

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Automatisierte Herstellung von virusantigen -
spezifischen T - Zellen und deren klinische Anwendung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Derbich, Alexander

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Tag der Disputation: 11.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Adenovirus	1
1.2.1	<i>Allgemeines</i>	1
1.2.2	<i>ADV bei Immunsuppression</i>	3
1.2.3	<i>Antivirale Therapie</i>	3
1.3	Cytomegalievirus	4
1.3.1	<i>Allgemeines</i>	4
1.3.2	<i>CMV bei Immunsuppression</i>	5
1.3.3	<i>Antivirale Therapie</i>	5
1.4	Epstein-Barr-Virus	6
1.4.1	<i>Allgemeines</i>	6
1.4.2	<i>EBV bei Immunsuppression</i>	7
1.4.3	<i>Antivirale Therapie</i>	7
1.5	Weitere therapeutischen Maßnahmen	8
1.6	Therapie mit virusspezifischen T-Zellen	8
1.7	Zielsetzung und Forschungshypothese	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Patientenkollektiv und Datenerfassung	11
2.2	Parameter und Erfassungszeiträume	14
2.3	Generierung von ADV-, CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen	16
2.3.1	<i>Prinzip</i>	16
2.3.2	<i>Anforderungen an Material</i>	16
2.3.3	<i>Reagenzien, vorgefertigte Lösungen und Verbrauchsmaterial</i>	16
2.3.4	<i>Geräte</i>	17
2.3.5	<i>Kontrollen</i>	17

2.3.6	<i>Verfahren/ Verfahrensweisen</i>	18
2.3.6.1	<i>Vorbereitung</i>	18
2.3.6.2	<i>Eingangsuntersuchung</i>	18
2.3.6.3	<i>Vorbereitung des Antigens</i>	19
2.3.6.4	<i>Aufbau des CliniMACS-Prodigy®</i>	19
2.3.6.5	<i>Automatische Separation am CliniMACS-Prodigy®</i>	19
2.3.6.6	<i>Probennahme und Ende der Separation</i>	20
2.3.6.7	<i>Direktabgabe als frische Zellen</i>	20
2.3.6.8	<i>Kryokonservierung zur Lagerung</i>	20
2.4	Statistische Auswertung	21
2.5	Graphische Darstellung	21
2.6	Ethikvotum	21
3.	Ergebnis	22
3.1	Allgemeines	22
3.2	Anreicherung und Separation der virusspezifischen T-Zellen	22
3.3	Virusinfektionen und Symptome	25
3.4	Wirkung der virusspezifischen T-Zellen	27
3.4.1	<i>Allgemeines</i>	27
3.4.2	<i>Wirkung auf klinische Symptome</i>	29
3.4.3	<i>Wirkung auf Viruslast</i>	29
3.4.4	<i>Korrelation Dosis - Wirkung</i>	32
3.4.5	<i>Toxizität der T-Zell-Therapie</i>	33
3.4.6	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>	34
3.5	Outcome	35
3.6	Analyse der einzelnen Patienten	37
4.	Diskussion	66
4.1	Allgemeines	66
4.2	Verlässliche Produktion mit dem <i>CliniMACS-Prodigy®</i>	66

4.3	Sicherheit der Therapie	67
4.4	Wirksamkeit der Therapie	68
4.5	Interpretation der Korrelationsanalyse	71
4.6	Gesamtsterblichkeit	71
4.7	Ausblick	74
4.7.1	<i>Verbesserung für künftige Studien</i>	74
4.7.2	<i>Anregungen für zukünftige Forschungsprojekte</i>	75
5.	Zusammenfassung	76
6.	Literaturverzeichnis	79
7.	Erklärung zum Eigenanteil	86
8.	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

-	Minus	GI	gastrointestinal
%	Prozent	GMP	Good Manufacturing Practise
(I)	römisch Eins	GvHD	Graft-versus-Host-Disease
(II)	römisch Zwei	HA	Humanalbumin
(III)	römisch Drei	HHV-6	humanes Herpesvirus-6
(IV)	römisch Vier	HLA	humanes Leukozyten Antigen
(V)	römisch Fünf	HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
+	Plus	INF-γ	Interferon Gamma
=	gleich	kg	Kilogramm
>	größer	KG	Körpergewicht
\leq	kleiner-gleich	KMT	Knochenmarkstransplantation
\geq	größer-gleich	l	Liter
®	registrierte Marke	log₁₀	Zehnerlogarithmus
°C	Grad Celsius	m²	Quadratmeter
μ l	Mikroliter	ml	Milliliter
Abb.	Abbildung	n	Anzahl
ADV	Adenovirus	NaCl	Natriumchlorid
ALL	akute lymphatische Leukämie	Nr.	Nummer
AML	akute myeloische Leukämie	p	Pearson-Korrelation
APC	antigen-präsentierende Zelle	PBMC	peripheral Blood mononuclear Cells
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	PBS	Phosphate buffered Saline
ATG	Antithymozytenglobulin	PC	Personal Computer
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Products	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
BKV	Betapolyomavirus	PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorder
bzw.	beziehungsweise	QC	Qualitätskontrolle
CCS	Cytokine Capture System	r	Korrelationskoeffizient
CD	Cluster of Differentiation	SOP	Standard Operating Procedure
CMV	Cytomegalievirus	Tab.	Tabelle
df	Degrees of Freedom	UAW	unerwartete Arzneimittelwirkung
DLI	Donor (Spender) Lymphozyten Infusion	Vol%	Volumenprozent
DNA	Desoxyribonukleinsäure	vTZ	virusspezifische T-Zellen
EBV	Ebstein-Barr-Virus	WFI	Water for Injection
ECIL	European Conference of Infections in Leukemia	x	Mal
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	z	Median
et al.	et alii/ et aliae/ et alia	z.B.	zum Beispiel
FACS	fluorescence-activated Cell Sorting		

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientencharakteristika	13
Tab. 2: Ergebnis der virusspezifischen T-Zell-Anreicherung	24
Tab. 3: Symptomverteilung nach Viren	26
Tab. 4: T-Zell-Dosis pro Patient	27
Tab. 5: Wertepaarung Korrelation Dosis - Wirkung	32
Tab. 6: Toxizität und Häufigkeit	33
Tab. 7: Auflistung Todesursachen (nicht virusassoziiert)	36
Tab. 8 - 32: Patientencharakteristika der Patienten Nr. 1 - 26	37 - 64

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Häufigkeit des Auftretens virusspezifischer Symptome 25 -5	-
Abb. 2: Virusspezifische Symptome und ihre Häufigkeit 26 -6 -
Abb. 3: Outcome der infizierten Patienten nach Therapie 28 -8	.. -
Abb. 4: Dauer bis zur Kuration Fehler! Textmarke nicht definiert. 8	
Abb. 5: Wirkung der Therapie auf klinische Symptome 29 -9	.. -
Abb. 6: Virusreduktion 2 Wochen nach Therapie 30 -30	.. -
Abb. 7: Virusreduktion innerhalb von 2 - 8 Wochen nach Therapie 31 -1	.. -
Abb. 8: Zeitpunkt des Therapieansprechen Fehler! Textmarke nicht definiert. 1	
Abb. 9: Akute GvHD nach T-Zell-Gabe 34 -4	.. -
Abb. 10: Patientenstatus 35 -5	.. -

Abb. 11: Überleben	.. -
35 -5	
Abb. 12: Überleben je nach Status der Virusinfektion	... -
36 -6	
Abb. 13 - 33: Zeitlicher Verlauf der Viruslasten, Virostatika und T-Zell-Gaben von Patient Nr. 1 - 26	. - 38 -8
- 65	

1. Einleitung

1.1 Einführung

In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen in der Forschung unternommen, um den Erfolg der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) zu steigern. Verbesserungen in den Bereichen Konditionierung, Immunsuppression und Transplantatmanipulationen trugen zu dieser Entwicklung bei. Nichtsdestotrotz bleiben, aufgrund der starken Immunsuppression, opportunistische Keime eine signifikante Ursache für Morbidität und Mortalität (Kim et al., 2018; Ross et al., 2011). Zu den wichtigsten Vertretern dieser Pathogene gehören das Adeno- (ADV), Cytomegalie- (CMV) und Epstein-Barr Virus (EBV). Wegen der fehlenden T-Zell-Immunität der HSZT-Patienten können diese Viren schwere Komplikationen verursachen (Sukdolak et al., 2013).

1.2 Adenovirus

1.2.1 Allgemeines

Bei ADV handelt es sich um ein humanpathogenes, unbehülltes DNA-Virus aus der Familie der *Adenoviridae*. Aufgrund ihres stabilen Kapsids und des Fehlens einer empfindlichen Hülle zeichnet es sich durch eine langanhaltende Infektiosität außerhalb eines Wirtes aus (Gerabek et al., 2007; Davison et al., 2003). Die erste Isolation von ADV erfolgte durch Rowe et al. (1953). Mittlerweile konnte das Virus in unterschiedliche Spezies (A bis G), sowie 67 Sero- und Genotypen unterteilt werden (Lion, 2014).

Eine Übertragung findet am häufigsten über Tröpfcheninfektion statt. Bis zum Krankheitsausbruch besteht eine kurze Inkubationszeit von zwei bis 14 Tagen, je nach Subtyp. Die höchste Inzidenz besteht innerhalb der ersten fünf Lebensjahre (Hong et al., 2001; Pacini et al., 1987). Die meisten Erkrankungsfälle werden im Winter oder zu Beginn des Frühlings gemeldet (MITCHELL et al., 2000).

Unter Berücksichtigung, dass heutzutage hoch-sensitive PCR-Methoden zum Goldstandard in der Diagnostik der ADV-Infektion geworden sind, empfiehlt die

European Conference of Infections in Leukemia (ECIL) folgende Definitionen (Matthes-Martin et al., 2012):

- Systemische Infektion/ Virämie: Positive ADV-PCR, Virusisolation oder Detektion des Antigens im peripheren Blut.
- Lokale Infektion: Positive ADV-PCR, Virusisolation oder Detektion des Antigens in Biopsiematerial oder in Körperflüssigkeiten außerhalb des peripheren Blutes.
- Bewiesene Erkrankung: ADV-Infektion und zusätzlich übereinstimmende Symptome mit histologischer Bestätigung von ADV in der dazugehörigen Region.

Für gewöhnlich verläuft die Krankheit mild und selbstlimitierend ab und löst in der Regel Infektionen der oberen und unteren Atemwege (ca. 5 – 15 % der Atemwegsinfektionen im Kindesalter), aber auch des Verdauungstrakts und der Konjunktiven aus (Lynch et al., 2011; Gardner, 1968). Dabei lösen bestimmte Subtypen der Spezies D und F typischerweise gastrointestinale (GI) Symptome aus. Spezies B, C und E sind typisch für Symptome des Respirationstrakts (Lion, 2014).

Die Ersterkrankung mit ADV führt zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern, die wahrscheinlich zu einer lebenslangen Immunität gegen den vorliegenden Typen führen. Langanhaltende asymptomatische Verläufe wurden beschrieben (Tebruegge and Curtis, 2012).

1.2.2 ADV bei Immunsuppression

Eine ADV-Infektion tritt bei Patienten nach HSZT mit einer Häufigkeit von 5 - 21 % auf und kann in bis zu 50 % der Fälle zum Tod führen (Chakrabarti et al., 2002). Risikofaktoren im Rahmen der HSZT sind allogene Transplantationen mit T-Zell-Depletion, die Behandlung mit dem CD52-Antikörper Alemtuzumab oder Antithymozytenglobulin, sowie die Therapie mit Immunsuppressiva aufgrund von *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) Grad 3 - 4. Zusätzlich begünstigen eine schwere Lymphopenie ($\leq 300/\mu\text{l}$) oder das Fehlen von virusspezifischen T-Zellen (vTZ) eine Rolle in der Krankheitsentstehung (Lion, 2014). Die Betroffenen entwickeln häufig schwerwiegendere Manifestationen der Infektion, wie hämorrhagische Enteritis oder Zystitis. Es kann aber auch zur Pneumonie, Enzephalitis oder Multiorganversagen kommen (Tebruegge and Curtis, 2012).

1.2.3 Antivirale Therapie

Das wirksamste Virostatikum mit der höchsten Evidenz gegen ADV ist das Cytosin-Nukleotid-Analogon Cidofovir (Yusuf et al., 2006; Ljungman et al., 2003; Lenaerts and Naesens, 2006). In vitro wurde eine Wirksamkeit gegen sämtliche ADV-Spezies und Typen festgestellt. Allerdings gibt es bedeutende Nachteile bei der Behandlung. Einerseits besteht eine geringe Bioverfügbarkeit, da $> 90\%$ des Arzneimittels unverändert renal eliminiert wird (Cundy, 1999). Andererseits besteht eine hohe Nephrotoxizität, die zu tubulären Nekrosen führen kann (Lindemans et al., 2010). Des Weiteren beschrieben Kinchington et al. (2002) das Vorliegen von Arzneimittelresistenzen.

Vielversprechend scheint Brincidofovir, das *Prodrug* von Cidofovir zu sein. Es zeigt im Vergleich eine höhere Bioverfügbarkeit und ein günstigeres toxisches Profil (Hiwarkar et al., 2017). Allerdings wird die therapeutische Breite durch das Auftreten von toxischer Diarrhoe und Darm-GvHD limitiert (Wingard, 2017).

1.3 Cytomegalievirus

1.3.1 Allgemeines

Das CMV ist ein humanpathogenes, behülltes DNA-Virus und gehört zu der Familie der *Herpesviridae* (Blut, 2010). Die Erstisolation erfolgte 1956 durch Rowe, Weller und Smith (Weller, 1970). CMV ist weltweit verbreitet mit einer Serumprävalenz zwischen 45 - 100 %, je nach Altersgruppe und sozioökonomischen Hintergrund (Cannon et al., 2010).

Die Übertragung findet meistens durch Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten (Sputum, Urin, Genitalsekret) oder transplazental statt (Gonçalves et al., 2018).

Ähnlich der Definition der ADV-Infektion definierten Ljungman et al. (2002) ist eine CMV-Infektion als Isolierung des CMV-Virus oder Nachweis von viralen Proteinen oder Nukleinsäuren (z.B. zwecks PCR) in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Urin) oder Gewebeproben.

Eine primäre CMV-Infektion ist eine, für den Immunkompetenten meistens asymptomatisch und selbstlimitierend verlaufende Erkrankung. Sie kann sich ähnlich einer sanft verlaufenden Mononukleose äußern, sich aber auch unspezifisch in vielen Organsystemen manifestieren (Eddleston et al., 1997). Auch von seltenen schweren Verläufen mit GI-, zentral-nervösen oder respiratorischen Symptomen wurde berichtet (Rafailidis et al., 2008). Nach dem akuten Krankheitsbeginn geht die CMV-Infektion in eine Latenzphase über und persistiert lebenslang in peripheren Monozyten und CD34+ myeloischen Vorläuferzellen des Patienten (Lancini et al., 2014).

1.3.2 CMV bei Immunsuppression

CMV ist einer der häufigsten opportunistischen Pathogene, die trotz durchgeführter präventiver Maßnahmen nach HSZT, mit einer signifikanten Erhöhung der Morbidität und Mortalität einhergeht (Ross et al., 2011). Zwischen 60 und 70 % der HSZT-Patienten erkranken an einer CMV-Infektion (Hebart and Einsele, 2004). Dabei kann die Infektion durch Neuerkrankung, aber auch durch Reaktivierung des latenten Virus entstehen. Risikofaktoren dafür können der Serostatus von Spender und Empfänger, die immunsuppressive Therapie und eine GvHD sein (de Jong et al., 1998). Die häufigsten CMV-Manifestationen findet man im GI-Trakt und der Lunge. Die CMV-Pneumonie, die eine Inzidenz bei HSZT-Patienten von 5 - 8 % aufweist und ein Drittel aller Erkrankungen ausmacht, ist mit einer Sterblichkeit von 30 - 50 % eine gefürchtete Komplikation (Travi and Pergam, 2014).

1.3.3 Antivirale Therapie

Das Mittel erster Wahl ist das Guanin-Nukleosidanalogen Ganciclovir. Allerdings kann es laut Goodrich et al. (1991) zu Nebenwirkungen, wie GI-Störungen, Myelo- und Lebertoxizität, führen. Außerdem können Veränderungen des Blutbildes das Risiko für opportunistische Bakterien- und Pilzinfektionen erhöhen (Salzberger et al., 1997). Über Resistenzen berichteten Smith et al. (1997).

Sein oral einnehmbares *Prodrug* Valganciclovir zeigt ein vergleichbares Wirkung-Nebenwirkungsprofil.

Das Pyrophosphatanalogon Foscarnet und das bereits erwähnte Cidofovir werden aufgrund möglicher schwerer Nebenwirkungen, wie z.B. Nephrotoxizität und Elektrolytverschiebungen, als Mittel zweiter Wahl angesehen und bei Ganciclovir-Resistenz oder Hämatotoxizität eingesetzt (Cho et al., 2019) (Podolski, 2014).

Zur CMV-Prophylaxe werden Ganciclovir und Letermovir, ein CMV-DNA-Terminasekomplex-Inhibitor, favorisiert (Chen et al., 2018).

1.4 Epstein-Barr-Virus

1.4.1 Allgemeines

Das EBV ist ein humanpathogenes, behülltes DNA-Virus und gehört zu der Familie der *Herpesviridae*. Entdeckt wurde es 1964 von Tony Epstein und Yvonne Barr. EBV ist in der Lage malignes B-Zell-Wachstum induzieren zu können und ist somit das erst entdeckte Onkovirus (Epstein et al., 1965; Icheva et al., 2013; Naseem et al., 2018). Epidemiologischen Studien zufolge sind mehr als 90 % der Weltbevölkerung EBV-seropositiv (Smatti et al., 2018).

Der Hauptübertragungsweg findet über die Mundhöhle durch infektiösen Speichel per Tröpfcheninfektion statt (Guidry et al., 2018).

Wie zuvor genannt ist auch in der Diagnostik von EBV-Infektionen die PCR essentiell (Allen et al., 2009).

Eine Infektion verläuft bei Kindern meist asymptomatisch ab. Im Gegensatz dazu führt sie bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen häufig zur infektiösen Mononukleose mit Symptomen wie Fieber, Pharyngitis, Adenopathie, Hepatosplenomegalie und Fatigue. Obwohl diese meist innerhalb von zwei bis vier Wochen abklingt, sind auch schwerere Verläufe dokumentiert (Green and Michaels, 2013; Rea et al., 2001). Nach der Primärinfektion persistieren die Viren lebenslang in B-Gedächtniszellen, wo sie aufgrund ihrer geringen Immunogenität vom Immunsystem unberührt bleiben (Worth et al., 2016).

1.4.2 EBV bei Immunsuppression

Eine EBV-Infektion kommt bei 10 - 26 % der HSZT-Patienten vor (Lucas et al., 1998). Wie auch in Immunkompetenten kann eine EBV-Infektion asymptomatisch oder durch eine infektiöse Mononukleose imponieren (Nowalk and Green, 2016). Jedoch ist EBV bei immungeschwächten Personen mit verschiedenen Krebsarten assoziiert, einschließlich dem Burkitt-, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom und Tumoren der glatten Muskulatur (Cohen et al., 2016). Die wichtigste Manifestation ist die *posttransplant lymphoproliferative disorder* (PTLD), die zur Entstehung verschiedener lymphomartiger Erkrankungen führen kann (Allen and Preiksaitis, 2013). Das Erkrankungsrisiko variiert je nach Transplantationsart, Intensität der Immunsuppression und der Anzahl vorhandener EBV-spezifischen T-Zellen zwischen 10 und 30 % (Nowalk and Green, 2016).

1.4.3 Antivirale Therapie

Sowohl die EBV-Infektion als auch für die PTLD lassen sich aufgrund schlechter Wirksamkeit schwer mit den bekannten Virostatika therapieren (Heslop, 2009). Daher gehört die Reduktion der Immunsuppression zum Mittel der Wahl in der Behandlung des Virus (Green and Michaels, 2013). Als Mittel zweiter Wahl stehen die Behandlung mit Antikörpern und Chemotherapie zur Verfügung, die Gegenstand aktueller Forschung sind (Gross et al., 2012). Die Monotherapie mit Rituximab, einem monoklonalen CD20-Antikörper wird kontrovers diskutiert. So zeigt sich in der akuten Therapie eine vielversprechende Wirksamkeit (88 % komplette Remission nach vier Wochen), jedoch nur eine unbefriedigende nachhaltige Wirkung (57 % Virus-Progression nach zwölf Monaten) (Choquet et al., 2007; Peng et al., 2014).

1.5 Weitere therapeutische Maßnahmen

Zur Behandlung einer ADV-, CMV-, und EBV-Infektion können zusätzlich Donor Lymphozyten Infusionen (DLI) verwendet werden. Jedoch bergen sie die Gefahr eine GvHD zu verursachen und sind keine therapeutische Option bei der Behandlung von Hochrisiko-Patienten mit seronegativen Spender (Sukdolak et al., 2013).

1.6 Therapie mit virusspezifischen T-Zellen

Wie zuvor beschrieben birgt die Therapie mit antiviralen Pharmazeutika einige Probleme. Zusätzlich ist bekannt, dass die Rekonstitution der T-Zell-Immunität Virusinfektionen in Schach halten kann und vor diesen schützt. Dies führte zur Entwicklung einer adoptiven Immuntherapie mit vTZ. Dabei ist es nicht nur möglich vTZ zu produzieren, die monospezifisch wirken (z.B. gegen ADV, CMV oder EBV). Auch die Anwendung von multispezifischen T-Zellen, die zugleich gegen mehrere Viren wirken, wurde bereits erprobt (Boeckh and Nichols, 2004; Feuchtinger et al., 2006; Gerdemann et al., 2011; Feucht et al., 2013; Saglio et al., 2014). Diese vTZ erleichtern die Lyse infizierter Zellen durch einen perforin-abhängigen Mechanismus (Heemskerk et al., 2006).

Im Moment sind diverse Produktionstechniken dieser vTZ bekannt.

Eine Möglichkeit besteht darin, bereits vorhandene vTZ von seropositiven Spendern durch die Bindung an magnetisierte HLA-Peptid Tetramere zu separieren und anschließend dem erkrankten Patienten zu verabreichen (Keenan et al., 2001; Cobbold et al., 2005).

In einer andere Methode werden *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) mit zuvor genetisch modifizierten antigen-präsentierenden Zellen (APC) in Kontakt gebracht, um vTZ-Reihen zu erschaffen (Leen et al., 2006; Gerdemann et al., 2009).

Die beiden genannten Techniken sind jedoch auf einen seropositiven Spender angewiesen. Die Verwendung des *G-Rex®-Device* ermöglichte es erstmals naive T-Zellen aus Nabelschnurrblut oder seronegativen Spendern zu verwenden (Vera et al., 2010).

Die Grundlage in dieser wissenschaftlichen Arbeit ist eine weitere Produktionstechnik, die ebenfalls auf das Vorhandensein eines seropositiven Spenders angewiesen ist. Dabei werden die Spender-Lymphozyten mit Virusantigen-Fragmenten zusammengeführt. Die vTZ, die daraufhin das Zytokin Interferon- γ (INF- γ) ausschütten, können durch Bindung an magnetisierte Antikörper (*magnetic beads*) separiert werden (Peggs et al., 2011).

Durch die Verwendung des *CliniMACS-Prodigy*® der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) ist es möglich vTZ vollautomatisiert mit der *Cytokine Capture System* -Technik (CCS) zu produzieren (Kim et al., 2018; Kállay et al., 2018).

1.7 Zielsetzung und Forschungshypothese

Virusinfektionen nach HSZT sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Die pharmazeutischen Virostatika zeigen nur bedingt Erfolge in der Therapie. Zusätzlich können sie zu schweren unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen.

Dem gegenüber steht die Immuntherapie mit vTZ. Die aktuelle Studienlage zeigt eine Vielzahl von Forschungen, die eine gute Wirksamkeit bei fehlender/minimaler Toxizität gegen ADV-, CMV- und EBV-Infektionen versprechen.

Ziel dieser retrospektiven Studie ist es, Aussagen über die Effektivität der Anreicherung und Separation von vTZ mit Hilfe des *CliniMACS-Prodigy*® zu machen. Die Ermittlung der *Recovery* und Reinheit der generierten vTZ soll als Maß für die Effektivität dienen.

Ein weiteres Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, durch Zuhilfenahme von Viruslastverläufen und durch das Monitoring von virusspezifischen Symptomen, Rückschlüsse auf die Wirkung der vTZ-Therapie und das Outcome der behandelten Patienten vorzunehmen. Zusätzlich sollen toxische und GvHD-Reaktionen während des Therapiezeitraums beobachtet und erfasst werden.

Durch eine Korrelationsanalyse soll geprüft werden, ob das Überleben der Kohorte signifikant mit der Kontrolle der Virusinfektion zusammenhängt.

Aus dem bekannten und genannten Vorwissen ergeben sich folgende Forschungshypothesen, die durch diese wissenschaftliche Arbeit überprüft werden:

- Durch die Verwendung des *CliniMACS-Prodigy*® (Miltenyi Biotec) ist es möglich ADV-, CMV-, EBV- und multispezifische T-Zellen verlässlich zu produzieren und damit schnell für die Therapie verfügbar zu machen
- Die Therapie mit vTZ ist eine effektive Therapie, um eine ADV-, CMV- und/oder EBV-Infektion unter Kontrolle zu bekommen und ihre Symptome zu lindern
- Die schnelle Kontrolle über die Virusinfektion beeinflusst das Outcome der Patienten
- Die Therapie mit vTZ ist in der Anwendung sicher und führt nur in seltenen Fällen zu einer toxischen Reaktion oder GvHD
- Die verabreichte vTZ-Dosis ist unabhängig von einer Wirkung der Therapie

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Datenerfassung

Im Zeitraum vom 01. Januar 2015 bis zum 31. Dezember 2016 wurden für 31 Kinder und Erwachsene deutschlandweit vTZ im KMT-Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen durch den *CliniMACS-Prodigy*® automatisiert hergestellt. Insgesamt wurden 21 Patienten mit den generierten Zellen in mehreren Kliniken mit dem Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie behandelt. Involvierte Kliniken waren das Universitätsklinikum Aachen (ein Patient), die Charité Berlin (zwei Patienten), das Universitätsklinikum Düsseldorf (ein Patient), das Universitätsklinikum Erlangen (ein Patient), das Universitätsklinikum Gießen und Marburg (vier Patienten), das Universitätsklinikum Jena (ein Patient), das Klinikum der Universität München (zwei Patienten), das Universitätsklinikum Regensburg (zwei Patienten), das Universitätsklinikum Tübingen (sechs Patienten) und das Universitätsklinikum Ulm (ein Patient). Im Zeitraum vom 01. Januar bis 31. Dezember 2017 wurden für weitere sechs Patienten des Universitätsklinikums Tübingen und der Charité Berlin vTZ produziert. Insgesamt fünf Patienten erhielten die Therapie (Universitätsklinikum Tübingen: zwei Patienten; Charité Berlin: drei Patienten).

Für die Behandlung kamen lediglich Patienten in Betracht, die im Verlauf einer Stammzelltransplantation an einer Virusinfektion durch ADV und/ oder CMV und/ oder EBV erkrankten. Als diagnostischer Parameter dienten die, per Echtzeit-PCR nachgewiesenen, DNA-Kopien pro Milliliter im Vollblut, Plasma, Bronchialsekret und Rachenabstrich. Ebenso wurden qualitative Virusnachweise im Stuhl mit einbezogen.

Von der Studie ausgeschlossen wurden 16 Patienten. Bei sieben Probanden fand keine Therapie statt, da die vTZ kryokonserviert wurden. Von fünf Patienten konnten keine oder zu wenig Daten zur Evaluation gesammelt werden. Zwei Patienten verstarben kurz vor vTZ-Therapie und ein Patient am Folgetag der Therapie, sodass keine verwertbaren Daten gesammelt werden konnten. Ein Patient kurierte die Virusinfektion vor vTZ-Gabe.

Zur Erhebung der virologischen Daten wurde für das Tübinger Kollektiv das Laborinformationssystem Swisslab® benutzt, sowie digitalisierte Arztbriefe über das SAP- und CareView-System, um die Datenerhebung klinischer Parameter durchzuführen. Die Datenerhebung der restlichen Patienten erfolgte in den jeweiligen Kliniken. Im Vorfeld wurde eine Genehmigung zur Akteneinsicht eingeholt.

Das gesamte Patientenkollektiv setzte sich aus 15 männlichen und elf weiblichen Patienten im Alter von acht Monaten und 74 Jahren (Altersmedian $z = 15.9$) zusammen. Die Hauptdiagnosen, und somit Indikationen zur Stammzelltransplantation, sind in der Tabelle 1 erfasst. Bei 15 Patienten lag ein haploidentischer Familienspender, bei elf Patienten ein HLA-identischer Fremdspender vor.

Zur Konditionierung vor der Stammzelltransplantation wurden den Patienten eine Kombination aus diversen Zytostatika verabreicht bzw. eine Bestrahlung durchgeführt.

Um eine GvHD vorzubeugen wurden verschiedene Immunsuppressiva miteinander kombiniert gegeben, die ebenfalls der Tabelle 1 zu entnehmen sind. Patienten mit einer GvHD \geq Stufe 2 wurden im Vorfeld von der Therapie ausgeschlossen.

Bei den Patienten lagen neun ADV-Infektionen, neun CMV-Infektionen und vier EBV-Infektionen vor; parallel aufgetretene Infektionen kamen in vier Fällen vor.

Monospezifische T-Zellen (nur gegen ADV, CMV oder EBV) wurden 20 Mal verabreicht, multispezifische T-Zellen gegen alle drei Viren wurden drei Patienten gegeben und bei drei Patienten kamen vTZ gegen zwei Viren zum Einsatz.

Tab. 1: Patientencharakteristika

Merkmal 1	Merkmal 2	Anzahl
Geschlecht	männlich	15
	weiblich	11
Alter in Jahren	Altersmedian	15.9
	Spannweite	0.67–74.92
Hauptdiagnose	ALL	6
	AML	5
	Neuroblastom	2
	Myelodysplastisches Syndrom	2
	Sichelzellanämie	2
	Schwerer kombinierter Immundefekt	1
	Hämophagozytische Lymphohistiozytose	2
	Konnataler Knochenmarksversagen	1
	EBV assoziierte PTLD	1
	Primär metastasiertes Nasopharynxkarzinom	1
	Transplantation	Familienspender haploidentisch
Fremdspender HLA-identisch		11
Konditionierung	Total Body Irradiation	6
	Fludarabin	21
	Thiotepa	15
	Melphalan	11
	Treosulfan	5
	Cytarabin	1
	Amsacrine	1
	Busulfan	2
	Etoposidphosphat	1
	Rituximab	1
GvHD-Prophylaxe	ATG Fresenius S®	18
	Alemtuzumab	2
	Methotrexat	12
	Glykokortikoide	13
	Mycophenolat Mofetil	10
	Tacrolimus	1
	CiclosporinA	16
Infektionen	ADV	9
	CMV	9
	EBV	4
	ADV & CMV	2
	CMV & EBV	2
vTZ	Monospezifisch	20
	Multispezifisch	3
	ADV- & EBV- spezifisch	1
	CMV- & EBV- spezifisch	2

2.2 Parameter und Erfassungszeiträume

Zur Erfassung der Viruslast wurden Stichtage wie folgt definiert:

- der gesamte Virusverlauf ab dem Tag der Gabe der vTZ bis zur ersten negativen PCR-Bestimmung
- jedes weitere positive PCR- oder qualitativ positiv detektierte Messergebnis bis zum letzten *follow-up* oder Todeszeitpunkt

Eine Viruslastreduktion um eine Zehnerpotenz innerhalb von zwei bis acht Wochen wurde als ein schnelles Ansprechen der vTZ erachtet. Des Weiteren bedeutete ein erneutes positives Viruslast-Messergebnis nach bereits negativer Viruslastbestimmung (Wert= 0) ein Rezidiv der Virusinfektion.

Qualitative virusspezifische klinische Parameter, wie zum Beispiel Komplikationen und Symptome, wurden über den gesamten Zeitraum der Virusinfektion für jeden einzelnen Patienten beobachtet. Dabei wurde eine schnelle Besserung als eine Verbesserung der Symptome innerhalb von vier bis acht Wochen und eine schleppende Besserung als eine länger dauernde Verbesserung definiert.

Biometrische Daten:

- Alter
- Geschlecht
- Hauptdiagnose
- Art der Virusinfektion
- Transplantationsdatum
- Transplantationsart

Medikamente:

- vTZ
- Virostatika
- Immunsuppressiva

Viruspezifische klinische Symptome:

- Diarrhoe im Rahmen einer Enteritis
- Übelkeit/Erbrechen
- Hepatitis
- Akutes Nierenversagen
- Enzephalitis
- Pneumonie
- Dysphagie

Laborparameter:

- Viruslast (ADV-, CMV-, EBV- DNA-Kopien/ml)

Komplikationen:

- Toxizität der vTZ
- Verlegung auf Intensivstation
- Invasive Beatmung
- GvHD
- Rezidiv der Virusinfektion
- Tod durch Virusinfektion

2.3 Generierung von ADV-, CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen

2.3.1 Prinzip

Die Generierung der vTZ fand im Stammzelllabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen statt. T-Zellen eines Stammzellspenders werden mit Virusantigenen stimuliert und daraufhin freigesetztes INF- γ an einen bispezifischen Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden. Anschliessend werden die Zellen mit Antikörperbeladenen Magnetpartikeln markiert und mit dem *CliniMACS-Prodigy*® isoliert.

2.3.2 Anforderungen an Materialien

Aphereseprodukt mit geeignetem Antikoagulant (Heparin oder ACD) gewonnen in einer Herstellungsstätte mit Herstellungserlaubnis.

2.3.3 Reagenzien, vorgefertigte Lösungen und Verbrauchsmaterial

Hilfsstoffe und Reagenzien:

- INF- γ CCS Enrichment System, bestehend aus INF- γ Catch-Reagent und Microbeads (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)
- Für ADV: MACS GMP Peptivator ADV5 - Hexon synthetisches Peptid (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)
- Für CMV: MACS GMP Peptivator CMV pp65, synthetisches Peptid (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Für EBV: MACS GMP Peptivator EBNA-1, synthetisches Peptid, (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MACS GMP Peptivator LMP2a, synthetisches Peptid, (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MACS GMP Peptivator BZLF1-1, synthetisches Peptid, (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MACS GMP Peptivator Consensus, synthetisches Peptid, (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- TexMacs Medium 2 I, GMP grade (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- CliniMACS PBS/EDTA Buffer 3 I Beutel (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)

- Humanalbumin 20 % zur Anwendung am Menschen (Humanalbumin 20 % Fa. Behring, Albumin 20 % Fa. Biotest)
- physiologische 0,9 % NaCl Lösung zur Infusion 1000 ml (Fa. Fresenius)
- Aqua ad inject. 10 ml (Fa. Braun)

Geräte und Verbrauchsmaterial:

- Prodigy Tubing Set TS 500 (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)
- Transferbeutel 1000ml, (Nexell/Baxter, Unterschleissheim)
- Sampling Site Coupler EMC1401 (Baxter, Unterschleissheim)
- Blutkulturflaschen BD BACTEC PEDS PLUS/F CE und BD BACTEC PLUS Anaerobic/F
- Kunststoffkanüle Kwill Filling Tube CE (GP supplies, Großbritannien)
- Gel-Kühlkissen (Coolpacks), va-Q-gel, Würzburg
- 50 ml CryoMACS Beutel (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)
- 1 ml, 20 ml, 50 ml-Spritzen mit luer/lock Verbindung
- 50 ml Falcon tubes (Fa. BD), bei Kryokonservierung

2.3.4 Geräte

- *CliniMACS-Prodigy®* (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MACS Quant Analyser (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Schlauchschweißgerät Terumo TSCD SC201AH CE (Terumo, Leuven, Belgium)
- Waage BP 1200 CE (Sartorius, Göttingen)
- Hämocytometer ADVIA

2.3.5 Kontrollen

- FACS-Analyse des Endproduktes (Positiv und Negativfraktion) und der Oriprobe: CD3⁺INF γ ⁺, CD4⁺INF γ ⁺, CD8⁺INF γ ⁺, CD56⁺, CD19⁺
- Vitalität des Endproduktes
- Zellzahl des Ausgangsmaterials und des Endproduktes
- Sterilprobe des Apherisates und des Endproduktes

2.3.6 Verfahren /Verfahrensweisen

2.3.6.1 Vorbereitung

Ein 3 Liter Beutel PBS-EDTA Puffer wird mit 75 ml HA 20 % versetzt, entspricht einer 0,4 % PBS/ HA Pufferlösung. Das ermittelte Verdünnungsvolumen für die Leukapherese des PBS/ HA Puffers wird in eine 50er Spritze übernommen. 30 ml 20 % HA wird in eine 50 ml Spritze aufgezogen. Beide Spritzen werden im Kühlschrank gelagert. Die Virusantigene werden wie in Punkt 2.1.8 beschrieben resuspendiert.

2.3.6.2 Eingangsuntersuchung

Den Beutel untersuchen auf Unversehrtheit, vollständige Beschriftung, Einhaltung der Kühlkette, Prüfen des ACDA Gehalt.

- 0,5 ml für Zellzahlbestimmung entnehmen und Zellzahl am ADVIA bestimmen, Kontrollen von ADVIA prüfen,
- Sterilprobe entnehmen (1 Vol%),
- 3 ml für intrazelluläres FACS entnehmen, falls Vorbestimmung noch nicht erfolgt
- 2 ml LPH für zu kryokonservierende Rückstellproben entnehmen
- aus der Leukapherese werden 1×10^9 Zellen entnommen und mit PBS-EDTA-HA-Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

2.3.6.3 Vorbereiten des Antigens

ADV, CMV, EBV: GMP-Grade Material wird direkt nach Rekonstitution eingesetzt.

Rekonstituieren:

ADV, CMV, und die EBV Antigene liegen als lyophilisierte Peptivatoren vor. Die gewünschte Antigenflasche und eine Flasche WFI 10 ml werden in der Werkbank sprühdesinfiziert. 8 ml WFI wird mit wenig Luft in eine 20 ml Spritze mit langer Kanüle aufgenommen. Die 8 ml WFI werden mit der Spritze in die Flasche mit

dem Antigen gegeben, indem der sprühdesinfizierte Gummistopfen durchstochen wird. Die Flasche wird vorsichtig geschwenkt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hat. Der Stempel der Spritze liegt dabei locker in der Hand, damit, wenn nötig, ein Druckausgleich zwischen Spritze und Gläschen stattfinden kann. Dann wird der Inhalt vollständig in die Spritze aufgenommen, dabei wird auf den Druckausgleich geachtet. Die Antigenlösung wird über den Filter in den Antigenbeutel eingebracht, wenn der *Prodigy* dies angibt.

2.3.6.4 Aufbau des *CliniMACS-Prodigy*®

Vor dem Gebrauch sicherstellen, dass eine externe Batterie angeschlossen ist. Der *CliniMACS-Prodigy*® wird zu zweit gemäß den Vorschriften des Gerätes aufgebaut.

Programm: CCS INF- γ Enrichment.

Es wird das Herstellungsprotokoll HP20.0x ausgefüllt.

Vor dem Priming wird zwingend ein integrity test durchgeführt, es werden alle Verschlüsse kontrolliert und alle Ventile überprüft.

Ein 1 l Beutel wird an den Wastebag gespiked. Nach dem Priming werden 30 ml HA 20 % in den Elutionspuffer gegeben, die 50 ml Zellsuspension in den Applikationsbeutel und der Peptivator in den Antigenbeutel eingebracht. Das CCS Enrichment System wird an die vorgesehenen Adapter gesteckt, dabei die Gläschen senkrecht halten.

Die Zeitangabe für das Ende des Prodigylaufs wird angegeben, wobei die gespeicherte Zeit im *Prodigy* beachtet werden muss. Es ist notwendig 1,5 Stunden vor Ende im Reinraum zu sein, um die QC Probe abzunehmen und in den Kühlschrank zu legen.

2.3.6.5 Automatische Separation am *CliniMACS Prodigy*®

Der *CliniMACS-Prodigy*® arbeitet selbstständig über Nacht.

2.3.6.6 Probennahme und Ende der Separation

Am nächsten Morgen wird mindestens 1 Stunde 20 Minuten vor dem Prozessende die Oriprobe eluiert. Zu diesem Zeitpunkt muss ein Mitarbeiter vor Ort sein, um die Probe in Empfang zu nehmen und in den Kühlschrank zu legen. Nach Ende des Laufs werden der Targetzellbeutel und der Beutel der Negativfraktion abgeschweißt. Vor Probennahme werden die Beutel gekühlt ausgeschleust und gewogen. Nach Probennahme verbleiben die Beutel bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 2 - 8 °C.

Probennahme:

Targetzellen: ca. 700 µl für Analyse, ca. 100 µl für Mikrobiologie

Orifraktion und Negativfraktion: je 1 ml für Analyse

Die Analysen werden mit dem MACS Quant Analyzer durchgeführt. Die Ergebnisse werden im PC verrechnet.

2.3.6.7 Direktabgabe als frische Zellen

Die Zellen werden direkt vom Beutel in eine 20 ml Spritze übernommen. Das Volumen wird über das Gewicht ermittelt, Bruttobeutelgewicht minus Leergewicht Beutel. Es wird ein Aliquot für die Mikrobiologie entnommen und mit 10 ml 0.9 % NaCl-Lösung in zwei Blutkulturflaschen verteilt.

2.3.6.8 Kryokonservierung zur Lagerung

Sollen nach Anordnung des Arztes Zellen kryokonserviert werden, wird das dafür vorgesehene Volumen in ein 50er Falcon überführt und bei Bedarf mit Programm 10 (300 g, 4 °C, 15 Min) zentrifugiert. Der Überstand wird steril abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wird in das nötige Volumen NaCl/ HA aufgenommen, pro Pilot werden 0,9 ml Zellsuspension berechnet. Nach SOP HS005.xx „Kryokonservierung von Zellen in Kryoröhrchen“ werden die Zellen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium gemischt, in die vorgekühlten Pilots verteilt und mit dem Qualifreeze Verfahren eingefroren. Es wird das Herstellprotokoll HP008. ausgefüllt. Ein Aliquot von 1 Vol% verbleibt im Falcon und wird zur Sterilkontrolle nach SOP HY007 “ Sterilprobennahme von Zellen für Therapie“ in zwei Blutkulturflaschen verteilt. Hierbei wird der sterile Überstand verwendet.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten fand in deskriptiver Form statt. Die Gesamtheit der ermittelten Daten wurde in einer Datenbank des Programms *Microsoft Excel 2019*® tabellarisch erfasst. Hierbei wurden Häufigkeiten, Streuungen (Range) und Mediane gebildet. Durch eine Korrelationsanalyse nach *Pearson* wurde überprüft, ob das Outcome der Kohorte von der Kontrolle des Virus signifikant abhängt.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die verabreichte vTZ-Dosis signifikant mit einer Wirkung korreliert. Da einigen Patienten mehrere vTZ-Dosen verabreicht wurden, wurden zur Gruppenbildung in der Korrelationsanalyse jeweils die verabreichten Erstdosen berücksichtigt.

Die Analyse wurde mit dem Programm *Graphpad PRISM*® und *Microsoft Excel 2019*® durchgeführt.

2.5 Graphische Darstellung

Um den therapeutischen Effekt der vTZ und eine eventuelle Einflussnahme verschiedener Virostatika zu beschreiben, wurden Diagramme mit den Programmen *Microsoft Excel 2019*® und *Graphpad PRISM*® erstellt. Hierdurch konnten zeitliche Verläufe der Viruslast anhand der ADV-, CMV- und/ oder EBV-DNA-Kopien in diversen Medien dargestellt werden.

Ebenso wurden u.a. Häufigkeiten von Symptomen und Komplikationen graphisch abgebildet.

2.6 Ethikvotum

Die Arbeit an dieser Studie wurde im Vorfeld durch ein Ethikvotum der Ethikkommission Tübingen bewilligt (Aktenzeichen: 044/2017BO2).

3. Ergebnis

3.1 Allgemeines

In den folgenden Kapiteln wird zunächst das Ergebnis der Anreicherung der vTZ mit dem *CliniMACS-Prodigy*® beschrieben. Im Anschluss folgen die Untersuchungsergebnisse der 26 Patienten in Hinblick auf ihre Viruserkrankungen.

3.2 Anreicherung und Separation der virusspezifischen T-Zellen

Im Folgenden zeigt Tab. 2 das Ergebnis der Generierung der ADV-, CMV-, sowie EBV-spezifischen T-Zellen mit dem *CliniMACS-Prodigy*®. Die einzelnen Ergebnisse, sowie die verabreichte Dosis der vTZ sind jeweils den Studienteilnehmern („Patienten Nummer 1-26“) zugeordnet.

Mehrmalige Anreicherungen von vTZ sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet.

Die beiden Tabellenhälften zeigen den prozentualen und Anteil der vTZ ($CD3^+$ & $IFN\gamma^+$ - Zellen/ kg), je nach Stimulation mit virusspezifischen Antigenen (Originalprobe) und je nach der Separation von den restlichen Leukozyten (Positiv Fraktion).

Als Ausgangswert der Originalprobe dienten jeweils 1×10^9 Leukozyten.

Die Reinheit stellt den tatsächlichen Anteil der vTZ in der Positiv Fraktion dar.

Die *Recovery* ist der Quotient der vTZ nach und vor der Separation und spiegelt die Effektivität des Separationsvorgangs wider.

In der Originalprobe lagen zwischen $4,9 \times 10^3$ / kg und $5.255,1 \times 10^3$ / kg vTZ vor, mit einem Median von $z= 385,9 \times 10^3$ / kg. Das entsprach einem mittleren Anteil von $z= 0,23 \%$ (Range: 0,02 bis 0,94 %) aller $CD3^+$ - Zellen in der Originalprobe. Nach Separation der vTZ waren zwischen $59,4 \times 10^3$ und 2.948×10^3 / kg Zellen ($z= 375,6 \times 10^3$ / kg) in der Positiv Fraktion mit einer Reinheit zwischen 38,45 und 94 % ($z= 77,01 \%$).

Das entsprach einer durchschnittlichen *Recovery* von 81 % (Range: 4 bis >100 %).

Die genaue Datenerfassung war bei acht Anreicherungen aufgrund technischer Probleme nicht möglich. Diese sind als solche gekennzeichnet. Eine erfolgreiche vTZ -Produktion konnte trotz dessen bei jeder Anreicherung gewährleistet werden.

Recovery-Werte > 100 % kamen durch technische Schwierigkeiten zustande und wurden in der Interpretation mit dem Wert 100 % gleichgesetzt.

Tab. 2: Ergebnis der virusspezifischen T-Zell-Anreicherung

Patienten- nummer	Originalprobe nach der <i>Stimulation</i> , vor <i>Separation</i>		Positiv Fraktion nach der <i>Separation</i>			
	Frequenz INF- γ^+ der CD3 ⁺ - Zellen	Zellzahl CD3 ⁺ & INF- γ^+	Zellzahl CD3 ⁺ & INF- γ^+	Rein- heit	Reco- very	verabreichte vTZ- Dosis
	[%]	[x 10 ³ / kg]	[x 10 ³ / kg]	[%]	[%]	[Zellzahl/ kg]
1	0.07	739,7	885,6	90.3	>100	8.240
2	0.02	4,9	208,7	57.8	>100	9.440
3	0.3	5.210,6	214	79	4	2.269
4	<i>technisches Problem</i>					je 3.040
5	0.4	2.114,9	1.045,5	87.5	49	13.093
6	<i>technisches Problem</i>					13.000
7	0.3	2.156,6	160	60.06	78	13.000
8	0.3	158,7	557	85	>100	14.247
9	0.4	5.255,1	1.144,7	85	22	22.310
10	<i>technisches Problem</i>					4.931
11)	<i>technisches Problem</i>					4.328
12	0.12	55,1	183,5	38.45	>100	21.960
13	0.11	283,6	66,8	74	24	1.850
14 (I)	<i>technisches Problem</i>					1.702
14 (II)	<i>technisches Problem</i>					1.809
15	0.07	54,5	80,71	75.5	>100	1.020
16	0.12	385,9	331,4	77	86	38.761
17	0.9	3.163,4	1.955,8	94	62	10.000
18	<i>technisches Problem</i>					5.000
19	0.94	2.051,8	1.686,1	90.7	82	24.710
20	0.73	2.314,6	2.948	89	>100	22.600
21	<i>technisches Problem</i>					800
22	0.14	778,1	862,7	78.1	>100	je 25.540
23	0.35	199,3	625,8	89.7	>100	6.730
24	0.4	2.396,9	2.227,9	84.9	93	34.360
25	0.84	3.839,0	2.657,5	49.8	69	50.000
26 (I)	0.09	66,3	69,7	62.8	>100	9.554
26 (II)	0.07	20,8	67,6	63.1	>100	3.958
26 (III)	0.11	31,5	59,4	65.7	>100	3.960
26 (IV)	0.1	60,1	72,1	63.5	>100	7.722
26 (V)	0.23	170,9	375,6	77.01	>100	7.733

3.3 Virusinfektionen und Symptome

Im Patientenkollektiv wurden 15 von 23 Probanden (65 %) mit spezifischen Symptomen für eine ADV-/ CMV-/ und/ oder EBV-Infektion beobachtet. Acht Patienten (35 %) waren asymptomatisch. Bei drei Untersuchten wurden keine verwertbaren Angaben gefunden (s. Abb.1).

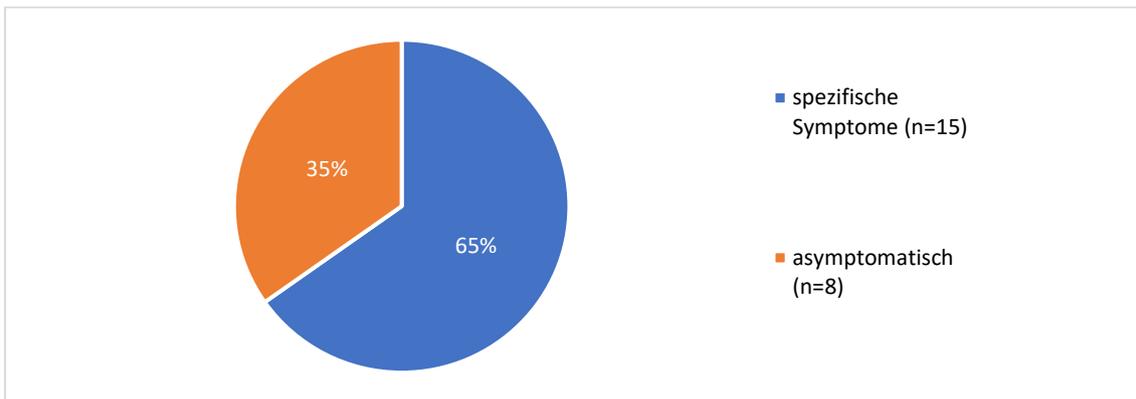


Abb. 1: Häufigkeit des Auftretens virusspezifischer Symptome vor T-Zell-Therapie

Im Folgenden werden die insgesamt 24 Fälle von virusspezifischen Symptomen aufgezählt und in Abb. 2 illustriert:

- sieben Fälle (29 %) von Pneumonie
- sechs Fälle (25 %) von Übelkeit/ Erbrechen
- Fünf Fälle (21 %) von Diarrhoe im Rahmen einer Enteritis
- Drei Fälle (13 %) von Hepatitis
- Je ein Fall (je 4%) von Dysphagie, Enzephalitis und akutem Nierenversagen

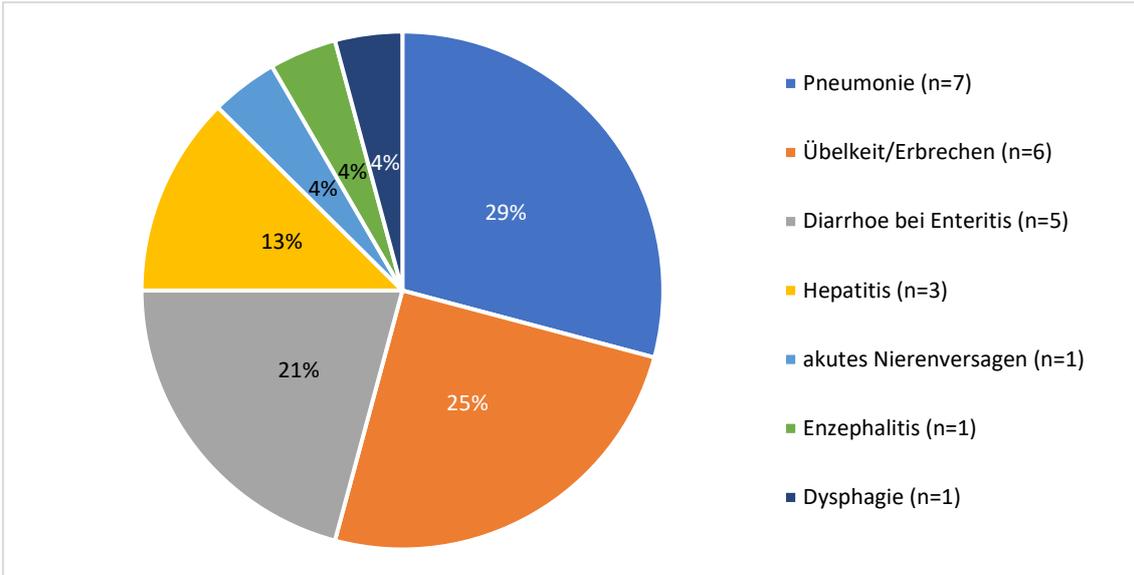


Abb. 2: Virusspezifische Symptome und ihre Häufigkeit

In Tab. 3 ist aufgeschlüsselt welches Virus jeweils welche Symptome verursacht hat.

Bei einem Patienten wurden nachweislich sowohl Übelkeit/ Erbrechen, als auch eine Diarrhoe durch ADV und CMV gleichzeitig ausgelöst (doppelt gezählt).

Tab. 3: Symptomverteilung nach Viren

ADV (n= 15)	CMV (n= 9)	EBV (n= 2)
Übelkeit/ Erbrechen (n= 5)	Übelkeit/ Erbrechen (n= 1)	Übelkeit/ Erbrechen (n= 1)
Diarrhoe (n= 5)	Diarrhoe (n= 1)	Dysphagie (n= 1)
Hepatitis (n= 2)	Pneumonie (n= 6)	
Pneumonie (= 1)	Hepatitis (n= 1)	
Enzephalitis (n= 1)		
Akutes Nierenversagen (n= 1)		

Im Verlauf der Virusinfektion kam es auch zu Komplikationen. So benötigten 13 Patienten (52 %) eine intensivmedizinische Behandlung. Neun dieser Patienten (39 %) mussten invasiv beatmet werden. In fünf Fällen war eine CMV-Pneumonie der Grund für die Intubation. Bei einem Patienten lag parallel eine CMV-, sowie eine Pilz-Infektion der Lunge als Intubationsgrund vor.

3.4 Wirkung der virusspezifischen T-Zellen

3.4.1 Allgemeines

Um die Wirkung der Therapie mit vTZ interpretieren zu können, wurden virusspezifische klinische Symptome sowie die Viruslast beobachtet.

Es wurden 34 Dosen von vTZ verabreicht. Dabei wurden zwischen 800 und 50.000 vTZ/ kg KG gegeben (z= 7.987).

Bei einer Gabe konnte keine Dosis ermittelt werden (s. Tab. 4).

Tab. 4: T-Zell-Dosis pro Patient

Patientennummer	vTZ [Zellzahl/ kg]	Patientennummer	vTZ [Zellzahl/ kg]
1	8240	14	1702/ 1809/ Dosis für 3. Gabe unbekannt
2	9440	15	1020
3	2269	16	38761
4	je 3040	17	10000
5	13093	18	5000
6	13000	19	24710
7	13000	20	22600
8	14247	21	800
9	22310	22	je 25540
10	4931	23	6730
11	4328	24	34360
12	21960	25	50000
13	1850	26	9554/ 3958/ 3960/ 7722/ 7733

Wie Abb. 3 verdeutlicht waren am Ende des Beobachtungszeitraums zwölf Patienten (44 %) nach vTZ-Therapie von der Virusinfektion kuriert.

Bei acht Patienten (30 %) kam es zu einer Besserung und bei sieben Patienten (26 %) zu einer Verschlechterung der Infektion.

Einer dieser Probanden kurierte nach Erhalt multispezifischer-T-Zellen sowohl eine ADV-, als auch eine CMV-Infektion aus. Ein weiterer Patient kurierte nach Therapie mit multispezifischen T-Zellen eine CMV-Infektion und zeigte zugleich eine Besserung der ADV-Last.

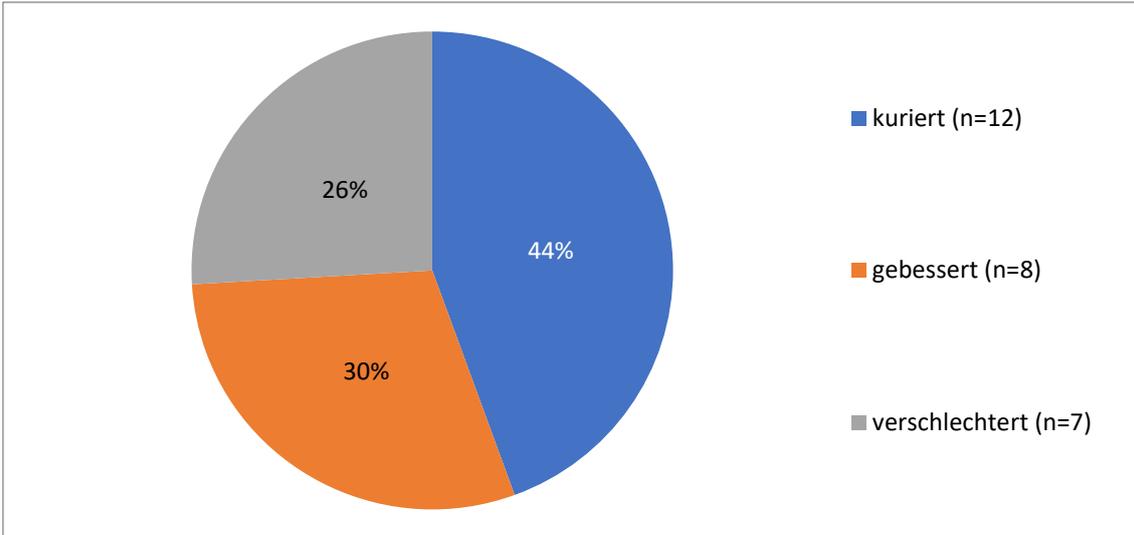


Abb. 3: Outcome der infizierten Patienten (n=26) nach T-Zell-Therapie

Abb. 4 verdeutlicht, dass insgesamt n= 13 Virusinfektionen kurierten. Eine Kuration dauerte zwischen 17 und 153 Tage mit einem Median von z= 63 Tagen.

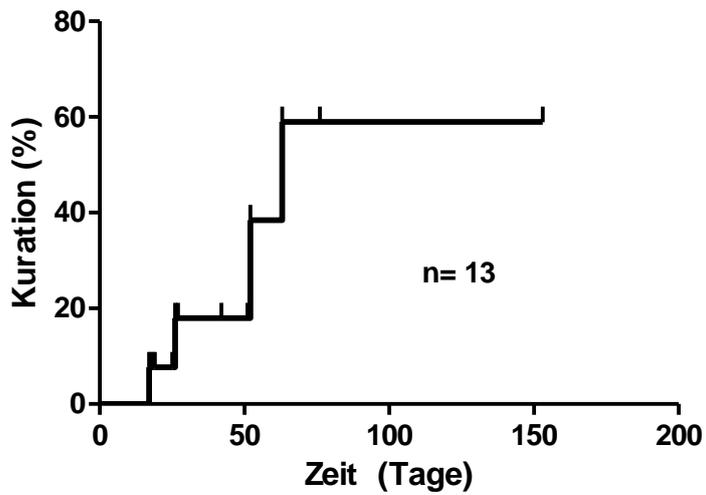


Abb. 4: Dauer bis zur Kuration

3.4.2 Wirkung auf klinische Symptome

Untersucht wurde, ob sich die virusspezifischen Symptome nach vTZ-Gabe veränderten. Bei 21 verfügbaren Patienten wurde zwischen einer schnellen (neun Symptome, 43 %) und einer schleppenden Besserung (vier Symptome, 19 %) unterschieden, je nachdem ob die Besserung innerhalb von zwei bis acht Wochen nach Zell-Gabe, oder danach stattfand.

Eine Symptomverschlechterung, sowie keine Veränderungen der Symptome konnte jeweils vier Mal (je 19 %) beobachtet werden.

In fünf Fällen (19 %) wurden keine verlässlichen Angaben dokumentiert (s. Abb.5).

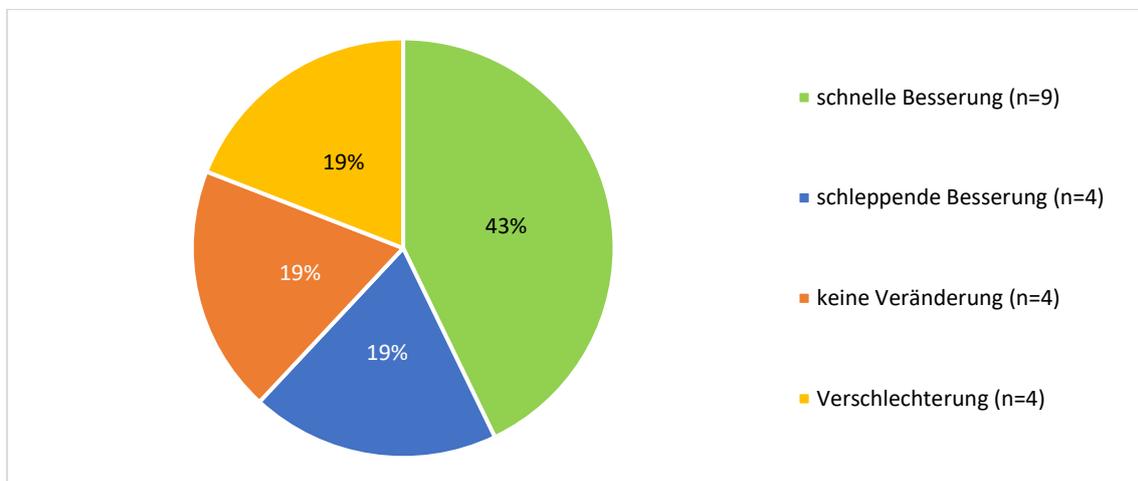


Abb. 5: Wirkung der virusspezifischen T-Zellen auf klinische Symptome

3.4.3 Wirkung auf Viruslast

Um die Wirkung der Therapie interpretieren zu können wurden die Viruslast in einem Zeitraum von zwei bis acht Wochen nach vTZ-Gabe, sowie zum letzten *follow-up* beobachtet. Eine Reduktion der Viruslast wurde als eine Viruslastsenkung um den Faktor 10^{-1} Kopien/ ml des Ausgangswertes an Tag 0 interpretiert.

Nach zwei Wochen sah man eine Virusreduktion bei elf von 19 auswertbaren Patienten (58 %). Bei acht Probanden (42 %) gab es keinen Abfall der Viruslast. Bei sieben Patienten war das Ergebnis nicht auswertbar, da in einem Fall keine

auswertbaren Daten vorlagen und die übrigen Patienten innerhalb der ersten zwei Wochen nach vTZ-Therapie bereits verstorben waren (s. Abb. 6).

Von diesen sechs Patienten verstarben zwei Patienten nachweislich an der jeweiligen Virusinfektion; bei drei Patienten konnte die Todesursache mit der Virusinfektion in Zusammenhang gebracht werden (zwei Fälle von Multiorganversagen und ein Fall von Lungenversagen).

Ein Patient verstarb nicht virusbezogen an einem kardiogenen Schock.

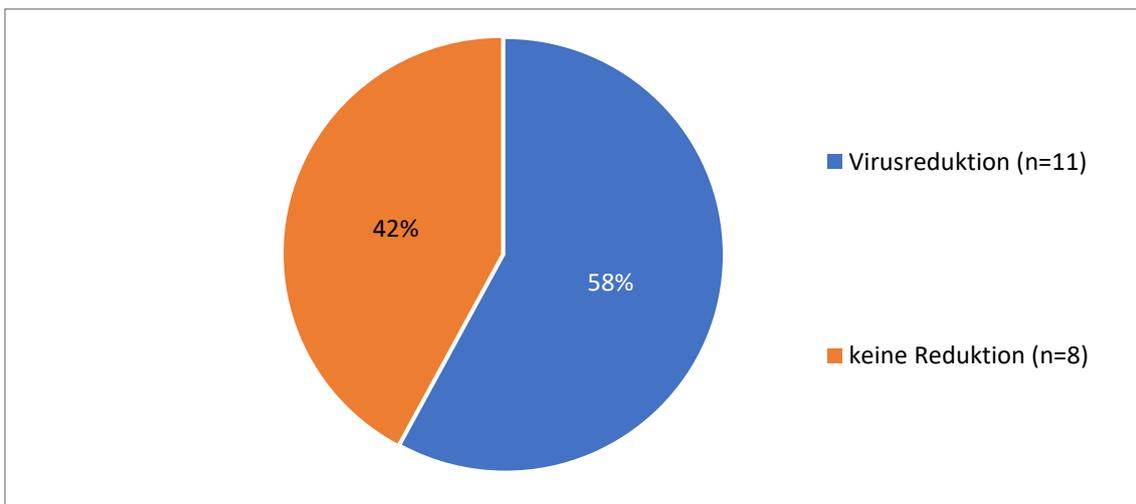


Abb. 6: Virusreduktion 2 Wochen nach T-Zell-Therapie

Innerhalb von acht Wochen erhöhte sich die Zahl der Fälle, in denen eine Reduktion zu erkennen war, auf 15 (83 %). Drei Patienten (17 %) zeigten weiterhin eine hohe Kopienzahl. Acht Fälle waren erneut nicht auswertbar (s. Abb.7).

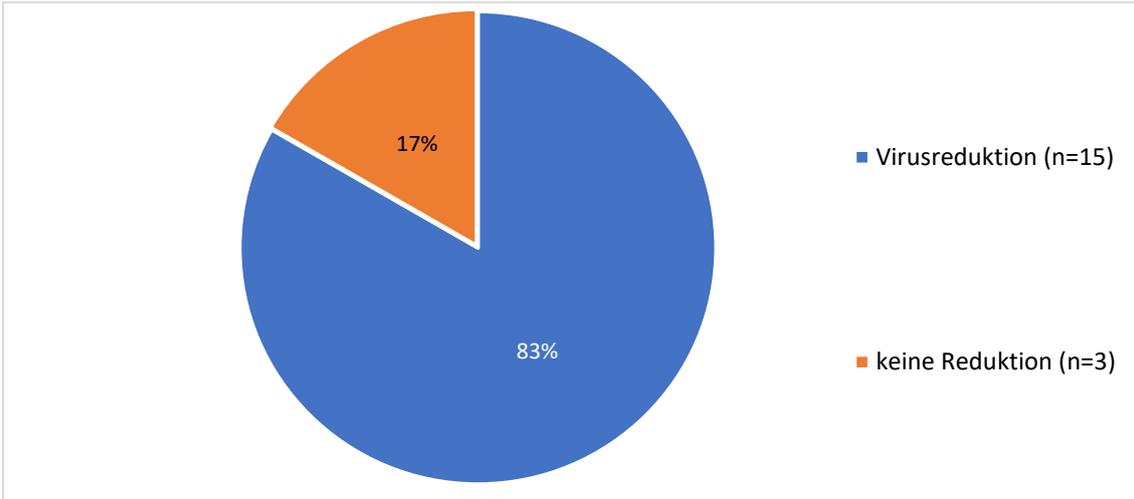


Abb. 7: Virusreduktion innerhalb von 2-8 Wochen nach T-Zell-Therapie

Betrachtete man die Reduktion der Viren über den gesamten Beobachtungszeitraum verteilt, wie in Abb. 8 dargestellt, kam es insgesamt zu n= 20 Virusreduktionen. Dieses Therapieansprechen trat zwischen Tag 14 und 38 ein (z= 27 Tage).

Weil bei vier Patienten zwei Virusinfektionen parallel auftraten wurde in der Darstellung nicht die Patientenzahl, sondern die Infektionsanzahl berücksichtigt.

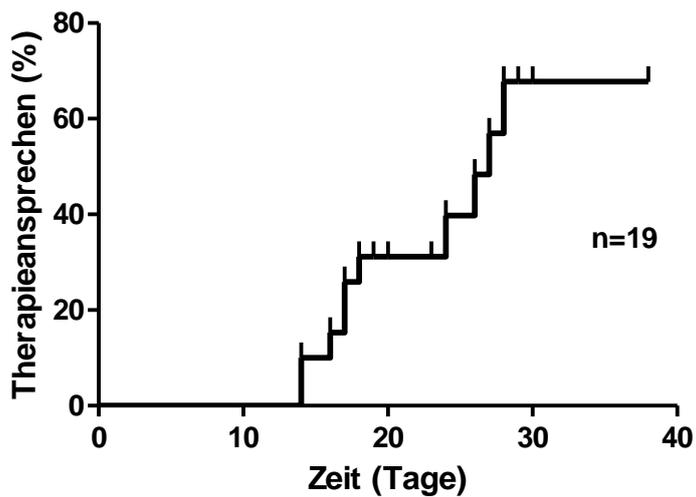


Abb. 8: Therapieansprechen während des gesamten Beobachtungszeitraums

Patienten, die eine Virusinfektion kurierten (n= 12) und dann im Verlauf erneut eine steigende Viruslast aufwiesen, wurden als Rezidiv der Infektion betrachtet. Bei zwei Patienten von 12 (17 %) kam es zu einem Rezidiv, wohingegen bei den übrigen zehn Probanden (83 %) keine Reinfektion nachweisbar war.

3.4.4 Korrelation Dosis - Wirkung

Um die Korrelation zwischen einer verabreichten vTZ-Dosis und einer Wirkung zu prüfen wurden eine Korrelationsanalyse nach *Pearson* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 26 Wertepaare aus Dosis und Wirkung gebildet. Ein Wert= 1 galt als Virusreduktion/ Kuration; ein Wert= 0 als „keine Wirkung“. Es ergab sich folgende Paarung (Tab. 5):

Tab. 5: Wertepaarung Korrelation Dosis - Wirkung

Patientennummer	vTZ [Zellzahl/kg]	Wirkung	Patientennummer	vTZ [Zellzahl/kg]	Wirkung
1	8240	1	14	1702	0
2	9440	1	15	1020	1
3	2269	0	16	38761	1
4	3040	1	17	10000	1
5	13093	0	18	5000	1
6	13000	1	19	24710	0
7	13000	0	20	22600	0
8	14247	0	21	800	1
9	22310	1	22	je 25540	1
10	4931	0	23	6730	1
11	4328	0	24	34360	1
12	21960	1	25	50000	1
13	1850	1	26	9554	1

Hieraus errechnet sich eine Korrelationskoeffizient von $r = 0.159$. Die t-Test-Statistik ergab einen t-Wert von $t = 0.788$. Die Berechnung der *degrees of freedom* (df) ergab den Wert $df = 24$. Auf Basis der zweiseitigen t-Verteilung ergab sich somit eine Pearson-Korrelation von $p = 0.439$.

3.4.5 Toxizität der T-Zell-Therapie

Die Verträglichkeit der vTZ wurde mit Hilfe der Tabelle *Common Toxicity Criteria* (Cancer Therapy Evaluation Program, 1998) evaluiert. Eine Stufeneinteilung von 0 - 4 diente hierbei zur Einordnung der Toxizitätsschwere.

Es wurden insgesamt 34 Dosen der vTZ verabreicht. Nach 29 von 32 Gaben (90.6 %) zeigte sich keinerlei toxische Wirkung auf den Patienten. Bei zwei Gaben wurde keine Angabe diesbezüglich gemacht.

Bei 9.4 % der Gaben (n= 3) wurde eine Toxizität dokumentiert:

Nach einmaliger vTZ-Gabe kam es bei einem einzigen Probanden gleichzeitig zu Diarrhoe (Stufe 3), Übelkeit (Stufe 1) und Fieber (Stufe 2).

Bei je einer Gabe konnte bei zwei Patienten Fieber (je Stufe 2) beobachtet werden. (s. Tab.6).

Tab. 6: Toxizität und Häufigkeit

Toxizität	Ja	Nein
Anzahl vTZ- Gaben	n= 3 (9.4 %)	n= 29 (90.6 %)

3.4.6 Graft-versus-Host-Disease

Die Einteilung erfolgte mit Hilfe der Tabelle *GvHD: Clinical Staging and Grading* (GLUCKSBERG et al., 1974).

Zu einer akuten GvHD nach einer vTZ-Gabe kam es in einem von 31 verwertbaren Fällen (3 %, Darmbeteiligung, GvHD Stufe 3).

30 Gaben (97 %) lösten keine Immunreaktion aus. Bei insgesamt drei Fällen wurde keine Angabe gemacht (s. Abb. 9).

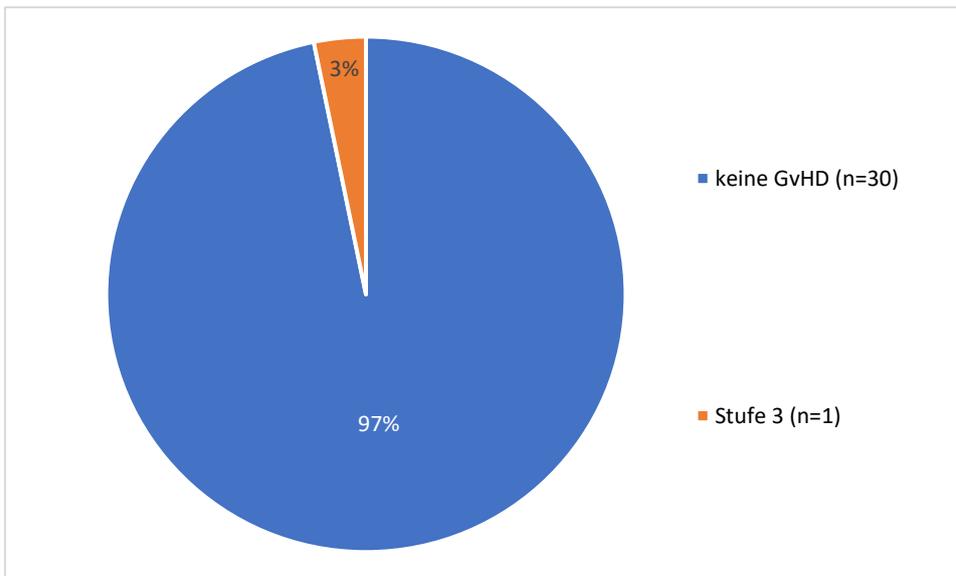


Abb. 9: Akute GvHD nach T-Zell-Gabe (modifizierte Einteilung nach Glucksberg)

3.5 Outcome

Zum Zeitpunkt des letzten *follow-ups* waren sieben Patienten (27 %) am Leben und von einer oder mehreren Virusinfektionen kuriert. Ein Patient (4 %) lebte, war jedoch noch erkrankt und 18 Patienten (69 %) waren verstorben (s. Abb.10).

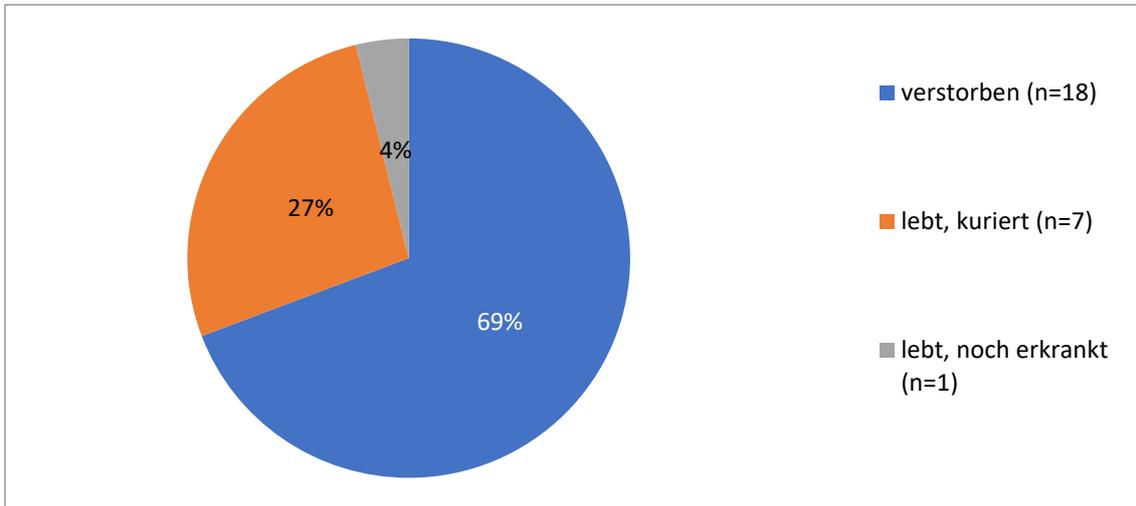


Abb. 10: Patientenstatus

Wie man Abb. 11 entnehmen kann, betrug das Überleben der Probanden zwischen vier und 430 Tagen mit einem Median von $z=73$ Tagen.

Innerhalb der ersten 30 Tage nach Therapiebeginn verstarben acht Probanden (31 %).

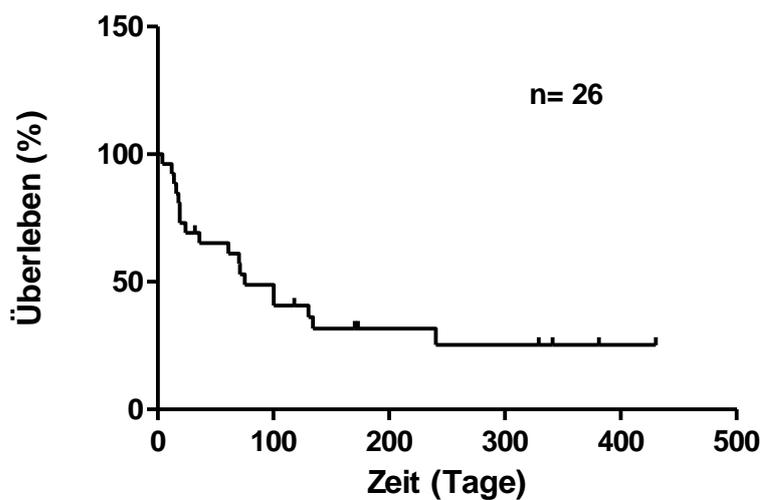


Abb. 11: Überleben

Abb. 12 zeigt, dass es einen Unterschied im Überleben der Probanden gab, je nachdem ob die Virusinfektion unter Kontrolle gebracht werden konnte, oder nicht. Alle acht Patienten, bei denen die Viruslast nicht mindestens um eine \log_{10} -Stufe reduziert werden konnte, verstarben innerhalb von 100 Tagen (Median $z=34,5$ Tage). Die anderen 18 Patienten überlebten mit einem Median von $z=130$. Es besteht ein Signifikanzwert von $p=0.0056$.

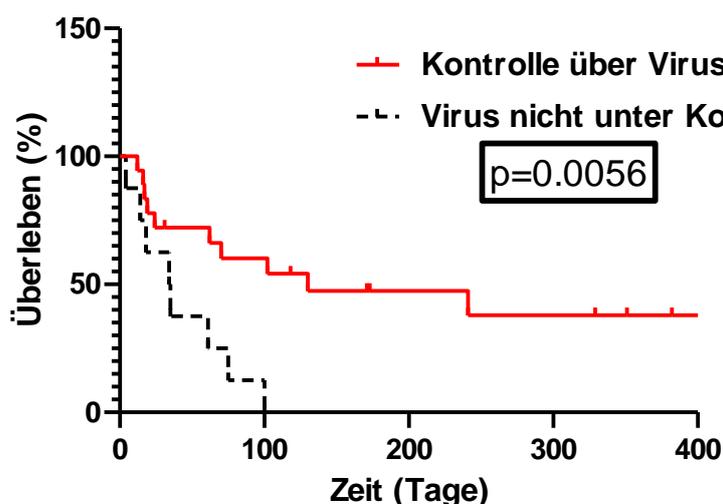


Abb. 12: Überleben je nach Status der Virusinfektion

Die Todesursache war bei neun Patienten (50 %) mit einer Virusinfektion assoziiert. In den restlichen 50 % der Fälle lag eine andere Todesursache vor (s. Tab.7).

Tab. 7: Auflistung Todesursachen (nicht virusassoziiert)

Todesursache	Anzahl (n=9)
ARDS	2
Rezidiv Primärerkrankung	2
Multiorganversagen	1
Intrakranielle Blutung	1
Kardiogener Schock	1
Sepsis (Pilzpneumonie)	1
Primärerkrankung	1

3.6 Analyse der einzelnen Patienten

Das folgende Kapitel stellt die Infektionsverläufe während der Therapie mit vTZ für jeden einzelnen Probanden graphisch dar (Abb. 13 - 33). Vorab werden diverse Patientencharakteristika in Tab. 8 bis 33 aufgelistet.

Um das Ausmaß der Infektion quantitativ zu visualisieren, diente die Anzahl an Virus-DNA-Kopien pro ml Blut zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei wurde der Tag 0 stets als der Tag der ersten vTZ-Gabe definiert.

Einige Messungen fanden qualitativ statt und sind als solche vermerkt.

Die Gaben weiterer antiviraler Medikamente sind ebenfalls den Graphen und den dazugehörigen Beschreibungen zu entnehmen.

Patient Nr.1

Tab. 8: Patientencharakteristika des Patienten Nr.1

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	haploidentisches Geschwisterkind 12/2012
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	multispezifisch, 8.240 T-Zellen/ kg KG, 11/2015
Immunsuppression	Kortison, Metotrexat

Der Patient Nr.1 zeigte zu Beginn an Tag -14 einen qualitativen Virusnachweis von ADV („schwach positiv“; zur grafischen Veranschaulichung mit dem Wert „1000 DNA-Kopien/ ml gleichgesetzt) im Blutplasma. Eine quantitative Messung an Tag -3 bestätigte einen zunehmenden Anstieg der Viruslast mit 13.000 DNA-Kopien/ml. Dieser Wert stellte auch den höchst gemessenen Wert dar.

Nach einmaliger Gabe von multispezifischen T-Zellen (ADV-, CMV- und EBV-spezifisch) erkannte man an Tag vier bereits einen deutlichen Abfall der Viruslast (3.300 DNA-Kopien/ ml), mit einem gemessenen Tiefstwert an Tag 11 (2.600 DNA-Kopien/ ml).

Der Patient verstarb an Tag 16 an Multiorganversagen. Der Tod kann mit dem Virus in Zusammenhang gebracht werden.

Der Patient hatte unmittelbar vor der ADV-Infektion eine CMV-Infektion kuriert.

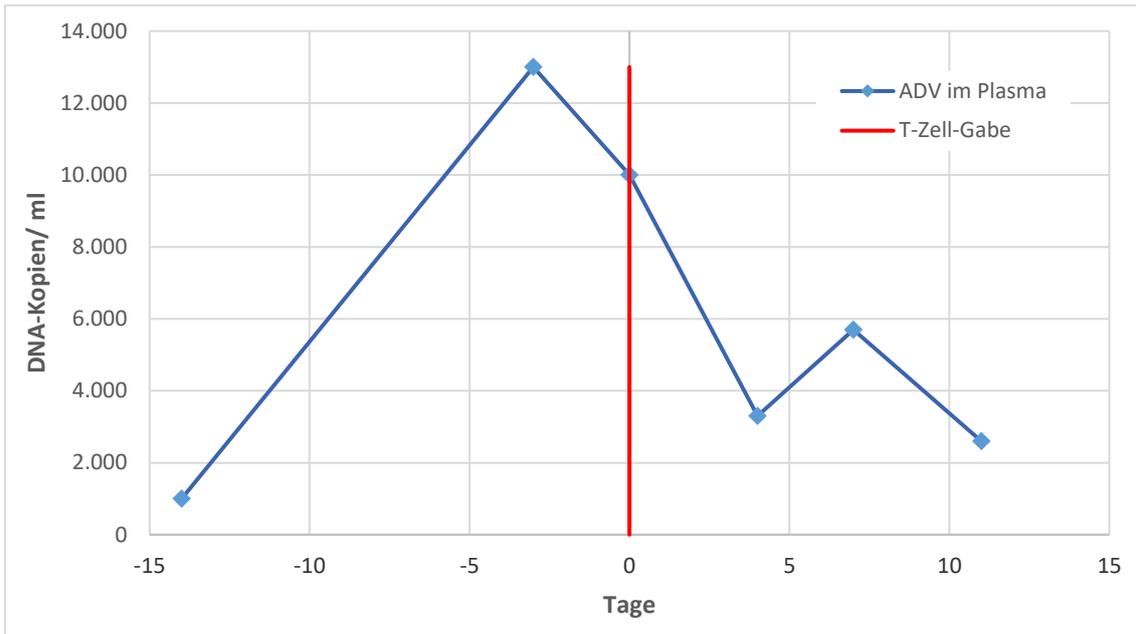


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe während der ADV-Infektion von Patient Nr.1

Patient Nr.2

Tab. 9: Patientencharakteristika des Patienten Nr.2

Hauptdiagnose	Akute myeloische Leukämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 06/2016
GvHD	Darm, Stufe 3
Virusinfektion	ADV
Viruspezifische Symptome	Übelkeit/Erbrechen, Enteritis
Viruspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, 9.440 T-Zellen/ kg KG, 09/2016
Immunsuppression	ATG Fresenius S®
Klinik	an Tag 3 akute GvHD; toxische Diarrhoe, Übelkeit und Fieber; schnelle Besserung der Diarrhoe/ Enteritis (acht Wochen), schleppende Besserung der Übelkeit (zehn Wochen)

Der Patient Nr.2 zeigte erstmals an Tag -52 einen qualitativen Nachweis von Adenoviren („schwach positiv“; zur graphischen Veranschaulichung mit dem Wert „500 DNA-Kopien/ ml gleichgesetzt) im Stuhl. Nach einer negativen Messung an Tag -34 (Wert = 1 im Graph) konnte ab Tag -27 ein positiver Nachweis erbracht werden (zur Übersichtlichkeit mit dem Wert „5.000“ im Diagramm belegt). Seit Tag -22 waren keine Viren im Stuhl detektierbar.

Quantitative Messungen von Tag -17 bis -10 zeigten eine Zunahme der ADV-Viruslast von 1.000 bis 58.000 mit einem Maximum von 77.000 DNA-Kopien/ml.

Nach einmaliger Gabe von ADV-spezifischen T-Zellen war ein zügiger Abfall der Viruslast ab Tag 20 zu sehen (1.000 DNA-Kopien/ml). Seit Tag 42 war eine vollständige Kuration der ADV-Infektion erreicht.

Bis zum letzten *follow-up* an Tag 173 gab es kein Virusrezidiv.

Während der Beobachtungszeit wurden parallel zu den vTZ noch Aciclovir im Zeitraum von Tag -86 bis 78, Foscarnet von Tag -22 bis 19 und Brincidofovir von Tag 21 bis 42 verabreicht.

Der Proband hatte vor der ADV-Infektion eine EBV-Infektion kuriert.

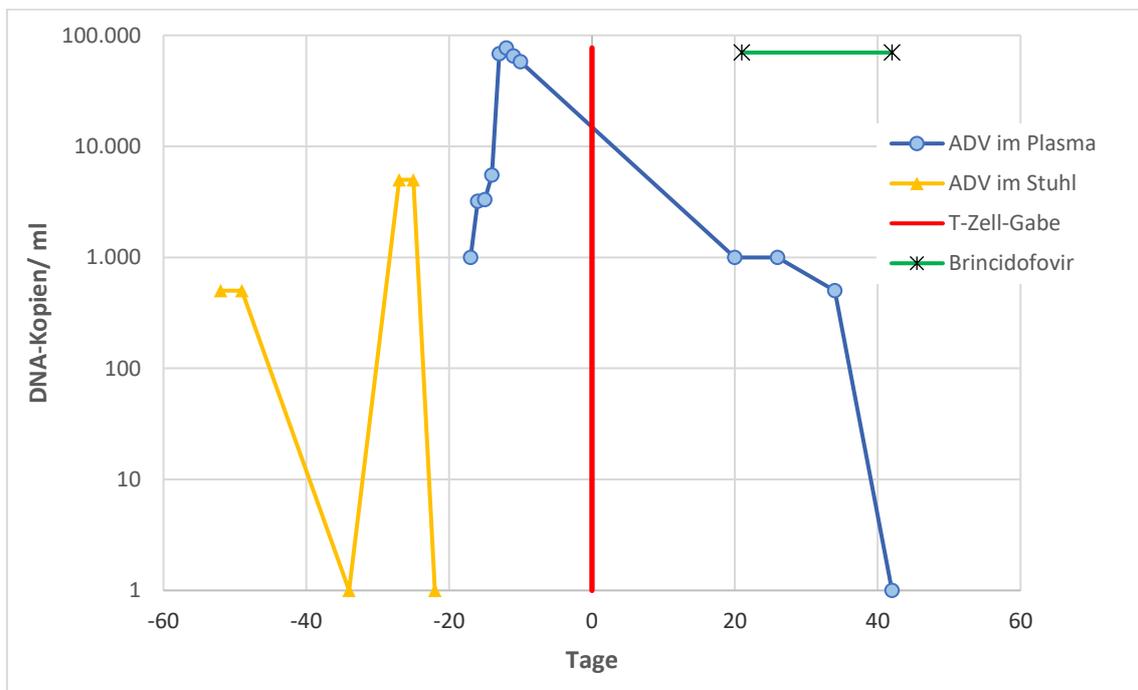


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der ADV-Infektion von Patient Nr.2

Patient Nr.3

Tab. 10: Patientencharakteristika des Patienten Nr.3

Hauptdiagnose	Primär metastasiertes undifferenziertes lymphoepitheliales Karzinom des Nasopharynx
Transplantation	haploidantisches Elternteil 09/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	EBV
Virusspezifische Symptome	Übelkeit/Erbrechen
Virusspezifische T-Zellen	EBV-spezifisch, 2.269 T-Zellen/ kg KG, 06/2016
Immunsuppression	Cortison, ATG Fresenius S®
Klinik	Verschlechterung der Infektion, Tod durch Multiorganversagen

Bei Patient Nr.3 bestand über den gesamten dargestellten Untersuchungszeitraum von Tag -32 bis 33 eine hohe EBV Last, beginnend bei 250.000 DNA-Kopien/ ml. Von Tag -2 (25.000 DNA-Kopien/ ml) bis Tag 26 stieg die Viruslast mit einem Maximum von 32.000.000 DNA-Kopien/ ml, trotz Gabe von EBV-spezifischen T-Zellen und paralleler Gabe von Foscarnet seit Tag -13. Im Verlauf sah man eine deutliche Virusreduktion von über 10^{-1} DNA-Kopien/ ml an Tag 33 (1.300.000 DNA-Kopien/ ml).

Von Tag 33 bis zum Tod an Tag 71 wurde aufgrund des schlechten Gesundheitszustands des Probanden auf weitere Messungen verzichtet. Der Tod kann mit dem Virus in Zusammenhang gebracht werden.

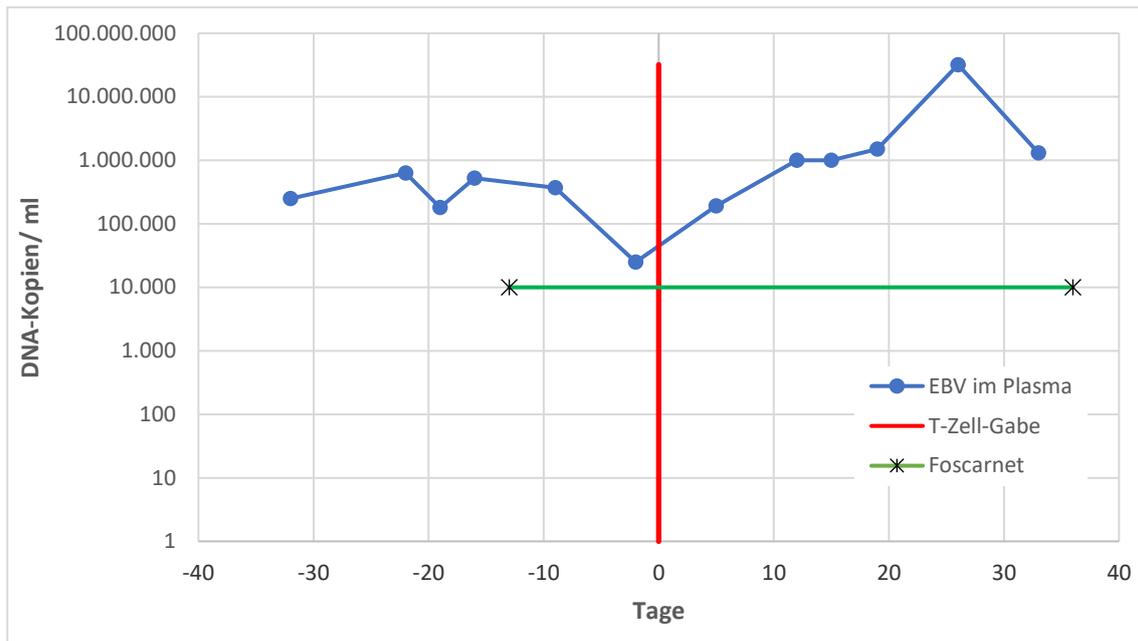


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der EBV-Infektion von Patient Nr.3

Patient Nr.4

Tab. 11: Patientencharakteristika des Patienten Nr.4

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 12/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	Übelkeit/Erbrechen, Diarrhoe bei Enteritis
Virusspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, je 3.040 T-Zellen/ kg KG, 12/2015
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, ATG Fresenius S®
Klinik	schleppende Besserung nach neun (Diarrhoe) bis 13 Wochen (Übelkeit)

Dieser Patient zeigte ab Tag -4 parallel eine hohe Viruslast von ADV im Blut (2.090.000 DNA-Kopien/ ml) und im Stuhl (96.300.000 DNA-Kopien/ ml) mit einem Maximum von 125.000.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 9.

Nach der zweimaligen Gabe von ADV-spezifischen T-Zellen (2. Gabe an Tag 7) erkannte man eine rasche Virusreduktion im Plasma an Tag 9 (366 DNA-Kopien/ ml) und im Stuhl an Tag 24 (152.000 DNA-Kopien/ ml).

Von Tag -11 bis 25 wurde zusätzlich mit Cidofovir therapiert.

Seit Tag 52 war der Patient vollständig von der ADV Infektion kuriert. Um die graphische Darstellung zu vereinfachen wurden die jeweils letzten qualitativen Messwerte „kein Virusnachweis“ im Blut (Tag 24) und Stuhl (Tag 52) mit dem Wert = 1 (aufgrund der logarithmischen Darstellung) belegt.

Bis zum letzten *follow-up* an Tag 240 kam es zu keinem Rezidiv.

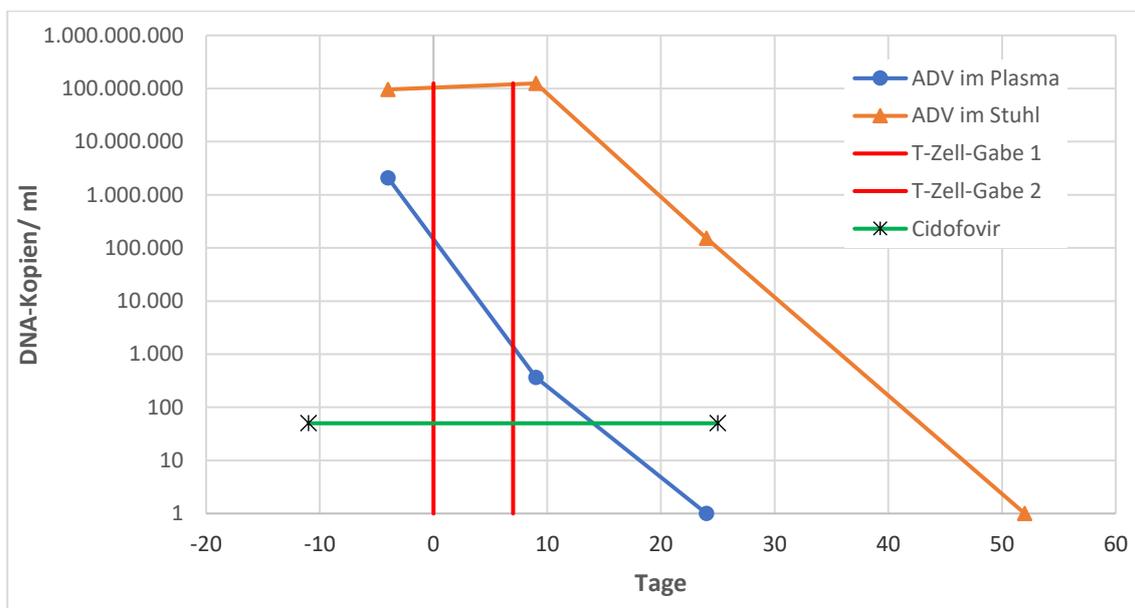


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der ADV-Infektion von Patient Nr.4

Patient Nr.5

Tab. 12: Patientencharakteristika des Patienten Nr.5

Hauptdiagnose	Akute myeloische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 06/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, Third Party, 13.093 T-Zellen/ kg KG, 10/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®

Der Proband zeigte multiple Rezidive der CMV Infektion bei insgesamt niedriger Kopienzahl (Maximum 105 DNA-Kopien/ ml an Tag 21). Nach der einmaligen vTZ-Gabe kam es immer wieder zu negativen Messergebnissen (Tag 26, 38, 48, 78), gefolgt von positiven Nachweisen (Tag 18, 33, 41, 73, 97).

Die letzte Kuration konnte man an Tag 101 beobachten.

Zusätzlich wurde von Tag 2 bis 20 mit Aciclovir, von Tag 21 bis 36 mit Valganciclovir und in den Zeiträumen Tag -35 bis 1 und Tag 46 bis 103 mit Foscarnet antiviral therapiert.

Bis zum Tod an Tag 130 (nicht virusbedingt) kam es zu keinem weiteren Rezidiv.

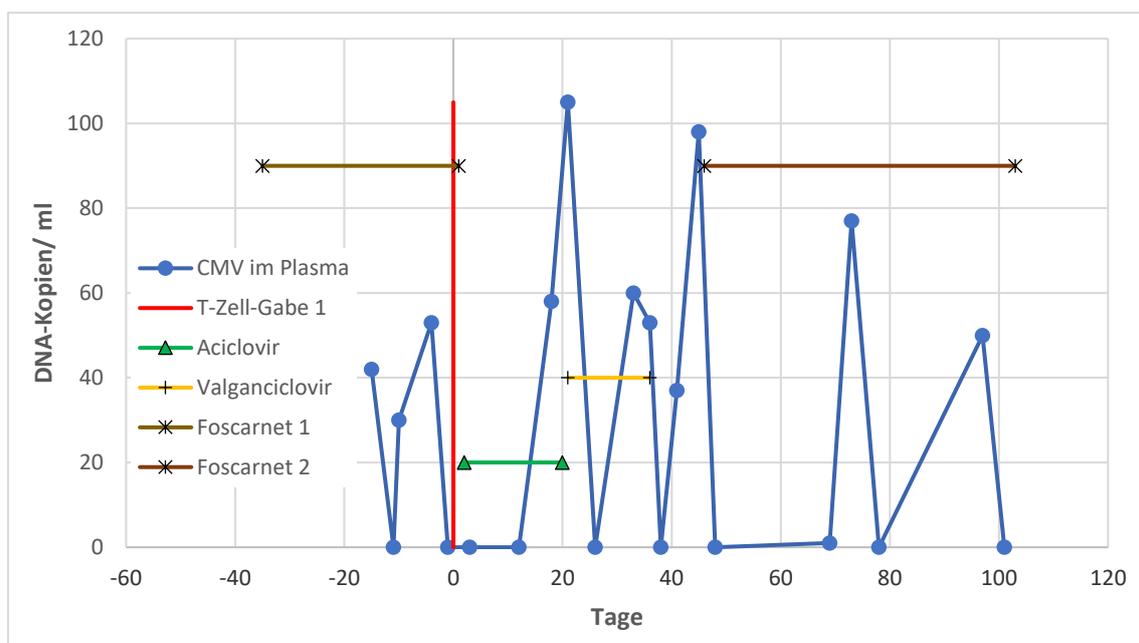


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV-Infektion von Patient Nr.5

Patient Nr.6

Tab. 13: Patientencharakteristika des Patienten Nr.6

Hauptdiagnose	Akute myeloische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 03/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	EBV
Viruspezifische Symptome	keine
Viruspezifische T-Zellen	EBV-spezifisch, 13.000 T-Zellen/ kg KG, 06/2015
Immunsuppression	Ciclosporin A

An Tag -29 war der Patient erstmals positiv auf EBV im Blut getestet worden (94.000 DNA-Kopien/ ml). Ein Maximum der Viruslast mit 580.000 DNA-Kopien/ ml lag an Tag -24 vor. Nach drei Gaben von Rituximab an den Tagen -27, -22 und -2 und der vTZ-Therapie fiel der Virusnachweis an Tag 4 negativ aus. Nach einem kurzzeitigen Peak von 3.100 DNA-Kopien/ ml an Tag 11 kam es an Tag 18 zur Kuration.

Von Tag 186 bis 237 und von Tag 259 bis 330 kam es zu Virusrezidiven (maximale Viruslast je 2.300 DNA-Kopien/ ml), welche an Tag 360 untherapiert qualitativ nicht mehr nachweisbar waren. Dieser Tag spiegelte auch das letzte *follow-up* wider.

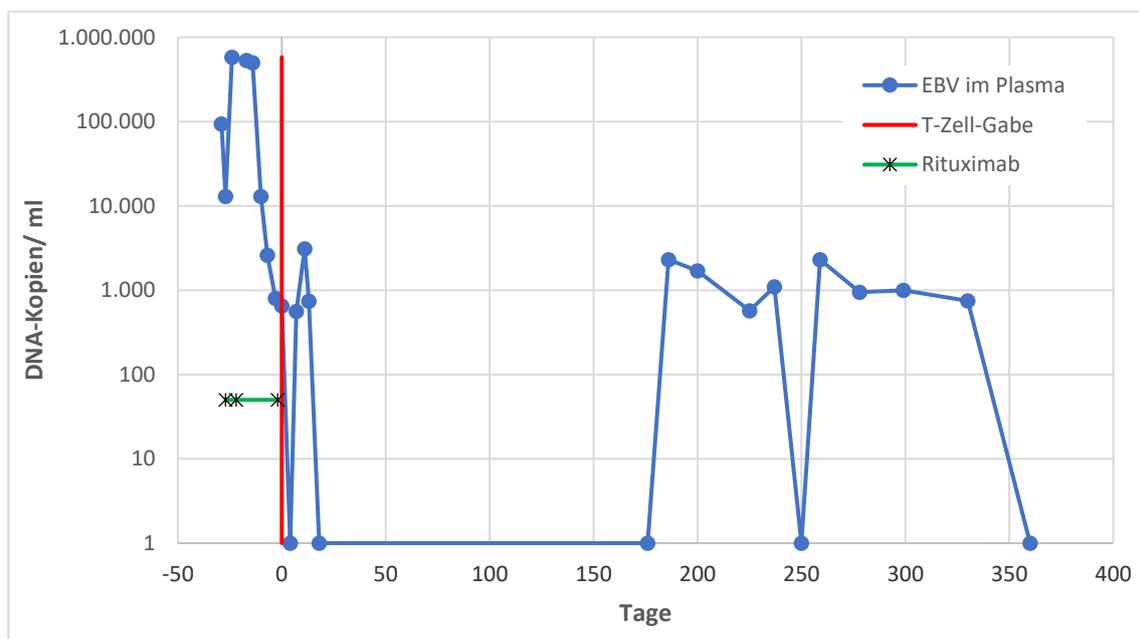


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der EBV-Infektion von Patient Nr.6

Patient Nr.7

Tab. 14: Patientencharakteristika des Patienten Nr.7

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 02/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	Hepatitis, Pneumonie
Virusspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, 13.000 T-Zellen/ kg KG, 10/2015
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®
Klinik	Aggravierung der Pneumonie mit virusbedingtem Tod an Tag 4; Wirkung der vTZ dadurch schwer aussagekräftig

Mangels verwertbarer Daten wurde auf die Erstellung eines Diagramms verzichtet.

Patient Nr.8

Tab. 15: Patientencharakteristika des Patienten Nr.8

Hauptdiagnose	Myelodysplastisches Syndrom
Transplantation	haploidentisches Elternteil 01/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Virusspezifische Symptome	Keine Angabe
Virusspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 14.247 T-Zellen/ kg KG, 03/2016
Klinik	Toxisches Fieber nach Zellgabe (Grad 2)

Während des gesamten Zeitraums sah man bei Patient Nr.8 Phasen niedriger Viruslast (Tag -8 bis 5, Tag 41 und Tag 54 bis 75) gefolgt von Peaks hoher CMV Konzentrationen (Tag -26, 13, 47, mit einem Maximum an Tag 89 mit 540.000 DNA-Kopien/ ml).

Trotz einmaliger Gabe von vTZ und der zusätzlichen Virostatika Valganciclovir (Tag -28 bis -2 und Tag 16 bis 47), Foscarnet (Tag 48 bis 83) und Cidofovir (seit Tag 83), beobachtete man nur eine temporär begrenzte Virusreduktion, ohne Kuration.

Kurz vor vTZ-Gabe bestand bereits Fieber (38,7 °C), welches sich nach vTZ-Therapie bis auf 39,9 °C erhöhte.

Die Todesursache an Tag 100 war eine Pilzpneumonie.

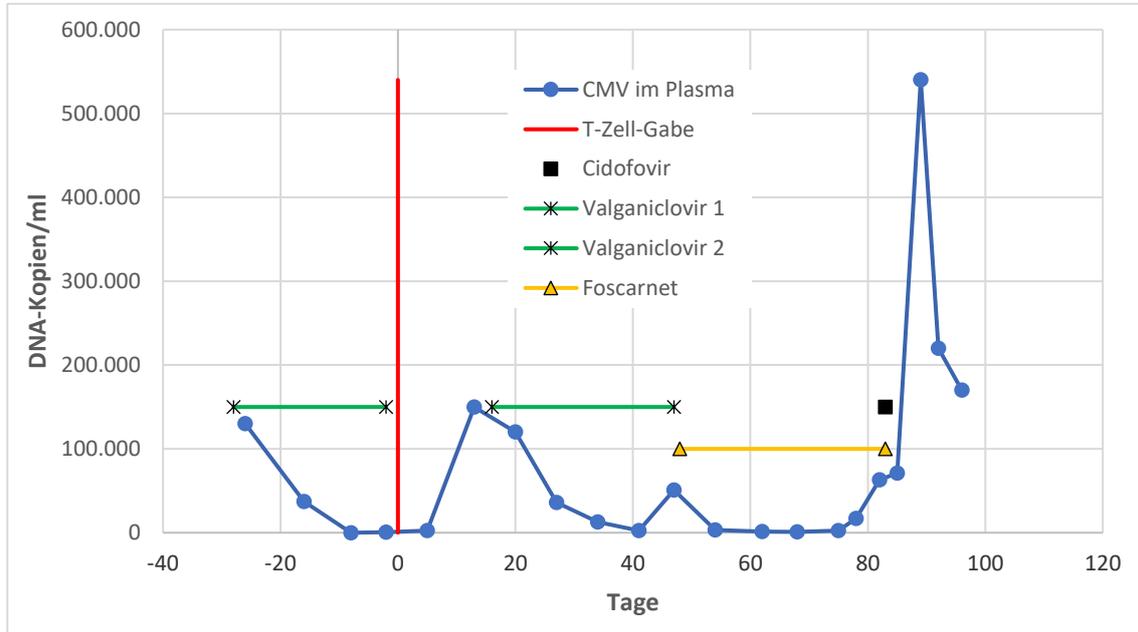


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV-Infektion von Patient Nr.8

Patient Nr.9

Tab. 16: Patientencharakteristika des Patienten Nr.9

Hauptdiagnose	Keine Angabe
Transplantation	haploidentesches Elternteil (Datum nicht angegeben)
GvHD	Keine Angabe
Virusinfektion	CMV
Virusspezifische Symptome	Keine Angabe
Virusspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 22.310 T-Zellen/ kg KG, 11/2015

Bei diesem Probanden lagen nur zwei Messwerte vor: eine CMV-Last von 18.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 0 und an Tag 17 „kein Virusnachweis“. Andere Virostatika wurden für den Zeitraum nicht erfasst.

Der Patient ist an Tag 19 einem ARDS verstorben, welches mit der CMV-Infektion assoziiert werden kann.

Patient Nr.10

Tab. 17: Patientencharakteristika des Patienten Nr.10

Hauptdiagnose	Akute myeloische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 02/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, 4.931 T-Zellen/ kg KG, 05/2015
Immunsuppression	Tacrolimus, ATG Fresenius S®

Trotz vTZ-Gabe und den Virostatika Cidofovir an Tag -8 und 0, Brincidofovir an Tag 5, DLI an Tag 6 und Ribavirin von Tag -51 bis 4, sah man eine schwankend hohe Viruslast während des Beobachtungszeitraums. Eine Viruslastreduktion konnte an Tag 11 und 18 (niedrigster Wert 9.000 DNA-Kopien/ ml Plasma), ein Peak an Tag 7, 14 und 29 (Maximum von 40.000 DNA-Kopien/ ml) beobachtet werden.

Bis zum Tod an Tag 75 (nicht virusbedingt) liegen keine weiteren Messwerte vor.

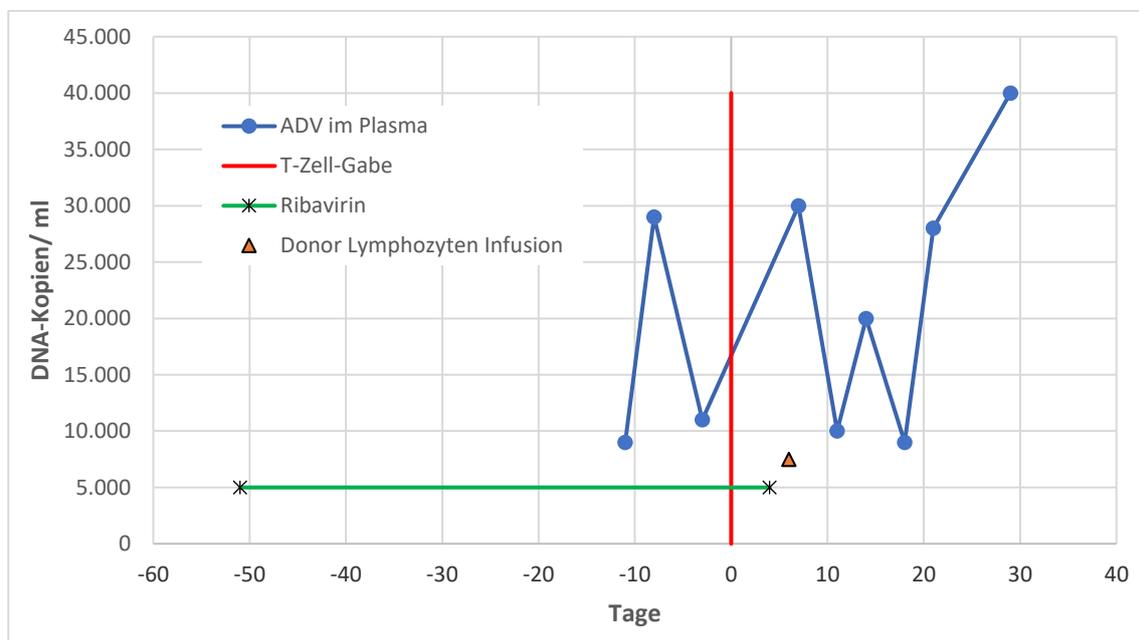


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der ADV-Infektion von Patient Nr.10

Patient Nr.11

Tab. 18: Patientencharakteristika des Patienten Nr.11

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 11/2014
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	Keine Angabe
Virusspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, Third Party, 4.328 T-Zellen/ kg KG, 03/2015
Immunsuppression	Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®
Klinik	Tod an Tag 14 durch ADV Infektion

Bei diesem Patienten lagen keine Messwerte vor.

Parallel zur der einmaligen vTZ-Gabe wurde einmal wöchentlich mit Cidofovir therapiert.

Patient Nr.12

Tab. 19: Patientencharakteristika des Patienten Nr.12

Hauptdiagnose	Neuroblastom der Niere
Transplantation	haploidentisches Elternteil 02/2017
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 21.960 T-Zellen/ kg KG, 03/2017
Immunsuppression	ATG Fresenius S®

Die Beobachtung begann an Tag -8 mit einer hohen CMV-Last von 286.000 DNA-Kopien/ ml. Bis Tag 5 und nach vTZ-Gabe sankt die Last auf 71.000 DNA-Kopien/ ml. Nach einem *Peak* an Tag 7 (Maximum von 383.000 DNA-Kopien/ ml) sah man eine Virenreduktion ab Tag 9 (47.100 DNA-Kopien/ ml), die bis zur Kuration an Tag 63 weiterführte (Diagramm bis Tag 55 mit 3.280 DNA-Kopien/ ml).

Bis zum Todestag (Tag 70, nicht virusbedingt) kam es zu keinem Rezidiv.

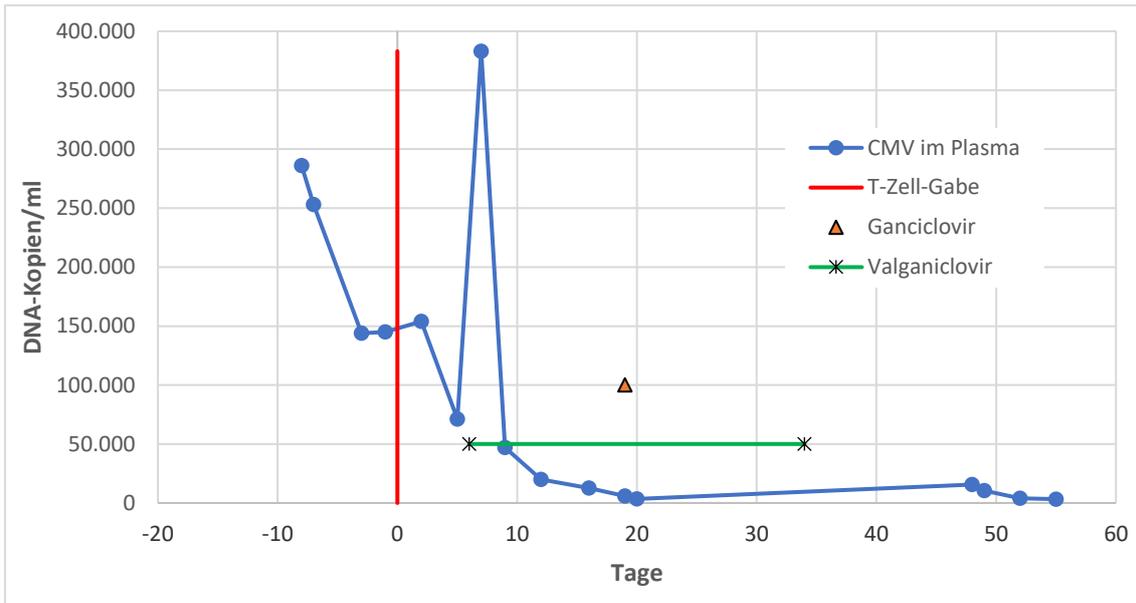


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV-Infektion von Patient Nr.12

Patient Nr.13

Tab. 20: Patientencharakteristika des Patienten Nr.13

Hauptdiagnose	Sichelzellanämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 12/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV & CMV
Virusspezifische Symptome	Diarrhoe bei Enteritis, Übelkeit/Erbrechen
Virusspezifische T-Zellen	ADV- & CMV-spezifisch, 1.850 T-Zellen/kg KG, 06/2017
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®
Klinik	schnelle Besserung der Übelkeit innerhalb von 4 Wochen, schleppende Besserung der Diarrhoe innerhalb von 8 Wochen

Bei diesen Probanden lagen nur qualitative Messungen von ADV und CMV im Stuhl vor. Zur grafischen Veranschaulichung wurden „positive“ Messergebnisse mit einem Wert = 100, „schwach positive“ Messergebnisse mit einem Wert = 50 und „negative“ Messergebnisse mit einem Wert = 0 gleichgesetzt.

Die CMV-Last, erstmals „positiv“ getestet an Tag -10, reduzierte sich nach vTZ-Gabe kontinuierlich. An Tag 16 fiel die Testung noch „schwach positiv“ aus, bis

an Tag 27 keine Cytomegalieviren mehr nachweisbar waren. Bis zum Tag 32 war kein Rezidiv verbucht worden.

Eine Infektion mit ADV war seit Tag -9 nachweisbar. An Tag 30 waren sie noch „schwach positiv“ im Stuhl vorhanden.

Parallel zur vTZ -Gabe wurden Aciclovir (von Tag 4 bis 14, an Tag 24 und 25), Cidofovir (von Tag 10 bis 24) und Foscarnet (Tag 26) verabreicht.

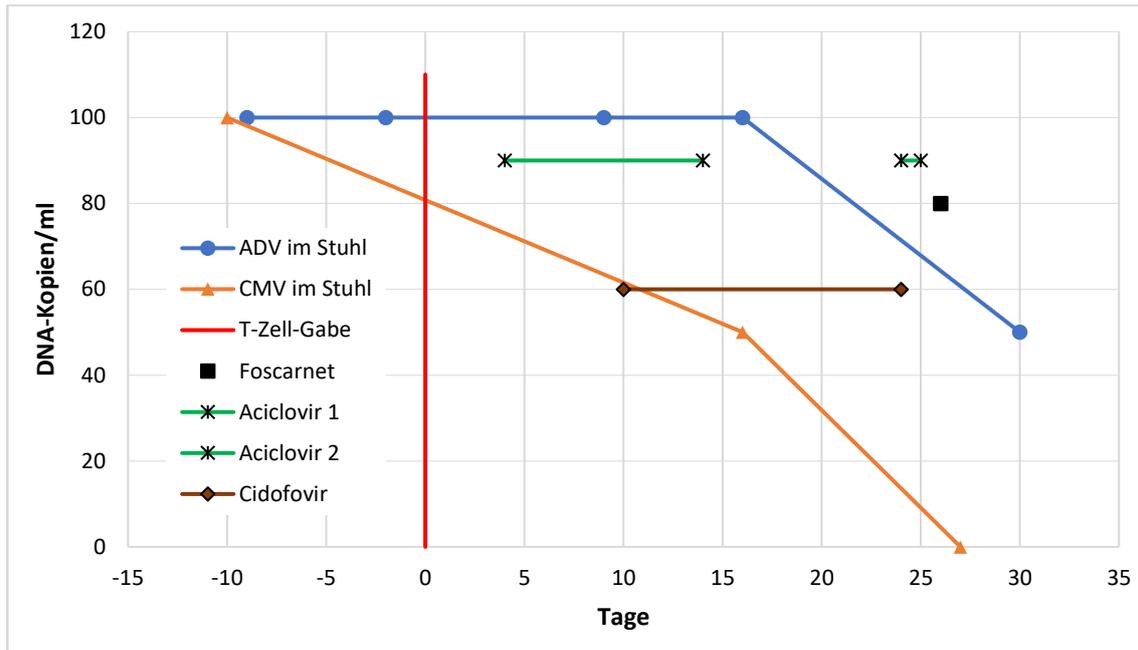


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der ADV-Infektion von Patient Nr.13

Patient Nr.14

Tab. 21: Patientencharakteristika des Patienten Nr.14

Hauptdiagnose	Fanconi - Anämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 03/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	Diarrhoe bei Enteritis, Übelkeit/Erbrechen, Hepatitis, akutes Nierenversagen, Enzephalitis
Virusspezifische T-Zellen	Drei Mal ADV-spezifisch, Third Party, 1.702/1.809 T-Zellen/ kg KG, 3.Dosis nicht dokumentiert, 04/2015
Immunsuppression	Cortison, Alemtuzumab, Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil
Klinik	alle Symptome (bis auf die Enzephalitis) besserten sich schnell nach einer operativen Sanierung des Darms und nach Dialyse; die Enzephalitis veränderte sich trotz Therapie nicht

Der Patient erhielt zu drei Zeitpunkten vTZ (Tag 0, 16 und 28). Zusätzlich wurde mit Ribavirin (Tag 8, 9, 14, 19 und 23) und mit Brincidofovir (von Tag 2 bis 26) therapiert.

Nach anfänglich steigender Viruslast bis Tag 9 (263.000.000 DNA-Kopien/ ml) fiel die bereits hohe Viruslast bis Tag 20 auf einen minimalen Wert von 4.090.000 DNA-Kopien/ ml. Ab Tag 22 zeigte sich ein progredienter Anstieg der Viruslast (mit einer kurzzeitigen Reduktion an Tag 31 bis 33 um $8,4 \times 10^{-1}$ DNA-Kopien/ ml) bis zu einem Maximum von 1.370.000.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 34.

An Tag 36 starb der Patient virusbedingt durch Multiorganversagen.

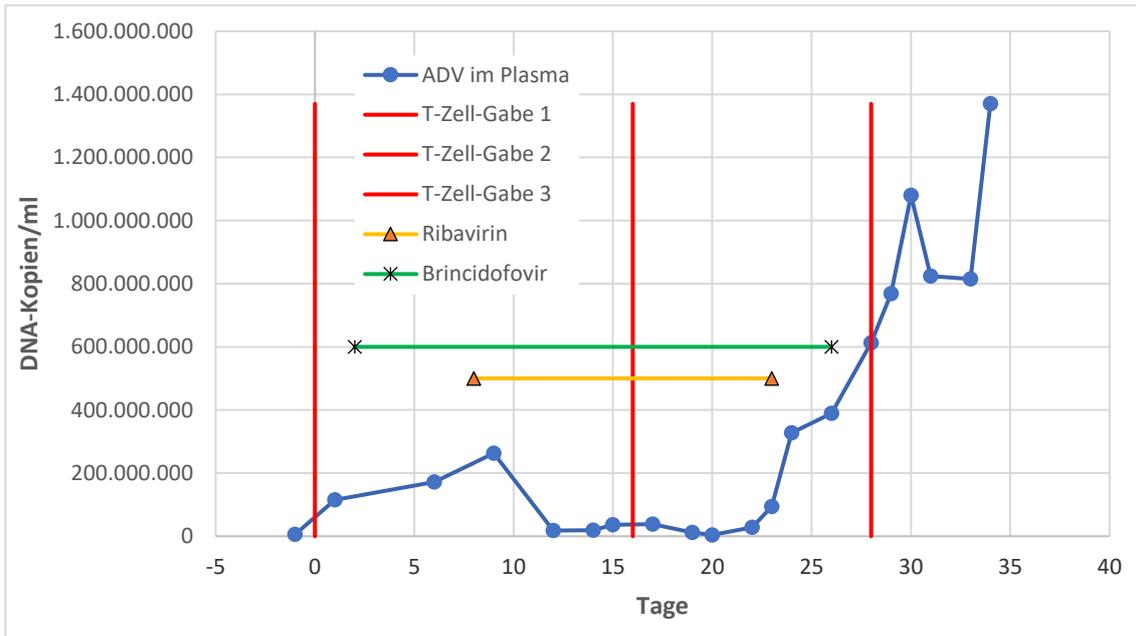


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gaben und zusätzlicher Virostatika während der ADV-Infektion von Patient Nr.14

Patient Nr.15

Tab. 22: Patientencharakteristika des Patienten Nr.15

Hauptdiagnose	Myelodysplastisches Syndrom
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 01/2017
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV
Virusspezifische Symptome	Diarrhoe bei Enteritis, Übelkeit/Erbrechen
Virusspezifische T-Zellen	ADV-spezifisch, 1.020 T-Zellen/ kg KG, 03/2017
Immunsuppression	Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®
Klinik	schnelle Besserung aller Symptome innerhalb von vier Wochen

Der Patient zeigte einen Nachweis von ADV im Plasma und im Stuhl, wobei das Virus im Blut kurz vor vTZ-Gabe bereits nicht mehr nachweisbar war. Die Stuhluntersuchung bestand nur aus qualitativen Messungen. Zur besseren Darstellung im Graphen wurden folgende Werte den Messergebnissen zugeordnet: „negativ“ = 0, „schwach positiv“ = 1000, „positiv“ = 5000 und „stark positiv“ = 30.000 DNA-Kopien/ ml.

Nach einer „stark positiven“ Viruslast ab Tag -16 sank diese ab Tag -1 auf ein „positives“ Messergebnis. An Tag 29 waren die Viren kaum nachweisbar, bevor die Infektion an Tag 76 die Kuration erreichte.

Bis zum letzten *follow-up* an Tag 118 kam es zu keinem Virusrezidiv.

Ab Tag 4 wurde zusätzlich Aciclovir verabreicht.

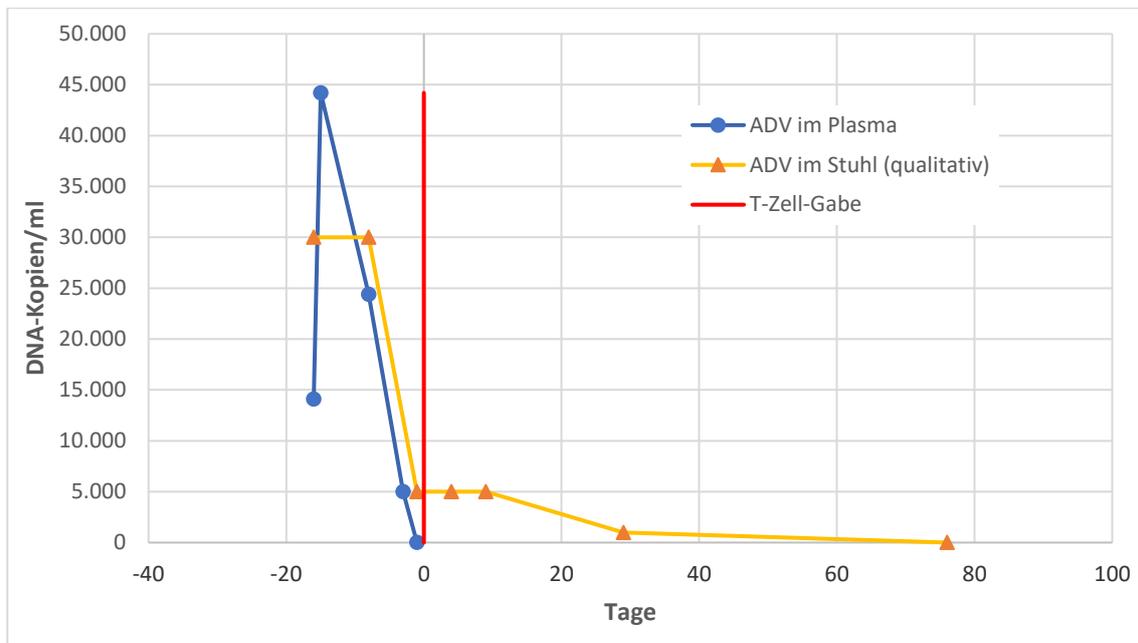


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der Viruslast und T-Zell-Gabe während der ADV-Infektion von Patient Nr.15

Patient Nr.16

Tab. 23 Patientencharakteristika des Patienten Nr.16

Hauptdiagnose	Schwerer kombinierter Immundefekt
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 07/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Viruspezifische Symptome	Pneumonie
Viruspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 38.761 T-Zellen/ kg KG, 08/2016
Immunsuppression	Alemtuzumab, Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil
Klinik	schnelle Besserung der Pneumonie innerhalb von vier Wochen

Vor vTZ-Gabe stieg die CMV-Last während paralleler Ganciclovir Therapie (Tag -12 bis 3) auf ein Maximum von 16.500.000 DNA-Kopien/ ml an Tag -6 an. Seit

Tag 6 ließ sich eine Virusreduktion um eine 10er-Potenz beobachten. Diese Reduktion setzte sich unter zusätzlicher Therapie mit Foscarnet (Tag 3 bis 9) und Ganciclovir (Tag 9 bis 22) bis Tag 20 fort.

An Tag 28 wurde einmalig Aciclovir verabreicht.

Nachdem kurzzeitig wieder ein Virusanstieg von Tag 62 bis 75 mit einem Maximum von 36.600 DNA-Kopien/ ml zu beobachten war, fiel die CMV-Last ab Tag 79, bis sie ab Tag 153 nicht mehr nachweisbar war. Bis zum letzten *follow-up* an Tag 329 kam es zu keinem Virusrezidiv.

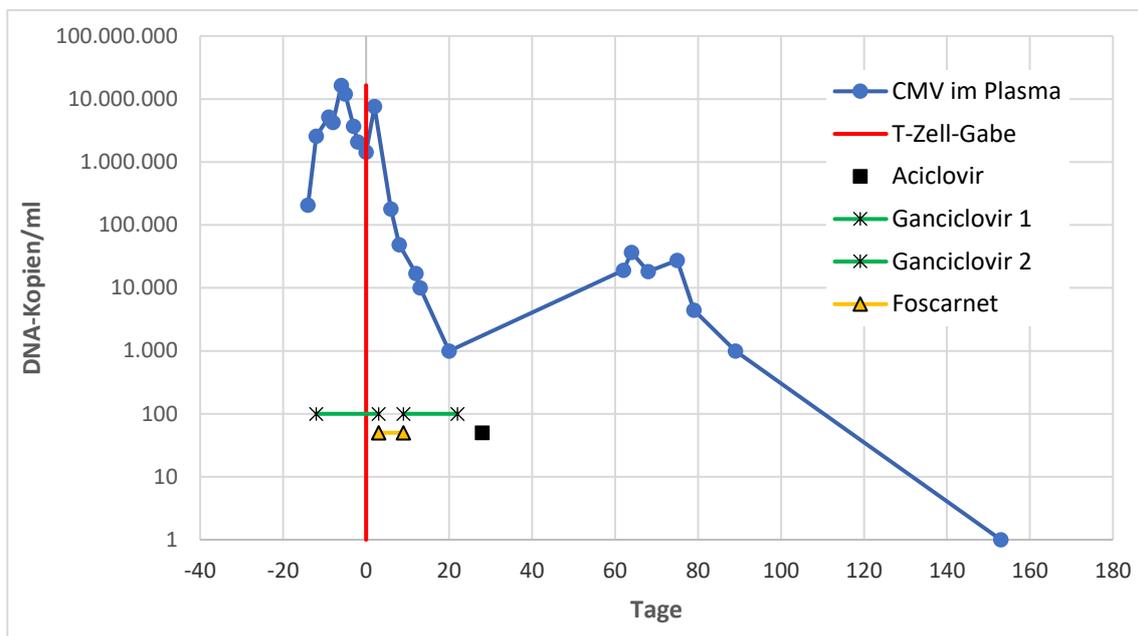


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV-Infektion von Patient Nr.16

Patient Nr.17

Tab. 24: Patientencharakteristika des Patienten Nr.17

Hauptdiagnose	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
Transplantation	haploidentisches Elternteil 12/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Viruspezifische Symptome	Übelkeit/ Erbrechen, Hepatitis
Viruspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 10.000 T-Zellen/ kg KG, 01/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®
Klinik	Toxisches Fieber (Grad 2) nach T-Zellgabe; schnelle Besserung der Übelkeit nach fünf und der Hepatitis nach sieben Wochen

Bei dem Patienten lag während des gesamten Beobachtungszeitraums eine niedrige CMV-Last vor. Von Tag -2 bis Tag 12 waren Werte von unter 600 DNA-Kopien/ ml zu erkennen. Seit Tag 19 war die Virusinfektion kuriert. Bis zum letzten *follow-up* an Tag 170 war kein Rezidiv zu erkennen.

Während der gesamten Untersuchung wurde zusätzlich mit Ganciclovir und bis Tag 25 mit Foscarnet therapiert.

Patient Nr.18

Tab. 25: Patientencharakteristika des Patienten Nr.18

Hauptdiagnose	Neuroblastom
Transplantation	haploidentisches Elternteil 08/2014
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV und CMV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	Multispezifisch, 5.000 T-Zellen/ kg KG, 02/2015
Immunsuppression	Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®

Der Patient hatte gleichzeitig eine ADV- und CMV-Infektion. Die ADV-Infektion war nur im Stuhl nachweisbar. CMV war im Urin vor vTZ-Gabe bereits „negativ“, jedoch noch im Plasma vorhanden.

Aus Gründen der Veranschaulichung wurden qualitative CMV-Messungen mit folgenden Werten gleichgesetzt: „positiv“ = 1.000 (Plasma), „negativ“ = 0 (Plasma).

Die CMV-Infektion hatte an Tag -65 ein Maximum von 131.000 DNA-Kopien/ ml erreicht. In Folge reduzierte sich die CMV-Last und betrug an Tag -1 11.300 DNA-Kopien/ ml. Nach der multispezifischen vTZ-Gabe sank die Viruslast kontinuierlich, sodass es an Tag 42 zur Kuration kam.

Da es für die ADV-Infektion nur qualitative Messungen gab, wurden „positive“ Messungen mit dem Wert = 20.000 und „negative“ Messungen mit dem Wert = 0 DNA-Kopien/ ml belegt, um sie besser graphisch darstellen zu können.

Erstmals konnte man eine ADV-Last im Stuhl an Tag -31 sehen, die bis Tag 2 weiterhin nachweisbar war. An Tag 27 kam es dann zur Kuration.

Parallel wurde von Tag -16 bis 35 mit Cidofovir therapiert.

Bis zum letzten *follow-up* an Tag 430 kam es zu keinem Virusrezidiv.

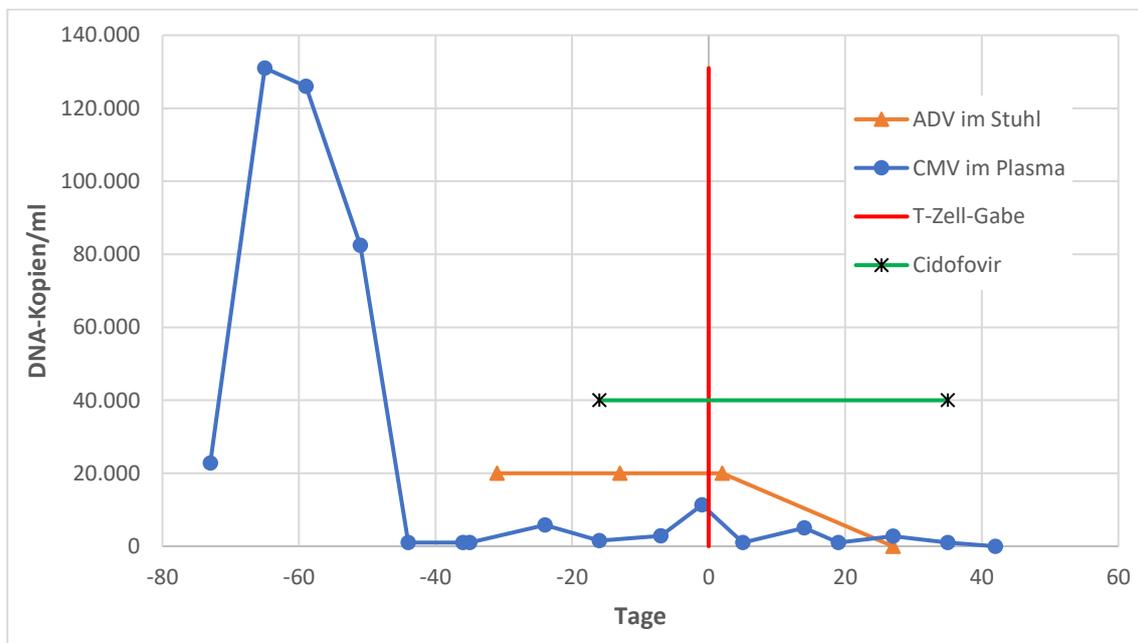


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der ADV- und CMV-Infektion von Patient Nr.18

Patient Nr.19

Tab. 26: Patientencharakteristika des Patienten Nr.19

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 10/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	ADV (vorab EBV-Infektion bereits kuriert)
Virusspezifische Symptome	Diarrhoe bei Enteritis
Virusspezifische T-Zellen	ADV- & EBV-spezifisch, 24.71 T-Zellen/ kg KG, 03/2016
Immunsuppression	Mycophenolat Mofetil, ATG Fresenius S®
Klinik	keine Veränderung der Symptome

Bereits vor vTZ-Gabe hatte der Patient eine EBV-Infektion kuriert (Tag -6). Adenoviren waren seit Tag -2 im Plasma nachweisbar (28.000 DNA-Kopien/ml). Trotz einmaliger vTZ-Therapie (Tag 2) kam es bis Tag 12 (51.000 DNA-Kopien/ml) zu keiner Reduktion oder massiven Erhöhung der ADV-Last. An Tag 18 verstarb der Patient nicht virusbedingt an einem kardiogenen Schock. Zu einem EBV-Rezidiv kam es nicht.

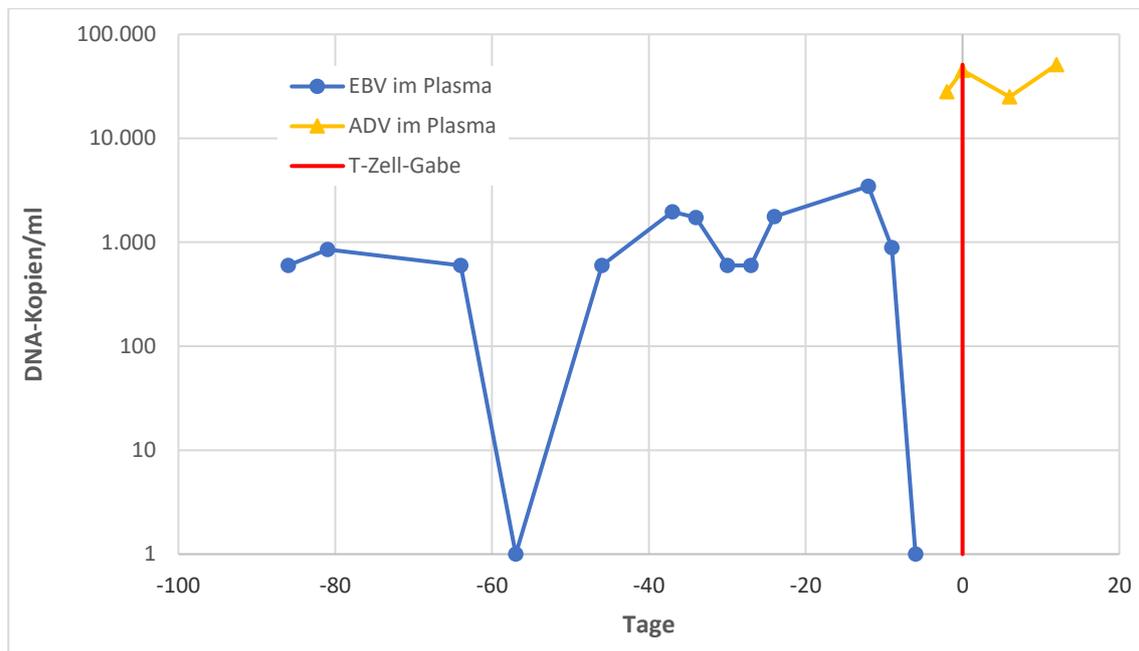


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Viruslast und T-Zell-Gabe während der ADV- und EBV-Infektion von Patient Nr.19

Patient Nr.20

Tab. 27: Patientencharakteristika des Patienten Nr.20

Hauptdiagnose	Familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose
Transplantation	haploidentesches Elternteil 10/2016
GvHD	Keine Angabe
Virusinfektion	CMV
Virusspezifische Symptome	Pneumonie
Virusspezifische T-Zellen	CMV-spezifisch, 22.600 T-Zellen/ kg KG, 01/2017
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil
Klinik	Tod durch ARDS (CMV bedingt)

Für diesen Patienten lagen keinerlei Messwerte vor. Aus Arztbriefen ging hervor, dass es bei EBV-Infektion nach Rituximab-Gabe zu einer Kuration gekommen ist.

Jedoch kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums auch zu einer CMV-Infektion, die an Tag 134 trotz vTZ-Therapie durch ein ARDS zum Tod geführt hat.

Patient Nr.21

Tab. 28: Patientencharakteristika des Patienten Nr.21

Hauptdiagnose	EBV assoziiertes posttransplantatives Lymphom
Transplantation	haploidentesches Geschwisterkind 04/2017
GvHD	Keine Angabe
Virusinfektion	EBV
Virusspezifische Symptome	Dysphagie
Virusspezifische T-Zellen	EBV-spezifisch, Third Party, 800 T-Zellen/ kg KG, 07/2017
Immunsuppression	Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®
Klinik	Verschlechterung der Dysphagie

Die EBV-Last reduzierte sich von Tag -3 (4.200 DNA-Kopien/ ml) schnell auf 1.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 8. An Tag 28 konnte das Virus nur „schwach positiv“ (in der Grafik mit dem Wert = 500 DNA-Kopien/ ml versehen) nachgewiesen werden. Von Tag 39 bis 54 kam es zu einem erneuten Anstieg der Viruslast mit einem Maximum von 9.400 DNA-Kopien/ ml an Tag 40. Ab

Tag 57 konnte man erneut eine Reduktion erkennen; es lagen knapp 1000 DNA-Kopien/ ml vor.

Zusätzlich zur Virämie konnten eine EBV-Last im Knochenmark (Tag 5) und Liquor (Tag 42) qualitativ nachgewiesen werden.

Die Beobachtung des Patienten endete an Tag 61 durch den Tod (nicht virusbedingt).

An Tag -1 wurde einmalig Rituximab verabreicht.

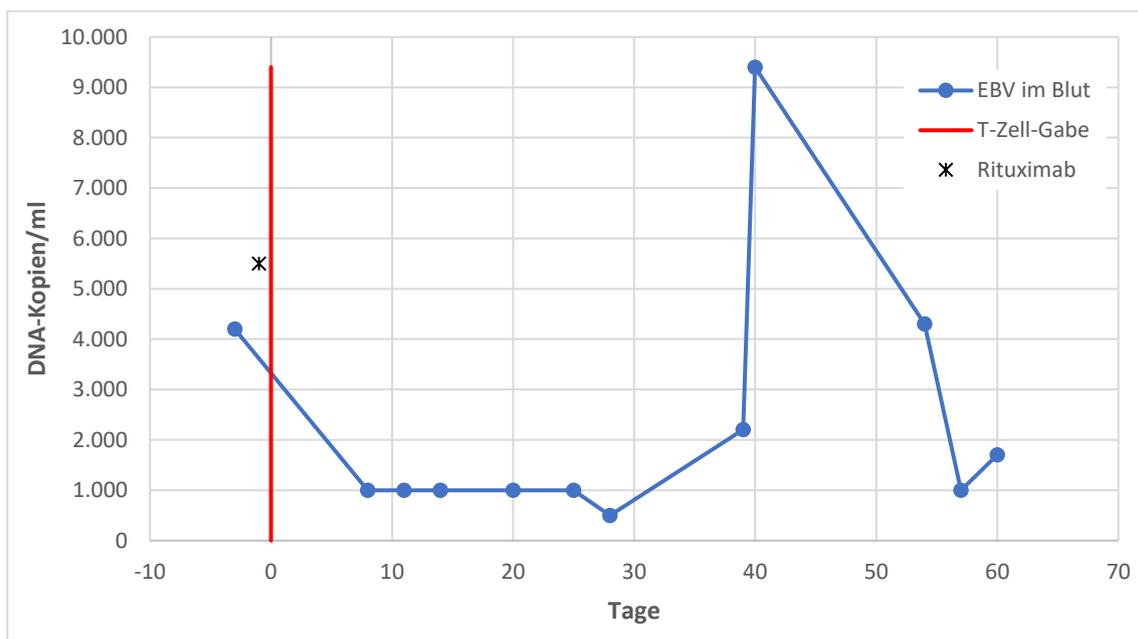


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der EBV-Infektion von Patient Nr.21

Patient Nr.22

Tab. 29: Patientencharakteristika des Patienten Nr.22

Hauptdiagnose	Akute myeloische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 04/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Viruspezifische Symptome	Pneumonie
Viruspezifische T-Zellen	zwei Mal CMV-spezifisch, Third Party, je 25.540 T-Zellen/ kg KG, 06/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®
Klinik	keine Veränderung der Symptome

Der Patient hatte während des Beobachtungszeitraums zwei Mal vTZ erhalten; an Tag 0 und 6. Andere Virostatika wurden nicht verabreicht.

Nach einer Viruslast von 680 DNA-Kopien/ ml an Tag -1 stieg diese bis Tag 6 auf 2.800 an (Maximum). Ab Tag 10 konnte man eine Reduktion (400 DNA-Kopien/ ml) erkennen, die bis auf ein Minimum von 80 Kopien an Tag 17 sank.

Der Patient war an Tag 19 virusassoziiert an einem ARDS verstorben.

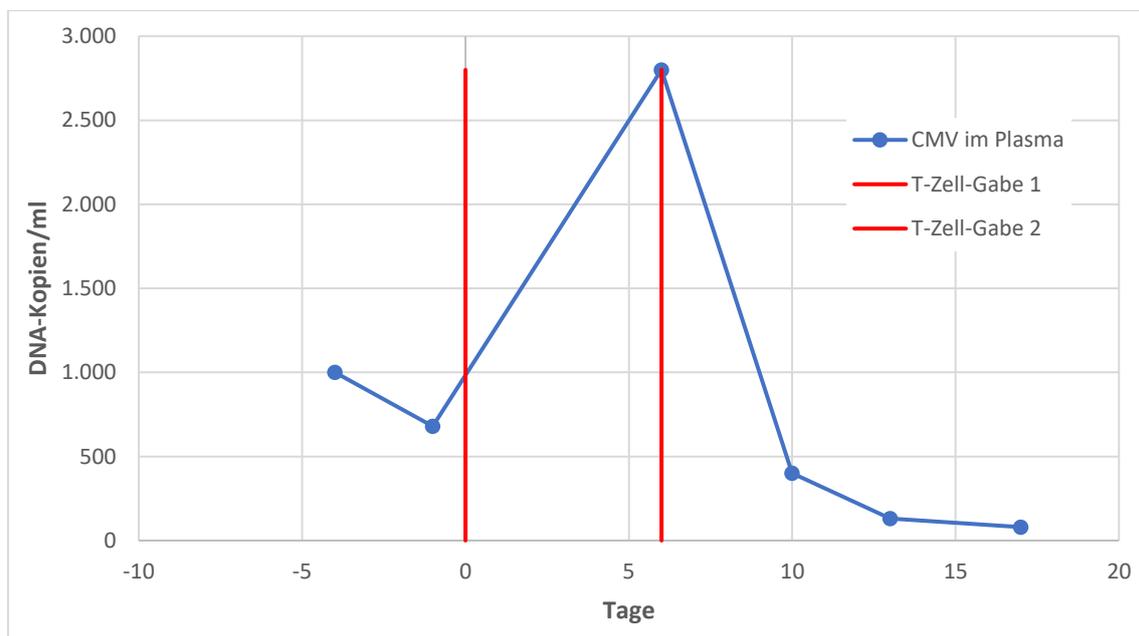


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der Viruslast und T-Zell-Gaben während der CMV-Infektion von Patient Nr.22

Patient Nr.23

Tab. 30: Patientencharakteristika des Patienten Nr.23

Hauptdiagnose	Akute lymphatische Leukämie
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 12/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	EBV
Viruspezifische Symptome	keine
Viruspezifische T-Zellen	EBV-spezifisch, 6.730 T-Zellen/ kg KG, 02/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®

Nach einer anfänglichen EBV-Last von 44.000 DNA-Kopien/ ml an Tag -4 sank diese bis Tag 3 auf 1000. Daraufhin stieg sie bis auf ein Maximum von 85.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 24. Ab Tag 38 war wieder eine Reduktion zu erkennen (2.300 DNA-Kopien/ ml), bis an Tag 51 eine Kuration eintrat. Bis Tag 381 kam es zu keinem Virusrezidiv.

Zusätzlich wurde an den Tagen -9, -2, 7 und 17 mit Rituximab therapiert.

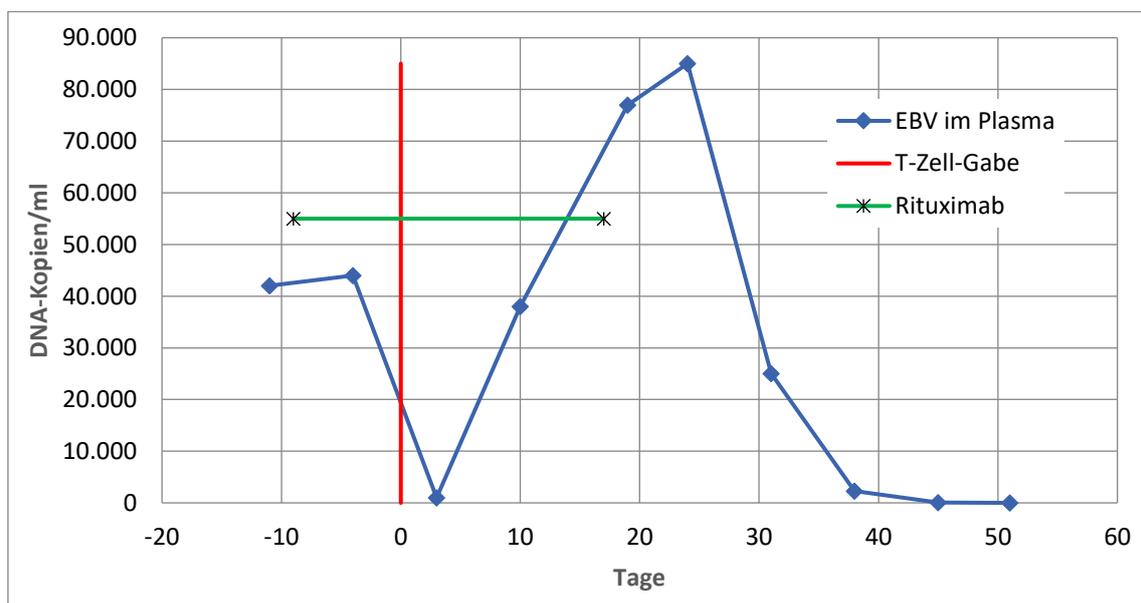


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der EBV-Infektion von Patient Nr.23

Patient Nr.24

Tab. 31: Patientencharakteristika des Patienten Nr.24

Hauptdiagnose	Konnatales Knochenmarksversagen
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 01/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV und EBV
Virusspezifische Symptome	keine
Virusspezifische T-Zellen	CMV- & EBV-spezifisch, Third Party, 34.360 T-Zellen/ kg KG, 11/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®

Der Patient wurde mit CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen behandelt.

Vor Gabe konnte eine maximale CMV-Last von 35.000 DNA-Kopien/ ml an Tag -5 gesehen werden. Bereits an Tag 2 reduzierte sich diese und fiel bis Tag 11 auf 210 DNA-Kopien/ ml.

Eine Virämie mit EBV war nur einmalig an Tag 11 gemessen worden (7.600 DNA-Kopien/ ml). Bis zum Tod an Tag 24 (ARDS) wurde kein erneuter CMV-Anstieg registriert; EBV Messungen blieben aus. Die Todesursache kann mit der Virusinfektion in Zusammenhang gebracht werden.

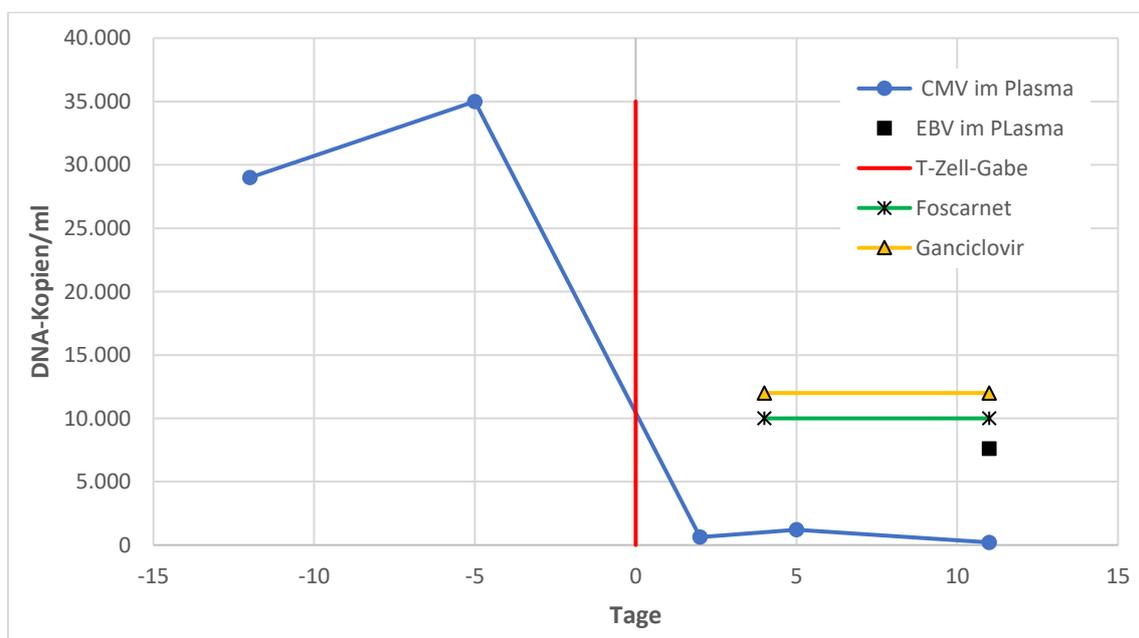


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV- und EBV-Infektion von Patient Nr.24

Patient Nr.25

Tab. 32: Patientencharakteristika des Patienten Nr.25

Hauptdiagnose	Myelodysplastisches Syndrom
Transplantation	HLA-identischer Fremdspender 08/2016
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV und EBV
Virusspezifische Symptome	Pneumonie
Virusspezifische T-Zellen	CMV- & EBV-spezifisch, Third Party, 50.000 T-Zellen/ kg KG, 10/2016
Immunsuppression	Cortison, Metotrexat, Ciclosporin A, ATG Fresenius S®
Klinik	keine Veränderung der Symptome

Bei diesem Patienten lagen Infektionen mit CMV und EBV vor.

Die CMV-Last hatte an Tag -2 ihr Maximum erreicht (4.100.000 DNA-Kopien/ml) und reduzierte sich ab Tag 4. An Tag 11 hatte sie mit 130.000 DNA-Kopien/ml ihr Minimum erreicht.

Die EBV-Last fiel von Tag -3 (24.000 DNA-Kopien/ml) kontinuierlich, sodass sie an Tag 11 mit 150 DNA-Kopien/ml kaum nachweisbar war.

An Tag 12 verstarbt der Patient an Multiorganversagen, welches mit den Infektionen assoziiert werden kann.

Zusätzlich wurden Rituximab (Tag -3), Foscarnet und Ganciclovir (jeweils von Tag -8 bis 11) zur antiviralen Therapie verabreicht.

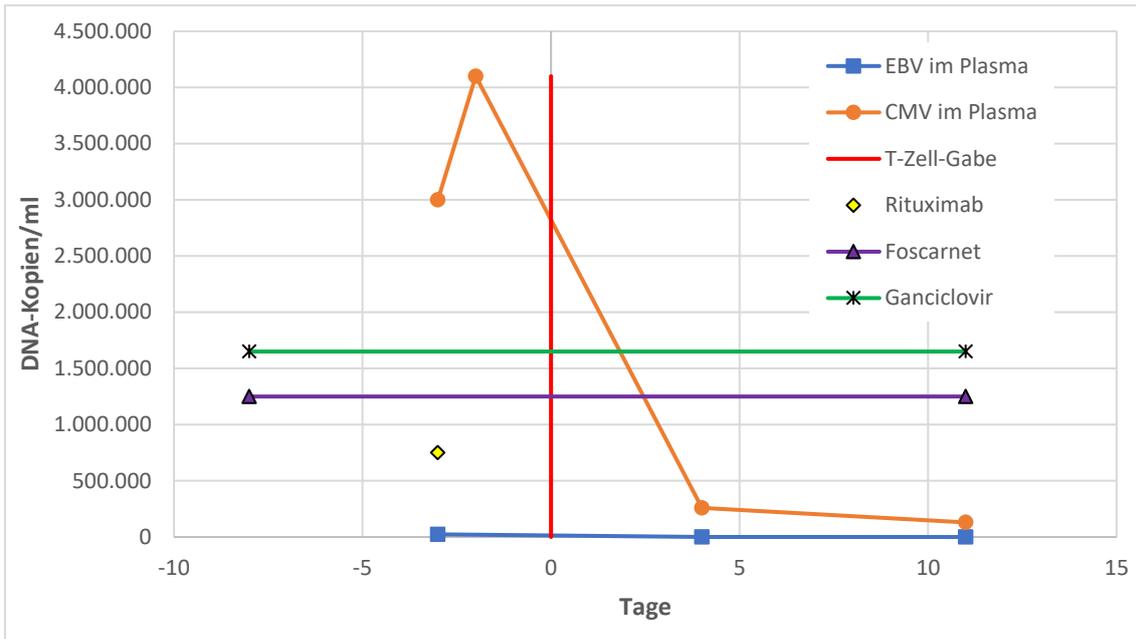


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gabe und zusätzlicher Virostatika während der CMV- und EBV-Infektion von Patient Nr.25

Patient Nr.26

Tab. 33: Patientencharakteristika des Patienten Nr.26

Hauptdiagnose	Sichelzellanämie
Transplantation	haploidentisches Elternteil 11/2015
GvHD	nicht aufgetreten
Virusinfektion	CMV
Viruspezifische Symptome	Pneumonie
Viruspezifische T-Zellen	Fünf Mal CMV-spezifisch, 9.554/ 3.958/ 3.960/ 7.722/ 7.733 T-Zellen/ kg KG, 02/2016 bis 04/2016
Immunsuppression	nicht dokumentiert
Klinik	zunächst Verschlechterung der Symptome

Der Patient erhielt multiple vTZ-Gaben (Tag 0, 8, 21, 35 und 70). Zusätzlich wurde mit Valganciclovir (Tag -26 bis 1) und Ganciclovir (Tag 1 bis 74) therapiert.

Vor der ersten vTZ-Gabe konnte man einen maximalen Virusanstieg im Blut bis auf 5.700.000 DNA-Kopien/ ml an Tag -9 beobachten. An Tag 0 betrug die CMV-Last noch 3.600.000. Seit Tag 7 konnte man eine deutliche Reduktion erkennen, die bis Tag 100 mit minimalen Schwankungen (maximal 270.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 18) bis auf 1.200 DNA-Kopien/ ml fiel.

Auch im Bronchialsekret waren Cytomegalieviren seit Tag 1 zu messen. Nach einem Maximum von 490.000 DNA-Kopien/ ml an Tag 1 reduzierte sich die Viruslast schnell ab Tag 5 (2.200 DNA-Kopien/ ml) und blieb bis Tag 100 auf einem niedrigen Niveau.

Der Proband starb an Tag 100 nicht virusbedingt. Eine vollständige Kuration konnte nicht erreicht werden.

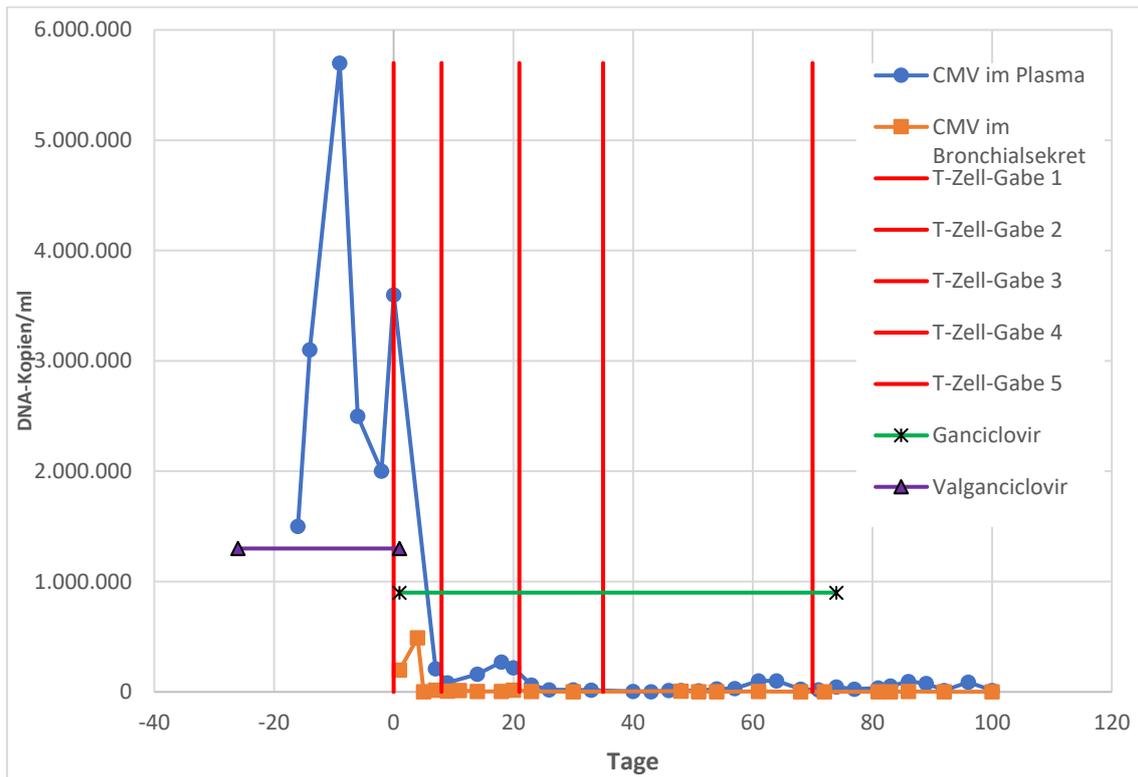


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf der Viruslast, T-Zell-Gaben und zusätzlicher Virostatika während der CMV- Infektion von Patient Nr.26

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studie konnten die zuvor formulierten Hypothesen bestätigt werden. In den folgenden Kapiteln werden die Hypothesen genauer erörtert und in den wissenschaftlichen Kontext gebracht.

4.2 Verlässliche Produktion mit dem *CliniMACS-Prodigy*®

Die wissenschaftliche Untersuchung konnte zeigen, dass die Produktion von vTZ mit Hilfe des *CliniMACS-Prodigy*® zuverlässig, schnell und effektiv vonstattenging. Es war für alle Patienten der Kohorte möglich vTZ in ausreichender Anzahl zu generieren. Eine Reinheit von 77 % im Median, sowie eine *Recovery* von durchschnittlich 81 % spiegelt die Effizienz der Produktion wider.

Ähnlich zufriedenstellend äußerten sich Kállay et al. (2018), die mit einem *CliniMACS-Prodigy*® unter Verwendung des gleichen Produktionsschemas vTZ für neun Patienten produziert haben. Im Vergleich zu dieser Studie separierte die Forschergruppe mit $z = 42.500$ ca. die 10-fache Menge an vTZ. Eine Reinheit oder *Recovery* wurde nicht angegeben.

Vergleicht man die Produktionsmethoden von vTZ in den Studien von Riddell et al. (1992) und Gerdemann et al. (2013) mit der automatisierten Herstellung durch den *CliniMACS-Prodigy*®, konnte eine drastische Verkürzung der Produktionsdauer beobachtet werden. Die längere Dauer resultierte maßgeblich durch die längere *in vitro* Stimulation mit Virusantigen und längere Expansionsdauer, die zwei bis 12 Wochen in Anspruch nahm. Die vTZ-Generierung via CCS des *CliniMACS-Prodigy*® verkürzt die Produktionsdauer auf 24 - 48 Stunden (Faist et al., 2019). Auch Saglio et al. (2014) verglichen die verschiedenen Produktionsmethoden und nannten das in dieser Studie angewandte Verfahren vorteilhaft.

4.3 Sicherheit der Therapie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit vTZ sicher in der Anwendung ist.

Eine toxische Wirkung konnte bei drei (9.4 %) von 34 verabreichten Dosen beobachtet werden. Dabei zeigten zwei Patienten kurz nach Therapiebeginn als einziges Symptom ein moderates Fieber bis 40 °C (Patient Nr. 8 und Nr. 17). Jedoch zeigte Proband Nr. 8 bereits vor Therapiebeginn eine erhöhte Körpertemperatur mit 38,7 °C, was daran zweifeln lässt, dass die vTZ-Therapie der Auslöser des Fiebers war.

Patient Nr. 2 war die einzige Person, die neben einem moderaten Fieber auch eine leichte Übelkeit und eine toxische Diarrhoe entwickelte. Ferner war es der einzige Patient, bei dem eine GvHD des Darms nach vTZ-Gabe dokumentiert wurde. Dies geht dem pathologischen Befund nach einer Darmbiopsie hervor. Hier ist zu diskutieren, ob es tatsächlich eine GvHD oder eine gewünschte Reaktion des mit ADV infizierten Darms auf die Therapie und somit ein Beweis für die Wirksamkeit der ADV-spezifischen T-Zellen war (Naymagon et al., 2017). Papadopoulou et al. (2014) beschrieben Vergleichbares über einen Patienten mit Cystitis nach BKV-spezifischer T-Zell-Therapie.

Abschließend kam es aber bei allen Patienten mit unerwünschten Wirkungen innerhalb von vier bis acht Wochen zu einer Besserung der Symptome. Nur die Übelkeit bei Patient Nr. 2 sistierte erst schleppend nach zehn Wochen. Hierbei ist es fraglich, ob die Übelkeit tatsächlich durch die vTZ verursacht wurde, da es sich um ein sehr unspezifisches Symptom handelt, dass möglicherweise durch andere Ursachen getriggert wurde.

Die Beobachtung zur Sicherheit der Therapie in dieser Arbeit gleicht sich mit zahlreichen Berichten aus vergleichbaren Studien.

Bereits Riddell et al. (1992) zeigten in der ersten Veröffentlichung zur Therapie mit CMV-spezifischen T-Zellen, dass keine der zwölf vTZ-Gaben zu einer akuten Toxizität, oder GvHD geführt haben.

Auch Feuchtinger et al. (2006) berichteten von keinem Fall von Toxizität nach Infusion von ADV-spezifischen T-Zellen. Lediglich einer von neu Probanden entwickelte eine GvHD der Haut (Stufe 2).

Eine weitere Studie der Universitätskinderklinik Tübingen um Icheva et al. (2013) evaluierte die Therapie mit EBV-spezifischen T-Zellen. Dabei trat lediglich bei einem von acht Studienteilnehmern eine GvHD der Haut (Stufe 1 - 2) auf; eine toxische Wirkung auf die Therapie konnte bei keinem Patienten verzeichnet werden.

In einer aktuelleren Studie untersuchten Pei et al. (2017) eine große Kohorte nach CMV-spezifischer T-Zell-Therapie. Nach 47 Dosen kam es zu keiner Toxizität oder GvHD.

Eine sichere Therapie mit multispezifischen T-Zellen konnten Kállay et al. (2018) beweisen. Keiner der drei Patienten zeigten eine toxische Reaktion oder eine GvHD auf die vTZ-Therapie.

So lässt sich abschließend zusammenfassen, dass eine Therapie mit vTZ nur in seltenen Fällen zu Nebenwirkungen führte. Wenn es eine toxische Reaktion oder eine GvHD gab, so war diese mild bis moderat und heilte meist schnell aus.

4.4 Wirksamkeit der Therapie

In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte verdeutlicht werden, dass es sich bei der Therapie mit vTZ um ein wirksames Therapieverfahren handelt.

Betrachtet man die laborchemischen Messdaten so zeigten zum Zeitpunkt des letzten *follow-ups* 20 von 26 Probanden (74 %) eine erwünschte Wirkung auf die Therapie. Die Mehrheit (44 %) konnte eine oder mehrere Virusinfektionen kurieren, während 30 % der Patienten zumindest eine Viruslastreduktion von ≥ 1 \log_{10} -Stufe schafften.

Von ähnlichen Ergebnissen berichteten zahlreiche vergleichbare Studien.

Pei et al. (2017) konnten durch die vTZ-Therapie 27 von 32 Patienten von einer CMV-Infektion kurieren.

Leen et al. (2013) kurierten 100 % der elf Studienteilnehmer mit Hilfe multispezifischer T-Zellen.

Feuchtinger et al. (2006) konnten bei fünf von sechs Patienten nach ADV-spezifischer T-Zell-Therapie eine Wirkung beobachten. 2010 konnten sie das Ergebnis bei 15 von 18 Probanden nach Gabe CMV-spezifischer T-Zellen reproduzieren (Feuchtinger et al., 2010).

Icheva et al. (2013) beschrieb eine Wirkung von EBV-spezifischen T-Zellen bei acht von zehn Studienteilnehmern.

Die Studien von Feucht et al. (2013) und Käuferle et al. (2019) konnten in einer Metaanalyse die Wirksamkeit der vTZ-Therapie, durch die Analyse von Studien im Zeitraum 1992 - 2018, belegen.

Dabei zeigten die vTZ in dieser Studie ihre Wirkung schnell. Innerhalb von zwei bis vier Wochen kam es bei 58 % der Patienten zu einer Virusreduktion, mit einem Median von $z=24$ Tagen. Nach acht Wochen zeigten 83 % die gewünschte Reduktion.

Bei der Kuration verhielt es sich anders. Mit einem Median von $z=63$ Tagen dauerte eine Kuration im Vergleich zur Reduktion mehr als doppelt so lang.

In der Studie von Feuchtinger et al. (2010) konnte ein ähnliches Ergebnis beschrieben werden. Eine Reduktion bzw. Kuration dauerten drei bis acht Wochen. Auch bei Pei et al. (2017) kam es nach vier Wochen zur Kuration.

Eine schnelle Virusreduktion zeigte die Studie von Kállay et al. (2018), bei der es vier bis sieben Tage dauerte. Die Forschungsgruppe vermutete, dass die schnelle Wirkung mit den zusätzlich verabreichten Virostatika zusammenhing.

Bezieht man die Wirkung auf die Symptome mit ein so zeigt sich, dass insgesamt bei 62 % der Symptome eine Besserung eintrat. Die Mehrzahl der Symptome (43 %) besserte sich schnell innerhalb von 4 - 8 Wochen. Eine Symptomverschlechterung konnte nur bei 17 % gesehen werden.

Dies ähnelt der Beobachtung von Kállay et al. (2018), bei denen acht von neun Patienten nach Therapie asymptomatisch wurden.

Die Anzahl der Virusinfektionsrezidive betrug 17 % ($n=2$ von 12 kurierten Patienten) und soll im Folgenden näher erörtert werden.

Betrachtet man Patient Nr. 5 fällt eine Besonderheit auf. Das Probematerial dieses Probanden war das Einzige, das in einem Labor untersucht wurde, wo eine Nachweisgrenze von ≥ 20 DNA-Kopien/ ml bestand. So lassen sich die Messungen der sehr geringen Viruslast (maximal 105 DNA-Kopien/ ml) erklären. Es lässt die Frage offen, ob eine so geringe Viruslast und ein Rezidiv in der Größenordnung überhaupt klinische Relevanz haben. Patient Nr. 5 hatte zu keinem Zeitpunkt CMV-typische Symptome entwickelt.

Bei Patient Nr. 6 zeigte sich zunächst eine Kuration der Virusinfektion ab Tag 18 nach vTZ-Therapie, was als erfolgreiche Therapie interpretiert werden kann. Warum es ab Tag 186 bis 330 erneut zu einem Virusanstieg und dann untherapiert wieder zur Kuration kam, kann abschließend nur gemutmaßt werden.

Einerseits kann dies bedeuten, dass die vTZ-Therapie bei diesem Patienten zu keiner Langzeit-Immunität gegen EBV geführt hat. Das Potenzial, dass die vTZ einen Schutz vor Virusinfektionen bergen, wurde erstmals von Riddell et al. (1992) beschrieben. Hier infundierte man drei Risikopatienten protektiv mit CMV-spezifischen T-Zellen. Keiner der Probanden zeigte ein CMV-Virämie oder eine CMV-Pneumonie. Walter et al. (1995) konnten das Ergebnis mit elf Probanden reproduzieren. Rooney und Leen (2012) beschrieben Vergleichbares bei sieben durchgeführten EBV-Prophylaxen. Auch Feuchtinger et al. (2006) sahen eine protektive Wirkung bei ADV-spezifischen T-Zellen.

Andererseits kann aufgrund der niedrigen Viruslast (knapp über 1.000 DNA-Kopien/ ml) vermutet werden, dass immer noch eine vTZ-Aktivität vorhanden war. Möglicherweise wurde diese aber durch den Einsatz von z.B. Immunsuppressiva, die die T-Zell-Funktion einschränken, kompromittiert (Cain and Cidlowski, 2017). Da genauere Daten zu diesem Zeitpunkt nicht vorliegen, kann die Ursache abschließend nicht geklärt werden.

Da es sich bei der Behandlung mit vTZ um eine experimentelle Therapie handelt, wurden die Patienten in dieser, aber auch in den bereits genannten Studien zusätzlich mit den virustypischen Virostatika therapiert [in dieser Studie Aciclovir, (Brin)Cidofovir, (Val)Ganciclovir, Foscarnet, Ribavirin, Rituximab]. So kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung der vTZ ein Zusammenspiel mit

der Wirkung der Virostatika war. Diese Interpretation könnte auf Patient Nr. 2, 4, 8, 12, 13, 16, 18, 21, 24, 25 und 26 zutreffen.

Dem entgegen standen Patienten, die trotz Virostatika eine steigende Viruslast hatten und erst nach vTZ-Therapie eine Besserung der Virämie zeigten. Patienten Nr. 16, 23, 25, 26 zeigten diesen Verlauf. Bei diesen Patienten schien erst die vTZ-Therapie die Virusinfektion einzudämmen.

4.5 Interpretation der Korrelationsanalyse

Die Auswertung der Korrelationsanalyse konnte mit einem p-Wert von $p=0.439$ keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Dosis und der Wirkung der vTZ zeigen ($p\text{-Wert} \geq 0.05$ des Signifikanzniveaus). Unabhängig von der Höhe der Dosis (Range: $0,8 - 50 \times 10^3 \text{ vTZ / kg}$; $z= 7.987 \text{ vTZ / kg}$) konnte eine Wirkung beobachtet bzw. nicht beobachtet werden.

Es konnte keine Mindest- bzw. Maximaldosis ermittelt werden, die zu einer gewünschten bzw. unerwünschten Wirkung geführt hat. Ähnliches konnten Papadopoulou et al. (2014) feststellen.

Vergleicht man die verabreichten Dosen aus vergangenen Studien so lässt sich dieses Ergebnis reproduzieren. Riddell et al. (1992) konnten die Wirksamkeit nach der hohen Zahl von $3,3 \times 10^7 - 10^9 \text{ vTZ / m}^2$ beschreiben. Auch Leen et al. (2006) ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^8 \text{ vTZ / m}^2$) und Withers et al. (2018) ($z= 2 \times 10^7 \text{ vTZ / m}^2$) therapierten erfolgreich mit hohen Dosen. Cobbold et al. (2005) konnte erstmals zeigen, dass auch geringere Dosen eine gewünschte Wirkung erzielen können. Mit $1,2 - 33 \times 10^3 \text{ vTZ / kg}$ war diese um ein Vielfaches geringer als die von Riddell et al. (1992) und vergleichbar mit den Dosen dieser Arbeit. Auch Icheva et al. (2013) ($z= 5,7 \times 10^3 \text{ vTZ / kg}$) und Feucht et al. (2015) ($z= 4,1 \times 10^3 \text{ vTZ / kg}$) therapierten erfolgreich mit geringeren Dosen.

4.6 Gesamtsterblichkeit

Trotz der bereits erwähnten Erfolge der vTZ-Therapie handelt es sich bei den Studienteilnehmern um ein vulnerables Patientenkollektiv mit einer hohen Gesamtsterblichkeit. Das mediane Überleben betrug $z= 73$ Tage.

Die Notwendigkeit, die Virusinfektion schnell und suffizient zu behandeln zeigt folgendes Ergebnis der Arbeit:

Konnte der Virusinfekt nicht unter Kontrolle gebracht werden lag die Sterblichkeit nach 100 Tagen bei 100 %. Die acht betroffenen Patienten verstarben im Median nach $z= 34,5$ Tagen. Konnte die Viruslast aber zumindest reduziert, wenn nicht sogar kuriert werden, so verlängerte sich die Überlebensdauer um mehr als das Dreifache (Überleben $z= 130$ Tage). Mit einem p-Wert von $p= 0.006$ zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

Ähnliches schilderten Feucht et al. (2015). Nach Therapieansprechen betrug das Gesamtüberleben nach sechs Monaten 71 %. Dem gegenüber stand eine 100%ige Sterblichkeit innerhalb von $z= 24$ Tagen bei Therapieversagen.

Es zeigte sich, dass der Tod von fünf Probanden (Nr. 1, 9, 22, 24, 25) trotz Kontrolle des Virus mit der Infektion in Verbindung gebracht werden konnte. Alle verstarben früh nach vTZ-Therapie (Range: 12 - 24 Tage, $z= 19$ Tage) und zeigten Organmanifestationen der Virusinfektionen (Multiorganversagen, Pneumonie). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es Einschränkungen in der Wirksamkeit der Therapie gibt. So können diese Einschränkung eine zu hohe Viruslast ≥ 100.000 DNA-Kopien/ ml (siehe Patienten Nr.3, 8, 14) oder, wie oben beschrieben, Organmanifestationen sein.

Ähnliches beschrieben Moosmann et al. (2010) in ihrer Studie mit EBV-spezifischen T-Zellen. Die Therapie schien am besten zu wirken, wenn sie schnell verabreicht wurde, noch bevor die Virusinfektion weit fortgeschritten war und Organe befallen hatte. Die drei von sechs Verstorbenen starben infolge einer EBV-Infektion zwischen ein und elf Tagen nach Therapiebeginn. Zusätzlich beschrieben Feucht et al. (2015), dass in ihrer Studie eine Kuration schneller zu sehen war, wenn die Viruslast ≤ 100.000 DNA-Kopien/ ml war.

Bis zum letzten *follow-up* verstarben in dieser Studie 69 % aller Patienten. Bei der Hälfte der Patienten kann die Todesursache in Zusammenhang mit einer Virusinfektion gebracht werden.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen Feuchtinger et al. (2010), als sie beobachteten, dass neun ihrer 18 Patienten virus-assoziiert verstarben.

Auch die Studie von Neuenhahn et al. (2017) zeigte eine Gesamtmortalität von 50 %. Jedoch lag die CMV-assoziierte Mortalität nach sechs Monaten nur bei 12.5 % bei den insgesamt 16 Probanden.

Kállay et al. (2018) berichtete Gegenteiliges. Von insgesamt neun Patienten überlebten sechs Personen mit einem medianen *follow-up* von 535 Tagen. Dabei verstarb nur ein Studienteilnehmer infolge einer Virusinfektion.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich durch die jeweils kleinen und heterogenen Studiengruppen erklären.

4.7 Ausblick

4.7.1 Verbesserung für künftige Studien

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde ein kleines und heterogenes Patientenkollektiv retrospektiv ausgewertet, welches dezentral in zehn verschiedene Universitätskliniken deutschlandweit behandelt wurde. Die dadurch entstanden Probleme, können in zukünftigen Forschungen verbessert werden.

Einerseits erwies sich die Datensammlung als langwierig und teilweise lückenhaft. Die Rücklaufquote der ausreichend ausgefüllten Fragebögen lag bei 77.3 %, was die bereits kleine Patientengruppe noch weiter einengte. Andererseits wurden die klinischen Fragebögen zur Evaluierung der Virussympptomatik und deren Dynamik nach vTZ-Therapie erst im Nachhinein, zum Teil bis zu zwei Jahre nach Therapiebeginn, ausgefüllt. Von einer korrekten Ausfüllung musste ohne weitere Kontrolle ausgegangen werden.

Zusätzlich waren jeweils verschiedene Labore mit der Analyse der Probematerialien beauftragt, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwerte.

Auch konnte aufgrund lückenhafter Datenerfassung keine Aussage zur vTZ-Rekonstitution gemacht werden. So ließ sich dieser Aspekt nicht mit Ergebnissen anderer Studien vergleichen, die Rückschlüsse auf eine mögliche Immunität vor Virusinfektionen zogen (Riddell et al., 1992; Feucht et al., 2013; Tzannou et al., 2017; Pei et al., 2017).

Eine mögliche Lösung, um die Aussagekraft bezüglich der Therapie mit vTZ zu verstärken, wäre ein prospektives Studiendesign und eine zentrale Datensammlung in Studienregistern. Ziel wäre es standardisierte Patientendaten zeitnah nach Therapie zu sammeln und so die Vergleichbarkeit mit ähnlichen Studien zu verbessern. So wäre es z.B. auch möglich Aussagen über die Dynamik in der Anzahl von vTZ im Patienten vor und nach Therapie mit produzierten vTZ zu machen.

4.7.2 Anregungen für zukünftige Forschungsprojekte

Bei allen bereits genannten Vorteilen der Therapie mit vTZ handelt sich dennoch um eine experimentelle Therapie, die einige Einschränkungen beinhaltet.

So ist die Produktion auf wenige GMP-Labore limitiert, die den strikten europäischen ATMP- (*Advanced Therapy Medicinal Products*) Standards unterliegen (Faist et al., 2019). Des Weiteren sind die Patienten in vielen Fällen auf eine Spendersuche angewiesen, die Produktionskosten sind hoch (Tzannou et al., 2017; Migliori et al., 2018) und von der Produktion bis zum Wirkungseintritt der vTZ verstreicht eine gewisse Zeit, die therapieentscheidend sein kann, wie diese Studie gezeigt hat. So starben z.B. drei Probanden unmittelbar, bzw. einen Tag nach vTZ-Gabe. Für das Outcome der Patienten wäre es wichtig eine Therapie schnell zu starten (Moosmann et al., 2010).

Ein Lösungsansatz könnte die Etablierung von virusspezifischen T-Zell-Spenderbanken sein, wie Haque et al. (2007) sie bereits beschrieben haben. Dass eine Spenderbank erfolgreiche Ergebnisse erzielt zeigten Withers et al. (2018) mit 23 Kurationen und fünf Patienten mit Teilwirkung von insgesamt 30 Studienteilnehmern. So könnte eine schnelle und kosteneffizientere Verfügbarkeit der Therapie erreicht werden.

Das Ziel sollte weg von einer experimentellen Therapie gegen diverse Viren, hin zu einer Standardtherapie gehen.

In unserer Studie wurden spezifische T-Zellen gegen ADV, CMV und EBV produziert und untersucht. In künftigen Studien könnte die vTZ-Produktion auf weitere Viren erweitert werden. Als Beispiel erweiterten Tzannou et al. (2017) ihr Spektrum um BKV- und HHV-6-spezifische T-Zellen.

5. Zusammenfassung

Trotz bahnbrechender Erfolge in der Behandlung von HSZT in den letzten Jahrzehnten bleiben ADV-, CMV- und EBV-Infektionen weiterhin eine große Gefahr und sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert.

Die Behandlung dieser Infektionen mit antiviralen Pharmazeutika wird standardmäßig angewandt, steht jedoch wegen der teils mangelnden Wirkung und der möglichen schweren UAWs in der Kritik.

Wie eine Vielzahl von Studien gezeigt hat kann den betroffenen Patienten durch eine Immuntherapie mit vTZ eine wirkungsvolle und sichere Alternativtherapie angeboten werden.

Das KMT-Labor der Universitätskinderklinik Tübingen produziert diese vTZ vollautomatisch mit Hilfe des *CliniMACS-Prodigy*® der Firma Miltenyi Biotec.

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit bestand darin, Aussagen über die Effektivität der Generierung von ADV-, CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen mit dem *CliniMACS-Prodigy*® zu machen. Außerdem sollten Rückschlüsse über die Wirkung, sowie UAWs der Therapie gemacht werden.

Methodik:

Die untersuchte Kohorte bestand aus 31 Patienten deutschlandweit, sowie sechs Patienten des Universitätsklinikums Tübingen und der Charité Berlin, für die zwischen dem 01.01.2015 - 31.12.2017 vTZ produziert wurden. Von der Studie ausgeschlossen wurden 16 Patienten, von denen die vTZ kryokonserviert wurden, Daten fehlten oder es frühzeitig zum Tod kam.

Mit den Programmen *Microsoft Excel 2019*® und *Graphpad PRISM*® konnten zuvor ermittelte Daten über Produktionsdaten der vTZ, Viruslasten, Symptome und das Outcome der Kohorte erfasst und graphisch dargestellt werden. Mit einer anschließenden Korrelationsanalyse wurden signifikante Zusammenhänge der Dosis zur Wirkung, sowie der Viruskontrolle zum Outcome untersucht.

Ergebnis:

Die Generierung von vTZ war für jeden Patienten erfolgreich und wies eine mediane Reinheit von $z= 77.01$ %, sowie eine durchschnittliche *Recovery* von 81 % auf.

Den 26 untersuchten Patienten wurden 34 Dosen mit einem Median von $z= 7.987$ vTZ verabreicht.

Bei 83 % ($n= 15$) der Probanden kam es zu einer Virusreduktion innerhalb von zwei bis acht Wochen nach Therapiebeginn. Bei 62 % ($n= 13$) der Untersuchten besserten sich die virusspezifischen Symptome. Je 19 % (je $n= 4$) der Patienten zeigten eine Symptomverschlechterung, oder keine Veränderung. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren 44 % ($n= 12$) der Kohorte kuriert; 30 % ($n= 8$) zeigten eine Besserung der Infektion. Bei 26 % ($n= 7$) der Patienten hatte sich die Infektion verschlechtert. Es kam bei 17 % der Probanden ($n= 2$ von 12) zu einem Virusrezidiv.

Nach 9.4 % der vTZ-Gaben ($n= 3$) kam es zu einer akuten Toxizität.

3 % der Gaben ($n= 1$) führten zu einer akuten Darm-GvHD.

Zum letzten *follow-up* waren 69 % ($n= 18$) der Kohorte verstorben; 50 % davon virusassoziiert.

Die Korrelationsanalysen ergaben für den Zusammenhang zwischen Wirkung der vTZ-Therapie und der verabreichten Dosis einen p-Wert von $p= 0.439$, sowie für die Korrelation zwischen Überleben und der Viruskontrolle einen p-Wert von $p= 0.006$.

Schlussfolgerung:

Nach Interpretation der Ergebnisse dieser Studie erwies sich die vTZ-Therapie als eine gut durchführbare, sichere und wirksame antivirale Immuntherapie bei Patienten nach HSZT. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen einer verabreichten vTZ-Dosis und einer Wirkung beobachtet werden. Damit konnte diese Studie die Ergebnisse zahlreicher vergleichbarer Studien reproduzieren. Die vTZ-Generierung mit dem *CliniMACS-Prodigy*® zeigte sich als verlässliches und effektives Verfahren, welches vor allem zeitliche Vorteile im Vergleich mit anderen Produktionsverfahren bot.

Bei dem insgesamt vulnerablen Patientenkollektiv konnten wir zeigen, dass es von essenzieller Bedeutung für die Überlebensdauer war, die Virusinfektion so früh wie möglich unter Kontrolle zu bekommen. Daher sollte eine vTZ-Gabe zusätzlich zu den gängigen Virostatika früh gegeben werden, bevor eine zu hohe Viruslast erreicht wurde oder es zu Organmanifestationen gekommen ist.

6. Literaturverzeichnis

- ALLEN, U., PREIKSAITIS, J. & PRACTICE, T. A. I. D. C. O. 2009. Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 9, S87-S96.
- ALLEN, U. D. & PREIKSAITIS, J. K. 2013. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*, 13 Suppl 4, 107-20.
- BLUT, A. 2010. Humanes Cytomegalievirus (HCMV). Robert Koch-Institut.
- BOECKH, M. & NICHOLS, W. G. 2004. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*, 103, 2003-8.
- CAIN, D. W. & CIDLOWSKI, J. A. 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*, 17, 233-247.
- CANNON, M. J., SCHMID, D. S. & HYDE, T. B. 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*, 20, 202-13.
- CHAKRABARTI, S., MAUTNER, V., OSMAN, H., COLLINGHAM, K. E., FEGAN, C. D., KLAPPER, P. E., MOSS, P. A. & MILLIGAN, D. W. 2002. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood*, 100, 1619-27.
- CHEN, K., CHENG, M. P., HAMMOND, S. P., EINSELE, H. & MARTY, F. M. 2018. Antiviral prophylaxis for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv*, 2, 2159-2175.
- CHO, S. Y., LEE, D. G. & KIM, H. J. 2019. Cytomegalovirus Infections after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Current Status and Future Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 20.
- CHOQUET, S., OERTEL, S., LEBLOND, V., RIESS, H., VAROQUEAUX, N., DÖRKEN, B. & TRAPPE, R. 2007. Rituximab in the management of post-transplantation lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation: proceed with caution. *Ann Hematol*, 86, 599-607.
- COBBOLD, M., KHAN, N., POURGHEYSARI, B., TAURO, S., MCDONALD, D., OSMAN, H., ASSENMACHER, M., BILLINGHAM, L., STEWARD, C., CRAWLEY, C., OLAVARRIA, E., GOLDMAN, J., CHAKRAVERTY, R., MAHENDRA, P., CRADDOCK, C. & MOSS, P. A. H. 2005. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 379-386.
- COHEN, J. I., DROPULIC, L., HSU, A. P., ZERBE, C. S., KROGMANN, T., DOWDELL, K., HORNUNG, R. L., LOVELL, J., HARDY, N., HICKSTEIN, D., COWEN, E. W., CALVO, K. R., PITTALUGA, S. & HOLLAND, S. M. 2016. Association of GATA2 Deficiency With Severe Primary Epstein-Barr Virus (EBV) Infection and EBV-associated Cancers. *Clin Infect Dis*, 63, 41-7.
- CUNDY, K. C. 1999. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin Pharmacokinet*, 36, 127-43.
- DAVISON, A. J., BENKÓ, M. & HARRACH, B. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 84, 2895-2908.
- DE JONG, M. D., GALASSO, G. J., GAZZARD, B., GRIFFITHS, P. D., JABS, D. A., KERN, E. R. & SPECTOR, S. A. 1998. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res*, 39, 141-62.
- EDDLESTON, M., PEACOCK, S., JUNIPER, M. & WARRELL, D. A. 1997. Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*, 24, 52-6.

- EPSTEIN, M. A., HENLE, G., ACHONG, B. G. & BARR, Y. M. 1965. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J Exp Med*, 121, 761-70.
- FAIST, B., SCHLOTT, F., STEMBERGER, C., DENNEHY, K. M., KRACKHARDT, A., VERBEEK, M., GRIGOLEIT, G. U., SCHIEMANN, M., HOFFMANN, D., DICK, A., MARTIN, K., HILDEBRANDT, M., BUSCH, D. H. & NEUENHAHN, M. 2019. Targeted in-vitro-stimulation reveals highly proliferative multi-virus-specific human central memory T cells as candidates for prophylactic T cell therapy. *PLoS One*, 14, e0223258.
- FEUCHT, J., JOACHIM, L., LANG, P. & FEUCHTINGER, T. 2013. Adoptive T-cell transfer for refractory viral infections with cytomegalovirus, Epstein-Barr virus or adenovirus after allogeneic stem cell transplantation. *Klin Padiatr*, 225, 164-9.
- FEUCHT, J., OPPERK, K., LANG, P., KAYSER, S., HARTL, L., BETHGE, W., MATTHES-MARTIN, S., BADER, P., ALBERT, M. H., MAECKER-KOLHOFF, B., GREIL, J., EINSELE, H., SCHLEGEL, P. G., SCHUSTER, F. R., KREMENS, B., ROSSIG, C., GRUHN, B., HANDGRETINGER, R. & FEUCHTINGER, T. 2015. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood*, 125, 1986-94.
- FEUCHTINGER, T., MATTHES-MARTIN, S., RICHARD, C., LION, T., FUHRER, M., HAMPRECHT, K., HANDGRETINGER, R., PETERS, C., SCHUSTER, F. R., BECK, R., SCHUMM, M., LOTFI, R., JAHN, G. & LANG, P. 2006. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 134, 64-76.
- FEUCHTINGER, T., OPPERK, K., BETHGE, W. A., TOPP, M. S., SCHUSTER, F. R., WEISSINGER, E. M., MOHTY, M., OR, R., MASCHAN, M., SCHUMM, M., HAMPRECHT, K., HANDGRETINGER, R., LANG, P. & EINSELE, H. 2010. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*, 116, 4360-7.
- GARDNER, P. S. 1968. Virus infections and respiratory disease of childhood. *Arch Dis Child*, 43, 629-45.
- GERABEK, W. E., HAAGE, B. D. & KEIL, G. 2007. *Enzyklopädie Medizingeschichte*, De Gruyter.
- GERDEMANN, U., CHRISTIN, A. S., VERA, J. F., RAMOS, C. A., FUJITA, Y., LIU, H., DILLOO, D., HESLOP, H. E., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & LEEN, A. M. 2009. Nucleofection of DCs to Generate Multivirus-specific T Cells for Prevention or Treatment of Viral Infections in the Immunocompromised Host. *Molecular Therapy*, 17, 1616-1625.
- GERDEMANN, U., KATARI, U. L., PAPADOPOULOU, A., KEIRNAN, J. M., CRADDOCK, J. A., LIU, H., MARTINEZ, C. A., KENNEDY-NASSER, A., LEUNG, K. S., GOTTSCHALK, S. M., KRANCE, R. A., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M., HESLOP, H. E. & LEEN, A. M. 2013. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol Ther*, 21, 2113-21.
- GERDEMANN, U., VERA, J. F., ROONEY, C. M. & LEEN, A. M. 2011. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*.
- GLUCKSBERG, H., STORB, R., FEFER, A., BUCKNER, C. D., NEIMAN, P. E., CLIFT, R. A., LERNER, K. G. & THOMAS, E. D. 1974. CLINICAL MANIFESTATIONS OF GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE IN HUMAN RECIPIENTS OF MARROW FROM HL-A-MATCHED SIBLING DONOR,S. *Transplantation*, 18, 295-304.
- GONÇALVES, C., CIPRIANO, A., VIDEIRA SANTOS, F., ABREU, M., MÉNDEZ, J. & SARMENTO, E. C. R. 2018. Cytomegalovirus acute infection with pulmonary involvement in an immunocompetent patient. *IDCases*, 14, e00445.

- GOODRICH, J. M., MORI, M., GLEAVES, C. A., DU MOND, C., CAYS, M., EBELING, D. F., BUHLES, W. C., DEARMOND, B. & MEYERS, J. D. 1991. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 325, 1601-7.
- GREEN, M. & MICHAELS, M. G. 2013. Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant*, 13 Suppl 3, 41-54; quiz 54.
- GROSS, T. G., ORJUELA, M. A., PERKINS, S. L., PARK, J. R., LYNCH, J. C., CAIRO, M. S., SMITH, L. M. & HAYASHI, R. J. 2012. Low-dose chemotherapy and rituximab for posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD): a Children's Oncology Group Report. *Am J Transplant*, 12, 3069-75.
- GUIDRY, J. T., BIRDWELL, C. E. & SCOTT, R. S. 2018. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Dis*, 24, 497-508.
- HAQUE, T., WILKIE, G. M., JONES, M. M., HIGGINS, C. D., URQUHART, G., WINGATE, P., BURNS, D., MCAULAY, K., TURNER, M., BELLAMY, C., AMLLOT, P. L., KELLY, D., MACGILCHRIST, A., GANDHI, M. K., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*, 110, 1123-31.
- HEBART, H. & EINSELE, H. 2004. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol*, 65, 432-6.
- HEEMSKERK, B., VAN VREESWIJK, T., VELTROP-DUITS, L. A., SOMBROEK, C. C., FRANKEN, K., VERHOESEL, R. M., HIEMSTRA, P. S., VAN LEEUWEN, D., RESSING, M. E., TOES, R. E. M., VAN TOL, M. J. D. & SCHILHAM, M. W. 2006. Adenovirus-Specific CD4⁺ T Cell Clones Recognizing Endogenous Antigen Inhibit Viral Replication In Vitro through Cognate Interaction. *The Journal of Immunology*, 177, 8851-8859.
- HESLOP, H. E. 2009. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, 114, 4002-8.
- HIWARKAR, P., AMROLIA, P., SIVAPRAKASAM, P., LUM, S. H., DOSS, H., O'RAFFERTY, C., PETTERSON, T., PATRICK, K., SILVA, J., SLATTER, M., LAWSON, S., RAO, K., STEWARD, C., GASSAS, A., VEYS, P., WYNN, R. & GROUP, O. B. O. T. U. K. P. B. M. T. 2017. Brincidofovir is highly efficacious in controlling adenoviremia in pediatric recipients of hematopoietic cell transplant. *Blood*, 129, 2033-2037.
- HONG, J.-Y., LEE, H.-J., PIEDRA, P. A., CHOI, E.-H., PARK, K.-H., KOH, Y.-Y. & KIM, W.-S. 2001. Lower Respiratory Tract Infections due to Adenovirus in Hospitalized Korean Children: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1423-1429.
- ICHEVA, V., KAYSER, S., WOLFF, D., TUVE, S., KYZIRAKOS, C., BETHGE, W., GREIL, J., ALBERT, M. H., SCHWINGER, W., NATHRATH, M., SCHUMM, M., STEVANOVIĆ, S., HANDGRETINGER, R., LANG, P. & FEUCHTINGER, T. 2013. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*, 31, 39-48.
- KAEUFERLE, T., KRAUSS, R., BLAESCHKE, F., WILLIER, S. & FEUCHTINGER, T. 2019. Strategies of adoptive T-cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*, 12, 13.
- KÁLLAY, K., KASSA, C., RÉTI, M., KARÁSZI, É., SINKÓ, J., GODA, V., STRÉHN, A., CSORDÁS, K., HORVÁTH, O., SZEDERJESI, A., TASNÁDY, S., 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, 158-163.

- KEENAN, R. D., AINSWORTH, J., KHAN, N., BRUTON, R., COBBOLD, M., ASSENMACHER, M., MILLIGAN, D. W. & MOSS, P. A. 2001. Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers. *Br J Haematol*, 115, 428-34.
- KIM, N., NAM, Y. S., IM, K. I., LIM, J. Y., JEON, Y. W., SONG, Y., LEE, J. W. & CHO, S. G. 2018. Robust Production of Cytomegalovirus pp65-Specific T Cells Using a Fully Automated IFN- γ Cytokine Capture System. *Transfus Med Hemother*, 45, 13-22.
- KINCHINGTON, P. R., ARAULLO-CRUZ, T., VERGNES, J. P., YATES, K. & GORDON, Y. J. 2002. Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir. *Antiviral Res*, 56, 73-84.
- LANCINI, D., FADDY, H. M., FLOWER, R. & HOGAN, C. 2014. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J Aust*, 201, 578-80.
- LEEN, A. M., BOLLARD, C. M., MENDIZABAL, A. M., SHPALL, E. J., SZABOLCS, P., ANTIN, J. H., KAPOOR, N., PAI, S. Y., ROWLEY, S. D., KEBRIAIEI, P., DEY, B. R., GRILLEY, B. J., GEE, A. P., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E. 2013. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 121, 5113-23.
- LEEN, A. M., MYERS, G. D., SILI, U., HULS, M. H., WEISS, H., LEUNG, K. S., CARRUM, G., KRANCE, R. A., CHANG, C.-C., MOLLIDREM, J. J., GEE, A. P., BRENNER, M. K., HESLOP, H. E., ROONEY, C. M. & BOLLARD, C. M. 2006. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nature Medicine*, 12, 1160-1166.
- LENAERTS, L. & NAESENS, L. 2006. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res*, 71, 172-80.
- LINDEMANS, C. A., LEEN, A. M. & BOELEN, J. J. 2010. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*, 116, 5476-85.
- LION, T. 2014. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 27, 441-62.
- LJUNGMAN, P., GRIFFITHS, P. & PAYA, C. 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34, 1094-7.
- LJUNGMAN, P., RIBAUD, P., EYRICH, M., MATTHES-MARTIN, S., EINSELE, H., BLEAKLEY, M., MACHACZKA, M., BIERINGS, M., BOSI, A., GRATECOS, N. & CORDONNIER, C. 2003. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 31, 481-6.
- LUCAS, K. G., BURTON, R. L., ZIMMERMAN, S. E., WANG, J., CORNETTA, K. G., ROBERTSON, K. A., LEE, C. H. & EMANUEL, D. J. 1998. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood*, 91, 3654-61.
- LYNCH, J. P., 3RD, FISHBEIN, M. & ECHAVARRIA, M. 2011. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*, 32, 494-511.
- MATTHES-MARTIN, S., FEUCHTINGER, T., SHAW, P. J., ENGELHARD, D., HIRSCH, H. H., CORDONNIER, C. & LJUNGMAN, P. 2012. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis*, 14, 555-63.
- MIGLIORI, E., CHANG, M. & MURANSKI, P. 2018. Restoring antiviral immunity with adoptive transfer of ex-vivo generated T cells. *Curr Opin Hematol*, 25, 486-493.
- MITCHELL, L. S., TAYLOR, B., REIMELS, W., BARRETT, F. F. & DEVINCENZO, J. P. 2000. Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19, 996-1000.

- MOOSMANN, A., BIGALKE, I., TISCHER, J., SCHIRRMANN, L., KASTEN, J., TIPPMER, S., LEEPING, M., PREVALSEK, D., JAEGER, G., LEDDEROSE, G., MAUTNER, J., HAMMERSCHMIDT, W., SCHENDEL, D. J. & KOLB, H. J. 2010. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*, 115, 2960-70.
- NASEEM, M., BARZI, A., BREZDEN-MASLEY, C., PUCCINI, A., BERGER, M. D., TOKUNAGA, R., BATTAGLIN, F., SONI, S., MCSKANE, M., ZHANG, W. & LENZ, H. J. 2018. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev*, 66, 15-22.
- NAYMAGON, S., NAYMAGON, L., WONG, S. Y., KO, H. M., RENTERIA, A., LEVINE, J., COLOMBEL, J. F. & FERRARA, J. 2017. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14, 711-726.
- NEUENHAHN, M., ALBRECHT, J., ODENDAHL, M., SCHLOTT, F., DÖSSINGER, G., SCHIEMANN, M., LAKSHMIPATHI, S., MARTIN, K., BUNJES, D., HARSODORF, S., WEISSINGER, E. M., MENZEL, H., VERBEEK, M., UHAREK, L., KRÖGER, N., WAGNER, E., KOBBE, G., SCHROEDER, T., SCHMITT, M., HELD, G., HERR, W., GERMEROOTH, L., BONIG, H., TONN, T., EINSELE, H., BUSCH, D. H. & GRIGOLEIT, G. U. 2017. Transfer of minimally manipulated CMV-specific T cells from stem cell or third-party donors to treat CMV infection after allo-HSCT. *Leukemia*, 31, 2161-2171.
- NOWALK, A. & GREEN, M. 2016. Epstein-Barr Virus. *Microbiol Spectr*, 4.
- PACINI, D. L., COLLIER, A. M. & HENDERSON, F. W. 1987. Adenovirus Infections and Respiratory Illnesses in Children in Group Day Care. *The Journal of Infectious Diseases*, 156, 920-927.
- PAPADOPOULOU, A., GERDEMANN, U., KATARI, U. L., TZANNOU, I., LIU, H., MARTINEZ, C., LEUNG, K., CARRUM, G., GEE, A. P., VERA, J. F., KRANCE, R. A., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M., HESLOP, H. E. & LEEN, A. M. 2014. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med*, 6, 242ra83.
- PEGGS, K. S., THOMSON, K., SAMUEL, E., DYER, G., ARMOOGUM, J., CHAKRAVERTY, R., PANG, K., MACKINNON, S. & LOWDELL, M. W. 2011. Directly Selected Cytomegalovirus-Reactive Donor T Cells Confer Rapid and Safe Systemic Reconstitution of Virus-Specific Immunity Following Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 49-57.
- PEI, X. Y., ZHAO, X. Y., CHANG, Y. J., LIU, J., XU, L. P., WANG, Y., ZHANG, X. H., HAN, W., CHEN, Y. H. & HUANG, X. J. 2017. Cytomegalovirus-Specific T-Cell Transfer for Refractory Cytomegalovirus Infection After Haploidentical Stem Cell Transplantation: The Quantitative and Qualitative Immune Recovery for Cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 216, 945-956.
- PENG, Z., LI, C. & HE, Y. 2014. Rituximab in the Treatment of Epstein-Barr Virus Infection after hematopoietic stem cell Transplantation in Children. *Blood*, 124, 5892-5892.
- RAFALIDIS, P. I., MOURTZOUKOU, E. G., VARBOBITIS, I. C. & FALAGAS, M. E. 2008. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology*, 5, 47.
- REA, T. D., RUSSO, J. E., KATON, W., ASHLEY, R. L. & BUCHWALD, D. S. 2001. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J Am Board Fam Pract*, 14, 234-42.
- RIDDELL, S. R., WATANABE, K. S., GOODRICH, J. M., LI, C. R., AGHA, M. E. & GREENBERG, P. D. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257, 238-41.
- ROONEY, C. & LEEN, A. 2012. Moving Successful Virus-specific T-cell Therapy for Hematopoietic Stem Cell Recipients to Late Phase Clinical Trials. *Mol Ther Nucleic Acids*, 1, e55.
- ROSS, S. A., NOVAK, Z., PATI, S. & BOPPARA, S. B. 2011. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*, 11, 466-74.

- ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., GILMORE, L. K., PARROTT, R. H. & WARD, T. G. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84, 570-3.
- SAGLIO, F., HANLEY, P. J. & BOLLARD, C. M. 2014. The time is now: moving toward virus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as the standard of care. *Cytotherapy*, 16, 149-59.
- SALZBERGER, B., BOWDEN, R. A., HACKMAN, R. C., DAVIS, C. & BOECKH, M. 1997. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood*, 90, 2502-8.
- SMATTI, M. K., AL-SADEQ, D. W., ALI, N. H., PINTUS, G., ABOU-SALEH, H. & NASRALLAH, G. K. 2018. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*, 8, 211.
- SMITH, I. L., CHERRINGTON, J. M., JILES, R. E., FULLER, M. D., FREEMAN, W. R. & SPECTOR, S. A. 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*, 176, 69-77.
- SUKDOLAK, C., TISCHER, S., DIEKS, D., FIGUEIREDO, C., GOUDEVA, L., HEUFT, H. G., VERBOOM, M., IMMENSCHUH, S., HEIM, A., BORCHERS, S., MISCHAK-WEISSINGER, E., BLASCZYK, R., MAECKER-KOLHOFF, B. & EIZ-VESEPER, B. 2013. CMV-, EBV- and ADV-specific T cell immunity: screening and monitoring of potential third-party donors to improve post-transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, 1480-92.
- TEBRUEGGE, M. & CURTIS, N. 2012. Adenovirus: an overview for pediatric infectious diseases specialists. *Pediatr Infect Dis J*, 31, 626-7.
- TRAVI, G. & PERGAM, S. A. 2014. Cytomegalovirus pneumonia in hematopoietic stem cell recipients. *J Intensive Care Med*, 29, 200-12.
- TZANNOU, I., PAPAPOPOULOU, A., NAIK, S., LEUNG, K., MARTINEZ, C. A., RAMOS, C. A., CARRUM, G., SASA, G., LULLA, P., WATANABE, A., KUVALEKAR, M., GEE, A. P., WU, M. F., LIU, H., GRILLEY, B. J., KRANCE, R. A., GOTTSCHALK, S., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M., HESLOP, H. E., LEEN, A. M. & OMER, B. 2017. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*, 35, 3547-3557.
- VERA, J. F., BRENNER, L. J., GERDEMANN, U., NGO, M. C., SILI, U., LIU, H., WILSON, J., DOTTI, G., HESLOP, H. E., LEEN, A. M. & ROONEY, C. M. 2010. Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gas-permeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J Immunother*, 33, 305-15.
- WALTER, E. A., GREENBERG, P. D., GILBERT, M. J., FINCH, R. J., WATANABE, K. S., THOMAS, E. D. & RIDDELL, S. R. 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*, 333, 1038-44.
- WELLER, T. H. 1970. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis*, 122, 532-9.
- WINGARD, J. R. 2017. Guarded promise for adenovirus therapy. *Blood*, 129, 1899-1900.
- WITHERS, B., CLANCY, L., BURGESS, J., SIMMS, R., BROWN, R., MICKLETHWAITE, K., BLYTH, E. & GOTTLIEB, D. 2018. Establishment and Operation of a Third-Party Virus-Specific T Cell Bank within an Allogeneic Stem Cell Transplant Program. *Biol Blood Marrow Transplant*, 24, 2433-2442.
- WORTH, A. J. J., HOULDCROFT, C. J. & BOOTH, C. 2016. Severe Epstein-Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host. *British Journal of Haematology*, 175, 559-576.
- YUSUF, U., HALE, G. A., CARR, J., GU, Z., BENAİM, E., WOODARD, P., KASOW, K. A., HORWITZ, E. M., LEUNG, W., SRIVASTAVA, D. K., HANDGRETINGER, R. & HAYDEN, R. T. 2006. Cidofovir

for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation*, 81, 1398-404.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Kinderklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Peter Lang (Doktorvater) durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Ihm erfolgte auch die Konzeption der Studie.

Die Fallzahlplanung fand in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Peter Lang und Herrn Friso Calkoen statt.

Die SOP zur Generierung der vTZ, sowie die Anreicherungstabelle der vTZ wurde von der Leiterin der Herstellung, Frau Dipl. biol. Christiane Braun, erstellt und mir zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Die Produktion erfolgte durch die Mitarbeiter des KMT-Labors der Universitätskinderklinik Tübingen.

Die Sammlung der Patienten-, Therapie- und Labordaten erfolgte eigenständig durch mich im Zeitraum 2016 - 2020.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich im Zeitraum 2018 - 2020.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, der 02.02.2021

Alexander Derbich

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir in der Erarbeitung dieser Promotion besonders geholfen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lang, der das ganze Projekt von Anfang an begleitet und unterstützt hat, bei Fragen jederzeit ansprechbar war und das Lektorat dieser Dissertationsschrift übernommen hat.

Herzlichen Dank auch an Herrn Friso Calkoen, der die Ergebnisse dieser Dissertation publizieren wird und meine Arbeit mit produktiven Anregungen vorangebracht hat.

Als weitere Unterstützung möchte ich mich bedanken bei allen Mitarbeitern des KMT-Labors der Kinderklinik, ohne die diese Studie gar nicht realisierbar gewesen wäre. Besonders Frau Christiane Braun, Annie Babarin-Dorner und Adelheid Hauler danke ich dafür mir immer ihre Ressourcen bereitgestellt zu haben über die Jahre hinweg ein offenes Ohr für Fragen gehabt zu haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Partnerin Selina, welche jede Zeile dieser Arbeit korrekturgelesen hat und mir stets mit Rat, Tat und Ideen zur Seite gestanden hat, um diese Dissertation zu erarbeiten.

Danke auch an meine Familie und Freunde, die mich in der ganzen Zeit unterstützt haben.