DISSERTATION

Standardanalysepanel zur immunphänotypischen Charakterisierung von klassischen und neuartigen Zelltherapeutika sowie ATMPs mit und ohne Stammzellen

Standard Analysis Panel for the Immunophenotyping Characterization of Standard and Advanced Cell Therapeutics as well as ATMPs with or without Stem Cells

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Katy Haussmann

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Lars Bullinger

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis iii

Abbildungsverzeichnis v

Abkürzungsverzeichnis vi

Zusammenfassung 7

1 Einleitung 9

1.1 Pharmazeutische Charakterisierung von Stammzell-Produkten 9

1.2 Entwicklung von neuartigen Zelltherapien mit Fokus auf T- und B-Zellen 10

1.3 Komplexität und Standardisierung der Methodenvalidierung 11

1.4 Fragestellung 13

2 Methodik 14

2.1 Probenmaterial 14

2.1.1 Spender:innen und Patient:innen 14

2.1.2 Vollblut 14

2.1.3 Gewinnung von Zellpräparaten 14

2.1.4 Herstellung von kryokonservierten Zellpräparaten 15

2.1.5 Herstellung von Zellpräparaten mit extrakorporaler Photopherese (ECP) 15

2.1.6 Gewinnung von Knochenmark 15

2.1.7 Einsatz von Referenz-Probenmaterial 15

2.2 Gerätequalifizierung 16

2.3 Probenvorbereitung 16

2.4 Markierung der Zellen für durchflusszytometrische Analyse 17

2.4.1 Analysepanel mit flüssigen Bestandteilen 17

2.4.2 Analysepanel mit getrockneten Bestandteilen 17

2.5 Probenanalyse und Auswertung 18

2.5.1 Probenmessung 18

2.5.2 Durchflusszytometrische Auswertung 19

2.5.3 Statistische Auswertung 19
2.6 Methodenvalidierungen und Methodentransfer 19
3. Ergebnisse 23
3.1 *Stem-Kit* modifiziert mit flüssigen Fluoreszenz-Antikörpern zur erweiterten T und B-Zell-Bestimmung vergleichbar 23
3.1.1 Sensitivitätsmessungen 23
3.1.2 Messungen zur Linearität 29
3.1.3 Messungen zur Präzision und Richtigkeit 31
3.2 Gewebe mit flüssigem und getrocknetem Analysepanel valide messbar 32
3.2.1 Linearitätsmessungen zum Vergleich des flüssigen und des getrockneten Analysepanels 32
3.2.2 Gewebeproben zeigen unterschiedliche Robustheit hinsichtlich der Lyse 33
3.3 8-MOP hat keinen Einfluss auf die 7-AAD Färbung / Messung 36
3.4 Methodentransfer– potentieller Einfluss unterschiedlicher Durchflusszytometer-Modelle auf die Vergleichbarkeit der Analysen 39
3.4.1 Messungen zur Linearität 39
3.4.2 Messungen am Referenzgerät und „Navios EX“ 41
4. Diskussion 45
5. Schlussfolgerungen 49
Literaturverzeichnis 50
Eidesstattliche Versicherung 57
Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen 58
Druckexemplar(e) der Publikation(en) 59
Lebenslauf 60
Komplette Publikationsliste 62
Danksagung 63

Tabellenverzeichnis

1	Zusammenfassung der Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel	20
2	Übersicht zur Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel bei stammzellhaltigem Knochenmark	21
3	Zusammenfassung der Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel	21
4	Transfer der flüssigen und getrockneten Analysepanel vom Durchflusszytometer Modell „Navios“ auf das Modell „Navios EX“	22
5	Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen für den Parameter CD34 Zellen/µL nach dem konservativen Verfahren	24
6	Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen für den Parameter CD34 Zellen/µL nach dem neuartigen Verfahren	25
7	Sensitivitätsbestimmung für den Parameter CD3 Zellen/µL nach dem konservativen Verfahren	26
8	Sensitivitätsbestimmung für den Parameter CD3 Zellen/µL nach dem neuartigen Verfahren	27
9	Zusammenfassung aller Sensitivitätsdaten nach dem konservativen Verfahren	28
10	Zusammenfassung aller Sensitivitätsdaten nach dem neuartigen Verfahren	29
11	Überblick zur Linearitätsbestimmung mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel	30
12	Messergebnisse zur Präzision	31
13	Statistische Auswertung der Messergebnisse zur Präzision	32
14	Überblick zur Linearitätsbestimmung mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel bei Knochenmark	33
15	Titration mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) an mononukleären Zellen einer ECP-Herstellung und anschließender Färbung mit dem flüssigen Analysepanel	36

16 Titration des 8-Methoxypsoralen (8-MOP) an mononukleären Zellen einer ECP-Herstellung und anschließende Färbung mit dem getrockneten Analysepanel 38

17 Richtigkeitsprüfung der beiden Durchflusszytometer Modelle „Navios“ und „Navios EX“ für das flüssige Analysepanel 42

18 Richtigkeitsprüfung der beiden Durchflusszytometer Modelle „Navios“ und „Navios EX“ für das getrocknete Analysepanel 43

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ergebnisse der Robustheitsprüfung „Alter der Färbung“ nach Färbung mit dem (A) flüssigem Analysepanel (Stem-Kit mit Erweiterung um anti-CD3-PB und anti-CD19 APC) und (B) getrocknetem Analysepanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, Zählpartikel); (eigene Darstellung) 35

Abb. 2: Vergleich der Linearität des Flüssigpanel (A) und des getrockneten Analysepanel (B) im Rahmen des Methodentransfers von Modell „Navios“ auf Modell „Navios EX“ an einer LA (Kohorte 2) der vitalen Zellkonzentration von CD45-, CD34-, CD3- und CD19 Zellen/µL. Der Messwert der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde mit dem berechneten Erwartungswert mittels Regressionsanalyse ausgewertet und das Bestimmtheitsmaß R^2 (=r^2) ermittelt. (eigene Darstellung) 40

Abkürzungsverzeichnis

ABW	Abweichung
ACD-A	Antikoagulat-Citrat-Dextrose-(Lösung) A
Ak	Antikörper
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product
APC	Allophycocyanin
BC	Beckman Coulter
BV421	Brilliant Violett 421
CFU	Kolonie-bildende Einheiten
CSCF	Charité Stem Cell Facility
CAR	chimärer Antigen-Rezeptor (*Chimeric Antigen Receptor*)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECP	*Extracorporeal Photopheresis*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ISHAGE	*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*
KM	Knochenmark
LA	Leukapherese
LOB	Leerwert (*Limit of Blank*)
LOD	Nachweisgrenze (*Limit of Detection*)
LOQ	Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*)
PB	Pacific Blue
PE	Phycoerythrin
SD	Standardabweichung
VB	Vollblut

Zusammenfassung

In der Entwicklung von zellulären Produkten stieg der Aufwand für die Qualitätskontrollbestimmungen zur Freigabe von Arzneimitteln für neuartige Therapien (*Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMPs). Während die frühere Analytik beispielsweise auf die Stammzellbestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU-Assay) oder die Drei-Farben-Durchflusszytometrie sowie auf die Sterilkontrolle setzte, sind heute bei ATMPs zusätzlich die Bestimmung von Endotoxin und Mykoplasmen notwendig und die Effektivität der Zellen ist mittels eines *Potency*-Assays nachzuweisen. Die immunphänotypische Analyse der Zielzellen wurde um die Bestimmung weiterer Zellpopulationen erweitert und wird nun im Verlauf der Herstellung vor und nach der Apherese sowie am Endprodukt bestimmt. Des Weiteren sollen die transfundierten Zellen möglichst auch im Empfänger:in nachgewiesen werden. Um die fortlaufende Qualität der zellulären Produkte zu sichern, sind standardisierte Prozesse und daher gezielte Analysen mit breiter Anwendung auf mehrere Zellprodukte in der Routineanwendung erforderlich. Dies reduziert den Aufwand der Methodenvalidierung als behördliche Voraussetzung für eine Herstellungserlaubnis. Im Fokus der Herstellung von Standard-Stammzellprodukten, selektierten Zellprodukten und ATMPs liegen neben den Stammzellen vorrangig die T- und B-Zellen. Im Rahmen meiner Doktorarbeit entwickelte einen immunphänotypischen Assay eines Analysepanel mit getrockneten Bestandteilen wie fluoreszenzbasierten Antikörpern (Ak) (anti-CD45 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), anti-CD34 Phycoerythrin (PE), anti-CD3 Pacific Blue (PB) und anti-CD19 Allophycocyanin (APC)) inklusive Zählpartikel und Totfarbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD), um zielorientiert und standardisiert die durchflusszytometrische Detektion von Leukozyten, Stammzellen nach dem *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE)-Protokoll sowie T- und B-Zellen simultan in einem Röhrchen zu ermöglichen. Parallel wurde das gleiche Paneldesign in flüssiger Form auf Basis eines bereits zugelassenen Kits zur Stammzell-Bestimmung mit demselben Ziel der breiten, standardisierten Anwendung für zelluläre Arzneimittel etabliert. Umfangreiche Validierungsmaßnahmen zeigten eine hohe Linearität, Sensitivität und Richtigkeit der Assays selbst und im Vergleich mit den sowohl getrockneten als auch den flüssigen Fluoreszenz-Ak an diversen Zellprodukten, wie autologen und allogenen Stammzellprodukten, Stammzellen aus Knochenmark sowie extrakorporale Photopherese (*Extracorporeal Photopheresis*, ECP) -Produkten. Weitere Validierungsmessungen

bestätigten die Machbarkeit des Methodentransfers bei Modellwechsel der Durchflusszytometer.

Abstract

With the development of cellular products, the effort of quality control regulations for the release of advanced therapy medicinal products (ATMP) has increased. While earlier analysis was based, for example, on determining the stem cell count of the colony-forming units (CFU assay) or three-color flow cytometry and sterility control, ATMPs today also require the determination of endotoxin and mycoplasma and the effectiveness of the cells can be demonstrated using a potency assay. The immunophenotypic analysis of the target cells has been expanded to include the determination of additional cell populations and is now carried out in the course of production, before and after apheresis and on the end product. If possible, the transfused cells should also be detected in the recipient during monitoring. In order to ensure the quality of the cell products in the long term, standardized processes and thus targeted analyzes with broad application to several cell products in routine use are required. This reduces the effort involved in validating the method as an official requirement for a manufacturing license. In addition to the stem cells, the focus of the production of standard stem cell products, ATMP starting material and the ATMPs themselves is on the T and B cells. During my thesis I have developed an immunophenotypic assay using a dried antibody panel (anti-CD45 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD34 phycoerythrin (PE), anti-CD3 Pacific Blue (PB) and anti-CD19 allophycocyanin (APC)) including particle counting and the death marker 7-aminoactinomycin (7-AAD) for the targeted and standardized flow cytometric detection of leukocytes, stem cells according to the protocol of the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) as well as T and B cells simultaneously in one tube. At the same time, the same panel design was established in liquid form based on an already approved kit for determining stem cells with the same goal of broad, standardized application for cellular products. Extensive validation measures demonstrated a high level of linearity, sensitivity and accuracy of the tests themselves and in comparison, to both the dried and liquid fluorescent antibodies on various cell products such as autologous and allogeneic stem cell products, bone marrow derived stem cells and extracorporeal photopheresis (ECP) products. Further validation measurements confirmed the feasibility of method transfer when changing the flow cytometer model.

1 Einleitung

1.1 Pharmazeutische Charakterisierung von Stammzell-Produkten

Nach ersten erfolgreichen Stammzell-Transplantationen mit Hilfe von Knochenmarkzellen beginnend im Jahre 1968[1] etablierte sich als weitere Möglichkeit die Stammzelltransplantation nach Mobilisierung und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen aus peripherem Blut. Diese wurde für die Eigentherapie (autolog) und Fremdspende (allogene) Transplantation durchgeführt.[2–4] Im Zuge dessen entwickelte sich auch die Qualitätskontrolle von Stammzellprodukten. Die Qualitätskontrolle beschränkte sich vorerst auf die Prüfung der Sterilität und den Nachweis von $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen. Mittels *Colony-forming Units* (CFU)-Assay[5–7] wurden hämatopoetische Zellen der Stammzellpräparate als Kolonien in einem Agar zählbar, wobei die Anzahl und Qualität der angewachsene Zellkolonien einen Rückschluss auf die Stammzell-Proliferation und Fähigkeit zur Differenzierung ermöglichte.[8] Neben dem CFU-Assay wurde die durchflusszytometrische Analyse von hämatopoetischen Stammzellen entwickelt und die automatisierte Sterilkontrolle zur Charakterisierung von Stammzellpräparaten wurde eingeführt.[9] 1996 publizierten Sutherland *et. al* ein Standardprotokoll unter der Schirmherrschaft der *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) zur Harmonisierung der durchflusszytometrischen Bestimmung von hämatopoetischen Stammzellen.[10] Im Laufe der Zeit wurde das ISHAGE-Protokoll hinsichtlich der Färbung und Auswertungsstrategie von hämatopoetischen Stammzellen angepasst und optimiert.[11–14] Nach Färbung der Stammzellen mit den Fluoreszenz-Ak anti-CD45-FITC und anti-CD34-PE sowie dem Marker 7-Aminoactinomycin (7-AAD) zur Detektion von nicht vitalen Zellen, sind nach Analyse im ersten Schritt des ISHAGE-Protokolls die totalen Zellen ($7\text{-}AAD^-$ und $7\text{-}AAD^+$) von den vitalen Zellen ($7\text{-}AAD^-$) Zellen bei der Auswertung zu bestimmen.[15] Im Anschluss werden die vitalen Leukozyten ($CD45^+/7\text{-}AAD^-$) und die vitalen Stammzellen ($CD45^+/CD34^+/7\text{-}AAD^-$) über die Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*) eingegrenzt. Das Re-Gating der Stammzellen und der Lymphozyten ermöglicht die Prüfung der Stammzellen auf ihre schwache CD45-Expression ($CD45^+dim/CD34^+$) und im Vergleich mit den Lymphozyten den Ausschluss von Zelltrümmern. Mit Hilfe von Zählpartikeln können die Absolut-Zellzahlen der zu bestimmenden Zellpopulationen als Einzel-Plattform-Analyse mit einer Erythrozytenlyse ohne zusätzliches Waschen bestimmt werden.[13,15,16]

Die immunphänotypische Bestimmung von Stammzellen nach ISHAGE am Durchflusszytometer wurde zu einer internationalen freigaberelevanten Methode für die Endprodukt-Analyse und ist die qualitätsbestimmende Stammzellanalyse bei der Verlaufskontrolle im Rahmen der Mobilisierung von Patient:innen und Spender:innen in der Herstellung am Tag der Spende sowie als In-Prozess-Kontrolle bei CD34-Zellseparationen geworden.[17–20] Im allogenen Transplantationsverfahren ist neben der Stammzellbestimmung auch die Bestimmung der T-Zell-Population ($CD45^+/CD3^+$) relevant.[21] In getrennten Analysen werden die Stammzellen nach dem ISHAGE-Protokoll, sowie die T-Zellen mit anti-CD45-FITC und anti-CD3-PE in Kombination mit einem Vitalfarbstoff markiert. Dabei wird die T-Zellpopulation wie auch die Stammzellpopulation über den SSC innerhalb der vitalen CD45 Zellen bestimmt. Die Zugabe von Zählpartikeln und das Lyse-Verfahren ohne Zentrifugation ermöglicht auch hier die Absolut-Zellzahlbestimmung der T-Zellen.
Die immunphänotypische Stamm-, T- und B-Zell-Analyse stand und steht weiterhin im Vordergrund der Charakterisierung klassischer Stammzell-Produkte. Der CFU-Assay wird allerdings heute nur noch im Rahmen von Prozessvalidierungen bei Stammzellprodukten eingesetzt.[22] Zunehmend werden Stammzellpräparate aber auch als Ausgangszellen für Arzneimittel neuartiger Zelltherapien verwendet oder neuartige Zellpräparate aus T-Zellen ohne Stammzellen hergestellt.[23,24]

1.2 Entwicklung von neuartigen Zelltherapien mit Fokus auf T- und B-Zellen

Die Therapien mit klassischen Stammzellprodukten werden zunehmend durch neuartige Zelltherapien optimiert oder erweitert.[24] Die gezielte Selektion von Stammzellen und die bewusste Gabe von immunspezifischen Zellen, ähnlich der Gabe von Donorlymphozyten[25], dienen der Unterstützung des Immunsystems u.a. gegen die Leukämie der Patient:innen. Beispielsweise werden Stammzellen zusammen mit natürlichen Killerzellen (NK-Zellen),[26] regulatorischen T-Zellen (Treg)[27] oder T-Zellen mit TCR gamma/delta-Charakter infundiert.[28]
Die Entwicklung von Arzneimitteln für neuartige Therapien (*Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMPs) nimmt einen großen Stellenwert bei der Erweiterung der Stammzelltherapie ein.[29,30] Unter ATMPs werden Arzneimittel verstanden, welche auf einer genetischen oder somatischen Zelltherapie beruhen oder durch Modifizierung von Gewebe hergestellt wurden oder aus Kombinationen dieser genannten Modifizierungen entstanden

sind.[31] Neben der klassischen Stammzelltherapie konnten nun sowohl Zellen zur Therapie hergestellt werden, welche die Begleiterkrankungen der Stammzelltherapie unterdrücken, also auch T-Zellen erzeugt werden, die virusspezifisch agieren[32,33] oder gezielt gegen das Tumor-Antigen gerichtet sind, sogenannte *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) T-Zellen.[34–37] Begleiterkrankungen der Transplantation wie die *Graft versus Host Disease* (GvHD) können beispielsweise mit UV-A-bestrahlten mononukleären Zellen des Patienten (*Extra Corporal Photopheresis*, ECP) behandelt werden, die im weiteren Sinne ebenfalls einem ATMP entsprechen.[38]

Die teilweise enorm aufwendig hergestellten ATMPs führen parallel zu einem Anstieg der Qualitätskontrolluntersuchungen. Neben der üblichen Sterilkontrolle wurden die Testung auf Endotoxin und Mykoplasmen aufgrund des längeren Manipulation *ex vivo* beispielsweise durch Kultivierung der Zellen notwendig.[39,40] Bei der Herstellung genetisch modifizierter Zellen gewann die Bestimmung der *Vector Copy Number* (VCN) an Bedeutung.[35,41] Der Aufwand der Herstellung von ATMPs spiegelt sich auch in der Anzahl an durchflusszytometrischen Analysen wider.[42–44] Zusätzlich werden Zellpopulationen, wie T-Zell-Subpopulationen (zytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen) und verunreinigende Zellen bestimmt.[44] Außerdem ist der Nachweis der biologischen Aktivität, also die Wirksamkeit von Zellen, mit Hilfe von *Potency*-Assays unabdingbar für die Charakterisierung von Zellprodukten.[45] Die Effektivität der Therapie wird auch durch Monitoring der hergestellten Zellen nach Transfusion im peripheren Blut der Patient:innen erfasst und bewertet.[46,47]

1.3 Komplexität und Standardisierung der Methodenvalidierung

Die pharmazeutische Herstellung und die begleitende Qualitätskontrolle benötigten eine standardisierte Vorgehensweise unter guter Herstellungspraxis (*Good Manufacturing Practice,* GMP).[48] Eine Standardisierung der Herstellung und Prüfung sichert die Qualität hergestellter zellulärer Produkte, die sich durch Konsistenz, Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit auszeichnet. Diese Aspekte sind in einer Methodenvalidierung bei der Genehmigungsbehörde von Herstellungen zellulärer Produkte für die Freigabeanalytik zu belegen.[49] Je komplexer beispielsweise die durchflusszytometrische Analyse, desto aufwendiger die Methodenvalidierung, da alle Analyseparameter einzeln hinsichtlich der Validität zu betrachten sind und die Zellen außerdem in ihrer umgebenden Matrix, wie Puffer

oder Medien zu prüfen sind (Matrixvalidierung innerhalb einer Methodenvalidierung). Reduzierte Analysepanel mit Fokus auf die relevanten Zielzellen wie beispielsweise die T-Zellpopulation sind daher von Vorteil. Strobel *et al.* zeigt die erste Anwendung der Stammzellanalyse nach ISHAGE in Kombination mit der T-Bestimmung und führte den Standard und eine Optimierung ein, Stammzellen und T-Zellen in einem Röhrchen unter derselben absoluten Leukozytenzahl zu analysieren.[50]

Vorgefertigte Analysepanel mit getrockneten Fluoreszenz-Ak werden zunehmend für standardisierte, aber auch komplexe Analysen eingesetzt.[51,52] Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich die erste validierte Anwendung eines vorgefertigten Analysepanel mit getrockneten Fluoreszenz-Ak und 7-AAD zur absoluten Stammzellbestimmung nach ISHAGE mit simultaner Absolut-Zellzahlbestimmung von T- und B-Zellen etablieren.[15] Mit dem getrockneten Analysepanel konnte die Validität der Messungen an unterschiedlichen zellulären Produkten belegt werden.[15,52] Analysepanel mit getrockneten Ak dienen beispielsweise auch zum Nachweis von minimalen Rest-Tumorzellen in peripherem Blut und autologen Stammzellprodukten[52] und können auch als Funktionstest und damit vorausschauend als *Potency*-Assay für T-Zellen herangezogen werden.[53] Mit Reduzierung der Variabilität beim Pipettieren von Flüssig-Ak wird die Analyse im Allgemeinen weiterhin verbessert.[15] Die lange Chargenhaltbarkeit der Röhrchen mit getrockneten Analysepanel sowie die hohe Anzahl an gleichzeitig produzierbaren Analysenröhrchen ermöglicht außerdem eine vielseitige Anwendung derselben Materialcharge über eine Vielzahl zu testender zellulärer Produkte.[15]

1.4 Fragestellung

Zur Charakterisierung des absoluten CD34-Anteils von Stammzellprodukten aus peripherem Blut und Knochenmark wird nach standardisierter ISHAGE-Methode eine Dreifarben-Analyse (anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE, 7AAD) am Durchflusszytometer durchgeführt. Im allogenen Transplantationssetting ist zusätzlich die Analyse der T-Zell-Population (anti-CD45 FITC, anti-CD3 PE, 7AAD) erforderlich. Neuartige Zelltherapien fordern eine Erweiterung der Analysepanel zur Charakterisierung von beispielsweise Ausgangsprodukten für ATMPs und den ATMPs selbst. Neben der Stammzell- und T-Zell-Population rücken zusätzlich die B-Zellen in den Fokus der Analysen. Simultane Bestimmungen inklusive der Bestimmung von Absolut-Zellzahlen werden zum neuen Stand von Wissenschaft und Technik. Hierfür habe ich zwei Analysepanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, 7AAD, inklusive Zählpartikel) basierend auf getrockneten oder flüssigen Ak entwickelt, die eine simultane Charakterisierung einer Vielzahl von Zellprodukten, Ausgangszellen für die ATMP-Herstellung, sowie die ATMPs selbst verwendet werden und die Freigabe der entsprechenden Produkte ermöglichen sollen.

Es ergibt sich die Fragestellung, ob diese erweiterten Analysepanel ebenso zur Standardanalytik von Stammzellprodukten und neuartigen Zellprodukten im Vergleich zur klassischen Analytik der Stammzellcharakterisierung geeignet sind und ob kombinierte Analysepanel eine vergleichbare oder verbesserte Methodenvalidität darstellen, je nachdem ob sie als flüssige oder getrocknete Analysepanel zum Einsatz kommen. Dies soll nach dem Vorgehen der guten Herstellungspraxis (GMP) im Rahmen von Qualifizierungs- und Validierungsmessungen durchflusszytometrisch an Standardprodukten wie autologen und allogenen peripheren Blutstammzellpräparaten, allogenem Knochenmark, Ausgangszellen für ATMPs und einem ATMP untersucht werden. Die beschreibende Statistik mit der Bestimmung von Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und das Bestimmtheitsmaß, zuvor festgelegt in Qualifizierungs- und Validierungsplänen, dienen als Akzeptanzkriterien für die Vergleichsmessungen.

2 Methodik

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Spender:innen und Patient:innen

Spender:innen für eine allogene Stammzellspende (Fremdtherapie, n=14) und Patient:innen für die autologe Stammzellspende (Eigentherapie, n=8)) wurden vorab mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) nach entsprechenden Mobilisierungsprotokollen zur Mobilisierung von Stammzellen behandelt. Bei der Lymphozytensammlung von Spender:innen und der Sammlung von mononukleären Zellen von Patient:innen ist keine Mobilisierung notwendig. Es wurden die Zellpräparate, sowie bei Stammzellsammlungen das Vollblut (VB) vor und nach Leukapherese (LA), von sowohl gesunden Spender:innen [Kohorte 1: nicht mobilisiert (nach Haussmann *et al.*[15]), Kohorte 2: G-CSF mobilisiert] als auch Patient:innen (Kohorte 3: G-CSF mobilisiert) mit vorrangig multiplem Myelom und Lymphomen und Patient:innen nach allogener Fremdtherapie (Kohorte 4: nicht mobilisiert, ECP, n=4) untersucht. Weiterhin wurde Gewebeproben von gesunden Spender:innen einer Knochenmarkentnahme (Kohorte 5: nicht mobilisiert, n=8) analysiert. Die Spender:innen und Patient:innen wurden für die Spende und Entnahme aufgeklärt und ihre Einwilligung wurde erteilt. Die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland erteilte die Studiengenehmigung (EA2/129/19).

2.1.2 Vollblut

Peripheres VB wurde von den Spender:innen und Patient:innen bei der Voruntersuchung zur Spende, als Verlaufskontrolle und am Tag der Stammzellspende abgenommen und in Vacutainer (Becton Dickinson, Deutschland) gefüllt, die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulanz enthielten.

2.1.3 Gewinnung von Zellpräparaten

Die Gewinnung eines Zellpräparates unterscheidet sich von der Entnahme des klassischen VB. Zellpräparate entstanden durch eine Sammlung / LA von peripheren Zellen mit dem Spectra Optia Apherese System (Terumo BCT Europe N.V.) über einen Zeitraum von durchschnittlich vier Stunden. Apheresezellen wurden im Verlauf der Sammlung mit dem Antikoagulanz ACD-A und mit Heparin je nach Herstellungsprotokoll versetzt.

2.1.4 Herstellung von kryokonservierten Zellpräparaten

Zelluläre Produkte wurden nach Apherese unter Berücksichtigung der Gesamtzellzahl und entsprechend ihrer Stammzell- oder T-Zell-Dosis / kg Körpergewicht der Empfänger:in in Isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B. Braun) und bei einer Endkonzentration von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) im Einfrierautomat (BV-50, Consarctic GmbH) kontrolliert eingefroren und bei ≤140 °C in der Gasphase von Flüssigstickstoffes gelagert. Die zugehörigen Rückstellmuster des Endproduktbeutels wurden nach mindestens 24 Stunden Lagerung aufgetaut und analysiert.

2.1.5 Herstellung von Zellpräparaten mit extrakorporaler Photopherese (ECP)

Patient:innen werden mittels Apherese mononukleäre Zellen ohne Mobilisierungstherapie entnommen (Kohorte 4), welche *ex vivo* mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) versetzt wurden und anschließend mit UV-A (2 J/cm^2) bestrahlt wurden. Die so nach extrakorporaler Photopherese (ECP) entstandene ATMP werden den Patient:innen im Anschluss reinfundiert.

2.1.6 Gewinnung von Knochenmark

Im OP wurde stammzellhaltiges Knochenmark (KM) von gesunden Spender:innen (Kohorte 5: KM, nicht mobilisiert) über eine KM-Nadel durch mehrmalige Punktion des Beckenbodenkamms gewonnen. Dabei wurden bis zu maximal 2000 mL KM in ein KM-Entnahmeset (*Bone Marrow Collection Set*, Fresenius Kabi) überführt und schrittweise über Gravitationskraft gefiltert (850 µm, 500 µm und 200 µm).

2.1.7 Einsatz von Referenz-Probenmaterial

Für die Sensitivitätsbestimmungen wurden Referenzproben verwendet, die einerseits einen niedrigen Anteil des zu bestimmenden Parameters (Bestimmungsgrenze) enthielten oder andererseits der Parameter nicht nachweisbar war (Leerwert). Als geeignetes Material für den CD34 Parameter wurden VB-Proben von zuvor chemotherapierten Patient:innen verwendet, die in der Verlaufskontrolle der Mobilisierungstherapie zur Stammzellapherese im Referenzlabor geprüft wurden. Erwartet wird ein Anstieg von Stammzellen am Tag 5 der G-CSF Gabe beginnend mit einer Konzentration von ≤ 10 CD34 Zellen/µL. Nach Analyse im Referenzlabor wurde außerdem für die Validierungsmessungen

geeignetes Referenzmaterial für die Herstellung von seriellen Verdünnungsreihen genutzt, die vor der eigentlichen durchflusszytometrischen Analyse mittels Blutbildbestimmung und Kontrolle des Leukozyten-Wertes geprüft werden konnten.

2.2 Gerätequalifizierung

Die Blutbildautomaten XP-300 und das Nachfolgermodell XN-350 (Sysmex, Deutschland) sowie die Durchflusszytometer „Navios“ und das Nachfolgermodell „Navios Ex“ (Beckman Coulter (BC), Frankreich) sind nach pharmazeutischen Vorgaben und unter GMP vor Validierungsmessungen und dem Routineeinsatz zu qualifizieren. Die Anforderungen des Anwenders CSCF wurden in einem Lastenheft (*User Requirement Specification*, URS) formuliert und beim Hersteller abgefragt (Designqualifizierung, DQ). Nach Installation der Geräte durch den Hersteller (Installationsqualifizierung, IQ) fand eine funktionale Qualifizierung (*Operational Qualification*, OQ) statt. Anschließend wurde die Grundeinstellung des Durchflusszytometers (Kompensation) mit der Auto-Setup Funktion durchgeführt und die Benutzer und deren Berechtigungen festgelegt. Es erfolgte darauf eine Leistungsqualifizierung (*Performance Qualification*, PQ) sowie nach jährlicher Wartung oder Reparatur der Geräte eine Requalifizierung der Geräte. Die Qualifizierung wurde zuvor nach einer Risikoanalyse zur Einführung der Geräte in die CSCF in einer Validierungsanweisung für die Durchflusszytometer festgelegt und bei Durchführung der Qualifizierung in einem Validierungsbericht dokumentiert. Zusätzlich unterlagen die Geräte einer täglichen technischen Qualifizierung vorrangig mittels Referenz-Probenmaterial (Blutbildautomat: XN-L2/L3 Check (Sysmex, Deutschland); Durchflusszytometer: Flow Check Beads (BC, Frankreich), Stem Cell Control Kit (Becton Dickinson, Germany); CDChex Plus (Streck Corporate, Nebraska) bevor mit den Validierungsmessungen der Methode begonnen wurde.

2.3 Probenvorbereitung

An einem Blutbildautomaten XP-300/XN-350 (Sysmex, Deutschland) wurden das Probenmaterial analysiert und die Leukozytenzahl, wenn notwendig, auf eine Zielkonzentration vom 30.000 Leukozyten/µL mit Phosphatpuffer ohne Calcium und Magnesiumchlorid (PBS, Gibco, Germany) und 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Aldrich, Germany) für die durchflusszytometrische Analyse eingestellt. Für die Sensitivitätsmessungen und Bestimmungen der Linearität wurde eine serielle Verdünnung (Faktor 2) in PBS und

0,5 % Rinderserumalbumin hergestellt. Die Verdünnung wurde als Triplikat gemessen. Kryokonservierte Proben wurden aufgrund der bekannten Einfrierkonzentration in PBS / 10 % humanem Serumalbumin (HSA, Shire, Germany) entsprechend verdünnt und per Blutbildanalyse vor der durchflusszytometrischen Analyse kontrolliert. Im Allgemeinen wurde das Probenmaterial pro Analysenröhrchen mit ≤ 3×10^6 Zellen mit exakt 100 µL *reverse* pipettiert.

2.4 Markierung der Zellen für durchflusszytometrische Analyse

2.4.1 Analysepanel mit flüssigen Bestandteilen

Durch die Betrachtung im Streulicht (Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht) und durch Fluoreszenzmarkierung von spezifischen Zell-Oberflächenmarker ist eine Unterscheidung von Zellen/Zellpopulationen im Humanblut mittels Durchflusszytometrie möglich.
Das Analyse-Kit für die Stammzellbestimmung (*Stem-Kit*, CE/IVD-Kit, BC, flüssig) enthält die flüssigen Ak anti-CD45 FITC (Klon J33) / CD34 PE (Klon 581.1.5), anti-CD45 FITC / *Isoclonic Control*-PE sowie den Marker für nicht vitale Zellen 7-AAD und Zählpartikel.[15] Dieses Kit wurde um die Einzel-Ak anti-CD3 PB (Klon UCHT1) und anti-CD19 APC (Klon J3.119) erweitert. Bei beiden Varianten der flüssigen Analysepanels erfolgte die Erythrozytenlyse nach 20 min Ak-Inkubation für weitere 10 min mit 2 mL 1 × NH4 Erythrozytenlyse. Zur Bestimmung der Absolut-Zellzahl wurde eine definierte Menge an Zählpartikel kurz vor der Messung hinzugegeben.

2.4.2 Analysepanel mit getrockneten Bestandteilen

Speziell für die Stammzell-, T-Zell- und B-Zell-Analyse wurde ein Röhrchen hergestellt, an dessen Röhrchen-Innenwand eine Mischung aus Fluorochrom-markierten monoklonalen Ak (Isotyp IgG1: anti-CD45 FITC (Klon J33), anti-CD34 PE (Klon 581.1.5), anti-CD3 PB (Klon UCHT1) und anti-CD19 APC (Klon J3.119)), 7-AAD und Zählpartikel getrocknet sind (DURAClone-Technologie; BC, Frankreich).[15] Durch Zugabe von VB oder von zellhaltigen Produkten (100 µL, ≤ 3×10^6 Leukozyten) werden die Bestandteile des getrockneten Analysepanel gelöst, sodass die Fluoreszenz-Ak spezifisch an den Oberflächenantigenen der Zellen sowie frei zugänglicher DNA toter Zellen (Lebend-Tot-Färbung mittels 7-AAD) binden. Nach 15 min Inkubation der Probenröhrchen bei Raumtemperatur und ohne Licht wurden die Erythrozyten mit 2 mL 1 × NH4 Erythrozytenlyse (IO Lyse Puffer, BC, Frankreich) innerhalb weiterer 10 min hämolysiert. Zur Identifizierung

von unspezifischen Färbungen der CD34-Population wird das gleiche Analysepanel mit getrockneten Ak eingesetzt, welches zusätzlich den unmarkierten anti-CD34 (Klon 581.1.5) als Isoklon-Kontrolle im Überschuss zum Vergleichs-Ak mit Fluoreszenz (anti-CD34 PE) enthält.

2.5 Probenanalyse und Auswertung

2.5.1 Probenmessung

Durch hydrodynamische Fokussierung passieren die nun markierten Zellen einzeln eine Messzelle im Durchflusszytometer. Über einen Laserstahl werden die Fluoreszenzen der markierten Zellen angeregt. Die Fluoreszenzsignale werden über ein Filtersystem geleitet, von entsprechenden Detektoren erkannt und mittels Photovervielfacher (*photomultiplier*, PMT) als elektrische Signale umgewandelt und anschließend gespeichert. Neben der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht) ist daher eine Unterscheidung der lebenden ($7AAD^-$) und toten ($7AAD^+$) Zellen von sowohl Leukozyten ($CD45^+$), hämatopoetischen Stammzellen ($CD45^+$dim / $CD34^+$), der T-Zellen ($CD45^+$ / $CD3^+$) als auch der B-Zellen ($CD45^+$ / $CD19^+$) am Durchflusszytometer möglich. Die gleichzeitige Analyse von Zählpartikeln (Absolutbeads) mit bekannter Konzentration dient der Bestimmung der absoluten Zahl positiv detektierter Zellen, da bei der Analyse die Zellereignisse mit den Ereignissen der Zählpartikel verglichen werden (*single-platform*-Analyse durch Lyse-ohne Zellwaschung). Die Proben wurden nach den ISHAGE-Standards mit der Navios-Software 1.3 und Navios EX-Software 2.2 (Teil Methodentransfer, Tabelle 4) gemessen. Neben der Probenidentifizierung wurde der Verdünnungsfaktor eingegeben sowie bei der Analyse von zellulären Produkten das Apheresevolumen (mL) und das Körpergewicht der Empfänger:innen (kg). Für die Analyse wurde auf Vorlagen für Einzelmessungen und Doppelmessungen mit bereits integrierten Regionen für die Zielpopulationen zugegriffen, die während der Messung feinjustiert wurden. Nach Ende der Messung wurde ein Report ausgedruckt, der die entsprechenden prozentualen Anteile, totalen und vitalen Absolutwerte, die Vitalitäten sowie bei der Doppelmessung von zellulären Produkten die Abweichung der Einzelmessungen aufführte.

2.5.2 Durchflusszytometrische Auswertung

Die durchflusszytometrische Messung und Auswertung für Stammzellen erfolgte nach den Standards der ISHAGE-Vorgaben. Die hierbei festgelegte Vorgehensweise sowie die Auswertung der T- und B-Zellen sind in der ergänzenden Information und Abbildung S4 nach Haussmann *et al.*[15] beschrieben.

2.5.3 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Parameter der vitalen Zellpopulationen (%, Zellen/µL) mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Version V5.01, USA) statistisch ausgewertet. Standardabweichungen (STABW) wurde zusätzlich über Excel (Microsoft Office Professional Plus 2019) berechnet. Der relative Variationskoeffizient (SD in %) wurde durch den Quotienten aus MITTELWERT und STABW*100 ermittelt.

2.6 Methodenvalidierungen und Methodentransfer

In Anlehnung der beschriebenen Methodenvalidierung des vorgefertigten Analysepanels mit getrockneten Bestandteilen nach Haussmann *et al.* (Tabelle 1)[15], im Folgenden auch genannt als „getrocknetes Analysepanel“, sind weitere Methodenvalidierungen nach zuvor festgelegten Validierungsanweisungen durchgeführt worden. Dazu gehörte die Methodenvalidierung des gleichen Analysepanel in flüssiger Form, im Folgenden genannt auch als „flüssiges Analysepanel“, an vorrangig Stammzellprodukten (Tabelle 1), die ergänzende Methodenvalidierungen mit dem getrockneten Analysepanel und dem flüssigen Analysepanel für das Gewebe Knochenmark (Tabelle 2) und für die zellulären ECP-Produkte (Tabelle 3), sowie eine Validierung zum Methodentransfer der Analysenmethoden des getrockneten und flüssigen Analysepanel auf das Durchflusszytometer Modell „Navios EX“ (Tabelle 4).

Tabelle 1: Zusammenfassung der Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel bei allogenen Stammzellspenden und autologen Stammzellentnahmen

Leistungs-Charakterisierung	**Verwendetes Probenmaterial**	**Linearität**	**Präzision**	**Richtigkeit**	**Sensitivität**	**Robustheit**
	VB (Kohorte 2)	x	x	x	x	x
	VB (Kohorte 3)	-	-	-	-	-
	LA (Kohorte 2)	x	-	x	x	x
	Kryokonservierte LA (Kohorte 3)	x	-	-	x	x
	LA, frisch vor Kryokonservierung (Kohorte 3)	-	x	-	-	-
	Referenzmaterial	-	-	x	-	-
Anzahl der Proben unterschiedlicher Konzentration		12	2	8	6	3
Anzahl der Replikate		3	3/10	3	10	3
Anzahl aller Proben		78	48	36	60	180
Akzeptanzkriterien		$R^2 \geq 0,95$	SD % ≤ 10	$R^2 \geq 0,95$; Triplikate SD % ≤ 10	keine	SD % ≤ 10

Probenmaterial: Vollblut (VB) und aus Leukapheresen (LA) aus Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender) und 3 (G-CSF mobilisierte Patienten) gefärbt mit dem flüssigen Analysepanel als *Stem-Kits* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD und Zählpartikel im Vergleich zum erweiterten flüssigen Analysepanel mit zusätzlich anti-CD3 PB, anti-CD19 APC), Darstellung der Probenanzahl und Replikate sowie Akzeptanzkriterien einzelner Validierungsparameter (R^2: Bestimmtheitsmaß, SD %: relative Standardabweichung); (Tabelle modifiziert nach Haussmann *et al.,* 2022)

Tabelle 2: Übersicht zur Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel bei stammzellhaltigem Knochenmark

Leistungs-Charakterisierung	**Verwendetes Probenmaterial**	**Linearität**	**Präzision**	**Richtig-keit**	**Sensitivi-tät**
	allogenes KM (Kohorte 5)	x	x	x	x
	allogenes KM, erythro-zytendepletiert (Kohorte 5)	x	-	x	-
Anzahl der Proben unterschiedlicher Konzentration		10	1	2	1
Anzahl der Replikate		3	3	3	10
Anzahl aller Proben		60	19	18	60
Akzeptanzkriterien		$R^2 \geq 0{,}95$	SD % ≤ 10	SD % ≤ 10	keine

Probenmaterial: allogenes Knochenmark (KM) mit und ohne Erythrozytendepletion (Kohorte 5), Färbung mit dem flüssigen Analysepanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD anti-CD3 PB, anti-CD19 APC und Zählpartikel), Darstellung der Probenanzahl und Replikate sowie Akzeptanzkriterien einzelner Validierungsparameter mit R^2: Bestimmtheitsmaß und SD %: relative Standardabweichung; (Tabelle modifiziert nach Haussmann *et al*. 2022)

Tabelle 3: Zusammenfassung der Methodenvalidierung des flüssigen Analysepanel von mononukleäre Apheresezellen nach extrakorporaler Photopherese

Leistungs-Charakterisierung	**Verwendetes Probenmaterial**	**Präzision**	**Robustheit**
	Zwischenprodukt, nach 8-MOP-Zugabe, vor Bestrahlung (Kohorte 4)	x	x
Anzahl der Proben unterschiedlicher Konzentration		1	3
Anzahl der Replikate		5	3
Anzahl aller Proben		10	90
Akzeptanzkriterien		SD % ≤ 10	SD % (Bezug d0) ≤ 20

Validierung des Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) unter Berücksichtigung des Einflusses von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) auf die intrazelluläre Vitalfärbung mit dem Marker 7-AAD bei zellulären Produkten mit extrakorporaler UV-A-Bestrahlung (*Extracorporeal Photopheresis*, ECP) innerhalb des flüssigen Analysenpanels mit anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC und Zählpartikel, Berücksichtigung der Akzeptanzkriterien einzelner Validierungsparameter, SD %: relative Standardabweichung; (Tabelle modifiziert nach Haussmann *et al*., 2022)

Tabelle 4: Transfer der flüssigen und getrockneten Analysepanel vom Durchflusszytometer Modell „Navios“ auf das Modell „Navios EX“

Leistungs-Charakterisierung	**Verwendetes Proben-material**	**Linearität**	**Richtigkeit**
	VB (Kohorte 2)	x	x
	mobilisierte LA (Kohorte 2)	x	x
	Referenzmaterial	-	x
Anzahl der Proben unterschiedlicher Konzentration		24	8
Anzahl der Replikate		3	1-3
Anzahl aller Proben		72	24
Akzeptanzkriterien		$R^2 \geq 0,95$	Triplikate SD % ≤ 10 Vergleich Referenz-Gerät rel. SD % ≤ 20

Probenmaterial: Vollblut (VB) und aus Leukapheresen (LA) der Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender) gefärbt mit den Flüssigreagenzien anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD anti-CD3 PB, anti-CD19 APC und Zählpartikel, Darstellung der Probenanzahl und Replikate sowie Akzeptanzkriterien einzelner Validierungsparameter (R^2: Bestimmtheitsmaß, SD %: relative Standardabweichung; (Tabelle modifiziert nach Haussmann *et al.*, 2022)

3. Ergebnisse

3.1 *Stem-Kit* modifiziert mit flüssigen Fluoreszenz-Antikörpern zur erweiterten T und B-Zell-Bestimmung vergleichbar

3.1.1 Sensitivitätsmessungen

Sensitivitätsmessungen werden im Rahmen von Methodenvalidierungen durchgeführt um den Leerwert (*Limit of Blank*, LOB), die Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LOD) und die Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LOQ) des Gerätes im Zusammenhang mit der angewendeten Methode feststellen zu können. Die Sensitivitätsparameter wurden mit geeigneten Referenzproben nach einem konservativen Verfahren und dem neuartigen Verfahren nach Armbruster *et al*.[54] für jede Parameterkonzentration bestimmt. Das neuartige Verfahren ermöglicht neben der Bestimmung vom LOD und LOQ zusätzlich die Bestimmung des LOB. Die ermittelten Sensitivitätsdaten (LOD und LOQ) des *Stem-Kit* zur Standard ISHAGE-Analyse (vitale Parameterkonzentrationen CD45 Zellen/µL, CD34 Zellen/µL) als Referenz und dem gleichen *Stem-Kit* mit Zusatz von anti-CD3 PB und anti-CD19 APC (vitale Parameterkonzentrationen CD45 Zellen/µL, CD34 Zellen/µL, CD3 Zellen/µL und CD19 Zellen/µL) waren über mehrere Produkte vergleichbar und zeigten kaum Unterschiede (Tabelle 9, Tabelle 10). Tendenziell lagen die Sensitivitätsparameter LOD und LOQ des erweiterten Flüssigpanel bei der konservativen Methode etwas höher beim Vergleich der Vollblutmessungen. Beispielhaft wurden nachfolgend die Messwerte und die Berechnung der Sensitivitätsdaten für die Parameter vitale CD34 Zellen/µL und vitale CD3 Zellen/µL für die konservative Methode (Tabelle 5, Tabelle 7) und dem neuartigen Verfahren (Tabelle 6, Tabelle 8) dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen für den Parameter CD34 Zellen/µL nach dem konservativen Verfahren

Statistik	**n**	***Stem-Kit* (Referenz)**			***Stem-Kit* (mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
		VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3	VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3
	1	2	1	2	2	1	3
	2	3	1	2	2	1	3
	3	2	1	2	1	1	3
	4	2	1	1	2	1	3
	5	2	1	1	2	1	2
	6	1	1	1	2	1	2
	7	2	1	1	2	2	2
	8	1	1	1	2	1	2
	9	1	1	1	2	2	2
	10	1	1	1	2	1	1
SD		0,6749486	0,0000000	0,4830459	0,3162278	0,4216370	0,6749486
SD´		0,2134375	0,0000000	0,1527525	0,1000000	0,1333333	0,2134375
LOD		0,6403124	0,00000000	0,4582576	0,3000000	0,4000000	0,6403124
LOD		**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**
LOQ		2,1343747	0,0000000	1,5275252	1,0000000	1,3333333	2,1343747
LOQ		**2**	**0**	**2**	**1**	**1**	**2**

Bestimmung des Detektionslimits (LOD, entspricht 3xSD´ bei SD´= Standardabweichung (SD)/Wurzel (n)) und der Bestimmungsgrenze (LOQ, entspricht 10xSD´) mit einem flüssigen Analysepanel (*Stem-Kit*: anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD) als Referenz sowie mit dem flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* erweitert um die Fluoreszenz-Antikörper (anti-CD3 PB und anti-CD19 APC) zur Detektion von T- und B-Zellen mit Probenmaterialien niedriger CD34-Konzentrationen aus Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender, Vollblut (VB)) und Kohorte 3 (G-CSF mobilisierte Patienten, Leukapherese (LA); (eigene Darstellung)

Tabelle 6: Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen für den Parameter CD34 Zellen/µL nach dem neuartigen Verfahren

Statistik	**n**	***Stem-Kit* (Referenz-Kit ohne Zusatz)**			***Stem-Kit* (mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
		VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3	VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
MW		0	0	0	0	0	0
SD		0,000000	0,000000	0,0000000	0,000000	0,0000000	0,0000000
LOB		0,000000	0,000000	0,0000000	0,000000	0,0000000	0,0000000
LOB		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
LOD		1,1102904	0,0000000	0,7946105	0,5201947	0,6935929	1,1102904
LOD		**1**	**0**	**1**	**1**	**1**	**1**
LOQ		**2**	**1**	**2**	**2**	**2**	**2**

Neuartigen Verfahren nach Armbruster *et al*., 2008[54] für den Parameter CD34 Zellen/µL: Bestimmung des Leerwertes (LOB mit Mittelwert (MW) Leermessung + 1,645 (Standardabweichung (SD) Leermessung)), des Detektionslimits (LOD mit LOB + 1,645 (SD der niedrigen CD34-Konzentration)) und der Bestimmungsgrenze (LOQ mit LOQ ≥ LOD). Analyse mittels flüssigen Analysepanel als Referenz mittels *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD) sowie mit dem flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* erweitert um die Fluoreszenz-Antikörper zur Detektion von T- und B-Zellen (anti-CD3 PB und anti-CD19 APC), Proben-Referenzmaterialien ohne detektierbare CD34-Zellen aus Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender, Vollblut (VB) und Kohorte 2 und 3 (G-CSF mobilisierte Spender und Patienten, Leukapherese (LA); (eigene Darstellung)

Tabelle 7: Sensitivitätsbestimmung für den Parameter CD3 Zellen/µL nach der konservativen Bestimmung

Statistik	**n**	***Stem-Kit* (mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
		VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3
	1	3	3	2
	2	3	4	2
	3	1	3	2
	4	2	3	2
	5	2	3	2
	6	1	3	2
	7	2	3	1
	8	1	3	2
	9	2	4	2
	10	2	3	2
SD		0,7378648	0,4216370	0,3162278
SD´		0,2333333	0,13333333	0,1000000
LOD		0,7000000	0,4000000	0,3000000
LOD		**1**	**0**	**0**
LOQ		2,3333333	1,3333333	1,0000000
LOQ		**2**	**1**	**1**

Ermittlung des Detektionslimits und der Bestimmungsgrenze (LOQ) mittels erweiterten Flüssigpanel *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB und anti- CD19 APC) und Proben-Referenzmaterialien aus Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender mit Vollblut (VB) und Kohorte 2 und 3 (G-CSF mobilisierte Spender und Patienten mit Leukapheresen (LA) (Erläuterungen und Berechnung von LOD, LOQ siehe Tabelle 5); (eigene Darstellung)

Tabelle 8: Sensitivitätsbestimmung für den Parameter CD3 Zellen/µL nach dem neuartigen Verfahren

Statistik	**n**	***Stem-Kit*** **(mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
		VB Kohorte 2	LA Kohorte 2	LA Kohorte 3
	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	1	0	0
	6	1	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	0	0	0
Mittelwert		0	0	0
SD		0,4216370	0,0000000	0,0000000
LOB		0,8935929	0,0000000	0,0000000
LOB		**1**	**0**	**0**
LOD		1,4137876	0,693593	0,5201947
LOD		**1**	**1**	**1**
LOQ		**2**	**2**	**2**

Ermittlung des Leerwertes (LOB), des Detektionslimits (LOD) und der Bestimmungsgrenze (LOQ) nach Armbruster *et al.* (2008)[54] mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB und anti-CD19 APC, Zählpartikel) und Proben-Referenzmaterialien aus Kohorte 2 (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender mit Vollblut (VB) und Kohorte 2 und 3 (G-CSF mobilisierte Spender und Patienten mit Leukapheresen (LA) (Erläuterungen und Berechnung von LOB, LOD, LOQ siehe Tabelle 6); (eigene Darstellung)

Tabelle 9: Zusammenfassung aller Sensitivitätsdaten nach dem konservativen Verfahren

		Stem-Kit **(Referenz-Kit ohne Zusatz)**			***Stem-Kit*** **(mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
Probenmaterial	Parameter vitale Zellen/µL	LOB	LOD	LOQ	LOB	LOD	LOQ
VB Kohorte 2	CD45	-	1	3	-	1	5
	CD45/CD34	-	1	2	-	0	1
	CD45/CD3	-	-	-	-	1	2
	CD45/CD19	-	-	-	-	1	2
LA Kohorte 2	CD45	-	1	2	-	1	2
	CD45/CD34	-	0	0	-	0	1
	CD45/CD3	-	-	-	-	0	1
	CD45/CD19	-	-	-	-	1	2
LA Kohorte 3	CD45	-	1	3	-	1	2
	CD45/CD34	-	0	2	-	1	2
	CD45/CD3	-	-	-	-	0	1
	CD45/CD19	-	-	-	-	1	3

Bestimmung des Detektionslimits (LOD) und der Bestimmungsgrenze (LOQ) für die verschieden vitalen Parameter [Zellen/µL] mit Hilfe des unveränderten flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, Zählpartikel) und dem erweiterten flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* mit dem Zusatz anti-CD3 PB und anti-CD19 APC, Sensitivitätsdaten ohne Leerwertbestimmung (LOB) bei dem konservativen Verfahren, durch Messung von mobilisiertem Vollblut (VB) und einer Leukapherese (LA) (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender, Kohorte 2) sowie einer kryokonservierten Stammzell-Apherese (G-CSF mobilisierte Patient, Kohorte 3); (eigene Darstellung)

Tabelle 10: Zusammenfassung aller Sensitivitätsdaten nach dem neuartigen Verfahren

		Stem-Kit **(Referenz-Kit ohne Zusatz)**			***Stem-Kit*** **(mit anti-CD3 und anti-CD19)**		
Probenmaterial	Parameter vitale Zellen/µL	LOB	LOD	LOQ	LOB	LOD	LOQ
VB Kohorte 2	CD45	0	2	3	0	2	3
	CD45/CD34	0	1	2	0	1	2
	CD45/CD3	-	-	-	1	1	2
	CD45/CD19	-	-	-	0	1	2
LA Kohorte 2	CD45	1	3	4	1	2	3
	CD45/CD34	0	0	1	0	1	2
	CD45/CD3	-	-	-	0	1	2
	CD45/CD19	-	-	-	1	1	2
LA Kohorte 3	CD45	0	1	2	0	2	3
	CD45/CD34	0	1	2	0	1	2
	CD45/CD3	-	-	-	0	1	2
	CD45/CD19	-	-	-	0	2	3

Sensitivitätsdaten nach Armbruster *et al*., (2008)[54] wie Leerwertes (LOB), Detektionslimits (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)) für die verschieden vitalen Parameter [Zellen/µL] des unveränderten flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, Zählpartikel) und dem erweiterten flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* inklusive anti-CD3 PB und des anti-CD19 APC, Probenmaterial aus mobilisiertem Vollblut (VB) und einer Leukapherese (LA) mit Stammzellen (Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierte Spender, Kohorte 2) sowie einer kryokonservierten Stammzell-Apherese (G-CSF mobilisierte Patient, Kohorte 3); (eigene Darstellung)

Die Sensitivitätsmessungen mit dem LOQ-Wert geben einen Hinweis, ab welcher Zellkonzentration eine Analytik valide gemessen werden kann. Zusammenfassend konnten mit dem jeweiligen Flüssig-Analysepanel und über drei Probenmaterialien sehr niedrige Messkonzentrationen für den LOQ- Wert mit maximal 5 Zellen/µL (konservatives Verfahren, CD45 Zellen/µL) ermittelt werden.

3.1.2 Messungen zur Linearität

Als Maß für die Übereinstimmung von Messwert und berechneten Erwartungswert bei der Bestimmung von Zellkonzentrationen mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel (*Stem-Kit* inklusive des anti-CD3 PE und des anti-CD19 APC) kann die Linearität für die Parameter (CD45, CD34, CD3, CD19 Zellen/µL) in Proben einer seriellen Verdünnung

bestimmt werden. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) wird durch den berechneten Erwartungswert im Vergleich zum Analysewert bestimmt.[15] Ein hohes Bestimmtheitsmaß nahe 1,0 weist auf eine hohe Linearität hin, da die gemessenen Zellkonzentrationen dann direkt proportional zur berechneten erwarteten Zellkonzentration in der Probe sind.[15]

In Tabelle 11 sind nachfolgend die R^2 für die Proben VB und LA der Kohorte 2 sowie die der LA aus Kohorte 3 aufgeführt. Alle R^2 zeigen eine hohe Übereinstimmung des Messwertes mit dem Erwartungswert, sodass die Linearität mit dem Flüssigpanel im angezeigten Messbereich belegt werden konnte. Die Akzeptanzkriterien ($R^2 \geq 0{,}95$) wurden erfüllt. Die LA der Kohorte 3 wies keine B-Zellen auf. Die Linearität war für diese Probe nicht bestimmbar.

Tabelle 11: Überblick zur Linearitätsbestimmung mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel bei Vollblut und Stammzell-Apheresen

Stem-Kit **(mit anti-CD3 und anti-CD19)**			
Probenmaterial	Parameter	Messbereich vitale Zellen/µL	R^2
VB Kohorte 2	CD45	400– 41114	0,9997
	CD34	1–49	0,9926
	CD3	28–3010	0,9998
	CD19	3–451	0,9995
LA Kohorte 2	CD45	2548–65245	0,9924
	CD34	20–498	0,9828
	CD3	787–22336	0,9921
	CD19	154–3987	0,9943
LA Kohorte 3	CD45	184–14233	0,9986
	CD34	1–37	0,9956
	CD3	46–3043	0,9996
	CD19	n. b.	n. b.

Färbung der Zellen mittels flüssigem Analysepanel (*Stem-Kit* mit dem Zusatz anti-CD3 PE und anti-CD19 APC) für die vitalen Parameter CD45-, CD34-, CD3- und CD19 Zellen/µL im angegebenen Messbereich bei der Messung von Vollblut (VB) und Leukapheresen (LA) von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierten Spendern und Patienten. Der Messwert der Verdünnungsstufe wurde mit dem berechneten Erwartungswert mittels Regressionsanalyse verglichen und das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt; (eigene Darstellung); n. b.: nicht bestimmbar

Über drei Probenmaterialien konnte eine deutliche Linearität der Analyse mittels flüssigen Analysepanel und den relevanten vitalen Parametern CD45-, CD34-, CD3- Zellen/µL gezeigt werden. Bei dem Parameter CD19 Zellen/µL konnte dies bei den Probenmaterialien der Kohorte 2 und 3 belegt werden.

3.1.3 Messungen zur Präzision und Richtigkeit

Durch 10fache Analyse einer Probe (M1–M10, Tabelle 12) kann die Präzision der Methode statistisch belegt werden. Die relative Standardabweichung (SD %) erfüllte mit ≤ 10 % bei allen bestimmten Parametern die vorgegebene Akzeptanz (Tabelle *13*).

Tabelle 12: Messergebnisse zur Präzision

vitale Parameter	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**M7**	**M8**	**M9**	**M10**
CD45 Zellen/µL	45296	45342	45948	43020	45516	43898	45736	43470	44086	41448
Vitalität CD45 %	99,39	99,36	99,37	99,37	99,38	99,36	99,40	99,41	99,35	99,35
CD34 Zellen %	0,32	0,32	0,32	0,36	0,35	0,33	0,36	0,33	0,38	0,34
CD34 Zellen/µL	146	144	146	154	158	146	164	142	164	140
Vitalität CD34 %	98,65	98,63	100	100	100	100	99,80	100	98,8	97,22
CD3 Zellen %	4,88	4,72	4,75	4,63	4,57	4,59	4,91	4,78	4,69	4,85
CD3 Zellen/µL	2210	2142	2182	1994	2080	2014	2244	2076	2066	2012
Vitalität CD3 %	99,82	99,63	99,45	99,70	99,81	99,51	99,47	99,52	99,52	99,31
CD19 Zellen %	1,22	1,20	1,28	1,21	1,18	1,28	1,19	1,22	1,27	1,31
CD19 Zellen/µL	552	544	588	520	538	562	546	530	560	544
Vitalität CD19 %	99,28	99,63	99,32	99,62	99,63	99,65	99,64	100	99,64	99,63

10fache Messung (M1–M10) von Vollblut eines mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierten Spenders (Kohorte 2) nach Färbung mit dem flüssigen Analysepanel *Stem-Kit* (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC und Zählpartikel); (modifiziert nach Haussmann *et al.*, 2022)

Tabelle 13: Statistische Auswertung der Messergebnisse zur Präzision

vitale Parameter	MW M1–M10	SD	SD %
CD45 Zellen/µL	44376	1450,8725	3,27
Vitalität CD45 %	99,37	0,0207	0,02
CD34 Zellen %	0,34	0,0208	6,10
CD34 Zellen/µL	150	8,9343	5,94
Vitalität CD34 %	99,31	0,9514	0,96
CD3 Zellen %	4,74	0,1195	2,52
CD3 Zellen/µL	2102	88,0606	4,19
Vitalität CD3 %	99,574	0,1637	0,16
CD19 Zellen %	1,24	0,0450	3,64
CD19 Zellen/µL	548	18,8515	3,44
Vitalität CD19 %	99,60	0,1970	0,20

Ermittlung des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (SD) und der relativen Standardabweichung (SD %) der Messdaten Tabelle *12*; (modifiziert nach Haussmann *et al.*, 2022)

Die Präzision der Analyse mit dem flüssigen Analysepanel und den zusätzlichen Ak für die T- und B-Zellbestimmung konnte anhand der dargestellten Messungen gezeigt werden. Außerdem wurde die Richtigkeit der Stammzell- sowie T Zell- und B Zellanalyse durch die regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen (Instand e.V.) durch den multizentrischen Vergleich bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.2 Gewebe mit flüssigem und getrocknetem Analysepanel valide messbar

3.2.1 Linearitätsmessungen zum Vergleich des flüssigen und des getrockneten Analysepanels

Die Anwendung und Validität des flüssigen Analysepanels (*Stem-Kit* mit anti-CD3 PB und anti-CD19 APC) und des getrockneten Analysepanels mit der gleichen Zusammensetzung anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, 7-AAD und Zählpartikel wurde an dem Gewebe allogenes Knochenmark mit und ohne einer Erythrozyten-Depletion geprüft. Die Linearität wurde über mindestens 6 Verdünnungsstufen bestimmt. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse beider Methoden für die Linearität. Das hohe Bestimmtheitsmaß als Indikator für die Linearität bei Anwendung des Analysepanels mit flüssigen Ak war durchschnittlich mit $R^2 = 0{,}9953$ vergleichbar mit dem Bestimmtheitsmaß des Analysepanel mit getrockneten Ak mit $R^2 = 0{,}9987$. Beide Analysepanel erfüllten das Akzeptanzkriterium ($R^2 \geq 0{,}95$).

Tabelle 14: Überblick zur Linearitätsbestimmung mit dem erweiterten flüssigen Analysepanel bei Knochenmark

		flüssiges Analysepanel		**getrocknetes Analysepanel**	
Probenmaterial	Parameter	Messbereich vitale Zellen/µL	R^2	Messbereich vitale Zellen/µL	R^2
allogenes KM Kohorte 5	CD45	69–7384	0,9998	182–7772	0,9994
	CD34	1–58	0,9997	1–64	0,9995
	CD3	8–992	0,9997	32–1116	0,9977
	CD19	3–401	0,9993	5–244	0,9988
allogenes KM, erythrozytendepletiert Kohorte 5	CD45	507–52669	0,9917	366–38907	0,9995
	CD34	7–541	0,9890	5–475	0,9947
	CD3	41–6452	0,9944	44–4710	0,9999
	CD19	18–2161	0,9889	8–1034	0,9999

Dargestellt ist R^2 der einzelnen Absolut-Zellzahlen für die vitalen Parameter CD45, CD34, CD3 und CD19 [Zellen/µL] resultierend aus der Gegenüberstellung des Erwartungswertes und des tatsächlichen Messwertes innerhalb des angegebenen Messbereiches der Verdünnungsreihe für das flüssige Analysepanel (*Stem-Kit* mit zusätzlich anti-CD3 PB und anti-CD19 APC) und das getrocknete Analysepanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, 7-AAD) an den Geweben „Allogenes Knochenmark“ (KM) und „Allogenes KM, erythrozytendepletiert“ (Kohorte 5); (eigene Darstellung)

Nicht nur für allogene und autologe Blutstammzellen, auch bei dem Gewebe KM konnte eine lineare Messung der relevanten Zellkonzentrationen über einen weiten Messbereich sowohl mit der flüssigen Analyse als auch mit der getrockneten Analysenvariante gezeigt werden.

3.2.2 Gewebeproben zeigen unterschiedliche Robustheit hinsichtlich der Lyse

Die Robustheit des Gewebes wurde mit dem flüssigen Analysepanel und mit dem getrockneten Analysepanel geprüft. Beide Methoden werden aufgrund der Absolut-Zellzahlbestimmung nach der Erythrozytenlyse gemessen. Das Probenmaterial wird nicht mehr durch einen Zentrifugationsschritt von der Lyselösung befreit. Zur Bestimmung der Robustheit des Probenmaterials wurde der Aspekt „Alter der Färbung“ zum Zeitpunkt „0“ direkt nach Lyse sowohl für das flüssige Analysepanel nach 30, 60, 90, 120, 240 und 480 min (Abb. 1, A) als auch für das getrocknete Analysepanel nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min (Abb. 1, B) betrachtet. Die prozentuale Abweichung der vitalen Parameter CD45 Zellen/µL, CD34 Zellen/µL, CD3 Zellen/µL und CD19 Zellen/µL wurde dabei zum Ausgangswert (100 %, Zeitpunkt „0“) errechnet und als Akzeptanzkriterium maximal 20 % zum Zeitpunkt „0“ festgelegt. Nach 90 min sinkt die Abweichung bei dem flüssigen

Analysepanel bei den Parametern CD3 Zellen/µL und CD19 Zellen/µL unter die 80 % der Wiederfindung, während bei der Analyse mit dem getrockneten Panel bei 120 min noch alle vitalen Parameter die Akzeptanzkriterien erfüllten. Der Einfluss der Lyse wurde nach 240 min und 480 min Lysezeit beim flüssigen Analysepanel verdeutlicht (Abb. 1, A) und deutete sich bereits nach 180 min mit dem getrockneten Analysepanel an (Abb. 1, B).

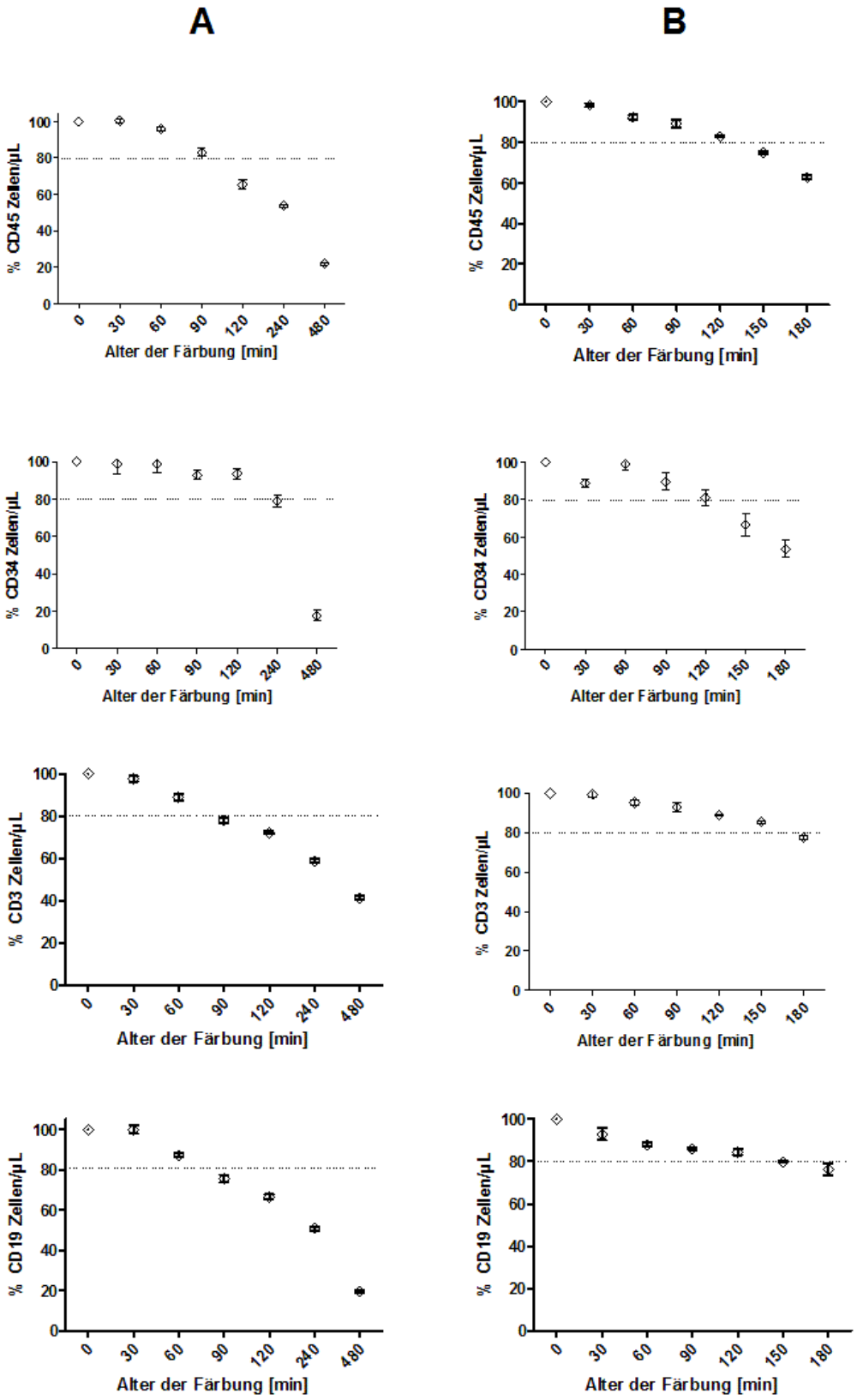

Abb. 1: Ergebnisse der Robustheitsprüfung „Alter der Färbung“ nach Färbung mit dem (A) flüssigem Analysepanel (*Stem-Kit* mit Erweiterung um anti-CD3-PB und anti-CD19 APC) und (B) getrocknetem Analysepanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, Zählpartikel); (eigene Darstellung)

Insgesamt war die Knochenmark-Probe bei der Analyse mit dem getrockneten Analysepanel robuster als die Probe mit dem flüssigen Analysepanel. Dabei gab es Unterschiede auch bei der Betrachtung der einzelnen Populationen. Als Schlussfolgerung und zur Standardisierung galt eine Probenmessung nach 60 min als nicht mehr valide unabhängig von der durchgeführten Methode.

3.3 8-MOP hat keinen Einfluss auf die 7-AAD Färbung / Messung

Die intrazelluläre Färbung des 7-AADs bei der Analyse mit dem Flüssigpanel oder dem getrockneten Panel könnte durch die Bindung des 8-MOPs, welches vor der UV-A-Bestrahlung auf die mononukleären Zellen zugegeben wird, beeinflusst werden. Daher wurden Titrationsstudien mit 8-MOP am zellulären Produkt vor Bestrahlung durchgeführt. Als Vergleichsprobe wurden nicht manipulierte mononukleären Zellen analysiert und mit den vitalen Zellkonzentrationen und Vitalitäten bei der Analyse mit dem flüssigen Analysepanel (Tabelle 15) und dem getrockneten Analysepanel (Tabelle 16) verglichen. Die Akzeptanzkriterien ≤ 20 % des Ausgangswertes (c0) wurden erfüllt. Im Vergleich waren die Abweichungen der Messungen mit dem getrockneten Analysepanel (Minimum: -0,10 %, Maximum: 9,54 %) über alle gemessenen 8-MOP Konzentrationen niedriger, als bei dem Flüssigpanel (Minimum: - 0,07 %, Maximum: 17,50 %).

Tabelle 15: Titration mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) an mononukleären Zellen einer ECP-Herstellung und anschließender Färbung mit dem flüssigen Analysepanel

Konzentration	Parameter	M1	M2	M3	MW	SD	SD %	ABW von c0 (+/- %)
c0	CD45 Zellen/µL	21170	22182	22297	21883	620,1476	2,83	
	Vitalität CD45 %	99,79	99,89	99,82	99,83	0,0513	0,05	
	CD3 %	27,32	27,51	27,32	27,38	0,1097	0,40	
	CD3 Zellen/µL	5783	6102	6093	5992,67	181,6324	3,03	
	Vitalität CD3 %	99,86	99,92	99,90	99,89	0,0306	0,03	n/a
	CD19 %	9,42	9,18	9,48	9,36	0,1587	1,70	
	CD19 Zellen/µL	1995	2036	2113	2048,00	59,9083	2,93	
	Vitalität CD19 %	99,8	99,90	99,86	99,85	0,0503	0,05	
c1	CD45 Zellen/µL	18425	19352	19696	19158	657,4073	3,43	-12,45
	Vitalität CD45 %	99,68	99,64	99,73	99,68	0,0451	0,05	-0,15
	CD3 %	26,97	26,98	27,59	27,18	0,3551	1,31	-0,74
	CD3 Zellen/µL	4968	5221	5434	5208	233,2859	4,48	-13,10
	Vitalität CD3 %	99,82	99,73	98,83	99,46	0,5474	0,55	-0,43
	CD19 %	9,22	8,93	9,20	9,12	0,1620	1,78	-2,60

Konzentration	Parameter	M1	M2	M3	MW	SD	SD %	ABW von c0 (+/- %)
c1	CD19 Zellen/µL	1698	1729	1812	1746	58,9435	3,38	-14,73
	Vitalität CD19 %	99,71	99,65	99,67	99,68	0,0306	0,03	-0,18
c2	CD45 Zellen/µL	19098	19739	18854	19230	457,0999	2,38	-12,12
	Vitalität CD45 %	99,72	99,76	99,7	99,73	0,0306	0,03	-0,11
	CD3 %	27,32	27,26	27,21	27,26	0,0551	0,20	-0,44
	CD3 Zellen/µL	5217	5380	5130	5242	126,9107	2,42	-12,52
	Vitalität CD3 %	99,81	99,83	99,84	99,83	0,0153	0,02	-0,07
	CD19 %	9,13	9,00	8,93	9,02	0,1015	1,13	-3,63
	CD19 Zellen/µL	1745	1777	1683	1735	47,7912	2,75	-15,28
	Vitalität CD19 %	99,83	99,72	99,76	99,77	0,0557	0,06	-0,08
c3	CD45 Zellen/µL	18469	18567	18689	18575	110,2180	0,59	-15,12
	Vitalität CD45 %	99,73	99,67	99,69	99,70	0,0306	0,03	-0,14
	CD3 %	27,07	27,19	27,22	27,16	0,0794	0,29	-0,82
	CD3 Zellen/µL	5000	5048	5086	5045	43,0968	0,85	-15,82
	Vitalität CD3 %	99,76	99,76	99,78	99,77	0,0115	0,01	-0,13
	CD19 %	9,29	9,32	9,21	9,27	0,0569	0,61	-0,93
	CD19 Zellen/µL	1716	1730	1722	1723	7,0238	0,41	-15,89
	Vitalität CD19 %	99,83	99,6	99,71	99,71	0,1150	0,12	-0,14
c4	CD45 Zellen/µL	18640	19335	18162	18712	589,8359	3,15	-14,49
	Vitalität CD45 %	99,67	99,7	99,66	99,68	0,0208	0,02	-0,16
	CD3 %	27,08	27,58	27,21	27,29	0,2594	0,95	-0,34
	CD3 Zellen/µL	5047	5332	4942	5107	201,8044	3,95	-14,78
	Vitalität CD3 %	99,84	99,81	99,86	99,84	0,0252	0,03	-0,06
	CD19 %	9,00	9,09	8,99	9,03	0,0551	0,61	-3,56
	CD19 Zellen/µL	1679	1757	1633	1690	62,6844	3,71	-17,50
	Vitalität CD19 %	99,76	99,66	99,69	99,70	0,0513	0,05	-0,15

Messungen als Triplikate (M1–M3) mit dem flüssigen Analysepanel (Stem-Kit erweitert um anti-CD3-PB und anti-CD19 APC) von autologen mononukleären Zellen (Kohorte 4), Vergleichswerte mit Zellen ohne 8-MOP (c0) und behandelt mit 8-MOP (8-MOP Konzentrationen: c1=150–200 ng/mL, c2=300–400 ng/mL, c3=600–800 ng/mL bis c4=750–1000 ng/mL). Dargestellt sind die Parameter CD45, CD34, CD3 und CD19 (%, absolut in Zellen/µL sowie deren Vitalität in %) und die statistische Auswertung des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (SD) sowie der relativen SD (SD %). Als Bezugsgröße diente die Messung ohne 8-MOP (c0) und die Abweichung (ABW) von c1 bis c4 zu c0. (n. a.: nicht anwendbar); (eigene Darstellung)

Tabelle 16: Titration des 8-Methoxypsoralen (8-MOP) an mononukleären Zellen einer ECP-Herstellung und anschließende Färbung mit dem getrockneten Analysepanel

Konzentration	Parameter	M1	M2	M3	MW	SD	SD %	ABW von c0 (+/- %)
c0	CD45 Zellen/µL	2302	2355	2199	2285	79,4362	3,48	
	Vitalität CD45 %	98,17	97,48	97,98	97,88	0,3564	0,36	
	CD3 %	3,34	3,31	3,32	3,32	0,0153	0,46	
	CD3 Zellen/µL	77	78	73	76,00	2,6458	3,48	n/a
	Vitalität CD3 %	95,44	98,32	99,10	97,62	1,9278	1,97	
	CD19 %	12,55	12,73	13,14	12,81	0,3024	2,36	
	CD19 Zellen/µL	289	300	289	293	6,3509	2,17	
	Vitalität CD19 %	99,20	99,01	98,86	99,02	0,1704	0,17	
c1	CD45 Zellen/µL	2534	2442	2534	2503	53,1162	2,12	9,54
	Vitalität CD45 %	97,01	97,72	97,50	97,41	0,3635	0,37	-0,48
	CD3 %	2,94	3,33	3,12	3,13	0,1952	6,24	-5,82
	CD3 Zellen/µL	75	81	79	78	3,0551	3,90	3,07
	Vitalität CD3 %	93,75	94,19	95,18	94,37	0,7324	0,78	-3,33
	CD19 %	11,83	12,32	12,86	12,34	0,5152	4,18	-3,67
	CD19 Zellen/µL	300	301	326	309	14,7309	4,77	5,58
	Vitalität CD19 %	98,36	98,05	97,9	98,10	0,2346	0,24	-0,93
c2	CD45 Zellen/µL	2442	2491	2416	2450	38,0832	1,55	7,19
	Vitalität CD45 %	97,64	96,68	96,77	97,03	0,5302	0,55	-0,87
	CD3 %	3,25	3,43	3,28	3,32	0,0964	2,90	-0,10
	CD3 Zellen/µL	79	85	79	81	3,4641	4,28	6,58
	Vitalität CD3 %	95,18	94,44	94,05	94,56	0,5740	0,61	-3,14
	CD19 %	12,56	12,43	12,81	12,60	0,1931	1,53	-1,61
	CD19 Zellen/µL	307	310	310	309	1,7321	0,56	5,58
	Vitalität CD19 %	97,46	98,41	98,10	97,99	0,4845	0,49	-1,04
c3	CD45 Zellen/µL	2377	2523	2429	2443	74,0000	3,03	6,90
	Vitalität CD45 %	96,59	96,22	97,16	96,66	0,4735	0,49	-1,25
	CD3 %	3,12	3,17	3,26	3,18	0,0709	2,23	-4,21
	CD3 Zellen/µL	74	80	79	78	3,2146	4,14	2,19
	Vitalität CD3 %	92,50	93,02	95,18	93,57	1,4212	1,52	-4,15
	CD19 %	12,69	12,17	12,49	12,45	0,2623	2,11	-2,79
	CD19 Zellen/µL	302	307	303	304	2,6458	0,87	3,87
	Vitalität CD19 %	97,73	97,46	97,12	97,44	0,3057	0,31	-1,60
c4	CD45 Zellen/µL	2329	2379	2423	2377	47,0319	1,98	4,01
	Vitalität CD45 %	97,08	96,20	96,34	96,54	0,4729	0,49	-1,37
	CD3 %	3,27	3,4	3,36	3,34	0,0666	1,99	0,60
	CD3 Zellen/µL	76	81	81	79	2,8868	3,64	4,39
	Vitalität CD3 %	93,83	94,19	93,1	93,71	0,5554	0,59	-4,01

Konzentration	Parameter	M1	M2	M3	MW	SD	SD %	ABW von c0 (+/- %)
c4	CD19 %	13,07	13,03	12,89	13,00	0,0945	0,73	1,48
	CD19 Zellen/µL	304	310	312	309	4,1633	1,35	5,47
	Vitalität CD19 %	97,75	98,41	97,5	97,89	0,4701	0,48	-1,15

Färbung mittels getrockneten Analysenpanel (anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB, anti-CD19 APC, Zählpartikel), Messungen als Triplikate (M1–M3) und eingesetzte 8-MOP-Konzentrationen (c1=150–200 ng/mL, c2=300–400 ng/mL, c3=600–800 ng/mL bis c4=750–1000 ng/mL) sowie Statistik des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (SD) sowie der relativen SD (SD %). Als Bezugsgröße diente die Messung ohne 8-MOP (c0) und die Abweichung (ABW) von c1 bis c4 zu c0. (n. a.: nicht anwendbar); (eigene Darstellung)

Die Behandlung mit 8-MOP hatte bis zu einer Konzentration von maximal 1000 ng/mL keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vitalitätsbestimmung mit 7-AAD sowohl bei der flüssigen Analyse als auch bei der Analyse mit dem getrockneten Panel.

3.4 Methodentransfer– potentieller Einfluss unterschiedlicher Durchflusszytometer-Modelle auf die Vergleichbarkeit der Analysen

3.4.1 Messungen zur Linearität

Das flüssige Analysepanel und die Analyse mit dem getrockneten Panel wurde beim Methodentransfer vom Modell „Navios“ auf das Modell „Navios EX“ geprüft. Hierbei galt es, die Linearität für die Parameter vitale CD45-, CD34-, CD3- und CD19 Zellen/µL erneut für die Analysenmethoden zu belegen. Beide Analysen wiesen eine hohe Linearität aufgrund der allgemeinen hohen R^2 auf für die Konzentrationsbereiche für das Flüssigpanel mit 712–23666 CD45 Zellen/µL, 7–301 CD34 Zellen/µL, 156–9049 CD3 Zellen/µL und 85–2915 CD19 Zellen/µL sowie für das Trockenpanel mit 951–37654 CD45 Zellen/µL, 10–334 CD34 Zellen/µL, 358–13984 CD3 Zellen/µL und 106–4032 CD19 Zellen/µL. Dabei besaß die Analyse mit dem getrockneten Analysepanel höhere R^2 mit 0,9992–0,9998 (Abb. *2*, B), als die Analysen mit dem flüssigen Analysepanel mit R^2 0,9914–0,9993 (Abb. *2*, A).

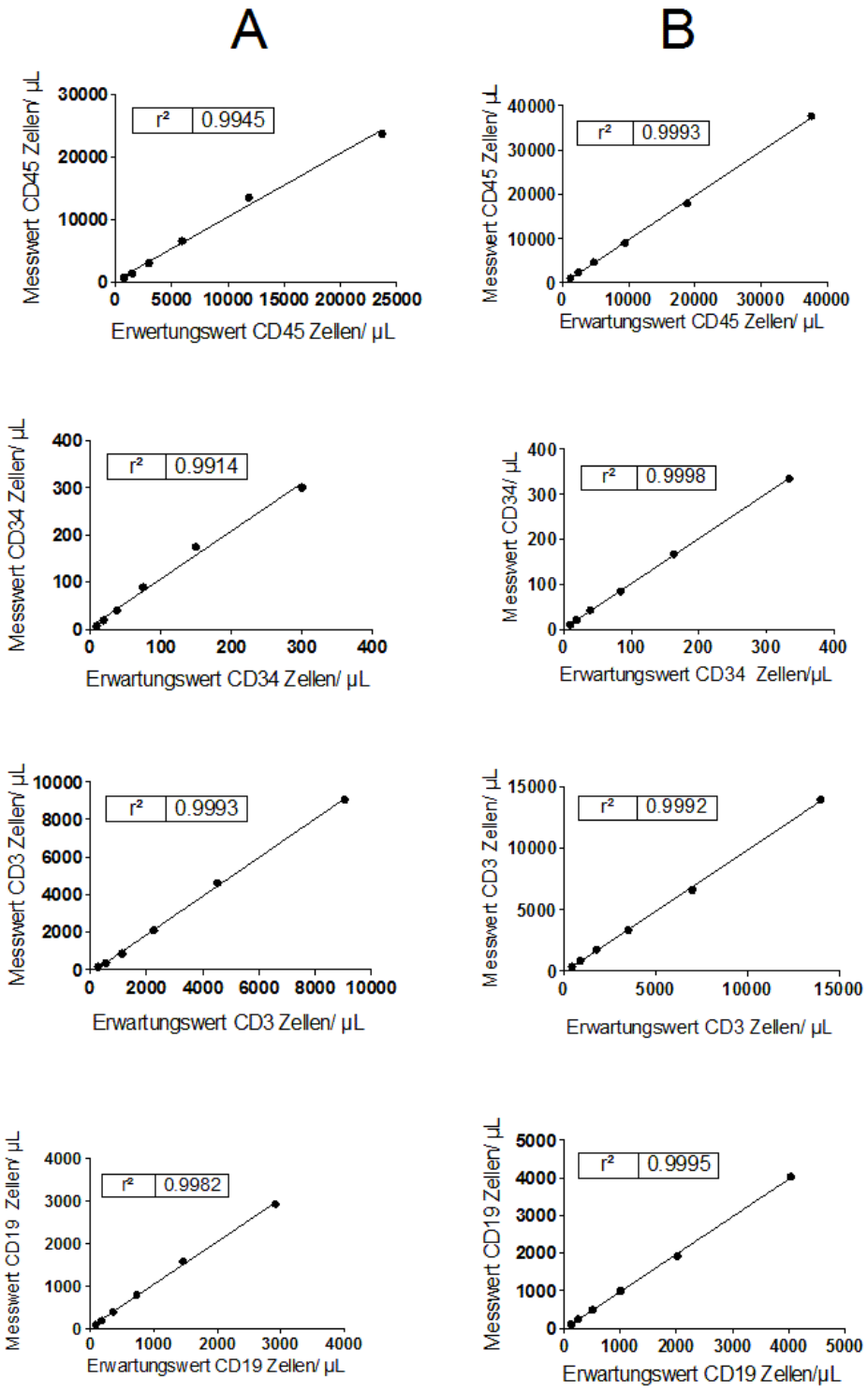

Abb. 2: Vergleich der Linearität des Flüssigpanel (A) und des getrockneten Analysepanel (B) im Rahmen des Methodentransfers von Modell „Navios“ auf Modell „Navios EX“ an einer LA (Kohorte 2) der vitalen Zellkonzentration von CD45-, CD34-, CD3- und CD19 Zellen/µL. Der Messwert der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde mit dem berechneten Erwartungswert mittels Regressionsanalyse ausgewertet und das Bestimmtheitsmaß R^2 (=r^2) ermittelt. (eigene Darstellung)

Am Modell „Navios EX“ waren keine Veränderungen hinsichtlich der Linearität bei dem flüssigen Analyseverfahren und dem getrockneten Analyseverfahren erkennbar. Die Messungen sind weiterhin linear in den bestimmten Konzentrationsbereichen der einzelnen Parameter gewesen.

3.4.2 Messungen am Referenzgerät und „Navios EX“

Im direkten Vergleich wurde das Durchflusszytometer Modell „Navios EX“ mit dem Referenzgerät Modell „Navios“ und den darauf etablierten Methoden für das flüssige Panel (Tabelle 17) und der Analyse mit dem getrockneten Panel (Tabelle 18) begutachtet. Dabei galt es, verschiedene Probenmaterialien als Pseudoreplikat (bereits gefärbte Probe erneut gemessen am „Navios EX“) und als Replikat (dieselbe Probe erneut gefärbt und gemessen am „Navios EX“) mit den jeweiligen Referenzmessungen und dem entsprechenden Messprotokoll für Einfachmessungen bei VB und Doppelmessungen bei LA zu vergleichen.

Tabelle 17: Richtigkeitsprüfung der beiden Durchflusszytometer Modelle „Navios“ und „Navios EX“ für das flüssige Analysepanel

			Modell Navios Referenz-Gerät				**Modell Navios EX**		
Proben-material				Pseudo-Replikat	SD	ABW Gerät %	Replikat	SD	ABW Gerät %
VB Kohorte 2	Zellen/µL	CD45	23756	25112	958,8368	5,71	24837	764,3824	4,55
		CD34	47	43	2,8284	-8,51	40	4,9497	-14,89
		CD3	1255	1342	61,5183	1,14	1355	70,7107	7,97
		CD19	399	413	9,8995	-1,79	416	12,0208	4,26
	%	CD34	0,20	0,17	0,0212	-15,0	0,16	0,0283	-20,00
		CD3	5,28	5,34	0,0424	1,14	5,46	0,1273	3,41
		CD19	1,68	1,65	0,0212	-1,79	1,67	0,0071	-0,60
	Vitalität	CD45	99,28	97,94	0,9475	-1,35	98,83	0,3182	-0,45
	%	CD34	100,00	100,00	0,0000	0,00	100,00	0,0000	0,00
		CD3	99,29	94,98	3,0476	-4,43	98,62	0,4738	-0,67
		CD19	99,25	96,05	2,2627	-3,22	99,05	0,1414	-0,20
LA Kohorte 2	Zellen/µL	CD45	184560	186160	1131,371	0,87	180650	2764,788	-2,12
		CD34	1720	1860	98,995	7,53	1780	42,426	3,49
		CD3	63860	63320	381,838	8,14	62380	1046,518	-2,32
		CD19	19700	19350	247,487	-0,85	18580	791,960	-5,69
	%	CD34	0,93	1,00	0,0495	7,53	0,99	0,0424	6,45
		CD3	34,46	34,01	0,3182	-1,31	34,53	0,0495	0,20
		CD19	10,63	10,39	0,1697	-2,26	10,29	0,2404	-3,20
	Vitalität%	CD45	99,78	98,91	0,6152	-0,87	99,49	0,2051	-0,29
		CD34	98,85	98,94	0,0636	0,09	99,44	0,4172	0,60
		CD3	99,81	98,11	1,2021	-1,70	99,46	0,2475	-0,35
		CD19	99,70	99,23	0,3323	-0,47	99,46	0,1697	-0,24

Messung mittels flüssigem Analysepanel (*Stem-Kit* erweitert um anti-CD3 PB und anti-CD19 APC) und statistische Auswertung mittels der Standardabweichung (SD) und der prozentualen Abweichung (ABW) der Gerätemodelle zueinander bei Messung des Pseudoreplikats und des Replikates bei Verwendung von Vollblut (VB) und Leukapherese (LA) von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierten Spendern (Kohorte 2); (eigene Darstellung).

Tabelle 18: Richtigkeitsprüfung der beiden Durchflusszytometer Modelle „Navios“ und „Navios EX“ für das getrocknete Analysepanel

			Modell Navios Referenz				**Modell Navios EX**		
Proben-material				Pseudo-Replikat	SD	ABW Gerät %	Replikat	SD	ABW Gerät %
VB Kohorte 2	Zellen/µL	CD45	61084	57770	2343,3519	-5,43	55662	3833,9330	-8,88
		CD34	150	144	4,2426	-4,00	138	8,4853	-8,00
		CD3	3918	3792	89,0955	-3,22	3694	158,3919	-5,72
		CD19	1038	974	45,2548	-6,17	952	60,8112	-8,29
	%	CD34	0,25	0,25	0,0000	0,00	0,25	0,0000	0,00
		CD3	6,41	6,56	0,1061	3,22	6,64	0,1626	3,59
		CD19	1,70	1,69	0,0071	-0,59	1,71	0,0071	0,59
	Vitalität%	CD45	98,66	96,60	1,4566	-2,09	97,91	0,5303	-0,76
		CD34	100,00	100,00	0,0000	0,00	97,18	1,9940	-2,82
		CD3	99,49	96,54	2,0860	-2,97	98,19	0,9192	-1,31
		CD19	99,43	98,38	0,7425	-1,06	96,55	2,0365	-2,90
LA Kohorte 2	Zellen/µL	CD45	152100	148410	2609,2240	-2,43	132210	14064,3539	-13,08
		CD34	0,33	0,32	0,0071	-3,03	0,33	0,0000	0,00
		CD3	500	480	14,1421	-4,00	430	49,4975	-14,00
		CD19	26,42	26,65	0,1626	0,87	27,00	0,4101	2,20
	%	CD34	40200	39550	459,6194	-1,62	35700	3181,9805	-11,19
		CD3	5,59	5,63	0,0283	0,72	5,65	0,0424	1,07
		CD19	8500	8350	106,0660	-1,76	7480	721,2489	-12,00
	Vitalität%	CD45	99,72	99,31	0,2899	-0,41	97,16	1,8102	-2,57
		CD34	100,00	100,00	0,0000	0,00	97,73	1,6051	-2,27
		CD3	99,75	99,42	0,2333	-0,33	98,65	0,7778	-1,10
		CD19	98,15	99,05	0,6364	0,92	93,85	3,0406	-4,38

Getrocknetes Analysepanel bestehend aus anti-CD45 FITC, anti-CD34 PE, 7-AAD, anti-CD3 PB und anti-CD19 APC und Zählpartikel, statistische Auswertung mittels der Standardabweichung (SD) und der prozentualen Abweichung (ABW) der Gerätemodelle zueinander bei Messung des Pseudoreplikats und des Replikates bei Verwendung von Vollblut (VB) und Leukapherese (LA) von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisierten Spendern (Kohorte 2); (eigene Darstellung).

Die Messungen als Pseudoreplikate und als Replikate am Navios EX-Durchflusszytometer waren unauffällig. Die Messung des prozentualen Anteils der CD34 Zellen in peripherem VB (flüssiges Analysepanel: Abweichung (ABW) des Gerätes vom Referenzwert -20 %) entsprach dem festgelegten Akzeptanzkriterium (ABW der Geräte ≤ 20 %). Die erhöhte ABW wird durch den niedrigen Stammzell-Anteil der Probe verursacht. Der Methodentransfer konnte durch die Prüfung von Linearität und Richtigkeit vom Modell „Navios“ auf das Modell „Navios EX“ durchgeführt werden.

Mit Hilfe der umfassenden Validierungsmessungen des flüssigen Analysepanels sowie den vergleichenden Messungen mit dem getrockneten Analysepanel konnte ich an Standardprodukten mit und ohne Stammzellen, Knochenmarkprodukten und extrakorporal mit 8-MOP behandelten ATMPs im Rahmen der Herstellung von ECP-Produkten eine hohe Validität beider Analysenpanel belegen. Die Vergleichbarkeit zwischen dem flüssigen Analysepanel und dem getrockneten Analysepanel war gegeben. Daher konnte die Fragestellungen beantwortet werden, (1) dass eine Erweiterung des Referenz-Kits (*Stem-Kit* inklusive anti-CD3 PB und anti-CD19 APC) zur Bestimmung des Stammzellgehaltes keinen Einfluss auf die eigentliche Stammzellbestimmung nach ISHAGE nimmt und, (2) dass keine Unterschiede hinsichtlich flüssiger Bestandteile und getrockneter Bestandteile im Analysepanel zur Detektion von Leukozyten, Stammzellen, T- und B-Zellen bestehen und beide erweiterten Panel gleichermaßen für die Analysen von zellulären Produkten geeignet sind.

4. Diskussion

Die immunphänotypische Charakterisierung von Standardprodukten in der Zelltherapie steht im Vordergrund der freigaberelevanten Qualitätskontrolle. Zur Detektion der Zellen werden vorrangig flüssige Fluoreszenz- Ak verwendet,[42,44] doch zunehmend sind Analysepanel mit getrockneten Ak zur Markierung bei der Pharmazeutischen Prüfung und in der Diagnostik im Einsatz.[15,51,52,55] Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten flüssigen Analysenpanel war mit den Fluoreszenz-Ak anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE, anti-CD3-PB, anti-CD19-APC sowie dem Marker für nicht vitale Zellen (7-AAD) identisch zum Analysepanel bestehend aus getrockneten Bestandteilen.[15] Auch unterschieden sich die Immunglobuline und Klone der Fluoreszenz-Ak nicht. Nach Zugabe des zu analysierenden Probenmaterials liegen die Bestandteile des getrockneten Analysepanels wie auch beim flüssigen Analysenpanel in gelöster Form vor. Die Detektion der Oberflächenantigene und die Messung am Gerät unterliegen bei beiden Analysenpanel den gleichen Voraussetzungen.

Die Auswahl der Fluoreszenz-Ak und der damit verbundenen Messkanäle und eingesetzten Laser des Durchflusszytometers spielte eine wichtige Rolle.[56] Die Emissionsspektren der Fluoreszenzen FITC und PE, angeregt durch den blauen Laser (488 nm), liegen entfernt vom Emissionsspektrum des PB (violetter Laser, 405 nm) und dem von APC (roter Laser, 633 nm). Damit ist die Fluoreszenzüberlappung gering ausgeprägt und besser kontrollierbar. Beschrieben ist ein niedriger Signal-Rausch-Abstand des Fluoreszenzfarbstoff PB im Vergleich zum Tandem-Fluoreszenzfarbstoff Brilliant Violett 421 (BV421) bei der Detektion der CD3-Population.[57] Tandem-Farbstoffe sind für eine standardisierte Freigabeanalytik von zellulären Produkten nicht einsetzbar, denn sie sind in der Herstellung variabel, instabil und zeigen falsch positive Ereignisse in den übergeordneten Fluoreszenzkanälen.[56,58] Die Zusammensetzung der Fluoreszenz-Ak des getrockneten Analysepanel beruht daher nicht auf Tandemkonjugaten.

Zur Bestimmung der Zellpopulationen wurden jeweils die Gating-Strategie für Stammzellen nach dem ISHAGE-Protokoll[10] mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der T- und B-Zellen kombiniert.[15] Grundsätzlich resultiert eine Vergleichbarkeit beider Methoden, die sich nur in der Anwendung von flüssigen oder getrockneten Bestandteilen unterscheidet. In verschiedenen Validierungsplänen zur Methodenvalidierung einzelner zellulärer Produkte wurde die Prüfung der relevanten Validierungsparameter Linearität, Sen-

sitivität, Richtigkeit sowie Robustheit festgelegt.[49] Die Validität des flüssigen Analysepanel und des getrockneten Analysepanel konnte unter Berücksichtigung der Publikation von Haussmann *et al.*[15] zusammen mit ergänzenden Validierungsmessungen von Knochenmark und einem ATMP zur immunphänotypischen Bestimmung der vitalen Absolut-Zellzahl von Stammzellen, T- und B-Zellen am Durchflusszytometer Navios gezeigt werden.

Der flüssige Referenzkit zur Stammzellbestimmung (*Stem-Kit*)[59] wurde ohne Verlust der Validität um die Fluoreszenz-Ak anti-CD3-PB und anti-CD19-APC erweitert, ähnlich dem DropIn-Verfahren bei dem vorgefertigten und getrockneten Analysepanel nach Haussmann *et al.*[15] Das Bestimmtheitsmaß R^2 als Maß zur Prüfung der Linearität lag bei dem flüssigen Analysenpanel (Minimum R^2: 0,9828, Maximum R^2: 0,9998) sehr hoch und war nahezu übereinstimmend mit den ermittelten R^2 des getrockneten Analysepanel (Minimum R^2: 0,9898, Maximum R^2: 0,9994).[15] Bei den Präzisionsmessungen nach Massin *et al.* wurde für den CD34 Absolutwert in unterschiedlichen Probenmaterialien eine relative SD zwischen 5 % (Knochenmark) und 12 % (peripheres Blut) erzielt.[16] Die gleiche Anwendung mit dem flüssigem Analysepanel mit den zusätzlichen CD3 und CD19 Fluoreszenz-Ak ergaben bei einer stimulierten Vollblutprobe eines gesunden Spender:in über alle betrachteten Parameter eine relative SD zwischen 0,2 % und 6,1 % sowie eine relative SD von nur 5,94 % für den Parameter CD34 Zellen/µL.

Die Sensitivitätsmessungen wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen durchgeführt, sodass nur die Absolutwerte, nicht aber der prozentuale Anteil der validierten Parameter betrachtet werden konnte. Auch bei der Bestimmung von LOB, LOD und LOQ konnten ähnliche Sensitivitätswerte zum getrockneten Analysepanel für die Parameter CD34, CD3 und CD19 ermittelt werden. Der LOQ für den CD34 Absolutwert lag bei beiden Analysen sehr niedrig mit zwei CD34 Zellen/µL.[15] Der LOQ für die Parameter CD3 Zellen/µL und CD19 Zellen/µL war für das getrocknete Analysepanel (je 4 Zellen/µL) nach dem Bestimmungsverfahren von Armbruster *et al.*[54] doppelt so hoch wie bei dem Flüssigpanel (je 2 Zellen/µL).[15] Die Verwendung von geeigneten Referenzmaterialien ermöglicht eine sichere Prüfung einzelner Validierungsparameter.

Spiking-Versuche dienen der präzisen Unterscheidung des Rauschsignals vom eigentlichen Messsignal, zum Beispiel bei der Bestimmung von minimalen Resterkrankungen (*Minimal Residual Disease*).[52] Das ISHAGE-Protokoll sieht einen Ausschluss von fluoreszierenden Zelltrümmern (*debris*) vor,[60] um eine präzise CD45-Population und damit

auch deren Unterpopulationen, wie CD34 oder CD3 Zellen zu analysieren. Ein Rauschsignal, verursacht durch Zelltrümmer, wird durch effektives Gaten vom eigentlichen Mess-Signal getrennt. Durch die serielle Verdünnungsreihe werden daher geeignete Referenzproben für die Sensitivitätsmessungen hergestellt. Bei einem Methodentransfer kann das qualifizierte Vergleichsgerät den Referenzwert zur Bewertung des Neugerätes liefern.

Die Prüfung des erythrozytendepletierten KM ermöglichte die Betrachtung eines größeren Messbereiches von 7–541 CD34 Zellen/µL (flüssiges Analysepanel) und 5–474 CD34 Zellen/µL (getrocknetes Analysepanel) aufgrund der Konzentrierung des KM. Allogenes KM wird bei Blutgruppen-Unverträglichkeiten erythrozytendepletiert oder plasmareduziert.[61] Im Vergleich wurde bei der Publikation von Daubner *et al.* die Stammzellen im unmanipulierten Knochenmark im Messbereich von 12,4–350 CD34 Zellen/µL unter Anwendung des Referenzkits bestimmt. Die Vergleichbarkeit beider Assays ist durch die Linearität, Sensitivität, Präzision und Richtigkeit belegt worden. Die Prüfung der Robustheit mit unterschiedlichen Probenmaterialien im Vergleich weist nur eine verbesserte Haltbarkeit eines der beiden eingesetzten Probenmaterialien auf. Eine fehlerhaft bestimmte Haltbarkeit, verursacht durch Assay-Unterschiede kann ausgeschlossen werden. Fraglich ist, ob die Punktionstechnik oder die anschließende Lagerung des KM bis zur Transplantation einen Einfluss auf die Probenhaltbarkeit hat. Die retrospektive Datenanalyse von Witt *et al.* 2016 über 20 KM-Punktionen ergab keine Unterschiede in der Transplantatzusammensetzung für MNC, Stammzellen und T-Zellen bei der Anwendung zweier Punktionstechniken (2 mL Entnahmevolumen / häufige Punktionen versus 100 mL Entnahmevolumen / wenige Punktionen) im pädiatrischen Bereich.[62]

Die evaluierten Messungen sind ohne die Robustheit der Vitalität im Verlauf ermittelt worden. Typische in der immunphänotypischen Durchflusszytometrie angewendete Lysepuffer sind durch Plank *et al.* 2021 hinsichtlich des Verlustes von unter anderem Leukozyten, T- und B-Zellen geprüft worden.[63] Dabei wurde der NH_4Cl-Puffer, angewandt sowohl beim Analysepanel mit flüssigen Bestandteilen als auch beim Analysepanel mit getrockneten Bestandteilen als am geeignetsten für das Lyse-ohne-Waschen-Verfahren bei der Zellquantifizierung identifiziert.[63] Eine Prüfung der Zellzahlen über einen längeren Zeitraum nach Ende der Lysezeit wurde bei dieser Arbeit ebenfalls nicht durchgeführt.

Mit der Entwicklung von ATMPs stieg der Aufwand an Analysen zur Qualitätskontrolle für die Freigabetestung zellulärer Arzneimittel und damit der Aufwand der Methodenvalidierung vor allem für die mikrobiologische und durchflusszytometrische Prüfung. Hierbei

müssen nicht nur zusätzliche Prüfparameter, sondern auch deren Probenmatrizes betrachtet werden. Beispielsweise erfolgt bei der Herstellung von CAR-T-Zellen eine Prüfung der Ausgangszellen im Apheresat, der angereicherten CD4/CD8-Population zum Kulturstart, nach lentiviraler Transduktion der zu modifizierenden Zellen, sowie nach Ernte und Formulierung der Zellen als Endprodukt.[44] Bei der Herstellung von UV-A-bestrahlten mononukleären Zellen durch ECP sind nicht nur die Probenmatrizes zu berücksichtigen. Unter Anwendung des Risikomanagements wurden Validierungsmessungen gezielt durchgeführt und der Einfluss des 8-MOP auf die Bindung des Farbstoffes 7-AAD betrachtet, während die Methodenvalidierung der Matrix der Ausgangszellen des ECP-Herstellungsverfahrens bereits in Analysen anderer Zellprodukte bewertet werden konnte. Es ist daher wichtig, die Prüfparameter zur Charakterisierung und Freigabe der ATMPs auf ein Minimum zu beschränken und für die breite Anwendung auszulegen.[15] Die Anwendung des flüssigen und getrockneten Analysepanel ist grundsätzlich auch bei der Prüfung von ATMPs möglich, doch fehlen beispielsweise eine weitere Klassifizierung der T-Zellen oder Ak zur spezifischen Detektion des chimären Antigens.[44] Eine Erweiterung der Analysepanel durch Zugabe weiterer Fluoreszenz-Ak bei dem getrockneten Analysepanel konnte bereits belegt werden.[15]

Die praktikable Anwendung eines getrockneten Analysepanels im Vergleich zum flüssigen Analysepanel spielt vor allem für Labore mit hohem Probendurchsatz nicht nur in Bezug auf die Zeitersparnis eine große Rolle. Ich konnte zeigen, dass die Methoden mit dem getrockneten Analysepanel vor allem weniger anfällig für Operatorenfehler ist.[15] Die Anzahl an Probentests bei der Herstellung einer Materialcharge getrockneter Analysepanel ist um ein Vielfaches erhöht und Messschwankungen durch einen Chargenwechsel des Materials sind reduziert.[15] Die Kosten für den Ansatz eines flüssigen Analysepanel sind vergleichbar mit der Verwendung eines getrockneten Analysepanel. Da die durchflusszytometrische Analyse auch hinsichtlich der biologischen Varianz der zu prüfenden Zellpräparate unterliegt, stellt die Standardisierung auf Seiten der analytischen Methode einen zusätzlichen Nutzen bei der Charakterisierung von zellulären Produkten dar.

5. Schlussfolgerungen

Die Entwicklung neuartiger Zelltherapien führte neben einem erhöhten Herstellungsaufwand auch zu einem erhöhten Aufwand in der Qualitätskontrolle. Die getrennte immunphänotypische Bestimmung von Stammzellen und T-Zellen entspricht nicht mehr dem Stand von Wissenschaft und Technik und muss weiter standardisiert werden. Die neue Anwendung als erweitertes Analysepanel mit simultaner Stammzellbestimmung nach dem ISHAGE-Protokoll mit kombinierter T- und B-Zell Bestimmung ist sowohl als flüssiges als auch als getrocknetes Analysepanel vergleichbar und valide einsetzbar. Die neue Standardisierung bietet sowohl Vor- als auch Nachteile bei der Charakterisierung zellulärer Produkte. Neben der breiten Anwendung der Methode mit den erweiterten Analysepanel über eine Vielzahl zellulärer Produkte ist der Validierungsaufwand zwar weiterhin groß, aber durch die fokussierte Anzahl an Parametern schneller umsetzbar als bei Methoden mit komplexen Analysepanel. Die breite Anwendung der Analysepanel ist trotzdem begrenzt und eher bei klassischen Zellprodukten, Knochenmark, Ausgangszellen für ATMPs und einfachen ATMPs zu sehen als bei ATMPs mit stark modifizierten Endprodukten. Analysepanel mit getrockneten Fluoreszenz-Ak stellen eine sehr gute Alternative zu flüssigen Analysepanel in einfacher oder komplexer Form hinsichtlich der standardisierten Anwendungen dar. Sie bieten ein großes Potenzial auch in Zukunft mehr in der Qualitätskontrolle als In-prozess-Kontrolle, Endproduktanalyse, als *Potency*-Assay und zum Monitoring eingesetzt zu werden.

Literaturverzeichnis

1. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2(7583):1366-1369. doi:10.1016/s0140-6736(68)92673-1
2. Weaver C, Buckner C, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, Storb R, Hansen JA, Bensinger W. Syngeneic Transplantation With Peripheral Blood Mononuclear Cells Collected After the Administration of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood*. 1993;82(7):1981-1984. doi:10.1182/BLOOD.V82.7.1981.1981
3. Gratwohl A, Pasquini M, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, Gratwohl M, Bouzas L, Confer D, Frauendorfer K, Gluckman E, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Madrigal A, Mohty M, Noel L, Novitzky N, Nunez J ,Oudshoorn M, Passweg J, van Rood J, Szer J, Blume K, Appelbaum F, Kodera Y, Niederwieser D. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*. Published online 2015. doi:10.1016/S2352-3026(15)00028-9
4. Im A, Pavletic SZ. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier; 2019:461-469.e3. doi:10.1016/B978-0-323-47674-4.00028-1
5. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol*. 1965;66(3). doi:10.1002/jcp.1030660309
6. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1966;44(3). doi:10.1038/icb.1966.28
7. Nissen-Druey C, Tichelli A, Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol*. 2005;113(1). doi:10.1159/000081987
8. Moretti S, Dabusti M, Castagnari B, Tieghi A, Ferrari L, Campioni D, Punturieri M, Dominici M, Castoldi G, Lanza F. Comparison of single and dual platform methodologies for the estimation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: Correlation with colony assay. *Int J Biol Markers*. 2002;17(4). doi:10.5301/JBM.2008.5044
9. Khuu HM, Patel N, Carter CS, Murray PR, Read EJ. Sterility testing of cell therapy products: Parallel comparison of automated methods with a CFR-compliant method. *Transfusion*. 2006;46(12). doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01041.x
10. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE

guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*. Published online 1996. doi:10.1089/scd.1.1996.5.213

11. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern A, Lansdorp P, Bonadonna G, Gianni A. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*. Published online 1991. doi:10.1182/blood.v77.2.400.bloodjournal772400
12. Bender J, Unverzagt K, Walker D, Lee W, Smith S, Williams S, Van Epps D. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol*. Published online 1994. doi:10.1006/clin.1994.1003
13. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Robert Sutherland D. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Commun Clin Cytom*. Published online 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2<61::AID-CYTO1>3.0.CO;2-F
14. Gratama J, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen H, Keeney M, Marti G, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland D, Van Der Schoot C, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Commun Clin Cytom*. Published online 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980615)34:3<128::AID-CYTO3>3.0.CO;2-D
15. Haussmann K, Streitz M, Takvorian A, Grund J, Skenderi Z, Tietze-Bürger C, Movassaghi K, Künkele A, Blum A, Bullinger L. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products. *Sci Rep*. 2022;12(1):1-14. doi:10.1038/s41598-022-22339-1
16. Massin F, Huili C, Decot V, Stoltz JF, Bensoussan D, Latger-Cannard V. Validation of a single-platform method for hematopoietic CD34+ stem cells enumeration according to accreditation procedure. In: *Bio-Medical Materials and Engineering*. ; 2015. doi:10.3233/BME-141226
17. Lemos N, Farias M, Kubaski F, Scotti L, Onsten T, Brondani L, Wagner S, Sekine L. Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. *Hematol Transfus Cell Ther*. Published online 2018. doi:10.1016/j.htct.2018.01.002
18. Sutherland DR, Nayyar R, Acton E, Giftakis A, Dean S, Mosiman VL. Comparison

of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. *Cytotherapy*. Published online 2009. doi:10.1080/14653240902923161

19. Uharek L, Friedrichs B, Nogai A, Gentilini C, Basara N, Niederwieser D, Thiel E. Successful Treatment of High-Risk and Refractory Acute Myeloid Leukemia with haploidentical Stem Cell Transplantation Plus NK cell therapy. *Blood*. 2010;116(21). doi:10.1182/blood.v116.21.2370.2370
20. Huenecke S, Bremm M, Cappel C, Esser R, Quaiser A, Bonig H, Jarisch A, Soerensen J, Klingebiel T, Bader P, Koehl U. Optimization of individualized graft composition: CD3/CD19 depletion combined with CD34 selection for haploidentical transplantation. *Transfusion*. 2016;56(9):2336-2345. doi:10.1111/trf.13694
21. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-4383. doi:10.1182/blood-2008-03-077974
22. Bundesärztekammer. Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen - Erste Fortschreibung. *Dtsch Arztebl*. Published online 2019.
23. Bönig H, Heiden M, Schüttrumpf J, Müller MM, Seifried E. Potenzial hämatopoetischer Stammzellen als Ausgangsmaterial für Arzneimittel für neuartige Therapien. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2011;54(7). doi:10.1007/s00103-011-1305-2
24. Quaiser A, Köhl U. Was ist gesichert bei den Zelltherapien? *Internist (Berl)*. 2018;59(12). doi:10.1007/s00108-018-0516-0
25. van Rhee F, Kolb HJ. Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse. *Curr Opin Hematol*. 1995;2(6). doi:10.1097/00062752-199502060-00005
26. Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of natural killer cells in hematopoetic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. Published online 2005. doi:10.1038/sj.bmt.1704810
27. McCallion O, Bilici M, Hester J, Issa F. Regulatory T-cell therapy approaches. *Clin Exp Immunol*. 2023;211(2):96-107. doi:10.1093/cei/uxac078
28. Maschan M, Blagov S, Shelikhova L, Shekhovtsova Z, Balashov D, Starichkova J, Kurnikova E, Boyakova E, Muzalevskii Y, Kazachenok A, Trakhtman P, Osipova E, Khripkova N, Zhogov V, Novichkova G, Maschan A. Low-dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted unrelated and haploidentical transplantation: Results of a pilot trial. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(3):264-

273. doi:10.1038/s41409-017-0035-y

29. Damerval M, Fagnoni-Legat C, Louvrier A, Fischer S, Limat S, Clairet A, Nerich V, Madelaine I, Kroemer M. ATMP Environmental Exposure Assessment in European Healthcare Settings: A Systematic Review of the Literature. *Front Med*. 2021;8. doi:10.3389/fmed.2021.713047
30. Priesner C, Hildebrandt M. Advanced Therapy Medicinal Products and the Changing Role of Academia. *Transfus Med Hemotherapy*. 2022;49(3). doi:10.1159/000524392
31. Detela G, Lodge A. EU Regulatory Pathways for ATMPs: Standard, Accelerated and Adaptive Pathways to Marketing Authorisation. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2019;13:205-232. doi:10.1016/j.omtm.2019.01.010
32. Neuenhahn M, Albrecht J, Odendahl M, Schlott F, Dössinger G, Schiemann M, Lakshmipathi S, Martin K, Bunjes D, Harsdorf S, Weissinger E, Menzel H, Verbeek M, Uharek L, Kröger N, Wagner E, Kobbe G, Schroeder T, Schmitt M, Held G, Herr W, Germeroth L, Bonig H, Tonn T, Einsele H, Busch D, Grigoleit G. Transfer of minimally manipulated CMV-specific T cells from stem cell or third-party donors to treat CMV infection after allo-HSCT. *Leukemia*. 2017;31(10). doi:10.1038/leu.2017.16
33. Gottlieb D, Clancy L, Withers B, McGuire H, Luciani F, Singh M, Hughes B, Gloss B, Kliman D, Ma C, Panicker S, Bishop D, Dubosq M, Li Z, Avdic S, Micklethwaite K, Blyth E. Prophylactic antigen-specific T-cells targeting seven viral and fungal pathogens after allogeneic haemopoietic stem cell transplant. *Clin Transl Immunol*. 2021;10(3). doi:10.1002/cti2.1249
34. Whilding LM, Maher J. CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? *Mol Oncol*. 2015;9(10). doi:10.1016/j.molonc.2015.10.012
35. Mock U, Nickolay L, Philip B, Cheung G, Zhan H, Johnston I, Kaiser A, Peggs K, Pule M. Thrasher AQasim W Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*. 2016;18(8). doi:10.1016/j.jcyt.2016.05.009
36. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*. 2020;59. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102975
37. Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, Del Baldo G, De Ioris M, Serra A, Mastronuzzi A, Cefalo M, Pagliara D, Amicucci M, Li Pira G, Leone G, Bertaina V,

Sinibaldi M, Di Cecca S, Guercio M, Abbaszadeh ZIaffaldano L, Gunetti MIacovelli S, Bugianesi R, Macchia S, Algeri M, Merli P, Galaverna F, Abbas R, Garganese M, Villani M, Colafati G, Bonetti F, Rabusin M, Perruccio K, Folsi V, Quintarelli C, Locatelli F. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2023;388(14):1284-1295. doi:10.1056/nejmoa2210859

38. Nygaard M, Wichert S, Berlin G, Toss F. Extracorporeal photopheresis for graft-vs-host disease: A literature review and treatment guidelines proposed by the Nordic ECP Quality Group. *Eur J Haematol*. 2020;104(5). doi:10.1111/ejh.13381
39. Gebo JET, Lau AF. Sterility Testing for Cellular Therapies: What Is the Role of the Clinical Microbiology Laboratory? *J Clin Microbiol*. 2020;58(7). doi:10.1128/JCM.01492-19
40. Putnam NE, Lau AF. Comprehensive Study Identifies a Sensitive, Low-Risk, Closed-System Model for Detection of Fungal Contaminants in Cell and Gene Therapy Products. *J Clin Microbiol*. 2021;59(11). doi:10.1128/JCM.01357-21
41. Christodoulou I, Patsali P, Stephanou C, Antoniou M, Kleanthous M, Lederer CW. Measurement of lentiviral vector titre and copy number by cross-species duplex quantitative PCR. *Gene Ther*. 2016;23(1). doi:10.1038/gt.2015.60
42. Mfarrej B, Gaude J, Couquiaud J, Calmels B, Chabannon C, Lemarie C. Validation of a flow cytometry-based method to quantify viable lymphocyte subtypes in fresh and cryopreserved hematopoietic cellular products. *Cytotherapy*. Published online 2021. doi:10.1016/j.jcyt.2020.06.005
43. Li Y, Huo Y, Yu L, Wang J. Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: General Principles and Key Issues. *Engineering*. Published online 2019. doi:10.1016/j.eng.2018.12.003
44. Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, Melk A, Kubaink F, Abken H, Hombach A, Aktas M, Essl M, Bürger I, Kaiser A, Rauser G, Jurk M, Goudeva L, Glienke W, Arseniev L, Esser R, Köhl U. Functionality and Cell Senescence of CD4/ CD8-Selected CD20 CAR T Cells Manufactured Using the Automated CliniMACS Prodigy® Platform. *Transfus Med Hemotherapy*. Published online 2019. doi:10.1159/000495772
45. Rossignol A, Bonnaudet V, Clémenceau B, Vié H, Bretaudeau L. A high-performance, non-radioactive potency assay for measuring cytotoxicity: A full substitute of the chromium-release assay targeting the regulatory-compliance objective. *MAbs*. 2017;9(3):521-535. doi:10.1080/19420862.2017.1286435

46. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, Yakoub-Agha I, Labalette M. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2021;100(2):218-224. doi:10.1002/cyto.b.21941
47. Blache U, Weiss R, Boldt A, Kapinsky M, Blaudszun A, Quaiser A, Pohl A, Miloud T, Burgaud M, Vucinic V, Platzbecker U, Sack U, Fricke S, Koehl U. Advanced Flow Cytometry Assays for Immune Monitoring of CAR-T Cell Applications. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.658314
48. Kaiser A, Assenmacher M, Schröder B, Meyer M, Orentas R, Bethke U, Dropulic B. Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy. *Cancer Gene Ther*. 2015;22(2). doi:10.1038/cgt.2014.78
49. Borman P, Elder D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures. In: *ICH Quality Guidelines*. John Wiley & Sons, Inc.; 2017:127-166. doi:10.1002/9781118971147.ch5
50. Strobel J, Hauck-Dlimi B, Weisbach V, Eckstein R, Zingsem J, Strasser E. Comparison of Simultaneous CD34+ and CD3+ Quantification with a Modified Stem Cell Enumeration Kit on Two Different Flow Cytometers. *Clin Lab*. Published online 2016. doi:10.7754/clin.lab.2016.160429
51. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed M, Magari R, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Schlickeiser S, Kverneland A, Meisel C, Volk H, Sawitzki B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: Panels and methods from the ONE study. *Transplant Res*. Published online 2013. doi:10.1186/2047-1440-2-17
52. Blum A, Haussmann K, Streitz M, Schlickeiser S, Tietze-Buerger C, Blau I, Uharek U. Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma. *Sci Rep*. Published online 2019. doi:10.1038/s41598-019-39631-2
53. Lacaille V, Bowers R. Using standardized dry antibody panels for flow cytometry in the assessment of altered immune profiles in response to SARS-CoV2 infection. *J Immunol*. 2021;206(1_Supplement). doi:10.4049/jimmunol.206.supp.20.40
54. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*. Published online 2008.
55. Waeckel L, Kennel A, Berger AE, Lambert C. Human leukocyte antigen-B27 typing by flow cytometry: Comparison of three CE-IVD methods. *Cytom Part B - Clin Cytom*. Published online 2022. doi:10.1002/cyto.b.22102

56. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytom Part A*. Published online 2004. doi:10.1002/cyto.a.20092
57. Ryherd M, Plassmeyer M, Alexander C, Eugenio I, Kleschenko Y, Badger A, Gupta R, Alpan O, Sønder S. Improved panels for clinical immune phenotyping: Utilization of the violet laser. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2018;94(5):671-679. doi:10.1002/cyto.b.21532
58. Hulspas R, Dombkowski D, Preffer F, Douglas D, Kildew-Shah B, Gilbert J. Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates. *Cytom Part A*. 2009;75(11):966-972. doi:10.1002/cyto.a.20799
59. Dauber K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T. Enumeration of viable CD34+ cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: Results of a study of the novel BD™â., ¢ stem cell enumeration kit. *Cytotherapy*. Published online 2011. doi:10.3109/14653249.2010.529894
60. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly J, Sutherland D, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytom Part B - Clin Cytom*. Published online 2012. doi:10.1002/cyto.b.20612
61. Soydan E, Ayyildiz E, Dalva K, Topçuoğlu P, Tol M, Arslan Ö, Ilhan O, Arat M. Impact of harvest product volume in erythrocyte depletion of allogeneic or autologous bone marrow using COBE spectra. *Transfus Apher Sci*. 2007;36(3):269-273. doi:10.1016/j.transci.2007.03.006
62. Witt V, Pichler H, Fritsch G, Peters C. Multiple small versus few large amount aspirations for bone marrow harvesting in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2016;55(2):221-224. doi:10.1016/j.transci.2016.07.017
63. Plank K, Dorn C, Krause SW. The effect of erythrocyte lysing reagents on enumeration of leukocyte subpopulations compared with a no-lyse-no-wash protocol. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(5):939-947. doi:10.1111/ijlh.13484

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katy Haussmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [„Standardanalysepanel zur immunphänotypischen Charakterisierung von klassischen und neuartigen Zelltherapeutika sowie ATMPs mit und ohne Stammzellen“ / „*Standard Analysis Panel for the Immunophenotyping Characterization of Standard and Advanced Cell Therapeutics as well as ATMPs with or without Stem Cells*“] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.og) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Katy Haussmann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Haussmann K, Streitz M, Takvorian A, Grund J, Skenderi Z, Tietze-Bürger C, Movassaghi K, Künkele A, Blum A, Bullinger L., Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products, Sci Rep, 2022
Beitrag im Einzelnen: Beantragung des Ethikvotums, Studiendesign (siehe Tabelle 1) und Probenmanagement für Vollblut und Apheresen, Erstellung des Manuskriptentwurfes mit Zusammenfassung, Ergebnisteil mit Zusammenstellung der Analysedaten sowie statistische Aufarbeitung (Fließtext sowie Tabellen 2 bis 4 und Abbildungen 1 bis 4 sowie ergänzende Abbildungen und Tabellen), Schreiben der Diskussion und des Methodenteils; Einpflegen der Rückmeldungen durch die Co-Autoren; Finalisierung und Formatierung zur Prüfung im Fachjournal „Scientific Reports“, Einreichen des Manuskripts im Fachjournal „Scientific Reports“, Erstellen des „Cover Letters“, Bewerbung um die Förderung der Veröffentlichung beim Publikationsfond der Charité Berlin während des Review-Prozesses, Kommunikation mit dem Fachjournal „Scientific Reports“ während des Review Prozesses, Überarbeitung des Manuskriptes nach Rückmeldung der Reviewer (Point-by-point response)

Publikation 2: Blum A, Haussmann K, Streitz M, Schlickeiser S, Tietze-Buerger C, Blau IW, Uharek L, Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma, Sci Rep, 2019
Beitrag im Einzelnen: Studiendesign und Probenmanagement für Knochenmark, Vollblut und Apheresen, Einpflegen der Daten in Tabelle 1, Schreiben Text „Material und Methoden“ Teil Färbeprozedere, Auswertung von Analysedaten Tabelle 4, Gegenlesen des Manuskriptentwurfes vor Einreichen im Fachjournal, Unterstützung bei der Beantragung zur Finanzierung über den Publikationsfond der Charité.

_____

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

_____

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar(e) der Publikation(en)

scientific reports

Check for updates

OPEN

Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products

Katy Haussmann[1]✉, Mathias Streitz[2,3], Anna Takvorian[1], Jana Grund[1], Zemra Skenderi[1], Carola Tietze-Bürger[1], Kamran Movassaghi[1], Annette Künkele[1,4,5,6,7], Agnieszka Blum[8] & Lars Bullinger[1,5,6,9]

The most widely used quality control assay for CD34 + hematopoietic stem cell product characterization is the protocol established by the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE). While this protocol is still the gold standard for stem cell enumeration and viability assessment, it does not include T cell enumeration, which is nowadays mandatory for assaying standard allogeneic grafts and various advanced therapy medicinal products (ATMPs). In accordance, we have developed and extensively validated a new approach for a more comprehensive characterization of hematopoietic cellular products using a pre-formulated dried antibody format panel. In addition to the counting beads, the typical markers CD45 fluorescein isothiocyanate (FITC) and CD34 phycoerythrin (PE), as well as the viability dye 7-amino actinomycin D (7-AAD), our novel pre-formulated panel also contains CD3 Pacific Blue (PB) and CD19 allophycocyanin (APC) in the same tube, thereby allowing a combined calculation of leucocytes, stem cells, T and B cells. Showing high linearity, sensitivity and accuracy, our approach is easy to implement and enables a more in-depth characterization of the cellular product under release testing conditions. In addition, the dried pre-formulated antibody approach increases assay reliability compared to the standard antibody panel.

The success of stem cell transplantation depends on the collection and infusion of adequate numbers of viable $CD34^+$ hematopoietic stem cells. CD34 enumeration by flow cytometry is a widely accepted method to count hematopoietic progenitors and stem cells. In 1996 the Stem Cell Enumeration Committee of the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) published the guideline for $CD34^+$ cell determination[1] that remains the recognized standard for laboratories all over the world. Over the time, the protocol for stem cell enumeration has been optimized[1–5]. Following the original publication of the ISHAGE standards by Sutherland et al.[1] Keeney et al. modified the protocol again introducing a single platform method with counting beads, two colors and the cell death marker 7-AAD[1,4].

Since then, the ISHAGE protocol has become a recognized pharmaceutical guideline. However, the current advances in the development of cellular therapies enforce the further improvement of quality control (QC) assays. In fact, information about the residual CD3 count is important for products such as donor lymphocyte infusions, TCR α/β- and CD19-depleted haploidentical allogeneic stem cell grafts. In addition, the leucocyte

[1]Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt Universität Zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Stem Cell Facility, Charité–Universitätsmedizin Berlin, 10353 Berlin, Germany. [2]Institute of Medical Immunology, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. [3]Department of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Friedrich-Loeffler Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany. [4]Department of Pediatric Oncology and Hematology, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt Universiät Zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Charité–Universitätsmedizin Berlin, 10353 Berlin, Germany. [5]German Cancer Consortium (DKTK), 10117 Berlin, Germany. [6]German Cancer Research Center (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany. [7]Berlin Institute of Health at Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. [8]Ardigen, 30-394 Kraków, Poland. [9]Department of Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt Universität Zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ✉email: Katy.Haussmann@charite.de

Performance characteristic	Used sample types	Internal laboratory range	Linearity	Sensitivity	Accuracy	Inter-operator analysis
	Non-mobilized WB	×	–	–	–	×
	Mobilized WB	×	×	×	×	×
	Mobilized stem cell apheresis	×	×	–	×	×
	Mobilized stem cell apheresis after cryopreservation	×	–	–	×	–
	Donor lymphocytes	×	×	–	×	×
	Raji cell line	–	–	×	–	–
	Stem cell apheresis-CD34 selected	–	–	×	–	–
	Non transduced CD4/CD8 cells	–	–	×	–	–
	Reference blood	–	–	–	×	–
No. of samples with different cell concentrations		185	24	5	148	5
No. of replicates		1–3	2	10	1–3	1–2
Total no. of samples		295	48	50	324	8
Acceptance criteria		–	$r^2 \geq 0.95$	–	$R^2 \geq 0.95$ reference values pass CV ≤ 10%	CV ≤ 10%

Table 1. Summary of the validation design for the pre-formulated dried reagent panel (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC as well as absolute counting beads) measured with the flow cytometer Navios 10/3 with different sample types of standard products.

and T cell counts are also relevant for advanced therapy medicinal products (ATMP) such as autologous mononuclear cells in extracorporeal photopheresis (ECP) or genetically engineered chimeric antigen receptor (CAR) T cells and CAR natural killer (NK) cells[6–9]. Furthermore, quantification of B cells gains on importance since there is a growing body of evidence indicating that B cell transfer can support the humoral immune response after hematopoietic stem cell transplantion[10,11]. Moreover, new generations of clinical flow cytometers expand the technical capabilities far beyond the detection of just three fluorescence parameters[12].

In order to meet the emerging QC requirements, we have established an innovative expanded, highly standardized and easily applicable flow cytometric panel. Besides the enumeration of CD34 cell subset, this panel also includes quantification of CD3 and CD19 cells. Furthermore, the staining protocol was optimized using the DURAClone dry technology. This approach is based on a dry, pre-formulated, custom-made reagent panel that enables robust performance and a faster turn-around of the assay.

Here, we present the validation results for this simplified and standardized approach that enables not only CD34 quantification, but also the determination of CD3 and CD19 cells in peripheral blood, as well as in fresh and cryopreserved standard stem cell products. The implementation of our assay allows an optimized, lean and efficient QC for a wide range of cell therapeutics. Furthermore, this approach is flexible and can be further adapted to suit the specific needs for the characterization of novel cellular products.

Results

The validation of our novel method was specified in a validation plan that defines the types of specimens to be investigated [whole blood (WB) and leukapheresis (LA)], the number of samples and replicates, as well as the acceptance criteria for internal laboratory range, linearity, sensitivity, accuracy and inter-operator analysis variation. This validation plan is summarized in Table 1. In general, the total number of samples does not include the CD34 isoclone control sample. Within the accuracy testing the new assay was compared with established reagent panels in liquid format.

Establishment of the pre-formulated dried reagent panel: internal laboratory measurements reveal typical wide laboratory ranges. In the manufacturing of pharmaceuticals, QC with the analysis of active ingredients plays a central role, since products and product batches can only be released after product specifications have been determined and evaluated. The characterization of cellular products forces the respective laboratories to establish measurement ranges for the different parameters determined during QC testing. Because of the specific character of these products, they naturally differ from the reference values of the blood obtained from healthy donors. Therefore, we used the laboratory range to give an overview about the measuring range for CD45, CD34, CD3 and CD19 populations, respectively, and statistical values (minimum (min), maximum (max), median (median)) in standard cellular products and their in-process controls (n = 295) at the Charité Stem Cell Facility (CSCF). The obtained values reflected the wide ranges generally observed in the QC measurements (Table 2).

The new approach nicely reflected the expected difference between the specimens and cohorts (Supplemental Table S1). As expected, healthy donor derived samples showed higher absolute values for CD45 and CD34 as well as higher CD34 frequencies after granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) mobilization than specimen from healthy donors without stimulation. Measurements of stimulated WB samples before apheresis (n = 15) showed the following results [CD45 cells/µL: 56,280 (28,860–84,620); CD34 cells/µL: 120 (32–280); CD34%: 0.19

Parameter		Min	Max	Median
CD45	cells/µL	1700	783,840	79,420
	Viability %	37.33	100.00	98.75
CD34	%	0.00	11.48	0.32
	cells/µL	0	35,440	328
	Viability %	34.21	100.00	99.46
CD3	%	1.26	62.72	15.83
	cells/µL	252	200,040	6,024
	Viability %	85.14	100.00	99.03
CD19	%	0.00	17.22	1.75
	cells/µL	0	60,120	644
	Viability %	0.00	100.00	99.23

Table 2. Results of the Laboratory range: Several sample types of patients and donors (n = 295) were measured to confirm the laboratory range of frequencies (%), viable absolute values (cells/µL) and viability (%) for the parameter CD45, CD34, CD3 and CD19.

(0.11–0.47)], and measurements in stimulated allogenic cellular products (n = 30) the following findings [CD45 cells/µL: 280,805 (116,695–691,240); CD34 cells/µL: 2020 (460–4800); CD34%: 0.72 (0.24–2.68)]. In comparison WB analysis of specimen from healthy donors without stimulation (n = 15) showed the following [CD45 cells/µL: 5770 (4080–8200); CD34 cells/µL: 2 (0–4); CD34%: 0.03 (0–0.08)], and the investigation of unstimulated donor lymphocytes (n = 20) these results [CD45 cells/µL: 78,315 (29,730–114,090); CD34 cells/µL: 57 (8–267); CD34%: 0.07 (0.01–0.24)]. In stimulated WB before LA the median CD45 absolute count was lower than after LA [CD45 cells/µL: 30,975 (1700–84,620) vs. CD45 cells/µL: 41,330 (16,990–85,200)], whereas the median CD34 absolute count and its frequency were higher [CD34 cells/µL: 112 (0–595); CD34%: 0.19 (0.00–5.61) vs. CD34 cells/µL: 37 (5–660); CD34%: 0.11 (0.02–1.75)]. Furthermore, the median values of the CD45, CD34 and CD3 absolute counts were lower in LA samples of mobilized patients than of healthy mobilized donors [CD45 cells/µL: 166,390 (64,490–783,840); CD34 cells/µL: 1285 (111–35,440); CD34%: 1.12 (0.13–11.48); CD3 cells/µL: 23,662 (2977–70,440); CD3%: 14.84 (3.63–43.29); CD19 cells/µL: 266 (0–6670); CD19%: 0.19 (0.00–3.03) vs. CD45 cells/µL: 280,805 (116,695–691,240); CD34 cells/µL: 2020 (460–4800); CD34%: 0.72 (0.24–2.68); CD3 cells/µL: 68,020 (41,190–200,040); CD3%: 25.77 (12.56–37.20); CD19 cells/µL: 17,980 (1207–60,120); CD19%: 6.51 (2.69–14.39)]. The median values of the viability parameter were close to 100% but the analysis showed low viability for CD45 (37%) and CD34 (34%) and the minimum viability of CD19 was zero. At the end, we defined our laboratory range based on the parameters measured in all different specimens used.

The new assay linearity was confirmed in standard cellular products and in process controls. The linearity indicates the level of correspondence between the measured cell phenotypes and the expected concentrations of CD45, CD34, CD3 and CD19 cells in the sample stained with the pre-formulated dried reagent panel. The coefficient of determination (r^2) is determined by the calculated expected value compared with the analysis value. A high coefficient of determination close to 1.0 indicates high linearity since the measured cell concentrations are then directly proportional to the calculated expected cell concentration in the sample.

Fresh autologous stem cells and non-mobilized healthy donor lymphocytes were stained with the pre-formulated dried reagent panel for linearity testing (Fig. 1). In fresh autologous stem cells, linearity was confirmed for the CD45 cell concentration between 975 and 98,324 cells/µL ($r^2 = 0.9916$), for CD34 between 61 and 6931 cells/µL ($r^2 = 0.9937$) as well as for CD3 between 552 and 30,199 cells/µL ($r^2 = 0.9994$) (Fig. 1a). In lymphocytes of healthy donors, the linearity was measured for CD45 cells between 410 and 104,596 cells/µL ($r^2 = 0.9898$), for CD3 between 145 and 43,254 cells/µL ($r^2 = 0.9976$) and for CD19 between 38 and 12,481 cells/µL ($r^2 = 0.9992$) (Fig. 1b). Linearity was also compared in mobilized WB and in fresh autologous stem cells. Despite different CD34 levels, the r^2 for mobilized WB with lower CD34 levels were comparable with the one seen in the fresh autologous stem cells with higher CD34 levels. The acceptance criteria of $r^2 \geq 0.95$ for linearity were always met across the tested samples and for all populations of interest. The linearity over all tested samples was therefore confirmed for the CD45 concentration between 761 and 98,324 cells/µL, for the CD34 concentration between 2 and 6931 cells/µL as well as for the CD3 concentration between 55 and 43,254 cells/µL and for the CD19 concentration between 12 and 12,481 cells/µL.

Sensitivity measurement strategies result in different values for LOD and LOQ. The sensitivity of a measurement can be described using the following values: Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ). To measure the sensitivity, two procedures were tested. The established approach includes LOD and LOQ determination whereas the novel approach additionally determines the LOB. With the help of low-level samples, the LOD and LOQ of the established approach can be determinate. Low-level samples of CD34 cells, CD3 cells and CD19 cells identified with the in the Charité Stem Cell Facility reference method by the FACS Calibur flow cytometer before the elaborate sensitivity measurements began. Reference samples without CD34 cells (WB), CD3 cells (Raji cell line) and CD19 cells (CD4/CD8 selected cells) were used

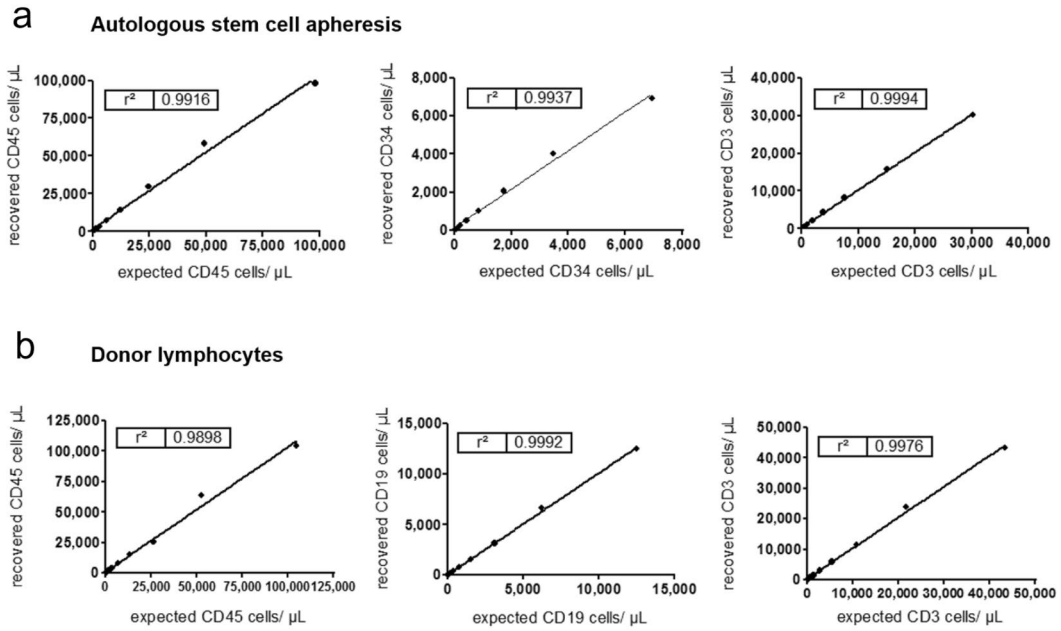

Figure 1. Linearity results of method validation with the pre-formulated dried reagent panel (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC, counting beads) and standard products analyzed with the flow cytometer. Autologous stem cell apheresis (**a**) and donor lymphocytes (**b**) were serial diluted and the concentration means of recovered cells in cells/µL (A: CD45, CD34, CD3; B: CD45, CD3, CD19) were compared with the expected values by linear regression.

Parameter		Sensitivity established approach		Sensitivity novel approach		
		LOD	LOQ	LOB	LOD	LOQ
CD34	%	0.01	0.04	0.01	0.02	0.03
	cells/µL	1	2	0	1	2
CD3	%	0.12	0.40	0.02	0.21	0.22
	cells/µL	2	6	0	3	4
CD19	%	0.02	0.06	0.00	0.03	0.04
	cells/µL	1	5	0	3	4

Table 3. Sensitivity results summary for of the Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) measured as established approach for frequencies and absolute counts of the parameters CD34, CD3 and CD19. The novel approach of sensitivity measurements estimates additionally the Limit of Blank (LOB) by Armbruster et al.[13].

for LOB determination. For every parameter CD34, CD3 and CD19 and sensitivity parameter 10 replicates analyzed and statistical evaluated. The assay with the pre-formulated dried panel in combination with the flow cytometer Navios showed a very low LOQ for both frequency levels and absolute counts (Table 3). Both measurement strategies showed comparable results for the LOQ and the LOD (Supplemental Tables S2 and S3). The LOQs of CD34 cells were similar and showed in both approaches a lower sensitivity level than the LOQs for CD3 and CD19 cells. Additionally, sensitivity analysis with the established approach (CD34: 2 cells/µL; 0.04%; CD3: 6 cells/µL; 0.40%; CD19: 5 cells/µL; 0.06%) was performed to confirm the validity of the new release testing assay.

Measuring cells in one tube improves accuracy. To exclude a systematic bias, we performed accuracy tests in concordance with the national External Quality Assessment (EQA). Results obtained using the pre-formulated tube were compared with the results obtained with validated methods on the same sample material. In brief, the results of the pre-formulated dried reagent panel tube were compared with the results of accepted methods using liquid antibody conjugates to enumerate stem cells (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, counting beads) and T cells (CD45 FITC, CD3 PE, 7-AAD, counting beads) separately (Fig. 2a). The statistical evaluations showed a strong correlation with $r^2 = 0.9672–0.9944$ for the absolute cell counts of CD45 as well as for the frequencies and absolute counts of CD34 cells. Moreover, the r^2 were higher when analyzing CD34 and CD3 cells in one tube (Fig. 2b) than in separate tubes (Fig. 2a). However, the regression coefficient between

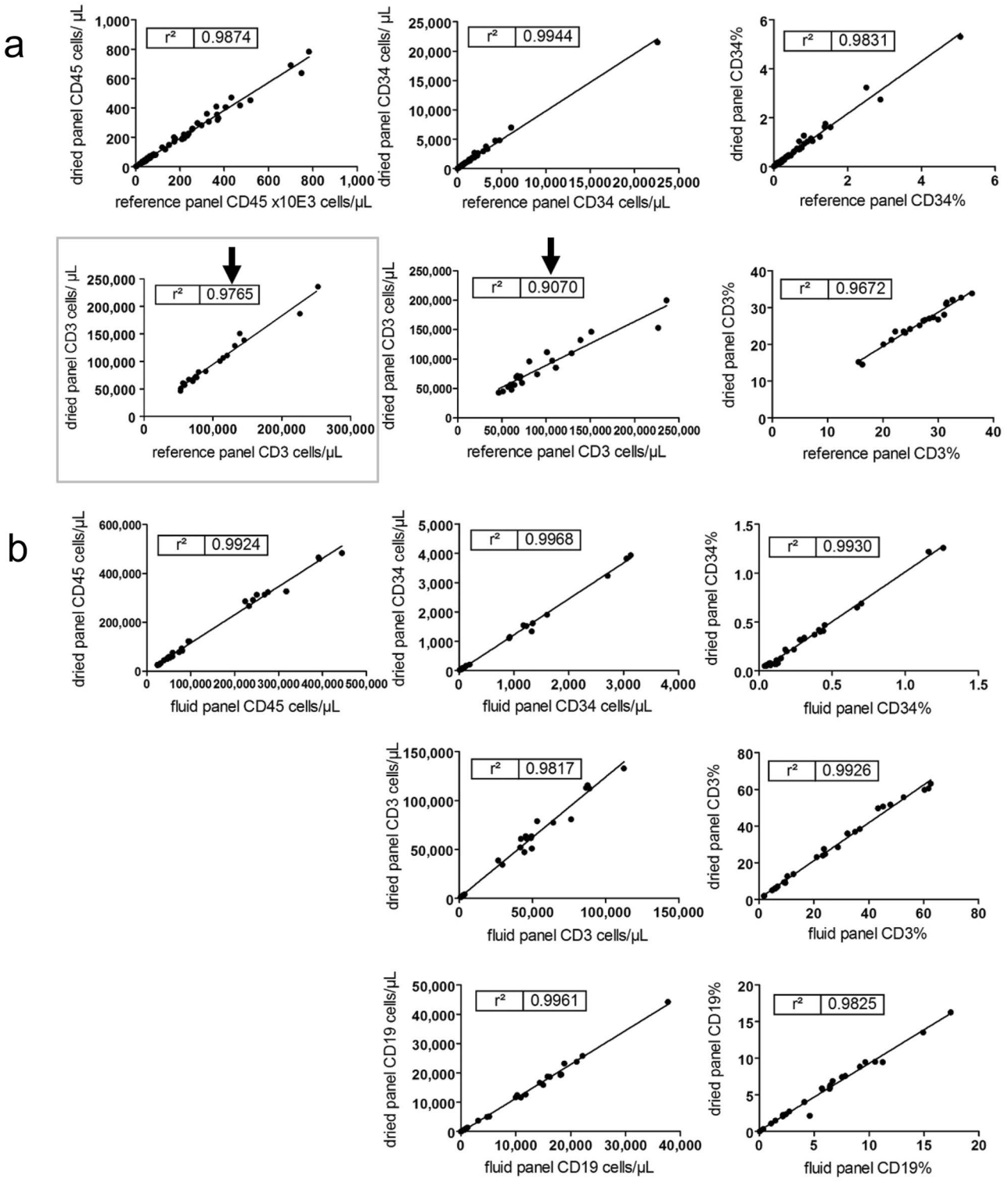

Figure 2. Validation results for accuracy testing. (**a**) Comparison the counting results of stem cells and T cells between the pre-formulated dried reagent panel including CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB and CD19 APC and counting beads as well as the reference method using separated CD34 and CD3 determinations and the fluidic antibodies CD45 FITC, CD34 PE and CD45 FITC, CD3 PE each with 7-AAD and true count beads (autologous specimens only CD34 enumeration). Standard allogenic and autologous stem cell apheresis (n = 33) and mobilized whole blood (n = 35) of donors and patient after mobilization were compared by linear regression regarding the results of absolute counts in cells/µL (CD45 × 10^3, CD34, CD3) and frequencies in % (CD34, CD3). (**b**) Accuracy of the measurement of the pre-formulated dried reagent panel and similar fluidic reagent panel (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC and counting beads) were compared as described under (**a**) (LA of all cohorts: n = 17), whole blood of mobilized donors and patient (n = 11) including stem cells, T and B cells.

the dry pre-formulated reagent panel and the separate liquid T cell enumeration was lower for CD3 frequency ($r^2 = 0.9672$) than for the CD34 frequency ($r^2 = 0.9831$) and the acceptance criterion of $r^2 \geq 0.95$ for CD3 cells/µL ($r^2 = 0.9070$) was not met. Further evaluations showed that when applying the relative percentage of CD3 to the CD45 absolute cell count from the CD34 determination demonstrating a measurement in one tube like the new assay, the r^2 improved from 0.9070 to 0.9765 (Fig. 2a). The acceptance criteria fulfilled when re-calculating the CD3 absolute cell count. Further, the comparison with the similar panel based on liquid reagents (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC, counting beads; Fig. 2b) showed a high degree of correlation between $r^2 = 0.9817–0.9968$ for all frequencies and absolute cell counts. Likewise, the method with the new pre-formulated dried reagent panel and the same fluid reagent panel as stem kit with the drop-in of CD3 PB and CD19 APC successfully met the national EQA (INSTAND e.V., Germany) for stem cells as well as for T and B cells during the investigation period of two years.

We demonstrated the accuracy of the new approach. The comparison of the pre-formulated dried reagent panel with the separate CD34 and CD3 determination reference methods with liquid reagents, showed the advantages of determining stem cells and T cells in one tube. This finding has been confirmed by using the similar assay as liquid variant. The validation data with the pre-formulated dried reagent panel were submitted and approved as release testing assay by the Paul Ehrlich Institute (PEI) authority. This approval enabled us to use the new assay for LA products as well as for manufacturing of ATMPs.

Optimized gate template results in low inter-operator variability. The inter-operator analysis provides an indication of the variability of the assay caused by the operator. The results of the Inter-Operator analysis are summarized in Table 4.

The CVs% between Operators were lower than 5% for all parameters except the parameter CD34% in the non-mobilized LA. This demonstrated a high consistency of the assay due to the optimized gate template.

The pre-formulated panel allows the characterization of advanced cellular products. New selection processes and the production of novel ATMPs require a combined determination of stem cells, T and B cells under standardized conditions. This comprehensive analysis is also necessary (i) for characterizing the starting materials for ATMPs, (ii) for process control, and (iii) for cell expansion monitoring. While the above reported validation study of our pre-formulated dried reagent panel demonstrated its valid application in standard products like autologous and allogenic stem cell apheresis and donor lymphocytes, we also wanted to investigate the possibility of utilizing the same panel to analyze other products and ATMPs. Therefore, the pre-formulated panel was tested for three different cellular products: allogenic CD19-TCR-α/β-depleted stem cells, mononuclear cells for ECP therapy and CAR T cells in process validation from healthy donors (Fig. 3).

Allogeneic CD19-TCR-α/β-depleted stem cells were measured before and after CD19- and TCR α/β-depletion with the CliniMACS System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). After depletion an enrichment of CD34 cells from 0.79 to 1.37% of total viable cells was achieved while a reduction of CD3 cells from 20.93 to 1.00% of total viable cells was observed (Fig. 3a). After labeling with immunomagnetic beads, the common issue with the masking of CD19 antigens by the manufacturing antibody occurred. In fact, the pre-formulated dried reagent panel with anti-CD19 APC could not detect the B cell population anymore.

To determine the actual CD19 value, all fractions were analyzed with the recommended fluorescence antibodies by Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach and we observed an CD19 depletion from 5.95% to 0.003%. Figure 3 shows the analysis of cells before and after manipulation with methoxsalen without UVA irradiation in the context of ECP product manufacturing with the pre-formulated dried antibody panel (Fig. 3b). We could demonstrate that the treatment with methoxsalen did not influence T and B cell frequencies.

In a third experiment, starting materials for CAR T cell manufacturing were analyzed before and after CD4/CD8-selection using immunomagnetic beads (Fig. 3c). The obtained target fraction after selection did not contain any CD34 cells and the T cells were enriched. The frequency of CD19 cells was reduced from 5.76% to 0.88% and the CAR T cell culture via Prodigy system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) was started. Our results show that the pre-formulated reagent panel can be used for in-process controls during the cell separations steps or ATMP manufacturing. Nevertheless, additionally validation steps are necessary for analyzing the influence on cells of immunomagnetic beads and matrices before applying for an officially approved release test.

Additional markers can be easily added to the dried panel assay. The multi-color flow cytometer Navios with three lasers enables the detection of up to 10 fluorescent parameters. Thus, the detection of more leucocytes subpopulations is possible on this platform by adding respective antibodies to the pre-formulated reagent panel. For example, it is possible to determine the populations of NK cells and natural killer T (NKT) cells by detecting the surface antigens CD56 and CD16 in combination with the T cell marker as shown in Fig. 4.

The addition of the liquid antibodies for NK cell determination changed the analysis method with the pre-formulated reagent panel and new validation measures were required. The supplementary validation with reference material showed reproducible and valid results. All measurements (n = 30) were within the reference range of the reference blood regarding the absolute values of WBC (6000–7600 cells/µL), CD34 (0.7–5.3 cells/µL), CD3 (1542–2242 cells/µL) and CD19 (134–434 cells/µL) as well as CD3/CD16/CD56 (144–434 cells/µL). The acceptance criteria for linearity were fulfilled between the concentrations 527–7056 CD45 cells/µL ($r^2 = 1.0000$), 129–1842 CD3 cells/µL ($r^2 = 0.9998$), 23–297 CD19 cells/µL ($r^2 = 0.9998$), 16–226 $CD16^+/CD56^+/CD3^-$ cells/µL ($r^2 = 0.9999$) and 7–88 $CD16^+/CD56^+/CD3^+$ cells/µL ($r^2 = 0.9867$) (Supplemental Fig. S5). The low CD34 concentrations in the reference material did not allow the assessment of detection linearity. The repeatability assay showed a small variation coefficient between 0.80 and 2.16%, except for CD34 cells (invalid results regarding

Specimen	Parameter	Operator A (reference)	Operator B	Operator C	Operator D	Operator E	Average	Standard deviation	CV %
WB (healthy donor)	CD45 cells/µL	4497	4438	4446	4426	4431	4448	28.6234	0.64
	CD34 cells/µL	4	4	4	4	4	4.00	0.0000	0.00
	CD34%	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.0000	0.00
	CD3 cells/µL	1818	1801	1804	1796	1798	1803	8.7063	0.48
	CD3%	40.58	40.58	40.58	40.58	40.58	40.58	0.0000	0.00
	CD19 cells/µL	256	253	254	252	253	254	1.5166	0.60
	CD19%	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70	0.0000	0.00
WB (mobilized donor)	CD45 cells/µL	33,770	36,464	36,070	36,054	36,022	35,676	1080.6961	3.03
	CD34 cells/µL	46	45	46	44	44	45	1.0000	2.22
	CD34%	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.0055	4.42
	CD3 cells/µL	2129	2120	2078	2077	2077	2096	26.0327	1.24
	CD3%	5.79	5.82	5.76	5.76	5.77	5.78	0.0255	0.44
	CD19 cells/µL	1162	1153	1139	1138	1137	1146	11.1669	0.97
	CD19%	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	0.0000	0.00
LA (non- mobilized donor)	CD45 cells/µL	78,650	78,392	76,708	76,440	76,310	77,300	1127.5114	1.46
	CD34 cells/µL	42	44	46	40	42	43	2.2804	5.33
	CD34%	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.0055	9.78
	CD3 cells/µL	45,984	45,932	44,960	44,802	44,726	45,281	624.2029	1.38
	CD3%	58.46	58.59	58.61	58.61	58.61	58.58	0.0654	0.11
	CD19 cells/µL	7208	7154	6970	6944	6952	7046	125.4225	1.78
	CD19%	9.16	9.13	9.09	9.09	9.11	9.12	0.0297	0.33
LA (mobilized donor)	CD45 cells/µL	297,140	291,520	280,860	281,280	284,670	287,094	7054.3022	2.46
	CD34 cells/µL	4760	4540	4390	4400	4450	4508	152.8725	3.39
	CD34%	1.60	1.56	1.57	1.57	1.57	1.57	0.0152	0.96
	CD3 cells/µL	69,710	68,860	66,140	66,230	67,020	67,592	1611.2324	2.38
	CD3%	23.47	23.64	23.55	23.55	23.55	23.55	0.0602	0.26
	CD19 cells/µL	24,440	23,940	23,040	23,070	23,350	23,568	606.8525	2.57
	CD19%	8.23	8.21	8.20	8.20	8.20	8.21	0.0130	0.16
LA (mobilized patient)	CD45 cells/µL	187,600	186,970	188,260	185,760	185,200	186,758	1,268.1956	0.68
	CD34 cells/µL	1330	1290	1340	1280	1280	1304	28.8097	2.21
	CD34%	0.71	0.69	0.71	0.70	0.69	0.70	0.0100	1.43
	CD3 cells/µL	11,990	12,080	11,660	11,460	11,470	11,732	289.6032	2.47
	CD3%	6.39	6.46	6.19	6.19	6.19	6.28	0.1311	2.09
	CD19 cells/µL	4400	4180	4080	3980	3940	4116	184.0652	4.47
	CD19%	2.35	2.24	2.17	2.15	2.13	2.21	0.0896	4.06

Table 4. Results of inter-operator analysis: operators (B to E) were checked versus the reference values of five several specimens analyzed with the pre-formulated dried reagent panel by Operator A.

the Limit of Quantification (CD34 cells/µL: 2, CD34%: 0.04; Supplemental Table S6). The LOQ for NK cells was 2 cell/µL (Supplemental Table S7).

The expansion of the pre-formulated dried reagent panel with the help of the drop-in antibody conjugates to detect further populations of interest like NK cells and NKT cells is possible, but must be validated accordingly to the respective cellular products when used as drug release test.

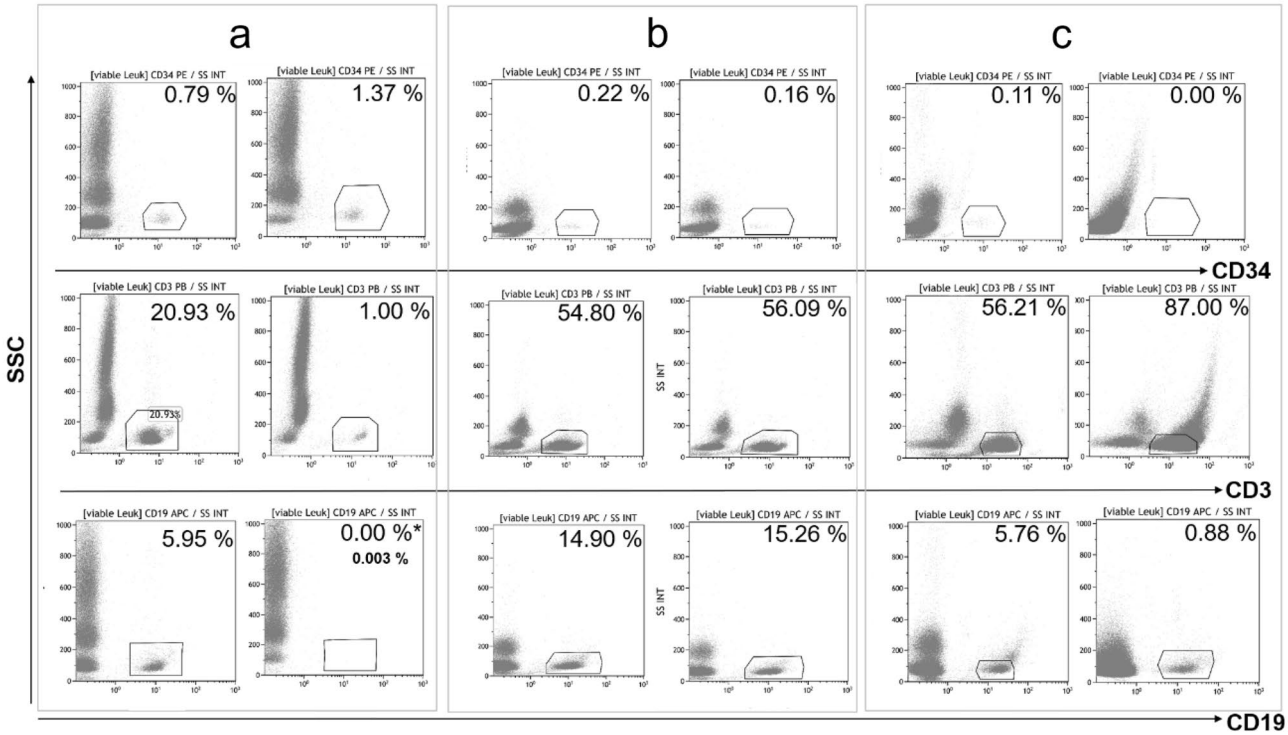

Figure 3. Application examples (each n = 1 before and after the manufacturing step) for the pre-formulated dried reagent panel with CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC and counting beads after method validation of standard stem cell products and donor lymphocytes. The samples were analyzed each as double approach. (**a**) CD19-TCR α/β-depletion: A mobilized stem cell apheresis of a heathy donor was incubated with magnetically antibodies against CD19 and TCR α/β-antigens from Miltenyi Biotec and depleted with the CliniMACS System. The assay was tested with cells before (part **a**, left) and after CD19-TCR α/β depletion (part a, right). CD19- and TCR α/β-depleted cells showed an enrichment of CD34 cells and the depletion of T-cells with TCR α/β character. Because of masked CD19 surface antigen (*) target cells were additional analyzed with the recommended fluorescence antibodies by Miltenyi Biotec (target: 0.003%). (**b**) Mononuclear cells for extracorporeal photopheresis (ECP): Apheresis cells of a non-mobilized healthy donor (part **b**, left) were diluted with isotonic NaCl-solution and mixed with Methoxsalen before UVA irradiation (part b, right). (**c**) Starting materials for CAR T cell manufacturing: The example shows the plots of the apheresis cells of a heathy non-mobilized donor before (part **c**, left) and after immunomagnetic CD4/8 labeling and selection (part **c**, right) with the prodigy system from Milenyi Biotec.

Discussion

The validation of release testing methods for pharmaceutical manufacturing is subjected to very strict regulatory requirements. Here, we present for the first time a novel pre-formulated panel based on dried antibodies designed for the comprehensive characterization of cellular products with the idea to reduce sources of human error and variability. The validation of this optimized stem cell enumeration panel follows the ISHAGE analysis protocol and fulfills the current regulatory standards as it has been approved by the PEI[1,13]. Moreover, due to the broad applicability of the newly developed assay, its validation was preceded by an extensive risk assessment and was developed in agreement with the ICH Quality Guidelines[13].

In fact, our extended product release assay is not only based on the historical ISHAGE protocol, but it also combines the enumeration of viable stem cells with T and B cell counts. The fluorescently labeled antibodies for the immunophenotype-based detection as well as the viability dye and the counting beads used in this assay are no longer in liquid format like in the CE (Conformité Européenne) certified stem cell enumeration kits available on the market[14], but are provided in a unitized dried format as a layer in the bottom of the assay tube. Based on this modern one tube design, this assay is highly reliable and broadly applicable, and it reduces the risk of operator failure. Furthermore, it can be used for a great variety of cellular products such as autologous stem cells, enriched cellular products, lymphocyte-containing fractions, bone marrow and ATMPs.

The results of the validation of our pre-formulated tubes are in line with the previously determined reference values from validation studies based on the ISHAGE protocol. The laboratory range for the CD34 absolute counts in fresh G-CSF mobilized WB was higher with the pre-formulated reagent panel than the range determined by Dauber et al. with standard liquid kits for stem cell counting[14]. The determined range for CD34 frequency among CD45 cells in all sample types common in stem cell characterization (e.g. mobilized peripheral blood, fresh and frozen LA, cord blood and bone marrow) showed a lower maximum value (7.87%)[14] than the maximum value determined with our dried panel (11.48%). This observation underlines the need for stem cell laboratories to

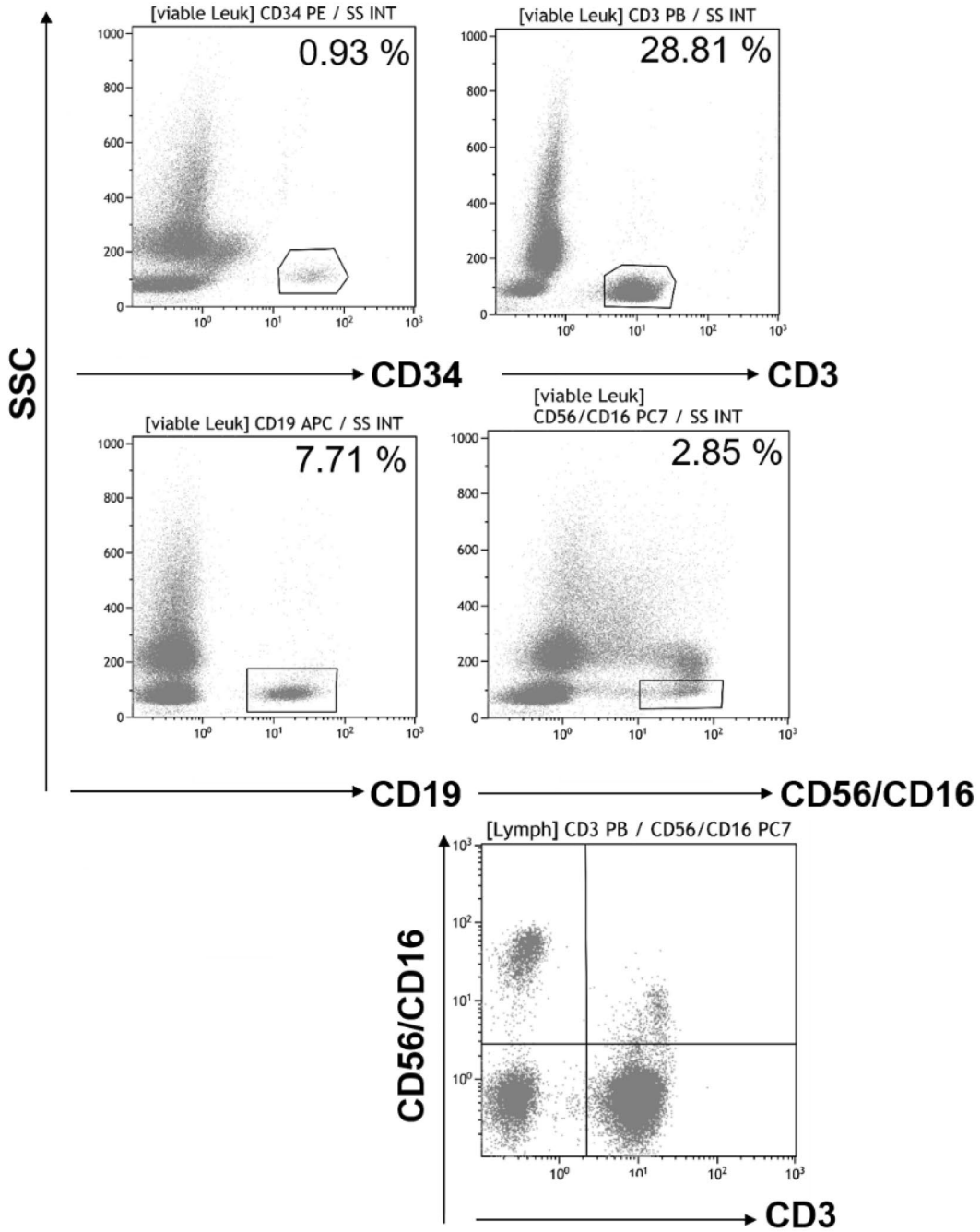

Figure 4. Expansion of the pre-formulated dried reagent panel: The template protocol (Supplemental Fig. S4) can be expanded for further parameter testing. For example, the addition of CD16 PC7 and CD56 PC7 fluorescence conjugates as drop-in to the dried pre-formulated tube enables the quality control for manufacturing of products enriched with natural killer cells (NK: $CD45^+/CD56^+/CD16^+/CD3^-$) including natural killer T cells (NKT: $CD45^+/CD56^+/CD16^+/CD3^+$) gated versus side scatter by excluding $CD16^+$ neutrophils and $CD16^+$ monocytes in the viable $CD45^+$ leucocytes gate (Supplemental Fig. S4) for absolute counting. To distinguish between NK and NKT plotting CD3 PB versus CD16/56 PC7 gated on the lymphocyte population is crucial.

handle their own sample material with specific characteristic. Every laboratory should therefore determine its own internal laboratory range. In our study, sample materials from allogenic donors and also from patients undergoing autologous stem cell therapy were included in the internal laboratory range. We determined the same LOQ as Massin et al.[15] in the validation study with the BD stem cell enumeration kit. Our linear measuring range for high and low CD34 absolute counts determined with the pre-formulated dry reagent panel, is 20 times

higher than the linearity range found by Massin et al.[15] and therefor extends the reference values for standard stem cell analysis according to the ISHAGE protocol.

Some manufacturing facilities use automatic hematology analyzers to determine the stem cell count prior to stem cell apheresis. The sensitivity of the pre-formulated tube is higher than the sensitivity of the hematology analyzer (CD34 cells/µL: 8.9)[16]. Interestingly, compromised stainability of CD34 cells with the hematology analyzer were reported among myeloma patients due to the unspecific labelling[16]. The validated assay with the pre-formulated tube detects unspecific bindings via the isoclone control allowing to correct the stem cell count accordingly by subtracting the unspecific binding from the CD34 value. This explains the higher accuracy of our assay.

Our reference values for CD45, CD3, CD19 cells in the WB of healthy donors were in agreement with the results of the ONE study with the validated pre-formulated dried tube and their absolute count[17,18]. A direct comparison of cell frequencies values was not possible due to the different gating strategies. In detail, our gating strategy relates frequencies to all leukocytes in apheresis cell products and not to lymphocytes in WB as the gating strategy of the study mentioned above. Besides this, all dead cells can be excluded by viability staining to control transport and storage[19], resulting in an improved accuracy of the measurement.

Our mid- to long-term goal, was to go beyond the optimization of the ISHAGE protocol[1–5], in order to use this gating strategy for absolute CD4 T lymphocytes counting[20] and absolute viable T cells assessment in cellular products[21]. Finally we wanted to combine the quantification of both, stem cells and further cell populations. Strobel *et al.* combined the ISHAGE protocol with a CD3 determination using a liquid reagent panel, whereby the bead-based quantification of the CD3 determination performed better than the volumetric quantification on the flow cytometer[22]. In addition to the stem cell and T cell population, the pre-formulated dried reagent tube used in our approach allows to determine the B cells with the help of bead counts.

The cell populations frequencies measured with the pre-formulated dried reagent panel are crucial for the manufacturing and therapeutic application of different cellular products. For example, the assessment of CD34 cells across different ranges is of high value for the clinical routine. In fact, patients and donors cannot undergo stem cell apheresis until the CD34 cell counts exceed a minimum levels (peripherally ≥ 5 to 15 CD34 events/µL)[23,24]. Moreover, high numbers of CD34 counts are present in enriched apheresis products and their accurate assessment is crucial for the stem cell transplantation outcome. For further characterization, the dose of multipotent progenitors among mobilized high stem cell can be phenotypically determined since multipotent progenitors might impact engraftment and immune reconstitution after stem cell transplantation[25]. Moreover, the use of an 8-color pre-formulated dried panel for the detection of minimal residual disease (MRD) was validated and its use can increase the quality of autologous blood stem cell products from myeloma patient apheresis to avoid the infusion of a residual disease[26].

The composition of LA used as starting material for genetically engineered ATMPs is critical. Many of the manufactures perform a T cell selection in order to reduce the risk of administering manipulated stem cells into the patient[27,28]. Our validation showed that unstimulated LA from healthy donors had higher CD34 cells levels (n = 20; average: 0.09%; min: 0.01%; max: 0,24%; median: 0.07%) compared to the reference value of 0.05% in WB and a lower CD3 absolute cell count. The quantification of viable lymphocyte subpopulations for T cells, NK cells, B cells and monocytes in unstimulated LA (mononuclear cells) was validated by Mfarrej et al. with three standard tubes each with separate CD45 staining and counting beads as liquid antibody panels[29]. Our pre-formulated antibody panel tube was developed to support a broad application for cellular products including stem cell quantification. Our validated assay allows cell counting of the CD34, CD3, CD19 cell population in a single tube with all populations related to the CD45 population and quantified using. This ensures a more consistent product characterization.

In haploidentical stem cell transplantation, T cell depletion is crucial for both the success of the treatment and the clinical outcome. Acceptance limits for T cell contamination must be specified, due to the associated threat of GvHD[8,30]. The T cell analysis following depletion, may be difficult to perform due to the low levels of T cells and because of the increased autofluorescence and unspecific binding of manipulated cells[8,30]. Over the time, the approach to haploidentical stem cell transplantation has changed and the initial CD34 cells selection has been replaced by a CD19 and TCR α/β-depletion[30–32]. The higher CD3 absolute count is now easier to detect because the remaining T cell population ($CD3^+$/TCR γ/d^+) is around 1% after depletion (Fig. 3, CD19 TCR α/β-depletion). Similar to stem cells, the pre-formulated reagent panel can be used to reliably determine high and low T cell levels.

Finally, our enumeration panel can be also used during the manufacturing process of CAR T cells. In fact, the determination of the T cell dose expressing the specific CAR is conducted several times on several manufacturing days for in-process control and also for the final testing[33,34]. The absolute T cell count, as determined with the pre-formulated dried panel, together with the assessment of the frequency level of CAR-expressing T cell cells with a dedicated assay, can be combined to calculate the actual CAR T cell dose contained in a cellular product. The drop-in concept would also enable the analysis of starting material for NK cell based ATMPs[9,35]. Furthermore, the increased application of anti-CD19 CAR therapies warrant adequate release testing that includes CD19-B cells[36].

In summary, we have developed a pre-formulated panel tube to address the growing regulatory requirements of release testing. The design of this new analytical test enables a significant reduction of pipetting time thereby enabling a detailed and reliable analysis. We also have put a focus on regulatory challenges like the production of batch sizes of up to 2000 tests of the pre-formulated dried tube. The tubes can be simlpy stored at room temperature and have a long shelf-life of two years after manufacturing. The release testing with the pre-formulated tubes represents an advancement over the fluidic CE certified kits because besides the stem cells, T cells an B cells can be analyzed in parallel in compliance to the ISHAGE protocol. The dried pre-formulated tubes are widely applicable across a variety of standard cellular products with or without stem cells and starting cells for ATMPs and ATMPs. Furthermore, our method is more time efficient and reduces operator failure. In summary,

a respective improved standardization can further support an increased product quality and ultimately improved cell therapy approaches for patients.

Methods

Instrument acceptance testing and risk assessment under good manufacturing practice (GMP). Release testing of the Navios flow cytometers (Beckman Coulter, France) was preceded by risk analysis using the Failure Mode and Effects Analysis. Based on written qualification plans the flow cytometers underwent validation and QC procedures complying with standard specification and defined requirements. All processes in the QC Laboratory follow the principles of European Pharmacopoeia, GMP guidelines and ISO15189 standards. All activities were described in standard operation procedures and the laboratory staff was adequately trained by application specialists and internal training programs. Validation plans used for the procedures described here followed relevant validation guidelines for analytical methods[13,37,38].

Summary of the validation study and specimen collection. The validation measurements in analytics, for example, linearity, sensitivity as well as accuracy were performed according to the ICH Q2 (R1) guidelines[39]. The study was approved by the Ethics Committee of the Charité—*Universitätsmedizin* Berlin, Germany (EA2/129/19). We confirm that all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. The informed consent was obtained from all subjects and/or their legal guardian(s). Specimens of healthy donors (cohort 1: not-mobilized, cohort 2: G-CSF mobilized) and patients suffering from multiple myeloma and a wide range of lymphomas (cohort 3: G-CSF-mobilized) were investigated including WB, mobilized WB before and after LA as well as cellular products. WB was collected into vacutainers (Becton Dickinson, Germany) containing the anticoagulant EDTA. LA samples were collected with the Spectra Optia Apheresis System (Terumo BCT Europe N.V.) Furthermore, cryopreserved autologous QC apheresis samples were analyzed. Unless otherwise specified the viable cell parameters (%, cells/µL) were statistically evaluated with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software V5.01, USA).

Sample preparation and staining procedures. White blood cells (WBC) were determined by the automated hematology analyzer XP-300 (Sysmex, Germany) and if necessary diluted with phosphate buffered saline without calcium- and magnesium chloride (PBS, Gibco, Germany) and 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, Germany). In case of cryopreserved samples, a minimum of 1 to 10 dilutions in PBS/10% human serum albumin (HSA, Shire, Germany) was applied. A defined volume of WBC per sample ($\leq 3 \times 10^6$ cells, 100 µL) was applied using the reverse pipetting approach.

The tubes contained dried reagents consisting of fluorescence antibodies conjugates (Isotyp IgG1) CD45 FITC (Clone J33), CD34 PE (Clone 581.1.5), CD3 PB (Clone UCHT1) and CD19 APC (Clone J3.119), the dead marker dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD) as well as counting beads. The tubes were manufactured by Beckman Coulter (France) using the DURAClone dry technology. After 15 min incubation of the validation samples at room temperature in the dark, red blood cells were lysed with 2 mL 1 × IO-lyses buffer (Beckman Coulter) for 10 min. The same pre-formulated reagent panel including also the unlabeled CD34 antibody (Clone 581.1.5) was used as internal isoclone control. In order to establish the count of NK cells the liquid antibodies CD16 PC5 (Clone 3G8) and CD56 PC5 (Clone N901 (NKH-1) were added (each 10 µL) to the pre-formulated dried reagent panel before pipetting the sample. Reference methods were used to compare the new assay: The similar antibody cocktail as liquid variation includes the Stem Cell Enumeration Kit (CE/IVD-Kit, Beckman Coulter) with the antibodies CD45 FITC (Clone J33)/CD34 PE (Clone 581.1.5), CD45 FITC/isoclonic control-PE and 7-AAD for cell staining, the lyses solution as well as stem count fluorosphores. The staining procedure followed the instructions of the kit and, in addition, the antibodies CD3 PB (Clone UCHT1; Beckman Coulter) and CD19 APC (Clone J3.119; Beckman Coulter) were used for staining the T- and B-cells (each 10 µL). After 20 min the $1 \times NH_4$ red blood lyses solution was added for further 10 min. Finally, a known number of stem count fluorosphores was added.

Further reference measurements were performed as separate CD34 and CD3 determinations with the FACS Calibur (Becton Dickinson, Germany). For staining, 20 µL of each liquid fluorescence antibodies (Isotyp IgG1) CD45 FITC (2D1, CE, Becton Dickinson, Germany), CD34 PE (Clone 8G12, Becton Dickinson) for CD34 determination and CD45 FITC, CD3 PE (SK7, CE, Becton Dickinson) for CD3 determination was added to true count beads tubes (Becton Dickinson). In all measurements the viability was checked by staining with 7-AAD (BD Pharmingen, Europe).

Sample acquisition. The Navios underwent daily verification of optical alignment and fluidics using further fluorescent microspheres (Flow Check beads, Beckman Coulter) and reference blood (stem cell control kit, Becton Dickinson; CDChex Plus, Streck Corporate, Nebraska). The flow cytometer settings were created with the auto-setup function of the Navios software using single stained target cells in the corresponding fluorescence channels and the setting was verified by multi stained target cells. As stop criteria the number of 75,000 $CD45^+$ events and in case of stem cell analysis 100 $CD34^+$ events per sample were determined. One thousand counting beads were needed to determinate the absolute cell count.

Data analysis. Data analysis was performed using the Navios software with a pre-defined analysis template that requires only fine adjustment by the operator. Cells were analyzed by using the fluorescence antibody conjugates and the death versus side scatter plot (SS INT). Supplemental Figure S4 explains the gating strategies for the enumeration of stem cell, T and B cells. The absolute count was calculated by the known numbers of counting beads in correlation to the count of stem cell, T and B cell populations. Viability was estimated by the division of the viable cells by the total number of cells (dead and viable cells).

Laboratory range. The new measurement method was applied to common samples from the manufacturing process, whereby a measurement range for the QC laboratory of the relevant parameters was determined. This included cell therapy products and starting material for further processing like cryopreservation and selection processes (non-mobilized donors: n = 20, mobilized donors: n = 30, mobilized patient: n = 30 + 30) as well as WB of healthy non-mobilized donors and WB before and after the LA process in autologous or allogenic settings (non-mobilized donors: n = 15, mobilized donors: n = 30, mobilized patient: n = 30). Results were assessed by the statistical parameter min, max and median. No acceptance criteria were defined.

Linearity. Linearity was tested in the specimen WB (mobilized donors and mobilized patient) as well as apheresis cells of all cohorts after serial dilution with a minimum of 7 concentrations (dilution factor 1 to 128). The estimated cell concentration was compared with the expected values as regression analysis. The acceptance criteria were $r^2 \geq 0.95$.

Sensitivity. Two approaches to sensitivity determinations were used to calculate values for Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ). The established approach determined the LOD and LOQ with the help of 10 replicates of a low-concentration sample of the parameter to be observed. The derivative of the standard deviation multiplied by a factor of three determined the LOD whereas the LOQ was determined by multiplying the standard deviation by factor 10. The novel approach according to Armbruster et al. enables the further determination of the Limit of Blank (LOB)[40], whereas the standard deviation (SD) of the low concentration sample was already been determined by the established approach and used for statistical evaluation of the LOD. No acceptance criteria were predetermined. Reference samples with low parameter concentration were used for the LOD determination whereas the determination of LOB needs reference samples with lack of the parameter. The reference sample with the low CD34 level and without CD34 cells were measured in the reference laboratory as part of the CD34 monitoring finding the optimal starting point for stem cell apheresis. The reference samples were obtained via blood collection from patients who has received chemotherapy and were on day 5 of G-CSF mobilization. Depending on the patient's mobilization the CD34 concentration at this time is 0 to < 10 cells/µL. As low CD3 and CD19 level sample the target fraction of an CD34 selection was used. The human hematopoietic CD19 positive cell line Raji (ATCC, CCL-86) immunophenotypically lacks the CD3 surface antigen. Raji cells used therefore as reference cells to determine the LOB of the CD3 parameter. The cell line was cultivated in RPMI 1640 (Gibco Thermo Fischer Scientific, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Millipore Sigma, MA, USA) in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37 °C. Identity was confirmed using short tandem repeat DNA genotyping (Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg). Cultures were checked regularly for mycoplasma contamination using the PlasmoTest Kit (Thermo Fischer Scientific, MA USA).

Accuracy. The DURAClone based assay was compared with the established analysing methods for the determination of CD45, CD34 and CD3 cells. The comparison methods estimated the CD34 count and the CD3 count in different tubes without considering the CD19 parameter. Therefore, WB before and after LA (mobilized donors: n = 40; mobilized patients: n = 28) as well as fresh LA products and LA products after cryopreservation (mobilized donors: n = 20; mobilized patient: n = 45) were tested. Further accuracy tests were done with a fluidic reagent panel of the same composition (CD45 FITC, CD34 PE, 7-AAD, CD3 PB, CD19 APC) like the pre-formulated dried tube with similar specimens (all cohorts: n = 28). The absolute counts and frequencies were statistically analyzed by regression analysis with an acceptance criterion of $r^2 = 0.95$. The new method with the pre-formulated dried reagent panel as well as the fluidic panel were tested with reference material from national EQA (Instand e.V., Germany) for the CD34 enumeration and CD3 and CD19 enumeration.

Inter-operator-analysis. To determine the inter-operator variability of our assay, five samples (unstimulated/mobilized WB and LA) and five operators were examined. The samples measured and evaluated by operator A were considered as reference values. Operators B to G performed the re-gating on the measured data set (list mode analysis). The acceptance criteria were CV% ≤ 10% between the operator results.

Panel expansion: short validation design. Reference blood (CD Chex Plus, Streck Corporate, Nebraska) was used to pre-test the expanded panel combination for NK cells and NKT cells. Because of blood stabilization cells were permeable for the death marker so the gating strategy was adjusted and 7-AAD + cells were included also. The material with the reference values enables anytime the proof of accuracy of undiluted as well as diluted replicate measurement. Linearity was tested after serial dilution into five concentrations (dilution factor 1 to 64) as triplicates. Estimated cell concentration was compared with the expected values by the acceptance criteria $r^2 \geq 0.95$. The repeatability was tested with five prepared tubes, whereas the first tube was measured five times. The sensitivity for $CD16^+/CD56^+/CD3^-$ cells was measured by 1:128 dilution of the reference blood offered through the linearity approach.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 30 June 2022; Accepted: 13 October 2022
Published online: 26 October 2022

References

1. Sutherland, D. R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R. & Chin-Yee, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J. Hematother.* https://doi.org/10.1089/scd.1.1996.5.213 (1996).
2. Siena, S. *et al.* Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* https://doi.org/10.1182/blood.v77.2.400.bloodjournal772400 (1991).
3. Bender, J. G. *et al.* Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* https://doi.org/10.1006/clin.1994.1003 (1994).
4. Keeney, M. *et al.* Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Commun. Clin. Cytom.* https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2%3c61::AID-CYTO1%3e3.0.CO;2-F (1998).
5. Gratama, J. W. *et al.* Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells: European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* **34**, 128–142 (1998).
6. Cho, A., Jantschitsch, C. & Knobler, R. Extracorporeal photopheresis: An overview. *Front. Med.* https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00236 (2018).
7. Maus, M. V. & June, C. H. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy. *Clin. Cancer Res.* https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1433 (2016).
8. Schumm, M. *et al.* Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.014 (2013).
9. Klöß, S. *et al.* Optimization of human NK cell manufacturing: Fully automated separation, improved ex vivo expansion using IL-21 with autologous feeder cells, and generation of anti-CD123-CAR-expressing effector cells. *Hum. Gene Ther.* https://doi.org/10.1089/hum.2017.157 (2017).
10. Klenovsek, K. *et al.* Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095414 (2007).
11. Winkler, J. *et al.* Adoptive transfer of purified donor-b-lymphocytes after allogeneic stem cell transplantation: Results from a phase I/IIa clinical trial. In *Blood. Conf. 58th Annu. Meet. Am. Soc. Hematol. ASH* (2016).
12. Chattopadhyay, P. K. & Roederer, M. Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons. *Methods* https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.02.009 (2012).
13. Borman, P. & Elder, D. Q2(R1) validation of analytical procedures. *ICH Qual. Guidel.* https://doi.org/10.1002/9781118971147.ch5 (2017).
14. Dauber, K. *et al.* Enumeration of viable CD34+ cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: Results of a study of the novel BDTMâ, ¢ stem cell enumeration kit. *Cytotherapy* https://doi.org/10.3109/14653249.2010.529894 (2011).
15. Massin, F. *et al.* Validation of a single-platform method for hematopoietic CD34+ stem cells enumeration according to accreditation procedure. *Bio-Med. Mater. Eng.* https://doi.org/10.3233/BME-141226 (2015).
16. Dima, F., Barison, E., Midolo, M., Benedetti, F. & Lippi, G. Assessment of haematopoietic progenitor cell counting with the Sysmex® XN-1000 to guide timing of apheresis of peripheral blood stem cells. *Blood Transfus.* https://doi.org/10.2450/2019.0086-19 (2020).
17. Streitz, M. *et al.* Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: Panels and methods from the ONE study. *Transplant. Res.* https://doi.org/10.1186/2047-1440-2-17 (2013).
18. Kverneland, A. H. *et al.* Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A* https://doi.org/10.1002/cyto.a.22855 (2016).
19. Antonenas, V. *et al.* Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy* https://doi.org/10.1080/14653240600620994 (2006).
20. Barnett, D., Granger, V., Whitby, L., Storie, I. & Reilly, J. T. Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single-platform flow cytometry: The way forward. *Br. J. Haematol.* https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01632.x (1999).
21. Koehl, U. *et al.* ISHAGE-based single-platform flowcytometric analysis for measurement of absolute viable T cells in fresh or cryopreserved products: CD34/CD133 selected or CD3/CD19 depleted stem cells, DLI and purified CD56+CD3-NK cells. *Int. J. Hematol.* https://doi.org/10.1007/s12185-007-0018-7 (2008).
22. Strobel, J. *et al.* Comparison of simultaneous CD34+ and CD3+ quantification with a modified stem cell enumeration kit on two different flow cytometers. *Clin. Lab.* https://doi.org/10.7754/clin.lab.2016.160429 (2016).
23. Lemos, N. E. *et al.* Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: A single center experience. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.002 (2018).
24. Sutherland, D. R. *et al.* Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. *Cytotherapy* https://doi.org/10.1080/14653240902923161 (2009).
25. Dmytrus, J. *et al.* Multi-color immune-phenotyping of CD34 subsets reveals unexpected differences between various stem cell sources. *Bone Marrow Transplant.* https://doi.org/10.1038/bmt.2016.88 (2016).
26. Blum, A. *et al.* Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma. *Sci. Rep.* https://doi.org/10.1038/s41598-019-39631-2 (2019).
27. Wang, X. & Rivière, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. Oncol.* https://doi.org/10.1038/mto.2016.15 (2016).
28. Jackson, Z. *et al.* Automated manufacture of autologous CD19 CAR-T cells for treatment of non-hodgkin lymphoma. *Front. Immunol.* https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01941 (2020).
29. Mfarrej, B. *et al.* Validation of a flow cytometry-based method to quantify viable lymphocyte subtypes in fresh and cryopreserved hematopoietic cellular products. *Cytotherapy* https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.06.005 (2021).
30. Bremm, M. *et al.* Generation and flow cytometric quality control of clinical-scale TCRαβ/CD19-depleted grafts. *Cytometry B.* https://doi.org/10.1002/cyto.b.21328 (2017).
31. Gaziev, J. *et al.* Long-term outcome after haploidentical hematopoietic cell transplantation utilizing CD34+ selected/CD3CD19+ depleted or TCRαβ+/CD19+ depleted grafts in pediatric patients with hemoglobinopathies. *Blood* **130**, 663 (2017).
32. Sullivan, L. C. *et al.* The complex existence of γδ T cells following transplantation: The good, the bad and the simply confusing. *Clin. Transl. Immunol.* https://doi.org/10.1002/cti2.1078 (2019).
33. Aleksandrova, K. *et al.* Functionality and cell senescence of CD4/ CD8-selected CD20 CAR T cells manufactured using the automated cliniMACS prodigy® platform. *Transfus. Med. Hemother.* https://doi.org/10.1159/000495772 (2019).
34. Li, Y., Huo, Y., Yu, L. & Wang, J. Quality control and nonclinical research on CAR-T cell products: General principles and key issues. *Engineering* https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.12.003 (2019).
35. Gentilini, C. *et al.* Patients receiving IL-2 activated donor NK cells show lower incidence of severe GvHD after haploidentical SCT. *Blood* https://doi.org/10.1182/blood.v110.11.354.354 (2007).
36. Sadelain, M. CD19 CAR T cells. *Cell* **171**, 1471 (2017).
37. Magnusson, B. & Örnemark, U. The fitness for purpose of analytical methods. *Eurachem. Guid.* (2014).
38. CSH, ICCS Workgroup. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the International Council for Standardization of Haematology and International Clinical Cytometry Society. *Cytometry B* https://doi.org/10.1002/cyto.b.21103 (2013).

39. Borman, P. & Elder, D. Q2(R1) Validation of analytical procedures. in *ICH Quality Guidelines* 127–166 (Wiley, 2017). https://doi.org/10.1002/9781118971147.ch5.
40. Armbruster, D. A. & Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* **1**, 1–10 (2008).

Acknowledgements
We thank L. Uharek for his support with the study. Special thanks go to M. Kapinsky from Beckman Coulter for excellent technical advice and the constructive discussions. We are also thankful to C. Gentilini for critical review of the manuscript. A. Künkele is participant in the BIH-Charité Advanced Clinician Scientist Pilotprogram.

Author contributions
K.H., A.T., A.B., A.K. and L.B. designed the study and analyzed the data. K.H. wrote the manuscript draft. K.H., C.T.B., K.M., A.K., and L.B. performed the patient management. K.H., A.B., A.K., M.S., J.G., Z.S., K.M., C.T.B., L.B. checked the manuscript draft critically, participated in final data assessment and approved the final version.

Funding
Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-022-22339-1.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2022

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma

Received: 30 April 2018
Accepted: 24 January 2019
Published online: 27 February 2019

Agnieszka Blum[1], Katy Haussmann[1], Mathias Streitz[3], Stephan Schlickeiser[3], Carola Tietze-Buerger[1], Igor Wolfgang Blau[2] & Lutz Uharek[1]

The recent advances in myeloma treatment result in significantly better outcomes, defined as increased progression free survival (PFS) and overall survival (OS). Since there is a proven correlation between the extend of response and prolonged survival, there is an urgent need for highly sensitive assays for the detection of minimal residual disease (MRD). Next generation flow cytometry has become a valuable approach for sensitive evaluation of the depth of complete response (CR). Here, we report the diagnostic performance and validation results of a single-tube 9-color panel assay. The validation design included intra-assay analysis measuring accuracy, inter-assay analysis estimating method's linearity and precision and inter-assay analysis evaluating repeatability. Furthermore, in inter-operator analysis assessed the comparability of the result analysis of different operators. Staining stability was evaluated in age-of-stain experiments. Our validation results show that a reliable detection of residual myeloma cells is feasible to a detection level of 10^{-5} with a single-tube assay for a variety of materials (peripheral blood, bone marrow and stem cell apheresis). This study establishes highly sensitive, fully standardized approach for MRD detection in myeloma that is ready for implementation in routine diagnostic laboratories.

Plasma cell myeloma is a hematologic neoplasm characterized by the proliferation of malignant plasma clones. With targeted therapies available, a considerable number of patients can achieve complete response and have a significantly better outcome, defined as increased progression free survival and overall survival[1,2]. However, only 3 to 10% of plasma cell myeloma patients who have received high dose therapy will remain in complete remission for more than ten years[3], while the majority will eventually relapse and undergo further treatment. Since there is a correlation between the extend of response and prolonged survival, there is an urgent need for highly sensitive assays for the detection of minimal residual disease (MRD)[4,5]. MRD is a more sensitive measure of response than conventional criteria and was shown to have an enhanced predictive value in comparison to standard methods[5]. Thus, MRD detection is very important for deciding whether a patient will undergo relapse-appropriate treatment[2,6].

Multiparameter flow cytometry enables robust and cost effective monitoring of minimal residual disease[7] in plasma cell myeloma patients. Because of the increased number of simultaneously used fluorochromes huge

[1]Charité Stem Cell Facility, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, Berlin, 13353, Germany. [2]Department of Haematology, Oncology, Tumor Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, Berlin, 13353, Germany. [3]Institute of Medical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, Berlin, 13353, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B. (email: agnieszka.blum@charite.de)

Observed variability	Intra-assay	Verification of drop-in options	Inter-assay	Inter-assay	Inter-operator	Age of stain	Background from blank
Performance Characteristic	Accuracy	Accuracy	Precision/Linearity	Repeatability	Variability of data analysis results	Stability of prepared samples	Limit of blank (LOB)
Sample type	normal whole blood spiked with patient apheresis product	5 × apheresis products 3 × bone marrow Drop-in variants: CD3/CD117 ECD	normal whole blood spiked with U266 cells	1 × peripheral blood, 1 × bone marrow, 1 × apheresis product	list mode data obtained from patient apheresis or whole blood	1 × bone marrow (0,4,6,8 h), 1 × patient apheresis product (0, 4, 6, 8, 18 h), 1 × peripheral blood (0, 4, 6, 8, 24 h)	25 × normal whole blood
No. of samples with different plasma cell concentrations	6 (serial dilution)	8 (individual samples)	6 (serial dilution)	1 (for each type of material)	25 (individual samples)	1 (for each type of material, 4–5 different time points)	1
No. of replicates	3	1	3 in 5 different normal donors	10	1	10	1 in 25 different normal donors
Total no. of samples	18	8	90	30	25 (×5 different data analysis operators)	140 (including the repeatability samples)	25

Table 1. Overview of the validation process.

variety of cells and subtypes with different characteristics can be assessed. This enables estimation of the MRD by detection and differentiation between normal and abnormal plasma cells.

In order for MRD assays to be highly specific and sensitive, a combination of immunophenotypic markers that are able to identify and discriminate between normal and abnormal plasma cells is required[1,8–10]. CD38 and CD138 were used as gating markers, while CD19, CD27, CD45, CD56, CD81, CD200 and CD117 allowed for the identification of the most frequent deviation from the normal plasma cell phenotype. In addition, the presence of CD45 allowed for further phenotypic characterization of plasma cells and their quantification relative to the leukocyte count.

In order to obtain a quantification limit (LOQ)[11], defined as the lowest concentration at which the analyte can be quantified, in the magnitude of $\leq 10^{-5}$ (i.e. one abnormal plasma cell detected in a population of $\geq$100,000 leucocytes) the sample has to be enriched to a total leucocyte count of 3–5 million in a small volume (e.g. 100 µl) following blood cell counting. The obtained cell suspension has to be stained according to a standard operating procedure (SOP)[11,12].

In this study, we present a highly sensitive and standardized procedure for assessing minimal residual disease in patients with plasma cell myeloma in peripheral blood, bone marrow as well as in apheresis product. Our results show that our assay due to its highly discriminative combination of antibodies and effective gating strategy can be easily applied and validated in high throughput flow cytometry laboratories.

Materials and Methods

Qualification of instruments and good manufacturing practice (GMP) training. Qualification of all cytometers used in the study was preceded by risk analysis using the Ishikawa (fishbone diagram) and risk mitigation strategy performed according to failure modes and effects analysis (FMEA)[13]. Moreover, all cytometers underwent qualification based on written SOPs. All procedures were described in SOPs and the technical staff was adequately trained in using the SOP Guard Software.

Blood and apheresis specimen collection. The study was approved by the Ethics Committee of the Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Healthy individuals and plasma cell myeloma patients undergoing stem cell apheresis at the Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany were recruited for this study. Written informed consent was obtained from all participants. Blood was collected into vacutainers (BD, Heidelberg, Germany) containing EDTA for anticoagulation. Apheresis samples were collected with the Spectra Optia® Apheresis System (Terumo BCT) using the Continuous Mononuclear Cell Collection (CMNC) protocol.

Myeloma cell line. For the inter-assay analysis the myeloma cell line U266 was used. This cell line was established from the peripheral blood of a 53-year-old male with IgE-secreting myeloma in 1968. U266 myeloma cells express the following markers: CD38weak+, cyCD79a+, CD138+, HLA-DR+, cylambda+, while they are negative for CD3−, CD5−, CD10−, CD13−, CD19−, CD20−, CD34−, CD37−, sm/cyIgG−, sm/cyIgM−, sm/cykappa−, smlambda−.

Materials. Premixed, dry reagent cocktail (DuraClone RE PC antibody panel) as well as CD117 ECD (Clone: 104D2D1) and CD3 ECD (Clone: UCHT1) antibodies used for the assessment of residual abnormal plasma cells and T cells were obtained from Beckman Coulter (Marseille, France). DuraClone RE PC tubes contained dried antibodies dosed to stain 3–5 × 10^6 leukocytes in 100–200 µl volume: CD81 FITC (Clone: JS64)[14]; CD27 PE (Clone: 1A4CD27)[15]; CD19 PC5.5 (Clone: J3–119)[16]; CD200 PC7 (Clone: OX-104)[17]; CD138 APC (Clone: B-A38)[18]; CD56 APC-A750 (Clone: N901)[19]; CD38 Pacific Blue (Clone: LS198-4-3)[20]; CD45 Krome Orange (Clone: J.33).

		DURAClone RE PC	MKSSC[32]	Euroflow
Assay format	No of tubes/no of colours/	1/8/	1/10/	2/6/
	Minimal cytometer configuration	blue/4-red/2-violet/2	blue/4-red/3-violet/3	blue/4-red/2-violet/2
	Formulation	glassified layer in FACS tube, 1-test-unitized	liquid single-color antibodies	3 different lyophilized bulk mixes for reconstitution
	Compensation approach	8 colors, dry single-color antibodies, 1-test-unitized	liquid single-color antibodies	4 color liquid single color antibodies (tandem dyes only), each tube with different compensation for dark red channel on red laser
	Storage & shipping	room temperature	cold storage	cold storage
	Marker selection according to consensus[21]	CD200 added, CD117 missing (can be added as drop in)	kappa, lambda added	kappa, lambda added CD27 and CD138 missing (can be added as drop in)
Mode of application	Sample type	bone marrow*, peripheral blood, apheresis product	bone marrow	bone marrow*
	Lysing method	bulk lysis of a volume equivalent to at least 5×10^6 leukocytes	bulk lysis of a volume equivalent to 20×10^6 leukocytes	bulk lysis of a volume equivalent to at least 20×10^6 leukocytes ($2 \times 10 \times 10^6$)
	Staining capacity	5×10^6 leukocytes*	all recovered cells from bulk lysis	10×10^6 leukocytes*
	Staining mode	surface	surface and intracellular	1 × surface; 1 × surface and intracellular
	Theoretical LOD/LOQ (20/50 positive events; %CD45+) based on 1/2 staining capacity	$8 \times 10^6/2 \times 10^5$	$2 \times 10^6/5 \times 10^6$ (10×10^6 cells staining capacity)	$4 \times 10^6/1 \times 10^5$

Table 2. Comparison of different flow cytometry based MRD methods.

Sample staining procedure. Flow cytometric analysis was performed in the same single laboratory (Charité, Stem Cell Facility, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter (Marseille, France) and according to the principles outlined by the European Myeloma Network[21] (Tables 1, 2).

Briefly, the number of leucocytes in the specimens was determined using the hematology analyzer (Sysmex IP300 (XP-350), Sysmex). Leucocytes were then lysed using Versafix solution (VersaLyse, Beckman Coulter supplemented with 0.25% IOTest Fixative Solution) at room temperature. Cell suspensions containing $3–5 \times 10^6$ leukocytes were then centrifuged at 300 x g and resuspended in 100 µl phosphate buffered saline (PBS, Gibco). Cell suspensions were then transferred to DuraClone RE PC tubes and an appropriate volume of CD117 ECD antibody was added. After 15 min incubation at room temperature, cells were washed with PBS and centrifuged at 150 × g. The final pellet was resuspended in 500 µL PBS containing fixative solution (10% IOTest3 fixative solution, Beckman Coulter).

Data acquisition. Sample acquisition was performed on 10-color, 3-laser NAVIOS flow cytometers (Beckman Coulter) using predefined settings. Debris was excluded by appropriate adjustment of the FSC recording trigger. Each sample was run twice in order to enhance the number of recorded events. Those duplicate readings were merged using the Kaluza analysis software prior to the final analysis.

Acquisition settings were defined according to the manufacturer's instructions using the eight DuraClone RE PC compensation tubes as well as single CD117 or CD3 staining. Obtained photomultiplier tube (PMT) voltages were used to define target channels for all scatter and fluorescence detectors using calibration bead particles (Flow-Set Pro beads, Beckman Coulter). Matching of target channels was verified daily with a new calibration run to prevent target mismatch. Furthermore, all instruments underwent daily verification of optical alignment and fluidics using other calibration bead particles (Flow Check beads, Beckman Coulter).

Data analysis. All acquired data files were analyzed using the Kaluza software, version 1.3 (Beckman Coulter). The two data files of the each stained sample were merged and analyzed. Cell doublets were excluded using either selection of events with highest FSC peak signals or with smallest width of FSC signal. Furthermore, cell debris was excluded from the analysis by using forward scatter time versus forward scatter dot plot. Dye aggregates were excluded from the analysis as outliers with high fluorescence intensities on the FITC detector and/or the near-infrared APC-AF750 detector. Absolute counts of the subpopulations were calculated in all panels by correlating CD45+ events with the white blood count obtained from all samples. Plasma cells were identified as events with high CD138 and high CD38 expression density. Abnormal phenotypes varied amongst patients and were identified by a combination of the following features: diminished expression of CD19, CD27, CD38, CD45, and/or CD81, overexpression of CD56, asynchronous expression of CD117 and CD200. Clusters of normal and abnormal plasma cells were identified using a 2D projection of all 9 fluorescent parameters (radar plot, Kaluza Analysis Software).

For the analysis of the inter-assay test, intra-assay test and inter-operator analysis, template analysis protocols were created for each set of experiments. Data files of the same sample were analyzed by loading the data files of each time point (inter-assay test) or parallel staining (intra-assay test) into the appropriate template. Accordingly, for the inter-operator analysis data, files were analyzed by 5 different operators using the same templates. Furthermore, each analysis included verification of compensation and, if applicable, minor adjustments. In case of age of stain assays analysis (for the 8-, 18- and 24 h specimens) the sideward scatter (SSC) parameter was adjusted when necessary.

Spiked %CD45	Recovered %CD45 (mean from 3 replicates)	Relative recovery of target frequency	Number of CD45+ (x10^3, mean from 3 replicates)	Number of recovered events (mean from 3 replicates)	CV	mean$^{-1/2}$ ("poisson noise")	theoretical LLOD (20 cells min)	theoretical LLOQ (50 cells min)
0.0080%	0.0086%	107%	2,674	228	7%	7%	0.00075%	0.00187%
0.0060%	0.0048%	80%	2,037	98	8%	10%	0.00098%	0.00245%
0.0040%	0.0027%	68%	1,708	47	6%	15%	0.00117%	0.00293%
0.0020%*	0.0013%	64%	1,513	19	24%	23%	0.00132%	0.00330%
0.0010%**	0.0007%	69%	1,453	10	44%	32%	0.00138%	0.00344%
0.0005%**	0.0003%	57%	1,408	4	25%	50%	0.00142%	0.00355%

Table 3. Results from validation runs on intra-assay variation/accuracy (*represents values below theoretical LLOQ; **represents spiked values below the theoretical LLOD).

Gated event counts were exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) for the calculation of the frequencies of the subpopulations together with the respective mean fluorescence intensities and related standard deviation. Coefficients of variation (CVs) were calculated for each subpopulation frequency from replicates prepared from the same sample. The CVs obtained in intra- and inter-assay analysis were compared with the CVs as expected for the Poisson distribution characteristics.

Design of validation approach. Design of the validation of the residual plasma cells measurement was based on the current recommendation[10,22,23]. Specifically, the validation design included intra-assay analysis measuring accuracy, inter-assay analysis estimating method's linearity and precision and inter-assay analysis evaluating repeatability (Table 1). Furthermore, in inter-operator analysis the comparability of the result analysis of different operators was assessed. Stability of the staining was evaluated in age-of-stain experiments. For the intra-assay test, blood samples from healthy individuals were spiked with different concentrations of stem cell apheresis product from patients with plasma cell myeloma. For the inter-assay analysis blood from five healthy donors was collected and spiked with U266 cells at five different concentrations: 0,5000%; 0,0500%; 0,0050%; 0,0010%; 0,0005%; 0,0003%.

For the inter-assay analysis, whole blood, stem cell apheresis and bone marrow samples were taken from three patients with multiple myeloma. For the inter-operator analysis, a data set consisting of 25 files (22 unique files, 3 file doublets) was analyzed independently by five independent, trained operators.

Results

Intra-assay analysis: Accuracy. The aim of the intra-assay analysis was to evaluate the accuracy of assessment of minimal residual disease in patients with plasma cell myeloma. 18 samples from normal donors with 6 different concentrations of spiked U266 cells were assayed, recording $1{,}799 \times 10^3 \pm 481 \times 10^3$ CD45+ events. Samples were created by spiking whole blood from a healthy donor with patient apheresis product of known plasma cell frequencies as assayed by flow cytometry analysis. Final target frequencies ranged from 0.008–0.0005% of CD45+ anomalous plasma cells, representing 8 anomalous plasma cells in 1×10^5 CD45+ to 1 anomalous plasma cell in 2×10^5 CD45+ cells, respectively. Table 3 shows the results of normal samples spiked with patient apheresis products. CVs were in the expected range (Poisson noise) for all tested samples. Recovery of spiked cells was found at an average of 85% when referring to samples above the theoretical lower limit of quantitation (LLOQ) from 0.008% to 0.004% and 75% for samples above the theoretical lower limit of detection (LLOD) from 0.008% down to 0.002%. The theoretical lower limit of detection was calculated as the percentage of minimum 20 positive events in the total number of leucocytes acquired. Furthermore, the theoretical limit of quantification was calculated as the percentage of minimum 50 positive events in the total number of leucocytes acquired[11,24,25].

Verification of drop-in options: Accuracy. The aim of the drop-in verification was to compare the accuracy of the assessment of minimal residual disease in patients with plasma cell myeloma while using additional antibodies. Five apheresis products and three bone marrow samples were stained in Duraclone RE PC tube parallel without additional anitibody, with CD3 and CD117 ECD drop-in. The addition of drop-in antibody did not compromise the performance of Duraclone RE PC tube staining (see Fig. 1B). Final frequencies of malignant plasma cells between different stainings of the same sample ranged from 0% to 0.01% of CD45+ cells whereas normal plasma cell frequencies ranged from 0% to 0.07% of CD45+ cells.

Furthermore, CD3 drop-in antibody was used to extend the analysis of the immune compartment. The frequencies of residual T, B, and NK cells analyzed in 5 leukapheresis products are shown in Table 4.

Inter-assay analysis: Precision/Linearity. The aim of the first set of experiments of the inter-assay analysis was to evaluate the precision and linearity of assessment of minimal residual disease in patients with plasma cell myeloma. 90 samples with 6 different concentrations of U266 cells across 5 different whole blood samples from normal donors were assayed recording $1{,}157 \times 10^3 \pm 176 \times 10^3$ CD45+ events. Samples were created by spiking whole blood from a healthy donor with U266 cells to create samples with known frequencies of this cell line. Final target frequencies ranged from 0.5% to 0.0005% of CD45+ anomalous plasma cells, representing 1 anomalous plasma cell in 2×10^3 CD45+ to 2 anomalous plasma cells in 2×10^5 CD45+ cells, respectively (Fig. 1)

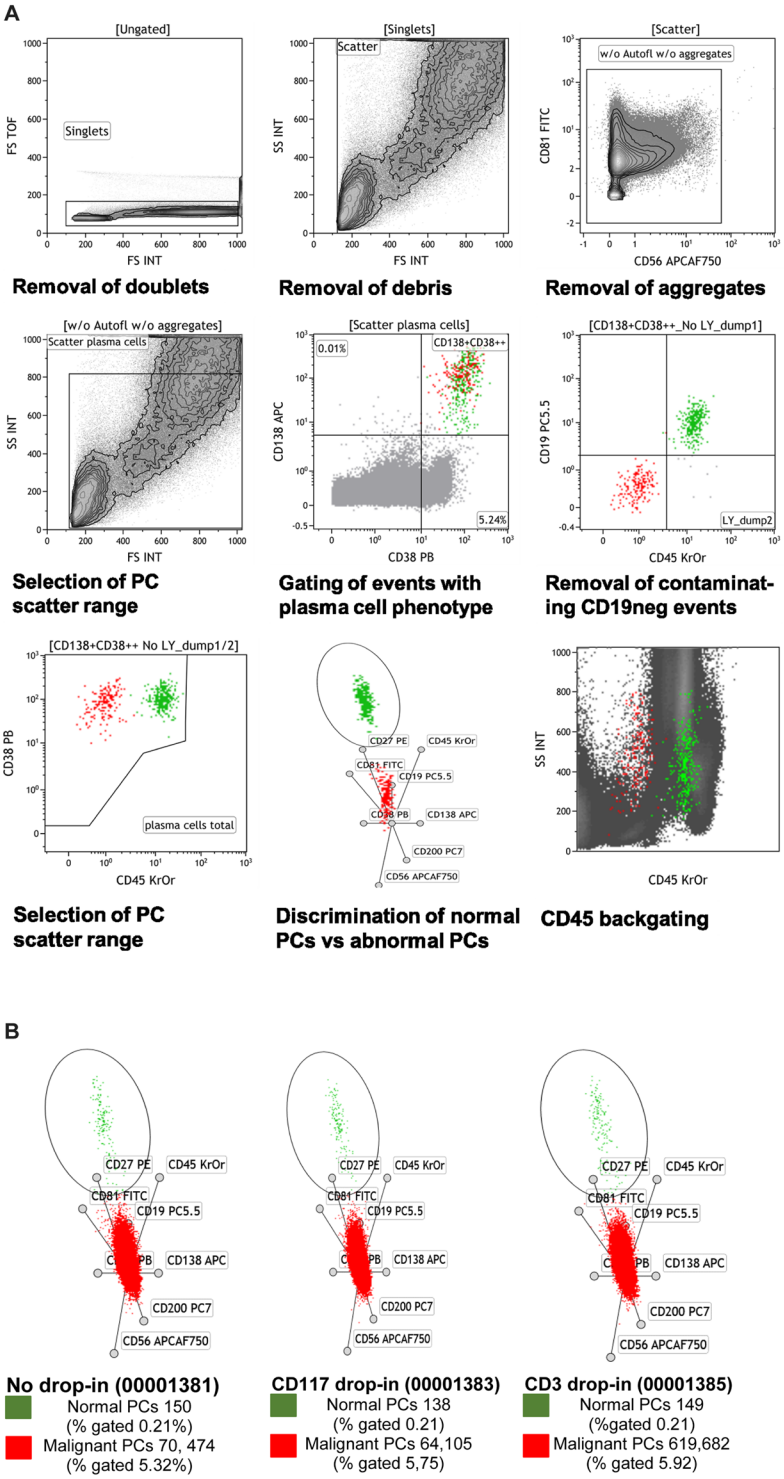

Figure 1. (**A**) Overview of the gating strategy for rare events plasma cells using the apheresis sample of a patient with plasma cell myeloma. Two compiled data files of lysed and stained samples were analyzed as follows: exclusion of non-single events, debris and dye aggregates. Furthermore, plasma cells were identified as events with high CD138 and high CD38 expression density. Clusters of normal and abnormal plasma cells were defined using a 2D projection of all 9 fluorescent parameters (radar plot). An abnormal phenotype was defined as plasma cells with diminished expression of CD19, CD27, CD38, CD45, and/or CD81; overexpression of CD56; and asynchronous expression of CD117 and CD200. (**B**) Comparison of staining without and with different drop-in antibodies (represents example of drop-in verification).

Normal Plasma Cells (%CD45+)	Abnormal Plasma Cells (%CD45)	Number of normal plasma cells	Number of abnormal plasma cells	No CD45+ lymphocytes	T cells (% lymph)	B cells (% lymph)	NK cells (% lymph)
0.13%	0.01%	169	2	23205	78.6%	1.25%	9.36%
0.03%	0.04%	680	53	130277	69.78%	0.34%	18.79%
0%	0.01%	6	45	556943	81.32%	0.07%	6.34%
0.04%	0%	1071	1	94378	85.87%	3.82%	8.75%
0.45%	0.02%	9892	76	317374	72.59%	1.21%	23%

Table 4. Results from five leukapheresis products showing frequencies of malignant and normal plasma cells as well as residual T, B, and NK cells.

Spiked %CD45	Recovered %CD45 (mean from 3 replicates in 5 normal whole blood samples)	Relative recovery of target frequency	Number of CD45+ ($\times 10^3$, mean from 3 replicates)	Number of recovered events (mean from 3 replicates)	CV	mean$^{-1/2}$ ("poisson noise")	theoretical LLOD (20 cells min)	theoretical LLOQ (50 cells min)
0.5000%	0.4815%	96%	1,174	5996	20%	1%	0.0017%	0.0043%
0.0500%	0.0459%	92%	1,153	523	17%	4%	0.0017%	0.0043%
0.0050%	0.0049%	98%	1,157	56	38%	13%	0.0017%	0.0043%
0.0010%**	0.0009%	94%	1,131	10	47%	31%	0.0018%	0.0044%
0.0005%**	0.0005%	109%	1,155	6	47%	40%	0.0017%	0.0043%
0.0003%**	0.0005%	195%	1,164	3	64%	56%	0.0017%	0.0043%

Table 5. Results from validation runs on inter-assay linearity/precision (**represents spiked values below the theoretical LLOD).

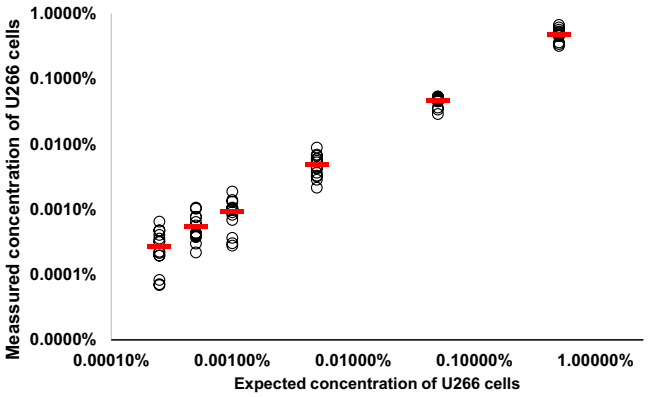

Figure 2. Linearity assessment. Black outlined circles represent data points from 6 different concentrations of U266 cells, spiked into whole blood samples from 5 different normal donors and run in triplicate. Red bars represent the mean of measured values at each concentration. Linear regression delivered a slope of 0.96 and a correlation coefficient of $R^2 = 0.948$.

as approximated through linear regression by a linear equation $y = 0.963 \times -1 \times 10^{-4}$ with a correlation coefficient of $R^2 = 0.948$ (Fig. 2). Table 5 shows the results of normal samples spiked with U266 cells. CVs were higher than expected (Poisson noise) for samples with frequencies from 0.5% to 0.005%. Recovery of spiked U266 cells was found at an average of 95% when referring to samples above the theoretical lower limit of detection (LLOD) or quantitation (LLOQ) from 0.5% to 0.005%. LLOD and LLOQ were calculated as described above.

Inter-assay analysis: Repeatability. In this set of experiments, the aim was to evaluate the repeatability of the assessment. 30 samples from three different sources were assayed: peripheral blood, bone marrow and apheresis product from three different plasma cell myeloma patients. 10 staining replicates from each sample (peripheral blood, bone marrow and apheresis product) were performed and acquired.

$382{,}6 \times 10^3 \pm 4{,}7 \times 10^3$ CD45+ events were recorded from 10 replicates of peripheral blood samples. Final frequencies of malignant plasma cells ranged from 0.03% to 0.02% of CD45+, representing 2 anomalous plasma cells in 1×10^4 CD45+ at the CV of 13%. Similarly, 10 replicates of bone marrow samples recorded $355{,}8 \times 10^3 \pm 12{,}3 \times 10^3$ CD45+ events. The estimated frequencies of malignant plasma cells ranged from 0.04% to 0.03% of CD45+ anomalous plasma cells. The %CV was 3. Finally, 10 replicates of autologous apheresis product were analyzed showing $396{,}4 \times 10^3 \pm 3{,}3 \times 10^3$ events. The ranged of from 0.08% to 0.07% of CD45+ anomalous plasma cells. The %CV was 7.

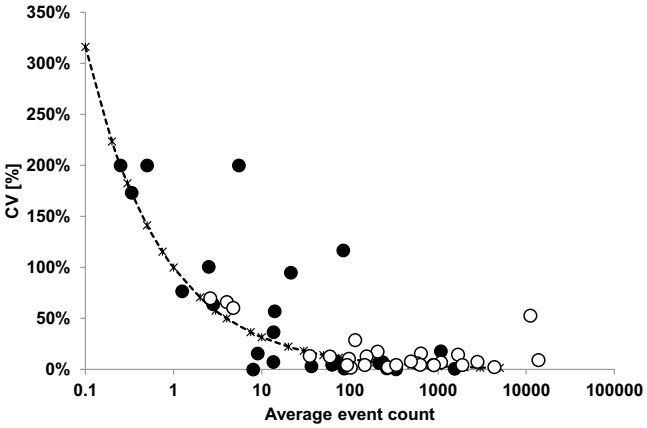

Figure 3. Results from validation runs on inter-operator analysis. White outlined circles represent numbers of normal plasma cells; black circles represent abnormal plasma cells estimated by the analysis.

	0 h		4 h		6 h		8 h	
Age of stain	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
CD45+ ($\times 10^3$)	355,8	12,9	396,0	9,5	411,4	8,6	419,8	7,9
Normal plasma cells	210	14	212	27	222	18	203	16
Abnormal plasma cells ($\times 10^3$)	12,1	0,4	12,2	0,5	12,3	0,5	12,2	0,4

Table 6. Validation run on age-of-stain comparing analysis of 10 replicates from a single bone marrow sample of a myeloma patient at four different time points (0; 4; 6; 8 h).

Inter-operator analysis. To evaluate the inter-operator variability a comparison of results from five different data analyses conducted by five independent operators was performed. Trained operators analyzed 25 datasets of apheresis and whole blood samples. The validation data set included 22 unique files and 3 file doublets. Analyses of data sets with average event counts above 50 plasma cell events (malignant or normal), showed high consistency, with CVs lower than 25% (Fig. 3). Outliers of inter-operator CVs were observed in samples with low frequencies ranging from 200% CV for 25 plasma cells total to 0% for 8 plasma cells total.

Age-of-stain analysis. Age of stain analysis was performed in order to evaluate the stability of the staining over time. 10 replicates from a single bone marrow sample of a myeloma patient were analyzed immediately after staining as well as 4, 6 and 8 h later. The variability for a change from the baseline assessed directly after performed staining ranged from 2 to 13% across different time points. Table 6 and Fig. 4 show the bone marrow age-of-stain analysis with comparable cell frequencies and CVs across all time points.

Although the reproducibility of the analysis was shown across all sample types (bone marrow, peripheral blood and apheresis (data not shown)) even after 24 h, we note that a moderate shift in granularity, as shown by altered SSC, was observed that required adaptation of the gating.

Background from blank. In order to determine the limit of blank (LOB) defined as the highest measurement result that is likely to be observed for a blank sample, 25 samples from healthy donors were collected and stained according to standard protocols. The number of detected plasma cells with abnormal phenotype ranged between 0 and 2, while the mean number of CD45+ cells was $1472{,}5 \times 10^3$ and the mean normal plasma cell number recorded was 330. The analysis was performed with a standard protocol and LOB was calculated as the mean result and the standard deviation (SD), following the formula: $\text{mean}_{\text{blank}} + 1.645(\text{SD}_{\text{blank}})$. The calculated LOB was 0,76.

Discussion

Flow cytometry is a reliable, easy and cost effective tool for the assessment of minimal residual disease in patients with plasma cell myeloma[26]. Novel drugs significantly improve patients' outcomes by achieving longer remissions that cannot be measured reliably with standard methods such as immunofixation and electrophoresis[5]. On the other hand, molecular tests like allele-specific oligonucleotide (ASO)-PCR[27] or next generation sequencing (NGS) of immunoglobulin rearranged genes[28,29] require pre-treatment evaluation, have relatively high cost per sample and are time consuming. Although flow cytometry MRD testing is being performed by many laboratories, there are major differences in antibody panels, gating strategies and minimal event counts[30]. The effort of minimalizing the laborious workflow and cost while preserving the robustness and sensitivity, has been recently shown by the EuroFlow Consortium[31] and MSKCC group[32] (see Table 2).

The presented, standardized assay addresses the urgent need for easy, applicable, lean and sensitive flow cytometry based method for the evaluation of treatment efficacy that can then be routinely used in the clinical

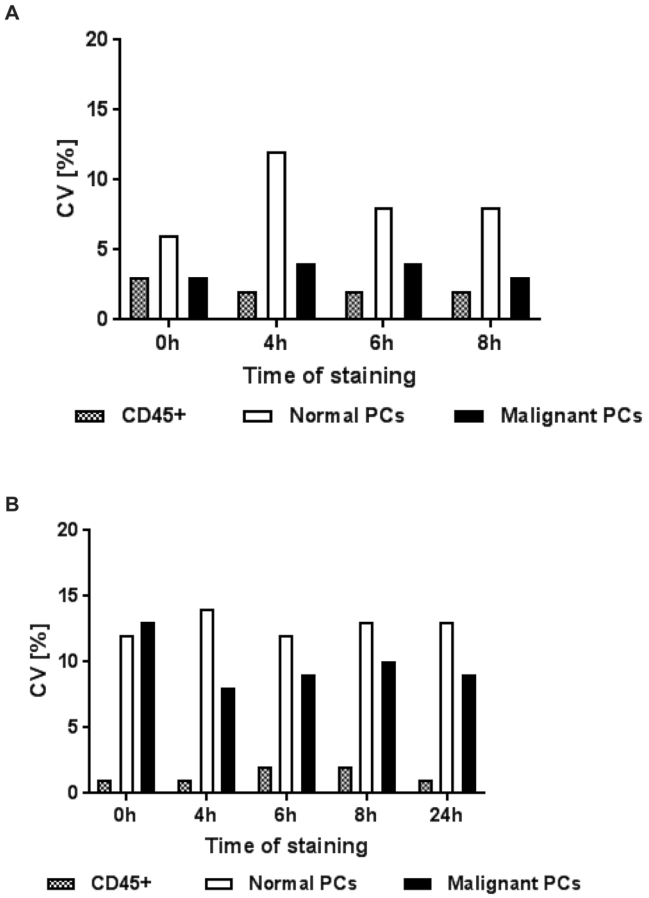

Figure 4. **(A)** Validation run on age-of-stain comparing analysis of 10 replicates from a single bone marrow sample of a myeloma patient at 0, 4, 6 and 8 h. Each column represents a different cell subtype (black/white pattern – CD45+ cells, white – cells with normal plasma cell phenotype, black– cells with malignant plasma cell phenotype) and corresponding CV at different time points of analysis after staining. **(B)** Validation run on age-of-stain comparing analysis of 10 replicates from a single peripheral blood sample of a myeloma patient at 0, 4, 6, 8 and 24 h. Each column represents a different cell subtype (black/white pattern – CD45+ cells, white – cells with normal plasma cell phenotype, black– cells with malignant plasma cell phenotype) and corresponding CV at different time points of analysis after staining.

setting. Furthermore, this validation evaluated the capability of using different starting material like mobilized peripheral blood and stem cell apheresis for MRD evaluation.

The tested flow cytometry panel was designed based on current recommendation and results of clinical trials[1,2,10] and took advantage of room temperature stable dried antibodies, preformatted for one test in a assay tube as well as automated instrument setup and compensation routine[33]. Furthermore, analysis using a predefined template, including dynamic gates and radar plots[34], allowed for a high level of standardization independent of the personnel performing the analysis. This leads to a simplified and easy protocol that can be expanded by including further markers (e.g. ECD and APC-AF700 conjugated fluorochromes), as shown here with the addition of the CD117 or CD3 antibody. Additional antibodies used as drop-ins did not compromise the performance of the assay.

Reliable assessment of minimal residual disease can only be achieved upon stringent validation of the diagnostic assay. Here, we presented a validation study that follows the current recommendation summarized in the consensus guidelines[12,21,23] with the aim to demonstrate the ability of this assay to detect, in a reproducible and reliable manner, the presence of minimal residual disease.

Validation performed in compliance with ISO15189: 2012 accreditation guidelines for clinical laboratories requires a verification of the accuracy. To validate the accuracy of an assay it is necessary to compare average values obtained with a conventional true value. This presents a technical challenge, since there are currently no fully characterized reference materials available. Furthermore, there are no external quality assessment programs, while other techniques for MRD assessment like (ASO)-PCR or NGS have different sensitivities and specificity, making it difficult to use them as a comparison method[35]. In order to overcome those difficulties and determine the lower level of detection (LLOD), we used whole blood from a healthy donor and spiked it with apheresis product from a patient with plasma cell myeloma with active disease as estimated by standard means. Due to the amount and nature of the original sample the percentage of malignant plasma cells in the samples varied between 0.008% and 0.0005% for CD45+ anomalous plasma cells. CVs were in the expected range: 7–25% (Poisson noise)

for all samples. Calculated LLOQ lied at 0.002% and LLOD was shown for 0.001%. In cases of rare populations where the LLOD is 0.01% or lower a CV < 30% is acceptable[22].

Inter-assay experiments demonstrated linearity of the assay with a linear regression slope of 0.96 and a correlation coefficient of $R^2 = 0.948$. Precision of the assay was analyzed in the dilution experiment with samples created by spiking whole blood from a healthy donor with U266 cells to create samples with known frequencies of this cell line. The CVs were higher than expected (Poisson noise) for samples with frequencies from 0.5% to 0.005%; this might be attributed to the modified gating strategy needed for identification of the U266 cellular phenotype as compared to native malignant plasma cells. Analysis of the blank samples from healthy donors showed a low LOB of 0.76. Furthermore, repeatability showed high consistency of the results, regardless of the material used and the age-of-stain for no more than 24 h.

The development and introduction of a highly standardized analysis procedure as well as the introduction of radar plots significantly simplified the analysis procedure. The performed inter-operator analysis showed that inter-operator variability which is highly dependent on the subset abundance[33] can be significantly reduced. According to our analysis, the consistency in data evaluation with average event counts above 50 plasma cell events (abnormal or normal) can be very high with CVs lower than 25%[11].

Although this standardized test has been validated to detect at least 20 abnormal plasma cells and quantify the cell concentration above 50 plasma cells, the actual sensitivity will depend on the adherence to the protocol and the quality of the sample[11,24,25]. Since the age of the sample significantly influences the variability, especially in low-abundant cell populations[36], our assay was performed immediately after sample collection. Age-of-stain analysis showed that immediately following staining, samples could be measured up to 24 h post staining. Variability remained comparable for 24 h.

Our validation results show that a reliable detection of residual myeloma cells was feasible to a detection level of 0.0010% (10^{-5}) with a single-tube assay for a variety of materials (peripheral blood, bone marrow and stem cell apheresis).

Our MRD detection approach is applicable to more than 98% of plasma cell myeloma patient samples run in our laboratory. Furthermore, valid estimation of the presence of minimal residual disease was possible from peripheral blood and stem cell products. Due to the high sensitivity and robustness of the assay there was no need of assessment of pretreatment samples from the patients[37].

In summary, the presented validation results demonstrate a highly standardized, well streamlined and lean workflow approach for the assessment of minimal residual disease in plasma cell myeloma patients. The presented validation of the test followed the FDA-NCI roundtable guidelines[7] and international consensus recommendations for myeloma flow cytometry based MRD quality control[12,23].

Expanding the sample material to include peripheral blood and apheresis product will help to collect long-term data of their predictive value as well as extend their usage. Furthermore, wider usage of this MRD assessment standardized approach will allow reliable comparison between laboratories setting new standards in routine evaluation patients' response to treatment.

Data Availability

The datasets generated during and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Rawstron, A. C. *et al.* Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2540–2547 (2013).
2. Rawstron, A. C. *et al.* Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: Independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* **125**, 1932–1935 (2015).
3. Mateos, M.-V. *et al.* Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.* **29**, 387–403 (2015).
4. San-Miguel, J. F. & Kantarjian, H. M. Multiple myeloma and chronic leukaemias in 2014: improved understanding of disease biology and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 71–2 (2015).
5. Kumar, S. *et al.* International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* **17**, e328–e346 (2016).
6. Paiva, B. *et al.* High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* **119**, 687–91 (2012).
7. Landgren, O. *et al.* Flow cytometry detection of minimal residual disease in multiple myeloma: Lessons learned at FDA-NCI roundtable symposium. *American journal of hematology* **89**, 1159–1160 (2014).
8. Dingli, D. *et al.* Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: A simple risk stratification system. *Blood* **107**, 3384–3388 (2006).
9. Alapat, D. *et al.* Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* **137**, 93–100 (2012).
10. Arroz, M. *et al.* Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, https://doi.org/10.1002/cyto.b.21228 (2015).
11. Roschewski, M. *et al.* Minimal residual disease: What are the minimum requirements? *J. Clin. Oncol.* **32**, 475–476 (2014).
12. Rawstron, A. C., Pavia, B. & Stetler-Stevenson, M. Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21272 (2015).
13. Stamatis, D. H. Failure Mode and EffectAnalysis: FMEA from Theory to Execution. *Am. Soc. Qual. Qual. Press. Milwaukee* 455, https://doi.org/10.2307/1268911 (2003).
14. Pesando, J. M., Hoffman, P. & Abed, M. Antibody-induced antigenic modulation is antigen dependent: characterization of 22 proteins on a malignant human B cell line. *J. Immunol.* **137**, 3689–95 (1986).
15. Sugita, K. *et al.* The 1A4 molecule (CD27) is involved in T cell activation. *J. Immunol.* **147**, 1477–1483 (1991).
16. Doody, G. M., Dempsey, P. W. & Fearon, D. T. Activation of B lymphocytes: Integrating signals from CD19, CD22 and Fc gamma RIIb1. *Current Opinion in Immunology* **8**, 378–382 (1996).
17. Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G. & Brown, M. H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* **23**, 285–290 (2002).

18. Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**(Pt 1), 1–16 (1997).
19. Griffin, J. D., Hercend, T., Beveridge, R. & Schlossman, S. F. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J Immunol* **130**, 2947–2951 (1983).
20. Mehta, K., Shahid, U. & Malavasi, F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J.* **10**, 1408–1417 (1996).
21. Stetler-Stevenson, M. *et al*. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, https://doi.org/10.1002/cyto.b.21249 (2015).
22. Lee, J. W. *et al*. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. in. *Pharmaceutical Research* **23**, 312–328 (2006).
23. Oldaker, Ta, Wallace, P. K. & Barnett, D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **90**, 40–6 (2016).
24. Rawstron, A. C. *et al*. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **21**, 956–964 (2007).
25. Rawstron, A. C. *et al*. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* **27**, 142–149 (2013).
26. Mailankody, S. *et al*. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nature reviews. Clinical oncology* 1–10, https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.239 (2015).
27. Martinez-Lopez, J. *et al*. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma: Results from a GEM/PETHEMA study. *Br. J. Haematol.* **163**, 581–589 (2013).
28. Martinez-Lopez, J. *et al*. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* **123**, 3073–3079 (2014).
29. Martinez-Lopez, J. *et al*. Analytical and clinical validation of a novel in-house deep sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia* **31**, 1446–1449 (2017).
30. Flanders, A., Stetler-Stevenson, M. & Landgren, O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood* **122**, 1088–1089 (2013).
31. Paiva, B., Puig, N., Böttcher, S. & Velden, V. H. J. V. D. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 1–10, https://doi.org/10.1038/leu.2017.29 (2017).
32. Roshal, M. *et al*. MRD detection in multiple myeloma: comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. *Blood* **1**, 2–4 (2017).
33. Maecker, H. T. *et al*. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.* **6**, 13 (2005).
34. Jafari, K. *et al*. Visualization of Cell Composition and Maturation in the Bone Marrow Using 10-Color Flow Cytometry and Radar Plots. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **94**, 219–229 (2018).
35. Puig, N. *et al*. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* **28**, 391–397 (2013).
36. Streitz, M. *et al*. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant. Res.* **2**, 17 (2013).
37. Silvennoinen, R. *et al*. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* **4**, e250 (2014).

Acknowledgements

Many thanks to Michael Kapinsky from Beckman Coulter for an excellent technical advice and many constructive discussions. Furthermore, a special thanks to the staff of Stem Cell Facility, especially to Petra Mackeldanz, Bianca Berg and Anna Takvorian for an outstanding technical support.

Author Contributions

A.B., K.H., M.S., S.S. and L.U. designed the study and analyzed the data. A.B. wrote the first draft of the manuscript. A.B., C.T.B., I.W.B., L.U. performed patient management. A.B., K.H., M.S., S.S., C.T.B., I.W.B., L.U. revised the manuscript critically, participated in final data analysis and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Journals

Haussmann K, Streitz M, Takvorian A, Grund J, Skenderi Z, Tietze-Bürger C, Movassaghi K, Künkele A, Blum A, Bullinger L. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products. Sci Rep. 2022 Oct 26;12(1):17995. doi: 10.1038/s41598-022-22339-1. PMID: 36289245; PMCID: PMC9605971. (IF 4,6)

Blum A, **Haussmann K**, Streitz M, Schlickeiser S, Tietze-Buerger C, Blau IW, Uharek L. Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma. Sci Rep. 2019 Feb 27;9(1):2922. doi: 10.1038/s41598-019-39631-2. PMID: 30814612; PMCID: PMC6393516. (IF 4,0)

Gilabert-Oriol R, Thakur M, **Haussmann K**, Niesler N, Bhargava C, Görick C, Fuchs H, Weng A. Saponins from Saponaria officinalis L. Augment the Efficacy of a Rituximab-Immunotoxin. Planta Med. 2016 Dec;82(18):1525-1531. doi: 10.1055/s-0042-110495. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27392242. (IF 2,3)

Abstract

Advancement of the gold standard: ishage protocol combined with t and b cell analysis as mulitflex flow cytometry assay for standard cellular products and ATMPS
K. Haussmann, M. Streitz, A. Takvorian, Z. Skenderi, C. Tietze-Bürger, K. Movassaghi, A. Künkele, A. Blum, L. Bullinger, Cytotherapy, Volume 23, Issue 5, S200 - S201 doi: https://doi.org/10.1016/S1465324921006265

Danksagung

Die Arbeit entstand in der Charité Stem Cell Facility zugehörig aus der Klinik m. S. Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow Klinikum anfangs unter der Leitung von Professor Dr. med. Lutz Uharek und nachfolgend geleitet durch Herrn Dr. med. Kamran Movassaghi.

Mein außerordentlicher Dank gilt zuallererst meinem Erstbetreuer Herrn Professor Dr. med. Lars Bullinger. Er hat mir wirklich großes Vertrauen entgegengebracht, als er meine Betreuung ohne Zögern nach dem Weggang meines vorhergehenden Doktorvaters übernommen hat. Ich gestehe Herrn Professor Bullinger doch zeitlich oft herausgefordert zu haben, z. B. zur Einreichung meiner Posterpräsentation für den ISCT 2021 oder auch bei der Finalisierung des Manteltextes. Für die zügige und sehr hilfreiche wissenschaftliche Betreuung sowie die angenehm unkomplizierte Zusammenarbeit möchte ich mich auf diesem Wege ganz herzlich bei Ihm danken.

Mein weiterer außerordentlicher und herzlichster Dank gilt Frau Professor Dr. med. Annette Künkele-Langer für die wissenschaftliche Betreuung und angenehmen Austausch sowie für die begleitende Motivation. Frau Professor Dr. med. Angelika Eggert und Annette stellten uns Räumlichkeiten für den Zeitraum der wissenschaftlichen Arbeit zur Verfügung. Dafür möchte ich mich hiermit nochmals ausdrücklich bedanken. Annette versprüht eine immense Energie für die Forschung und Wissenschaft, die Klinik, für die Kinder und die Familie und Freunde. Ich hoffe noch viel von dieser Energie erfahren und aufnehmen zu können und ihr auch eines Tages diese Energie zurückgeben zu können.

Eine weitere stetige Unterstützung ist- und damit bin ich zu großem Dank verpflichtet- Frau Dr. med. Agnieszka Blum. Sie hat den Grundstein dieser Arbeit geschaffen und die Durchflusszytometer zusammen mit der Idee der Trockenpanels in die Stem Cell Facility gebracht. Selbst der Weg nach Irland war nicht zu weit, um sich gemeinsam für diese wissenschaftliche Arbeit auszutauschen. Die nächtlichen Telefonate über dem Manuskript haben mich stets motiviert weiter zu machen. Vielen herzlichen Dank Agnieszka.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. med. Kamran Movassaghi für sein entgegengebrachtes Vertrauen in die neue Technologie der DuraClone und Navione danken. Ohne seine

Zustimmung und Unterstützung der umfangreichen Validierungsarbeiten wäre dieser lange Weg nicht möglich gewesen.

Meine besondere Achtung und Dankbarkeit verdient des weiteren Anna Takvorian. Sie fügte sich ohne Protest, aber nicht ohne Hinterfragen, den umfangreichen Validierungsplänen. Anna ist eine Spezialistin am Durchflusszytometer. Ohne Ihre Unterstützung auf allen Ebenen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlichsten Dank bin ich den Kollegen:innen der Quality Unit, Frau Dr. rer. medic. Zemra Skenderi sowie Christa Hechler und Annika Klaus (AG Künkele-Langer) verpflichtet, die während meiner Doktorarbeit stets ein offenes Ohr hatten und den sowohl fachlichen als auch humorvollen Austausch ermöglichten. Danke auch für das erste Gegenlesen des Manteltextes Romy.

Die wichtigste Stellung nimmt allerdings meine Familie ein. Alle trugen teilweise unbewusst unterstützend bei. Wichtig war es, wenn auch im Hintergrund, dabei und da zu sein. Die Kinder sind stets interessiert gewesen und erkundigten sich nach dem aktuellen Stand. Ihr Interesse an meiner Arbeit hat mich sehr berührt. Zutiefst bin ich meinen Eltern dankbar, die mir vorbildhaft unter anderem durch ihr eigenes Lebenswerk gezeigt haben, dass auch große Aufgaben im Leben Schritt für Schritt zu meistern sind. Einfach machen! Diese Doktorarbeit widme ich meinem Papa, dessen schmerzlichen Verlust wir leider viel zu früh erfahren mussten. Für mich bist Du immer da.