

Aus dem Interdisziplinärem Transplantationslabor Med. Klinik m.S. Nephrologie
und intern. Intensivmedizin und dem Institut für Med. Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Generierung von antigenspezifischen T-Zelllinien aus gesunden und
immunsupprimierten Spendern zur adoptiven Immuntherapie von
Zytomegalievirus-Erkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Gordon Brestrich

aus Ludwigsfelde

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P Reinke
2. Prof. Dr. C. Scheibenbogen
3. Prof. E.K Geissler, Ph.D

Datum der Disputation: 29.02.2008

Zusammenfassung

In der Transplantation stellen Zytomegalovirus- (CMV-) Infektionen ein ernstzunehmendes Problem dar und können sowohl das Überleben des Patienten als auch das des Transplantats negativ beeinflussen. Zur Behandlung von CMV-Komplikationen ist die medikamentöse antivirale Therapie die erste therapeutische Option. Eine langfristige Behandlung durch antivirale Substanzen ist aber aufgrund toxischer Nebenwirkungen sowie viraler Resistenzbildungen nur bedingt möglich. Die einzige Möglichkeit einen langfristigen Schutz vor CMV-Komplikationen zu gewährleisten, ist die Etablierung einer effektiven CMV-spezifischen Immunantwort. Bei transplantierten Patienten ist die natürliche Entwicklung einer protektiven Antwort durch die medikamentöse Immunsuppression, welche die Abstoßung des transplantierten Organs verhindern soll, stark erschwert. Darum setzen neuere Therapieansätze auf den adoptiven Transfer *in vitro*-manipulierter CMV-spezifischer T-Zelllinien zur Überwindung dieses iatrogenen Effektes. Obwohl klinische Studien die Sicherheit und Effektivität adoptiv transferierter T-Zelllinien in der Bekämpfung von CMV-Komplikationen belegten, kommen diese bis heute lediglich bei wenigen Patienten zur Anwendung. Dies ist vor allem durch den technisch aufwendigen Herstellungsprozess, sowie die mangelnde Übertragbarkeit vieler Generierungsmethoden in die klinische Praxis bedingt. Kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Protokoll entwickelt, das die Herstellung CMV-spezifischer T-Zelllinien aus gesunden Probanden ermöglicht. Dieses Protokoll basiert auf der Stimulation mit überlappenden Peptidpools, der anschließenden magnetischen Isolierung der Interferon- γ -sezernierenden Zellen, sowie deren *in vitro*-Expansion. Dieses Protokoll überwindet viele Limitierungen bisheriger Herstellungsmethoden, da es für jeden HLA-Typ einsetzbar ist und keine Kenntnis von immundominanten Epitopen voraussetzt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Weiterentwicklung und Verbesserung dieses Herstellungsprotokolls.

Es konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Methode für die Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus immunsupprimierten Patienten genutzt werden kann. Dadurch können Patienten nach solider Organtransplantation behandelt und somit die Anwendung der Methode um ein Vielfaches ausgeweitet werden. Des Weiteren wurden T-Zelllinien gegen mehrere virale Proteine aus demselben Spender generiert. Die dadurch erreichte breitere Antigenreaktivität sollte die Effizienz der adoptiven Immuntherapie weiter erhöhen. Abschließend wurde in dieser Arbeit die Übertragbarkeit der Generierungsmethode in die

klinische Praxis demonstriert, und es konnte ein Patient mit CMV-spezifischen T-Zelllinien behandelt werden.

Somit stellt das entwickelte Herstellungsprotokoll einen wichtigen Fortschritt in der adoptiven Immuntherapie dar und erlaubt eine bessere Versorgung von Patienten mit schweren CMV-Komplikationen. Des Weiteren ist zukünftig eine Übertragung dieser Methode auf die Behandlung anderer viraler Erkrankungen oder Tumoren denkbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Die Immunantwort gegen virale Infektionen.....	9
1.2 Das Zytomegalovirus.....	11
1.2.1 Aufbau	11
1.2.2 Epidemiologie	12
1.2.3 Infektionen in gesunden Personen.....	13
1.2.4 Infektionen in immuninkompetenten Patienten	14
1.3 Behandlungsoptionen.....	16
1.3.1 antivirale Therapie.....	16
1.3.2 Vakzinierung	17
1.3.3 Herabsetzung der immunsuppressiven Therapie.....	18
1.3.4 Immuntherapie	18
1.4 Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien	20
1.4.1 Methodenüberblick.....	20
1.4.2 Generierung von antigenspezifischen T-Zelllinien für die klinische Anwendung ..	28
1.4.3 Anforderungen an ein optimales Generierungsprotokoll	30
1.4.4 Vorarbeiten.....	32
2. Ziele der Arbeit und Studiendesign.....	33
3. Material und Methoden.....	36
3.1 Probanden und Materialien	36
3.2 Methoden.....	41
3.2.1 PBMC-Isolierung	41
3.2.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	41
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
3.2.4 LCL-Generierung und -Kultivierung	42
3.2.5 T-Zell-Generierung und -Kultivierung.....	42
3.2.6 T-Zell-Generierung und -Kultivierung unter GMP-Bedingungen	43
3.2.7 Durchflusszytometrie	45
3.2.8 Zytotoxizitätstestung	46
3.2.9 Epitopmapping und IFN- γ -ELISA	47
3.2.10 Analyse der T-Zellrezeptor Beta variablen Gene (TRBV)	48
3.2.11 Mykoplasmenantigennachweis	50
3.2.12 Aerobe-/anaerobe Bakterienkultur und LPS-Testung	50
3.2.13 HLA-Typisierung	51
3.2.14 CMV-PCR.....	51
3.2.15 Statistische Analysen.....	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1 Generierung antigenspezifischer T-Zelllinien aus SOT-Patienten.....	52
4.1.1 Analyse der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellfrequenz im peripheren Blut.....	52
4.1.2 Isolierung und Expansion der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellen	54
4.1.3 Phänotyp der Zelllinien	56

4.1.4 <i>In vitro</i> -Funktion und Antigen-spezifität.....	57
4.1.5 Differenzierungsstatus.....	62
4.1.6 Epitopdiversität	63
4.1.7 Klonalität.....	64
4.2. Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien für die klinische Anwendung....	66
4.2.1 Herstellung der Linien unter GMP-Bedingungen	66
4.2.2 Testung der Linien für die klinische Zulassung.....	67
4.2.3 Klinische Anwendung der GMP-generierten T-Zelllinien.....	69
5. Diskussion.....	72
5.1 Generierung von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus SOT-Patienten	73
5.1.1 Isolierung und Expansion der im Blut vorhandenen Gedächtniszellen	74
5.1.2 Funktion und Spezifität	75
5.1.3 Persistenz.....	76
5.2 Generierung von T-Zelllinien gegen andere virale Proteine.....	78
5.3 Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien zur klinischen Anwendung	79
5.3.1 Übertragung in die GMP-Richtlinien.....	79
5.3.2 Klinische Anwendung	82
5.4 kritische Analyse der Arbeit und Ausblicke für die Zukunft	85
6. Literaturverzeichnis.....	89
7. Abkürzungsverzeichnis.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines CMV-Virions	12
Abb. 2: Überlappender Peptidpool von pp65	22
Abb. 3: Funktionsprinzip des Sekretionsassay	24
Abb. 4: Arbeitsplan	34
Abb. 5: Aufbau eines CliniMACS Plus.....	45
Abb. 6: Detektion antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut.....	52
Abb. 7: Keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ ⁺ -Zellen im peripheren Blut	54
Abb. 8: Expansionsraten der T-Zelllinien	55
Abb. 9: Vergleichbarer Phänotyp.....	57
Abb. 10: Strategie zur Analyse der IFN- γ Produktion	58
Abb. 11: Keine signifikanten Unterschiede in der IFN- γ Produktion.....	60
Abb. 12: Vergleichbare Antigenpezifität.....	61
Abb. 13: Prinzip des Epitopmappings.....	63
Abb. 14: Multiple Epitopspezifität in Linien aus gesunden und transplantierten Spendern....	64
Abb. 15: Eingeschränkte T-Zellrezeptor Beta Varianz in den generierten T-Zelllinien.....	65
Abb. 16: Multiple Klonalitäten in Linien aus gesunden und transplantierten Spendern	65
Abb. 17: Beide Linien produzieren IFN- γ nach spezifischer Stimulation	68
Abb. 18: Spezifische zytotoxische Aktivität einer T-Zelllinie.....	69
Abb. 19: Höhe der CMV-Viruslast vor und nach Infusion der T-Zellen.....	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von Zusätzen bei der Expansion von antigenspezifischen T-Zellen.....	26
Tabelle 2: Übersicht Stärken und Schwächen bestehender Generierungsprotokolle für CMV-spezifische T-Zelllinien.....	27
Tabelle 3: Probanden.....	36
Tabelle 4: Geräte	37
Tabelle 5: Einwegartikel	38
Tabelle 6: Reagenzien	38
Tabelle 7: Individuelle Frequenz antigenspezifischer T-Zellen.....	53
Tabelle 8: Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen.....	59
Tabelle 9: Differenzierungsstatus der T-Zelllinien	62
Tabelle 10: Herstellung zweier T-Zelllinien unter GMP-Richtlinien	66
Tabelle 11: Phänotyp der Zelllinien	67
Tabelle 12: Monitoring der CMV-spezifischen T-Zellen	71