

## 5. Diskussion

In der Transplantationsmedizin stellen CMV-Infektionen ein großes Problem dar und können sowohl das Überleben des Patienten als auch das des Transplantats beeinflussen. Zur Behandlung von CMV-Komplikationen ist die medikamentöse antivirale Therapie die erste therapeutische Option. Sie kommt sowohl in der prophylaktischen als auch in der symptomatischen Behandlung zum Einsatz und verhindert die ungehemmte Ausbreitung der Infektion durch virale Partikeln (140). Eine langfristige prophylaktische Behandlung durch antivirale Substanzen ist aber aufgrund von toxischen Nebenwirkungen sowie viralen Resistenzbildungen nur bedingt möglich. Die einzige Möglichkeit einen langfristigen Schutz vor CMV-Komplikationen zu gewährleisten, ist die Etablierung einer effektiven CMV-spezifischen Immunantwort (141). 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. Frühe klinische Pilotstudien belegen die Sicherheit und Effektivität dieser Methode in der Bekämpfung von CMV-Komplikationen nach HSCT (101, 102).

Trotz dessen ist bis heute die Generierung von CMV-spezifischen T-Zelllinien nur bei wenigen ausgewählten Patienten nach HSCT möglich. Dies ist vor allem durch eine mangelnde Übertragbarkeit vieler Herstellungsmethoden in eine GMP-konforme Produktion bedingt, die für die klinische Anwendung unumgänglich ist. Des Weiteren setzen viele Generierungsstrategien das Wissen immundominanter Epitope voraus und sind dadurch auf Patienten mit weit verbreiteten HLA-Typen restringiert.

Kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Protokoll entwickelt, das die Herstellung pp65-spezifischer T-Zelllinien aus gesunden Probanden ermöglicht (119). Dieses Protokoll basiert auf der Stimulation mit überlappenden Peptidpools, der anschließenden magnetischen Isolierung der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen und deren *in vitro*-Expansion. Dieses Protokoll setzt keine Kenntnis immundominanter Epitope voraus und ist deshalb unabhängig vom HLA-Typ anwendbar. Zusätzlich ist durch die einfache Konzipierung eine Übertragung in die GMP-Richtlinien möglich.

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung dieses bestehenden Protokolls, um dessen Anwendungsmöglichkeit auf ein größeres Patientenspektrum zu erweitern und die Qualität der damit generierten T-Zelllinien zu erhöhen. Des Weiteren sollte das Protokoll in die GMP-Richtlinien übertragen werden.

## **5.1 Generierung von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus SOT-Patienten**

Als erstes wurde die Übertragbarkeit des Protokolls zur Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien aus SOT-Patienten überprüft. Aufgrund häufiger CMV-Reaktivierungen besteht in der SOT ebenfalls ein großer Bedarf an CMV-spezifischen T-Zelllinien. Durch die Behandlung von SOT-Patienten mit CMV-Komplikationen könnte die Anwendung der adoptiven Immuntherapie um ein Vielfaches ausgeweitet werden.

Bei der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus SOT-Patienten treten einige Umstände erschwerend in Erscheinung, die bei Patienten nach HSCT in den meisten Fällen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Während bei HSCT-Patienten das Blut des gesunden Spenders zur Generierung verwendet werden kann, muss in der SOT das Blut des Patienten eingesetzt werden. Dieses steht nur in begrenztem Maße zur Verfügung, da die Entnahme größerer Mengen ethisch bedenklich wäre. Außerdem enthält es immunsupprimierende Substanzen, die unter anderem die Aktivierung und Funktion von T-Zellen unterdrücken. Somit könnten immunsupprimierende Substanzen die Generierung und Expansion von CMV-spezifischen T-Zelllinien erschweren. Die Gruppe um Rooney et al. belegte als erstes, dass die Generierung von antigenspezifischen T-Zelllinien aus immunsupprimierten Patienten möglich ist. Sie generierten funktionelle EBV-spezifische T-Zelllinien aus 8 SOT-Patienten (115). Bei dieser Studie wurde aber die Wirkung der immunsupprimierenden Substanzen während des Herstellungsprozesses ausgedünnt, da das von ihnen verwendete Generierungsprotokoll auf der wiederholten Stimulation mit autologen LCLs beruhte. Im Gegensatz dazu ist der Erfolg unseres Protokolls maßgeblich von der initialen Aktivierbarkeit von CMV-spezifischen T-Zellen im Blut des Patienten abhängig, weil diese über IFN- $\gamma$ -Sezernierung isoliert werden sollen. Darum schien unser Protokoll im besonderen Maße gegen Calcineurin-Inhibitoren (CNIs) anfällig, da deren inhibitorische Wirkung bei der T-Zellrezeptor-vermittelten IFN- $\gamma$ -Sezernierung beschrieben ist (142). Um die Möglichkeit zu untersuchen mit unserem Protokoll T-Zelllinien aus SOT-Patienten zu generieren, sollten von 10 nierentransplantierten Patienten und 5 gesunden Probanden CMV-spezifische T-Zelllinien hergestellt und anschließend miteinander verglichen werden.

### 5.1.2 Isolierung und Expansion der im Blut vorhandenen Gedächtniszellen

Eine Isolierung von Gedächtniszellen über die IFN- $\gamma$ -Sekretion ist nur möglich, wenn sich diese spezifisch aktivieren lassen. Zum Zeitpunkt der T-Zellgenerierung wurden allen 10 transplantierten Spendern CNIs verabreicht (Tabelle 4). Nichtsdestotrotz konnten bei allen Spendern IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen nach spezifischer Stimulation mit pp65- und IE-1-Peptidpools im peripheren Blut detektiert werden. Die Frequenz dieser Zellen war bei Transplantierten oft sogar höher als bei gesunden Spendern (Abbildung 7). Dieser Umstand stimmt mit Beschreibungen aus der Literatur überein und wird mit vermehrtem Antigenkontakt erklärt. Dieser ist auf CMV-Reaktivierungen zurückzuführen, welche bei Transplantierten häufiger als bei Gesunden auftreten (24, 143).

Die IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen konnten bei allen Spendern mittels IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay isoliert werden. Die Expansion der Zellen war bei 8 von 10 transplantierten und allen 5 gesunden Spendern erfolgreich. Bei den Spendern TX-3 und TX-6 konnte zu keinem Zeitpunkt ein Wachstum der isolierten Zellen beobachtet werden. Diese Wachstumsunfähigkeit schien spenderbedingt und nicht eine Konsequenz des verwendeten Antigens zu sein, da weder pp65- noch IE-1-spezifische Zellen expandiert werden konnten. Die Analyse der Spenderdaten führte zu keinem direkten Zusammenhang zwischen Alter, Geschlecht, Art der Immunsuppression, Zeit nach Transplantation und mangelndem Wachstum der isolierten Zellen (Tabelle 4).

Eine Erklärung für die mangelnde Expansionsfähigkeit der Zellen dieser Spender wäre eine allgemeine T-Zellinsuffizienz zum Zeitpunkt der Generierung. Dafür gab es aber keine Hinweise, da keiner der Spender reduzierte Mengen PBMCs im peripheren Blut aufwies oder unter opportunistischen Infektionen litt.

Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen in der isolierten Zellfraktion. Diese sind in der Lage über die Ausschüttung von inhibitorischen Substanzen wie Interleukin-10 sowie durch Zell-Zell Kontakt die spezifische Funktion und das Wachstum von T-Zellen negativ zu beeinflussen (9). Dadurch wird in der Regel eine erregerspezifische Immunantwort auf ein angemessenes Niveau begrenzt. Die übermäßige Aktivität von Tregs kann aber auch die Kontrolle viraler Infektionen verhindern. Bei Hepatitis B konnte eindeutig ein Zusammenhang zwischen Tregs und dem Schweregrad der Erkrankung festgestellt werden. So litten Patienten mit erhöhten T-reg Frequenzen im Blut und in der Leber unter schwereren Erkrankungen (144).

Des Weiteren könnte die mangelnde Expansion der isolierten Zellen durch das Vorhandensein von terminal differenzierten Effektor-T-Zellen erklärt werden. Diese werden oft in Transplantierten beschrieben und haben die Fähigkeit zur Expansion verloren, wohingegen sie noch in der Lage sind Effektorzytokine wie IFN- $\gamma$  zu produzieren (76, 141).

### 5.1.2 Funktion und Spezifität

Für die adoptive Immuntherapie ist nicht nur die Gewinnung ausreichender Zellmengen wichtig, sondern auch deren spezifische Funktion. Diese bestimmt maßgeblich den Therapieerfolg sowie die Sicherheit des Patienten. Ein endgültiger Beweis für die Effektivität und die Sicherheit der T-Zelllinien ist aber erst nach *in vivo*-Applikation möglich. Im Gegensatz zu Vakzinierungsstrategien kann der Nutzen und das Gefahrenpotenzial von T-Zelllinien durch Kombination verschiedener *in vitro*-Tests gut eingeschätzt werden (106). Das therapeutische Potenzial einer T-Zelllinie hängt von der Eigenschaft ab, spezifisch CMV-infizierte Zellen zu lysieren, sowie proinflammatorische Moleküle zu produzieren. Diese Eigenschaften können *in vitro* durch Zytotoxizitätstestungen und intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Färbungen überprüft werden.

Die von SOT-Patienten generierten T-Zelllinien wurden mittels dieser Tests auf ihre Spezifität und Funktion untersucht und mit den Linien von gesunden Probanden verglichen. Da die Linien von SOT-Patienten aus Gedächtniszellen generiert wurden, die unter dem Einfluss immunsuppressiver Substanzen standen, waren Einschränkungen in der Funktion oder Spezifität denkbar. Außerdem konnten vermehrt auftretende virale Reaktivierungen oder die Gegenwart antiviraler Substanzen einen negativen Einfluss haben. Des Weiteren ist die Entstehung von alloreaktiven T-Zellen im Patienten durch den ständigen Kontakt mit dem allogenen Transplantat denkbar. Diese könnten durch das verwendete Protokoll unspezifisch aktiviert und angereichert werden und bei Applikation zu GvHD oder Rejektionen führen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätstestungen belegen, dass alle aus transplantierten Spendern generierten Linien in der Lage waren, autologe mit CMV-Peptiden beladene Zielzellen spezifisch zu lysieren (Abbildung 12). Die spezifische Lyse war mit der von Linien aus gesunden Spendern vergleichbar. Des Weiteren zeigte keine der analysierten Linien eine signifikante Lyse von unbeladenen autologen oder allogenen Zielzellen, sodass nichts auf ein erhöhtes Risiko von GvHD oder der Abstoßung der allogenen Transplantate durch die T-Zelllinien hindeutet.

Die Analyse der spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion bestätigt diese Aussagen. Alle Linien produzierten nach spezifischer Stimulation IFN- $\gamma$ , während nach unspezifischer Stimulation kein IFN- $\gamma$  gebildet wurde. Interessanterweise korrelierte die Frequenz der IFN- $\gamma$ -produzierenden CTLs und Th-Lymphozyten nicht direkt mit der lytischen Aktivität der T-Zelllinien. Einige der analysierten Linien wiesen nur geringe Frequenzen an IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen auf, waren aber sehr effektiv in der Lage CMV-peptidbeladene Zielzellen zu lysieren. Diese Beobachtung wird durch die Gruppe um Sun et al. bestätigt. Diese konnten zeigen, dass die lytische Aktivität von EBV- und CMV-spezifischen T-Zellen nicht mit der Menge an produziertem IFN- $\gamma$  korrelieren muss (145). Außerdem zeigten Tetrameranalysen CMV-spezifischer T-Zellen eindeutig, dass nicht alle spezifischen T-Zellen in der Lage sind, nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen IFN- $\gamma$  zu produzieren (33, 143). Diese Beobachtungen betonen noch einmal die Wichtigkeit bei der Vorhersage der *in vivo*-Funktion von T-Zelllinien mehrere Tests zu kombinieren.

### 5.1.3 Persistenz

Die Langzeitkontrolle von latenten CMV-Infektionen ist eine kontinuierliche Herausforderung für die zelluläre Immunantwort. Durch virale Evasionsmutationen, Perioden mit niedrigem CMV-Antigentiter sowie der begrenzten Lebensspanne von T-Zellen ist die zelluläre Immunantwort gezwungen, sich ständig anzupassen. Die Gruppe um Riddell et al. konnte zeigen, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zwar die Hauptrolle in der Kontrolle von CMV-Infektionen spielen, aber nur die Gegenwart von Th-Lymphozyten einen lang anhaltenden Schutz ermöglichen (110, 138). Bei anderen chronischen viralen Erkrankungen wie Hepatitis C konnte Ähnliches beobachtet werden (146).

Die Bestimmung des Phänotyps der generierten T-Zelllinien ergab, dass alle Linien einen zum Teil geringen, aber eindeutig nachweisbaren Anteil an CD4<sup>+</sup>-Th-Lymphozyten aufwiesen (Abbildung 9). Ein Teil dieser Zellen produzierte IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit CMV-Peptidpools und kann somit als spezifisch und funktionell angesehen werden. Dies wurde zusätzlich durch das Epitopmapping bestätigt, bei dem in fast jeder Linie MHC-II-restringierte Epitope identifiziert wurden, welche nur von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden können (Daten nicht gezeigt). Der Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Th-Lymphozyten war bei Zelllinien von transplantierten Spendern oft geringer als bei Gesunden (Tabelle 8). Dies könnte ein Einfluss der kontinuierlichen Immunsuppression sein. Diese ist in der Lage die Differenzierung von T-Zellen zu beeinflussen oder die Menge an Th-Lymphozyten im

peripheren Blut zu reduzieren (147). Nichtsdestotrotz konnten die aus SOT-Patienten isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro* expandiert werden und es gibt keinen Hinweis darauf, dass sie nicht auch *in vivo* proliferieren sollten.

Ein weiterer Faktor, der den Langzeitschutz vor CMV-Infektionen negativ beeinflussen kann, ist die Fähigkeit von Viren zur Evasionsmutation. Ein weit verbreiteter Evasionsmechanismus ist der Austausch einer einzelnen Aminosäure innerhalb eines Epitops. Dies kann die spezifische Erkennung durch den T-Zellrezeptor verhindern, sodass T-Zellantworten gegen dieses Epitop unwirksam werden (137, 148). Darum ist es wichtig multispezifische T-Zellantworten gegen mehrere Epitope zu generieren (149, 150). Bei der Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptidpools eingesetzt. Diese beinhalten viele überlappende Einzelpeptide, die alle möglichen aus einem Antigen entstehenden Epitope bilden könnten (Abbildung 2). Darum ist mit Peptidpools die einfache Herstellung multispezifischer T-Zelllinien möglich.

Bei den meisten der hergestellten T-Zelllinien konnte mehr als eine Epitopspezifität identifiziert werden, wobei keine Unterschiede zwischen gesunden und transplantierten Spendern beobachtet wurde (Abbildung 14). Darum sollten sowohl die Linien aus Gesunden als auch aus Transplantierten gut auf Evasionsmutationen reagieren können und somit eine effektive Langzeitkontrolle von CMV-Infektionen ermöglichen.

Des Weiteren bestand die Möglichkeit eines negativen Einflusses der *in vitro*-Expansion auf die Funktion und Persistenz der T-Zelllinien. In der Literatur sind Fälle beschrieben, bei denen T-Zellen nach intensiver Expansion einen anergen Zustand einnehmen. Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage, spezifische Effektorfunktionen auszuführen oder gehen sogar in den aktivierungsinduzierten Zelltod (activation induced cell death) über (138, 151). Das Auftreten aneurer CMV-spezifischer T-Zellen wird oft in Älteren und Transplantierten beschrieben (136, 152-154). Diese Zellen besitzen einen terminalen Entwicklungsstatus und sind in ihrer Klonalität stark eingeschränkt. Ihr Entstehen wird auf massive Proliferation zurückgeführt, die durch vermehrte virale Reaktivierungen ausgelöst wird.

Bei der Analyse der Differenzierungsmarker von sechs T-Zelllinien wurde ein spätes Entwicklungsstadium festgestellt, was auf anerge Zellen hindeuten kann (Tabelle 9). Dieses späte Entwicklungsstadium ist aber auch bei funktionellen CMV-spezifischen T-Zellen von gesunden Personen beobachtet worden (155, 156). Darum ist die Bestimmung des Entwicklungsstadiums kein ausreichendes Kriterium, um anerge T-Zellen zu identifizieren.

Deshalb wurde zusätzlich die Klonalität der T-Zelllinien anhand der Bestimmung der T-Zellrezeptor Beta Varianz untersucht. Im Vergleich zu unselektionierten PBMCs war die Anzahl der TCR-V $\beta$ -Familien bei allen T-Zelllinien eingeschränkt (Abbildung 15). Nichtsdestotrotz waren alle T-Zelllinien multiklonal, da sie Zellen mehrerer TCR-V $\beta$ -Familien enthielten (Abbildung 16). Diese Ergebnisse deuten auf eine breite Reaktivität der T-Zellen hin. Das hohe lytische Potential und die antigenspezifische IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Zelllinien machen es unwahrscheinlich, dass die intensive *ex vivo*-Expansion zur Generierung von anergen T-Zellen führte.

## 5.2 Generierung von T-Zelllinien gegen andere virale Proteine

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es, die Herstellung von T-Zelllinien gegen andere virale Proteine als pp65 zu evaluieren. Über längere Zeit galt das Matrixprotein pp65 als das bedeutendste immunogene Antigen in der Bekämpfung von CMV-Infektionen (36, 157). Die Zahl der exprimierten Proteine ist bei CMV sehr hoch, und somit ist eine immunologische Reaktion gegen viele dieser Proteine denkbar. Diese Hypothese wurde kürzlich durch eine umfangreiche Studie bestätigt, bei der 33 gesunde CMV-seropositive Probanden auf spezifische T-Zellantworten gegen alle 213 CMV-Proteine untersucht wurden. Dabei konnten Antworten gegen 151 Proteine nachgewiesen werden, wobei einige häufiger immunogen waren als andere. Pp65 gehörte zu den immunogensten Proteinen, da eine pp65-spezifische T-Zellantwort in fast allen Probanden nachgewiesen werden konnte. Einige Probanden ohne Antwort gegen pp65, reagierten dafür jedoch gegen IE-1. Dieses Protein ist ebenfalls sehr immundominant, und IE-1-spezifische T-Zellen konnten schon zuvor häufig detektiert werden (7, 16, 35). Des Weiteren konnte vor kurzem bei SOT-Patienten nur eine direkte Korrelation zwischen IE-1-spezifischer, nicht aber pp65-spezifischer, T-Zellfunktion und dem Schutz vor CMV-Erkrankungen beobachtet werden (158). Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit aus jedem Spender T-Zelllinien gegen pp65 und IE-1 generiert und verglichen werden.

Aus allen gesunden und transplantierten Spendern, bei denen sich Zellen expandieren ließen, konnten pp65- und IE-1-spezifische T-Zelllinien generiert werden. Diese waren vom Phänotyp, dem lytischen Potenzial sowie der Eigenschaft IFN- $\gamma$  nach spezifischer Stimulation zu produzieren vergleichbar. Außerdem bestanden zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Epitopspezifitäten und der Klonalitäten.

Dies demonstriert die problemlose Generierbarkeit von pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien aus demselben Spender. Somit ist zukünftig, durch die Kombination von pp65- und IE-1-Peptidpools, die Herstellung von T-Zelllinien gegen beide Proteine möglich. Dies würde die Effizienz der T-Zelllinien stark erhöhen, da diese Linien noch besser in der Lage sind, sich an virale Evasionsmutationen anzupassen. Außerdem ist mit diesen Linien eine Bekämpfung von CMV in der frühen und späten viralen Entwicklungsphase möglich, da IE-1 bereits kurz nach der Infektion und pp65 erst nach 6-24 Stunden von der Wirtszelle exprimiert wird (18). Des Weiteren erhöht die Kombination von pp65- und IE-1-Peptidpools den Erfolg der T-Zellherstellung und weitet somit die Anwendbarkeit der adoptiven Immuntherapie auf eine größere Zahl von Patienten aus. So lassen sich CMV-spezifische T-Zelllinien aus Spendern generieren, die nur eine T-Zellantwort gegen eines der beiden Proteine aufweisen. Dies ist häufig der Fall, wie eine Analyse von pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellantworten in gesunden Spendern feststellte. Diese zeigte, dass 42% der Probanden nur auf pp65 und 25% nur auf IE-1 reagierten, während der Rest beide Spezifitäten besaß (35).

### **5.3 Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien zur klinischen Anwendung**

Der dritte Schwerpunkt dieser Arbeit war die Überführung des Herstellungsprotokolls in die GMP-Richtlinien sowie die klinische Anwendung der generierten T-Zelllinien.

#### **5.3.1 Übertragung in die GMP-Richtlinien**

##### Stimulation

Viele Herstellungsprotokolle verwenden für die spezifische Stimulation autologe oder transgene APCs in Kombination mit viralen Lysaten, rekombinanten Proteinen oder viralen Vektoren (109, 111, 112). All diese Verfahren sind aufgrund der mangelnden Biosicherheit nicht für die Herstellung zur klinischen Anwendung geeignet, da sie bakterielle oder virale Rückstände enthalten können. Der Einsatz von Einzelpeptiden oder Peptidpools zur spezifischen Stimulation ist hingegen im Hinblick auf die Biosicherheit unbedenklich, da diese synthetisch hergestellt werden und somit keine infektiösen Bestandteile enthalten.

## Arbeiten im geschlossenen System

Die Herstellung von T-Zelllinien für die klinische Anwendung findet unter hohen Sicherheitsauflagen statt. Dies soll eine Kontamination mit infektiösem oder allogenen Material verhindern, was eine Gefährdung für den Patienten darstellen könnte. Darum findet die Generierung in speziell dafür konzipierten Reinraumlaboren und unter Verwendung von Schutzbekleidung statt. Um die Gefahr der Kontamination weiter zu reduzieren, wäre die Übertragung des Herstellungsprozesses in ein komplett geschlossenes System mit definierten Zugängen sinnvoll. Das CliniMACS-System erlaubt die magnetische Isolierung von markierten Zellen innerhalb eines geschlossenen Systems. Diese Methode wird seit längerer Zeit zur Selektion von haemopoetischen Stammzellen eingesetzt, wurde aber auch schon für die Isolierung von Monozyten, dendritischen Zellen, NK-Zellen oder tetramermarkierten T-Zellen verwendet (116, 159-161). Eine Integration dieser Methode in unser Protokoll erschien ohne Probleme möglich.

Unter Verwendung des CliniMACS-Systems wurden CMV-spezifische Zellen aus zwei gesunden Stammzellspendern erfolgreich isoliert. Nach Angaben des Herstellers wurden  $1 \times 10^9$  PBMCs als Ausgangsmaterial eingesetzt. Durch die Isolierung kam es zu einem Zellverlust von 30,7% bzw. 48,9% (Tabelle 10). Dies ist vor allem auf die großen Toträume des verwendeten Beutel- und Schlauchsystems zurückzuführen. Diese entstehen, da das System für große Volumina konzipiert ist, wie sie bei der Isolierung von haemopoetischen Stammzellen auftreten. Dabei bleiben viele Zellen während der Isolierung an den großen Oberflächen der Beutel haften. Außerdem verbleibt bei jedem Transfer ein Teil der Zellsuspension in den langen Verbindungsschläuchen. So wird selbst vom Hersteller ein mittlerer Zellverlust von 35% angegeben (persönliches Gespräch).

Um diese hohen Verluste ausgleichen zu können, muss eine hohe Zellzahl zu Beginn der Isolierung eingesetzt werden. Dies ist aber nur bei der Isolierung aus gesunden Spendern möglich, da nur hier die Entnahme großer Zellmengen unbedenklich ist. Damit ist diese Methode auf die Behandlung von Patienten nach HSCT limitiert, weil bei diesen das Blut des gesunden Spenders zur T-Zellgenerierung eingesetzt wird. Zur Behandlung von SOT-Patienten muss das Blut des Organempfängers verwendet werden, was nur in kleinen Mengen zur Verfügung steht. Um für diese Patienten die Isolierung im geschlossenen System zu ermöglichen, müssen neue Systeme mit kleinen Volumina und reduzierten Toträumen entwickelt werden.

Eine weitere Problematik stellt die Kultivierung der isolierten Zellen im geschlossenen System dar. Zurzeit werden von mehreren Herstellern gasdurchlässige Beutelsysteme zur Kultivierung von T-Zellen angeboten. Keines dieser Systeme erwies sich als für die Expansion von T-Zellen geeignet, da in diesen Beuteln kultivierte T-Zellen gar kein oder nur geringes Wachstum zeigten (Daten nicht gezeigt). Dies lässt sich auf eine schlechte Gasdurchlässigkeit der Beutel oder die schlechte Oberflächenbeschaffenheit der Beutelinnenfläche zurückführen. Beide Möglichkeiten lassen sich aber weitestgehend ausschließen, da die Hersteller über geeignete Materialien und Erfahrungen verfügen, um dies zu gewährleisten. Außerdem ist die uneingeschränkte Kultivierung von LCLs in diesen Beuteln möglich (eigene Beobachtungen). Eine weitere Erklärung wäre das große Volumen der Beutel, was den Kontakt zwischen den T-Zellen bei geringen Zellzahlen, wie sie nach der Isolierung vorliegen, schwierig macht. Darum fand die Expansion der unter GMP-Richtlinien generierten T-Zelllinien in 24-Lochplatten statt, durch die eine größere räumliche Nähe und somit ein besserer Zell-Zell-Kontakt gewährleistet wird. Diese Technik wird zurzeit bei allen Protokollen zur klinischen Herstellung antigenspezifischer T-Zelllinien erfolgreich angewendet (102, 105, 106). Obwohl die Gefahr von mikrobiellen oder allogenen Kontaminationen durch abschließende Reinheitsuntersuchungen des Produktes ausgeschlossen werden können, wäre eine Kultivierung der Zellen im geschlossenen System wünschenswert. Dazu müssen neue Produkte mit verbesserten Eigenschaften entwickelt und getestet werden.

#### Auswahl des Serumzusatzes

Bei der Überführung des Protokolls in die GMP-Richtlinien ist die Auswahl eines geeigneten Serumzusatzes ein kritischer Punkt. Für die Kultivierung von Säugerzellen wird dem Medium ein gewisser Anteil an Serum zugesetzt. Dabei handelt es sich in der Regel um fötales Kälberserum (FKS). Dieses beinhaltet eine Vielzahl an Proteinen und Wachstumsfaktoren, die zur *in vitro*-Kultivierung von Zellen unabdingbar sind. Die Art der Inhaltsstoffe und deren Zusammensetzung ist noch nicht vollständig aufgeklärt und variiert zwischen unterschiedlichen Produktionschargen. Eine Verwendung von FKS gestaltet sich für die klinische Produktion als schwierig, da die Anwesenheit von gefährdenden Substanzen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann und eine Standardisierung aufgrund schwankender Zusammensetzungen nicht möglich ist. Außerdem kann es nach dem Einsatz von FKS bei der Infusion zu speziesbedingten Unverträglichkeiten kommen. Aus diesem Grund bieten viele

Hersteller serumfreie Medien mit synthetisch hergestellten Zusätzen in definierten Konzentrationen an. Diese erweisen sich aber bei der T-Zellkultivierung als wenig effizient (Daten nicht gezeigt). Alternativ kann für die klinische Produktion autologes Serum verwendet werden. Dessen Verwendung stellt keine Gefährdung für den Patienten dar, gewährleistet aber eine adäquate Kultivierung der Zellen (162). Für die Generierung von T-Zelllinien aus SOT-Patienten ist die Verwendung von autologem Serum jedoch nicht geeignet. Hier enthält das Serum große Mengen an immunsupprimierenden Substanzen, da es aus dem Blut des Empfängers gewonnen wird. Diese würden das Wachstum und die Funktion der hergestellten T-Zellen beeinträchtigen. Außerdem ist für die Gewinnung von autologem Serum eine größere Menge an Blut notwendig, die bei SOT-Patienten nicht zur Verfügung steht. Um unter GMP-Bedingungen T-Zelllinien aus SOT-Patienten zu generieren, sollte humanes AB-Serum als Mediumszusatz verwendet werden, da dies GMP-zertifiziert erhältlich ist und keine AB0-Unverträglichkeiten auslöst.

### 5.3.2 Klinische Anwendung

#### Eingesetzte Zellzahlen

Ein kritischer Punkt vor dem T-Zelltransfer war die Menge der einzusetzenden Zellen. Es sollten einerseits für den Erfolg ausreichende Zellzahlen eingesetzt werden, andererseits aber Nebenwirkungen durch Überdosierung verhindert werden. In vorangegangenen Studien wurden verschiedenste Zellzahlen in der immuntherapeutischen Behandlung von CMV-Komplikationen eingesetzt. Die Gruppe um Greenberg et al. setzte bei einer Studie bis zu  $4,5 \times 10^9$  T-Zellen/m<sup>2</sup> Körperoberfläche ein und erzielte damit einen guten prophylaktischen Effekt (101). Einsele et al. und Peggs et al. verabreichten  $10^7$  T-Zellen/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bzw.  $1 \times 10^5$  T-Zellen/kg und konnten auch damit therapeutische Erfolge verzeichnen (102, 103). Bei einer erst kürzlich durchgeführten Studie von Cobbold et al. wurden lediglich  $8,6 \times 10^3$  T-Zellen/kg wirkungsvoll eingesetzt (116). All diese Studien zeigen einen deutlichen Trend zum Einsatz immer geringerer Zellzahlen. Dies lässt sich auf neuere Erkenntnisse zurückführen, die darauf hindeuten, dass ein Therapieerfolg nicht ausschließlich von der Menge der infundierten T-Zellen abhängig ist. Andere Eigenschaften wie die antigenspezifische Aktivität, die Persistenz, die Expansion *in vivo* sowie die Migrationsfähigkeit der infundierten T-Zellen spielen ebenfalls für den Therapieerfolg eine wichtige Rolle (138). Des Weiteren können patientenspezifische Faktoren wie niedrige

Antigenlast oder geringe Mengen bereits vorhandener T-Zellen (Lymphopenie) den Therapieerfolg positiv beeinflussen (151, 163).

Die vor der Applikation durchgeführte Phänotypisierung zeigte, dass die T-Zelllinie sowohl aus CD8<sup>+</sup>- als auch aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestand (Tabelle 11). Somit sollte diese Linie in der Lage sein, durch die Hilfe der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vivo* zu expandieren und über längere Zeit zu persistieren. Des Weiteren war die T-Zelllinie in der Lage spezifisch beladene Zielzellen effizient zu lysieren und große Mengen IFN- $\gamma$  nach spezifischer Stimulation zu produzieren (Abbildung 17+ 18). Zusätzlich besaß der zu behandelnde Patient zum Zeitpunkt der Infusion eine geringe CMV-Viruslast (Abbildung 19) und verfügte über nur geringe Mengen an autologen T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse erschien ein Erfolg auch mit geringen Zellzahlen wahrscheinlich. Darum wurde der Patient lediglich mit drei Injektionen von insgesamt  $7,5 \times 10^4$  T-Zellen behandelt. Des Weiteren sollte durch den Transfer von geringen Zellzahlen das Risiko einer GvHD durch kontaminierende alloreaktive T-Zellen, wie sie bei haploidenten Transplantationen vermehrt auftreten, so gering wie möglich gehalten werden.

### Erfolg der Therapie

Durch den adoptiven T-Zelltransfer soll eine spezifische Immunantwort im Patienten generiert oder gestärkt werden, wodurch die lang anhaltende Kontrolle der Infektion möglich ist. Bei CMV-Infektionen kann der Erfolg der Therapie anhand der Reduktion der Viruslast und der Expansion der spezifischen T-Zellen im Blut des Patienten gemessen werden.

Alle in der Literatur beschriebenen Studien waren zum größten Teil erfolgreich. Bei Walter et al. konnte bei 11/14 Patienten die Expansion der infundierten Zellen beobachtet werden. Da aber lediglich CD8<sup>+</sup>-T-Zellen transferiert wurden, waren diese nur transient stabil (101). Bei Einsele et al. wurden CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen transferiert. Dies reduzierte bei allen Patienten signifikant die Viruslast und führte bei 6/7 Patienten zum schnellen Anstieg der im Blut enthaltenen CMV-spezifischen T-Zellen. Bei einem dieser 6 Patienten waren die Zellen aber nur über kurze Zeit stabil, weil sich keine CD4<sup>+</sup>-Immunantwort entwickelte. Somit war die Therapie bei 5/7 über längere Zeit erfolgreich (102). Peggs et al. behandelte 16 Patienten mit CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Bei allen verringerte sich daraufhin initial die CMV-Viruslast und nur 2 litten später unter viralen Reaktivierungen (103). Cobbold et al. infundierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei 9 Patienten. Bei allen konnte die Reduktion der Viruslast beobachtet werden. Die

Persistenz der T-Zellen wurde in dieser Studie aber nicht über einen längeren Zeitraum evaluiert (116).

Nach Infusion der unter GMP-Bedingungen hergestellten T-Zelllinie wurde der Erfolg der Therapie anhand der Viruslast und der spezifischen Zellen im Blut bestimmt. Die Viruslast blieb nach der Infusion auf einem niedrigen Niveau (Abbildung 19). Ob dies ein Effekt der T-Zellinfusion oder der kontinuierlichen antiviralen Therapie war, verbleibt unklar.

Die Frequenz der CMV-spezifischen T-Zellen im Blut des Patienten stieg nach der Infusion deutlich an (Tabelle 12). Leider konnte der Verlauf der Viruslast und der spezifischen T-Zellen nicht über einen längeren Zeitraum verfolgt werden, da der Patient aufgrund einer allgemeinen Immunsuffizienz an den Folgen einer Sepsis verstarb. Es kann aber angenommen werden, dass die Frequenz der CMV-spezifischen T-Zellen weiter gestiegen wäre, da in allen vorangegangenen Studien der Maximalwert zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wurde. Um dies aber eindeutig zu belegen und den Erfolg der Therapie abschätzen zu können, müssen weitere Patienten behandelt und über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

### Nebenwirkungen

Bei der adoptiven Immuntherapie können zwar Nebenwirkungen durch mikrobielle oder toxische Kontaminationen auftreten, die Entwicklung von GvHD stellt aber ein bedeutend höheres Risiko dar. Es kann durch verschiedene Umstände zur Entwicklung von GvHD kommen. So besteht die Möglichkeit, dass eine generierte T-Zelllinie Reste von alloreaktiven T-Zellen enthält. Diese sind gegen die HLA-Moleküle des Empfängers gerichtet und attackieren nach Infusion dessen Körperzellen. Des Weiteren können Kontaminationen in der T-Zelllinie zur Entstehung von alloreaktiven T-Zellen im Patienten führen.

Ein hoher NK-Zellanteil kann ebenfalls zu Problemen führen. Die lytische Aktivität von NK-Zellen ist unspezifisch gegen körperfremde Strukturen gerichtet und kann in der SOT an der Rejektion des Transplantats beteiligt sein (164). All diese Risiken lassen sich mit Hilfe von *in vitro*-Tests gut einschätzen. Andere lassen sich nicht *in vitro* beurteilen und müssen bei der Infusion in Kauf genommen werden. So können kreuzreaktive T-Zellen, die durch die Stimulation mit einem viralen Antigen entstehen, anschließend zu schweren Autoimmunreaktionen in bestimmten Geweben führen. Diese T-Zellen erkennen virale Antigene, die in ihrer Aminosäuresequenz mit körpereigenen Proteinen übereinstimmen. Ein Beispiel dafür ist die Coxsackievirus-induzierte Myokarditis (165). Bis heute wurden aber

keine Fälle von Kreuzreaktivität bei den verwendeten CMV-Proteinen pp65 und IE-1 beschrieben. Des Weiteren können große Mengen des zur Expansion der isolierten T-Zellen eingesetzten IL-2 zur Entstehung von GvHD führen können (166).

Trotz dieser Risiken kam es bis heute nur bei der Infusion von unselektionierten PBMCs zur Entwicklung schwerer Nebenwirkungen (135). Bei der Anwendung selektionierter T-Zelllinien wurden lediglich einige milde Fälle von GvHD beobachtet (101-103, 116).

Die unter GMP-Richtlinien hergestellte T-Zelllinie zeigte bei der Funktionstestung weder einen hohen NK-Zellanteil noch konnten bei der Zytotoxizitätstestung Anzeichen von unspezifischen Reaktivitäten beobachtet werden. Die Reinheitstestungen belegten zusätzlich, dass das Produkt frei von mikrobiellen und allogenen Kontaminationen war. Nach der Infusion der Zellen konnten ebenfalls zu keinem Zeitpunkt Anzeichen von GvHD beobachtet werden. Somit scheint die Behandlung zumindest bei der Verwendung von niedrigen Zellzahlen sicher und frei von Nebenwirkungen zu sein. Zukünftige klinische Anwendungen werden aber entscheiden müssen, ob dies auch für die Verabreichung von höheren Zellzahlen zutrifft.

#### **5.4 kritische Analyse der Arbeit und Ausblicke für die Zukunft**

Durch diese Arbeit wurde eine bestehende Methode zur Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien weiterentwickelt und verbessert. Die Methode beruht auf der Stimulation mit überlappenden Peptidpools, der Isolierung der reagierenden Zellen sowie deren anschließender Expansion. Dabei ist keine Kenntnis des HLA-Typs des Patienten oder ein Wissen um immundominante Epitope von Nöten.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Methode für die Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus immunsupprimierten Patienten genutzt werden kann. Dadurch ist es möglich, SOT-Patienten mit CMV-Komplikationen durch spezifische T-Zelllinien zu behandeln und somit die Anwendung der adoptiven Immuntherapie um ein Vielfaches zu erweitern. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit der neu entwickelten Methode die Herstellung von T-Zelllinien gegen mehrere virale Proteine ohne großen Aufwand möglich ist. So wurden durch die Stimulation mit pp65- und IE-1-Peptidpools funktionell vergleichbare Linien aus demselben Spender generiert. Der Einsatz von T-Zelllinien, die gegen mehrere virale Proteine und somit gegen eine größere Antigenbreite gerichtet sind, sollte die Effizienz der adoptiven Immuntherapie erhöhen. Abschließend wurde in dieser Arbeit die klinische Übertragbarkeit der Methode demonstriert.

Dazu wurden zwei T-Zelllinien unter GMP-Bedingungen generiert, wovon eine klinisch angewendet wurde.

Kritisch betrachtet führte die in dieser Arbeit beschriebene Behandlung eines Patienten durch CMV-spezifische T-Zellen nur zu sehr eingeschränkten Erkenntnissen. Aufgrund des frühen Versterbens des Patienten an einer Sepsis konnten die Verläufe der CMV-Viruslast sowie der spezifischen T-Zellen im Blut des Patienten nur kurzzeitig beobachtet werden. Dadurch waren keine Aussagen über den langzeitigen Erfolg sowie die Effizienz der Immuntherapie möglich. Es konnte aber gezeigt werden, dass zumindest die Verabreichung von geringen Mengen CMV-spezifischer T-Zellen sicher und frei von Nebenwirkungen ist. Um aber die Sicherheit bei der Verabreichung höherer Zellzahlen zu gewährleisten sowie die langfristige Effizienz der adoptiven Immuntherapie eindeutig zu belegen, müssen in der näheren Zukunft weitere Patienten in die Behandlung integriert werden. Dabei sollte einer statistisch relevanten Anzahl von Patienten T-Zellen in eskalierenden Dosen appliziert werden, um eine Korrelation zwischen Zellzahl, Nebenwirkungen und Therapieerfolg zu ermöglichen. Dafür wird es von uns als sinnvoll erachtet mit Zelldosen von  $10^4$ - $10^5$ /kg bei HSCT-Patienten bzw.  $10^5$ - $10^6$ /kg bei SOT-Patienten zu beginnen und diese bei gegebener viraler Persistenz schrittweise zu erhöhen.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Herstellung der Zelllinien unter GMP-Bedingungen. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode ist für eine uneingeschränkte Produktion von T-Zelllinien bis jetzt noch ungeeignet. Durch die sehr hohe benötigte Ausgangszellzahl ist diese Methode noch auf gesunde Spender beschränkt, sodass nur Patienten nach HSCT behandelt werden können. Des Weiteren stellt die Expansion der isolierten Zellen im offenen System ein erhöhtes Kontaminationsrisiko dar. Darum müssen zukünftig geschlossene Systeme für die Herstellung unter GMP-Bedingungen weiterentwickelt, sowie neue Verfahren in Erwägung gezogen werden. Konkret sollten dazu in Zusammenarbeit mit dem Hersteller Volumen und Toträume des CliniMACS-Systems durch konzeptionelle Modifikationen reduziert werden. Zusätzlich müssen neu auf den Markt kommende geschlossene T-Zellkultivierungssysteme auf ihre Effizienz und Kompatibilität mit dem CliniMACS-System überprüft werden.

Anschließend muss in einer klinischen Studie die Effizienz der Behandlung von SOT-Patienten mit CMV-spezifischen T-Zelllinien belegt werden, da alle betreffenden Daten dieser Arbeit aus *in vitro*-Untersuchungen stammen. Im Vergleich zur HSCT kann bei SOT-Patienten die T-Zellfunktion durch die kontinuierliche Immunsuppression eingeschränkt

werden, sodass häufigere Infusionen oder höhere Zelldosen von Nöten sein könnten, um eine langfristige Wirkung zu erzielen.

Ein weiteres zukünftiges Ziel ist die Evaluierung der Generierbarkeit von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus naiven Personen. Diese entwickeln nach der Transplantation eines CMV-infizierten Organs eine Primärinfektion, welche mit einem erhöhten Auftreten von CMV-Komplikationen verbunden ist (57). Darum wäre gerade bei diesen Patienten eine immuntherapeutische Behandlung klinisch sehr relevant. Ob dies mit dem hier vorgestellten Generierungsprotokoll möglich ist, bleibt fraglich. Die Gruppe um Rooney et al. versuchte in einer Studie EBV-spezifische T-Zelllinien aus seronegativen Personen zu generieren. Dafür stimulierten sie PBMCs der Spender wiederholt mit LCLs oder antigenbeladenen DCs. Dabei gelang die Herstellung mittels LCLs lediglich bei seronegativen Erwachsenen. Bei diesen konnte aber zum Teil EBV-DNA im Blut nachgewiesen werden, was auf vorherigen Kontakt mit EBV hindeutet. Bei der Stimulation mit antigenbeladenen DCs gelang die Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien ebenfalls bei einigen wenigen seronegativen Kindern, bei denen aufgrund des jungen Alters ein Kontakt mit EBV viel unwahrscheinlicher war (167). Eine Studie von Ho et al. beschreibt die Generierung von spezifischen T-Zelllinien gegen das Tumorantigen WT-1 aus gesunden Spendern. T-Zellen gegen dieses Autoantigen sind bei Gesunden sehr selten und kommen nur in minimalen Frequenzen vor. Auch hier führte die Verwendung von antigenbeladenen DCs zur erfolgreichen Etablierung spezifischer T-Zelllinien. Des Weiteren wirkte sich der Zusatz von IL-7 am dritten Tag nach Stimulation förderlich auf den Herstellungserfolg aus (168). Andere Arbeiten betonen den positiven Einfluss von IL-15, IL-12 oder IL-21 auf die Differenzierung und Expansion von T-Zellen (128, 169, 170). Darum sollte bei der Generierung von CMV-spezifischen T-Zellen aus naiven Personen eine Strategie entwickelt werden, die antigenbeladene DCs und den Zusatz von verschiedenen Zytokinen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung in Betracht zieht.

Des Weiteren soll zukünftig die Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode auf die Behandlung anderer Erkrankungen untersucht werden. Durch ihre Konzipierung ermöglicht die Methode die universelle Generierung von spezifischen T-Zelllinien gegen jedes denkbare Protein, solange dies antigene Eigenschaften besitzt. Die einzige Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz, sodass überlappende Peptidpools hergestellt werden können. Durch die schnelle, einfache und effiziente Generierung von T-Zelllinien mit unterschiedlichster Spezifität können mit dieser Methode andere aufwendigere Protokolle ersetzt werden. So würden bereits bestehende immuntherapeutische Strategien zur

Behandlung von viralen Infektionen durch EBV, HIV oder Adenovirus erheblich erleichtert. Des Weiteren könnten neue Strategien zur Behandlung von Tumoren entwickelt werden. Lediglich ein Beispiel dafür wäre die Behandlung des Papillomavirus-vermittelten Zervixkarzinoms. Während ein neu entwickelter Impfstoff seit kurzem prophylaktische Anwendung findet, beschäftigen sich therapeutische Ansätze unter anderem mit der Generierung einer spezifischen T-Zellantwort gegen die viralen Onkogene E6 und E7 (171, 172). Mit der neu entwickelten Methode wäre die Herstellung von E6/E7-spezifischen T-Zelllinien zur Behandlung etablierter Zervixkarzinome wahrscheinlich möglich. Dies macht das viel versprechende Potenzial der neu entwickelten Methode deutlich und erlaubt das Erschließen neuer Gebiete für den adoptiven T-Zelltransfer. Damit soll zukünftig eine bessere Behandlung von Erkrankungen und somit eine bessere medizinische Versorgung für den Patienten gewährleistet sein.