

2. Ziele der Arbeit und Studiendesign

Die vorliegende Arbeit entstand aus dem Bedürfnis, bestehende Strategien zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zelllinien weiterzuentwickeln und in die klinische Praxis zu überführen. Dies soll dazu beitragen, die Behandlung mittels adoptiver Immuntherapie zu erleichtern und für ein breites Patientenspektrum zugänglich zu machen. Es wurde CMV als Modell gewählt, um eine optimale Generierungsmethode zur Herstellung spezifischer T-Zelllinien zu etablieren, die dann auf weitere Zielstellungen übertragen werden kann.

Das in den Vorarbeiten beschriebene Protokoll stellt eine eindeutige Verbesserung bisheriger Generierungsmethoden dar. Trotzdem erfüllt es noch nicht alle an ein optimales Protokoll gestellten Anforderungen. So ist noch unklar, ob sich das Protokoll für eine Generierung von T-Zelllinien aus immunsupprimierten Patienten eignet. Dieser Punkt ist von entscheidender Wichtigkeit, da dies die Anzahl der zu behandelnden Personen um eine Vielzahl erweitern würde. Gerade nach SOT besteht ein zunehmender Bedarf an spezifischen T-Zellen zur Behandlung von CMV-Erkrankungen. Darum beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung dieses Aspektes. Zusätzlich soll evaluiert werden, ob sich mit Hilfe des entwickelten Protokolls vergleichbare T-Zelllinien gegen mehrere CMV-Antigene aus demselben Spender generieren lassen. Diese Erkenntnis soll in der Praxis die Herstellung von T-Zelllinien gegen mehrere immundominante Proteine erlauben und dadurch deren Multispezifität erhöhen.

Zur Klärung dieser Fragen wurde ein Arbeitsplan entworfen (Abbildung 4).

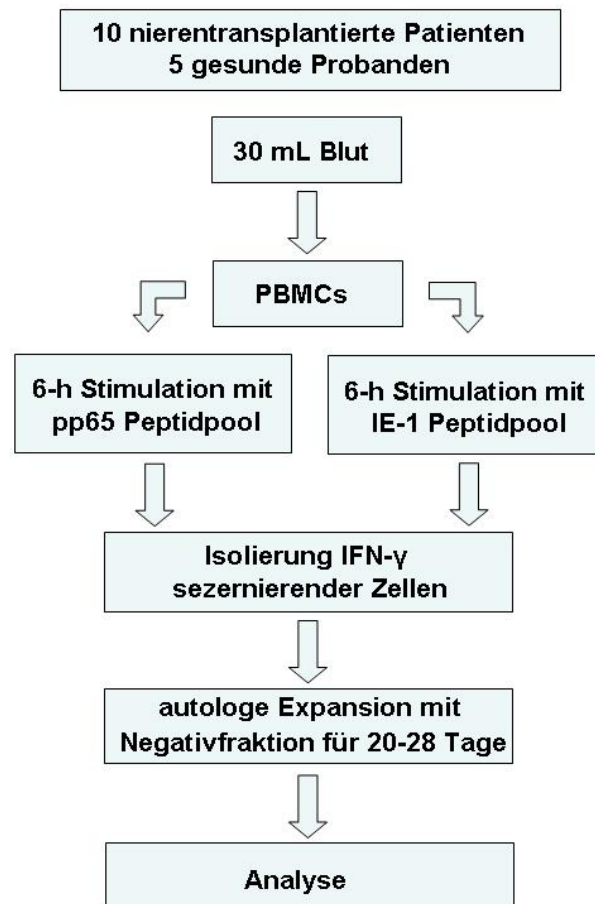


Abb. 4: Arbeitsplan

Es sollen CMV-spezifische T-Zelllinien aus 10 nierentransplantierten Patienten sowie 5 gesunden Spendern generiert werden. Für die Generierung sollen lediglich 30 ml Blut als Ausgangsmaterial verwendet werden, da nur die Entnahme einer geringen Menge bei SOT-Patienten vertretbar ist. Das Ausgangsmaterial wird gleichmäßig geteilt und mit pp65- oder IE-1-Peptidpools stimuliert. Anschließend erfolgt die Isolierung der IFN- γ -sezernierenden Zellen mittels Antikörpermarkierung und anschließender MACS-Separation. Für die Expansion der positiv isolierten Zellen wird die radioaktiv bestrahlte Negativfraktion als Feeder eingesetzt. Nach 20-28 Tagen *in vitro*-Kultivierung werden die generierten T-Zelllinien analysiert, wobei besonderer Wert auf Wachstum, Phänotyp, Antigenpezifität und Klonalität gelegt wird. Anschließend werden die Eigenschaften von pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Patienten, sowie die Linien von transplantierten und gesunden Spendern miteinander verglichen.

Um die angestrebten Ziele zu erreichen, müssen im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Lassen sich trotz medikamentöser Immunsuppression CMV-spezifische T-Zellen im Blut von SOT-Patienten aktivieren?
- 2) Genügt diese Aktivierung für eine Isolierung mittels INF- γ Markierung?
- 3) Können aus der geringen Menge Blut genügend spezifische Zellen isoliert werden?
- 4) Genügt eine einmalige autologe Stimulation, um isolierte Zellen in genügendem Maße zu expandieren?
- 5) Können aus demselben Spender sowohl pp65-als auch IE-1-spezifische T-Zelllinien generiert werden und sind diese in ihrer Funktion vergleichbar?
- 6) Hat die medikamentöse Immunsuppression einen Einfluss auf die Funktion und Eigenschaften der fertigen Linien?
- 7) Lässt sich die Herstellungsmethode in die klinische Praxis übertragen, und lassen sich damit CMV-spezifische T-Zelllinien unter GMP-Bedingungen generieren?
- 8) Führen die unter GMP-Bedingungen generierten T-Zelllinien *in vivo* zu Nebenwirkungen wie GvHD?
- 9) Zeigen die unter GMP-Bedingungen hergestellten Linien *in vivo* therapeutische Wirkung?