

4. Ergebnisse

4.1 Generierung antigenspezifischer T-Zelllinien aus SOT-Patienten

4.1.1 Analyse der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellfrequenz im peripheren Blut

Die Grundlage des Herstellungsprozesses ist die Isolierung und Expansion IFN- γ -sezernierender antigenspezifischer Zellen. Darum hängt der Erfolg des Protokolls maßgeblich von der Existenz dieser Zellen im peripheren Blut, sowie deren Aktivierbarkeit durch einen spezifischen Stimulus ab. Daher wurden vor der Isolierung alle transplantierten (n=10) und alle gesunden (n=5) Spender auf die Existenz von pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut untersucht. Dazu wurde nach Stimulation mit pp65- oder IE-1-Peptidpools die Frequenz IFN- γ -sezernierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 6).

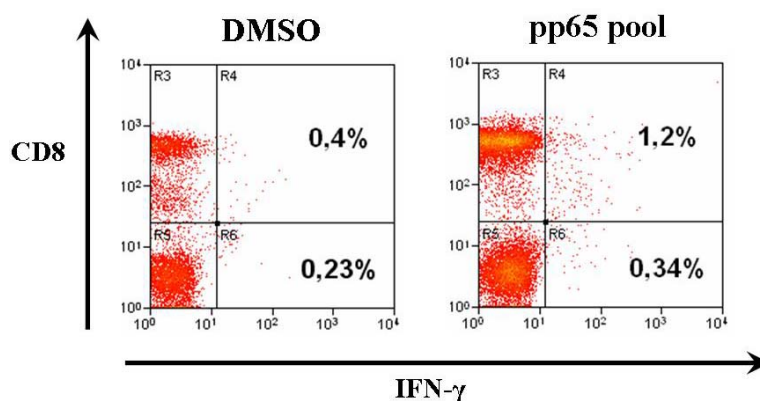


Abb. 6: Detektion antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut

Die Abbildung zeigt repräsentativ die Bestimmung der pp65-spezifischen T-Zellfrequenz im Blut. Dazu wurden die PBMCs des Spenders mit pp65-Peptidpool oder DMSO stimuliert. Anschließend wurden IFN- γ -sezernierende Zellen mit Hilfe des IFN- γ -Secretionsassays markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Dotplots zeigen den prozentualen Anteil der IFN- γ -sezernierenden CD8⁺- und CD8⁻-T-Zellen bezogen auf die Gesamtmenge der im Blut enthaltenen CD3⁺-T-Zellen.

In allen Spendern konnten zum Zeitpunkt der Generierung eindeutig pp65- und IE-1-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Diese setzten sich sowohl aus CD3⁺/CD8⁺ als auch aus CD3⁺/CD8⁻-T-Lymphozyten zusammen (Tabelle 7). Der Vergleich der Mediane zeigte, dass transplantierte Spender eine Tendenz zu höheren Anteilen CMV-spezifischer Zellen im peripheren Blut hatten (Abbildung 7).

Bei Spender TX-2 konnte als einziges CMV-DNA zum Zeitpunkt der Generierung im peripheren Blut nachgewiesen werden. Trotz alledem wurden keine klinischen Anzeichen einer CMV-Infektion beobachtet. Dies deutet auf eine asymptomatische CMV-Reaktivierung zum Zeitpunkt der Analyse hin. Reaktivierungen sind mit erhöhten Frequenzen spezifischer T-Zellen im Blut verbunden. So wies auch dieser Spender ungewöhnlich hohe CMV-spezifische T-Zellfrequenzen auf (pp65: 8,0%; IE-1: 1,3%). Damit es bei der Berechnung der Mediane zu keiner Verfälschung kommt, wurde der Spender TX-2 bei der Berechnung ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden die Frequenzen der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellen jedes Spenders miteinander verglichen. Dabei ergaben sich nur geringfügige Unterschiede, die sich bei Anwendung des nichtparametrischen Wilcoxontests als nicht signifikant herausstellten ($p=0,27-0,89$) (Abbildung 7).

Tabelle 7: Individuelle Frequenz antigenspezifischer T-Zellen

Spender	pp65		IE-1	
	CD8 ⁺	CD8 ⁻	CD8 ⁺	CD8 ⁻
H-1	0,40	0,20	0,40	0,20
H-2	0,12	0,22	0,14	0,22
H-3	0,80	0,40	0,30	0,40
H-4	0,11	0,01	0,11	0,01
H-5	0,40	0,20	0,20	0,20
TX-1	0,18	0,52	0,24	0,40
TX-2*	0,80*	0,50*	8,00*	0,05*
TX-3	0,10	0,12	0,11	0,11
TX-4	0,78	0,02	0,32	0,31
TX-5	0,14	0,26	0,09	0,15
TX-6	0,10	0,30	0,10	0,30
TX-7	1,80	0,10	0,25	0,35
TX-8	6,10	0,40	0,70	0,20
TX-9	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
TX-10	1,10	2,20	0,90	1,00

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Frequenzen IFN- γ -produzierender T-Zellen im Blut von allen gesunden und transplantierten Spendern. Die Werte sind auf die Gesamtmenge der CD3⁺-T-Zellen bezogen und nach Abzug des Hintergrundes (DMSO) dargestellt.

*Tx-2 wurde aufgrund einer asymptomatischen Reaktivierung bei der Berechnung der Mediane nicht berücksichtigt

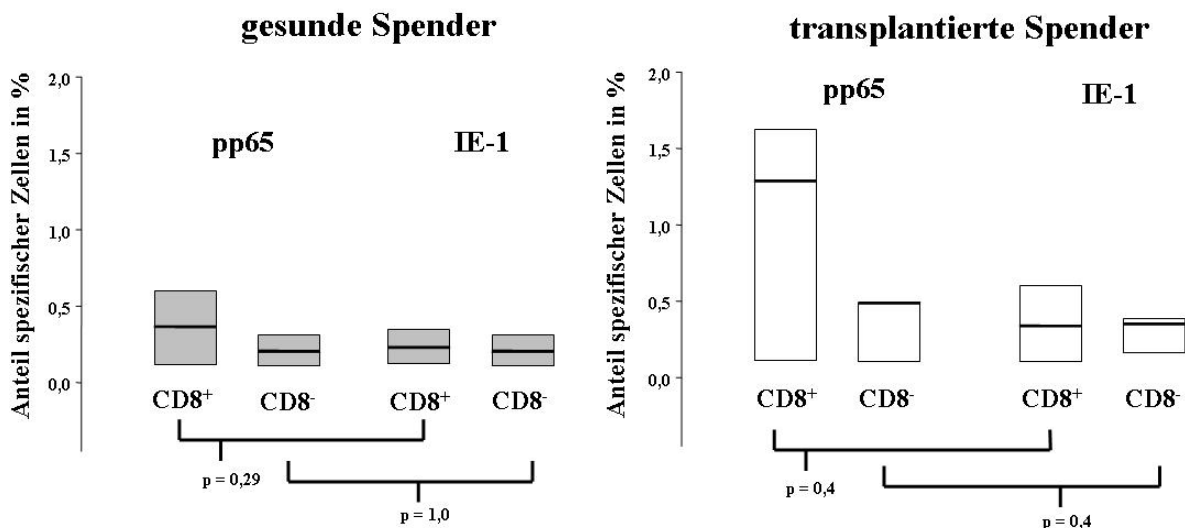


Abb. 7: Keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ ⁺-Zellen im peripheren Blut

Die Abbildung zeigt die Frequenz der IFN- γ ⁺/CD8⁺- und IFN- γ ⁺/CD8⁻-T-Zellen im peripheren Blut von gesunden und transplantierten Spendern bezogen auf die Gesamtmenge der CD3⁺-T-Zellen. Der Median ist durch einen schwarzen Querbalken angezeigt. Bei Spender TX-2 bestand zum Zeitpunkt der T-Zellherstellung der Verdacht einer aktiven CMV-Infektion. Er wurde deshalb für die Berechnung des Medianes ausgeschlossen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxontests überprüft und durch einen p-Wert von < 0,05 definiert. Es konnten weder signifikante Unterschiede zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders, noch zwischen der gesunden und der transplantierten Gruppe beobachtet werden.

4.1.2 Isolierung und Expansion der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellen

Die Absolutmenge antigenspezifischer T-Zellen, die mit Hilfe des Protokolls isoliert werden können, ist durch den Anteil dieser Zellen im peripheren Blut sowie der Menge des eingesetzten Ausgangsmaterials bedingt. Bei SOT-Patienten ist nur die Entnahme einer geringen Menge Blutes praktikabel. Somit ist das Ausgangsmaterial bei diesen Personen begrenzt. Um späteren klinischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde für die Generierung der T-Zelllinien nur 30 ml Blut, unabhängig der darin enthaltenen Menge spezifischer T-Zellen, verwendet. Die daraus mittels Dichtegradienten isolierten PBMCs wurden gleichmäßig geteilt, und je eine Hälfte wurde zur Herstellung von pp65- oder IE-1-spezifischen Linien verwendet. Bei gesunden Spendern wurden durchschnittlich $1,8 \times 10^7$ PBMCs für die Generierung einer Zelllinie eingesetzt, während es bei transplantierten Spendern $1,9 \times 10^7$ waren. Die Anzahl der daraus isolierten IFN- γ -sezernierenden Zellen lag je nach Spender zwischen $1-3 \times 10^5$.

Die isolierten Zellen wurden unter einmaliger Verwendung der bestrahlten Negativfraktion als Feeder expandiert. Dabei konnten die Zelllinien von 5/5 Gesunden und 8/10

Transplantierten auf mindestens $2,5 \times 10^7$ Zellen expandiert werden. Die isolierten Zellen von Spender TX-3 und TX-6 zeigten weder in der frühen noch der späten Kultivierungsphase Anzeichen von Wachstum.

Die Bestimmung der Wachstumskinetiken und der Expansionsraten geschah unter Ausschluss von Spender TX-3 und TX-6. Die Wachstumskinetiken der Zelllinien unterschieden sich zwischen gesunden und transplantierten Spendern. Zellen von transplantierten Spendern zeigten schnelleres Wachstum in der frühen Kultivierungsphase und erreichten nach 2 Wochen eine durchschnittliche Zellzahl von $1,2 \times 10^8$, während Linien von gesunden zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich $3,4 \times 10^7$ Zellen aufwiesen. 3 Wochen nach der *in vitro*-Kultivierung glichen sich diese Unterschiede aber an und sowohl Linien von Gesunden als auch von Transplantierten erreichten eine durchschnittliche Zellzahl von $1,7 \times 10^8$. Da das Ausgangsmaterial je nach Spender $1-3 \times 10^7$ PBMCs betrug, wurden die Expansionsraten der Zelllinien berechnet. (Abbildung 8). Die Expansionsraten aller Zelllinien betrugen nach 3 Wochen 10-11-mal der Zahl der eingesetzten unselektionierten Ausgangszellen. Dabei konnten während der gesamten Kultivierung keine signifikanten Unterschiede zwischen pp65- oder IE-1-spezifischen Zelllinien beobachtet werden ($p=0,18-0,69$).

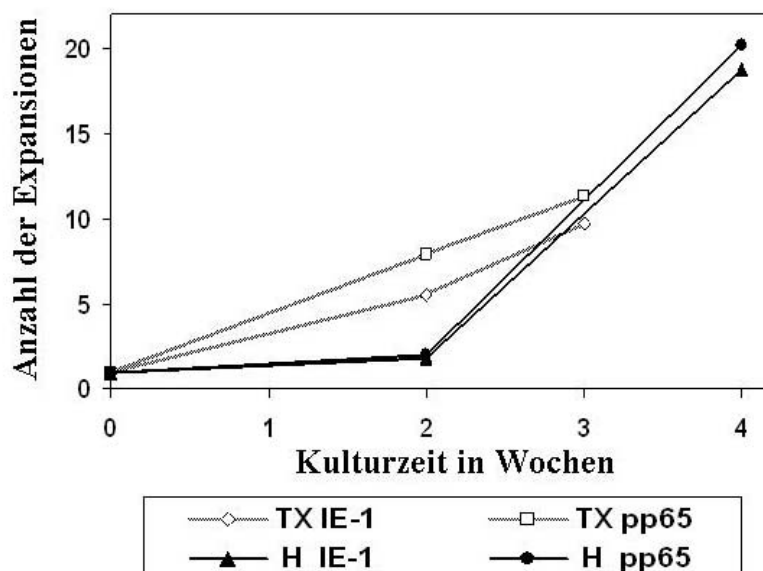


Abb. 8: Expansionsraten der T-Zelllinien

Die Abbildung zeigt die mittleren Expansionsraten aller wachsenden Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-Kultivierung. Es sind pp65- und IE-1-spezifische T-Zelllinien von gesunden Spendern und von transplantierten Spendern dargestellt. Die Expansionsraten wurden in Bezug zur jeweils eingesetzten unselektionierten Ausgangszellzahl berechnet.

4.1.3 Phänotyp der Zelllinien

Die Zellen wurden mittels Oberflächenfärbungen und anschließender durchflusszytometrischer Analyse phänotypisiert. Die Zelllinien aller Spender bestanden zum größten Teil aus CD3⁺-T-Zellen (83-100%) und nur zu einem geringen Teil aus NK-Zellen (0-17%) (Abbildung 9). Die Bestimmung des NK-Zellanteils ist für die Charakterisierung der Zelllinien von entscheidender Bedeutung, da diese ebenfalls nach kurzzeitiger Stimulation IFN- γ sezernieren und durch den IFN- γ -Sekretionsassay angereichert werden können.

Zusätzlich wurden die CD3⁺-T-Zellen nach den Oberflächenmarkern CD8⁺ und CD4⁺ subtypisiert. Bei immuntherapeutischen Ansätzen ist das Zusammenspiel von CD8⁺- und CD4⁺-Lymphozyten von entscheidender Wichtigkeit, um lang anhaltende Immunität zu ermöglichen. Die Zelllinien aller Spender bestanden größtenteils aus CD8⁺-Zellen. Der Anteil der CD4⁺-T-Zellen war bei Linien von gesunden Spendern in 8/10 Fällen größer als 5%. Bei transplantierten Spendern hingegen war dies lediglich bei 8/16 Linien der Fall (Abbildung 9). Dieser Trend konnte aber nicht statistisch verifiziert werden ($p=0,6$). Des Weiteren bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen pp65- oder IE-1-spezifischen Zelllinien ($p=0,16-0,5$).

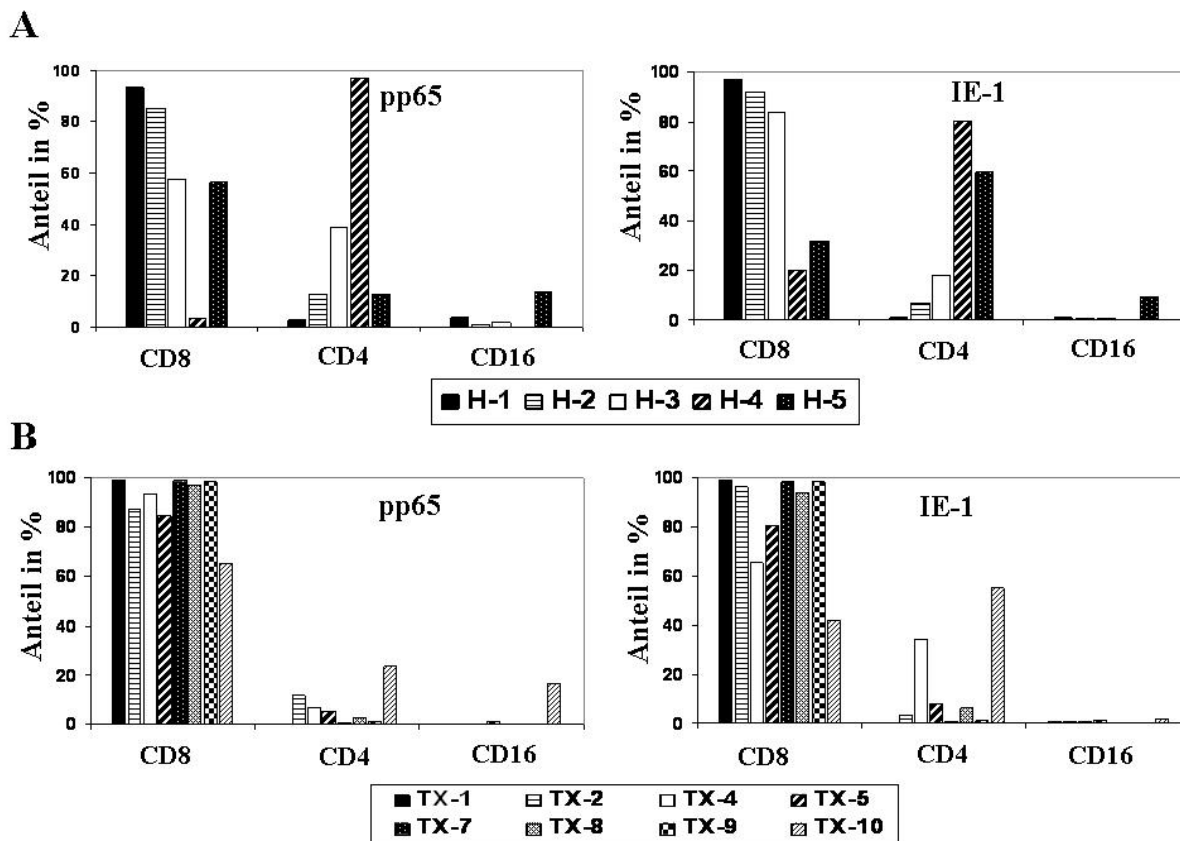


Abb. 9: Vergleichbarer Phänotyp

Die Abbildung zeigt die individuellen Phänotypen aller wachsenden T-Zelllinien. Die Bestimmung erfolgte durch Analyse der Oberflächenstrukturen mittels Durchflusszytometrie. Die Anteile von $CD4^+$ -T-Zellen ($CD3^+/CD4^+$), $CD8^+$ -T-Zellen ($CD3^+/CD8^+$) und $CD16^+$ -NK-Zellen ($CD3^+/CD16^+$) für Linien von gesunden (A) und transplantierten Spendern (B) sind für pp65 und IE-1 dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Zellen im Life Gate. Es konnten weder signifikante Unterschiede zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders, noch zwischen der gesunden und der transplantierten Gruppe beobachtet werden.

4.1.4 *In vitro*-Funktion und Antigenpezifität

Der erwünschte Effekt von adoptiv transferierten T-Zellen ist die Etablierung einer langfristigen Immunität gegen CMV. Dies ist nur durch die spezifische Erkennung infizierter Zellen und deren Bekämpfung möglich. Mittel der Bekämpfung sind die direkte Lyse der infizierten Zelle und die Sezernierung von antiviralen oder proinflammatorischen Molekülen. Im Gegensatz zu Vakzinierungsstrategien, bei denen T-Zellantworten *in vivo* generiert werden, lassen sich diese Eigenschaften bei *in vitro*-generierten T-Zelllinien vor der Infusion qualitativ und quantitativ bestimmen.

Dazu wurden die Zelllinien nach antigenspezifischer Stimulation auf den Anteil $IFN-\gamma$ -produzierender Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. $IFN-\gamma$ ist ein Zytokin, was

antivirale Eigenschaften besitzt und dessen Produktion als Marker einer proinflammatorischen Immunantwort gilt.

Zur antigenspezifischen Stimulation wurden autologe LCLs eingesetzt, die mit pp65- oder IE-1-Peptidpools beladen wurden. Das Gros der IFN- γ -produzierenden Zellen waren CD8⁺-Zellen, die auch den Hauptbestandteil in den T-Zelllinien bildeten. Damit die Funktion der Th-Lymphozyten besser erfasst werden konnte, wurde der Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen nicht auf alle CD3⁺-T-Zellen, sondern separat auf die CD3⁺CD8⁺- bzw. CD3⁺CD8⁻-Subpopulationen bezogen. Dabei wurden CD8⁻-Zellen, die zuvor auf CD3 gegatet wurden, als Th-Lymphozyten angesehen (Abbildung 10).

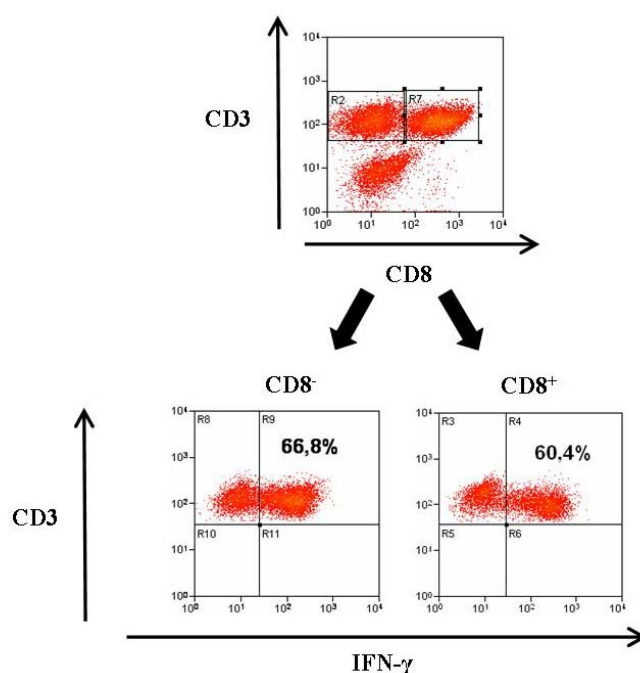


Abb. 10: Strategie zur Analyse der IFN- γ Produktion

Die Abbildung zeigt die Analysestrategie zur Bestimmung der IFN- γ -produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie und elektronischem Gating. Dargestellt ist repräsentativ eine pp65-T-Zelllinie nach spezifischer Stimulation. Der obere Dotplot zeigt die Auftrennung von Gesamtlymphozyten nach den Oberflächenmarkern CD3 und CD8. In den unteren Dotplots können CD8⁻- und CD8⁺-T-Lymphozyten separat auf ihren Anteil an IFN- γ -produzierenden Zellen untersucht werden.

Nach antigenspezifischer Stimulation konnte die IFN- γ -Produktion der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen bei 10/10 Linien von Gesunden und bei 15/16 Linien von Transplantierten nachgewiesen werden. Der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD3⁺CD8⁻-T-Zellen lag aber nur bei 7/10 Gesunden und 10/16 Transplantierten über 5% (Tabelle 8). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders

(Abbildung 11) und zwischen der gesunden und der transplantierten Gruppe beobachtet werden ($p=0,22-0,89$).

Tabelle 8: Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen

Spender	pp65		IE-1	
	CD8 ⁺	CD8 ⁻	CD8 ⁺	CD8 ⁻
H-1	61,4	42,5	15,7	18,2
H-2	42,8	6,5	7,8	0,4
H-3	55,5	5,3	55,8	6,6
H-4	11,0	71,4	36,8	43,5
H-5	13,9	0,6	13,3	4,6
TX-1	64,9	4,7	39,3	0,0
TX-2	52,7	7,8	53,1	9,0
TX-4	35,7	5,8	24,0	3,1
TX-5	57,8	14,6	47,9	4,0
TX-7	3,5	12,7	17,9	2,1
TX-8	35,5	11,0	77,7	25,1
TX-9	0,0	2,3	24,8	5,2
TX-10	19,5	30,6	70,9	58,0

Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der IFN- γ -produzierenden CD3⁺/CD8⁻- und CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten nach Abzug des Hintergrundes (DMSO). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtmenge der CD3⁺/CD8⁻- bzw. CD3⁺/CD8⁺-Zellen. Die Zelllinien wurden mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung durchflusszytometrisch analysiert.

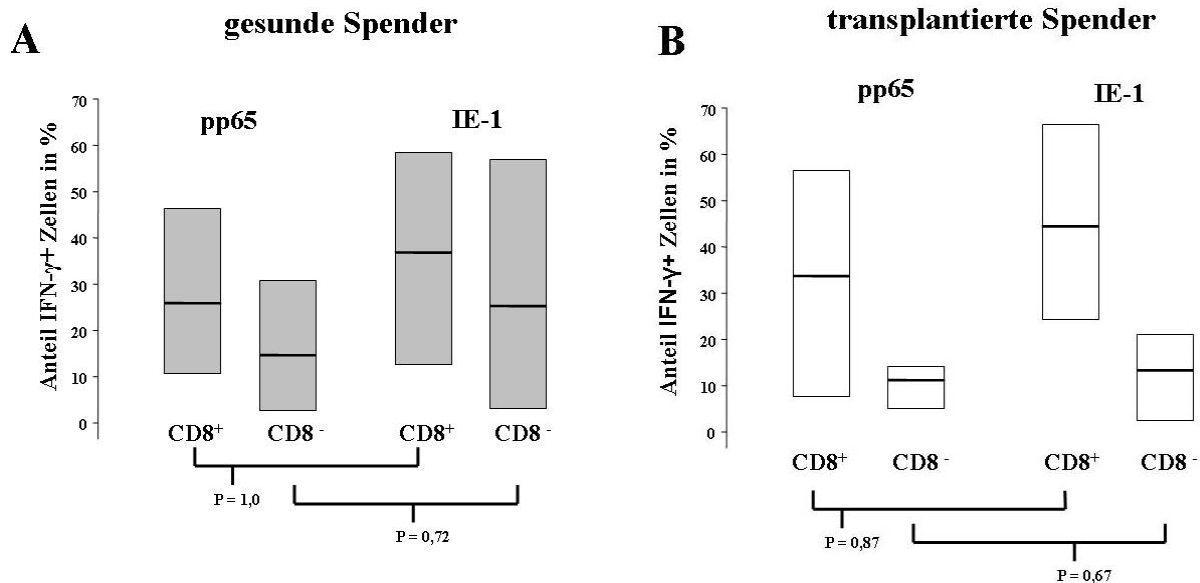


Abb. 11: Keine signifikanten Unterschiede in der IFN- γ Produktion

Die Abbildung zeigt den Anteil IFN- γ -produzierender CD8⁺/CD8⁻- und CD3⁺/CD8⁻-Lymphozyten in den T-Zelllinien von gesunden (A) und transplantierten Spendern (B). Der Median ist durch einen schwarzen Querbalken angezeigt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxontests überprüft und durch einen p-Wert von < 0,05 definiert. Es konnten weder signifikanten Unterschiede zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders, noch zwischen Linien aus gesunden und transplantierten Spendern beobachtet werden.

Anschließend wurden die T-Zelllinien auf ihre Antigen-spezifität mittels Zytotoxizitätstestung untersucht. Eine T-Zelllinie kann als funktionell spezifisch betrachtet werden, wenn sie in der Lage ist, autologe CMV-infizierte Zielzellen zu lysieren, aber autologe nichtinfizierte Zellen sowie allogene Strukturen (wie ein Transplantat) zu verschonen. Es wurden autologe LCLs, die mit pp65/IE-1-Peptidpools beladen waren, stellvertretend für infizierte Zielzellen eingesetzt. Autologe LCLs, die mit irrelevanten Peptiden beladen waren, repräsentierten nichtinfizierte Zellen. Allogene Strukturen wurden durch allogene LCLs repräsentiert. Diese wurden für jeden Spender individuell aus einer Zellbank (n=10) ausgewählt, wobei auf eine maximale HLA-Inkompatibilität geachtet wurde.

Alle generierten T-Zelllinien zeigten eine dosisabhängige Lyse von autologen mit Peptidpools beladenen LCLs (Abbildung 12 A). Die mittlere Lyse dieser spezifischen Zielzellen lag bei einer Dosis von 20 T-Zellen pro Zielzelle für Linien von gesunden Probanden bei 58,5% mit einer Bandbreite von 18-100% für pp65 und von 39-100% für IE-1. T-Zelllinien von transplantierten Spendern zeigten bei dieser Dosis eine mittlere Lyse von 63,5% mit einer Bandbreite für pp65 von 25-100% und für IE-1 von 19-100% (Abbildung 12 B). Im Gegensatz dazu lag die mittlere Lyse von autologen und allogenen unspezifischen Zielzellen unter 6% mit einer Bandbreite von 0-15%. Zusätzlich wurde die Lyse der NK-Zell-sensitiven

K-562-Zelllinie untersucht. Diese wurde zu 3-13% durch die T-Zelllinien lysiert. Beim Vergleich der lytischen Aktivität von pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,1-0,72$).

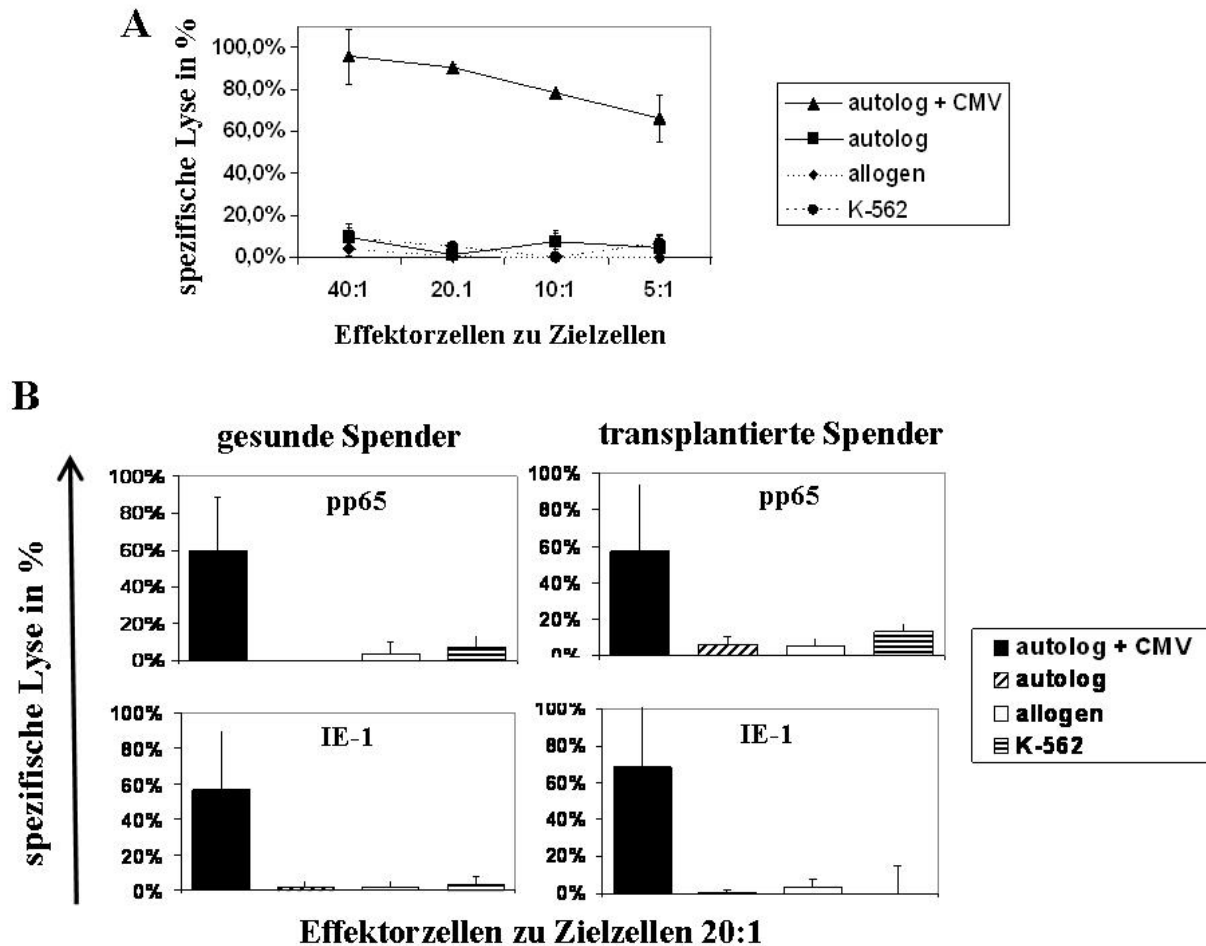


Abb. 12: Vergleichbare Antigen-spezifität

Die antigenspezifische Zelllyse wurde mittels Zytotoxizitätstestung bestimmt. Fluoreszenzgefärbte Zielzellen wurden mit fallenden Dosen von T-Zellen inkubiert. Autologe LCLs, die mit pp65- oder IE-1-Peptidpools beladen waren (autolog + CMV) wurden als CMV-infizierte Zellen eingesetzt, während autologe LCLs, die mit irrelevanten Peptiden beladen waren (autolog) nichtinfizierte Zellen darstellten. Allogene LCLs aus einer Zellbank (allogen) und NK-Zell-sensitive K-562-Zellen (K-562) wurden ebenfalls untersucht. Die Analyse einer repräsentativen T-Zelllinie ist in (A) gezeigt. Das Diagramm zeigt den Anteil der lysierten Zielzellen bei fallenden Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen. Weiterhin ist die mittlere Lyse der Zielzellen bei einem Verhältnis von 20 zu 1 für pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien in (B) dargestellt. Die linken Diagramme zeigen Linien aus gesunden, die rechten aus transplantierten Spendern. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders, oder zwischen Linien aus gesunden und transplantierten Spendern beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass alle T-Zelllinien von gesunden und von transplantierten Spendern die Eigenschaft besaßen, IFN- γ nach spezifischer Stimulation zu produzieren und CMV-infizierte Zielzellen zu lysieren. Eine unspezifische Stimulation löste keine dieser Funktionen aus. Dies belegt die Spezifität und Funktionalität der aus gesunden und transplantierten Spendern hergestellten T-Zelllinien.

4.1.5 Differenzierungsstatus

Der Differenzierungsstatus antigenspezifischer T-Zellen gibt Auskunft über ihren Entwicklungsstand. Dieser ist bei der Generierung von antigenspezifischen T-Zelllinien von Bedeutung, da spät differenzierte Zellen schneller das Ende ihrer Lebensspanne erreichen können und somit nach Infusion nur transienten Schutz gewähren. Es wurden exemplarisch die Zelllinien von 3 gesunden und von 3 transplantierten Spendern auf den Differenzierungsgrad der CD8⁺-T-Zellen untersucht. Dazu wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD27, CD28, CD62L und CCR7 mittels Durchflusszytometer analysiert. CD8⁺-T-Lymphozyten, die diese Marker tragen, befinden sich in einem frühen Entwicklungsstadium, während stark differenzierte Zellen diese verloren haben. Die T-Zellen zeigten eine schwache Expression der Marker CD28, CD62L und CCR7. CD27 wurde hingegen bei 4/6 Linien zu einem Großteil exprimiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Differenzierungsstatus der T-Zelllinien

Proband	CD28 ⁺ CD27 ⁺	CD28 ⁻ CD27 ⁺	CD28 ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
H1	11	88,5	0,3	8,2	0,2
H3	0	0	99,7	8,8	0
H5	0	0,1	99,4	8,3	0,1
TX-1	1,6	97	1,3	0	3,5
TX-8	0,1	96,7	3,2	0,2	0,7
TX-9	0	99,3	0,7	0	0,2

Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der CD27-, CD28-, CD62L- und CCR7-exprimierenden Zellen von 6 Zelllinien. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtmenge der CD3⁺/CD8⁺-Zellen. Es wurden exemplarisch 3 gesunde und 3 transplantierte Spender mittels durchflusszytometrischer Oberflächenfärbung analysiert

4.1.6 Epitopdiversität

Antigenspezifische T-Zellen erkennen Epitope, die aus Peptidfragmenten viraler Proteine und Teilen der MHC-Moleküle zusammengesetzt sind. Für eine erfolgreiche Therapie ist die Herstellung von T-Zelllinien mit mehreren Epitopspezifitäten von entscheidender Wichtigkeit, um viralen Evasionsmutationen entgegenzuwirken. Aus diesem Grund wurden alle hergestellten T-Zelllinien mittels Epitopmapping auf ihre Multispezifität untersucht (Abbildung 13).

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9	p10	p11
p12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p13	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
p14	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
p15	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
p16	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
p17	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
p18	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
p19	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
p20	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
p21	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
p22	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121

Abb. 13: Prinzip des Epitopmappings

Zur Bestimmung einzelner Epitopspezifitäten wurden die T-Zellen mit autologen LCLs in Gegenwart von Mappingpools inkubiert. Anschließend wurden die Epitopspezifitäten durch die Analyse von IFN- γ im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die schematische Zusammensetzung des IE-1-Mappingpools, sowie die Bestimmung eines Epitops. Die Mappingpools p1-22 setzen sich aus einer Reihe von 15 AS langen IE-1-Peptiden zusammen (1-121). Die Stimulation mit dem horizontalen Mappingpool p5 sowie mit dem vertikalen Mappingpool p16 löst IFN- γ -Produktion aus. Darum ist das spezifische Epitop im Peptid Nummer 49 lokalisiert.

Bei der Untersuchung von 24 Linien wurden 36 unterschiedliche Epitope identifiziert. Einige dieser Epitope konnten in Linien von mehreren Spendern, deren MHC-Moleküle Homologien aufwiesen, identifiziert werden, sodass insgesamt 60 Epitope gefunden wurden. Die mittlere Anzahl der Epitope betrug in gesunden Spendern für pp65 und IE-1 jeweils 2,4. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Linien aus transplantierten Spendern erzielt. Hier lag die mittlere Anzahl für pp65 bei 3,0 und für IE-1 bei 2,1 (Abbildung 14). Die meisten untersuchten Linien waren multispezifisch. Lediglich bei den Spendern H1, TX-1, TX-2 und TX-9 wurden monospezifische Linien gegen pp65 oder IE-1 generiert.

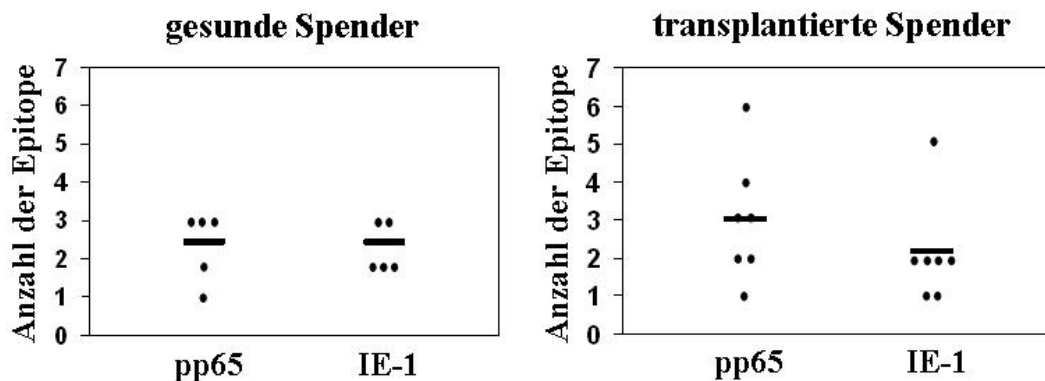


Abb. 14: Multiple Epitopspezifität in Linien aus gesunden und transplantierten Spendern

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Epitopspezifitäten in den generierten T-Zelllinien. Die Daten von 5 gesunden (links) und 7 transplantierten Spendern (rechts) sind für pp65- und IE-1-spezifische T-Zelllinien dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert die Anzahl der Epitopspezifitäten einer Zelllinie. Die mittlere Anzahl wird durch einen schwarzen Balken dargestellt.

4.1.7 Klonalität

Jedes individuelle Epitop kann von mehreren T-Zellklonen erkannt werden, die sich durch ihren T-Zellrezeptor und dessen Affinität zum Epitop unterscheiden. Eine multiple Klonalität ist ebenfalls für einen effektiven Schutz vor latenten Virusinfektionen entscheidend, da einige Klone durch wiederholte virale Reaktivierungen das Ende ihrer Lebensspanne erreichen und mit der Zeit aussterben. Darum wurde als Nächstes die T-Zellrezeptor Beta Varianz (TRBV) der T-Zelllinien mittels Real Time PCR bestimmt. Eine T-Zellpopulation kann anhand der β -Kette des TCRs in verschiedene Untergruppen (TCR-V β -Familien) unterteilt werden. Die Anzahl der Untergruppen in einer T-Zelllinie gibt einen Hinweis auf deren Klonalität. Die Analyse aller generierten T-Zelllinien zeigte, dass diese im Vergleich zu unselektionierten PBMCs in der T-Zellrezeptor Beta Varianz eingeschränkt waren (Abbildung 15).

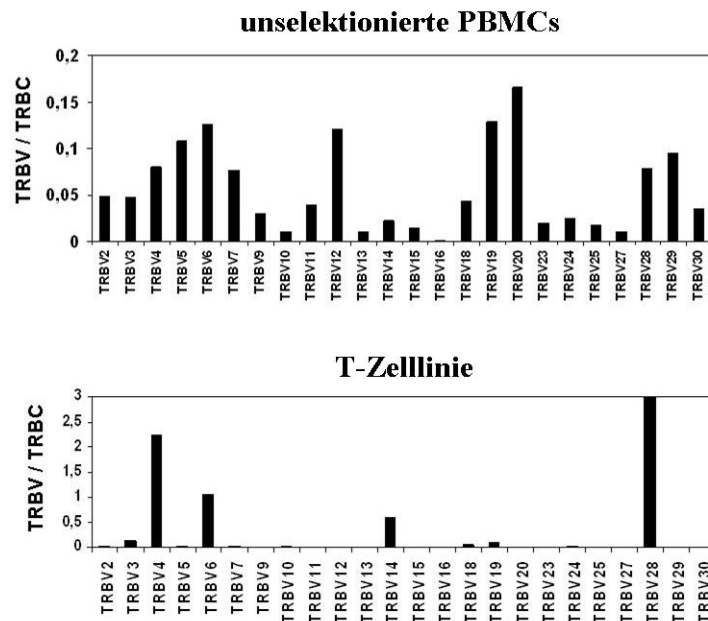


Abb. 15: Eingeschränkte T-Zellrezeptor Beta Varianz in den generierten T-Zelllinien

Die Abbildung zeigt die TRBV von unselektierter PBMCs (oben) und einer generierten T-Zelllinie (unten). Im Vergleich zu PBMCs ist die T-Zelllinie auf 4 dominante TCR-V β -Familien restringiert.

Die Mittlere Anzahl der dominanten TCR-V β -Familien in den T-Zelllinien lag bei Gesunden bei 2,8 für pp65 und 3,4 für IE-1. Die Analyse von Linien aus transplantierten Spendern ergab vergleichbare Ergebnisse. Hier war die TRBV für pp65 3,75 und für IE-1 4,25 (Abbildung 16). Beim Vergleich von pp65- und IE-1-spezifischen Zelllinien konnte weder bei Gesunden noch bei Transplantierten ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,1-1,0$).

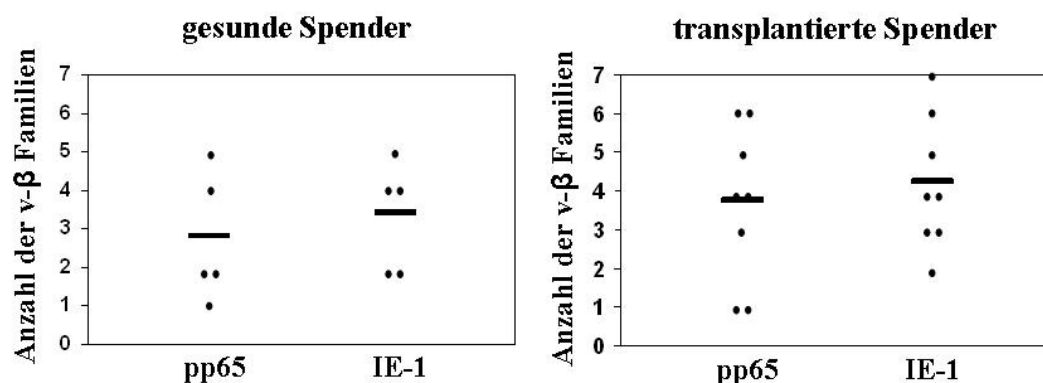


Abb. 16: Multiple Klonalitäten in Linien aus gesunden und transplantierten Spendern

Die Abbildung zeigt die Anzahl der detektierbaren TCR V β -Familien in den generierten T-Zelllinien. Die Daten von 5 gesunden (links) und 8 transplantierten Spendern (rechts) sind für pp65- und IE-1-spezifische T-Zelllinien dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert die Anzahl der TCR-V β -Familien einer Zelllinie. Die mittlere Anzahl wird durch einen schwarzen Balken dargestellt.

4.2. Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien für die klinische Anwendung

4.2.1 Herstellung der Linien unter GMP-Bedingungen

Bei der Entwicklung des Herstellungsprotokolls war die problemlose Überführbarkeit in die GMP-Richtlinien ein wichtiges Kriterium. Darum konnten unter dessen Anwendung T-Zelllinien von 2 gesunden Knochenmarksspendern (KL-1 und KL-2) hergestellt werden. Dazu wurde das CliniMACS-System verwendet, das eine GMP-gerechte Isolierung der IFN- γ -sezernierenden Zellen erlaubt. Es wurden jeweils 1×10^9 PBMCs als Ausgangsmaterial eingesetzt, die mit pp65- und IE-1-Peptidpools stimuliert wurden. Aus diesem Ausgangsmaterial konnten $5,4 \times 10^6$ bzw. $4,4 \times 10^6$ Zellen als Positivfraktion isoliert werden. Die Größe der Negativfraktion betrug $6,93 \times 10^8$ bzw. $5,11 \times 10^8$ (Tabelle 10). Somit ergab sich ein durch den Isolierungsprozess bedingter Zellverlust von 30,7% bei KL-1 und 48,9% bei KL-2.

Die positiv selektionierten Zellen wurden unter Verwendung der radioaktiv bestrahlten Negativfraktion als Feeder in einem Verhältnis von 1:20 und dem Zusatz von IL-2 für 14 Tage kultiviert. Dadurch konnten die isolierten antigenspezifischen Zellen 71,1- bzw. 6,6-fach expandiert werden (Tabelle 10). Zur Kontrolle wurden die bestrahlten Feeder ohne Zusatz der Positivfraktion kultiviert. Diese zeigten kein Wachstum und nach 14 Tagen waren alle in diesem Ansatz enthaltenen Zellen abgestorben (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 10: Herstellung zweier T-Zelllinien unter GMP-Richtlinien

	Ausgangszellzahl		Positivfraktion		Negativfraktion		Zellverlust	Zellzahl d 14	Expansionsfaktor
	Zellzahl	%	Zellzahl	%	Zellzahl	%	%		
KL-1	1×10^9	100	$5,4 \times 10^6$	0,54	$6,93 \times 10^8$	69,3	30,7	$3,84 \times 10^8$	71,1
KL-2	1×10^9	100	$4,4 \times 10^6$	0,44	$5,11 \times 10^8$	51,1	48,9	$2,9 \times 10^7$	6,6

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Generierung zweier unter GMP-Richtlinien hergestellter T-Zelllinien. Es ist die eingesetzte Ausgangszellzahl, die Zellzahlen nach der Isolierung sowie nach 2 Wochen *in vitro*-Kultur numerisch und prozentual dargestellt. Die prozentuale Berechnung basiert auf der Ausgangszellzahl.

4.2.2 Testung der Linien für die klinische Zulassung

Reinheitstestung

Die generierten Linien wurden auf Verunreinigungen durch aerobe und anaerobe Bakterien, Mykoplasmen und LPS untersucht. Des Weiteren erfolgten Analysen auf Kreuzkontamination durch allogenes humanes Material. All diese Untersuchungen lieferten ein negatives Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Phänotyp

Die Zellen wurden mittels Oberflächenfärbungen und anschließender durchflusszytometrischer Analyse phänotypisiert. Die Voraussetzung für die klinische Zulassung der Linien war ein Anteil von $CD3^+$ -T-Zellen $>95\%$ und ein Anteil von $CD19^+$ -B-Zellen und $CD16^+$ -NK-Zellen $<5\%$. Beide Linien entsprachen diesen Voraussetzungen, da ihr Anteil an T-Zellen 95,1 bzw. 96,8% betrug (Tabelle 11). Beide Linien wiesen neben $CD8^+$ - auch $CD4^+$ -Lymphozyten auf. Ihr Anteil betrug 13,2 bzw. 22,6% der Gesamtzellzahl.

Tabelle 11: Phänotyp der Zelllinien

	$CD3^-/CD19^+$	$CD3^-/CD16^+$	$CD3^+$	$CD3^+CD8^+$	$CD3^+CD4^+$
KL-1	1,8	3	95,1	81,6	13,5
KL-2	0,8	2,3	96,8	72,2	23,6

Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der B-Zellen ($CD3^-/CD19^+$), NK-Zellen ($CD3^-CD16^+$), gesamt T-Zellen ($CD3^+$), sowie der Subpopulationen $CD3^+/CD8^+$ und $CD3^+/CD4^+$ innerhalb der Zelllinien. Der Phänotyp der Zelllinien wurde mittels Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch bestimmt.

In vitro-Funktion und Antigen-spezifität

Es wurde der Anteil der IFN- γ -produzierenden T-Zellen nach spezifischer Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die T-Zellen mit autologen LCLs, die mit pp65/IE-1-Peptidpool oder DMSO beladen waren inkubiert. Als Voraussetzung für die klinische Zulassung wurde ein eindeutig positives Signal durch die Peptidpoolstimulation sowie ein möglichst geringer Hintergrund durch DMSO-Stimulation festgesetzt.

Der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD3⁺ T-Zellen war nach spezifischer Stimulation 48,3 bzw. 49,4%, wobei das Signal der DMSO-Kontrolle bei 2 bzw. 0,8% lag (Abbildung 17).

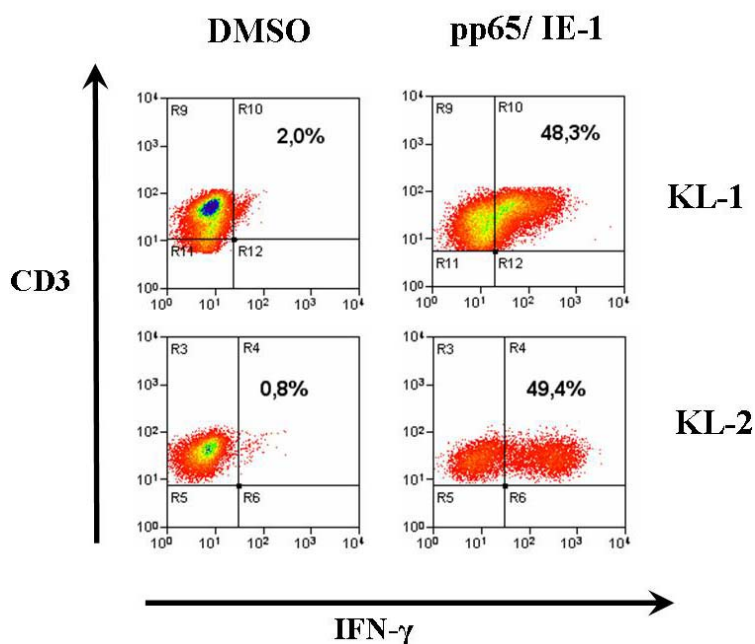


Abb. 17: Beide Linien produzieren IFN- γ nach spezifischer Stimulation

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ -produzierenden Zellen nach Stimulation mit pp65/IE-1-Peptidpools oder DMSO. Für die Analyse wurden die Zelllinien intrazellulär auf IFN- γ gefärbt und elektronisch auf CD3⁺-Zellen gegatet.

Als nächstes wurden die T-Zelllinien auf ihre Antigenpezifität mittels Zytotoxizitätstestung untersucht. Es wurde die spezifische Lyse von autologen LCLs, die mit pp65- und IE-1-Peptidpools beladen waren analysiert. Unbeladene autologe LCLs wurden als Kontrollen für uninfizierte Strukturen eingesetzt, während NK-Zell-sensitive K-562-Zellen zur Bestimmung der NK-Zell-abhängigen Lyse verwendet wurden.

Beide Linien lysierten eindeutig die pp65/IE-1-beladenen Zielzellen und verschonten unbeladene LCLs sowie K-562-Zellen (Abbildung 18).

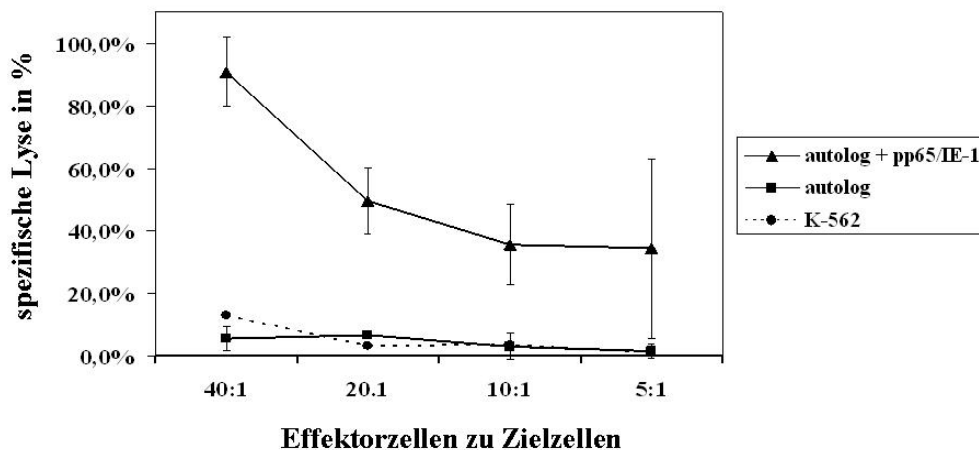


Abb. 18: Spezifische zytotoxische Aktivität einer T-Zelllinie

Die Abbildung zeigt repräsentativ das lytische Potenzial der T-Zelllinie KL-2 bei fallenden Effektor- zu Zielzellendosen. Als Zielzellen wurden autologe LCLs, die mit pp65- und IE-1-Peptidpools beladen waren (autolog + pp65/IE-1) stellvertretend für CMV-infizierte Zellen eingesetzt. Autologe LCLs, die mit DMSO beladen waren (autolog), repräsentierten nichtinfizierte Zellen und NK-Zell-sensitive K-562-Zellen (K-562) wurden zur Bestimmung der NK-Zell-abhängigen Lyse verwendet.

Beide unter GMP-Bedingungen hergestellten T-Zelllinien besaßen die Eigenschaft, hohe Mengen IFN- γ nach spezifischer Stimulation und nur geringe Mengen nach unspezifischer Stimulation zu produzieren. Zusätzlich waren beide Linien in der Lage CMV-infizierte Zielzellen zu lysieren und uninfizierte Strukturen zu verschonen. Dies belegt die restringierte Funktion der Linien auf die zu ihrer Generierung eingesetzten Antigene pp65 und IE-1.

Weder Reinheitsuntersuchungen noch Funktionsanalysen deuteten auf eine direkte Gefährdung für den Patienten hin. Darum wurden die hergestellten T-Zelllinien für die klinische Anwendung freigegeben.

4.2.3 Klinische Anwendung der GMP-generierten T-Zelllinien

Die Linie des Spenders KL-2 wurde für die Therapie eines haploidenten stammzelltransplantierten Patienten eingesetzt. Dieser litt an einer lang anhaltenden Immuninsuffizienz, die durch ein vermindertes Anwachsen des Transplantates bedingt war. So traten bei diesem Patienten unter anderem chronische CMV-Reaktivierungen auf, die sich durch wiederholten Anstieg der viralen DNA im Knochenmark manifestierten (Abbildung 19). Dieser Anstieg erfolgte trotz kontinuierlicher antiviraler Therapie mittels Aciclovir, was auf eine virale Resistenzbildung oder auf eine komplette T-Zellinsuffizienz hindeutete. Der exponentielle Anstieg des viralen Titers konnte durch die kombinierte Medikation mit

Ganciclovir und Foscarnet transient verhindert werden. Da eine lang anhaltende Kontrolle der CMV-Infektion angestrebt wurde und zusätzlich ein erhöhtes Risiko zur Ausweitung der viralen Resistenz bestand, sollte die Etablierung einer spezifischen Immunantwort durch den Transfer CMV-spezifischer T-Zellen erfolgen.

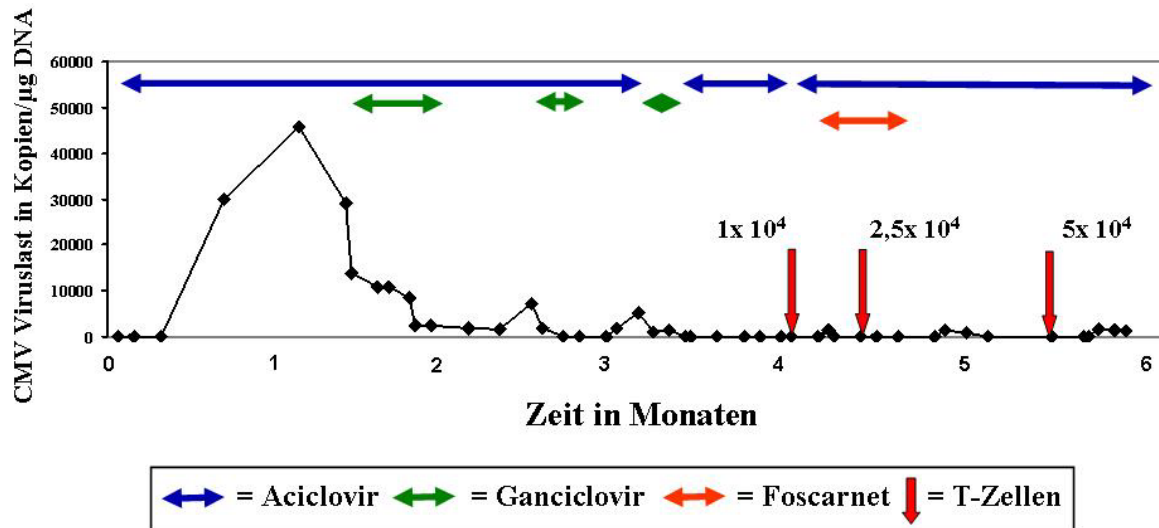


Abb. 19: Höhe der CMV-Viruslast vor und nach Infusion der T-Zellen

Die Abbildung zeigt den klinischen Verlauf eines stammzelltransplantierten Patienten. Die Kurve stellt den zeitlichen Verlauf der CMV-Viruslast im Knochenmark des Patienten dar. Die waagerechten Pfeile geben die Perioden der antiviralen Medikation mittels Aciclovir (blau), Ganciclovir (grün) und Foscarnet (orange) an. Senkrechte Pfeile symbolisieren die Zeitpunkte, zu denen CMV-spezifische T-Zellen appliziert wurden (rot). Die Zahlen geben die Menge der verabreichten Zellen an.

Es wurden insgesamt $7,5 \times 10^4$ Zellen in drei separaten Dosen über einen Zeitraum von 6 Wochen appliziert (Abbildung 19). Es konnten zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer GvHD-Entwicklung beobachtet werden. Zusätzlich blieb die CMV-Viruslast nach Applikation auf einem niedrigen Niveau und pp65/IE-1-spezifische $CD8^+$ - und $CD4^+$ -T-Lymphozyten waren schon 6 Tage nach der ersten Zellgabe im peripheren Blut nachweisbar (Tabelle 12). Die Persistenz der T-Zellen konnte nur über einen kurzen Zeitraum überwacht werden, da der Patient aufgrund seiner allgemeinen Immuninsuffizienz an den Folgen einer Sepsis verstarb. Über diesen kurzen Zeitraum war die Menge der pp65/IE-1-spezifischen T-Zellen konstant.

Tabelle 12: Monitoring der CMV-spezifischen T-Zellen

Tage nach T-Zellgabe	pp65		IE-1	
	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺
-245	0,09	0,17	neg	neg
+6	1,5	0,2	0,6	0,2
+10	1,9	0,3	0,1	0,2

Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der pp65- bzw. IE-1-spezifischen CD3⁺/CD8⁺- und CD3⁺/CD4⁺-Zellen im Blut des Patienten. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtmenge der CD3⁺-T-Zellen und sind nach Abzug des Hintergrundes (DMSO) dargestellt. Es sind Zeitpunkte vor und nach der ersten Infusion dargestellt. Die Bestimmung fand durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung aus isolierten PBMCs statt.