

## 2. ZIELE UND ARBEITSPLAN

### 2.1 Allgemeine Zielstellung der Arbeit

Im Kontext bisher erörterter Grenzen adoptiver Immuntherapie und dem fortbestehendem Interesse an ihren attraktiven Potentialen entstand die vorliegende Arbeit. Sie soll dazu beitragen, bisherige Strategien zur Herstellung antigenspezifischer Lymphozyten weiterzuentwickeln und die adoptive Immuntherapie mit antigenspezifischen T-Zellen voranzubringen.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Anforderungen an ein ideales Protokoll:

- 1) Generierte T-Zelllinien sollten eine hohe Antigenpezifität und keine Allo- und Autoreaktivität besitzen.
- 2) Die Zellen sollten entsprechend der natürlichen Immunität und im Hinblick auf potentielle Mutationen multispezifisch sein und sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Immunphänotypen einschließen.
- 3) Die Zellgenerierung soll unabhängig vom HLA-Typ des Patienten möglich sein, und keine Kenntnis bzw. Erforschung immunrelevanter Epitope voraussetzen.
- 4) Die Zellexpansion soll effizient sein, unter anderem, um die Kosten möglichst gering zu halten.
- 5) Die Biosicherheit und der problemlose Transfer unter GMP-Richtlinien muss gewährleistet sein.

Die Entwicklung einer Methode, die möglichst viele dieser Anforderungen erfüllen kann, ist entscheidend für eine klinische Anwendbarkeit antigenspezifischer T-Zellen und für den Fortschritt der adoptiven Immuntherapie.

### 2.2 Konkrete Ziele und Fragestellungen

Folgende konkrete Ziele wurden im einzelnen erstellt und anhand eines Arbeitsprogramms umgesetzt (**Abb. 5**): Am Beispiel des pp65 Antigens des HCMV sollen T-Zelllinien nach 3 verschiedenen Strategien zunächst für 8 gesunde, HCMV-seropositive Probanden generiert werden. Als Basis für die neuen Strategien dient die Entwicklung überlappender Peptidpools (OPPs), deren Anwendung für diagnostische Fragestellungen und zur Charakterisierung von T-Zellepitopen etabliert ist (Kern 1998). Im Rahmen dieser Arbeit soll ihr Potential zur Generierung von T-Zelllinien untersucht werden. Die mit Hilfe der OPPs erkannten spezifischen

Zellen müssen dazu aus dem unspezifischen polyklonalen T-Zellpool herausgefiltert und angereichert werden. Dazu verwendeten wir eine Methode, die auf magnetischer Selektion und anschließender Expansion in vitro basiert. Das Prinzip der magnetischen Selektion beruht darauf, dass spezifisch aktivierte Zellen IFN- $\gamma$  freisetzen. Durch mehrfache AK-Markierung, zuletzt mit metallischen AK, können IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen mit Hilfe einer Säule und eines Magneten negativ selektioniert werden (Manz 1995; Becker 2001; Bissinger 2002). Anschließend soll eine Expansion der so gewonnenen Zellen erreicht werden. In **Protokoll I** werden hierfür bestrahlte PBMCs als unspezifischer Wachstumsstimulus eingesetzt. Um den Einfluss einer unspezifischen Expansion evaluieren zu können, soll im **Protokoll II** eine Expansion durch spezifische Stimuli durchgeführt werden. Dazu wurden autologe pp65 mini-LCLs (siehe 1.3.2) als spezifische Feederzellen ausgewählt. Als Referenz sollen diese beiden neuen Strategien mit dem erfolgreich etablierten **Protokoll III** verglichen werden (Moosmann 2002). Bei diesem Protokoll werden ebenfalls autologe transgene pp65 mini-LCLs eingesetzt, allerdings ohne vorherige Selektion. Durch Koinkubation dieser APCs mit einem nicht selektierten PBMC-Pool entstehen nach repetitiven Stimulationen zusammen mit der Gabe von IL2 als Wachstumsfaktor ab Tag 10 pp65-spezifische T-Zelllinien.

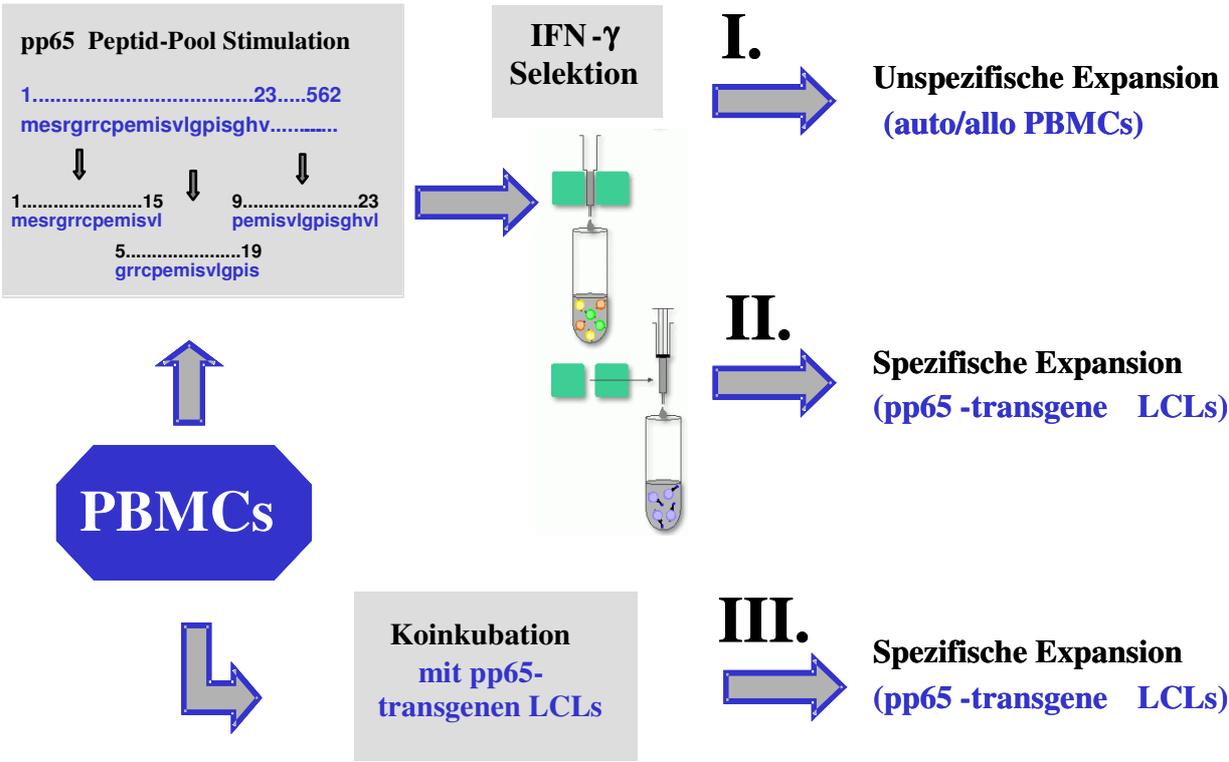


Abbildung 6: Übersicht der drei Protokolle I, II und III

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Protokolle sind dargestellt: Ausgangspunkt sind pro Proband (n=8) frische PBMCs aus jeweils 100ml Blut. Für jeden Probanden wurden dabei die nach den 3 Protokollen hergestellten Zelllinien gleichzeitig hergestellt, um weitere Einflussfaktoren zu minimieren.

Für **Protokoll I und II** wurden die PBMCs mit dem pp65 Peptidpool stimuliert und reagierende Zellen mittels ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion magnetisch selektioniert. In Protokoll I fand eine weitere unspezifische Expansion durch autologe und allogene PBMCs statt. Im Protokoll II wurden die Zellen durch autologe transgene pp65 mini-LCLs spezifisch kultiviert, insbesondere um einen Einfluss auf die Spezifität im Vergleich mit Protokoll I zu untersuchen. Das in vitro bereits erfolgreich getestete **Protokoll III** generiert spezifische CTL-Linien durch Koinkubation der PBMCs mit bestrahlten pp65 mini-LCLs (4-malig) und der Gabe von IL2 ab dem 10. Tag und wurde hier als Kontrolle eingesetzt.

Während und nach der Zellherstellung sollen die Eigenschaften der T-Zelllinien und insbesondere ihre Antigenpezifität abhängig von den 3 vorgestellten Generierungsstrategien miteinander verglichen und in vitro evaluiert werden.

Dabei sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- a) Gelingt die Generierung spezifischer T-Zelllinien für HCMV-seropositive Probanden mit allen 3 Protokollen?
- b) Welche Zeitspanne eignet sich am besten zur Selektion IFN- $\gamma$ -positiver spezifischer Lymphozyten nach Inkubation mit Peptidbibliotheken ?
- c) Welchen Einfluss hat spezifische oder unspezifische Expansion nach OPP-Stimulation in Protokoll I und II? Ist es nötig, die spezifisch selektierten Linien weiterhin spezifisch zu expandieren, oder ist eine unspezifische Expansion ohne Verlust der Antigenpezifität möglich?
- d) Besitzen die Zellen, die durch OPP-Stimulation gewonnen wurden, multiple Spezifitäten, und sind diese vergleichbar mit den Spezifitäten vor Selektion?
- e) Sind die generierten T-Zelllinien pp65-antigen-spezifisch und frei von Allo- und Autoreaktivität, und welchen Einfluss hat das Generierungsprotokoll darauf?
- f) Wie viel Zeit wird für die Expansion benötigt bzw. welchen Einfluss haben die verschiedenen Generierungsmethoden auf die Expansionsrate und auf den Phänotyp der Zellen?
- g) Eignet sich das Protokoll für einen problemlosen Transfer unter GMP-Richtlinien ?