

## 5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen HLA-Typ unabhängigen Strategie zur Generierung antigenspezifischer T-Zellen. Am Beispiel des pp65 Antigens des HCMV sollte, basierend auf Peptidbibliotheken, ein neues Protokoll entwickelt und evaluiert werden. HCMV wurde als Beispiel gewählt, da für dieses Pathogen bereits zahlreiche relevante Daten vorliegen - unter anderem zur T-Zellgenerierung und zur Charakterisierung der Immunantwort. Die von uns verwendete Peptidbibliothek enthält alle potentiellen Epitope von pp65 und kann deshalb unabhängig vom HLA-Typ und von der Kenntnis immunrelevanter Epitope eingesetzt werden. Für das **Protokoll I** wurde die Stimulation von PBMCs mittels OPPs mit einer magnetischen Selektion der auf pp65 reagierenden Zellen kombiniert und diese wurden anschließend unspezifisch expandiert. Zur besseren Evaluierung testeten wir den Einfluss, den eine unspezifische Expansion auf die gewonnenen Zellen hat, durch einen Vergleich mit spezifischer Expansion in **Protokoll II**. Als weitere Kontrolle führten wir parallel für alle Probanden das bereits erfolgreich in vitro etablierte **Protokoll III** durch. Insgesamt zeigte sich Protokoll I als das beste Protokoll. Auch wenn die Eigenschaften der generierten T-Zelllinien gegenüber den anderen Protokollen – möglicherweise auch aufgrund der geringen Fallzahlen – in einigen Aspekten nicht eindeutig als signifikant überlegen belegt werden können, so ist dieses Protokoll schon alleine bezüglich des Zeit- und Arbeitsbedarfes sowie der Biosicherheit eindeutig vorzuziehen.

**Tabelle 8: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der drei Protokolle**

	Protokoll I	Protokoll II	Protokoll III
<b>Stimulation</b>	pp65 OPP	pp65 OPP	pp65 mini-LCL
<b>Selektion</b>	IFN-g-assay	IFN-g-assay	durch Expansion
<b>Expansion</b>	unspezifisch (PBMCs)	pp65 mini-LCL	pp65 mini-LCL
<b>Zeitbedarf insgesamt</b>	++	-	-
<b>Expansionsrate</b>	++	+	+
<b>CD4+ Phänotypen</b>	++	+	+
<b>CD16+ Phänotypen</b>	++	-	+
<b>Antigen-Spezifität</b>	+++	++	+
<b>Multiple Epitop-Spezifität</b>	+++	n. u.*	n. u.*

\* Wiesener et al zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit mit pp65-mini-LCLs, dass die dabei generierten spezifische T-Zellen gegen verschiedene funktionale CMV-Epitope gerichtet sind (Wiesner 2005).

## 5.1 Antigen-spezifische T-Zellen durch spezifische Stimulation - Vergleich etablierter Methoden mit Protokoll I

Vorteil der In-vitro-Generierung von T-Zelllinien für die adoptive Immuntherapie gegenüber Vakzinierungsstrategien ist eine Kontrolle ihrer Spezifität durch eine Messung und Beeinflussung in vitro. Eine hohe Spezifität gegenüber HCMV-infizierten Zellen und nicht gegen Allo- und Autoantigene ist ein Kernpunkt für erfolgreiche adoptive Lymphozytentherapie. Die Infusion unselektierter in vitro expandierter Zelllinien kann zwar durch vorhandene HCMV-spezifische Zellen antivirale Effekte zeigen, birgt aber die Gefahr lebensbedrohlicher Graft-versus-Host-Reaktionen (Papadopoulos 1994). Der Transfer selektierter spezifischer T-Zellen vermag dieses Risiko drastisch zu reduzieren (Rooney 1995). Verschiedene inzwischen etablierte Methoden ermöglichen eine Selektion antigen-spezifischer T-Zellen aus den polyklonalen Spender-PBMCs.

Erste Versuche der Anwendung von HCMV-spezifischen Zellen wurden in der prophylaktischen Behandlung von KM-Tx durchgeführt. Walter et al. verwendeten (1995) dabei HCMV-spezifische T-Zellen, die sie mit Hilfe **HCMV-infizierter Fibroblasten** aus Hautbiopsaten der Spender hergestellt hatten. Danach wurden in einer Weiterentwicklung dieser Methode **virale Lysate** aus Fibroblasten-Zelllinien als HCMV-Antigen verwendet. Nach endogener Prozessierung werden diese auf der Oberfläche von autologen APCs den T-Zellen präsentiert. Als APCs dienen dabei in der Regel Dendritische Zellen und gelegentlich auch unmodifizierte Monozyten, deren Anteil in PBMC-Pools bei 5 - 10% liegt.

Obwohl es durch diese Methode möglich ist, multispezifische T-Zelllinien zu generieren und zwar unabhängig vom HLA-Typ des Spenders, ist ihre Biosicherheit mit entscheidendem Risiko behaftet. Auch Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit sind fraglich, da eine endogene Prozessierung durch die APCs nötig ist. Die generierten T-Zellen gehören überwiegend dem CD4<sup>+</sup> Immunphänotyp an und enthalten kaum CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen. Walter et al. mussten aus diesem Grunde nach der Zell-Herstellung eine Selektion für CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> Zellen durchführen. Einsele et al. generierten 2002 T-Zellen nach dem gleichen Prinzip. Der erreichte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Anteil lag bei 77% (+- 10%), der CD8<sup>+</sup> T-Zellanteil war mit 6% (+- 3%) sehr gering (n= 14). Außerdem gelang es nur in 14 von 21 Patienten, antigen-spezifische T-Zelllinien zu generieren. Die klinische Anwendbarkeit dieses Ansatzes ist also eingeschränkt.

Um den Anteil der CD8<sup>+</sup> spezifischen Zellen zu erhöhen, werden mit zunehmender Kenntnis immunorelevanter Epitope **Einzelpeptide** eingesetzt. Mit einer Länge von 9 AS können diese durch eine kurze Inkubationszeit direkt in passenden MHC-I-Moleküle präsentiert werden, ohne dass eine endogene Prozessierung nötig ist. Dadurch ist die spezifische Stimulation von CD8<sup>+</sup>

Lymphozyten möglich. Kleihauer et al. (Kleihauer 2001) propagierten diese Methode. Aufgrund der erforderlichen Kenntnis immunrelevanter Epitope generierten sie HCMV-spezifische Zellen ausschließlich für Spender des HLA-Typs A 0201. Für diesen HLA-Typ ist eine immunrelevante AS-Sequenz eines HCMV-Proteins bekannt (Diamond 1997; Solache 1999), die wiederholt zur Entwicklung neuer Methoden für T-Zellgenerierung verwendet wurde und wird. Diese Sequenz umfasst die AS 495 – 503 von pp65 und wird mit NLVPMVATV abgekürzt. Kleihauer et al. konnten trotz hypothetischer Immunrelevanz dieser Sequenz nur in 6 von 14 HCMV-seropositiven Spendern antigenspezifische CTLs generieren. Da bis zu 50% der Bevölkerung den HLA-Typ A 0201 aufweisen - in dieser Arbeit 5/10 getesteten Personen bzw. 3/8 der erfolgreichen Zelllinien -, ist mit diesem Ansatz die Generierung antigenspezifischer Zellen für etwa die Hälfte der Bevölkerung nicht möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass selbst innerhalb der gleichen HLA-Typen die wirksamen Epitope variieren können und viele wirksame Epitope nicht bekannt sind (Kern 1999; Solache 1999) (Kleihauer, unpublizierte Daten). Gehört das Stimulationsepitop nicht zu den immunrelevanten Epitopen des Patienten, gelingt eine Etablierung einer antigenspezifischen T-Zelllinie nur in Ausnahmefällen. Diese Tatsache könnte die geringe Erfolgsrate von unter 50% in dieser Arbeit erklären. Ein anderer Kritikpunkt ist das Fehlen spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, ebenso wie die Spezifität der T-Zellklone gegen insgesamt nur ein einzelnes Epitop mit entsprechender Vulnerabilität für virale Mutationen (siehe 5.3.). Auch hier ist deshalb eine breite Anwendung schwierig zu realisieren.

Noch zeit- und arbeitssparender als Einzelpeptide für den Gesamtaufwand der Zellgenerierung sind **Tetramere**, da diese, wenn sie erst einmal etabliert sind, in großen Mengen und ohne weitere Arbeitsschritte hergestellt werden können. Wie Einzelpeptide sind sie vergleichbar unkompliziert unter GMP-Bedingungen transferierbar, und sind dabei sehr zuverlässig in der Antigenpräsentation. Da sie die Struktur des MHC-I-Antigenkomplexes imitieren, können sie nicht nur an spezifische T-Zellen binden, sondern durch direkte Fluoreszenz-Markierung visualisiert, quantifiziert, und dadurch isoliert werden (Altman 1996). Keenan et al. (Keenan 2001) schlugen den Einsatz von Tetrameren als Basis für die Gewinnung HCMV-spezifischer T-Zellen vor. Für 17 HCMV-seropositive Probanden – aber nur der HLA-Typen A 0201 und B 0702 - setzten sie PE-konjugierte HLA-Klasse-I-Tetramere ein. Die immunrelevanten Epitope von pp65 sind für diese HLA-Typen bekannt. Für HLA A 0201 handelt es sich, wie erwähnt und vielfach angewandt, um die Sequenz der AS 495-503; für HLA B 0702 ist dies die Sequenz 417-426. Nach Inkubation von Spender-PBMCs mit PE-markierten Tetrameren wurden die tetramergebundenen CD8<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe magnetischer Beads zweimalig positiv selektioniert. In 14 von 17 seropositiven Probanden konnten HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien hergestellt werden. Die pp65-Spezifität der T-Zellen wurde durch ELISpot bestätigt, allerdings wurde ihre tatsächliche Funktion in vitro nicht durch einen Zytotoxizitätstest nachgewiesen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen

konnten nicht generiert werden. In der Arbeit von Keenan et al. werden die Nachteile der Tetramere deutlich, die im Prinzip mit allen Nachteilen Einzelpeptid-basierter Verfahren vergleichbar sind. Die fehlenden CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten könnten zwar prinzipiell gezielt durch Selektion mittels MHC-II-Tetrameren hergestellt werden. Valide Daten liegen hierzu allerdings noch nicht vor.

Sowohl für Einzelpeptide, als auch für HCMV-Antigen, nicht aber für Tetramere sind zusätzlich autologe Zellen mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation erforderlich. Meistens werden hierzu **Dendritische Zellen** eingesetzt. Diese präsentieren nicht nur endogen prozessierte Antigene - z. B. im Fall von viraler Infektion - sondern können auch exogen mit relevanten Antigenen gepulst (beladen) werden. Während einer kurzen Inkubationszeit werden die Antigene dabei durch ubiquitäre Proteasen in Peptidfragmente verarbeitet. Passende Peptidstücke können deshalb direkt und ohne weitere intrazelluläre Bearbeitung in den MHC-Rezeptor aufgenommen werden. (Subklewe 1999). Dendritische Zellen sind durch Besitz von MHC-I und MHC-II-Rezeptoren in der Lage, sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Helferzellen zu aktivieren. Gewonnen werden können sie – allerdings mit sehr geringer Ausbeute – durch direkte Isolation aus dem Blut, oder – häufiger praktiziert - durch Kokultivierung von Monozyten mit Zytokinen wie GM-CSF, IL4, und eventuell zusätzlich TNF- $\alpha$  oder CD40 (Dhodapkar 2000; Kleihauer 2001). Da aufgrund der niedrigen Frequenzen der DCs im peripheren Blut mehrere Arbeitsschritte nicht nur zu ihrer Gewinnung, sondern auch zu ihrer Expansion notwendig sind, fällt hierbei zusätzlicher Zeit- und Arbeitsbedarf an. Hierfür werden mindestens 7 zusätzliche Tage veranschlagt (Peggs, K 2001; Szmania 2001). Eine größere Menge an DCs ist auch deshalb nötig, da zur T-Zellgenerierung aufgrund niedriger Ausgangszellzahlen meist repetitive Stimulationen mit DCs nötig sind.

Um die Effizienz und Anwendbarkeit oben vorgestellter Methoden zu verbessern, **kombinierten** andere Gruppen diese miteinander. Szmania et al. (Szmania 2001) nutzten Tetramere gemeinsam mit Einzelpeptiden. Sili et al. (Sili 2003) setzten transgene pp65-exprimierende DCs zusammen mit transgenen pp65 LCLs ein, da pp65 LCLs aufgrund ihres besseren Wachstums schneller in großen Mengen zur Verfügung stehen. Einsele et al. verwendeten eine Kombination von Peptiden und Proteinen, um die Stimulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erreichen (Einsele 2002a). Andere Arbeitsgruppen entwickeln künstliche APCs, die durch zeit- und arbeitseffizientere Herstellung Dendritische Zellen ersetzen sollen (Oelke 2003). Auch wenn letztere attraktiv scheinen, ist die HLA-Abhängigkeit, die Abhängigkeit von Kenntnissen immunrelevanter Epitope und eine begrenzte Spezifität ein bedeutendes Handicap für eine breite Anwendung. Insgesamt brachte bisher also auch die Kombination der Einzelmethoden keine entscheidende Verbesserung.

Durch die genetische Modifikation autologer Antigenpräsentierender Zellen wurden **transgene APCs** entwickelt. Eines dieser Systeme sind die primär im Kontext von EBV-Infektionen erfolgreich eingesetzten **LCLs**. Diese entstehen durch Immortalisierung autologer B-Lymphozyten durch einen EBV-Laborstamm. Auf verschiedenen Wegen können LCLs zur Präsentation fremder Proteine nutzbar gemacht werden. Zur Anwendung im Rahmen von HCMV-Infektionen können z. B. fremde Genabschnitte mittels DNA-Transfektion oder adeno- und retroviralem Gentransfer in das Genom integriert werden. Nach endogener Prozessierung der fremden Proteine findet eine Präsentation vor allem im MHC-I-Kontext, aber auch im MHC-II-Kontext statt. Dabei kommt es zur Expression verschiedener pp65-Epitope, neben der gleichzeitigen Präsentation von EBV-Proteinen. Eine zusätzliche Hoffnung dieses Systems war es damit, doppelspezifische - z. B. EBV- und HCMV-spezifische T-Lymphozyten - generieren zu können. Sun et al. (Sun 1999) erreichten durch retroviral modifizierte LCLs teilweise bispezifische Zelllinien, die allerdings nicht über längere Stimulationszyklen beobachtet wurden. Nach Beobachtungen von Moosmann et al. kam es innerhalb dieser doppelspezifischen Linien nach mehreren Restimulationen zur Dominanz der HCMV-spezifischen CTLs gegenüber den EBV-spezifischen Zellen. Eine mögliche Erklärung sind HCMV-assoziierte Immunsupprimierungsmechanismen (Moosmann 2002). Ein weiteres System in der Kategorie transgene APCs sind die sogenannten „**mini-LCLs**“. Durch ein teilungsdefizientes „**mini-EBV**“ als Vektorsystem zur Expression der Zielantigene in LCLs (Kempkes 1995a; Moosmann 2002) konnten insbesondere Aspekte der Biosicherheit deutlich verbessert werden. Verschiedene Genabschnitte wurden aus einem EBV-Laborstamm entfernt, so dass B-Lymphozyten zwar noch immortalisiert, aber nicht mehr lytisch infiziert werden können. Mit Hilfe einer Verpackungszelllinie wird der teilungsdefiziente EBV in B-Lymphozyten eingeschleust. Fremde Antigene können in den EBV-Vektor integriert und so durch LCLs exprimiert werden. Die Infektiosität für den Menschen ist ausgeschlossen, solange keine Rekombination in mit EBV koinfizierten B-Zellen stattfindet. Dies kann unter Laborbedingungen durch genetische Analyse der Zellen mittels PCR festgestellt werden. Moosmann et al. verwendeten pp65 als Modellantigen zur T-Zellherstellung mit dieser Technologie. Nach 5-8 Wochen Vorbereitungszeit waren pp65 mini-LCLs in ausreichender Menge hergestellt, und es gelang mit diesen als APCs, pp65 spezifische T-Lymphozyten zu generieren. Prinzipiell eröffnet diese Technologie die Möglichkeit, große Genabschnitte mehrerer Viren gleichzeitig in einer einzigen autologen Zelllinie zu exprimieren und den T-Zellen zu präsentieren. Ob nach mehreren Stimulationen mit „**multi-Antigen-LCLs**“ tatsächlich Zelllinien gegen mehrere Antigene gleichzeitig hergestellt werden können, oder ob es zur Dominanz einer Antigen-spezifität kommt, muss noch untersucht werden.

Für dieses von Moosmann et al. etablierte Protokoll (III), welches wir als Kontrolle bzw. Vergleich benutzten, stellten wir pp65 mini-LCLs her. In 9 von 10 Probanden gelang ihre Generierung, und in 8 Probanden standen für alle Restimulationen ausreichende Zellzahlen zur Verfügung. Eine Koexistenz der pp65 mini-LCLs mit endogenem EBV und damit die Gefahr einer Rekombination konnte in 26 von 30 generierten Zelllinien ausgeschlossen werden. Der Zeitbedarf für die Herstellung der pp65 mini-LCLs lag im Median bei 41 Tagen. Auch wenn dieser Zeitaufwand durch Verbesserung des Vektorsystems optimiert werden kann, bedeutet dies immer einen zusätzlichen Zeit- und Arbeitsbedarf.

Für das **neues Protokoll I** war die Herstellung von APCs nicht erforderlich. Dadurch war der Zeitbedarf vor der eigentlichen T-Zellherstellung im Median um 41 Tage kürzer. Die Stimulation der T-Zellen (in Protokoll I und II) basierte dabei auf OPPs. Diese werden innerhalb des PBMC-Pools auf Monozyten, B-Zellen und DCs im MHC-I und MHC-II-Kontext präsentiert. Die erforderliche Inkubationszeit ist kurz. In Vorversuchen hatte sich im Vergleich eine 6-stündige Inkubationszeitspanne als optimal gezeigt. Pp65 spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten konnten so aktiviert und anhand ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion selektiert werden. OPPs haben gegenüber APCs neben Zeitersparnis den Vorteil der HLA-Typ Unabhängigkeit, und erfordern kein Wissen über immunrelevante Epitopsequenzen, da alle Epitope mit einer Länge bis 15 AS vorhanden sind. Die kosten- und zeitintensive Erforschung von Epitopen entfällt. Da viele verschiedene Epitope präsentiert werden, reagiert ein diverses T-Zellrepertoire – analog der Situation in vivo. Bei Antigen-Mutationen oder Virusvarianten können Peptidpools zügig aktualisiert und angepasst werden.

## 5.2 Expansion der T-Zellen ohne Spezifitätsverlust

Die Frequenz antigenspezifischer Zellen innerhalb der polyklonalen PBMC-Pools ist sehr gering, während gleichzeitig für eine Anwendung mit guter antigenspezifischer Wirkung im Patienten höhere Zelldosen erforderlich sind. Die nötige Zelldosis zur Infusion wird anhand der Körperoberfläche des Patienten abgeschätzt, hängt aber auch von anderen Faktoren ab: Der Fähigkeit der infundierten Zellen zur Persistenz bzw. Expansion in vivo, der Migration zu entscheidenden Lokalisationen, der antigenwirksamen Funktion, der Antigenlast des Patienten, und möglicherweise weiteren Einflussfaktoren (Ho, WY 2002). Es herrscht keine Klarheit darüber, wie hoch die Zelldosis im Einzelfall sein sollte. Walter et al. (Walter 1995) setzten zur HCMV-Prophylaxe bei KM-Tx bis zu  $10^9$  in vitro expandierte T-Zellen pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche ein (n= 14). Dies resultierte in guter Wirkung ohne signifikante Nebenwirkungen. Einsele et al. (Einsele 2002b) infundierten zur Therapie von HCMV-Infektionen  $10^7$  T-Zellen/m<sup>2</sup>, wobei 5 von 7 KM-Tx Patienten von einer länger anhaltenden Wirkung profitierten. Der Bedarf an T-Zellen

kann für Transplantierte solider Organe weitaus höher liegen, da ihre T-Zellimmunität in der Regel stärker supprimiert ist und deshalb eine geringere Expansion der infundierten Zellen in vivo erfolgt. Für solche Infusionsdosen ist eine intensive, möglichst kosten- und zeiteffiziente Zellexpansion erforderlich. Die wichtigste An- und Herausforderung dabei ist, die Spezifität der T-Zellen während der Expansion in vitro zu erhalten bzw. weiter auszubauen, um das Risiko von Allo- und Autoreaktivität nach Infusion zu minimieren.

Für unsere **neue Methode I** wurden Lymphozyten mittels OPPs kurzzeitig spezifisch stimuliert und basierend auf ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion magnetisch selektiert. Die resultierende nur noch geringe Zellpopulation von < 100 000 Zellen (Median) wurde durch 4 Expansionsschritte unspezifisch expandiert. Als Feederzellen setzten wir autologe und allogene bestrahlte PBMCs ein. Wir befürchteten allerdings, dass eine unspezifische Expansion zu einem Verlust der Antigen-spezifität führen könnte. Um dies zu evaluieren, führten wir mit der gleichen Ausgangspopulation zeitgleich eine spezifische Expansion (**Protokoll II**) durch. Hierzu halbierten wir die Zellen nach IFN- $\gamma$ -Selektion, und verwendeten als spezifischen Stimulus oben beschriebene **pp65 mini-LCLs**.

Ein Spezifitätsverlust nach unspezifischer Expansion wurde vor kurzem von Sili et al. (Sili 2003) beschrieben. T-Zellen wurden nach 1-maliger Stimulation mit pp65-exprimierenden transgenen Dendritischen Zellen unspezifisch expandiert. Nach 2 Stimulationen kam es zu einem Verlust der anfangs nachgewiesenen Antigen-spezifität. Die Arbeitsgruppe von Szmania et al. führte eine Zellexpansion nach Selektion durch pp65-Tetramere mit Hilfe von allogenen Feederzellen, allogenen, Tetramer-gepulsten LCLs sowie verschiedenen Zytokinen durch. Nach einer sehr schnellen Expansion berichteten die Autoren über einen leichten Spezifitätsverlust – von zuerst 94,5 - 99% Tetramer-spezifischen Zellen zu 75,4% - 86 % (n=3). Trotzdem kam es zu einer HCMV-spezifischen Lyse im Zytotoxizitätstest. Bissinger et al. (Bissinger 2002) verwendeten zur Zellherstellung nach Einzelpeptid-Stimulation ebenfalls magnetische, auf IFN- $\gamma$ -Sekretion basierte Selektion, und expandierten die Zellen anschließend unspezifisch durch allogene und autologe Feederzellen. Trotz dieser Expansion blieben die T-Zelllinien auch nach 2 - 4-wöchiger Expansion spezifisch.

Wir stellten nach 4-maliger unspezifischer Stimulation keinen Verlust der Antigen-spezifität fest. Im Vergleich mit Protokoll II, bei dem eine spezifische Stimulation stattgefunden hatte, war die mediane pp65-spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest nach Protokoll I sogar größer. T-Zelllinien aus Protokoll I und II zeigten eine im Median stärkere Lyse als aus Protokoll III. Diese Ergebnisse könnten dadurch zu erklären sein, dass in diesen beiden Protokollen durch den initialen sehr strengen Selektionsprozess – von  $1 \times 10^8$  Ausgangszellen blieben nach OPP-

Stimulation und magnetischer Selektion weniger als  $1 \times 10^6$  Zellen übrig - bereits eine streng selektierte pp65-spezifische Population vorlag. Im Gegensatz dazu handelte es sich nach einmaliger Stimulation mittels Koinkubation eines unselektierten T-Zellpools bei Sili et al. (Sili 2003) vermutlich noch um eine große oder sogar überwiegende Anzahl unspezifischer T-Zellen, die sich durch eine allgemeine Aktivierung und Zytokinsekretion während der Expansion der spezifischen Zellen mitvermehren konnten.

Unmodifizierte PBMCs als Feederzellen sind deutlich vorteilhafter als pp65 mini-LCLs bezüglich Zeitbedarf, Arbeitsaufwand und Biosicherheit. Theoretisch ideal wären autologe PBMCs, die zusätzlich OPPs präsentieren. Durch die benötigten Mengen an OPPs wären die Kosten nicht nur wesentlich höher, sondern auch der Einsatz autologer PBMCs ist - aufgrund der benötigten Zellzahlen - im Kontext lymphopener Patienten schwierig zu realisieren. Praktikabler ist der Einsatz allogener PBMCs. Die Gefahr liegt dabei in der Aktivierung alloreaktiver Zellen. Viele Gruppen verwenden gepoolte allogene Feederzellen unbekanntem HLA-Typs, um eine gleichmäßige Funktion und Zytokinsekretion der verwendeten Zellen zu gewährleisten. Um das Risiko der Mit-Expansion allogener Zellen zu minimieren, wäre es vorteilhafter, wenn verwendete Stimulatorzellen im Verhältnis zum Empfänger bzw. Transplantat keinen teilweise übereinstimmenden HLA-Typ aufweisen. Noch besser wäre ein völliger Verzicht auf allogene Zellen durch eine Expansion mit beads und Antikörpern. Bisher ist es allerdings nicht gelungen, spezifische T-Zellen ausschließlich durch OKT-3-Antikörper oder CD28/CD3-Beads zu vermehren (Hammer 2004). Aktuell müssen bei diesem Ansatz zusätzlich allogene oder autologe Feederzellen eingesetzt werden - wenn auch in geringerer Menge. Rekombinantes IL2 erleichtert die klonale Expansion, indem es die Zellen vor aktivierungsinduzierter Apoptose schützt (Biron 1990).

In allen 3 Protokollen war die Zellexpansionsrate ausreichend. In einem Zeitraum von 25 Tagen konnten - bis auf je 1 Ausnahme pro Protokoll und abgesehen von der mini-LCL-Generierung - Zellzahlen von ca.  $10^8$  T-Zellen gewonnen werden. Dies ist nach bisherigen Studien eine ausreichende Zellzahl für eine klinische Anwendung. Im Einzelfall kann die benötigte Infusionsdosis durchaus höher sein.

**In Protokoll III** konnten wir nach repetitiven Stimulationen ohne weiteren Selektionsschritt pp65-spezifische T-Zelllinien gewinnen. Dies wurde bereits anderweitig beschrieben (Moosmann 2002). Für alle 7 Probanden fanden wir mit diesem Protokoll im Zytotoxizitätstest eine Lyse von über 25% (E : T Ratio von 20:1). Eine von 7 Linien (Pr. 7) zeigte dabei einen höheren Level an unspezifischer Reaktivität gegen allogene Zellen (24% Lyse bei einer E : T Ratio 20:1) und gegen die NK-sensitive Zelllinie K 562. Der CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellanteil lag bei



dieser Linie mit 23% weit über dem durchschnittlichen NK-Zellanteil für Protokoll III. Es ist bekannt, dass NK Zellen zu einer unspezifischen und nicht HLA-abhängigen Lyse führen können (Rooney 1998). Bisher sind keine negativen Effekte durch die Infusion von NK-Zellen bekannt. Aber auch die Depletion dieser Subpopulation ist möglich - z. B. mit Hilfe magnetischer AK. Durch Hinauszögern der IL-2 Zugabe, welches je nach Protokoll ca. am Tag 10 nach Zellkulturbeginn zugesetzt wird, kann der CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> Zellanteil ebenfalls vermindert werden, da diese Subpopulation auf Fehlen dieses Zytokins schneller mit Apoptose reagiert als CD3<sup>+</sup> Zellen (Khanna 1999). Im Fall der Zelllinie des Proband 7 könnte die Zelllinie NK-Zell-depletiert und anschließend die Alloreaktivität erneut geprüft werden. Demgegenüber vorzuziehen wäre eine primäre Zellgenerierung mit einem geringen NK-Zellanteil.

### **5.3 Multispezifität durch OPP-Stimulation**

Die natürliche Immunantwort richtet sich gegen ein breiteres Spektrum verschiedener Epitope und Antigene, wobei einige wenige Epitope alleine eine starke T-Zellantwort hervorrufen können (siehe 1.3.2). Im Fall von HCMV ist nach heutigem Wissenstand pp65 das immunrelevanteste Antigen für viele, aber nicht für alle Personen. Dabei ist die Immunantwort fast immer gegen mehrere Epitope von pp65 gerichtet. Bisherige T-Zellgenerierungsstrategien, die sehr häufig auf Einzelpeptiden, aber auch auf Tetrameren oder künstlichen APCs basieren, erfassen dabei nur ein einzelnes Epitop, welches zwar durchaus auch oligoklonale T-Zellantworten hervorrufen kann. Kommt es allerdings zu einer Mutation, kann der Austausch einer einzigen Aminosäure ausreichen, dass diese mono- bis oligoklonalen T-Zellen dieses Epitop und damit das Pathogen nicht mehr erkennen. Durch die Infusion solcher einzelspezifischen T-Zellklone entsteht zusätzlich ein Selektionsdruck, der die Entwicklung von Mutationen und Immunescape-Mechanismen begünstigt, ähnlich wie bei der Resistenzentwicklung im Rahmen von antibiotischer Behandlung (Gottschalk 2001; Elkington 2003; Midgley 2003; Khong 2004).

Durch den Einsatz der Peptidbibliothek stimulierten wir die Lymphozyten mit allen möglichen Epitopen des pp65. Wir untersuchten 3 der 8 generierten T-Zelllinien aus Protokoll I bezüglich einer multispezifischen Reaktion durch Epitopmapping-Experimente. Dabei fanden wir für alle Probanden eine multispezifische T-Zellantwort gegen 2, 4 und 5 Einzelpeptide, und eine stärkere Reaktion auf den Gesamtpeptidpool von pp65. Dies zeigt, dass durch den Einsatz von OPPs tatsächlich multispezifische T-Zelllinien generiert werden konnten, und die Multispezifität auch nach 25 Tagen In-vitro-Kultivierung erhalten bleibt.

Wir untersuchten das Spektrum der T-Zellreaktivität dieser Probanden vor der T-Zellgenerierung und verglichen die Ergebnisse mit denen am Ende der Kulturzeit, um zu überprüfen, ob es durch die Expansion zu einem Verlust von Epitopspezifitäten der T-Zellen kam. Dabei zeigte sich kein Verlust in der Multispezifität der T-Zellreaktionen. In einem Fall ließ sich ein schwach reagierendes Epitop nach der Expansion nicht mehr nachweisen, statt dessen fanden wir jedoch zusätzlich ein neues Epitop mit einer T-Zellantwort. Dies liegt darin, dass die T-Zellfrequenzen gegen dieses Epitop vor der Zellexpansion unterhalb der Nachweisgrenze lagen, durch die Expansion aber nachweisbar wurden. Dadurch wird vermutlich die Multispezifität der T-Zellantworten in vielen Fällen noch weit unterschätzt, und kann durch unsere neue Herstellungsstrategie verbessert werden.

Zusätzlich testeten wir die 3 Probanden mit dem HLA-Typ A 02 auf ihre Antwort gegen das bekannteste pp65 Peptid AS 495-503 durch Tetramerfärbung. Obwohl wir zuvor nachgewiesen hatten, dass diese Linie eine pp65-spezifische Lysefähigkeit besaßen, zeigte nur eine dieser 3 Linien eine eindeutige Antwort auf diese Tetramerfärbung (mündliche Mitteilung durch Dr. Hammer 2004). Auch Kleihauer et al. (2001) hatten mit diesem Peptid nur in 6 von 14 HLA-A2 Probanden antigenspezifische T-Zelllinien herstellen können (siehe 5.1). Dies zeigt nochmals deutlich, dass die hypothetischen und vorhergesagten Peptidmotive praktisch wenig relevant sind. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass es trotz unzähliger Untersuchungen der letzten Jahrzehnte über pp65 und seine Immunantwort immer noch neue und bisher unbekannte Epitope gibt, die für die Immunantwort des Einzelnen eine entscheidende Rolle spielen. Die Bedeutung von Algorithmen zur Vorhersage von Peptidmotiven sowie Epitopmapping-Experimente im Rahmen von T-Zellgenerierungsstrategien sind deshalb wenig nützlich und den überlappenden Peptidbibliotheken weit unterlegen.

## 5.4 T-Zellhilfe

Zu den Faktoren, die eine längerfristige Erhaltung der Immunität und die Entwicklung bzw. Re-Etablierung der Gedächtnisfunktion beeinflussen, gehört das **Zusammenspiel** der **CTLs** mit **CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen**. Viele Autoren führen als Beweis die klinische Studie von Walter et al. (Walter 1995) an. Nach 4-maliger Infusion spezifischer CTLs zeigten Patienten, deren CD8<sup>+</sup> Antwort kontinuierlich abnahm, auch keine Erholung ihrer HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen. Gleichzeitig kann aber eine stärker immunsuppressive Behandlung bei GvHD in dieser Patientengruppe zu einer Abnahme der Anzahl und Wirkung infundierter T-Zellen geführt haben. Da sich diese Patientensubgruppen überschneiden, ist ein definitiver Beweis für die Funktion der CD4<sup>+</sup> Zellen in diesem Zusammenhang nicht gegeben.

In Mäusen mit lymphotropher Choriomeningitis-Virusinfektion konnte durch experimentelle Depletion ihrer CD4<sup>+</sup> Zellen modellhaft eine Verminderung der CD8<sup>+</sup>-Zellen gezeigt werden. Obwohl nicht alle CD8<sup>+</sup> Zellen aus dem Blut verschwanden, verloren sie ihre Effektorfunktionen und waren somit nicht zur Ausheilung der Infektion in der Lage (Matloubian 1994; Kalams 1998; Zajac 1998a). Auch andere Ergebnisse und klinische Studien beim Menschen, z. B. im Rahmen von EBV-Infektion, EBV-induzierten Lymphomen (Heslop 1996; Rooney 1998; Ho, WY 2002) oder bei HIV-Infektion (Brodie 1999) suggerieren, dass die zusätzliche Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> Zellen die Wirksamkeit der Zellinfusionen verlängert. Die Bedeutung der Kooperation zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen liegt dabei nicht nur in der anhaltenderen Immunität, sondern auch im Erhalt und der Verbesserung der Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> Zellen. Insbesondere im Rahmen chronischer viraler Infekte sind T-Helferzellen zur Unterstützung und Erhaltung zytotoxischer Effektorzellen wichtig.

**IL 2** hat in vivo eine ähnliche Wirkung wie die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> Zellen und kann diese dadurch teilweise ersetzen. Aktivierte CD4<sup>+</sup> Zellen wirken zum einen durch Sekretion von IL2 und anderen Zytokinen, IL2 wiederum stimuliert das Wachstum der CD4<sup>+</sup> Zellen und die Funktion der CD8<sup>+</sup> Zellen (Cheever 1982; Matloubian 1994; Hunziker 2002). Dudley et al. zeigte (Dudley 2002) durch Infusion von CTLs zusammen mit hohen Dosen von IL2 in Melanom-Patienten, dass eine starke Expansion infundierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit erhaltener Effektorfunktion erreicht werden kann. Hierbei gilt zu bedenken, dass im Kontext Organ- und KM-transplantierte Patienten, die eine Immunsuppression benötigen, IL2 - besonders in hohen Dosen - zu einer GvHD führen kann (Janeway 2005).

Zur **Generierung von CD4<sup>+</sup> Zellen** ist eine Antigenpräsentation über die auf APCs vorkommenden MHC-II-Moleküle nötig. Aktuelle GMP-gerechte Herangehensweisen, die z. B. auf Einzelpeptiden oder Tetrameren basieren, sind dazu bisher nicht in der Lage (Kleihauer 2001; Szmania 2001; Bissinger 2002). Peptidbibliotheken aus 15-mer Peptiden stimulieren hingegen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen genauso effektiv wie Gesamtprotein (Maecker 2001). In Epitop-Mapping-Experimenten mit dem OPP von pp65 konnte Kern et al (Kern 2002) bei 83% der HCMV-seropositiven Probanden eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort und bei 63% eine CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort feststellen (n=40). Dies belegt, dass OPPs sowohl CTLs als auch T-Helferzellen stimulieren.

Innerhalb der T-Helferzellen werden mehrere **Subtypen** unterschieden, von denen die beiden wichtigsten die Th1 und Th2 Zellen sind (Mosmann 1986). Erstere sezernieren vor allem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL2 und unterstützen damit die zelluläre Immunantwort, indem sie das Wachstum und die Differenzierung diverser Lymphozyten fördern. Letztere stärken durch andere Zytokine

wie IL4, IL5, IL6 und IL13 die humorale Immunität. In Tiermodellen hat sich die isolierte Infusion von Th1-Zellen als nützlich gezeigt, der isolierte Transfer der Th2-zellen war dagegen zum Teil mit vermehrter Entzündungsreaktion und erhöhter Morbidität verbunden (Alwan 1994; Graham 1994; Riddell 1997). In Menschen wurden solche Versuche nicht durchgeführt. Es ist aber möglich, dass bestimmte Subsets von T-Zellen analog schädlich sein könnten. Da neben den CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch der Th1-Subtyp der CD4<sup>+</sup> Zellen, aber nicht der Th2-Subtyp der CD4<sup>+</sup> Zellen IFN- $\gamma$  sezernieren kann (Riddell 1997; Burmester 1998; Janeway 2005), werden letztere im IFN- $\gamma$ -Sekretion-Assay nicht selektiert. Das Fehlen der CD4<sup>+</sup> Th2 Zellen ist dabei möglicherweise günstig

Wie theoretisch zu erwarten stellten wir im **neuen Protokoll I** tatsächlich einen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Anteil der T-Zelllinien fest, der auch nach Expansion in vitro erhalten blieb. Es waren große interindividuelle Schwankungen der Immunphänotypen zu beobachten. Einige Zelllinien - vor allem aus Protokoll I - bestanden in der Mehrzahl aus T-Helferzellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass manche Probanden überwiegend pp65-spezifische T-Helferzellen besitzen, aber wenige bis gar keine pp65-spezifischen CTLs, oder umgekehrt (siehe 1.3.2). Trotzdem war eine gute zytotoxische Spezifität dieser Linien zu beobachten. In der Literatur sind CD4<sup>+</sup> MHC-II-abhängige zytotoxische Zellen beschrieben, die vermutlich über Exozytose von Granulysin wirken (Sun 2002). Um dies zu untersuchen, wiederholten wir einige Zytotoxizitätstests unter Zusatz von MHC-I-blockierenden AK. Dabei fanden wir bei den CD8<sup>+</sup> dominierten T-Zelllinien eine Hemmung ihrer Lysefähigkeit. Bei Zelllinien, die überwiegend aus CD4<sup>+</sup> Zelllinien bestanden, kam es zu keinem Einfluss durch die MHC-I-blockierenden AK. Eine Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass es sich bei den CD4<sup>+</sup> dominierten Zelllinien tatsächlich teilweise um CD4<sup>+</sup> zytotoxische Zellen handelt. Es könnte aber auch eine verbesserte Effektorfunktion der CTLs durch die T-Helferzellen ihre geringere Anzahl kompensieren. Nicht alle Fragen bezüglich dieses Aspektes sind geklärt. Das ideale Verhältnis der Immunphänotypen zueinander steht nicht fest. Es kann aber durch Depletion oder Selektion – z. B. mit Hilfe magnetischer Beads – manipuliert und angepasst werden. Die T-Zelllinien aus **Protokoll III** besaßen, wie bereits zuvor beschrieben, ebenfalls CTLs und T-Helferzellen. Dies ist durch die Präsentation der Antigene im MHC-I und MHC-II-Kontext der LCLs nachzuvollziehen.

Werden im adoptiven Transfer ausschließlich CTLs transfundiert, kann auch eine endogene Erholung der Helferzell-Antwort zu einem anhaltenden klinischen Effekt verhelfen. Ist dies nicht gegeben, können mehrfache hochdosierte CTL-Infusionen während besonders vulnerabler Zeiträume – z. B. Tag 30 bis 100 bei KM-Transplantierten - zur Kompensation verringerten Überlebens und verringerter Funktion der CTLs eingesetzt werden. Dies erfordert eine erfolgreiche und effiziente Expansion der Zellen.

## 5.5 Biosicherheit

Bedeutende Voraussetzungen für eine klinische Anwendung in vitro generierter T-Zellen liegen in einer biosicheren und qualitätsbeständigen Herstellungspraxis. Diese Standards sind in den sogenannten **GMP-Richtlinien** festgeschrieben. Für viele bisher in vitro verfolgte Methoden ist eine Einhaltung der GMP-Richtlinien mit großen Schwierigkeiten verbunden. Eine der Hauptschwierigkeiten liegt in der **spezifischen Stimulation** der T-Zellen. Um die T-Zellrezeptoren HLA-unabhängig zu stimulieren, werden vielfach autologe oder transgene APCs in Kombination mit viralen Lysaten, rekombinanten Proteinen oder mittels adeno- und retroviraler Vektoren zur Antigenpräsentation eingesetzt. Durch die Anwesenheit infektiöser Partikel besteht die Gefahr einer Übertragung und Infektion des Patienten, die sich auch durch Testung nicht mit Sicherheit ausschließen lässt. Eine zuverlässige und beständige Qualität mit diesen Methoden zu erreichen ist ebenfalls kritisch, da die APCs in Menge, Funktion und Zustand stark von Patient zu Patient variieren können. Ein Transfer unter die strengen GMP-Leitlinien ist mit solchen Methoden sehr schwierig zu realisieren.

Um die Biosicherheitsaspekte für die T-Zellgenerierung zu verbessern, wurden Strategien entwickelt, die ohne virale Bestandteile funktionieren. Dazu gehören neben Tetrameren und künstlichen APCs insbesondere die aktuell häufig verwendeten **Einzelpeptide**, mit denen autologe APCs zur Antigenpräsentation gepulst werden. Die Herstellung von Peptiden ist problemlos unter GMP-Richtlinien möglich. Zu den Grenzen dieser Methoden gehört, dass ausschließlich CD8<sup>+</sup> Lymphozyten gewonnen werden, und ein Detailwissen über individuelle, HLA-Typ-abhängige Peptidsequenzen vorausgesetzt wird. Dieses Wissen liegt nicht vor, und computerbasierte Vorhersage-Algorithmen für Peptidmotive sind nicht zuverlässig (siehe 1.3.2). Das gleiche Problem ergibt sich für die synthetisch hergestellten Tetramere und die künstlichen APCs. Außerdem können mit diesen Methoden nur Einzel-Epitop-spezifische T-Zelllinien hergestellt werden. Die Multispezifität der generierten T-Zelllinien wird von immer mehr Arbeitsgruppen als Notwendigkeit angesehen (Gottschalk 2001; Elkington 2003; Khong 2004).

Die von uns **entwickelte Methode I** basiert auf Peptidbibliotheken. Diese sind in Aspekten der Biosicherheit unbedenklich, können T-Zellen HLA-Typ unabhängig stimulieren. Es werden multispezifische Antworten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten generiert. Eine weitere Expansion kann ohne Anwendung viraler oder gentechnisch veränderter Bestandteile durch die weniger problematischen PBMCs erreicht werden. Dadurch vereinfacht sich eine Implementierung des Protokolls unter GMP-Richtlinien. Die Herstellungsqualität und der Einsatz von OPPs ist ohne Schwierigkeiten kontrollierbar. Längerfristig wäre die Anwendung in einem geschlossenen und automatisierten System wünschenswert, um die Biosicherheit und eine

Qualitätsbeständigkeit zu gewährleisten. Die für diese Strategie benutzten Komponenten, insbesondere zur IFN- $\gamma$ -Stimulation und zur magnetischen Selektion, sind zurzeit bereits zur Anwendung in einem geschlossenen System auf dem Markt erhältlich und werden kontinuierlich weiter entwickelt. Im geschlossenen System wird das Risiko der Kontamination minimiert und die Standardisierung erleichtert.

In **Protokoll II und III** kommen transgene pp65 mini-LCLs zur Anwendung. Trotz der verbesserten Biosicherheit des teilungsdefizienten EBV-Vektors im Vergleich zu retro- und adenoviral modifizierten LCLs sind die Kulturbedingungen und der Transfer zur GMP-gerechten Arbeitsweise aufwendig sowie zeit- und kostenintensiver als ohne Einsatz potentiell infektiöser Partikel. In Aspekten der Biosicherheit sowie der Organisation der GMP-Implementierung ist damit Protokoll I deutlich überlegen.

## **5.6 Kritische Analyse der Methoden und des Ansatzes**

### **5.6.1 FCS**

Ein kritischer Punkt innerhalb der durchgeführten Versuche ist die Verwendung von FCS als Zusatzstoff im Medium. Aufgrund der Sicherheitsrichtlinien ist eine Anwendung von FCS - zumindest aus Europa - für die Herstellung eines therapeutischen Produkts für den Menschen nicht zulässig. Als eine Alternativen kommt autologes menschliches Serum in Betracht. Dies ist, obwohl eindeutig die beste Alternative, aufgrund der benötigten Mengen schwierig zu realisieren. Andere Möglichkeiten sind allogenes menschliches Serum z. B. als AB-Serum, oder Plasma, welches als FFP nach Sicherheitsstandards getestet in den Blutbanken erhältlich ist. Aus Kostengründen führten wir dennoch die In-vitro-Versuche wie fast alle anderen erwähnten Arbeitsgruppen mit FCS als Zusatz zum Medium durch.

Szmania et al. untersuchten (Szmania 2001) den Einfluss der Zugabe von 10% autologem Plasma im Vergleich zu 10% FCS auf die Generierung von DCs. Obwohl DCs unter anderem stark von dem sie umgebenden Zytokinmilieu abhängen, fanden sie bei beiden Subgruppen vergleichbare Morphologien, Immunphänotypen, und vergleichbare funktionelle Eigenschaften - wie z. B. das Stimulationspotential von Immunantworten. Analog gehen wir davon aus, dass der Unterschied von menschlichen oder bovinen Proteinzusätzen keine entscheidende Veränderung bewirkt. Ein leichter Einfluss lässt sich jedoch sogar innerhalb verschiedener FCS-Chargen durch die natürlicherweise schwankende Qualität erkennen, hat aber in der Regel keine bedeutenden Konsequenzen. Trotzdem stehen im einzelnen weitere Versuche in

größerem Rahmen aus, die Genaueres testen und evaluieren sollen, wie z. B. benötigte Mengenanteile für autologes Serum, AB-Serum, Serumfreie Medien oder FFP.

### 5.6.2 Varianz der Immunphänotypen

Neben interindividuellen Schwankungen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Immunphänotypen waren variable Anteile der CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> Lymphozyten zu beobachten (siehe 5.4). Ein bekannter Faktor, der einen Einfluss auf die phänotypische Entwicklung der Zellen hat, ist die Anwendung von IL2. Insbesondere im Rahmen von Protokoll III sowie bei anderen Methoden, die auf repetitiver Stimulation unselektierter PBMCs basieren (z. B. auch Sun 1999, Moosmann 2002), führt eine zu frühe IL2-Gabe zu einem hohen Anteil an CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> Zellen. Diese Zellen können wiederum zu einer unspezifischen zytotoxischen Aktivität führen (siehe 5.6.3). Auch in Protokoll I und II können Unterschiede der Immunphänotypen auf den Einfluss und eine ungleichmäßige Aktivität von IL2 zurückzuführen sein. Obwohl immer die gleiche Menge an IL2 eingesetzt wurde und das Medium in gleichen Zeitabständen erneuert wurde, ist aufgrund der Instabilität dieses Zytokins eine verschieden starke Aktivität denkbar. Durch den Einsatz z. B. von magnetischen Beads können einzelnen Subpopulationen der Lymphozyten voneinander separiert und räumlich getrennt weiterkultiviert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, das Verhältnis des CD4<sup>+</sup>-, des CD8<sup>+</sup>-, und des CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> Zellanteils zueinander so zu beeinflussen, wie es erforderlich ist.

### 5.6.3 Zytotoxizitätstest

Jede Zelllinie muss vor Infusion in den Patienten zu dessen Sicherheit in vitro auf ihre spezifische Effektorfunktion sowie auf ihr allo- und autoreaktives Potential getestet werden. Dies kann - wie in dieser Arbeit - durch einen Zytotoxizitätstest geschehen. Dafür sind geeignete autologe und allogene Zielzellen erforderlich. Als **autologe Ziele** für eine spezifische Lyse verwendeten wir unter anderem pp65 mini-LCLs. Theoretisch handelt es sich um physiologischere Zielzellen als peptidgepulste PBMCs, da sie endogen prozessiertes pp65 Antigen exprimieren. Da allerdings eine Herstellung von pp65 mini-LCLs für unser Protokoll I ansonsten nicht notwendig ist und eine Herstellung dieser Zelllinien insgesamt sehr aufwendig ist, ist eine andere Möglichkeit zur Testung der spezifischen Lyse vorteilhafter. Als Alternative kommen autologe APCs in Frage, die exogen mit den OPPs beladen werden können. Als APCs können dabei neben PBMCs auch autologe wt-LCLs oder B-Blasten verwendet werden, die im Gegensatz zu den mini-LCLs deutlich einfacher und schneller herzustellen sind. In vergleichenden Experimenten zeigte sich, dass es keine Unterschiede in der Evaluierung der

Lysefähigkeit von beladenen wt-LCLs als Zielzellen im Vergleich zu pp65 mini-LCLs gibt (Daten nicht gezeigt).

Die **Alloreaktivität**, die durch allogene wt-LCLs als Zielzellen bzw. in 2 Fällen zusätzlich durch allogene PHA-Blasten getestet wurde, zeigte in mehreren Fällen eine signifikante Lyse dieser Zellen (definiert als > 20% Lyse bei einer E : T Ratio von 20 : 1). Eine Lyse von allogenen, „mismatch“ LCLs kann allerdings auch eine unspezifische LAK-Aktivität anzeigen (Rooney 1998). Tatsächlich fand sich bei den alloreaktiven Zelllinien ein hoher NK-Zellanteil und zusätzlich eine Lyse der NK-sensitiven Zelllinie K562. Vermutlich ist die Alloreaktivität in dieser Arbeit zu einem großen Teil durch die unspezifische HLA-unabhängige NK-Zellaktivität bedingt und deshalb überbewertet. Trotzdem würde man aus Sicherheitsgründen bei Zelllinien mit signifikanter Lyse allogener Zellen auf eine Infusion in Patienten verzichten. Alternativ kann eine Depletion der T-Zelllinien von den CD3- CD16+ Zellen die unspezifische Lyse zu akzeptablen Werten herabsetzen. Bisher sind allerdings auch keine negativen Effekte durch Infusion von LAK-Zellen bzw. von NK-Zellen bekannt. Es gibt sogar neuere Arbeiten, die einen therapeutischen Nutzen von NK-Zellen für die adoptive Immuntherapie bestimmter Tumorerkrankungen zeigen (Ishikawa 2004).

#### 5.6.4 Auswahl von pp65 als Zielantigen

Das Matrixprotein pp65 wird oft als das bedeutendste Antigen für die Immunreaktion gegen HCMV bezeichnet (McLaughlin-Taylor 1994; Wills 1996). Das Genom von HCMV ist jedoch sehr groß und eine Immunantwort ist auch gegen andere Virusproteine möglich. Die Bedeutung von **IE-1** ist zwar schon lange bekannt (Borysiewicz 1988), wurde aber als Nicht-Struktur-Protein vernachlässigt bzw. unterschätzt (Kern 1999; Retiere 2000). Durch methodische Verbesserungen konnten CTL-Antworten gegen pp65 und IE-1 in Bezug auf einzelne Epitope genauer untersucht und quantifiziert werden. Dabei zeigte sich eine ähnliche Bedeutung beider Proteine. Kern et al. (1999) untersuchten 12 Probanden hinsichtlich ihrer CTL-Antwort. 4/12 (33%) reagierten gegen pp65 und IE-1, 5/12 (42%) reagierten ausschließlich auf pp65. 3/12 (25%) Probanden zeigten nur eine Antwort gegen IE-1, das heißt, sie besaßen keine pp65-reaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Pp65 als alleiniges Zielantigen reicht deshalb nicht, um eine effektive Immunantwort bei allen Probanden auszulösen. In dieser Arbeit konnte mit Protokoll I bei Proband 4 keine spezifische T-Zelllinie generiert werden. Eine wahrscheinliche Erklärung ist das Fehlen von pp65-reaktiven Precursor-Zellen in diesem Probanden. Kern et al. stellten in der erwähnten Studie fest, dass alle Probanden, die keine Reaktion auf pp65 zeigten, HLA-A 2 und B7 negativ waren. Auch Proband 4 war HLA-A 2 und B 7 negativ und stattdessen HLA-Typ A1 B25. Dadurch, dass die meisten der nicht auf pp65 reagierenden HCMV-seropositiven Probanden auf IE-1 reagieren (Kern 1999; Gyulai 2000; Kern 2000), ist eine **Peptidbibliothek**,



die sowohl IE-1 als auch pp65 umfasst, für diese Probanden von Vorteil. Zusätzlich lässt sich auch für die anderen Probanden eine breitere T-Zellantwort erreichen. Da Peptidbibliotheken für IE-1 bereits etabliert sind, ist ein kombinierter Einsatz der OPPs von pp65 und IE-1 einfach zu verwirklichen und in Zukunft wünschenswert.

### 5.6.5 HCMV-seronegative Spender

Bisher gibt es keine zuverlässige und ausreichende Methode, aus seronegativen Spendern antigenspezifische T-Zellen herzustellen. Keenan et al. (Keenan 2001) versuchten, aus HCMV-seronegativen Probanden des HLA-Typs A 2 mit Hilfe der dafür bekannten Peptidsequenz HCMV-spezifische T-Zellen herzustellen. Auch nach 2-facher Selektion gelang dies in keinem der 3 Probanden, im Gegensatz zum Erfolg in 8 von 10 HCMV-seropositiven Probanden des gleichen HLA-Typs. Szmania et al. konnten in 2 von 10 HCMV-seronegativen Spendern in vitro funktionsfähige Zelllinien herstellen. Bei beiden erfolgreichen Zelllinien verwendeten sie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, während sie bei den anderen 8 ausschließlich von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ausgingen. Sie machten die Tatsache des Fehlens von CD4<sup>+</sup> Zellen der Anfangskultur dafür verantwortlich, dass eine Generierung aus den seronegativen Spendern nicht gelungen war.

Eine große Hoffnung zur Zellgenerierung aus seronegativen Probanden wird auf **Dendritische Zellen** gesetzt, die in vivo als einzige Zellen in der Lage sind, eine primäre Immunantwort auszulösen (Banchereau 1998). Obwohl DCs in vivo in der Lage sind, dieses sogenannte „Priming“ der Immunantwort hervorzurufen, gelingt dies in vitro bisher nicht in ausreichendem Maße. Kleihauer et al. (Kleihauer 2001) beschrieben in 2 von 11 HCMV-seronegativen Spendern die erfolgreiche Generierung von T-Zelllinien mittels peptidgepulster Dendritischer Zellen. Manche Arbeitsgruppen hoffen, durch Identifikation zusätzlicher Faktoren wie z. B. bestimmter Zytokine, die Funktion der DCs für ein „Priming“ in vitro zu verbessern (Peggs, K 2001). Dass es dennoch manchmal gelingt, aus seronegativen Probanden antigenspezifische T-Zellen herzustellen, liegt z. T. daran, dass die Seronegativität nur eine mangelnde humorale Immunität, nicht aber eine fehlende zelluläre Immunantwort bzw. eine erfolgte Exposition widerspiegelt. Bei der erfolgreichen Generierung EBV-spezifischer T-Zellen durch Savoldo et al. zeigte sich bei 3 von 4 EBV-seronegativen Probanden eine positive EBV-Viruslast in der PCR (Savoldo 2002). Diese Probanden besaßen eine EBV-spezifische T-Zellantwort trotz einer negativen Serologie. Eine weitere Möglichkeit, die diese Ergebnisse erklärt, sind kreuzreagierende CTLs, insbesondere bei Erwachsenen, die im Laufe ihres Lebens bereits mit unzähligen Antigenen Kontakt hatten. Bei den bisherigen einzelnen Erfolgen handelt es sich damit eher nicht um ein In-vivo-Priming der Immunantwort. Bei den meisten tatsächlich nicht exponierten Erwachsenen sind die Precursorfrequenzen antigenspezifischer und

kreuzreagierender T-Zellen im Blut extrem niedrig (Bourgault 1991), so dass eine T-Zellgenerierung vorerst nur in Einzelfällen möglich ist.

### **5.6.6 Kosten**

Die Herstellungskosten für einen OPPs setzen sich aus den Synthesekosten für die Einzelpeptide zusammen, und liegen für ein Einzelpeptid um die 10 000 Euro, für den gesamten OPP-Pool damit um die 500 000 Euro - bei einer GMP-gerechten Herstellung. Da aber nur kleinste Mengen für die Herstellung einer T-Zelllinie benötigt werden, liegen die Kosten pro Patient weit geringer bzw. werden mit jeder Anwendung günstiger. Bei einer nicht GMP-gerechten Herstellung lägen die Kosten um ein vielfaches darunter und würden ca. nur 15 000 Euro betragen. Bis jetzt ist noch keine Stellungnahme erfolgt, ob die Peptidbanken unter GMP-Bedingungen hergestellt werden müssen, oder ob sie als Beiprodukte deklariert unter letztgenannten weniger strengen Anforderungen hergestellt werden können.

Berücksichtigt man alle Kosten insgesamt, die bei der Generierung einer T-Zelllinie entstehen, so ergibt sich, dass zum aktuellen Zeitpunkt ein prophylaktischer Einsatz der so generierten T-Zelllinien für alle Risikogruppen - ebenso wie eine prophylaktische Behandlung dieser Patienten mit antiviralen Pharmaka - nicht kosteneffizient ist. Eine Behandlung ist deshalb für diejenigen Risikogruppen sinnvoll und kosteneffizient, die einen Anstieg der Viruslast oder eine HCMV-Erkrankung zeigen, im Sinne einer präemptiven oder einer definitiven Therapie.

### **5.7 Ausblick**

Bei der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Studie in vitro, bei der bisher bekannte Prinzipien adoptiver Immuntherapie berücksichtigt wurden. Das ein Einsatz dieser Zellen auch im Patienten effektiv ist, und dass eine T-Zellgenerierung nicht nur in gesunden Probanden, sondern auch für erkrankte bzw. immunsupprimierte Patienten möglich ist, muss in weiteren Studien untersucht werden. Erste Daten deuten darauf hin, dass dies gelingt. Deshalb gehört es zu den nächsten nötigen Schritten, die generierten T-Zellen in einer In-vivo-Studie zu beurteilen. Der Beginn einer solchen Studie ist für Juni 2006 geplant.

Durch neue Erkenntnisse könnte es möglich werden, die Effizienz infundierter T-Zellen auch in vivo noch zu verbessern. Neuere Studien in Mäusen zeigen, dass durch Zytokine oder Kostimulation eine noch bessere Wirkung erreicht werden kann. Ein konkreter Vorschlag stammt von Bourgeois et al. (Bourgeois 2002). Durch eine gezielte Aktivierung von CD40-Ligand auf den CTLs soll die Entstehung von Gedächtniszellen und eine Verbesserung der Zellfunktion in vivo erreicht werden. Dennoch sind solche Erkenntnisse kritisch zu beurteilen.

Eine inadäquate Stimulation durch Zytokine oder Kostimulation könnte die Qualität infundierter Zellen auch verschlechtern. In einer Studie Listerien-infizierter Mäuse erwarben infundierte T-Zellen innerhalb 1 Woche nach Infusion einen funktionellen Defekt, der zu einem Verlust ihrer Effektorfunktion und ihrer Proliferationsfähigkeit führte (Tuma 2002). Neue Erkenntnisse, die Zusammenhänge der T-Zellaktivierung und - Funktion weiter aufklären, könnten zu verbesserter Effizienz infundierter Zellen in vivo beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lösen wichtige Probleme bisheriger Methoden zur T-Zellgenerierung. Insbesondere ist kein Detailwissen über immunrelevante Epitope nötig, deshalb ist dieses Protokoll nicht auf bestimmte HLA-Typen beschränkt, und die Generierung von zeit- und arbeitsintensiven künstlichen oder transgenen APCs entfällt. Der Transfer unter GMP-Richtlinien ist problemlos möglich und die erforderlichen Komponenten sind bereits auf dem Markt erhältlich. Im Besonderen kann dieses neue Protokoll ohne weitere Veränderungen für andere immunogene Proteine oder Tumoren angepasst und angewendet werden. Deshalb eröffnet diese T-Zellgenerierungsstrategie ein neues Feld mit einem breiten Potential, um letztendlich dem Fortschritt der adoptiven Immuntherapie und damit dem Patienten zu dienen.