

Entwicklung neuer Verfahren zur Herstellung autologer Epstein-Barr Virus-spezifischer T-Zellen zur Adoptiven Immuntherapie

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Andy Römhild
aus Berlin

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Leif-Alexander Garbe
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster
Berichter: Prof. Dr. med. Petra Reinke

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Mai 2010

Berlin 2010
D 83

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die Immunreaktion	2
1.2 Das Epstein-Barr Virus (EBV)	4
1.2.1 Latente und lytische Phase	5
1.2.2 Latenzformen und EBV- assoziierte Krankheitsbilder	7
1.3 Adoptive Immuntherapie virusassoziierter Erkrankungen	8
1.3.1 Die Adoptive Immuntherapie im Rahmen der Guten Herstellungspraxis	10
1.4 Verfahren zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien	12
1.4.1 Verfahren der repetitiven Stimulation	12
1.4.2 Das Mini-EBV System	13
1.4.3 Generierung von T-Zellen mit Hilfe Formalin-fixierter LCL	15
1.5 Prinzip der Antigen-spezifischen Stimulation von T-Zellen durch Peptidpools	17
1.4 Zielstellung der Arbeit	19
2. Material	20
2.1 Reagenzien und Chemikalien	20
2.2 Verbrauchsmaterial	21
2.3 Medien und Puffer	22
2.4 Antikörper	22
2.5 Geräte	24
2.6 Produkte zur magnetischen Zellseparation	25
2.7 Peptidpools	26
3. Methoden	27
3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	27
3.1.1 Depletion CD3 positiver Zellen	27
3.1.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	27
3.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	27
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
3.1.5 Generierung von PHA-Blasten	28
3.1.6 Generierung EBV-transformierter lymphoblastoider B-Zellen	28

3.1.6.1	Kultivierung von lymphoblastoiden B-Zelllinien	29
3.1.7	Bestrahlung von Zellen	29
3.2	Generierung EBV-spezifischer T-Zellen	29
3.2.1	T-Zellgenerierung mittels repetitiver Stimulation	29
3.2.2	T-Zellgenerierung mittels IFN γ Sekretions-Assay	30
3.2.3	Kultivierung und Expansion der T-Zelllinien	31
3.3	Charakterisierung der Zelllinien	31
3.3.1	ELISpot-Analyse der EBV-spezifischen T-Lymphozyten im peripheren Blut	31
3.3.2	Durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächen-Moleküle	32
3.3.3	Analyse der Zytokinproduktion und Degranulationskapazität nach Restimulation	32
3.3.4	Bestimmung des Aktivierungsstatus nach Restimulation	33
3.3.5	Bestimmung des Vb-Repertoires der T-Zelllinien	33
3.3.6	Zytotoxizitätstestung der T-Zelllinien	34
3.3.7	Bestimmung des Zytokinprofils mittels Cytometric-Bead-Array (CBA)	35
3.3.8	Bestimmung der Glukose- und Laktat-Konzentration	36
3.3.9	Statistische Analysen	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Vergleichende Analyse der Generierungsmethoden	37
4.1.1	ELISpot	37
4.1.2	Zellzahl nach Expansion und Kultivierungsdauer	39
4.1.3	Phänotyp nach Expansion	40
4.1.4	Analyseschema der Multiparameter-Durchflusszytometrie	41
4.1.5	Lymphknoten Homing und Differenzierungsstatus	43
4.1.6	Antigenspezifität und Aktivierungsstatus nach Restimulation	44
4.1.7	Effektorfunktion EBV-spezifischer T-Lymphozyten	45
4.1.8	Multifunktionale T-Zellen	47
4.1.9	Lytische Kapazität	48
4.1.10	Immundominanz latenter Antigen	49
4.1.11	Analyse des Vb-Repertoires der T-Zellrezeptoren	52
4.1.11.1	Anzahl der Vb-Expansionen und Vb-Expansionsstärke	52
4.1.11.2	Bestimmung des Differenzierungsstatus der expandierten Vb-Klone	54
4.1.11.3	Bestimmung der expandierten Vb-Klone	54

4.2	Adaption der T-Zellexpansion an ein geschlossenes Kultursystem	56
4.2.1	Auswahl des Kultursystems	56
4.2.2	Anpassung der Kulturführung an die Expansion in Zellkulturbeuteln	58
4.2.3	Verfahrensoptimierung	60
4.2.3.1	Minimierung der Startzellzahl	61
4.2.3.2	Phänotyp nach Expansion in Zellkulturbeuteln	62
4.2.3.3	Differenzierungsstatus nach Expansion in Zellkulturbeuteln	63
4.2.3.4	Effektorfunktion nach Restimulation	64
4.2.3.5	T-Lymphozyten mit multifunktionaler Wirkung	66
4.3	Anwendung des Generierungs- und Expansionsverfahrens auf Patientenmaterial	67
4.3.1	Phänotyp und Differenzierungsstatus der Patienten-Zelllinien	68
4.3.2	Effektorfunktion nach spezifischer Restimulation	68
4.3.3	Multifunktionalität	69
5. Diskussion		71
5.1	Vergleichende Analyse der Generierungsmethoden	72
5.1.1	Indirekte Schutzfunktionen der T-Zellen	74
5.1.2	Direkte Schutzfunktionen der T-Zellen	75
5.1.3	Schutzfunktionen der T-Zellen gegen Evasionsmechanismen des Virus	77
5.2	Adaption der T-Zellexpansion an ein geschlossenes Kultursystem	78
5.3	Anwendung des Generierungs- und Expansionsverfahrens auf Patientenmaterial	81
5.4	Ausblick und weiteres Optimierungspotential	83
6. Zusammenfassung		86
7. Literaturverzeichnis		88
8. Publikationsliste		94
8.1	Kongressbeiträge	95
9. Danksagung		96
10. Abkürzungsverzeichnis		97
11. Maße und Einheiten		99

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt einen gesunden Organismus vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen sowie malignen körpereigenen Zellen. Es hat somit die Fähigkeit zwischen körpereigenen, körperfremden und körpereigenen, aber krankhaft veränderten Strukturen zu unterscheiden. Zur Eliminierung als fremd erkannter Strukturen werden spezifische Abwehrreaktionen bzw. eine Immunantwort in Gang gesetzt, die zumeist auf dem Zusammenspiel eines komplexen Netzwerks aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen beruht. Man kann zwischen angeborener und erworbener (adaptiver) Immunität unterscheiden, wobei beide letztlich ein eng interagierendes Abwehrsystem bilden.

Die angeborene Immunantwort basiert auf Komponenten wie dem Komplementsystem, Phagozyten (Makrophagen, Dendritische Zellen), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und löslichen Mediatoren, die diverse Effektormechanismen vermitteln. Sie dient der frühzeitigen Erkennung und sofortigen Bekämpfung von Pathogenen, ist weitestgehend unspezifisch und führt nicht zu einer anhaltenden schützenden Immunität. Ferner wird die Auslösung und Steuerung der zeitlich verzögert einsetzenden adaptiven Immunantwort durch die angeborene Immunität beeinflusst.

Die spezifische adaptive Immunantwort verstärkt und fokussiert die angeborene Immunantwort und führt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Dies erlaubt dem Organismus eine schnellere und wirksamere Reaktion auf einen erneuten Infekt mit dem gleichen Pathogen. Das adaptive System kann in humorale und zelluläre Bestandteile unterschieden werden. Beide basieren auf der klonalen Selektion von B- und T-Lymphozyten mit einem weiten Repertoire hochspezifischer Antigen-Rezeptoren, die sie zur Erkennung diverser Pathogene befähigen. So kann aus einem breiten Spektrum an Effektormechanismen eine Antigen-spezifische Reaktion induziert werden.

Die humorale Immunantwort kann gegen eine fast unlimitierte Anzahl chemischer Antigene gerichtet sein. Sie wirkt durch lösliche Zytokine und Antikörper, die von B-Lymphozyten sezerniert werden. Diese löslichen Faktoren vermitteln durch Antikörperspezifitäten sowie –diversitäten die Erregerabwehr gegen z.B. Mikroorganismen, Toxine und Viren. Die Antikörper binden bzw. markieren ein Pathogen,

das später durch akzessorische Zellen und Moleküle erkannt und entfernt wird. Das Komplementsystem der angeborenen Immunität kann hierbei verstärkend wirken, indem es die Schwelle zur Aktivierung der humoralen Antwort herabsetzt.

Zweiter Bestandteil der zellulären Immunantwort sind die T-Lymphozyten. Diese können anhand der Expression eines charakteristischen Oberflächenmoleküls in CD4 und CD8 positive T-Zellen unterteilt werden. Primär CD8 pos. T-Zellen töten virusinfizierte Zellen ab und werden deshalb auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. CD4 pos. T-Zellen werden in T-Helfer Zellen vom Typ 1 und 2 (Th1 und Th2) sowie T-regulatorische Zellen (Treg) unterschieden. Alle drei Subtypen dienen in erster Linie der Koordination einer Immunreaktion. Th1-Zellen führen dabei durch Aktivierung und Stimulierung eher zu einer Verstärkung der zellulären Immunität, während Th2-Zellen eher die Antikörperproduktion und damit die humorale Immunantwort stimulieren. Treg-Zellen können eine inhibitorische Wirkung auf aktivierte T-Zellen haben und somit auch zur Abschaltung einer Immunreaktion beitragen. Außerdem haben sie eine Funktion bei der Unterdrückung von Überreaktionen des Immunsystems gegen ansonsten ungefährliche Antigene.

1.1.1 Die Immunreaktion

Krankheitserreger, die die mechanischen Barrieren (z.B. Haut) mit denen sich ein Organismus vor einer Infektion schützt überwunden haben, sind Auslöser der Immunantwort. Der Ablauf der Immunreaktion ist davon abhängig, ob das Immunsystem zuvor bereits mit dem Erreger in Kontakt gekommen ist.

Bei Erstinfektionen wird zunächst das angeborene Immunsystem aktiviert. Dies geschieht meist durch Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells; APC). Dendritische Zellen, Makrophagen, aber auch B-Lymphozyten (B-Zellen) können als APC fungieren und T-Zellen stimulieren. Sie haben somit eine wichtige Funktion bei der Vermittlung von Immunität zwischen Antigen und Effektorzellen (T- und B-Lymphozyten). Die Antigenpräsentation erfolgt über spezielle, Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) genannte, Glykoproteine. Im humanen System spricht man hierbei vom HLA (humanes Leukozyten-Antigen)-System. Die MHC-Moleküle mit ihren jeweiligen Untereinheiten bilden eine längliche Bindungsfurche, in der

Antigenbruchstücke in Form von Peptiden über nichtkovalente Wechselwirkungen gebunden werden (s. Abb. 1). Man unterscheidet zwischen MHC-Klasse I (MHC-I) und MHC-Klasse II (MHC-II) Molekülen. MHC-I Moleküle werden mit Peptiden aus dem intrazellulären Abbau beladen und von CD8 pos. T-Zellen erkannt. Im Falle Tumor- oder virusinfizierter Zellen wird somit sichergestellt, dass auch Peptide der Virus- bzw. Tumorspezifischen Proteine gegenüber den T-Zellen präsentiert werden. MHC-II Moleküle präsentieren Membran-, zytosolische- oder extrazelluläre Proteine und interagieren mit CD4 pos. T-Zellen.

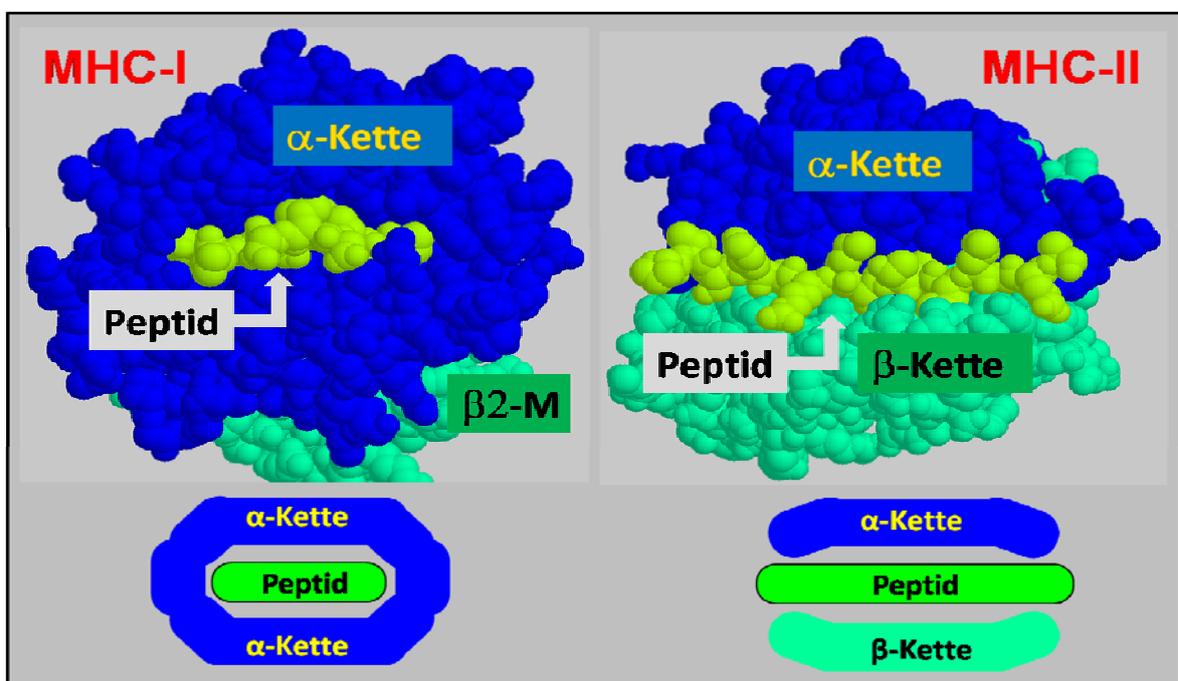


Abb. 1: Schematische Darstellung von MHC-I und MHC-II Molekülen. Auf der linken Seite ist ein, mit einem Peptidstück, beladenes MHC-I Molekül zu sehen. Es besteht in erster Linie aus einer α -Kette, die die Bindungsfurche bildet. Rechts ist ein beladenes MHC-II Molekül zu sehen. Es ist aus einer α - sowie einer β -Kette aufgebaut, die zusammen eine an beiden Enden offene Antigenbindungsstelle bilden.

Die Geometrie der Peptidbindungsfurche eines MHC-Moleküls ergibt eine charakteristische Ligandenlänge von meist neun Aminosäuren für MHC-I und 9-25 Aminosäuren für MHC-II Moleküle. Die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes erfolgt über den T-Zellrezeptor (T cell receptor; TCR). Dieser spezifische Rezeptor erkennt sowohl Merkmale des Peptidantigens, als auch des MHC-Moleküls. Durch die

Oberflächenmoleküle CD4 und CD8, die neben dem TCR als so genannte Korezeptoren agieren, wird die Empfindlichkeit der T-Zellen gegenüber dem Antigen erhöht. Für eine vollständige Aktivierung einer T-Zelle ist jedoch meist ein zusätzliches Signal notwendig. Dieses wird durch kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD80 (Glykoprotein B7.1) oder CD86 (Glykoprotein B7.2), auf den APC vermittelt. Normalerweise kommt es erst bei Bindung der kostimulatorischen Moleküle an die entsprechenden Membranproteine des T-Zellrezeptors (CD28 und CD152) zu einer vollständigen Aktivierung und damit zur Effektorfunktion, Proliferation oder Differenzierung der T-Zellen.

Alle T-Zellvorläufer werden im Knochenmark gebildet, wandern dann in den Thymus und durchlaufen dort Selektionsprozesse. Der Organismus erzeugt zunächst durch genetische Rekombination eine große T-Zelldiversität. Zellen, die Immunreaktionen auf körpereigene Strukturen veranlassen, werden entfernt (negative Selektion), so dass nur solche T-Zellen im Körper verbleiben, die Fremdstrukturen im Kontext der MHC-Moleküle erkennen (positive Selektion). Zusätzlich kann es in der Peripherie zur Inaktivierung autoreaktiver T-Zellen durch Anergie kommen. Positiv selektierte T-Zellen zirkulieren im Organismus und passieren dabei die lymphatischen Gewebe (z.B. Lymphknoten) in denen APC in hoher Dichte vertreten sind. Somit wird sichergestellt, dass die patrouillierenden T-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit auch ihr potentiell vorhandenes spezifisches Antigen treffen können. Sollten Krankheitserreger oder Tumorzellen dieser Suche entkommen, spricht man von einem Immun-Escape-Mechanismus.

1.2 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Das Epstein-Barr Virus (EBV) wurde 1964 erstmalig von Michael Epstein, Bert G. Achong und Yvonne M. Barr beschrieben (Epstein, Achong et al. 1964). Es handelt sich hierbei um ein humanpathogenes, ikosaedrisch behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus (172kb) aus der Gruppe der Gamma-Herpesviridae, weshalb es auch den Namen Humanes-Herpes-Virus 4 (HHV 4) trägt.

Die Durchseuchung der erwachsenen Population beträgt >95% (Fujita, Rooney et al. 2008). EBV infiziert B-Zellen und verursacht ein weites Spektrum an akuten und chronischen Infektionen in gesunden sowie immunsupprimierten Individuen. Meist findet die Erstinfektion im Kindesalter über die oralen Schleimhäute statt und verläuft in der

Regel asymptomatisch. Mit steigendem Lebensalter erhöht sich das Risiko des Jugendlichen oder Erwachsenen bei der Primärinfektion an infektiöser Mononukleose (IM; auch bekannt als „Pfeiffer’sches Drüsenfieber“) zu erkranken auf bis zu 50% (Faulkner, Krajewski et al. 2000). Nach dem Abklingen dieser häufigsten Form der EBV-Erkrankung bzw. nach symptomloser Infektion persistiert das Virus lebenslang latent in den Gedächtnis-B-Zellen. Im weiteren Verlauf kann es in gewissen Abständen zu einer Reaktivierung und damit zum lytischen Replikationszyklus des Virus kommen. Dieser kann jedoch vom Immunsystem eines immunkompetenten Wirts problemlos unter Kontrolle gebracht werden, wodurch die Reaktivierungsphasen vom Betroffenen häufig unbemerkt bleiben.

1.2.1 Latente und lytische Phase

Der EBV-Generationszyklus wird in eine latente und eine lytische Phase unterschieden. Während des lytischen Replikationszykluses werden alle Gene, die zur Erzeugung von Viruspartikeln nötig sind, aktiviert. So entsteht in kurzer Zeit eine große Zahl an infektiösen Virionen, die letztlich die Wirtszelle lysieren und nach ihrer Freisetzung neue Zellen infizieren können. Die lytische Phase ist gekennzeichnet durch die Expression von über 80 verschiedenen Genprodukten (Steven, Annels et al. 1997; Rensing, Horst et al. 2008). Charakteristisch für deren Beginn ist die Expression von ZEBRA (BamHiZ-encoded EBV replication trans-activator), einem DNA-bindenden Protein, dass andere Gene der lytische Phase aktiviert (Katz, Baumann et al. 1992). Es ist auch unter dem Namen BZLF 1, Zta und EB 1 bekannt (Amon and Farrell 2005).

Die latente, nicht produktive Phase ist durch den Erhalt des Virusgenoms im Nukleus der infizierten Zelle gekennzeichnet. Infiziert sind in erster Linie ruhende Gedächtnis-B-Zellen. Dies führt u.a. zu einer Immortalisierung der Zellen, verbunden mit einer fortlaufenden Proliferation und steht im gesunden Individuum unter der Kontrolle des Immunsystems. Der Anteil latent infizierter B-Zellen liegt normalerweise bei etwa 1 bis 50 pro 1×10^6 B-Zellen und bleibt in der Regel über viele Jahre konstant (Babcock, Decker et al. 1998; Cohen 2000). Die latente Infektion ist durch eine begrenzte Expression bestimmter RNA (ribonucleic acid; Ribonukleinsäure) und Proteine gekennzeichnet. Zu den Latenzgenen (s. Tab. 1) gehören die sechs nukleären Proteine EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen)-1, EBNA-2, EBNA-3a-c, EBNA-LP (leader protein), drei latente

Membranproteine LMP-1, -2a, -2b sowie die zwei nicht translatierten RNA EBER (Epstein-Barr encoded RNA)-1 und -2.

Tab. 1: EBV-Latenzgene.

Latenzgen	Funktion	Quelle
EBNA-1	Genomerhaltung, bindet den ORI für latente Replikation	(Amon and Farrell 2005)
EBNA-2	Transkriptionsfaktor, reguliert die zelluläre Transformation sowie einzelne Virusgene wie z.B. die LMP	(Kuppers 2003)
EBNA-3a	reguliert (wie alle EBNA) die Funktion von EBNA2	(Amon and Farrell 2005)
EBNA-3b	Transkriptionsregulator	(Amon and Farrell 2005)
EBNA-3c	überwindet Zellzyklus Kontrollpunkte	(Amon and Farrell 2005)
EBNA-LP	co-aktiviert EBNA2 reagierende Gene; erhöht die Immortalisierungseffizienz	(Harada and Kieff 1997)
LMP-1	essentiell für die Immortalisierung von infizierten B-Zellen	(Kaye, Izumi et al. 1993)
LMP-2a	Inhibitor der B-Zellrezeptor Signaltransduktion; blockt viralen lytischen Zyklus; gibt Überlebenssignale	(Longnecker 2000)
LMP-2b	formt Aggregate mit LMP 2a, beeinflusst so dessen Aktivität	(Bornkamm and Hammerschmidt 2001)
EBER-1+2	kann IL-10 Sekretion induzieren	(Kitagawa, Goto et al. 2000)
BART	Funktion bisher unbekannt	(Young and Murray 2003)

1.2.2 Latenzformen und EBV-assoziierte Krankheitsbilder

Anhand der Expression viraler Latenzgene können verschiedene Latenztypen unterschieden werden. In gesunden EBV-positiven Individuen ist in den infizierten Gedächtnis-B-Zellen der Latenztyp 0 nachweisbar. Er ist geprägt durch die Expression von EBER-1, -2 und LMP-2a (Gottschalk, Heslop et al. 2005). Charakteristisch für den Typ 1 sind EBER-1, -2 und EBNA-1 Transkripte. Der Latenztyp 2 steht im Zusammenhang mit der zusätzlichen Expression von LMP-1, -2a und -2b. Die Latenz vom Typ 3 exprimiert außerdem EBNA-2, -3a-c und EBNA-LP (Amon and Farrell 2005). Letzterer Latenztyp ist auch *in-vitro* in EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinien (lymphoblastoid B cell lines; LCL) und EBV-positiven Zellkulturen zu finden (Murray, Kurilla et al. 1992).

In Individuen mit intaktem Immunsystem unterliegt das Epstein-Barr Virus der permanenten Kontrolle EBV-spezifischer T-Zellen, so dass es in der Regel nicht zu klinisch manifestierten lymphoproliferativen Krankheitsbildern kommt. Dennoch ist die Entstehung einiger Erkrankungen mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert.

Das Burkitt-Lymphom (BL), erstmalig 1958 von Denis Burkitt beschrieben, ist ein Beispiel einer aggressiven Erkrankung B-zellulären Ursprungs des Latenztyps 1 (Rowe, Lear et al. 1992). Es ist ein hochgradig malignes Karzinom, dessen stark proliferierende Tumorzellen Lymphknoten und Organe infiltrieren. Man unterscheidet zwischen endemischem, sporadischem und AIDS-assoziiertem BL. Das sporadische BL ist häufig in der westlichen Welt anzutreffen, wohingegen das endemische BL in Gebieten mit hoher Malariainfektion wie Zentralafrika zu finden ist (Khanna, Burrows et al. 1995). Dort ist es die am häufigsten auftretende Tumorerkrankung bei Kindern unter 15 Jahren (Inzidenz 10/10000). BL-Zellen entkommen dem Immunsystem durch verminderte Expression von Zelladhäsions- und MHC-I Molekülen. Ferner werden nur sehr wenige EBV-Antigene exprimiert. Eines davon ist EBNA-1, das zudem durch seine langen Glycin-Alanin Regionen nur sehr ineffizient über MHC-I prozessiert wird (Levitskaya, Sharipo et al. 1997).

Das Hodgkin-Lymphom (HL; Latenztyp 2) ist ein bösartiger Tumor, dessen Ursprung T- oder B-Zellen sein können. Es ist eines der am häufigsten auftretenden malignen Lymphome in westlichen Ländern und in 40-50% aller immunkompetenten Fälle mit der Expression von EBV-Antigen in malignen Reed-Sternberg Zellen assoziiert (Chapman and Rickinson 1998).

Das Nasopharynxkarzinom (Latenztyp 2) ist eine Krebserkrankung des Nasenrachens und meist im ostasiatischen Raum sowie in Nord- und Ostafrika anzutreffen. Es entsteht aus den Epithelzellen des Nasopharynx und ist zu annähernd 100% mit EBV assoziiert. Als wichtige Entstehungsfaktoren werden sowohl Umwelteinflüsse, wie über die Nahrung aufgenommene flüchtige Nitrosamine, als auch genetische Faktoren diskutiert (Poirier, Bouvier et al. 1989).

B-Zell-Lymphome bzw. die EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (Latenztyp 3) treten vornehmlich bei Individuen mit angeborenen oder erworbenen Immundefiziten auf (Pedersen, Gerstoft et al. 1991). Unter erworbenen Immundefiziten versteht man z.B. eine HIV-induzierte Immunsuppression bei AIDS-Patienten oder medikamentös induzierte Immunsuppression nach Organtransplantation zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion. Im letzteren Fall spricht man deshalb auch von einer Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankung oder PTLD (post transplant lymphoproliferative disorder). Gefördert wird diese Art der Erkrankung durch ein Ungleichgewicht zwischen EBV-infizierten B-Zellen und den dazugehörigen EBV-spezifischen T-Zellen, die aufgrund des Immundefizits die EBV-Infektion nicht ausreichend kontrollieren können.

1.3 Adoptive Immuntherapie virusassoziierter Erkrankungen

Unter dem Begriff der Adoptiven Immuntherapie versteht man die Infusion immunkompetenter Zellen, die eine Immunantwort im Körper eines immundefizienten Patienten aufrechterhalten bzw. rekonstituieren können. Sie dient der Prävention oder Therapie bestimmter lebensbedrohlicher Erkrankungen.

Die zu transferierenden Zellen können nach Spezifität isoliert bzw. angereichert sowie *in-vitro* durch Antigenstimulation in Gegenwart wachstumsfördernder Zytokine (z.B. Interleukin 2; IL-2) expandiert und schließlich infundiert werden. Im Gegensatz zur passiven Immunisierung, die humorale Aktivität überträgt, führt der adoptive Zelltransfer zur Übertragung spezifischer zellulärer Immunität.

Erste Hinweise zur Übertragbarkeit von Immunkompetenz wurden durch Lymphozyten-Transferexperimenten an Ratten erlangt (Gowans and Uhr 1966). Bei den Tieren führten die Lymphozytendepletion zum Verlust- und das Re-Infundieren zur Wiederherstellung

der Immunität. Dies identifizierte Lymphozyten als wichtige Mediatoren einer immunologischen Antwort und Träger des immunologischen Gedächtnisses. Im Jahre 1994 wurden Patienten nach Knochenmarkstransplantation (KMT) mit unmanipulierten immunkompetenten Spender T-Lymphozyten behandelt. Hromas et al. konnten auf diesem Weg einen Patienten mit schwerer adenoviraler Infektion heilen (Hromas, Cornetta et al. 1994). Papadopoulos et al. behandelten auf gleiche Weise Patienten mit EBV-assoziierten Komplikationen und konnten über einen Rückgang der Lymphome in allen Patienten berichten (Papadopoulos, Ladanyi et al. 1994). Allerdings kam es im Zuge der Behandlung zum Auftreten von Transplantat-Wirt Reaktionen (graft-versus-host disease; GvHD) sowie opportunistischen Infektionen mit signifikanten Mortalitätsraten. Das hohe GvHD-Risiko dieses Ansatzes war auf den großen Anteil alloreaktiver Zellen zurückzuführen. Zu dessen Vermeidung sowie einer schnelleren Rekonstitution des Immunsystems gingen andere Gruppen zur Generierung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen *in-vitro* über. Philip Greenberg und Stanley Riddell entwickelten etwa 1995 das erste klinische Protokoll zur Adoptiven Immuntherapie mit Cytomegalie-Virus (CMV)-spezifischen T-Zellen für Patienten nach KMT.

Bei diesem Ansatz wurden CMV-spezifische Klone gesunder Knochenmarksspender isoliert, *in-vitro* expandiert und HLA-kompatiblen Empfängern verabreicht. Es konnte eine bis zu 12-wöchige antivirale Immunität ohne toxische Nebenwirkungen oder GvHD-Entwicklungen erzielt werden (McLaughlin-Taylor, Pande et al. 1994; Riddell and Greenberg 1995). Leider konnte mit diesem Protokoll aufgrund des fehlenden Anteils von unterstützenden CD4 pos. T-Helferzellen keine Langzeitprotektion gegen CMV vermittelt werden.

CMV-bedingte Erkrankungen nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation stellen mit einer Reaktivierungsrate von ca. 30% die häufigste virale Komplikation dar. Sie werden meist durch ein Defizit an virusspezifischen CD8 pos. T-Zellen induziert. Etwa 10% bis 25% aller Empfänger von T-Zell-depletierten Knochenmarkstransplantaten entwickeln EBV-induzierte Lymphome (Heslop, Brenner et al. 1994; Papadopoulos, Ladanyi et al. 1994). Damit stellen EBV-Reaktivierungen die zweithäufigste Komplikation im Zusammenhang mit KMT dar. Das EBV-Reaktivierungsrisiko ist bei soliden Organtransplantationen (SOT) aufgrund der dauerhaften Immunsuppression höher als bei KMT einzuschätzen. Für die Gruppe um Cliona Rooney und Helen Heslop war dies der Anlass, klinische Studien der Phase I/ II zur Wirkung EBV-spezifischer T-Zellen zu

entwickeln. Sie konnten zeigen, dass der Therapieansatz keine toxischen Nebenwirkungen hat oder GvHD verursacht. Außerdem zeigten die infundierten Zellen nicht nur prophylaktische sondern ebenso therapeutische Wirkung bei der Bekämpfung bereits etablierter Lymphome (Heslop, Brenner et al. 1994; Heslop and Rooney 1997).

Im Zuge der Weiterentwicklung wurden immer neue Anwendungsgebiete der Adoptiven Immuntherapie erforscht. Gegenstand dieses zellbasierten Therapieansatzes sind mittlerweile nicht nur diverse virale Erkrankungen (z.B. EBV, CMV, ADV, HIV, Hepatitis C), sondern auch verschiedene Tumorarten wie etwa Melanome, Mamma- und Prostatakarzinome (Dudley, Wunderlich et al. 2001; Bishop, Fowler et al. 2004; Bollard, Kuehnle et al. 2004; Ma, Safar et al. 2004).

Ziel aktuellerer Forschung u.a. an verschiedenen Tiermodellen ist die Verbesserung der Generierungsprotokolle für T-Zellen im Hinblick auf Herstellungsdauer, Affinität, Spezifität und Potenz bzw. protektiver Wirkung. Genetische Modifikationen der Zellen dienen beispielsweise der Schaffung hochaffiner T-Zellrezeptoren (Cooper, Kalos et al. 2000; Roszkowski, Lyons et al. 2005) oder der Generierung multispezifischer T-Zelllinien (Leen, Myers et al. 2006). Eine weitere vielversprechende Studie von der Gruppe um Tanzina Haque setzt auf die Anwendung allogener, partiell HLA-identischer antigenspezifischer T-Zellen als zeitnah verfügbare Behandlungsoption (Wilkie, Taylor et al. 2004; Haque, Wilkie et al. 2007).

1.3.1 Die Adoptive Immuntherapie im Rahmen der Guten Herstellungspraxis

Die Etablierung der Adoptiven Immuntherapie im klinischen Alltag ist eng an die Erfüllung gesetzter Standards gebunden. Da die Anwendung im Patienten erfolgt, unterliegt das Herstellungsverfahren zur Produktion der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (good manufacturing practice; GMP) sowie dem Arzneimittelgesetz (AMG). Diese Richtlinien dienen der Patientensicherheit und fordern u.a. speziell ausgestattete, durch Druckschleusensysteme getrennte Labore mit entsprechenden Reinraumklassen. Ferner sind strikte kontinuierliche Kontrollen der Qualität gefordert, um Übertragungen infektiöser, genetisch modifizierter oder anders kontaminierter Produkte mit Sicherheit auszuschließen. Die aktuell angewandte Herstellungsmethode zur Produktion der EBV-spezifischen T-Lymphozyten

stellt die eigentliche Limitierung der Adoptiven Zelltherapie dar. Dies gilt im gleichen Maße für die Herstellung der Antigen-spezifischen Zellen in der PTLD-Therapie sowie für die Herstellung spezifischer T-Zellen der meisten anderen Tumor- und Virustherapien. Die Generierungsmethode beinhaltet zahlreiche „offene“ Zellkulturschritte. Offen bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Produkt Kontakt zur Raumluft hat. Um die Reinheit des Zellproduktes zu gewährleisten und Kreuzkontaminationen auszuschließen, kann man lediglich die Zelllinien eines einzigen Patienten in einem GMP-Labor bearbeiten. Neben einem extremen Personal- und Kostenaufwand können aufgrund der Dauer des Herstellungsprozesses nur einige wenige Zelllinien pro Jahr (< 10) in einem GMP-Labor parallel hergestellt werden. Dies ist in der Praxis kaum realisierbar und mit sehr hohen Kosten verbunden. Folglich konnten, gemessen am Bedarf, bisher nur wenige Patienten behandelt werden. Dies hatte für die nicht therapierten Patienten zum Teil fatale Folgen und verhinderte eine stärkere Verbreitung der Therapie.

Zusammenfassend hat das derzeit etablierte Standardverfahren zur Herstellung adoptiv anwendbarer, autologer, EBV-spezifischer Immunzellpräparate folgende Mängel:

- a) Die Generierung der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten ist sehr zeitintensiv (ca. 80 Tage).
- b) Die Notwendigkeit zur Produktion EBV-infizierten B-Zellen (LCL) führt meist zum Therapieausschluss von Patienten mit B-Zell depletierender Medikation.
- c) Die Herstellung des prozessrelevanten LCL-Zwischenprodukts muss aufgrund des Kontaminationsrisikos räumlich getrennt vom T-Zellendprodukt in verschiedenen GMP-Reinräumen erfolgen.
- d) Der Herstellungsprozess beinhaltet die Verwendung und den Umgang mit infektiösem Material.
- e) Die Herstellung erfolgt im „offenen“ System, daher müssen sämtliche Handhabungsschritte in der Reinraumklasse A (Sterilwerkbank) mit einem Hintergrund der Reinraumklasse B durchgeführt werden.
- f) Das Verfahren erfordert Kampagnenbetrieb.
- g) Die Generierungsmethode schließt die Möglichkeit zur Automatisierung aus.

- h) Die für den Herstellungsprozess benötigte Blutmenge ist für Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf relativ hoch. Dies gilt insbesondere für die Behandlung von Kindern.

1.4 Verfahren zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien

Alle drei im Folgenden vorgestellten beispielhaften Verfahren zur Herstellung EBV-spezifischer T-Lymphozyten nutzen 24-Loch Zellkulturplatten und Interleukin-2 supplementiertes, serumhaltiges Medium zur Kultivierung und Expansion der Zellen.

1.4.1 Verfahren der repetitiven Stimulation

Der derzeit etablierte Goldstandard zur Herstellung EBV-spezifischer T-Lymphozyten basiert auf einem zweistufigen Verfahren. Vor der eigentlichen Genierung der T-Zelllinie muss in einem mindestens sechs- bis achtwöchigen Prozess eine EBV-Antigen präsentierende Stimulatorzelllinie etabliert werden.

Hierfür werden zunächst patienteneigene periphere Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) per Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Diese werden anschließend mit Epstein-Barr Virus infiziert. Die Infektion führt zu einer Transformation und Immortalisierung der humanen B-Zellen innerhalb der PBMC. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Ciclosporin A (CSA) haltigen Medium. CSA ist ein immunsuppressives Arzneimittel, das als Calcineurininhibitor die Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten hemmt. Nach ca. sechswöchiger Kultivierung der Zellen erhält man eine stabil wachsende B-Zelllinie (LCL). Zwei Wochen vor der weiteren Verwendung der LCL wird dem Kulturmedium das gegen Herpes-Viren wirkende Virostatikum Aciclovir zugesetzt. Der Arzneistoff hemmt den Stoffwechsel infizierter Zellen. Auf diesem Weg wird die Produktion und Freisetzung neuer infektiöser Virionen ins Kulturmedium sowie eine potentielle Kontamination des T-Zellprodukts verringert. Die Eigenschaft der LCL, EBV-Antigene auf ihren Zelloberflächenrezeptoren zu präsentieren, wird im weiteren Herstellungsprozess genutzt, um die Antigen-spezifischen T-Zellen in einem repetitiven Verfahren zu generieren.

Der folgende zweite Herstellungsschritt umfasst die mindestens vierwöchige Produktionszeit der EBV-spezifischen T-Zelllinie. Dies erfordert eine erneute Isolierung frischer patienteneigener PBMC, die dann mit bestrahlten (30Gy) autologen LCL stimuliert werden. Die LCL als B-Zellen sind zur Antigenpräsentation im MHC-I und -II Kontext befähigt. Hierdurch können sowohl die in den PBMC enthaltenen patienteneigenen EBV-spezifischen CD8-, als auch die CD4 pos. T-Zellen zum Wachstum angeregt werden. Die Bestrahlung schädigt das Genom der LCL in der Art, dass eine Zellteilung nicht mehr möglich ist, ohne deren Funktion als APC zu unterbinden. Somit wird ein Überwachsen der zunächst sehr wenigen EBV-spezifischen T-Zellen verhindert. Durch eine wöchentliche Restimulation mit EBV-Antigen (LCL) erhalten nur die EBV-spezifischen T-Zellen einen fortwährenden Wachstumsimpuls und werden so zur weiteren Proliferation angeregt. Nicht EBV-spezifische Zellen erhalten kein Überlebenssignal, gehen dadurch in Apoptose und sterben aus der Kultur. Ein Fließschema des Herstellungsprozess ist in Abb. 2 dargestellt.

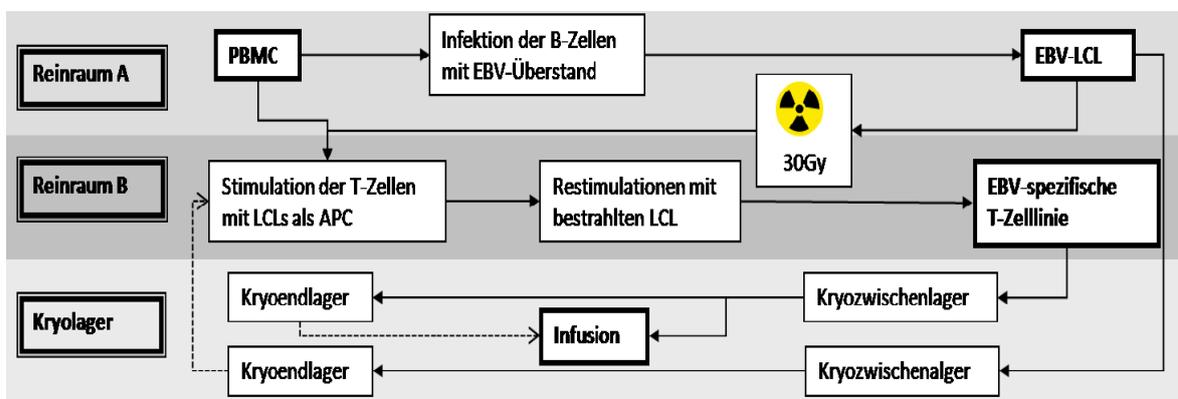


Abb. 2: Flussdiagramm zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien. Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien. Die Generierung des Zwischenprodukts (LCL) und des Endprodukts (T-Zellen) muss aufgrund des Kontaminationsrisikos in verschiedenen Reinräumen durchgeführt werden. Bis zur Freigabe nach erfolgreicher Produkttestung werden die Zellen kryokonserviert.

1.4.2 Das Mini-EBV System

Das Mini-EBV System wurde zur Immortalisierung von B-Zellen entwickelt. Durch Genmodifikationen sind die B-Zellen anschließend nicht zur Produktion von neuem infektiösen Material befähigt. Sie weisen somit eine höhere Biosicherheit als herkömmlich

produzierte LCL auf. Die Verwendung und der Prozess zur Generierung der T-Zelllinien sind ansonsten mit dem repetitiven Verfahren identisch.

Das Mini-EBV System nutzt die Effizienz des Epstein-Barr Virus bei der Infektion und Immortalisierung von B-Zellen. Hierfür wurde das Konstrukt eines B-Zell immortalisierenden EBV-Vektors (s. Abb. 3), bestehend aus subgenomischen EBV-Fragmenten, geschaffen (Kempkes, Pich et al. 1995). Es umfasst ca. 40% der Sequenz des B95.8 EBV-Stamms sowie sämtliche für die latenten Proteine codierenden Sequenzen des EBV-Genoms inklusive regulatorischer Elemente für Replikation und Verpackung in Viruspartikel. Für die virus-freie Verpackung dieser sogenannten mini EBV-Vektoren in infektiöse Partikel wurde die Verpackungszelllinie 293/ TR² entwickelt (Delecluse, Pich et al. 1999). Die letztlich entstehenden B-Zelllinien (mini-LCL) zeigen unbegrenzte Proliferation sowie einen aktivierten Phänotyp (Moosmann, Khan et al. 2002). Sie enthalten aber kein lytisch replikationsfähiges Virus.

Allerdings wird diese Sicherheit durch zusätzlichen Zeit- und Arbeitsaufwand sowie letztlich durch Einsatz von Gentechnik erlangt. Eine klinische Anwendung im Patienten und der damit verbundene Transfer in AMG bzw. GMP-konforme Herstellungsprozesse werden somit leider nicht erleichtert.

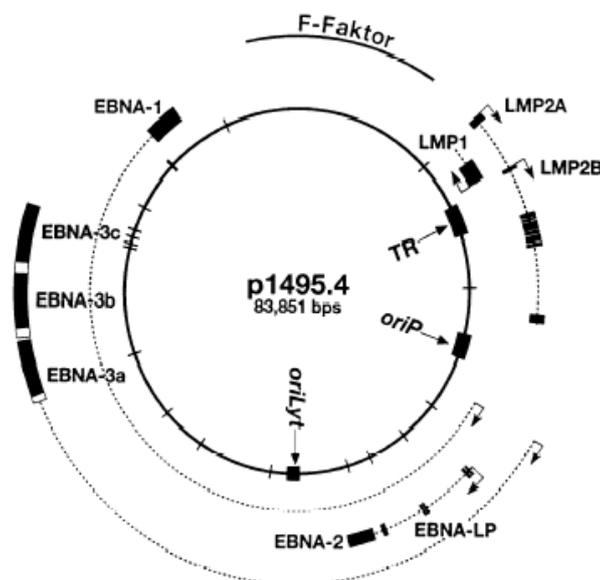


Abb. 3: Design des Mini-EBV Plasmids p1495.4. Dargestellt ist der Aufbau des Mini-EBV Plasmids als Genvektor mit den cis-aktiven Steuerelementen oriP, oriLyt, TR. Die gezeigten Gene LMP und EBNA sind an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt. (Quelle: European Patent EP0915165)

1.4.3 Generierung von T-Zellen mit Hilfe Formalin-fixierter LCL

Für dieses Verfahren werden zunächst analog zum repetitiven Herstellungsprozess LCL unter Verwendung des Überstandes der B95.8 Zelllinie generiert. Vor Verwendung der LCL als Stimulator-APC im Generierungsprozess der T-Zelllinie erfolgt eine Fixierung in einer Formalin-haltigen Lösung.

Formalin sorgt für eine effektive Unterbrechung des Zellstoffwechsels und führt zu einer Quervernetzung chemisch reaktiver Gruppen wie beispielsweise von Proteinen oder Nukleinsäuren (Barisas, Wade et al. 1999). Zelleigenschaften wie die Reaktivität zu Antikörpern oder die Oberflächenstrukturen von MHC-I und -II Molekülen werden bei geringer Formalinkonzentration (ca. 1%) nicht negativ beeinflusst (Hammer, Brestrich et al. 2007). Die LCL können folglich trotz Fixierung als EBV-Antigen präsentierende Zellen uneingeschränkt zur Generierung polyklonaler T-Zelllinien mittels repetitiver Stimulation genutzt werden.

Von der Gruppe um Markus Hammer in Berlin wurde eine weitere Einsatzmöglichkeit fixierter LCL im Herstellungsprozess EBV-spezifischer T-Zellen vorgestellt. Sie basiert auf der durch spezifische Antigenstimulation induzierten Sekretion des Zytokins Interferon gamma (IFN γ) in Verbindung mit einem Zellseparationssystem (Cytokine Secretion Assay; Milteny Biotech).

Ausgangspunkt des Prozesses ist ebenfalls die Isolierung frischer PBMC aus peripherem Blut. Für die Stimulation der wenigen, aber EBV-spezifischen T-Zellen innerhalb der PBMC werden die Formalin-fixierten LCL verwendet. Als Reaktion auf den Stimulus produzieren die T-Zellen IFN γ . Durch die in Abb. 4 dargestellte Kopplung verschiedener Antikörper sind die IFN γ produzierenden Zellen schließlich mit einem magnetischen Partikel markiert und können so in einem Magnetfeld von den anderen Zellen getrennt werden. Die nicht IFN γ produzierenden Zellen werden wiederum radioaktiv bestrahlt und als Feeder-Fraktion während der Expansionsphase verwendet (s. Abb. 5).

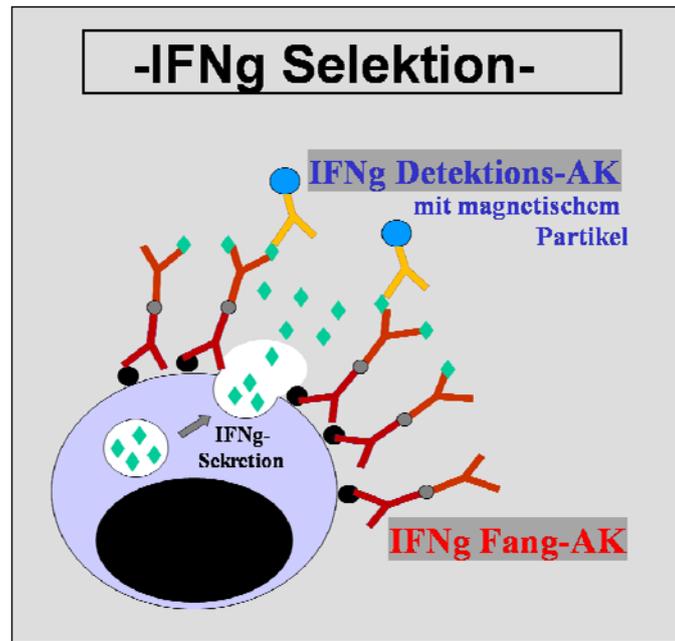


Abb. 4: Selektion IFN γ sezernierender Zellen. Dargestellt ist die Kopplung der zur magnetischen Zellseparation notwendigen Antikörper.

Die Verwendung der fixierten LCL resultierte sowohl im repetitiven als auch im auf Zytokinsekretion-basierenden Protokoll in T-Zelllinien mit vergleichbaren Eigenschaften bzgl. Zellzahl, Spezifität, Phänotyp und Effektorfunktion (Hammer, Brestrich et al. 2007). Außerdem führt die Formalinfixierung der LCL zum Ausschluss aller Kontaminationsquellen des T-Zellproduktes durch eventuell infektiöse B-Zellen. Somit ist ein höheres Maß an Biosicherheit gewährleistet. Allerdings bedarf diese Methode weiterhin der zeitintensiven Etablierung der LCL.

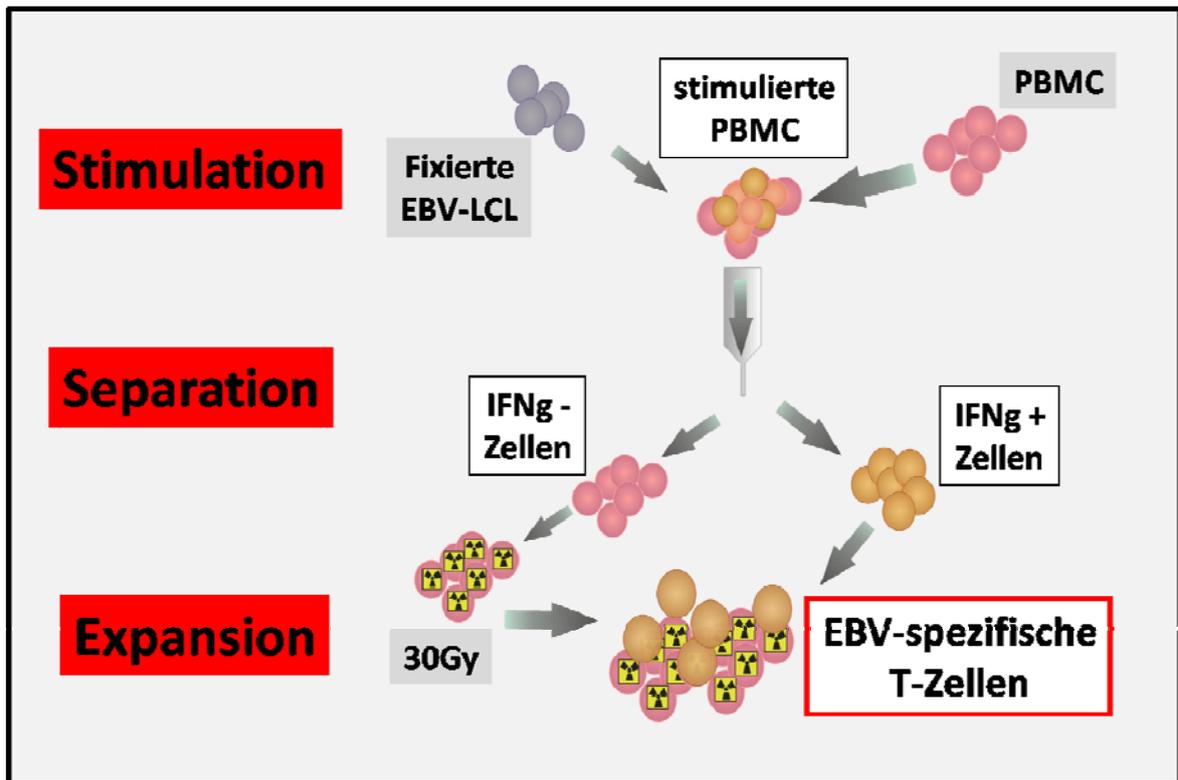


Abb. 5: Herstellung von T-Zellen mit Formalin-fixierten LCL. Dargestellt ist ein Schema zur Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien, basierend auf der Sekretion von IFNg. PBMC werden mit Formalin-fixierten LCL stimuliert und zur IFNg-Produktion angeregt. Nach Kopplung mit Antikörpern erfolgt im Magnetfeld die Trennung in IFNg pos. und negative Zellfraktionen. Die negative Fraktion wird bestrahlt und zur Expansion der EBV-spezifischen T-Zellen genutzt.

1.5 Prinzip der Antigen-spezifischen Stimulation von T-Zellen durch Peptidpools

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die bisher zur Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien benötigten LCL durch Peptidpools zu ersetzen. Ein Peptidpool ist aus einem Gemisch vieler Einzelpeptide mit einer Länge von je 15 Aminosäuren (AS) zusammengesetzt. Aneinandergereiht bilden sie die komplette Sequenz eines Proteins wie z.B. LMP-1 ab. Untersuchungen haben erwiesen, dass Peptide mit einer Länge von 15 AS (15-mere) sowohl in MHC-I als auch in MHC-II Komplexen effizient präsentiert werden (Maecker, Ghanekar et al. 2001; Hoffmeister, Kiecker et al. 2003). Damit ist die Stimulation von CD4- und CD8 pos. T-Zellen möglich (Maecker, Dunn et al. 2001). Ein Peptidpool enthält jedoch nicht nur die in einzelne 15-mere zerschnittene Sequenz eines größeren Polypeptids bzw. Proteins. Er beinhaltet zusätzlich diverse, jeweils auf einer Länge von 11 AS überlappende konsekutive 15-mere (s. Abb. 6). Durch die Überlappung der Einzelpeptide

sind alle potenziell immunogenen Epitope eines Proteins im Peptidpool enthalten (Han, Huang et al. 2009). Nach dem Beladen von MHC-Molekülen, der z.B. in PBMC vorhandenen APC, kann mit Hilfe der Peptidpool-Technik ein zur T-Zellstimulation essentieller Peptid-MHC-Komplex gebildet werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, ohne Kenntnis einzelner immundominanter Epitope oder HLA-Typen, CD4- und CD8 pos. T-Zellen zu stimulieren.

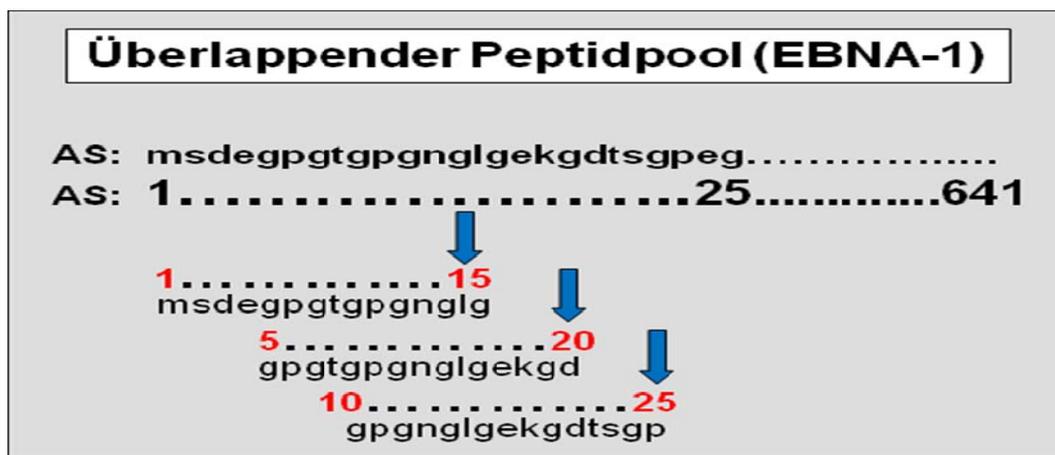


Abb. 6: Überlappender Peptidpool. Dargestellt ist der Aufbau eines überlappenden Peptidpools am Beispiel des EBV-Antigens EBNA-1. In der ersten Zeile ist die Abfolge der ersten 23 AS des Proteins aufgeführt. Die komplette Sequenz besteht aus 641 AS. Darunter sind beispielhaft die ersten drei Fragmente des überlappenden Pools gezeigt. Die Fragmente haben eine Länge von 15 AS und überlappen auf einer Länge von 11 AS. Die Buchstaben bezeichnen die verschiedenen AS nach internationaler Nomenklatur. Insgesamt enthält der EBNA-1 Peptidpool 158 Fragmente.

1.6 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit ist die Neuentwicklung eines Herstellungsverfahrens für autologe EBV-spezifische T-Zelllinien zum adoptiven Transfer. Der Therapieansatz soll dadurch schneller verfügbar, weniger arbeitsintensiv und damit kostengünstiger sowie auch für immunsupprimierte Patienten anwendbar sein. Ferner sollen die Grundlagen für ein höheres Maß an Biosicherheit, eine zukünftige Automatisierungsoption sowie eine potentielle Plattform zur Herstellung bi- bzw. multispezifischer (z.B. EBV und CMV) T-Zelllinien geschaffen werden.

Hierfür soll zunächst ein neuer Generierungsprozess EBV-spezifischer, polyklonaler T-Zellen etabliert werden. Die bisherige Notwendigkeit zur Herstellung EBV-infizierter B-Zellen (LCL) soll durch sechs synthetisch produzierte überlappende EBV-Peptidpools ersetzt werden (EBNA-1, -2, -3c, LMP-1, -2, BZLF-1).

Anschließend sollen T-Zelllinien des neuen Protokolls mit dem derzeitigen Standardverfahren verglichen werden. Die Zellen sollen aus identischem Ausgangsmaterial produziert und detailliert hinsichtlich Charakteristika wie u.a. Funktionalität, Differenzierung, Zellzahl oder T-Zellrezeptor Vb-Repertoire analysiert werden.

Im Zuge der Arbeit soll ebenso die Möglichkeit zur Überführung des Expansionsverfahrens der EBV-spezifischen T-Lymphozyten in ein geschlossenes, automatisierbares Kultursystem erarbeitet werden.

Abschließend sollen Generierungs- und Expansionsverfahren mit Patientenmaterial unter realer posttransplantativer Immunsuppression durchführbar sein.

Alle Entwicklungen zur Optimierung des Herstellungsverfahrens autologer EBV-spezifischer T-Zelllinien sollen hinsichtlich der verwendeten Materialien und Prozesse auf den Richtlinien der "Guten Herstellungspraxis (GMP)" basieren bzw. zukünftig mit ihnen kompatibel sein.

2. Material

2.1 Reagenzien und Chemikalien

<u>Reagenzien/ Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Golgi Stop	Becton Dickinson, Heidelberg
Brefeldin A	Becton Dickinson, Heidelberg
5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, USA
Calcein AM	MoBiTec, Göttingen
Ionomycin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumazid (NaN ₃)-Lösung	Merck, Darmstadt
PBS-Pufferlösung	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Penizillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
Proleukin 2 (humanes Interleukin-2; IL-2)	Chiron, Ratingen
Ciclosporin A	Novartis, Nürnberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Schnelldorf

FACS Perm-2 Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
Triton X 100	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
ELISpot Entwicklungsmodul	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

2.2 Verbrauchsmaterial

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Einmal-Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Kryo-Einfrierröhrchen	Greiner, Ammerbuch
25- und 75 cm ² Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
24-Loch Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
3,5 ml Transfer-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
5-, 10-, 25 ml Einmalpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
10, 100, 1000 µl Pipetten	Eppendorf, Hamburg
10, 100, 1000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
15 und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Cell Culture Bag	Lampire, Pipersville, USA
Cell Expansion Bag	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

VueLife Bag	Cellgenix, Freiburg
FibraCel Disks	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Cytodex-3 Beads	GE Healthcare Europe GMBH, München

2.3 Medien und Puffer

<u>Artikel</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Zellkulturmedium	500ml RPMI-Medium, 2mM L-Glutamin, 10% FCS, 1% Penizillin/ Streptomycin
T-Zellkulturmedium	500ml RPMI-Medium, 2mM L-Glutamin, 10% FCS, 1% Penizillin/ Streptomycin, 100IU/ ml IL-2
Einfriermedium	50ml FCS, 10% DMSO
FACS-Puffer	500ml PBS, 1% FCS, 0,01% NaN ₃
Fixierlösung	100ml PBS, 2g Formaldehyd

2.4 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-human CD3 (PerCP)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD3 (Pacific Blue)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD4 (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD4 (FITC)	Becton Dickinson, Heidelberg

Anti-human CD4 (PE-Cy7)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD8 (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD8 (Pacific Orange)	Invitrogen Camarillo, Kanada
Anti-human CD8 (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD8 (PerCP)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD16 (FITC)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD16 PE-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD40L/ CD154 (Fitc)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD45RA (ECD)	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-human CD45RA (Pacific Blue)	Invitrogen Camarillo, Canada
Anti-human CD62L (ECD)	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-human CD69 (PE-Cy7)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD107a (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD137/ 4-1BB (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CCR7 (unkonjugiert)	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Cytometric Bead Array; Th1/ Th2 Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Goat anti Mouse IgG2a, human ads-Biot	Biozol, Eching
Anti Human IL-2 (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human IFN γ (Alexa700)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human IFN γ (Pacific Blue)	Emelca, Breda

IOTest Beta Mark Kit	Beckman Coulter, Krefeld
Live/ Dead fixable Kit (Aqua Dead)	Invitrogen Camarillo, Kanada
Live/ Dead fixable Kit (Far Red Dead)	Invitrogen Camarillo, Kanada
Anti Human TNFa (FITC)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti Human TNFa (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
RosetteSep CD3 Depletion Kit	StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich
Streptavidin (Pacific Blue)	Invitrogen Camarillo, Kanada

2.5 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
AID Reader	AID GMBH, Straßberg
Bestrahlungsgerät Gamma Cell-40	Atomic Energy, Mississauga, Kanada
Durchflusszytometer Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer Partec CyFlow	Partec, Görlitz
ELISA/ Fluoreszenzmessgerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Einfrierbox	Nalgene, Roskilde, Dänemark
EKTACHEM DT 60	Ortho-Clinical-Diagnostics; Neckargemünd
Feinwaage	Satorius, Göttingen

Gefriertruhe (-80°C)	Liebherr, Oberhausen
Gluco Control	Stada Arzneimittel AG; Bad Vilbel
Inkubator	Heraeus, Berlin
Kühlschrank	Liebherr, Oberhausen
Mikroskop	Leica, Braunschweig
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Jena
Pipettierhilfe	Matrix Technologies, New Hampshire, USA
Sterilwerkbank	Heraeus, Berlin
Stickstofftank	Taylor-Wharton, Husum
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge, Heraeus, Berlin

2.6 Produkte zur magnetischen Zellseparation

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
IFNg Secretion Assay (Cell Enrichment and Detection Kit)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Trennsäulen (MS; LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini- und OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSmix Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.7 Peptidpools

Die EBV-Peptidpools wurden von der Firma JPT Technologies GMBH synthetisiert. Jeder Pool beinhaltet die komplette Aminosäuresequenz eines antigenen EBV-Proteins. Die einzelnen Pools bestehen aus einem Mix verschiedener Einzelpeptide. Jedes einzelne Peptid hat eine Länge von 15 Aminosäuren (15-mer) und überlappt auf einer Länge von 11 Aminosäuren mit dem folgenden Sequenzstück. Die Anzahl der Einzelpeptide pro Pool ist durch die Länge der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins gegeben.

<u>Peptid-Pool</u>	<u>Poolgröße</u>	<u>Hersteller</u>
PepMix EBV EBNA-1	158 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin
PepMix EBV EBNA-2a	119 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin
PepMix EBV EBNA-3c	265 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin
PepMix EBV BZLF-1	59 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin
PepMix EBV LMP-1	94 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin
PepMix EBV LMP-2	122 Peptide	JPT Technologies GMBH, Berlin

3. Methoden

3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

3.1.1 Depletion CD3 positiver Zellen

Zur Depletion von CD3 pos. Zellen wird das RosetteSep System der Firma StemCell Technologies verwendet. Die Depletion erfolgt unter Verwendung einer geringen Menge Depletionsantikörper (30µl/ ml Blut) nach Herstellerangaben. Das System wird mit venösem Blut und vor der PBMC-Isolierung angewendet.

3.1.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Heparin- oder Zitratblut werden im Verhältnis 1:2 mit PBS gemischt. Anschließend werden 3ml Ficoll in ein Ficoll-Röhrchen vorgelegt und mit ca. 8ml des Blut-PBS-Gemisches überschichtet. Nach 40 min. Zentrifugation (400g, RT, keine Dezeleration) wird der gebildete Interphasenring mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in einem großen Volumen PBS aufgenommen. Die gewonnen PBMC werden abschließend mit PBS gewaschen und stehen dann für die jeweilige Anwendung zur Verfügung.

3.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wird die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau vermischt und anschließend mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Es wird das Mittel der lebenden, ungefärbten Zellen in vier Großquadraten der Zählkammer bestimmt. Anschließend kann mit folgender Formel die Zellzahl pro ml Zellsuspension ermittelt werden:

$$\text{gemittelte ZZ} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor Trypanblau)} \times 10^4 = \text{ZZ/ ml Suspension}$$

Die Bestimmung der Vitalität erfolgt durch das Auszählen der blaugefärbten toten Zellen sowie der Bestimmung ihres Anteils an der Gesamtzellzahl.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden bei 4°C pelletiert und für 30 min. auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Zellen in kaltem Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO, 4°C) aufgenommen und in Aliquots von bis zu 25×10^6 Zellen in vorgekühlte Kryoröhrchen (4°C) pipettiert. Die Kryoröhrchen werden mit Hilfe einer temperaturkontrollierten Einfrierbox um 1°C je Minute auf -80°C abgekühlt und anschließend zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.1.5 Generierung von PHA-Blasten

In 10ml kompletten Medium (KM; RPMI1640-Medium + 10% FCS + 1% Pen/ Strep) werden 5×10^6 PBMC resuspendiert. Das KM wird mit Phytohämagglutinin (PHA) supplementiert (Endkonzentration 5µg/ ml). Von der PHA-PBMC-Suspension werden je 2ml pro Loch einer 24-Lochplatte aliquotiert. Die umgebenden Löcher werden evaporiert. Die Zellen werden im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) inkubiert. Mit Tag drei beginnend wird (bei entsprechendem Wachstum) täglich 1ml Medium vom Überstand entnommen und durch 1ml frisches KM mit 200 IU/ ml IL-2 ersetzt. An Tag 7 können die fertigen PHA-Blasten zur Zytotoxizitätstestung eingesetzt oder kryokonserviert werden.

3.1.6 Generierung EBV-transformierten lymphoblastoider B-Zellen

Frisch isolierte und gewaschene PBMC (5×10^6 Zellen) werden bei 400g zentrifugiert (8 min., RT). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 200µl konzentriertem B95-8 Virusüberstand resuspendiert. Anschließend werden 1,8 ml KM mit 1 µg/ ml Ciclosporin A (CSA) supplementiert. Die Zellsuspension wird gründlich gemischt und je 200µl der Suspension werden in 5 Löcher einer 96-Loch Zellkulturplatte pipettiert. Je 100µl der Suspension werden in 10 Löcher der Platte gegeben. Zu den letzteren Ansätzen werden 100µl KM mit 1µg/ ml CSA pipettiert. Die umgebenden Löcher werden als

Verdunstungsbarriere mit sterilem Wasser befüllt. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C (5% CO₂). Die Zellen werden wöchentlich durch Austausch von 100µl Überstand mit 100µl frischem KM gefüttert. Frühestens nach zwei Wochen (bei sichtbaren Proliferationsklumpen und Gelbfärbung des Mediums) werden die Zellen aus drei bis fünf Löchern der 96-Lochplatte in ein Loch einer 24-Lochplatte überführt. KM wird bis zu einem Kulturvolumen von 2ml pro 24er Loch zugesetzt. Bei deutlich sichtbaren Proliferationsklumpen und einer Gelbfärbung des Mediums werden die Zellen in eine kleine Zellkulturflasche (25cm²) überführt. Die Zellen werden bis zu einem Kulturvolumen von ca. 15ml expandiert und anschließend in eine große Kulturflasche (75cm²) überführt. Nach dem Erreichen eines stabilen Wachstums werden die lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) entweder weiter in Kultur gehalten oder kryokonserviert.

3.1.6.1 Kultivierung von lymphoblastoiden B-Zelllinien

Nach der Überführung in einen stabilen Wachstumszustand werden die LCL in einem Volumen von 50ml KM in 75cm² Kulturflaschen kultiviert. Die LCL werden bei sichtbarer Vermehrung der Proliferationsklumpen und Gelbfärbung des Mediums gesplittet. Hierbei werden 40-45ml der Kultur verworfen und durch frisches KM ersetzt. Die Zellen werden in der Regel dreimal wöchentlich gesplittet.

3.1.7 Bestrahlung von Zellen

In KM suspendierten Zellen werden in einem Falconröhrchen auf Eis mit 30Gy (3500 rad) bestrahlt.

3.2 Generierung EBV-spezifischer T-Zellen

3.2.1 T-Zellgenerierung mittels repetitiver Stimulation

Frisch isolierte PBMC werden auf eine Zellzahl von 2×10^6 / ml KM eingestellt. Autologe LCL werden mit 30Gy bestrahlt, einmal gewaschen und auf eine Zellzahl von 5×10^4 / ml KM eingestellt. Je 1ml der LCL- und der PBMC-Zellsuspension werden in ein Loch einer 24-Lochplatte pipettiert und bei 37°C im Inkubator (5% CO₂) kultiviert. Am 10. Tag

werden die Zellen geerntet und der Anteil lebender bzw. toter Zellen wird mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Liegt der Anteil toter Zellen über 40%, werden diese durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Die Zellzahl wird schließlich auf 1×10^6 / ml KM eingestellt. Zur Restimulation der Zellen werden wiederum LCL bestrahlt und die Zellzahl auf $2,5 \times 10^4$ / ml KM eingestellt. Anschließend wird je 1 ml der Zellsuspensionen in ein 24er Loch gegeben. Nach viertägiger Inkubation werden der Kultur 100 IU rekombinantes IL-2 zugesetzt. Nach der ersten Restimulation erfolgen am 7. und 14. Tag zwei weitere Restimulationen nach gleichem Schema.

3.2.2 T-Zellgenerierung mittels IFN γ Sekretions-Assay

Frisch isolierte PBMC von EBV seropositiven, HLA-typisierten Probanden werden auf eine Zellzahl von 10×10^6 / ml KM eingestellt. Die Zellen werden zur Stimulation in eine 24- Lochplatte gesetzt (1×10^7 Zellen/ Loch). Die sechsstündige Stimulation erfolgt antigenspezifisch mit sechs EBV-Peptidpools (EBNA-1, 2a, 3c, BZLF-1, LMP-1 und LMP-2). Anschließend werden die Zellen geerntet, mit Puffer (PBS mit 0,5% FCS) gewaschen und pelletiert (400g, 8 min., 4°C). Das Zellpellet wird aufgeschüttelt und mit IFN γ Fang-Antikörper (100 μ l Puffer sowie 25 μ l/ 20 Mio. Zellen) für 5 min. auf Eis inkubiert. Die IFN γ Sekretion wird durch Zugabe von warmem Medium (1ml/ 1×10^6 Zellen) induziert. Die Inkubation erfolgt bei Rotation im Brutschrank (50 min, 37°C, 5% CO₂). Im Anschluss werden die Zellen mit kaltem Puffer bei 4°C gewaschen und abzentrifugiert (400g, 8 min., 4°C). Das Pellet wird mit Pycoerythrin (PE) markiertem IFN γ Detektions-Antikörper (100 μ l Puffer sowie 25 μ l/ 20 Mio. Zellen) gemischt und auf Eis inkubiert. Nach 10 min. werden die Zellen erneut mit kaltem Puffer bei 4°C gewaschen. Die Zellen werden nach erfolgter Zentrifugation (400g, 8 min., 4°C) mit anti PE-Beads für 25 min. im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Abschließend werden die Zellen nochmals bei 4°C gewaschen, zentrifugiert (400g, 8 min., 4°C) und das Pellet wird in 1ml Puffer resuspendiert. Die Zellen werden auf eine vorgespülte Separations-Säule gegeben und im Magnetfeld in IFN γ pos. und IFN γ neg. Fraktionen getrennt. Die in der Säule verbliebenen IFN γ pos. Zellen werden mit 1ml Medium (KM mit 100 IU IL2) und der Hilfe eines Stempels von der Säule in ein Loch einer 24-Lochplatte eluiert. Die IFN γ neg. Zellfraktion wird bestrahlt und auf eine Konzentration von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ ml Medium (KM mit 100 IU IL2) eingestellt. Ein Milliliter dieser Zellsuspension wird als Feederzellfraktion zu den IFN γ pos., EBV-spezifischen Zellen gegeben.

3.2.3 Kultivierung und Expansion der T-Zelllinien

Die mit Hilfe des IFN γ Sekretions-Assays angereicherten Zellen werden direkt nach der Selektionierung in KM mit 100 IU IL2 kultiviert. EBV-spezifische T-Zellen, die mittels repetitiver Stimulation generiert wurden, werden in den ersten 14 Tagen in KM kultiviert. Erst nach Tag 14 wird dem Medium zusätzlich IL2 (100 IU) zugesetzt. Die Kultivierung der T-Zelllinien erfolgt in 24-Loch Zellkulturplatten.

Die Expansion der Zellen erfolgt nach mikroskopischer und makroskopischer Beurteilung. Das Zellwachstum wird anhand der Größe der Proliferationsklumpen mikroskopisch bewertet. Die makroskopische Kontrolle der Farbe des Mediums dient als weiterer Indikator zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zellen. Die Zellen werden bei ausreichender Dichte und gleichzeitigem Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb gesplittet. Hierfür werden sie mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert und die Hälfte der Zellsuspension wird in ein neues Loch überführt. Abschließend wird das Kulturvolumen durch Zugabe von frischem Medium (100 IU IL2) wieder auf 2ml gebracht.

3.3 Charakterisierung der Zelllinien

3.3.1 ELISpot-Analyse der EBV-spezifischen T-Lymphozyten im peripheren Blut

Die ELISpot-Analyse wird mit frisch isolierten PBMC durchgeführt. ELISpot-Platten (96-Loch) werden jeweils mit IFN γ oder IL-2 Antikörper beschichtet und über Nacht inkubiert (4°C). Am folgenden Tag werden die Platten gewaschen und für 1 bis 2 Std. bei RT mit 200 μ l Block-Lösung (PBS + 1% BSA)/ Loch inkubiert. Es werden 3×10^5 PBMC/ Loch in die Platten gegeben. Die Zellen werden mit EBV-Lysat, SEB (Positivkontrolle) bzw. Medium (Negativkontrolle) stimuliert und für 24 Std. bei 37°C (5% CO $_2$, dunkel) inkubiert. Nach drei Waschschritten wird der sekundäre IFN γ - oder IL-2 Detektionsantikörper hinzugegeben (Inkubationszeit vier Std. bei RT). Anschließend werden die Platten erneut gewaschen. Dem IFN γ -ELISpot wird zunächst eine Streptavidin-Merrettich-Peroxidase-Lsg. zugesetzt (2 Std., RT, dunkel). Nach drei weiteren Waschschritten erfolgt die Zugabe von AEC-Lsg. (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol gelöst in N, N Dimethylformamid) und H $_2$ O $_2$ (3 min. Inkubation). Der IL-2-ELISpot wird mit Streptavidin-AP (alkalische Phosphatase) für 2 Std. bei RT inkubiert und dann dreimal

gewaschen. Anschließend wird BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyphosphat p-Toluidin Salz) / NBT (Nitro Blau Tetrazolium Chlorid) Chromogen für 1 Std. bei RT (dunkel) zugegeben.

Nach drei abschließenden Waschschrritten werden die resultierenden Spots mit Hilfe des AID Readers (AID GMBH, Straßberg) analysiert. Die Frequenz der IFN γ bzw. IL-2 produzierenden T-Zellen wird nach Abzug der Hintergrundsignale berechnet.

3.3.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächen-Moleküle

Zur Analyse von Markern auf der Zelloberfläche werden $2,5-5 \times 10^5$ Zellen in 50 μ l FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 0,5% NaN $_3$) suspendiert und mit je 3 μ l fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und CD16 (FITC: Fluoroisothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyllprotein, APC: Allophycocyanin) versetzt. Nach der Inkubation (15 min.) auf Eis werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 750 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgt am Durchflusszytometer (Partec, München).

3.3.3 Analyse der Zytokinproduktion und Degranulationskapazität nach Restimulation

Die EBV-spezifischen T-Zellen werden mit autologen PBMC bzw. autologen LCL restimuliert. Um sicherzustellen, dass nur Antigen-spezifisch expandierte T-Zellen analysiert werden, werden die CD3 pos. Zellen vor der Beladung mit den jeweiligen Peptidpools (1 Std., 37°C, 5% CO $_2$) aus den PBMC depletiert. T-Zellen und Stimulatorzellen werden in FACS-Puffer aufgenommen und im Verhältnis 1:2 (max. 3×10^6 Zellen gesamt) bei 37°C und 5% CO $_2$ stimuliert. Der Degranulationsmarker CD107a und Golgi-Stop werden direkt zum Stimulationsansatz dazu gegeben. Nach einer Stunde erfolgt zur umfassenden Blockierung des Golgi-Apparates die Zugabe von Brefeldin A (Bref. A; 5 μ l/ml). Nach weiteren 4 Std. Inkubation werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zunächst mit den Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD45RA, CCR7, CD3 und CD4 sowie einem Lebend-Tod-Farbstoff markiert (15 min., 4°C). Im Anschluss an einen Waschschrtritt wird Permeabilisierungslsg. (Perm2, BD) auf die Zellen

gegeben (20 min., dunkel, 4°C) und diese dann erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen werden für 30 min. mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Zytokine IFN γ , TNF α sowie das Oberflächenantigen CD8 markiert. Abschließend werden die gefärbten Zellen mit einer Paraformaldehyd-Lösung fixiert, gewaschen, in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen, bei 4°C dunkel gelagert und am folgenden Tag mit Hilfe des LSR II-Durchflusszytometers (Becton Dickinson; Heidelberg) analysiert.

3.3.4 Bestimmung des Aktivierungsstatus nach Restimulation

Der Aktivierungsstatus der T-Zellen wird nach Antigen-spezifischer Restimulation der Zellen bestimmt. Die Zellen werden 24 Std. zuvor aufgetaut. Zur Stimulation werden autologe LCL und Peptid-beladene CD3-depletierte PBMC verwendet. Die PBMC werden für eine Stunde mit sechs EBV-Peptidpools (EBNA-1, 2a, 3c, BZLF-1, LMP-1 und LMP-2) beladen und anschließend im Verhältnis 1:2 zu den T-Zellen gegeben. Zur Kontrolle der Analyse werden positiv (Stimulation mit SEB) und unstimulierte negativ Ansätze (DMSO) mitgeführt. Nach vier Std. erfolgt die Zugabe von Bref. A (5 μ l/ ml) sowie eine weitere Inkubationsperiode von 16 Std. bei 37°C und 5% CO $_2$. Im Anschluss werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 min. bei 4°C mit einem Lebend-Tod-Farbstoff gefärbt. Die nur mit dem Lösungsmittel der Peptidpools (DMSO) stimulierte Negativkontrolle wird während dieser Zeit parallel mit CD62L und CD45RA Antikörpern markiert. Vor der Permeabilisierung der Zellen erfolgt ein Waschschrift. Anschließend werden die Zellen mit Antikörpern gegen CD40L (CD154), CD137, CD69, CD3, CD4, CD8, IL-2 und IFN γ für 30 min. bei 4°C markiert. Nach einem abschließenden Waschschrift werden die einzelnen Ansätze in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und direkt analysiert (LSR II-FACS).

3.3.5 Bestimmung des Vb-Repertoires der T-Zelllinien

Zur Bestimmung des T-Zellrezeptor (TCR) Vb-Repertoires der EBV-spezifischen T-Zelllinien wird der IO Test Beta Mark Kit von Beckmann Coulter verwendet. Das Kit besteht aus acht verschiedenen Antikörpergemischen, die jeweils drei Vb-Familien beinhalten. Die Antikörper der einzelnen Familien sind jeweils an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE oder FITC und PE gekoppelt. Die Färbung wird nach den

Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich werden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RA markiert. Nach zwei abschließenden Waschschritten werden die Zellen direkt am LSR II-FACS analysiert.

3.3.6 Zytotoxizitätstestung der T-Zelllinien

Für die Zytotoxizitätstestung werden K-562 Zellen, PHA-Blasten, autologe und allogene LCL als Zielzellen (Targets) sowie T-Zellen des Spenders als Effektorzellen benötigt. Zur Testung EBV-Peptidpool spezifischer T-Zellen müssen autologe und allogene LCL für eine Stunde mit den jeweiligen Peptidpools beladen werden.

Zur Präparation der Targets werden diese mehrmals mit PBS gewaschen, um das im KM vorhandene Serum auszuwaschen. Die Zellzahl wird ebenfalls mit PBS auf 2×10^6 / ml eingestellt. Je 500 μ l der Zellsuspensionen werden mit 10 μ l Calcein-AM (1mg/ ml) gemischt und für 30 min. bei 37°C im Inkubator (5% CO₂) gefärbt. Die Färbung wird durch Zugabe von KM gestoppt. Die gefärbten Zellen werden nach zweimaligem Waschen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und auf eine Zellzahl von 4×10^4 Zellen/ ml eingestellt.

Die zu testenden T-Zellen werden auf eine Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ / ml eingestellt. Von dieser Zellzahl ausgehend werden die Zellen in drei Stufen bis zu einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ / ml mit KM verdünnt.

Je 100 μ l der Calcein-AM gefärbten Targets werden nach dem untenstehenden Pipettierschema in eine 96-Loch Flachbodenplatte ausplattiert (s. Abb. 7). Ebenfalls 100 μ l jeder Stufe der Verdünnungsreihe der T-Zellen werden nach Schema in die vorgesehenen Löcher pipettiert. Abschließend werden die ersten vier Löcher jedes Ansatzes mit KM befüllt (spontane bzw. minimale Calcein-Freisetzung). Die folgenden vier Löcher werden mit einer zuvor hergestellten 1,8 %-igen TritonX-Lsg. befüllt (max. Calcein-Freisetzung). Der Ansatz wird für 3 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Der in den Zellkulturüberstand freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff wird nach Überführung von 100 μ l Kulturüberstand in eine neue 96-Loch Flachbodenplatte bestimmt. Die Messung erfolgt mit Hilfe eines geeigneten Fluoreszenzmessgeräts (Anregungswellenlänge: 485nm;

Emissionswellenlänge: 535nm). Anhand folgender Formel wird der spezifische Lysierungsgrad berechnet:

$$\text{Spezif. Lysierungsgrad (\%)} = \frac{\text{Probenfluoreszenz} - \text{Min. Fluoreszenz}}{\text{Max. Fluoreszenz} - \text{Min. Fluoreszenz}}$$

Abschließend wird mit den Messwerten ein Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt.

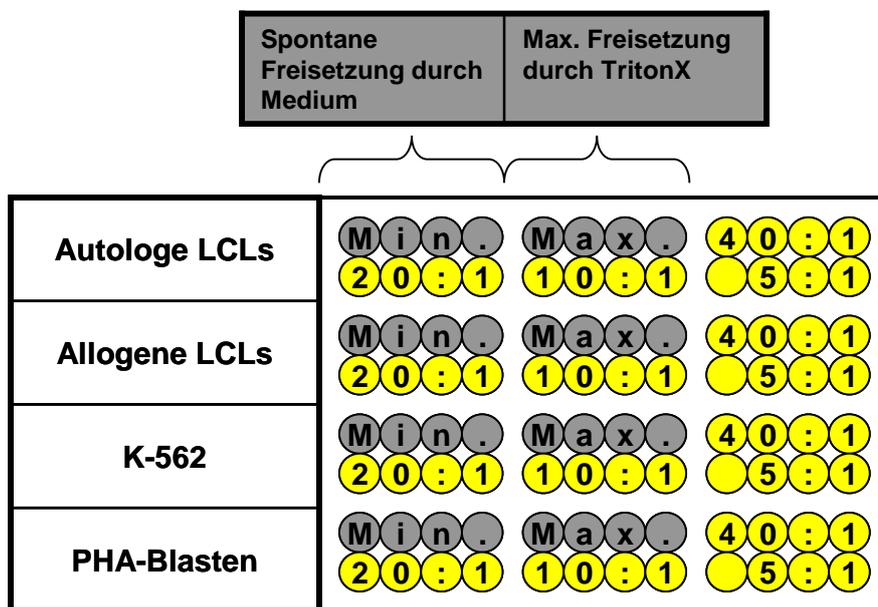


Abb. 7: Pipettierschema des Zytotoxizitätstests.

3.3.7 Bestimmung des Zytokinprofils mittels Cytometric-Bead-Array (CBA)

Die quantitative Zytokinbestimmung wird mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Th1/ Th2 Cytometric Bead Arrays (CBA) der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Mit diesem Kit können Zellkulturüberstände auf ihren Zytokingehalt analysiert werden. Die simultane Detektion der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 beruht auf der Kopplung von sechs Zytokin-spezifischen Primärantikörpern, die an ebenfalls sechs verschiedene Latexpartikelarten gekoppelt sind. Bei Anregung durch Laserlicht (488 nm) zeigen die über den Antikörper an die Partikel gebundenen Zytokine unterschiedliche

Eigenfluoreszenzen und ermöglichen so eine Differenzierung zwischen einzelnen Zytokinpopulationen.

Die Untersuchung der Zytokinprofile aus dem Zellkulturüberstand wurde nach Herstellerangaben am FACS Calibur (Becton Dickinson; Heidelberg) durchgeführt.

3.3.8 Bestimmung der Glukose- und Laktat-Konzentration

Die Bestimmung der Glukose- und Laktat-Konzentration im Zellkulturmedium wurde mit dem Ektachem-Gerät der Firma Ortho-Clinical-Diagnostics durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf einer enzymatischen Reaktion, bei der ein roter Farbstoff entsteht. Dieser Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 555nm detektiert. Aus der gemessenen Intensität des Farbstoffs lässt sich die Konzentration der Analyten (Glukose bzw. Laktat) ermitteln.

Eine definierte Probenmenge (10µl) wird auf ein Analyse-Plättchen gegeben und anschließend im Detektor gemessen. Bei jeder neuen Plättchen-Charge erfolgte eine Kalibrierung des Geräts mit Standards.

Eine weitere Variante der Glukosebestimmung wurde mit Hilfe des GlucoControl-Geräts der Firma Stada vorgenommen. Für die Analyse wird 5µl zellfreier Kulturüberstand auf die Teststelle des Streifens zur Glukosebestimmung pipettiert und auf dessen Rückseite die Farbentwicklung kontrolliert. Nach dem Einschalten des Geräts wird der Streifen innerhalb von 60 Sekunden in den Einschub für den Teststreifen eingeführt. Zuvor muss der richtige Teststreifen-Code angezeigt werden und das Teststreifen-Symbol aufleuchten. Der Messwert wird nach einigen Sekunden angezeigt.

3.3.9 Statistische Analysen

Für alle statistischen Analysen wurde, sofern nicht anders angegeben, die Software SPSS (SPSS Inc.) verwendet. Zwei verschiedene Methoden zur T-Zellgenerierung wurden vergleichend für eine Testperson durchgeführt. Aus diesem Grund wurde die paarweise Analyse dieser Zelllinien mit Hilfe des Wilcoxon-Tests vorgenommen. Unterschiede mit p-Werten kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

Im Zuge der Arbeit konnte ein zeitlich verkürztes Verfahren zur Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien etabliert werden. Die neue Herstellungsmethode wurde mit dem aktuellen Standardprotokoll zur Produktion EBV-spezifischer T-Zelllinien verglichen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte auf der Grundlage des neuen Verfahrens die Expansion der T-Zellen an ein geschlossenes Kultursystem adaptiert werden. Abschließend wurde der erarbeitete Herstellungs- und Expansionsprozess unter Realbedingungen getestet. Hierfür wurde das Material (Vollblut) immunsupprimierter Patienten verwendet.

4.1 Vergleichende Analyse der Generierungsmethoden

Das etablierte Standardprotokoll zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien wurde als Referenz für den Vergleich der beiden Generierungsverfahren genutzt. Es beinhaltet die repetitive Stimulation und Expansion von T-Zellen mit bestrahlten EBV-infizierten B-Zellen (LCL) als APC. Vergleichend hierzu wurde das neue Protokoll, bestehend aus sechs überlappenden EBV-Peptidpools (EBNA-1, -2a, -3c, LMP-1, -2, BZLF-1) in Kombination mit dem IFN γ Sekretions-Assay analysiert. Hierfür wurden zunächst von sieben gesunden EBV seropositiven Probanden LCL-Zelllinien etabliert. Die Herstellungsdauer betrug sechs bis neun Wochen. Um später eine vergleichende Auswertung vornehmen zu können, wurden für die Generierung der autologen EBV-spezifischen T-Zelllinien jeweils $1,1 \times 10^7$ PBMC zu gleichen Teilen als Ausgangsmaterial verwendet.

4.1.1 ELISpot

Die Frequenz EBV-spezifischer T-Zellen im Blut der Probanden wurde untersucht, um eine Aussage über die Startzellzahl bei Generierung der T-Zelllinien treffen zu können. Aufgrund des geringen Anteils EBV-spezifischer T-Zellen im Blut gesunder Individuen konnten durchflusszytometrisch keine klaren, verlässlichen T-Zellpopulationen detektiert werden. Daher wurden die Vorfrequenzen von sechs Testpersonen mit Hilfe der sensitiveren ELISpot-Technik analysiert. Für die ELISpot-Analyse wurden 3×10^5 PBMC EBV-spezifisch für 24 Std. stimuliert und auf IFN γ sowie IL-2 produzierende T-Zellen untersucht. Zytokin-produzierende Zellen wurden als positive Spots gezählt. Die

Ergebnisse wurden nach Abzug der unspezifischen Hintergrundsignale sowie auf Grundlage der eingesetzten Startzellzahl zur T-Zelllinienherstellung (55×10^6 PBMC) berechnet. Das Ergebnis des IFN γ -ELISpots ist exemplarisch in Abb. 8 dargestellt.

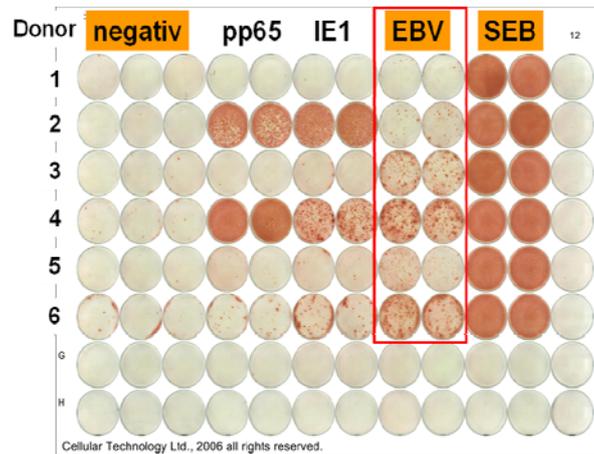


Abb. 8: IFN γ -ELISpot. Dargestellt ist das Ergebnis zur Detektion IFN γ produzierender T-Zellen nach Stimulation mit EBV-Antigenen. Für alle sechs untersuchten Testpersonen wurden negativ (DMSO) und positiv (SEB) Kontrollen mitgeführt. Als zusätzliche Kontrollen wurden CMV-Antigene (pp65 und IE-1) aufgetragen.

Aus Abb. 9 wird deutlich, dass die Frequenz IFN γ produzierender Zellen deutlich höher ist, als die der IL-2 produzierenden Zellen. Die Werte sind auf der Basis von 55×10^6 PBMC extrapoliert worden und variieren für IFN γ zwischen 8953 (Donor 1) und 76847 positiven Spots (Donor 4). Die Kalkulation der Anzahl IL-2 pos. Zellen basiert auf den 3330 (Donor 3) bis 12772 (Donor 4) detektierten IL-2 produzierenden Zellen. Im Durchschnitt produzierten 44504 (0,08%; IFN γ) bzw. 7435 (0,01%; IL-2) der 55×10^6 PBMC nach EBV-spezifischer Stimulation detektierbare Zytokine.

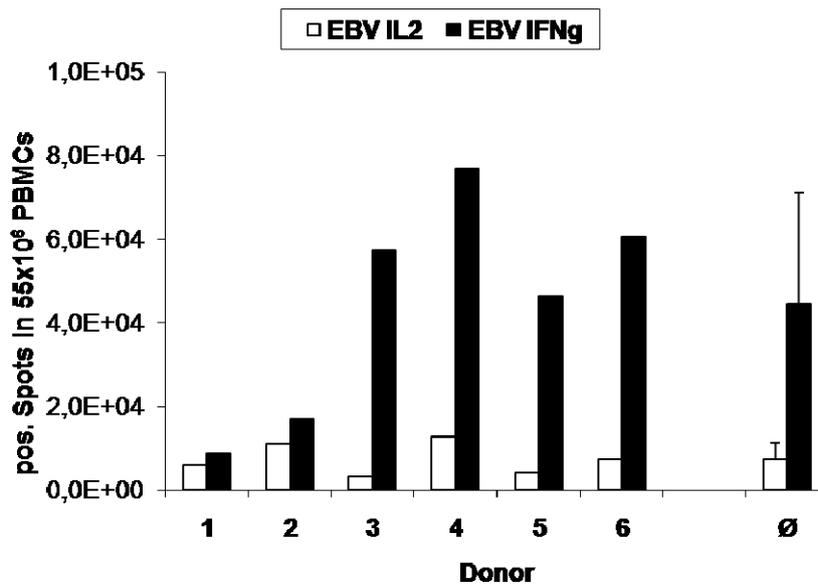


Abb. 9: ELISpot-Daten. Dargestellt sind die mit Hilfe der ELISpot-Technik ermittelten Frequenzen EBV-spezifischer T-Lymphozyten im Blut von sechs gesunden seropositiven Spendern. Untersucht wurden die Produktion der Zytokine IL-2 (weiße Balken) und IFNg (schwarze Balken) nach Stimulation mit EBV-Antigen. Die durchschnittliche Anzahl (mit STABW) spezifischer Zellen ist auf der rechten Seite aufgetragen.

4.1.2 Zellzahl nach Expansion und Kultivierungsdauer

Eine entscheidende Anforderung an ein neues T-Zell-Generierungsverfahren ist, eine ausreichend große Zellzahl für die adoptive Zelltherapie mit virusspezifischen T-Zellen zu erzielen. Für die klinische Anwendung werden mindestens 1×10^7 Zellen pro m^2 Körperfläche benötigt. Diese Zellzahl konnte mit beiden Methoden erreicht werden. Mit dem repetitiven Standardprotokoll (Protokoll 1) dauerte es ohne Berücksichtigung der LCL-Herstellung 26 Tage, um mindestens 55×10^6 EBV-spezifische T-Zellen zu generieren. Das hier neu etablierte Peptid-basierte Protokoll (Protokoll 2) erreichte diese Zellzahl bereits nach 20 Tagen. Die nach Expansion erzielten Zellzahlen zeigten spenderabhängig starke Schwankungen, wie in Abb. 10 dargestellt. Protokoll 1 variierte zwischen $5,5 \times 10^7$ (Donor 7) und $7,9 \times 10^8$ (Donor 4) EBV-spezifischen T-Zellen. Die Generierung der T-Zelllinien mittels Peptid-Stimulation (Protokoll 2) ergab ebenfalls mindestens $5,5 \times 10^7$ (Donor 1) und maximal 4×10^8 T-Zellen (Donor 7). Im Durchschnitt erzielten beide Protokolle eine vergleichbare Anzahl EBV-spezifischer T-Zellen von $2,6 \times 10^8$ (Protokoll 1) bzw. $2,4 \times 10^8$ Zellen (Protokoll 2).

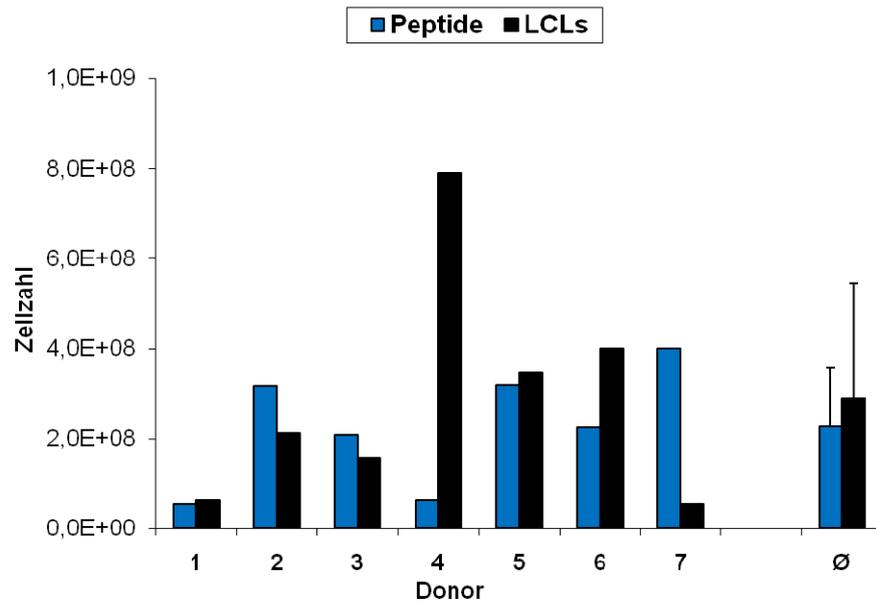


Abb. 10: Zellzahlen nach Expansion. Dargestellt sind die nach der Expansionsphase erzielten Zellzahlen EBV-spezifischer T-Lymphozyten. Die Resultate sind für alle sieben Probanden einzeln und im Durchschnitt mit STABW für das Peptid-basierte (blau) sowie das repetitive LCL Protokoll (schwarz) gezeigt.

4.1.3 Phänotyp nach Expansion

Die Analyse der Zelloberflächenmarker CD3, CD4, CD8 und CD16 ergab, dass die T-Zelllinien beider Protokolle von CD8 pos. Zellen dominiert waren. In Abb. 11 ist die durchschnittliche Verteilung der Marker für alle sieben Testspersonen dargestellt. Die Ergebnisse jedes Markers variierten spenderabhängig und ergaben vergleichbare Anteile CD8 pos. Zellen in beiden Protokollen. Das LCL-basierte Protokoll 1 resultierte durchschnittlich in 81,6% (64-92%) CD8 pos. Zellen. Die durch Peptid-Stimulation generierten T-Zelllinien enthielten im Mittel 77,4% (60-93%) CD8- und 14,9% CD4 pos. Zellen. Dies ergab im Vergleich zur Referenz (Protokoll 1; 3,1%) einen signifikant erhöhten Anteil CD4 pos. ($p= 0,03$) T-Zellen. Im Gegensatz hierzu erzielte Protokoll 1 einen höheren Anteil CD16 pos./ CD3 neg. Natürlicher Killer (NK)-Zellen (7,7%; Protokoll 2: 3,1%). CD4 und CD8 doppelt positive Zellen waren in den Zelllinien beider Generierungsmethoden gleichermaßen in geringem Umfang enthalten (Protokoll 1: 1,1%; Protokoll 2: 0,9%).

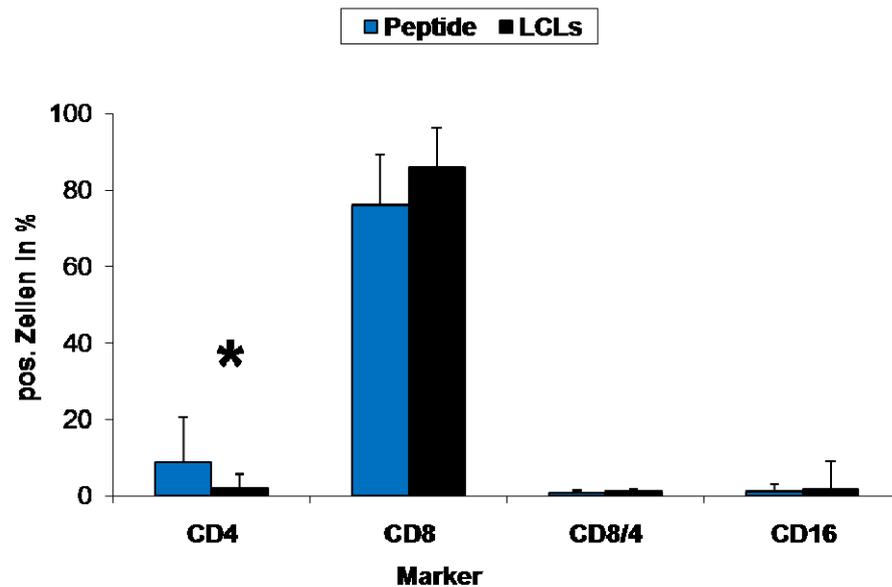


Abb. 11: Phänotyp. Dargestellt sind die im Durchschnitt (n=7) erzielten Ergebnisse der phänotypischen Bestimmung anhand der Zelloberflächenmarker CD4, CD8 und CD16. Die expandierten EBV-spezifischen T-Zellen wurden mit Peptidpools (blaue Balken) oder LCL (schwarze Balken) generiert. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Protokollen sind durch einen schwarzen Stern markiert ($p < 0,05$).

4.1.4 Analyseschema der Multiparameter-Durchflusszytometrie

Die Multiparameter-Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der T-Zellpopulationen wurde mit Hilfe von, zur jeweiligen Fragestellung der Analyse, passenden Antikörperkombinationen durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere auf die Handhabbarkeit der verschiedenen Fluorochrom-Konjugate in Bezug auf die spätere Detektion sowie evtl. zu stark überlappende Streustrahlung geachtet. Die Lymphozytenpopulation wurde durch ein großes Fenster ("Gate") markiert (s. Abb. 12). Dadurch konnte eine erste Abgrenzung zu anderen Zellarten vorgenommen werden, ohne potentielle Antigen-spezifische T-Zellen von der Analyse auszuschließen. Aneinanderhaftende, das Messergebnis verfälschende Zellen (Dubletten) wurden ebenfalls durch Markierung ausgeschlossen. Durch die Verknüpfung mit einem weiteren Fenster wurden tote Zellen, die Antikörper auch unspezifisch binden können, eliminiert. Die Abgrenzung wurde nicht anhand von T-Zell-Markern wie CD3, CD4 oder CD8 vorgenommen, da deren Expression auf aktivierten Zellen herunterreguliert sein kann, was eine genaue Unterscheidung erschweren bzw. verhindern kann. Im Folgenden wurden alle CD3 pos. T-Lymphozyten markiert und so von anderen Zellen (z.B. B-Lymphozyten)

getrennt. Im Anschluss wurden diese, direkt oder nach vorheriger Auftrennung in CD4- und CD8 pos. Subpopulationen, analysiert. Dieses Analyseschema wurde jeder durchflusszytometrischen Multiparametercharakterisierung zur eindeutigen Identifizierung der zu untersuchenden Zellpopulationen vorangestellt. Insgesamt sind durchflusszytometrisch Zelleigenschaften wie Zytokinproduktion, Differenzierungs- und Aktivierungsstatus, Vb-Repertoire, Degranulationskapazität sowie das Vermögen zur Remigration in lymphatisches Gewebe analysiert worden.

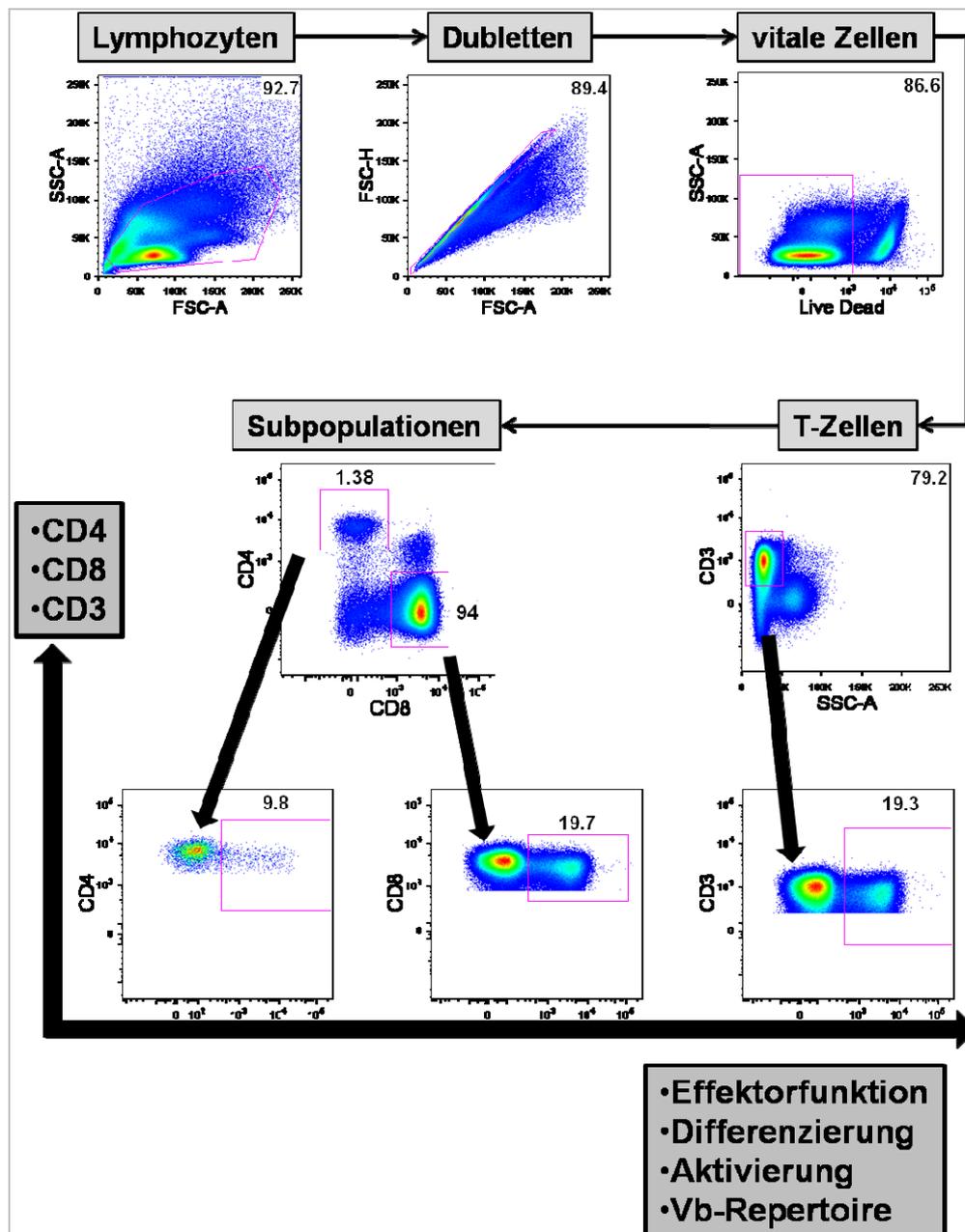


Abb. 12: Analyseschema der Multiparameter-Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die Verknüpfung der einzelnen Analysefenster ("Gating") bis zur eindeutigen Identifizierung der T-Lymphozyten und deren Subpopulationen.

4.1.5 Lymphknoten Homing und Differenzierungsstatus

Das Potential der expandierten T-Zellen zu sekundären Lymphorganen zurückzukehren wurde durchflusszytometrisch durch die Expression des Markers CD62L bestimmt. Zur Analyse des Differenzierungsstatus wurde die Markerkombination CD45RA und CD62L zur Unterscheidung zwischen Effektor-Gedächtnis-Zellen (effector memory: EM; CD45RA-/ CD62L-), zentralen Gedächtnis-Zellen (central memory: CM; CD45RA-/ CD62L+) und terminal differenzierten Effektor-Zellen (Eff; CD45RA+/ CD62L-) genutzt. Aufgrund der signifikanten Unterschiede beim Anteil CD4 pos. Zellen (s. Abb. 11) wurden die Ergebnisse in Abb. 13 auf der Basis einer für klinische Applikationen eingesetzten Zelldosis berechnet (1×10^7 Zellen pro m^2 Körperoberfläche).

Der Anteil CD8 pos. und CD62L pos. T-Zellen war in den mit EBV-Peptiden generierten Zelllinien (Protokoll 2) signifikant erhöht ($p=0,03$). Vergleicht man den Anteil *ex-vivo* generierter EBV-spezifischer CD4 pos. CD62L pos. Zellen beider Protokolle, so findet man einen tendenziell, aber nicht signifikant höheren T-Zellanteil mit dem Protokoll 2.

Abb. 13 macht darüber hinaus deutlich, dass mit beiden Herstellungsmethoden CD8- und CD4 pos. T-Zellen mit einem dominierenden EM- und CM-Phänotyp sowie einem vergleichsweise kleinen Anteil an Eff-Zellen generiert werden können. Offensichtlich werden aber mit dem Protokoll 2 (Peptidgenerierung) signifikant mehr EM-Zellen innerhalb der CD4 pos. T-Zellen ($p=0,02$) generiert. Des Weiteren werden signifikant mehr CM-T-Zellen ($p=0,02$) und weniger EM-T-Zellen ($p=0,02$) im CD8 Kompartiment generiert.

Zusammenfassend werden mit dem neuen Peptid-basierten Protokoll 2 im Vergleich signifikant mehr Memory-T-Zellen etabliert.

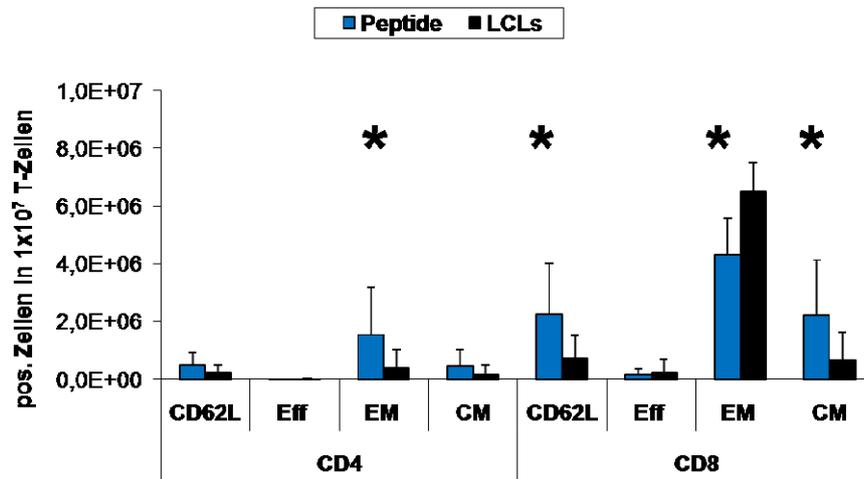


Abb. 13: Homing Potential und Differenzierungsstatus. Dargestellt ist der durchschnittliche ($n=7$) Differenzierungsstatus der CD4- und CD8 pos. T-Zellsubpopulationen (Eff-, EM- und CM-Zellen). Das Potential zur Rückwanderung der T-Lymphozyten zu lymphoiden Strukturen wird durch den Anteil CD62L pos. Zellen repräsentiert. Alle Ergebnisse sind für Peptid- (blau) und LCL-generierte Zellen (schwarz) aufgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Herstellungsverfahren sind mit schwarzen Sternen ($p < 0,05$) markiert.

4.1.6 Antigenpezifität und Aktivierungsstatus nach Restimulation

Zur besseren Charakterisierung der Zellfunktionalität wurden Oberflächenmoleküle, die den Aktivierungsstatus beschreiben, nach Langzeitstimulation mit autologen LCL (20 Std.) untersucht. Zusätzlich wurde die IFN γ und IL-2 Produktion der *ex-vivo* generierten T-Zellprodukte von sechs verschiedenen Probanden analysiert. Die Analyse des Aktivierungszustandes der Zellen wurde mit Hilfe der Marker CD137, CD40L (CD154) und CD69 vorgenommen. Die IFN γ Produktion wurde aufgrund der, im Verhältnis zu CMV-spezifischen T-Zellen, geringen Frequenz IFN γ pos. T-Zellen nach 6 Std. Stimulation nochmals untersucht. Es sollte getestet werden, ob eine längere Stimulationsdauer mit einer höheren Frequenz IFN γ pos. Zellen assoziiert ist. Alle in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse sind auf eine Applikationsdosis von 1×10^7 Zellen berechnet.

Die Abbildung zeigt, dass die Zahl aktivierter und Zytokin-produzierender CD8 pos. Zellen höher ist, als die der CD4 pos. Zellen. Mit dem Protokoll 1 (konventionelle Technologie) werden tendenziell mehr CD8 pos. CD137 pos. CD40L pos. EBV-spezifische T-Zellen generiert. Im Gegensatz dazu etabliert das Protokoll 2 signifikant mehr CD8 pos. CD69 pos. T-Zellen ($p = 0,05$). Der Vergleich beider Protokolle für den

CD4 pos. T-Zellanteil zeigt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von CD40L, CD69, CD137 sowie der IL-2Produktion. Signifikant höher hingegen war die Fähigkeit zur IFN γ Produktion der Protokoll 2 (Peptid) basierten EBV-spezifischen CD4 pos. T-Zellen. Eine Verlängerung der Stimulationszeit (20 Std. vs. 6 Std.) führte nicht zu einer Erhöhung der IFN γ Produktion im T-Zellprodukt.

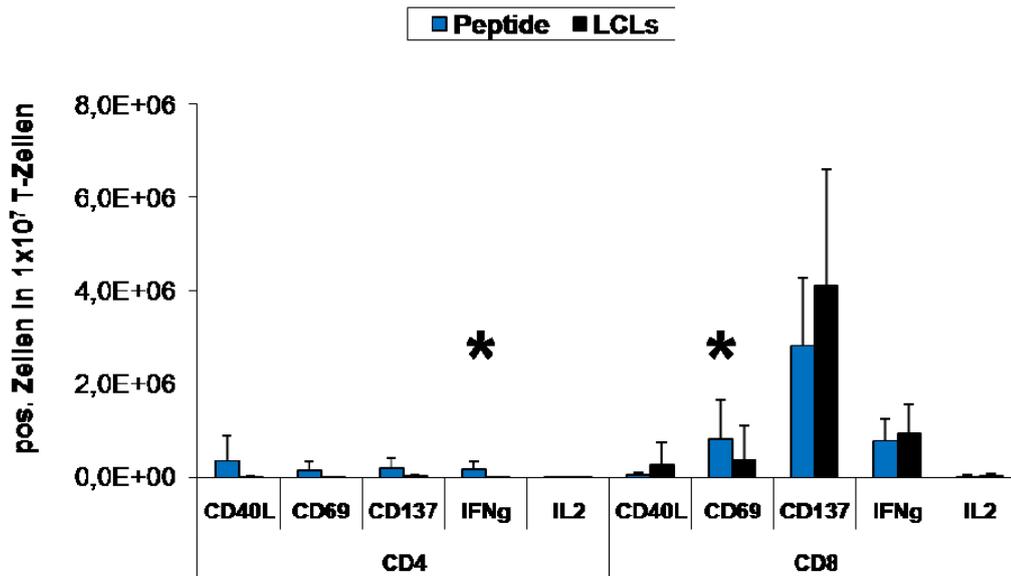


Abb. 14: Aktivierungsstatus und Zytokinproduktion. Dargestellt sind die durchschnittlichen (n=7) Resultate der Expression der Aktivierungsmarker CD40L, CD69 und CD137 nach Antigen-spezifischer Restimulation der expandierten T-Zelllinien. Die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN γ ist ebenfalls getrennt für CD4- und CD8 pos. Zellen gezeigt. Blaue Balken repräsentieren mit EBV-Peptidpools generierte T-Zellen. Schwarze Balken zeigen die Ergebnisse der mit LCL hergestellten Zelllinien. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Herstellungsverfahren sind durch schwarze Sterne ($p < 0,05$) markiert.

4.1.7 Effektorfunktion EBV-spezifischer T-Lymphozyten

Nach der Expansion wurden die EBV-spezifischen T-Zellen beider Generierungsmethoden mit autologen LCL restimuliert, um *ex-vivo* deren Funktionalität zu charakterisieren und somit Aussagen über ein weiteres Qualitätsmerkmal des T-Zellproduktes machen zu können. Wesentlich hierbei ist die Fähigkeit der Zellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IFN γ und TNF α sowie die Vermittlung von

Zytotoxizität. In beiden Protokollen variierte die Markerexpression deutlich zwischen den einzelnen Testpersonen.

Die Abb. 15 A+B dargestellten Resultate sind auf eine Applikationsdosis von 1×10^7 Zellen berechnet. Generell war die Expression aller Marker bei CD4 pos. Zellen niedriger als bei CD8 pos. Zellen. Hinsichtlich der TNFa und IFNg Expression zeigten beide Methoden in den jeweiligen Subpopulationen vergleichbare Ergebnisse. Jedoch wurde der Zytotoxizitätsmarker CD107a in den T-Zelllinien, die mit Protokoll 1 (LCL) hergestellt wurden, wesentlich stärker exprimiert. Dies zeigte sich insbesondere bei der CD4 pos. Subpopulation, wobei auch hier keine Signifikanz erreicht wurde (s. Abb. 15 A).

In der Abb. 15 B sind die Ergebnisse der drei analysierten Marker für CD8 pos. Zellen beider Generierungsmethoden vergleichend dargestellt. Die T-Zelllinien, die durch repetitive Stimulationen mit LCL (Protokoll 1) hergestellt wurden, zeigten im Durchschnitt eine höhere Expression der drei Marker. Signifikante Unterschiede wurden in diesem Fall nicht erzielt. Verglichen mit dem Peptid-basierten Protokoll 2 wurde CD107a 1,5 mal, IFNg 1,96 mal und TNFa 1,86 mal höher exprimiert. Das Expressionsmuster (CD107a>TNFa>IFNg) war hingegen in Protokoll 1 und 2 gleich.

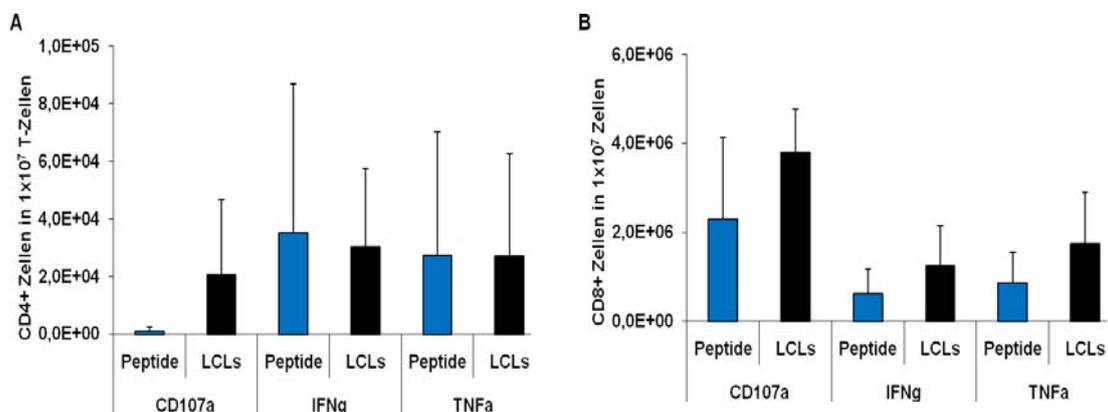


Abb. 15 A+B: Effektorfunktion. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl (n=7) der CD4 pos. (A) und CD8 (B) pos. Zellen, die auf spezifische Restimulation mit der Bildung von Effektormolekülen (IFNg und TNFa) oder Degranulation (CD107a Expression) reagierten. Die expandierten T-Zelllinien wurden entweder mit EBV-Peptiden (blau) oder LCL (schwarz) hergestellt.

4.1.8 Multifunktionale T-Zellen

Multifunktionale CD4 pos. und CD8 pos. Zellen innerhalb der EBV-spezifischen T-Zelllinien wurden, wie Abb. 16 A-D dargestellt, auf die gleichzeitige Expression der Marker CD107a, IFN γ und TNF α hin untersucht. Die Ergebnisse sind auf die für eine klinische Applikation genutzte Dosis von 1×10^7 Zellen pro m^2 Körperoberfläche bezogen worden. Die Anzahl der Zellen, die einen, zwei oder alle drei Marker exprimieren, wurde durch eine Funktion zur Verknüpfung der Auswertungsplots (Boolean gates) ermittelt. Die Anzahl aller für einen der Marker pos. Zellen wurde als 100% Wert genutzt und die Zahl zwei- bzw. dreifach pos. Zellen wurde anteilig kalkuliert.

Der Großteil aller T-Zellen beider Protokolle zeigte nur jeweils eines der drei untersuchten Merkmale. Die T-Zelllinien, die durch repetitive Stimulation mit LCL (Protokoll 1) hergestellt wurden, beinhalteten signifikant mehr zweifach CD8 pos. Zellen (s. Abb. 16 C+D; $p=0,04$). Im Gegensatz hierzu gab es innerhalb der mit Protokoll 2 generierten CD4 pos. Subpopulation signifikant mehr dreifach pos. Zellen (s. Abb. 16 A+B; $p=0,03$). Ferner waren im Durchschnitt ebenfalls mehr doppelt und weniger einfach pos. Zellen nach Expansion vorhanden.

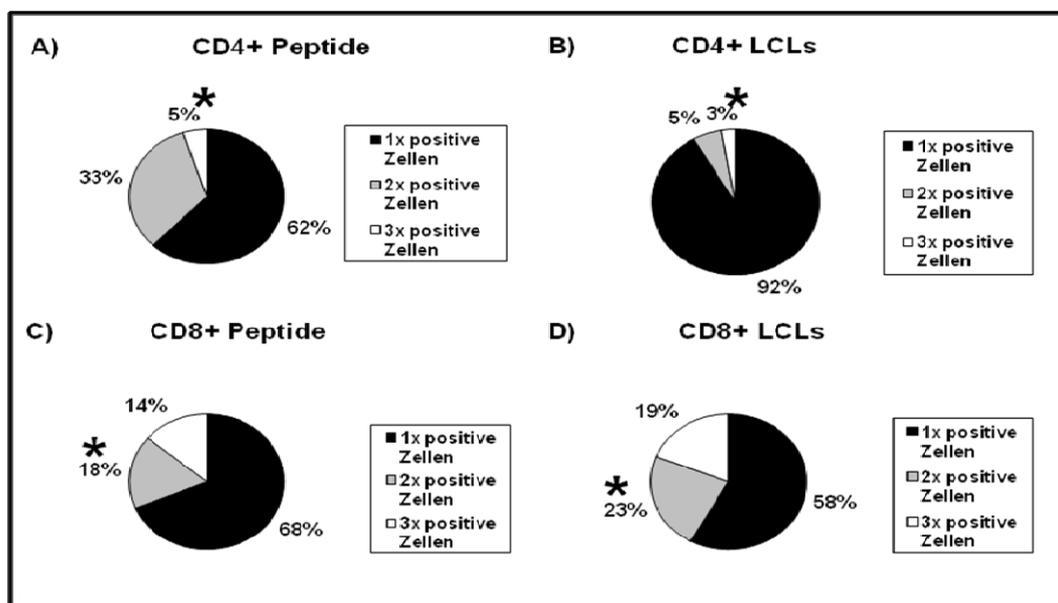


Abb. 16 A-D: Multifunktionalität. Dargestellt ist der durchschnittliche ($n=7$) T-Lymphozytenanteil innerhalb der Zelllinien mit ein, zwei oder drei der untersuchten Funktionalitäten (Degranulation, IFN γ - und TNF α -Produktion). Die Ergebnisse sind für LCL generierte CD4- (A) und CD8 (B) pos. T-Zellen ebenso wie für EBV-Peptidpool generierte CD4- (C) und CD8 (D) pos. T-Lymphozyten gezeigt. Signifikante Differenzen zwischen beiden Protokollen sind durch schwarze Sterne hervorgehoben ($p < 0,05$).

4.1.9 Lytische Kapazität

Das Potential der T-Zelllinien aller sieben Probanden EBV-Antigen präsentierende Zellen spezifisch zu lysieren, wurde mit Hilfe eines Calcein-AM basierten Zytotoxizitätstests untersucht. Autologe LCL (Peptid beladen oder unbeladen), allogene LCL (HLA verschieden) und K-562 Zellen (MHC-I defizient und sensitiv gegenüber NK-Zellen) wurden als Zielzellen genutzt, um Transplantationsbedingungen zu simulieren.

Die T-Zelllinien beider Generierungsmethoden zeigten eine Dosis-abhängige spezifische Zytotoxizität gegenüber autologen mit zusätzlichem EBV-Antigen beladenen LCL (s. Abb. 17 A+B). Auch die maximale lytische Aktivität (40:1 Ratio) gegen autologe EBV-Peptidpool beladene Zielzellen (LCL) war für beide Methoden vergleichbar. Es gab jedoch signifikante, von der Generierungsmethode abhängige Unterschiede bei der Erkennung bzw. der Lyse nativer autologer LCL ($p=0,03$). Alle mit LCL hergestellten T-Zelllinien zeigten, wie in Abb. 17 B dargestellt, diesbezüglich eine durchschnittliche Lyserate von 30% (20:1 Ratio). Die Abb. 17 A zeigt, dass die mit EBV-Peptidpools generierten T-Zelllinien hier im Durchschnitt nur eine Rate von 5% (20: 1 Ratio) erzielten. Bei beiden Herstellungsmethoden war die für den adoptiven Transfer relevante Zytotoxizität gegenüber allogenen Zellen gering ($< 10\%$). Im Vergleich beider Protokolle zeigten die T-Zelllinien, die mit Protokoll 2 (Peptide) generiert wurden bei einer 20:1 Ratio im Durchschnitt eine höhere Aktivität gegenüber NK-Zellen (18% zu 8%). Stichprobenartig wurde die Aktivität gegenüber autologen, nicht EBV-infizierten Zellen (PHA-Blasten) getestet. In keinem Fall konnte hierbei eine Lyse dieser Zellen detektiert werden.

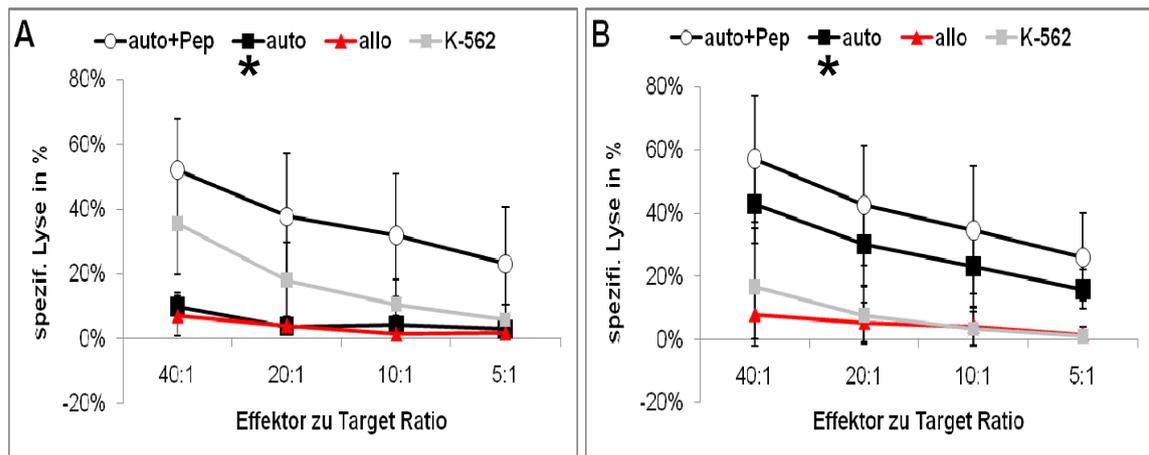


Abb. 17 A+B: Lytische Kapazität. Dargestellt ist die durchschnittliche ($n=7$) lytische Aktivität der expandierten EBV-spezifischen T-Zellen. Die Ergebnisse der mit LCL (Abb. 17 B) sowie der mit Peptidpools generierten T-Zelllinien (Abb. 17 A) sind getrennt aufgeführt. Als Zielzellen (Targets) dienten autologe (auto, schwarz), allogene (allo, rot) und autologe Peptid-beladene (auto+Pep, schwarz/ weiss gepunktet) LCL sowie K-562 Zellen (grau). Die lytische Aktivität wurde für die Verhältnisse von 40, 20, 10 und 5 T-Zellen zu einer LCL analysiert. Signifikante Unterschiede sind durch einen schwarzen Stern in der Legende gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.1.10 Immundominanz latenter Antigene

Die EBV-spezifischen T-Zelllinien aller sieben Probanden wurden mit Hilfe der vorhandenen sechs EBV-Peptidpools hinsichtlich immundominanter latenter Antigene untersucht. Hierfür wurden die parallel hergestellten Zelllinien beider Generierungsverfahren mit CD3-depletierten autologen PBMC restimuliert. Die zur Stimulation verwendeten PBMC wurden zuvor in sechs Parallelansätzen mit jeweils einem der sechs EBV-Peptidpools beladen. Anschließend wurden die CD4- und CD8 pos. T-Lymphozyten der expandierten Zelllinien auf die Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α sowie die Expression des Degranulationsmarkers CD107a untersucht. Aus diesen Daten wurden der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (STABW) ermittelt. Antworten, die größer als der MW plus 2x STABW waren, wurden als dominant gewertet. Antworten, die größer als der MW plus 1x STABW waren, wurden als subdominant eingestuft.

Tab. 2: Immundominanz der LCL T-Zelllinien. Dargestellt sind dominante (in rot) und subdominante (in schwarz) Immunantworten der T-Zellen gegen die sechs verwendeten EBV-Peptidpools. Die Ergebnisse sind für alle sieben Probanden einzeln und in Summe für jeden der drei untersuchten Marker (CD107a, IFN γ , TNF α) aufgeführt. Die Resultate der Analyse sind für CD4- und CD8 pos. T-Zellen gezeigt.

LCLs								
Marker	Donor	EBNA 1	EBNA 2a	EBNA 3c	BZLF 1	LMP 1	LMP 2	Gesamt
CD107a	1			CD8				
IFN γ				CD8/CD4	CD4			
TNF α			CD4	CD8				
CD107a	2			CD8/CD4				
IFN γ				CD8/CD4				
TNF α				CD8/CD4				
CD107a	3				CD8/CD4			
IFN γ					CD8			
TNF α					CD8/CD4			
CD107a	4		CD4				CD8	
IFN γ				CD8	CD4			
TNF α			CD4				CD8	
CD107a	5			CD8	CD4			
IFN γ					CD8			
TNF α						CD8	CD4	
CD107a	6		CD4	CD8	CD8			
IFN γ				CD8/CD4				
TNF α			CD4	CD8				
CD107a	7						CD8	
IFN γ		CD4			CD8			
TNF α		CD4						
Σ dominant CD8/CD4				6/1			1/0	7/1
Σ subdominant CD8/CD4		0/2	0/5	5/4	7/5		2/1	14/17

In der Tabelle 2 ist die Verteilung der dominanten und subdominanten Antworten gegen die einzelnen Peptidpools der mit LCL generierten T-Zelllinien aufgeführt. Die Verteilung der insgesamt 39 detektierten Antworten schwankt Spender-spezifisch. Der größte Teil der Antworten (79%) ist vom subdominanten Typ, wobei der Anteil CD4- und CD8 pos. Antworten etwa gleich ausgeprägt ist (CD4: 45%; CD8: 55%). Die dominanten Antworten hingegen sind klar CD8 dominiert (88%). Dominante wie auch subdominante Antworten sind häufig gegen jeweils einen der sechs getesteten Peptidpools gerichtet. Sie konzentrieren sich vermehrt auf EBNA-3c oder BZLF-1 (5 von 7 Zelllinien). Auffallend sind die wenigen gegen EBNA-1 bzw. die nicht vorhandenen gegen LMP-1 gerichteten Antworten.

Tab. 3: Immundominanz der Peptidpool T-Zelllinien. Dargestellt sind dominante (rot) und subdominante (schwarz) Immunantworten der T-Zellen gegen die sechs verwendeten EBV-Peptidpools. Die Ergebnisse sind für alle sieben Probanden einzeln und in Summe für jeden der drei untersuchten Marker (CD107a, IFN γ , TNF α) aufgeführt. Die Resultate der Analyse sind für CD4- und CD8 pos. T-Zellen gezeigt.

Peptide								
Marker	Donor	EBNA 1	EBNA 2a	EBNA 3c	BZLF 1	LMP 1	LMP 2	Gesamt
CD107a	1		CD8/CD4					
IFN γ				CD8				
TNF α		CD4		CD8				
CD107a	2		CD4	CD8/CD4				
IFN γ			CD4	CD8/CD4				
TNF α			CD4	CD8/CD4				
CD107a	3	CD4			CD8			
IFN γ					CD8/CD4			
TNF α					CD8/CD4			
CD107a	4		CD4	CD8/CD4	CD8			
IFN γ				CD8/CD4				
TNF α				CD8				
CD107a	5			CD4	CD8			
IFN γ				CD4	CD8			
TNF α				CD4	CD8			
CD107a	6			CD8/CD4				
IFN γ				CD8/CD4				
TNF α			CD4	CD8				
CD107a	7		CD8/CD4					
IFN γ			CD8/CD4					
TNF α			CD8/CD4					
Σ dominant CD8/CD4			3/0	6/0	4/0			13/0
Σ subdominant CD8/CD4		0/2	1/9	5/10	3/2			9/23

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Analyse für die auf Basis der EBV-Peptidpools generierten T-Zelllinien. Auch hier schwankt die Verteilung der Antigen-spezifischen Antworten in Abhängigkeit von den Spendern. Wobei es eine deutliche Fokussierung auf zumeist jeweils einen der drei Peptidpools EBNA-2a, EBNA-3c oder BZLF-1 gibt. Im Vergleich zu den mit LCL generierten Zellen konnte eine etwas größere Anzahl von 45 Antigen-spezifischer Antworten nachgewiesen werden. Allerdings waren diese ebenfalls meist subdominanter Natur (71%) und deutlich CD4 dominiert (72%). Im Gegensatz hierzu stammten alle dominanten Antworten von CD8 pos. T-Zellen. Ähnlich gering fiel im Vergleich die Reaktion auf eine Stimulation mit EBNA-1 aus. Gegen LMP-1 und LMP-2 konnten weder dominante noch subdominante Antworten detektiert werden.

Tab. 4: Prozentuale Verteilung der Immunantworten. Dargestellt ist die durchschnittliche Verteilung der detektierten Antworten gegen die untersuchten Peptidpools (EBNA-1, 2a, 3c, BZLF-1, LMP-1 und LMP-2). Die Ergebnisse sind für beide Generierungsverfahren (LCL und Peptide) gegen die sechs einzelnen EBV-Peptidpools sowie als Summe dominanter und subdominanter Antworten gezeigt.

Generierungsmethode	EBNA 1	EBNA 2a	EBNA 3c	BZLF 1	LMP 1	LMP 2	Σ Antworten	
							dominant	subdominant
LCLs	5%	13%	41%	31%	X	10%	21%	79%
Peptide	4%	29%	47%	20%	X	X	29%	71%

Der prozentuale Anteil der gegen die einzelnen latenten Antigen-Peptidpools gerichteten Antworten ist für beide Herstellungsverfahren in Tabelle 4 zusammengefasst. Weiterhin sind die Summen aller dominanten und subdominanten Antworten dargestellt. Die stärkste Häufung mit jeweils über 40% der Antworten gegen einzelne Peptidpools zeigt sich für beide Generierungsmethoden bei EBNA-3c. Im Vergleich zeigen beide Verfahren verschieden stark ausgeprägte Häufungen bei den Reaktionen auf EBNA-2a (LCL: 13%; Peptide: 29%) und BZLF-1 (LCL: 31%; Peptide: 20%) Stimulationen. Ein deutlicher Unterschied ist die nicht vorhandene Antwort der mit Peptidpools generierten T-Zelllinien gegen das Antigen LMP-2. Zelllinien, die auf Basis der Stimulation mit LCL hergestellt wurden, zeigten hier in 10% der Fälle eine Reaktion auf den LMP-2 Stimulus. Die durchschnittliche Verteilung dominanter und subdominanter Antworten war für beide Generierungsprozesse vergleichbar.

4.1.11 Analyse des Vbeta-Repertoires der T-Zellrezeptoren

4.1.11.1 Anzahl der Expansionen und Expansionsstärke

Die Charakterisierung des Vbeta (Vb)-Repertoires der T-Zellrezeptoren wurde durchflusszytometrisch für alle sieben Testpersonen und 24 Vb-Klone vorgenommen. Die durchschnittliche Anzahl expandierter Vb-Klone ist vergleichend (LCL Protokoll 1: schwarz; Peptid Protokoll 1: weiss) für CD3-, CD4- und CD8 pos. T-Zellen beider Protokolle in Abb. 18 A dargestellt. Ein Klon wurde als expandiert angesehen, wenn die Expression seines Markers (z.B. Vb-1) größer als die zweifache Standardabweichung eines gegebenen Standards (Beckmann Coulter; Quick Reference Card) war. Beide

Generierungsmethoden resultierten in einer vergleichbaren Anzahl expandierter CD3 pos. (ca. 3 Klone/ Zelllinie). und CD8 pos. Vb-Klone (ca. 2 Klone/ Zelllinie). Die Anzahl expandierter CD4 pos. Vb-Klone war im Peptid-basierten Protokoll 2 signifikant höher ($p=0,01$; ca. 5 Klone/ Zelllinie) als im repetitiven Protokoll 1 (LCL; ca. 1 Klon/ Zelllinie). Generell zeigten die mit EBV-Peptidpools generierten T-Zelllinien ein größeres Vb-Repertoire in der CD4 pos. Subpopulation. Im Gegensatz hierzu war das Repertoire in den repetitiv generierten Linien innerhalb der CD8 pos. T-Zellen höher, ohne jedoch eine größere Vielfalt als das Peptid-Protokoll 2 zu beinhalten.

Die durchschnittliche Stärke der Vb-Expansionen wurde als Quotient eines expandierten Klons und eines gegebenen Standards (Beckmann Coulter; Quick Reference Card) errechnet. In Abb. 18 B lässt sich erkennen, dass alle mit Peptidpools hergestellten T-Zelllinien tendenziell stärkere Vb-Expansionen zeigen. Allgemein wiesen beide Protokolle eine stärkere Vb-Expansion bei CD8 pos. Zellen als bei CD4 pos. T-Zellen auf.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass das Peptid-basierte neue Protokoll 2 im Vergleich zum Standard (Protokoll 1) eine vergleichbare Anzahl, aber stärker expandierte CD8 pos. Vb-Klone generiert. Im Gegensatz hierzu beinhalten die mit Protokoll 2 erzeugten CD4 pos. T-Zellen ein breiteres und stärker expandiertes Vb-Repertoire.

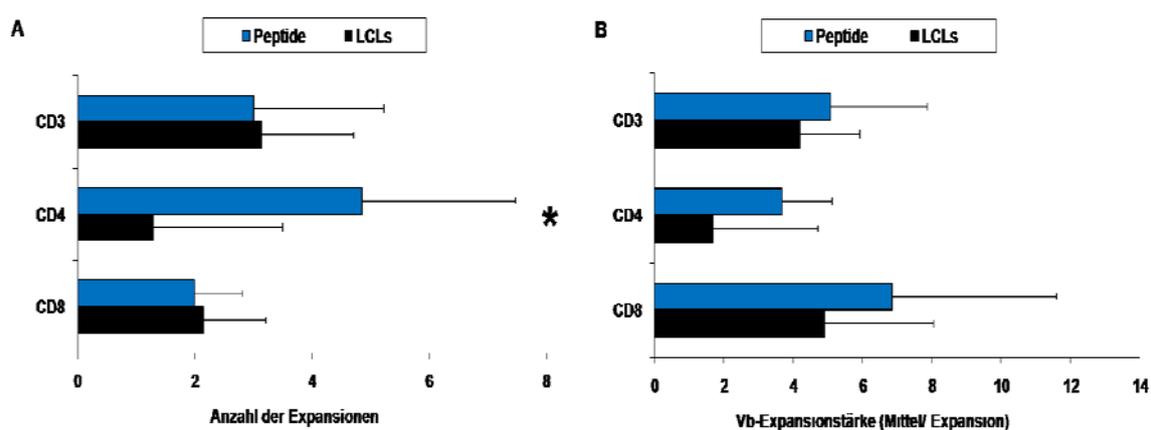


Abb. 18 A+B: Anzahl und Stärke der Vb-Expansionen. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl ($n=7$) der expandierten Vb-Klone (A) pro T-Zelllinie sowie deren Expansionsstärke (B) für beide Generierungsmethoden (Peptide: blau; LCL: schwarz). Die Ergebnisse sind für CD3-, CD4- und CD8 pos. Zellen aufgeführt, wobei signifikante Unterschiede mit einem schwarzen Stern markiert sind ($p < 0,05$).

4.1.11.2 Bestimmung des Differenzierungsstatus der expandierten Vb-Klone

Die Anzahl aller expandierten CD3-, CD4- und CD8 pos. Vb-Klone wurden hinsichtlich ihres Differenzierungsstatus, wie in Abb. 19 dargestellt, analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf die in der Therapie verwendete Zelldosis von 1×10^7 Zellen pro m^2 Körperoberfläche bezogen. Die expandierten Klone beider Generierungsmethoden wurden von CD8 pos. Klonen mit einem EM-Phänotyp dominiert und enthielten vergleichsweise geringe Anteile an Eff-Zellen. Klone, die aus Protokoll 2 (Peptide) resultierten, beinhalteten tendenziell mehr Zellen mit einem CM-Phänotyp als die Referenzklone aus Protokoll 1 (LCL).

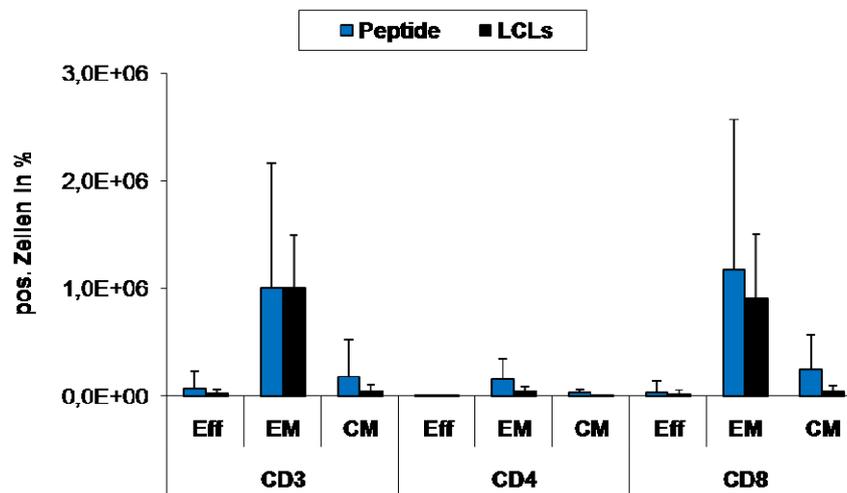


Abb. 19: Differenzierungsstatus der expandierten Vb-Klone. Dargestellt ist der durchschnittliche (n=7) Differenzierungszustand sowie die korrespondierende Zellzahl für beide Herstellungsprotokolle (Peptide: blau; LCL: schwarz). Die Resultate sind getrennt nach CD3-, CD4- und CD8 pos. EBV-spezifischen T-Zellen aufgezeigt.

4.1.11.3 Bestimmung der expandierten Vb-Klone

In Abb. 20 A+B ist die Bestimmung der einzelnen expandierten CD4- und CD8 pos. Vb-Klone dargestellt. Es ist ersichtlich, dass alle mit Protokoll 1 (LCL) expandierten CD4 pos. Klone mit Protokoll 2 (Peptid) in gleichem Umfang oder höher expandiert wurden (s. Abb. 20 A). Außerdem erzielte das Peptid-basierte Protokoll 2 eine höhere Diversität an expandierten Vb-Klonen (18 Klone Protokoll 2; 7 Klone Protokoll 1). Der Vb-Klon 13.1 war in allen sieben Testpersonen und beiden Protokollen gleichermaßen am stärksten ausgeprägt.

Das Expansionsmuster der CD8 pos. T-Zellen war, wie Abb. 20 B dargestellt, für sieben von zehn expandierten Klonen beider Protokolle identisch (Vb 2, 7.1, 8, 12, 16, 18, 21.3). Mit Protokoll 1 (LCL) wurden zwei der zehn Klone (13.1 und 14) öfter expandiert. Ausschließlich mit Protokoll 1 kam es zu einer Expansion des Vb-Klons 5.1. Hingegen konnte mit Protokoll 2 der Vb-Klon 14 nur zweimal expandiert werden. Vorherrschend im repetitiven Protokoll 1 war Klon 14 (Expansion in 4 T-Zelllinien). Im neu entwickelten Protokoll 2 enthielten maximal zwei Zelllinien expandierte Klone der gleichen Vb-Familie.

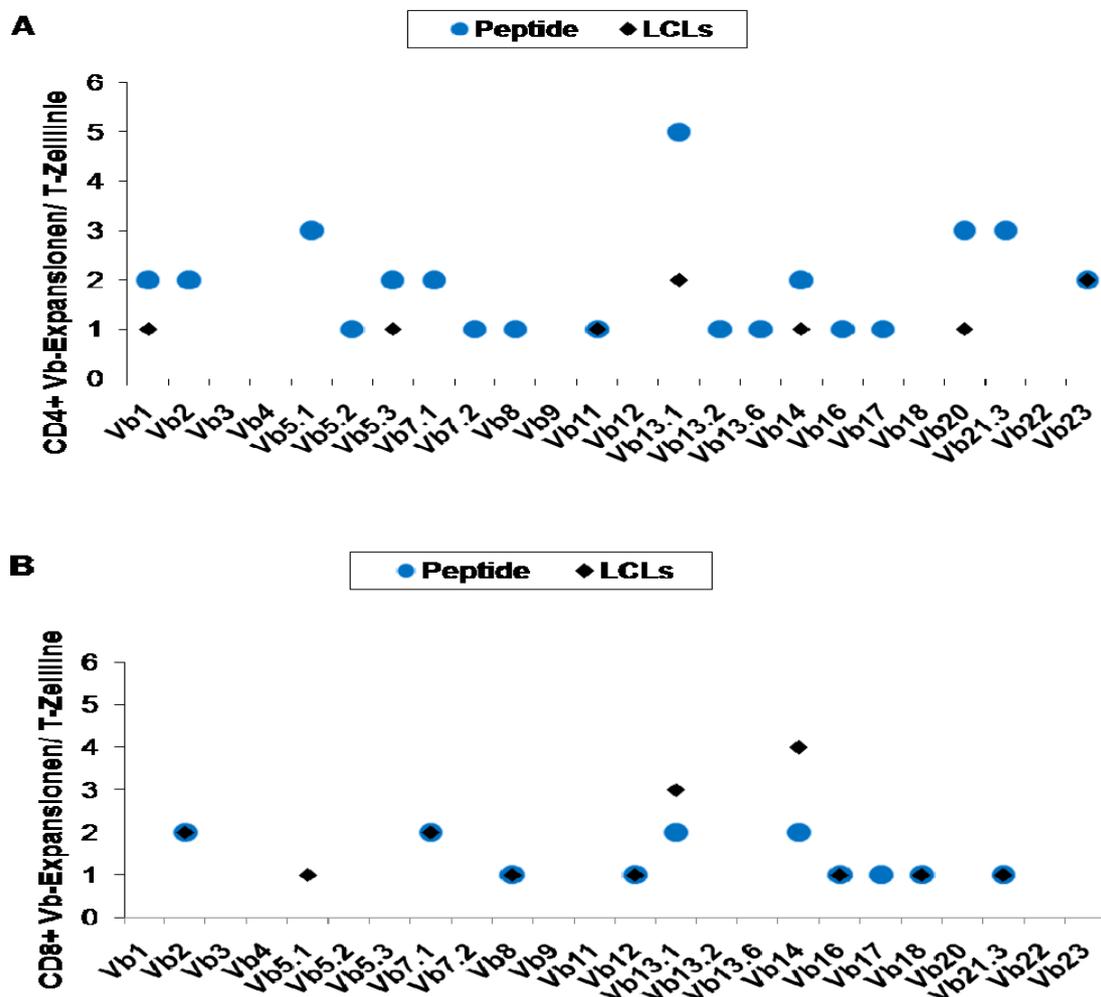


Abb. 20 A+B: Expandierte Vb-Klone. Dargestellt sind die expandierten Vb-Klone sowie deren durchschnittliche (n=7) Anzahl pro T-Zelllinie. Die Ergebnisse sind für beide Herstellungsmethoden (Peptide: blau; LCL: schwarz) und getrennt nach CD4- (A) bzw. CD8 (B) pos. Klonen aufgeführt.

4.2 Adaption der T-Zellexpansion an ein geschlossenes Kultursystem

Die im ersten Teil der Arbeit dargestellten Ergebnisse zum Peptidpool-basierten Generierungsverfahren EBV-spezifischer T-Lymphozyten bilden die Grundlage für eine mögliche Adaption des Expansionsprozesses an ein geschlossenes Kultursystem. Im zweiten Teil der Arbeit werden zunächst kurz die Resultate zur Vorauswahl eines geeigneten Kultursystems sowie zur Anpassung und Optimierung der Kulturführung vorgestellt. Abschließend sind die detaillierten Resultate zu den funktionellen Eigenschaften der T-Zellen nach Expansion in einem geschlossenen Kultursystem dargestellt.

4.2.1 Auswahl des Kultursystems

Im Anschluss an eine Produktrecherche wurden kommerziell erhältliche Beutelsysteme der Hersteller Lampire, Miltenyi Biotech und CellGenix (s. Tab. 5) auf ihre Eignung zur Expansion von T-Lymphozyten aus kleinsten Startzellzahlen getestet. Um die bestmögliche Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurde ein anfängliches Kulturvolumen von 5% des jeweiligen Beutelvolumens inokuliert. Die Kulturdauer betrug 14 Tage. Weiterhin wurde der Einfluss einer Vergrößerung der Kulturoberfläche mittels Adhärenz-fördernden Microcarriern in der Expansionskultur evaluiert (s. Abb. 21). Analysiert wurde das Zellwachstum in Verbindung mit mikroporösen Cytodex3-Beads (GE Healthcare Europe) aus Dextran sowie FibraCel Disks (New Brunswick Scientific) aus einem Polypropylen-Polyester Gemisch.

Tab. 5: Zellkulturbeutel. In der Tabelle sind die verwendeten Beutel mit dem jeweiligen Hersteller, den erhältlichen Größen, den erzielten Expansionsfaktoren sowie der Zellvitalität nach Kulturende aufgeführt.

Produkt	Hersteller	Volumen	Expansionsfaktor/Vitalität
Vue Life	Cell Genix	7ml-730ml	1/71%
Cell Culture Bag	Lampire	250ml-2000ml	33/86%
T Cell Expansion Bag	Miltenyi Biotech GMBH	100ml	9/78%

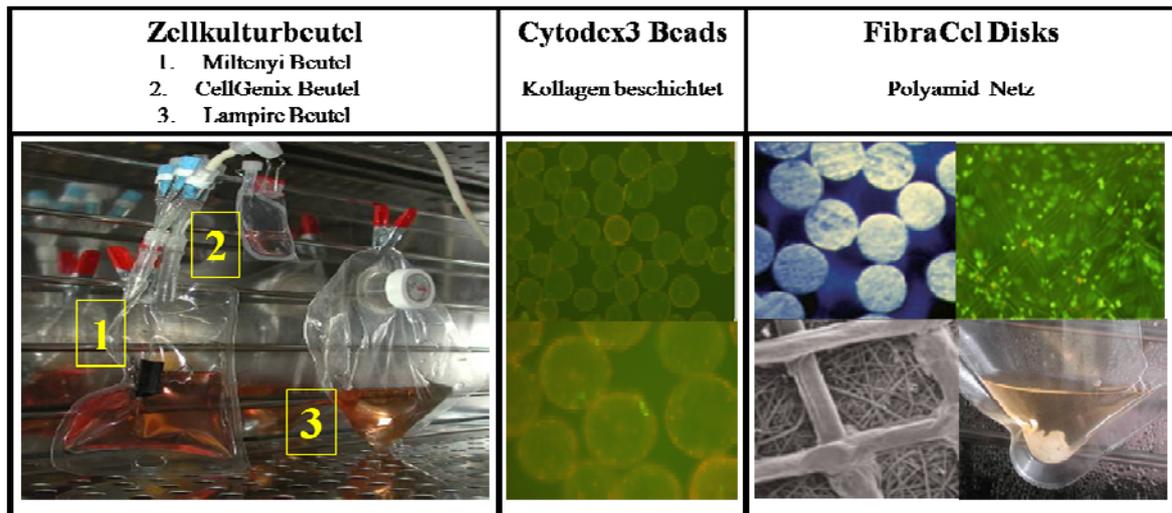


Abb. 21: Getestete Zellkulturmaterialien. Im linken Teil der Abbildung sind alle drei getesteten Beutel zu sehen (Beutel 1: Miltenyi; Beutel 2: CellGenix; Beutel 3: Lampire). In der Mitte sind die bewachsenen Cytodex3 Beads in 4 (oberes Bild) bzw. 10-facher (unteres Bild) Vergrößerung nach Fluoreszenzfärbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid dargestellt. Auf der rechten Abbildungsseite sind Aufnahmen der FibraCel Disks in Originalgröße, mit Zellbewuchs (Acridinorange-/ Ethidiumbromidfärbung; 10-fache Vergrößerung), im Rasterelektronenmikroskop und während der Kultivierung im Beutel erkennbar.

Der Zellkulturbeutel der Firma Lampire wurde für alle weiteren Experimente ausgewählt. Im direkten Vergleich der erzielten durchschnittlichen Expansions- und Vitalitätsraten (s. Tab. 5) zeigte dieser Beutel die besten wachstumsunterstützenden Eigenschaften. Weiterer Beleg hierfür war die anhand von Glukose- und Laktatbestimmungen gemessene Stoffwechselaktivität der Zellen während der Expansion in den Beuteln.

Die zusätzliche Verwendung der Cytodex3-Beads im Zellkulturbeutel erbrachte keine Wachstumsvorteile. Hingegen wurden durch die Einbringung der FibraCel Disks höhere Expansionsraten erzielt. Jedoch konnten die Zellen nur durch mehrmaliges Spülen mit einer EDTA-PBS-Lösung und auch dann nur partiell aus dem Kunststoffgewebe rückgewonnen werden. Weiterhin hatte diese Behandlung einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Aufgrund der zusätzlich notwendigen Arbeitsschritte sowie des hohen Zellverlustes wurde auch der Einsatz von FibraCel Disks für die Expansion der T-Zellen verworfen.

4.2.2 Anpassung der Kulturführung an die Expansion in Zellkulturbeuteln

Die Kulturführung im offenen System der 24-Loch Kulturplatte ist nicht standardisiert. Sie orientiert sich an der makroskopischen und mikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie, Zelldichte und Clusterbildung. Im Zusammenspiel mit der Verfärbung des Phenolrot-Indikators im Medium wird so der Zustand einer T-Zellkultur eingeschätzt. Je nach Beurteilung erfolgt dann eine weitere Kulturperiode, eine Erneuerung des Mediums oder die Expansion der Zellen.

Alle genannten Parameter, bis auf die makroskopische Analyse der Zellcluster, sind für die Kultivierung in einem Beutelsystem nicht anwendbar. Wiederholte mikroskopische Untersuchungen führten, aufgrund der im Beutel nicht fixierbaren Zellsuspension und damit einhergehenden Zellverlusten, stets zu einer erheblichen Wachstumsbeeinträchtigung oder zum Absterben der Kultur. Auch aus der Färbung des Mediums ließen sich keine Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen gewinnen. Aus diesem Grund wurden die T-Zellen eines Spenders parallel in Zellkulturplatten bzw. im Beutel expandiert und mit Hilfe des Cytometric-Bead-Arrays (CBA) auf wachstumslimitierende Faktoren untersucht. Des Weiteren wurde der Zellkulturüberstand beider Systeme hinsichtlich der Glukose- und Laktatkonzentration analysiert.

Die in Abb. 22 A-C dargestellten Ergebnisse zeigen die Verläufe von Zytokinprofilen während der Kultivierung von T-Lymphozyten im Referenzmodell der 24-Lochplatte und im Zellkulturbeutel. Ohne Adaption der Kulturführung an die Bedingungen der Beutelexpansion kam es zu wachstumslimitierenden Einflüssen durch zu hohe IFN γ (Werte von 10000 pg/ml repräsentieren Werte von ≥ 10000 pg/ml) und zu geringe IL-2 Konzentrationen (s. Abb. 22 B). Nach einer Anpassung der Kulturführung konnte auch während der Beutelexpansion von T-Zellen ein dem Kulturplattenstandard (s. Abb. 22 A) entsprechendes Profil erzielt werden (s. Abb. 22 C). Übereinstimmend hiermit sind die exemplarisch gezeigten Ergebnisse der Laktat- und Glukosebestimmung im Beutel vor (s. Abb. 22 D+E) und nach Adaption des Expansionsregimes (s. Abb. 22 F).

Eine weitere Steigerung der Expansionsausbeute konnte durch die Positionierung der Kulturbeutel im Inkubator erzielt werden. Bis zu einem Kulturvolumen von 50ml wurde der Beutel hängend, darüber hinaus liegend kultiviert. Nach Anpassung der Fütterungs- und Expansionsstrategie an die Beuteleigenschaften waren sämtliche Messungen der

Laktatkonzentration weit von dem kritischen Wert von 20mM entfernt. Aus diesem Grund wurde nach Abschluss der Optimierungsversuche auf weitere Laktatmessungen verzichtet.

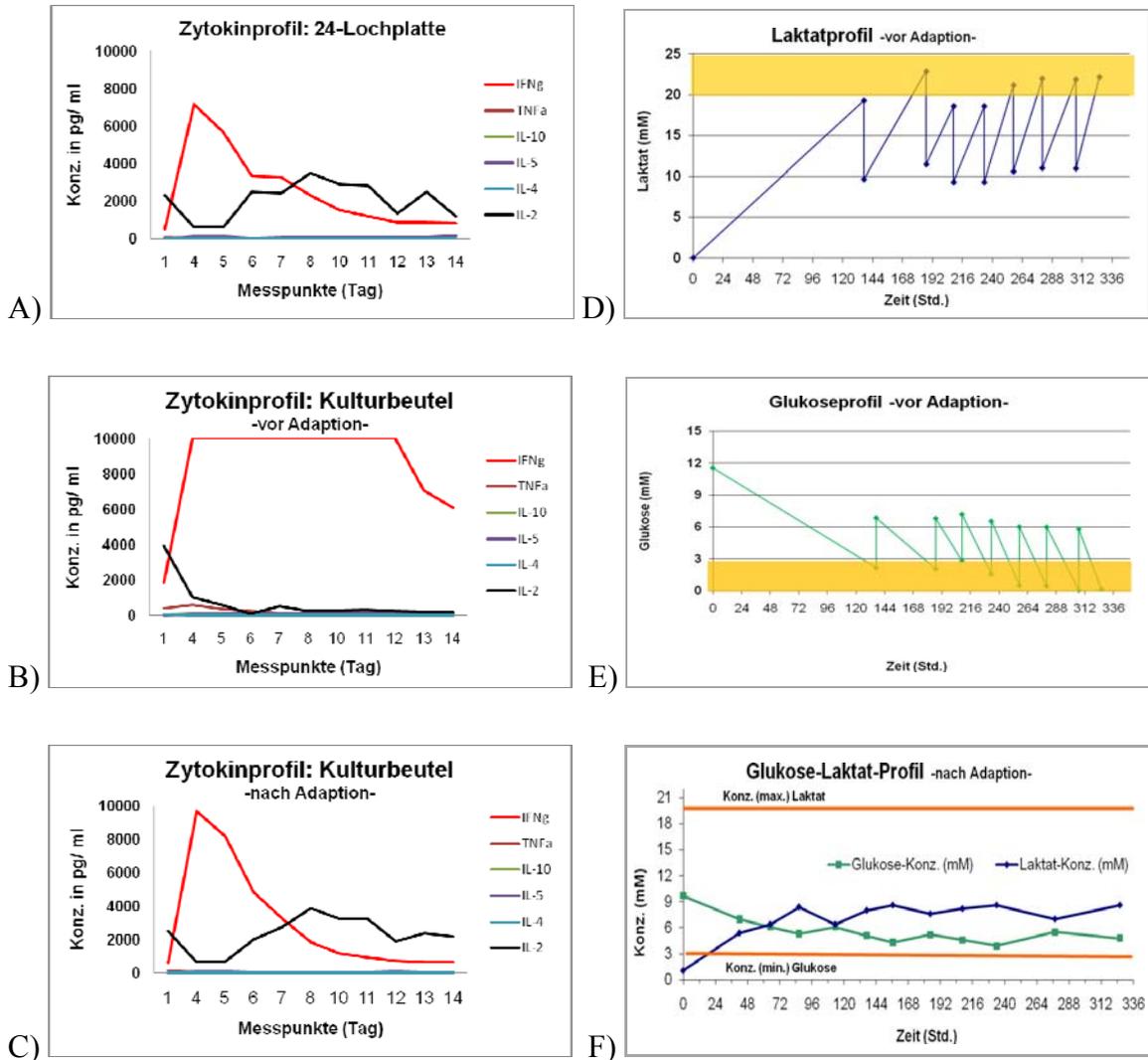


Abb. 22 A-F: Zytokin-, Glukose- und Laktatprofile. In den Abbildungen A bis C sind exemplarisch die Zytokinprofile der T-Zellkultivierung in einer 24-Lochplatte (A), einem Zellkulturgebeutel vor Adaption (B) und nach Adaption (C) der Kulturführung zu sehen. Farblich dargestellt ist der 14-tägigen Konzentrationsverlauf (pg/ ml) für IFN γ (rot), TNF α (braun) sowie für die Zytokine IL- 10 (grün), -5 (lila), -4 (blau) und IL-2 (schwarz). Die Abbildungen D bis F zeigen exemplarisch die Konzentrationsprofile (mM) der Beuteltivierung für Laktat (D) und Glukose (E) vor Adaption sowie in Kombination (F) nach Adaption der Kulturführung im zeitlichen Verlauf (Std.). Die gelben Linien markieren die kritischen Konzentrationsbereiche von 3mM Glukose bzw. 20mM Laktat.

Eine Weiterentwicklung konnte auch durch die Umstellung der zeit- und kostenaufwendigen Methode der Glucose-Bestimmung mittels EKTACHEM DT60

(Ortho-Clinical-Diagnostics) auf einen Schnelltest (Stada Gluco Control) vorgenommen werden. Dieser zur Blutzuckerbestimmung eingesetzte Schnelltest wurde zunächst auf Eignung für Zellkulturüberstände getestet. Anhand mehrerer Prozess- und Mediumleerproben wurde eine systematische Abweichung der beiden Testmethoden ermittelt.

Der Mittelwert der systematischen Abweichung betrug +11,90%, bei einer Standardabweichung von 4,62% (s. Abb. 23). Die systematische Abweichung wurde durch die Anhebung der kritischen Glucose-Konzentration von 3mM (bei EKTACHEM-Messwerten) auf 3,5mM kompensiert. Eine Mediumzufuhr in den Expansionskulturen erfolgte demnach bereits, wenn der Glucose-Wert zwischen 3,5- und 4mM lag.

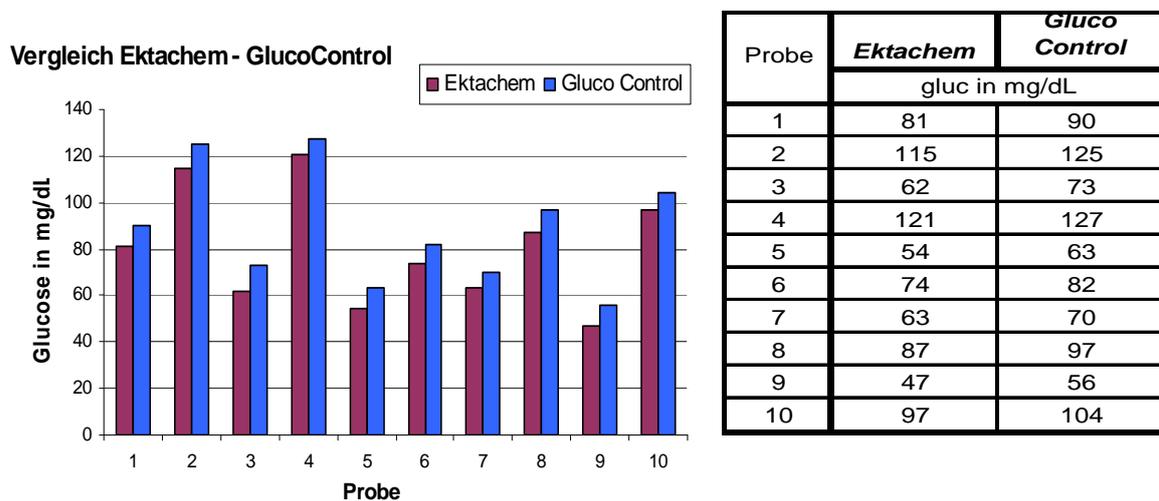


Abb. 23: Vergleich von Glukose-Testsystemen. Das Diagramm und die Tabelle zeigen die systematische Abweichung der Messwerte der zwei unterschiedlichen Testmethoden.

4.2.3 Verfahrensoptimierung

Im Anschluss der Adaption der Kulturführung an die Gegebenheiten des geschlossenen Systems wurden eine Reduzierung des benötigten Ausgangsmaterials und damit verbundene Einflüsse auf das T-Zellprodukt untersucht. Um die Vergleichbarkeit mit der etablierten Expansion im 24-Loch Kulturplattensystem zu erzielen, wurden stets Parallelansätze mit identischem Ausgangsmaterial analysiert. Die den verwendeten

Kultursystemen (Beutel oder 24-Loch Kulturplatten-Kontrolle) nachstehende Zahlenangabe bezieht sich im Folgenden auf die eingesetzte Startzellzahl an PBMC in Millionen.

4.2.3.1 Minimierung der Startzellzahl

Für die reine Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien werden in der Regel 40 bis 60ml peripheres Blut verwendet. In Abhängigkeit vom Lymphozytenanteil in der Blutprobe, der Spender bzw. Patienten abhängig ist, können aus dieser Blutmenge normalerweise 40- bis 60×10^6 PBMC gewonnen werden. Aufgrund der fehlenden Erfahrung im Umgang mit dem neuen Kultursystem wurde zunächst eine deutlich höhere Startzellzahl im Kulturbeutel expandiert. Diese wurde in Folgeexperimenten von anfänglich 120- auf 60- bzw. 30×10^6 PBMC verringert. In sämtlichen Ansätzen wurde zum Vergleich eine 24-Loch Kulturplatte als Standard mitgeführt.

In der Abb. 24 kann man erkennen, dass die zu erzielenden Endzellzahlen offenbar von der verwendeten Startzellzahl abhängig sind. So konnten mit einer Ausgangszellzahl von 120×10^6 PBMC im Durchschnitt etwa 7×10^8 T-Zellen expandiert werden. Die Kontrolle erzielte mit 60×10^6 PBMC im Mittel ca. $1,6 \times 10^8$ T-Lymphozyten. Eine zweimalige Halbierung der Startmenge auf 60- und 30×10^6 PBMC resultierte im Beutelsystem durchschnittlich in einer Zellzahl von 2,8 bzw. $0,2 \times 10^8$ expandierten T-Zellen. Die Standardabweichungen spiegeln die zum Teil starken, spenderabhängigen Schwankungen dieses biologischen Systems wieder.

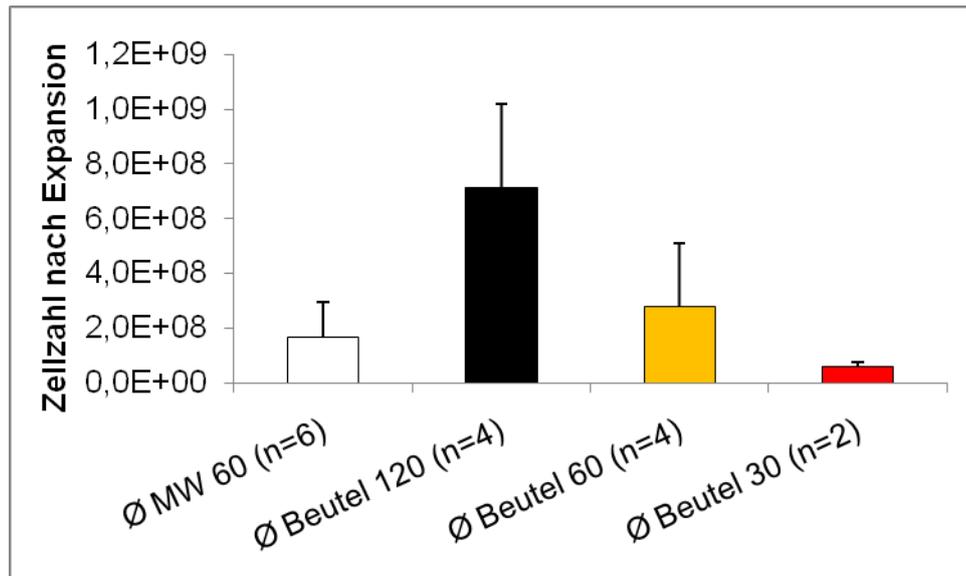


Abb. 24: Zellzahlen nach Expansion. Dargestellt sind die nach einer Expansionsdauer von 20 Tagen erzielten Zellzahlen. Die 24-Loch Kulturplatten-Kontrolle (MW; Startzellzahl: 60×10^6 PBMC) ist in weißen, die Beutelansätze mit 120×10^6 sowie 60×10^6 PBMC in schwarzen bzw. gelben Balken dargestellt. Der rote Balken zeigt Beutelansätze mit einer Ausgangszellzahl von 30×10^6 PBMC. In der Legende ist die Anzahl (n) der einzelnen Ansätze aufgeführt.

4.2.3.2 Phänotyp nach Expansion in Zellkulturbeuteln

Die Beutelansätze (Startzellzahl: 120×10^6 , 60×10^6 und 30×10^6 PBMC) wurden im Vergleich mit dem Referenzsystem der Kulturplatte (Startzellzahl: 60×10^6 PBMC) hinsichtlich des Phänotyps der expandierten EBV-spezifischen T-Zellen verglichen.

Die expandierten Zelllinien aller Beutelansätze, wie auch der Kontrolle, sind von CD8 pos. T-Lymphozyten dominiert (s. Abb. 25). Der Anteil CD16 pos. NK-Zellen sowie CD4- und CD8 doppelt pos. T-Zellen ist vergleichsweise gering. Der Anteil CD4 pos. Zellen hingegen steigt mit sinkender Anzahl eingesetzter PBMC (Beutel 120: 7,8%; Beutel 60: 22,2%; Beutel 30: 27%) Dies spiegelt sich in der verminderten Rate CD8 pos. Zellen wieder. Einflüsse der Beutelkultivierung auf die Expansion von NK- sowie doppelt pos. (CD4 und CD8) Zellen sind im Vergleich zum Standard vernachlässigbar.

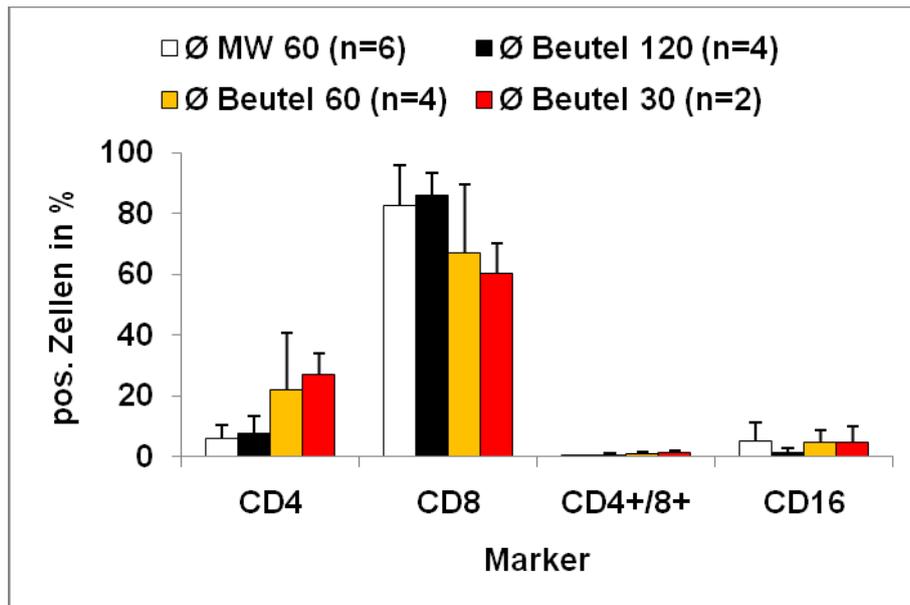


Abb. 25: Phänotyp nach Expansion. Dargestellt ist der Anteil an CD4 und/ oder CD8 pos. T-Zellen sowie der Anteil CD16 pos. Natürlicher Killer (NK)-Zellen in Prozent. Die Ansätze im Zellkulturbeutel sind mit schwarzen (120×10^6 PBMC), gelben (60×10^6 PBMC) oder roten (30×10^6 PBMC) Balken abgebildet. Ergebnisse der Kontrolle (24-Lochplatte) sind durch weiße Balken (60×10^6 PBMC) repräsentiert. In der Legende ist die Anzahl (n) der einzelnen Ansätze aufgeführt.

4.2.3.3 Differenzierungsstatus nach Expansion in Zellkulturbeuteln

Mit Hilfe der Analyse des Differenzierungsstatus sollte der Einfluss des Beutelsystems auf die EBV-spezifischen T-Zellen der verschiedenen Ansätze (Beutel 120, Beutel 60 und Beutel 30) weitergehend untersucht werden. Als Kontrollstandard diente das etablierte Expansionssystem der 24-Loch Kulturplatte. Analysiert wurde die Verteilung von CD4 und CD8 pos. Eff-, EM- und CM-Zellen.

Die Zelllinien aller Ansätze inklusive der Kontrolle sind sowohl im CD4 als auch im CD8-Kompartiment von EM-Zellen dominiert, wie in Abb. 26 ersichtlich ist. Der Anteil CD8 pos. Eff- und CM-Zellen liegt für alle Ansätze auf dem geringen Niveau der Kontrolle. Die Rate CD4 pos. CM-Zellen fällt mit sinkender Anzahl an verwendeten PBMC von durchschnittlich 23% (Beutel 120) auf 12% (Beutel 60) und schließlich auf ca. 1,5% (Beutel 30) nach Expansion im Kulturbeutel. Die Referenzkontrolle erzielt hier im Durchschnitt etwa 21,5% CM-Anteil. Das Kontingent CD4 pos. EM-Zellen entwickelt sich entgegengesetzt und ist umso größer je kleiner die Startzellzahl ist (Beutel 120: 55%;

Beutel 60: 80%; Beutel 30: 98%). Der Kontrollstandard enthält ca. 61% T-Zellen mit einem EM-Differenzierungsstatus.

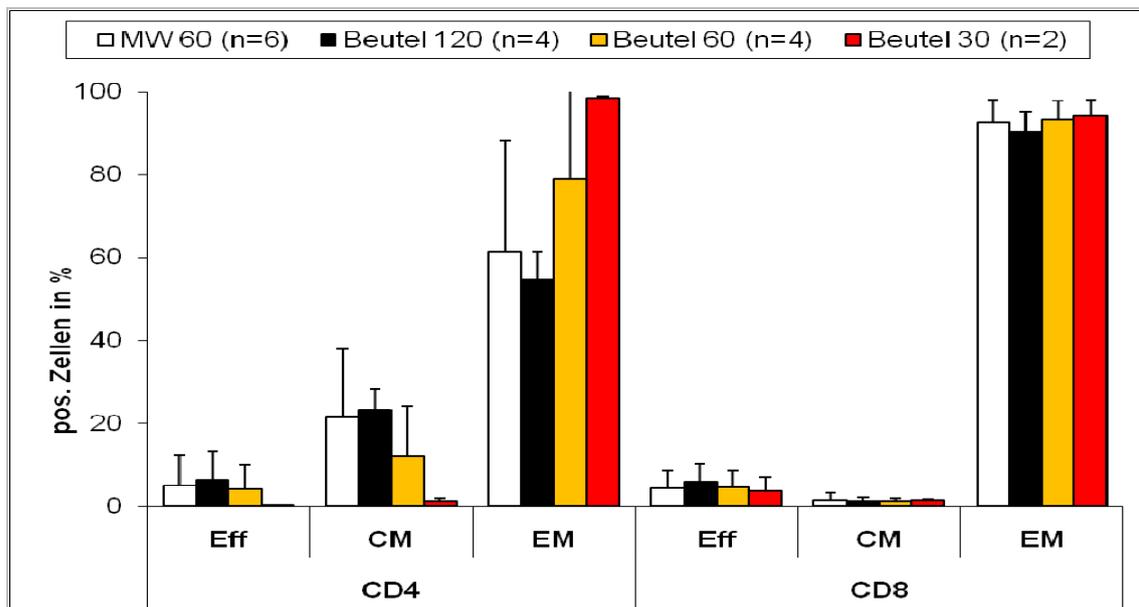


Abb. 26: Differenzierungsstatus nach Expansion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD4 und CD8 pos., in Effektor- (Eff), Effektor-Gedächtnis- (EM) und zentrale Gedächtnis-Zellen (CM) differenzierter T-Lymphozyten. Die farbigen Balken repräsentieren die verschiedenen Beutelansätze (Beutel 120: schwarz, Beutel 60: gelb; Beutel 30: rot) bzw. den Kontrollansatz (MW 60, weiß). In der Legende ist die Anzahl (n) der einzelnen Ansätze aufgeführt.

4.2.3.4 Effektorfunktion nach Restimulation

Der Einfluss der Beutelexpansion auf die Zytokinproduktion und Degranulationskapazität der Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollwert dienten parallel in 24-Loch Zellkulturplatten expandierte T-Zellen. Untersucht wurde die Expression der Zytokine IFN γ und TNF α . Die Degranulationsfähigkeit als Maß für die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des Antikörpers CD107a bestimmt.

Die Abb. 27 A+B zeigt, dass die durchschnittliche Markerexpression bei CD4 pos. Zellen generell niedriger ist, als bei CD8 pos. Zellen. Die Expressionsstärke aller untersuchten Marker nimmt innerhalb der Ansätze mit fallender Zahl an ursprünglich verwendeten PBMC ab. Einzige Ausnahme hierbei ist die Expression des Markers CD107a in der CD4 pos. Subpopulation (s. Abb. 27 A). Dieser Wert ist größer als in allen weiteren Ansätzen. Das Vermögen der expandierten Zellen zur Zytokinproduktion scheint bei einer

Ausgangszellzahl von 30×10^6 PBMC beeinträchtigt zu werden. Allerdings muss beachtet werden, dass dieser Ansatz lediglich zweimal durchgeführt wurde. Generell kann man an den, insbesondere im CD8-Konpartiment (s. Abb. 27 B) vorhandenen, erhöhten Standardabweichungen eine starke Spendervariabilität erkennen.

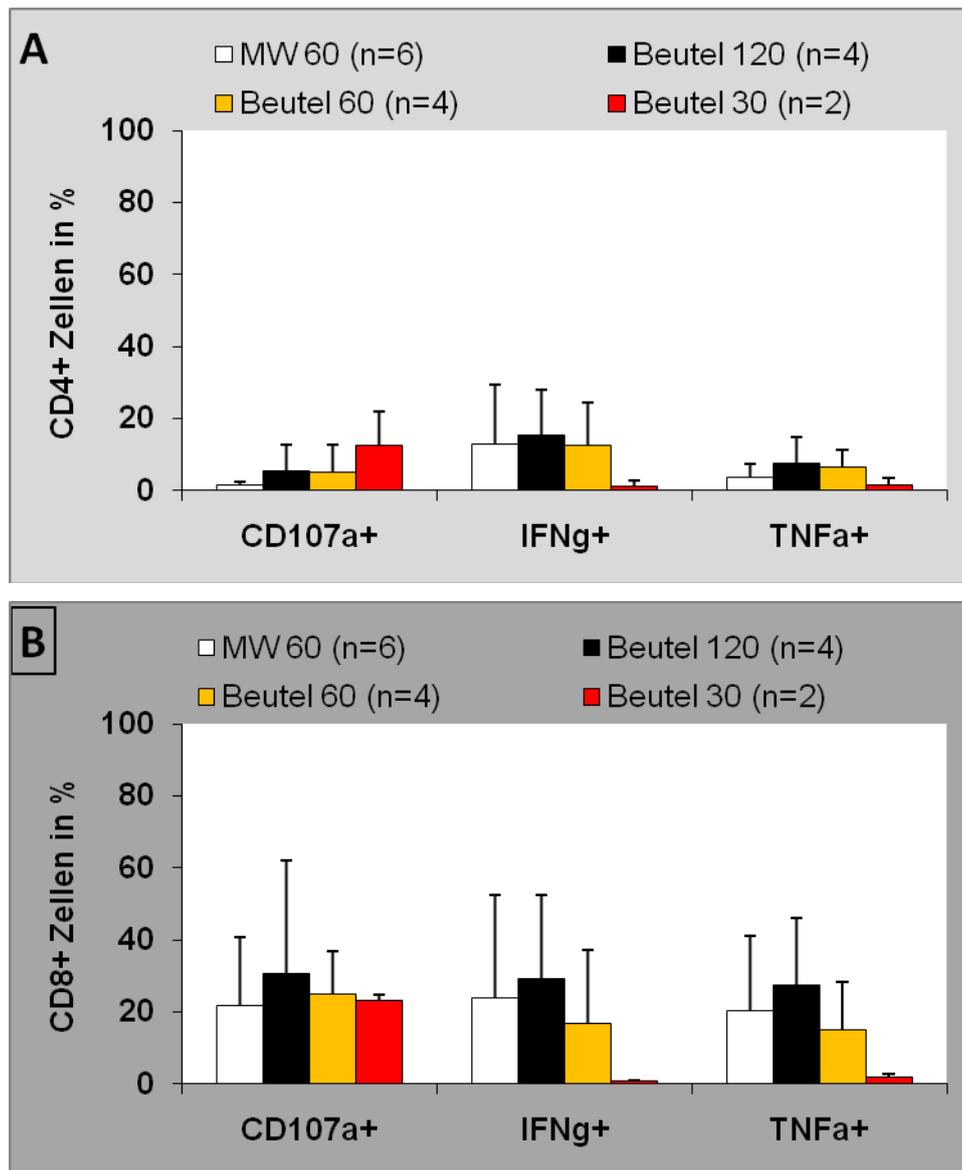


Abb. 27 A+B: Antigen-spezifische Funktion. Dargestellt sind die Degranulationskapazität (CD107a) sowie die Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α expandierter T-Zellen nach Restimulation mit EBV-Antigenen. Die Ergebnisse der Ansätze sind in verschiedenen Farben (weiß: MW 60, Kontrolle; schwarz: Beutel 120; gelb: Beutel 60; rot: Beutel 30) und getrennt für CD4 pos. (A) sowie CD8 pos. (B) Zellen in Prozent aufgeführt. In der Legende ist die Anzahl (n) der einzelnen Ansätze angegeben.

4.2.3.5 T-Lymphozyten mit multifunktionaler Wirkung

Die im Beutel expandierten EBV-spezifischen T-Zellen wurden hinsichtlich ihres Potentials ein (1x pos.) oder mehrere Effektorfunktionen (2x bzw. 3x pos.) auszuüben analysiert. Untersucht wurden die Effektorfunktionen Degranulation (CD107a) und Zytokinproduktion (IFN γ , TNF α) im Vergleich mit Parallelansätzen in 24-Loch Zellkulturplatten.

In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse der einzelnen Ansätze im Durchschnitt, getrennt nach CD4- und CD8 pos. Subpopulationen, aufgeführt. Generell scheinen verstärkt CD8 pos. T-Zellen das Potential zur Ausübung zwei oder mehrerer der untersuchten Funktionen zu besitzen. Innerhalb aller analysierten Ansätze nimmt der Anteil der Zellen mit zwei oder drei parallelen Funktionen jedoch mit sinkender Ausgangszellzahl ab. In gleichem Maße steigt hingegen der Anteil der Zellen, die nur zur Degranulation oder IFN γ - oder TNF α -Produktion befähigt sind. Dies gilt sowohl für das CD4- als auch für das CD8-Kompartiment innerhalb der EBV-spezifischen T-Zelllinien.

Tab. 6: Multifunktionale Wirkung. Aufgeführt ist der prozentuale Anteil multifunktionaler CD4- und CD8 pos. T-Lymphozyten innerhalb der expandierten T-Zelllinien. Ein-, zwei- oder dreifach pos. Zellen können entweder eine, zwei oder alle drei der untersuchten Funktionen (Degranulation, IFN γ - und TNF α -Produktion) ausüben.

Ansätze	CD4+ Zellen in %			CD8+ Zellen in %		
	1x pos.	2x pos.	3x pos.	1x pos.	2x pos.	3x pos.
MW 60, n=6	77	17	6	44	25	31
Beutel 120, n=4	62	26	12	38	28	34
Beutel 60, n=4	69	22	8	59	15	26
Beutel 30, n=30	88	7	5	94	4	2

4.3 Anwendung des Generierungs- und Expansionsverfahrens auf Patientenmaterial

Für eine Anwendung des experimentell erarbeiteten Herstellungsverfahrens im Patienten wurden fünf transplantierte Patienten zufällig ausgewählt. Untersucht wurde, ob die Peptid-basierte Generierung EBV-spezifischer T-Lymphozyten sowie eine anschließende Zellexpansion im geschlossenen Kultursystem auch unter immunsuppressiven Bedingungen möglich sind.

Von allen fünf immunsupprimierten Transplantierten konnten EBV-spezifische T-Zelllinien generiert werden. Tabelle 7 zeigt die Ausgangszahl an PBMC sowie die nach Expansion im Beutelsystem erzielten Zellzahlen. Beachtet werden muss hierbei, dass die PBMC nur einen Bruchteil EBV-spezifischer T-Zellen enthalten (s. 4.1 Vorfrequenzen). Des Weiteren sind in der Tabelle Patientenangaben u.a. zur Art der Immunsuppression, dem Geschlecht, bestehenden Infektionen und Anzahl an Transplantationen (n) aufgeführt.

Tab. 7: Patientendaten.

Patientendaten		#141	#142	#143	#144	#145
Alter/ Geschlecht (m/ W)		55/ w	56/ w	45/ w	36/ m	69/ m
letzte Transplantation		2000	2002	2008	2007	2005
Transplantationen		n=2	n=2	n=4	n=1	n=1
Zellzahl	PBMC	21x10 ⁶	14,2x10 ⁶	6,9x10 ⁶	18x10 ⁶	9,4x10 ⁶
	nach Expansion	13x10 ⁷	70x10 ⁷	2.9x10 ⁷	16x10 ⁷	2.2x10 ⁷
Immunsuppression		Methylpred, MMF, Tac, Rapa	Methylpred, MMF, Tac	Methylpred, MMF, Tac	Methylpred, MMF, Tac	Methylpred, MMF, Rapa
Infektionen		CMV, EBV, Hepatitis B+C	CMV, EBV, BKV, Hepatitis C	CMV, EBV, Hepatitis C	CMV, EBV	CMV, EBV

4.3.1 Phänotyp und Differenzierungsstatus der Patienten-Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von CD8 pos. Zellen (60,5%) mit einem EM-Phänotyp dominiert. Die zweitgrößte Subpopulation bildeten CD4 pos. Zellen (34%), die ebenfalls überwiegend in EM T-Lymphozyten (26%) differenziert waren. Die Differenzierung der expandierten EBV-spezifischen T-Zellen wurde mit Hilfe der Marker CD45RA und CCR7 analysiert. Die Unterteilung in die Eff-, EM- und CM-Subpopulationen ist in Abb. 28 aufgeführt. Das Kontingent doppelt positiver (CD4 und CD8) T-Zellen und CD16 pos. NK-Zellen war ebenso wie der B-Zellanteil (CD19 pos. Zellen) sehr gering. Alle im Rahmen der Phänotypisierung und Differenzierungsanalyse gemessenen Zellzahlen, wie auch die Zellzahl nach Expansion (durchschnittlich $2,08 \times 10^8$), waren variabel und patientenabhängig. Durchschnittlich war der Anteil von CM-Zellen bei den CD4 pos. Zellen (26%) größer als bei CD8 pos. T-Zellen (3,5%).

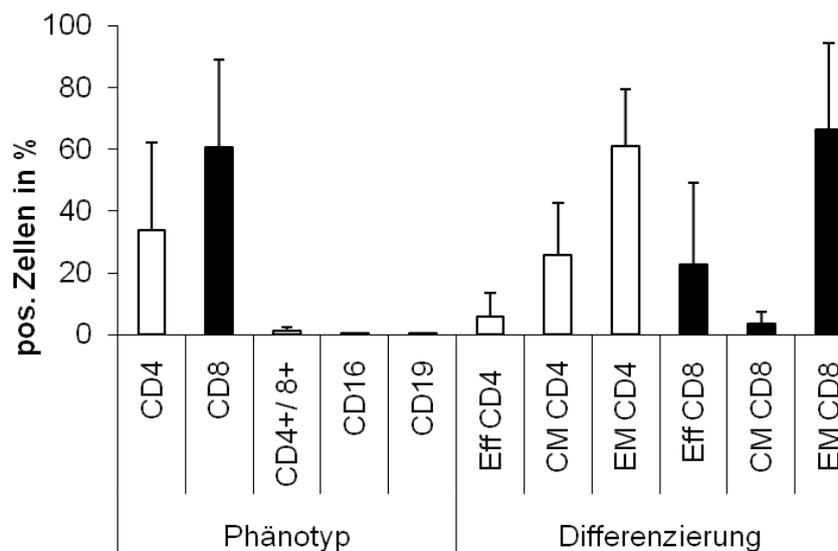


Abb. 28: Phänotyp und Differenzierungsstatus. Dargestellt sind die Ergebnisse der Phänotypisierung (links) für die analysierten Marker CD4, CD8, CD16 und CD19. Rechts ist der Differenzierungsstatus der Zellen nach Expansion anhand der Unterteilung in Eff-, EM- und CM-Zellen gezeigt. Alle Ergebnisse sind in Prozent angegeben.

4.3.2 Effektorfunktion nach spezifischer Restimulation

Die Durchschnittswerte mit Standardabweichungen aller Ergebnisse der Antigen-spezifischen Restimulation im Kulturbeutel expandierter patienteneigener T-Zelllinien sind in Abb. 29 graphisch dargestellt. Das an der CD107a-Expression gemessene

Degranulationsvermögen der EBV-spezifischen T-Zellen war im Durchschnitt bei den CD8 pos. (25%) stärker ausgeprägt als bei CD4 pos. (7%) Zellen. Die Produktion von IFN γ und TNF α hingegen lag bei beiden Subpopulationen auf jeweils vergleichbarem Niveau von etwa 7 bis 10%.

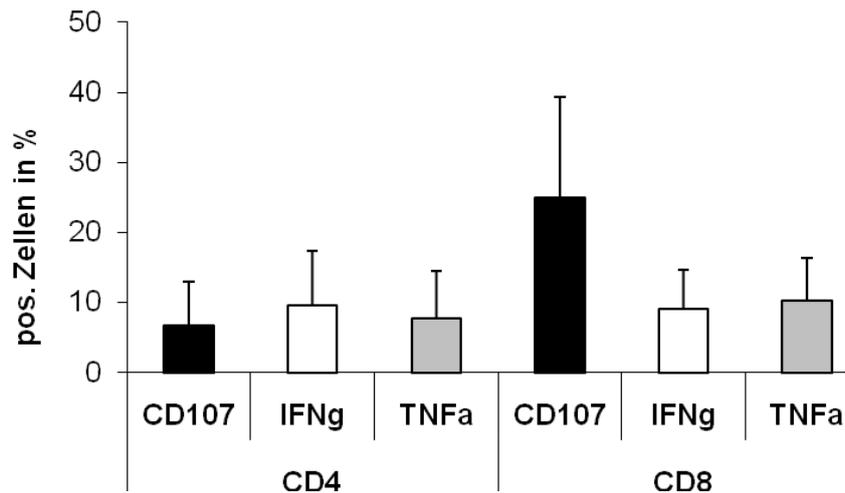


Abb. 29: Effektorfunktionen der patienteneigenen T-Zelllinien. Dargestellt sind die nach Antigen-spezifischer Restimulation gemessenen Anteile degranulierender (CD107a pos.; schwarze Balken), IFN γ - (weisse Balken) oder TNF α -produzierender T-Zellen (graue Balken) in %. Die Ergebnisse sind für die CD4- (linke Seite) und CD8 (rechte Seite) pos. Subpopulationen getrennt aufgezeigt.

4.3.3 Multifunktionalität

Die aus dem Material immunsupprimierter Patienten hergestellten EBV-spezifischen T-Zelllinien sind auch hinsichtlich ihrer Multifunktionalität untersucht worden (s. Abb. 30 A+B). Hierbei wurden erneut die Marker CD107a, IFN γ und TNF α untersucht. Sowohl die CD4- (s. Abb. 30 A) als auch die CD8 pos. Subpopulation (s. Abb. 30 B) waren von T-Zellen dominiert, bei denen nur eine der drei analysierten Funktionen ausgeprägt war (CD4 pos.: 56%; CD8 pos.: 62%). Der Vergleich beider Subpopulationen zeigte, dass die CD4 pos. Zellen mehr doppelt positive (33% zu 11%), aber weniger dreifach positive Zellen (11% zu 27%) enthalten.

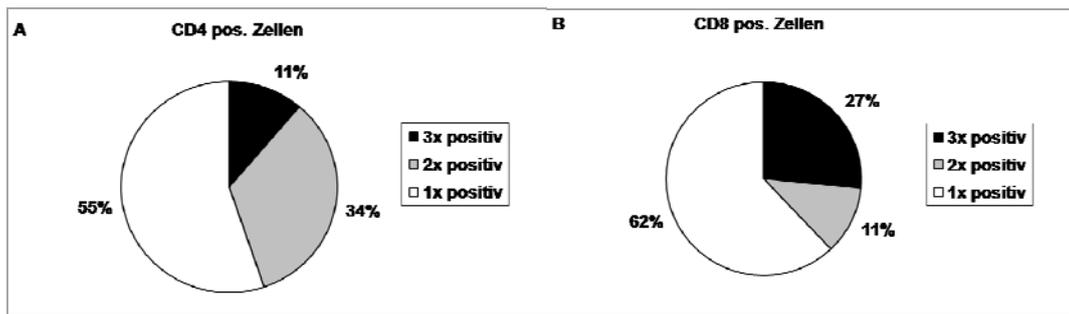


Abb. 30 A+B: Multifunktionalität. Dargestellt sind die Anteile CD4- (A) und CD8 pos. (B) T-Lymphozyten, die ein, zwei oder drei Funktionalitäten besitzen. Analysiert wurden die Funktionen der Degranulation sowie die Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α nach Restimulation. Einfach pos. Zellen sind in weiß aufgeführt. Die Anteile zwei- oder dreifach pos. Zellen sind grau (2x) bzw. schwarz (3x) hinterlegt.

5. Diskussion

Virale Infektionen sind ein ernsthaftes Problem der Transplantationsmedizin und haben einen großen Einfluss auf die Morbidität sowohl nach Knochenmarks- als auch nach Organtransplantationen. Zelluläre und humorale Immunantworten spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von EBV- und CMV-Infektionen des Menschen (Addo and Rosenberg 2002). In transplantierten Patienten führt die Verabreichung starker immunsupprimierender Medikamente zu einem Defizit an EBV-gerichteter Immunkontrolle. Dies kann eine EBV-getriebene (B-) Lymphozytenproliferation und Tumorbildungen verursachen. Die Inzidenz einer PTLD-Erkrankung liegt bei Knochenmarktransplantationen in Abhängigkeit der Spender-Empfänger-Konstellation zwischen 1 bis 25% (Gerritsen, Stam et al. 1996; Lucas, Small et al. 1996). Bei Organtransplantationen liegt dieser Wert zwischen 1 bis 33% und wird vorrangig vom jeweilig transplantierten Organ beeinflusst (Cockfield 2001).

Die erste Wahl bei der Behandlung einer Dysbalance zwischen B-Zellwachstum und T-Zellwachstumskontrolle ist die Senkung der Immunsuppression (bei Organtransplantationen) oder die Verabreichung antiviraler Medikamente. Erstgenannte Option hat das Ziel des Wiederaufbaus einer natürlichen EBV-spezifischen Immunität. Dies führt jedoch nur in 20 bis 25% der Fälle zu einem erfolgreichen Rückgang der Tumore (Paya, Fung et al. 1999). Der Ansatz wird außerdem durch die Reaktivierung einer allo-reaktiven Immunität, resultierenden Abstoßungsepisoden, die bis zum Transplantatverlust oder Tod führen können, unterminiert (Swinnen, Mullen et al. 1995).

Die medikamentöse antivirale Therapie kommt in der prophylaktischen und symptomatischen Behandlung zum Einsatz und soll eine ungehemmte Ausbreitung infektiöser viraler Partikel unterbinden (Swinnen, Mullen et al. 1995). Sie ist jedoch mit toxischen Nebenwirkungen und der Ausbildung viraler Resistenzen verbunden. Der Einsatz B-Zell-depletierender Antikörper, wie dem Medikament Rituximab (gegen das B-Zell-Antigen CD20 gerichtet) ist leider in bis zu 45% aller Fälle nicht erfolgreich. Des Weiteren kann die resultierende, mehr als sechs monatige Depletion aller B-Zellen in bereits immunsupprimierten Patienten problematisch sein (Burns and Crawford 2004).

Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass die Adoptive Immuntherapie eine sichere und effektive Strategie zur Rekonstitution einer spezifischen zellulären Immunität

in immunsupprimierten transplantierten Patienten ist (Heslop, Ng et al. 1996; Rooney, Smith et al. 1998; Comoli, Basso et al. 2007; Heslop, Slobod et al. 2009). Die Infusion EBV-spezifischer T-Zellen wurde von den jeweiligen Empfängern gut toleriert, zeigte keine toxischen Begleiterscheinungen und konnte in einigen Fällen sogar bereits etablierte Tumore beseitigen (Burns and Crawford 2004). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse wird die Adoptive Immuntherapie bisher nur in vergleichsweise geringem Umfang als Therapieoption genutzt. Dies ist zu großen Teilen auf die schwierige, zeitintensive Generierung der Zelllinien zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu einer vereinfachten und schnelleren Herstellung autologer EBV-spezifischer T-Zellen beitragen und den Therapieansatz so einem breiteren Patientenspektrum zugänglich machen.

5.1 Vergleichende Analyse der Generierungsmethoden

Eines der größten Hindernisse für eine breite klinische Anwendung der Adoptiven Immuntherapie mit Virus-spezifischen T-Zellen ist die sehr zeit- und kostenintensive Prozedur zur Erzeugung dieses Produkts (Savoldo, Goss et al. 2001; Thorley-Lawson 2001; Gottschalk, Heslop et al. 2005; Berger, Turtle et al. 2009). Aktuell ist der Herstellungsprozess immer mit der Handhabung von potentiell infektiösem oder Genverändertem Material verbunden.

In dieser Arbeit wurde eine neue, zeitsparende Methode für die Produktion von EBV-spezifischen T-Zell-Linien entwickelt. Die Methode basiert auf der Verwendung von überlappenden EBV-Peptidpools anstelle von EBV-infizierten B-Zellen (LCL) zur Generierung der Antigen-spezifischen T-Zelllinien. Durch die synthetische Herstellung der Peptidpools und dem damit verbundenen Ausschluss von potentiell infektiösem Material bei der Herstellung wird ein höheres Maß an Biosicherheit sowohl für den Herstellenden als auch für den betroffenen Patienten erlangt. Außerdem gewährleistet die chemische Synthese eine gleichbleibende Qualität des Ausgangsmaterials. Dies ist im biologischen System der LCL aufgrund des (auch *in-vitro*) komplexen Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus nicht möglich (Sugimoto, Tahara et al. 2004). Das Virus kann beispielsweise zwischen latenten und lytischen Phasen wechseln. Diese sind weiterhin durch die Präsentation verschiedener, für die jeweilige Phase vorherrschender, Antigenmuster charakterisiert. Die Peptid-basierte Herstellung sollte somit auch zur besseren

Standardisierung und Reproduzierbarkeit bei der Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von gesunden und immunsupprimierten Spendern beitragen können.

EBV-assoziierte Erkrankungen sind in verschiedenen Latenzphasen kategorisiert, die durch ihre prädominanten Antigen-Expressionsmuster charakterisiert sind (Cohen, Bollard et al. 2008). Während der Latenz 1 (z.B. bei Burkitt Lymphomen) werden nur EBNA 1, EBER (EBV-RNAs) und BART (BamHI-A rightward transcripts) Transkripte exprimiert (Gottschalk, Heslop et al. 2005). Im Latenzstadium 2, das beim Nasopharynx Karzinom und der Hodgkin-Krankheit auftritt, werden außerdem LMP 1 und -2 exprimiert (Kuppers 2003). Die Latenzphase 3 ist in der Regel bei immungeschwächten Patienten sowie bei der *in-vitro* Kultivierung von LCL anzutreffen (Bollard, Cooper et al. 2008). Sie wird durch die Expression von EBNA 2, 3a-c und Leader Protein (LP) charakterisiert (Young and Rickinson 2004; Craddock and Heslop 2008). Die lytische Replikationsphase des Epstein-Barr Virus tritt bei der Primärinfektion sowie bei Virusreaktivierungen aus dem latenten Zustand auf. Eine Expression sogenannter IE- (immediate early) Proteine wie BZLF 1 oder BRLF 1 leitet den Beginn des lytischen Zyklus ein. Diese sind ebenfalls bekannte Teile einer T-Zell Immunreaktion (Steven, Annels et al. 1997; Hislop, Annels et al. 2002; Hislop, Taylor et al. 2007). Das Bemühen, ein möglichst breites Spektrum dieser Antigene abzudecken, bildete die Basis für die Auswahl der Peptidpools EBNA 1, 2, 3c, BZLF 1, LMP 1 und -2 zur Generierung der EBV-spezifischen T-Zelllinien.

Der Generierungsprozess mit Hilfe von Peptidpools verkürzt die Herstellungsdauer von EBV-spezifischen T-Zelllinien von ca. 80- auf etwa 20 Tage. Neuere Studien von Haque et al. zeigten, dass die Behandlung von Patienten mit partiell zum jeweiligen HLA-Typ passenden allogenen T-Zellen in ca. 50% der Fälle möglich war (Haque, Wilkie et al. 2007). Allerdings konnte bei den zweiten 50% der Patienten kein Behandlungserfolg beobachtet werden (Wilkie, Taylor et al. 2004; Fujita, Rooney et al. 2008). Dieser allogene Ansatz könnte die Etablierung von T-Zell-Banken zur zeitnahen Behandlung ermöglichen. Jedoch wäre ein adoptiver Zelltransfer stets mit dem Risiko einer Graft-versus-Host-Erkrankung verbunden (Savoldo, Goss et al. 2001; Wilkie, Taylor et al. 2004). Des Weiteren könnte dieser Ansatz durch evtl. fehlende Persistenz der allogenen Zellen *in-vivo* limitiert werden (Lucas, Salzman et al. 2004). Das Peptidpool basierte Protokoll hingegen ermöglicht die Generierung autologer T-Zellen zur klinischen Anwendung, auch bei schweren Erkrankungen, ohne zusätzliches Risiko und in einem angemessenen kurzen

Zeitrahmen. Dies bietet die Möglichkeit, Patienten mit fehlender viraler Immunität und daraus resultierenden viralen Erkrankungen zeitnah zu behandeln. Diese waren bisher vom therapeutischen Nutzen des adoptiven Ansatzes aufgrund der langen Herstellungsdauer EBV-spezifischer T-Zellen weitgehend ausgeschlossen.

5.1.1 Indirekte Schutzfunktionen der T-Zellen

Herpes-Virus-Infektionen im Allgemeinen und insbesondere EBV-Infektionen werden durch zelluläre Immunantworten kontrolliert, die oft von zytotoxischen CD8 pos. T-Zellen dominiert sind (Wilkie, Taylor et al. 2004; Hammer, Meyer et al. 2005; Hammer, Brestrich et al. 2007; Heslop, Slobod et al. 2009). CD4 pos. T-Zellen liefern dennoch einen wichtigen unterstützenden Beitrag zum Überleben und zur (Schutz-) Funktion der CD8 pos. T-Zellen *in-vivo* (Sun, Williams et al. 2004; Sebelin-Wulf, Nguyen et al. 2007; Craddock and Heslop 2008). So wurde beispielsweise festgestellt, dass Frequenz, Funktion und therapeutischer Nutzen von zirkulierenden EBV-spezifischen CD8 pos. T-Zellen nach soliden Organtransplantationen von der Anzahl CD4 pos. T-Zellen abhängig ist (Sebelin-Wulf, Nguyen et al. 2007). Der signifikant erhöhte Anteil CD4 pos. Zellen im neuen Peptidpool-basierten Ansatz lässt, im Einklang mit klinisch positiven Verläufen beim Transfer von T-Zelllinien mit hohem CD4 pos. Zellanteil, einen verbesserten therapeutischen Nutzen erwarten.

Zusätzlich zu PTLD-Erkrankungen tragen EBV-infizierte immunsupprimierte Patienten ein erhöhtes Risiko, Lymphome wie Morbus Hodgkin, das Burkitts Lymphom oder das Nasopharynxkarzinom zu entwickeln (Khanna, Burrows et al. 1995; Thorley-Lawson 2001; Addo and Rosenberg 2002; Young and Rickinson 2004). Aus diesem Grund ist ein wichtiges Merkmal EBV-spezifischer T-Zellen ihr Potenzial zur Rückwanderung (‘‘Homing’’) in lymphatische Gewebe. Dort können sie am effizientesten von Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert werden. Eine Beeinträchtigung dieser Fähigkeit könnte T-Zellen daran hindern, effektiv gegen opportunistische Infektionen wie z.B. EBV, CMV und HIV zu schützen (Chen, Shankar et al. 2001). Aus diesem Grund wurden die T-Zelllinien hinsichtlich der Expression von CD62L (L-Selektin) verglichen. L-Selektin ist ein auf Leukozyten exprimiertes Zelladhäsionsmolekül und mitverantwortlich für die Migration der Lymphozyten aus dem Blutgefäß in Lymphknoten und entzündetes Gewebe (Sallusto, Lenig et al. 1999; Wolint, Betts et al. 2004).

Das neue Peptidpool-basierte Herstellungsprotokoll zeigte im Vergleich zum repetitiven Generierungsverfahren mit LCL eine signifikant erhöhte CD62L Expression in CD8 pos. T-Zellen.

Die dauerhafte Protektion und Wirksamkeit der Adoptiven Immuntherapie wird oft durch mangelnde Persistenz der transferierten Zellen *in-vivo* beeinträchtigt (Klebanoff, Gattinoni et al. 2005; Gattinoni, Powell et al. 2006). Obgleich sich sowohl von zentralen - als auch von Effektor-Gedächtniszellen abgeleitete T-Zellklone (central memory T cells: T_{CM}; effector memory T cells: T_{EM}) nach Antigen-Stimulation vermehren und differenzieren können, unterscheidet sich ihr Schicksal *in-vivo*. In einer Studie persistierten Klone der T_{CM} für lange Zeit *in-vivo*, migrierten zu Lymphknoten oder Knochenmark und konvertierten zu T_{CM} und T_{EM}. Im Gegensatz hierzu konnten Klone der T_{EM} nur für eine deutlich kürzere Zeit *in-vivo* bestehen und waren weder in Lymphknoten noch im Knochenmark nachweisbar (Berger, Jensen et al. 2008). Für eine klinische Anwendung sollten T-Zelllinien daher aus T_{EM}-Zellen für eine sofortige Effektorfunktion und aus T_{CM}-Zellen zum Aufbau eines Langzeitschutzes bestehen (Gattinoni, Klebanoff et al. 2005; Gattinoni, Powell et al. 2006). Dieser Anspruch wird durch den EBV-Peptidpool basierten Ansatz mit seinem größeren Kontingent an T_{CM}-Lymphozyten in höherem Maße erfüllt. Im Kontext mit der signifikant verkürzten Generierungsdauer des EBV-spezifischen T-Zellprodukts ist dies ein klarer Vorteil gegenüber der konventionellen Technologie.

5.1.2 Direkte Schutzfunktionen der T-Zellen

Eine weitere Voraussetzung für die Funktionalität bzw. Protektivität von Antigen-spezifischen T-Zellen *in-vivo* ist deren Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen wie IFN γ und TNF α sowie ihr zytotoxisches Potential. Diese direkten Effektorfunktionen werden im Allgemeinen CD4- und CD8 pos. T-Zellen zugeschrieben (Bhaduri-McIntosh, Rotenberg et al. 2008). Die Expression dieser funktionellen Marker lag im Vergleich beider Herstellungsprotokolle auf vergleichbarem und für EBV-spezifische T-Zellen normalem Niveau (Vanhoutte, McAulay et al. 2009). Die Expressionshöhe der Marker könnte auf den Differenzierungszustand (EM dominiert) und die Anzahl vollzogener Teilungszyklen zurückzuführen sein (Sarkar, Kalia et al. 2008; Blackburn, Shin et al. 2009).

Um einen besseren Einblick in die Spezifität und ko-stimulierende Kapazität der generierten T-Zelllinien zu gewinnen, wurde die Expression verschiedener Aktivierungsmarker untersucht. Die IFN γ -Produktion wurde erneut analysiert, um den Einfluss einer längeren Stimulationszeit auf den Anteil IFN γ positiver Zellen zu

konkretisieren. Allerdings ergab sich durch die verlängerte Stimulationszeit kein Unterschied im Anteil IFN γ produzierender T-Zellen. In den mit EBV-Peptidpools generierten CD4 pos. T-Zellen konnte aber eine leichte Hochregulation des Markers CD40L, einem wichtigen Spieler bei der Wechselwirkung zwischen APCs, CD4- und CD8 pos. Zellen, festgestellt werden (Bourgeois, Rocha et al. 2002; Agarwal and Newell 2008; Elgueta, Benson et al. 2009). Die Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD137 (4-1BB), das die Proliferation sowie das Überleben von kürzlich aktivierten spezifischen T-Zellen unterstützt (Pulle, Vidric et al. 2006; Zhu, Zhu et al. 2007; Wehler, Karg et al. 2008), lag bei beiden Protokollen auf vergleichbar hohem Niveau. Zukünftig scheint somit die Expression von CD137, anstelle der bislang standardmäßig untersuchten Zytokinproduktion, ein aussagekräftigerer Parameter für die Antigen-Spezifität der *ex-vivo* generierten EBV-spezifischen T-Zellen zu sein (Wofl, Kuball et al. 2007).

Bekannt ist, dass T-Zellen, die in der Lage sind nach Stimulation parallel mehrere Zytokine zu produzieren (sogenannte double oder tripple producer) mit einem gesteigerten Therapieerfolg bei HIV Patienten korreliert werden (Betts, Nason et al. 2006). In diesem Zusammenhang konnte durch die T-Zellherstellung mit EBV-Peptidpools der Anteil multifunktionaler CD4 pos. T-Zellen signifikant gesteigert werden.

Für eine sichere Anwendung der T-Zellen bei Organtransplantierten im Rahmen der Adoptiven Immuntherapie ist die Allogenität ein wichtiges Kriterium. Sollte in den Zelllinien ein zu hoher Anteil allo-spezifischer T-Zellen vorliegen, könnte dies zu einer Schädigung oder schlimmstenfalls zur Transplantatabstoßung führen (Savoldo, Goss et al. 2001). Sowohl EBV-Peptidpool als auch LCL generierte T-Zelllinien zeigten im Zytotoxizitätstest keine gesteigerte Alloreaktivität (Anteil < 10%). Der Anteil bzw. die Aktivität reaktiver NK-Zellen wurde anhand der Lyse der NK-Zell sensitiven Zelllinie K-562 bestimmt. Die mit Peptidpools hergestellten T-Lymphozyten zeigten eine deutlich höhere Reaktivität der NK-Zellen, obwohl sie im Vergleich der Methoden eine ähnliche Menge an NK-Zellen enthielten. In der letzten Dekade wurden die Zusammensetzungen von T-Zelllinien u.a. hinsichtlich ihres NK-Zellanteils kontrovers diskutiert. Momentan scheint sich aber die Auffassung, dass ein gewisser NK-Zellanteil Therapie-förderlich ist durchzusetzen. Hierbei wird deren sofortige Effektorfunktion bei einer Immunreaktion als Überbrückung bis zum Einsetzen der T-Zellantwort als positiv bewertet. Ferner wird ihre stimulierende Wirkung auf andere Immunzellen wie u.a. auf T-Zellen angeführt (Lin, Nieda et al. 2006; Vela-Ojeda, Garcia-Ruiz Esparza et al. 2006; Cerwenka, Falk et al.

2007). Erstaunlicherweise konnten nur T-Zelllinien, die mit LCL generiert wurden, autologe LCL, die nicht zusätzlich mit Peptidpools beladen wurden, effektiv lysieren. Dem entgegen steht die durchflußzytometrisch ermittelte Expression des Degranulationsmarkers CD107a als Parameter für die Zytotoxizität der Zellen. Es zeigte sich eine geminderte, aber deutlich vorhandene Degranulationsaktivität der mit EBV-Peptidpools generierten CD8 pos. T-Zellen nach LCL-Stimulus. Die im Vergleich sehr geringe Degranulationkapazität CD4 pos. mit Peptidpools hergestellten T-Zellen korreliert jedoch gut mit deren Zytotoxizität. Allerdings haben CD4 pos. T-Zellen einen deutlich geringeren Anteil an der direkten zytotoxischen Wirkung einer T-Zellpopulation im Vergleich zu CD8 pos. Zellen (Burns and Crawford 2004; Heller, Gurer et al. 2006).

Eine weitere Erklärung für die differenten Zytotoxtest-Ergebnisse ist möglicherweise durch den Herstellungsprozess der Peptidpool-Zelllinien begründet. Ein Peptid-Überschuss könnte die Selektion einer hohen Zahl an T-Zellen mit einer eher geringen Avidität gegenüber präsentierten EBV-Antigen bedingen. Daraus würde wohl ein Überwachsen der wenigen Zellen mit hoher Avidität und letztlich eine geminderte Zelllyse autologer LCL im Zytotoxtest resultieren. Ein anderer Erklärungsansatz könnte in einer evtl. heterogeneren als bisher vermuteten Antigenpräsentation der LCL selbst liegen. Die LCL-Kultur wird parallel zur T-Zellgenerierung kultiviert und zur wöchentlichen Restimulation der T-Lymphozyten genutzt. Somit können denkbare, bereits für *in-vitro* Kulturen beschriebene Veränderungen der präsentierten Antigene durch die Restimulationen an die T-Zellkultur weitergegeben werden (Sugimoto, Tahara et al. 2004). Diese Veränderungen wären als Einflussfaktoren für eine effektive Lysierung autologer LCL im Zytotoxizitätstest denkbar.

5.1.3 Schutzfunktionen gegen Evasionsmechanismen des Virus

Detailliertere Erkenntnisse zur genaueren Charakterisierung der T-Zelllinien beider Herstellungsverfahren, auch bezüglich des Zytotoxtests, konnten durch den Vergleich immundominanter latenter Antigene gewonnen werden. Die Datenanalyse zeigte vergleichbare Ergebnisse zwischen den Methoden. Der einzige deutliche Unterschied bezieht sich auf die ausschließlich bei einer Generierung mit LCL vorhandene Reaktion von 10% der T-Zellen auf einen LMP-2-Stimulus. Eine mögliche Ursache könnte in der Konkurrenz zwischen den sechs einzelnen, im Überschuss vorhandenen, Peptidpools liegen. Bei der Generierung der T-Zellen mit Peptidpools konkurrieren die Peptide vermutlich um MHC-Bindungsstellen. Letztlich könnte dies zu den fehlenden dominanten

und subdominanten Reaktionen auf das LMP-2 Antigen führen. Diese Hypothese korreliert jedoch nicht mit der Größe bzw. der Anzahl an Peptiden innerhalb der einzelnen Peptidpools. So führt der mit 59 Einzelpeptiden kleinste Peptidpool zu 20% der dominanten oder subdominanten Immunantworten.

Die Aufrechterhaltung eines großen T-Zellrezeptor-Repertoires sowie der Polyfunktionalität bzw. Epitopspezifität der T-Lymphozyten nach Expansion könnte die Wirksamkeit der Adoptiven T-Zelltherapie beeinflussen. Bereits durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure innerhalb eines Epitops kann die spezifische Erkennung durch einen T-Zellrezeptor verhindert und die entsprechende T-Zellantwort unwirksam werden (Gottschalk, Ng et al. 2001). Daher sind die für das EBV-Peptidpool-basierte Protokoll gezeigten multispezifischen T-Zellantworten gegen diverse Epitope als Schutz vor den Evasionsmechanismen der Viren von Bedeutung. Des Weiteren erhöht ein breites Spektrum von Vb-Subfamilien die Wahrscheinlichkeit von vorhandenen T-Zellrezeptoren mit geeigneter Avidität und Spezifität gegenüber den entsprechenden EBV-Antigenen (Betts, Nason et al. 2006; McAulay, Haque et al. 2009; Vanhoutte, McAulay et al. 2009). Diese Anforderung wird von den mit EBV-Peptidpools erzeugten T-Zellen in stärkerem Umfang erfüllt als beim LCL-basierten Protokoll.

5.2 Adaption der T-Zellexpansion an ein geschlossenes Kultursystem

Das etablierte Standardverfahren zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien setzt auf die mehrmalige Restimulation der Lymphozyten durch EBV-präsentierende APC. Hierfür müssen die Zellen wöchentlich geerntet, ausgezählt und in definierten Verhältnissen mit bestrahlten EBV-infizierten B-Zellen (LCL) ko-kultiviert werden. Für jeden einzelnen Arbeitsschritt während der Kulturführung (z.B. Mediumwechsel, Zellernte, Restimulation, Expansionsschritt) muss bisher das Kultursystem der 24-Loch Zellkulturplatte geöffnet werden. Trotz der hierbei zwingend vorgeschriebenen hohen Reinheitsklassen ergibt sich aufgrund der Prozessführung ein gesteigertes Risiko für Produkt- und Kreuzkontaminationen. Diese können beispielsweise während der Öffnung des Systems durch evtl. vorhandene Keime hervorgerufen werden. Auch kann es zu Verwechslungen bei der Bearbeitung der zahlreichen Kulturplatten im Zuge der spezifischen Restimulationen kommen.

Eine Grundvoraussetzung der Prozessüberführung in ein geschlossenes Kultursystem ist es die (Antigen-) spezifische Expansion der T-Zellen zu ermöglichen. Dies kann mit Hilfe des neu etablierten, EBV-Peptidpool basierten T-Zell-Generierungsverfahrens erzielt werden.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, die T-Zellkultivierung in geschlossene Kultursysteme wie etwa Bioreaktoren oder Zellkulturbeutel zu überführen. Alle Ansätze scheiterten bisher jedoch an der sehr geringen Ausgangszellzahl EBV-spezifischer T-Lymphozyten im Blut des Menschen (s. 4.1.1). Die Überwindung der geringen Ausgangszelldichten bis zum Erreichen einer stabilen Proliferation macht die *in-vitro* Expansion von T-Zellen sehr diffizil und anfällig gegenüber kleinsten Schwankungen in der Kulturführung. Untersuchungen zur Verwendung von Rührkessel- oder Wave-Bioreaktoren mussten daher auf Vorkulturen in T-Flaschen oder Kulturplatten zurückgreifen, um eine ausreichend hohe Zelldichte zur Inokulation zu erhalten (Foster, Gottlieb et al. 2003; Tran, Burton et al. 2007). Somit konnte lediglich ein Teil der Zellexpansion vom offenen System verlegt, aber kein komplett geschlossenes Kultursystem etabliert werden. Ein anderer Ansatz zielt auf die direkte Überführung der spezifischen T-Zellen in Zellkulturbeutel meist ohne weitere Expansionsschritte (Tran, Burton et al. 2007). Um zumindest für eine einmalige Applikation therapierelevante Zelldosen zu erhalten, wurden hierbei entsprechend hohe Blutmengen bzw. Aphreseprodukte (Lymphozytenkonzentrate) verwendet. Diese Art der Zellgewinnung ist für gesunde Probanden durchaus anwendbar. Bei immunsupprimierten transplantierten Patienten ist dieser Ansatz aufgrund der benötigten Blutmenge eher in Einzelfällen eine Option. Im Rahmen der Pädiatrie ist ein solcher Therapieansatz gleichsam unmöglich. Aus den genannten Gründen ist die 24-Loch Zellkulturplatte nach wie vor das Standardsystem im Herstellungsverfahren EBV-spezifischer T-Zelllinien.

Im Rahmen der Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien nach GMP-Richtlinien konnten erste Erfahrungen im Umgang mit Zellkulturbeuteln gewonnen werden. Eine erfolgreiche Nutzung dieses geschlossenen Kultursystems bei der Expansion EBV-infizierter B-Zellen war ausschlaggebend für den Versuch, auch die T-Zell-Kultivierung an dieses System zu adaptieren. Die nach eingehender Literaturrecherche für die Adaptionenversuche ausgewählten Beutelsysteme sind aus einer gasdurchlässigen Membran aufgebaut. Aus diesem Grund kann auf eine aktive Begasung, die beispielsweise bei Rührreaktoren notwendig ist, verzichtet werden. Allerdings unterscheiden sich die Beutelmaterialeigenschaften in ihren, die Zelladhärenz fördernden Eigenschaften. Der Cell Culture Bag der Firma

Lampire ist für die Kultur adhärenter Zellen ausgewiesen. Die Vue Life Bags von Cellgenix und der T-Cell Expansion Bag von Miltenyi dagegen sind für die Suspensionskultur von Leukozyten entwickelt. Sie unterstützen das Adhären der Zellen nur leicht bzw. gar nicht. Das Wachstum einer T-Zellkultur in 24-Lochplatten vollzieht sich unter Bildung von Proliferationsklumpen, die zum Teil deutlich auf der Kulturfläche adhären. Im Vergleich sind die stärksten wachstumsfördernden Eigenschaften des Lampire Beutels daher nicht verwunderlich. Im Zuge der Anpassung der Kulturführung an die Gegebenheiten eines Zellkulturbeutels wurde festgestellt, dass die Kriterien zur Beurteilung der T-Zellkultur in Lochplatten nicht auf die Beutelsysteme übertragbar sind. Die im Kulturplattensystem wichtige Orientierung an der Farbe des Mediums als Stoffwechselindikator war im Beutelsystem, vermutlich aufgrund eines veränderten Gasaustauschs durch die gaspermeable Beutelmembran, unmöglich. Andere Parameter wie die makro- und mikroskopische Kontrolle der Proliferationsaktivität waren aufgrund der nicht fixierbaren Zellsuspension schwer zu handhaben. Sie führten meist zu Fehleinschätzungen und letztlich zur Apoptose der Kultur. Nach zahlreichen Untersuchungen zu wachstumslimitierenden Einflussfaktoren, wie etwa der Konzentration verschiedener Zytokine, konnte eine erfolgreiche Kulturführung schließlich u.a. durch die Bestimmung kritischer Glukose- und Laktat-Schwellenkonzentrationen etabliert werden. Die Mediumnachführung in Abhängigkeit vom tatsächlichen Glukoseverbrauch konnte nachfolgend auf einen in der Handhabung einfacheren, zeitsparenden Schnelltest umgestellt werden. Als einen weiteren wichtigen Faktor für eine optimale Proliferation konnte die enge räumliche Nähe der Zellen im Sinne eines stimulierenden Zell-Zell-Kontaktes in der Anfangsphase der Kultivierung herausgearbeitet werden. Reproduzierbare Expansionserfolge waren nur in, bis zu einem Kulturvolumen von ca. 50ml, hängenden Beuteln erreichbar. Nach dem Erreichen einer stabilen Wachstumsphase wurden die Beutel dann liegend kultiviert, um den Zellen genügend Expansionsraum zur Verfügung zu stellen.

Im Zuge der weiteren Verfahrensoptimierung gelang auch die Umstellung des Fütterungsregimes auf die reine Nachdosierung von frischem Kulturmedium. Die Vermeidung des Mediumwechsels während der Expansion ist vorteilhaft zur Schaffung eines komplett geschlossenen Systems. Eine Fütterung kann durch am Beutel anzubringende Applikatoren leicht vollzogen werden. Ein Mediumwechsel hingegen ist stets mit der Problematik der Zellrückhaltung und des Zellverlustes verbunden. Für eine gute therapeutische Einsetzbarkeit des neuen Generierungs- und Expansionsverfahrens ist

die notwendige Menge an Ausgangsmaterial von Bedeutung. Während bei Knochenmarktransplantationen die benötigten Zellen aus dem Blut des gesunden Spenders gewonnen werden können, muss bei Organtransplantierten das Blut des erkrankten Patienten eingesetzt werden. Diese Patienten sind häufig nicht in der Lage ohne weiteres größere Blutmengen zu spenden, insbesondere wenn es sich um Kinder handelt. Hier gelang es, die anfänglich benötigte Blutmenge von 100 bis 120ml auf ca. 30ml zu senken.

Interessanterweise war die Senkung der Startzellzahl auf etwa 30 Mio. PBMC mit einer Zunahme, der für einen protektiven Langzeitschutz der Therapie relevanten CD4 pos. T-Zellen nach Expansion verbunden. Gegensätzlich hierzu verschob sich der Differenzierungszustand der Zellen jedoch in Richtung zu kurzlebigeren T_{EM}. Auch der Anteil an Effektor- und multifunktionalen T-Lymphozyten verringerte sich. Allerdings wurden im Rahmen der Optimierungsversuche lediglich zwei Expansionsansätze mit einer Startzellzahl von 30 Mio. PBMC durchgeführt. Die statistische Validität der Ergebnisse bedarf demzufolge einer weiteren Überprüfung. Sollte dieser Trend bestätigt werden, könnten die veränderten Zellcharakteristika auf die höhere Zahl an durchlaufenen Zellteilungszyklen und eine einhergehende terminale Differenzierung zu Effektorzellen zurückzuführen sein. Das bislang auf eine maximale Zellausbeute ausgelegte Expansionsverfahren führt evtl. ebenso zu einem fortschreitenden Erschöpfungszustand der Zellen. Dieser Effekt wird wohl durch eine geringe Startzellzahl und damit eine höhere Zahl an Teilungszyklen verstärkt. Dennoch lag der gesunkene Anteil multifunktionaler Zellen immer noch über dem Vergleichswert der 24-Lochplatten Kontrolle.

5.3 Anwendung des Generierungs- und Expansionsverfahrens auf Patientenmaterial

Die Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien basiert derzeit auf der Verwendung autologer, *in-vitro* EBV-infizierter B-Zellen als Stimulatoren für den Generierungs- und Expansionsprozess der T-Lymphozyten. Die zur Vermeidung der Transplantatabstoßung zwingend erforderliche Immunsuppression bei Organ-transplantierten Patienten beeinflusst jedoch das vorhandene B-Zellkompartiment. Die Verwendung von Medikamenten wie Rituximab führt zu einer starken Beeinträchtigung bis hin zur totalen Depletion der B-Zellen. Für eine große Patientengruppe ist somit eine Herstellung der prozessnotwendigen LCL erschwert oder unmöglich (Savoldo, Goss et al. 2001; Wilkie, Taylor et al. 2004;

McAulay, Haque et al. 2009). Diese Patienten sind bisher vom Nutzen der Adoptiven Immuntherapie mit EBV-spezifischen T-Zellen ausgeschlossen, sofern nicht in zeit- und kostenintensiven Arbeitsschritten brauchbares Material vor der Medikation für eine spätere Anwendung kryokonserviert wird.

Ein Vorteil der EBV-Peptidpool-basierten Herstellungsweise liegt in der Abschaffung der LCL sowie der damit verbundenen deutlichen Zeitersparnis. Ein weiterer Vorzug des Protokolls ist die Möglichkeit, EBV-spezifische T-Zelllinien auch für Patienten unter Immunsuppression herstellen zu können. Dies erschien zunächst fraglich, da das Generierungsverfahren auf der initialen Stimulation der Zellen zur IFN γ -Sekretion basiert. Ein wesentlicher Bestandteil immunsuppressiver Therapie ist die Verabreichung von Calcineurin-Inhibitoren, für die eine Hemmung der Calcineurin-abhängigen Signaltransduktion bei der T-Zellrezeptor-vermittelten IFN γ -Sekretion beschrieben ist (Esser, Krishnamurthy et al. 1996). Im Zuge dieser Arbeit konnte aber für fünf transplantierte, medikamentös immunsupprimierter Patienten die Durchführbarkeit des Herstellungsverfahrens demonstriert werden. Im Durchschnitt stand eine Blutmenge von 30,8 ml pro Patient zu Verfügung. Als Ausdruck der medikamentösen Dauerimmunsuppression konnten durchschnittlich effektiv lediglich 13,9 Mio. PBMC für die T-Zellgenerierung eingesetzt werden. Bei gesunden Spendern liegt bei gleichem Blutvolumen die PBMC-Menge bei etwa 30 bis 40 Mio. Zellen. Hieran lässt sich der allgemein anerkannte Einfluss immunsuppressiv wirkender Medikamente verdeutlichen. Die Zelllinien der Patienten wurden ebenfalls analysiert und zeigten im Vergleich mit den entsprechenden Ansätzen gesunder Spender (Beutelanatz mit 30 Mio. PBMC) einen leicht erhöhten Anteil CD4⁺ T-Zellen. Allerdings bedarf dieser Vergleich aufgrund der geringen Zahl an Ansätzen wiederum einer zukünftigen Überprüfung. Erstaunlicherweise enthielten die patienteneigenen T-Zelllinien jeweils einen etwa doppelt so hohen Anteil an CD4⁺- und CD8⁺ T_{CM} wie die Referenzlinien der Beutelexpansionsversuche. Sollte sich diese Tendenz bestätigen, könnte die Ursache in der Krankengeschichte der Testpersonen zu finden sein. Das Patientenmaterial wurde von Probanden ohne akute EBV-Problematik gespendet. Folglich muss das Immunsystem das Virus gut kontrollieren können, was auf eine gewisse Erfahrungheit bzw. ein Gedächtnis im Umgang mit der Infektion zurückzuführen sein könnte. Somit wäre auch eine höhere Ausgangszellzahl an zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) im Patientenmaterial denkbar. In diesen Kontext, der durch häufigere Virusreaktivierung getriggerten höheren T_{CM}-Zellzahl, könnte auch die im Vergleich gute Potenz der aus dem Patientenmaterial generierten T-Zellen gestellt werden.

Als Indikatoren sind hierbei die Effektorfunktionen der Degranulation und Zytokinproduktion zu sehen. Der Anteil multifunktionaler T-Lymphozyten innerhalb der Patientenzellen liegt auf dem Niveau der Beutelansätze gesunder Spender mit 60 Mio. PBMC. Multifunktionelle Antigen-spezifische Lymphozyten werden in der Literatur als maßgeblich in Bezug auf einen Langzeitschutz vor latenten, reaktivierenden Viren beschrieben (Betts, Nason et al. 2006). Auch hier ist ein Zusammenhang mit der in den Testpersonen vorhandenen effektiven Viruskontrolle durch potente spezifische Lymphozytenpopulationen vorstellbar.

5.4 Ausblick und weiteres Optimierungspotential

Die Adoptive Immuntherapie mit Antigen-spezifischen T-Zellen ist im Verhältnis zu der medikamentösen Behandlung transplantationsbedingter Komplikationen eine junge Alternative. Bisher konnte in zahlreichen klinischen Studien die nebenwirkungsarme bis nebenwirkungsfreie Effektivität der applizierten Zellpräparate belegt werden (Gottschalk, Heslop et al. 2005; Heslop, Slobod et al. 2009). Im Hinblick auf eine Etablierung auch als Präventivmaßnahme und nicht nur als Option für den "schlimmsten Fall" bietet der Ansatz weiteres Optimierungspotential. Diese Weiterentwicklungen sind u.a. hinsichtlich des Zeitaufwandes zur Zellherstellung und daraus resultierender Therapiekosten vorstellbar. So wurden bereits im Laufe dieser Arbeit erste Versuche zur teilweisen Automatisierung des Expansionsprozesses durch die Verwendung einer steuerbaren kontinuierlichen Mediumszufuhr unternommen. Zukünftig soll ebenfalls die Probennahme zur Glukosebestimmung durch eine Online-Messung per Sensor ersetzt werden. Alle genannten Punkte zielen auf eine vereinfachte, weniger zeitintensive Prozessführung und somit auf eine Reduzierung der Produktions- sowie Therapiekosten.

Ein anderes Feld mit Entwicklungspotential bezieht sich auf die Qualität der produzierten Zellen. Die momentane Kulturführung resultiert in Analyseergebnissen mit zum Teil erheblichen Standardabweichungen. Diese hohen Varianzen zeigen sich in erster Linie im Rahmen funktioneller Tests und finden sich gleichermaßen in beiden untersuchten Generierungsverfahren. Deshalb scheint eine Spendervariabilität die wahrscheinlichste Erklärung für die starken Schwankungen zu sein. Ein Einflussfaktor hierbei ist sicherlich das periphere Blut als, in Bezug auf Spender-spezifische Unterschiede (auch in der Krankengeschichte), nicht standardisierbare Ausgangsquelle des Zellmaterials. Ferner sind

die Generierungsprotokolle bislang auf eine maximale Ausbeute mit Blick auf die Endzellzahl ausgelegt. Dies hat zur Folge, dass die generierten Zellen eine hohe Anzahl an Teilungszyklen vollzogen haben und durch einen fortgeschrittenen Differenzierungsstatus charakterisiert sind. Genannte Eigenschaften sind wiederum mit einem Erschöpfungszustand der Zellen sowie negativen Auswirkungen auf die Effektorfunktion verbunden (Sarkar, Kalia et al. 2008; Blackburn, Shin et al. 2009). Aus dem hohen terminalen Differenzierungsgrad folgen ein oftmals geringer Anteil zentraler T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und damit eine temporär begrenzte Schutzfunktion der applizierten Zellen (Kaech, Wherry et al. 2002; Sallusto, Geginat et al. 2004). Anhand von Erfahrungswerten wird durch eine extensive Kulturdauer auch der ebenfalls für einen positiven Therapieverlauf relevante Anteil CD4 pos. Zellen verringert. Die langsamer wachsenden CD4 pos. Zellen werden hierbei im Kulturverlauf von den schneller proliferierenden CD8 pos. T-Zellen überwachsen. Eine Möglichkeit den angeführten Nachteilen zumindest partiell entgegenzuwirken ist eine Verkürzung der Kulturdauer. So sollten erfahrungsgemäß bei normalem Expansionsverlauf auch nach etwa 14 Tagen bereits genügend Zellen für mehrmalige Anwendungen in Dosen von 1×10^7 Zellen pro m^2 Körperoberfläche vorliegen. Ein Argument für den Verzicht auf eine maximale Endzellzahl wird zudem von der Gruppe um Dirk Busch geliefert. In einem Listeria-Modell konnte gezeigt werden, dass bereits die Applikation einiger weniger spezifischer T-Lymphozyten von entsprechender Qualität für den Aufbau einer langanhaltenden protektiven Immunität ausreichend sind (Stemberger, Huster et al. 2007; Stemberger, Neuenhahn et al. 2009). Unabhängig von der Kulturdauer könnte hinsichtlich der Zellausbeute die Verwendung eines anderen Selektionsmarkers eine Verbesserung erbringen. Bislang wurde die IFN γ -Produktion als Selektionsmerkmal genutzt. In einer vergleichenden Analyse mit dem Zelloberflächenmarker CD137 konnte gezeigt werden, dass nach Antigen-spezifischer Stimulation deutlich mehr T-Lymphozyten CD137 pos. als IFN γ pos. waren (Wehler, Karg et al. 2008). Diese höhere Vorfrequenz könnte, bei Verwendung eines CD137-basierten Zellseparationssystems, letztlich auch zu einer gesteigerten Endzellzahl führen.

Eine Möglichkeit den Differenzierungsstatus der T-Zellen zu beeinflussen, bietet sich durch die Wahl des Ausgangsmaterials. Durch die Arbeitsgruppe von Carmen Scheibenbogen wurde publiziert, dass durch die Verwendung von Knochenmark als Ausgangsmaterial ein erhöhter Anteil Antigen-spezifischer T_{CM} expandiert werden konnte (Letsch, Knoedler et al. 2007; Na, Letsch et al. 2009). Es muss nun basierend auf diesen

Daten gezeigt werden, dass sich auch aus dem Knochenmark von transplantierten PTLD erkrankten Patienten eine höhere Zahl an zentralen Gedächtniszellen im T-Zellendprodukt generieren lässt.

Optimierungspotential liegt sicherlich auch in der Wahl der im Kulturmedium verwendeten wachstumsunterstützenden Zytokine. Das standardmäßig genutzte Interleukin-2 ist zwar als T-Zell-proliferationsfördernd beschrieben, kann jedoch auch zu einer Apoptoseinduktion durch aktivierungsinduzierten Zelltod führen (Liu, Riley et al. 2006; Berger, Berger et al. 2009). Eine gute Alternative könnte durch die Kombination der Zytokine IL-7 und IL-15 gegeben sein. Diese wurden bereits in Optimierungsversuchen getestet und besitzen neben der Unterstützung des T-Zellwachstums auch eine anti-apoptotische Wirkung. Außerdem sind sie in der Lage, T-Lymphozyten aus dem Zustand der Anergie zu dispensieren und das Kompartiment der therapierelevanten Gedächtniszellen zu unterstützen (Chen, Lai et al. 2005; Gattinoni, Powell et al. 2006; Ma, Koka et al. 2006).

Mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten scheint eine Ablösung der zeit- und kostenintensiv herzustellenden LCL zur Generierung EBV-spezifischer T-Zellen durch überlappende EBV-Peptidpools möglich. Letztlich müssen die geschaffenen Grundlagen aber durch weitere geplante *in-vivo* Studien evaluiert werden, bevor eine Übertragung des Herstellungsverfahrens in den klinischen Alltag vorgenommen werden kann.

6. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien entwickelt. Die bisher zur Generierung der T-Lymphozyten benötigten EBV-infizierten B-Zellen (LCL) konnten erfolgreich durch chemisch synthetisierbare EBV-Peptidpools ersetzt werden. Hierdurch wurde die Prozessdauer stark verkürzt (von ca. 80 auf 20 Tage) sowie ein höheres Maß an Biosicherheit und Standardisierbarkeit erzielt. Im detaillierten Vergleich sieben gesunder seropositiver Probanden mit der Referenzmethode resultierte das neue Verfahren in T-Zelllinien mit gleichwertigen, meist jedoch verbesserten therapierelevanten Eigenschaften bei einer vergleichbar hohen Endzellzahl. Einzige Ausnahme hierbei war ein schlechterer Lysierungsgrad von LCL ohne weitere EBV-Antigenbeladung im Zytotoxizitätstest.

Im zweiten Teil der Arbeit gelang durch Anpassung und Optimierung die Überführung der Zellexpansion des neuen Prozesses von der "offenen" Kultivierung in 24-Lochplatten in ein geschlossenes Beutelsystem. In diesem Zusammenhang konnten erfolgsentscheidende Parameter wie z.B. die Platzierung des Beutelsystems während der Inkubationszeit eruiert werden. Weiterhin konnte die sehr subjektive Kulturführung des 24-Lochplattensystems durch eine objektivere Methode ersetzt werden. Als Indikator der metabolischen Zellaktivität und zur Beurteilung der durchzuführenden Arbeiten wurde die Bestimmung des tatsächlichen Glukoseverbrauchs der Kultur etabliert. Zugleich konnte die Testmethode auf ein einfacheres zeitsparendes Schnelltestsysteum umgestellt werden. Im Vergleich mit der Zellkulturplatte zeigten alle analysierten Zelleigenschaften durch die Expansion im geschlossenen Kulturbeutel keine Beeinträchtigungen.

Im abschließenden Teil der Arbeit konnte das Potential des neuen Herstellungsverfahrens auch unter realen Bedingungen bewiesen werden. Eine B-Zell-depletierende Immunsuppression ist in der Regel ein Ausschlusskriterium der Adoptiven Immuntherapie mit autologen EBV-spezifischen T-Zellen. Aufgrund der Medikation können aus diesen Patienten keine, für das derzeitige Standardverfahren prozessnotwendigen LCL hergestellt werden. Die auf EBV-Peptidpools basierte neue Herstellungsweise ermöglicht die Behandlung solcher Patienten auch ohne Unterbrechung der Immunsuppression und erweitert die Anwendungsoptionen der Adoptiven Immuntherapie damit um ein Vielfaches.

Die Herstellung der T-Zellpräparate nach den Richtlinien der ‘‘Guten Herstellungspraxis’’ ist eine Voraussetzung, um die Adoptive Immuntherapie außerhalb klinischer Heilversuche zukünftig einer größeren Zahl betroffener Patienten zugänglich zu machen. Diesen Vorgaben entsprechend, gelang es einen Herstellungsprozess ohne Verwendung von potentiell infektiösem Material zu etablieren. Ferner konnte durch die Adaption des Prozesses an ein geschlossenes Kultursystem das Risiko für (Kreuz-) Kontaminationen minimiert sowie eine Automatisierungsoption geschaffen werden. Ebenso wurde durch den Wechsel von 24-Loch Kulturplatten zu Zellkulturbeuteln der Arbeitsaufwand im Rahmen der Kulturführung (Mediumswechsel, Zellexpansion etc.) verringert werden. Die Integration eines Glukosebestimmungsverfahrens konnte die Kulturführung objektiver und standardisierter gestalten.

Das dargestellte Potential des weiterentwickelten Verfahrens zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien muss in weiterführenden *in-vivo* Untersuchungen belegt werden. Zukünftig wäre dann eine bessere, im Gegensatz zur antiviralen medikamentösen Therapie, nebenwirkungsarme bis –freie medizinische Versorgung von Patienten möglich.

7. Literaturverzeichnis

- Addo, M. M. and E. S. Rosenberg (2002). "Cellular immune responses in transplantation-associated chronic viral infections." Transpl Infect Dis **4**(1): 31-40.
- Agarwal, A. and K. A. Newell (2008). "The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance." Curr Opin Organ Transplant **13**(4): 366-72.
- Amon, W. and P. J. Farrell (2005). "Reactivation of Epstein-Barr virus from latency." Rev Med Virol **15**(3): 149-56.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, et al. (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." Immunity **9**(3): 395-404.
- Barisas, B. G., W. F. Wade, et al. (1999). "Dynamics of molecules involved in antigen presentation: effects of fixation." Mol Immunol **36**(11-12): 701-8.
- Berger, C., M. Berger, et al. (2009). "Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates." Blood **114**(12): 2417-26.
- Berger, C., M. C. Jensen, et al. (2008). "Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates." J Clin Invest **118**(1): 294-305.
- Berger, C., C. J. Turtle, et al. (2009). "Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity." Curr Opin Immunol **21**(2): 224-32.
- Betts, M. R., M. C. Nason, et al. (2006). "HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells." Blood **107**(12): 4781-9.
- Bhaduri-McIntosh, S., M. J. Rotenberg, et al. (2008). "Repertoire and frequency of immune cells reactive to Epstein-Barr virus-derived autologous lymphoblastoid cell lines." Blood **111**(3): 1334-43.
- Bishop, M. R., D. H. Fowler, et al. (2004). "Allogeneic lymphocytes induce tumor regression of advanced metastatic breast cancer." J Clin Oncol **22**(19): 3886-92.
- Blackburn, S. D., H. Shin, et al. (2009). "Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection." Nat Immunol **10**(1): 29-37.
- Bollard, C. M., L. J. Cooper, et al. (2008). "Immunotherapy targeting EBV-expressing lymphoproliferative diseases." Best Pract Res Clin Haematol **21**(3): 405-20.
- Bollard, C. M., I. Kuehnle, et al. (2004). "Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections." Biol Blood Marrow Transplant **10**(3): 143-55.
- Bornkamm, G. W. and W. Hammerschmidt (2001). "Molecular virology of Epstein-Barr virus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1408): 437-59.
- Bourgeois, C., B. Rocha, et al. (2002). "A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory." Science **297**(5589): 2060-3.
- Burns, D. M. and D. H. Crawford (2004). "Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease." Blood Rev **18**(3): 193-209.
- Cerwenka, A., C. S. Falk, et al. (2007). "NK cells--from basic research to cancer therapy." Eur J Immunol **37**(5): 1161-4.
- Chapman, A. L. and A. B. Rickinson (1998). "Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease." Ann Oncol **9** Suppl 5: S5-16.
- Chen, G., P. Shankar, et al. (2001). "CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection." Blood **98**(1): 156-64.
- Chen, Y. Z., Z. F. Lai, et al. (2005). "Coculture of Th cells with interleukin (IL)-7 in the absence of antigenic stimuli induced T-cell anergy reversed by IL-15." Hum Immunol **66**(6): 677-87.

- Cockfield, S. M. (2001). "Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder." Transpl Infect Dis **3**(2): 70-8.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein-Barr virus infection." N Engl J Med **343**(7): 481-92.
- Cohen, J. I., C. M. Bollard, et al. (2008). "Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas." Leuk Lymphoma **49** **Suppl 1**: 27-34.
- Comoli, P., S. Basso, et al. (2007). "Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation." Am J Transplant **7**(6): 1648-55.
- Cooper, L. J., M. Kalos, et al. (2000). "Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T-cell receptor genes." J Virol **74**(17): 8207-12.
- Craddock, J. and H. E. Heslop (2008). "Adoptive cellular therapy with T cells specific for EBV-derived tumor antigens." Update Cancer Ther **3**(1): 33-41.
- Delecluse, H. J., D. Pich, et al. (1999). "A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5188-93.
- Dudley, M. E., J. Wunderlich, et al. (2001). "Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma." J Immunother **24**(4): 363-73.
- Elgueta, R., M. J. Benson, et al. (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." Immunol Rev **229**(1): 152-72.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, et al. (1964). "Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma." Lancet **1**(7335): 702-3.
- Esser, M. T., B. Krishnamurthy, et al. (1996). "Distinct T cell receptor signaling requirements for perforin- or FasL-mediated cytotoxicity." J Exp Med **183**(4): 1697-706.
- Faulkner, G. C., A. S. Krajewski, et al. (2000). "The ins and outs of EBV infection." Trends Microbiol **8**(4): 185-9.
- Foster, A. E., D. J. Gottlieb, et al. (2003). "Rapid, large-scale generation of highly pure cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy." J Hematother Stem Cell Res **12**(1): 93-105.
- Fujita, Y., C. M. Rooney, et al. (2008). "Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases." Bone Marrow Transplant **41**(2): 193-8.
- Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, et al. (2005). "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells." J Clin Invest **115**(6): 1616-26.
- Gattinoni, L., D. J. Powell, Jr., et al. (2006). "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat Rev Immunol **6**(5): 383-93.
- Gerritsen, E. J., E. D. Stam, et al. (1996). "Risk factors for developing EBV-related B cell lymphoproliferative disorders (BLPD) after non-HLA-identical BMT in children." Bone Marrow Transplant **18**(2): 377-82.
- Gottschalk, S., H. E. Heslop, et al. (2005). "Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies." Leuk Lymphoma **46**(1): 1-10.
- Gottschalk, S., C. Y. Ng, et al. (2001). "An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs." Blood **97**(4): 835-43.
- Gowans, J. L. and J. W. Uhr (1966). "The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat." J Exp Med **124**(5): 1017-30.
- Hammer, M. H., G. Brestrich, et al. (2007). "Generation of EBV-specific T cells for adoptive immunotherapy: a novel protocol using formalin-fixed stimulator cells to increase biosafety." J Immunother **30**(8): 817-24.

- Hammer, M. H., S. Meyer, et al. (2005). "HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy." *Eur J Immunol* **35**(7): 2250-8.
- Han, S., Y. Huang, et al. (2009). "Phenotype and functional evaluation of ex vivo generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications." *J Hematol Oncol* **2**: 34.
- Haque, T., G. M. Wilkie, et al. (2007). "Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial." *Blood* **110**(4): 1123-31.
- Harada, S. and E. Kieff (1997). "Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation." *J Virol* **71**(9): 6611-8.
- Heller, K. N., C. Gurer, et al. (2006). "Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack." *J Exp Med* **203**(4): 805-8.
- Heslop, H. E., M. K. Brenner, et al. (1994). "Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma." *N Engl J Med* **331**(10): 679-80.
- Heslop, H. E., C. Y. Ng, et al. (1996). "Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes." *Nat Med* **2**(5): 551-5.
- Heslop, H. E. and C. M. Rooney (1997). "Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease." *Immunol Rev* **157**: 217-22.
- Heslop, H. E., K. S. Slobod, et al. (2009). "Long term outcome of EBV specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients." *Blood*.
- Hislop, A. D., N. E. Annels, et al. (2002). "Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection." *J Exp Med* **195**(7): 893-905.
- Hislop, A. D., G. S. Taylor, et al. (2007). "Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus." *Annu Rev Immunol* **25**: 587-617.
- Hoffmeister, B., F. Kiecker, et al. (2003). "Mapping T cell epitopes by flow cytometry." *Methods* **29**(3): 270-81.
- Hromas, R., K. Cornetta, et al. (1994). "Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation." *Blood* **84**(5): 1689-90.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry, et al. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol* **2**(4): 251-62.
- Katz, D. A., R. P. Baumann, et al. (1992). "Viral proteins associated with the Epstein-Barr virus transactivator, ZEBRA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 378-82.
- Kaye, K. M., K. M. Izumi, et al. (1993). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 9150-4.
- Kempkes, B., D. Pich, et al. (1995). "Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA." *J Virol* **69**(1): 231-8.
- Khanna, R., S. R. Burrows, et al. (1995). "Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases." *Microbiol Rev* **59**(3): 387-405.
- Kitagawa, N., M. Goto, et al. (2000). "Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction." *Embo J* **19**(24): 6742-50.
- Klebanoff, C. A., L. Gattinoni, et al. (2005). "Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9571-6.
- Kuppers, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 801-12.

- Leen, A. M., G. D. Myers, et al. (2006). "Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals." *Nat Med* **12**(10): 1160-6.
- Letsch, A., M. Knoedler, et al. (2007). "CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow." *Eur J Immunol* **37**(11): 3063-8.
- Levitskaya, J., A. Sharipo, et al. (1997). "Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12616-21.
- Lin, H., M. Nieda, et al. (2006). "Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells." *Exp Hematol* **34**(3): 289-95.
- Liu, S., J. Riley, et al. (2006). "Comparison of common gamma-chain cytokines, interleukin-2, interleukin-7, and interleukin-15 for the in vitro generation of human tumor-reactive T lymphocytes for adoptive cell transfer therapy." *J Immunother* **29**(3): 284-93.
- Longnecker, R. (2000). "Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence?" *Adv Cancer Res* **79**: 175-200.
- Lucas, K. G., D. Salzman, et al. (2004). "Adoptive immunotherapy with allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes for recurrent, EBV-positive Hodgkin disease." *Cancer* **100**(9): 1892-901.
- Lucas, K. G., T. N. Small, et al. (1996). "The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **87**(6): 2594-603.
- Ma, A., R. Koka, et al. (2006). "Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis." *Annu Rev Immunol* **24**: 657-79.
- Ma, Q., M. Safar, et al. (2004). "Anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer therapy." *Prostate* **61**(1): 12-25.
- Maecker, H. T., H. S. Dunn, et al. (2001). "Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry." *J Immunol Methods* **255**(1-2): 27-40.
- Maecker, H. T., S. A. Ghanekar, et al. (2001). "Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens." *J Immunol* **166**(12): 7268-75.
- McAulay, K. A., T. Haque, et al. (2009). "Epitope specificity and clonality of EBV-specific CTLs used to treat posttransplant lymphoproliferative disease." *J Immunol* **182**(6): 3892-901.
- McLaughlin-Taylor, E., H. Pande, et al. (1994). "Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes." *J Med Virol* **43**(1): 103-10.
- Moosmann, A., N. Khan, et al. (2002). "B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells." *Blood* **100**(5): 1755-64.
- Murray, R. J., M. G. Kurilla, et al. (1992). "Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies." *J Exp Med* **176**(1): 157-68.
- Na, I. K., A. Letsch, et al. (2009). "Human bone marrow as a source to generate CMV-specific CD4+ T cells with multifunctional capacity." *J Immunother* **32**(9): 907-13.
- Papadopoulos, E. B., M. Ladanyi, et al. (1994). "Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation." *N Engl J Med* **330**(17): 1185-91.
- Paya, C. V., J. J. Fung, et al. (1999). "Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting." *Transplantation* **68**(10): 1517-25.

- Pedersen, C., J. Gerstoft, et al. (1991). "HIV-associated lymphoma: histopathology and association with Epstein-Barr virus genome related to clinical, immunological and prognostic features." Eur J Cancer **27**(11): 1416-23.
- Poirier, S., G. Bouvier, et al. (1989). "Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation." Int J Cancer **44**(6): 1088-94.
- Pulle, G., M. Vidric, et al. (2006). "IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival." J Immunol **176**(5): 2739-48.
- Ressing, M. E., D. Horst, et al. (2008). "Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products." Semin Cancer Biol **18**(6): 397-408.
- Riddell, S. R. and P. D. Greenberg (1995). "Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases." Annu Rev Immunol **13**: 545-86.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, et al. (1998). "Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients." Blood **92**(5): 1549-55.
- Roszkowski, J. J., G. E. Lyons, et al. (2005). "Simultaneous generation of CD8+ and CD4+ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor." Cancer Res **65**(4): 1570-6.
- Rowe, M., A. L. Lear, et al. (1992). "Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes." J Virol **66**(1): 122-31.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-63.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Sarkar, S., V. Kalia, et al. (2008). "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates." J Exp Med **205**(3): 625-40.
- Savoldo, B., J. Goss, et al. (2001). "Generation of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy in solid organ transplant recipients." Transplantation **72**(6): 1078-86.
- Sebelin-Wulf, K., T. D. Nguyen, et al. (2007). "Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD." Transpl Immunol **17**(3): 203-10.
- Stemberger, C., K. M. Huster, et al. (2007). "A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets." Immunity **27**(6): 985-97.
- Stemberger, C., M. Neuenhahn, et al. (2009). "Stem cell-like plasticity of naive and distinct memory CD8+ T cell subsets." Semin Immunol **21**(2): 62-8.
- Steven, N. M., N. E. Annels, et al. (1997). "Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response." J Exp Med **185**(9): 1605-17.
- Sugimoto, M., H. Tahara, et al. (2004). "Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus." Cancer Res **64**(10): 3361-4.
- Sun, J. C., M. A. Williams, et al. (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." Nat Immunol **5**(9): 927-33.
- Swinnen, L. J., G. M. Mullen, et al. (1995). "Aggressive treatment for postcardiac transplant lymphoproliferation." Blood **86**(9): 3333-40.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). "Epstein-Barr virus: exploiting the immune system." Nat Rev Immunol **1**(1): 75-82.

- Tran, C. A., L. Burton, et al. (2007). "Manufacturing of large numbers of patient-specific T cells for adoptive immunotherapy: an approach to improving product safety, composition, and production capacity." J Immunother **30**(6): 644-54.
- Vanhoutte, V. J., K. A. McAulay, et al. (2009). "Cytolytic mechanisms and T-cell receptor Vbeta usage by ex vivo generated Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes." Immunology **127**(4): 577-86.
- Vela-Ojeda, J., M. A. Garcia-Ruiz Esparza, et al. (2006). "Clinical relevance of NK, NKT, and dendritic cell dose in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood allogeneic stem cell transplantation." Ann Hematol **85**(2): 113-20.
- Wehler, T. C., M. Karg, et al. (2008). "Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4(+) and CD8(+) T cells based on antigen-triggered CD137 expression." J Immunol Methods **339**(1): 23-37.
- Wilkie, G. M., C. Taylor, et al. (2004). "Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of epstein-barr virus-associated diseases." J Immunother **27**(4): 309-16.
- Wolfl, M., J. Kuball, et al. (2007). "Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities." Blood **110**(1): 201-10.
- Wolint, P., M. R. Betts, et al. (2004). "Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells." J Exp Med **199**(7): 925-36.
- Young, L. S. and P. G. Murray (2003). "Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours." Oncogene **22**(33): 5108-21.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-68.
- Zhu, Y., G. Zhu, et al. (2007). "CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype." Blood **109**(11): 4882-9.

8. Publikationsliste

Replacing Lymphoblastoid Cell lines: Short time generation of Epstein-Barr Virus-specific T cell lines

Andy Roemhild, Andreas Kurtz, Sandra Zwinger, Annika Lubitz, Christoph Giese, Gordon Brestrich, Shimaz Hashimdeen, Manuel Guerreiro, Arne Sattler, Hans-Dieter Volk and Petra Reinke

(in Vorbereitung)

Human peripheral blood and bone marrow EBV-specific T-cell repertoire in latent infection reveals distinct memory T-cell subsets.

Guerreiro M, Na IK, Letsch A, Haase D, Bauer S, Meisel C, Roemhild A, Reinke P, Volk HD, Scheibenbogen C.

Eur J Immunol. 2010 Mar 15. [Epub ahead of print]PMID: 20232341

Generation of HCMV-specific T-cell lines from seropositive solid-organ-transplant recipients for adoptive T-cell therapy.

Brestrich G, Zwinger S, Roemhild A, Noutsias M, Rohde M, Keeren K, Sawitzki B, Volk HD, Reinke P, Hammer MH.

J Immunother. 2009 Nov-Dec;32(9):932-40.PMID: 19816188

Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy.

Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmück M, Römhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P.

Am J Transplant. 2009 Jul;9(7):1679-84. Epub 2009 May 20.PMID: 19459791

Generation of EBV-specific T cells for adoptive immunotherapy: a novel protocol using formalin-fixed stimulator cells to increase biosafety.

Hammer MH, Brestrich G, Mittenzweig A, Roemhild A, Zwinger S, Subklewe M, Beier C, Kurtz A, Babel N, Volk HD, Reinke P.

J Immunother. 2007 Nov-Dec;30(8):817-24.PMID: 18049333

8.1 Kongressbeiträge

A. Roemhild, A. Kurtz, G. Brestrich, A. Fischer, M. Schmueck, S. Zwinger, H-D. Volk, P. Reinke

Adoptive Immunotherapy: Functional Characterisation of Epstein-Barr-Virus (EBV) specific T Cells generated by short time stimulation with EBV peptides

2. European Congress of Immunology, Berlin, Deutschland 09/ 2009

Andy Roemhild, Gordon Brestrich, Annika Fischer, Sandra Zwinger, Michael Schmueck, Andreas Kurtz, Hans-Dieter Volk and Petra Reinke

Adoptive Immunotherapy: Functional Characterisation of Epstein-Barr-Virus (EBV) specific T Cells generated by short time stimulation with EBV peptides

Cellular Therapy, Nürnberg, Deutschland 05/ 2009

Andy Roemhild, Gordon Brestrich, Annika Fischer, Sandra Zwinger, Michael Schmueck, Andreas Kurtz, Hans-Dieter Volk and Petra Reinke *Adoptive Immunotherapy: Functional Characterisation of Epstein-Barr-Virus (EBV) specific T Cells generated by short time stimulation with EBV peptides*

5. Springschool in Immunology, Ettal, Deutschland 03/ 2009 (2. Platz Posterpreis)

A. Roemhild, A. Kurtz, S. Zwinger, G. Brestrich, I. Noack, C. Beier, H-D. Volk, P. Reinke *Adoptive Immunotherapy: A Shortened Generation Method for the Production of Epstein-Barr (EBV) specific T cells*

8. Internationaler Kongress für Immunsuppression und Immuntherapie, Berlin, Deutschland 02/ 2008

A. Roemhild, A. Kurtz, S. Zwinger, G. Brestrich, I. Noack, C. Beier, H-D. Volk, P. Reinke *Adoptive Immunotherapy: Functional Characterisation of Epstein-Barr-Virus (EBV) specific T Cells generated by short time stimulation with EBV peptides*

XXII International congress of Transplantation, Sydney, Australien 08/ 2008

Andy Römhild, Gordon Brestrich, Prof. Dr. H.-D. Volk, Prof. Dr. P. Reinke *Cell therapy for EBV-related PTLN in solid organ transplant patients*

European Epstein-Barr Virus Meeting, Brighton, England 06/ 2009:

9. Danksagung

Danken möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Roland Lauster für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie an der TU-Berlin zu übernehmen.

Frau Prof. Dr. Petra Reinke gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die erstklassige Betreuung, die Herzlichkeit, die stete Diskussionsbereitschaft und letztlich die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk danke ich dafür, die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Medizinische Immunologie der Charite Berlin ermöglicht zu haben sowie zahlreiche wertvolle Hinweise.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Markus Hammer für die freundliche Aufnahme und Einarbeitung innerhalb der Arbeitsgruppe. Gleichmaßen danken möchte ich Herrn Dr. Andreas Kurtz für die Betreuung meiner Arbeit im Alltag, seine unermüdliche Bereitschaft Fragen unverzüglich zu diskutieren und mit hilfreichen Ratschlägen zum Gelingen dieser Arbeit beizutragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Christoph Giese, Annika Lubitz, Christian Demmler und Jana Reuschel von der Firma ProBioGen für die gute Zusammenarbeit und ihr Engagement auch während der schwierigen Projektphasen bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut, insbesondere Gordon, Sandra, Carola, Annika, Micha, Karin, Su-Jin, Si-Hong, Arne, Harald und Manuel, möchte ich für die Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft und nicht zu letzt für das angenehme Arbeitsklima danken.

Der größte Dank gebührt jedoch meinen Eltern, die mich all die Jahre hindurch in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und nie an meinen Fähigkeiten zweifelten. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADV	Adenovirus
AMG	Arzneimittelgesetz
APC	antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BFA	Brefeldin A
BL	Burkitt Lymphom
BRLF-1	IE R-Transaktivatorgen
BZLF-1	IE Z-Transaktivatorgen
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CD	cluster of differentiation, Differenzierungscluster
CMV	Cytomegalie Virus
CSA	Ciclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EBER	Epstein-Barr encoded RNAs, Epstein-Barr kodierende RNAs
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen; Epstein-Barr Kernantigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GMP	good manufacturing practice, Gute Herstellungspraxis
GvHD	graft versus host disease, Transplantat gegen Wirt Reaktion
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HL	Hodgkin Lymphom
HLA	human leukocyte antigen, humanes Leukozytenantigen
IE	immediate early
IFNg	Interferon gamma
IL	Interleukin

IM	infektiöse Mononukleose
KMT	Knochenmarkstransplantation
LCL	lymphoblastoid cell line, lymphoblastoide Zelllinie
LMP	latentes Membranprotein
LP	leader protein
Lsg.	Lösung
MACS	magnetic activated cell sorting, magnetisch aktivierte Zellsortierung
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
mind.	mindestens
MW	Mittelwert
neg.	negative
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, periphere mononukleäre Blutzelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
pos.	positiv
PTLD	post transplant lymphoproliferative disorder, lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
STABW	Standardabweichung
TCR	T cell receptor, T-Zellrezeptor
Th	T-Helfer Zelle
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zelle
V β	V beta
z.B.	zum Beispiel
ZEBRA	BamHI Z Epstein-Barr replication activator

11. Maße und Einheiten

bp	Basenpaare
IU	international units, internationale Einheiten
Kb	Kilobasen
mg	Milligramm
min.	Minute
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Gy	Gray
Std.	Stunde