

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
Direktor : Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

Funktionalität von genmodifizierten zytotoxischen T-Lymphozyten  
mit doppelter Spezifität für Epstein-Barr-Virus und Tumorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Annette Bär (geb. Dieckert)

aus Hamburg

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. J. Vormoor

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Kienast

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2004

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Aspekte der Funktionalität Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischer, CD19 $\zeta$ -transduzierter zytotoxischer T-Zellen (CTL) unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Kostimulation untersucht.

Durch retroviralen Gentransfer wurden EBV-spezifische CTL mit einem chimären T-Zell-Rezeptor ausgestattet, der gegen das Oberflächenantigen CD19 gerichtet ist. CD19 wird sowohl auf Tumorzellen des B-Zellsystems, wie leukämischen Blasten und Burkitt-Lymphomzellen, als auch auf EBV-infizierten lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCL) exprimiert. Im Gegensatz zu Tumorzellen sind B-Zellen potente antigenpräsentierende Zellen, die eine suffiziente Kostimulation bieten. Die Expression eines CD19-spezifischen Rezeptors in EBV-spezifischen CTL ermöglichte daher einen Vergleich der Rezeptorfunktionalität unter dem Aspekt fehlender bzw. ausreichend vorhandener Kostimulation.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die CD19 $\zeta$ -CTL EBV-infizierte Zielzellen über ihren nativen Rezeptor und CD19-positive Zielzellen über ihren chimären Rezeptor mit vergleichbarer Effektivität erkennen und lysieren. Blockierungsversuche und Cold-Target-Inhibition-Tests haben gezeigt, dass die Lyse allogener HLA-inkompatibler LCL und Tumorzellen ausschließlich über den chimären Rezeptor stattfindet. In Expansions- und Proliferationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des chimären Rezeptors durch Koinkubation mit allogenen, HLA-inkompatiblen LCL zu einer proliferativen Antwort der transduzierten T-Zellen führt. Durch Stimulation des chimären Rezeptors durch Tumorzellen hingegen konnten die CD19 $\zeta$ -EBV-CTL nicht zur Proliferation angeregt werden. Eine zusätzliche externe Kostimulation mit CD28 konnte das vorhandene Defizit des chimären Rezeptors bei der Induktion proliferativer Aktivität oder Expansionsrate nicht ausgleichen.

Zusammenfassend ist die Aktivierungsantwort der T-Zelle nach Stimulation des chimären Rezeptors durch die Tumorzellen der natürlichen T-Zellantwort auf Virusantigene deutlich unterlegen. In Anbetracht der Komplexität von T-Zellstimulation und Kostimulation ist anzunehmen, dass für eine optimale T-Zellaktivierung mittels chimärer Rezeptoren die Integration weiterer Moleküle und Signale notwendig ist. Dieses Erkenntnis ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung erfolgversprechender adoptiver immuntherapeutischer Konzepte.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Einführung .....	1
1.1.2	Vorarbeiten: Klonierung, Expression des CD19 $\zeta$ -Rezeptors .....	7
1.2	Ziele .....	8
1.3	Arbeitsschritte und Fragestellungen.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Material .....	10
2.1.1	Geräte und Materialien.....	10
2.1.2	Kulturmedien und Lösungen .....	10
2.1.2.1	Medien.....	11
2.1.2.2	Zelllinien.....	11
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Erzeugen EBV-spezifischer B-Zell-Linien (LCL) .....	12
2.2.2	Erzeugen EBV-spezifischer T-Zell-Linien (CTL) .....	12
2.2.3	Retrovirale Transduktion.....	13
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	13
2.2.5	Zytotoxizitätsassays mit <sup>51</sup> Cr .....	13
2.2.5.1	Cold-target-inhibitor-Tests .....	14
2.2.5.2	Funktionstests unter Antikörperblockierung .....	14
2.2.6	Proliferationstests .....	15
2.2.7	Langzeitexpansionsversuche .....	16
3	Ergebnisse.....	17
3.1	Generierung EBV-spezifischer CTL.....	17
3.2	Transduktion der CTL mit CD19 $\zeta$ .....	17
3.3	Ermittlung des Phänotyps der einzelnen Zelllinien.....	18
3.4	Darstellung der CD19-Oberflächenexpression.....	19
3.5	Lyse EBV-spezifischer LCL und Tumorzellen bzw. leukämischer Blasten.....	21
3.6	Antikörperblockierungsversuche.....	23
3.6.1	HLA-Inhibitionstests und CD19 $\zeta$ -Inhibitionstests .....	23
3.7	Cold-target-inhibition Tests .....	26
3.8	Proliferationsexperimente .....	29
3.9	Langzeitexpansionsversuche .....	31

4	Diskussion.....	35
5	Literaturverzeichnis.....	44

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zellen
chRec	Chimäre Rezeptoren
cpm	counts per minute
CTL	zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T cells)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat
KMT	Knochenmarktransplantation
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien (lymphoblastic cell lines)
PBMC	Mononukleäre Zellen bzw. peripheral blood-derived mononuclear cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinchlorophyllprotein

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

In Deutschland sterben jährlich etwa 450 Kinder an den Folgen von Krebs. Dabei ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) die häufigste maligne Erkrankung. Aktuell erkranken in Deutschland jährlich etwa 508 Kinder an ALL (Dt. Krebsregister). Die Primärbehandlung der kindlichen ALL beruht auf einer Kombinationspolychemotherapie. Ein bedeutender Aspekt im Rahmen dieser Erkrankung ist die Verhinderung von Rezidiven. Trotz ständiger Optimierung der Chemotherapie kommt es im Anschluss an diese Behandlung bei 20-30 % der Kinder zu einem Rezidiv (Schrappe 1995).

Ein häufig angewandtes, auch als „immuntherapeutisch“ zu verstehendes, Therapieverfahren bei ALL ist die allogene Knochenmarktransplantation (KMT), worunter wir eine Übertragung von Knochenmarkstammzellen HLA-kompatibler Spender verstehen. Dabei wird zunächst durch Zytostatikabehandlung das Empfänger Knochenmark zerstört, mit dem Ziel, die Ausgangspopulation der leukämischen Blasten zu vernichten. Anschließend erfolgt eine Rekonstitution des Knochenmarks mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.

Bei den bei einigen Patienten dennoch persistierenden Rezidivblasten kommt es, nach Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie, häufig zu einer Resistenz gegen die eingesetzten Zytostatika, wodurch weitere Therapiemöglichkeiten äußerst beschränkt sind.

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen ist eine mögliche Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung von Tumoren untersucht worden.

Das Immunsystem des Körpers ist ein hocheffizientes Abwehrsystem. Es erkennt und vernichtet fremde Genprodukte auf unterschiedliche Weise. Eine Möglichkeit ist die Lyse durch zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T cells, CTL). T-Zellen besitzen individuelle Rezeptoren, über die sie Bestandteile fremder Proteine erkennen. Nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen lysieren die CTL die präsentierende Zielzelle. Gleichzeitig kommt es zur Proliferation und Abgabe von Wachstumsfaktoren, um

weitere Bestandteile des Immunsystems, z.B. Antikörperbildung durch B-Zellen, zu aktivieren.

Auch Tumorzellen, die konstant tumorspezifische Antigene exprimieren, können mit Hilfe ex vivo generierter, gegen diese Antigene gerichteter zytotoxischer T-Zellen vernichtet werden. Diese Strategie ist erfolgreich bei stark immunogenen Tumoren wie der EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung eingesetzt worden (Khanna 2000, Bollard 2001, Rooney 1995, Heslop 1997, Rooney 1998).

T-Zellen könnten bei dem Vorliegen minimaler Resterkrankung einer ALL, die auch nach einer intensiven Behandlung zurückbleiben kann, eine sinnvolle Ergänzung der Therapie und somit eine Unterstützung bei der Bekämpfung von Rezidiven darstellen.

Das bisher gängigste immuntherapeutische Konzept bei der Leukämie beinhaltet, dass bei den Knochenmarkempfängern eine Immunreaktion auf der Grundlage der minor-Histokompatibilitätsantigene ausgelöst wird. Dabei bewirken therapeutisch verabreichte Spenderlymphozyten eine Bekämpfung residualer leukämischer Zellen (Montagna 1998). Die Gefahr dieser therapeutischen Maßnahme bei Patienten mit Leukämie rezidiv nach KMT ist die Entwicklung einer relevanten Graft-versus-Host-Erkrankung (Bader 1999).

Um dieses Risiko zu minimieren, sind Versuche unternommen worden, spezifisch gegen die leukämischen Zellen gerichtete zytotoxische T-Lymphozytenkulturen zu etablieren (Dolstra 1999). Eine Behandlung durch Retransfusion dieser T-Zellen bezeichnet man als „adoptive Immuntherapie“. Da die Effektorzellen der tumorspezifischen Immunität passiv verabreicht werden, ist ein intaktes Immunsystem des Patienten nicht erforderlich.

Allerdings wird die Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen durch die geringe Präsentation der Oberflächenproteine erschwert. Dazu kommt als weitere Schwierigkeit die Möglichkeit der Unterdrückung der T-Zellaktivierung durch die Tumorzelle. CTL mit Spezifität für leukämische Blasten selektiv zu expandieren, ist auch bei Kenntnis immundominanter, tumorassoziierter HLA-Antigene (Cardoso 1999) durch den sehr hohen zeitlichen und technischen Aufwand begrenzt.

Eine alternative Form der Immuntherapie ist die Behandlung mit tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern. Seit den 80er Jahren sind verschiedene Antikörper entwickelt worden, von denen einige mittlerweile im Rahmen der Behandlung verschiedener Tumoren eingesetzt werden. Voraussetzung für die Behandlung mit Antikörpern ist das Vorhandensein tumorspezifischer Oberflächenmerkmale.

Auf Grund der Tatsache, dass die typische B-Vorläufer-ALL [t (12, 21)], als häufigste ALL nach Knochenmarktransplantation von einem CD19-positiven Zelle ausgeht (Hotfilder 2002), ist das B-Zelldifferenzierungsantigen CD19 eine geeignete Zielstruktur. Eine gesunde Stammzellpopulation erwies sich in der immunphänotypischen Charakterisierung als CD19-negativ (Vormoor 1998; Bärsch 1999). Daher ist davon auszugehen, dass die leukämische Transformation auf der Ebene einer CD19-positiven lymphatischen Vorläuferzelle stattfindet. Eine therapeutische Lyse CD19-positiver Zellen würde damit auch die komplette Vernichtung des malignen Stammzellklons bewirken, ohne die gesunden Stammzellen in Mitleidenschaft zu ziehen.

Antikörper gegen CD19 sind in mehreren klinischen Studien zur Therapie von Leukämien und Lymphomen zur Anwendung gekommen (Heckman 1991; Vlasveld 1995). Dabei hat sich gezeigt, dass leukämische Blasten von Anti-CD19-Antikörpern gezielt erkannt werden können. Gleichzeitig wurden jedoch die schwachen Effektorfunktionen der verwendeten Antikörper deutlich. Trotz erfolgreicher Bindung der Antikörper an die Blasten kam es nur in unzureichendem Maße zur Vernichtung der Tumorzellen. Um die zytolytische Wirkung der Antikörper zu erhöhen, wurde daraufhin die Spezifität des Antikörpers mit einem Toxin verbunden (Grossbard 1993; Uckun 1999) oder eine doppelte Spezifität für CD19 und für das T-Zell-Antigen CD3 geschaffen, wodurch T-Lymphozyten rekrutiert werden konnten (Daniel 1998; Kipriyanov 1998; Manzke 1999; Loffler 2000; Cochlovius 2000).

Zu Beginn der 90er Jahre ist eine neue immuntherapeutische Strategie entwickelt worden. Die hochspezifische Erkennung von Tumorzellen durch Antikörper wurde mit den effizienten Effektorfunktionen von T-Zellen verbunden. T-Zellen wurden mit sogenannten „chimären Rezeptoren“ (chRec) ausgestattet.

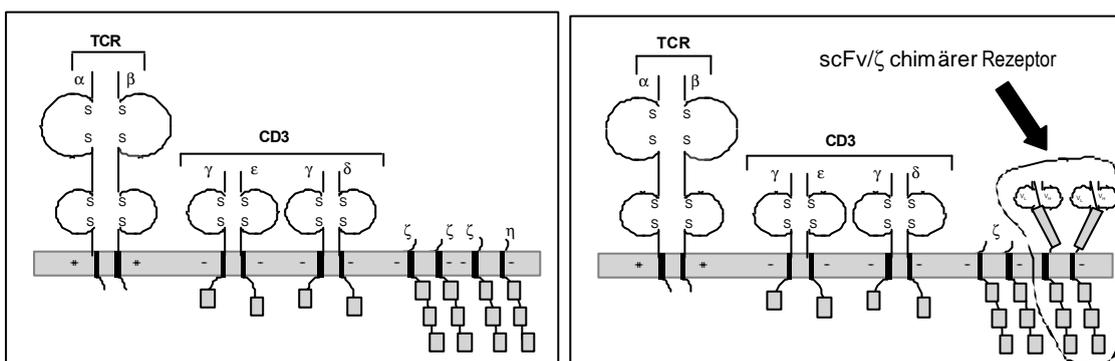
Voraussetzung für diese Strategie ist die Ähnlichkeit der molekularen Struktur des T-Zell-Rezeptors und der Immunglobulinmoleküle. Einzelketten-Antikörper, die gegen tumorspezifische Antigene gerichtet sind, wurden als extrazelluläre Erkennungsdomänen für CTL genutzt. Durch eine Verbindung mit der  $\zeta$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors ist es möglich, Zugang zu zellulären Signaltransduktionswegen zu erlangen. So erfolgt die Weiterleitung der durch Antigenerkennung ausgelösten Signale an den Kern der T-Zelle (Abb. 1a, b). Diese Signale führen zu Lymphokinproduktion und Zytolyse.

Erste präklinische Studien zeigten signifikante *in vivo* Antitumor-Aktivität der genetisch modifizierten Effektor-T-Zellen (Hwu 1995; Wang 1998; McGuinness 1999).

Abb.1

a. Struktur des T-Zell-Rezeptorkomplexes

b. Struktur eines chimären T-Zell-Rezeptors



Die Kombination von T-Lymphozyten mit der Spezifität von Antikörpern in Form chimärer T-Zell-Rezeptoren kann zu einer suffizienten, tumorspezifischen Immunantwort führen, die in der Zytolyse von Tumorzellen mündet. Erste klinische Studien mit genmodifizierten T-Zellen haben jedoch zu enttäuschenden Ergebnissen geführt (Mitsuyasu 2000, Deeks 2002). Offenbar ist die Funktionalität der mit chimären Rezeptoren ausgestatteten T-Zellen abhängig vom Aktivierungszustand der T-Zelle (Brocker 1995; Brocker 2000). Dabei ist über die chimären Rezeptoren zwar im aktivierten Zustand eine Antigen-getriggerte, spezifische Lyse der Zielzellen möglich, nicht jedoch die vollständige Aktivierung der T-Zelle mit nachfolgender Proliferation und Expansion. Die entsprechenden Defizite der Signalweiterleitung sind bisher nicht detailliert aufgeklärt worden.

Immunologisch ist bekannt, dass für die vollständige Aktivierung einer T-Zelle mehrere unabhängige Signale erforderlich sind. Zusätzlich zur Erkennung von Peptidfragmenten im Zusammenspiel mit MHC-Molekülen (Signal 1) sind auch ein oder mehrere kostimulatorische Moleküle erforderlich (Signal 2) (Coyle 2001). Ohne Stimulation und Kostimulation wiederum sind die verschiedenen Zellen und damit auch CTL nicht in der Lage, über einen längeren Zeitraum in einem aktivierten und damit reagiblen Zustand zu bleiben.

Tumorzellen haben in der Regel keine bzw. wenige kostimulatorische Moleküle, es fehlt das oder die weitere/n Signal/e und es kommt damit zu einer inkompletten Aktivierung reagierender T-Zellen (Abken 2002). CD28 wurde als wichtiges kostimulatorisches Molekül erkannt, und es gibt Versuche, CD28 in chRec zu integrieren (Krause, 1998, Finney 1998, Beecham 2000, Geiger 2001, Hombach 2001, Maher 2002). In diesen Experimenten zeigt sich aber auch, dass dieser Ablauf ausgesprochen komplex und multifaktoriell ist und sich nicht auf CD28 beschränken oder reduzieren lässt.

Ein besonderes Modell für die Aktivierung von CTL stellt die Immunantwort auf spezifische Infektionen und die nachfolgende, teilweise lebenslange Unterdrückung symptomatischer Erkrankungsphasen dar. Eines der am besten untersuchten Beispiele ist die Immunreaktion auf Epstein-Barr-Virus (EBV).

Die Erstinfektion mit EBV erfolgt häufig im Kindesalter, sodass eine 85-90 %ige Durchseuchungsrate der Bevölkerung in Mitteleuropa vorliegt. Bei akuter Erkrankung kommt es neben der Bildung spezifischer Antikörper zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort, die zur Lyse der virusbeladenen B-Zellen führt. Die Infektion bedingt jedoch nach Abklingen der akuten Erkrankung auch eine lebenslange Persistenz der Viren in infizierten B-Zellen. Durch die Gedächtnisfunktion und Generierung spezifischer T-Lymphozyten ist ein intaktes Immunsystem in der Lage, eine aufflackernde Infektion durch EBV wirksam zu bekämpfen, so dass ein Gleichgewicht ohne klinisch relevante Symptomatik entsteht. Diese spezifischen T-Lymphozyten werden durch wiederkehrenden Kontakt mit ihrem Antigen auf infizierten B-Zellen

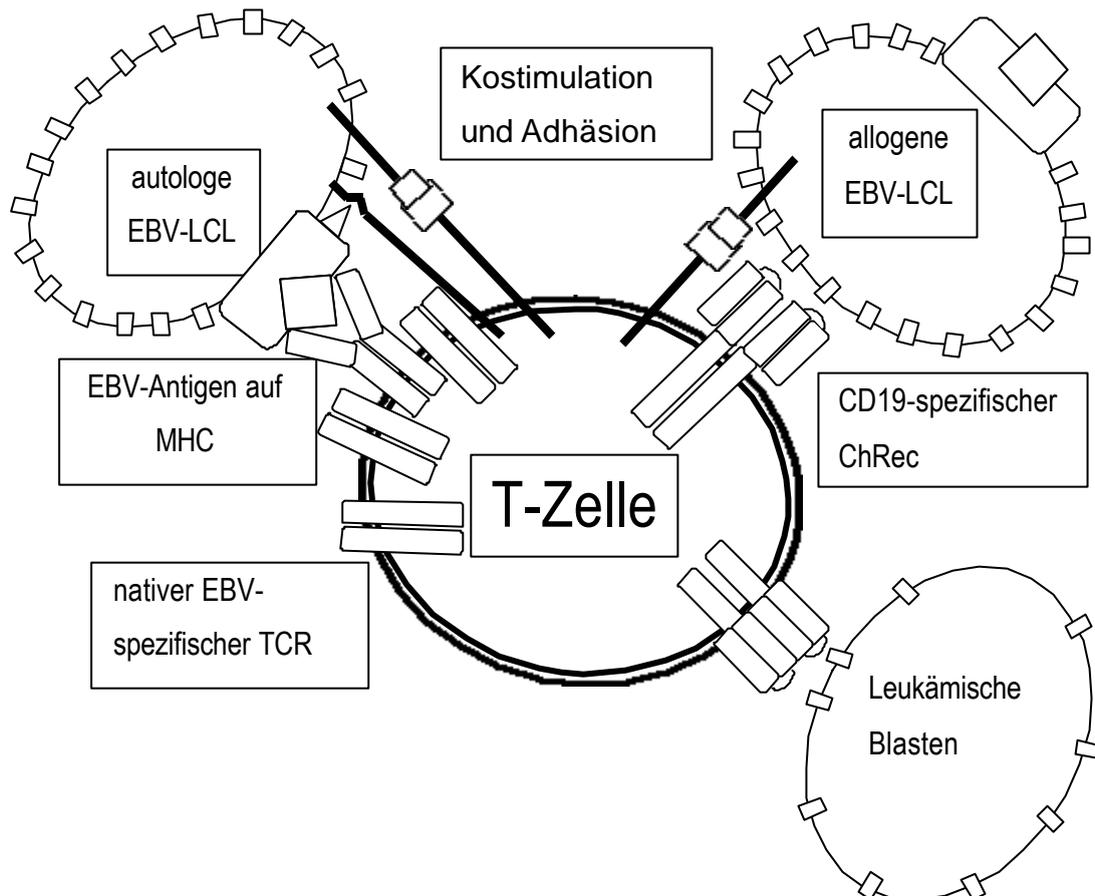
immer wieder aktiviert und sind ständig in der Lage, mit Erkennung und Lyse zu reagieren.

EBV-infizierte, lymphoblastoide Zelllinien (lymphoblastic cell lines, LCL) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) und zeichnen sich daher durch eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle zur Aktivierung tumorassoziierter T-Zellen aus. Als Mitglieder der B-Zell-Reihe besitzen sie, ebenso wie leukämische B-Vorläufer-Blasten, den Oberflächenmarker CD19. Diese Gemeinsamkeit erlaubt einen Vergleich der T-Zell-Immunaktivierung über chimäre Rezeptoren durch professionelle APC und Tumorzellen (Abb. 2): Nach unserem Modell erkennen EBV-spezifische T-Lymphozyten, die mit einem CD19-spezifischen chimären T-Zell-Rezeptor ausgestattet sind, ihre Zielzellen über unterschiedliche Mechanismen. Autologe EBV-Zielzellen werden mittels des nativen Rezeptors erkannt. EBV-infizierte B-Zellen eines HLA-inkompatiblen Spenders hingegen werden ausschließlich über CD19 und den chimären Rezeptor erkannt, vor einem Hintergrund kostimulatorischer Moleküle. Auch mit CD19-positiven Tumorzellen interagieren die T-Zellen mittels des chimären Rezeptors, jedoch in Abwesenheit ausreichender Kostimulation.

Sollte Kostimulation eine entscheidende Rolle bei der T-Zellaktivierung über chimäre Rezeptoren spielen, ist zu erwarten, dass die Funktionalität der mit Tumorzellen und mit EBV-Zielzellen stimulierten T-Zellen sich deutlich unterscheidet. Ist der chimäre Rezeptor funktionell gleichwertig mit dem nativen Rezeptor, sollte eine Interaktion der genetisch modifizierten T-Zellen mit allogenen und mit autologen EBV-infizierten Zellen zu einer vergleichbaren T-Zellantwort führen.

Mit diesem Modell ist also ein Vergleich und die Untersuchung der Bedeutung von Kostimulation bei der Interaktion und Lyse von Zielzellen über den T-Zell- bzw. Rezeptorkomplex durch chimäre Rezeptoren möglich.

Abb. 2: Modell der Interaktion eines T-Lymphozyten mit autologen, EBV-spezifischen LCL, allogenen EBV-spezifischen LCL und Tumorzellen bzw. leukämischen Blasten



### 1.1.2 Vorarbeiten: Klonierung, Expression des CD19 $\zeta$ -Rezeptors

Frau Professor Heddy Zola am Child Health Research Institute in Australien stellte das Plasmid pHB Strep/CD19 zur Verfügung, das die variablen Anteile des monoklonalen CD19-spezifischen Hybridomantikörpers FMC63 enthält. Die variablen Domänen dieses Antikörpers konnten ohne hohe Affinitätsverluste als Einzelkettenmoleküle und als Bestandteil rekombinanter Immunkonjugate kloniert werden. In der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. Claudia Rössig wurden die Antigenerkennungsdomänen von FMC63

mit der signaltransduzierenden  $\alpha$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors verbunden. Die rekombinanten chimären Rezeptoren wurden per retroviralem Gentransfer in humanen T-Lymphozyten zur Expression gebracht. Dazu wurden die chimären Rezeptorgene in den retroviralen Vektor SFG kloniert. Zellen der transienten retroviralen Packaging-Zelllinie „Phoenix-eco“ wurden mit dem viralen Plasmid transfiziert und der virushaltige Überstand wurde für die Infektion von Zellen der Linie PG13 verwendet. Die entstandenen stabilen Produktionszelllinien verfügen über den GALV-Hüllprotein, der den Viruseintritt in T-Lymphozyten über hochexprimierte spezifische Rezeptoren ermöglicht.

## 1.2 Ziele

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Untersuchung der Funktionalität und Eigenschaften von Epstein-Barr-Virus-spezifischen, CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Kostimulation bei der T-Zellaktivierung über chimäre Rezeptoren.

Es soll ein Beitrag für eine therapeutische Verwendung von T-Zellen, die mit einem chimären Rezeptor ausgestattet sind, geleistet werden. Daraus könnte als Behandlungskonzept abgeleitet werden, dass im Anschluss an eine KMT EBV-spezifische T-Zellen des Spenders in Kultur gebracht und anschließend mit einem kombinierten Rezeptor ausgestattet werden. Die veränderten T-Zellen werden im Labor vermehrt und dem Patienten bei Verdacht auf minimale Resterkrankung zurückgegeben. Diese modifizierten T-Zellen sind dann in der Lage, leukämische Blasten zu erkennen und zu lysieren.

Durch die Verwendung Epstein-Barr-Virus-spezifischer CTL als Effektorzellen der Leukämie-spezifischen Immunität ergibt sich eine sinnvolle Strategie für die Lösung eines weiteren Problems: der EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung. Unbehandelt besteht bei dieser Erkrankung eine hohe Letalität. Durch Transfusion CD19 $\zeta$ -transduzierter EBV-CTL würde nach allogener Stammzelltransplantation sowohl eine antivirale als auch eine antitumorale Immunität erreicht.

### 1.3 Arbeitsschritte und Fragestellungen

Aus diesen Zielen ergaben sich zunächst folgende Arbeitsschritte und Fragen:

- Generierung von EBV-spezifischen CTL und Transduktion mit CD19 $\zeta$
- Wird der Immunphänotyp der CTL durch die Transduktion und Expression des Rezeptors beeinflusst?
- Wird die Zytolyse von EBV-LCL durch die Transduktion und Expression des Rezeptors beeinflusst?
- Zeigen EBV-spezifische, CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL eine lytische Aktivität gegen leukämische Blasten?
- Ist diese Lyse rezeptorspezifisch?
- Ist diese Lyse MHC-unabhängig?
- Können EBV-spezifische LCL über den chimären Rezeptor lysiert werden?
- Gibt es Beeinflussungen der beiden Rezeptorsysteme in ihrer Funktion?

Weiterführende Fragestellungen

LCL und leukämische Blasten haben eine Gemeinsamkeit. Sie sind beide Abkömmlinge der B-Zellreihe und exprimieren also beide CD19. Der Unterschied besteht in der Fähigkeit zur Kostimulation, der bei den LCL als antigenpräsentierenden Zellen optimal, bei den leukämischen Blasten bzw. Tumorzellen jedoch nur unzureichend gegeben ist.

Auf dieser Grundlage ergaben sich weitere Fragestellungen zu der T-Zellfunktionalität:

- Können EBV-spezifische, CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL durch leukämische Blasten bzw. Tumorzellen oder allogene LCL zur Proliferation angeregt werden?
- Welche Auswirkung hat eine Kostimulation mit CD28 auf die spezifische Proliferation der CTL?
- Expandieren EBV-spezifische, CD19-transduzierte CTL nach Stimulation durch Tumorzellen bzw. allogenen LCL in Langzeitkulturen?
- Welche Auswirkung hat eine Kostimulation mit CD28 auf die spezifische Expansion der CTL?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Materialien

- Dispensiersystem Multiplette<sup>®</sup> plus: Kolbenhubpipetten 1-10, 10-100, 100-1000  $\mu$ l; Eppendorf, Hamburg
- Pipettierhilfe pipetus<sup>®</sup> akku; Hirschmann Laborgeräte Eberstadt
- Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, konische 15 ml-Röhrchen, 96-, „multiwell“-Kulturpl. U- u. V-Form; Greiner Cellstar, Solingen
- 15 ml-Röhrchen und 50 ml-Röhrchen; Sarstedt, Nürmbrecht
- Flexible 96-Loch-Mikrotiterplatten; Wallac, Finnland
- Beschichtete 24-Loch-Kulturplatten, 1 ml-Einfrierröhrchen; Nunc, Wiesb.
- Unbeschichtete 24-Loch-Kulturplatten; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
- FACS Calibur mit Cell Quest Pro Software; Becton Dickinson, San Jose, CA
- Fiberglasfilterpapier; Wallac Trilux Freiburg
- $\gamma$ - und  $\beta$ -Counter; 1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter; Wallac Trilux Freiburg
- Brutschrank, Heraeus; Heraeus
- Sterile Werkbank, Herasafe; Heraeus

#### 2.1.2 Kulturmedien und Lösungen

- RPMI Medium 1640; Hyclone, Logan, Utah
- RPMI Medium 1640; GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland
- Einfriermedium (Kulturmedium mit 50 % FCS und 10 % DMSO)
- Clicks; EHAA, Irvine Scientific, Santa Ana, California
- DMEM; GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland
- IMDM; GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland
- PBS (phosphate-buffered saline); GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland
- CD 28.2; Pharmingen

- Lymphoprep<sup>®</sup> Nycomed
- Fetales Kälberserum (FCS); Hyclone, Logan, Utah
- L-Glutamin; GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland
- Ciclosporin A (CSA); Sandoz Pharmaceuticals, Washington, DC
- Rekombinantes, humanes IL2; Proleukin
- RetroNectin<sup>™</sup> (rekombinantes FN CH-296); Takara Shuzo, Otsu, Japan
- 0,2 % Paraformaldehyd; Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- <sup>51</sup>Cr Sodium Cromate; PE Applied Biosystems
- Triton X 100; Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Optiphase Supermix; Wallac, Turku, Finnland
- W6/32- und CR3/43-Antikörper; Dako, Carpinteria, CA
- FMC-63 (CD19-Antikörper); Chemicon, Temecula, CA
- Trypanblau; GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland

#### 2.1.2.1 Medien

Als Standardmedium diente RPMI 1640 (mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin), im weiteren RPMI-Medium genannt. Dies wurde für die Kultivierung der LCL und für alle Waschschrte, auch im Rahmen der Testungen, verwendet. Die PBMC (mononukleäre Zellen bzw. peripheral blood-derived mononuclear cells) wurden während der ersten beiden Stimulationen in RPMI Hyclone (mit 10 % FCS, 1 mM Glutamin) gehalten, nach der dritten Stimulation und für alle CTL wurde Clicks-Medium (mit 50 % RPMI Hyclone, 10 % FCS, 1 mM Glutamin), im weiteren als Clicks-Medium bezeichnet, benutzt.

#### 2.1.2.2 Zelllinien

Zur Generierung EBV-spezifischer LCL wurde virushaltiger Überstand der Produktionszelllinie B95-8, der uns von Prof. Cliona Rooney, Houston, USA zur Verfügung gestellt wurde, genutzt.

Da die humane HLA-Antigen-negative Lymphoblastenlinie K562 (American Type Culture Collection, ATCC) sowohl besonders sensibel auf natürliche Killerzellen reagiert, als auch eine CD19-negative Oberfläche aufweist, wurde diese Zelllinie in allen Versuchen als Negativkontrolle genutzt. Raji (ATCC) ist eine Burkitt-

Lymphomzelllinie und wurde zusammen mit Reh (ATCC), einer akuten lymphatischen Leukämiezelllinie, als Zielzellen im Sinne von CD19<sup>+</sup> Tumorzellen bzw. leukämischen Blasten eingesetzt. Für einige Versuche standen leukämische Blasten eines Patienten mit ALL zur Verfügung.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Erzeugen EBV-spezifischer B-Zell-Linien (LCL)

Zur Herstellung EBV-spezifischer B-Zell-Linien wurden  $5 \times 10^6$  PBMC mit 50  $\mu$ l konzentriertem Virusüberstand der Zelllinie B95-8 in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l über 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Ciclosporin-haltigem (1  $\mu$ g/ml) RPMI-Medium resuspendiert und  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro „well“ auf einer 96-Loch-Flachboden-Platte verteilt. Die Platte wurde in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel, indem 100  $\mu$ l Medium pro „well“ aspiriert und durch 100  $\mu$ l RPMI-Medium ersetzt wurden (Smith 1987). In Abhängigkeit vom individuellen Spender betrug die Zeitdauer für die Etablierung manifester lymphoblastoider Zelllinien 4-8 Wochen.

### 2.2.2 Erzeugen EBV-spezifischer T-Zell-Linien (CTL)

Für die Generierung von CTL-Linien wurden Blutproben von 4 gesunden, EBV-positiven Spendern (CH, CR, MK, OB) entnommen und die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Das Prinzip der Generierung EBV-spezifischer CTL-Linien beruht auf der wiederholten Stimulation und nachfolgenden Expansion EBV-spezifischer Vorläuferzellen aus dem peripheren T-Lymphozytenpool seropositiver Spender. Nach Bestrahlung von autologen EBV-spezifischen LCL mit 30 Gy durch eine Cäsiumquelle wurden je  $5 \times 10^4$  dieser Zellen auf einer 24-Loch Platte mit  $2 \times 10^6$  PBMC pro „well“ kultiviert (Ratio 1 : 40). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Es wurde insgesamt 9-12 Tage bis zur ersten Restimulation kultiviert. Dazu wurden autologe EBV-spezifischen LCL bestrahlt und  $2,5 \times 10^5$  Zellen zu je  $1 \times 10^6$  CTLs gegeben (Ratio 1 : 4). Zweimal wöchentlich erfolgte eine Zugabe von rekombinantem, humanen IL2 (Proleukin) 50 U/ml. Weitere Restimulationen erfolgten in wöchentlichen Abständen.

### 2.2.3 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion der CTL mit dem Plasmid SFG/CD19 $\zeta$  erfolgte 24 Stunden nach der 3. Stimulation. Dazu wurden zunächst die „wells“ einer 24-Loch Platte mit 4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Retronectin (rekombinantes FN CH-296) beschichtet (Hanenberg 1996). Dieses Fibronektinfragment ermöglicht durch gleichzeitige Bindung viraler und zellulärer Oberflächenproteine eine Kolokalisierung von Virus und Zelle. Frisch hergestellter virushaltiger Überstand der Verpackungszelllinie PG13/CD19 $\zeta$  wurde in mehreren aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei 32°C an das Retronektin gebunden. Schließlich wurden 1 x 10<sup>6</sup> CTL pro „well“ hinzugegeben und mit dem frischen Überstand über 36-48 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen mit Hilfe der Verpackungszelllinie PG13/SFG mit EGFP (enhanced green fluorescent protein) transduziert, um durchflusszytometrisch den Erfolg der Transduktion beurteilen zu können.

### 2.2.4 Durchflusszytometrie

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen des Phänotyps der CTL wurden monoklonale Antikörper (Becton Dickinson, San Jose, CA) der Maus, gerichtet gegen CD3, CD4, CD8, CD16 und CD56, eingesetzt. Die Antikörper sind mit Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Peridinchlorophyllprotein (PerCP) gekoppelt und gehören der IgG<sub>1</sub>-Unterklasse an. Es wurden pro Untersuchung 10000-20000 Zellen gemessen. Isotypkontrollen wurden bei allen Färbungen mitgeführt.

Der FACS-Puffer setzte sich aus PBS, supplementiert mit 2 % fetalem Kälberserum, zusammen. Als Fixationslösung verwendeten wir 0,2 % Paraformaldehyd in PBS.

Zur Kontrolle nach Transduktion wurde der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen pro 10000-20000 Zellen direkt ermittelt.

### 2.2.5 Zytotoxizitätsassays mit <sup>51</sup>Cr

Alle Versuche wurden jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt.

Die zytotoxische Funktionsfähigkeit der generierten CTL wurde im <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest ermittelt. Die Zielzellen wurden mit 100 $\mu\text{Ci}$  <sup>51</sup>Cr pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen inkubiert. Das radioaktiv markierte Chrom bindet dabei an zytoplasmatische Proteine.

Der Reaktionsansatz erfolgte auf einer 96-Loch-V-Boden-Kulturplatte in einem totalen Volumen von 200 µl pro „well“. Nach Zugabe von CTL als Effektorzellen in verschiedenen Konzentrationen (40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1) erfolgte eine Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die maximale Lyse wurde durch Zugabe von je 100 µl Triton X, die spontane Lyse durch Zugabe von 100 µl Medium zu den Zielzellen pro „well“, ermittelt.

Nach der Inkubationszeit wurde nach Zentrifugieren 50 µl Überstand abgenommen und auf flexible 96-Loch-Mikrotiter-Platten überführt. Nach Zugabe von 150 µl Supermix wurden die Platten mit Klebefolie versiegelt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Gammacounter gemessen.

Bei erfolgreicher Lyse rupturieren die CTL die Zellmembran der Zielzellen, wodurch das radioaktive Chrom wieder freigesetzt wird. Dabei ist die Menge des freigesetzten Chroms proportional zur Lyseeffizienz. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{\text{Probenwert} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100$$

#### 2.2.5.1 Cold-target-inhibitor-Tests

Die Versuchsanordnung soll klären, ob es zu einer funktionalen Koexpression beider Rezeptoren, nämlich des nativen und des chimären Rezeptors, auf derselben Zelle kommt. Diese ist durch die Lyseeffizienz des nativen so wie des chimären Rezeptors gegenüber EBV-spezifischen B-Zellen und Tumorzellen bzw. leukämischen Blasten zu zeigen.

Für die Cold-target-inhibitor-assays wurde eine vergleichbare Versuchsanordnung angewandt. Die nichtmarkierten Zielzellen (cold targets) wurden auf einer 96-Loch-Platte verteilt und zunächst die CTL für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> dazu gegeben. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Zielzellen (hot targets) zugegeben und es erfolgte, wie oben beschrieben, eine Inkubation von 4 Stunden mit anschließender Messung.

### 2.2.5.2 Funktionstests unter Antikörperblockierung

Auch dem Funktionstest unter Antikörperblockierung wurde das oben dargestellte Versuchsschema zu Grunde gelegt. Um festzustellen, ob die Lyse HLA-Klasse I oder II abhängig ist, wurden die Zielzellen 30 Minuten vor der Testung im Zytotoxizitätsassay mit 11,5 ng/ml W6/32 oder CR3/43 Antikörper vorinkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, als Zielzellen eingesetzt.

In einigen Experimenten wurde eine Blockierung mit dem CD19-spezifischen monoklonalen Antikörper FMC-63 vorgenommen. Die Zielzellen wurden 30 Minuten vor der Testung im Zytotoxizitätsassay mit 2,5 µg/ml oder 5 µg/ml vorinkubiert und dann nach Schema getestet.

### 2.2.6 Proliferationstests

Für die Quantifizierung der antigenspezifischen Proliferation der CTL wurde der Einbau von tritiummarkiertem Thymidin (Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin) während der Inkubation mit den Zielzellen gemessen.

Die transduzierten CTL wurden in Dreifachansätzen von je  $5 \times 10^4$  Zellen pro „well“ über 72 Stunden mit unterschiedlichen, bestrahlten Effektorzellen inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte eine Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin (1 µCi pro „well“) und eine weitere Koinkubation über 16 Stunden.

Das markierte Thymidin wird dabei in die DNA der proliferierenden Zellen integriert. Im Anschluss wurden die Zellen durch ein spezielles Ansauggerät auf ein Fieberglassfilterpapier aufgenommen und die Radioaktivität in einem Betaszintillationszähler gemessen. Die Messwerte sind direkt proportional zu der im Versuchszeitraum erfolgten DNA-Synthese und damit zu der Proliferationsrate der Zellen. Die Ergebnisse wurden als counts per minute (cpm) von Dreifachansätzen gemessen.

In einigen Experimenten wurden die Koinkubationen zusätzlich auf Platten durchgeführt, die zuvor für 4 Stunden mit Anti-CD28-Antikörper (1 µg/ml) beschichtet wurden.

### 2.2.7 Langzeitexpansionsversuche

Transduzierte CTL wurden wöchentlich im Verhältnis 4 : 1 (CTL : LCL) mit bestrahlten Tumorzellen oder autologen bzw. allogenen EBV-spezifischen LCL inkubiert. Zweimal wöchentlich erfolgte eine Zugabe von IL2. Vor der Stimulation wurden die 24-Loch-Platten teilweise mit 500 µl pro „well“ CD28-spezifischem monoklonalen Antikörper in einer Endkonzentration von 1 µg/ml über 2-4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und die Platten vor Verteilung der CTL mit RPMI-Medium gewaschen. Vor der wöchentlichen Stimulation wurden alle Zellen gesammelt, gewaschen und gezählt. Dazu nahmen wir 20 µl der Gesamtzellmenge, färbten diese mit Trypanblau zu gleichen Teilen und zählten die vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

## 3 Ergebnisse

Die genannten Daten stellen eine repräsentative Auswahl mehrfach durchgeführter Versuche dar.

### 3.1 Generierung EBV-spezifischer CTL

Für die Generierung EBV-spezifischer CTL standen Blutspenden von vier verschiedenen gesunden, seropositiven Spendern (CH, CR, MK, OB) zur Verfügung.

Einem Antrag der Arbeitsgruppe von Fr. Dr. Rössig bei der zuständigen Ethikkommission wurde vor Beginn der Arbeiten stattgegeben (Reg. Nr. 1 IX Rös 1) und die Spender durch Aufklärung und Einwilligung über die Arbeiten mit den entsprechenden Blutspenden informiert.

Zunächst wurden für jeden Spender lymphoblastoide Zelllinien (LCL) hergestellt, indem aus peripherem Blut aufgereinigte Lymphozyten mit EBV-virushaltigem Überstand der Produktionszelllinie B95-8 inkubiert wurde.

Durch wiederholte Stimulationen von durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten Lymphozyten der Spender mit diesen bestrahlten autologen EBV-LCL und Expansion in Anwesenheit von Interleukin-2 wurden insgesamt sieben verschiedene EBV-spezifische T-Lymphozytenzelllinien hergestellt.

### 3.2 Transduktion der CTL mit CD19 $\zeta$

Nach 24-29 Tagen in Kultur wurden die CTL zum dritten Mal mit autologen LCL stimuliert. Am Folgetag erfolgte durch Koinkubation mit Retrovirus-haltigem Überstand der Produktionszelllinie PG13/SFG/CD19 $\zeta$  die Transduktion. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellen mit SFG/EGFP (enhanced green fluorescent protein) unter der Annahme transduziert, das die Effizienz der Transduktion mit EGFP mit der Übertragung des chimären Rezeptor-Gens proportional ist.

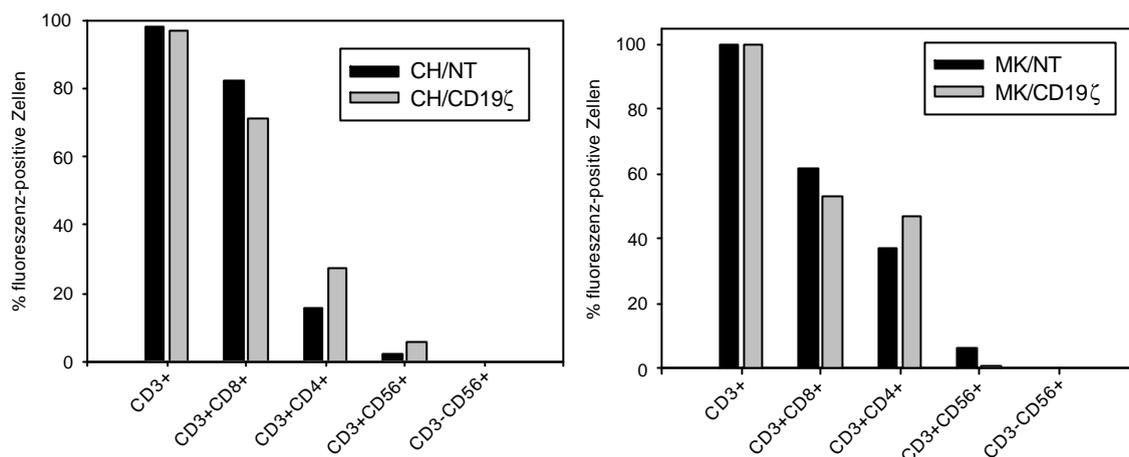
Zunächst wurde die Transduktionseffizienz indirekt mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Es wurde der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen unter den parallel zur CD19 $\zeta$ -Transduktion mit EGFP transduzierten Zellen ermittelt. Der Durchschnittswert EGFP positiver Zellen lag bei 27 %.

Im Rahmen weiterer Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Rössig wurde die Effizienz mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgewertet. Hier konnte direkt die Transduktionsrate der CD19 $\zeta$ -transduzierten Zellen gemessen werden. Die Werte der einzelnen transduzierten Linien lagen zwischen 23 und 67 %. Der Durchschnittswert lag bei 36 %. Die mit Hilfe der PCR ermittelten Transduktionseffizienzen sind also tatsächlich mit den indirekten Messdaten per Durchflusszytometrie vergleichbar.

### 3.3 Ermittlung des Phänotyps der einzelnen Zelllinien

Es sollte ermittelt werden, ob sich der Phänotyp der Zellen durch die Transduktion verändert, und ob es Unterschiede zwischen dem Phänotyp der nichttransduzierten und der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL gibt. Des weiteren sollte vor den Funktionstests überprüft werden, ob sich in den T-Zellkulturen natürliche Killerzellen befinden, die durch ihre unspezifische zytolytische Funktion die Ergebnisse verfälschen könnten.

Es konnte in gleicher Weise für die nichttransduzierten und die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL-Linien ein charakteristischer Phänotyp gezeigt werden (Abb. 1). Wie in Tab. 1 zu sehen, exprimieren annähernd 100 % der Zellen den T-Zellmarker CD3. Der überwiegende Anteil der Zellen koexprimiert CD8, den Marker zytotoxischer T-Zellen. Alle Linien enthalten darüber hinaus einen unterschiedlich hohen Anteil von T-Helferzellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), die für die Funktionsfähigkeit der zytotoxischen Zellen erforderlich sind. Der Anteil von Zellen mit NK-Phänotyp (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) lag durchweg unter 2 %.



**Abb 1:** CH/NT (nichttransduziert) und CD19 $\zeta$ -transduziert; MK/NT und CD19 $\zeta$ -transduziert  
 Nichttransduzierte und CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL wurden mit fluoreszenz-markiertem Antikörper gegen die T-Zell-Oberflächen-Antigene CD 3, CD 4, CD 8 und CD 56 inkubiert und die Oberflächenimmunfluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. Darstellung zweier repräsentativer CTL-Linien

Bei nachfolgenden Transduktionen weiterer Linien ergaben sich keine abweichenden Werte.

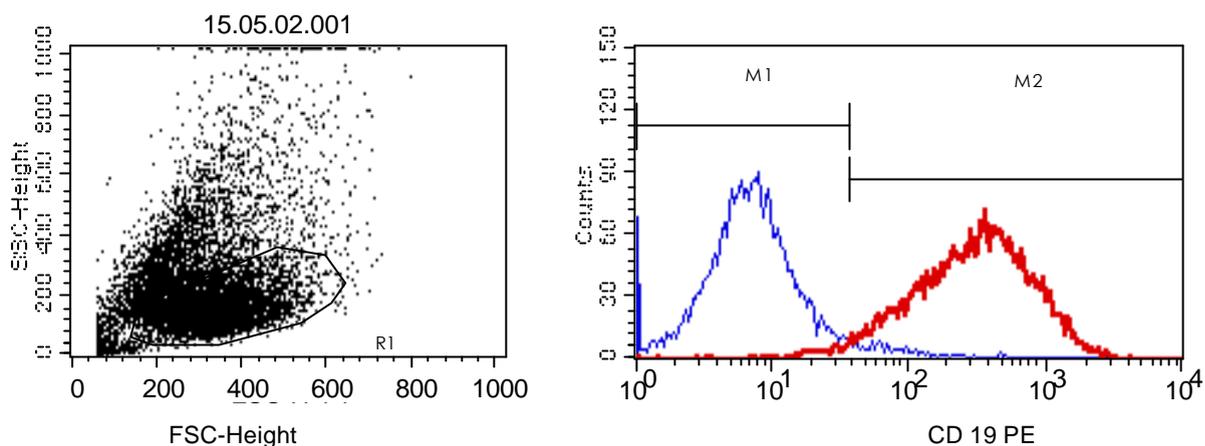
In Tabelle 1 sind die Ergebnisse aller sieben CTL-Linien zusammengefasst.

	CD19 $\zeta$		NT	
	%	Mittelwert (%)	%	Mittelwert (%)
CD3+	98-100		97-98	
CD3+, CD8+	62-99	84	82-94	86
CD3+, CD4+	1-38	14	5-15	11
CD3-CD56+	0-2		0-1	

Tab. 1. Immunphänotyp CD19 $\zeta$ -transduzierter und nicht-transduzierter (NT) CTL-Linien

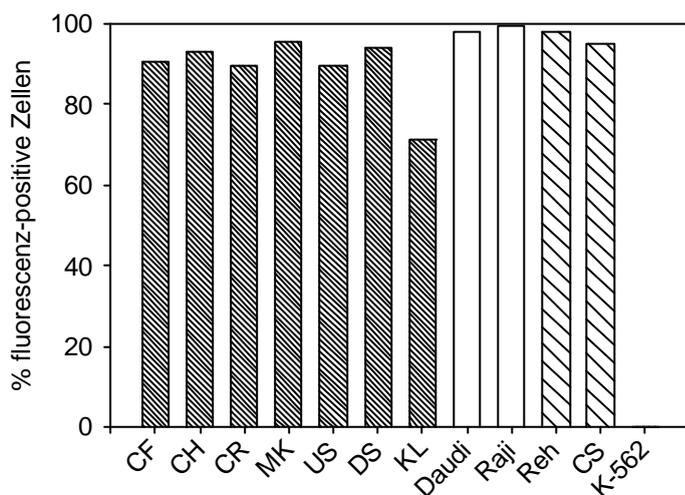
### 3.4 Darstellung der CD19-Oberflächenexpression

Voraussetzung für die Erkennung und Lyse sowohl von EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinien als auch leukämischen Blasten über den CD19 $\zeta$ -Rezeptor ist die Expression von CD19 auf der Oberfläche beider Zelltypen. Es sollte ermittelt werden, ob die Zielzelllinien CD19 in ähnlicher Ausprägung auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Färbung verschiedener LCL- und Tumorzelllinien zeigte tatsächlich vergleichbare Anteile CD19-positiver Zellen, wie in Abb. 2a und b zu sehen ist.



**Abb 2a:** Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen der CD19-Expression auf der LCL-Spenderlinie CF

Gezeigt sind die Werte der durchflusszytometrischen Messung nach Färbung mit fluoreszenzmarkiertem CD19-Antikörper. In Abb. 2b sind die Ergebnisse der Messungen aller LCL-Linien, Tumorzelllinien, leukämischer Blasten und der Negativkontrollzelllinie K 562 zusammengefasst.



**Abb 2b:** CD19-Expression auf den LCL-Linien gesunder Spender und auf den Tumorzelllinien Daudi, Reh und Raji und leukämischen Blasten eines Patienten (CS). Als Negativkontrolle K-562

### 3.5 Lyse EBV-spezifischer LCL und Tumorzellen bzw. leukämischer Blasten

Die zytotoxische Aktivität wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Test gemessen. Im gleichen Test wurden jeweils als direkter Vergleich nichttransduzierte und CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL gemessen. Um zu ermitteln, ob die Zytolyse von EBV-LCL durch die Transduktion und Expression des Rezeptors beeinflusst wird, wurden autologe und allogene EBV-LCL als Zielzellen eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die Transduktion mit dem chimären Rezeptorgen die CTL in die Lage versetzt, CD19-exprimierende Tumorzellen zu lysieren, wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Test die Funktionsfähigkeit gegenüber den CD19-exprimierenden Tumorzelllinien Reh (Zelllinie einer akuten lymphatischen Leukämie) und Raji (Zelllinie eines Burkitt Lymphoms) und teilweise gegen leukämische B-Vorläufer-Blasten eines pädiatrischen Patienten (CS) untersucht.

Es zeigte sich, dass alle Zelllinien EBV-spezifisch lysieren können. Nach Transduktion können sie darüber hinaus CD19-spezifisch lysieren.

In Tabelle 2a sind zunächst die Lyseraten der nichttransduzierten CTL aufgetragen.

<b>Übersicht der spezifischen Lyse im <math>^{51}\text{Cr}</math> -Test (in %)</b>						
Effektorzell zu Zielzell-Ratio 20 : 1						
Nichttransduzierte CTL						
CTL Linien	Auto LCL	Allo LCL	Reh	Raji	CS	K-562
CH, Line 1	63	5	12		6	-3
CH, Line 2	36	19		6		15
CH, Line 3	78	7		12	4	1
CH, Line 4	49	22	2			4
CR	60	17	8			11
MK	74	18		-1		2
OB	39	13	1			11

Tab. 2a Lyseraten der nicht-transduzierten CTL (Darstellung aller Linien)

Beim Test mit nichttransduzierten CTL zeigte sich eine durchschnittliche Lyse der autologen EBV-spezifischen LCL von  $57 \pm 16$  %. Die Hintergrundlyse allogener HLA-inkompatiblen EBV-spezifischer LCL war gering. Es zeigten sich keine signifikanten Lyseraten der CD19-positiven Zellen. Diese Ergebnisse waren in allen Experimenten reproduzierbar.

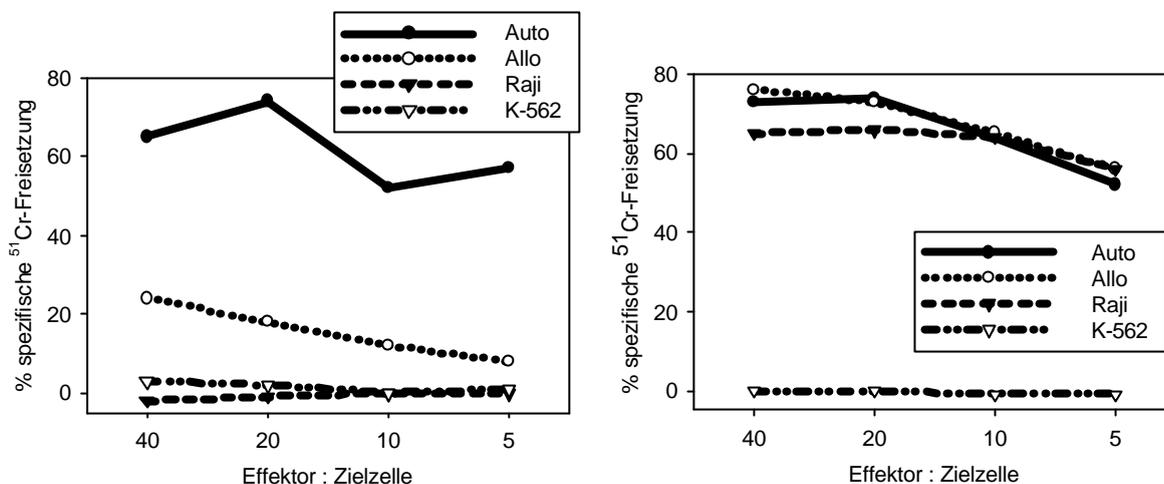
Übersicht der spezifischen Lyse im $^{51}\text{Cr}$ -Test (in %)								
Effektorzell zu Zielzell-Ratio 20 : 1								
CD19 $^{-}$ -transduzierte CTL								
CTL Linien	Transduktion s-effizienz	Tag nach Transduktion	Auto LCL	Allo LCL	Reh	Raji	CS	K- 562
CH, Line 1		52	80	46	44		30	13
CH, Line 2		9	46	48		47		23
CH, Line 3		31	53	2		47	47	1
CH, Line 4	27,0	14	29	50	38			0
CR	29,0	14	46	42	37			19
MK	66,8	47	74	73		66		0
OB	23,0	7	67	71	41			15

Tab. 2b Lyseraten der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL (Darstellung aller Linien)

Die unterschiedlichen CTL-Linien wurden bis zu 52 Tage nach ihrer Transduktion getestet. Es zeigte sich, dass alle Zielzellgruppen, sowohl die EBV-spezifischen autologen LCL, die HLA-inkompatiblen EBV-spezifischen LCL als auch die CD19-positiven leukämischen Blasten bzw. Tumorzellen von den CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL in ähnlicher Rate lysiert wurden.

Dabei zeigte die Lyse EBV-spezifischer autologer Zielzellen Werte von durchschnittlich  $56 \pm 16$  %. Die Raji- oder Reh-Zellen als Zielzellen zeigten eine Lyserate von 37-66 % (Durchschnitt 46 %). Parallel dazu ergab sich 30-47 % (Durchschnitt 39 %) Lyserate der leukämischen Blasten (CS) des pädiatrischen Patienten.

In Abb. 3 sind die Ergebnisse einer repräsentativen Linie dargestellt. Sie zeigt den Vergleich von nichttransduzierten und CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL.



**Abb 3:** MK/NT

MK CD19 $\zeta$ -transduziert

Die zytolytische Aktivität nichttransduzierter und CD19 $\zeta$ -transduzierter CTL wurde jeweils gegen  $^{51}\text{Cr}$ -beladene autologe LCL, HLA-inkompatible, allogene LCL, CD19-positive Tumorzellen (Raji) und CD19-negative Zellen (K-562) getestet. Darstellung einer repräsentativen CTL-Linie

### 3.6 Antikörperblockierungsversuche

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL sowohl mit EBV-spezifischen LCL als auch mit CD19-positiven Tumorzellen interagieren, sollte die Spezifität und MHC-Abhängigkeit der Erkennung des jeweiligen Antigens überprüft werden. Es sollte untersucht werden, ob die Lyse von inkompatiblen LCL einem der beiden Rezeptorsysteme zuzuordnen ist.

#### 3.6.1 HLA-Inhibitionstests und CD19 $\zeta$ -Inhibitionstests

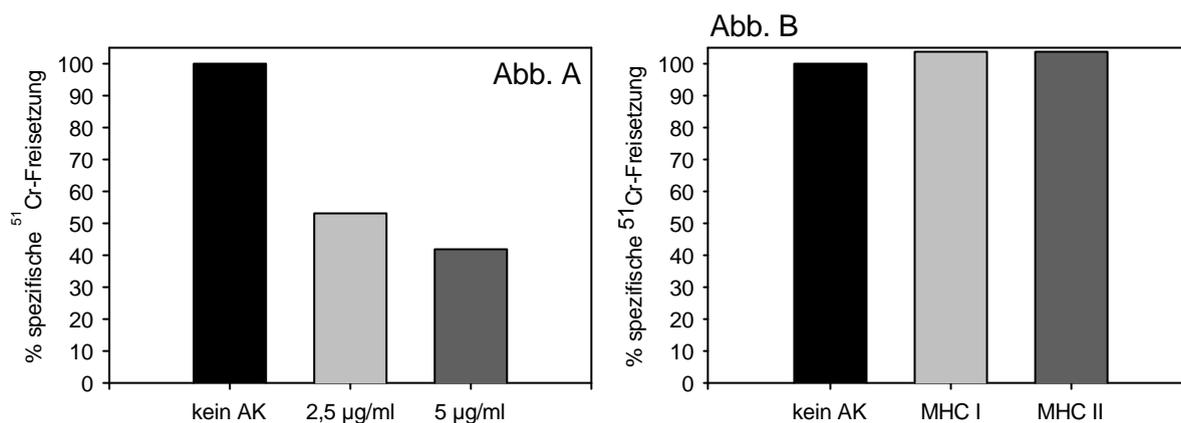
Zunächst sollte ermittelt werden, ob die Lyse von Zielzellen über den EBV-spezifischen Rezeptor MHC Klasse I abhängig, die Lyse von CD19 $\zeta$ -spezifischen Zellen über den chimären Rezeptor jedoch unabhängig vom MHC-System ist. Nach Inkubation der Zielzellen mit MHC- bzw. CD19-spezifischen Antikörpern wurde die zytotoxische Aktivität im  $^{51}\text{Cr}$ -Test gemessen.

Die Lyse von Raji-Zellen wurde sowohl durch die Blockierung der MHC-I- wie auch der MHC-Klasse II nicht beeinflusst, was zeigt, dass diese Lyse unabhängig vom MHC-

System stattfindet. Dagegen wurde die Lyse von autologen LCL durch nichttransduzierte CTL durch die Blockierung der MHC Klasse I stark gemindert.

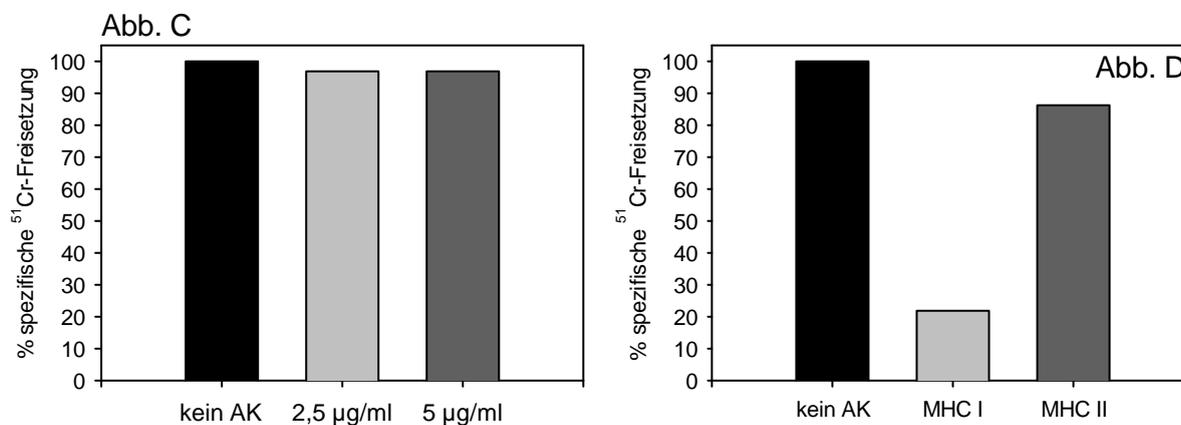
Ebenso wurden Inhibitionsversuche mit dem CD19 monoklonalen Antikörper (mAk) FMC-63 durchgeführt. Eine Präinkubation mit diesem Antikörper führte zu einer deutlich geringeren Lyse durch die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL. Es ergaben sich Werte von bis zu 66 % Inhibition.

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse eines von drei repräsentativen Experimenten.



**Abb 4**

**A + B:** Lyse von CD19-positiven Tumorzellen (Reh) durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL unter vorheriger Inkubation mit dem CD19-mAk (A) oder mit MHC-I bzw. MHC II-Antikörper (B)



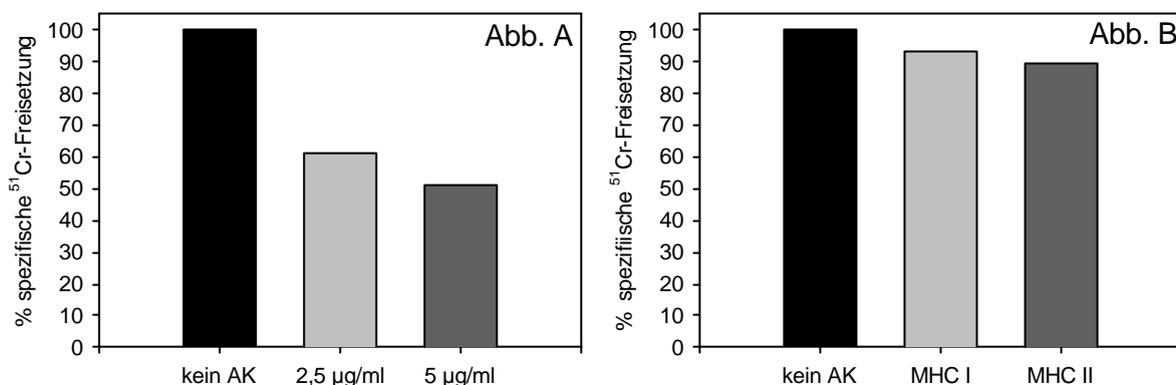
**C + D:** Lyse von autologen LCL durch nichttransduzierte CTL unter vorheriger Inkubation mit dem CD19-mAk (C) oder mit MHC-I bzw. MHC II-Antikörper (D)

Um zu ermitteln, welches der beiden Rezeptorsysteme für die Lyse allogener, MHC-mismatched LCL verantwortlich ist, wurde in weiteren Versuchen die Lyse von allogenen LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL in Anwesenheit blockierender Antikörper getestet. Durch die Blockierung des MHC-I oder II Systems wurde die Lyse der Zielzellen nicht signifikant beeinflusst. Im Gegensatz dazu kam es zu einer

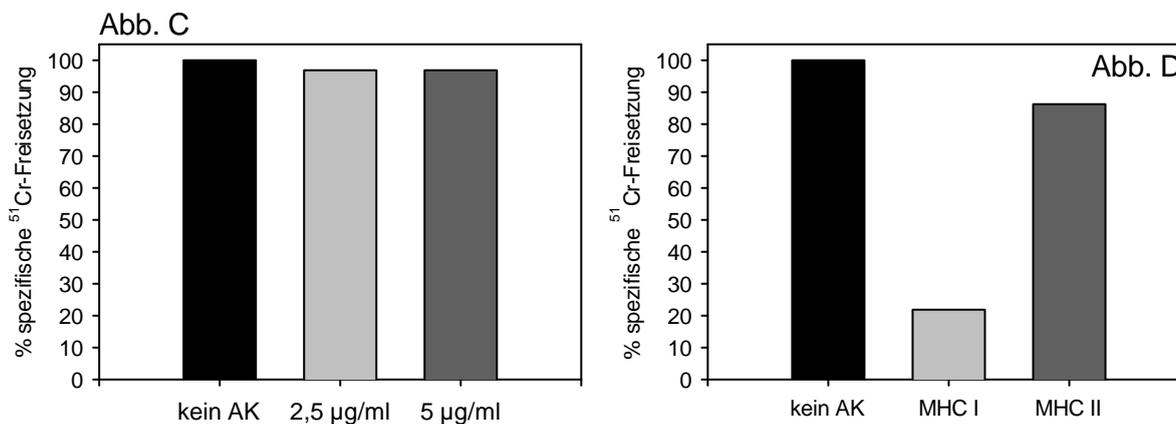
Abnahme der Lyserate um 49 % bei Vorinkubation mit dem CD19-mAK, wie in Abb. 5 zu sehen ist.

Im Gegensatz zu der in erster Linie durch das MHC I System bestimmten Lyse der autologen LCL durch nichttransduzierte CTL zeigte sich keine signifikante Blockierung der CTL Lyserate der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL in Anwesenheit des MHC I-Antikörpers. Dagegen zeigte sich eine Blockierung der Lyserate um bis zu 33 % bei der Lyse von autologen LCL in Anwesenheit des anti-CD19-Antikörpers.

Daraus ergibt sich, dass bei der Lyse von autologen LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL auch anteilig der chimäre Rezeptor beteiligt ist.



**Abb. 5**



**A + B:** Prozentuale Lyse von allogenen HLA-inkompatiblen LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL unter vorheriger Inkubation mit dem CD19-mAK (A) oder mit MHC-I bzw. MHC II-Antikörper (B)

**C + D:** Vergleichend Lyse von autologen LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL unter vorheriger Inkubation mit dem CD19-mAK (C) oder mit MHC-I bzw. MHC II-Antikörper (D)

### 3.7 Cold-target-inhibition Tests

Um die Beteiligung sowohl des nativen T-Zellrezeptors als auch des CD19 $\zeta$ -Rezeptors an der Antigenerkennung weiter zu beleuchten, wurden sogenannte Cold-target-inhibition Tests durchgeführt. Dabei wurde die Fähigkeit von nichtmarkierten autologen, HLA-inkompartiblen LCL und CD19-positiven Tumorzellen, die Lyse von markierten Zielzellen zu blockieren, analysiert. Dadurch ergaben sich Informationen über die Antigenspezifität der Zielzellyse durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL.

Die zytotoxische Aktivität wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Test gemessen. Der Versuchsablauf wurde jedoch insofern verändert, als unterschiedliche Konzentrationen von nicht  $^{51}\text{Cr}$ -beladenen Zielzellen hinzugegeben wurden. Die mit  $^{51}\text{Cr}$ -beladenen Zielzellen bezeichneten wir als „hot targets“, die unbeladenen Zielzellen als „cold targets“.

Erwartungsgemäß zeigte sich eine maximale Blockierung der Lyse von allogenen EBV-LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL nach Zugabe von kalten allogenen LCL. Durch Zugabe kalter autologer LCL sowie kalter CD19-positiver Tumorzellen wurde die Lyse allogener LCL ebenfalls deutlich gehemmt (Abb. 7).

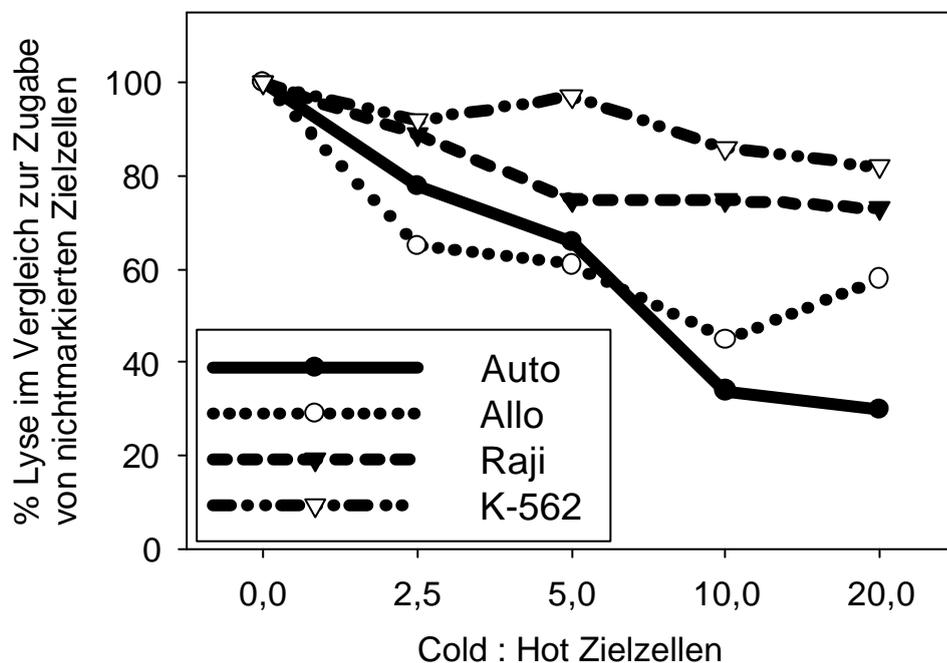
Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine unvollständige Blockierung der Lyse von autologen LCL durch CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL unter Zugabe von nichtmarkierten allogenen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Abb. 6). Nur die Zugabe von autologen LCL erbrachte eine deutliche Blockierung der Lyse der markierten autologen LCL durch die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL. Die als Kontrolle eingesetzten Zellen der CD19-negativen Linie K562 zeigten keinen Effekt auf die lytische Aktivität der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL.

Parallel wurden die Ergebnisse bei Einsatz von nichttransduzierten CTL ermittelt. Hier zeigte sich der Effekt der Blockierung bei Zugabe von nichtmarkierten autologen LCL. Die Zugabe anderer Zielzellgruppen zeigte keinen Effekt auf die Lyserate (Abb. 8).

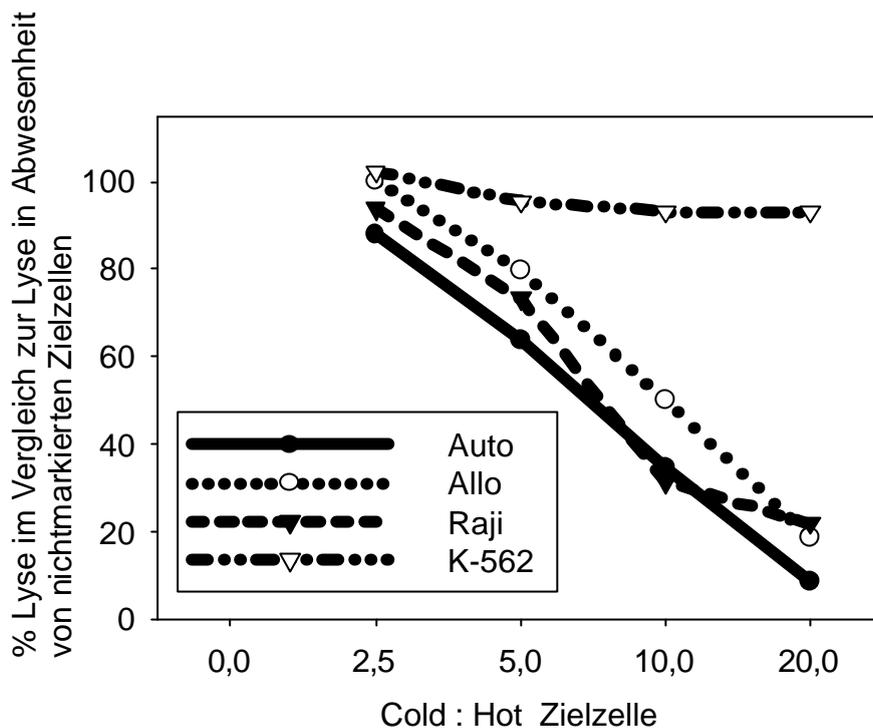
Sowohl allogene, mismatched LCL als auch CD19-positiv Tumorzellen werden also ausschließlich über den chimären Rezeptor erkannt. Der Mechanismus der Lyse autologer LCL ist abhängig davon, ob die CTL den chimären Rezeptor exprimieren

oder nicht. Während die Lyse durch nicht transduzierte LCL MHC Klasse I-abhängig erfolgt, trägt der chimäre Rezeptor deutlich zu der Lyse durch transduzierte Zellen bei. Die Blockade einer der beiden Rezeptoren kann durch den anderen zumindest teilweise ausgeglichen werden (Abb. 6).

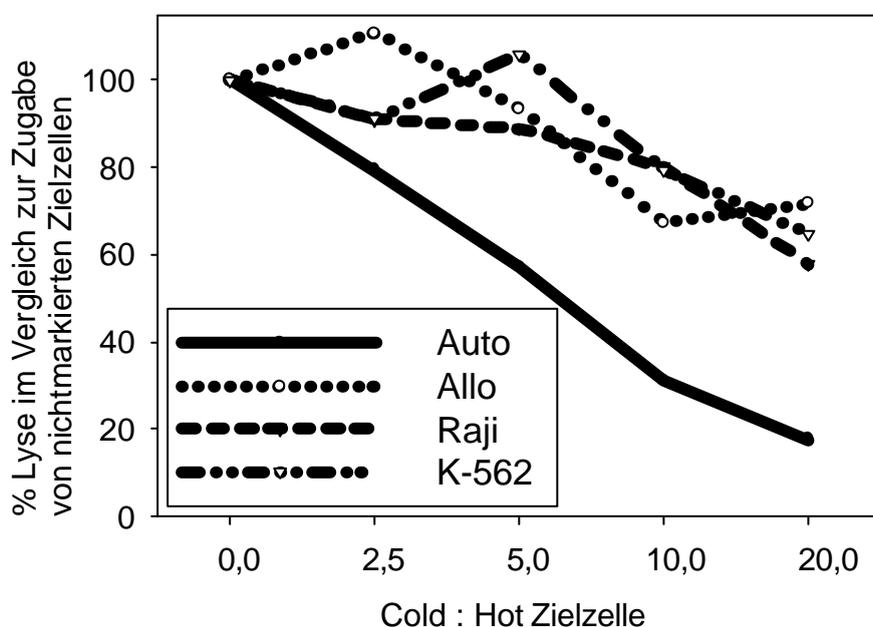
Die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL besitzen also doppelte Spezifität für EBV- und CD19-positive Tumortargets. Über beide Rezeptoren kann die jeweilige Zielzelle spezifisch erkannt werden. Die Zielzellyse als Maß für die unmittelbaren Effektorfunktionen der CTL erfolgt in vergleichbarem Ausmaß über die beiden Rezeptorsysteme.



**Abb. 6:** Cold-target-inhibition Test. CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL wurden mit unmarkierten autologen LCL (Auto), allogenen, HLA-inkompartiblen LCL (Allo), CD19-positiven Tumorzellen (Raji) und CD19-negativen Tumorzellen (K-562) in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Die zytotoxische Aktivität der CTL wurde dann gegen  $^{51}\text{Cr}$ -markierte autologe LCL mit einer Effektor zu Zielzellratio bis 20 : 1 gemessen. Darstellung eines von drei repräsentativen Experimenten



**Abb. 7:** Cold-target-inhibition Test. CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL wurden mit unmarkierten autologen LCL (Auto), allogenen, HLA-inkompartiblen LCL (Allo), CD19-positiven Tumorzellen (Raji) und CD19-negativen Tumorzellen (K-562) in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Die zytotoxische Aktivität der CTL wurde dann gegen  $^{51}\text{Cr}$ -markierte allogene LCL mit einer Effektor zu Zielzellratio bis 20 : 1 gemessen. Darstellung eines von drei repräsentativen Experimenten



**Abb. 8:** Cold-target-inhibition Test. Nichttransduzierte CTL wurden mit unmarkierten autologen LCL (Auto), allogenen, HLA-inkompartiblen LCL (Allo), CD19-positiven Tumorzellen (Raji) und CD19-negativen Tumorzellen (K-562) in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Die zytotoxische Aktivität der CTL wurde dann gegen  $^{51}\text{Cr}$ -markierte autologe LCL mit einer Effektor zu Zielzellratio bis 20 : 1 gemessen. Darstellung eines von drei repräsentativen Experimenten

### 3.8 Proliferationsexperimente

Nachdem gezeigt worden war, dass CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL sowohl CD19-positive leukämische Blasten und Tumorzellen als auch allogene LCL lysieren, wurde die Proliferationsrate der transduzierten CTL unter Stimulation mit diesen unterschiedlichen Ziellzellen verglichen. Es sollte untersucht werden, wie sich die unterschiedliche Stimulation auf die Proliferationsraten auswirkt.

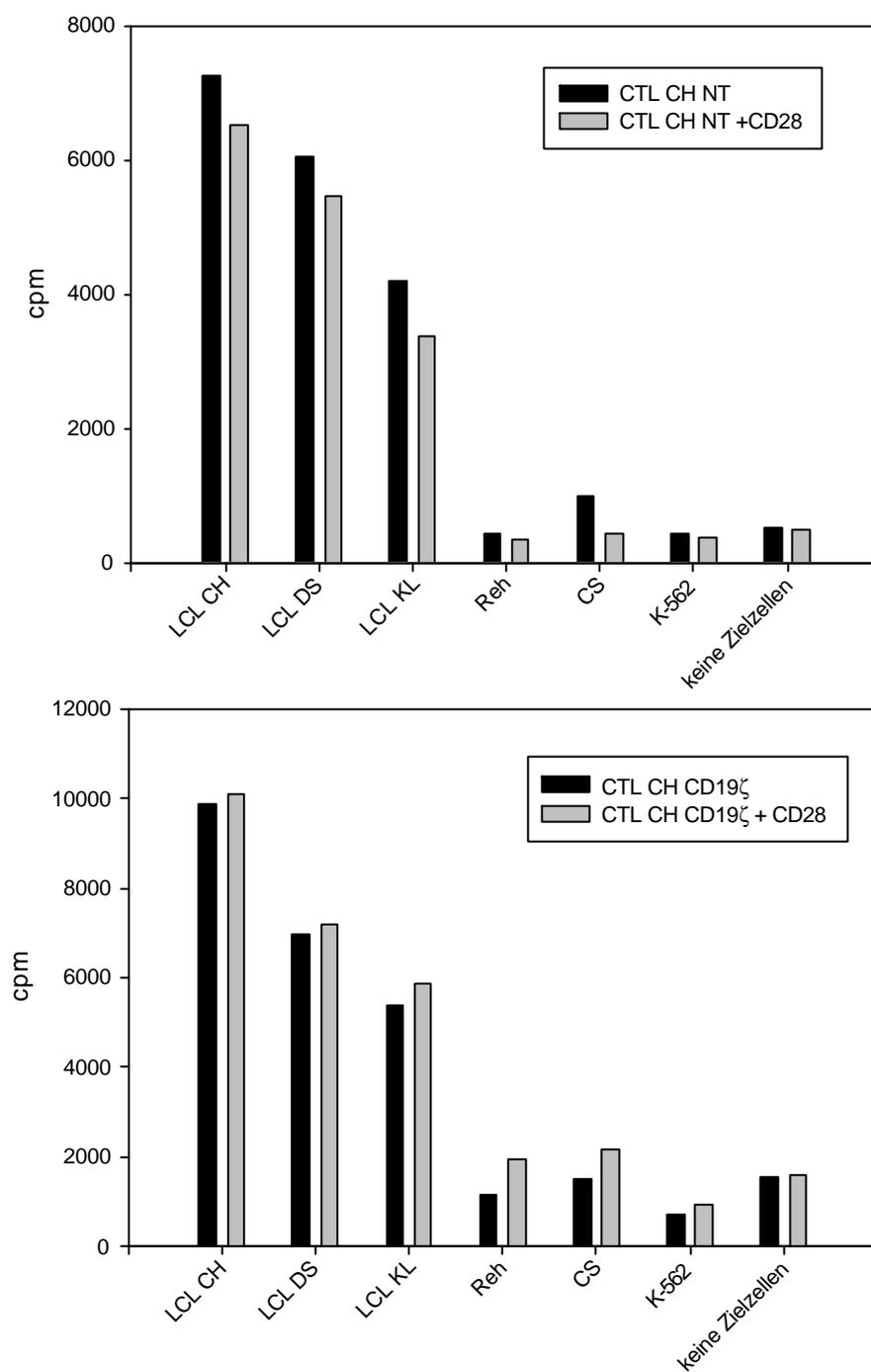
Die Proliferationsraten wurde mit Hilfe radioaktiv markierten Thymidins quantifiziert, das in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird.

Es wurden nichttransduzierte und CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL in Anwesenheit von bestrahlten autologen oder allogenen-inkompatiblen LCL, CD19-positiven Tumorzellen oder CD19-negativen Tumorzellen (K-562) unter regelmäßiger Zugabe von Interleukin-2 kultiviert. Als Kontrolle für die spontane Proliferation wurden gleichzeitig EBV-spezifische CTL allein in Anwesenheit von Interleukin-2 kultiviert.

Während durch Stimulation mit autologen LCL sowohl bei den nichttransduzierten als auch bei den CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL eine deutliche Thymidinaufnahme gezeigt werden konnte, reagierten weder die nicht-transduzierten noch die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL auf eine Stimulation durch CD19-positive Tumorzellen bzw. leukämische Blasten (Abb. 9).

Die Stimulation mit allogenen-mismatched LCL ergab bei manchen CTL-Linien eine höhere Thymidinaufnahme, als bei der Kontrolle der spontanen Proliferation der nichtstimulierten CTL gesehen wurde. Allerdings war die Proliferationsrate der CD19 $\zeta$ -transduzierten Zellen bei keinem Versuch höher als die der nichttransduzierten Zellen.

Die teilweise beobachteten Anstiege der Proliferationsrate nach Inkubation mit allogenen LCL sind also nicht auf eine Stimulation über den chimären Rezeptor zurückzuführen, sondern sind am ehesten durch eine unspezifische Interaktion bedingt.



**Abb 9:** Nichttransduzierte und CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL wurden mit bestrahlten, autologen oder HLA-inkompartiblen LCL, mit CD19-positiven Tumorzellen (Reh, CS) oder mit CD19-negativen Tumorzellen (K-562) mit einer Ratio von 1 : 4 stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch die Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Koinkubation mit CD28

Um zu untersuchen, ob die Kostimulation der transduzierten CTL durch Kreuzvernetzung des CD28-Rezeptors zu einer chimären Rezeptor-spezifischen Proliferation beitragen kann, wurde die Proliferationsrate in Anwesenheit und Abwesenheit von CD28 verglichen. Dazu wurde CD28-spezifischer Antikörper auf den Kulturplatten immobilisiert und die Proliferationsexperimente auf den Antikörperbeschichteten Platten wiederholt. Es ergaben sich keinerlei Unterschiede zu den ohne Kostimulation mit CD28 erhobenen Daten.

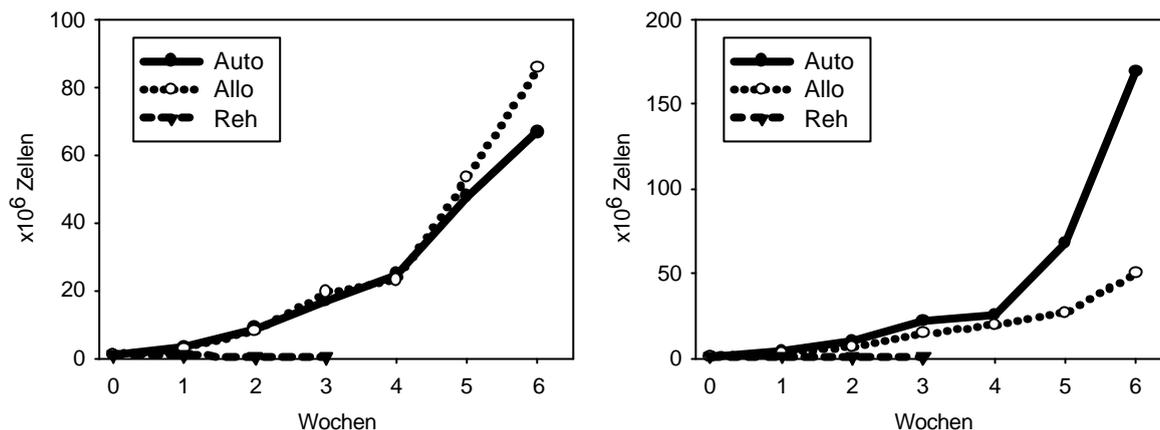
So zeigte sich in diesem System, dass der inadäquate Stimulationseffekt des chimären Rezeptors auch durch diese Form der Kostimulation mit CD28 nicht überwunden werden konnte.

### 3.9 Langzeitexpansionsversuche

Eine weitere Methode, spezifische Proliferation zu messen, ist die Untersuchung der T-Zellexpansion in vitro. Sollte es durch spezifische Stimulation mit CD19-positiven Zellen zu einer effizienten Aktivierung der CD19 $\zeta$ -transduzierten Zellen innerhalb der Gesamtpopulation kommen, ist zu erwarten, dass diese Zellen innerhalb einiger Wochen die anderen Zellen überwachsen, bis ausschließlich CD19 $\zeta$ -positive T-Zellen in der Kultur vorhanden sind. Bleibt die spezifische Proliferation aus, werden alle Zellen absterben.

Es wurde also untersucht, wie die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL unter Stimulation mit autologen oder allogenen LCL bzw. CD19-positiven Tumorzellen expandieren, und ob sich Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den mit unterschiedlichen Zelltypen stimulierten CTL ergeben.

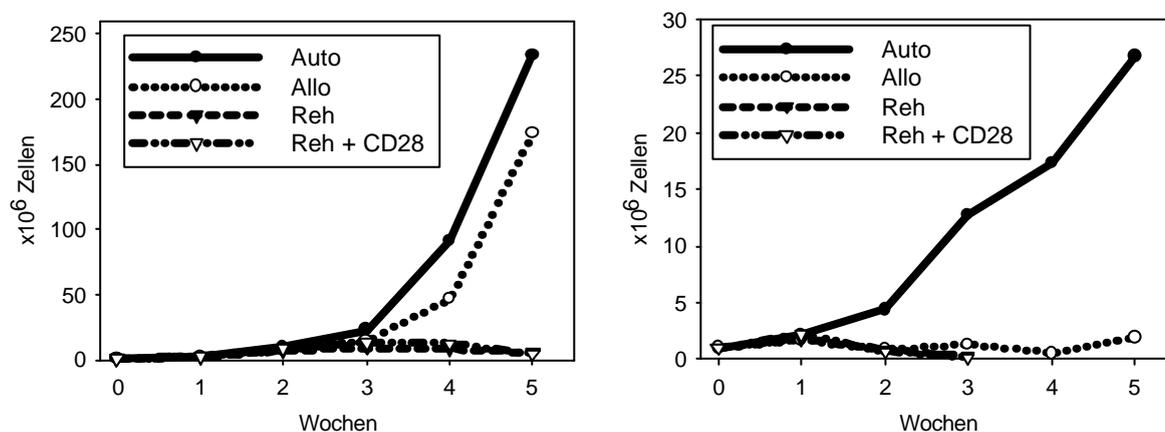
Während CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL unter Stimulation mit bestrahlten, autologen LCL in annähernd gleicher Kinetik expandierten wie nichttransduzierte CTL, konnten sowohl die nichttransduzierten als auch die CD19 $\zeta$ -transduzierten Zellen unter Stimulation mit CD19-positiven Tumorzellen nicht länger als 3-5 Wochen in Kultur gehalten werden (Abb. 10).



**Abb. 10:** Expansion einer CD19 $\zeta$ -transduzierten und nichttransduzierten CTL-Population unter Stimulation mit autologen LCL, allogenen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Reh). EBV-spezifische, CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL und nichttransduzierte CTL wurden wöchentlich mit bestrahlten autologen, EBV-spezifischen LCL, HLA-inkompartiblen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Reh) stimuliert. Die Wachstumsrate wurde wöchentlich durch Zählung der vitalen Zellen unter Anfärben mit Trypanblau ermittelt

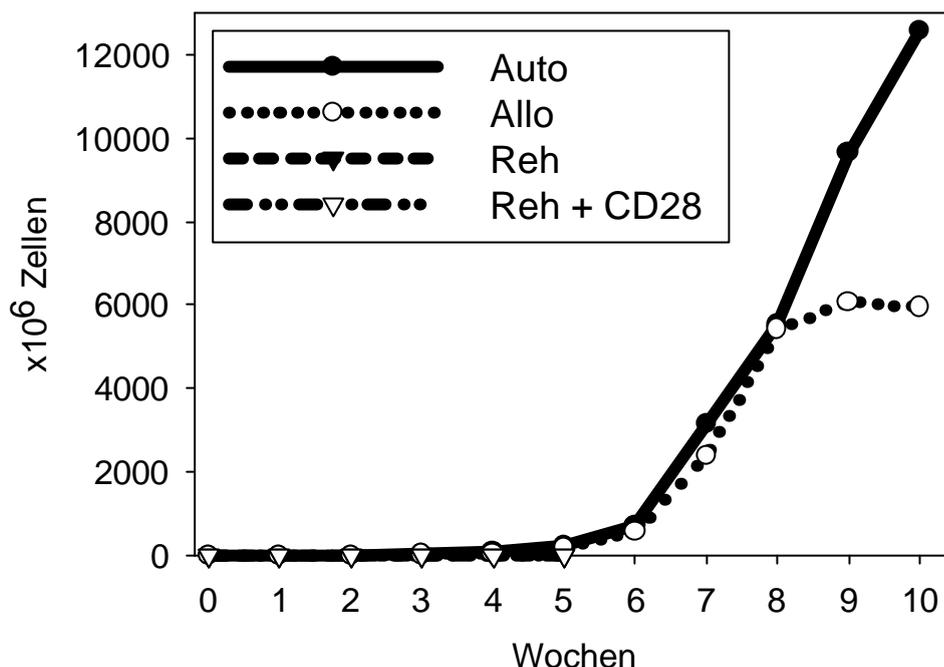
Auch bei Stimulation mit CD19-positiven Tumorzellen unter Kostimulation mit CD28-spezifischem Antikörper waren keine längeren Kultivierungszeiten möglich (Abb. 11).

Die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL, die mit HLA-inkompartiblen LCL stimuliert wurden, expandierten hingegen in ähnlicher Weise wie die CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL unter Stimulation mit autologen LCL, wie in Abb. 10, 11 und Abb. 12 zu sehen ist.



**Abb. 11:** Expansion einer CD19 $\zeta$ -transduzierten und nichttransduzierten CTL-Population unter Stimulation mit autologen LCL, allogenen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Reh). EBV-spezifische, CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL und nichttransduzierte CTL wurden wöchentlich mit bestrahlten autologen, EBV-spezifischen LCL, HLA-inkompartiblen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Reh) stimuliert. Die Stimulation mit CD19-positiven Tumorzellen (Reh) erfolgte in Anwesen- oder Abwesenheit von immobilisiertem monoklonalem CD28-Antikörper (1 $\mu$ g/ml). Die Wachstumsrate wurde wöchentlich durch Zählung der vitalen Zellen unter Anfärben mit Trypanblau ermittelt.

Die nichttransduzierten CTL zeigten unter Stimulation mit HLA-inkompartiblen LCL spenderabhängig eine mehr oder weniger ausgeprägte Hintergrundexpansion. Die Werte waren jedoch durchweg deutlich niedriger als die der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL unter gleicher Stimulation.



**Abb. 12:** Expansion einer CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL-Population unter Stimulation mit autologen LCL, allogenen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen. EBV-spezifische, CD19 $\zeta$ -transduzierte CTL wurden wöchentlich mit bestrahlten autologen, EBV-spezifischen LCL, HLA-inkompatiblen LCL oder CD19-positiven Tumorzellen (Reh) stimuliert. Die Stimulation mit CD19-positiven Tumorzellen (Reh) erfolgte in Anwesen- oder Abwesenheit von immobilisiertem monoklonalem CD28-Antikörper (1 $\mu$ g/ml). Die Wachstumsrate wurde wöchentlich durch Zählung der vitalen Zellen unter Anfärben mit Trypanblau ermittelt.

Während die Erkennung spezifischen Antigens auf Tumorzellen durch den chimären Rezeptor nicht zur Induktion von Proliferation und nachfolgender Expansion führt, kann das gleiche Antigen eine vollständige T-Zell-Aktivierung einschließlich einer Reaktion im Sinne einer Proliferation auslösen, wenn es auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle exprimiert wird.

Mittlerweile konnten diese Beobachtungen durch Untersuchungen an Einzelzellklonen CD19 $\zeta$ -transduzierter Zellen gestützt werden. In Proliferationsassays zeigte sich hier deutlich eine CD19-spezifische proliferative Antwort auf Stimulation mit allogenen, mismatched LCL. CD19-positive Tumorzellen hingegen stellen weder in An- noch in Abwesenheit von Anti-CD28-Antikörper einen Proliferationsreiz dar (Rossig et al, Manuskript eingereicht).

## 4 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit zeigt Untersuchungen zu der Funktionalität und den Eigenschaften von CD19 $\zeta$ -transduzierten EBV-spezifischen CTL. Vergleichend wurden in parallelen Ansätzen nichttransduzierte CTL der gleichen Zelllinien untersucht. Besondere Berücksichtigung bei der Versuchsanordnung fand die Rolle der Kostimulation bei der T-Zellaktivierung über den chimären Rezeptor.

Die hier vorgestellten Untersuchungen können einen Beitrag für eine therapeutische Verwendung von T-Zellen, die mit einem chimären Rezeptor ausgestattet sind, leisten.

Eine Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie mit genmodifizierten T-Zellen könnte so aussehen, dass im Anschluss an eine Knochenmarktransplantation EBV-spezifische T-Zellen des Spenders in Kultur gebracht und anschließend mit einem kombinierten Rezeptor ausgestattet werden. Die so veränderten T-Zellen, die nun die leukämischen Blasten erkennen, werden im Labor vermehrt und bei Verdacht auf minimale Resterkrankung dem Patienten zurückgegeben.

Die Generierung EBV-spezifischer CTL erfolgte nach einem Protokoll, das bereits klinische Anwendung findet und die Expansion größerer Mengen virusspezifischer T-Zellen aus dem T-Zell-Repertoire des peripheren Blutes ermöglicht (Rooney 1998, Heslop 1997).

Entscheidend für die erfolgreiche Expression des chimären Rezeptors in den T-Zellen ist ein effizienter Gentransfer. Für die genetische Modifizierung der T-Zellen wurde ein retrovirales Gentransfersystem verwendet, das die Transduktion eines hohen Anteils aktivierter T-Lymphozyten ermöglicht (Rossig 2001). Mit dieser Methode wurden Transduktionsraten von 23-67 % erreicht. Eine Positivselektion transduzierter Zellen ist bei dieser hohen Transduktionseffizienz nicht erforderlich. Für eine spätere klinische Anwendung der Strategie ist das von Vorteil, da eine Positivselektion die Koexpression selektierbarer Markergene erfordert, die hochimmunogen sind und in aller Regel eine immunvermittelte Beseitigung der modifizierten T-Lymphozyten in vivo nach sich ziehen. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Transduktion mit CD19 $\zeta$  nicht zu einer Veränderung des Immunphänotyps der CTL-Linien führt.

Unter Berücksichtigung der klinischen Anwendbarkeit ist der Aspekt der Sicherheit von besonderer Bedeutung. Eine schwere unerwünschte Nebenwirkung retroviralen Gentransfers wurde kürzlich in einer klinischen Gentherapie-Studie der X-chromosomalen Form der schweren kombinierten Immundefizienz (X-SCID) beobachtet (Baum 2003). In Folge eines oder mehrerer Ereignisse insertieller Mutagenese in den transduzierten hämatopoetischen Stammzellen kam es zur malignen Entartung lymphatischer Zellen mit Entwicklung einer Leukämie. Die genetische Modifizierung reifer T-Lymphozyten mit chimären Rezeptoren birgt ein deutlich geringeres theoretisches Risiko, da die Zellen im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen bereits terminal ausdifferenziert sind und darüber hinaus, wie hier gezeigt, ihren Proliferationsreiz nicht über den retroviral kodierten, sondern den nativen Rezeptor erhalten und somit kein Selektionsvorteil für die genetisch manipulierten Zellen besteht. In bisherigen klinischen Studien mit retroviral transduzierten reifen T-Zellen sind keine Fälle sekundärer Leukämie aufgetreten. Erst der klinische Einsatz der CD19 $\zeta$ -CTL wird jedoch Klarheit über mögliche Nebenwirkungen und Risiken dieser Strategie erbringen.

Das Oberflächenmolekül CD19 scheint unter therapeutischen Gesichtspunkten eine geeignete Zielstruktur für die Verwendung chimärer T-Zell-Rezeptoren zu sein. So wird das Protein CD19 in der Regel nicht von den Zellen sezerniert und in die Umgebung abgegeben (Uckun 1988). Die Ausgangspopulation der B-Vorläufer-ALL ist durch Oberflächenexpression von CD19 gekennzeichnet (Hotfilder 2002). Von immunphänotypischen Veränderungen der Blastenpopulation, die im Verlauf der Erkrankung und im Rezidiv häufig zu beobachten sind, ist CD19 nur in den seltensten Fällen betroffen (Guglielmi 1997). Die immunvermittelte Zerstörung des CD19-positiven gesunden B-Zellkompartiments aufgrund der fehlenden Tumorspezifität von CD19 lässt eine nur transiente und milde Beeinträchtigung des humoralen Immunsystems erwarten, da weder Plasmazellen und zirkulierende Immunglobuline noch die Stammzellen der B-Zell-Linie angegriffen werden (Fearon 2000). Sollte die Zerstörung CD19-positiver B-Zellen und ihrer Vorläufer dennoch einen humoralen Immundefekt zur Folge haben, kann dieser durch Substitution von Immunglobulinen behoben werden. So bietet die Generierung großer Mengen CD19-spezifischer T-

Effektorzellen durch genetisches Engineering die Möglichkeit, durch therapeutischen Immuntransfer nach allogener Knochenmarktransplantation die minimale Resterkrankung effizient zu behandeln.

Zusätzliche klinische Gesichtspunkte ergeben sich durch die Verwendung Epstein-Barr-Virus-spezifischer CTL als Effektorzellen der Leukämie-spezifischen Immunität. Wie bereits erläutert, haben in vivo-Studien mit transgenen Mäusen gezeigt, dass chimäre Rezeptoren nur eine geringe Signalgebung zur Verfügung haben, die nur dann eine Aktivierung ruhender T-Zellen in Gang setzen kann, wenn diese über ihren nativen Rezeptor vorstimuliert wurden (Brocker 1995; Brocker 2000). Dieser Erkenntnis wird somit insofern Rechnung getragen, als die transduzierten Zellen in vivo im Rahmen einer Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus in infizierten antigenpräsentierenden B-Zellen wiederholt über den nativen Rezeptor aktiviert werden.

Ein weiterer entscheidender Aspekt liegt darin, dass der adoptive Transfer von genetisch modifizierten EBV-spezifischen CTL eine sinnvolle Strategie sein könnte, um einem weiteren Problem zu begegnen: Wie bereits erwähnt, werden vom Stammzellspender generierte spezifische zytotoxische T-Zellen mit großem Erfolg zur Prophylaxe und Therapie der EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung eingesetzt (Khanna 2000, Bollard 2001, Rooney 1995, Heslop 1997, Rooney 1998). Unbehandelt geht diese Erkrankung mit einer hohen Letalität einher. Durch Transfusion CD19 $\zeta$ -transduzierter EBV-CTL würde bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation zusätzlich zur antitumoralen auch eine antivirale Immunität erreicht. Das Resultat wäre die Prävention sowohl einer EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung als auch eines Leukämie rezidivs.

Eine Schlüsselfrage im Bezug auf die Anwendung von mit chimären Rezeptoren ausgestatteten T-Zellen für eine erfolgreiche Immuntherapie ist, ob die Signalgebung durch den chimären Rezeptor ein Signal von ausreichender Stärke und Qualität darstellt, um eine adaptive Immunantwort in den CD19 $\zeta$ -transduzierten Zellen zu erreichen. Die optimale Konstellation wäre erreicht, wenn die Bindung von chimären Rezeptoren an Tumorzellen eine sofortige effektive Antwort hervorrufen und anschließend in eine T-Zellgedächtnisfunktion und lebenslange Antitumorimmunität münden würde.

Verschiedene unabhängige *in vitro* Studien stimmen darüber überein, dass mit chimären Rezeptoren ausgestattete und durch diese stimulierte T-Zellen ihre Zielzellen effektiv lysieren und eine antigen-spezifisch Zytokine freisetzen können (Hwu 1995; Wang 1998; McGuinness 1999). Ob eine suffiziente T-Zellproliferation über den Weg des chimären Rezeptors der genmodifizierten T-Zellen möglich ist, wird andererseits von vielen Arbeitsgruppen angezweifelt (Eshhar 2001; Hombach 2001; Maher 2002; Brocker 2000, Rossig 2000, Rossig 2001). Die eingeschränkte Möglichkeit der Signalübertragung über den chimären T-Zellrezeptor zur Einleitung einer klonalen Proliferation wurde in ersten klinischen Studien gesehen (Mitsuyasu 2000). Selbst bei optimaler Persistenz der Zellen im peripheren Blut und unverminderter Oberflächenexpression des chimären Rezeptors über viele Wochen war die Fähigkeit zur Zielzellyse und Zytokinsekretion nach adoptivem Transfer verloren (Deeks 2002; Walker 2000).

Im Gegensatz zu der T-Zell-Aktivierung über den natürlichen T-Zell-Rezeptorkomplex sind die Mechanismen der Antigenerkennung und Signalweiterleitung über chimäre Rezeptoren bisher wenig untersucht.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell EBV-spezifischer CTL, die zusätzlich adoptive Spezifität für das B-Zell-Antigen CD19 besitzen, bietet die Möglichkeit zu untersuchen, wie die bekannten funktionellen Defizite der Stimulation genmodifizierter T-Lymphozyten über chimäre Rezeptoren überbrückt werden können. CD19 wird sowohl auf Tumorzellen des B-Zellsystems, wie leukämischen Blasten und Burkitt-Lymphomzellen, als auch auf EBV-infizierten B-Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu Tumorzellen sind B-Zellen potente antigenpräsentierende Zellen, die eine suffiziente Kostimulation bieten, um eine vollständige und anhaltende Immunreaktion hervorzurufen. Die Expression eines CD19-spezifischen Rezeptors in EBV-spezifischen CTL erlaubt daher einen Vergleich der Rezeptorfunktionalität unter dem Aspekt fehlender bzw. ausreichend vorhandener Kostimulation.

Als grundlegender Parameter der Funktionalität wurde die Zytolyse von EBV- und Tumorzielzellen durch transduzierte und nichttransduzierte CTL untersucht. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurden alle Experimente mit CTL-Linien

unterschiedlicher Spender mehrfach reproduziert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die CD19 $\zeta$ -transduzierten EBV-spezifischen CTL Linien über ihren nativen Rezeptor sehr effektiv EBV-infizierte Zielzellen lysieren. Mit vergleichbarer Effizienz lysieren sie CD19-positive Zielzellen über ihren chimären Rezeptor. Die Lyserate von CD19-negativen Zellen als Hintergrund war sehr gering. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten der Leiterin der Arbeitsgruppe Frau Dr. Rössig, die die funktionelle Expression eines chimären Rezeptors spezifisch für das Tumorgangliosid GD2 auf Epstein-Barr-Virus-spezifischen CTL gezeigt hat (Rössig 2002).

Blockierungsversuche und Cold-Target-Inhibition-Tests haben gezeigt, dass die Lyse von allogenen HLA-inkompatiblen LCL und leukämischen Blasten bzw. Tumorzellen über den chimären Rezeptor allein stattfindet. Bei der Lyse von autologen EBV-spezifischen LCL kommt die Erkennung sowohl über die Peptide im Rahmen des MHC-Systems als auch über die Expression von CD19 auf der Zelloberfläche zustande, so dass sowohl der native als auch der chimäre T-Zellrezeptor an der Zielzellyse beteiligt sind. Mit diesen Experimenten konnte die Validität des vorgestellten Modells bestätigt werden.

Die vollständige Aktivierung nativer T-Zellen erfordert zwei unabhängige Signale. Zusätzlich zu Signal 1, das in Folge der Bindung von Peptid/MHC an den T-Zellrezeptor entsteht, wird durch die Interaktion kostimulatorischer Moleküle wie CD28 mit ihren Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle ein zweites Signal vermittelt (Coyle 2001). Von professionellen antigenpräsentierenden Zellen werden physiologische, kostimulatorische Signale angeboten. Da die Tumorzellen einen Mangel an kostimulatorischen Molekülen aufweisen, erhalten T-Lymphozyten, die mit einem chimären Rezeptor ausgestattet sind, bei Bindung an das Zielantigen dieses Rezeptors in der Regel keine kostimulatorischen Signale. Dieser Mangel an Kostimulation könnte entscheidend an der funktionellen und permanenten Inaktivierung der Zellen nach adoptivem Transfer in vivo beteiligt sein.

Um die Rolle des zweiten Signals, das durch Bindung kostimulatorischer Moleküle an deren Rezeptoren auf der T-Zelle ausgelöst wird, für die T-Zell-Aktivierung über chimäre Rezeptoren zu klären, wurde in dem bestehenden Modellsystem ein funktioneller Vergleich der T-Zellaktivierung als Antwort auf die unterschiedlichen zellulären Interaktionen durchgeführt (Abb. 2, Einleitung).

Zunächst wurde die Fähigkeit der unterschiedlichen Zielzellen, die T-Zellen zur Proliferation und Expansion anzuregen, untersucht. In Übereinstimmung mit Versuchen mit chimären Rezeptoren, die ein Gangliosidantigen auf Neuroblastomzellen erkennen (Rössig 2002), zeigten die Ergebnisse, dass CD19-spezifische EBV-CTL durch Stimulation des chimären Rezeptors mit Tumorzellen bzw. leukämischen Blasten nicht zur Proliferation angeregt werden konnten und unter dieser Stimulation allein nur maximal 3-5 Wochen in Kultur zu halten waren. Durch Stimulation des chimären Rezeptors mit HLA-inkompatiblen EBV-spezifischen LCL konnte zunächst ebenfalls keine deutliche Proliferation erreicht werden.

In diesem Kontext gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei den verwendeten CTL um eine unsortierte transduzierte Zellpopulation handelt. Je nach Transduktionseffizienz der einzelnen Zelllinien war ein Anteil von bis zu über 50 % nichttransduzierter Zellen in der Zellpopulation vorhanden. Eine effektivere Proliferationsreaktion durch die transduzierten Zellen innerhalb der Mischpopulation könnte eventuell verdeckt worden sein, da die Mehrzahl der Zellen in Kultur durch Fehlen des chimären Rezeptors nicht auf den spezifischen Proliferationsreiz ansprechen konnte.

Mittlerweile sind in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Rössig Untersuchungen an CD19 $\zeta$ -positiven Einzelzellklonen der transduzierten CTL durchgeführt worden. Hier zeigte sich, im Gegensatz zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit den Mischkulturen, nach Stimulation des chimären Rezeptors durch HLA-inkompatible EBV-spezifische LCL eine ähnlich hohe Proliferationsrate der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL, wie sie auch durch Stimulation ihres nativen Rezeptors durch autologe LCL zu erreichen war. Die Stimulation mit Tumorzellen führte auch bei den Klonen zu keiner signifikanten T-Zell-Proliferation (Rossig et al., Manuskript eingereicht).

In Expansionsexperimenten konnte auch unter Verwendung von Mischkulturen gezeigt werden, dass die Stimulation des chimären Rezeptors in Anwesenheit allogener EBV-spezifischer HLA-inkompatibler LCL, jedoch nicht in Anwesenheit von Tumorzellen, zu einer proliferativen Antwort der transduzierten T-Zellen führt. So erbrachten wiederholte Stimulationen mit bestrahlten HLA-inkompatiblen EBV-spezifischen LCL eine selektive Anreicherung von CD19 $\zeta$ -exprimierenden CTL innerhalb der Kulturen der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL. Die Expansion der CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL, die mit HLA-inkompatiblen EBV-spezifischen LCL stimuliert wurden, war vergleichbar mit der Expansion von nichttransduzierten oder CD19 $\zeta$ -transduzierten CTL, die über ihren nativen Rezeptor stimuliert worden waren. Somit zeigt sich durch diese Daten, dass die Stimulation des chimären T-Zellrezeptors durch ein spezifisches Zielzellantigen, das auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle dargeboten wird, eine vollständige T-Zell-Aktivierung auslöst, die quantitativ und qualitativ ungleich besser ist als die Antwort auf das identische Antigen auf einer Tumorzelle.

Das bisher am besten beschriebene kostimulatorische Signal wird durch den CD28-Rezeptor nach Ligation durch einen seiner Liganden B7-1 oder B7-2 ausgelöst (Lenschow 1996). B7/CD28 spielt eine entscheidende Rolle bei der klonalen Expansion von nativen T-Zellen (Lenschow 1996). Basierend auf der Tatsache, dass sowohl CD28 als auch CD3 $\zeta$  gemeinsam als Signalgeber in einem chimären Immunrezeptor genutzt werden können (Finney 1998), wurden modifizierte chimäre Rezeptoren erstellt, die darauf abzielen, kostimulatorische Signale gemeinsam mit dem Signal des chimären Rezeptors an die Effektorzelle zu senden (Krause 1998; Finney 1998; Geiger 2001; Hombach 2001; Eshhar 2001; Maher 2002). Die Induktion von Zytokinsekretion und T-Zellproliferation unter Vermittlung von chimären Rezeptoren konnte durch Integration CD28-vermittelter kostimulatorischer Signale in die zytoplasmatische Domäne des chimären Rezeptors deutlich gesteigert werden (Daniel 1998; Hombach 2001; Beecham 2000). CD28 kann also zur Effizienz der T-Zellaktivierung durch den chimären Rezeptor beitragen.

In dem hier beschriebenen System konnte jedoch das Defizit des chimären Rezeptor in der Induktion von proliferativer Aktivität oder Expansionsrate nicht durch eine zusätzliche Kostimulation mit CD28 allein ausgeglichen werden. Ähnliche Daten wurden schon früher gezeigt. In Studien mit transgenen Mäusen war das durch den

chimären Rezeptor eingeleitete Signal nicht ausreichend, um eine Aktivierung ruhender T-Zellen unter Kostimulation von CD28 als zusätzlichem Antikörper zu erreichen (Brocker 1995).

Ein Erklärungsansatz für die ausbleibende Unterstützung der T-Zell-Stimulation durch CD28 in der vorliegenden Arbeit ist die Art der Darbietung des kostimulatorischen Reizes. Anti-CD28-Antikörper wurde auf dem Boden der Kulturgefäße immobilisiert, um eine Kreuzvernetzung des CD28-Rezeptors auf den T-Zellen parallel zu der Signalweiterleitung über den chimären Rezeptor zu erreichen. Es konnte also nur eine externe Kostimulation außerhalb des Rezeptorsystems stattfinden. Durch eine Integration wäre vielleicht ein synergistisches Zusammenwirken der Komponenten möglich. Daraus ergibt sich als weitere Möglichkeit der kostimulatorischen Unterstützung zur Aktivierung von Effektorzellen, die Kostimulation nicht außerhalb des chimären Rezeptors, sondern in direktem Zusammenhang stattfinden zu lassen. Durch gekoppelten Gentransfer des chimären Rezeptors und möglicherweise notwendigen kostimulatorischen Antigenanteilen ist eventuell eine suffizientere Art der kostimulatorischen Unterstützung möglich.

Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise, dass weitere Rezeptor-Ligandenpaare qualitativ unterschiedliche Formen von T-Zellkostimulation beitragen. Viele dieser Moleküle werden auf aktivierten und auch EBV-infizierten B-Zellen exprimiert. Zu diesen Molekülen gehören weitere Mitglieder der B7 Familie (Coyle 2001), OX-40L (Godfrey 1994), humaner 41-BBL (Wen 2002) sowie die Adhäsionsmoleküle CD58 und CD59. Diese Moleküle und ihre Rezeptoren haben ergänzende Aufgaben bei der Aktivierung und Erhaltung der antigen-spezifischen zellulären Immunantwort. Auch die primäre Expansion von Peptid-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, die Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion und die Verlängerung der Lebensdauer von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind Wirkungsbereiche dieser Moleküle und ihrer Rezeptoren.

Auf der Grundlage der Komplexität von T-Zellstimulation und Kostimulation ist anzunehmen, dass eine Integration weiterer Moleküle und Signale für eine optimale Effektivität notwendig ist. Die Substitution von CD28-vermittelten Signalen allein, ist

wahrscheinlich nicht ausreichend. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell wird durch Verwendung EBV-spezifischer lymphoblastischer Zellen als Zielzellen des chimären Rezeptors eine große Vielfalt an bekannten und unbekanntem kostimulatorischen Molekülen bereitgestellt. In dieser Kombination scheint eine sehr effektive Kostimulation zu erfolgen, die eine dem nativen Rezeptor vergleichbare Aktivierung über den chimären Rezeptor ermöglicht. Der relative Beitrag jedes einzelnen Moleküls zu der Immunantwort, die durch chimäre Rezeptoren induziert wird, wird noch weiter untersucht werden, aber die Möglichkeiten der Kombination verschiedener Moleküle erscheint ungleich effizienter als der Nutzen von CD28 allein.

## 5 Literaturverzeichnis

Abken H., et al. 2002: Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol.* 23: 240-245

Bader, P., et al. 1999: Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia*; 13:2079-2086

Bärsch, G., et al. 1999: Expression of AC133 and CD117 on candidate normal stem cell populations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 107:572-580

Baum, Ch., et al. 2003: Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*; 101: 2099-2114

Beecham E.J., et al. 2000: Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules : the dynamics of T-cell proliferation and death. *J.Immunother.* 23:631:642

Bollard CM, et al. 2001: Long term follow-up of patients who received EBV specific CTLs for the prevention or treatment of EBV lymphoma [abstract]. *Blood*;96:2057

Brenner H., et al. 2001: Long-term survival of children with leukemia achieved by the end of the sec. mill. *Cancer*, Vol. 92, 7:1977-1983

Brocker T, et al. 1995: Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med.*181:1653-1659

Brocker T. et al. 2000: Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*; 96:1999-2001

Cardoso, A. et al. 1999: Adoptive T-cell therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia: preclinical studies. *Blood*; 94: 3531-3540

Cochlovius, B., et al. 2000: Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 x CD19 diabody and T cells. *J.Immunol.* 165:888-895

Coyle A.J., et al. 2001: The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulation of T cell function. *Nat.Immunol.* 2:203-209

Daniel P. T., et al. 1998: Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* 92:4750-4757

Deeks S.G., et al. 2002: A Phase II Randomized Study of HIV-specific T-cell Gene Therapy in Subjects with Undetectable Plasma Viremia on Combination Antiretroviral Therapy. *Mol.Ther.* 5:788-797

Dolstra, H., et al. 1999: A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J.Exp.Med.*; 189:301-308

Eshhar Z., et al. 2001: Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J.Immunol.Methods* 248:67-76

Eshhar, Z., et al. 1993: Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:720-724

Fearon, D. T. and M. C. Carroll. 2000: Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu.Rev.Immunol.* 18:393-422

Finney H.M., et al. 1998: Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J.Immunol.* 161:2791-2797

Geiger T.L., et al. 2001: Integrated src kinase and costimulatory activity enhances signal transduction through single-chain chimeric receptors in T lymphocytes. *Blood* 98:2364-2371

Godfrey W.R., et al. 1994: Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 180:757-762

Grossbard M. L., et al. 1993: Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non- Hodgkin's lymphoma. *Blood* 81:2263-2271

Guglielmi, C., et al. 1997: Immunophenotype of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: changes at first relapse and clinico-prognostic implications. *Leukemia*; 11:1501-1507

Hanenberg H., et al. 1996: Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* 2:876-882

Hekman A., et al. 1991: Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti- CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol.Immunother.* 32:364-372

Heslop H.E., et al. 1997: Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative diseases. *Immunol.Rev.* Vol. 157: 217-222

Hombach A., et al. 2001: Tumor-specific t cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J.Immunol.* 167:6123-6131

Hombach A., et al. 2001: T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Res.* 61:1976-1982

Hotfilder M., et al. 2002: Immature CD34+CD19- progenitor/stem cells in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia are genetically and functionally normal. *Blood* 100: 640-646

Hwu, P., et al. 1995: In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res.* 55:3369-3373

Khanna, R., et al. 2000: Role of cytotoxic T Lymphocytes in Epstein-Barr Virus-associated diseases. *Annu.Rev.Microbiol.* 54:19-48

- Kipriyanov S. M., et al. 1998: Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int.J.Cancer* 77:763-772
- Krause A., et al. 1998: Antigen-dependent CD28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:619-626
- Lenschow D.J., et al. 1996: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev. Immunol.* 14:233:258
- Loffler, A., et al. 2000: A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95:2098-2103
- Maher J., et al. 2002: Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat.Biotechnol.* 20:70-75
- Manzke O., et al. 1999: CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 bivalent antibodies enhance T- cell reactivity against autologous leukemic cells in pediatric B-ALL bone marrow. *Int.J.Cancer* 80:715-722
- McGuinness R.P., et al. 1999: Anti-Tumor Activity of Human T Cells Expressing the CC49- $\zeta$  Chimeric Immune Receptor. *Hum.Gen.Ther.*; 10: 165-173
- Mitsuyasu R.T., et al. 2000: Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 $\zeta$  gene-modified autologous CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96: 785-793
- Montagna, D., et al. 1998: Does the emergence and persistence of donor-derived leukaemia-reactive cytotoxic T lymphocytes protect patients given an allogeneic BMT from recurrence? Results of a preliminary study. *Bone Marrow Transplant.*; 22:743-750
- Rooney CM, et al. 1995: Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein- Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*, 345:9-13

Rooney CM, et al. 1998: Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*;92:1549-1555

Rossig C, et al. 2001: Targeting of neuroblastoma tumor cells by human T lymphocytes engineered to express GD<sub>2</sub>-specific chimeric T cell receptor genes. *Int J Cancer* 94:228-36

Rossig C, et al. 2000: Use of EBV-specific human T lymphocytes transduced with GD<sub>2</sub>-specific chimeric T cell receptor genes for tumor targeting. *Blood*; 96:26a

Rossig C., et al. 2002: Epstein-Bar virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T cell receptors: Potential for improved immunotherapy. *Blood* 99:2009-16

Schrapppe M., et al. 2000: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95:3310-3322

Smith L.J., et al. 1987: In vitro transformation of human B-cell follicular lymphoma cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res.* 47:2062-2066

Uckun, F. M., et al. 1988: Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti- CD19 immunotoxins. *Blood* 71:13-29

Uckun F. M., et al. 1999: Treatment of therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia with an apoptosis-inducing CD19-directed tyrosine kinase inhibitor. *Clin.Cancer Res.* 5:3906-3913

Vlasveld L. T., et al. 1995: Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with continuous infusion of low-dose recombinant interleukin-2 in combination with the B-cell- specific monoclonal antibody CLB-CD19. *Cancer Immunol.Immunother.* 40:37-47

Vormoor J., et al. 1998: Flow cytometric identification of candidate normal stem cell populations in CD45-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J Haematol.* 100:501-508

Walker R.E., et al. 2000: Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 467-474

Wang G., et al. 1998: A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc-gamma chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen. *Nat.Med.* 4:168-172

Wen. T., et al. 2002: 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production and the development of cytolytic effector function. *J.Immunol.* 168:4897-4906

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Jürgens und Herrn Priv. Doz. Dr. med. J. Vormoor für das Ermöglichen und die Überlassung des Dissertationsthemas und die Betreuung meiner Arbeit.

Frau Dr. C. Rössig als Leiterin der Laborgemeinschaft, danke ich sehr herzlich für die konsequente, aufmerksame Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Pscherer für meine Einarbeitung in den Laboralltag.

Allen MitarbeiterInnen der Laborgemeinschaft möchte ich für die freundliche, offene Arbeitsatmosphäre danken.

Den SpenderInnen des Arbeitsmaterials danke ich für ihre freigiebige Unterstützung.