

**Aus dem Institut für  
Transfusionsmedizin und Immunhämatologie  
des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. E. Seifried**

**Etablierung eines GMP-konformen Zellkultur- und Expansionsprotokolls zur  
Vorbereitung einer klinischen Phase I Studie einer adoptiven Immuntherapie  
maligner Erkrankungen mit der natürlichen Killerzelllinie (NK-92)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Julia-Alexandra Adams  
aus München

Frankfurt am Main, 2004

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. med. E. Seifried
Koreferent:	Prof. Dr. med. K. Strebhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18.05.2005

Meiner Großmutter  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Die Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung von Krebszellen	2
1.3	Herkunft, Wirkung und Rezeptoren der NK-Zellen	5
1.4	Bisherige klinische Studien zur Effektivität von NK-Zellen bei malignen Erkrankungen	8
1.4.1	Autologe NK-Zell-Therapie	8
1.4.2	Adoptive Immuntherapie unter Verwendung allogener NK-Zellen	10
1.5	Ursprung der NK-92-Zellen	11
1.5.1	Kultivierung der NK-92-Zellen	13
1.5.2	Vergleich zwischen NK-92-Zellen und A-NK-Zellen	13
1.5.3	Indikationen für die NK-92-Therapie	14
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1	Chemikalien	18
3.2	Geräte	18
3.3	Allgemeine Materialien	19
3.4	Zelllinien	20
3.5	Medien für die Zellkulturen und Kit	20
3.6	Oberflächenantikörper / monoklonale Antikörper	21
3.6.1	Beschreibung der verwendeten monoklonalen Antikörper	22
3.7	Kultivierung der Effektor- und Zielzellen	24
3.7.1	NK-92-Zellen	24
3.7.2	K562-Zellen	25

3.8	Allgemeine Prinzipien der verwendeten Methoden	26
3.8.1	Funktionsprinzip des Durchflußzytometers	26
	3.8.1.1 Lichtstreuung	26
	3.8.1.2 Darstellung der Meßdaten	27
3.8.2	Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenrezeptoren	28
3.8.3	Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-92-Zellen	28
3.8.4	Zellzählung mittels Casy®	29
3.8.5	Expansion von NK-92-Zellen im Wannenstapel	30
3.8.6	Kryokonservierung der NK-92-Zellen	30
3.8.7	Bestrahlung der NK-92-Zellen	31
3.8.8	Untersuchung des Einflusses der Übernachtlagerung auf 4 °C auf die zytotoxische Aktivität von NK-92-Zellen	31
3.9	Durchführung der Versuche	32
3.9.1	Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometer	32
3.9.2	Durchflußzytometrische Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-92-Zellen	33
	3.9.2.1 Vorbereitung der Ziel- und Effektor Zellen	33
	3.9.2.2 Durchflußzytometrische Analyse	34
3.9.3	Zellzählung mittels Casy®	35
3.9.4	Expansion von NK-92-Zellen im Wannenstapel	35
3.9.5	Vorbereitung der NK-92-Zellen zur Kryokonservierung	36
3.9.6	Kryokonservierung und Bestrahlung von NK-92-Zellen	37
3.9.7	Vorbereitung der NK-92-Zellen zur Untersuchung des Einflusses einer Übernacht-Lagerung bei 4 °C	38
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1	Expansion von NK-92 im klinischen Maßstab	40
	4.1.1 Untersuchung des Einflusses der Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab auf die zytotoxische Funktion	42
4.2	Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab	43

4.2.1	Untersuchung des Einflusses von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die zytotoxische Aktivität von NK-92-Zellen	43
4.2.2	Einfluß der unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen auf die Expressionsdichte von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren (CD11a, 25, 28, 54, 56, 122 und FAS-Ligand)	44
4.2.3	Untersuchungen zur Viabilität von geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration und einer vorherigen Bestrahlung mit 10Gy in Ampullen	45
4.2.4	Untersuchung des Einflusses der DMSO-Konzentration und der Bestrahlung auf die Viabilität von im klinischen Maßstab geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen	46
4.2.5	Einfluß einer Übernacht-Lagerung bei 4 °C auf die zytolytische Aktivität von NK-92-Zellen	51
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1	Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab	53
5.1.1	Zusammensetzung des Zellkulturmediums	53
5.1.2	Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab	54
5.2	Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung von NK-92-Zellen	56
5.2.1	Einfluß von DMSO auf die Zytotoxizität von NK-92-Zellen	56
5.2.2	Einfluß verschiedener DMSO-Konzentrationen auf die Expression von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren	57
5.2.3	Viabilität von geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration und einer vorherigen Bestrahlung mit 10 Gy in Ampullen	58
5.2.4	Einfluß der DMSO-Konzentration und der Bestrahlung auf die Viabilität von im klinischen Maßstab eingefrorenen NK-92-Zellen	59

5.3	Konzept einer Expansion und Herstellung von NK-92-Zellen unter Berücksichtigung der erzielten Gewinne	60
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIT	Adaptive Immuntherapie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
A-NK	Aktivierte Natürliche Killerzellen
APC	Antigen präsentierende Zelle
C	cells
CASY	Cell Counter and Analyser System
CD	Cluster Determinants
CMV	Cytomegalie Virus
CO <sub>2</sub>	Chemisches Zeichen für Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulphoxid
E/T	Verhältnis von Effektor- zu Target- Zellen
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fab- Fragment	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanner
Fc- Fragment	Fragment crystalline
Fitc	Fluoreszein-Isothiozyanat
g	Gramm
GFP	Gefrorenes Frischplasma
GMP	Good Manufacture Practice
GVHD	Graft versus Host Disease
GVL- Effekt	Graft versus Leukemia Effekt
Gy	Gray
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HI- GFP	hitzeinaktiviertes gefrorenes Frischplasma

HIV	Human immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSA	Humanes Serum-Albumin
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobuline der Klasse Gammaglobuline
IL-2	Interleukin-2
KAR	Killing aktivierender Rezeptor
KI	Klasse
KIR	Killing inhibierender Rezeptor
L	Liter
LAK- Zellen	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LGL	Grosse (large) granuläre Lymphozyten
μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
μl	Mikroliter
m	Milli ( $10^{-3}$ )
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
s.	siehe
SAP	Standard Acid Puffer
SCID	Severe combined immunodeficiency
Tab.	Tabelle
U	Units

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist eine Organisation von Zellen und Molekülen, das eine spezialisierte Rolle in der körpereigenen Infektabwehr spielt. Man unterscheidet zwei prinzipiell verschiedene Arten von Immunantworten, die des angeborenen Immunsystems und die des erworbenen Immunsystems (Delves P.J. et al., 2000).

Das angeborene Immunsystem bedarf keiner vorherigen Aktivierung, d.h. es ist bereits bei einem ersten Kontakt mit Mikroorganismen und bösartig entarteten Zellen aktiv. Es stellt somit einen sofortigen Schutz gegen Viren, Bakterien oder andere „Eindringlinge“ dar. Es umfasst einerseits Zellen, die darauf spezialisiert sind, Mikroorganismen durch Phagozytose aufzunehmen und zu zersetzen, wie z.B. Makrophagen (phagozytierende Zellen), andererseits aus Zellen, die ihre immunologische Wirkung durch Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe, wie Interleukine, entfalten. Zu den phagozytierenden Zellen zählt man Monozyten, Makrophagen und neutrophile Leukozyten, während basophile und eosinophile Leukozyten sowie Mastzellen in erster Linie entzündungsfördernde Botenstoffe freisetzen. Natürliche Killerzellen (NK) werden ebenfalls zum angeborenen Immunsystem gezählt. NK-Zellen können virusinfizierte und bösartig (maligne) entartete Zellen direkt angreifen und diese durch das ihnen eigene Enzymsystem zerstören (lysieren) (Bennett M., 1987; Burkowski J.F. et al., 1985).

Das adaptive (erworbene) Immunsystem ist im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem „lernfähig“. Es umfasst die Proliferation von antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten, die nach Kontakt dieser Immunzellen mit einem Antigen erfolgt. Damit die B- und T-Lymphozyten das betreffende Antigen erkennen und auf dieses reagieren, bedarf es jedoch einer vorherigen Sensibilisierung durch sog. Antigen-präsentierende Zellen (APC's). APC's, zu denen Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen gezählt werden, phagozytieren körperfremde Mikroorganismen und Proteine und präsentieren deren Bestandteile dann an T- und B-Lymphozyten (Delves P.J. et al., 2000; Pardoll D.M., 1998). Diese werden dadurch für spezifische Antigene des abzuwehrenden Mikroorganismus sensibilisiert. Während B-

Lymphozyten daraufhin Antikörper zur Abwehr extrazellulärer Mikroorganismen ausbilden, können T-Lymphozyten einerseits infizierte, körpereigene oder körperfremde Zellen direkt ausschalten (T-Killerzellen), oder sie unterstützen B-Zellen bei der Ausbildung einer antikörper-basierten Immunantwort. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem vermögen es die Komponenten des erworbenen Immunsystems bei einem erneuten Aufeinandertreffen mit dem gleichen Mikroorganismus, eine zweite Immunantwort wesentlich schneller und stärker ausprägen als es bei einem ersten Kontakt der Fall war (Delves P.J. et al., 2000). Beide Komponenten des Immunsystems arbeiten bei der Bekämpfung und Abwehr von Pathogenen eng zusammen (Delves P.J. et al., 2000)

## **1.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung von Krebszellen**

Nicht nur bei der Bekämpfung von Mikroorganismen (Delves P.J., 2000) wie Pilzen, Viren und Bakterien, spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle, sondern auch bei der Ausschaltung und Beseitigung von bösartig entarteten Zellen (maligne Zellen) (Greenberg P.D., 1991; Schreiber H. et al., 1988; Greenberg P.D. et al., 1981; Rosenberg S.A. et al., 1986; Shimizu K. and Mackiewicz A., 1979). Insbesondere der zellulären Immunantwort scheint bei der Abwehr von Krebszellen eine entscheidende Rolle zuzukommen (Greenberg P.D., 1991; Schreiber H. et al., 1988; Greenberg P.D. et al., 1981; Rosenberg S.A. et al., 1986; Shimizu K. and Mackiewicz A., 1979).

Es gibt zwei verschiedene Arten von Immunzellen, die in der Lage sind "ungewollte" virusinfizierte oder entartete Zellen zu zerstören. Hierzu werden die natürlichen Killerzellen und die T-Killerzellen (zytotoxische T-Zelle) gezählt. Während natürliche Killerzellen (NK-Zellen) nach dem heutigen Kenntnisstand zu einer ungerichteten, zytotoxisch vermittelten Abwehr von Krebszellen beitragen (Chiorean E.G. et al., 2001) und als Bestandteil des angeborenen Immunsystems die erste Welle der körpereigenen Immunabwehr gegen Krebszellen darstellen, bedarf es nach dem heutigen Verständnis zur Aktivierung von T-Killerzellen als Komponente des erworbenen Immunsystems einer vorherigen Sensibilisierung gegen spezifische „Tumorantigene“. Als Tumorantigene werden solche Oberflächenbestandteile,

welche eine Krebszelle von einer gesunden Zelle unterscheiden, bezeichnet (Nawrocki S. and Mackiewicz A., 1999; Shiku H. et al., 1976). Während ein Zusammenwirken der Bestandteile des zellulären und antikörpervermittelten (humoralen) Immunsystems normalerweise entartete Zellen sicher ausschalten (Greenberg P.D., 1991; Schreiber H. et al., 1988; Greenberg P.D. et al., 1981; Rosenberg S.A. et al., 1986; Shimizu K., Shen F.W., 1979) und so die Entstehung einer Krebserkrankung verhindern können, konnten bei Patienten, die eine Krebserkrankung entwickelt haben, die bösartig veränderten Zellen offenbar dem körpereigenen Immunsystem entkommen und sich ungehindert im Gewebe ansiedeln und vermehren (Staveley-O´Carroll et al., 1998; Pardoll D.M., 1998).

Es gibt unterschiedlichste Gründe, die man in einem solchen Fall für das Versagen der körpereigenen Immunantwort verantwortlich machen kann. Eine entscheidende Rolle spielt insbesondere die Tatsache, dass Krebszellen körpereigene Zellen sind, die sich per se nur wenig von gesunden Zellen unterscheiden. Krebszellen sind für das Immunsystem so wesentlich schwieriger zu erkennen als „körperfremde“ Mikroorganismen (Nawrocki S. and Mackiewicz A., 1999).

Neben der Schwierigkeit für das Immunsystem, entartete Zellen unter den gesunden Körperzellen zu identifizieren, kann auch eine verminderte Funktionsfähigkeit des Immunsystems das Ausbrechen einer Krebserkrankung ermöglichen. Dieses ist z.B. bei einer nachlassenden Immunkompetenz im hohen Alter (Becker N. and Wahrendorf J., 1998) oder bei Erkrankungen unter Mitbeteiligung des Immunsystems, wie der erworbenen Immunschwäche (AIDS), der Fall (Rosen F.S. et al., 1995; Ullum H. et al., 1995; Whiteside T.L., 1998).

Als weitere Komponente einer mangelnden Effektivität des Immunsystems bei Krebserkrankungen sieht man heute die „Fähigkeit“ von Tumorzellen, einer körpereigenen Immunantwort zu entkommen. Hierbei entstehen z.B. zufällig Krebszellen, welche den komplexen Regulationsmechanismen des Immunsystems durch unterschiedlichste Mechanismen entgehen können. Solche Mechanismen, die es den Tumorzellen erlauben, der körpereigenen Immunantwort zu entkommen, werden als „Tumor-Escape Mechanismen“ bezeichnet. Diese Mechanismen setzen an unterschiedlichsten Komponenten der Immunregulation an (s. Tab. 1). So können sie einerseits die Ursache für eine verminderte Bindung von immunologischen

Effektorzellen an Tumorzellen andererseits ursächlich für die mangelnde Erkennung der Tumorantigene sein. Außerdem können diese Mechanismen zu einer Herunterregulierung von kostimulatorischen Molekülen, welche für eine Ausbildung einer T-Zellantwort unabdingbar sind, führen.

In jüngster Zeit wurde auch erkannt, dass Tumorzellen nicht nur in der Lage sind, sich „passiv“ der Immunantwort zu entziehen, sondern dass sie auch „aktiv“ gegen zytotoxische Immunzellen, wie T-Zellen und NK-Zellen, vorgehen können, indem sie diese Zellen gezielt ausschalten. Hierbei binden sie spezielle Rezeptoren (FAS-FASL), wodurch ein geregelter Zelltod (Apoptose) der Immunzellen induziert wird (Strand S. et al., 1996; Hahne M. et al., 1996).

Tab. 1 : Tumor Escape-Mechanismen ( ↑↑↑ = vermehrte Expression auf der Zelloberfläche, ↓↓↓ =verminderte Expression auf der Zelloberfläche)

<b>Mechanismus</b>	<b>Effekt</b>	<b>Referenz</b>
MHC KI I auf Tumorzelloberfläche ↓↓↓	Keine Erkennung durch T-Zellen	Hui K. et al.,1984; Wallich R. et al.,1985
Expression von MHC KL I ↑↑↑	Inhibition von NK-Zellen	Raulet D., 2001
Fehlende Antigenität	Keine Erkennung durch T-Zellen	Restifo N.P., 1993
Kostimulierende Moleküle ↓↓↓	Keine Aktivierung von T-Zellen	Han P. et al., 2002
Adhäsions- Moleküle ↓↓↓	Verhinderte Bindung durch zytotoxische Killerzellen	Gregory C.D. et al., 1988
Fas- Rezeptor ↓↓↓	Keine Apoptose durch T-Zellen	Galle P.R. et al., 1995
Fas Ligand ↑↑↑	Tumor " counterattack" = Apoptose der zytotoxischen Killerzelle	Stand S. et al., 1996; Hahne M. et al., 1996
Geschwächtes Immunsystem des Wirtes	Verminderte Wirkung von T-, NK-und APC-Zellen	Heslop H.E., 1994; Ghosh P. et al., 1995

### 1.3 Herkunft, Wirkung und Rezeptoren der NK- Zellen

Die NK-Zellen stellen eine Untergruppe von Lymphozyten dar und machen ca.10-15% der zirkulierenden Lymphozyten aus. Morphologisch erscheinen sie als große granuläre Lymphozyten (LGL) (Gong J.H. et al, 1994; Timonen T. et al., 1981).

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und werden in diesem Zusammenhang auch als „erste Welle“ der Immunabwehr bezeichnet, da sie sofort und ohne eine vorherige Sensibilisierung gegen virus-infizierte und maligne entartete Zellen vorgehen können (Nawrocki S. and Mackiewicz A., 1999). NK-Zellen sind hierbei in der Lage, virusinfizierte und tumorös veränderte Zellen zu erkennen und zu zerstören (Biron C.A. et al., 1997).

Um diese Aufgabe erfüllen zu können, ist die NK-Zelle mit einer Vielzahl von kleinen Granula ausgestattet, aus denen bei Kontakt mit der Zielzelle die lytischen Enzyme Granzym B und Perforin ausgeschüttet werden. Beide Enzyme führen zu einer raschen enzymatischen Verdauung der Zelle auf die sie „abgefeuert“ werden (Delves P.J. et al., 2000; Janeway C.A. et al., 1997).

Zusätzlich kann die Wirkung der NK-Zellen noch durch Einbindung von Bestandteilen der humoralen Immunabwehr verstärkt werden. Die “Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC)” von NK-Zellen ist besonders effektiv, da es hier zu einer Antikörpervermittelten Bindung der NK-Zellen an die zu eliminierende Zielzelle kommt (Delves P.J. et al., 2000; Gong J.H. et al., 1994). Eine Bindung von Effektorzelle (NK-Zelle) und Zielzelle (z.B. virusinfizierte Zelle oder Krebszelle) ist Voraussetzung für die Ausbildung einer lytischen Aktivität der NK-Zelle und führt letztlich zu einer Zerstörung der Zielzelle. Auf Seiten der NK-Zelle bindet der Antikörper mit seinem Fc-Teil an den entsprechenden Fc-Rezeptoren, während der spezifische (Fab)<sub>2</sub> Teil des Antikörpers antigene Strukturen auf der Zielzelle bindet (Janeway C.A. et al., 1997).

Während die Aktivität von T-Killerzellen immer gegen bestimmte Antigene gerichtet ist, gegen die zuvor eine Sensibilisierung durch spezialisierte APC's, wie Makrophagen und Dendriten, stattgefunden hat, bedarf es zur Ausbildung einer NK-Zell-Aktivität keiner vorherigen Sensibilisierung (Robertson M.J. and Ritz J., 1990).

Dennoch ist die Aktivität der NK-Zellen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren reguliert (Yokoyama W.M. et al., 1993; Moretta A. et al., 1996; Lanier L.L., 1998). Eine solche Regulation ist notwendig, um eine "überschießende" Aktivität der NK-Zellen gegen gesundes, körpereigenes Gewebe zu verhindern (Sivori S. et al., 1997; Pessino A. et al., 1998; Pende D. et al., 1999). Und dennoch können die NK-Zellen sofort und rigoros gegen entartete Zellen vorgehen (Nawrocki S. and Mackiewicz A., 1999). Einen wesentlichen Beitrag in dieser Regulation der NK-Zellaktivität haben die „Killer Immunglobulin-like Rezeptoren (KIR's)“, welche sich aus der Gruppe der aktivierenden (KAR's) und inhibierenden (KIR's) zusammensetzen (Delves P.J. et al., 2000).

Während die natürlichen Liganden der aktivierenden NK-Zellrezeptoren bisher nicht bekannt sind, vermitteln Humane Leukozyten Antigene (HLA's) durch Bindung von KIR's eine Inhibition der NK-Zellaktivität (Raulet D., 2001). Die Bindung eines passenden, körpereigenen HLA-Antigens an den entsprechenden inhibitorischen NK-Zellrezeptor kann eine bereits stattgefundenen Aktivierung der NK-Zelle „überstimmen“ und die Ausschüttung der zytotoxischen Enzyme Granzyme und Perforin verhindern (Delves P.J. et al., 2000).

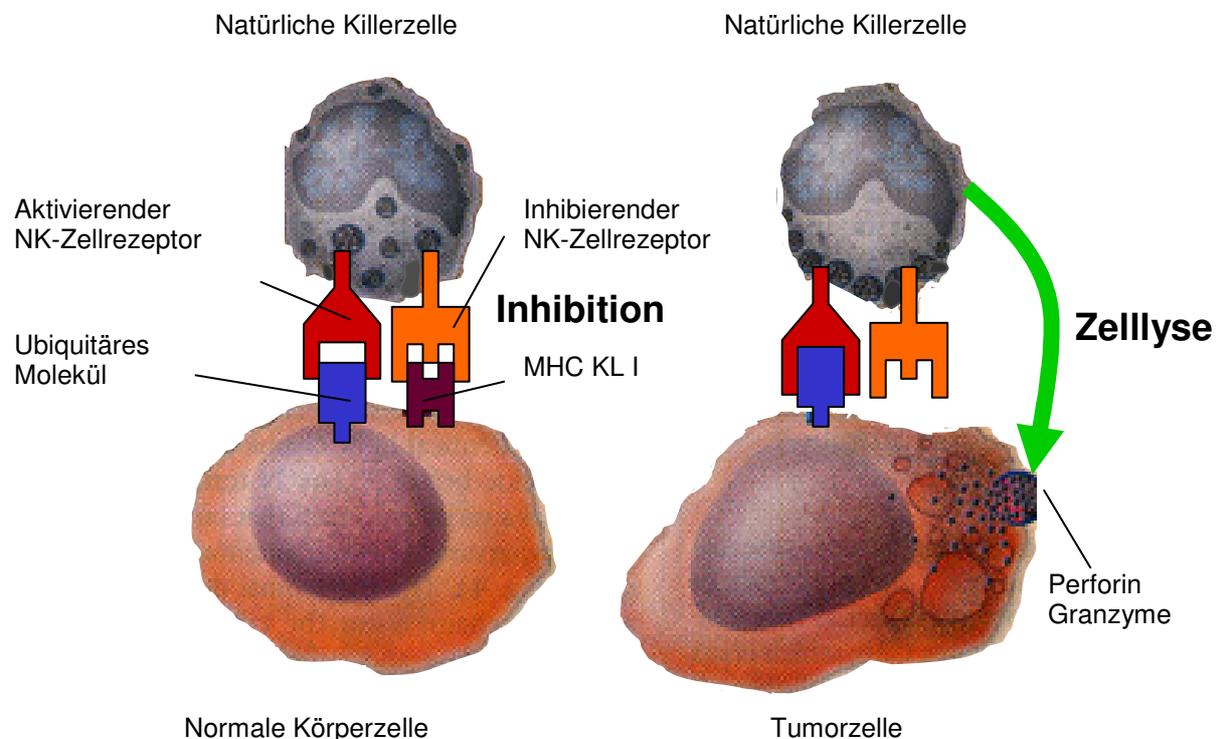


Abb.1: Lysemechanismus der NK-Zellen (N Engl J vom 6. Juli 2000, S. 41)

Die Gewebemerkmale des HLA Klasse I Komplexes sind normalerweise jeder Zelle eines Organismus zu eigen. Zudem hält das sehr polymorphe NK-Zellrezeptor Repertoire des Menschen auf jeder NK-Zelle einen passenden Rezeptor für das individuelle HLA Klasse I Antigen bereit, um eine Erkennung von „Selbst“ zu gewährleisten (Moretta L. et al., 1996).

Kommt es jedoch zu einem Verlust der Expression der Gewebemerkmale, wie dies z.B. auf der Zelloberfläche von virusinfizierten Zellen und maligne entarteten Zellen der Fall sein kann, kann es zu einer ungehinderten Ausprägung der lytischen NK-Zellaktivität gegen infizierte und entartete Zellen kommen (Delves P.J. et al., 2000). Durch die Fähigkeit, auch diese Zielzellen erkennen und ausschalten zu können, welche kein HLA KI I auf ihrer Oberfläche exprimieren, ergänzen NK-Zellen in idealer Weise zytotoxische T-Killerzellen, die nur solche Zellen erkennen, die ein spezifisches "Tumorantigen" im Kontext des individuellen MHC KI I Rezeptors auf ihrer Oberfläche tragen (Delves P.J. et al., 2000; Nawrocki et al., 1999; Shiku H. et al., 1976).

Trotz der unterschiedlichen Regulation von T-Killerzellen und NK-Zellen lässt sich nicht immer eine so scharfe Trennung beider Zellpopulationen durchführen. NK-Zellen und T-Zellen entwickeln sich aus einem gemeinsamen Knochenmarksvorläufer (Lanier L. et al., 1992; Rodewald H.R., 1992). Die NK-Zellen eines Menschen sind keine in sich homogene Zellpopulation. Es stellte sich heraus, dass es unterschiedliche Populationen von NK-Zellen gibt, die sich in der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren stark unterscheiden. Einige dieser NK-Zellen weisen sogar Merkmale von T-Killerzellen auf. Eine solche Mischpopulation stellen die NKT-Zellen dar. Dieser Zelltyp exprimiert sowohl Oberflächenrezeptoren, die für NK-Zellen typisch sind (z.B. CD56), als auch typische T-Zellmarker, wie z.B. das CD3 Antigen (Bendelac M.N. et al., 1997; Godfrey D.I. et al., 2000).

## **1.4 Bisherige klinische Studien zur Effektivität von NK-Zellen bei malignen Erkrankungen**

### **1.4.1 Autologe NK-Zell Therapie**

Eine verminderte NK-Zellfunktion und die hieraus resultierende abgeschwächte Immunsurveillance kann mit der Entstehung von malignen Erkrankungen assoziiert sein (Whiteside T.L. and Herbermann R.B., 1994). Sowohl angeborene als auch erworbene Immundefekte sind mit einem häufigerem Auftreten von Krebserkrankungen in Verbindung zu bringen. Beispielsweise zeigten Patienten mit einem erworbenen Immundefizienz Syndrom (z.B. AIDS) ein erhöhtes Risiko für das Auftreten maligner Erkrankungen, wie z.B. Lymphome oder Kaposi Sarkome (Rosenberg F.S. et al., 1995; Ullum H. et al., 1995; Whiteside T.L. et al. 1998).

Rosenberg et al. kombinierten bereits vor zwei Jahrzehnten die Erkenntnisse über die NK-Zellen mit den wachstumsfördernden und aktivierenden Effekten des Interleukin 2 (IL-2) (Lotz M.T. et al., 1981; Grimm E.A. et al., 1982). Die mit IL-2 aktivierten NK-Zellen wurden Lymphokin aktivierte Killer (LAK-) Zellen genannt (Mulé J.J. et al., 1984). Rosenberg benutzte zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zur Aktivierung der körpereigenen NK-Zellen. Im ersten Fall wurde versucht, die körpereigenen NK-Zellen des Patienten in vivo durch die systemische Verabreichung von IL-2 zu aktivieren (Maraninchi D. et al., 1998). Bei der zweiten Vorgehensweise wurden die NK-Zellen der Patienten ex vivo mit IL-2 aktiviert, expandiert und dem Patienten reinfundiert (Fujimiya Y et al., 1999). Als dritte Möglichkeit wurde eine Kombination der beiden Aktivierungsschritte gewählt (Benyunes M.C. et al., 1993).

Durch in vitro Versuche mit LAK-Zellen konnte in Anwesenheit von IL-2 gezeigt werden, dass diese Tumorzellen selektiv lysieren können (Yron I. et al., 1980). In weiteren Untersuchungen konnte zusätzlich demonstriert werden, dass LAK-Zellen ein breites Zytotoxizitätsspektrum besitzen und somit unterschiedlichste Tumoren erkennen und zerstören (Grimm E.A. et al., 1982; Grimm E. et al., 1983).

In den ersten in vivo Versuchen, die an Mäusen mit einem metastasierendem Sarkom vorgenommen wurden, zeigte sich die Effektivität der LAK-Zell Therapie. So konnte eine Reduktion der Anzahl und Größe der Metastasen erreicht werden (Mulé

J.J. et al., 1984). Allerdings war die Effektivität der LAK-Zell Therapie abhängig von der Anzahl der injizierten LAK-Zellen, der IL-2 Dosis und der Größe des Tumors (Papa M.Z. et al., 1986). Insgesamt erwies sich dieser Ansatz nach der Auswertung der Tierversuche als effektiver gegenüber der alleinigen systemischen Gabe von IL-2.

Bereits seit 1985 wurden von Rosenberg et al. die ersten klinischen Studien an Menschen durchgeführt, mit dem Ziel, NK-Zellen als Krebstherapeutikum zu entwickeln. Bei 20-35% dieser Patienten, die u.a. an einem Nierenzell-Ca, Melanom, kolorektalem Carzinom und Lungenadenocarcinom erkrankt waren, zeigte sich eine erfolgreiche Wirkung nach der Verabreichung der LAK/IL-2 Therapie (Rosenberg S.A. et al., 1985; Rosenberg S.A. et al., 1989; Hoffman D.M. et al., 2000). In einer Versuchsreihe wurden Patienten mit Lungentumoren, die je nach Tumorart und Dauer der Krebserkrankung nach der Tumorentfernung als kuriert oder nicht kuriert galten, mit einer kombinierten adjuvanten Chemo-/Radiotherapie und LAK/IL-2 Gabe behandelt. Dabei zeigte sich im Vergleich zu der standardisierten adjuvanten Therapie eine signifikant höhere Überlebensrate (Kimura H. and Yamaguchi Y., 1997).

Um ein besseres Ergebnis der NK-Zell Therapie zu erreichen, wurden Versuche unternommen, bei denen ein direkter LAK-Zell-Tumor Kontakt hergestellt werden sollte. Um diesen direkten Kontakt zu erhöhen, wurden in einer Phase II Studie bei Patienten mit Tumoren des Verdauungstraktes LAK-Zellen (mit oder ohne IL-2) intrahepatisch verabreicht, was zu einer verminderten Metastasenbildung in der Leber führte. Im Gegensatz dazu konnte eine systemische Gabe von LAK-Zellen, mit oder ohne IL-2, keinen therapeutischen Effekt erzielen, wenn eine generalisierte Metastasenbildung im Körper vorlag (Ueda Y. et al., 1999).

Anhand von Tierversuchen hatte sich, wie bereits erwähnt, die alleinige systemische Gabe von IL-2 als weniger effektiv als die kombinierte LAK/IL-2 Therapie erwiesen. Dem Ergebnis widerspricht eine randomisierte klinische Studie, in deren Verlauf kein signifikanter Unterschied zwischen der Gabe von LAK/IL-2 und der alleinigen IL-2 Verabreichung bei Patienten mit Nierenzell-Ca oder einem Melanom beobachtet werden konnte (McCabe et al., 1991). Allerdings sprechen gegen die alleinige IL-2

Verabreichung in therapierelevanten Dosen die beobachteten Nebenwirkungen im Bereich der Lunge, des Herzens und der Leber, die sich nach dem Absetzen der IL-2 Gabe vollständig zurückbildeten (Rosenberg S.A. et al., 1985; Gentilucci U.V. et al., 2002).

Obwohl positive Effekte der LAK-Zell Therapie festgestellt werden können, ist ihr klinischer Nutzen bisher bei den meisten Tumoren als gering einzustufen (Chiorean E.G. and Miller J.S., 2001).

Bisherige NK-Zell Therapien haben zumeist körpereigene (autologe) NK-Zellen verwendet. Die Effektivität der reinfundierten autologen ex vivo expandierten NK-Zellen war jedoch nur geringfügig und führte, wie bereits beschrieben, kaum zu therapeutischen Effekten. Eine Ursache dafür könnte die häufig geschwächte NK-Zell Funktion von Krebspatienten sein, die auch nach der Expansion mit IL-2 nicht vollständig wiederhergestellt werden kann (Lister J. et al., 1995; Rosenberg S.A. et al., 1987; Benyunes M. et al.; 1995).

#### **1.4.2 Adoptive Immuntherapie unter Verwendung allogener NK-Zellen**

Einen alternativen Ansatz zur autologen Immuntherapie stellt die Adoptive Immuntherapie dar. Dieser Ansatz verspricht, dass expandierte NK-Zellen eines Spenders (allogene NK-Zellen) einem Empfängerpatienten infundiert werden.

Anhand von Tierversuchen wurde gezeigt, dass nach der Verabreichung allogener NK-Zellen der gewünschte zytotoxische Effekt gegen maligne Zellen (Graft versus Leukemia Effekt (GVL)) beobachtet werden konnte. Andererseits konnte jedoch im Gegensatz zu den T-Zellen, die ebenfalls einen GVL-Effekt aufweisen, keine gegen den Wirt gerichtete Ausbildung von zytotoxischen T-Zellen und Antikörpern (Graft versus Host Disease (GVHD)) nachgewiesen werden (Zeis M. et al., 1994). Darüber hinaus stellte sich in weiteren Versuchen heraus, dass die allogene NK-Zell Therapie der Ausbildung eines GVHD vorbeugend entgegen wirkte und somit zu einem besseren Engraftment des jeweiligen Transplantates führt (Asai O. et al., 1998; Ruggeri L. et al., 2002). Die große Wirkweite der allogenen NK-Zellen von "mismatched" Familienspendern liegt zum großen Teil in der mangelnden Übereinstimmung der KIR's des NK-Zell Spenders und dem HLA C Typ des

Empfängers. Durch die mangelnde Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger kann die NK-Zelle ihrer zytotoxischen Aktivität nachkommen, ohne durch ein hemmendes Signal des KIR's gestoppt zu werden. Diese Beobachtung zwischen den "mismatched" NK-Zell-Spender und Empfänger wurde anhand von Stammzell-Transplantaten bei Leukämiepatienten in vitro gemacht und im Verlauf von Tierversuchen bestätigt. Trotzdem wurde auch bei der Durchführung dieser Versuche eine eingeschränkte Wirkung der NK-Zell Therapie zumindest bei einer Form der Leukämien beobachtet. So wurde beobachtet, dass die alloreaktive NK-Zell Therapie bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) keinerlei Wirkung zeigt (Ruggeri L. et al., 2002).

## **1.5 Ursprung der NK-92-Zellen**

Da, wie oben ausführlich beschrieben, einiges für die Verwendung von allogenen NK-Zellen im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie (AIT) bei malignen Erkrankungen spricht, laufen Versuchsreihen zur Entwicklung von standardisierten und klonalen NK-Zelllinien für eine AIT. Hier kommt der NK-92 Zelllinie eine besondere Rolle zu, da sie, im Vergleich zu den NK-Zellen, ein sehr viel breiteres Wirkspektrum und eine höhere zytolytische Aktivität gegen solide und hämatologische Tumoren aufweist (Klingemann HG et al. 1996; Yan Y et al. 1998; Tam Y.K. 1999).

Die Zelllinie NK-92 wurde 1992 aus dem Blut eines 50-jährigen Patienten gewonnen, der an einem rasch fortschreitendem Non-Hodgkin Lymphom erkrankt war. Bei der histologischen Untersuchung ließ sich das Knochenmark des Patienten als diffus infiltriertes und von großen granulären Lymphozyten (LGL) durchflochtenes Gewebe darstellen. Nahezu die Hälfte der Blutleukozyten des Patienten bestanden aus blastenähnlichen Zellen. Bei der immunphänotypischen Untersuchung zeigten die Knochenmarksblasten eine positive Reaktion für die Oberflächenmarker CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54 und CD56 (Gong J.- H. et al., 1994).

Die Zellen konnten als eine von bisher nur 5 beschriebenen NK-Zelllinien stabil in der Zellkultur etabliert werden und wurden nach dem Jahr ihrer Gewinnung 1992 NK-92 Zelllinie genannt. Die NK-92-Zelllinie ist klonalen Ursprungs, d.h. die von dem Lymphompatienten gewonnenen NK-Zellen haben ihren Ursprung alle gemeinsam in

einer einzigen entarteten NK-Zelle. Dieses wird unter anderem dadurch deutlich, dass sich die NK-92-Zellen in Bezug auf die Expression von NK-Zellrezeptoren, und hier insbesondere in Bezug auf das Fehlen inhibitorischer Rezeptoren, als homogene Population darstellen (Tonn T. et al 2001). Funktionell sind NK-92-Zellen unter einer Erhaltungskultur mit geringen (100 IE) Konzentrationen von IL-2 hochaktiv und ähneln somit aktivierten NK (A-NK).

Tab.2 : Charakteristika der NK-92-Zellen

<b>Kriterien</b>	<b>Charakteristika</b>
<b>Morphologie</b>	große granuläre Lymphozyten (LGL's), azurophile Granulozyten
<b>Immunophenotyp</b>	Positiv: CD56, CD2, CD7, C11a, CD28, CD45, CD54 Negativ: CD1, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20, CD23, CD34, HLA-DR TCR Gene in Keimbahnkonfiguration
<b>Karyotyp</b>	Numerische and strukturelle Abnormalien
<b>NKR Expression</b>	positiv: KIR2DL4, CD94/NKG2a negativ: (aktivierende Rezeptoren) 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 3DS1 (inhibierende Rezeptoren) 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2
<b>Zytotoxizität</b>	Hochlytische Funktion gegen Tumoren wie z.B. Leukämien, Lymphome, malignes Melanom, Prostata Karzinom, Brustkrebs und gegen viral infizierte Zellen
<b>Viraler Status</b>	Negativ: HIV1, HBV, HCV, CMV, latent positiv: EBV
<b>Radiosensitivität</b>	> 250cGY

### **1.5.1 Kultivierung der NK-92-Zellen**

Die aus dem peripheren Blut des Patienten gewonnenen NK-92-Zellen wurden zur Etablierung in einem Medium kultiviert, welches für myeloide Zellen optimiert worden war und hohe Anteile tierischer Seren aufweist (Myelokult®, Stemcell Technology, Canada). Die Zelllinie benötigt zum Wachstum rekombinantes IL-2, anderenfalls sterben die Zellen innerhalb von 72h ab. Auch andere Zytokine, z.B. IL-7 oder IL-12 vermögen es, NK-Zellen für kurze Zeit zu aktivieren und deren Zytotoxizität zu erhalten bzw. sogar zu erhöhen. Ein Wachstum der NK-92-Zellen fördern diese Zytokine jedoch nicht (Klingemann H.G. et al. 1996; Kalina U. et al. 2000).

NK-92-Zellen sind klonalen Ursprungs und lassen sich unter standardisierten Bedingungen in vitro vermehren. Hierin weisen sie einen deutlichen Vorteil gegenüber physiologischen NK-Zellen auf, die für ihre Gewinnung, Aufreinigung und Expansion aufwendigere Verfahren benötigen (Gong J.-H. et al. 1994; Tonn T. et al. 2001).

### **1.5.2 Vergleich zwischen NK-92-Zellen und A-NK-Zellen**

NK-92-Zellen gleichen den aktivierten NK-Zellen (A-NK) im hohen Maße in Bezug auf die Ausprägung der Oberflächenrezeptoren und ihren funktionellen Charakteristiken. Eine Ausnahme bildet der Fc-Rezeptor, der normalerweise auf allen Zellen, die eine "Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität" aufweisen, und somit auch auf den NK-Zellen, vorhanden ist. Auf NK-92-Zellen jedoch fehlt dieser Rezeptor (Gong J.H. et al., 1994). Dennoch fällt auf, dass die NK-92-Zelllinie im Vergleich zu physiologischen NK-Zellen eine deutlich höhere zytolytische Aktivität gegen ein sehr breites Spektrum von entarteten Zellen hat (Klingemann H.G. et al. 1996; Yan Y. et al. 1998; Tam Y.K. 1999). Man vermutet, dass diese breit gefächerte Aktivität der NK-92-Zellen auf das weitgehende Fehlen inhibitorischer KIR's auf NK-92 beruht (Tonn T. et al., 2001; Burshtyn D.N. et al., 1996). Zudem weisen die NK-92-Zellen eine hohe Konzentration der lytischen Enzyme Granzym B und Perforin auf, die für die hohe Aktivität der NK-92-Zellen verantwortlich sein könnten (Mahi J. et al., 2001).

Trotz dieser effizienten zytotoxischen Funktion gegen entartete Zellen entfalten NK-92-Zellen offensichtlich keine Aktivität gegenüber allogenen, nicht entarteten Zellen, wie z.B. Lymphozyten und Hautzellen (Klingemann H.G. et al. 1996)

### **1.5.3 Indikationen für die NK-92 Therapie**

Die NK-92-Zelllinie wurde, nachdem sie 1992 gewonnen und in den folgenden Jahren etabliert wurde, systematisch auf ihre Wirkung gegen unterschiedliche maligne Erkrankungen hin untersucht. Es zeigte sich, dass die NK-92-Zellen eine hohe zytotoxische Aktivität gegen ein weites Spektrum von Krebszellen aufweisen. Zu den Krebsarten, die gegenüber einer Lyse durch NK-92 sensibel sind, gehören Leukämien und Lymphome aber auch einige solide Tumore wie z.B. das maligne Melanom, Prostata-Karzinom und Mamma-Karzinom (Klingemann H.G. et al., 1996; Yan Y. et al., 1998; Tam Y.K. et al, 1999).

NK-92-Zellen zeigen hierbei auch gegen solche Tumoren eine Aktivität, gegen welche physiologische, A-NK keine Aktivität aufweisen. Eine Untersuchung an 45 verschiedenen Leukämieformen zeigte, dass akute myeloische Leukämien (AML), T-Zell Leukämien (T-ALL) und chronisch myeloische Leukämien (CML) sensibel oder hochsensibel für die NK-92-Zellen waren. Die Wirkung von NK-92 zeigte sich nicht nur *in vitro*, sondern auch in humanisierten Tiermodellen, bei denen immundefiziente SCID-Mäuse mit primären menschlichen Blasten *inoculiert* wurden. In diesen Tierversuchen wurden SCID-Mäuse mit einer Dosis von T-ALL oder AML-Zellen behandelt, die innerhalb weniger Wochen zum Tode der Mäuse führen würden. Nach mehrfacher intraperitonealer Injektion von NK-92-Zellen konnte die Lebensspanne der Mäuse signifikant verlängert werden. Diese Wirkung ließ sich noch steigern, wenn mit der Gabe der NK-92-Zellen, gleichzeitig geringe Dosen IL-2 verabreicht wurden. In diesem Fall konnte bei einigen Mäusen eine komplette Remission beobachtet werden (Yan Y. et al., 1998).

Anhand dieser Versuche mit SCID- Mäusen hatte sich gezeigt, dass die NK-92-Zellen ihre zytotoxische Aktivität auch *in vivo* ausüben können. Weiterhin wurde durch die Versuche mit den SCID-Mäusen deutlich, dass die Effizienz der NK-92-

Zellen unter der Zugabe von IL-2 zunimmt. Das führte zu der Entwicklung von zwei NK-92 Klonen (NK-92CI und NK-92MI), die geringe Mengen IL-2 sezernierten. Zur Generierung dieser Klone wurde eine nicht virale Gentransfer-Methode verwendet. Da dieses Verfahren keine potentiell gefährlichen Virusbestandteile beinhaltet, stellt sie keine Gefahr für den zu transfundierenden Patienten dar und könnte somit ebenfalls einer klinischen Anwendung zugebracht werden (Tam Y.K. et al., 1999).

Sowohl die unveränderten NK-92-Zellen als auch die IL-2 sezernierenden Varianten zeigten im Bezug auf verschiedene Zelllinien des malignen Melanoms eine höhere Aktivität als A-NK-Zellen in vitro und in humanisierten Mausmodellen. Darüberhinaus war eine weitaus geringere Dosis NK-92-Zellen als A-NK-Zellen notwendig, um diesen therapeutischen Effekt hervorrufen zu können (Tam YK. et al., 1999).

In Versuchen mit aggressiven Melanom-Linien (WM1341), die innerhalb von 25 Tagen zum Tod der infizierten Mäuse führte, zeigte sich, dass die NK-92-Zellen nur effektiv sein konnten, wenn sie unmittelbar vor oder simultan mit den Melanomzellen verabreicht wurden. Bei Tumorzellen, die sich als weniger aggressiv herausstellten, erwies sich die Gabe von NK-92 oder NK-92MI auch 24h nach der Infizierung der Maus als ausreichend (Tam Y.K. et al., 1999).

Zusammenfassend kann fest gehalten werden, dass die NK-92-Zelllinie im Vergleich zu NK- und klonalen Zelllinien eine einzigartige Zytotoxizität gegen ein breites Spektrum von entarteten Zellen aufweist (Klingemann H.G. et al., 1996; Yan Y. et al., 1998). Ursächlich dafür ist wahrscheinlich das weitgehende Fehlen inhibitorischer KIR's auf den NK-92-Zellen (Tonn T. et al., 2001; Burshtyn D.N. et al., 1996). In Bezug auf den in vivo Einsatz der NK-92-Zellen an SCID-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass eine wiederholte Infusion von NK-92-Zellen gut toleriert wurde und zu keinerlei toxischen Nebenwirkungen oder zur Entstehung sekundärer Lymphome führte (Tonn T. et al., 2001). Außerdem konnte festgestellt werden, dass der Einsatz der NK-92 Therapie nicht allein auf die Bekämpfung maligne entarteter Zellen beschränkt bleibt, sondern auch in der Eliminierung von virusinfizierten Zellen erste Erfolge aufgezeigt werden konnten. So erkannten die NK-92-Zellen z.B. mit Epstein-Barr Virus (EBV) infizierte B-Lymphozyten und lysierten diese (Maki G., 2001).

Neben dem Einsatz von NK-92-Zellen in der adoptiven Immuntherapie könnten die Zellen auch bei der Gewinnung und Vermehrung von tumorfreien autologen Stammzellpräparaten von großem Nutzen sein. So kommt es im Rahmen der Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzellsupport häufig zu einem Wiederauftreten der Erkrankung, weil mit dem patienteneigenen Stammzellen auch leukämische Stammzellen retransplantiert werden. In einem solchen Fall würde eine Inkubation mit NK-92-Zellen eine Methode anbieten, solche Leukämiezellen aus den Stammzellpräparaten zu entfernen, wo andere Methoden, wie magnetische Zellsortierung, nicht anwendbar sind (Klingemann H.G. et al., 1996)

Vor dem Hintergrund sich zunehmend abzeichnender Indikationen für die NK-Zelltherapie, im Rahmen hämatologischer und onkologischer Erkrankungen, bietet die Verwendung einer NK-Zelllinie verschiedene Vorteile gegenüber primären, autologen oder allogenen NK-Zellen. Diese bestehen insbesondere darin, dass sich solche Zellen ungerichtet, d.h. für verschiedene Patienten, unter standardisierten Bedingungen und bei genau definierter Qualität herstellen liessen. Auch wären besondere Verfahren, z.B. das sog. „Retargeting“ von Effektorzellen mittels chimärer Antigenrezeptoren praktisch durchführbar, wenn sie zwar für einzelne Tumorentitäten, nicht aber für jeden individuellen Patienten durchgeführt werden müssten.

## 2. Aufgabenstellung

Die natürliche Killerzelllinie NK-92 hat in zahlreichen präklinischen Untersuchungen eine hohe Zytotoxizität gegen solide und hämatologische Krebserkrankungen gezeigt. Um die Wirkung und Verträglichkeit dieser aus dem Terry Fox Labor in Vancouver, Canada, nach Frankfurt transferierten Zelllinie in einer klinischen Phase I Prüfung untersuchen zu können, war die Anpassung und Optimierung von Zellkulturverfahren an GMP-konforme Herstellschritte notwendig.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, das Wachstum der NK-92-Zellen an ein klinisch anwendbares Zellkulturmedium anzupassen, welches ohne tierische Serumbestandteile auskommt. Ferner sollte ein Protokoll erarbeitet werden, welches eine Expansion der NK-92-Zellen im klinischen Maßstab erlaubt. Hier sollte insbesondere das Wachstum und die Expansionsrate der NK-92-Zellen in einem Wannenstapelsystem (Cellfactory®) mit 2L Kulturvolumen als Batchkultur untersucht werden. Ziel war es, ein Kultursystem zu etablieren, mit dem sich bis zu  $10^{10}$  NK-92-Zellen unter Erhalt ihrer zytotoxischen Funktion gewinnen lassen.

In einem zweiten Abschnitt dieser Dissertationsarbeit sollte untersucht werden, ob eine Kryokonservierung der NK-92-Zellen möglich ist. Hier sollte zunächst der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Gefrierschutzmittels DMSO auf funktionelle Eigenschaften der NK-92-Zelllinie wie die zytotoxische Aktivität und Vitalität, aber auch die Ausprägung von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren, untersucht werden.

In einem zweiten Schritt galt es, eine optimale DMSO-Konzentration für eine Kryokonservierung von NK-92-Zellen unter Verwendung eines computergestützten Einfrierprotokolls zu identifizieren und eine mögliche Einfrierstrategie für NK-92-Zellen im Rahmen einer klinischen Anwendung zu entwickeln. Da bei einem klinischen Einsatz der NK-92-Zellen eine radioaktive Bestrahlung zur Vermeidung einer Proliferation der Zellen in immunsupprimierten Patienten notwendig ist, sollte insbesondere der Einfluss einer Bestrahlung auf die Kryokonservierung bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen untersucht werden. So galt es insbesondere zu erarbeiten, ob eine Bestrahlung der NK-92-Zellen vor der Kryokonservierung oder nach dem Auftauen erfolgen soll.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
HBSS	Gibco, England
FCS	Sigma, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies, Schottland
Probenecid	Sigma, Deutschland
Lysepuffer Triton X-100	United States Biochemical Corp., USA
DMSO (Dimethylsulphoxid)	Sigma, Deutschland
EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)	Life Technologies, Schottland
Ethanol absolut	Merck, Deutschland
Propidium Jodid	Sigma, Deutschland
HSA (Humanes Serum Albumin)	Blutspendedienst Hessen des DRK, Deutschland
GFP (gefrorenes frisches Plasma)	Blutspendedienst Hessen des DRK, Deutschland
PBS Dulbecco`s	Gibco, England
Trypsin	Gibco, England
Proleukin® (rekombinantes IL-2)	Chiron, USA

#### 3.2 Geräte

CO2-Brutschrank	Forma Scientific
Sterilbank	Heraeus, Deutschland
Einfriertanks (N2-Tanks)	Consarctic, Deutschland
Fluorometer	Wallac Oy, Finnland
Epics XL Durchflußzytometer	Beckman Coulter GmbH, Deutschland
System II Software	Beckman Coulter GmbH, Deutschland

CASY 1 (Cell Counter and Analyser System)	Schäfer System GmbH, Deutschland
Zentrifugen:	
Megafuge	Heraeus, Deutschland
1.0 R Tischzentrifuge	Heraeus, Deutschland
Rüttler	Janke & Kunkel GmbH, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Deutschland
Bestrahlungsgerät	CBL, Deutschland

### 3.3 Allgemeine Materialien

Auslaufpipette Kunststoff (1, 5, 10ml)	NUNC Brand Products, Dänemark
Auslaufpipetten einzeln verpackt (1, 5, 10ml)	Sarstedt, Deutschland
Elektropipettor	Hirschmann, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Manuelle Pipette (10, 100, 1000ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Pipette automatisch	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Molecular Bio Products, USA
Zellkulturflaschen	Cellstar, Deutschland
Falcons	Cellstar, Deutschland
Trypan blau	Life Technologies, Schottland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Deckgläser Zählkammer	Roth, Deutschland
96 Wellplatte	NUNC Brand Products, Dänemark
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
Neo-Kodan Spray farblos	Schülke & Mayr, Deutschland

Küvetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Handschuhe	Hartmann, Deutschland
Blutbeutel	NPBI Biotrans, Deutschland
Cryocyte-Beuteln	Nexell Baxter, Deutschland

### 3.4 Zelllinien

NK-92	Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Hans Klingemann, Chicago, USA, überlassen
K 562	American Tissue Culture Collection (ATCC) No.: CCL-243

### 3.5 Medien für die Zellkulturen und Kit

Für NK-92	X-VIVO 10 Proleukin® (100U/ml) HSA (5%)	Bio Whittaker, USA Chiron, USA Blutspendedienst Hessen des DRK, Deutschland
Für K562	RPMI FCS (10%) Glutamin (2%)	Bio Whittaker, USA Sigma, Deutschland Life Technologies, Schottland
PKH 67-GL Kit		Sigma, Deutschland

### 3.6 Oberflächenantikörper / monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind spezifische Reagenzien, die fähig sind, eine hohe Affinitätsinteraktion mit identifizierbaren Epitopen (Antigenen) der Moleküle einzugehen. Konjugiert man diese Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff oder mit Enzymen, kann durch Messung dieser Konjugate, bzw. ihrer Produkte, die Anzahl der zu betrachtenden Antigene bestimmt werden.

Tab. 2: Verwendete monoklonale Antikörper

Spezifität	Exprimiert auf:	Isotyp	Hersteller
CD11a	T-, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen	Maus IgG 1	Immunotech
CD25	Aktivierte T-, B- Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	Maus IgG2a κ	Immunotech
CD28	T-Zellen, Plasmazellen und Thymozyten	Maus IgG 1	Immunotech
CD54 (ICAM-1)	NK-Zellen, aktivierte Endothelzellen und Monozyten	Maus IgG 1	Immunotech
CD56	Große granuläre Lymphozyten, Zellen mit natürlicher Killer- zellaktivität, Sub- gruppe der T- Lymphozyten	Maus IgG 1	Becton Dickinson
CD122	Aktivierte NK-Zellen, T-, B-Zellen und aktivierte Monozyten	Maus IgG 1	Immunotech
FAS-L	Aktivierte T-, NK- Zellen	Maus IgG 1	Immunotech

Zur Isotypenkontrolle werden

- FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) konjugierte Anti-Maus-IgG (Immunotech),  
sowie
- PE (Phycoerythrin) gereinigtes normales Maus IgG2a (Immunotech),  
verwendet.

### **3.6.1 Beschreibung der verwendeten monoklonalen Antikörper**

#### **IgG2a-PE**

Die Abkürzung PE steht für Phycoerythrin. Protein A-gereinigtes normales Maus IgG2a ist eine angemessene Negativkontrolle zur Benutzung im Zusammenhang mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Das Fluoreszenzspektrum des PE's liegt zwischen 550-650nm mit einem Peak bei 575nm, d.h. es wird rotes Licht emittiert (R&D Systems, Beipackzettel).

#### **IgG-FITC**

IgG-FITC ist Fc $\gamma$  Fragment spezifisch. Die Abkürzung FITC steht für Fluorescein Isothiocyanate Conjugated und dient als Doppelmarkierung in der Durchflußzytometrie (Fluorescence Analysing Cell Sorter = FAC's). Das Fluoreszenzspektrum im FAC's liegt zwischen 475-600nm mit einem Peak bei 525nm. Das bedeutet, es wird grünes Licht emittiert. Der Antikörper reagiert mit den schweren Ketten der Maus IgG aber nicht mit den leichten Ketten auf den meisten Maus-Immunglobulinen (Immunotech, Beipackzettel).

#### **CD11a**

CD11a ist ein transmembranes Glykoprotein, das hauptsächlich von Leukozyten, darunter Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile sowie T- und B-Lymphozyten, exprimiert wird. Somit dient es als Identifikationsmerkmal von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Außerdem erkennt CD11a das z.B. "Lymphocyte functional antigen (LFA1)" welches für die Adhäsion zwischen lymphoiden Zellen entscheidend ist. Es wirkt u.a. hemmend auf die Zytolyse von NK-Zellen (Uchieowski P. and Schmidt R.E., 1989).

### **CD25**

CD25 ist ein niedrig affiner Teil-Rezeptor für IL-2. In Verbindung mit CD 122 und CD132 bildet das CD25-Antigen den hochaffinen IL-2R Komplex. Die Expression dieses Rezeptors ist auf aktivierten T- und B-Zellen, aktivierten Makrophagen und mit IL-2 kultivierten NK-Zellen zu finden. Ruhende T- und B-Zellen dagegen bilden diesen Rezeptor nicht aus (Hemmler M.E. et al., 1983; Smith K.A., 1988).

### **CD28**

CD28 ist ein T-Zell Oberflächenmolekül. Der Rezeptor ist an der Adhäsion zwischen T- und B-Zellen über seine Liganden B7/BB1 beteiligt. Die Interaktion zwischen CD28-B7 ist ein wichtiges Ko-Signal, das zur T-Zell und Lymphokinproduktion führt. 60-80% der T-Zellen, Plasmazellen und Thymozyten exprimieren den CD28 Rezeptor (McMichael A.J. and Goth F.M., 1987).

### **CD54 (ICAM-1)**

Das früher unter der Bezeichnung ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) bekannte CD54-Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein. Es bindet u.a. die Integrine LFA-1. Das Antigen wird vor allem auf NK- und aktivierten Endothel-Zellen sowie auf Monozyten exprimiert. Es vermittelt die Adhäsion von T-Lymphozyten an Antigen-präsentierende Zellen (APC) und ist an T-Zell / T-Zell und T-Zell / B-Zell Interaktionen beteiligt. Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Adhäsion von Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen an aktiviertes Endothel (Makgoba M.W. et al., 1988).

### **CD56**

Das CD56 ist eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (N-CAM). Es wird mäßig auf einer Subpopulation großer granulärer Lymphozyten im peripheren Blut sowie auf allen Zellen mit natürlicher Killerzellaktivität exprimiert. Zusätzlich wird es von einer Subpopulation der T-Lymphozyten exprimiert. Der CD56-Antikörper reagiert nicht mit Granulozyten, Monozyten oder B-Zellen (Ida H. et al., 1997; Hercend T. et al., 1985).

## **CD122**

Durch Assoziation von CD25, CD132 und CD122 bildet sich der hochaffine IL-2 Rezeptor. CD122 kann IL-2 direkt binden und ist an der IL-2 Signalweiterleitung direkt beteiligt. CD 122 wird von aktiven NK-Zellen, T- und B-Zellen sowie aktiven Monozyten exprimiert. (Waldmann T.A., 1989; François C. et al., 1995)

## **FAS-L**

Fas (FS7 associated super Ag) Ligand oder Fas L ist ein Membranprotein vom Typ II mit einem Molekulargewicht von 40kD, das zur Tumornekrose- (TNF-) Familie gehört. Es wird von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sowie in sehr geringen Mengen von sogenannten "immunprivilegierten" Zellen exprimiert. Nach Bindung des Fas-Liganden an einen Rezeptor (CD95, FAS oder Apo-1) wird der programmierte Zelltod (Apoptose) der Zielzelle eingeleitet (Berthou C. et al., 1997).

## **3.7 Kultivierung der Effektor- und Zielzellen**

### **3.7.1 NK-92-Zellen**

Die NK-92-Zellen stammen aus dem Blut eines an einem schnell fortschreitendem Non- Hodgkin Lymphom erkrankten Patienten. Die NK-92-Zellen werden in einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro ml (c/ml) in einem Kulturmedium aus X-VIVO 10, Proleukin und hitzeinaktiviertem HSA kultiviert. Die Zellen wachsen als nicht adhärenzte Zelllinie heran, die in der Kultur kleine Aggregate bildet. Die Verdoppelungszeit der NK-92-Zellen liegt bei 24-36h. Um ein optimales Kulturergebnis zu erlangen, werden die IL-2 abhängigen NK-92-Zellen jeden dritten Tag mit frischem Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden zur Etablierung in einem Medium kultiviert, welches wegen des hohen Anteil an tierischen Seren (12,5% fetales Kälber Serum, 12,5% Pferde Serum) für die klinische Anwendung ungeeignet war (s.1.5.1) Die NK-Zellen wurden daher langsam an das unter Kapitel 2.5 beschriebene Medium gewöhnt.

### 3.7.2 K562-Zellen

Die Zelllinie K562 ist eine 1970 etablierte Erythroleukämie Zelllinie. Sie zeigt aufgrund einer fehlenden MHC KI I Expression eine hohe Sensibilität gegenüber der Zytotoxizität von NK-Zellen. Aufgrund dieser Tatsache gilt die K562-Zelllinie bei der Überprüfung der lytischen Aktivität von NK-Zellen als Standard (Lozzio C.B., Lozzio B.B., 1975).

Die Kultur von K562-Zellen wird in einem Medium aus RPMI, FCS und Glutamin kultiviert und stellt sich als Zellsuspension dar. In einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  c/ml werden die K562-Zellen jeden dritten Tag mit frischem Medium versetzt, um die Vitalität der K562-Zellen nicht durch eine hohe Zelldichte bzw. Zellkonzentration zu minimieren.

## **3.8 Allgemeine Prinzipien der verwendeten Methoden**

### **3.8.1 Funktionsprinzip des Durchflußzytometers**

Die Durchflußzytometrie mit dem Fluorescence activated cell scanner (FACS)-Gerät Epics XL von Beckman Coulter beruht auf der gleichzeitigen Erfassung der Zellgröße, der Granularität und der Messung von drei unterschiedlichen Fluoreszenzwellenlängen. In diesem Falle wird die FACS-Messung zur Erfassung der Viabilität und zytotoxischen Aktivität von NK-92-Zellen versus K562-Zellen eingesetzt, sowie die Expression bestimmter Oberflächenmarker untersucht. Die Auswertung dieser Daten erfolgt mit der System II Software.

Um exakte Messergebnisse zu erreichen, müssen sich die Zellen in Einzelzellsuspension befinden. Diese Einzelzellsuspension wird über eine Strahlenkapillare angesogen und in eine Meßküvette überführt. In der Meßküvette werden die Zellen in eine Trägerflüssigkeit (isotone Lösung) eingebettet, wodurch die Zellen perlschnurartig hintereinander aufgereiht und nacheinander durch den Laserstrahl geführt werden. Die Trägerflüssigkeit, die auch als Hüllstrom bezeichnet wird, sorgt durch eine hohe Fließgeschwindigkeit dafür, dass sich die Zellen im Zentrum der Meßzelle befinden und jede Zelle im Fokus des Laserstrahls gemessen wird. Somit ergeben sich immer gleiche Bedingungen für die Präsentation der Zelle gegenüber dem Laserstrahl. In der Meßzelle wird die Zelle vom Lichtstrahl eines Lasers getroffen und die Fluoreszenz- und Streulichtwerte jeder einzelnen Zelle quantifiziert. Diese Fluoreszenz- und Streulichtwerte werden von opto-elektrischen Detektionssystem aufgefangen.

#### **3.8.1.1 Lichtstreuung**

Der Strahl des Lasers wird durch ein Linsensystem auf das Zentrum der Durchflußküvette konzentriert. Die im rechten Winkel dazu vorbeigeführten Partikel werden dadurch mit Licht hoher Energie bestrahlt. Das entstehende Streulicht wird in den gesamten Raumwinkel abgestrahlt. Dabei ergibt sich eine unterschiedliche Intensitätsverteilung, die von den physikalischen Eigenschaften der Partikel abhängig ist. Es hat sich gezeigt, dass für die Diskriminierung von Zellen zwei Parameter

ausreichend sind: das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ( $3-10^\circ$ ) des einfallenden Lichtstrahls und wird Vorwärtsstreulicht (engl. Forward angle light scatter, FCS) genannt. Das Vorwärtsstreulicht ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht macht nur einen geringen Teil der Lichtstreuung aus und gibt Auskunft über die Struktur der Zellmembran und die Granularität der Zelle. Die unterschiedlichen Signale, die bei der Messung des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichtes gemessen werden, können jeweils in der Form unterschiedlicher Histogramme abgebildet werden. Mit Hilfe des sog. "Gatings" oder "Triggerns" lässt sich eine Zellpopulation als "Region of Interest" ausblenden und im Verhältnis zur Gesamtpartikelzahl auszählen.

### **3.8.1.2 Darstellung der Meßdaten**

Die sich bei den Messungen ergebenden Werte werden an den Rechner als elektrische Impulse übermittelt und in Histogrammen dargestellt. Es können wahlweise ein- oder zweiparametrische Histogramme erstellt werden. In einem solchen Zwei-Parameter-Streulichthistogramm ist es möglich, eine beliebige Zellpopulation zur weiteren fluoreszenzspezifischen Analyse auszuwählen. Hierzu wird ein "Gate" um die Zellpopulation von Interesse gelegt. Nur die Zellen innerhalb dieser Region werden dann in den weiteren Histogrammen auf ihre Fluoreszenzinhalte hin untersucht. Um kleine unerwünschte Partikel von den Analysen auszuschließen, ist es möglich, einen Schwellenwert (Diskriminator) festzulegen. Alle Partikel, die Impulse unterhalb des Schwellenwertes erzeugen, werden automatisch aus der Analyse ausgeschlossen. Damit ist eine negative Beeinflussung der Messung der Zielzellen durch diese Partikel beseitigt worden (Eckhardt R. 1997; Boll I. Heller S., 1992).

### **3.8.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenrezeptoren**

Um Zellen für die durchflußzytometrische Analyse zu markieren, werden in dieser Arbeit Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet, die sich proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen an die Zelle binden. Fluorochrome sind fluoreszierende Verbindungen, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Die mit den jeweiligen Antikörpern konjugierten Fluorochrome lassen sich alle durch den Laser im FACS anregen. Die Fluoreszenzspektren von Fluoreszen-Isocyanat (FITC) liegen bei 475-600nm (d.h. grünes Licht emittierend) mit einem Peak bei 525nm und bei R-Phycoerythrin (PE) bei 550-650nm (rotes Licht emittierend) mit einem Peak bei 575nm (Lanier L.L. and Warner N.L., 1981; Becton-Dickinson GmbH, 1988; Ashmore L.M. et al., 1989). Für den Nachweis schwach exprimierter Antigene sind PE-konjugierte Antikörper besser geeignet, da dieser Farbstoff intensiver Licht emittiert (Eckhardt R. 1997).

### **3.8.3 Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-92-Zellen**

Die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen wird in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Einfrierprotokollen gegen eine Leukämiezelllinien getestet, die sich durch ihre Sensitivität gegenüber einer Lyse durch NK-Zellen auszeichnet. Die Messung erfolgt hierbei durchflußzytometrisch, wobei die K562-Zellen (Zielzellen) mittels eines Zellmembranfarbstoffs (PKH-67, Sigma Aldrich, D) fluoreszierend markiert werden, um eine Abgrenzung von den nicht gefärbten NK-92-Zellen (Effektorzellen) zu erlauben. Nach einer Inkubation der Ziel- und Effektorzellen für 2h werden die toten Zellen mittels Propidiumiodid (PI) angefärbt. PI ist ein DNA Farbstoff, der die toten Zellen selektiv anfärbt und in der Fluoreszenz 2 (FL2) emittiert. Die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen ergibt sich dann aus dem Prozentsatz toter Zielzellen abzüglich der toten Zielzellen in einer Probe, welche nicht mit NK-92-Zellen koinkubiert wird. In einzelnen Experimenten werden Effektor zu Zielzell (E/T) Ratios von 20:1, 10:1 und 1:1 getestet, wobei jeweils 3 Einzelansätze pro Meßgruppe analysiert werden.

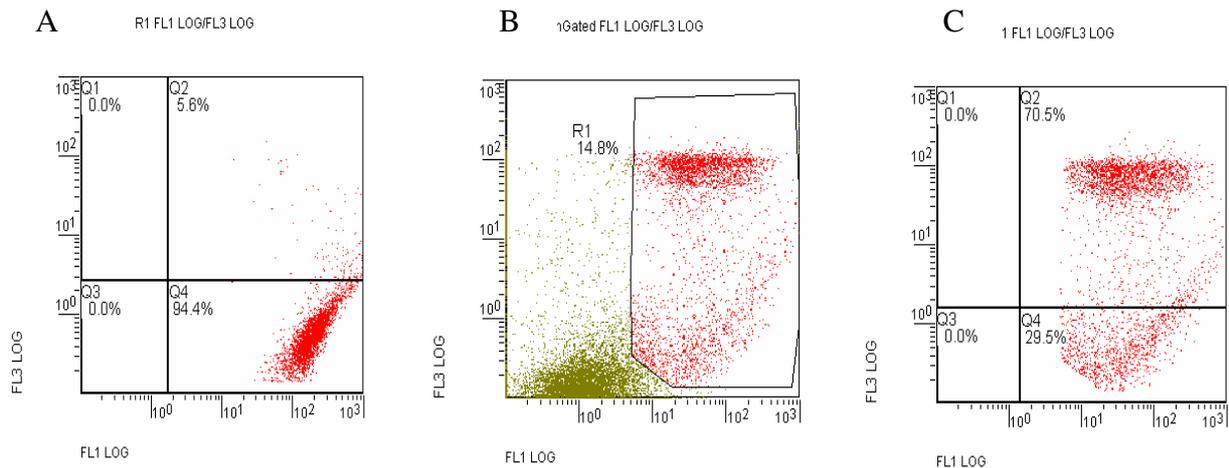


Abb.2 Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

NK-Zell-sensitive K562 (rot) Zellen werden mit PKH angefärbt und stellen sich in FL1 dar (A). Apoptotische K562-Zellen nehmen den Kernfarbstoff PI auf und färben sich in FL3 an. Nicht PKH gefärbte NK-Zellen (grün) sind deutlich von den K562-Zellen abzugrenzen (B). In einem weiteren Histogramm wird der Anteil toter K562-Zellen (Q2) im Verhältnis zu lebenden K562 (Q4) bestimmt (C).

### 3.8.4 Zellzählung mittels Casy®

Die Zellzählungen zur Bestimmung der Wachstumsrate von NK-92-Zellen in den Expansionskulturen wird mittels des Casy® Zellzählgerätes durchgeführt. Dieses Gerät ist besonders dafür geeignet, auch geringe Zellkonzentrationen von 1000 bis 10.000c/ml genau zu bestimmen. Zur Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare mit definiertem Durchmesser gesaugt. Die Präzisionsmesspore ist als Bohrung in einem Rubin realisiert, der in den Kapillarkörper eingegossen ist. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängt die Zelle eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass die Zellen die Meßpore einzeln passieren. Aus den Einzelmessungen, die durch Zellen hervorgerufen werden die beim Durchtritt durch die Meßpore ein Signal mit

entsprechender Pulsfläche erzeugen, berechnet CASY® das Integral des Meßsignals (Pulsflächenanalyse). Aus der volumenlinearen Originalverteilung wird eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet. Alle weiteren Messparameter werden auf der Basis dieser Größenverteilung ermittelt.

### **3.8.5 Expansion von NK-92-Zellen im Wannenstapel**

Um NK-92-Zellen klinisch einsetzen zu können, ist eine Adaption der Kulturbedingungen auf klinisch anwendbare Zellkultursysteme notwendig. Da davon ausgegangen werden kann, dass große Volumina notwendig sein werden, um therapieentsprechende Zellkonzentrationen zu erreichen, werden Wannenstapel der Firma NUNC, Dänemark, in Bezug auf ihre Eignung für eine Expansion von NK-92-Zellen hin untersucht. Der Nunc Wannenstapel besteht aus 10 miteinander verschweißten Schalen, die an einer der beiden Schmalseiten miteinander durch Öffnungen verbunden sind. Zusammen genommen besitzt er eine Wachstumsfläche von 6320cm<sup>2</sup> und bietet einem Volumen von 2L Zellsuspension Platz. Als positiver Aspekt für die Zellkultivierung gelten der geringe Platzbedarf bei einer relativ großen Zellausbeute sowie der einfache Medien austausch.

### **3.8.6 Kryokonservierung der NK-92-Zellen**

Die Kryokonservierung erfolgt mit einem für die klinische Anwendung von Zellpräparaten geeigneten automatischen und geregelten Einfriergerät.

Hierbei wird die Zellsuspension durch computergestützte Zugabe von Flüssigstickstoff um 1-2°C/min auf bis zu -100°C heruntergekühlt. Eine Referenzprobe gibt während des Einfriervorgangs die Temperatur des Zellpräparates wieder und zeichnet diese als Einfrierkurve auf.

### **3.8.7 Bestrahlung der NK-92-Zellen**

Wie bereits beschrieben wurde, stammen die NK-92-Zellen aus dem Blut eines an einem schnell fortschreitenden Non-Hodgkin Lymphom erkrankten Patienten und stellen eine Tumorzelllinie dar. Damit die NK-92-Zellen in der Therapie von zumeist stark immungeschwächten Patienten eingesetzt werden können, müssen die Zellen mit einem Bestrahlungsgerät der Firma CBL mit 10Gy bestrahlt werden, um die Zellteilung der NK-92-Zellen zu unterbinden. Dabei wird des weiteren überprüft, wie sich eine Bestrahlung der NK-92-Zellen vor oder unmittelbar nach dem Auftauen auf die Viabilität der NK-92-Zellen auswirkt. Die Zellen werden in Albumin aufgenommen und mit 10Gy bestrahlt. Im Anschluss erfolgt nach mehreren Zentrifugationen die Viabilitätsbestimmung der NK-92-Zellen in der Neubauer Zählkammer mit Trypan blau (Verhältnis Zellen zu Farbstoff 1:10), wobei unter dem Mikroskop alle 4 Quadranten der Zählkammer bzw. mindestens 100 Zellen ausgezählt werden.

### **3.8.8 Untersuchung des Einflusses der Übernacht-Lagerung von NK-92-Zellen bei 4°C auf die zytotoxische Aktivität**

Die Kühlung der NK-92-Zellsuspension auf 4°C über Nacht erfolgt in FACS Röhrchen in einem Kühlschranks (Liebherr, D). Dabei werden die gekühlten Zellen am folgenden Morgen in den Röhrchen über mehrere Stunden zur Revitalisierung in einen CO<sub>2</sub> Brutschrank überführt. Eine Referenzprobe wird bis kurz vor dem anschließenden Zytotox-Assay in dem Kühlschranks belassen. Die Viabilität der NK-92-Zellen wird einerseits mithilfe von Trypan blau in der Neubauer Zählkammer ausgezählt, andererseits bei der anschließenden FACS-Messung nach der Zufügung des DNA-Farbstoffes PI bestimmt. Die Messung der zytotoxischen Aktivität der über Nacht gekühlten NK-92-Zellen erfolgte durchflußzytometrisch, wobei die K562-Zellen, wie bereits beschrieben, mittels eines Zellmembranfarbstoffs (PKH-67, Sigma Aldrich, D) fluoreszierend markiert werden, um eine Abgrenzung von den nicht gefärbten NK-92-Zellen zu erlauben. Die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen ergibt sich dann aus dem Prozentsatz toter Zielzellen abzüglich der toten Zielzellen in einer Probe, welche nicht mit NK-92-Zellen koinkubiert werden.

### **3.9 Durchführung der Versuche**

#### **3.9.1 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometer**

Um den Einfluß der verschiedenen Expansions- und Kryokonservierungsmodalitäten auf den Phänotyp der NK-92 zu untersuchen, werden verschiedene für NK-Zellen typische Oberflächenmarker untersucht. Die Färbung der NK-92-Zellen erfolgt hierbei mit Maus-anti-human monoklonalen IgG1 Antikörpern, die entweder direkt mit einem Fluorochrom konjugiert, oder sekundär über einen Ratte-anti-Maus IgG Antikörper angefärbt werden. Als Kontrolle werden entweder Isotypkontrollen gegen irrelevante Antigene verwendet, oder– im Fall der Sekundärfärbung– der flurochrom-konjugierte Ratte-anti-Maus Antikörper verwendet.

Für die Markierung werden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Markierungsansatz nach der Zentrifugation in 100µl SAP-Puffer resuspendiert und mit monoklonalen Antikörpern für 20 min bei 4°C induziert. Jeder dieser monoklonalen Antikörper markiert ein spezifisches Antigen auf der Oberfläche der zu untersuchenden Zellen. Das somit gewonnene Zellpellet wird in 100µl „Standard Acid Puffer (SAP)“ resuspendiert und mit 2µg des Primär-Antikörpers für 20 min bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Antikörper werden im Kapitel Materialien im Detail aufgeführt. Anschließend werden überschüssige, nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Zellsuspension in 4ml SAP (Zentrifugation bei 1200U/min für 10 min) entfernt. Es folgt die erneute Resuspension in 100µl SAP-Puffer und das Hinzufügen des zweiten Antikörpers.

CD56 wird mit Phycoerythin (PE) markiert. Zu allen anderen primären Antikörpern wird Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) hinzugefügt (pro Ansatz 1µl des sekundären Antikörpers). Es folgt eine erneute Inkubation für 20 min bei 4°C. Hiernach werden überschüssige Antikörper erneut durch einen Waschschrift entfernt. Anschließend wird das Zellpellet in 250µl SAP-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern. Die Messung erfolgt in allen Experimenten innerhalb von 6h nach der Färbung. Die Analyse der Daten wird mit der Systemsoftware von Beckmann® Coulter® vorgenommen, wobei pro Ansatz mindestens 10000 Events aufgenommen werden.

In Fällen, in denen die Viabilität der NK-92-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt wird, werden die toten Zellen mit dem Kernfarbstoff Propidiumiodid angefärbt.

Hierzu werden die Zellen in 300µl PBS plus 1µg Propidiumiodid aufgenommen. Nach 5 min sind die toten Zellen angefärbt und die Zellen können der Messung zugeführt werden. Bis zur Messung werden die Zellen gekühlt (4 °C) und im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

### **3.9.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-92-Zellen**

#### **3.9.2.1 Vorbereitung der Ziel- und Effektor Zellen**

Zur Durchführung des Zytotox-Assays werden zunächst die Zielzellen vorbereitet. Die K562 Zellen werden der Zellkulturflasche entnommen und in 50ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen werden bei 1500U/min für 10 min zentrifugiert und anschließend 2-mal in PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in Medium (RPMI, 10% FCS) aufgenommen, auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen eingestellt und erneut zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wird in 1ml Diluent C resuspendiert und mit 1ml frisch angesetzter PKH 67 Farblösung versetzt. Um eine möglichst gleichmäßige Färbung zu erreichen, wird die Zellsuspension für 2-5 min vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert. Dabei sollte dieser Vorgang nicht länger als 5 min dauern, da es ansonsten zu einer Zellschädigung kommen könnte. Um die Färbung zu beenden, werden 2ml FCS zu der Zellsuspension hinzugefügt und erneut 1 min pipettiert. Im Anschluss folgt die weitere Zuführung von 2ml RPMI-Medium, versetzt mit 10% FCS. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation bei 1500rpm für 10 min pelletiert und der Überstand dekantiert. Um überschüssiges PKH zu entfernen, werden die Zellen anschliessend mindestens 4-mal mit PBS gewaschen (1500U/ 10 min). Die Zielzellen werden dann in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  c/ml in RPMI/10% FCS aufgenommen.

Die Entnahme der NK-92-Zellen aus dem Brutschrank erfolgt erst dann, wenn die Färbung der Zielzellen abgeschlossen ist. Die NK-92-Zellen werden ebenfalls bei 1500U/min in einem 50ml Falcon Röhrchen pelletiert und 2-mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Einstellung der Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  c/ml in X-Vivo Medium plus 100IU IL-2 und 5% hitzeinaktivierten Plasmas.

Pro Versuchsansatz werden 50.000 Zielzellen in ein 4ml FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, D) pipettiert, in welches zuvor 500µl RPMI vorgelegt wird. Die NK-92-Zellen werden nun ebenfalls in einem Volumen von 500µl dazugefügt, wobei je nach der beabsichtigten Effektor zu Target (E:T) Ratio,  $5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  c/ml dazugegeben werden. Dies entspricht einer E:T Ratio von 1:1 und 10:1. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4h in einem Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen zur Vorbereitung der durchflußzytometrischen Analyse durch 5 min Zentrifugation bei 1500U/min pelletiert und erneut mit PBS gewaschen. Nach Abkippen des PBS erfolgt die Aufnahme der Zellen in 300µl PBS plus 1µg Propidiumiodid (PI). Das PI wird 5-10 min vor der Analyse auf die Zellen gegeben. Bis zur Messung sind die Zellen gekühlt (4°C) und im Dunkeln aufzubewahren, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

### **3.9.2.2 Durchflußzytometrische Analyse**

Die Analyse erfolgt mit dem Epics XL Durchflußzytometer (Beckmann Coulter, D) und der dazugehörigen System II Software. Pro Analyse werden mindestens 1000 K562-Zellen aufgenommen. Die Einstellung und Kompensation des Durchflußzytometers erfolgt zunächst durch Aufnahme einer Probe, die nur K562-Zellen enthält. Hier wird die Verstärkung der Fluoreszenz 1 (PKH-67) so eingestellt, dass die Zellpopulation eine mittlere Fluoreszenz von ca. 1000 aufweist. Die Einstellung wird so kompensiert, dass keine Überschneidung mit der Fluoreszenz 3 (Propidiumiodid) vorliegt. In einem weiteren Schritt erfolgt die Überprüfung, ob die nicht-gefärbten NK-92-Zellen deutlich von den K562-Zellen abgrenzbar sind. Gegebenenfalls werden weitere Justierungen der Einstellung vorgenommen. Nachdem die Einstellungen optimiert worden sind, werden die Regionen festgelegt, in denen die lebenden und toten K562-Zellen erfaßt werden sollen. Anschließend werden je 3 Ansätze pro Versuchsgruppe aufgenommen. Die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen in % berechnet sich durch Abzug der toten Zellen in Proben ohne NK-92-Zellen (spontane Lyse) von dem Anteil toter Zellen in dem betreffenden Ansatz mit NK-92-Zellen. Die spezifische Aktivität von optimal kultivierten NK-92-

Zellen, wie sie als Positivkontrolle mitgeführt werden, liegt in Bezug auf K562-Zellen im Mittel bei 65% bei einer E:T Ratio von 10:1.

### **3.9.3 Zellzählung mittels Casy®**

Aus der zu bestimmenden Zellkultur werden jeweils Aliquots a 2ml entnommen, wobei darauf geachtet wird, dass vorher eine gute Durchmischung der Kultur stattgefunden hat. Aus dieser Probe werden dann jeweils 100µl in 10ml sterilfiltrierte Casyton® Lösung pipettiert. Die Verdünnung wird dann mittels des Casy® Zellanalysers gezählt. Es werden von jeder Probe jeweils 3 Messungen durchgeführt und der Mittelwert der Messungen als Zellzahl/ml ermittelt. Je Meßzeitpunkt und Probe wird jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### **3.9.4 Expansion von NK-92-Zellen im Wannenstapel**

Zur Expansion der NK-92-Zellen in Wannenstapeln wird der Wannenstapel unter sterilen Kautelen mit 2L X-VIVO 10 Medium plus 5% hitze-inaktiviertem gefrorenen Frischplasma (HI-GFP) und 100IU Interleukin-2 (Proleukin) befüllt. Anschließend erfolgt die Zugabe von  $4 \times 10^7$  NK-92-Zellen, so dass die Konzentration  $2 \times 10^4$  NK-92/ml Zellkulturvolumen ergibt. Der Wannenstapel wird gut durchmischt, eine Probe zur Zellzahlbestimmung entnommen und der Nunc Wannenstapel mit einem Sterilfilter verschlossen. Die Expansion der NK-Zellen erfolgt dann in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Ausgangskonzentration wird so gewählt, dass die NK-92-Zellen etwa eine Dichte von  $2 \times 10^4$ /ml aufweisen. Es werden täglich Proben zur Zellzahlbestimmung entnommen, wobei die Entnahme jeweils nach guter Durchmischung der Zellkultur und unter sterilen Kautelen vorgenommen wird. Es werden jeweils zwei unabhängige Proben von 2ml entnommen und die Zellzahl, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Expansion der Zellen wird in einer Batchkultur durchgeführt, d.h. es erfolgte keine Zugabe von „frischem“ Medium.

In einigen Experimenten wird die höchste zu erreichende Zelldichte ermittelt. Diese liegt bei ca.  $1 \times 10^6$  c/ml. In Expansionen, die der Gewinnung von NK-92-Zellen zur

Kryokonservierung dienen, werden die Zellen daher abgeerntet, bevor sie die höchste Dichte erreicht haben. Die Gewinnung der NK-92-Zellen aus den Wannenstapeln erfolgt hierbei in einem weitgehend geschlossenen System mit Hilfe einer Schlauchpumpe. Der Zellkulturinhalt wird hierbei in bis zu vier 500 ml Blutbeutel (NPBI Biotrans, D) überführt. Anschließend werden die jeweiligen Beutel bei 1800U/min und 20 min zentrifugiert, der Überstand abgepresst und der Inhalt der 4 Beutel gepoolt. Nach einem Waschschrift der Zellen mit PBS-EDTA (Miltenyi Biotech, D), werden die Zellen in 5%igem humanem Serum-Albumin (Blutspendedienst Hessen des DRK) aufgenommen und den Experimenten zur Kryokonservierung zugeführt (siehe unten).

### **3.9.5 Vorbereitung der NK-92-Zellen zur Kryokonservierung**

Die in Kulturflaschen oder in Wannenstapeln expandierten NK-92-Zellen werden für 10 min bei 1500U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift werden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  c/ml in 5%igem humanem Serum-Albumin (HSA) eingestellt. Hierbei ist darauf zu achten, dass alle folgenden Schritte unter einer strikten Kühlung auf 4°C erfolgen, da ansonsten eine toxische Wirkung des Einfrierschutzmittels DMSO eintreten würde. In Fällen, wo die Wirkung einer Bestrahlung der NK-92-Zellen vor dem Einfrieren untersucht werden soll, wird die eine Hälfte der Zellen der Bestrahlung zugeführt. Anschließend erfolgt deren Waschung in PBS, um Sauerstoffradikale, die durch die Bestrahlung mit Gamma-Strahlen freigesetzt werden können, zu entfernen. Im Anschluss werden die Zellen analog zu den nicht-bestrahlten NK-92-Zellen weiter behandelt.

Zu jedem Teil NK-92-Zellen in HSA wird vor dem Einfrieren 1 Teil Einfrierschutzlösung (DMSO gelöst in X-VIVO 10 Medium) dazu gegeben, so dass sich die Zellkonzentration um die Hälfte auf  $5 \times 10^7$  c/ml verringert. Die Einfrierschutzlösung wird so vorbereitet, dass jeweils die doppelte Menge DMSO von der gewollten Endkonzentration enthalten ist. In allen Experimenten ist die Endkonzentration der NK-92-Zellen  $5 \times 10^7$  c/ml, die HSA Konzentration beträgt immer 50% und der Anteil des X-VIVO Medium variiert, in Abhängigkeit von dem Anteil des DMSO, welches 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 8% oder 10% beträgt.

In den Fällen, wo die NK-92-Zellen in Ampullen eingefroren werden, werden Nunc Kryoröhrchen verwendet. Das Volumen beträgt jeweils 1ml. Bei Experimenten, in denen die NK-Zellen in Beuteln eingefroren werden, werden 20ml der Zellen in Cryocyte-Beuteln (Nexell Baxter) gefüllt.

Der eigentliche Einfriervorgang wird möglichst unmittelbar nach Zusetzen der DMSO-Lösung vorgenommen, wobei nie mehr als 30 min vergehen und die Zellen strikt bei 4°C gekühlt werden. Zum Einfrieren wird eine geregelte Einfriermaschine der Firma Cryoson verwendet. Durch geregelte Zugabe von Flüssigstickstoff (N<sub>2</sub>) werden die Zellen mit 1°C/min auf -100°C heruntergekühlt. Anschließend erfolgt die Lagerung der Zellen bis zu ihrem Auftauen in der Dampfphase von Flüssigstickstoff bei -190°C.

### **3.9.6 Kryokonservierung und Bestrahlung von NK-92-Zellen**

Bei einer Bestrahlung der NK-92-Zellen vor der Kryokonservierung werden die dem Brutschrank direkt entnommenen NK-92-Zellen abzentrifugiert, und das Zellpellet in frischem Medium oder Albumin aufgenommen. Nach der Bestrahlung bei 10Gy wurden die Zellen mit dem 10-fachen ihres Volumens mit X-VIVO 10 Medium versetzt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, um die bei der Bestrahlung entstandenen freien Radikale zu entfernen. Das Zellpellet wird in frischem Medium bzw. Albumin aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  c/ml eingestellt. Im Anschluss wird die Zellsuspension 1:1 mit einer X-VIVO 10 Lösung mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen versetzt. Alle verwendeten Reagenzien und die Zellen werden hierbei strikt bei 4°C gehalten, um eine toxische Wirkung des DMSO's zu vermeiden. Die Zellen werden innerhalb der nächsten Minuten mit Hilfe der computergesteuerten Einfrieranlage (Fa. Cryoson) geregelt eingefroren. Hierbei wird ein für Lymphozyten optimiertes Programm gewählt, welches eine Absenkung der Temperatur um 1°C/min auf -100°C gewährleistet.

In einem weiteren Experiment wird untersucht, welchen Einfluss eine Bestrahlung auf die Funktionsfähigkeit der NK-92-Zellen hat, wenn sie im Anschluss an die Kryokonservierung durchgeführt wird. Hierzu werden die Zellen zunächst im Wasserbad bei 37°C soweit aufgetaut, dass nur noch ein kleiner Eisklumpen

vorhanden ist. Die Zellen werden dann unmittelbar bei einer Temperatur von 4 °C mit 10Gy radioaktiv mit einem auch für Blutprodukte geeigneten Bestrahlungsgerät bestrahlt. Die Bestrahlungszeit zum Erreichen von 10Gy liegt bei 111 Sekunden. Nach der Bestrahlung werden die Zellen mit dem 10-fachen ihres Volumens in kaltem X-VIVO 10 Medium aufgenommen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 1800U/min über 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet im 37°C warmen Medium aufgenommen.

Die Viabilität der so behandelten NK-92-Zellen wird mittels Trypanblau Färbung bestimmt. Während vitale Zellen in der Lage sind, Trypanblau aktiv aus der Zelle auszuschleusen, verbleibt der Farbstoff in toten Zellen, welche sich dadurch blau anfärben. Die NK-92-Zellen werden mit einer 1:4 Verdünnung von Trypanblau und PBS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es werden mindestens 100 Zellen ausgezählt und der Anteil der vitalen bzw. toten Zellen bestimmt.

### **3.9.7 Vorbereitung der NK-92-Zellen zur Untersuchung des Einflusses einer Übernacht-Lagerung bei 4°C**

Für eine klinische Anwendung von NK-92-Zellen wäre es gegebenenfalls sinnvoll, die Zellen bei 4°C lagern zu können, da unter diesen Bedingungen ein geringeres Risiko für das Wachstum von Bakterien besteht. Um den Einfluss einer Abkühlung der Zellen auf 4°C und insbesondere die Dauer zu untersuchen, bis die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen wieder hergestellt ist, werden NK-92-Zellen zunächst durch Übernachtlagerung bei 4°C abgekühlt. Hierzu erfolgt die Aufnahme der NK-92-Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  c/ml in humanem Serum Albumin (HSA, BSD Hessen, D). Die Zellen werden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Morgen werden die Zellen entnommen, bei 1500rpm/10min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 37° warmen Kulturmedium (X-VIVO 10, 100IU IL-2, und 5% HI-HP) in jeweils 3 FACS-Röhrchen pro zu untersuchender Gruppe aufgenommen und bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Nach 50 min, 2h, 4h und 16h werden die Zellen entnommen und der Analyse, Zytotoxizitätsmessung, bzw. Viabilitätsmessung, wie oben beschrieben, zugeführt. Als Kontrolle wird bei

jeder Messung eine Probe NK-92-Zellen mitgeführt, welche nicht der 4 °C Lagerung unterzogen worden ist.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab

Um eine Expansion von NK-92-Zellen unter klinisch anwendbaren Bedingungen gewährleisten zu können, ist eine Adaptation der Kulturbedingungen auf ein weitgehend geschlossenes System notwendig, welches darüber hinaus die Kultivierung größerer Volumina erlaubt. Als ein solches Zellkultursystem wird das Wachstum der NK-92-Zellen in einem 2-3L fassenden Zellkultursystem (Wannenstapel, Nunc Cellfactory®) untersucht. Als Referenzmethode wird das Wachstum der NK-92-Zellen in 100ml T-Flaschen herangezogen. Es zeigt sich, dass die Adaptation der Kulturbedingungen von 100ml Kulturflaschen auf 2L Cellfactory-Kulturgefäße zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums führt.

Ausgehend von einer Zelldichte von  $1,9 \times 10^4$  NK-92c/ml kann eine 22,3-fache Expansion in T-Flaschen und eine im Maximum 33,6-fache Expansion im Wannenstapel erzielt werden. Durch das höhere Kulturvolumen der Wannenstapel ergibt sich bei einem Kulturvolumen von 2000ml eine Expansion von  $5,97 \times 10^7$  Zellen auf  $2,1 \times 10^9$  Zellen in einer 10 Tage andauernden Batchkultur (Abb.3). Die maximale Zelldichte/ml erreicht in dem Wannenstapel-System somit  $2,1 \times 10^6$  c/ml. Nach diesem Zeitpunkt nimmt die Viabilität der Zellen deutlich ab und die Zellzahl verminderte sich bis zum Abschluss der Batchkultur nach 288 Tagen auf  $0,8 \times 10^6$  NK-92c/ml (Abb.4).

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass für den klinischen Einsatz von NK-92-Zellen, bei dem eine Dosis aus zwei Transfusionen von mindestens  $1 \times 10^9$  NK-92c/m<sup>2</sup> Körperoberfläche vorgesehen ist, ein Wannenstapel ausreichen würde, um Zellen für eine Transfusion eines Patienten mit 2m<sup>2</sup> Körperoberfläche innerhalb von 10 Tagen zu generieren.

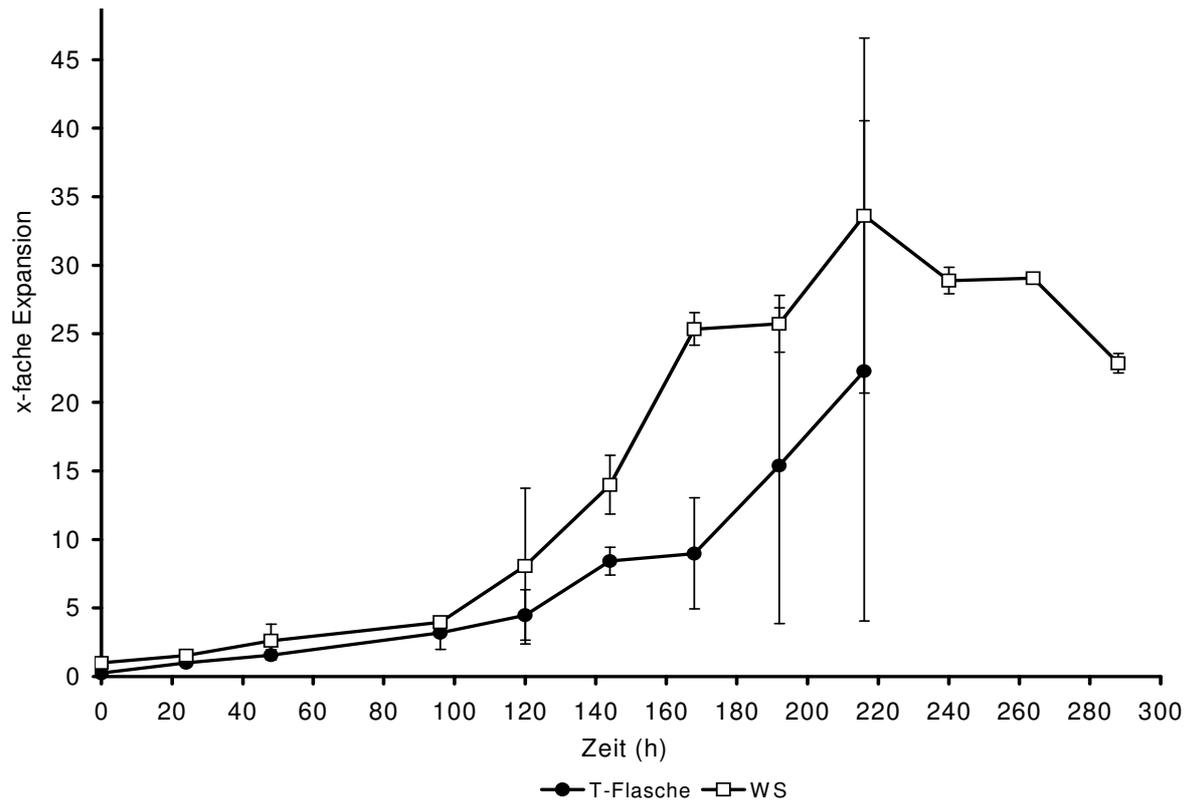


Abb. 3: Vergleich der Expansionsergebnisse von NK-92-Zellen in T-Flaschen und Wannenstapel in Abhängigkeit von der Zeit. Angegeben ist der Mittelwert aus n=3

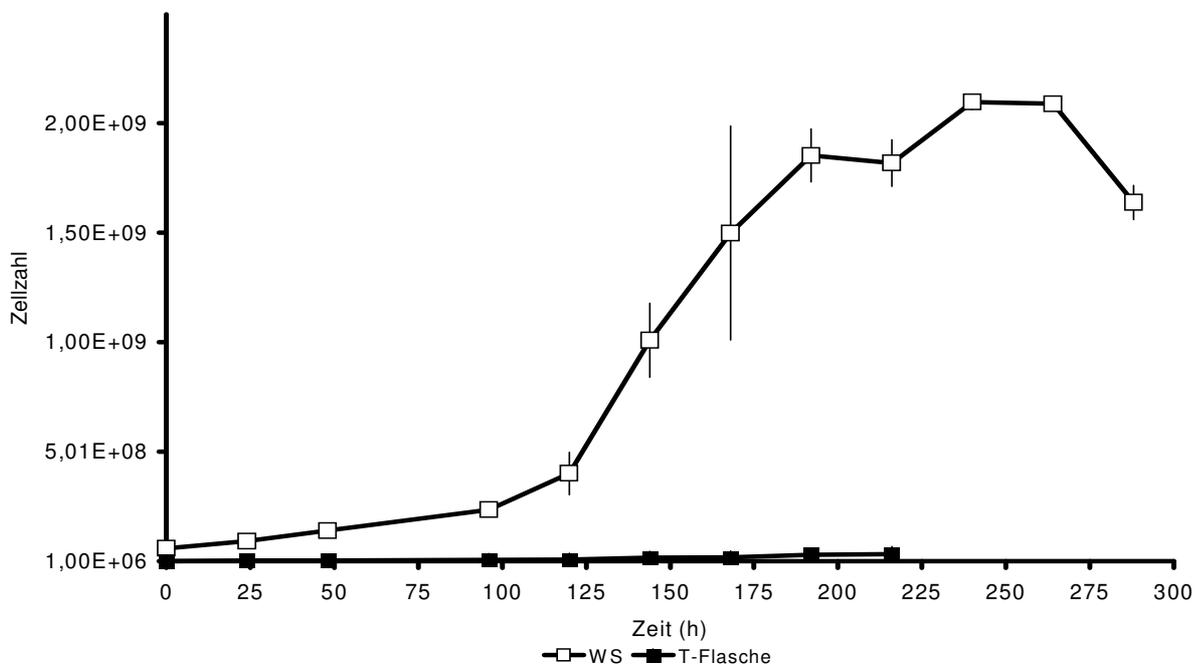


Abb.4: Vergleich der absoluten Zellzahl von in WS und T-Flaschen expandierten NK-92-Zellen in Abhängigkeit zur Zeit. Angegeben ist der Mittelwert aus n=3

#### 4.1.1 Untersuchung des Einflusses der Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab auf die zytotoxische Funktion

Um festzustellen, ob die Kulturbedingungen der Batchkultur im Wannenstapel zu einer Beeinträchtigung der zytolytischen Funktion der NK-92-Zellen führt, wird deren Aktivität gegen die Erythroleukämie-Zelllinie K562 gemessen. Es zeigt sich, dass die Kulturbedingungen in den Wannenstapeln zu keiner Beeinträchtigung der zytolytischen Aktivität der NK-92-Zellen führt, wenn diese am Tag 10 der Kultur, d.h. zum Zeitpunkt der höchsten Zelldichte, untersucht werden. Sowohl die im Wannenstapel expandierten NK-92-Zellen als auch die in T-Flaschen kultivierten NK-92-Zellen zeigen eine Aktivität von im Mittel 65% gegenüber K562-Zellen bei einem Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle von 10/1.

Diese zytolytische Aktivität ist auch dann gegeben, wenn die NK-92-Zellen zusätzlich mit 10 Gy bestrahlt werden. Diese Dosis soll bei einem klinischen Einsatz von NK-92-Zellen deren weiteres Wachstum im Patienten verhindern (Abb. 5).

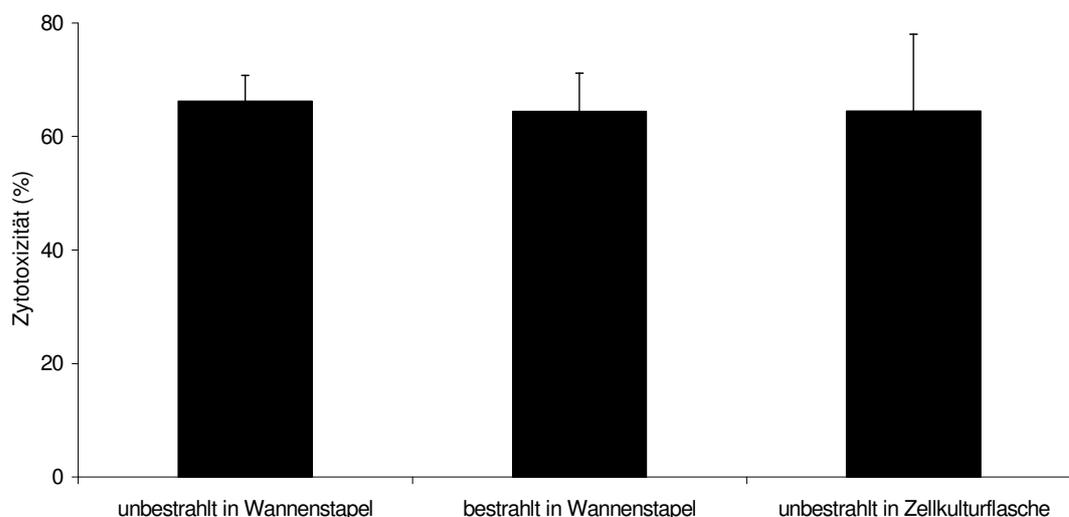


Abb. 5: Zytotoxische Aktivität von expandierten und bestrahlten NK-92-Zellen

## 4.2 Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab

### 4.2.1 Untersuchung des Einflusses von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die zytotoxische Aktivität von NK-92-Zellen

Um ein Protokoll zu entwickeln, welches eine Kryokonservierung der NK-92-Zellen ermöglicht, wird zunächst untersucht, welche Konzentrationen von DMSO toxisch auf die Aktivität von NK-92-Zellen wirken. Diese Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, auf welche Konzentration das Gefrierschutzmittel DMSO in dem NK-92 Zellpräparat herunterverdünnt werden muss, um nach dem Einfrieren eine zytolytische Aktivität der NK-92-Zellen im Patienten zu gewährleisten.

Es zeigt sich, dass bereits eine Konzentration von 5% DMSO zu einer signifikanten Reduktion der zytotoxischen Aktivität von NK-92-Zellen gegen die Erythroleukämie-Zelllinie K562 führt. Während die Aktivität von NK-92-Zellen bei einer DMSO-Konzentration von 0,5-2% im Vergleich zur Kontrolle (83%) nur zu einer geringen Beeinträchtigung der zytotoxischen Aktivität führt (75,4% bzw.68,5%), reduziert sich die Aktivität bei einer Konzentration von 5% DMSO auf nur noch 23,2% (s.Abb.6).

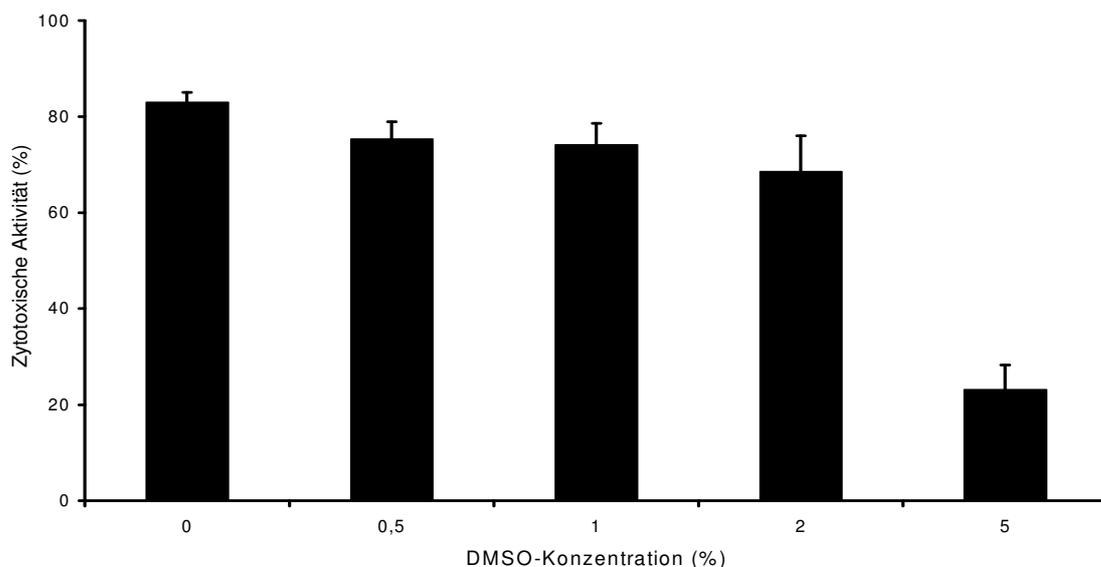


Abb. 6: Einfluß unterschiedlicher DMSO-Konz. auf die zytotoxische Aktivität von NK-92-Zellen versus K562-Zellen

#### 4.2.2 Einfluß der unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen auf die Expressionsdichte von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren (CD11a, 25, 28, 54, 56, 122 und FAS-Ligand)

In diesem Versuch soll überprüft werden, ob die bekannte toxische Wirkung des Frostschutzmittels DMSO zu einer Beeinflussung der immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren führt.

Tab. 3: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Expressionsdichte immunologisch relevanter Oberflächenrezeptoren

Rezeptoren	CD 11a	CD25	CD28	CD54	CD56	CD122	FAS-L
<b>Kontrolle</b>	++	+	+	+	++	+	-
<b>2%DMSO</b>	+	+/-	+	+	++	+/-	-
<b>3%DMSO</b>	++	+	+	+	++	+	-
<b>5%DMSO</b>	++	+	+	+	++	+	-
<b>8%DMSO</b>	++	+/-	+	+	++	+	-
<b>10%DMSO</b>	++	+/-	+	+	++	+	-

- = keine Expression (LOG- Fluoreszenz 0,1-1); + = geringe Expression (LOG- Fluoreszenz 1-10); ++ = mittlere Expression (LOG- Fluoreszenz 10-100); +++ = starke Expression (LOG-Fluoreszenz 100-1000)

Tab.3 lässt erkennen, dass die Zuführung des Frostschutzmittels DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen keine Veränderung in bezug auf die Expressionsdichte der Oberflächenrezeptoren hervorruft. Eine Ausnahme bilden hierbei die IL-2 affinen Rezeptoren CD25 und CD122, bei denen es zu einer Abschwächung der mittleren Fluoreszenz um eine Logstufe kommt.

#### **4.2.3 Untersuchungen zur Viabilität von geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration und einer vorherigen Bestrahlung mit 10Gy in Ampullen**

Um zu untersuchen, ob eine Kryokonservierung von NK-92-Zellen möglich ist und bei welcher DMSO-Konzentration sich ein möglichst optimaler Erhalt der Viabilität der NK-92-Zellen nach der Kryokonservierung erreichen lässt, werden verschiedene DMSO-Konzentrationen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ein geregeltes Einfrieren der NK-92-Zellen unter Erhalt der Viabilität zu ermöglichen. Da ein therapeutischer Einsatz der NK-92-Zellen, wie oben beschrieben, eine Bestrahlung der Zellen mit 10Gy notwendig macht, wird ebenfalls untersucht, welchen Einfluss eine Bestrahlung der NK-92-Zellen vor der geregelten Kryokonservierung hat. Diese Untersuchungen werden zunächst im Labormaßstab durchgeführt, d.h. die Kryokonservierung wird in Ampullen vorgenommen.

Wie in Abb. 7 dargestellt, zeigt sich trotz des geregelten computergestützten Einfrierens der NK-92-Zellen bei einer Kühlrate von 1 °C/min auf minus 100°C eine relativ schlechte Viabilität der NK-92-Zellen bei allen getesteten DMSO-Konzentrationen. Ein Einfriermedium, welches mit 3% DMSO substituiert wird, zeigt im Mittel die beste Viabilität (39,4%). Weder höhere noch geringere DMSO-Konzentrationen tragen zu einem verbesserten Überleben der Kryokonservierung und des anschließenden Auftauvorgangs bei. Werden die NK-92-Zellen vor dem Einfrieren mit 10Gy radioaktiv bestrahlt, wirkt sich dieses zusätzlich negativ auf die Überlebensrate der Zellen aus. In diesem Fall liegt die Viabilität der NK-92-Zellen bei nur 18-25%.

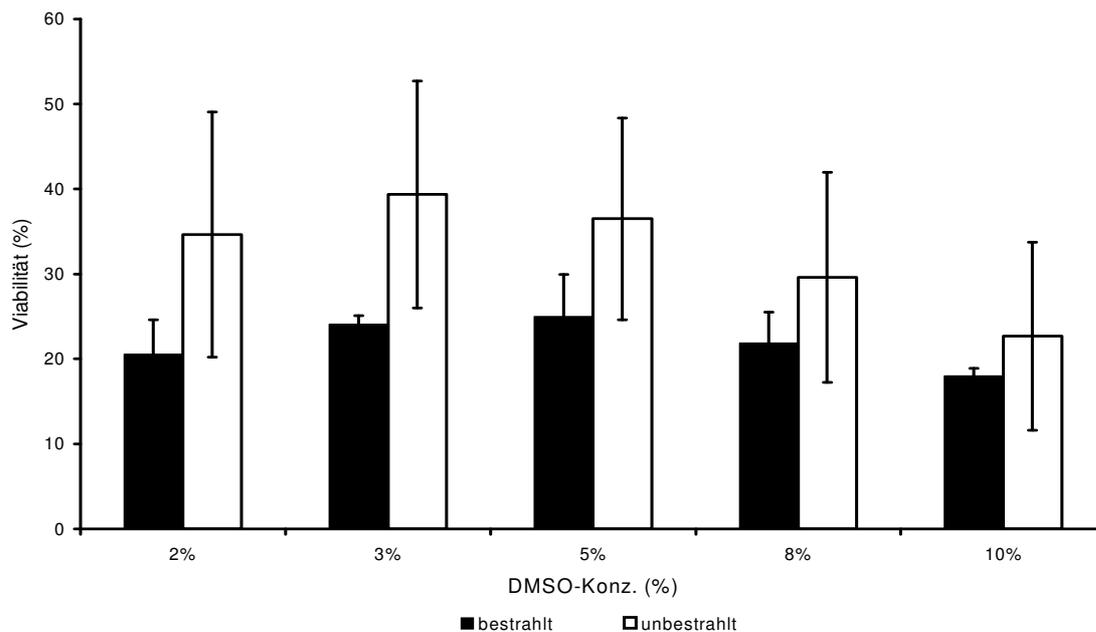


Abb. 7: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von in Ampullen geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen in Abhängigkeit von einer vorherigen Bestrahlung mit 10Gy

#### 4.2.4 Untersuchung des Einflusses der DMSO-Konzentration und der Bestrahlung auf die Viabilität von im klinischen Maßstab geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen

Nachdem die Kryokonservierung der NK-92-Zellen in Ampullen über eine breite Spanne verschiedener DMSO-Konzentrationen nur eine geringe Viabilität von deutlich unter 50% ergibt, soll dennoch untersucht werden, ob sich unter Einfrierbedingungen im klinischen Maßstab ein deutlich besserer Erhalt der Viabilität erreichen lässt. Bei der Kryokonservierung im klinischen Maßstab wird die Kryokonservierung in Beuteln vorgenommen. Die Beutel weisen eine geringere Wandstärke auf als Ampullen, wodurch eine bessere Kühlrate im Inneren des Beutels erreicht wird. Es werden Beutel mit je 20ml Albuminlösung und  $1 \times 10^9$  NK-92-Zellen bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen eingefroren. Die Bestrahlung der NK-92 Präparate erfolgt entweder vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen. Insgesamt zeigt sich in den Präparaten, welche im Beutel eingefroren werden, eine vergleichbar niedrige Viabilität, wie dieses bei einer Kryokonservierung in Ampullen

der Fall ist. Präparate, die nicht bestrahlt werden, zeigen die höchste Viabilität bei einer DMSO-Konzentration von 3% auf (50% +/- 5,8%) (Abb.8). In diesen NK-92 Präparaten führt eine Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 10% zu keiner Zunahme der Viabilität. Im Gegenteil, nicht bestrahlte Präparate weisen bei 10% DMSO-Lösung eine Viabilität von nur noch 34,4% auf (Abb.8).

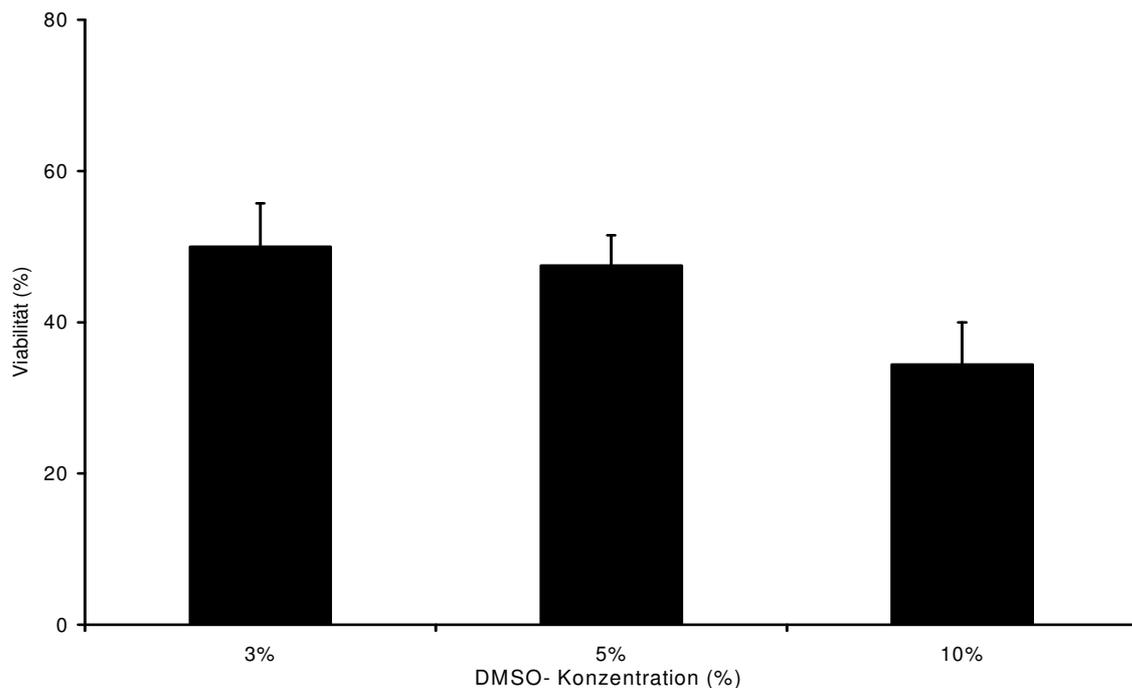


Abb.8: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, unbestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln 5 min nach dem Auftauen

Werden die NK-92 Präparate nach dem Auftauen mit 10Gy bestrahlt und nach einer Inkubation von 15 min im Brutschrank und in Anwesenheit von DMSO die Viabilität bestimmt, zeigt sich eine weitere Abnahme der Viabilität bei allen DMSO-Konzentrationen im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Präparaten. Dieses ist bei allen untersuchten DMSO-Konzentrationen gleich stark ausgeprägt und führt im Mittel zu einer weiteren Abnahme der Viabilität (Abb.9) um 27,8% auf 35,9-34,5% (3 bzw. 5% DMSO) bzw. 21,5% (10% DMSO).

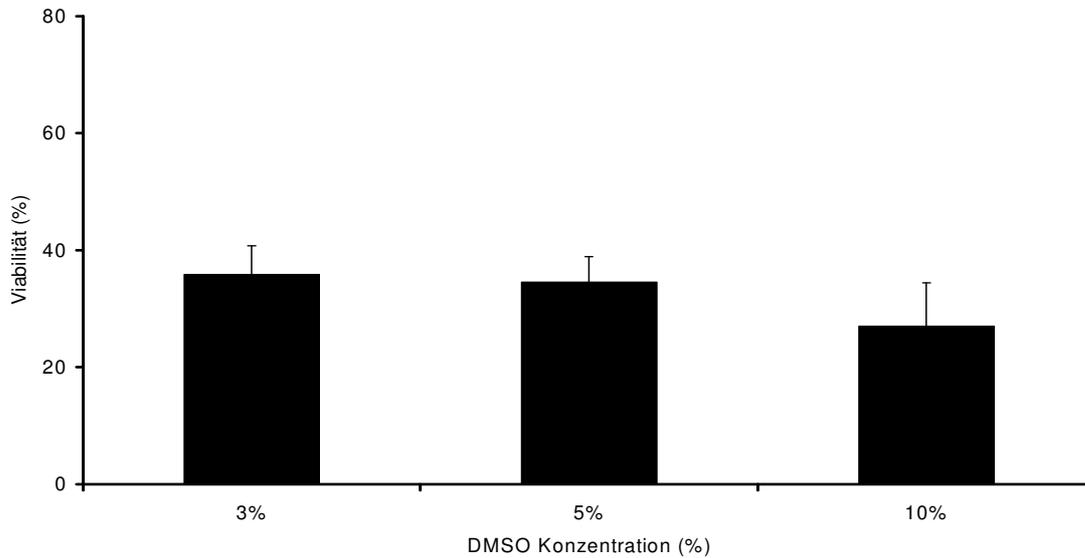


Abb.9: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, im Anschluss an die Kryokonservierung bestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln, 15 min nach dem Auftauen

Eine erneute Bestimmung der Viabilität der NK-92-Zellen, in den gleichen Präparaten nach einer Inkubation von 2h, zeigt eine weitere und deutliche Abnahme der Viabilität auf (Abb.10). Diese ist besonders ausgeprägt, wenn 3 oder 5% DMSO als Gefrierschutzlösung verwendet werden (0 Viabilität bei 3% DMSO, 5,6% bei 5% DMSO). Bei 10% Gefrierschutzlösung, zeigt sich zwar eine zunächst geringere Viabilität in nicht bestrahlten Präparaten (35,8% Viabilität bei 10% DMSO, gegenüber 53,0% und 57,7% Viabilität bei 3 und 5% DMSO), der Einfluss der Bestrahlung auf die Viabilität ist in dieser Gruppe jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie bei 3 und 5% DMSO (Viabilität von 7,8 und 7,2% gegenüber 33,9% Viabilität bei 10% DMSO) (Abb.10).

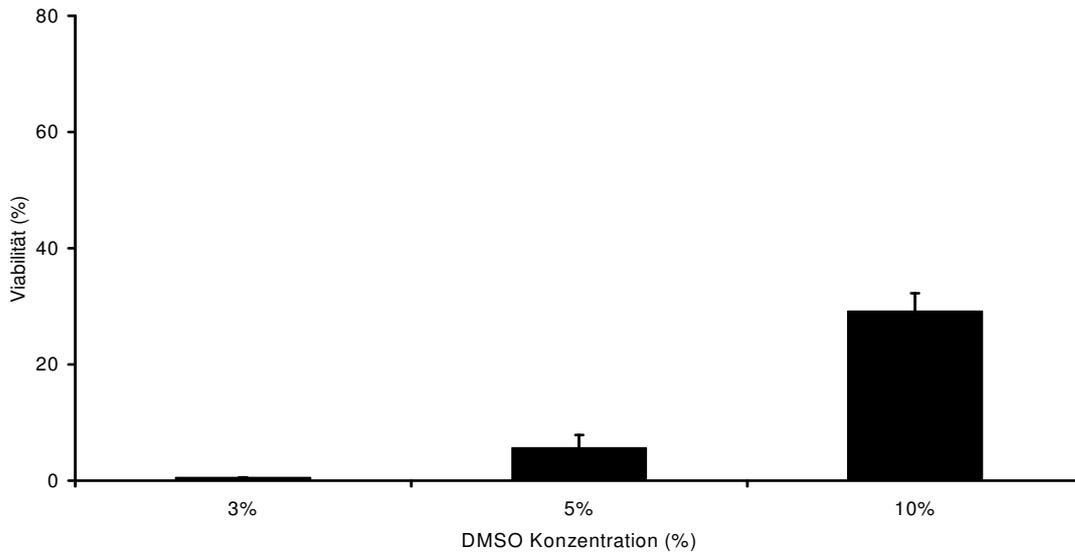


Abb.10: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, im Anschluss an die Kryokonservierung bestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln, nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C im Anschluss an das Auftauen

Werden die Präparate vor der geregelten Kryokonservierung bestrahlt, so ist die Viabilität 15 min nach dem Auftauen zunächst vergleichbar mit nicht bestrahlten Präparaten (Abb.8, 11).

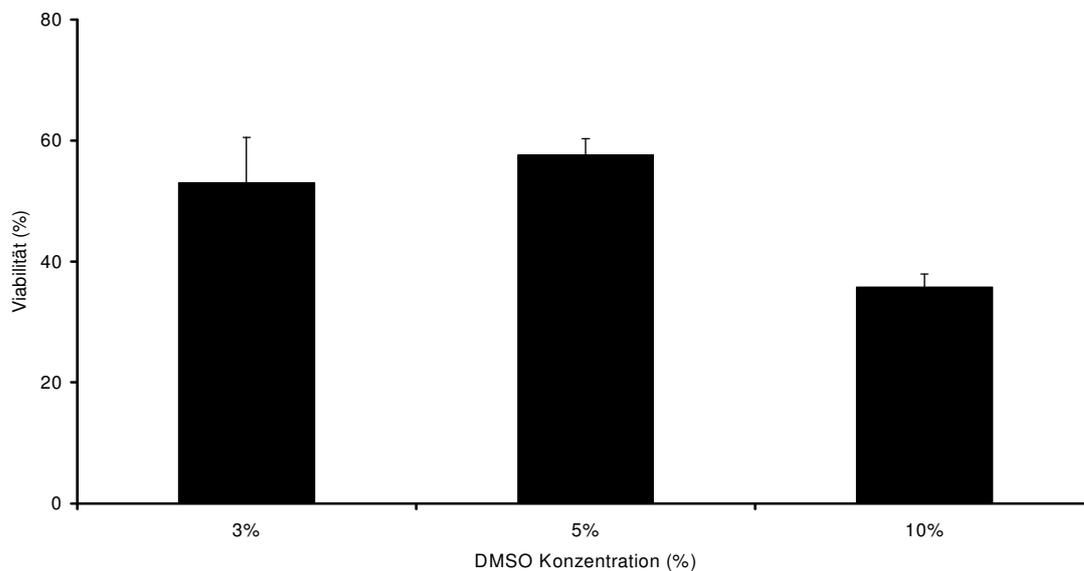


Abb.11: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, vorbestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln, 15 min. nach dem Auftauen

Nach einer weiteren 2-stündigen Inkubation im Brutschrank und in Anwesenheit von DMSO, zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität (s.Abb.12). Zu diesem Zeitpunkt sind nahezu alle NK-92-Zellen tot (93% bei 3 und 5% DMSO).

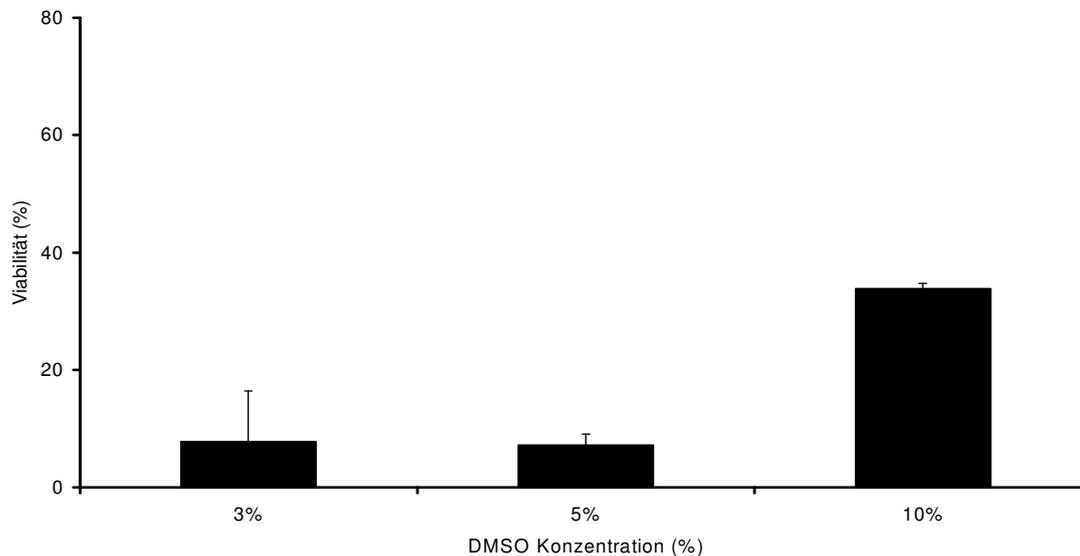


Abb.12: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, vorbestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln, nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C im Anschluss an das Auftauen

Unter den hier untersuchten Bedingungen einer geregelten Kryokonservierung in Beuteln weist eine Kryokonservierung mit einer 10%igen DMSO-Lösung initial die geringste Viabilität nicht bestrahlter NK-92-Zellen auf (Abb.8).

Zieht man jedoch die Viabilität 2h nach Auftauen in Betracht, so wird die höchste Ausbeute vitaler NK-92-Zellen erreicht, wenn die Kryokonservierung mit einer 10%igen DMSO-Lösung durchgeführt wird. Bei dieser DMSO-Konzentration bleibt die Viabilität, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen von 3 und 5% DMSO, nahezu konstant und es kommt zu keinem verzögerten Absterben von NK-92-Zellen (siehe Abb.13). Etwas besser ist in der 10% DMSO-Gruppe die Option, eine Bestrahlung vor der Kryokonservierung vorzunehmen. Hier liegt die mittlere Viabilität nach 2h bei 33,9%, während Präparate, die nach Kryokonservierung bestrahlt werden, zu diesem Zeitpunkt eine Viabilität von 29,2% aufweisen (Abb.13).

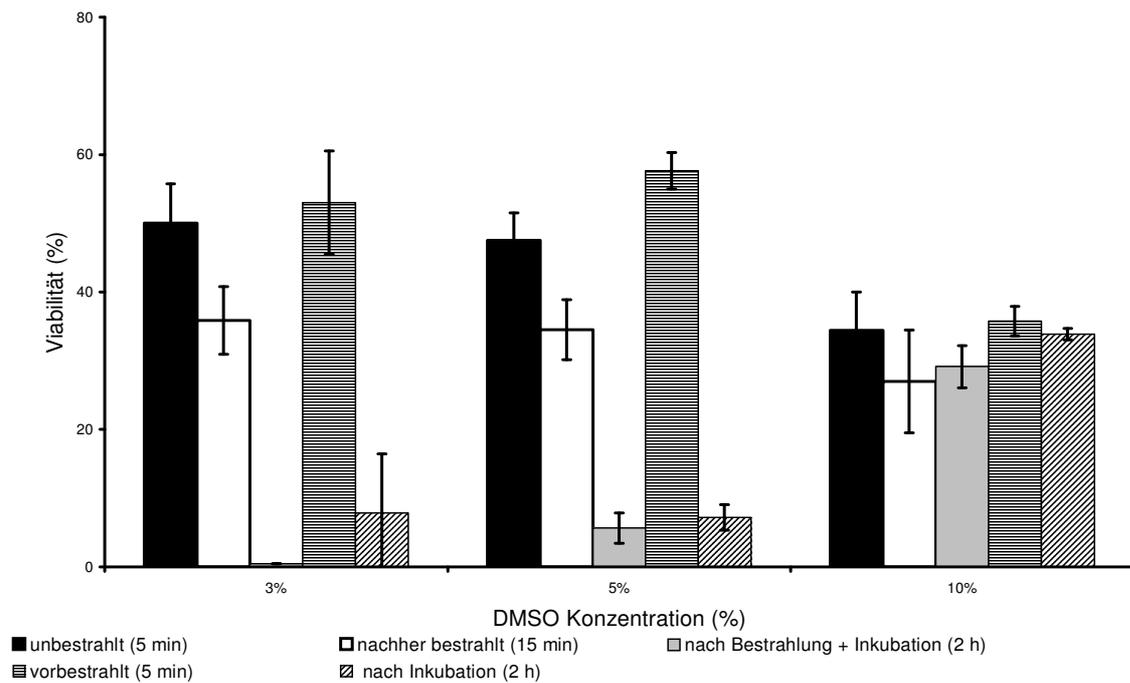


Abb.13: Einfluß der DMSO-Konzentration auf die Viabilität von geregelt eingefrorenen, bestrahlten und unbestrahlten NK-92-Zellen in Beuteln (Zusammenfassung der Abb.8-12)

#### 4.2.5 Einfluß einer Übernacht-Lagerung bei 4 °C auf die zytolytische Aktivität von NK-92-Zellen

Da die Kryokonservierung der NK-92-Zellen unter klinischen Bedingungen in Beuteln mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen ebenfalls nur eine geringe Viabilität von deutlich unter 50% ergibt, wird überprüft, ob eine Kühlung der NK-92-Zellen auf 4 °C eine Alternative zur Kryokonservierung darstellen kann. Hierzu werden die NK-92-Zellen über Nacht im Kühlschrank auf 4 °C abgekühlt. Eine Messung der zytotoxischen Aktivität erfolgte dann nach einer erneuten „Aufwärmphase“ der Zellen in einem CO<sub>2</sub> Brutschrank, wobei die Zeit untersucht werden soll, die benötigt wird, um eine zytotoxische Aktivität von über 50% zu erreichen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität der NK-92-Zellen streng temperaturabhängig ist und dass die komplexen biologischen Abläufe einer Lyse von Tumorzellen durch NK-92-Zellen nur bei einer Temperatur von 37° C erfolgen können. Es wird des weiteren beobachtet, dass nach einer Abkühlung der NK-92-Zellen auf 4°C eine 16-stündige Inkubation bei 37°C notwendig ist um 60% der Ausgangsaktivität wieder herzustellen (Abb.14).

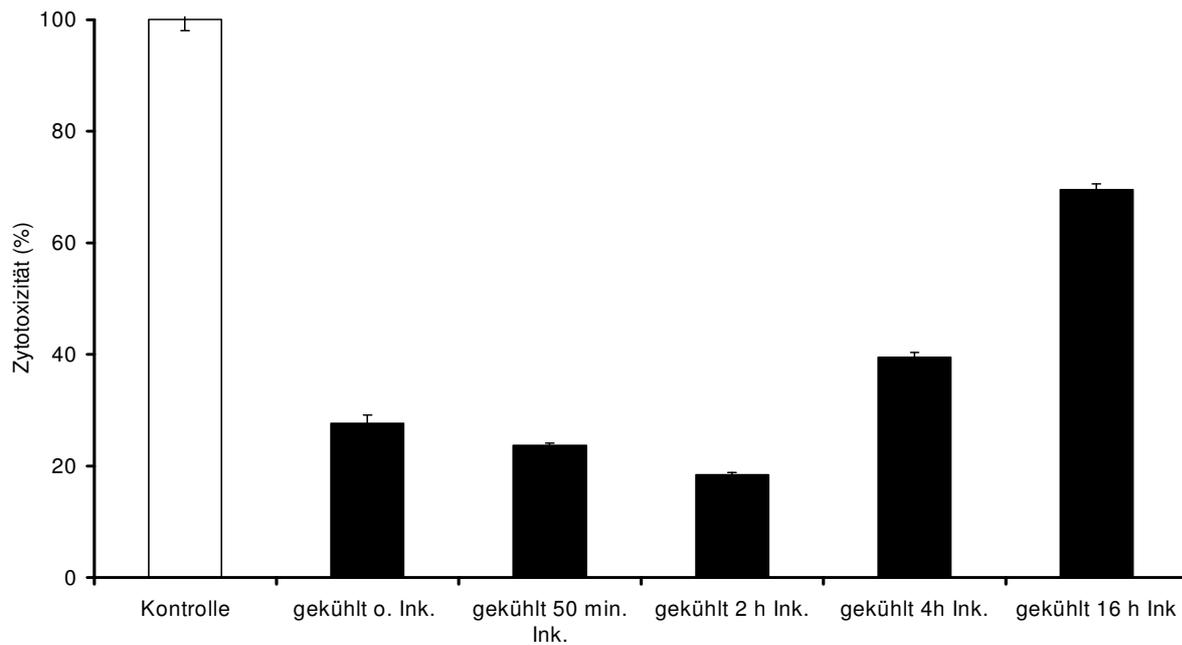


Abb.14: Einfluß einer Übernacht-Lagerung bei 4°C auf die zytotoxische Aktivität von NK-92-Zellen

## **5. Diskussion**

### **5.1 Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab**

#### **5.1.1. Zusammensetzung des Zellkulturmediums**

NK-92-Zellen sind eine von weltweit nur 5 existierenden NK-Zelllinien, welche sich als stabile Zellkultur in Vitro etablieren liessen (Drexler H.G. et al 2000). Während dieses zum einen auch in der relativ niedrigen Inzidenz von NK-Zell-Lymphomen begründet sein mag, so scheint die Zusammensetzung des Zellkulturmediums eine zentrale Rolle in der Kultivierung der NK-92-Zellen zu spielen. NK-92-Zellen wurden seit Beginn ihrer Kultivierung im Jahr 1992 und bis zum Beginn dieser Doktorarbeit in einem Medium kultiviert, welches zu einem hohen Anteil mit tierischen Seren supplementiert war. So benötigten NK-92-Zellen für ihr Wachstum ein Medium, welches zusätzlich 15% fetales Kälberserum (FCS) und 15% Pferdeserum enthielt. In Zellkulturmedien, welche einen geringeren Anteil tierischer Seren aufwiesen oder nur mit einem der beiden tierischen Bestandteile versetzt waren, wuchsen NK-92-Zellen nicht.

Um NK-92-Zellen klinisch einsetzen zu können, war es zunächst notwendig, die Zelllinie an ein Medium zu adaptieren, welches eine Vermehrung der Zellen unter Beachtung der Grundsätze der „Guten Herstellungs-Praxis (GMP)“ erlaubt. Entsprechende Zellkulturmedien sind in der Regel frei von tierischen Bestandteilen und enthalten stattdessen einen geringen Anteil humanen Serumalbumins als Eiweisskomponente. Ein solches Medium, welches seitens der „Federal Drug Administration (FDA)“ für die Expansion von Immunzellen zur klinischen Anwendung im Rahmen von Studien zugelassen ist, stellt das Zellkulturmedium X-Vivo-10 (BioWhittaker, Belgien) dar. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Zusammensetzung dieses Mediums allein nicht ausreicht, um ein Wachstum der NK-92-Zellen zu gewährleisten. Das X-Vivo-10 Medium wurde daher mit hohen Bestandteilen (30%) gefrorenen Frischplasmas (GFP) versetzt, welches als Fertigarzneimittel allen Vorgaben einer „guten Herstellungspraxis“ entspricht. Es zeigte sich, dass NK-92-Zellen in diesem Medium ohne jede Beeinträchtigung der zytolytischen Aktivität und Viabilität konstant vermehrt werden konnten. Durch

langsame Verminderung des Serumbestandteils liessen sich schliesslich Kulturbedingungen etablieren, welche eine Kultivierung von NK-92-Zellen in einem mit 5%-GFP und 100 IE IL-2 supplementierten X-Vivo-10 Medium vorsehen. Da IL-2 als wichtiger Bestandteil des Zellkulturmediums ebenfalls nach GMP-Richtlinien hergestellt sein muss, wurde hier ebenfalls auf das als Fertigarzneimittel verfügbare Proleukin<sup>®</sup> der Firma Chiron zurückgegriffen.

### **5.1.2 Expansion von NK-92-Zellen im klinischen Maßstab**

Eine Behandlung von malignen Erkrankungen durch adoptiven Transfer der hoch zytotoxischen NK-92-Zellen ist, ebenso wie andere immunologische Ansätze, vermutlich dann besonders erfolgversprechend, wenn ein günstiges Verhältnis von Effektorzellen (NK-Zellen) und Target-Zellen (Krebszellen) vorliegt. Eine solche Situation wäre z.B. dann gegeben, wenn eine Therapie mit NK-92-Zellen als Ergänzung zu klassischen Behandlungsmethoden, wie der Chemo- oder Bestrahlungstherapie, in der Situation einer minimalen Resterkrankung zum Einsatz kommt (Klingemann H.G; 2001).

Eine derzeit durchgeführte klinische Studie sieht in einer Phase I die Applikation von je zwei Transfusionen einer Dosis von  $1 \times 10^9$  NK-92-Zellen/m<sup>2</sup> Körperoberfläche vor, steigerbar bis auf  $5 \times 10^9$  Zellen in der höchsten Dosis. Dieses würde bedeuten, dass in der höchsten derzeit vorgesehenen Dosiseskulation bei einem Patienten mit einer Körperoberfläche von 2m<sup>2</sup>,  $2 \times 10^{10}$  NK-92-Zellen benötigt werden. Diese hohen benötigten Zellzahlen verdeutlichen, dass man, um NK-92-Zellen klinisch einsetzen zu können, Methoden etablieren muss, die eine rasche und reproduzierbare Expansion der NK-Zellen unter GMP-gerechten Bedingungen und unter Erhalt der zytolytischen Aktivität gewährleisten.

Ausgehend von einer Zellkonzentration von ca.  $2 \times 10^4$  NK-92-Zellen/ml ließ sich unter den in dieser Arbeit etablierten Kulturbedingungen eine Vermehrung der NK-92-Zellen auf eine Zellzahl von bis zu  $2,1 \times 10^6$ /ml innerhalb von 10 Tagen erreichen. Mit einer im Maximum 33,6-fachen Expansion erwies sich, im Vergleich zu einer Expansion in T-Zellkulturflaschen (22,3-fache Expansion), eine Kultivierung im Nunc-Bioreaktor dabei als überlegen (Abb. 3). Wenn zusätzlich das 40-fach größere

Kulturvolumen des Nunc-Reaktors hinzugezogen wird, ergibt sich, dass ein Nunc-Bioreaktor ausreicht, um in einer 10 Tage dauernden Batchkultur eine Zelldosis von  $2 \times 10^9$  Zellen zu generieren. Dies würde ausreichen, um eine einmalige Applikation von NK-92-Zellen in der ersten Therapiestufe mit der geringsten NK-92-Zelldosis vorzunehmen. Für die höchste Dosisescalation müssten demnach etwa 10 Nunc-Reaktoren angesetzt werden, um eine Dosis von  $2 \times 10^{10}$  Zellen zu erreichen und einen Patienten mit  $2 \text{m}^2$  Körperoberfläche versorgen zu können.

Ein wichtiger Punkt der Expansion ist der Erhalt der zytotoxischen Funktion der NK-92-Zellen. Es zeigte sich, dass die Kultivierung in Nunc-Reaktoren im Batchkulturverfahren keine Beeinträchtigung der Zytotoxizität der NK-92-Zellen gegen die Erythroleukämie-Zelllinie K562 zur Folge hatte. Dies traf auch dann zu, wenn die NK-92-Zellen zusätzlich mit 10Gy bestrahlt wurden, wie es für eine klinische Anwendung notwendig ist, um das Proliferationsvermögen der Zellen zu inhibieren.

Bei der Expansion der NK-92-Zellen wurde bewusst das System einer Batchkultur gewählt. Bei einer Batchkultur wird das Zellkulturmedium mit einer geringen Konzentration von NK-92-Zellen beimpft. Die Kultur wird dann, bis zum Erreichen der maximalen Dichte, nicht mehr eröffnet. Vor dem Hintergrund einer GMP-konformen Herstellung eine Batchkultur muß ein entsprechender Sterilttest zum Zeitpunkt der Etablierung der Kultur angesetzt werden. Da die Sterilkulturen ca. 7 Tage inkubiert werden müssen, bevor sie ein eindeutiges Ergebnis anzeigen, kann man nur bei einer entsprechend langen Batchkultur einen Befund über die Sterilität des hergestellten Zellproduktes schon zum Zeitpunkt des Kulturendes erhalten.

Die Kulturbedingungen für NK-92-Zellen ergaben eine maximale Zelldichte nach ca. 10 Tagen Kulturdauer. Nach Erreichen dieser maximalen Zelldichte nahm die Viabilität und weitere Proliferation der NK-92-Zellen ab. Diese Abnahme ist vermutlich auf den Verbrauch der in dem Kulturmedium enthaltenen Aminosäuren und des supplementierten IL-2 zurückzuführen. Es wäre demnach durchaus denkbar, dass eine weitere Substitution des X-VIVO Mediums mit höheren Aminosäurekonzentrationen eine höhere Zelldichte erlauben würde. Dieses wäre insbesondere dann von Vorteil, wenn sich in den klinischen Studien eine Dosis von bis zu

$2 \times 10^{10}$  c/Therapiezyklus bei einem Patienten mit einer  $2\text{m}^2$  Körperoberfläche ergeben würde. In diesem Fall müssten bei dem hier gewählten Kulturverfahren ca. 10 Nunc-Reaktoren mit insgesamt 20L Zellkulturvolumen angesetzt werden. Da ein 180L  $\text{CO}_2$  Brutschrank 4 Nunc-Reaktoren aufnehmen kann, würden in einem solchen Fall 2,5 Brutschränke pro zu behandelnden Patient benötigt werden. Dieses verdeutlicht, dass, sollte sich die Therapie mit NK-92-Zellen als effektiv gegenüber malignen Erkrankungen erweisen, Verfahren entwickelt werden müssen, die auf der Grundlage der hier erarbeiteten Daten eine Vermehrung der Zellen im industriellen Maßstab ermöglichen würde.

## **5.2. Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung von NK-92-Zellen**

### **5.2.1. Einfluss von DMSO auf die Zytotoxizität von NK-92-Zellen**

Die Einfrierschutzlösung DMSO ist für Zellen toxisch. Es musste daher untersucht werden, welche DMSO-Konzentrationen die zytolytische Aktivität von NK-92-Zellen beeinträchtigen. Es zeigte sich, dass Konzentrationen von 0,5 -2% DMSO im Zellkulturmedium nur zu einer geringeren Beeinträchtigung der Aktivität von NK-92-Zellen gegenüber der K562-Zelllinie führte. Diese Untersuchungen sind wichtig, weil bei dem Ziel einer Herstellung von NK-92-Zellpräparaten mit einer anschließenden Kryokonservierung in den aufgetauten Zellpräparaten relativ hohe Mengen der Einfrierschutzlösung enthalten sind. Die Ergebnisse dieses Experimentes legen nahe, dass NK-92-Zellen, eine erfolgreiche Kryokonservierung vorausgesetzt, nach dem Auftauen auf DMSO-Konzentrationen von  $< 2\%$  verdünnt werden müssen, um die Zytotoxizität der Zellen zu erhalten (Abb. 6).

Die Verminderung der Aktivität von NK-92-Zellen in 2% DMSO-haltigem Medium auf eine 68,5%ige Zytotoxizität, im Vergleich zu einer 83%igen Zytotoxizität in DMSO-freiem Medium, ist annehmbar, da im Falle einer umgehenden Transfusion der Zellen von einer weiteren Verdünnung in der Blutzirkulation des Patienten ausgegangen werden kann.

## **5.2.2 Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen auf die Expression von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren**

Für die funktionelle Aktivität von NK-92-Zellen sind verschiedene Oberflächenrezeptoren wichtig. Diese vermitteln einerseits die Bindung der NK-92-Zellen an die Zielzelle (Adhäsionsmoleküle), andererseits vermitteln sie die Wirkung von NK-92-Zell-aktiven Zytokinen, wie z.B. IL-2 (IL-2-Rezeptor). Auch kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, sind für die zytolytische Aktivität von NK-92-Zellen unabdingbar (Smyth M., 2002). Da DMSO als aggressives Lösungsmittel zu einer Beeinträchtigung der Expression dieser Oberflächenmoleküle und somit letztlich auch zu einer Funktionsbeeinträchtigung der NK-92-Zelle führen könnte, wurde die Ausbildung dieser Oberflächenmarker unter dem Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen gemessen.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt eine relativ stabile Expression der einzelnen Rezeptoren in schwacher bis mittlerer Fluoreszenz, die durch die DMSO-Konzentrationen nicht beeinträchtigt oder hoch reguliert wurden. Die Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen von Letellier überein, der ebenfalls keine Veränderung in der Expression der Oberflächenrezeptoren bei einer Kryokonservierung von primären NK-Zellen beobachtet hat (Letellier C. et al., 1991). In einigen untersuchten NK-92 Proben zeigte sich lediglich eine geringe Abnahme der Expression der IL-2 Rezeptoren CD25 und CD122. Dieser Effekt des DMSO könnte auf Veränderungen der Oberflächenstruktur des Rezeptors zurückzuführen sein, welcher sich letztlich auf die Bindungsaffinität der verwendeten monoklonalen Antikörper auswirkt. Es wäre in einem solchen Fall anzunehmen, dass auch die Bindung von IL-2 vermindert wird, welches eine verminderte Proliferation der Zellen zur Folge haben könnte.

Insgesamt fällt jedoch auf, dass sich hier kein Dosiseffekt nachweisen lässt, d.h. bei zunehmender DMSO-Konzentration zeigt sich eine stärkere Abschwächung der immunologischen Anfärbung der NK-92-Zellen. Dieses deutet darauf hin, dass die beobachteten leichten Unterschiede in der Stärke der IL-2-Rezeptor-Expression auch andere Ursachen haben könnte. So ist die Stärke der Expression von CD25 und CD122 abhängig vom IL-2-Gehalt in der Zellkultur (Maki G et al., 2001). Die gemessenen Unterschiede können somit letztlich auch Abweichungen der IL-2-

Konzentration des Mediums reflektieren, möglicherweise verursacht durch unterschiedliches Wachstum und einem damit einhergehenden IL-2-Verbrauch innerhalb der untersuchten DMSO-Konzentrationen.

### **5.2.3 Viabilität von geregelt eingefrorenen NK-92-Zellen in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration und einer vorherigen Bestrahlung mit 10Gy in Ampullen**

Da, wie bereits beschrieben, eine Kryokonservierung der expandierten NK-92-Zellen für die Verfügbarkeit der Präparate im Rahmen der Zelltherapie von großem Vorteil wäre, wurde der Einfluss der Kryokonservierung bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen auf die Viabilität untersucht. Obwohl für die Kryokonservierung eine geregelte Einfriermaschine verwendet wurde, die die Temperatur unter stetiger Überwachung um 1 °C pro Minute auf bis zu -100 °C absenkte, zeigte sich eine überaus geringe Viabilität der NK-92-Zellen nach dem Auftauen. Die Viabilität bei unbestrahlten Zellen lag zwischen 22,7-39,4%, d.h. 2/3 der Zellen hatten den Einfriervorgang nicht überlebt. Dieser Effekt war noch ausgeprägter, wenn die Zellen vor dem Einfrieren bestrahlt wurden (Viabilität von 18-25%). Zudem liessen sich keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten DMSO-Konzentrationen ausmachen. Die Vitalität lag damit weit unter den normalerweise für Lymphozyten üblichen Werten, bei denen mehr als 80% der Zellen eine Kryokonservierung unter den oben beschriebenen Bedingungen überleben.

Die Kryokonservierung von humanen Lymphozyten ist eine häufig angewandte Methode und findet z.B. im Rahmen der Herstellung und Lagerung von peripheren Blutstammzell-Apheresen häufige Anwendung, ohne Beeinträchtigung des Engraftment-Potentials der Stammzellen (Sputtek A. et al., 1997). In einer früheren Arbeit haben Letellier et. al. primäre LAK-Zellen nach der hier verwendeten Methode eingefroren. In seiner Arbeit zeigten die aufgetauten LAK-Zellen eine durchweg hohe Viabilität nach dem Auftauprozess. Auch die zytotoxische Aktivität der LAK-Zellen war nach 4 Tagen Kultur, im Vergleich zu nicht-kryokonservierten NK-Zellen, nicht beeinträchtigt (Letellier C. et al., 1991).

Schmidt-Wolf et al haben keine Beeinträchtigung durch eine Kryokonservierung von murinen NK-Zellen gefunden. In ihren Experimenten liessen sich immundefiziente Mäuse, die mit einer Prä-B-Lymphomzelllinie inokuliert wurden, erfolgreich mit NK-Zellen behandeln, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor kryokonserviert waren (Schmidt- Wolf I.G. et al., 1992).

#### **5.2.4 Einfluss der DMSO-Konzentration und der Bestrahlung auf die Viabilität von im klinischen Maßstab eingefrorenen NK-92-Zellen**

Nachdem die oben beschriebenen Ergebnisse eines Einfrierens von NK-92-Zellen im Labormaßstab, d.h. in Ampullen, keine befriedigenden Ergebnisse ergaben, sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse durch eine Kryokonservierung in speziellen Einfrierbeuteln verbessern liessen. Beutelsysteme bieten gegenüber Ampullen den Vorteil einer geringeren Wanddicke. Der Beutelinhalt wird darüber hinaus in speziellen Metallbehältnissen schon während der Kryokonservierung recht eng aneinander gepresst, wodurch sich eine relativ geringe Schichtdicke des Präparates ergibt. Beide Faktoren tragen letztlich zu einer schnelleren und effektiveren Abkühlung des Präparates bei.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass sich, unabhängig von der DMSO-Konzentration und unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung, auch im Beutel keine akzeptierbare Viabilität der kryokonservierten NK-92-Zellen erreichen ließ. Die Zellen, die ohne Bestrahlung eingefroren wurden, zeigten zwar eine etwas höhere Viabilität von 50% bei einer DMSO Konzentration von 3%, eine nachträgliche Bestrahlung führte jedoch zu einem weiteren raschen Absterben der verbliebenen NK-92-Zellen. Dieses weist darauf hin, dass die NK-92-Zellen nach dem Einfriervorgang eine relativ höhere Strahlensensitivität aufweisen als frische, nicht eingefrorene Zellen.

Es erstaunt zunächst, dass sich NK-92-Zellen, im Gegensatz zu primären NK-Zellen, nicht einfrieren lassen. Es kann allerdings durchaus sein, dass dies auf Faktoren zurückzuführen ist, die durch den besonderen zellulären Hintergrund der NK-92-Zellen hervorgerufen werden. NK-92-Zellen sind, wie in der Einleitung bereits beschrieben, maligne entartete Zellen, die von einem Patienten isoliert wurden, der

an einem Non-Hodgkin-Lymphom litt. NK-92-Zellen weisen mehrere Chromosomenaberrationen auf. Es ist anzunehmen, dass die Genregulation der NK-92-Zellen, aufgrund der Malignität der Zelle und der langen Zellkulturdauer, von der Regulation primärer NK-Zellen verschieden ist. So könnten Gene aktiv sein, die in primären NK-Zellen nicht aktiv sind und letztlich eine verminderte Resistenz der Zellen gegenüber einer Kryokonservierung vermitteln.

Nicht alle Zelltypen lassen sich problemlos einfrieren. Während sich, wie oben erwähnt, Lymphozyten, zu denen auch NK-Zellen zählen, im allgemeinen sehr gut einfrieren lassen, sind insbesondere Granulozyten nahezu nicht zu kryokonservieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Kryokonservierung von Granulozyten zu einer Recovery von nur 58% der eingesetzten Zellen führte (Richman C.M., 1983). NK-92-Zellen sind große granuläre Zellen, die in ihrer Morphologie Granulozyten ähneln. Ebenso wie in der Arbeit von Richman ließ sich unter optimalen Einfrierbedingungen eine Recovery von 50% erzielen. So könnte es sein, dass NK-92-Zellen auch weitere Eigenschaften mit Granulozyten vereinen, die für die geringe Resistenz gegenüber der Kryokonservierung verantwortlich sein könnten.

### **5.3 Konzept einer Expansion und Herstellung von NK-92-Zellen unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse**

Für eine therapeutische Applikation von NK-92-Zellen, bei der Patienten bis zu  $10^{10}$  Zellen je Anwendung transfundiert werden sollen, ist es nicht denkbar, ein Zellpräparat zu applizieren, welches zu mehr als 20% aus toten Zellen besteht. Damit NK-92-Zellen in dem Patienten einen therapeutischen Effekt ausüben können, ist es notwendig, dass sie über die Blutbahn in die befallenen Organe einwandern und hier aktiv eine zytotoxische Immunantwort gegen die Tumorzellen ausüben.

Würde man ein Zellpräparat transfundieren, welches zu einem hohen Prozentsatz und dazu in großer Zahl aus toten, großen, granulären Lymphozyten besteht, so würden diese Zellen vermutlich einerseits über die Milz abgebaut, andererseits könnten sich aber auch ernsthafte Komplikationen durch z.B. die Verlegung kleinster

Gefäße (z.B. in der Lunge) ergeben. Eine Kryokonservierung von NK-92-Zellen stellt somit keine Option für eine Herstellung und Lagerung von NK-92-Zellen, im Rahmen einer therapeutischen Anwendung von NK-92-Zellen, dar. Es muss daher ein Prozedere gewählt werden, welches eine Transfusion von frischen, expandierten NK-92-Zellen vorsieht.

## 6. Zusammenfassung

Die natürliche Killerzelllinie NK-92 zeichnet sich durch eine breit gefächerte Aktivität gegen verschiedenste Tumore und Leukämien aus und würde sich daher prinzipiell für eine Verwendung als adoptives Zelltherapeutikum eignen. NK-92-Zellen sind eine von nur 5 etablierten NK-Zelllinien weltweit. Ihr Wachstum in der Zellkultur war bisher von Bedingungen abhängig, die mit einer klinischen Anwendung der Zellen nicht zu vereinbaren sind.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es daher, ein Kulturverfahren zu etablieren, mit dem sich NK-92-Zellen unter Bedingungen einer „Guten Herstellungs Praxis“ kultivieren und expandieren lassen. In dieser Arbeit wurde daher die Adaption der NK-92-Zellen an ein in der Klinik einsetzbares Zellkulturmedium vorgenommen und ein Batch-Kulturverfahren entwickelt, mit dem sich die NK-92-Zellen innerhalb von 10-14 Tagen auf bis zu  $10^{10}$  Zellen in 10L Kulturvolumen expandieren lassen. Die Funktionsprüfung der NK-92-Zellen, anhand der Expression von immunologisch relevanten Oberflächenrezeptoren (CD11a, CD25, CD28, CD54, CD56, CD122, FAS-L), ergab keine Veränderung des Phänotyps der expandierten Zellen. Darüber hinaus wiesen die Zellen eine Viabilität von  $>95,3\% \pm 0,46\%$  auf, und ihre zytotoxische Aktivität gegen die NK-sensitive Leukämiezelllinie K562 war nicht eingeschränkt.

Da NK-92-Zellen in der Erkennung virusinfizierter und maligner Zellen nicht MHC-restringiert sind, eignen sie sich auch für den ungerichteten Einsatz. Hierzu wäre eine Expansion der Zellen im großen Massstab mit anschließender Kryokonservierung von Vorteil, da die Zellen dann im Voraus hergestellt und geprüft werden könnten. Die Prüfung des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8 10 %) der Einfrierschutzlösung Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die zytotoxische Aktivität der NK-92-Zellen ergab keine Einschränkung der NK-Zellfunktion bei Konzentrationen  $< 5\%$ . Es wurden daraufhin verschiedene Einfrierprotokolle und deren Einfluss auf die Viabilität der NK-92-Zellen untersucht. NK-92-Zellen wurden mit 2, 3, 5 8 und 10% DMSO in humanem Serum Albumin (HSA) in Ampullen, oder aber im klinischen Masstab ( $5 \times 10^8$  Zellen/ 20ml HSA) mit 3, 5 und 10% DMSO eingefroren und ihre Viabilität nach dem Auftauen untersucht. Im Mittel

ergab sich für alle Zellpräparationen und DMSO Konzentrationen eine relativ geringe Viabilität der Zellen nach dem Auftauen ( $<50\% \pm 9,77$ ). Hierbei war es unerheblich, ob die für eine klinische Anwendung der allogenen NK-92-Zellen notwendige Bestrahlung mit 10GY vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen durchgeführt wurde (Viabilität 48,8% versus 44%).

Aus den in dieser Dissertation erarbeiteten Daten wurde schliesslich ein Konzept zur Expansion der NK-92-Zellen entwickelt, welches ihren klinischen Einsatz, unter Erhalt der Funktionalität bei höchstmöglicher Sicherheit für den Patienten, erlaubt. Dieses Konzept geht von einer Expansion der NK-92-Zellen, ausgehend von einer Masterzellbank, in 2L Batchkulturen im Nunc-Wannenstapel-System aus. Die Kulturen werden mit  $2 \times 10^4$  NK-92-Zellen/ml X-Vivo 10 Medium, 5% hitzeinaktiviertem humanen Plasma und 100IE IL-2 beimpft. Nach 10 Tagen haben die Kulturen ihre höchste Dichte ( $6,4 \times 10^5$ /ml) erreicht.

## 7. Conclusion

The natural killer-cell line NK-92 is characterized by a broad activity against different leukaemias and solid tumors and would therefore, in principle, be suitable to be used as an adoptive anticancer cellular therapeutic. NK-92 cells are one out of only 5 worldwide established NK cell lines. However, their expansion in cell culture was, until now, dependent on conditions that are not in compliance with the standards for good manufacturing practice as necessary for clinical use.

Therefore, the goal of this thesis was to establish a culture method that allows the culture and expansion of the NK-92 cells under conditions compliant with the standards of "good manufacturing practice, GMP". In this work, NK-92 cells were adapted to a cell culture medium that is suitable for clinical use. Moreover, based on a "Batch-culture" method an expansion protocol was developed that allows the harvest of up to  $10^{10}$  cells in 10L culture volume within 10-14 days of expansion. The functional characterization of expanded NK-92 cells showed no changes in the expression pattern of relevant immunological surface receptors (CD11a, CD25, CD28, CD54, CD56, CD122, FAS-L). In addition, the cells showed very good viability  $>95,3\% \pm 0,46\%$ , and no impairment with regard to their cytotoxic activity against the NK-sensitive leukemia cell line K562.

Since the immune response of NK cells against virus infected or malignant cells is not MHC-restricted, they thus hold the option for a readily available "off the shelf" anti-cancer cell therapy. For this, an expansion of the cells on a large scale basis with concomitant cryoconservation would be of advantage and allow the in advance production of NK-92 batches with defined quality.

The examination of the influence of different concentrations (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8 10 %) of the freezing solution Dimethylsulfoxid (DMSO) on the cytotoxic activity of the NK-92 cells, revealed that concentrations of  $<5\%$  had no impact on the NK cell function. As a result, different freezing protocols were examined with regard to their influence on the viability of NK-92 cells. The NK-92 cells were cryopreserved in cryovials with 2, 3, 5, 8 and 10% DMSO in human serum albumin (HSA), respectively. Clinical scale doses of NK-92 ( $5 \times 10^8$  cells/20ml HSA) were

cryopreserved in freezing bags with 3, 5 and 10% DMSO, respectively. After thawing NK-92 cells were tested for their viability. Overall, the cryopreservation and thawing of NK-92 cells resulted in considerably low viabilities irrespective of freezing protocol and/or DMSO concentration used, with mean viabilities of  $< 50\% \pm 9,77$ .

For a clinical application, NK-92 cells have to be irradiated with 10 Gy. It was of no significance for the viability of cryopreserved NK-92 cells, whether the irradiation was performed before freezing or after thawing (Viability 48,8% vs. 44%).

Based on this thesis, a concept was developed that allows the expansion of NK-92 cells to clinical scale, resulting in functional highly active NK-92, while providing utmost safety standards for the patients. Starting from a master cell bank, this concept assumes the expansion of NK-92 cells in 2L Nunc-Cellfactory® culture flasks under batch culture conditions. The cultures are initiated with  $2 \times 10^4$  NK-92 cells/ml in X-Vivo10 Medium, supplemented with 5% fresh frozen plasma (FFP) and 100 IE IL-2. On day 10 the batch cultures have reached their maximum density ( $6,4 \times 10^5$ /ml).

## 8. Literaturverzeichnis

Asai O., Longo D.L., Tian Z.G., Hornung R.L., Taub D.D., Ruscetti F.W., Murphy W.J.: Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998 May 1; 101: 1835-1842

Ashmore L.M., Shopp G.M. Edwards B.S.: Lymphocyte subset analysis by flow cytometry: Comparison of three different straining techniques and effects of blood storage. *J. Immunol. Methods* 1989; 118: 209-215

Becker N., Wahrendorf J.: Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 3. Auflage

Becton-Dickinson GmbH: FACScan Handbuch, Heidelberg 1988

Bendelac A., Rivera M.N., Park S.H., Roark J.H.: Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535-562

Bennett M.: Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv Immunol* 1987; 41: 333-445

Benyunes M.C., Higuchi C., York A., Lindgren C., Thompson J.A., Buckner C.D., Fefer A.: Immunotherapy with interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma: a feasibility trial. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 283-288

Benyunes M.C., Masumoto C., York A., Higuchi C.M., Buckner C.D., Thompson J.A., Petersen F.B., Fefer A.: Interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cell as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1993;12(2):159-163

Berthou C., Michel L., Soulie A., Jean-Louis F., Flageul B., Dubertret L., Sigaux F., Zhang Y., Sasportes M.: Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. *J Immunol* 1997; 159: 5293-5300

Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev. Immunol* 1999; 17: 189-220

Boll I., Heller S.: *Praktische Blutzellendiagnostik. Band 7 Instand Schriftenreihe*, Springer Verlag, Berlin, 1992

Burkowski J.F. et al.: Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1985; 161: 40-52

Burshtyn D.N., Scharenberg A.M., Wagtmann N., Rajagopalan S., Berrada K., Yi T., Kinet J.P., Long E.O.: Recruitment of Tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitory receptor. *Immunity* 1996; 4: 77-85.

Chiorean E.G., Miller J.S.: State of the Art Review: The biology of Natural Killer cells and implications for therapy and human disease. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2001; 10: 451-463

Delves P.J., Ph.D., Roitt I.M., D.Sc.: *Advances in Immunology: the Immun System*. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 37-49

Eckhardt R.: *Grundlagen der Durchflußzytometrie. Handbuch Coulter® Epics® Systeme für die Durchflußzytometrie*, Krefeld, 1997

François C., Sorel M., Cherel M., Brailly H., Minvielle S., Blanchard D., Jaques Y.: Immunological characterization of antigenic domains on human IL-2 receptor beta subunit: epitope-function relationships. *Int. Immunol.* 1995; 7: 1173-1181

Fujimiya Y., Suzuki Y., Katakura R., Ohno T.: Injury to autologous normal tissues and tumors mediated by lymphokine-activated killer (LAK) cells generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells of glioblastoma patients. *J Hematol* 1999; 8:29-37.

Galle P.R., Hoffman W.J., Walczak K.: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182: 1223-1230

Gentilucci U.V., Santini D., Picardi A., Vincenzi B., Riva E., Bianchi A., Tonini G.: Liver cirrhosis after prolonged therapy with IFN-alpha plus Interleukin-2 in a metastatic renal cancer long-term survivor. *J. Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 683-688

Ghosh P., Komschlies K.L., Cippitelli M., Longo D.L., Subleski J., Ye J., Sica A., Young H.A., Wiltrout R.H., Ochoa A.C.: Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1478-1483

Gong J.H., Maki G., Klingeman H.G.: Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652-658

Greenberg P.D., Cheever M.A., Fefer A.: H-2 restriction of adoptive immunotherapy of advanced tumours. *J.Immunol.* 1981; 126: 2100-2103

Greenberg P.D.: Adoptive T cell therapy of tumours: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumour cells. *Adv. Immunol* 1991; 49: 281-355

Gregory C.D., Murray R.J., Edwards C.F., Rickinson A.B.: Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 1988; 167: 1811-1824

Grimm E., Robb, R., Roth J., Neckers L., Lachman L., Wilson D., Rosenberg S.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon: III. Evidence that IL-2 is sufficient for

direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine activated killer cells. J. Exp. Med. 1983; 158: 1356-1361

Grimm E.A., Mazumder A., Zhang H.Z., Rosenberg S.A.: The lymphokine activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med. 1982; 155: 1823-1841

Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J.: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science 1996; 274:1363-1366

Han P., Story C., McDonald T., Mrozik K., Snell L.: Immune escape mechanisms of childhood ALL and a potential countering role for DC-like leukemia cells. Cytotherapy 2002; 4: 165-175

Hemeler M.E., Malissen B., Rebai N., Liabeuf A., Mawas C., Kourilsky F.M., Strominger J.L.: A 55,00 Mr surface antigen on activated human T lymphocytes defined by a monoclonal antibody. Human Immunology 1983; 8: 153-165

Hercend T., Griffin J.D., Bensussan A., Schmidt R.E., Edson M.A., Brennan A., Murray C., Daley J.F., Schlossman S.F., Ritz J.: Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. J Clin Invest 1985; 75: 932-943

Heslop H.E.: Cytokine gene transfer in the therapy of malignancy. Baillieres Clin Haematol 1994; 7: 135-151

Hoffman D.M., Gitlitz B.J., Beldegrun A., Figlin R.A.: Apoptive cellular therapy. Semin. Oncol. 2000; 27: 221-233

Horan P.K., Melnicoff M.J., Jensen B.D., Slezak S.E.: Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* 1990; 33: 469-490

Horan P.K., Slezak S.E.: Stable cell membrane labelling. *Nature* 1989; 340: 167-168

Hui K., Grosveld F., Festenstein H.: Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984 Oct 25-31;311(5988):750-752

Ida H., Robertson M.J., Voss S., Ritz J., Anderson P.: CD94 ligation induces apoptosis in a subset of IL-2-stimulated NK cells. *J Immunol* 1997; 159: 2154-2160

Janeway C.A., Travers P.: *Immunologie*. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 1997

Kalina U., Kauschat D., Koyama N., Nuernberger H., Ballas K., Koschmieder S., Bug G., Hofmann W.K., Hoelzer D. and Ottmann O.G.: IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN- $\gamma$  production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinase p44erk-1 and p42erkk-21. *J Immunol* 2000; 165: 1307-1313

Kimura H., Yamaguchi Y.: A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or non curative resection of primary lung carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 42-49

Klingemann H.G., Wong E. and Maki G.: A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Bone Marrow Transplant* 1996; 2: 68-75

Lanier L.L., Warner N.L.: Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J. Immun. Meth.* 1981; 47: 25-30

Lanier L.L., Spits H., Phillips J.H.: The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol. Today* 1992; 13: 392-399

Lanier L.L.: NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 359-393

Letellier C., Ramelarisson L., Fizet D., Ferrer A.M., Vezon G. : The influence of cryopreservation on activity and surface markers of lymphokine-activated killer cells. *Vox Sang.* 1991; 61: 90-95.

Lotze M.T., Grimm E.A., Mazumder A., Strausser J.L., Rosenberg S.A.: Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor (TCGF). *Cancer Res.* 1981; 41: 4420- 4425

Lozzio C.B., Lozzio B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1974; 45: 321-334

Makgoba M.W., Sanders M.E., Ginther Luce G.E., Dustin M.L., Springer T.A., Clark E.A., Mannoni P., Shaw S.: ICAM-1a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 1988; 331: 86-88

Maki G., personal communication with Tonn T., 2001

Maraninchi D, Vey N., Viens P., Stoppa A. M., Archimbaud E., Attal M., Baume D., Bouabdallah R., Demeoq F., Fleury J., Michallet M., Olive D., Reiffers J., Sainty D., Tabilio A., Tiberghien P., Brandely M., Hercend T., Blaise D.: A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed refractory acute leukemia. *Leuk lymphoma* 1998; 31(3-4):343-349

McCabe M., Stablein D., Hawkins M.J.: The modified groupe C experience-phase III randomized trials of IL-2 versus IL-2/LAK in advanced cell cancer and advanced melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1991; 10: 213

McMichael A.J., Goth F.M.: T-cell antigens: new previously defined clusters:in leucocyte typing III. Oxford University Press 1987; 30-62

Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L.: *Flow Cytometry and Sorting*, 2. Aufl. Verlag Wiley-Lyss, New York 1990

Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R., Mingari M.C., Moretta L.: Receptors for HLA-class I-molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 619-648

Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R., Mingari M.C., Moretta L.: Receptors for HLA-class I-molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 619-648

Moretta L., Bottino C., Pender D., Mingari M.C., Biassoni R. and Moretta A.: Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 1205-1211

Mulé J.J., Shu S., Schwarz S.L., Rosenberg S.A.: Adoptive immunotherapy of established pulmonary Metastases with LAK cells and recombinant Interleukin-2. *Science* 1984; 225:1487-1489

Nawrocki S., Mackiewicz A.: Genetically modified tumour vaccines-where we are today. *Cancer treatment Reviews* 1999; 25: 29-46

Nunès J., Klasen S., Ragueneau M., Pavon C., Couez D., Mawas C., Bagnasco M., Olive D.: CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events. *International Immunology* 1993; 5: 311-315

Papa M.Z. Mule J.J., Rosenberg S.A.: Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: successful immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly immunogenic and nonimmunogenic murine tumors of three distinct histological types. *Cancer Res* 1986; 46: 4973-4978

Pardoll D.M.: Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement* 1998; 4: 525-531

Pellicci D.G., Hammond K.J., Uldrich A.P., Baxter A.G., Smyth M.J., Godfrey D.I.: A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-) CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 2002; 195: 835-844

Pende D., Parolini S., Pessino A., Sivori S., Augugliaro R., Morelli L., Marcenaro E., Accame L., Malaspina A., Biassoni R., Bottino C., Moretta L., Moretta A.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity by human natural killer cells. *J. Exp. Med* 1999; 190: 1505-1516

Pessino A., Sivori S., Bottino C., Malaspina A., Morelli L., Moretta L., Biassoni R., Moretta A.: Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 953-960

Pulvertaft R.J.: Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* 1964; 1: 238-240

Raulet D.: Regulation of the natural killer cell receptore. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 9001- 9010

Reid G.S., Bhayra S., Klingemann H.G., Schultz K.R.: Differential killing of pre- B acute lymphoblastic leukemia cells by activated NK cells and the NK-92 ci cell line. *Clin Exp Immunol* 2002; 129(2): 265-271

Restifo N.P., Esquivel F., Kawakami Y., Yewdell J.W., Mule J.J., Rosenberg S.A., Bennink J.R.: Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 265-272

Richman C.M.: Prolonged cryopreservation of human granulocytes. *Transfusion* 1983; 508-511

Richman CM. : Prolonged cryopreservation of human granulocytes. *Transfusion.* 1983 Nov-Dec;23(6):508-11.

Robertson M.J., Ritz J.: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421-2438

Rodewald H.R., Moingeon P., Lucichi J.L., Dosiou C., Lopez P., Reinherz E.L.: A population of early fetal Thymocytes expressing FcγRII/III contains precursors of T-lymphocytes and natural killer cells. *Cell* 1992; 69: 139-149

Rosen F.S., Cooper M.D., Wedgwood R.J.: The primary immunodeficiencies. *N. Eng. J. Med.* 1995; 333: 431-440

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *New.Engl. J. Med.* 1987; 316: 889-897

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T., et al.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-1492

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T. et al.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-1492

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Yang J.C., Aebersold P.M., Linehan W.M., Seipp C.A., White D.E.: Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989; 210: 474-484

Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumourinfiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233: 1318-1321

Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Shlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassoni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A.: Effectiveness of donor

natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-2100

Schmidt- Wolf I.G., Aihara M., Negrin R.S., Blume K.G., Chao N.J.: In vitro and in vivo activity of murine lymphokine-activated killer cells after cryopreservation. *Transfusion*. 1992; 32: 42-45.

Schreiber H., Ward P.L., Rowley D.A., Stauss H.J.: Unique tumour specific antigens. *Ann. Rev. Immunol.* 1988; 6: 465-483

Shiku H., Takahasi T., Oettingen H.F.: Cell surface antigen of human malignant melanoma. *J.Exp. Med.* 1976; 144: 873-881

Shimizu K., Shen F.W.: Role of different T cell set in the rejection of syngeneic chemically induced tumours. *J.Immunol.* 1979; 122: 1162-1165

Sivori S., Vitale M., Morelli L., Sanseverino L., Augugliaro R., Bottino C., Moretta L., Moretta A.: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. *J.Exp. Med.* 1997; 186: 1129-1136

Smith K.A.: The biomolecular structure of the IL-2 receptor. *Imunology Today* 1988; 9: 36

Smyth M.J., Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H. : New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002;2 :850-861.

Sputtek A., Jetter S., Hummel K., Kuhn P.: Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques. *Beitr. Infusionsther. Transfusiosmed.* 1997; 34: 79-83

Strand S., Hofmann W.J., Hug H., Muller M., Otto G., Strand D., Mariani S.M., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R.: Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-a mechanism of immune evasion? *Nat. Med* 1996;2:1361-1366

Tam Y.K., Maki G., Miyagawa B., Hennemann B., Tonn T., Klingemann H.G.: Characterization of genetically altered, interleukin-2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Human Gene Therapy* 1999; 10: 1359-1373.

Tam Y.K., Miyagawa B., Ho V.C., Klingemann H.G.: Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *J Hematother* 1999; 8: 281- 290

Tas J., Westerneng G.: Reagent for the fluorescent staining of nucleid acids. *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29: 929

Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med* 1981; 153: 569-582

Tonn T., Becker S., Esser R., Schwabe D., Seifried E.: Cellular Immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK- 92. *J Hematother. Stem. Cell Res.* 2001; 10: 535-544

Uchichowski P., Schmidt R.E.: "Cluster Report CD11" in *Leucocyte Typing IV.* Oxford University Press, 1989; 543-551

Ueda Y., Yamagishi H., Tanioka Y., Fujiwara H., Fuji N., Itoh T., Fujiki H., Yoshimura T., Oka T.: Clinical application of adoptive immunotherapy and IL-2 for the treatment of advanced digestive tract cancer. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1274-1279

Uherek C., Tonn T., Uherek B., Becker S., Schnierle B., Klingemann H.G., Wels W.: Retargeting of natural killer-cells cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*, Vol. 2002; 100, No.4, 1265- 1273

Ullum H., Gotzsche P.C., Victor J., Dickmeiss E., Skinhoj P., Pedersen B.K.: Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 789-799

Waldmann T.A.: The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem* 1989; 58: 875-911

Wallich R., Bulbuc N., Hammerling G.J., Katzav S., Segal S., Feldman M.: Abrogation of metastatic properties of tumour cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 1985 May 23-29; 315(6017):301-305

Whiteside T.L., Herberman R.B.: Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 1994; 1: 125-133

Whiteside T.L., Vujanovic N.L., Herberman R.B.: Natural killer cells and tumour therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1998; 230: 221-244

Yan Y., Steinherz P., Klingemann H.G., Dennig D., Childs B.H., McGuirk J., O'Reilly R.J.: Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemia. *Cell Cancer Res* 1998; 4: 2859- 2868

Yan Ying, Steinherz P., Klingemann H.-G., Denning D., Barrett H.C., McGuirk J., O'Reilly R.: Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin. Can. Res.* 1998; 4: 2859-2868

Yokoyama W.M., Seaman W.E.: The Ly49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 613-635

Yokoyama W.M., Seaman W.E.: The Ly49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 613-635

Yron I., Wood T.A. Jr., Spiess P.J., Rosenberg S.A.: In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. J Immunol 1980;125:238-245

Zeis M., Uharek L., Glass B., Gaska T., Gassmann W., Mueller-Ruchholtz W.: Induction of graft-versus-leukemia (GVL) activity in murine leukemia models after IL-2 pretreatment of syngeneic and allogeneic bone marrow grafts. Bone Marrow Transplant 1994; 14: 711-715

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. E. Seifried danke ich für die Überlassung des hoch interessanten Themas der vorliegenden Dissertationsarbeit und seine stets wohlwollende Unterstützung. Die Beschäftigung mit dieser Thematik hat mir den Zugang zur wissenschaftlichen Denk- und Arbeitsweise eröffnet und Freude an der wissenschaftlichen Arbeit bereitet.

Herrn Dr. med. T. Tonn danke ich für die große Sorgfalt und Geduld, mit der er mich während Höhen und Tiefen der Dissertation betreut und begleitet hat. Für die vielen Stunden der Diskussion gilt mein besonderer Dank. Für die vorbehaltlose Integration in die Arbeitsgruppen und die andauernde Unterstützung danke ich ganz besonders.

Herrn Dr. rer. nat. S. Becker möchte ich ebenfalls für seine Hilfsbereitschaft danken. Ebenso haben mir seine wertvollen Tipps zur Durchführung der Experimente so manches Mal große Hilfe geleistet.

Frau Dr. rer. nat. R. Esser und Stefanie Grohal danke ich ebenfalls ganz herzlich für die Einführung in die Handhabung und die Pflege unterschiedlichster Zellkulturen

## 10. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN:

Julia- Alexandra Adams, geb. Riesenkampff  
geb. am 30. Juli 1973 in München,  
seit 22. Dezember 2003 verheiratet mit Christian Adams,  
27.Mai 2004 Geburt einer Tochter

### SCHULBILDUNG:

1980-1984 Grundschule am Stadtpark, Lübeck  
1984-1987 Gymnasium Ernestinen-Schule, Lübeck  
1987-1991 Gymnasium Johanneum, Lübeck  
1991-1994 Gymnasium Kreuzgasse, Köln  
Abschluß: Abitur Juni 1994

### STUDIUM:

10/95-02/97 Studium der Rechtswissenschaften an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt  
10/96-03/98 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt  
08/98 Ärztliche Vorprüfung  
10/98-04/01 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt  
4/99 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
4/01 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/01-03/02 Praktisches Jahr  
Klinik der Inneren Medizin und Klinik der Chirurgie, Kliniken des Main-Taunus-Kreises GmbH Hofheim und Bad Soden,

Augenheilkunde (Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt)

03.05.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **BERUF:**

15.10.2002 Beginn des Arzt im Praktikum in der Augenklinik des St. Joseph Stiftes zu Bremen

15.4.2003 Weiterführung des Arzt im Praktikum in der Augenklinik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt

14.04.2003 Abschluss des Arzt im Praktikum in der Augenklinik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt

seit 10/2003 Dozententätigkeit an der staatlichen Schule für Kranken-/Kinderkrankenpflege der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

### **STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN:**

1996 Krankenhauspflegepraktikum in den Städtischen Kliniken Höchst (insgesamt 2 Monate)

Famulaturen in der :

09/2000 Augenheilkunde (Praxis Dr.Adams-Deinhard/Dr.Kröger-Paulus, Göttingen)

08/2000 Augenheilkunde (Bürgerhospital Frankfurt)

08/1999 Innere Medizin (Praxis Dr. Riesenkampff, Altenmarkt/Alz)

08/1998 Innere Medizin (Bürgerhospital Frankfurt)

1998-2002 Stationsaushilfe im Pflegebereich des Bürgerhospital und den Städtischen Kliniken Höchst auf den Stationen der Inneren Medizin und Chirurgie

## **Erklärung und Ehrenwort**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**Etablierung eines GMP-konformen Zellkultur- und Expansionsprotokolls zur Vorbereitung einer klinischen Phase I Studie einer adoptiven Immuntherapie maligner Erkrankungen mit der natürlichen Killerzelllinie (NK-92)**

dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main

unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. E. Seifried  
mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. T. Tonn

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bisher habe ich an keiner In-oder Ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. keinem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, den 19.10.2004