



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 028 T2** 2007.06.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 937 251 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 028.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13950**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 936 461.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/010284**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **12.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.08.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 5/06** (2006.01)

**A61K 45/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**25588 P**      **06.09.1996**      **US**

(73) Patentinhaber:

**Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc., Raritan, N.J.,  
US**

(74) Vertreter:

**BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LUXEMBOURG, T., Alain, La Jolla, CA 92037, US;  
JACKSON, R., Michael, Del Mar, CA 92014, US;  
PETERSON, A., Per, Santa Fe, CA 92067, US**

(54) Bezeichnung: **REINIGUNG VON ANTIGENSPEZIFISCHEN T-ZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Erhalt von Antigen-spezifischen T-Zelllinien aus einer heterogenen Lymphocytenpopulation, einschließlich Gesamt-T-Lymphocytenpopulationen von naiven Individuen. Dieses Verfahren beruht auf einem Anreicherungsschritt für Antigen-spezifische Lymphocyten mittels Einfangen der Antigen-spezifischen T-Lymphocyten auf einem Substrat, das mit antigenen Peptid-MHC-Komplexen beschichtet ist, die als Liganden für spezifisch T-Zell-Antigenrezeptoren dienen, gefolgt von einem Expansionsschritt unter Verwendung von Oberflächen, die mit antigenen Peptid-MHC-Komplexen beschichtet sind.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Antigen-spezifische Immunantworten werden durch Antigen-spezifische Effektor-B und T-Lymphocyten vermittelt. Diese Zellen stammen aus ruhenden Precursor-Zellen mit allgemein niedriger Häufigkeit, die Rezeptoren für verschiedene Antigene exprimieren, welche das gesamte Repertoire repräsentieren und die beim Zusammentreffen mit spezifischen Antigenen und geeigneter Co-Stimulierung aktiviert werden, expandieren und sich zu Effektorzellen differenzieren.

**[0003]** Die Entwicklung von einer ex-vivo-Immuntherapie für Zustände, wie etwa Krebs oder virale Infektionen ist durch die niedrige Häufigkeit von Antigen-spezifisch Precursor-Lymphocyten beschränkt. Zum Beispiel sind Virus-spezifische CTL-Precursor (CTLp)-Häufigkeiten in peripheren Lymphoidgeweben von Mäusen im allgemeinen niedriger als 1/100000–1/1000000 (Lau et al., 1994; Hou et al., 1994). Die Isolierung von Antigen-spezifischen Lymphocyten mittels Einfangen auf einem Antigen-beschichteten Träger ist für ruhende B-Zellen aus Mäusemilz, die für TNP spezifisch sind, beschrieben worden (Snow et al., 1983a). Die Isolierungsprozedur beinhaltete einen Rosettierungsschritt („rosetting step“) auf mit Hapten versehenen roten Blutkörperchen vom Pferd und ermöglichte das Gewinnen von Haptenspezifischen B-Zellen mit 40% Reinheit. Diese Technik ist nützlich gewesen, um die Erfordernisse für eine Aktivierung (Stein et al., 1986) ebenso wie die anfänglichen Signalereignisse nach der Aktivierung (Snow et al., 1986; Myers et al., 1987; Grupp et al., 1987; Noelle and Snow, 1990; Gold and DeFranco, 1994) zu studieren. Jedoch war dies eine sehr günstige Situation wegen der relativen hohen Häufigkeit von B-Zellen, die für TNP spezifisch waren (ungefähr 1%) (Snow et al., 1983a). Es ist bislang über keine Studie über eine B-Zellaktivierung unter Verwendung von ruhenden B-Zellen berichtet worden, die für ein anderes Antigen mit niedriger Precursor-Häufigkeit spezifisch sind (Radbruch and Recktenwald, 1995).

**[0004]** Eine niedrige Precursor-Häufigkeit ist ebenfalls ein Problem bei T-Zellen. Darüber hinaus erkennen T-Zellen, während B-Zellen das Antigen direkt erkennen, eine komplexe Struktur, die aus der Kombination eines antigenen Peptids, gebunden an ein Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekül gemacht ist. Die TCR/MHC-Peptid-Wechselwirkung hat eine niedrige bis mäßige Affinität ( $10^{-4}$ – $10^{-7}$  M Bereich; Matsui et al., 1991; Weber et al., 1992; Sykulev et al., 1994a; Corr et al., 1994; Sykulev et al., 1994b). Antikörper weisen gewöhnlich Affinitäten auf, die mehrere Größenordnungen höher sind, und nutzen eine Multivalenz aus. Neue Isolierungstechniken von seltenen Zellpopulationen stehen jetzt zur Verfügung. Diese beruhen auf Zellsortierung und/oder magnetischer Trennung (Bellone et al., 1995; Radbruch and Recktenwald, 1995). Ebenfalls sind jetzt rekombinante Liganden für TCR durch Kombinieren von rekombinanten leeren MHC-Molekülen (Jackson et al., 1992) und MHC-bindenden antigenen Peptiden verfügbar (Engelhard, 1994; Ramensee et al., 1995). Diese synthetischen MHC-Peptid-Komplexe können auf Kügelchen immobilisiert werden, um multivalente Liganden für den TCR zu liefern. Theoretisch sollte eine Multivalenz dabei helfen, eine niedrige Affinität zu überwinden. Es ist zuvor gezeigt worden, daß die Wechselwirkung zwischen TCR und immobilisiertem Peptid-MHC-Komplex zur Etablierung von stabilen Wechselwirkungen in bestimmten in-vitro-Systemen führt. Erstens reichen MHC-Klasse-I-Antigene, die auf Lipid-Monoschichten (Nakanashi et al., 1983) oder auf Lipid-beschichteten Kügelchen in Zellgröße (Kane et al., 1988) immobilisiert sind, aus, um eine Bindung von klonierten allogenen cytotoxischen T-Zellen (CTL) zu bewirken. Zweitens binden syngene klonierte CTL an MHC-beschichtete Kügelchen in einer Peptid-abhängigen Weise (Kane and Mescher, 1993; Mescher, 1995). Drittens kann eine klonierte syngene CTL Aggregate mit RMA-S-Zellen bilden, einer Zelllinie, die große Mengen an leeren MHC-Molekülen exprimiert, in einer Peptid-spezifischen Weise (De Bruijn et al., 1992). In zwei dieser Berichte waren TCR-MHC-Peptid-Wechselwirkungen nicht der primäre Adhäsionsvermittler. Sie spielten eher eine anfängliche Rolle bei den frühen Ereignissen der Aggregation, vermutlich durch Transduzieren von Signalen, die zur Aktivierung von Adhäsion mittels akzessorischen Molekülen führte. Hier beschreiben wir ein Verfahren zum Isolieren von Antigen-spezifischen T-Zellen unter Verwendung von leeren MHC-Klas-

se-I-Molekülen, die aus *Drosophila melanogaster*-Zellen (Jackson et al., 1992) aufgereinigt worden sind, immobilisiert auf magnetischen Kügelchen und mit Peptid beladen. Dieses künstliche Substrat für T-Zellen ist mit einer hohen Dichte an identischen MHC-Peptid-Komplexen beschichtet. Die T-Zell-Isolierung wurde unter Verwendung von Populationen von naiven T-Zellen optimiert, aufgereinigt aus Mäusen, die für den 2C-TCR transgen sind (Sha et al., 1988). Liganden mit verschiedenen Affinitäten und Spezifitäten für den 2C-TCR sind identifiziert worden (Sykulev et al., 1994a, b). 2C-T-Zellen konnten ebenfalls auf Kügelchen adsorbiert werden, die Peptid-MHC-Komplexe trugen, welche eine Affinität für den 2C-TCR hatten, die so niedrig wie  $10^{-4}$  M war. Die Adsorption war auf MHC beschränkt und peptid-spezifisch, da sie nur mit den richtigen MHC-Kombinationen stattfand, die durch den 2C-TCR erkannt wurden. Zusätzlich konnten 2C-T-Zellen, die mit irrelevanten T-Zellen aus einem naiven Tier gemischt waren, unter Verwendung dieser Adsorptionsprozedur wiedergewonnen werden. Diese Technik wurde erfolgreich verwendet, um Antigen-spezifische T-Zellen aus naiven Tieren wiederzugewinnen.

**[0005]** CA-A-2,069,541 offenbart die Induktion einer Antigen-spezifischen T-Lymphocytenantwort in einer T-Lymphocytenkultur. Die Induktion der Antwort wird erzielt durch Beladen von Antigen-präsentierenden Trägern, die MHC-Moleküle mit einem Antigen-abgeleiteten T-Zell-immunogenen MHC-bindenden Peptid tragen.

**[0006]** A. Stryhn et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24:1404-1409 offenbart einen Satz an Antigen-spezifischen MHC-Klasse-I-T-Zell-Hybridomen, die verwendet worden sind, um die Fähigkeit von Peptid-Klasse-I-Komplexen zu untersuchen, T-Zellen zu stimulieren.

**[0007]** K.P.Kane et al., (1993) J. Immunol 150:4788-4797 offenbart die Aktivierung von CDH-abhängigen cytotoxischen T-Lymphocytenadhäsion und Degranulierung mittels Peptid-Klasse-I-Antigen-Komplexen. Die Aktivierung von CTL erfordert eine Beschäftigung sowohl dem TCR als auch dem CD8-Corezeptor.

**[0008]** WO 96/05287 offenbart ein Verfahren zur Isolierung von T-Zellen aus peripherem Blut unter Verwendung von MHC-Antigen-Komplexen.

**[0009]** EP 0814838, welches nur Stand der Technik zur Beurteilung von Neuheit ist, offenbart ein Antigen-präsentierendes System und ein Verfahren zum Aktivieren von T-Zellen. Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Matrix, enthaltend synthetische Antigen-präsentierende Proteine. Die Matrix kann verwendet werden, um CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dahingehend zu aktivieren, daß sie cytotoxisch werden.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Isolierung und Expansion in Kultur von Antigen-spezifischen T-Lymphocyten aus einer heterogenen Population von Lymphocyten bereit. Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zum Herstellen einer Population von Antigen-spezifischen T-Lymphocyten aus einem Patienten zur Behandlung der Krankheit oder des Zustandes des Patienten bereit. Diese Erfindung stellt eine Matrix bereit, die leere Klasse-I-Peptide enthält, die dahingehend funktionell sind, dass die leeren Klasse-I-Peptide eine Vielzahl von Antigenen akzeptieren und binden können. Diese Matrices können so hergestellt werden, daß sie spezifische vorbestimmte Mengen von einem oder mehreren Antigenen enthalten. Solche Matrices sind für eine Vielzahl von Zwecken nützlich, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Verwendung bei den Verfahren der vorliegenden Erfindung.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0011]** Fig. 1, Tafeln A, B, C und D: Bindungsanalyse von biotinyliertem L<sup>d</sup> an Avidinbeschichteten magnetischen Kügelchen unter Verwendung von Fluß-Cytofluorometrie.

**[0012]** Tafel A zeigt eine Dosis-Antwort-Kurve der mittleren Fluoreszenzwerte von Kügelchen, die mit zunehmenden Mengen an L<sup>d</sup> inkubiert werden, dann mit Fluoreszein-markiertem anti-L<sup>d</sup> Antikörper 30.5.7 gefärbt werden. Tafel B zeigt grüne Fluoreszenzhistogramme (FL1) von nicht-markierten Avidin-beschichteten magnetischen Kügelchen. Tafel C zeigt grüne Fluoreszenzhistogramme (FL1) von Avidin-beschichteten magnetischen Kügelchen nach der Inkubation mit 3 µg biotinyliertem L<sup>d</sup>/10<sup>6</sup> Kügelchen; die Färbung wurde unter Fluoreszeinmarkierten anti-L<sup>d</sup>-Antikörper 30.5.7 durchgeführt. Tafel D zeigt grüne Fluoreszenzhistogramme (FL1) von Avidin-beschichteten magnetischen Kügelchen nach Inkubation mit 3 µg nicht-biotinyliertem L<sup>d</sup>/10<sup>6</sup> Kügelchen; die Färbung wurde durchgeführt unter Verwendung von Fluoreszein-markierten anti-L<sup>d</sup>-Antikörper 30.5.7.

**[0013] Fig. 2,** Tafeln A, B, C, D, E und F: Beurteilung der L<sup>d</sup>-beschichteten Kügelchen-2C-T-Zell-Komplexbildung in der Anwesenheit von antigenen Peptiden unter Verwendung von grünen (FL1) gegen rote (FL2) Fluoreszenzpunktauftragungen („dot plots“). Die Zellen wurden mit Fluoreszein grün gefärbt; die Kügelchen wurden mit Phycoerythrin rot gefärbt. Die magnetischen Kügelchen sind selbstfluoreszierend; ein Ausgleich wurde so eingestellt, daß die Phycoerythrin-gefärbten Kügelchen dieselbe grüne Fluoreszenzintensität wie ungefärbte Kügelchen aufwiesen. Tafel A zeigt die Kügelchen alleine. Tafel B zeigt 2C-T-Zellen alleine. Tafel C zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von QL9 inkubiert sind. Tafel D zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von p2Ca inkubiert sind. Tafel E zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von SL9 inkubiert sind. Tafel F zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von LCMV-Peptid inkubiert worden sind.

**[0014] Fig. 3,** Tafeln A, B, C, D, E, F, G und H: Beurteilung von MHC-beschichteter Kügelchen-2C-T-Zell-Komplexbildung in der Anwesenheit von antigenen Peptiden unter Verwendung von seitlicher Streuung („side scatter“) (SSC) gegen Vorwärtsstreuung („forward scatter“) (FSC) dot plots. Tafel A: zeigt die Grenzen der Regionen, enthaltend die Zellen, die Kügelchen und die Zell-Kügelchen-Komplexe. Tafel B zeigt die Kügelchen alleine. Tafel C zeigt 2C-T-Zellen alleine. Tafel D zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von QL9 inkubiert worden sind. Tafel E zeigt L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von p2Ca inkubiert sind. F: L<sup>d</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von LCMV-Peptiden inkubiert worden sind. Tafel G zeigt K<sup>bm3</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in der Anwesenheit von dEV-8 inkubiert sind. Tafel H zeigt K<sup>bm3</sup>-beschichtete Kügelchen und 2C-T-Zellen, die in Anwesenheit von E1 inkubiert sind.

**[0015] Fig. 4,** Tafeln A, B und C: Der Effekt der verschiedenen Parameter auf 2C-T-Zelladsorption an MHC-beschichteten magnetischen Kügelchen. Tafel A zeigt die Zeitabhängigkeit: aufgereinigte 2C-T-Zellen wurden mit MHC-beschichteten Kügelchen und Peptid gemischt und bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitdauern inkubiert; die Zellanhangung wurde dann mittels Fluß-Cytofluorometrie quantifiziert. Die Tafel B zeigt die Temperaturabhängigkeit: aufgereinigte 2C-T-Zellen wurden mit MHC-beschichteten Kügelchen und Peptid gemischt und bei verschiedenen Temperaturen und für verschiedene Zeitdauern inkubiert; die Zellanhangung wurde dann mittels Fluß-Cytofluorometrie quantifiziert. Die Tafel C zeigt CD8-Abhängigkeit: aufgereinigte 2C-T-Zellen oder aufgereinigte CD8<sup>-</sup> 2C-T-Zellen wurden mit MHC-beschichteten Kügelchen und Peptid gemischt und bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Die Zellanhangung wurde dann mittels Fluß-Cytofluorometrie quantifiziert.

**[0016] Fig. 5,** Tafeln A, B, C, D und E: Anreicherung in 2C-T-Zellen unter Verwendung eines Einfangs auf K<sup>bm3</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen, beginnend mit einer Mischung von 2C-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei einem Verhältnis von 1:3000. Tafel A zeigt ein grünes Fluoreszenzhistogramm (FL1) von Fluoreszein-markierten aufgereinigten 2C-T-Zellen. Tafel B zeigt ein grünes Fluoreszenzhistogramm (FL1) von aufgereinigten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Tafel C zeigt ein grünes Fluoreszenzhistogramm (FL1) von aufgereinigten Fluoreszein-markierten 2C-T-Zellen, die mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen in einem Verhältnis von 1:3000 gemischt sind. Tafel D zeigt ein grünes Fluoreszenzhistogramm (FL1) von Zellen, die nach Inkubation mit K<sup>bm3</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von dEV-8 eluiert worden sind. Tafel E zeigt ein grünes Fluoreszenzhistogramm (FL1) von Zellen, die nach Inkubation mit K<sup>bm3</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von E1 eluiert worden sind.

**[0017] Fig. 6:** in-vitro-funktionale Aktivität von CTL, abgeleitet aus naiven C57BL/6-Mäusen unter Verwendung von Adsorption auf K<sup>b</sup>-OVA-8- oder K<sup>b</sup>-VSV-8-beschichteten magnetischen Kügelchen. Kultivierte T-Zellen wurden auf Cytotoxizität mittels eines Chromfreisetzungssassay getestet, wie in Beispiel 4 gezeigt. EL4-Zellen wurden als Ziele verwendet. Die Peptide wurden in einer Endkonzentration von 1 µM verwendet.

**[0018] Fig. 7:** in-vitro-funktionale Aktivität von CTL, abgeleitet aus naiven BLB/c-Mäusen unter Verwendung von Adsorption auf L<sup>d</sup>-LCMV-beschichteten magnetischen Kügelchen. Kultivierte T-Zellen wurden in vitro auf Cytotoxizität mittels Chrom-Freisetzungssassay getestet, wie in Beispiel 4 gezeigt. L<sup>d</sup>-exprimierende RMA-S (Tafel A), BALB/c-CL7 (Tafel B), MC57(Tafel C) oder YAC-1 (Tafel D) wurden als Ziele verwendet. Die Peptide wurden in einer Endkonzentration von 1µM verwendet.

**[0019] Fig. 8:** in-vivo-funktionale Aktivität von CTL abgeleitet aus naiven BALB/c-Mäusen unter Verwendung von Adsorption auf L<sup>d</sup>-LCMV-beschichteten magnetischen Kügelchen. Die in-vivo-Aktivität in Mäusen, die akut mit LCMV infiziert waren, wurde getestet, wie in Beispiel 4 gezeigt. LCMV-infizierte BALB/c-Mäuse bekamen 10<sup>7</sup> CTL anti-LCMV-NP 118-126 am Tag 1 injiziert, während 4 BALB/c-Mäuse nur PBS erhielten. Als eine Kontrolle verwendeten wir LCMV-C57BL/6-Mäuse, denen entweder 10<sup>7</sup> CTL-anti-LCMV-NP 118-126 oder PBS in-

jiziert worden war.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0020]** Die vorliegende Erfindung stellt ein neues Verfahren zum in-vitro-Gewinnen von Antigen-spezifischen T-Zelllinien aus gemischten Zellpopulationen bereit, einschließlich Gesamt-T-Zellen aus naiven Individuen. Das Gewinnen von T-Zelllinien in vitro aus naiver T-Zellpopulation bringt mehrere Arten von Problemen mit sich: Als erstes sind die Precursor-Häufigkeiten typischerweise sehr niedrig, oft niedriger als  $10^{-5}$ ; zweitens haben naive T-Zellen spezielle Erfordernisse zur Aktivierung, wobei sie im allgemeinen stärkere Reize benötigen als zuvor aktivierte T-Zellen.

**[0021]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung umfaßt zwei Schritte: Einen Isolierungsschritt, um die Zellzubereitung mit Antigen-spezifischen T-Zellen anzureichern, und einen Schritt der in-vitro-Expansion, um die Antigen-spezifische Zelllinie aus der angereicherten Zellzubereitung zu gewinnen. Es ist Fachleuten in leichter Weise offensichtlich, daß diese Schritte nach Bedürfnis wiederholt werden können. Der Isolierungsschritt von Antigen-spezifischen T-Zellen verwendet MHC-beschichtete Substrate, die bei Inkubation mit antigenem Peptid und T-Zellen die Isolierung von T-Zellen ermöglichte, die für den antigenen Peptid-MHC-Komplex spezifisch sind. Es wird für Fachleute offensichtlich sein, dass eine große Vielfalt von MHC-Molekülen zur Verwendung bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf klassische und nicht-klassische MHC-Proteine aus einer Säugetier- oder Vogelspezies, wobei humane HLA-Proteine und murine H-2-Proteine bevorzugt sind. Es wird ebenfalls Fachleuten offensichtlich sein, daß MHC-Moleküle aus einer Vielzahl an Quellen zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, einschließlich aber nicht beschränkt auf MHC, stammend aus natürlich vorkommenden Quellen und aus rekombinanten Quellen, wie etwa MHC-Proteine, die in Bakterien, Insektenzellen oder Säugetierzellen exprimiert werden, wobei Insektenzellen bevorzugt werden. Zusätzlich wird für Fachleute offensichtlich sein, daß eine große Vielzahl von MHC-beschichteten Substraten zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Glaskügelchen, Latexkügelchen und magnetische Kügelchen, wobei magnetische Kügelchen bevorzugt sind. Schließlich wird es für Fachleute auf dem Gebiet offensichtlich sein, dass eine große Vielzahl von Prozeduren verwendet werden könnten, um MHC-Moleküle auf Substraten zur Verwendung bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung anzuhängen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf passive Adsorption, Verwendung von Quervernetzern, Biotinylierung von MHC-Molekülen zur Adsorption auf Avidin-beschichtetem Substrat, Einführung einer Erkennungsstelle mittels gentechnischer Veränderung von MHC-Molekülen oder Verwendung von einer natürlichen Erkennungsstelle zur Adsorption auf Antikörper-beschichtetem Substrat, wobei Avidin-Biotin- und Antikörper-Erkennung bevorzugt wird.

**[0022]** Um die Prozedur zu etablieren wurde eine Kombination aus mehreren Mitteln verwendet. Als erstes verwendeten wir leere rekombinante MHC-Moleküle, die in *Drosophila melanogaster*-Zellen produziert worden waren (Jackson et al., 1992) die die Verwendung von MHC-Protein, das mit demselben Peptid homogen beladen war, ermöglichte; zweitens wurden naive T-Zellen verwendet, die aus Lymphknoten von Mäusen aufgereinigt worden waren, welche für den 2C-TCR transgen waren (Sha et al., 1988), diese Zellen exprimieren denselben TCR auf demselben Niveau homogen. Dies ermöglichte die Analyse auf dem Niveau der einzelnen Zelle. Ebenfalls wurden mehrere verschiedene Peptid-MHC-Komplexe verwendet, deren Affinitäten für den 2C-TCR vor kurzem bestimmt worden sind (Sykulev et al., 1994a, b). Dies machte es möglich, die Prozedur unter Verwendung von Komplexen verschiedenen Affinitäten zu erforschen. Die MHC-Klasse-I-Moleküle, die verwendet wurden, schlossen  $L^d$ ,  $K^b$ ,  $K^{bm3}$  ein. Da der 2C-cytotoxische T-Zell-Klon aus BALB.B ( $H-2^b$ )-Mäusen stammte (Sha et al., 1988), sind  $L^d$  und  $K^{bm3}$  allogene Restriktionselemente für den 2C-TCR, während  $K^b$  syngene ist. Immobilisierte biotinylierte  $L^d$ ,  $K^b$  und  $K^{bm3}$  auf Avidin-beschichteten Kügelchen wurden verwendet. 2C-T-Zellen wurden auf solchen Kügelchen in der Anwesenheit von mehreren antigenen Peptiden adsorbiert. Die Adsorption wurde in der Anwesenheit von Peptid-MHC-Komplexen mit einer Affinität für den 2C-TCR in einem  $10^{-4}$ – $10^{-7}$  M-Bereich beobachtet, unter Verwendung von  $L^d$ ,  $K^{bm3}$  oder  $K^b$  als Restriktionselement. Schließlich war die Adsorption spezifisch, da Kontrollpeptide keine Wechselwirkung zwischen MHC-beschichteten Kügelchen und 2C-T-Zellen bewirkte.

**[0023]** Die Eigenschaften der Adsorption von T-Zellen auf MHC-beschichteten Kügelchen wurden weiter untersucht: Die Adsorption war zeitabhängig, erreichte ein Plateau zwischen 1 und 4 Stunden bei Durchführung bei Raumtemperatur. Die Adsorption begann über diese Zeit hinaus abzunehmen, was die Initiierung eines De-adhäsionsprozesses reflektieren könnte. Die Adsorption war ebenfalls temperaturabhängig: Sie war geringfügig niedriger bei  $37^\circ\text{C}$  als bei Raumtemperatur für drei der untersuchten Peptid-MHC-Komplexe und war sogar dramatisch niedriger als bei Raumtemperatur für einen weiteren Komplex. Dies beruht auf der Abnahme hinsichtlich der Stabilität der MHC-Moleküle bei höherer Temperatur. Die Adsorption bei  $4^\circ\text{C}$  war viel

niedriger als bei Zimmertemperatur, was wahrscheinlich eine Konsequenz der Veränderung hinsichtlich der Zellmembranfluidität bei niedriger Temperatur war, was molekulare Assoziationen verringert. Zusätzlich könnten einige Signalereignisse, die nur bei höherer Temperatur stattfinden, zur Adsorption beitragen, wie in einem früheren Bericht über die Rolle von CD8 bei der Adhäsion, die durch eine TCR-Antigenwechselwirkung induziert worden ist, festgestellt worden ist (Kane and Mescher, 1993). Interessanterweise variierte die CD8-Abhängigkeit der Zell-Kügelchen-Komplexbildung entsprechend dem verwendeten Antigen. Unter den getesteten Peptiden waren die am stärksten CD8-abhängigen p2Ca und dEV-8, die als natürlich vorkommend an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen isoliert worden waren; QL9 und SIYR, die nicht auf der Zelloberfläche gefunden worden sind, waren CD8-unabhängig. In jedem Fall war die CD8-Abhängigkeit des T-Zell-Einfangs auf MHC-beschichteten Kügelchen nicht vollständig mit der TCR-Liganden-Affinität korreliert, da wir konsistent ein Einfangen mit  $K^{bm3}$ -dEV-8 ( $1,8 \times 10^4 M^{-1}$ ),  $K^b$ -SIYR ( $3,1 \times 10^4 M^{-1}$ ) oder  $K^{bm3}$ -SIYR ( $3,4 \times 10^4 M^{-1}$ ), aber nicht mit  $L^d$ -p2Ca-A3 ( $2 \times 10^4 M^{-1}$ ) oder  $K^b$ -dEV-8 ( $1,2 \times 10^4 M^{-1}$ ) beobachteten. Ein Einfangen wurde mit  $L^d$ -SL<sup>9</sup> ( $1,4 \times 10^4 M^{-1}$ ) beobachtet, oder auch nicht, entsprechend den  $L^d$ -Chargen. Dies stimmt mit der Vorhersage überein, daß eine Kenntnis über die Affinität eines einzelnen TCR bei einem gegebenen Peptid-MHC-Komplex wahrscheinlich nicht ausreicht, um Vorhersagen über die Wechselwirkungen auf dem Niveau der ganzen Zelle zu machen (Agrawal and Linderman, 1996). Es wird angenommen, daß MHC-beschichtete Kügelchen als Sonden nützlich sein werden, um die Regeln der Antigen-Erkennung durch T-Zellen zu studieren.

**[0024]** Um die Eignung dieser Technik zu erforschen, um eine Population von Antigen-spezifischen CTL-Precursoren mit niedriger Häufigkeit zu gewinnen, wurde versucht, 2C-T-Zellen zu erhalten, die mit irrelevanten T-Zellen aus einem naiven Tier gemischt waren. Es wurde gezeigt, daß die Prozedur der vorliegenden Erfindung die Aufreinigung von Antigen-spezifischen T-Zellen ungefähr 800–1600-mal in einem Aufreinigungsschritt ermöglichte, ausgehend von einer 2C-T-Zell-Häufigkeit, die so niedrig war wie 0,03%. Die Zellgewinnung war ungefähr 50% bei Verwendung von Peptid-MHC-Komplexen mit niedriger Affinität für den 2C-TCR, wie etwa  $K^{bm3}$ -dEV-8 und  $K^b$ -SIYR und erreichte 90–100% mit dem Hochaffinitäts- $L^d$ -QL9-Komplex. Die endgültige 2C-T-Zellreinheit betrug  $47,6 \pm 2,1\%$  bei Verwendung von  $K^b$ , dem syngenen Restriktionselement für den 2C-TCR und  $24,8 \pm 6,9\%$  bei Verwendung von  $L^d$ , einem allogenen Restriktionselement. Dies legt nahe, daß dieser Unterschied durch anti- $L^d$ -allogenen T-Zellen erklärt werden könnte, die unter Verwendung von  $L^d$ -beschichteten Kügelchen eingefangen worden sind. Dies würde bedeuten, daß einige der Nicht-2C-Zellen, die von den Kügelchen eluiert worden sind, spezifisch eingefangen worden waren. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, daß dieses Verfahren geeignet war, um T-Zell-Precursors mit niedriger Häufigkeit aus einem naiven Tier aufzureinigen, einschließlich Zellen, deren TCR eine niedrige Affinität für einen MHC-Peptid-Komplex hat.

**[0025]** Es wurde ebenfalls gezeigt, daß die Isolierungsprozedur der vorliegenden Erfindung bei Verwendung in Kombination mit einem neuen in-vitro-T-Zell-Expansions-schritt dazu geeignet war, CTL-Precursors aus naiven Mäusen anzureichern. Der Zellexpansionsschritt beruhte auf der Kultur von isolierten Zellen in Gewebekulturplatten, die mit MHC-Peptid-Komplexen und Anti-CD28-Antikörper beschichtet waren. Es wird in leichter Weise offensichtlich für Fachleute sein, daß andere co-stimulatorische Moleküle zur Verwendung beim Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf anti-CD28-Antikörper, anderen Liganden von CD28, wie etwa B7-1 und B7-2 oder Liganden oder Antikörper an andere T-Zell-co-stimulatorische Moleküle, wie etwa Integrine und andere Zelladhäsionsmoleküle, oder Cytokine, wie Interleukin-2 oder Interleukin-4 oder eine Kombination davon. Es ist bemerkenswert, daß andere klassische Expansionsprotokolle, einschließlich einer Stimulation mit Concanavalin A oder mit Anti-TCR-Antikörpern, es nicht ermöglichen würden, Antigen-spezifische CTL aus naiven Lymphocytenpopulationen zu gewinnen. Dies ist wahrscheinlich so aufgrund der Tatsache, daß die Zellen nach der Isolierung nicht 100% rein sind und daher eine gewisse spezifische Stimulierung benötigen, um gewonnen zu werden. Zusätzlich ist eine hohe Dichte an homogenen Liganden notwendig, um nicht-geprimte T-Zellen („unprimed T cells“) zu aktivieren, was durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung ermöglicht wird, ebenso wie durch Verwendung von MHC-exprimierenden Insektenzellen als Antigen-präsentierende Zellen (Cai et al., 1996), aber nicht durch Verwendung von klassischen Antigen-präsentierenden Zellen, die eine heterogene Population von Antigenen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zusätzlich erfordert dieses vollständig synthetische Expansions-system der vorliegenden Erfindung nicht die Verwendung von exogenen Antigenen-präsentierenden Zellen, was potentielle Komplikationen eliminiert, wie etwa die Kontaminierung und das Kreuz-Primen („cross-priming“).

**[0026]** Interessanterweise war es nicht notwendig, die Zellen von den MHC-beschichteten magnetischen Kügelchen zu lösen, die zur Isolierung vor der Expansion verwendet wurden, was die Handhabungszeit verringert. Jedoch können die Antigen-spezifischen T-Lymphocyten eluiert oder von dem Substrat entfernt werden zum Kultivieren oder für andere Zwecke, sofern erwünscht. Die T-Lymphocyten könnten unter Verwendung ei-

ner Vielzahl von Techniken eluiert werden, die für Fachleute auf dem Gebiet bekannt sind, wie etwa verlängerte Inkubation und/oder Zugabe eines anti-MHC-Antikörpers. Unter Verwendung dieses Verfahrens konnten LCM-Virus-spezifische CTL aus nicht-infizierten BALB/c-Mäusen gewonnen werden unter Verwendung von L<sup>d</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen und LCMV-Nukleoproteinpeptid. Die Anreicherung hatte mit Sicherheit stattgefunden, da wenigstens eine Zelle in den 10<sup>4</sup>-Zellen, die gewonnen worden waren, Antigen-spezifisch war, im Vergleich mit einer Precursor-Häufigkeit von weniger als 10<sup>-5</sup> in einem naiven Tier (Oehen et al 1992, Lau et al, 1994).

**[0027]** Zusätzlich ergaben nicht-abgetrennte Gesamt CD<sup>8+</sup>-T-Zellen aus dem selben Tier, kultiviert unter den selben Bedingungen, keine spezifische CTL-Aktivität. Schließlich wurde die spezifische CTL-Aktivität nach nur einer erneuten Stimulierung gemessen, was auf eine hohe Häufigkeit an spezifischen Precursor-T-Zellen nach der Anreicherungsprozedur hinweist. Wir verwendeten ebenfalls die Anreicherungsprozedur der vorliegenden Erfindung, um OVA-8-spezifische CTL ebenso wie VSV-8-spezifischen CTL aus C57BL/6-Mäusen zu gewinnen. Die Anreicherung war spezifisch, da keine VSV-8-spezifischen CTL aus Zellen wachsgelassen werden konnten, die unter Verwendung von K<sup>b</sup>-OVA-8-beschichteten Kügelchen eingefangen worden waren, und keine OVA-8-spezifischen CTL konnten aus Zellen wachsgelassen werden, die unter Verwendung von K<sup>b</sup>-VSV-8-beschichteten Kügelchen eingefangen worden waren. Die CTL-Precursor-Häufigkeit von OVA-8-spezifischen CTL in der angereicherten Population nach Einfangen auf K<sup>b</sup>-OVA-8-beschichteten Kügelchen war näherungsweise 1/3500. Die Anreicherung hatte somit sicherlich stattgefunden, da die Precursorhäufigkeit für CTL-anti-OVA-8 in naiven C57BL/6-Mäusen 1/30.000 ist (Dillon et al., 1994). Jedoch schien eine Anreicherung niedriger als aus den Experimenten unter Verwendung von 2C-T-Zellen erwartet zu sein (Tabelle II). Dies ist nicht überraschend, da Messungen mit 2C-T-Zellen direkt die Fähigkeit des Anreicherungsschrittes reflektieren, während in Experimenten, die aus Gesamt-CD<sup>8+</sup>-T-Zellen ausgingen, eine Anreicherung wahrscheinlich unterschätzt wurde: Einige CD<sup>8+</sup>-Zellen könnten eingefangen und expandiert worden sein, ohne eine cytotoxische Aktivität aufzuweisen, oder könnten eingefangen worden sein, würden aber möglicherweise nicht in Kultur wachsen oder könnten eine zu schwache Wechselwirkung mit MHC-beschichteten Kügelchen haben, um „einfangbar“ zu sein. Es ist unwahrscheinlich, daß ein Einfangen die T-Zellen dazu bringt, keine Antwort zu geben, da 2C-T-Zellen in CTL nach dem Einfangen expandiert werden können.

**[0028]** Eine magnetische Trennung hat sich als das Verfahren der Wahl herausgestellt, um seltene Zellpopulationen aufzureinigen. Diese schließen humane Peripherblut-hämopoietische Progenitorzellen (Aufreinigung von 0,18% auf 54,4%, 300-fache Anreicherung, > 39% Wiedergewinnung) (Kato and Radbruch, 1993), humanem Peripherblut-Burst-bildende Einheiten-Erythroide (Aufreinigung von 0,04% auf 56,6%, 1400-fache Anreicherung, 13% Wiedergewinnung) (Sawada et al, 1990) und Peripherblut IgA<sub>1</sub>-exprimierende B-Lymphocyten (Aufreinigung von 0,1–1,5% auf bis zu 80%, bis zu 80% Wiedergewinnung) (Irsch et al, 1994) ein. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung für eine Antigen-spezifische T-Zell-Anreicherung ist wesentlich besser als diese Verfahren, beurteilt anhand der Anreicherungs- und Wiedergewinnungszahlen. Dies ist insbesondere signifikant, da die oben erwähnten Aufreinigerungsverfahren Antikörper als Liganden für die spezifischen Zellen verwendeten; Antikörper haben Affinitäten für Antigene, die viel höher als diejenigen von MHC-Peptid-Komplexen für TCR sind. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls zur Zellaufreinigung mittels anderer Liganden mit niedriger Affinität an Zelloberflächenmoleküle nützlich, wobei Liganden mit niedriger Affinität Moleküle bedeutet, die eine Affinität haben, welche zu niedrig ist, um bei Verwendung in löslicher Form stabil an die Zelloberfläche gebunden zu bleiben. Im Gegensatz dazu bleiben Liganden mit hoher Affinität, wie etwa Antikörper, bei Verwendung in löslicher Form stabil an die Zelloberfläche gebunden.

**[0029]** Interessanterweise konnte, obwohl die Fluoreszenzmarkierung von Antigen-spezifischen T-Zellen möglich ist (Altman et al., 1996), eine Zellsortierung mittels Fluß-Cytometrie kein Ersatz für eine magnetische Trennung sein, da T-Zellprecursor gewöhnlich zu selten sind, um in der Fluß-Cytometrie nachweisbar zu sein, und die Analyse- und Sortiergeschwindigkeit bleibt ein limitierender Faktor. Im Gegensatz dazu kann die magnetische Trennung verwendet werden, um seltene Antigen-spezifische T-Zell-Populationen zu trennen, ebenso wie um große Anzahlen von Zellen schnell zu sortieren. Diese Eigenschaften machen eine magnetische Isolierung zu einer attraktiven Prozedur, um Antigen-spezifische T-Zellen zur klinischen Verwendung zu gewinnen.

**[0030]** In der Schlussfolgerung ist dies der erste Bericht über ein Verfahren zur Aufreinigung von Antigen-spezifischen T-Zellen, das auf naive Individuen angewendet werden kann. Wir zeigten, daß es auf mehrere verschiedene MHC-Moleküle und eine Vielzahl von Peptiden angewandt werden kann. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist in einer Vielzahl von Situationen verwendbar, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Verwendung zum Gewinnen von Virus- oder Tumor-spezifischen cytoxischen T-Zelllinien aus humanem Peripherblut. Die unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindungen gewonnenen Zellen sind

selbst für eine Vielzahl von Zwecken nützlich, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Expansion in Kultur und Reinfusion in einen Patienten, diagnostische Analyse und andere therapeutische Anwendungen.

**[0031]** Die folgenden Beispiele werden dargeboten, um die vorliegende Erfindung zu veranschaulichen, ohne jedoch den Umfang der vorliegenden Erfindung auf die folgenden Beispiele zu beschränken.

#### BEISPIEL 1

Anhängen von biotinylierten MHC-Klasse-I-Molekülen auf Avidin-beschichtete magnetische Kügelchen

**[0032]** Lösliche MHC-Klasse I-Moleküle L<sup>d</sup>, K<sup>b</sup> und K<sup>bm3</sup> wurden in *Drosophila melanogaster*-Zellen exprimiert (Jackson et al., 1992) und aufgereinigt, wie zuvor beschrieben (Sykulev et al., 1994a). Die Biotinylierung wurde durchgeführt unter Verwendung von Biotin-BMCC (Pierce, Rockford, IL) gemäß den Anweisungen des Herstellers.

**[0033]** Dynabeads M500 (DynaL, Lake Success, NY) wurden mit Neutravidin (Pierce, Rockford, IL) beschichtet und darauffolgend mit biotinylierten MHC-Klasse-I-Molekülen inkubiert, die in PBS verdünnt waren, enthaltend 3% FCS, für 2 Stunden bei 4°C unter leichtem Schütteln. Die Kugeln wurden dann 3-mal in DMEM gewaschen, enthaltend 10% FCS, und für eine Stunde mit 20 µM-Peptid inkubiert. Die Kügelchen wurden dann unmittelbar zur Zelladsorption verwendet.

**[0034]** Biotinyliertes L<sup>d</sup> wurde als ein Testmodell verwendet, um das Anhängen von biotinylierten MHC-Klasse-I an Avidin-beschichtete magnetische Kügelchen zu studieren. Verschiedene Mengen dieses Moleküls wurden mit Kügelchen inkubiert. Die Kügelchen wurden dann unter Verwendung von Fluorescein-markiertem konformationsempfindlichen anti-L<sup>d</sup>-monoklonalem Antikörper 30.5.7 gefärbt. Das Anhängen von L<sup>d</sup> wurde mittels Fluß-Cytofluorometrieanalyse beurteilt. Der mittlere Fluoreszenzwert stieg linear mit der Menge an L<sup>d</sup> zwischen 0 und 1,5 µg an L<sup>d</sup>/10<sup>6</sup> Kügelchen an und erreichte ein Plateau bei 3 µg L<sup>d</sup>/10<sup>6</sup> Kügelchen, wie in [Fig. 1A](#) gezeigt. Die Menge an L<sup>d</sup>, die erforderlich ist, um Sättigung zu erreichen, war dieselbe bei mehreren Chargen an Kügelchen und an biotinyliertem L<sup>d</sup>. Um die Anzahl an MHC-Molekülen, die pro Kügelchen immobilisiert worden waren, zu quantifizieren, maßen wir die Konzentrationen an MHC-Klasse-I-Molekülen in Lösung vor und nach dem Binden unter Verwendung eines Festphasen-Immunoassays, wie folgt: MHC-Klasse-I-Moleküle L<sup>d</sup> wurden an 6,8 µm Polystyrol-Latex-Sulfat-Kügelchen adsorbiert (Interfacial Dynamics Corporation, Portland, OR), die mit 28-14-8S-anti-L<sup>d</sup> beschichtet worden waren (ATTC, Rockville, MD); Die Kügelchen wurden dann unter Verwendung von Fluoresceinmarkiertem 30-5-7-anti-L<sup>d</sup> gefärbt; die mittleren Fluoreszenzwerte (MFV) wurden mittels Fluß-Cytofluorometrie gemessen. Eine Standardkurve wurde mit bekannten Konzentrationen von L<sup>d</sup> etabliert, und MFV wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Es wurde gefunden, daß die Menge an immobilisiertem L<sup>d</sup> unter Sättigungsbedingungen  $1,23 \pm 0,10 \times 10^6$  Moleküle pro Kügelchen war. Fluoreszenzhistogramme zeigen die Fluoreszenz von nicht gefärbten Kügelchen ([Fig. 1B](#)) und Kügelchen, die mit sättigenden Mengen an L<sup>d</sup> adsorbiert worden waren ([Fig. 1C](#)). Ein Anhängen fand über Avidin-Biotin-Wechselwirkung statt, da nicht-biotinylierte Moleküle mit Kügelchen keine Bindung eingingen ([Fig. 1D](#)). K<sup>b</sup>- und K<sup>bm3</sup>- beschichtete Kügelchen wurden hergestellt und unter Verwendung derselben Technik getestet. Eine Sättigung wurde unter Verwendung des selben Konzentrationsbereichs wie L<sup>d</sup> erzielt.

#### BEISPIEL 2

Einfangen von antigen-spezifischen T-Zellen auf MHC-Klasse-I-beschichteten magnetischen Kügelchen in Anwesenheit von antigenen Peptiden

**[0035]** Mäuse und Zelllinien. BALB/c (H-2<sup>d</sup>) und C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)-Mäuse waren von Harlan Sprague Dawley (San Diego, CA). 2C-transgene Mäuse (Sha et al, 1988) wurden in dem R.W.Johnson P.R.I. Vivarium gezüchtet. Alle Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten. L<sup>d</sup>-exprimierende RMA-S-Zellen (Cai and Spent, 1996) und EL4-Zellen (H-2<sup>b</sup>, erhalten von ATCC, Rockville, MD) wurden als Zielzellen in CTL-Assays verwendet. Die anti-klontypischen 1B2-Hybridome wurden zuvor beschrieben (Kranz et al., 1994).

Aufreinigung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus normalen Mäusen

**[0036]** Die Aufreinigung wurde bei 4°C unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Leisten-, Achselhöhlen-, zervikale, Darmbein- und mesenterische Lymphknoten aus der Maus wurden seziiert und in Einzelzellsuspension aufgetrennt. Avidin-beschichtete magnetische Kügelchen (DynaL, Lake Success, NY) wurden mit biotinyliertem



Ziegen-anti-Maus-Ig beschichtet (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), und dann mit der Zellsuspension inkubiert, um Ig-exprimierende Zellen zu adsorbieren. Nicht-adsorbierte Zellen wurden dann mit 2 µg/ml H129.19 inkubiert (anti-CD4, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 1 µg/ml AF6-120.1 (anti-I-A<sup>b</sup>, Pharmingen, San Diego, CA), 1 µg/ml KH74 (anti-I-A<sup>b</sup>, Pharmingen, San Diego, CA) und 1 µg/ml 34-5-3 (anti-I-A<sup>d,b</sup>, Pharmingen, San Diego, CA) für Mäuse mit einem H-2<sup>b</sup>-Hintergrund; oder mit 2 µg/ml H129.19 und 1 µg/ml 34-5-3 für Mäuse mit einem H-2<sup>d</sup>-Hintergrund. Die Zellen wurden dann 3 mal gewaschen und Zellen, die CD4 oder MHC-Klasse-II-exprimierten, wurden mittels Adsorption auf Schaf-anti-Ratten-I<sub>g</sub>-beschichteten magnetischen Kügelchen eliminiert (DynaL, Lake Success, NY). Die Reinheit erreichte 90 bis 94% an CD8<sup>+</sup>-Zellen, beurteilt mittels Antikörperfärbung und Fluß-Cytofluorometrie.

#### Aufreinigung von 2C-T-Zellen aus 2C-transgenen Mäusen

**[0037]** 2CT-Zellen wurden aus Maus-Lymphknoten gemäß der oben beschriebenen Prozedur aufgereinigt. Die aufgereinigten Zellen waren 97–98% reaktiv mit dem anti-klonotypischen Antikörper 1B2. Zusätzlich konnten CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>-</sup>)-Zellen ebenfalls hergestellt werden durch Entfernen der CD8<sup>+</sup>-Zellen mit dem anti-CD8a-Antikörper 53-6.7 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) und magnetischen Kügelchen, die mit Schaf-anti-Ratten Ig beschichtet waren.

#### Peptide

**[0038]** Die L<sup>d</sup>- und K<sup>b</sup>-bindenden Peptide, die in diesen Studien verwendet wurden, wurden auf Applied Biosystem 430A- und 431A-Instrumenten mittels Standard-Festphasen-Peptid-Synthese-Verfahren (tBoc-Chemie) synthetisiert. Die Peptidsequenzen waren wie folgt:

QL9:	QLSPFPFDL [SEQ.ID.NO.:1]
p2Ca:	LSPFPFDL [SEQ.ID.NO.:2]
SL9:	SPFPFDLLL [SEQ.ID.NO.:3]
p2Ca-A3:	LSAFPFDL [SEQ.ID.NO.:4]
dEV-8:	EQYKFYSV [SEQ.ID.NO.:5]
SIYR:	SIYRYGYL [SEQ.ID.NO.:6]
LCMV:	RPQASGVYM [SEQ.ID.NO.:7]
MCMV:	YPHFMPNTL [SEQ.ID.NO.:8]
OVA-8:	SIINFEKL [SEQ.ID.NO.:9]
VSV-8:	RGYVYQGL [SEQ.ID.NO.:10]
E1:	EIINFEKL [SEQ.ID.NO.:11]

#### 2C-T-Zell-Adsorption auf MHC-beschichteten magnetischen Kügelchen

**[0039]** Um die Kapazität von MHC-Klasse-I-beschichteten Kügelchen, antigen-spezifische T-Zellen einzufangen, zu testen, verwendeten wir magnetische Kügelchen, die mit L<sup>d</sup>, K<sup>bm3</sup> oder K<sup>b</sup> beschichtet waren, und T-Zellen, die aus zwei 2C TCR-transgenen Mäusen aufgereinigt waren. Der 2C-TCR ist umfangreich charakterisiert worden, und es ist über mehrere antigene Peptide berichtet worden, die mit verschiedenen Affinitäten in Assoziation mit L<sup>d</sup> erkannt werden (Tabelle I) (Sykulev et al., 1994 a, b). Darüber hinaus ist vor kurzem gezeigt worden, daß K<sup>bm3</sup> und K<sup>b</sup> als Restriktionselemente für den 2C TCR in Assoziation mit den Peptiden dEV-8 und SIYR dienen (Tallquist and Pease, 1995; Ukada et al, 1996; Tallquist et al., 1996). Es ist vor kurzem bestimmt worden, daß die Affinitäten von K<sup>bm3</sup>-dEV-8 und K<sup>b</sup>-SIYR-Komplexe für 2C TCR  $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  waren. Sofern nicht anderweitig festgestellt, wurden die Kügelchen mit sättigenden Mengen an biotinyliertem L<sup>d</sup>, K<sup>bm3</sup> oder K<sup>b</sup>-Molekülen beschichtet.

**[0040]** Die Zellen wurden mit Kügelchen suspendiert, um eine Endkonzentration von  $10^7$  Kügelchen/ml zu erreichen. Zellkonzentrationen waren  $10^6$ /ml in den **Fig. 2, 3, und 4**, und  $10^7$ /ml in den **Fig. 5, 6, und 7**. Die Peptide wurden bei einer Konzentration von 20 µM zugegeben. Die Adsorption wurde unter leichtem Rühren für die im Text angezeigten Zeitdauern und Temperaturen durchgeführt. Die an die Kügelchen adsorbierten Zellen wurden dann unter dem Mikroskop gezählt. In Fällen, bei denen eine definierte Rosette (3 Kügelchen oder mehr pro Zelle) nicht beobachtet wurde, wurde ein Anhängen getestet, indem das Deckgläschen sanft angekippt wurde. Bei Inkubation bei Zimmertemperatur in der Anwesenheit des Peptids QL9 mit hoher Affinität, des Peptids p2Ca mit mittlerer Affinität und des Peptids SL9 mit niedriger Affinität, heftete sich ein Großteil der 2C-T-Zellen an die L<sup>d</sup>-beschichteten Kügelchen an, beurteilt mittels mikroskopischer Untersuchung nach vier Stunden Inkubation (Tabelle I). Ähnliche Ergebnisse (60–80% der eingefangenen Zellen) wurden in 5 unabhängigen Experimenten erhalten. Die Zellanhängung war spezifisch, da sie nicht in der Anwesenheit von nicht-2C

reaktiven L<sup>d</sup>-LCMV- und L<sup>d</sup>-MCMV-Komplexen auftrat.

**[0041]** Die Adsorption wurde ebenfalls mittels Fluß-Cytofluorometrie unter Verwendung eines FACScan® (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA) durch Aufzeichnen von Dot-Plots grüne gegen rote Fluoreszenz oder Dot-Plots Vorwärts- gegen Seitenstreuung quantifiziert. Um die Zell-Kügelchen-Komplexbildung unter Verwendung von Dot-Plots grüne gegen rote Fluoreszenz zu beurteilen, wurden die Kügelchen mit Phycoerythrin rot markiert (2A: Kügelchen alleine), und die Zellen wurden grün mit NHS-Fluorescein markiert (Pierce, Rockford, IL) (Fig. 2B: Zellen alleine). Zell-Kügelchen-Komplexbildung wurde anhand des Erscheinens von grünen (G) und roten (R) Ereignissen beurteilt. Der prozentuale Anteil an Zellen, die an Kügelchen komplexiert waren, wurde als das Verhältnis  $RG/G + RG$  berechnet, wobei G die Anzahl an Ereignissen in dem unteren rechten Quadranten und RG die Anzahl an Ereignissen im oberen rechten Quadranten ist. Wir haben gefunden, daß bei solchen Dot-Plots grün gegen rote Fluoreszenz (Fig. 2), die Zell-Kügelchen-Komplexbildung in der Anwesenheit der antigenen Peptide QL9 (Fig. 2C), p2Ca (Fig. 2D) und SL9 (Fig. 2E) ziemlich deutlich war, wobei sich mehr als 85% der Zellen zu einem hohen roten Fluoreszenzwert verschoben. Einige rote und grüne Ereignisse (2,2%) wurden in der Probe nachgewiesen, die mit einem Kontrollpeptid (LCMV) inkubiert war (Fig. 2F). Dies beruhte am wahrscheinlichsten auf einer nicht-spezifischen Adsorption einer geringen Menge an Fluorescein-markierten Zelltrümmern an die Kügelchen.

**[0042]** Dot-Plots von seitlicher Streuung gegen Vorwärtsstreuung konnten ebenso für diese Quantifizierung verwendet werden, aufgrund der Tatsache, daß die Zellen (Fig. 3C) und die Kügelchen (Fig. 3B) sehr unterschiedliche seitliche und Vorwärts-Streuungen hatten, was es leicht machte, deutlich unterschiedlichere Regionen zu zeichnen (Fig. 3A), enthaltend die Populationen der Ereignisse, die die Zellen bzw. die Kügelchen repräsentierten. Das Auftreten einer zusätzlichen Population von Ereignissen mit einer höheren Vorwärtsstreuung als die Kügelchen und einer höheren seitlichen Streuung als die Zellen reflektierte eine Zell-Kügelchen-Komplex-Bildung; dies ermöglichte es, eine Komplexregion zu definieren, die von den Zell- und Kügelchen-Regionen unterschiedlich war. Der prozentuale Anteil an Zellen, der an die Kügelchen adsorbiert war, wurde als das Verhältnis von  $CO/CO + CE$  berechnet, wobei CO die Anzahl an Ereignissen in der Komplexregion war und CE die Anzahl an Ereignissen in der Zellregion war. Solche Messungen der Vorwärts- gegen die seitliche Streuung zeigten eine Antigen-spezifische Adsorption der 2C-T-Zellen an die Kügelchen: Indem in Fig. 3 gezeigten Experiment waren 91,0% und 78,9% der Zellen an die L<sup>d</sup>-beschichteten Kügelchen in der Anwesenheit von QL9 (Fig. 3D) bzw. p2Ca (Fig. 3E) adsorbiert, und 63,8% der Zellen waren an K<sup>bm3</sup>-beschichtete Kügelchen in der Anwesenheit von dEV-8 adsorbiert (Fig. 3G), und 75,7% der Zellen waren an die K<sup>b</sup>-beschichteten Kügelchen in der Anwesenheit von SIYR (nicht gezeigt) nach 4 Stunden Inkubation adsorbiert. Mehrere Populationen, die sich durch ihre seitlichen Streuungswerte unterschieden, waren in der Komplexregion sichtbar; wahrscheinlich repräsentierten sie Komplexe, enthaltend verschiedene Anzahlen von Kügelchen. In der Anwesenheit von nicht-2C-reaktiven L<sup>d</sup>-LCMV (Fig. 3F), K<sup>bm3</sup>-E1 (Fig. 3H) und K<sup>b</sup>-E1-Komplexen wurden 2,6%, 1,1% bzw. 0,2% Ereignisse in der Komplexregion gefunden.

**[0043]** Wir verwendeten Fluß-Cytofluorometrie-Analyse, um den Einfluß verschiedener Parameter auf Zell-Kügelchen-Komplexbildung zu quantifizieren. Das Anhängen von Zellen an Kügelchen war zeitabhängig. Die Bindung war nach 5 Minuten Inkubation nachweisbar, nahm darauffolgend zu, um ein Plateau zwischen 1 und 4 Stunden zu erreichen, und nahm nach 6 Stunden merkbar ab (Fig. 4A). Die Adsorptionskinetiken waren merkbar parallel für verschiedene Peptid-MHC-Komplexe. Das Anhängen war ebenfalls temperaturabhängig, wie in Fig. 4B gezeigt. Bei 4°C wurde nur ein geringer prozentualer Anteil an Zellen auf den Kügelchen eingefangen, sogar nach einer verlängerten Inkubation. Die Adsorption bei Zimmertemperatur war sehr ähnlich der Adsorption bei 37°C mit der Ausnahme von L<sup>d</sup>-p2Ca, wofür die Anhängungsniveaus bei 37°C ungefähr 25% der Werte waren, die bei Zimmertemperatur gemessen wurden, was mit der Unfähigkeit von p2Ca übereinstimmt, L<sup>d</sup> bei 37°C zu stabilisieren (Cai and Sprent, 1996). Schließlich variierte die CD8-Abhängigkeit des Zelleinfangens mit dem Peptid-MHC-Komplex: zum Beispiel waren L<sup>d</sup>-QL9 und K<sup>bm3</sup>-SIYR-Einfänge weitgehend CD8-unabhängig, während L<sup>d</sup>-p2Ca und K<sup>bm3</sup>-dEV-8 eine CD8-Abhängigkeit aufwies (Fig. 4C).

### BEISPIEL 3

Wiedergewinnung von Antigen-spezifischen T-Zellen, die mit irrelevanten T-Zellen gemischt waren

**[0044]** Die T-Zell-Precursor-Häufigkeiten in einem naiven Tier sind typischerweise niedrig. Es ist gefunden worden, daß magnetische Kügelchen in anderen Systemen zur Anreicherung von Zellpopulationen mit niedriger Häufigkeit geeignet sind (Sawada et al., 1990; Kato and Radbruch 1993). Um zu beurteilen, ob MHC-Klasse-I-beschichtete magnetische Kügelchen für eine T-Zell-Precursor-Anreicherung verwendet werden könnten, vermischten wir Fluoresceinmarkierte 2C-T-Zellen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus naiven C57BL/6-Mäusen aufge-

reingt waren. Nach einer Inkubation mit MHC-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von Peptid, wurden adsorbierte Zellen eluiert und gezählt, und der prozentuelle Anteil an 2C-T-Zellen wurde mittels Fluß-Cytofluorometrie bestimmt. In dem in **Fig. 5** gezeigten Experiment waren 2C-T-Zellen bei der anfänglichen Häufigkeit von 0,03% nicht nachweisbar. Nach einer Adsorption unter Verwendung von K<sup>bm3</sup>-beschichteten Kügelchen und dEV-8-Peptid wurde ein definiertes Maximum an grüner Fluoreszenz beobachtet, was dieselbe Intensität wie die ursprüngliche Fluorescein-gefärbte 2C-T-Zellpopulation aufwies. Dieses Maximum stellte 65,1% der eluierten Zellen dar. Kein Maximum wurde beobachtet, wenn ein Kontrollpeptid anstelle von dEV-8 verwendet wurde. Wir erzielten 800-1600-fache Anreicherung hinsichtlich 2C-T-Zellen in vergleichbaren Experimenten unter Verwendung von Kügelchen, die mit 3 verschiedenen MHC-Peptid-Komplexen beschichtet waren (Tabelle II). In allen Fällen repräsentierten die nicht-fluoreszierenden Zellen in der eluierten Population nur eine geringe Fraktion der anfänglichen Zellpopulation (~0,2%).

#### BEISPIEL 4

##### In-Vitro-Isolierung und Expansion von Antigen-spezifischen CTL aus naiven Mäusen

###### In-vitro-Zell-vermittelte Cytotoxizität

**[0045]** L<sup>d</sup>-exprimierende RMA.S-Zellen, EL4-Zellen (H-2<sup>b</sup>), MC57-Zellen (H-2<sup>b</sup>), infiziert mit LCMV-Armstrong (48 h; vielfache Infektion: 1 PFU pro Zelle), oder BALB/c CL-7-Zellen (H-2<sup>d</sup>), infiziert mit LCMV-Armstrong (48h; vielfache Infektion: 1PFU pro Zelle) wurden als Zielzellen verwendet. Die Zielzellen wurden mit 100 µCi an Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> beladen (New England Nuclear, Wilmington, DE) pro 10<sup>6</sup> Zellen bei 37°C für 60 min in der Anwesenheit von 20% FCS. Sie wurden dreimal gewaschen und in 96-Napf-Platten bei 4000 bis 10000 Zellen pro Napf aliquotisiert. Die Peptide und Effektor-Zellen wurden dann zugegeben. Das Endvolumen war 200 µl/Napf. Die Platten wurden bei 37°C für 5 Stunden inkubiert. Einhundert µl an Überstand wurden gesammelt und in einem Gamma-Zähler gezählt. Die prozentuale spezifische Lyse wurde berechnet, wie zuvor berichtet (Wunderlich and Shearer, 1991).

###### In-vivo-Assay auf CTL-Aktivität

**[0046]** Empfängermäuse bekamen am Tag 0  $2 \times 10^3$  PFU LCMV-Armstrong i.v. injiziert und bekamen adoptiv Zellen an Tag 1 i.v. übertragen. Am Tag 2 wurden die Mäuse geopfert, und die Milze wurden auf infektiöse Virustiter mittels Plaque-Assay auf Vero-Zellen getestet, wie zuvor beschrieben (Byrne and Oldstone, 1984). Die Virustiter wurden als Plaque-bildende Einheiten pro Gramm Gewebe (pfu/g) ausgedrückt.

###### Zellkultur

**[0047]** Zellen, die auf Kügelchen adsorbiert worden waren, wurden wiedergewonnen, indem die Kügelchen 3-mal mit DMEM gewaschen wurden, enthaltend 10% FCS, und wurden dann in 96-Napf-Platten kultiviert, die mit dem geeigneten MHC-Klasse-I-Molekül und anti-CD28-Antikörper beschichtet waren, in der Anwesenheit von 10 µM Peptid; diese Bedingungen reichen aus, um ruhende 2C T-Zellen zu aktivieren. Flachboden-Napfplatten wurden verwendet, um sicherzustellen, daß jede Zelle mit den immobilisierten stimulatorischen Molekülen in Kontakt ist. Nach 2 Tagen Kultivierung bei 37°C unter feuchter Atmosphäre, enthaltend 8% CO<sub>2</sub>, wurde die Hälfte des Mediumvolumens durch frisches Medium ersetzt, enthaltend 20% Kulturüberstand aus Concanavalin A-aktivierten Ratten-Splenocyten (conA-Überstand). Nach 8–12 Tagen wurden die Zellen erneut mit Milzzellen restimuliert, die mit 1 µM Peptid pulsiert worden waren, und in der Anwesenheit von 10% conA-Überstand und 2 ng/ml an TGFβ<sub>1</sub> kultiviert (Lee and Rich, 1991; Zhang et al, 1995).

Erzeugung von Antigen-spezifischen CTL-Linien aus naiven Maus-T-Zellen unter Verwendung von Adsorption auf MHC-beschichteten magnetischen Kügelchen; Antigen-Spezifität des Isolierungsschrittes

**[0048]** Um zu erforschen, ob das Einfangverfahren auch dazu verwendet werden kann, Antigen-spezifische T-Zellen aus einem naiven Tier zu isolieren, inkubierten wir zwei Aliquots an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die aus C57BL/6-Maus-Lymphknoten (H-2<sup>b</sup>-Haplotyp) aufgereinigt waren, mit K<sup>b</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von entweder OVA-8 Peptid (Aliquot 1) oder VSV-8-Peptid (Aliquot 2) für 4 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach 3 Waschungen wurden Zellen in Kultur in 12 Nöpfen einer 96-Napf-Platte gebracht, die mit K<sup>b</sup> und anti-CD28-mAb beschichtet war, in der Anwesenheit von 10 µM von OVA-8 oder VSV-8-Peptid. Die Kulturen wurden verarbeitet, wie in dem vorherigen Absatz angezeigt. Das Zellwachstum war nach 7 Tagen in den Nöpfen sichtbar, enthaltend adsorbierte Zellen. Die Zellen wurden auf Feeder-Zellen am Tag 9 restimuliert und auf cytotoxische Aktivität am Tag 18 getestet. Die Zellen aus Aliquot 1, kultiviert mit

OVA-8, zeigten eine CTL-Aktivität, die spezifisch für OVA-8-Peptid war (Fig. 6A), und Zellen aus Aliquot 2, die mit VSV-8 kultiviert waren, zeigten eine CTL-Aktivität, die für VSV-8 spezifisch war (Fig. 6C). Kontrollen wurden durch die umgekehrte Kombination gestellt: Zellen, die eingefangen wurden unter Verwendung von OVA-8-Peptid, enthielten keine nachweisbaren Anti-VSV-8-CTL-Precursor, da sie kein Anti-VSV-8-CTL erzeugten, wenn VSV-8 anstelle von OVA-8 verwendet wurde, um sie in Kultur zu aktivieren (Fig. 6B); in ähnlicher Weise enthielten Zellen, die unter Verwendung von VSV-8-Peptid eingefangen wurden, keine nachweisbaren Anti-OVA-8-CTL-Precursor (Fig. 6D).

**[0049]** Um eine Schätzung der CTLp-Häufigkeiten nach der Anreicherung zu erhalten, wiederholten wir das Anreicherungsexperiment unter der Verwendung von K<sup>b</sup>-beschichteten Kügelchen und OVA-8-Peptid. In einem repräsentativen Experiment wurden die 12000 Zellen, die durch Adsorption an K<sup>b</sup>-OVA8-beschichteten magnetischen Kügelchen gewonnen wurden, aliquotisiert und separat in 12 Näpfen von 96-Napf-Platten unmittelbar nach dem Einfangen kultiviert. Die spezifischen CTL wurden aus kultivierten eingefangenen Zellen in 3 Näpfen wiedergewonnen, was darauf hinweist, daß die Häufigkeit der Precursor nach dem Einfangen ungefähr 1/3500 war. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erhalten.

Erzeugung von anti-LCMV-CTL aus naiven Maus T-Zellen; in-vitro- und in-vivo-antivirale Aktivität.

**[0050]** Wir erhielten anti-LCMV-CTL durch Inkubieren von 10<sup>7</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aufgereinigt aus BALB/c-Maus-Lymphknoten (H-2<sup>d</sup>-Haplotyp), zusammen mit L<sup>d</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von LCMV-Peptid für 4 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach 3 Waschungen wurden ungefähr 10<sup>4</sup> Zellen wiedergewonnen und in Kultur in 12 Näpfe einer 96-Napf-Platte gebracht, die mit L<sup>d</sup> und anti-CD28-mAb beschichtet war, in der Anwesenheit von 10 µM eines LCMV-Peptids. Die Zellen wurden kultiviert, wie in dem vorherigen Absatz angezeigt. Wie in Fig. 7A gezeigt, erhielten wir cytotoxische T-Lymphocyten (CTL), die für LCMV-Peptid spezifisch waren. Die Zellen töteten ebenfalls, LCMV-infizierte Ziele des H-2<sup>d</sup>-Haplotyps, während sie nur eine Hintergrundaktivität gegen nicht-infizierte Ziele aufwiesen (Fig. 7B). Eine anti-alloptypische Aktivität (Fig. 7C) ebenso wie eine gewisse NK/LAK-Aktivität waren ebenfalls vorhanden (Fig. 7D). Alle Zellen exprimierten CD8, beurteilt anhand von Fluß-Cytofluorometrie. Ein in-vivo-Assay zeigte, daß die Zellen in der Lage waren, in merkbarer Weise die Virustiter in BALB/c-Mäusen (H-2<sup>d</sup>) zu verringern, die akut mit LCMV infiziert waren (Fig. 8). Diese Reduktion war MHC-spezifisch, da keine signifikante Reduktion der Virustiter in C57/BL6-Mäusen (H-2<sup>b</sup>) nach einer CTL-Injektion beobachtet wurde.

#### LITERATURANGABEN

- Agrawal GB, Linderman JJ (1996) Mathematical modeling of helper T lymphocyte/antigenpresenting cell interactions: analysis of methods for modifying antigen processing and presentation. *J. Theor. Biol.* 182, 487-504.
- Ashman RF (1973) Lymphocyte receptor movement induced by sheep erythrocyte binding. *J. Immunol.* 111, 212-220.
- Altman JD, Moss PAH, Goulder JPR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Bellone G, Geuna M, Carbone A, Silvestri S, Foa R, Emanuelli G, Matera L (1995) Regulatory action of prolactin on the in vitro growth of CD34<sup>+</sup>ve human hemopoietic progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 163, 221-231.
- Borrow P, Oldstone MBA (1997) Lymphocytic choriomeningitis virus. In: "Viral Pathogenesis", Neal Nathanson et al., ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 593-627.
- Cai Z, Sprent J (1996) Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8<sup>+</sup> T cells in vitro. *J. Exp. Med.* 183, 2247-2257.
- Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Loh D, Peterson PA, Sprent J (1996) Transfected Drosophila cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14736-14741.
- Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, Al-Ramadi BK, Sang Kim Y, Maher SE, Bothwell ALM, Margulies DH (1994) T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265, 946-949.
- De Bruijn MLH, Nieland JD, Schumacher TNM, Ploegh HL, Kast WM, Melief CJM (1992) Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.* 22, 3013-3020.
- Dillon SR, Jameson SC, Fink PJ (1994) Vβ5<sup>+</sup> T cell receptors skew toward OVA + H-2K<sup>b</sup> recognition. *J. Immunol.* 152, 1790-1801.
- Engelhard VH (1994) Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion Immunol.* 6, 12-23.
- Gold MR, DeFranco AL (1994) Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* 55, 221-295.
- Grupp SA, Snow EC, Harmony JAK (1987) The phosphatidylinositol response is an early event in the physio-

- logically relevant activation of antigen-specific B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 109, 181-191.
- Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty, PC (1994) Virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369, 652-654.
- Irsch J, Irlenbusch S, Radl J, Burrows PD, Cooper MD, Radbruch AH (1994) Switch recombination in normal IgA<sub>1</sub><sup>+</sup> B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1323-1327.
- Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA (1992) Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12117-12121.
- Kane KP, Goldstein SAN, Mescher MF (1988) Class I alloantigen is sufficient for cytolytic T lymphocyte binding and transmembrane signaling. *Eur. J. Immunol.* 18, 1925-1929.
- Kane KP, Mescher MF (1993) Activation of CD8-dependent cytotoxic T lymphocyte adhesion and degranulation by peptide class I antigen complexes. *J. Immunol.* 150, 4788-4797.
- Kato K, Radbruch A (1993) Isolation and characterization of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 14, 384-392.
- Klavinskis LS, Tishon A, Oldstone MBA (1989) Efficiency and effectiveness of cloned virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* 143, 2013-2016.
- Kranz DM, Tonegawa S, Eisen HN (1994) Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7922-7926.
- Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R (1994) Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369, 648-652.
- Lee H, Rich S (1991) Co-stimulation of T cell proliferation by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. Immunol.* 147, 2991-3000.
- Luxembourg AT, Cooper NR (1994) Modulation of signaling via the B cell antigen receptor by CD21, the receptor for C3dg and EBV. *J. Immunol.* 153, 4448-4467.
- Matsui K, Jay Boniface J, Reay PA, Schild H, Fazekas de St. Groth B, Davis MM (1991) Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254, 1788-1791.
- Mescher MF (1995) Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 146, 177-210.
- Moore MD, DiScipio RG, Cooper NR, Nemerow GR (1989) Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J. Biol. Chem.* 264, 20576-20582.
- Myers CD, Kriz MK, Sullivan TJ, Vitetta ES (1987) Antigen-induced changes in phospholipid metabolism in antigen-binding B lymphocytes. *J. Immunol.* 138, 1705-1711.
- Nakanishi M, Brian AA, McConnell HM (1983) Binding of cytotoxic T-lymphocytes to supported lipid monolayers containing trypsinized H-2K<sup>b</sup>. *Mol. Immunol.* 20, 1227-1231.
- Noelle RJ, Snow EC (1990) Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* 11, 361-368.
- Oehen S, Waldner H, Kündig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM (1992) Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J. Exp. Med.* 176, 1273-1281.
- Radbruch A, Recktenwald D (1995) Detection and isolation of rare cells. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 270-273.
- Ramensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.
- Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI (1990) Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.* 142, 219-230.
- Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY (1988) Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 335, 271-274.
- Snow EC, Vitetta ES, Uhr JW (1983a) Activation of antigen-enriched B cells. I. Purification and response to thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 130, 607-613.
- Snow EC, Noelle RJ, Uhr JW, Vitetta ES (1983b) Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *J. Immunol.* 130, 614-618.
- Snow EC, Fetherson JD, Zimmer S (1986) Induction of the c-myc protooncogene after antigen binding to hapten-specific B cells. *J. Exp. Med.* 164, 944-949.
- Stein P, Dubois P, Greenblatt D, Howard M (1986) Induction of antigen-specific proliferation in affinity-purified small lymphocytes: requirement for BSF-1 by type 2 but not type 1 thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 136, 2080-2089.
- Sun S, Cai Z, Langlade-Demoyen P, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J (1996) Dual function of *Drosophila* cells as APCs for naïve CD8<sup>+</sup> T cells: implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 4, 555-564.
- Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN (1994a) Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1, 15-22.
- Sykulev Y, Brunmark A, Tsomides TJ, Kageyama S, Jackson M, Peterson PA, Eisen HN (1994b) High-affinity

reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11487-11491.

Tallquist MD, Pease LR (1995) Alloreactive 2C T cells recognize a self peptide in the context of the mutant K<sup>bm3</sup> molecule. J. Immunol. 155, 2419-2426.

Tallquist MD, Yun TJ, Pease LR (1996) A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity. J. Exp. Med. 184, 1017-1026.

Ukada K, Wiesmüller KH, Kienle S, Jung G, Walden P (1996) Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. J. Immunol. 157, 670-678.

Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K (1992) Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. Nature 356, 793-796.

Wilson HA, Greenblatt D, Poenie M, Finkelman FD, Tsien RY (1987) Crosslinkage of B lymphocyte surface immunoglobulin by anti-Ig or antigen induces prolonged oscillation of intracellular ionized calcium. J. Exp. Med. 166, 601-606.

Wunderlich J, Shearer G (1991) Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In: "Current Protocols in Immunology" (Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds.) John Wiley and Sons, New York, pp. 3.11.1-3.11.15.

Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL (1995) Control of CD4 effector fate: transforming growth factor  $\beta$ 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. J. Exp. Med. 182, 699-709.

TABELLE I:

Einfangen von 2C-T-Zellen auf L<sup>d</sup>-beschichteten magnetischen Kügelchen in der Anwesenheit von verschiedenen Peptiden, beurteilt mittels mikroskopischer Untersuchung

Peptid	% eingefangene Zellen	2C-TCR-Affinität für L <sup>d</sup> -Peptid (M <sup>-1</sup> )	Peptidaffinität für L <sup>d</sup> (M <sup>-1</sup> )
QL9	87%	10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>8</sup>
p2Ca	83%	2x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>6</sup>
SL9	77%	1,4x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>7</sup>
MCMV	<1%	<10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>9</sup>

Tabelle II

Wiedergewinnung von 2C-T-Zellen, die mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus naiver B6 Maus gemischt waren, mittels Adsorption auf MHC-Klasse-I-beschichteten magnetischen Kügelchen

MHC Molekül	Peptid	%2C-T-Zellen vor Anreicherung	%2C-T-Zellen nach Anreicherungen	2C-T-Zell-Anreicherung	2C-T-Zell-Wiedergewinnung	Anzahl an Experimenten
L <sup>d</sup>	QL9	0,03%	24,8 ± 6,9%	828 ± 230-fach	90,0 ± 14,0%	3
K <sup>bm3</sup>	dEV-8	0,03%	50,9 ± 14,2%	1697 ± 473-fach	47,7 ± 1,7%	2
K <sup>b</sup>	SIYR	0,03%	47,6 ± 2,1%	1588 ± 71-fach	56,8 ± 0,06%	2

### Patentansprüche

- Verfahren zum Anreichern von Antigen-spezifischen T-Lymphocyten, umfassend die Schritte:
  - In-Kontakt-Bringen einer heterogenen Population von Antigen-spezifischen T-Lymphocyten mit einem Sub-

strat zum Fangen von Antigenen, wobei das Substrat umfaßt:

i) einen Träger, der auf seiner Oberfläche eine homogene Population von immobilisierten, leeren MHC-Klasse I-Molekülen hat, wobei die Klasse I-Moleküle in der Lage sind, ein oder mehrere Antigene zu binden, und die Klasse I-Moleküle  $K^{bm3}$ - oder  $L^d$ -Moleküle sind, die von einer rekombinanten Drosophila-Zelllinie exprimiert werden;

ii) ein Kügelchen (bead),

an das ein oder mehrere Antigene gebunden sind, für eine Zeitperiode, die ausreicht, um die Antigen-spezifischen T-Lymphocyten mit dem Substrat wechselwirken zu lassen;

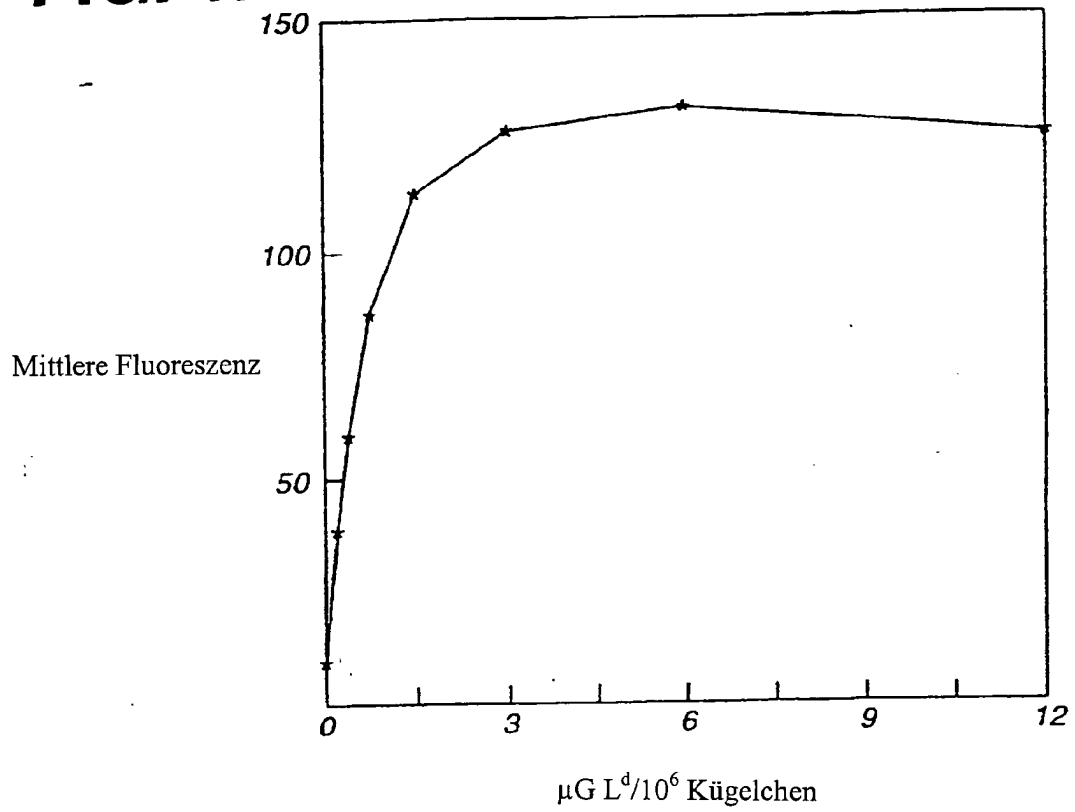
(b) Eluieren der Antigen-spezifischen T-Lymphocyten von dem Substrat, um eine angereicherte Population von Antigen-spezifischen T-Lymphocyten bereitzustellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Kügelchen ein magnetisches Kügelchen ist.

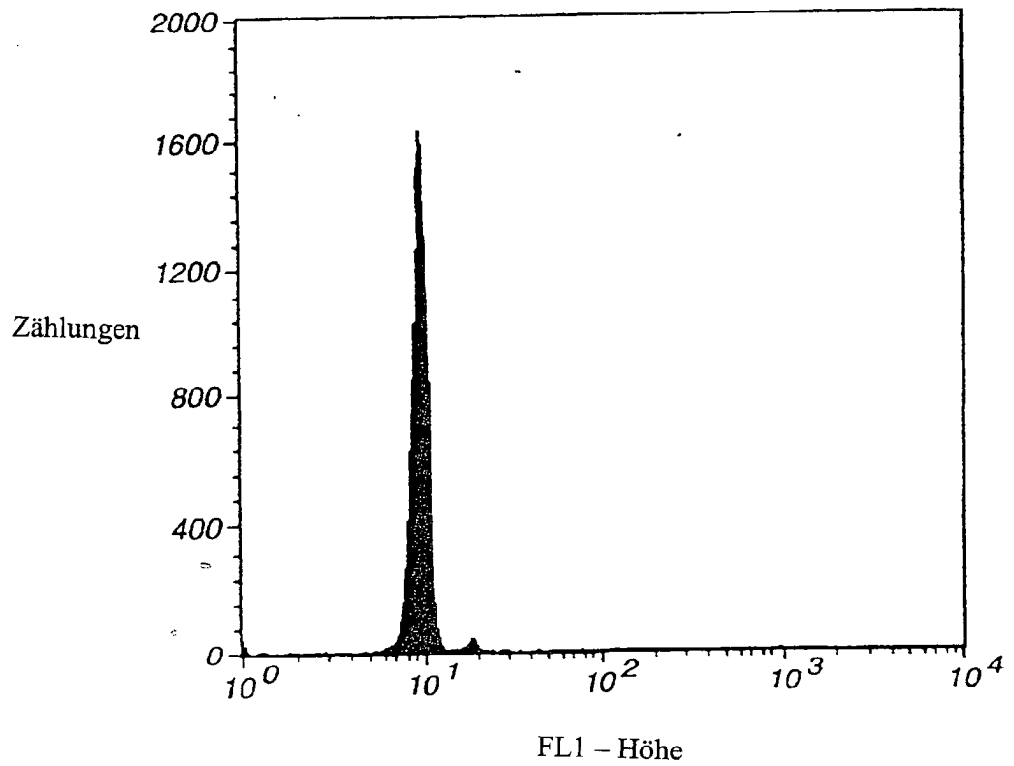
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das ein oder mehrere Antigene Peptide sind.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

**FIG. 1A**

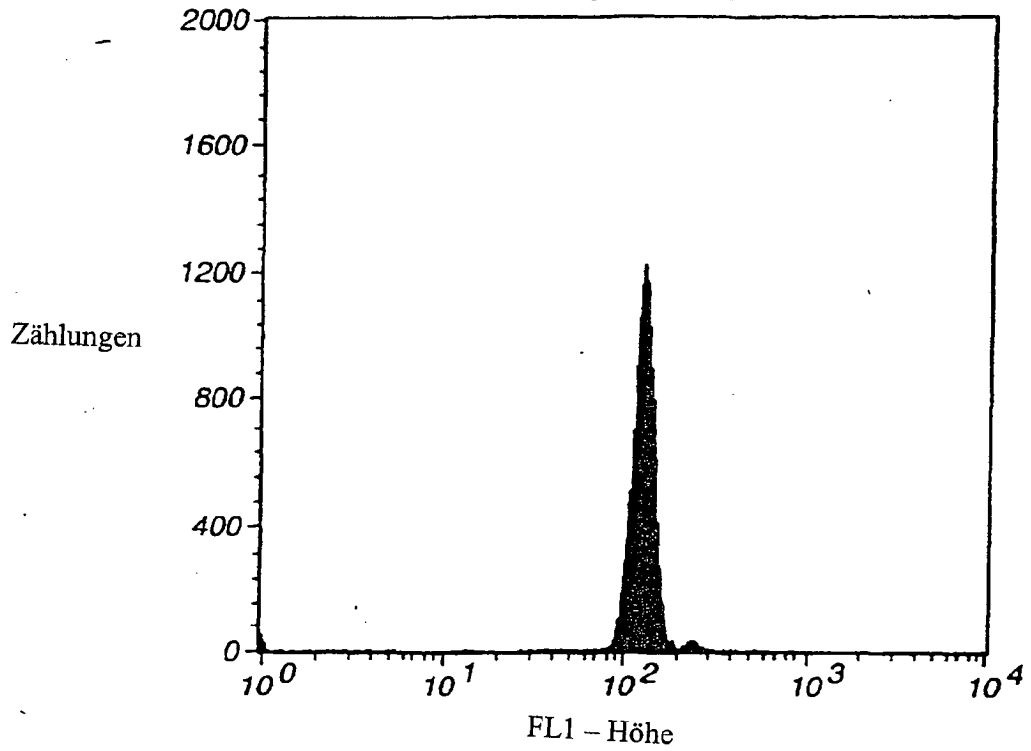


**FIG. 1B**

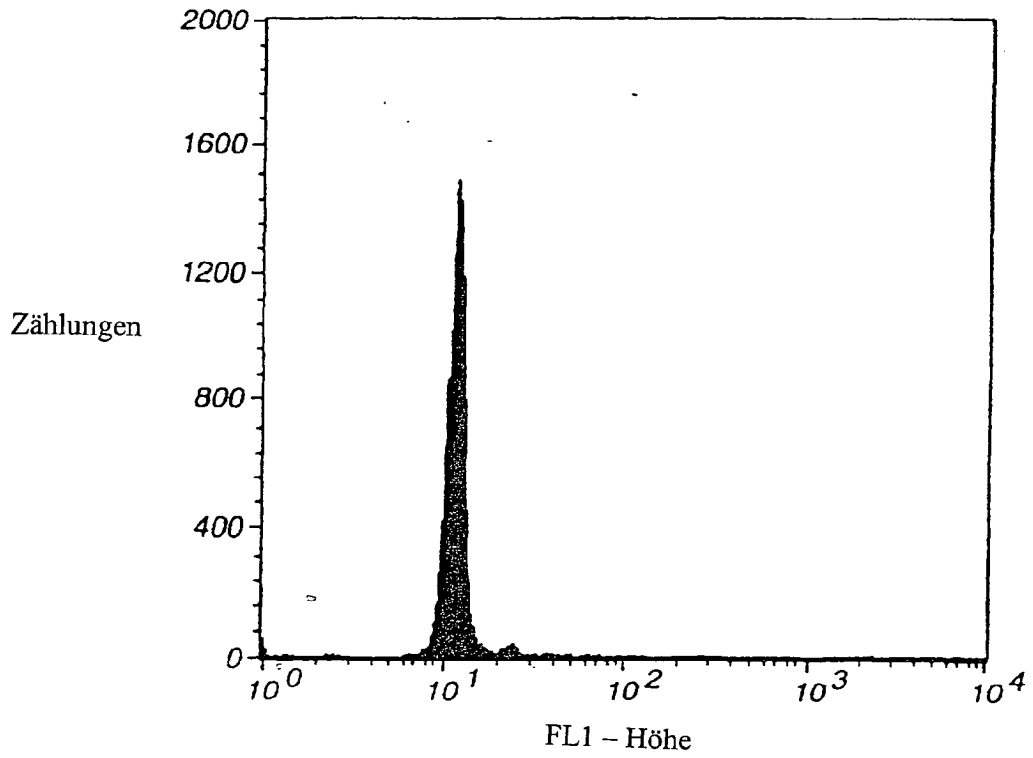




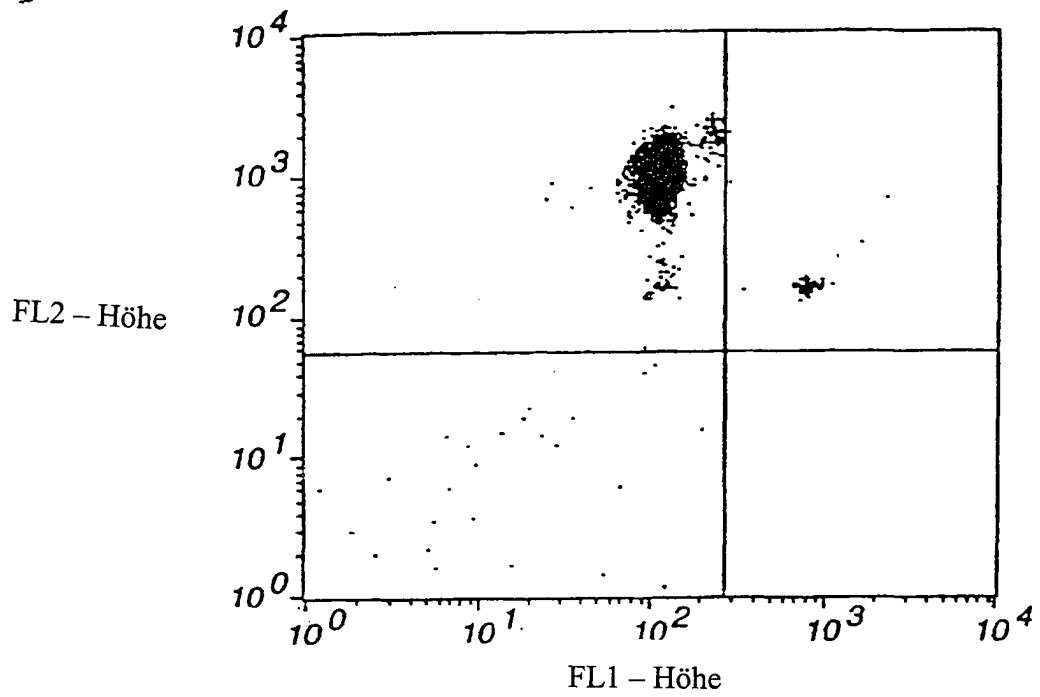
**FIG. 1C**



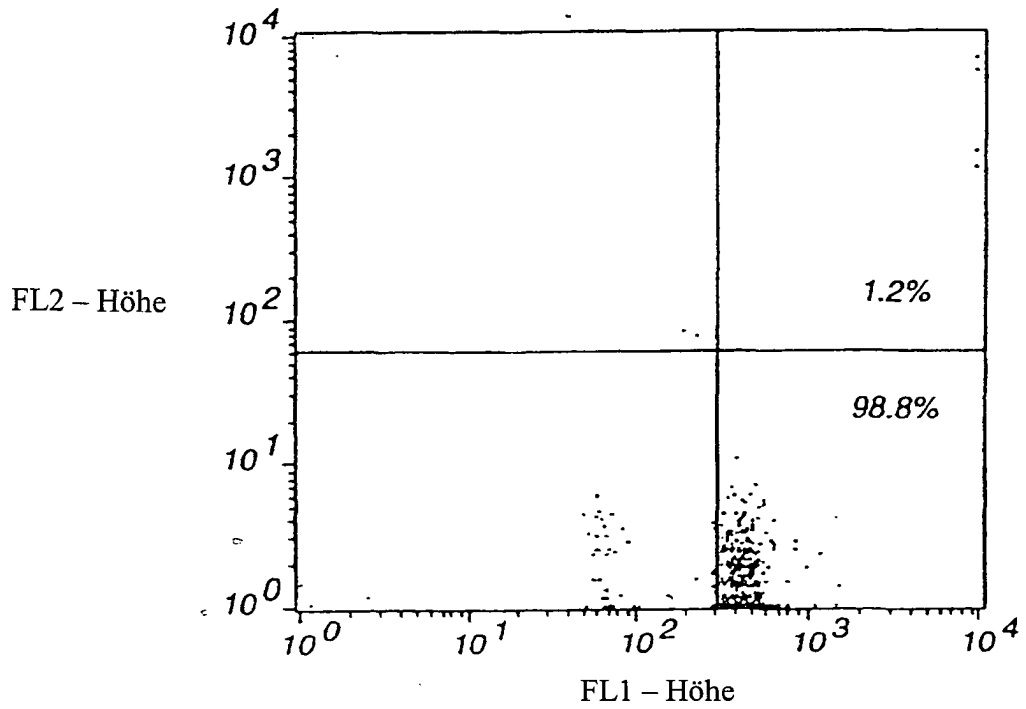
**FIG. 1D**



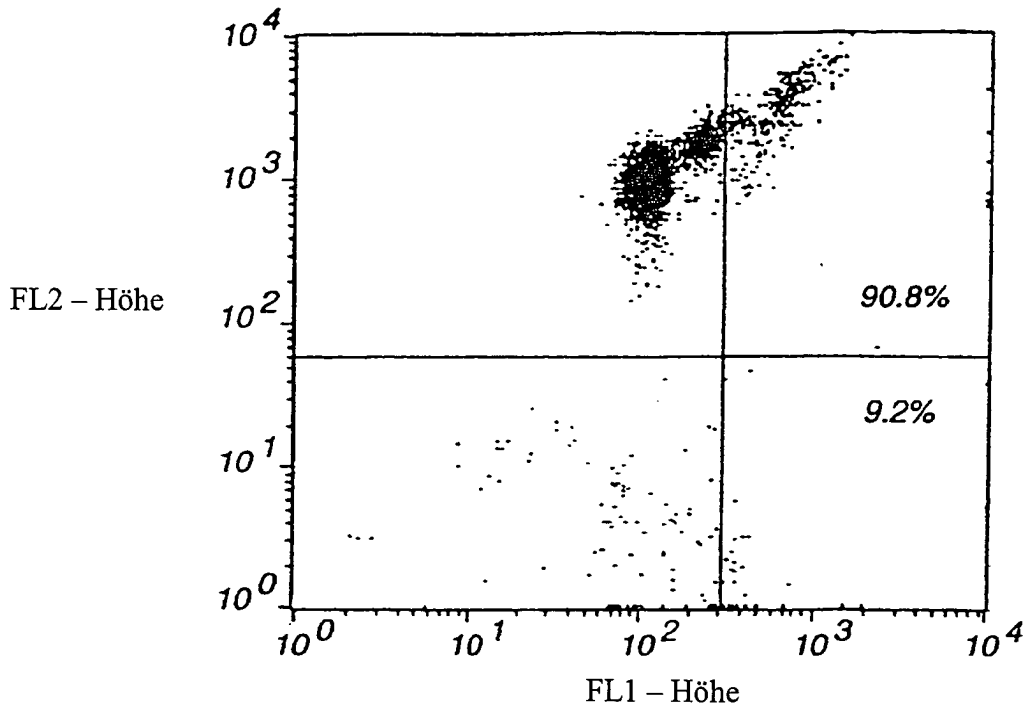
**FIG. 2A**



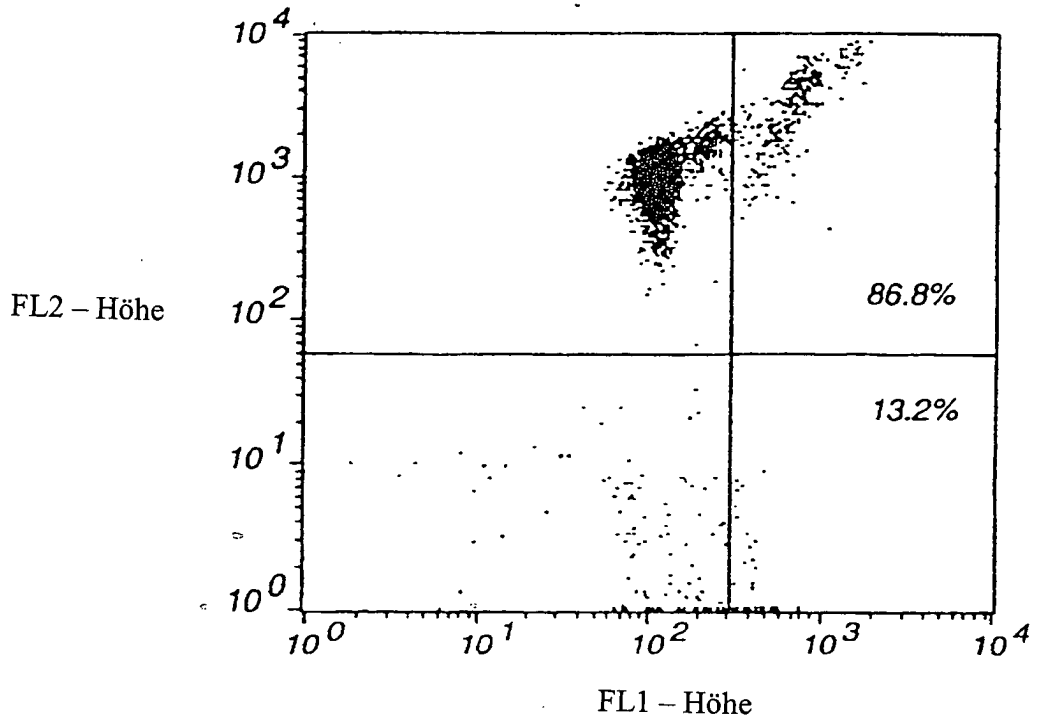
**FIG. 2B**



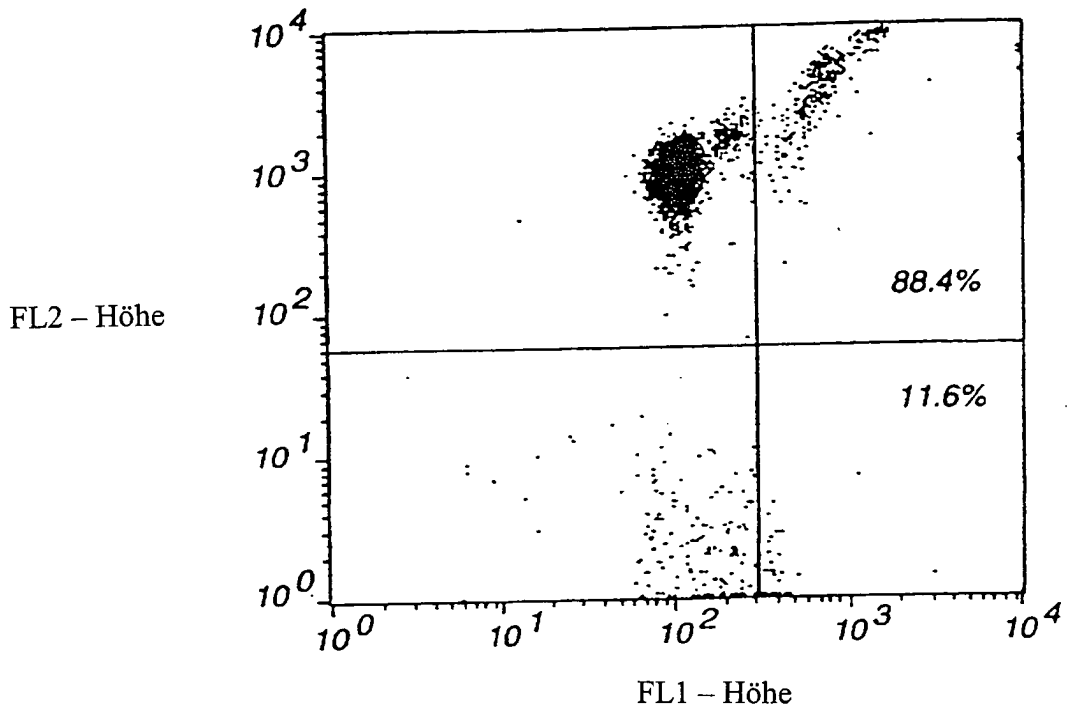
**FIG. 2C**



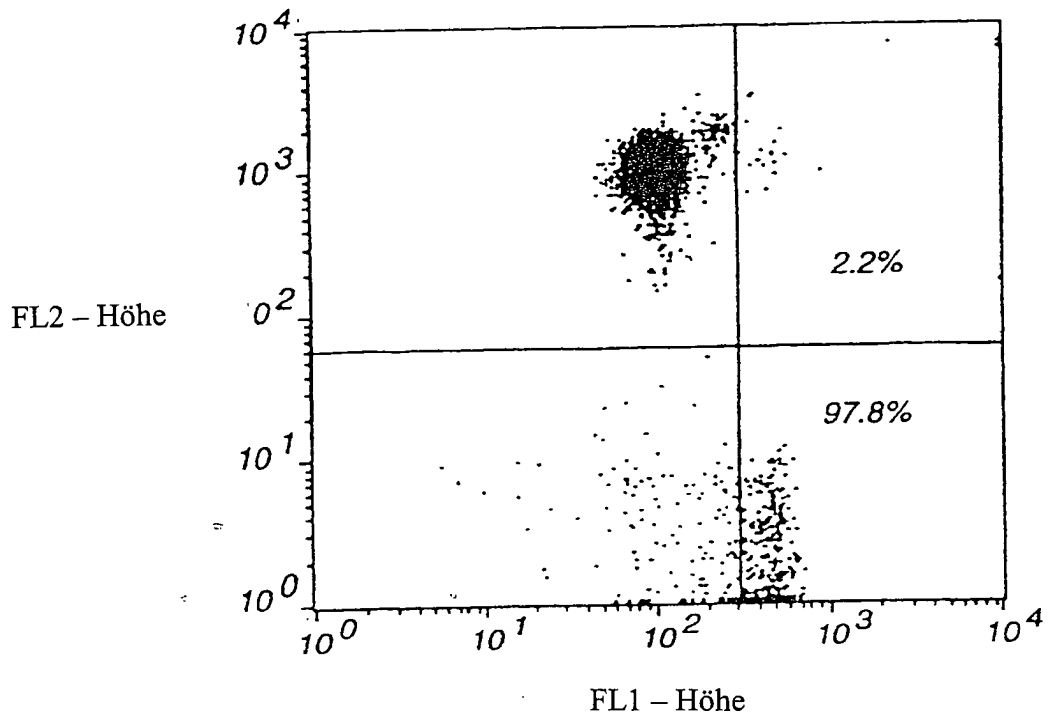
**FIG. 2D**



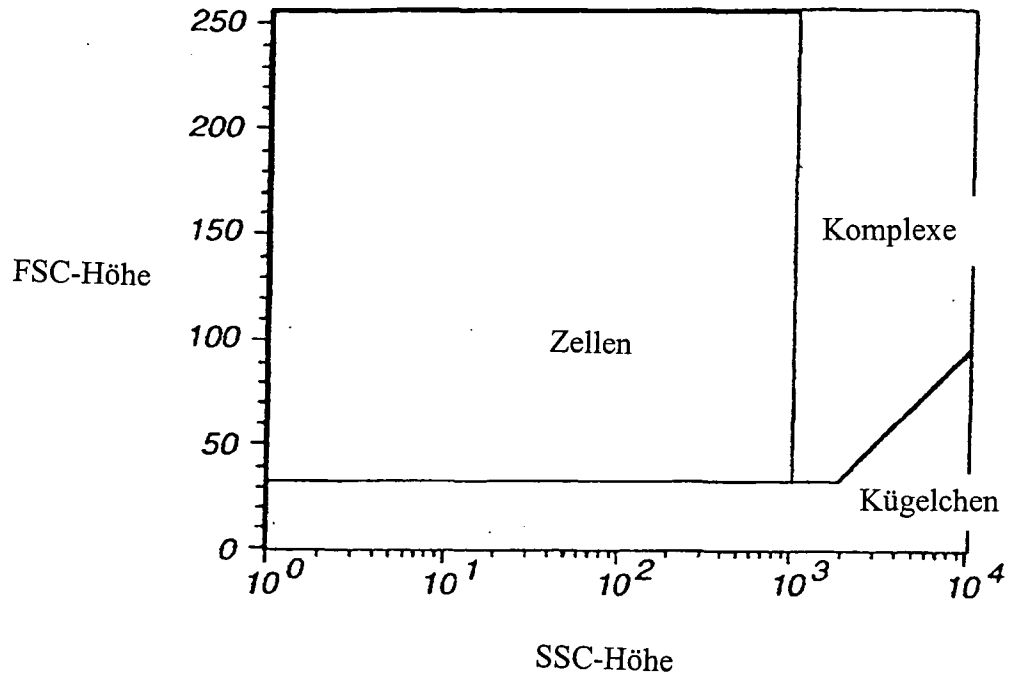
**FIG. 2E**



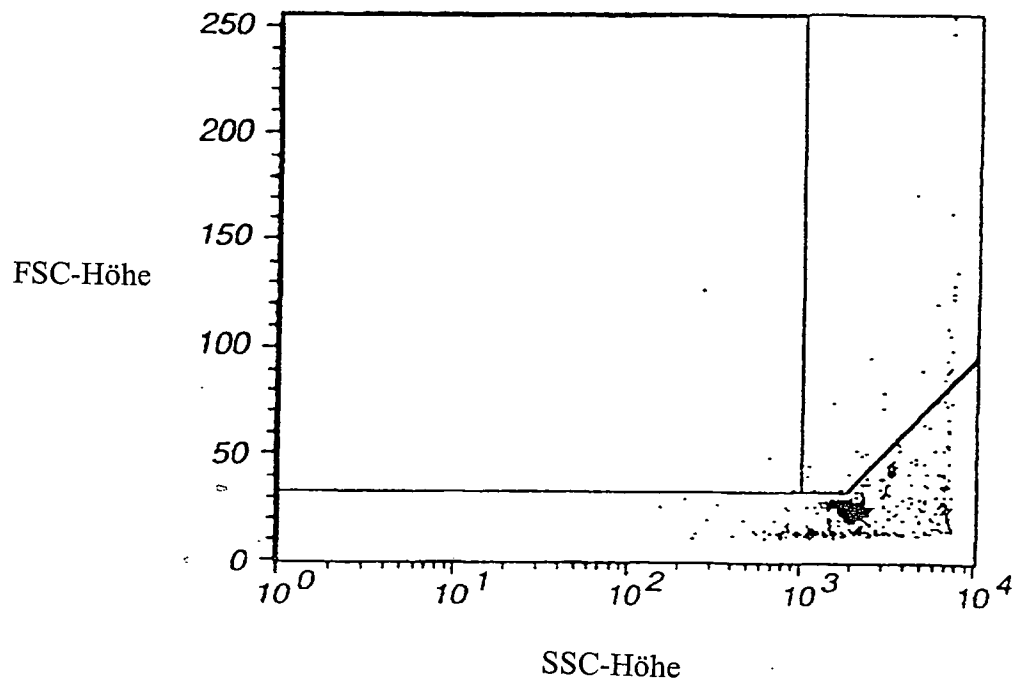
**FIG. 2F**



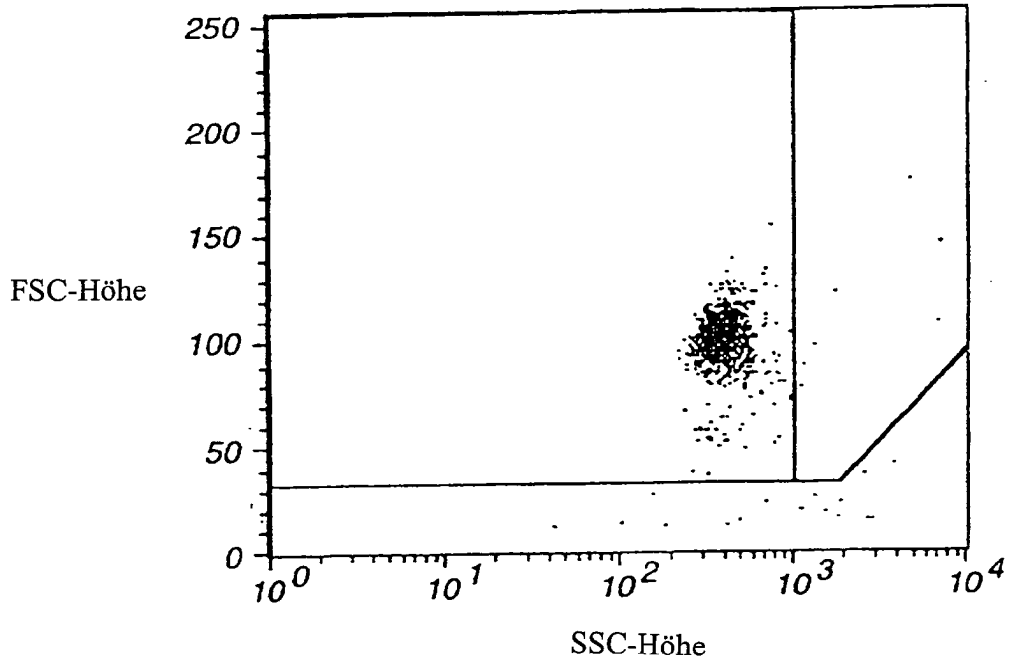
**FIG. 3A**



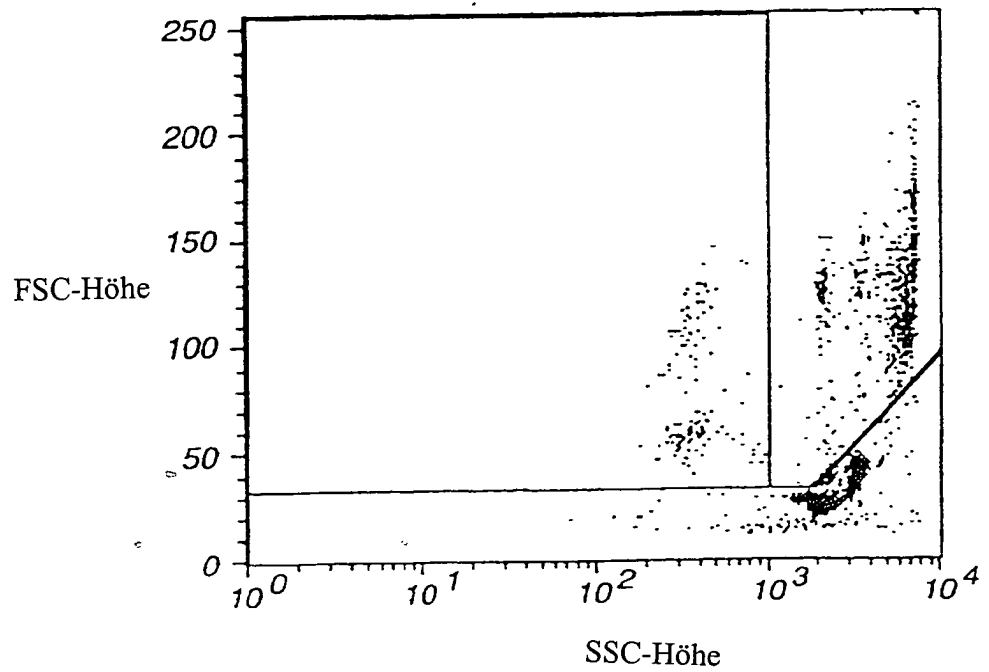
**FIG. 3B**



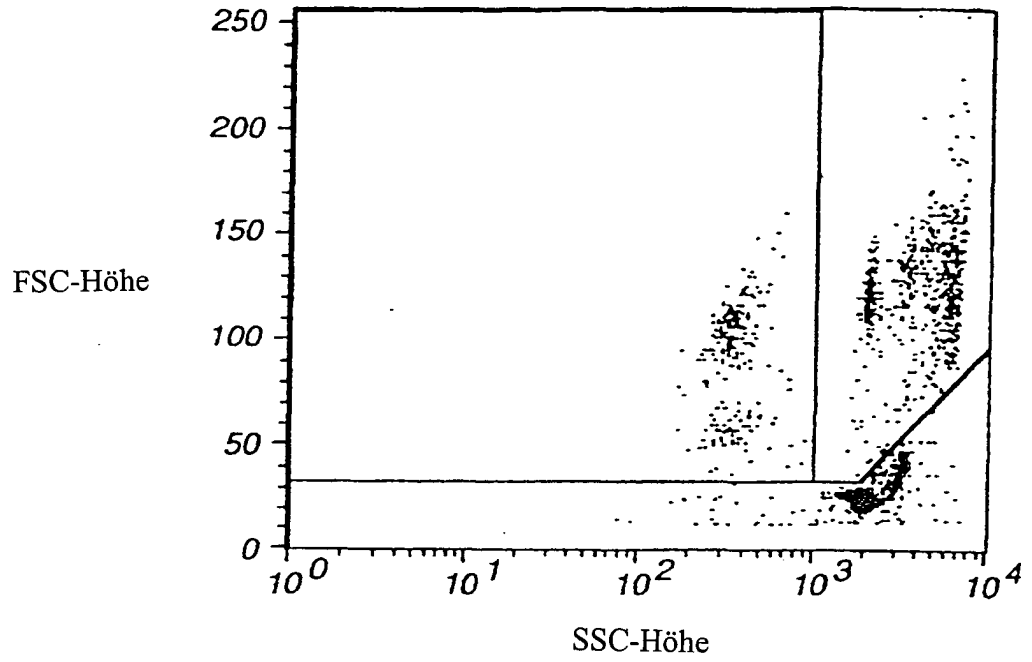
**FIG. 3C**



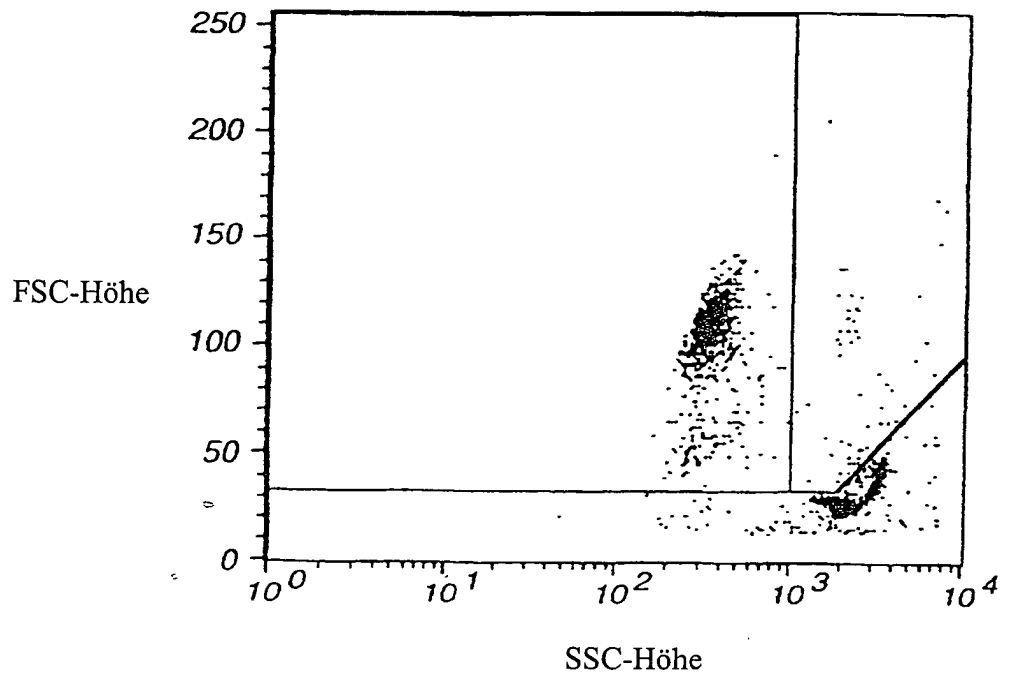
**FIG. 3D**



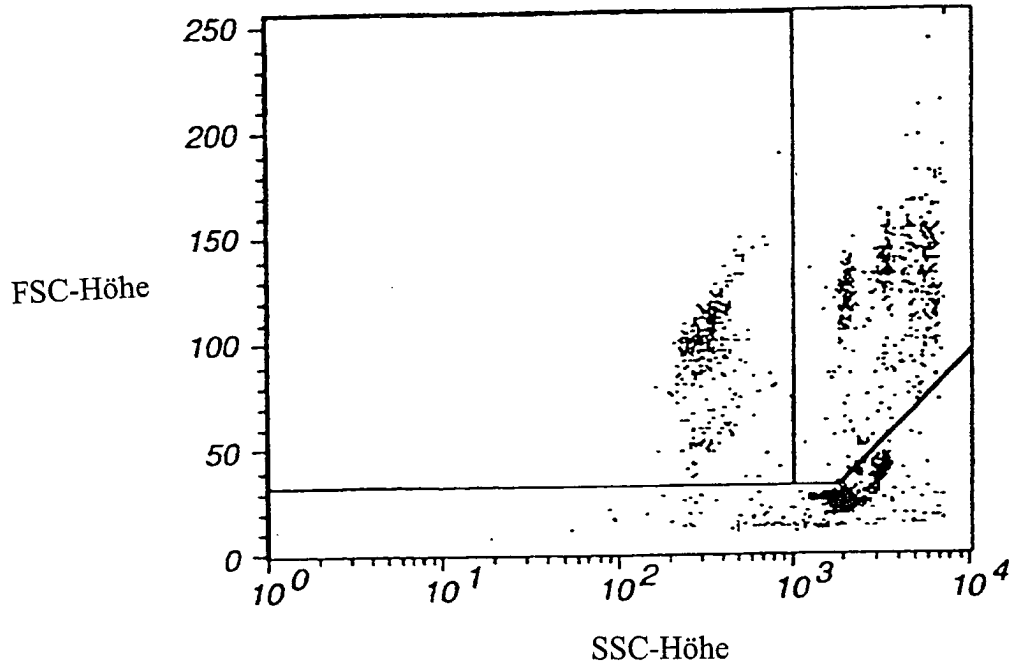
**FIG. 3E**



**FIG. 3F**



**FIG. 3G**



**FIG. 3H**

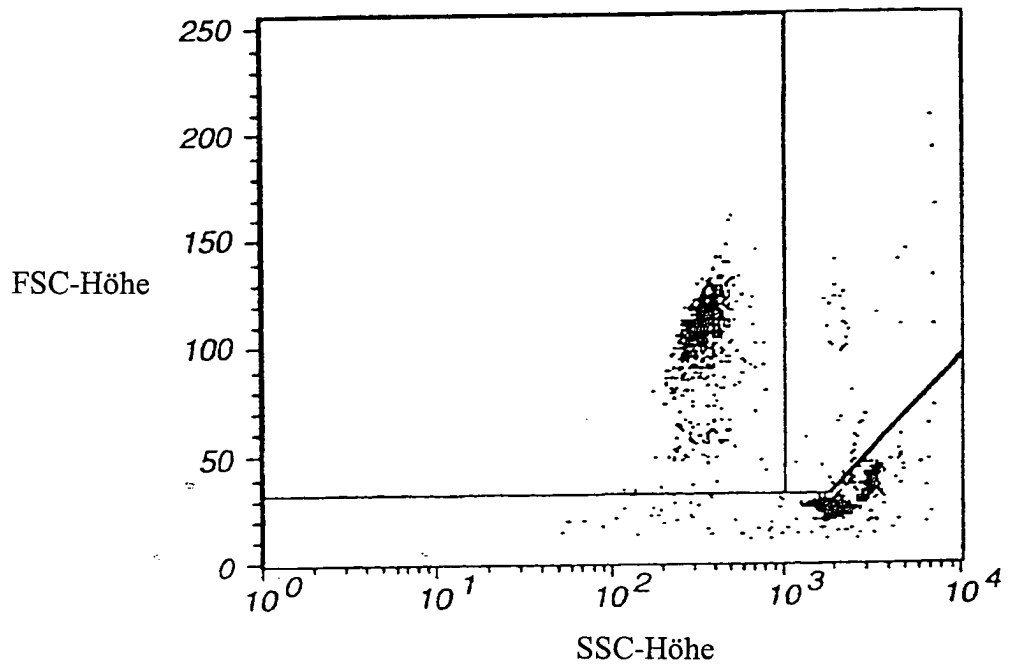
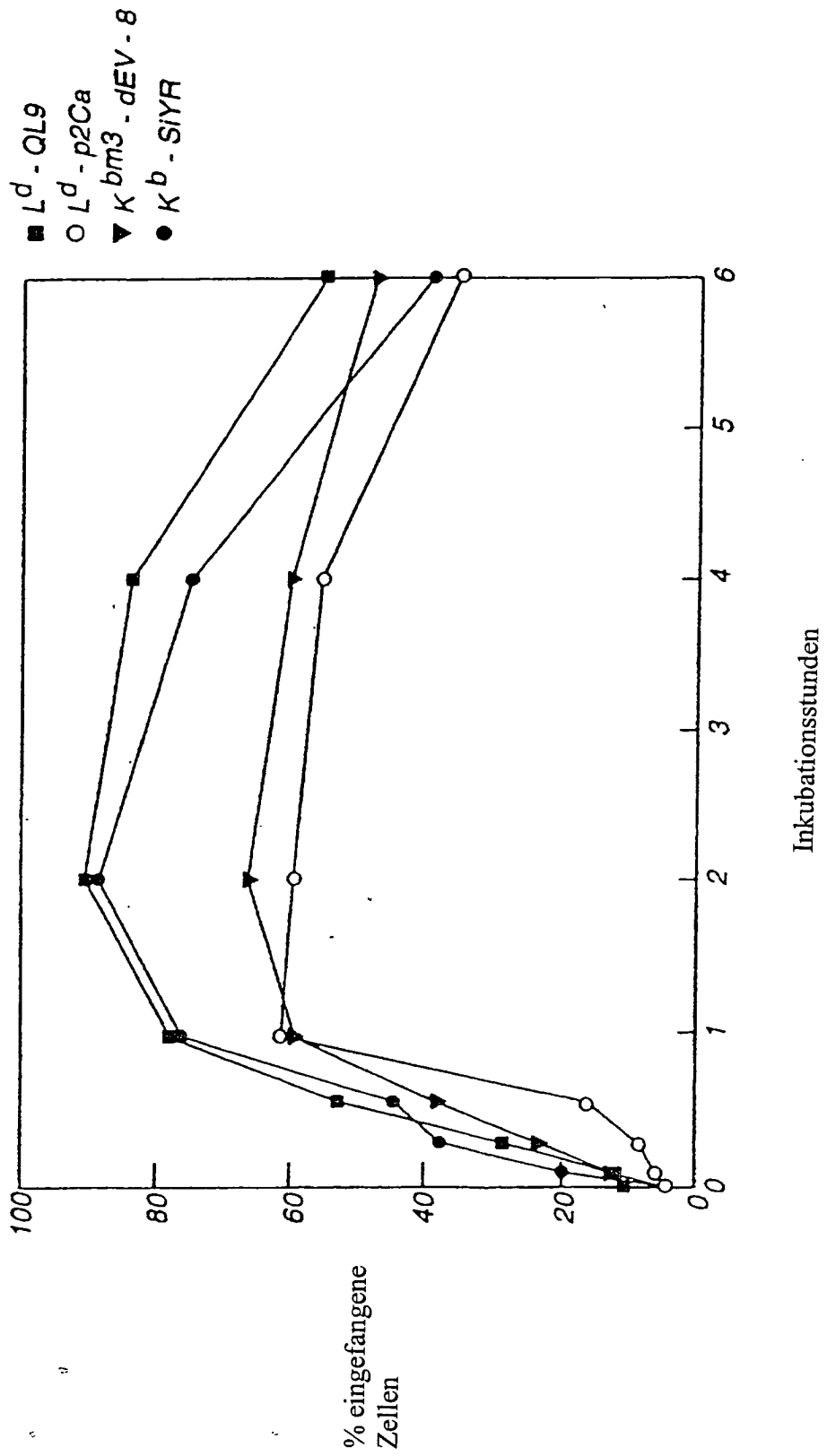
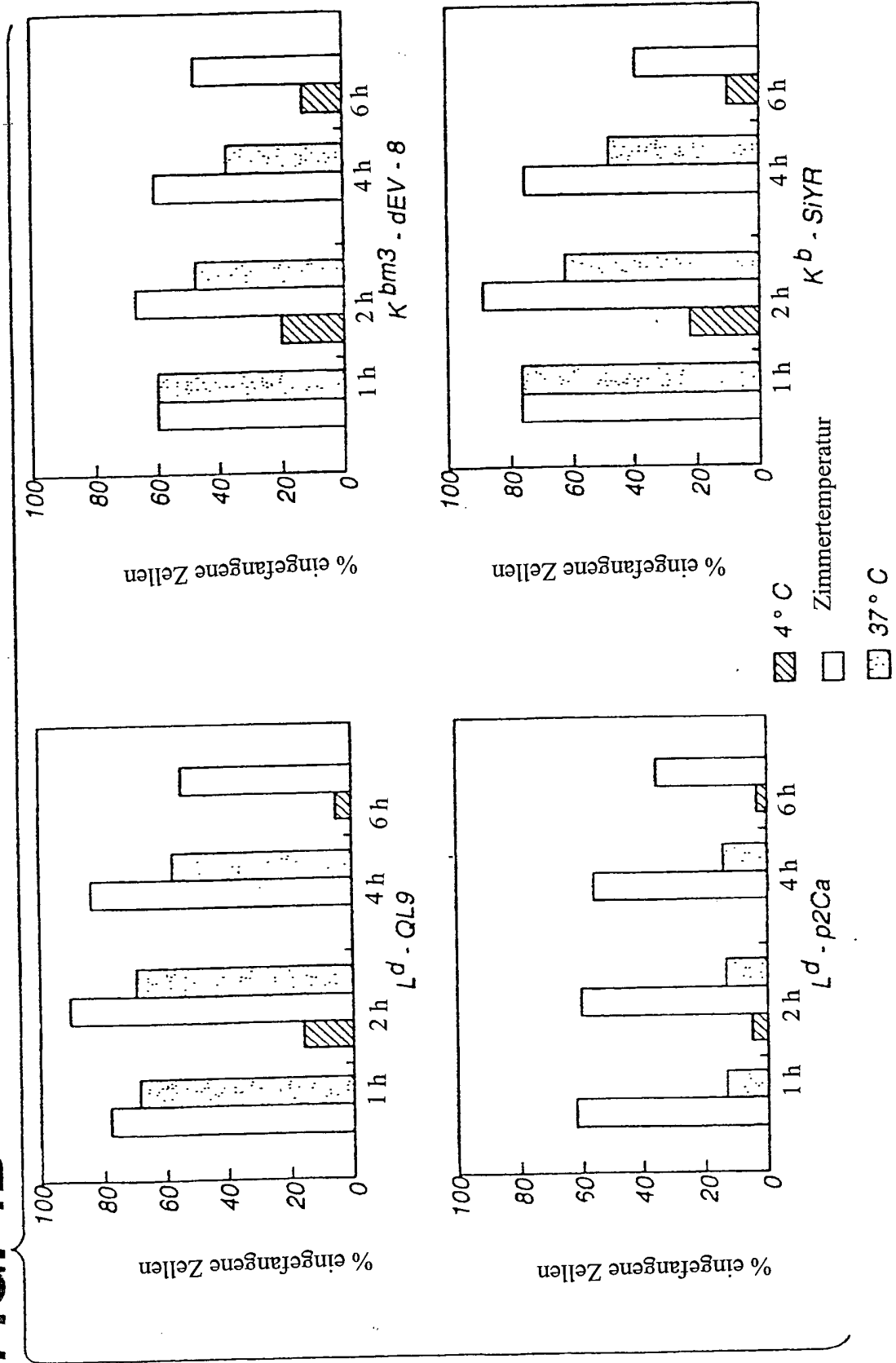




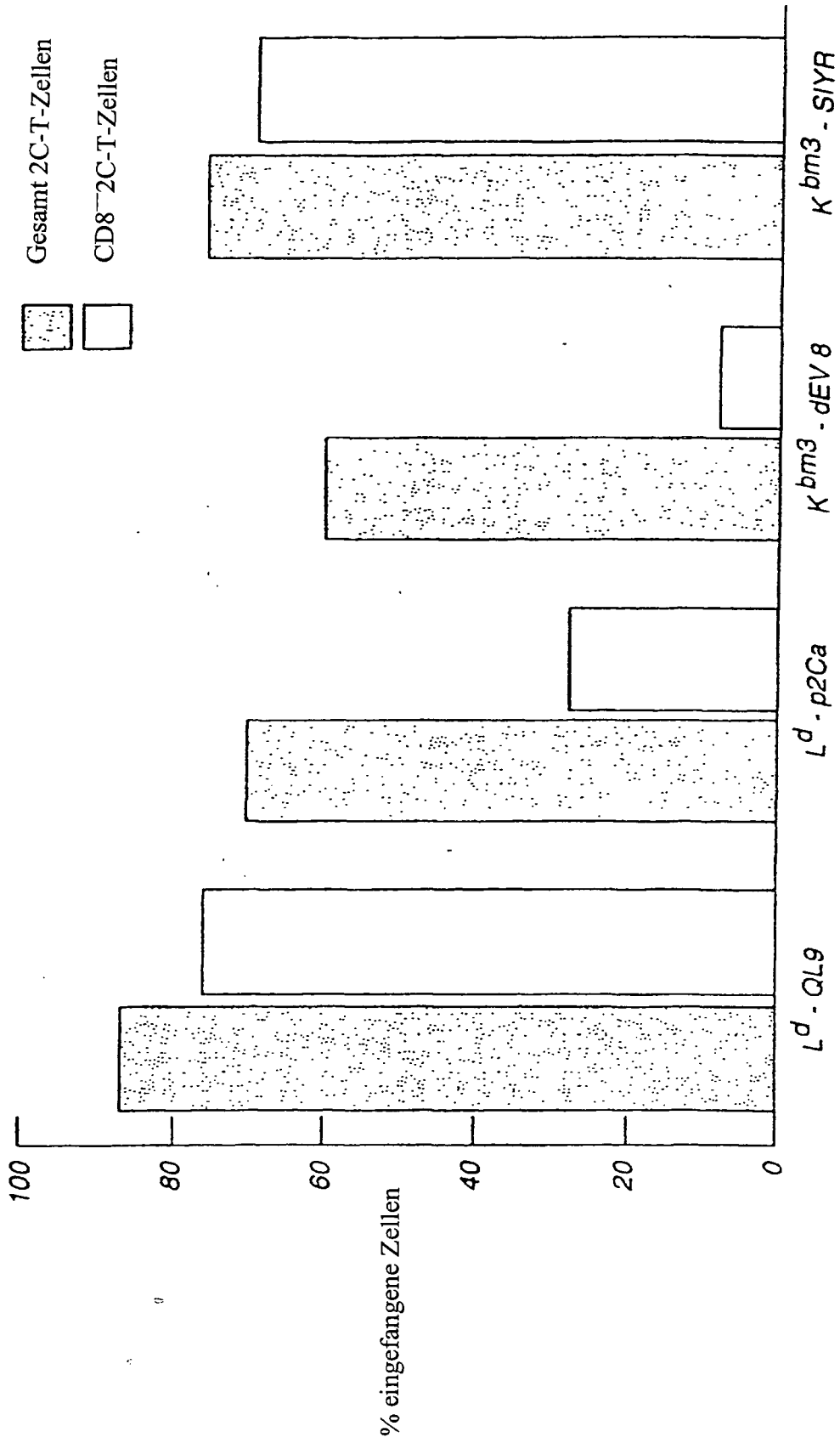
FIG. 4A



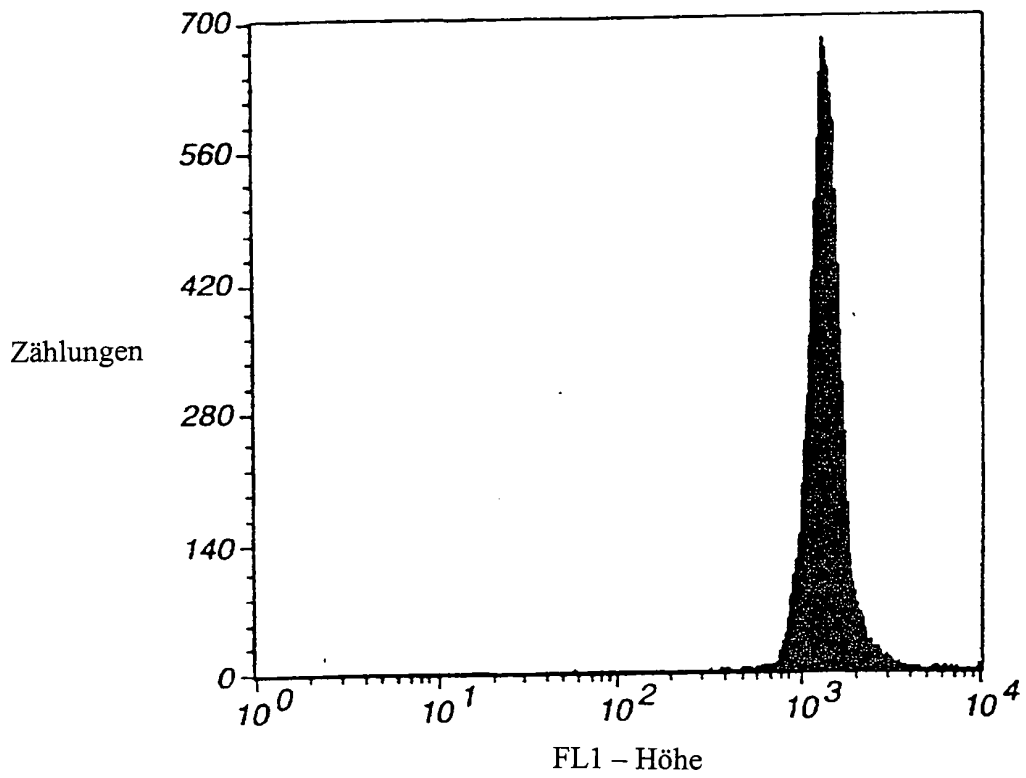
**FIG. 4B**



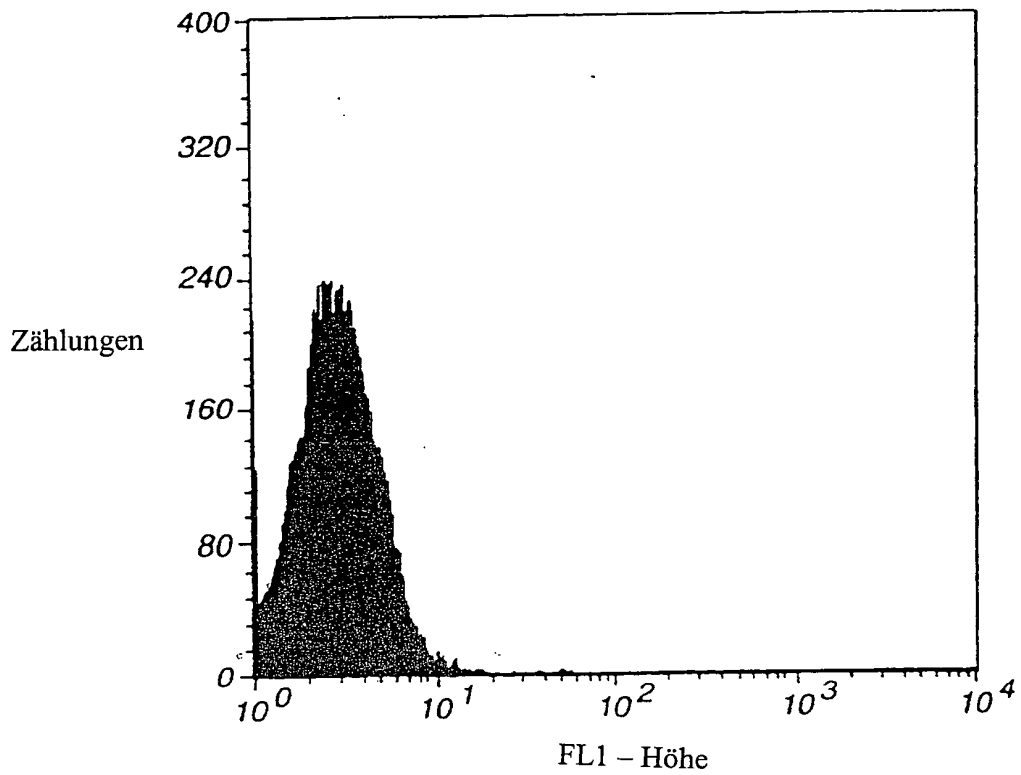
**FIG. 4C**



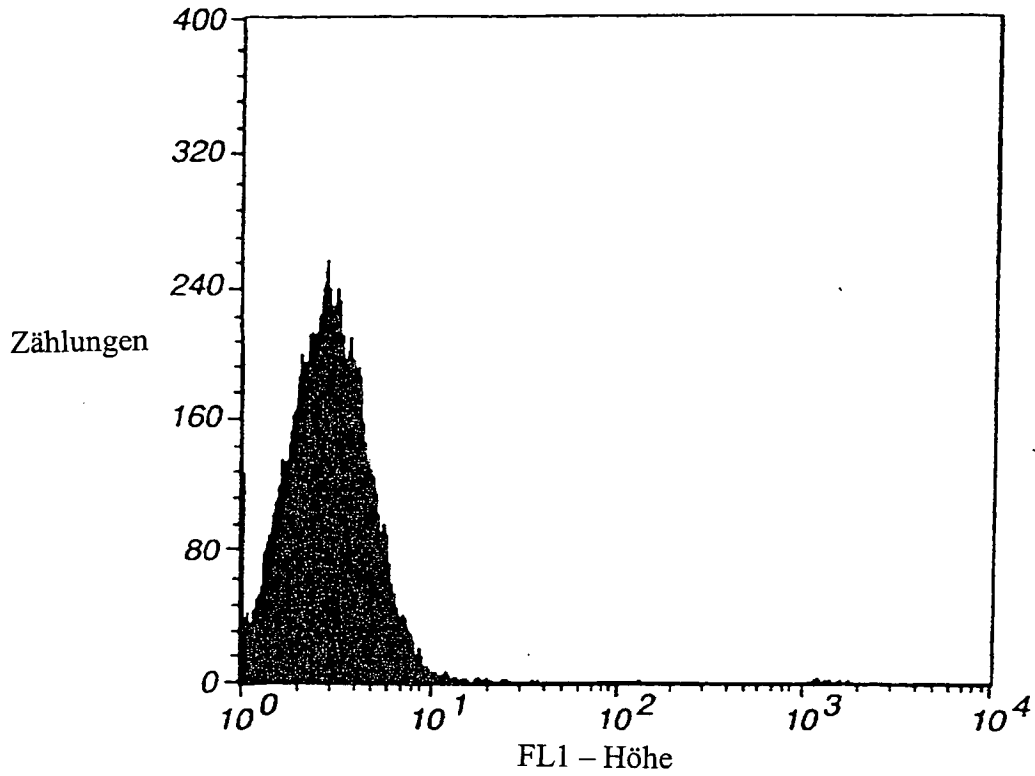
**FIG. 5A**



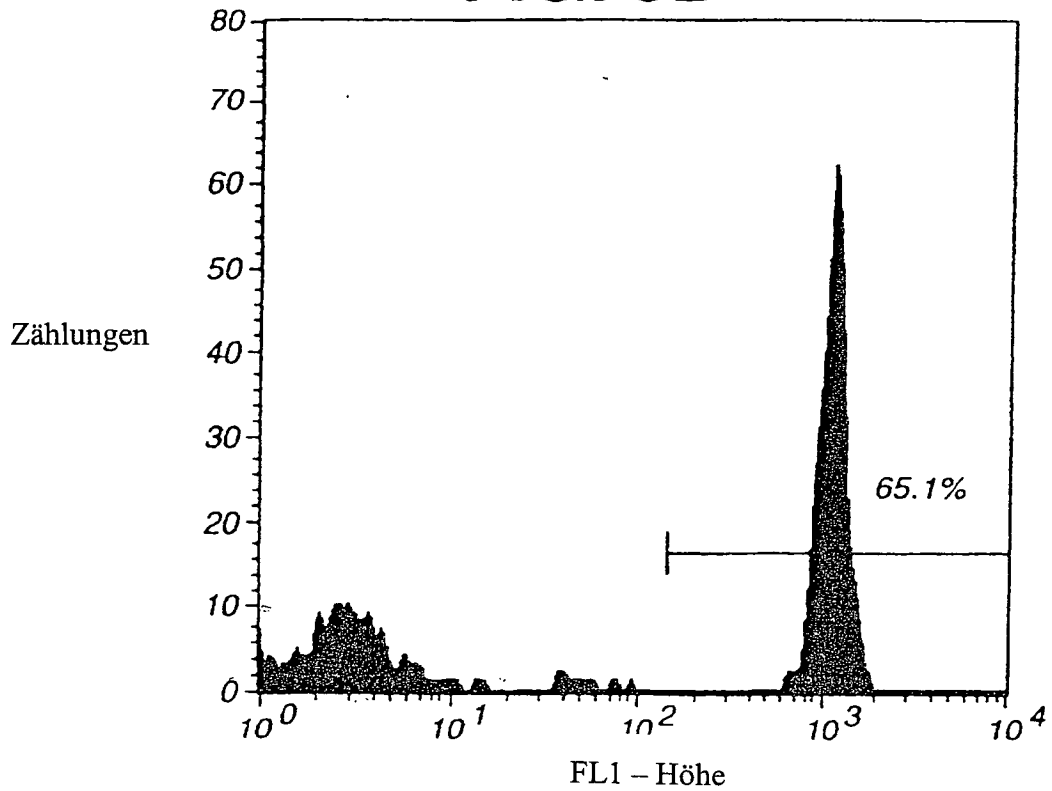
**FIG. 5B**



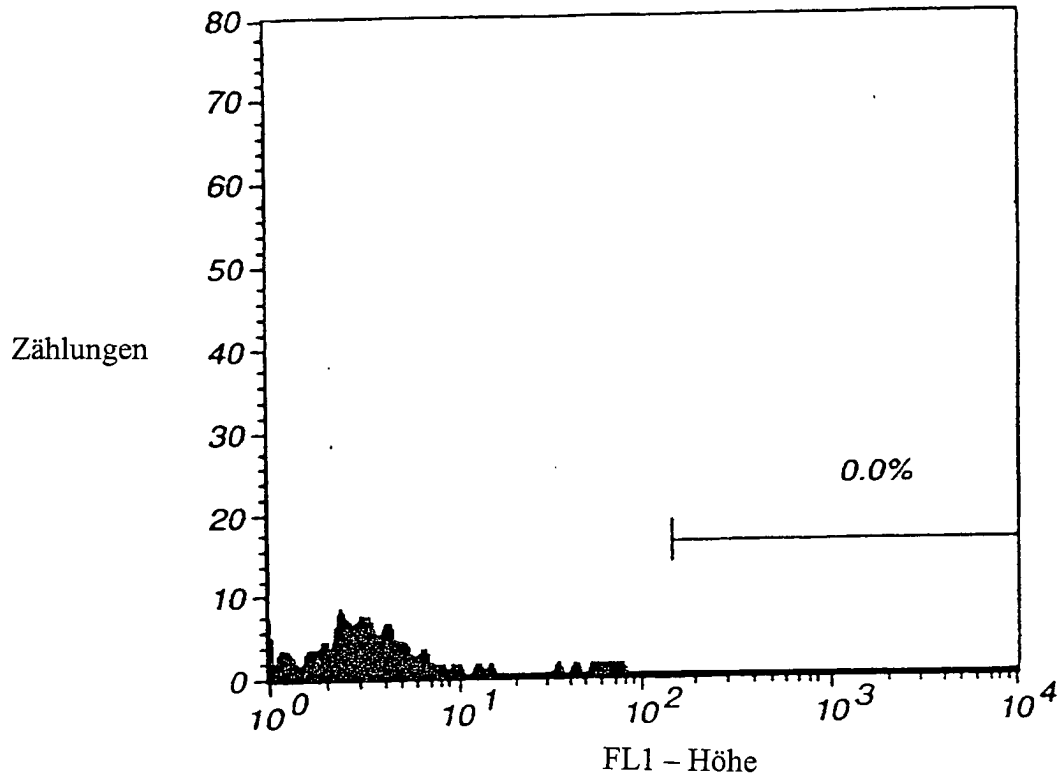
**FIG. 5C**



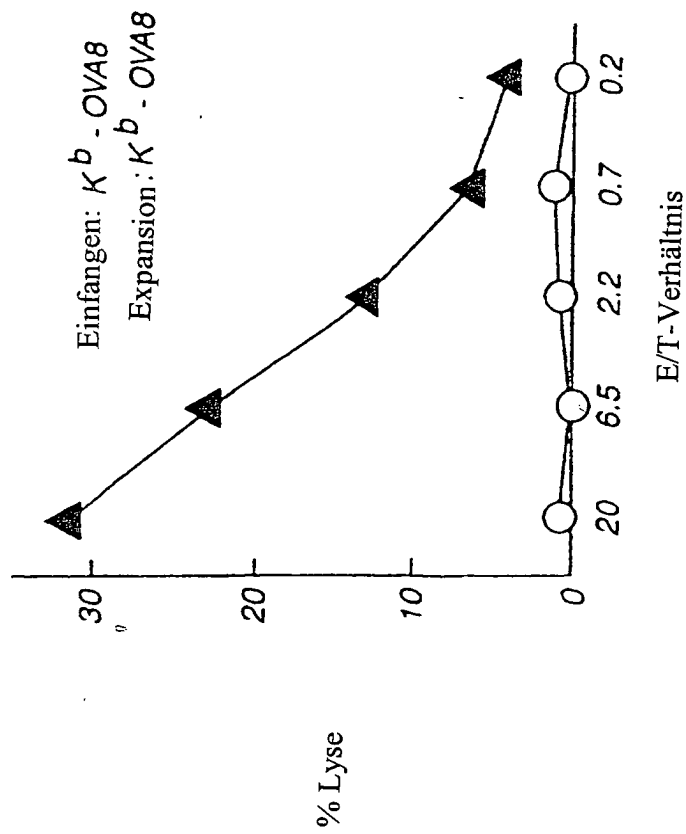
**FIG. 5D**



**FIG. 5E**



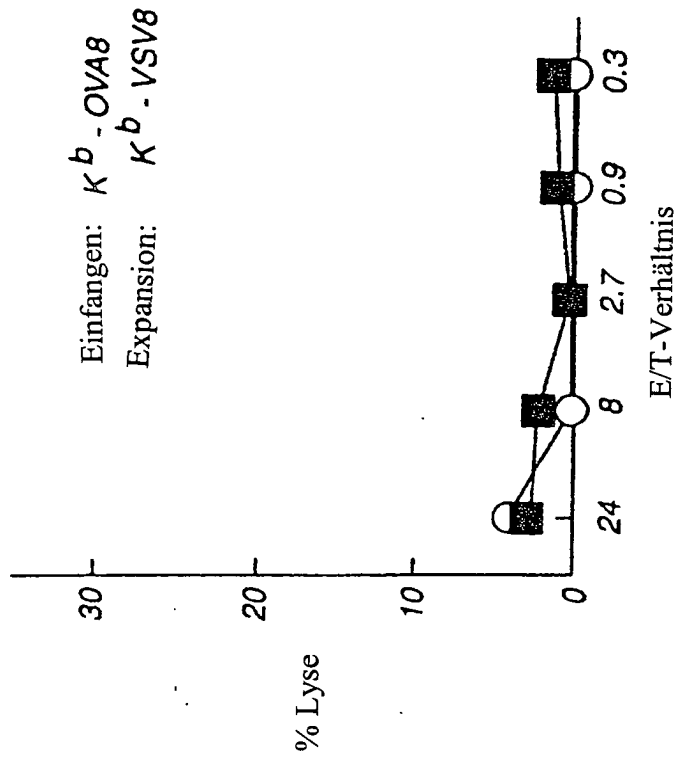
**FIG. 6A**



Peptide, die für den Chrom-  
freisetzungssassay verwendet wurden

▲ OVA8  
○ kein Peptid

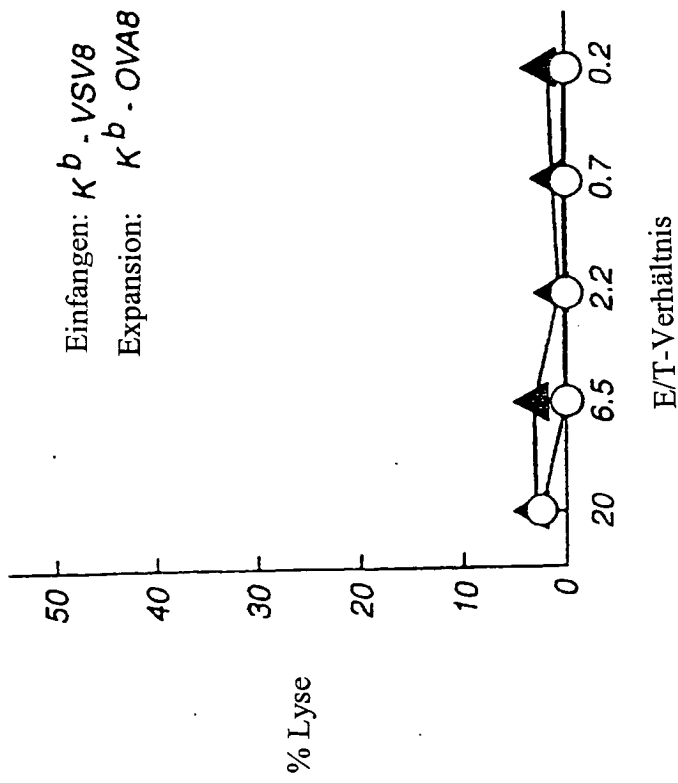
**FIG. 6B**



Peptide, die für den Chrom-  
freisetzungssassay verwendet wurden

■ VSV8  
○ kein Peptid

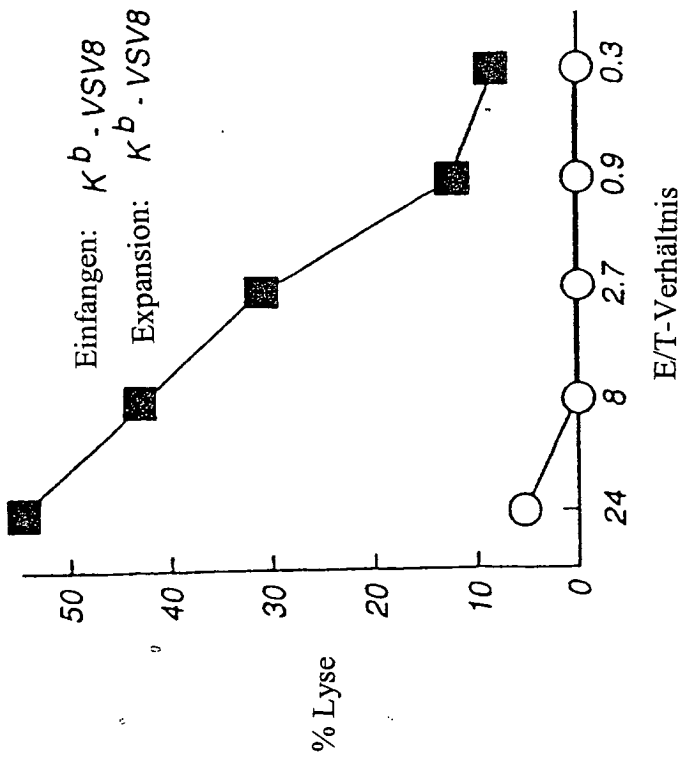
**FIG. 6D**



Peptide, die für den Chrom-  
freisetzungssassay verwendet wurden

- ▲ OVA8
- kein Peptid

**FIG. 6C**

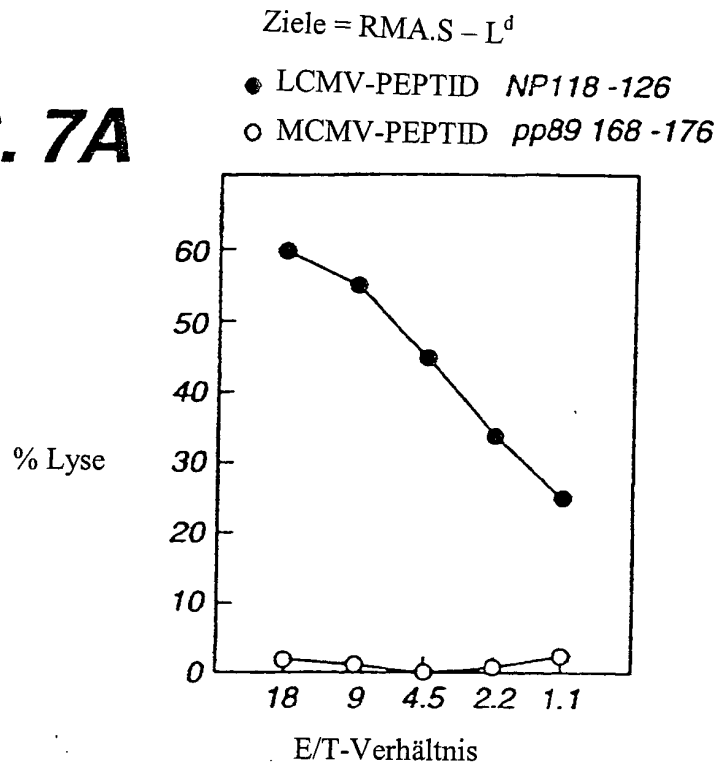


Peptide, die für den Chrom-  
freisetzungssassay verwendet wurden

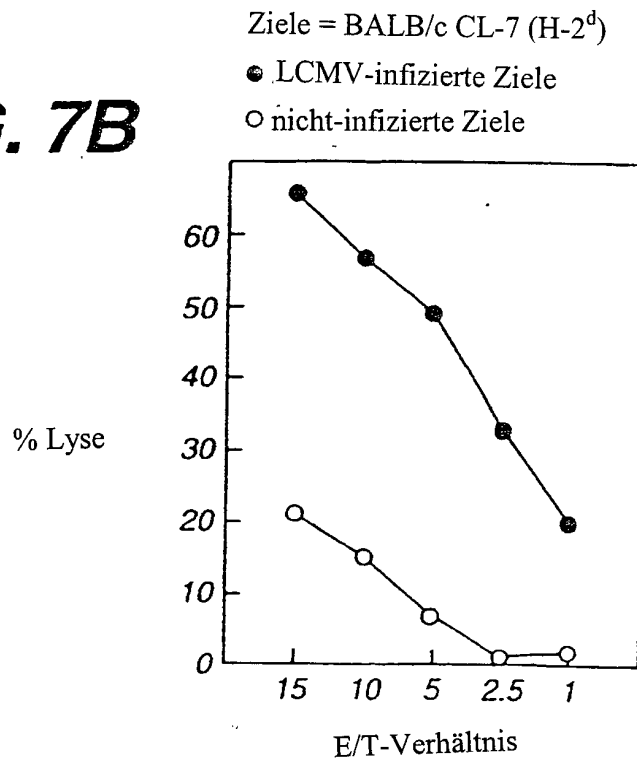
- VSV8
- kein Peptid



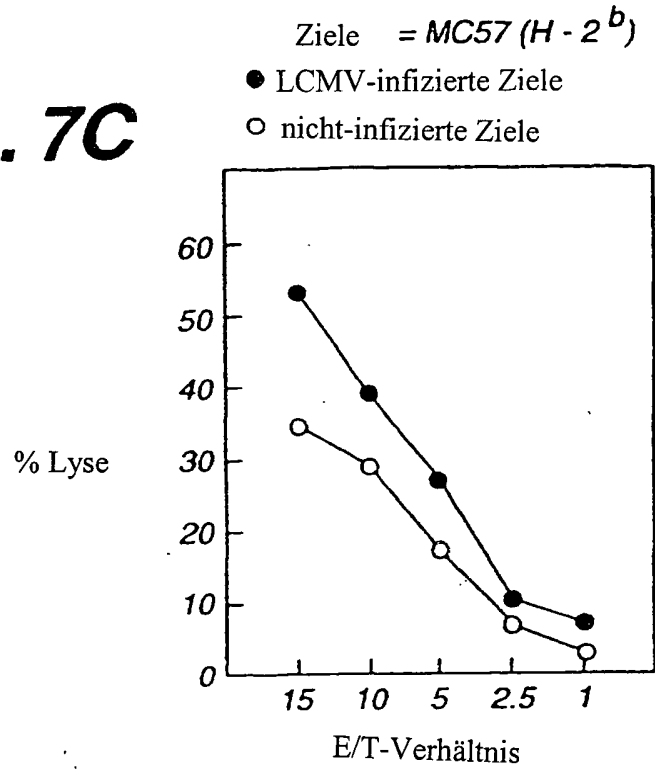
**FIG. 7A**



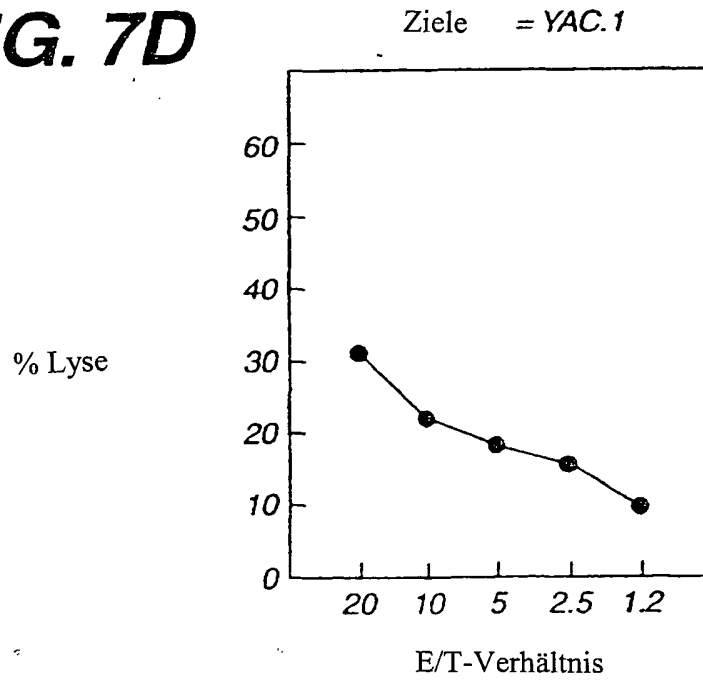
**FIG. 7B**



**FIG. 7C**



**FIG. 7D**



**FIG. 8**

