

## IFB-Tx - Zelltherapeutika - GMPDU

### ■ Leiter: Prof. Dr. Ulrike Köhl

Tel.: 0511/532-8253 • E-Mail: [zuther.katja@mh-hannover.de](mailto:zuther.katja@mh-hannover.de) • [www.mh-hannover.de/zelltherapeutika.html](http://www.mh-hannover.de/zelltherapeutika.html)

- Keywords: Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs), Zelltherapeutika, Clinical-Scale-Up, antigen-spezifische T-Zellen, NK-Zellen, chimäre Antigenrezeptoren, Tumor-Immune-Escape-Mechanismen, Stammzelltransplantation, Good Manufacturing Practice (GMP)

### Forschungsprofil

Das Institut für Zelltherapeutika mit der „Good Manufacturing Practice Development Unit“ (GMPDU) und dem „Cellular Therapy Centre“ (CTC) dient der Translation von Zelltherapeutika von der Entwicklung bis zur klinischen Anwendung. Als GMP core facility der MHH werden im Rahmen der Herstellung unterschiedliche Zellprodukte ohne Manipulation, durch Aufreinigung (Selektion, Depletion) oder zellbasierte Therapien mit aufwendiger Bearbeitung, Expansion und Transduktion, sogenannte „Advanced Therapy Medicinal Products“ (ATMPs) hergestellt. ATMPs sind Gen- und somatische Zelltherapeutika bzw. biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte (sog. TEP Tissue Engineered Products), die individuelle Therapien erlauben. Im Rahmen des BMBF geförderten Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrums Transplantation (IFB-Tx) werden in enger Zusammenarbeit zwischen den Mitarbeitern der GMP core facility und den Kollegen aus den verschiedenen Forschergruppen des IFB-Tx die im Labormaßstab entwickelten Zellprodukte auf einen klinischen Maßstab gebracht, um sie zur Behandlung von Patienten mit Stammzell- und Organtransplantation einsetzen zu können. Nach Abschluss der Validierung wird die jeweilige Herstellungserlaubnis nach §13 AMG (Arzneimittelgesetz) eingeholt.

In enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin (Prof. B. Eiz-Vesper, PD Dr. H.G. Heuft, Dr. L. Goudeva) und der Kinderklinik (PD. Dr. B. Maecker-Kolhoff) wurde zunächst das Herstellungsverfahren für verschiedene antigen-spezifische T-Zellen (gegen: Cytomegaloviren (CMV), Epstein Barr Viren (EBV), Adenoviren (ADV)) aufgebaut und validiert und anschließend die Herstellungserlaubnis eingeholt. Diese liegt seit April 2014 für CMV-spezifische T-Zellen und seit Januar 2015 für die beiden anderen virus-spezifischen T-Zellen vor, wodurch die MHH erstmals Hersteller für drei ATMPs ist. Die Konzentration CMV-spezifischer T-Zellen im Leukapherisat allogener Spender lag bei 0,07-1,1% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Durch die immunomagnetische Aufreinigung mittels „Cytokine Capture System“ (CCS) wurde eine mediane Reinheit von 81% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen erreicht. Da der bisherige Herstellungsprozeß für antigen-spezifische T-Zellen sehr zeitaufwendig ist, wurden außerdem in parallelen Test-Läufen neue Möglichkeiten zur vollautomatischen Zellprozessierung [Abb.1] untersucht und optimiert, die erste erfolgsversprechende Ergebnisse lieferten. Die Mitarbeiter von CTC und GMPDU arbeiten ferner an der translationalen Umsetzung verschiedener Zelltherapeutika zur Behandlung von Patienten mit Krebs, schweren traumatischen sowie degenerativen Gewebe- und Organverletzungen und zur Toleranzinduktion nach Stammzell- und Organtransplantation. Dies umfasst die Herstellung regulatorischer T-Zellen, NK-Zellen, Dendritischer Zellen, antigen-spezifischer T-Zellen, mesenchymaler Stammzellen, T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ -depletierter Transplantate sowie gen-manipulierter Stamm- und Effektorzellen. Für die Entwicklung neuer NK-Zell-basierter Therapien wurde U. Köhl im Rahmen eines EU geförderten Marie Curie ITNs in 2014 Sprecher des EU Konsortiums „NATURIMMUN“.



**Abb. 1:** Vollautomatische Aufreinigung antigen-spezifischer T-Zellen. Im Clinical-Scale-Up-Raum der GMPDU, Institut für Zelltherapeutika, wurden Testläufe mit dem neuen vollautomatischen CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotech) zur Herstellung antigen-spezifischer T-Zellen und anderer Zellprodukte durchgeführt. Im Vergleich zu etablierten Geräten, mit denen eine manuelle Aufreinigung und Zellexpansion verschiedener Zellprodukte unter GMP-Bedingungen erfolgt, erlaubt das neue Gerät eine zeitsparende und standardisierte Herstellung antigen-spezifischer T-Zellen.

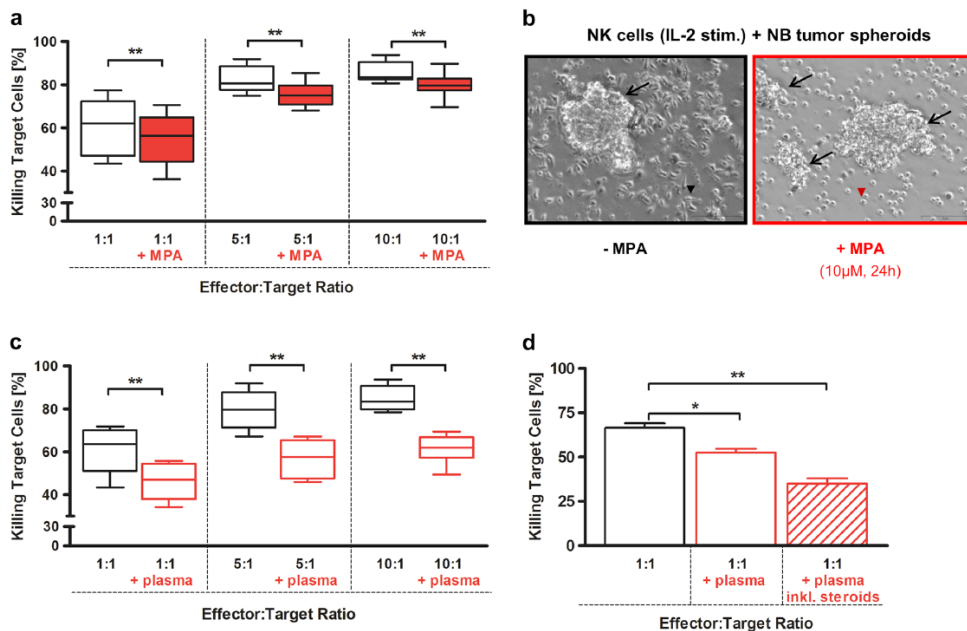
## Forschungsprojekte

### **NK-Zellzytotoxizität: Steigerung durch gerichtete NK-Zellen, aber Hemmung durch immunsuppressive Therapie**

Natürliche Killer (NK)-Zellen spielen eine bedeutende Rolle für die immunologische Kontrolle von Leukämien und Tumoren. So gewinnt ihre therapeutische Nutzung im Rahmen von zellulären Immuntherapien immer mehr an Bedeutung. Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie ([clinicaltrials.gov NCT01386619](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01386619)) zur Behandlung von Leukämien und Tumoren mit Spender-NK-Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation (SZT) konnten wir die Machbarkeit und Verträglichkeit dieser Zelltherapie zeigen. Die Ergebnisse unserer Studie weisen jedoch darauf hin, dass der Erfolg der Therapie durch Tumor-Immune-Escape-Mechanismen (TIEMs) erheblich abgeschwächt wird. Die alleinige Immuntherapie mit allogenen Spender-NK-Zellen nach haploidenter SZT reicht offenbar nicht aus, um die Heilungsrate bei pädiatrischen Leukämien und Tumoren entscheidend zu verbessern. Ein Forschungsschwerpunkt des Instituts für Zelltherapeutika liegt daher auf (i) den Untersuchungen zu den TIEMs und (ii) der Entwicklung neuer Strategien zur Steigerung der NK-Zellzytotoxizität. Dazu werden gerichtete NK-Zellen generiert, die spezifisch an maligne Zellen binden können.

In den vergangenen Jahren zeigten unsere Untersuchungen zu bestimmten löslichen Liganden (TGF- $\beta$ 1, lösliches MICA), dass diese Mediatoren direkt an einer Immunsuppression in Hoch-Risiko-Patienten bei fortgeschrittenem Stadium der malignen Erkrankung und erhöhter Tumorlast beteiligt sind und lösliche NKG2D-Liganden durch Bindung an NK-Zellen die Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen blockieren können. In 2014 wurden darüber hinaus Untersuchungen zur möglichen Hemmung der zytotoxischen Funktionalität von NK-Zellen durch das immunsuppressive Medikament Mycophenolat-Mofetil (MMF), das im Rahmen der haploidenten SZT eingesetzt wird, durchgeführt. MMF zeigt einen

starken inhibierenden, jedoch reversiblen Einfluss auf die Proliferationshemmung von NK-Zellen in der therapeutisch relevanten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (Abb. 2). Auch die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Signalmoleküle STAT -3/-4/-5, AKT und ERK1/2, die an der NK-Zell Proliferation beteiligt sind, wurden durch MMF-Inkubation negativ beeinflusst. Dies korrelierte signifikant mit der reduzierten Sekretion von Zytokinen/Chemokinen und der Abnahme der Oberflächenexpression von NKG2D- und den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 auf den NK-Zellen sowie von Adhäsions- und Migrationsmarkern (z. B. ICAM-1/CD54, LFA-1/CD11a, CD62L, CXCR3). Zudem zeigte sich, dass die Zytotoxizität IL-2 aktivierter NK-Zellen allogener Spender gegen die leukämische Zelllinie K562 und gegen primäre humane Neuroblastom (NB)-Zellen bereits nach 24-stündiger Inkubation mit dem Immunsuppressivum deutlich eingeschränkt war (Abb. 2 a+b). Erfolgte eine ex vivo-Inkubation der aktivierten Spender-NK-Zellen mit MMF-haltigem Plasma von Patienten, war diese Inhibition ebenfalls signifikant (Abb. 2c). MMF-haltiges Plasma, das zusätzlich Steroide enthielt, führte zu einer verstärkten Inhibition der NK-Zell-Zytotoxizität (Abb. 2d). Interessanterweise wurde die Zytotoxizität voraktivierter NK-Zellen, die 9-12 Tage mit IL-2 stimuliert wurden, deutlich weniger durch MMF inhibiert im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen oder NK-Zellen, die nur kurz aktiviert wurden. Dies kann für zukünftige Therapien im Rahmen der SZT von größerer Bedeutung zur Optimierung von NK-Zell-Therapien sein und wird nun in weitergehenden Experimenten genauer untersucht.



**Abb. 2:** Einfluss von Mycophenolat-Mofetil auf die Zytotoxizität von NK-Zellen. (a) Die zytotoxische Aktivität von IL-2-stimulierten NK-Zellen allogener Spender (weiß) gegen K562-Zielzellen war nach 16-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  MPA (bioaktiver Metabolit von Mycophenolat-Mofetil) vermindert (rot). (b) Mikroskopie-basiertes „Time-lapse-Imaging“ von NK-Zellen, die mit primären NB-Zellen ko-kultiviert wurden, wuchsen als Tumor-Spheroiden (Pfeile). IL-2-stimulierte NK-Zellen zeigten höhere Zytotoxizität gegen Tumor-Spheroiden (links, schwarzes Dreieck) gegenüber NK-Zellen nach MPA Inkubation (für eine Videoaufzeichnung s. Supplementary Material Brehm et al, 2014). (c) Die hohe Zytotoxizität IL-2-aktivierter NK-Zellen (weiß) gegen K562-Zellen war nach 16-stündiger Inkubation mit Patientenplasma, welches Mycophenolat-Mofetil enthielt (rot), signifikant vermindert. (d) Patientenplasma nach Behandlung mit Mycophenolat Mofetil und Steroidzugabe führte zur weiteren Reduktion der NK-Zellzytotoxizität \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ ; MPA = Mycophenolsäure; NB = Neuroblastom. (Brehm et al. 2014).

Zur Überwindung von Tumor-Immune-Escape-Mechanismen (TIEM) wurde die klinisch einsetzbare humane NK-Zelllinie NK-92 durch Transduktion mit einem retroviralen Vektorkonstrukt gentechnisch verändert, so dass sie chimäre Antigenrezeptoren (CARs) spezifisch für das Tumor-assoziierte ErbB2 (HER2)-Antigen exprimiert. Dieser CAR basiert auf dem ErbB2-spezifischen Antikörper FRP5, welcher die CD28 und CD3- $\zeta$ -Signal-Domänen trägt (CAR5.28.z). Entsprechend GMP-konformer Prozeduren wurde eine stabile klonale Zelllinie generiert, die den humanisierten CAR exprimiert. In einer Kooperation mit Prof. W. Wels (Frankfurt) konnte das deutlich höhere Potential der so modifizierten NK-Zellen gegenüber der unmanipulierten NK-92 hinsichtlich der gerichteten Zellyse von ErbB2 positiven Tumoren gezeigt werden. Diese NK-92/5.28.z-Zellen gelangten in vivo an ihre Wirkorte und konnten effizient sowohl ErbB2-exprimierende als auch anderweitig NK-Zell-resistente Tumorzellen in vitro und in vivo in einem orthotopen Brustkrebs-Fremdimplantat-Modell lysieren. In Experimenten zur Abklärung möglicher Nebenwirkungen dieser gen-modifizierten NK-Zelllinie konnte selbst bei den höchsten Effektor-/Zielzell-Verhältnissen nur eine unterschwellige Basalaktivität der NK-92/5.28.z-Zellen gegenüber normalen Lungen-Epithel-Zellen beobachtet werden. Keine Zytotoxizität wurde gegenüber anderen Geweben wie Kardiomyozyten und peripheren Blutzellen beobachtet. Damit steht mit den NK-92/5.28.z-Zellen ein klonales, molekular und funktional gut beschriebenes und stabiles Zelltherapeutikum zur Verfügung, was vielversprechend für die adoptive Krebstherapie sein könnte.

■ Projektleitung: Kloess, Stephan (Dr.); Förderung: BMBF

## Weitere Forschungsprojekte

### **NATURIMMUN: Natural Killer Cell-Based Anti-Cancer Immunotherapies (EU-FP7-People-Marie-Curie ITN)**

■ Projektleitung: MHH: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Paris: Santo di, James (Prof. Dr.), Jerusalem: Mandelboim, Ofer (Prof. Dr.), London: Nathwani, Amit (Prof. Dr.), Barcelona: Lopez-Botet, Miguel (Prof. Dr.), Cambridge: Trowsdale, John (Prof. Dr.); Förderung: EU

### **Steigerung der Zytotoxizität haploidenter NK-Zellen zur Behandlung pädiatrischer Patienten mit Neuroblastom durch Überwinden von Tumor-Immune-Escape Mechanismen**

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Frankfurt: Koch, Joachim (PD Dr.); Förderung: Sander-Stiftung

### **Entwicklung von Immunliganden für die NK-Zell-vermittelte Immuntherapie pädiatrischer akuter Leukämien**

■ Projektleitung: Pogge von Strandmann, (Prof. Dr.), Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Förderung: Deutsche Krebshilfe

### **Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration-2 (Studiename: BOOST-2 trial, (EudraCT-Nr.: 2005-000774-46)**

■ Projektleitung: Wollert, Kai (Prof. Dr. Kardiologie), Arseniev, Lubomir (Dr.); Förderung: BMBF

### **Zielgerichtete Killerzellen für die Krebs-Immuntherapie**

■ Projektleitung: Wels, Winfried (Prof. Dr., Frankfurt); Kooperationspartner: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Förderung: BMBF

### **12 Parameter Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von Zellsubpopulationen bei der Freigabe von Zellprodukten**

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Klöss, Stephan (Dr.), Esser, Ruth (Dr.); Förderung: Wirtschaft (Beckman Coulter)

**AGORA: ATMP GMP Open Access Research Alliance (EU-FP7)**

■ Projektleitung: Meji, Pauline (PhD), Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Dickinson, Anne (Prof. PhD), Brunswieck, Sönke (Dr.), Hildebrandt, Martin (Prof. Dr.), Hauser, Andrea (Dr.), Mark W Lowdell (Dr.); Förderung: EU

**CATCH-AMI POLYPOHOR: CXCR4 Antagonism for Cell Mobilisation and Healing in Acute Myocardial Infarction**

■ Projektleitung: Wollert, Kai (Prof. Dr.), Kardiologie MHH; Kooperationspartner: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Arseniev, Lubomir (Dr.), Aleksandrova, Krasimira; Förderung: Wirtschaft

**Originalpublikationen**

Brehm C, Huenecke S, Esser R, Kloess S, Quaiser A, Betz S, Zimmermann O, Soerensen J, Passweg JR, Klingebiel T, Schwabe D, Bader P, Koehl U Interleukin-2-stimulated natural killer cells are less susceptible to mycophenolate mofetil than non-activated NK cells: possible consequences for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63(8):821-833

Elze MC, Ciocarlie O, Heinze A, Kloess S, Gardlowski T, Esser R, Klingebiel T, Bader P, Huenecke S, Serban M, Köhl U, Hutton JL Dendritic cell reconstitution is associated with relapse-free survival and acute GVHD severity in children after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(2):266-273

Schönfeld K, Sahn C, Zhang C, Naundorf S, Brendel C, Odendahl M, Nowakowska P, Bönig H, Köhl U, Kloess S, Köhler S, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Schmidt M, Schubert R, Kühlcke K, Seifried E, Klingemann HG, Rieger MA, Tonn T, Grez M, Wels WS Selective Inhibition of Tumor Growth by Clonal NK Cells Expressing an ErbB2/HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Mol Ther* 2015;23(2):330-338

Tischer S, Priesner C, Heuft HG, Goudeva L, Mende W, Barthold M, Kloess S, Arseniev L, Aleksandrova K, Maecker-Kolhoff B, Blasczyk R, Koehl U, Eiz-Vesper B Rapid generation of clinical-grade antiviral T cells: selection of suitable T-cell donors and GMP-compliant manufacturing of antiviral T cells. *J Transl Med* 2014;12(1):336

**Abstracts**

2014 wurden 15 Abstracts publiziert.

**Stipendien**

Alessa Silva: EU-NATURIMMUN: Improvement of NK cell cytotoxicity to overcome resistance against relapse leukemia.

**Weitere Tätigkeiten in der Forschung**

Köhl, Ulrike (Prof. Dr.): Professional Societies: International Society for Cellular Therapy (ISCT), Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH), Pädiatrische Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (PÄD-AG-KBT), Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGFI), AG Biologie der NK-Zellen, Knochenmarktransplantation / Genterapie Frankfurt (KGF), European working group on clinical cell analysis (EWGCCA); Gutachtertätigkeiten: EMA (European Medicine Agency), Carreras-Stiftung, Deutsche Krebshilfe, Austrian Science Foundation, Foundation for Scientific Research Belgium, Nature Medicine, New England Journal of Medicine, Clinical Cancer Research, Journal of Biochemical Pharmacology, Journal of Human Immunology, Journal of Immunological Methods, Journal of Leukemia and Lymphoma, Journal of Tissue Antigen, Bone Marrow Transplantation, International Journal of Hematology, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Klinische Pädiatrie Cytometry, Cytotherapy.