

IFB-Tx: Zelltherapeutika - GMPDU

■ Leiter: Prof. Dr. Ulrike Köhl

Tel.: 0511/532-8253 • E-Mail: zuther.katja@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/zelltherapeutika.html

■ Keywords: Zelltherapeutika, GMP, ATMPs, Advanced Therapy Medicinal Products, Reinraum, Clean Room, Stammzelltransplantation, stem cell transplantation

Forschungsprofil

Das Institut für Zelltherapeutika mit der „Good Manufacturing Practice Development Unit“ (GMPDU) und dem „Cellular Therapy Centre“ (CTC) dient der Translation von Zelltherapeutika bis zur klinischen Anwendung. Als GMP core facility der MHH mit 3 Reinräumen „A“ in „B“ werden zell-basierte Therapien ohne oder mit aufwendiger Manipulation, sogenannte „Advanced Therapy Medicinal Products“ (ATMPs) auf einen klinischen Maßstab übertragen. ATMPs sind Gen- und Zelltherapeutika bzw. biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte, die individuelle Therapien erlauben. In enger Zusammenarbeit zwischen den Mitarbeitern der GMP core facility und den Kollegen aus den verschiedenen Forschergruppen des Integrierten Forschungs und Behandlungszentrum für Transplantation (IFB-Tx) erfahren die im Labormaßstab entwickelten Zellprodukte dieses „Clinical scale-up“, um sie zur Behandlung von Patienten mit Stammzell- und Organtransplantation einsetzen zu können. Nach Abschluss der Validierung wird die jeweilige Herstellungserlaubnis eingeholt. Als Basis dazu dient die vorliegende Herstellungserlaubnis nach §13 AMG (Arzneimittelgesetz) sowie Genehmigungen nach §20b, §20c und §21a AMG z.B. für Blut- und Gewebezubereitung inkl. immunomagnetischer CD34 Selektion oder CD3/CD19 Depletion peripherer Blutstammzellen.

Es werden Zelltherapeutika zur Behandlung von Patienten mit Krebs, schweren traumatischen sowie degenerativen Gewebe- und Organverletzungen und zur Toleranzinduktion nach Stammzell- und Organtransplantation entwickelt. Dies umfasst die Herstellung regulatorischer T-Zellen, NK-Zellen, Dendritischer Zellen (DZs), antigen-spezifischer T-Zellen, aktivierter Makrophagen, mesenchymaler Stammzellen, T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ -depletierter Transplantate sowie gen-manipulierter Stamm- und Effektorzellen. In Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin (Prof. B. Eiz-Vesper, PD Dr. H.G. Heuft, Dr. L. Goudeva) und der Kinderklinik (Prof. B. Mäcker-Kolhoff) konnte die Validierung des Prozesses zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) erfolgreich abgeschlossen werden. Im CTC (Dr. L. Arseniev, C. Priesner, K. Aleksandrova) erfolgte die GMP-konforme Herstellung der CMV-CTLs, während in der GMPDU (Dr. R. Esser, Dr. S. Klöß) parallel Test-Läufe zu CMV-CTLs im klinischen Maßstab mittels CliniMACS Prodigy® (neue Möglichkeit zur vollautomatischen Zellprozessierung) durchgeführt wurden. Zur Implementierung eines aufwendigen Programms zur Qualitätskontrolle von Zelltherapeutika wurde in Kooperation mit der Neurologie (Prof. S. Petri) an Mesenchymalen Stromazellen und mit der Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation (Prof. R. Strieppe) an genetisch manipulierten DZs gearbeitet. Im Rahmen eines von der EU geförderten Marie Curie Programms wurden altersgemachte Normwerte für DZs im peripheren Blut (PB) gesunder Kinder erhoben.

Forschungsprojekte

Allogene NK-Zellen als Zelltherapeutikum zum Überwinden von Tumor Immune Escape Mechanismen und autologer NK-Zell-Defizienz

Die Zytotoxizität von NK-Zellen wird durch aktivierende und inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren reguliert. Zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren gehören die Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und der

Rezeptor NKG2D, der unter IL-2 hochreguliert wird [Abb. 1A]. In einer abgeschlossenen GCP-konformen Phase I/II Studie mit CD56+CD3- Spender NK-Zellen zur Behandlung von rezidivierenden Hochrisiko-Leukämien und Tumoren nach haploidenter Stammzelltransplantation konnten wir die Machbarkeit und Verträglichkeit dieser Zelltherapie ohne das Auftreten einer graft versus host disease (GvHD) zeigen, wenn die kontaminierende T-Zell-Dosis unter 25×10^3 T-Zellen/kg KG lag (Stern M et al., Koehl U. BMT 48:433-8; 2013). Es zeigten sich aber auch Limitationen durch Tumor-Immune-Escape-Mechanismen. Dabei wurden hohe Plasmaspiegel von löslichem „class I chain-related peptide A“ (soluble sMICA) detektiert. sMICA bindet an NKG2D auf den NK-Zellen und kann somit die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen inhibieren [Abb. 1B]. Hoch aktivierte Spender NK-Zellen, die unter IL-2 den Rezeptor NKG2D stark exprimiert haben, können sMICA abfangen und sind mit den noch freien NKG2D-Rezeptoren in der Lage die Tumorzelle zu erkennen und zu lysieren [Abb. 1C].

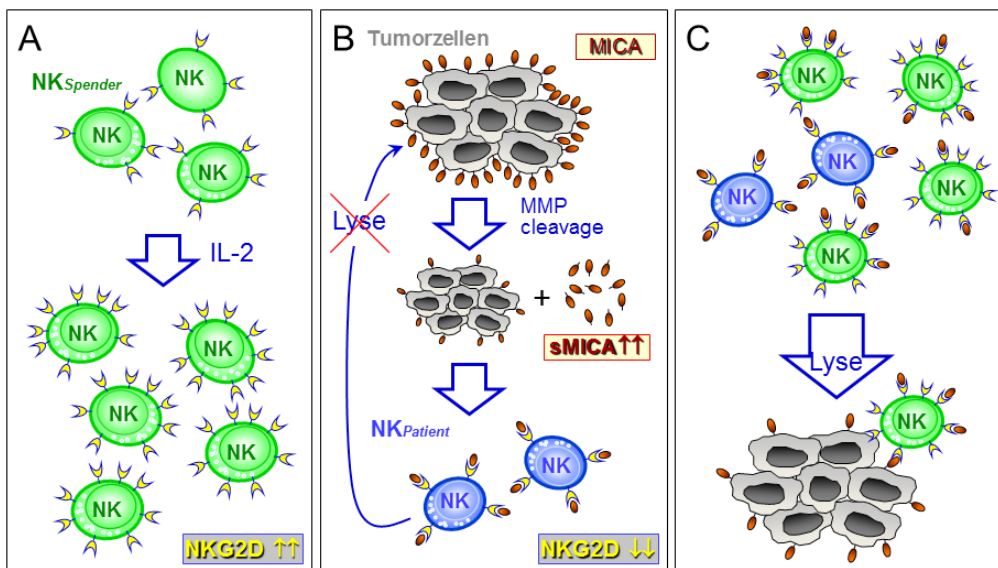


Abb. 1: Überwinden von Tumor Immune Escape Mechanismen durch expandierte/aktivierte NK-Zellen (Kloess S et al., Eur J Immunol 40:3255-67; 2010). (A) Allogene CD56+CD3- NK-Zellen werden mit 1000 U/ml IL-2 aktiviert und expandiert. Dies führt zu einer Hochregulierung des aktivierenden NK-Zell Rezeptors NKG2D. (B) Unter dem Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kommt es zum Abscheren von „class I chain-related peptide A“ (MICA), das als lösliches (soluble) sMICA die NKG2D-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen blockiert. (C) Nach Gabe von IL-2 aktivierten NK-Zellen wird sMICA an NKG2D gebunden, die verbleibenden freien Bindungsstellen des NKG2D Rezeptors erlauben eine Lyse der malignen Zelle durch die NK-Zellen.

Dr. Stephan Klöß konnte in Kooperation mit PD Dr. O. Seitz (Universitätsklinik Frankfurt) bei 55 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (HNSCC, head and neck squamous cancer) vor Behandlungsbeginn zeigen, dass diese Patienten eine normale Anzahl an autologen NK-Zellen im PB haben. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zeigte sich jedoch eine signifikant unterschiedliche Zusammensetzung hinsichtlich regulatorischer und zytotoxischer NK-Zellen [Abb. 2A]. Sieben Patienten konnten initial und im Rezidiv untersucht werden. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme an sMICA und TGF- β 1 bei gleichzeitiger Herunterregulierung von NKG2D [Abb. 2B]. Die Inkubationen von NK-Zellen mit Plasma, das hohe Konzentrationen an sMICA enthielt, korrelierte mit einer geringen NK-Zell-Zytotoxizität [Abb. 2C].

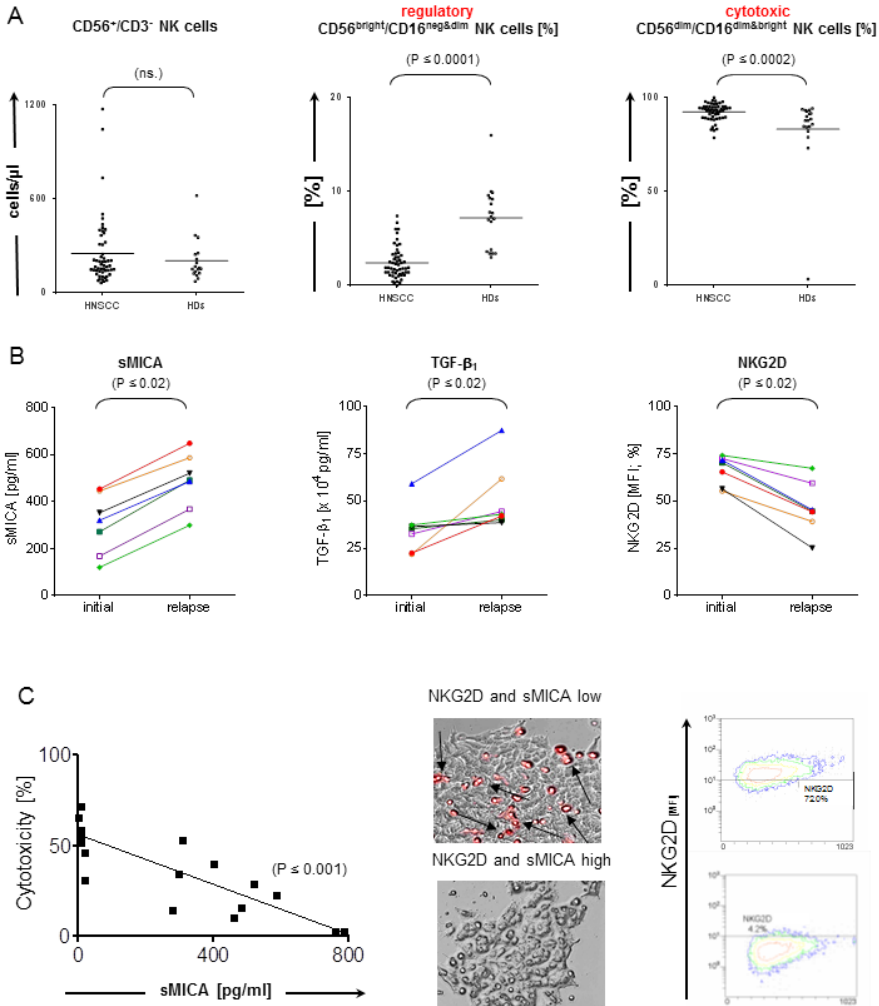


Abb. 2: Rolle von löslichem MICA (sMICA) und TGF-β₁ auf die NKG2D-abhängige Zytotoxizität von NK-Zellen (A) Im Vergleich zu gesunden Spendern (healthy donors, HDs) gibt es keine Unterschiede in der NK-Zellzahl im PB von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (head and neck squamous cancer, HNSCC), jedoch eine Umverteilung der regulatorischen und zytotoxischen NK-Zellen. (B) Ansteigende Plasmaspiegel von sMICA und TGF-β₁ bei gleichzeitig abnehmender NKG2D-Expression auf NK-Zellen in Patienten mit initialer Diagnose im Vergleich zum Rezidiv. (C) Hohe sMICA-Plasma-Spiegel korrelieren mit einer niedrigen NK-Zell-Zytotoxizität in HNSCC Patienten. Floureszenz-Mikroskopie der MICA-abhängigen NKG2D-Expression und Migration von NK-Zellen im HNSCC Tumormodell.

Da haploidente NK-Zellen im Patienten keine oder nur eine geringe GvHD verursachen und die Applikation einer hohen Anzahl allogener NK-Zellen eine Möglichkeit darstellt Tumor-Immune-Escape-Mechanismen zu überwinden, versuchen wir derzeit die Herstellung von Spender NK-Zellen zu optimieren. Eine GMP-konforme CD3-Depletion mit anschließender CD56 Anreicherung führt im Median zu einer Reinheit an 94% CD56+CD3- NK-Zellen. Dr. Ruth Esser konnte zeigen, dass die „Clinical scale“ Expansionsrate bei Stimulation mit 1000 U/ml IL-2 (Proleukin) über 10 Tage erheblich schwankte und im Median eine drei-fache (Range 0-20-fache) Expansion erreichte [Abb. 3A]. Vergleichende Untersuchungen zur Stimulierung mit IL-2 versus IL-2 und IL-15 konnten keine Unterschiede in der Expansionsrate und

im intrazellulären Signalling der NK-Zellen zeigen [Abb. 3B]. IL-2-stimulierte NK-Zellen unterschieden sich von frisch isolierten, unstimulierten NK-Zellen durch eine Abnahme der CD16+ NK-Zellsubpopulation und einer signifikanten Zunahme der Oberflächenexpression aller aktivierenden Rezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D [Abb. 3C+D]. Für Zelltherapeutika, die zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden, ist die Vitalität der kryokonservierten Zellen nach dem Auftauen von besonderer Wichtigkeit. Unstimulierte NK-Zellen zeigten nach dem Auftauen eine signifikant

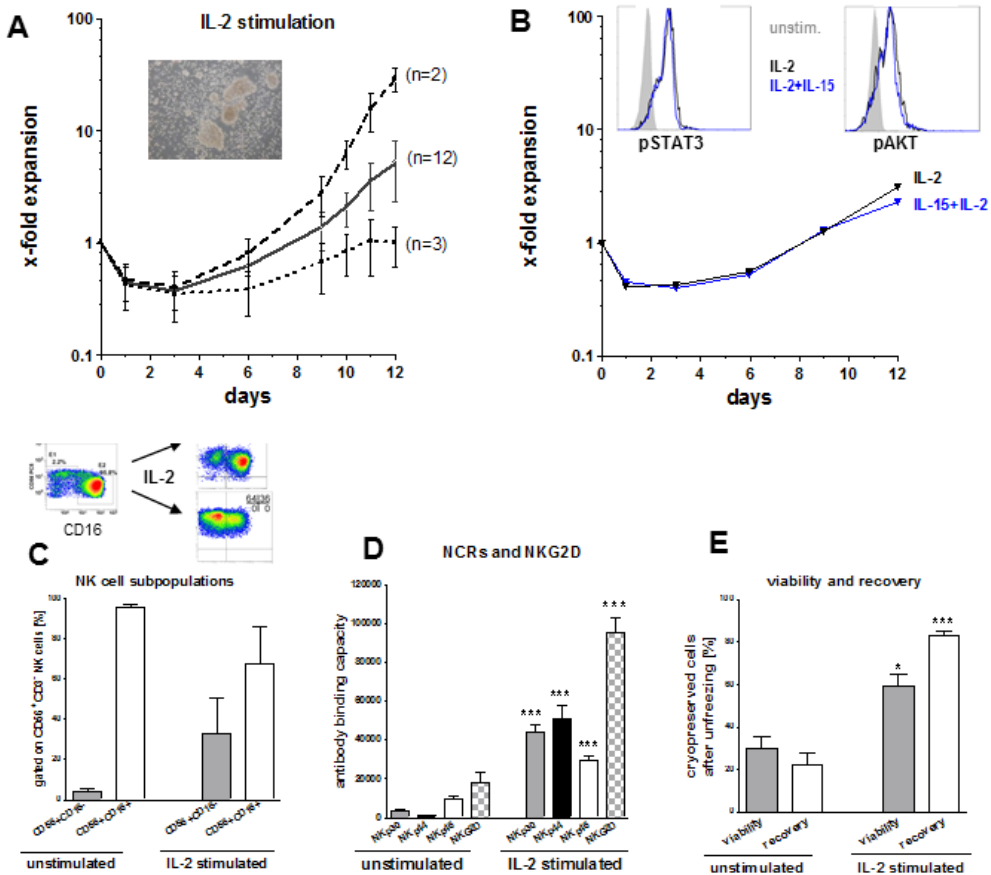


Abb. 3: GMP-konforme Expansion von CD56+CD3- NK-Zellen. (Koehl U et al., Esser R. Front Oncol 13(118):1-12; 2013) (A) Expansionsrate: Median 3-fach, Range: 0-20-fach. (B) Keine Unterschiede zwischen IL-2 versus IL-2/IL-15 Stimulierung. (C) IL-2 Stimulierungen führen zur Abnahme von CD16+ NK-Zellen. (D) Hochregulierung von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren unter IL-2-Aktivierung. (E) Die Vitalität und Recovery ist signifikant besser nach Auftauen von kryokonservierten, IL-2-stimulierten NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

■ Projektleitung Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Klöß, Stephan (Dr.), Esser, Ruth (Dr.); Kooperation: Klingebiel, Thomas (Prof. Dr.), Schwabe, Dirk (Prof. Dr.), Seitz, Oliver (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Passweg, Jakob (Prof. Dr.), Universitätsspital Basel; Förderung: IFB-Tx (BMBF)

Weitere Forschungsprojekte

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

■ Projektleitung: Hofer, Erhard (Prof. Dr.), Wien, Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), MHH; Kooperationspartner: Paris: Santo di, James (Prof. Dr.), Mandelboim, Ofer (Prof. Dr.), Jerusalem, Nathwani, Amit (Prof. Dr.), London, Lopez-Botet, Miguel (Prof. Dr.), Barcelona, Trowsdale, John (Prof. Dr.), Cambridge; 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: Koch, Joachim (PD Dr.), Frankfurt; Förderung: Sander-Stiftung

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

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

Academic GMP: The impact of Regulation (EC) No 1394/2007 on the development of Advanced Therapy Medicinal Products: an academic perspective (EU-FP7)

■ Projektleitung: Hildebrandt, Martin (Prof. Dr.), München; Kooperationspartner: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), MHH, Mischak-Weissing, E (Prof. Dr.); Förderung: EU

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

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

Zielgerichtete Killerzellen für die Krebs-Immuntherapie

■ Projektleitung: Wels, Winfried (Prof. Dr.), Frankfurt; Kooperationspartner: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), MHH; 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: Mark W Lowdell (Dr.), London, Meji, Pauline (Dr.), Leiden, Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), MHH, Dickinson, Anne (Prof. Dr.), Newcastle, Brunswiek, Sönke (Dr.), Pharmacell, Hildebrandt, Martin (Prof. Dr.), München, : Hauser, Andrea (Dr.), Regensburg; Förderung: EU

CATCH-AMI POLYPHOR: 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

Bunse CE, Borchers S, Varanasi PR, Tischer S, Figueiredo C, Immenschuh S, Kalinke U, Köhl U, Goudeva L, Maecker-Kolhoff B, Ganser A, Blasczyk R, Weissing EM, Eiz-Vesper B. Impaired Functionality of Antiviral T Cells in G-CSF Mobilized Stem Cell Donors: Implications for the Selection of CTL Donor. *PLoS One* 2013;8(12):e77925

Ciocarlie O, Heinze A, Elze MC, Kloess S, Klingebiel T, Serban M, Koehl

U. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells: reference ranges in the peripheral blood of healthy children. *Klin Padiatr* 2013;225(6):354-356

Eissmann M, Schwamb B, Melzer IM, Moser J, Siele D, Khl U, Rieker RJ, Wachter DL, Agaimy A, Herpel E, Baumgarten P, Mittelbronn M, Rakek S, Kögel D, Böhm S, Gutschner T, Diederichs S, Zörnig M. A functional yeast survival screen of tumor-derived cDNA libraries

designed to identify anti-apoptotic mammalian oncogenes. *PLoS One* 2013;8(5):e64873

Heinze A, Elze MC, Kloess S, Ciocarlie O, Königs C, Betz S, Bremm M, Esser R, Klingebiel T, Serban M, Hutton JL, Koehl U. Age-matched dendritic cell subpopulations reference values in childhood. *Scand J Immunol* 2013;77(3):213-220

Kafert-Kasting S, Schneider A, Attaran M, Priesner C, Barthold M, Perrier AL, Kriegbaum H, Ott M, Meyburg J. Safety assessment of intraportal liver cell application in New Zealand white rabbits under GLP conditions. *Arch Toxicol* 2012;86(9):1413-1422

Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Bremm M, Ullrich E, Soerensen J, Quaiser A, Erben S, Wunram C, Gardlowski T, Auth E, Tonn T, Seidl C, Meyer-Monard S, Stern M, Passweg J, Klingebiel T, Bader P, Schwabe D, Esser R. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118

Kuci Z, Seiberth J, Latifi-Pupovci H, Wehner S, Stein S, Grez M, Böning H, Köhl U, Klingebiel T, Bader P, Kuci S. Clonal analysis of multipotent stromal cells derived from CD271+ bone marrow mononuclear cells: functional heterogeneity and different mechanisms of allosuppression. *Haematologica* 2013;98(10):1609-1616

Pajtlér KW, Rebmann V, Lindemann M, Schulte JH, Schulte S, Stauder M, Leuschner I, Schmid KW, Köhl U, Schramm A, Eggert A. Expression of NTRK1/TrkA affects immunogenicity of neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2013;133(4):908-919

Pearce KF, Hildebrandt M, Greinix H, Scheduling S, Koehl U, Worel N, Apperley J, Edinger M, Hauser A, Mischak-Weissinger E, Dickinson AM, Lowdell MW. Regulation of advanced therapy medicinal products in Europe and the role of academia. *Cytotherapy* 2014;16(3):289-297

Reiners KS, Kessler J, Sauer M, Rothe A, Hansen HP, Reusch U, Hücke C, Köhl U, Dürkop H, Engert A, von Strandmann EP. Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther* 2013;21(4):895-903

Schmidt S, Tramsen L, Perkhofe S, Lass-Flörl C, Hanisch M, Röger F, Klingebiel T, Koehl U, Lehrnbecher T. *Rhizopus oryzae* hyphae are damaged by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity. *Immunobiology* 2013;218(7):939-944

Schmidt S, Zimmermann SY, Tramsen L, Koehl U, Lehrnbecher T. Natural killer cells and antifungal host response. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(4):452-458

Seeger T, Haffez F, Fischer A, Koehl U, Leistner DM, Seeger FH, Boon RA, Zeiher AM, Dimmeler S. Immunosenescence-associated microRNAs in age and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2013;15(4):385-393

Sörensen J, Jarisch A, Smorta C, Köhl U, Bader P, Seifried E, Böning H. Pediatric apheresis with a novel apheresis device with electronic interface control. *Transfusion* 2013;53(4):761-765

Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, Suttorp M, Seifried E, Ottmann OG, Bug G. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 2013;15(12):1563-1570

Tramsen L, Schmidt S, Koehl U, Huenecke S, Latge JP, Roeger F, Schubert R, Klingebiel T, Lehrnbecher T. No effect of antifungal compounds on functional properties of human antifungal T-helper type 1 cells. *Transpl Infect Dis* 2013;15(4):430-434

Ungerer C, Quade-Lysson P, Radeke HH, Henschler R, Königs C, Köhl U, Seifried E, Schüttrumpf J. Galectin-9 Is a Suppressor of T and B Cells and Predicts the Immune Modulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Stem Cells Dev* 2013;DOI: 10.1089/scd.2013.0335

Vyas M, Koehl U, Hallek M, Strandmann EP. Natural ligands and antibody-based fusion proteins: harnessing the immune system against cancer. *Trends Mol Med* 2014;20(2):72-82

Übersichtsarbeiten

Borchers S, Ogonek J, Varanasi PR, Tischer S, Bremm M, Eiz-Vesper B, Koehl U, Weissinger EM. Multimer monitoring of CMV-specific T cells in research and in clinical applications. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78(3):201-212

Abstracts

2013 wurden 11 Abstracts publiziert.

Stipendien

Ciocarlie, Oana (Dr.): Immune Reconstitution Of Dendritic Cells Following Allogeneic Stem Cell Transplantation.

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.