
IFB-Tx - Zelltherapeutika – GMP core facility

■ **Leiter: Prof. Dr. Ulrike Köhl** (ab 01.05.2012)

Tel.: 0511/532-5718 • E-Mail: koehl.ulrike@mh-hannover.de • www.ifb-tx.de

Forschungsprofil

Im Mai 2012 wurde das Institut für Zelltherapeutika an der MHH gegründet, zudem die „Good Manufacturing Practice Development Unit“ (GMPDU) und das „Cellular Therapy Centre“ (CTC) mit der GMP core facility (3 Reinräume „A“ in „B“) gehören. Im Juni 2012 haben in der GMPDU zunächst 1 ½ Mitarbeiter ihre Arbeit aufgenommen und Ende 2012/Anfang 2013 wurden weitere 5 Stellen besetzt; zum CTC gehören 11 Mitarbeiter.

In der GMP core facility 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 Krebs oder schweren traumatischen sowie degenerativen Gewebe- und Organverletzungen einsetzen zu können. Nach Abschluß der Validierung soll die jeweilige Herstellungserlaubnis eingeholt werden. Als Basis dazu dient die vorliegende Herstellungserlaubnis nach §13 AMG (Arzneimittelgesetz) sowie Genehmigungen nach §20b, §20c und §21a AMG z.B. für Blut- und Gewebesubereitung inkl. immunomagnetischer CD34 Selektion oder CD3/CD19 Depletion peripherer Blutstammzellen. Im Fokus neuer Forschungsaktivitäten steht dabei die Herstellung regulatorischer T-Zellen, NK-Zellen, Dendritischer Zellen (DZ), antigen-spezifischer T-Zellen, aktivierter Makrophagen, mesenchymaler Stammzellen, T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ -depletierter Transplantate sowie gen-manipulierter Stamm- und Effektorzellen. Im Rahmen der Entwicklung neuer Zelltherapeutika haben Dr. L. Arseniev und K. Aleksandrova begonnen, ein Verfahren zur CD25 Depletion von Donor Lymphozyten aufzubauen. Ferner wurde mit der Implementierung eines aufwendigen Programms zur Qualitätskontrolle begonnen, das funktionale Assays und neuartige flowzytometrische Analysen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung des Zellproduktes enthält. In Zusammenarbeit mit der Transplantationsimmunologie soll dies auch für das Immunmonitoring nach Transfusion der Zelltherapeutika genutzt werden. In einer Kooperation zwischen Prof. E. Mischak-Weissinger und Prof. U. Köhl konnte eine tri-zentrische Studie zur Regeneration CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTL) nach Stammzelltransplantation (SZT) bei 278 Patienten abgeschlossen werden. Patienten mit nur 1 CMV-CTL/ μl im peripheren Blut zwischen Tag +50 und +75 nach SZT hatten einen signifikant höheren Schutz vor einer CMV-Reaktivierung gegenüber Patienten, die keine CMV-CTLs entwickelten (29%). Ein besonderer Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung zell-basierter Therapien liegt auf den NK-Zellen.

Forschungsprojekte

NK-zell-basierte Therapien zum Überwinden von Tumor Immune Escape Mechanismen

Eine GLP-konforme bi-nationale (Deutschland-Schweiz) Phase I/II Studie mit allogenen CD56+CD3- Spender NK-Zellen konnte erfolgreich in Kooperation zu Prof. J. Passweg (Basel) und Prof. D. Schwabe (Frankfurt) abgeschlossen werden. Patienten mit Hochrisikoleukämien und Tumoren erhielten am Tag +3, +40 und +100 unstimulierte oder am Tag +40 und +100 IL-2 stimulierte NK-Zellen (Abb. 1) nach haploidenter Stammzelltransplantation (SZT).

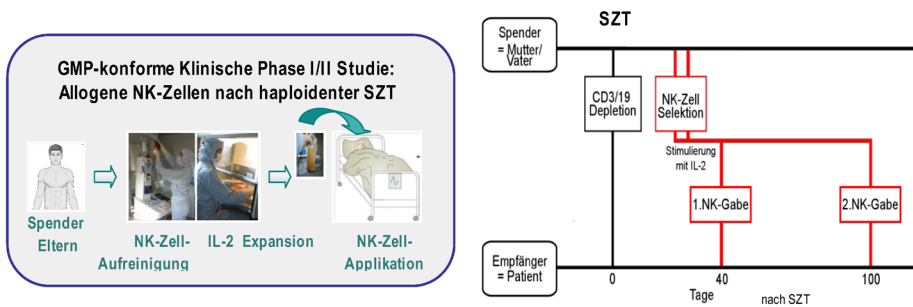


Abb.1: GMP-konforme klinische Phase I/II Studie mit allogenen NK-Zellen nach haploidenter SZT

Patienten mit Hochrisiko-Leukämien oder Tumoren erhalten nach Konditionierung und haploidenter SZT (CD3/CD19 depletiert) am Tag +40 und +100 nach SZT IL-2 expandierte und aktivierte Spender-NK-Zellen von ihrem Stammzellspender. Zieldosis der Studie (clinicaltrials.gov NCT01386619) waren 1×10^7 CD56+CD3- NK-Zellen/kg KG und $< 50 \times 10^3$ CD3+/kg KG.

Im Rahmen eines Begleitprojektes wurden die zellulären Wirkmechanismen, die zu einer verstärkten NK-Zell-Zytotoxizität gegen Leukämiezellen führen, immunologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Auf NK-Zellen unter IL-2-Expansion konnte im Vergleich zu frisch isolierten, unstimulierten NK-Zellen eine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern (CD69, HLA-DR) und der aktivierenden Rezeptoren (NCRs: NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D) sowie eine Abnahme von inhibitorischen Rezeptoren (KIR) beobachtet werden. Dies führte zu einer verbesserten Migration, Erkennung und Zytotoxizität der stimulierten NK-Zellen gegenüber residualen, malignen Zellen. Um weiterhin abzuschätzen, ob diese hochaktiven, allogenen NK-Zellen durch Tumor Immune-Escape

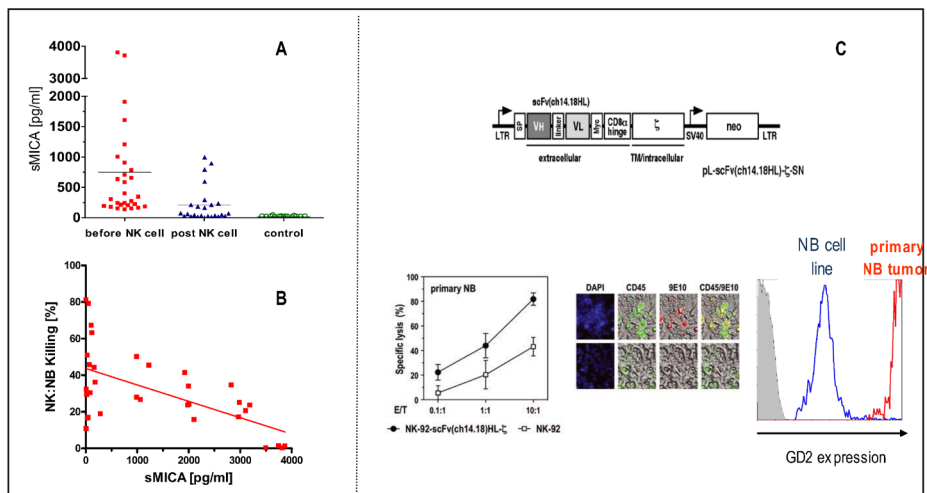


Abb.2: Blockierung der NK-Zell Zytotoxizität durch Tumor Immune Escape Mechanismen und Möglichkeiten der Überwindung durch expandierte/aktivierte NK-Zellen oder Tumor-Retargeting

- (A) Vor NK-Zell Applikation finden sich signifikant höhere Spiegel an löslichem MICA (sMICA) im peripheren Blut von Patienten mit Neuroblastom (NB) gegenüber dem Zeitpunkt direkt nach der NK-Zell-Infusion.
- (B) Hohe Spiegel an löslichem MICA inhibieren die NKG2D-vermittelte Zytotoxizität der transfundierten Spender NK-Zellen, während eine große Anzahl an NK-Zellen das lösliche MICA zum Teil abfangen kann und dann zu einer besseren Zytotoxizität führt (S. Kloess et al., Eur J Immunol 2010).
- (C) Eine molekulare Strategie zum Überwinden von Tumor Immune Escape Mechanismen ist der Einsatz von gen-modifizierten NK-Zellen (NK-92-scFv(ch14.18)HL-ξ, die gegen das GD2 Antigen auf der Oberfläche von NB Zellen gerichtet sind (Esser et al. J of Cellular and Molecular Medicine 2012).

Mechanismen, insbesondere lösliche Faktoren (soluble MICA/B), einem kompetitiven, inhibitorischen Effekt unterliegen, untersuchte Dr. S. Klöss die Plasmakonzentrationen dieser NKG2D-Liganden bei Patienten mit Neuroblastomen im Rahmen der NK-Zell-Studie vor, während und nach der Immuntherapie. Dabei konnten signifikant höhere Konzentrationen von löslichem MICA im Plasma dieser Patienten vor Applikation der allogenen NK-Zellen im Vergleich zu den Plasmaspiegeln danach und gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen werden [Abb. 2A]. In parallel durchgeführten, funktionalen Zytotoxizitätstests zeigte sich eine deutliche Abnahme in der Zytotoxizität allogener NK-Zellen [Abb. 2B], wenn diese mit MICA-haltigem Patientenplasma vorinkubiert waren. Im peripheren Blut der Patienten konnte aber auch nachgewiesen werden, dass durch Applikation einer großen Anzahl an NK-Zellen das lösliche MICA für einige Stunden gebunden wurde, sodass ein Teil der NK-Zellen in Ihrer zytotoxischen Aktivität nicht beeinträchtigt war. Auf der Basis dieser Ergebnisse wird derzeit versucht, durch neue Expansionsprotokolle über (i) Interaktion von NK-Zellen und Dendritischen Zellen und (ii) Ko-Inkubation von NK-Zellen mit verschiedenen Feeder-Zellen die Ausbeute an NK-Zellen deutlich zu steigern, aber die Anzahl residueller CD3+ alloreaktiver T-Zellen bei <0,01% zu halten.

In einem weiteren Ansatz zur Überwindung von Tumor Immune Escape Mechanismen wurde die klinisch einsetzbare humane NK-Zelllinie NK-92 durch Transduktion mit einem retroviralen Vektorkonstrukt gentechnisch verändert, so dass sie chimäre Antigenrezeptoren spezifisch für das Neuroblastom-spezifische GD2 exprimiert. Diese Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären „single chain“ Fv (scFv) Antikörperfragment abgeleitet von dem bereits klinisch eingesetzten humanisierten anti-GD2 Antikörper ch14.18, mittels Genfusion verknüpft mit der signalleitenden zeta-Kette des CD3 Komplexes. In einer Kooperation mit Prof. W. Wels (Frankfurt) konnte das deutlich höhere Potential der so modifizierten NK-Zellen gegenüber der unmanipulierten NK92 hinsichtlich dem effektiven Abtöten von Neuroblastomzellen gezeigt werden. Insbesondere konnte Dr. R. Esser dies auch an primären Neuroblastomzellen eindrucksvoll demonstrieren [Abb. 2C].

Weitere Forschungsprojekte

Naturimmun: EU-FP7-People-Marie-Curie ITN

■ Projektleitung: Hofer, Erhard (Prof. Dr.), Wien, Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Santo di James (Prof. Dr.), Paris, 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.); 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), EU

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

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

■ Projektleitung: Arseniev, Lubomir (Dr.), Kooperationspartner: Wollert, Kai (Prof. Dr.), Kardiologie, 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: Beckman Coulter

Zielgerichtete Killerzellen für die Krebs-Immuntherapie

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

Originalpublikationen

Stern M, Passweg RJ, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, Paulussen M, Gratwohl A, Klingebiel T, Bader P, Tichelli A, Schwabe D, Köhl U. Preemptive Immunotherapy with Purified Natural Killer Cells after Haploidentical Stem Cell Transplantation. A Prospective Phase II Study in 2 Centers. *Bone Marrow Transplantation*; 2012; doi: 10.1038/bmt.2012.162

Borchers S, Bremm M, Lehrnbecher T, Dammann E, Pabst B, Wölk B, Esser R, Yildiz M, Eder M, Stadler M, Bader P, Martin H, Jarisch A, Schneider G, Klingebiel T, Ganser A, Weissinger EM, Koehl U. Sequential Monitoring of Anti-Cytomegalovirus (CMV) Response May Allow Prediction of CMV-reactivation Post Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLoS One*; 2012;7(12):e50248. doi: 10.1371/journal.pone.0050248

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 / Gentherapie Frankfurt (KGF), European working group on clinical cell analysis (EWGCCA); Reviewer: EMA (European Medicine Agency), *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*.