

## IFB-Tx - Institut für Zelltherapeutika

### ■ 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, antigenspezifische T-Zellen, NK-Zellen, chimäre Antigenrezeptoren (CARs), CAR-T-Zellen, multi-virus-spezifische T-Zellen, Leukämiezellen, Stammzelltransplantation, Good Manufacturing Practice (GMP), CliniMACS Prodigy, Reinraum

### 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 Genmodifizierte- 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.

Basierend auf der Herstellungserlaubnis für CMV-spezifische T-Zellen konnte in 2015 in guter Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin (ITM, Prof. B. Eiz-Vesper, PD Dr. H.G. Heuft, Dr. L. Goudeva) und der Kinderklinik (Prof. Dr. B. Maecker-Kolhoff) auch die Herstellungserlaubnis für EBV-, ADV- und multi-virus-spezifische T-Zellen (CTLs) eingeholt werden. Im Lohnauftrag für das ITM wurden bisher erfolgreich 15 CTL-Produkte zur Behandlung von Patienten mit schweren Infektionen nach SZT hergestellt. 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 letztere konnte in Kooperation mit Prof. H. Abken aus Köln und der Fa. Miltenyi Biotec eine Förderung vom BMBF eingeholt werden für die Erstellung eines Entwicklungsplans zur Herstellung von CAR (chimeric antigen receptor) exprimierenden T-Zellen.

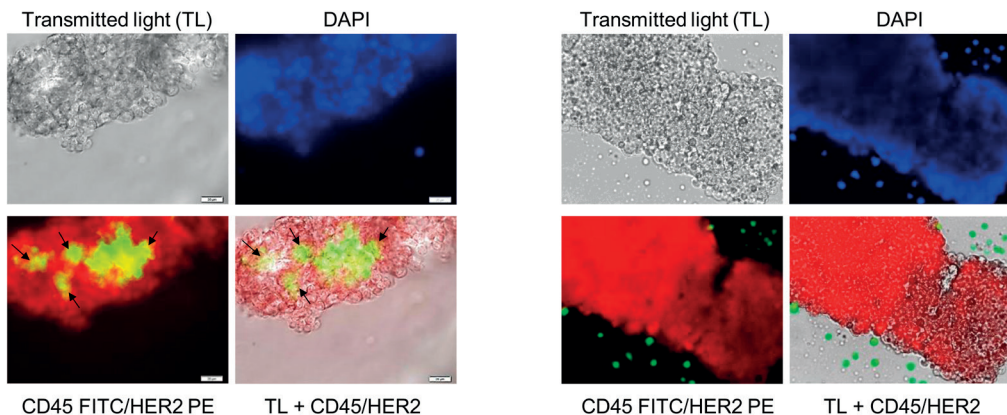
### Ausgewähltes Forschungsprojekt

#### Gerichtete NK-Zellen zur Steigerung der Zytotoxizität und Spezifität gegen Krebszellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind neben T-, NK-T- und B-Lymphozyten eine weitere essentielle Subpopulation der Lymphozyten im peripheren Blut. Im Rahmen der zellulären Immunabwehr sind NK-Zellen für die Erkennung und Eliminierung virusinfizierter und („gestresster“) maligner Zellen verantwortlich und stellen damit primäre Mediatoren des natürlichen unspezifischen Abwehrsystems („first line of defence“) dar, die entscheidend zur immunologischen Überwachung („Immunsurveillance“) von entarteten und transformierten Zellen beitragen. Jedoch kann diese Wir-

kung durch unterschiedliche Tumor-Immune-Escape-Mechanismen (TIEMs) erheblich eingeschränkt bzw. blockiert werden, was einerseits die autologen, patienteneigenen und andererseits die allogenen Spender-NK-Zellen nach einer Stammzelltransplantation weitgehend hemmt. In einer abgeschlosseneren Studie zur Identifikation von verschiedenen TIEMs konnten wir in 55 unbehandelten Patienten bei initialer Diagnose und nach Wiedererkrankung mit Kopf-Halsbereich-Tumoren (Plattenepithelkarzinome), also bösartigen Karzinomen, die von Epithelzellen ausgehen, eine stark abgeschwächte Wirkung solcher autologer Effektorzellen zeigen. Insbesondere bei 7 „Follow-up“ Patienten dieser Studie konnten Korrelationen von ansteigenden Plasmakonzentrationen von immunsupprimierenden Markern (sMICA and TGF- $\beta$  1), Tumorprogression, Stadienbestimmung („Staging“) und abgeschwächte Anti-Tumor-Wirkungen von Patienten-NK-Zellen detektiert werden (Kloess et al., 2015, Oncoimmunology). Ebenso konnte eine gestörte Tumorerkennung und Infiltration sowie erniedrigte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF  $\alpha$  und IFN  $\gamma$ ) solcher autologer NK-Zellen gezeigt werden (Kloess et al., 2015, Frontiers in Immunology).

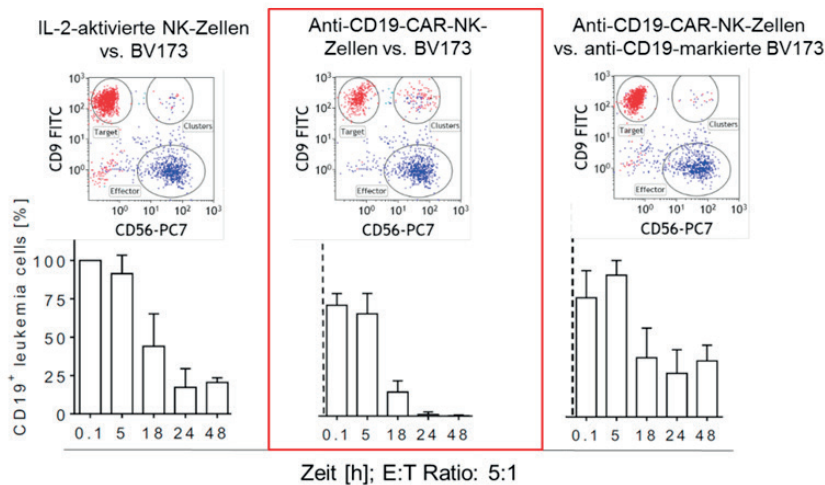
In einem dazu eigens erzeugten Tumormodell mit Plattenepithelkarzinomen von Patienten wurden Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung von TIEMs und zur Steigerung der Immunüberwachung und Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass die Zytotoxizität von autologen, IL-2-aktivierten NK-Zellen gegenüber EGFR/HER2-positiven Tumorzellen gehemmt ist und keine gerichtete Infiltration in korrespondierende Tumorsphäroide stattfindet (Abb. 1 rechts, Kloess et al., 2015, Frontiers in Immunology). Jedoch kann diese akute Immundefizienz der NK-Zellen durch Markierung der Tumorsphäroide mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab (Anti-epidermal growth factor Rezeptor [Anti-EGFR bzw. anti-HER2]) reversibel beeinflusst werden. Dies resultiert in einer wiederhergestellten Anti-Tumorantwort dieser Effektorzellen, welche ausgelöst wird durch eine erhöhte Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Zytokinausschüttung und Tumorerkennung (Abb. 1 links, Kloess et al., 2015, Frontiers in Immunology).



**Abb. 1: Überlappende 3D Fluoreszenz Mikroskopie zur Rekonstitution der NK-Zell-abhängigen Tumorerkennung durch Cetuximab.** Gezeigt ist die gerichtete Tumorerkennung (24 Std.) von Patienten-NK-Zellen (grün-gelb markiert) in die korrespondierenden Tumorsphäroide (Plattenepithelkarzinome) in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von 1  $\mu$ g/ml Cetuximab (anti-HER2).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die gerichtete Zytotoxizität allogener Spender-NK-Zellen signifikant gesteigert. Dazu wurden innerhalb einer engen Kooperation der GMPDU und dem Institut für Experimentelle Hämatologie (A. Schambach, M. Morgan) zur Überwindung von TIEMs primäre IL-2 aktivierte, humane NK-Zellen mit alpha-retroviralen Vektoren gentechnisch modifiziert. Die transduzierten Effektorzellen exprimierten CARs spezifisch gegen

das für lymphatische Leukämien-assoziierte Antigen CD19. In Zytotoxizitätsuntersuchungen (Effektor-Wirkungsanalysen) konnten wir zeigen, dass IL-2-aktivierte NK-Zellen resistente CD19-positive Leukämiezellen (BV173) nur verzögert und zu einem geringeren Anteil zerstören können (Abb. 2 links). Im Gegensatz dazu waren die gerichteten CD19-CAR-exprimierenden NK-Zellen in der Lage innerhalb von 24 Std. die Leukämiezellen fast vollständig zu eliminieren (Abb. 2 Mitte rot umrandet). Eine spezifische Blockierung dieser Effektor-Target-Interaktion konnten wir durch Vorinkubation der Leukämiezellen mit anti-CD19 Antikörpern zeigen. Dies führte zu einer eingeschränkten Zytotoxizität (Abb. 2 rechts) (Suerth et al., 2015, J Mol Med).



**Abb. 2: Flowzytometrische Zytotoxizitätsassays.** IL-2-aktivierte primäre NK-Zellen wurden für 24 Stunden (E:T [Effektor-Target] Ratio: 5:1) mit Leukämiezellen (BV173) inkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAK; u.a. CD9-FITC, CD56-PC-7) gefärbt und die Abnahme der lebenden Zellpopulationen quantitativ durch 10-Farb Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurde die Effektor-Zell-abhängige Zytotoxizität von unmanipulierten (links) und anti-CD19-CAR-transduzierten NK-Zellen (Mitte rot umrandet) verglichen. Zur Blockierung der CAR-spezifischen Effektor-Target-Zell-Interaktionen wurde ein mAK gegen CD19-positive Leukämiezellen (rechts) verwendet.

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

## Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2015)

**NATURIMMUN: Natural Killer Cell-Based Anti-Cancer Immunotherapies (EU-FP7-People-Marie-Curie ITN) Projekt 1: Improvement of NK cell cytotoxicity to overcome resistance against relapse leukemia Projekt 2: Management**

■ 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

**SFB 738, Projekt C10: Immuntherapie mit NK-Zellen mit bispezifischen Antigenrezeptoren zur Elimination von AML-Stammzellen**

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Förderung: DFG

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

■ Projektleitung: Leiden: Meiji, Pauline (PhD); MHH: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Newcastle: Dickinson, Anne (Prof. PhD),

Pharmacell: Brunswieck, Sönke (Dr.); München: Hildebrandt, Martin (Prof. Dr.); Regensburg: Hauser, Andrea (Dr.); London: Mark W Lowdell (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. Kardiologie) und Arseniev, Lubomir (Dr.)

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

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

### **CAR T Cells-Projektplanentwicklung**

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.)

#### **Originalpublikationen**

Bochennek K, Fryns E, Wittekindt B, Buxmann H, Quaiser A, Fischer D, Klingebiel T, Koehl U, Schloesser R, Huenecke S. Immune cell subsets at birth may help to predict risk of late-onset sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Early Hum Dev* 2016;93:9-16

Bremm M, Brehm C, Erben S, Jarisch A, Schumm M, Arendt A, Boenig H, Klingebiel T, Koehl U, Bader P, Huenecke S. Generation and flow cytometric quality control of clinical-scale TCRalphabeta/CD19-depleted grafts. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;DOI: 10.1002/cyto.b.21328

Busch S, Auth E, Scholl F, Huenecke S, Koehl U, Suess B, Steinhilber D. 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. *J Immunol* 2015;194(4):1646-1653

Chao MM, Ebell W, Bader P, Beier R, Burkhardt B, Feuchtinger T, Handgretinger R, Hanenberg H, Koehl U, Kratz C, Kremens B, Lang P, Meisel R, Mueller I, Roessig C, Sauer M, Schlegel PG, Schulz A, Strahm B, Thol F, Sykora KW. Consensus of German transplant centers on hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia. *Klin Padiatr* 2015;227(3):157-165

Giannattasio A, Weil S, Kloess S, Ansari N, Stelzer EH, Cerwenka A, Steinle A, Koehl U, Koch J. Cytotoxicity and infiltration of human NK cells in in vivo-like tumor spheroids. *BMC Cancer* 2015;15:351

Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, Grez M, Kloess S, Arseniev L, Koehl U. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Pharmacol* 2015;6:21

Klöss S, Chambron N, Gardlowski T, Arseniev L, Koch J, Esser R, Glienke W, Seitz O, Köhl U. Increased sMICA and TGFbeta levels in HNSCC patients impair NKG2D-dependent functionality of activated NK cells. *Oncoimmunology* 2015;4(11):e1055993

Klöss S, Chambron N, Gardlowski T, Weil S, Koch J, Esser R, Poggendorf von Strandmann E, Morgan MA, Arseniev L, Seitz O, Köhl U. Cetuximab Reconstitutes Pro-Inflammatory Cytokine Secretions and Tumor-Infiltrating Capabilities of sMICA-Inhibited NK Cells in HNSCC Tumor Spheroids. *Front Immunol* 2015;6:543

Siler U, Paruzynski A, Holtgreve-Grez H, Kuzmenko E, Koehl U, Renner ED, Alhan C, de Loosdrecht AA, Schwäble J, Pfluger T, Tchinda J, Schmugge M, Jauch A, Naundorf S, Kuehlcke K, Notheis G, Güngör T, Kalle CV, Schmidt M, Grez M, Seger R, Reichenbach J. Successful Combination of Sequential Gene Therapy and Rescue Allo-HSCT in Two Children with X-CGD - Importance of Timing. *Curr Gene Ther* 2015;15(4):416-427

Suerth JD, Morgan MA, Kloess S, Heckl D, Neudörfel C, Falk CS, Koehl U, Schambach A. Efficient generation of gene-modified human natural killer cells via alpharetroviral vectors. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(1):83-93

Sundarasetty BS, Chan L, Darling D, Giunti G, Farzaneh F, Schenck F, Naundorf S, Kuehlcke K, Ruggiero E, Schmidt M, von Kalle C, Rothe M, Hoon DS, Gerasch L, Figueiredo C, Koehl U, Blasczyk R, Gutzmer R, Striepecke R. Lentivirus-induced 'Smart' dendritic cells: Pharmacodynamics and GMP-compliant production for immunotherapy against TRP2-positive melanoma. *Gene Ther* 2015;22(9):707-720

Sundarasetty BS, Kloess S, Oberschmidt O, Naundorf S, Kuehlcke K, Daenthanasanmak A, Gerasch L, Figueiredo C, Blasczyk R, Ruggiero E, Fronza R, Schmidt M, von Kalle C, Rothe M, Ganser A, Koehl U, Striepecke R. Generation of lentivirus-induced dendritic cells under GMP-compliant conditions for adaptive immune reconstitution against cytomegalovirus after stem cell transplantation. *J Transl Med* 2015;13:240

#### **Abstracts**

2015 wurden 14 Abstracts publiziert.

#### **Stipendium**

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

#### **Weitere Tätigkeiten in der Forschung**

Köhl, Ulrike (Prof. Dr.): Sprecher: EU-Konsortium NATURIMMUN Mitgliedschaften: 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); Gutachtertätigkeiten: EMA (European Medicine Agency), Carreras- Stiftung, Deutsche Krebshilfe, Austrian Science Foundation, Foundation for Scientific Research Belgium, Nature Medicine, New England Journal of Medicine, American Journal of Transplantation, Clinical

Cancer Research, Experimental Hematology, Journal of Biochemical Pharmacology, Journal of Human Immunology, Journal of Immunological Methods, Journal of Leukemia and Lymphoma, Journal of Pediatric Hematology and Oncology, Journal of Tissue Antigen, Bone Marrow Transplantation, International Journal of Hematology, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Klinische Pädiatrie, Cytometry, Cytotherapy.