

IFB-Tx: Institut für Zelltherapeutika

■ Leiter: Prof. Dr. Ulrike Köhl

Tel.: 0511/532-5718 • E-Mail: koehl.ulrike@mh-hannover.de • 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 Gen- und somatische Zelltherapeutika bzw. biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte (sog. Tissue Engineered Products, TEP), 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 konnten in den letzten 1 ½ Jahren in 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 Herstellungserlaubnisse für EBV-, ADV- und multi-virus-spezifische T-Zellen (CTLs) eingeholt werden. Im Lohnauftrag für das ITM wurden bisher erfolgreich 29 CTL-Produkte zur Behandlung von Patienten mit schweren Infektionen nach SZT oder zur Therapie der Post-Lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) 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 Stromazellen, T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ -depletierter Transplantate sowie gen-manipulierter Stamm- und Effektorzellen. Für letztere starteten in 2016 zwei neue Projekte: (1) ein BMBF-gefördertes Projekt zur Herstellung von CAR (chimeric antigen receptor) exprimierenden T-Zellen zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem Melanom (genauere Beschreibung siehe unten) und (2) ein Krebshilfe-gefördertes Projekt zur Etablierung neuartiger CARs, die mit zusätzlichen Elementen ausgestattet werden, um hochmaligne Tumoren besser zu eliminieren.

Ausgewähltes Forschungsprojekt

Automatisierte Herstellung von CAR-T-Zellen zur Behandlung des rezidivierenden Melanoms

Derzeit werden CAR (Chimäre Antigen-Rezeptor)-T-Zell-Therapien entwickelt, die sich gegen Tumor-Stammzellen richten. Ein Beispiel ist unsere im Rahmen des BMBF-Projekts CD20 CAR-TIME (Förderkennzeichen 01EK1507A-C) in Zusammenarbeit mit der Universität zu Köln (Prof. Hinrich Abken) sowie der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

geförderte CAR-T-Zelltherapie zur Behandlung des rezidivierenden Melanoms.

Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung mit CD20-spezifischen CAR-T-Zellen das Tumorwachstum inhibierte, obwohl die CD20-positiven Zellen nur zwei Prozent der Tumormasse ausmachten. Diese Erkenntnis lieferte die Basis für die Herstellung der CAR-T-Zellen mit Spezifität gegen humanes CD20 für die Anwendung im Menschen (Schmidt et al., 2011, PNAS). In einer klinischen Phase I-Studie sollen später 15 Melanompatienten mit autologen CD20-spezifischen CAR-T-Zellen behandelt werden. Eingeschlossen werden Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf (Stadium III oder IV) nach Versagen der Standardtherapie. Insbesondere soll die Sicherheit der Therapie und des CAR-T-Zell-Produkts nach GMP-konformer Herstellung in einem automatischen, geschlossenen System, dem CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec GmbH, Abbildung 4B), beim rezidivierenden Melanom geprüft werden.

In der EU werden CAR-T-Zellen als genmodifizierte Zelltherapeutika (gene therapy medicinal products, GTMPs) risikobasiert den Arzneimitteln für neuartige Therapien (advanced therapy medicinal products, ATMPs) zugeordnet und einem strengen zentralisierten Zulassungsprozess unterzogen (Richtlinie 2009/120/EG der Kommission, Verordnung (EG) 1394/2007). Die Genehmigung zur Durchführung klinischer Prüfungen mit CAR-T-Zellen am Menschen durch das deutsche Bundesinstitut für Impfstoffe und Biomedizinische Arzneimittel (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) setzt die Einhaltung derartiger Richtlinien und die besondere Berücksichtigung des aktuellen Stands der biomedizinischen und pharmazeutischen Wissenschaft und Technik voraus.

Um ausreichende Mengen CAR-exprimierender T-Zellen bereitstellen zu können, müssen diese in klinischem Maßstab ex vivo unter Einhaltung der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) nicht nur transduziert, sondern auch vermehrt werden. Produktionsumgebung, -ausrüstung und -prozesse müssen dabei neben der aseptischen Herstellung des sterilen Arzneimittels auch den Schutz des mit der Herstellung betrauten Personals vor einer Exposition mit dem Vektor sicherstellen. Im Rahmen des CD20 CAR-TIME-Projekts erfolgt der komplexe Herstellungsprozess wie oben erwähnt im geschlossenen System des Zellprozessors CliniMACS Prodigy. Durch In-Prozess- und Qualitätskontrollen wurden an Zwischenstufen und Endprodukten Reinheit, Gehalt, Identität und Aktivität der CAR-T-Zellen geprüft. Dies erfolgte unter anderem durch 1. die quantitative durchflusszytometrische Analyse der Zellarten (Abbildung 1), 2. die Bestimmung des Glukosegehalts (Abbildung 2), 3. der CD20 CAR-Expression und Vitalität (Abbildung 3), sowie 4. die Anzahl der Vektorkopien (vector copy number, VCN) im Genom der transduzierten Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR. Zur Dokumentation wurden die Kulturen überdies in verschiedenen Stadien des Herstellungsprozesses fotografiert (Beispiel in Abbildung 4).

Zur Gewinnung von T-Zellen wurden diese aus Leukapheresen immunmagnetisch mit Hilfe von CD62L bzw. CD4/CD8- Magnetbeads angereichert (Priesner et al., 2016, HGT) Diese wurden zum Teil unmittelbar ($n = 3$) oder nach Kryokonservierung weiterverarbeitet ($n = 1$). Die Vermehrung der Zellen verlief in allen „Clinical Scale“-Läufen sehr ähnlich. Dabei kehrte sich das Verhältnis der CD4- und CD8-positiven T-Zell-Subpopulationen über die Kultivierung in allen Läufen um. Im unteren Beispiel von ursprünglich 2,3:1 zu 1:1,3 (Abbildung 1).

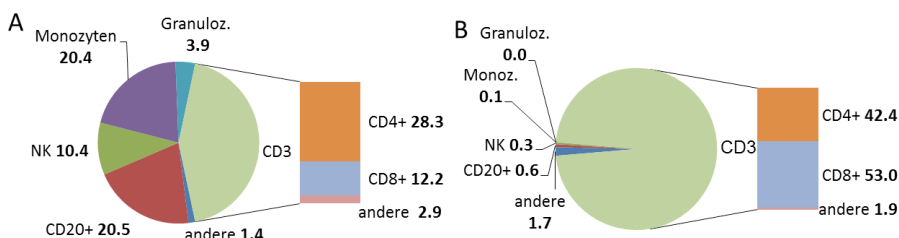


Abb. 1: Zellkompositionen von Apherese- und Endprodukt. A. Das Aphereseprodukt enthielt neben T-Zellen unter anderem Monozyten, NK-Zellen und Granulozyten. Die beiden Subtypen der CD3 positiven T-Zellen lagen im Verhältnis von 2,3:1 (CD4+/CD8+) vor. B: Zellkomposition des Endproduktes. Immunselektion und Kulturbedingungen führten zu einem T-Zellprodukt hoher Reinheit. Das Verhältnis von CD4+/CD8+ T-Zellen verschob sich zu Gunsten der CD8-positiven Zellen.

Als Surrogat für die Erschöpfung von Nährstoffen im Kulturmedium wurde die Glukosekonzentration mit dem Accu-Chek Aviva-Blutzucker-Messgerät (Roche, Mannheim) bestimmt. Deren zeitlicher Verlauf ist durch die Glukoseaufnahme der Zellen und die Zuführung frischen Mediums charakterisiert. Durch automatisierte Zugabe von oder teilweisen Austausch von Kulturüberstand mit frischem Medium konnte eine Nährstofflimitierung durch Unterschreiten eines kritischen Schwellenwerts von 100 mg/dL vermieden werden (Abbildung 2).

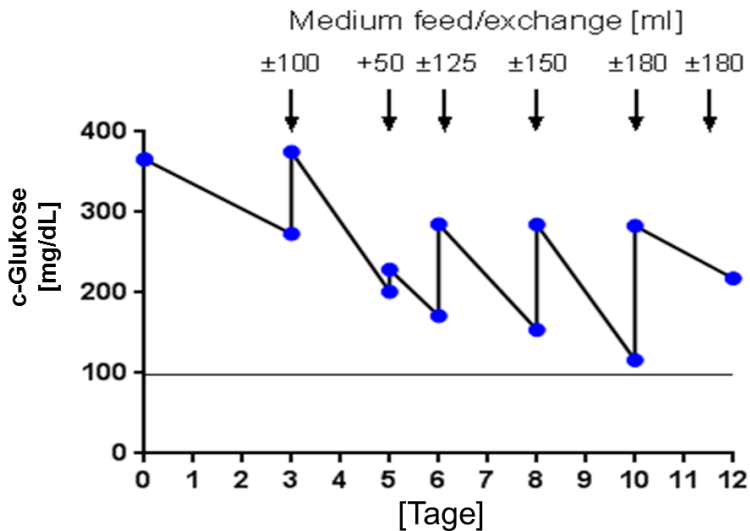


Abb. 2: Verlauf des Glukosegehalts während der T-Zellkultivierung im CliniMACS Prodigy.

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden CAR-exprimierende Zellen mit einem PE-(Phycoerythrin)-markierten anti-Idiotyp-Antikörper markiert. Im ersten CD20 CAR-Lauf betrug die Transduktionseffizienz 10% (Abbildung 3A). Neben der Anzahl wurde auch die Vitalität der T-Zellen ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Bei durchgängig hohen Vitalitäten von über 90% konnten die Zellen über die 12tägige Kultivierung auf das 50fache des Ausgangswertes vermehrt werden (Abbildung 3B).

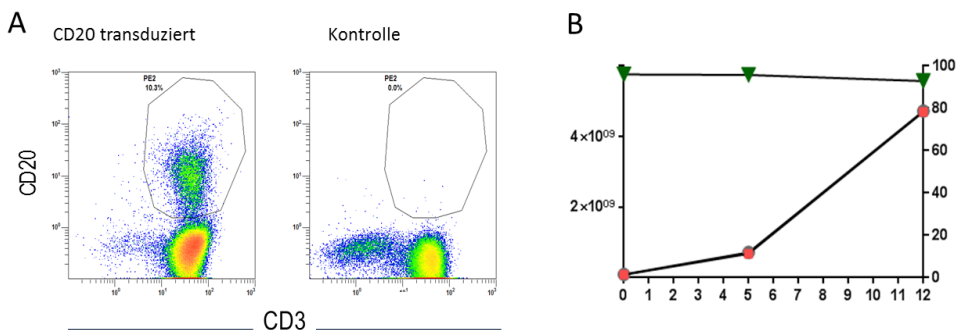
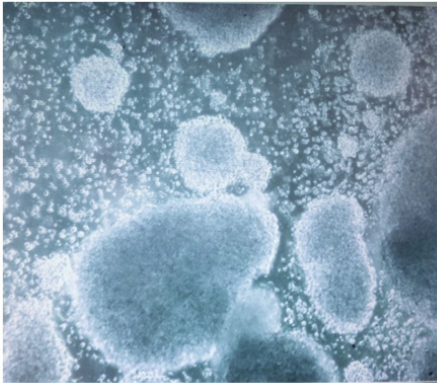


Abb. 3: A. Durchflusszytometrische Bestimmung der CAR-Expression. Am Ende der Kultivierung exprimieren rund 10% der T-Zellen den CD20 CAR-Rezeptor. B. Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellexpansion und Vitalität. Die Zellzahl konnte über die Kulturdauer auf das 50fache des Ausgangswertes erhöht werden, der Anteil lebender, 7-AAD-negativer mononukleärer Zellen lag durchgängig über 90% (modifiziert nach Priesner et al., 2016, HGT).

Das in den Zellprozessor integrierte Lichtmikroskop erlaubt eine morphologische Kontrolle des Kulturverlaufs, z. B. die charakteristische Aggregation der T-Zellen nach Aktivierung mit MACS GMP TransAct CD3/CD28 kit, Miltenyi Biotec GmbH (Abbildung 4A).

A



B



Abb. 4: A. Proliferierende CAR-T-Zellen im CliniMACS Prodigy (Vergrößerung 400fach) vier Tage nach Start der Kultivierung (Zuther et al., 2017, J Onkologie, im Druck). B. CliniMACS Prodigy System zur Herstellung GMP-konformer Zellprodukte.

Ausblick

CAR-T-Zellen sind vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die Krebstherapie, deren Wirksamkeit vor allem bei Therapie-refraktären Leukämien und Lymphomen mit beeindruckenden Ergebnissen klinisch nachgewiesen wurde. Im Rahmen des Projekts CD20 CAR-TIME soll das Anwendungsspektrum der CAR-T-Zellen unter Einsatz des geschlossenen Systems CliniMACS Prodigy zur Behandlung des Melanoms ausgeweitet werden. Durch den Automatisierungsgrad dieser Plattform und der sich daraus ergebenden Standardisierung können die Produktvariabilität minimiert und langfristig möglicherweise Herstellungskosten gesenkt werden. Eine CAR-T-Zell-Therapie könnte somit vielen Patienten effektiv, sicher und kostengünstig zugänglich gemacht werden.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Projekts CD20 CAR-TIME (Förderkennzeichen 01EK1507A-C).

■ Projektleitung: Glienke, Wolfgang (Dr.), Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Abken, Hinrich (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Köln; Rauser, Georg (Dr.), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach; Förderung: BMBF

Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2016)

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

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Schambach, Axel (Prof. Dr.), MHH; Morgan, Michael (PD Dr.), MHH; Ganser, Arnold (Prof. Dr.), MHH; Heuser, Michael (Prof. Dr.), MHH; Förderung: DFG

CD20 CAR-TIME: CD20CAR transduzierte T-Zellen für die individualisierte Melanomtherapie - Teilprojekt Herstellung Zellprodukte (Fkz.: 01EK1507B)

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Glienke, Wolfgang (Dr.); Kooperationspartner: Abken, Hinrich (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Köln; Rauser, Georg (Dr.), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach; Förderung: BMBF

TRUCKS: From CARs to TRUCKs: Induction of a concerted antitumor immune Response by engineered T cells

■ Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.), Glienke, Wolfgang (Dr.); Kooperationspartner: Mackensen, Andreas (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Erlangen; Rössig, Claudia (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Münster; Wels, Winfried (Prof. Dr.), Georg-Speyer-Haus Frankfurt; Hudecek, Michael (Dr.), Universitätsklinikum Würzburg; Schambach, Axel (Prof. Dr.), MHH; Moritz, Thomas (Prof. Dr.), MHH; Abken, Hinrich (Prof. Dr.), Universitätsklinikum Köln; Eiz-Vesper, Britta (Prof. Dr.), MHH; Förderung: Deutsche Krebshilfe

Visualized fluorescence microscopy of NK-cell mediated Lysis of CD30+ target cells in presence and Absence of AFM13

■ Projektleitung: Klöss, Stephan (Dr.); Förderung: Wirtschaft

Originalpublikationen

Bogdanou D, Penna-Martinez M, Filmann N, Chung TL, Moran-Auth Y, Wehrle J, Cappel C, Huenecke S, Herrmann E, Koehl U, Badenhoop K. T-lymphocyte and glycemic status after vitamin D treatment in type 1 diabetes: A randomized controlled trial with sequential crossover. *Diabetes Metab Res Rev* 2017;33(3):e2865

Gerstner S, Köhler W, Heidkamp G, Purbojo A, Uchida S, Ekici AB, Heger L, Luetke-Eversloh M, Schubert R, Bader P, Klingebiel T, Koehl U, Mackensen A, Romagnani C, Cesnjevar R, Dudziak D, Ullrich E. Specific phenotype and function of CD56-expressing innate immune cell subsets in human thymus. *J Leukoc Biol* 2016;100(6):1297-1310

Huenecke S, Bremm M, Cappel C, Esser R, Quaiser A, Bonig H, Jarisch A, Soerensen J, Klingebiel T, Bader P, Koehl U. Optimization of individualized graft composition: CD3/CD19 depletion combined with CD34 selection for haploidentical transplantation. *Transfusion* 2016;56(9):2336-2345

Huenecke S, Fryns E, Wittekindt B, Buxmann H, Königs C, Quaiser A, Fischer D, Bremm M, Klingebiel T, Koehl U, Schloesser R, Bochennek K. Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents. *Scand J Immunol* 2016;84(5):291-298

Priesner C, Aleksandrova K, Esser R, Mockel-Tenbrinck N, Leise J, Drechsel K, Marburger M, Quaiser A, Goudeva L, Arseniev L, Kaiser A, Glienke W, Koehl U. Automated enrichment, transduction and expansion of clinical-scale CD62L+ T cells for manufacturing of GTMPs. *Hum Gene Ther* 2016;DOI: 10.1089/hum.2016.091

Priesner C, Esser R, Tischer S, Marburger M, Aleksandrova K, Maecker-Kolhoff B, Heuft HG, Goudeva L, Blasczyk R, Arseniev L, Köhl U, Eiz-Vesper B, Klöss S. Comparative Analysis of Clinical-Scale IFN-gamma-Positive T-Cell Enrichment Using Partially and Fully Integrated Platforms. *Front Immunol* 2016;7:393

Roemer A, Köhl U, Majdani O, Klöß S, Falk C, Haumann S, Lenarz T, Kral A, Warnecke A. Biohybrid cochlear implants in human neurosensory restoration. *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):148

Vyas M, Schneider AC, Shatnyeva O, Reiners KS, Tawadros S, Kloess S, Köhl U, Hallek M, Hansen HP, Pogge von Strandmann E. Mono- and dual-targeting triplebodies activate natural killer cells and have anti-tumor activity in vitro and in vivo against chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 2016;5(9):e1211220

Übersichtsarbeiten

Koehl U, Kalberer C, Spanholtz J, Lee DA, Miller JS, Cooley S, Lowdell M, Uharek L, Klingemann H, Curti A, Leung W, Alici E. Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control. *Oncoimmunology* 2015;5(4):e1115178

Herausgeberschaften

Sack U [Hrsg.]: *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. Berlin Boston: De Gruyter, 2016. XV, 426 S.

Abstracts

2016 wurden 14 Abstracts publiziert.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Köhl, Ulrike (Prof. Dr.): Sprecher: EU-Konsortium NATURIMMUN; Handling Editor: *Frontiers Immunology*; 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 / 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, 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.