

Ausgewähltes Forschungsprojekt

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

GMP-konforme Herstellung von iIL-18 TRUCKs und Entwicklung einer klinischen Studie

Ziele

Ziel des Verbundprojekts From CARs to TRUCKs: Induction of a concerted anti-tumor immune response by engineered T cells war die Entwicklung einer innovativen Zelltherapie mit sogenannten TRUCK (T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing). Dabei werden T-Zellen aus peripherem Blut in vitro aktiviert und mittels Gentransfer mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) ausgestattet, der nach antigenspezifischer Aktivierung die Sekretion eines Zytokins induziert. TRUCK sind Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMPs). Exemplarisch wurde ein TRUCK entwickelt, der a) das tumorassoziierte Antigen GD2 erkennt, und b) nach Erkennung der Tumorzelle das immunaktivierende Zytokin IL-18 sezerniert (Zimmermann et al. 2020, Cancers 12:375ff).

Ziel unseres Teilprojektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur GMP-konformen Herstellung von TRUCK, welches die einzelnen Prozessschritte (1) Aufreinigung der Ausgangszellen, (2) Aktivierung der T-Zellen, (3) Transduktion, (4) Expansion zur Erreichung der erforderlichen Zielzelldosis und (5) Formulierung des Endproduktes, umfasst und den regulatorischen Anforderungen zur Herstellung eines ATMP für eine zukünftige klinische Studie entspricht.

Herstellung von TRUCK am CliniMACS Prodigy

Die Herstellung von TRUCK erfolgte am CliniMACS Prodigy, einem automatisierten Gerät zur Zellverarbeitung (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) (siehe Abb.1) in einem geschlossenen System unter Verwendung der T cell transduction (TCT) Prozess-Software. Im Rahmen des automatisch ablaufenden Prozesses ist die Eingabe verschiedener

flexibler Parameter für bestimmte Prozessschritte z. B. Zeitpunkt Transduktion, Waschen der Kultur, Ernte, Mediumzugabe bzw. -wechsel innerhalb der Software Activity Matrix) möglich. Die von uns verwendeten Parameter für den Prozessablauf ist unten beschrieben und in Abb. 2 schematisch dargestellt.

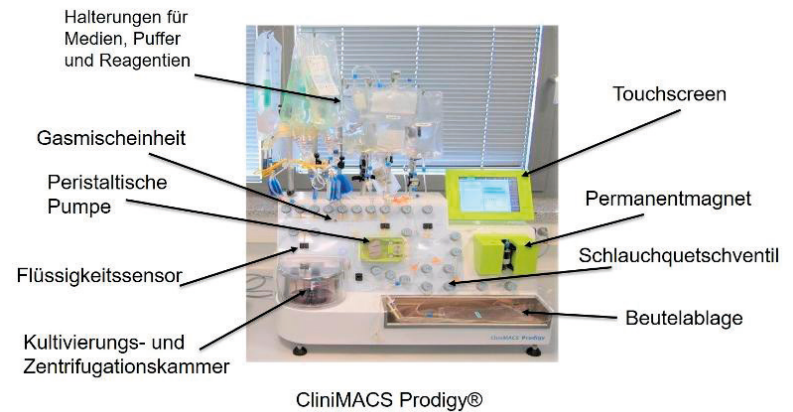


Abb. 1: Der CliniMACS Prodigy® ein vollautomatisches Gerät zur Zellverarbeitung mit installiertem tubing set für den T cell transduction Prozess. Foto: Dr. Wolfgang Glienke.

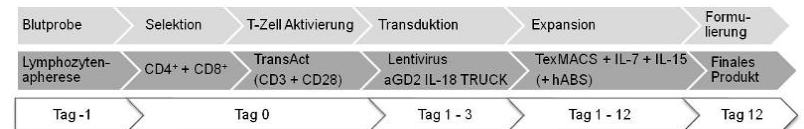


Abb. 2: Schematische Darstellung über den Ablauf des TRUCK-Herstellungsprozesses am Clin MACS Prodigy.

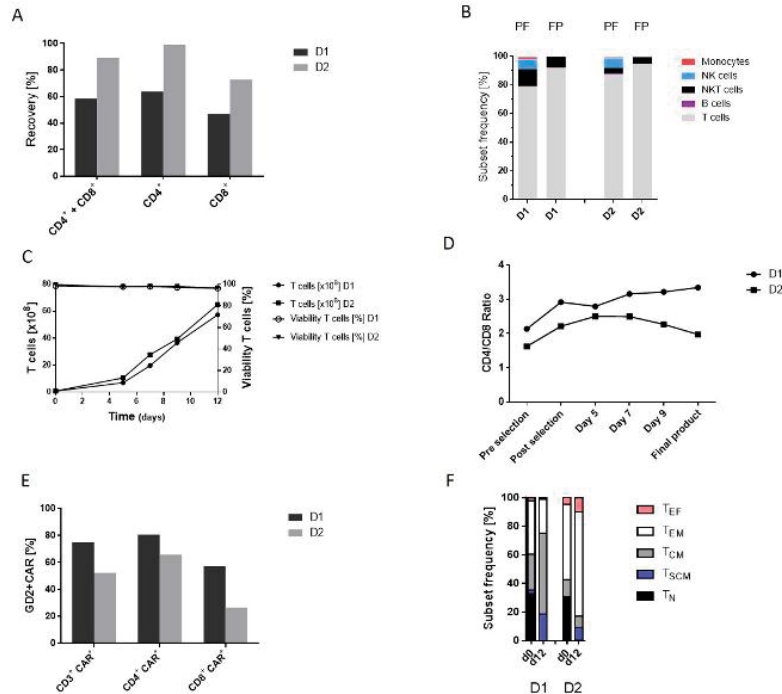


Abb. 3: Die automatisierte GMP-konforme Herstellung von GD2-spezifischen IL-18 TRUCKs, unter Verwendung des CliniMACS Prodigy (Verfahren im klinischen Maßstab). (A) Recovery (CD4+, CD8+ Zellpopulation nach Anreicherung in Prozent der entsprechenden Zellpopulation (B) Zellzusammensetzung nach Anreicherung von CD4+- und CD8+-Zellen und in den Endprodukten. Die erreichte T-Zellreinheit in der positiven Fraktion (PF) betrug 79,1% D1 und 87,7% D2 mit kontaminierenden CD56+CD3+ NKT-Zellen (12,0% D1 und 3,8% D2), CD56+CD3-NK-Zellen (6,4% D1 und 6,8% D2), CD14+ Monozyten (1,9% D1 und 0,6% D2) und CD20+ B-Zellen (0,2%

D1 und 0,5% D2). Zellzusammensetzung der Endprodukte (FP) mit einer Reinheit von 92,1% D1 und 95,0% D2 T-Zellen (CD3+/CD56-) und Verunreinigungen mit NKT-Zellen (7,6% D1 und 4,4% D2) sowie Rest 0,1% D1 und 0,2% D2 NK-Zellen. In den Endprodukten konnten residuale B-Zellen (0,05% D2) jedoch keine Monozyten nachgewiesen werden. (C) Expansion und Viabilität von T-Zellen (CD3+ CD56-) während der 12-tägigen Herstellung. (D) Das CD4/CD8-Verhältnis änderte sich während der Kultivierung (nach Selektion bis Endprodukt) von 2,9 bis 3,3 bei D1 und 2,2 bis 2,0 D2. (E) Transduktionsrate von CD3+-Zellen und CD4+-CD8+-Subtypen in den Endprodukten. (F) Die Analyse des T-Zell-Phänotyps des Ausgangsmaterials am Tag 0 (Lymphozytenapherese) und in den Endprodukten am Tag 12. Die durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD45RO, CCR7 und CD95 unter vitalen CD3+-Zellen wurde zu der Definition der verschiedenen T-Zell-Phänotypen herangezogen: Naive (TN: CD45RO-, CCR7+, CD95-), Stammzellgedächtnis (TSCM: CD45RO-, CCR7+, CD95+), zentrale Gedächtnis (TCM: CD45RO+, CCR7+ CD95+), Effektor-Gedächtnis (TEM: CD45RO+, CCR7-CD95+) und Effektor- (TEF: CD45RO-, CCR7-CD95+). Im Ausgangsprodukt waren TN- (33,1% D1 und 30,0% D2), TCM- (25,1% und 11,8% D2) und TEM- (37,6% D1 und 53,0% D2) Zellen mit unterschiedlichem Anteil der T-Zellsubtypen vorhanden. TSCM: 2,2% D1 und 0,62% D2, TEF: 2,1% D1 und 4,62% D2). Im Unterschied dazu enthielten die Endprodukte TCM (56,9% D1 und 8,17% D2) und TSCM (18,3% D1 und 8,62% D2) Zellen, TEM (23,6% D1 und 72,74% D2) und TEF (1,2% D1 und 9,9% D2)-Zellen sowie TN (0,1% D1 und 0,54% D2)-Zellen. Der Anteil der T-Zellen (CD3+ CD56-), Monozyten (CD14+), NK-Zellen (CD56+ CD16+), NKT-Zellen (CD56+ CD3+) und der B-Zellen (CD20+) unter vitalen CD45+ Zellen wurden anhand der entsprechenden linienspezifischen Marker identifiziert.

Erstellung von SOPs zur Herstellung und Qualitätskontrolle von TRUCK

Basierend auf unseren Erfahrungen bei der Etablierung eines Prozesses zur Herstellung von CD20-CAR-Zellen am CliniMACS Prodigy wurden SOPs (Standard Operating Procedures) sowie die zugehörigen Unterlagen zur Dokumentation der Arbeitsschritte erstellt. Diese Dokumente umfassen sowohl den Herstellungsprozess als auch die Qualitätskontrolle zur Charakterisierung der Zellen während des Prozesses und des TRUCK-Endproduktes.

Prozessetablierung: Proof-of-concept

Zur Prüfung der Machbarkeit wurden zwei komplette Prozesse zur Herstellung von TRUCK entsprechend der SOPs am CliniMACS Prodigy durchgeführt und in den entsprechenden Unterlagen (Herstellungsprüfprotokolle) die Arbeitsschritte dokumentiert. Der gesamte

Herstellungsprozess dauerte insgesamt 12 Tagen bis zum fertigen TRUCK-Produkt (Abb. 2). Im ersten Schritt an Tag 0 wurden mit Hilfe von magnetischen anti-CD4- und anti-CD8-Beads die CD4+ und CD8+ Zellen aus der Lymphozytenapherese selektioniert. Am gleichen Tag begann die Kultivierung der selektionierten CD4+ und CD8+-Zellen mit den Zytokinen Interleukin 7 (IL-7) und IL-15 sowie die Aktivierung mit CD3- und CD28-Agonisten (TransAct). Von Tag 1 bis Tag 3 fand die Transduktion durch Zugabe des Lentivirus zur Zellkultur statt. Während der Kultivierung erfolgte regelmäßig die Zugabe bzw. der Wechsel von Kulturmedium. Nach der Expansion an Tag 12 wurde das formulierte Endprodukt vom CliniMACS Prodigy ausgegeben und anschließend kryokonserviert.

Ergebnisse und Diskussion

In der Machbarkeitsprüfung, die auf den von uns entwickelten Herstellungs-SOPs basierte, wurden aus Lymphozytenapheresen gesunder Spender iIL-18 TRUCKs in einer für die klinische Anwendung entsprechenden Quantität und Qualität hergestellt. Die CD4/CD8 Selektion zu Beginn des TRUCK-Herstellungsprozesses führte zu einer Reinheit von >79% T-Zellen, vergleichbar mit anderen Studien.

Die Transduktionsraten der TRUCKs waren mit >70% im Endprodukt im Vergleich zu anderen veröffentlichten Studien, in welchen CAR T-Zellen mit dem CliniMACS Prodigy hergestellt wurden, sehr hoch. Die Ergebnisse der VCN-Untersuchung (2,6 bzw. 2,4 Kopien pro Zelle im Endprodukt) erfüllen die Empfehlungen der Behörden (VCN <5 Kopien pro Zelle), um das potenzielle Risiko einer Insertionsmutagenese zu verringern.

Durch die hohe Transduktionsrate und starke Expansion der T-Zellen ist die Ausbeute von CAR+ T-Zellen im Endprodukt mit $3,6 \times 10^9$ bzw. $4,5 \times 10^9$ sehr gut und definitiv ausreichend für die therapeutischen Dosierungen bei der geplanten klinischen Anwendung. Detaillierte Ergebnisse sind in Abb. 3 und in der Veröffentlichung von Glienke et al. 2022, Front Immunol 13:839783 dargestellt.

Auswirkungen der Projektergebnisse auf Klinik und Praxis

Die Machbarkeit der GMP-konformen Herstellung von GD2-spezifischen iIL-18 TRUCKs konnte exemplarisch gezeigt werden (Glienke et al., 2022) und mündet in der „Klinische Phase I-Studie der Sicherheit, Dosisfindung und Machbarkeit einer GD2-IL18 CART-Zell-Therapie bei Patientinnen und Patienten mit rezidivierten oder refraktären GD2-positiven soliden Tumoren“ FKZ 01EN2007A.

» Projektleitung: Köhl, Ulrike (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Wels, W., Georg-Speyer-Haus Institut für Tumorbiologie und experimentelle Therapie Frankfurt am Main, Frankfurt am Main, Deutschland; Rössig, C., Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Universitätsklinikum Münster, Münster, Deutschland; Abken, H., Leibniz-Institut für Immuntherapie, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland; Mackensen, A., Medizinische Klinik 5, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Deutschland; Hudecek, M., Medizinische Klinik II Hämatologie, Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland; Serve, H., Medizinische Klinik II Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt, Deutschland; Handgretinger, R., Universitätsklinikum Tübingen, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen, Deutschland; Moritz, Thomas (Prof. Dr.) Experimentelle Hämatologie AG Reprogrammierung und Gentherapie, Medizinische Hochschule Hannover; Schambach, Axel (Prof. Dr.) Institut Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover; Eiz-Vesper, Britta (Prof. Dr.) Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering, Medizinische Hochschule Hannover; Förderung: Stiftung Deutsche Krebshilfe

Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2021)

CAR NK-Zellen mit zielgerichteter Pharmakotherapie z Herstellung der BCR-ABL negativen akuten B-lineage lymphoblastischen Leukämie des Erwachsenen

» Projektleitung: Esser, Ruth (Dr.); Förderung: Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.