

CAR-T-Zellen gegen malignes Melanom

Automatisierung für die personalisierte Krebstherapie

MANAL HADENFELD¹, GEORG RAUSER¹, ULRIKE KÖHL², HINRICH ABKEN³,
MICHAEL APEL¹

¹ MILTENYI BIOTEC GMBH, BERGISCH GLADBACH

² MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER

³ UNIVERSITÄTSKLINIK KÖLN

Every year, in Germany about 17.000 patients are diagnosed with malignant melanoma, and 3.000 patients die as a consequence of the disease. Recently, many successful results in cancer therapy were achieved by the CAR T cell therapy. In the BMBF-funded project CD20 CAR-TIME, CAR T cells will be applied to treat melanoma patients in a clinical study. Moreover, this project consortium will explore how automation can deliver this personalized form of therapy to a large number of patients.

DOI: 10.1007/s12268-016-0717-9

© Springer-Verlag 2016

■ CAR steht für chimäre Antigenrezeptoren (**Abb. 1**). Dabei handelt es sich um künstliche Oberflächenmoleküle, die durch gentechnische Methoden in Zellen des Immunsystems eingeführt werden. Sie fungieren in der Zelltherapie als Erkennungsmoleküle, ähnlich wie Antikörper oder T-Zell-Rezeptoren, um T-Zellen gegen Krebszellen zu richten und diese dann gezielt zu eliminieren [1–3]. Ein großer Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass der Körper eine dauerhafte zelluläre Abwehrreaktion gegen diese Art von Tumorzellen aufbaut. Dies minimiert den Therapieaufwand erheblich im Vergleich zu den bisher angewandten Chemo-, Bestrahlungs- oder Antikörpertherapien.

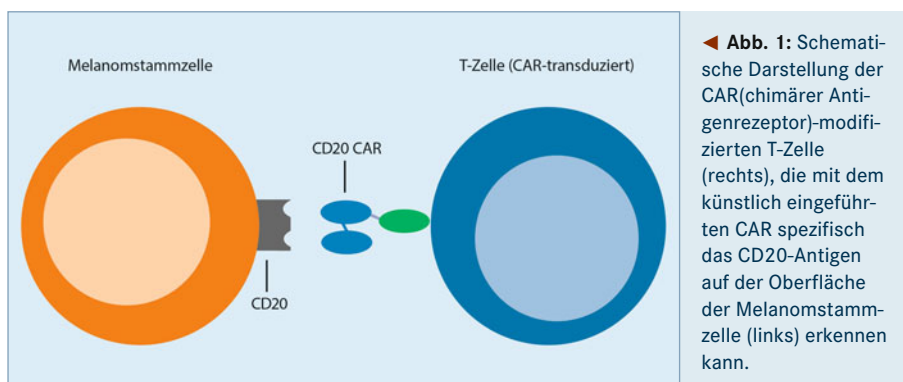
Der hier zu untersuchende CAR-T-Zell-Therapieansatz basiert auf der Erkenntnis, dass die zielgerichtete Eliminierung einer definierten kleinen Subpopulation von Tumorstammzellen (0,1 bis zwei Prozent aller Tumorzellen) zur vollständigen Beseitigung des Tumors beim Hautkrebs führen kann [4]. Die Analyse von Tumorbiopsien von fünf Patienten zeigte, dass zusätzlich zu dem bei Melanomzellen häufig exprimierten Oberflächenmarker HMW-MAA (*high molecular weight-melanoma associated antigen*) bei der Mehrzahl der Patienten CD20 als weiterer Oberflächenmarker auf einer Subpopulation von bis zu zwei Prozent der Zellen exprimiert wurde. Nach der Implantation von Biopsien

dieser Tumoren in immunsupprimierte Mäuse bildeten sich Tumoren mit identischer histologischer Morphologie des Ursprungstumors. Die Behandlung der Mäuse mit CD20-spezifischen CAR-T-Zellen führte dazu, dass das Tumorwachstum gleichermaßen inhibiert wurde wie unter Behandlung mit HMW-MAA-spezifischen CAR-T-Zellen, obwohl die CD20-positiven Zellen nur zwei Prozent der Tumorzellen ausmachten (**Abb. 2A**). Bemerkenswert ist, dass im Fall von Tumoren ohne CD20-positive Zellen die CD20-spezifischen CAR-T-Zellen keinen wachstumsinhibierenden Effekt zeigten (Patient Nr. 5, **Abb. 2A**). In den Mäusen, bei denen der Tumor vernichtet werden konnte, kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums von 36 Wochen zu keinem Rückfall. Als Negativkontrolle wurden CD19-spezifische CAR-T-Zellen benutzt, die keinen Effekt aufwiesen. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass die Eliminierung der Tumorzellen durch Anti-CD20- und Anti-HMW-MAA-CAR-T-Zellen durch die Apoptose-auslösende Serinprotease Granzym B stattfindet (**Abb. 2B**).

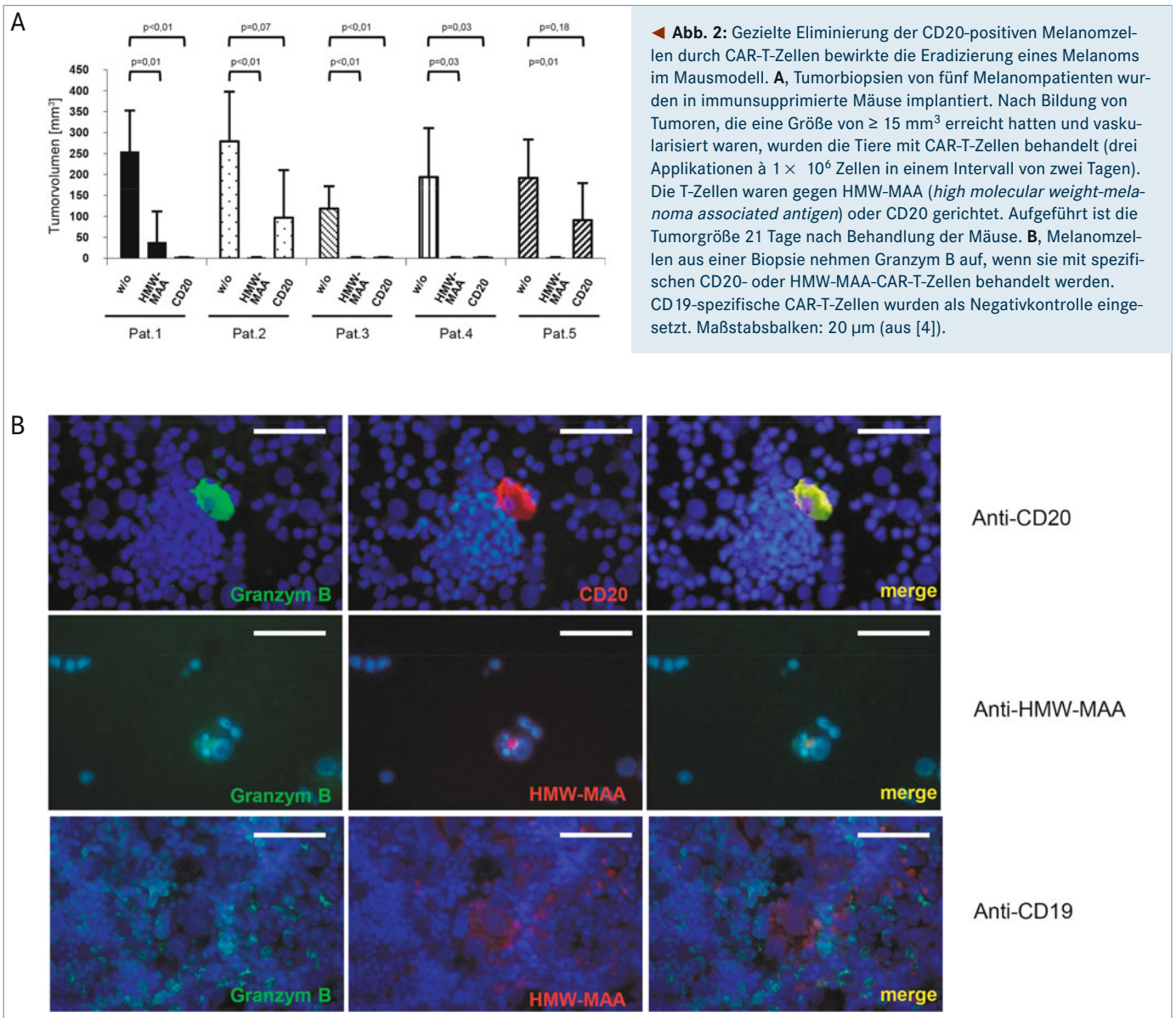
Herstellung der CAR-T-Zellen

Die Herstellung der CAR-T-Zellen für klinische Anwendungen ist sehr komplex und aufwendig (**Abb. 3A**). Eine Vielzahl von manuellen Schritten unter Verwendung von verschiedenen Geräten ist erforderlich; weiterhin muss das Verfahren wenig fehleranfällig sein, um den hohen Sicherheitsanforderungen der regulatorischen Behörden zu genügen. Daraus ergeben sich hohe Kosten für Material, GMP (*Good Manufacturing Practice*)-Labore und Personal. Außerdem ist die Anzahl der Patienten, die mit derartig aufwendigen Herstellungsverfahren behandelt werden könnten, sehr begrenzt, und der Bedarf könnte langfristig nicht gedeckt werden.

Um die zellbasierte Therapie möglichst vielen Patienten effektiv, sicher und kostengünstig zugänglich zu machen, muss der Herstellungsprozess automatisiert und an industrielle Anforderungen angepasst werden. Dabei muss in erster Linie berücksichtigt wer-



◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der CAR (chimärer Antigenrezeptor)-modifizierten T-Zelle (rechts), die mit dem künstlich eingeführten CAR spezifisch das CD20-Antigen auf der Oberfläche der Melanomstammzelle (links) erkennen kann.



den, dass sich das zelluläre Produkt durch eine konstante Qualität auszeichnet und zugleich sicher und klinisch effektiv ist. Darüber hinaus ist es für eine Herstellung im industriellen Maßstab erforderlich, den Arbeitsablauf des GMP-konformen Herstellungsprozesses weniger aufwendig, zugleich aber skalierbar zu gestalten. Die technische Lösung der Firma Miltenyi Biotec ist das Laborautomationssystem CliniMACS Prodigy® (**Abb. 3B**). Das integrierte System ermöglicht die automatisierte Zellprozessierung in einem GMP-konformen geschlossenen System [5]. Die Automatisierung des Prozesses erleichtert ferner eine Übertragbarkeit auf unterschiedliche Herstellzentren, um die Wege zwischen Patient und Herstellort zu verringern und somit eine gleichbleibende Qualität des Zellprodukts zu gewährleisten.

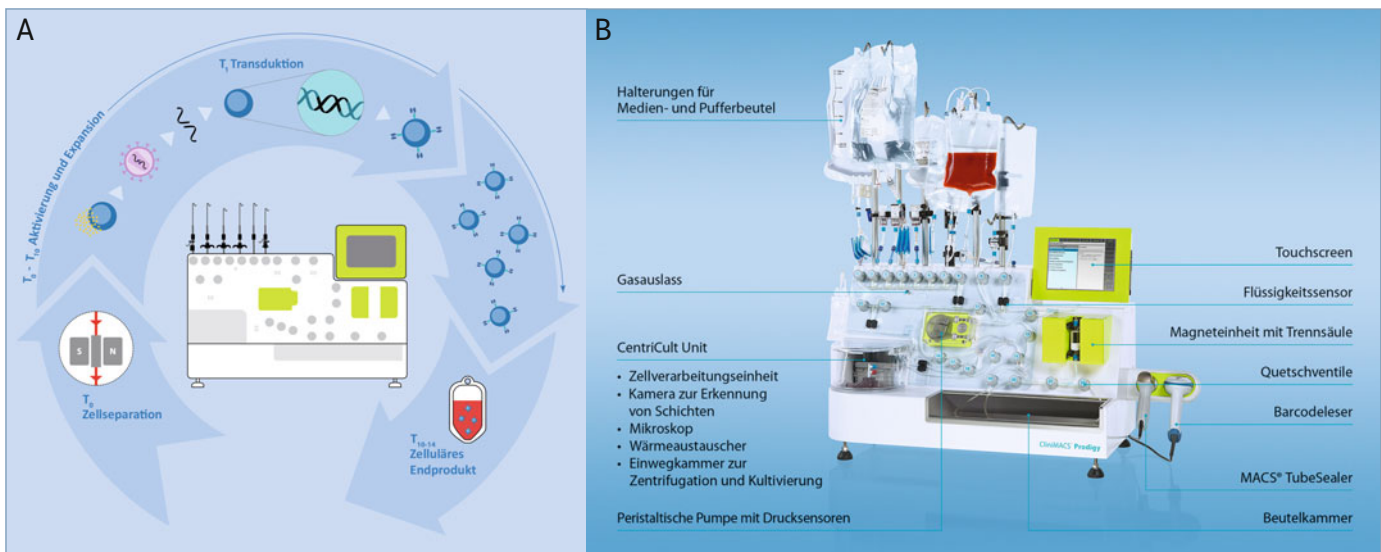
Die Herstellung der CAR-T-Zellen im Projekt CD20 CAR-TIME wird am Institut für Zell-

therapeutika der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) unter der Leitung von Prof.

Verbundprojekt CD20 CAR-TIME

Das Verbundprojekt CD20 CAR-TIME wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) mit 3,2 Millionen Euro für eine Laufzeit von vier Jahren (bis 2019) gefördert. Projektpartner sind Miltenyi Biotec, das Institut für Zelltherapeutika der Medizinischen Hochschule Hannover und die Klinik I für Innere Medizin der Universitätsklinik Köln. In dem Projekt soll die CAR-T-Zell-Therapie zur Behandlung des Melanoms in einer klinischen Phase-I-Studie untersucht werden. In dieser Studie sollen 15 Melanompatienten

mit autologen CD20-spezifischen CAR-T-Zellen (CD20-CAR-T-Zellen) behandelt werden. Eingeschlossen werden Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf (Stadium III oder IV) nach erfolgloser Standardtherapie. Außerdem sollen im Projekt CD20 CAR-TIME erstmals die Sicherheit und der *Proof of Concept* der CD20-CAR-T-Zellen, die in einem automatisierten geschlossenen System generiert werden, in der Melanomtherapie klinisch untersucht werden.



▲ Abb. 3: Arbeitsablauf zur Produktion genetisch veränderter T-Zellen. **A**, Eine komplexe Vielzahl von Einzelschritten beginnt mit der Gewinnung der Zellen aus dem Blut des Patienten (Leukapherese), die T-Zellen werden magnetisch angereichert (Zellseparation, Tag 0). In der Aktivierungs- und Expansions-Phase (Tag 0–10) werden die T-Zellen aktiviert, mit einem CAR-Molekül ausgestattet (Transduktion, Tag 1) und vermehrt (Expansion). Die CAR-T-Zellen werden eventuell noch einmal aufgereinigt und danach in der finalen Formulierungslösung abgefüllt (zelluläres Endprodukt, Tag 10–14). **B**, Alle Arbeitsschritte von der T-Zell-Anreicherung bis zur finalen Formulierung können innerhalb des Laborautomationsystems CliniMACS Prodigy® durchgeführt werden.

Dr. Ulrike Köhl durchgeführt. Im Rahmen des Projekts werden CAR-T-Zellen für eine Phase I-Studie auf dem CliniMACS Prodigy hergestellt. Ein automatisierter Prozess, der speziell für die Herstellung von CAR-T-Zellen entwickelt und optimiert wurde, ermöglicht es, den gesamten Workflow von der T-Zell-Anreicherung über die Transduktion bis hin zur finalen Zellformulierung in einem Einwegschlauchset durchzuführen. Dies führt nicht nur zu einer hohen Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit des Prozesses, sondern reduziert auch den Arbeitsaufwand und die benötigten Reinraumkapazitäten. Um von einem optimalen Ausgangsmaterial ausgehen zu können, wird die Leukapherese des Patienten direkt nach der Entnahme ohne zwischenzeitliche Kryokonservierung an den CliniMACS Prodigy angeschlossen. Zunächst erfolgt eine automatisierte Anreicherung der T-Zellen mittels magnetbasierter Zellseparation. Die isolierten Zellen werden dann in die CentriCult-Einheit überführt, mithilfe eines eigens dafür entwickelten Reagenses aktiviert und anschließend mit dem lentiviralen Vektor, der die genetische Information für den CAR trägt, transduziert. Die CentriCult-Einheit ist dabei ein integraler Bestandteil des Schlauchsets und erlaubt es, die Zellen unter kontrollierten Temperatur- und Gasbedingungen sowohl zu kultivieren als auch bei Bedarf zu waschen und mit frischem Medium zu versetzen. Nach mehrtägiger Expansion

werden die Zellen in einem automatisierten Prozess in dem gewünschten finalen Puffer formuliert und in den Transferbeutel überführt. Für die Qualitätskontrolle des zellulären Produkts werden während des Herstellungsprozesses und von dem finalen Produkt Proben entnommen und hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht. Um die maximale Wirksamkeit der CAR-T-Zellen zu erreichen, soll das finale Produkt, wenn möglich, ohne zwischenzeitliche Kryokonservierung frisch appliziert werden.

Der T-Zell-Transduktionsprozess auf dem CliniMACS Prodigy wurde erfolgreich zur Herstellung der CD19-CAR-T-Zellen für die Behandlung von Leukämie am University College London etabliert. Die CD19-CAR-T-Zellen, die mittels des automatisierten Prozesses hergestellt wurden, zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem humanisierten Mausmodell biologische Aktivität [6].

Ausblick

Für die breite Anwendung von CAR-T-Zellen als Standardtherapie wird eine effiziente und sichere Technologie benötigt, genetisch-modifizierte T-Zellen automatisiert herzustellen – unter der Berücksichtigung aller regulatorischen Anforderungen. Auf diese Weise soll der Verbund CD20 CAR-TIME neue Therapieoptionen für eine große Anzahl von Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen ermöglichen.

Danksagung

Wir danken dem BMBF für die Förderung des Projekts CD20 CAR-TIME (Fkz: 01EK1507) im Rahmen der Fördermaßnahme „Innovationen für die Individualisierte Medizin“.

Literatur

- [1] Brenner MK (2012) Will T-cell therapy for cancer ever be a standard of care? *Cancer Gene Ther* 19:818–821
- [2] Anurathapan U, Leen AMI, Brenner MK et al. (2014) Engineered T cells for cancer treatment. *Cytotherapy* 16:713–733
- [3] Riet T, Abken H (2015) Chimeric antigen receptor T cells: power tools to wipe out leukemia and lymphoma. *Exp Rev Hematol* 8:383–385
- [4] Schmidt P, Kopecky C, Hombach A et al. (2011) Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2474–2479
- [5] Apel M, Brüning M, Granzin M et al. (2013) Integrated clinical scale manufacturing system for cellular products derived by magnetic cell separation, centrifugation and cell culture. *Chemie Ingenieur Technik* 85:103–110
- [6] Mock U, Nickolay L, Philip B et al. (2016) Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy* 18:1002–1011

Korrespondenzadresse:

Dr. Manal Hadenfeld
Miltenyi Biotec GmbH
Friedrich-Ebert-Straße 68
D-51429 Bergisch Gladbach
Tel.: 02204-8306-4246
Fax: 02204-85197
Manal.Hadenfeld@MiltenyiBiotec.de
www.miltenyibiotec.com