



Gesamtschlussbericht Fkz 01EK1507A-C

Verbund „CD20 CAR-TIME“

Gesamtschlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Fkz 01EK1507A

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG

Friedrich-Ebert-Str. 68

51429 Bergisch Gladbach

Fkz 01EK1507B

Medizinische Hochschule

Hannover

Inst. f. Zelltherapeutika

Feodor-Lynen-Str.21

30625 Hannover

Fkz 01EK1507C

Universitätsklinikum Regensburg

Abt. f. Gen-Immuntherapie am LIT

Franz-Josef-Strauss Allee 11

93053 Regensburg

Vorhabenbezeichnung:

CD20CAR transduzierte T-Zellen für die individualisierte Melanom-Therapie – „CD20 CAR-TIME“

Laufzeit des Vorhabens und Berichtszeitraum:

01.12.2015 – 31.12.2023

Wir weisen an dieser Stelle darauf hin, dass der nachfolgende Bericht um vertrauliche Passagen und Abbildungen gekürzt wurde, um den Schutz der Patientendaten sowie wirtschaftliche Interessen zu wahren und noch nicht publizierte wissenschaftliche Ergebnisse zu schützen.

Inhalt

I.	Kurze Darstellung zu.....	2
1.	Aufgabenstellung.....	2
2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	2
3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	3
4.	Darstellung des wissenschaftlichen und technischen Stands	3
5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	4
II.	Eingehende Darstellung	5
1.	Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	5
	AP1 (Präklinische Forschung)	5
	AP2 (Prozessvalidierung und Herstellungsgenehmigung).....	8
	AP3 (Klinische Studie).....	11
	AP4 (Begleitforschung).....	13
	AP5 (Projektmanagement).....	20
2.	Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	20
3.	Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	21
4.	Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	22
	Geschäftsfeldentwicklung:	22
	Wissenschaftlich-technische Verwertung:.....	23
5.	Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens	24
6.	Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11 ...	25

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Übergeordnete Ziele des Projektverbundes waren die klinische Erprobung eines innovativen individualisierten Therapieansatzes zur Behandlung von Melanomen sowie die Implementierung einer standardisierten, automatisierten Zellprozessierungsplattform im klinischen Umfeld. Patienteneigene T-Zellen sollten gentechnisch so modifiziert werden, dass sie ein bestimmtes Molekül (CD20) auf Melanom-Stammzellen erkennen, diese gezielt bekämpfen und so zur spezifischen Tumorelimination beitragen.

Das hier berichtete Verbundprojekt umfasste fünf Arbeitspakete:

- **AP1 (Präklinische Forschung)** diente der Generierung der präklinischen *in vitro* und *in vivo* Daten, die dem PEI für die Genehmigung der klinischen Studie vorgelegt werden mussten.
- **AP2 (Prozessvalidierung und Herstellungsgenehmigung)** war die GMP-konforme Etablierung eines standardisierten und automatisierten Herstellungsprozesses, der Aufbau der Qualitätskontrolle (QK) zur Freigabe des Zellprodukts und die Erlangung der Herstellungsgenehmigung.
- **AP3 (Klinische Studie)** war das zentrale Arbeitspaket des Antrags. Ziel war die Vorbereitung, Beantragung, Durchführung und Auswertung der klinischen Studie.
- **AP4 (Begleitforschung)** untersuchte das *in vivo* Verhalten von CD20-CAR-transduzierten T-Zellen zum einen in Mausmodellen und darüber hinaus auch im Patienten, um die therapeutischen Effekte besser zu verstehen und weiter zu optimieren.
- **AP5** beinhaltete das **Projektmanagement** zur Koordinierung des Konsortiums, des Steering Committee sowie des Scientific Advisory Board, zur Überwachung der Meilensteinplanung und zur Zusammenarbeit mit dem Projektträger

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt baute auf Vorarbeiten des Konsortiums auf, in denen optimierte „Chimäre Antigen Rezeptor“ (CAR)-Strukturen für die klinische Anwendung in der T-Zell-Therapie erforscht wurden, neue Zielstrukturen auf Krebsstammzellen identifiziert, innovative Technologien zur klinischen Herstellung von Zellprodukten entwickelt und zelluläre Herstellprozesse standardisiert und optimiert wurden.

Wissenschaftlich-technisches Ziel von CD20CAR-TIME war die Translation dieser Arbeiten in die klinische Routine. Eine klinische Studie Phase I sollte (a) die Sicherheit des therapeutischen Konzepts der Tumorstammzellelimination mit CD20CAR-transduzierten T-Zellen bei soliden Tumoren zeigen und (b) eine automatisierte Plattform zur standardisierten Herstellung von Zellprodukten in der klinischen Routine etablieren, die die sichere und einfache Herstellung von Zellprodukten für die individualisierte Therapie ermöglicht.

Ziel der Begleitforschung war die Untersuchung des *in vivo* Verhaltens von CD20-CAR-transduzierten T-Zellen in Mausmodellen und darüber hinaus auch im Patienten, um die therapeutischen Effekte besser verstehen und weiter optimieren zu können.

Zunächst war die Miltenyi Biotec als Sponsor verantwortlich für die Durchführung der klinischen Studie entsprechend den gültigen regulatorischen Bedingungen. Mit Wirkung zum 01. Februar 2020 wurde die Miltenyi Biomedicine GmbH als Tochter der Miltenyi Biotec gegründet und agiert seitdem als neuer Sponsor für diese Studie. Die Universität zu Köln stellte den Leiter der klinischen Prüfung (Coordinating Investigator) und koordinierte zunächst das dort angesiedelte Teilprojekt für die Begleitforschung, bis

gewinnen zu können. CD20 ist ein Zielmolekül, das bereits als spezifischer Marker auf einigen Krebsarten nachgewiesen werden konnte¹ und physiologisch ausschließlich auf frühen (ab dem pro-B-Stadium) und reifen B-Zellen vorkommt. Da CD20 nur auf B-Zellen und auf den Tumorzellen exprimiert wird, eignet es sich als „Tumormarker“ für therapeutische Anwendung für eine Reihe von Tumoren wie Lymphome, lymphatische Leukämien und das maligne Melanom². Insbesondere Melanome sind häufig sehr aggressiv und bilden rasch Metastasen, für welche keine kurativen Therapien zur Verfügung stehen.

Üblicherweise werden CAR T-Zellen mit Hilfe von viralen Vektoren, welche die Komponenten des CAR-Rezeptors enthalten, durch Transduktionsmethoden hergestellt. Das hier verwendete CAR-Rezeptorkonstrukt ist modular aufgebaut und besteht im Wesentlichen aus anti-CD20 scFv-, „Spacer“- , Transmembran- und intrazellulären T-Zell-Signaltransduktionsdomänen, welche bereits in einem retroviralen Vektor in präklinischen Studien verwendet wurde^{3,4}. Anstelle publizierter, retroviraler Expressionssysteme für die Herstellung der T-Zellen verwendeten wir für das vorliegende Vorhaben ein lentivirales System. Lentivirale Expressionssysteme haben den Vorteil, dass sie auch Zellen transduzieren können, die sich nicht in Teilung befinden. Sie werden klinisch als mindestens genauso sicher wie retrovirale Systeme eingeschätzt⁵. Ein weiterer Vorteil des lentiviralen Systems ist die Möglichkeit, die Herstellung der CAR T-Zellen für die klinische Anwendung sicher, standardisiert und automatisiert auf der CliniMACS Prodigy Zellkulturplattform durchzuführen, was die Sicherheit bei einem zukünftigen therapeutischen Einsatz in der Klinik weiter erhöht⁶.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

In diesem Verbundprojekt haben sich international führende Wissenschaftler im Bereich der Zellprozessierung, der CAR-Therapie und der industriellen (Zell-therapeutisch aktiven) Biotechnologie zu einem Forschungsverbund zusammengeschlossen. Alle Verbundpartner brachten unterschiedliche, sich ergänzende Expertisen ein und arbeiteten bereits in langjährigen Kooperationen zusammen. Die enge Verzahnung der einzelnen Arbeitspakete erforderte eine intensive Interaktion der Verbundpartner, die durch eine nachhaltige Projektkoordination gewährleistet wurde. Jeder Partner wurde entsprechend seiner Expertise federführend in mind. ein Arbeitspaket eingebunden:

- Miltenyi Biotec war als Verbundkoordinator verantwortlich für das Gesamtprojekt-Management (AP5), für die Durchführung der klinischen Studie (AP3) sowie für die Koordination der präklinischen Arbeiten (AP1).
- Die Universität zu Köln stellte den Leiter der klinischen Prüfung (LKP). Univ.-Prof. Hinrich Abken koordinierte die Begleitforschung (AP4), zunächst in seiner Position als C3 Professor an der Klinik I für Innere Medizin. Nach seinem Ruf an die Universität Regensburg und nach Gründung des Leibniz-Instituts für Immuntherapie (LIT) in Regensburg führte er die Arbeiten dort fort.

¹ Fang, Dong, et al. "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." *Cancer research* 65.20 (2005): 9328-9337.

² Barrett, David M., et al. "Chimeric antigen receptor therapy for cancer." *Annual review of medicine* 65 (2014): 333-347.

³ A. Hombach, and H. Abken. "Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response." *Gene therapy* 17.10 (2010): 1206-1213.

⁴ Schmidt, Patrick, et al. "Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.6 (2011): 2474-2479.

⁵ Zufferey, Romain, et al. "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." *Journal of virology* 72.12 (1998): 9873-9880.

⁶ Kaiser, A. D., et al. "Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy." *Cancer gene therapy* 22.2 (2015): 72-78.

- Die Medizinische Hochschule Hannover war unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrike Köhl und Dr. Ruth Esser/Dr. Lubomir Arseniev für die GMP-konforme Herstellung der Zellprodukte verantwortlich sowie ihre Qualitätskontrolle in AP2 (Leitung) sowie AP3.
- Klinische Partner (Klinische Zentren) zur Patientenrekrutierung und -behandlung waren die Universitätsklinik Köln unter der Leitung von Oberarzt Prof. Dr. Peter Borchmann und die Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Klinikdirektor Medizinische Klinik und Poliklinik III Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt.
- Ein externes „Scientific Advisory Board“ mit regulatorischer, wissenschaftlicher und industrieller Expertise wurde nominiert und begleitete und beriet die Arbeiten des Konsortiums : Prof. Dr. Carl June (University of Pennsylvania, Experte auf dem Gebiet der genetisch veränderten T-Zellen), Prof. Dr. Ulrich Kalinke (TWINCORE Hannover, Experte auf dem Feld “regulatorische Angelegenheiten”) und Prof. Dr. Waseem Qasim (UCL, Experte auf dem Gebiet der klinischen Zell- und Gentherapie).
- Zur Vorbereitung der klinischen Studie wurden einzelne Projektarbeiten an externe Auftragnehmer abgegeben. Die Sponsor-Rolle für die klinische Studie wurde nach Ausgründung des klinischen Bereichs der Miltenyi Biotec in die eigenständige Tochtergesellschaft Miltenyi Biomedicine im Dienstleistungsauftrag an diese übergeben. Teilbereiche der Studiendurchführung wurden an spezialisierte externe Auftragnehmer vergeben.

II. Eingehende Darstellung

1. Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

AP1 (Präklinische Forschung)

In diesem Arbeitspaket erfolgten das Design und die Testung des ursprünglich entwickelten CD20 CAR Konstruktes *in vitro* und *in vivo*. Dazu wurde das CD20 CAR Transfervektor-Plasmid zunächst in Forschungsqualität hergestellt und getestet. Anschließend wurde eine Masterzellbank zur Herstellung des CD20 CAR Transfervektor-Plasmids in GMP Qualität erstellt. Der entwickelte lentivirale CD20 CAR Vektor wurde weiter getestet und zur Transduktion von T-Zellen verwendet. Die Eigenschaften der generierten CD20 CAR T-Zellen wurden eingehend untersucht: es erfolgten verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente zur Testung der Funktionalität, der Persistenz und der Unbedenklichkeit der CD20 CAR T-Zellen, die im Folgenden zusammengefasst dargestellt werden.

Ergebnisse der *in vitro* Studien:

CD20 CAR T-Zellen wurden mit dem CliniMACS Prodigy in einem automatisierten Herstellungsprozess generiert und mittels verschiedener *in vitro* Experimente auf ihre Funktionalität und Stabilität untersucht⁷.

Zur Bestimmung der Funktionalität wurden CD20 CAR T-Zellen mit CD20 positiven Zielzellen co-kultiviert und die Zytolyse der Zielzellen („killing assay“, Abb. 1) sowie die Zytokin Sekretion der CD20 CAR T-Zellen detektiert. Etabliert wurden drei verschiedene Analysemethoden: MACSQuant Analyser zur durchflusszytometrischen Bestimmung, der Synergy zur Lumineszenz-basierten Messung sowie der IncuCyte zur real-time Analyse der Funktionalität von CD20 CAR T-Zellen. Mit allen angewendeten

⁷ Lock, Dominik, et al. "Automated manufacturing of potent CD20-directed chimeric antigen receptor T cells for clinical use." *Human gene therapy* 28.10 (2017): 914-925.

Methoden konnte die spezifische Detektion von CD20 Zielzellen durch CD20 CAR T-Zellen nachgewiesen werden.

Neben der Funktionalitätsanalyse kamen die oben genannten Methoden bei der Bestimmung der CD20 CAR T-Zell-Effizienz zum Einsatz. In einem sogenannten „spike in“ Experiment wurden CD20 positive Zielzellen (hier Melanoma-Zelllinie) auf sehr geringe CD20 Frequenzen (minimum 2% CD20 positive Melanoma Zellen) eingestellt und anschließend die Detektion sowie Lyse der Zielzellen (Abb. 2) durch die CD20 CAR T-Zellen gemessen: Die Effektivität der CD20 CAR T-Zellen konnte für alle Zielzellfrequenzen mit den oben beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Zudem wurde die Stabilität der CD20 CAR T-Zellen untersucht. Hierzu wurden automatisch hergestellte CD20 CAR T-Zellen final formuliert (Composol mit HSA) und für maximal 72 Stunden bei 4°C kontrolliert gelagert. Anschließend wurde die Funktionalität und Vitalität der CD20 CAR T-Zellen sowie die Expression des CARs untersucht. Es konnte eine ausreichende Vitalität (höher 80%) für eine maximale Lagerung von 48 Stunden bestimmt werden. Zudem zeigten alle Zeitpunkte keine Reduktion der CD20 CAR Expression. Für alle untersuchten Zeitpunkte konnte zytolytische Aktivität der CD20 CAR T-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Aktivität höher war, je kürzer die Proben gelagert wurden.

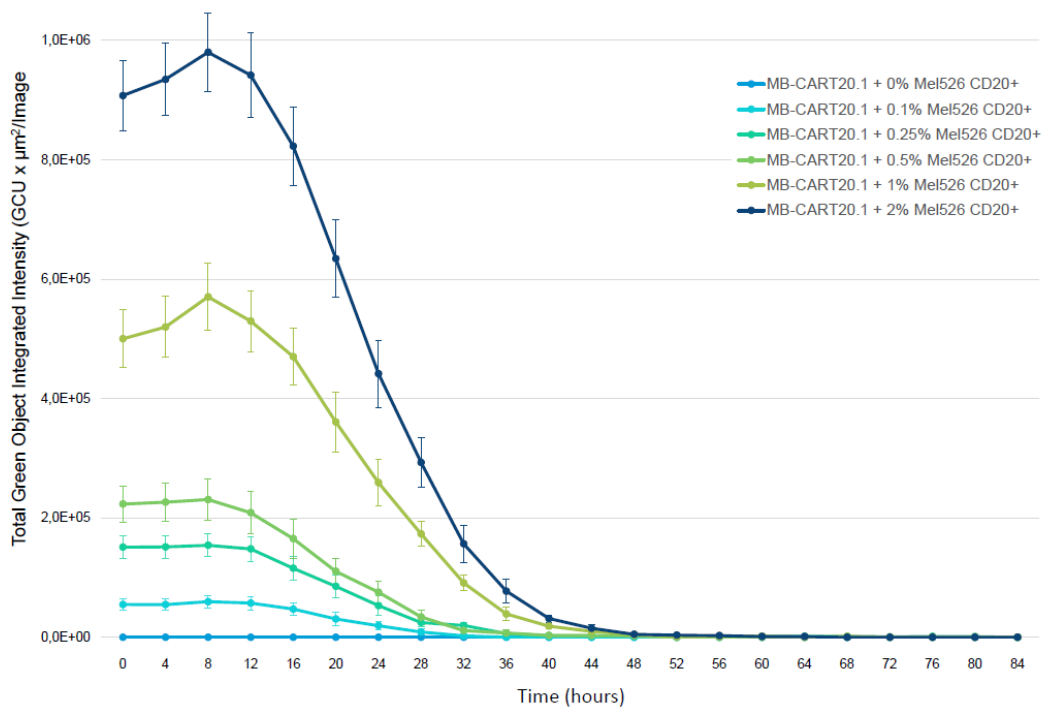


Abb. 1: Spike-In Assay: Killing assay (GFP, Incucyte) MB-CART20.1, 1:1 (T cell : melanoma cell ratio) (2x10⁴ Zellen)

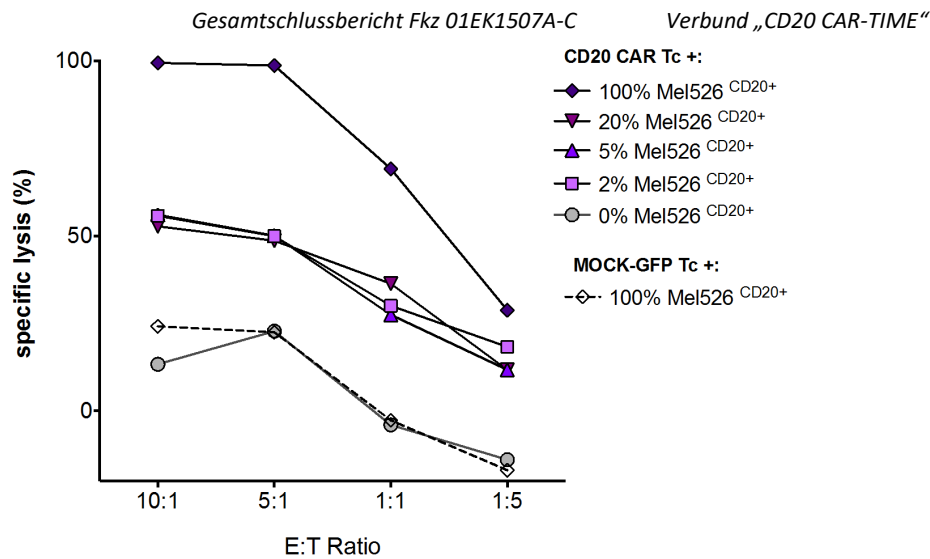


Abb. 2: Spezifische Lysierung von CD20+ Zielzellen (unterschiedliche Frequenzen)

Ergebnisse der *in vivo* Studien:

Es wurden mehrere CD20 CAR Konstrukte in verschiedenen Orientierungen in Mausmodellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Konstrukt in drei verschiedenen Studien mit je drei Spendern die höchste therapeutische Wirksamkeit ohne Nebenwirkungen aufweist. Es wurde daher als klinischer Kandidat ausgewählt und in der klinischen Studie (MB-CART20.1 Melanoma) eingesetzt. Außerdem konnte ein deutlicher Dosierungseffekt festgestellt werden (Daten nicht gezeigt): die niedrige Dosis (1e5 CAR+ T-Zellen) zeigte keinen therapeutischen Effekt im Gegensatz zu der etablierten Dosis (1e6 CAR+ T-Zellen), die den Tumor bis zum Tag 15 eliminierte.

Einfriertestungen ergaben weiterhin, dass eine vollständige Tumoreliminierung mit frischen und 24-Stunden gelagerten MB-CART20.1 Zellen erreicht werden konnte. Eine Behandlung mit nicht-eingefrorenen, frischen MB-CART20.1 Zellen im klinischen Umfeld kann für eine verbesserte Prognose von Vorteil sein. Eine Lagerung für 24h bei 4°C verzögert die Tumoreliminierung für eine Woche in der präklinischen Untersuchung. Das Lieferzeitfenster beträgt 24 Stunden.

In weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte eine hohe Effektivität der MB-CART20.1 Zellen dadurch nachgewiesen werden, dass auch bei einem geringen Anteil von unter 2% CD20-positiven Melanom Zellen, diese wenigen Zielzellen eliminiert werden konnten. *In vitro* Killing Assays (Zytolyse der Zielzellen) und die Untersuchung der Zytokin Sekretion der MB-CART20.1 Zellen konnten zeigen, dass die Funktionalität der CAR T-Zellen sogar bei einer noch geringeren Frequenz von 0.1% CD20-positiven Melanom Zellen gegeben war. Diese hohe Sensitivität der MB-CART20.1 Zellen konnte auch durch weitere *in vivo* Experimente belegt werden, da die CAR T-Zellen die CD20-positiven Subpopulationen bei einem Anteil von nur 1% in einem etablierten soliden Melanom-Xenograft nach i.v. Applikation eliminieren konnten. Somit konnte im Rahmen dieser präklinischen Analysen, die die klinische Aktivität vorhersagen sollten, eine sehr hohe Sensitivität der MB-CART20.1 Zellen nachgewiesen werden.

Das Arbeitspaket 1 konnte damit erfolgreich abgeschlossen werden.

AP2 (Prozessvalidierung und Herstellungsgenehmigung)

TP2.1: Prozessoptimierung und Herstellung von CAR T-Zellen

In der ersten Projektphase wurde der von Miltenyi Biotec entwickelte Herstellungsprozess optimiert, insbesondere hinsichtlich aseptischer Verfahren für die Vorbereitung von Kulturmedien und Reagenzien. Um die mikrobiologische Sicherheit zu erhöhen, wurden Änderungen in der Handhabung des CliniMACS Prodigy Sets empfohlen, z.B. sterile Konnektion von Schläuchen mittels TSCDII-Gerät und das Entfernen nicht mehr notwendiger Sterilfilter nach Prozessstart. Zudem wurden GMP-konforme Rohmaterialien und Hilfsstoffe vorgeschlagen, wie humanes, hitzeinaktiviertes AB-Serum und ComposolPS/HSA-Puffer.

Zur Prozessetablierung wurden zunächst drei Prozesse mit CD62L-selektionierten Ausgangszellen durchgeführt (siehe Priesner et al 2016). Danach folgten drei weitere Prozesse (TCT 004 – TCT006) mit CD4/CD8-selektionierten, transduzierten und expandierten Zellen gemäß dem neuen Plan des Sponsors. Die Ergebnisse mit Berücksichtigung der Akzeptanzkriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2, Etablierung des Herstellverfahrens mit CD4/CD8 selektionierten T-Zellen:

PARAMETER	PROZESS			AKZEPTANZ KRITERIUM (NACH MB)
	TCT004/ 160216TTF (OHNE TRANSDUKTION)	TCT005/ 160329TTF	TCT006/ 170516TTF	
Vitalität CD3 ^{pos} von CD45 ^{pos} Zellen Endprodukt Tag 12	94,94 ¹	92,87 ¹	97,45	≥80%
Prozentsatz CD3 ^{pos} von CD45 ^{pos} Zellen Endprodukt Tag 12	97,32	99,42	99,45	≥80 %
CAR ^{pos} von CD3 ^{pos} Zellen/ Transduktionsrate Tag 5	n.z.	3,09	23,94	≥5%
CAR ^{pos} von CD3 ^{pos} Zellen/ Transduktionsrate Tag 12	n.z.	9,98	38,42	≥10%
Dosis (CD3/CAR ^{pos} Zellen auf 70 kg ±20% zulässig) ²	n.z.	4,60×10 ⁸ (4,69×10 ⁶ /ml)	2,3×10 ⁹ (21,56×10 ⁶ /ml)	Kohorte 1: 7×10 ⁶ Zellen Kohorte 2: 7×10 ⁷ Zellen
Vector Copy Number (VCN) Endprodukt Tag 12	n.d.	n.d.	n.d.	<5 Kopien /transduzierte Zelle
Mikrobiologische Kontrolle	n.d.	entspricht ⁴	n.d.	kein Wachstum
Mycoplasmen-Kontrolle	n.d.	n.d.	n.d.	negativ
Endotoxin-Kontrolle	n.d.	n.d.	n.d.	negativ
Visuelle Kontrolle	entspricht	entspricht	entspricht	keine erkennbaren Aggregate, transparente/farblose Flüssigkeit, Primärverpackung intakt

n.z. - nicht zutreffend; n.d. – nicht durchgeführt; ¹ Vitalität der CD45^{pos} im Endprodukt (abweichend); ² Wie im Validierungsplan beschrieben erfolgt die individuelle Dosierung und Darreichungsform entsprechend den Standardverfahren des CTC und war nicht Gegenstand der Validierung. Um beurteilen zu können, ob die in den verschiedenen Kohorten vorgesehenen Dosierungen erreicht werden können, wurde hier die im Endprodukt erreichte Gesamtmenge der Zielzellen (lebende CD3/CAR^{pos}) im Endprodukt dokumentiert; ³ nur Etablierung der DNA-Isolierung; ⁴ nicht validierte Matrix.

Die Prozesse zur Etablierung des CD20CART Prozesses haben die Machbarkeit der geplanten Herstellung belegt. Die zuvor von Miltenyi Biotec festgelegten Akzeptanzkriterien wurden erfüllt.

TP2.2 Etablierung und Validierung der Qualitätskontrolle (QK)

Aufbau der flowzytometrischen Qualitätskontrolle zur Freigabe des Endproduktes

Es wurde ein standardisiertes Qualitätskontrollprogramm erstellt und validiert (gemäß den ICH-Richtlinien). Die Etablierung von zwei flowzytometrischen Mehrfarben-Analysen (Panel) erlaubt die Bestimmung der Vitalität, der zellulären Zusammensetzung (Panel A) und der Transduktionsrate (Panel B).

Mikrobiologische Qualitätskontrolle (aerobe und anaerobe Keime, Mycoplasmen, Endotoxin-Bestimmung)

Darüber hinaus wurden Sterilitäts- und Sicherheitsprüfungen sowie prozessinterne Kontrollen implementiert und validiert. Die endgültige, an die regulatorischen Anforderungen angepasste QC-Strategie wird für die klinische Studie verwendet.

Für die Prüfung aerober und anaerober Keime wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, MHH eine matrixspezifische Validierung der mikrobiologischen Untersuchung von Zellkulturproben mittels automatisierter Blutkulturdetektionssysteme zum Nachweis vermehrungsfähiger Mikroorganismen, nach Ph. Eur. 2.6.27 durchgeführt.

Die matrixspezifische Validierung und Prüfung der Abwesenheit von Mycoplasmen (PhEur 2.6.7) mittels Nukleinsäure-Amplifizierungstechnik (PhEur 2.6.21) wurde extern bei Minerva Analytix GmbH, Berlin in Auftrag gegeben.

Der Nachweis bakterieller Endotoxine entsprechend PhEur 2.6.7 wurde in-house nach matrixspezifischer Validierung durchgeführt.

Bestimmung der Vector Copy Number (VCN)

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal hinsichtlich der Sicherheit eines gentherapeutischen Arzneimittels ist die Bestimmung der Anzahl der Kopien des therapeutischen Vektors in den Zielzellen (*vector copy number/VCN*). Im Rahmen von AP2 sollte eine Methode zum Nachweis der VCN am Institut für Zelltherapeutika, MHH (CTC) etabliert, validiert und als Bestandteil der Qualitätskontrolle bei den am Standort hergestellten Zellpräparaten durchgeführt werden.

Für diesen Zweck wurde das Real-Time PCR Cyler Modell StepOne Plus System vor Ort durch die Firma Applied Biosystems qualifiziert (IQ/OQ).

Nach Abschluss dieser Etablierungsphase wurde seitens Miltenyi eine zentrale Durchführung der VCN-Bestimmung unter Verwendung der am Herstellzentrum isolierten DNA beschlossen.

Aufgrund dieser Entscheidung wurden nur die Methode zur Isolierung der DNA und zusätzlichen Kryokonservierung von Zellpellets validiert. Die isolierte DNA der Validierungsprozesse sowie der Herstellprozesse des IMP für die Studienpatienten wurden bei -80°C gelagert, versandt und zentral bei Miltenyi zur Bestimmung der VCN an Tag 12 verwendet. Die kryogelagerten Zellpellets dienen als Rückstellmuster.

Es konnte zuverlässig und in allen Fällen DNA zur Bestimmung der VCN isoliert werden. Die zusätzliche Kryokonservierung von Zellpellets als zusätzliche Rückstellmuster hat sich als sinnvoll erwiesen, da bei Problemen der VCN-Bestimmung jederzeit neue DNA isoliert werden kann.

TP2.3 Validierungsläufe und Herstellgenehmigung

Die Prozesse zur Etablierung des CD20CAR Prozesses haben die Machbarkeit und Eignung des geplanten Herstellungsverfahrens belegt. Die zuvor von Miltenyi Biotec festgelegten Akzeptanzkriterien wurden erfüllt.

Basierend auf den Erfahrungen und Ergebnissen der drei Etablierungsläufe mit CD4/CD8-selektionierten Ausgangszellen (siehe Tabelle 2) wurden 3 Validierungsprozesse durchgeführt (Chargenbezeichnungen: 170718LVF001, 170829LVF002, 171028LVF003). Für alle Prozesse wurde das Gerät CliniMACS® Prodigy S/N 258 und die Software 1.2.1/TCT Prozessversion V1.0 (*released*) verwendet. Trotz Beibehaltung/Konsistenz der technischen Bedingungen (Hard- und Software) traten ab dem zweiten Validierungslauf technische Probleme (Druckanstieg in der Kulturkammer des Prodigy und darauf austretende Flüssigkeitsaustritte) zum Ende des Prozesses auf. Die Herstellungsprozesse konnten mithilfe des technischen Supports von MB zu Ende geführt werden.

Zur Durchführung einer gründlichen Ursachenanalyse seitens Miltenyi wurden die Arbeiten am CTC von Anfang November 2017 bis Anfang März 2018 unterbrochen (nach 3. Validierungslauf). Die im Anschluss von Miltenyi vorgeschlagenen Maßnahmen zur Fehlerbehebung wurden in zwei weiteren Prozessen umgesetzt und die Validierung erfolgreich beendet. Bei den insgesamt 5 durchgeführten Validierungsprozessen wurden die Akzeptanzkriterien des Sponsors bzgl. des Endproduktes erfüllt (s. Tabelle 3)

Die Prozessentwicklung und Validierung wurde von dem staatlichen Gewerbeaufsichtsamt Hannover (sGAA) und dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) begleitet. Die Herstellungserlaubnis wurde erteilt.

Tabelle 3, Ergebnisse der Validierungsprozesse 2017-2018, Endprodukt (Tag 12) ohne patientenindividuelle Formulierung:

PROBEN	PARAMETER (Spezifikationen)				
	Zellgehalt (≥80% CD3/CD45pos Zellen)	Vitalität (≥80% der CD3/CD45pos Zellen)	Transduktion (≥10% CAR/ CD3pos Zellen)	Identität (CD20 CAR Detektionsreagent bindet an CD3pos Lebendzellen)	Dosis (>7 ×10 ⁶ CAR/ CD3pos Zellen ±20% zulässig) ¹
1	99,71	97,29	20,78	entspricht	1,36×10 ⁹ (14,23×10 ⁶ /ml)
2	99,72	98,01	23,51	entspricht	1,04×10 ⁹ (11,14×10 ⁶ /ml)
3	99,57	96,38	21,88	entspricht	1,67×10 ⁹ (16,72×10 ⁶ /ml)
4	99,70	96,39	44,46	entspricht	3,01×10 ⁹
5	99,55	97,23	22,32	entspricht	1,44×10 ⁹
PROBEN	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG (kein Keimwachstum am T10 und T12) ³	VCN (<5 Kopien/Zelle) ²	BET (<0,5 EU/ml) ³	MYKOPLASMEN (negativ am T10 und T12) ³	ERSCHEINUNG ⁴ (transparent/ farblos, keine Aggregate, Primärverpackung intakt)
1	n.d.	0,8	<0,5	entspricht	entspricht
2	n.d.	0,7	<0,5	entspricht	entspricht
3	entspricht ^{3, 5}	0,6	<0,5	entspricht	entspricht
4	entspricht ^{3, 5}	1,0	<0,5	entspricht	entspricht
5	entspricht ⁵	0,6	<0,5	entspricht	entspricht

n.z. - nicht zutreffend; n.d. – nicht durchgeführt;

¹ Wie im Validierungsplan beschrieben erfolgt die individuelle Formulierung entsprechend den Standardverfahren des CTC und war nicht Gegenstand der Validierung. Um beurteilen zu können, ob die in den verschiedenen Kohorten vorgesehenen Dosierungen erreicht werden können, wurde hier die im Endprodukt erreichte Gesamtmenge der Zielzellen (lebende CAR/CD3pos Zellen) im Endprodukt dokumentiert. Hier wurde die Dosis für einen Patienten mit 70 kg Körpergewicht der Kohorte 1 angenommen;

² VCN von MB durchgeführt, am CTC wurde lediglich die DNA-Isolierung vorgenommen;

³ im Rahmen der entsprechenden Methodenvalidierung erhoben;

⁴ s. Kommentar im Pkt. 9 Diskussion

⁵ nach 14-tägiger Bebrütung.

Das Arbeitspaket 2 zur Prozessvalidierung und Herstellgenehmigung konnte somit erfolgreich abgeschlossen werden.

AP3 (Klinische Studie)

Die klinische Studie M-2015-307, Kurztitel MB-CART20.1 Melanoma, wurde aufgesetzt, um die Anwendbarkeit, Sicherheit und Toxizität von adoptiver Zelltherapie mit autologen CD20CAR transduzierten T-Zellen (MB-CART20.1) in 15 Melanompatienten mit progressivem Krankheitsverlauf (Stage III oder IV) nach Standardtherapie zu untersuchen. Es wurde hier ein klassisches 3 + 3 Schema zur Dosisescalation verwendet. Weitere Studienziele waren der vorläufige Nachweis eines Ansprechens auf die Behandlung, die Bewertung der B-Zell Aplasie sowie die in-vivo Persistenz der infundierten MB-CART20.1 Zellen. Zusätzlich sollten anhand von Biopsien das Vorhandensein und der Phänotyp von MB-CART20.1 und von B-Zellen sowie die Anzahl an CD20 positiven Tumorzellen analysiert werden.

Der Verlauf der Vorbereitungen sowie der Ablauf der klinischen Studie nach der Erstgenehmigung des PEI und der zustimmenden Bewertung durch die EK wird im Folgenden tabellarisch aufgeführt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4, Zusammenfassung des Ablaufs der klinischen Studie

	<u>Ereignisse</u>	<u>Amendments</u>
2016	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Studienprotokoll</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Weiterentwicklung und Detaillierung des Studienprotokolls nach vorhergehenden Diskussionen intern, mit den Klinikern, dem Statistiker und dem PEI ➤ <u>Sonstiges</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Durchführung eines Scientific Advice Meetings mit dem PEI zum Thema Studienprotokoll und Durchführung der klinischen Studie im Dezember 2015 ○ Durchführung eines Scientific Advice Meetings mit dem PEI zum Thema Herstellung und Qualitätskontrolle der CD20 CAR T-Zellen im November 2016 	=
2017	<ul style="list-style-type: none"> <u>Studienprotokoll</u> ➤ Finalisierung des klinischen Prüfplans und aller notwendigen Unterlagen ➤ Planungsgemäße Einreichung aller notwendigen Dokumente bei der Ethikkommission und dem PEI zur Erlangung einer Genehmigung zur Durchführung der klinischen Studie in Q4/2017. 	➤ <u>Einreichung CTP V. 1.0 in 2017</u> <u>Genehmigung unter Auflagen</u>

Gesamtschlussbericht Fkz 01EK1507A-C

Verbund „CD20 CAR-TIME“

2018	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Die Unterlagen zur klinischen Prüfung wurden in geänderter Version den Behörden und der EK vorgelegt. Die Genehmigung zur Durchführung der klinischen Studie wurde erteilt. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Einreichung CTP v.2.0 bis 4.0 und Genehmigung PEI und zustimmende Bewertung EK in 2018
2019	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Die Unterlagen zur klinischen Prüfung wurden in geänderter Version den Behörden und der EK vorgelegt. Die Genehmigung zur Durchführung der klinischen Studie wurde erteilt. ➤ Studienstart mit Einschluss des ersten Patienten im März 2019. Erste Dosis Kohorte (Dose level: 1 x 10⁵ MB-CART20.1 per kg bw) mit 3 Patienten durchgeführt. Behandlung des 3. Patienten mit MB-CART20.1 am 13.Aug.2019. ➤ Der Safety Bericht für die Kohorte 1 wurde dem Safety Monitoring Board (SMB) im Oktober 2019 vorgelegt. Das SMB sprach die Empfehlung aus, mit der 2. Dosisstufe mit 1 x 10⁶ MB-CART20.1 per kg bw fortzufahren. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Start der Studie mit CTP V.5.0 und Amendment 3.0 im März 2019 ➤ CTP V.6.0 / Amendment 4.0 ➤ CTP V.7.0 und Amendment 5.0
2020	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Kein Einschluss von Patienten aufgrund von Rekrutierungsproblemen und der Corona Pandemie 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Amendment 6.0 CTP 8.0 in Apr.2020 ➤ Die Ausgründung der Miltenyi Biomedicine GmbH als Tochterfirma der Miltenyi Biotec musste im gesamten CTP berücksichtigt werden. ➤ CTP v. 9.0 und Amendment 7.0 ➤ Apr. 2020 ➤ Ein Ausschlusskriterium musste korrigiert werden
2021	<ul style="list-style-type: none"> ➤ LMU München wurde als zweites Zentrum unter Vertrag genommen und initiiert. ➤ Rekrutierung und Einschluss von 5 Patienten in die zweite Dosisstufe mit 1 x 10⁶ MB-CART20.1 per kg bw, davon wurden 2 Patienten mit einem OoS (Out of Specification) Produkt behandelt, ein anderer Patient verstarb am Tag 21 nach Behandlung und erreichte den Tag 28 nicht (Beurteilung der DLT von Tag 0 bis Tag 28 laut Prüfplan erforderlich). Er wird durch einen weiteren Patienten ersetzt. Insgesamt gab es 3 vollständig auswertbare Patienten in der zweiten Dosisstufe. 	-
2022	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Der Safety Bericht für die Kohorte 2 wurde dem Safety Monitoring Board (SMB) im Juni 2022 vorgelegt. Das SMB sprach zu diesem Zeitpunkt die Empfehlung aus, 3 weitere Patienten in die Kohorte 2 aufzunehmen und die aufgetretenen Toxizitäten besonders im Hinblick auf die Neurotoxizität erneut zu prüfen. ➤ Aufgrund einer hohen Häufigkeit von mit der Behandlung zusammenhängenden schweren unerwünschten Wirkungen und einer fehlenden Evidenz einer klinischen Aktivität bei den bisher behandelten Patienten, wurde nach mehreren Diskussionen mit Prüfer, Sponsor und DSMB und in einer weiteren geschlossenen Sitzung des DSMB im Dezember 2022 von diesem empfohlen, die klinische Prüfung zu stoppen. 	-
2023	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Januar 2023: der letzte Patient hatte seine letzte Visite. ➤ Vorbereitungen für den klinischen Bericht (Datenbank bereinigt und geschlossen) ➤ Vorlage des finalen klinischen Berichts beim PEI und der Ethikkommission (13.Dec.2023) 	-

Insgesamt wurden neun Patienten an zwei Prüfzentren in die Studie eingeschlossen. Drei Patienten erhielten die erste Dosis von 1×10^5 MB-CART20.1 pro kg Körpergewicht (Dosisstufe 1) und vier Patienten wurde eine Dosis von 1×10^6 MB-CART20.1 pro kg Körpergewicht (Dosisstufe 2) verabreicht. Weiterhin wurden zwei Patienten der Dosisstufe 2 mit einem Produkt außerhalb der Spezifikation (Out of Specification) behandelt und konnten deshalb nicht in die Sicherheitsanalyse der Studie eingeschlossen werden. Ein Patient wurde erneut gescreent und erhielt eine neue Patientenummer. Da für diesen Patienten nur Daten bis zum Tag 14 vorlagen, war er für die Bewertung der Dosisbegrenzende Toxizität (DLT, Dose Limiting Toxicity) nicht ausreichend auswertbar. Es wurde daher ein vierter Patient in die Dosisstufe 2 eingeschlossen.

Somit besteht die Population der Sicherheitsanalyse aus drei Patienten der Dosisstufe 1 und vier Patienten der Dosisstufe 2. Diese Patienten wurden auch in die pharmakokinetische Analyse aufgenommen.

AP4 (Begleitforschung)

Ziel von AP4 war die Untersuchung des *in vivo* Verhaltens von CD20-CAR-transduzierten T-Zellen zum einen in Mausmodellen und darüber hinaus auch im Patienten, um die therapeutischen Effekte besser zu verstehen und weiter zu optimieren. Dazu wurden geeignete standardisierte Monitoring-Assays entwickelt und anschließend sowohl Proben aus der Maus als auch aus Patienten eingehend analysiert. Die Assays wurden genutzt, um neue Erkenntnisse über die biologischen Eigenschaften von CAR T-Zellen, ihre Kinetik, Pharmakologie sowie die *in vivo* Immunreaktion zu gewinnen.

Teilprojekt Miltenyi Biotec

Etablierung von Monitoring-Assays

Es wurden neue standardisierte Assays entwickelt und evaluiert, um CAR T-Zellen im Blut und in Gewebebiopsien zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen (Durchflusszytometrie, quantitative PCR, Immunfluoreszenz-Mikroskopie) sowie Assays zur Bestimmung der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von CAR T-Zellen (Zelldifferenzierung, Expression von Aktivierungsmarkern, Zytokinproduktion und Zytotoxizität). Weiterhin wurden Assays zur Untersuchung der Anti-CAR Immunantwort (humorale und T-Zellvermittelte Reaktionen) entwickelt. Im Rahmen der Qualitätskontrolle und des Immunmonitorings wurde ein umfassendes Teilprojekt zur Entwicklung und Testung von Färbepanels für die durchflusszytometrische Analyse der CD20 CAR T-Zellen initiiert.

Entwicklung von Assays für die Qualitätskontrolle und das Immunmonitoring

Zunächst wurde ein Färbepanel entwickelt und validiert, das speziell zur Bestimmung der Persistenz von CD20 CAR T-Zellen im Rahmen des Immunmonitorings dient. Ergänzend dazu wurden drei weitere Färbepanels entwickelt und getestet, die zur Analyse von B-Lymphozyten sowohl in der Qualitätskontrolle als auch im Immunmonitoring eingesetzt werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Arbeiten war die Erstellung von Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für alle Färbepanels, um eine standardisierte und reproduzierbare Anwendung sicherzustellen. Zur Optimierung der durchflusszytometrischen Analysen wurden sogenannte „Express Modes“ programmiert, die eine automatisierte Messung und Auswertung der Daten mit dem MACSQuant Durchflusszytometer ermöglichen. Diese Färbepanels wurden dann für die

Qualitätskontrolle an die Herstellzentren für CAR T-Zellen transferiert und für das Immunmonitoring an das zentrale Messlabor in Mannheim übergeben.

Im zentralen Messlabor in Mannheim wurden kontinuierlich durchflusszytometrische Persistenz- und Begleitforschungsanalysen an frischem EDTA-Blut durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden regelmäßig vom Immunmonitoring-Team bei Miltenyi Biotec überprüft, insbesondere bei den Visiten der ersten Patienten.

Für die Analyse der im zentralen Messlabor generierten Daten wurden bioinformatische Algorithmen entwickelt. Diese Algorithmen dienen der Analyse von Begleitforschungspanels hinsichtlich der „proliferative ability (proliferativen Fähigkeit)“, „exhaustion (Erschöpfung)“ und „Aktivierung“. Zudem wurde mit der Entwicklung von Algorithmen für die Panels zur „B-Zell-Differenzierung“ und „T-Zell-Differenzierung“ begonnen. Skripte zur Datenanalyse in Bezug auf die Pharmakokinetik („Noncompartmental Analysis“) wurden ebenfalls erstellt und die verfügbaren Daten an das Translational Research and Immune Monitoring (TRIM) Team der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG transferiert.

Ein weiterer Fokus lag auf dem Training der klinischen Zentren zur Aufarbeitung und Lagerung der Proben für das erweiterte Immunmonitoring. Bei Miltenyi Biotec wurde ein System zur Probenannahme, -lagerung und -dokumentation etabliert, unterstützt durch die Implementierung einer professionellen Probenmanagementsoftware („FreezerPro“). Die Probenmanagementprozesse wurden in einer SOP dokumentiert, wodurch nun ein professionelles Probenmanagement für klinische Studien sichergestellt werden kann.

Die Daten der Begleitforschung wurden nach Beginn der klinischen Studie im monatlichen Rhythmus durch das Data Governance Board für jeden einzelnen Patienten ausgewertet. Für SMB Meetings erfolgte jeweils eine globale Auswertung der Daten aller eingeschlossenen Patienten inklusive Pharmakokinetik-Parameter.

Etablierung und Durchführung einer qPCR-Methode für die molekularbiologische Analyse von CD20 CAR T-Zellen

Im Rahmen der molekularbiologischen Forschung wurde eine qPCR-Methode zur Bestimmung der „Vector Copy Number“ (VCN) von CD20 CAR T-Zellen entwickelt und etabliert. Diese Methode sollte den präzisen Nachweis und die Quantifizierung der Vektor-Kopienzahl in den Zellen ermöglichen und wurde anschließend zur Finalisierung der Entwicklung und Durchführung der Tests in ein externes, qualifiziertes Labor transferiert. Diese Entwicklungs- und Optimierungsmaßnahmen sollten sicherstellen, dass die qPCR-Methode sowohl in ihrer Präzision als auch in ihrer Anwendungsbreite den hohen Anforderungen für klinische Studien gerecht wird und zuverlässige Ergebnisse für die Qualitätskontrolle und das Immunmonitoring von CD20 CAR T-Zellen liefert.

In einer initialen Machbarkeitsstudie wurde vorhandenes Patientenmaterial mit der neu entwickelten qPCR-Methode untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden anschließend mit den durchflusszytometrischen Daten verglichen (s. Abb. 3), wobei sich die Resultate als vielversprechend erwiesen. Dennoch wurden Optimierungspotenziale identifiziert, insbesondere hinsichtlich der Spezifität der Primer, der Einflussfaktoren der Matrize, der Robustheit und der Grenzen der Methode.

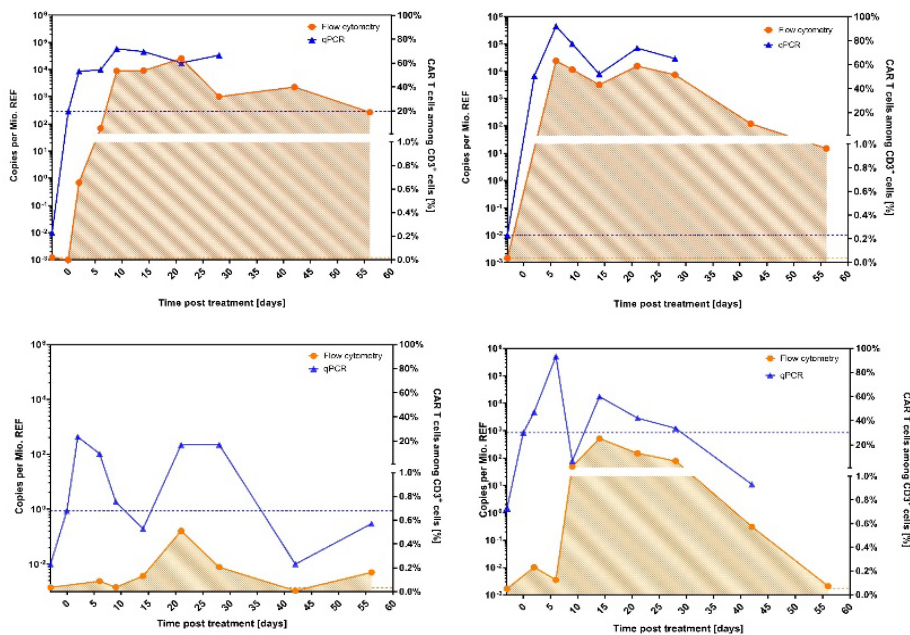


Abb. 3: Correlation of the qPCR and Flow Cytometry data (4 cases)

Zur Unterstützung der Weiterentwicklung und Optimierung der qPCR-Methode sowie zur durchflusszytometrischen Persistenz-Bestimmung wurden Kontrollmaterialien generiert. Hierbei handelte es sich um CAR-transduzierte Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Transduktionsniveaus (low/medium Level), die als Standardmaterial für die Methodenanpassung dienten. Zusätzlich wurden Jurkat-Zellen mit hohen und ultra-hohen Transduktionsniveaus hergestellt, um den gesamten Bereich der Methode abzudecken – von 0 % bis nahezu 100 % CAR-transduzierten Zellen unter den CD3-positiven T-Zellen.

Entwicklung und Durchführung von Assays zur Bestimmung der humoralen anti-CAR Antwort in Patienten

Im Rahmen der Forschungsarbeiten zur Bestimmung der humoralen anti-CAR Antwort in Patienten wurde ein zellulärer Immunogenizitätsassay entwickelt. Hierbei wurden sowohl ein anti-Interferon-gamma ELISPOT als auch eine vergleichbare durchflusszytometrische Methode evaluiert. Es stellte sich heraus, dass der anti-Interferon-gamma ELISPOT sensitiver war und weniger zelluläres Material benötigte, was besonders bei der Verwendung eingefrorener PBMC-Proben (periphere mononukleäre Blutzellen) von Vorteil war.

Ein externes Labor wurde identifiziert und als qualifizierter Service Provider für Miltenyi ausgewählt. Ein Master Service Agreement wurde unterzeichnet, um die dortige Probenanalyse zu ermöglichen. Daraufhin wurden erste gemeinsame Assay-Entwicklungsprozesse für die CAR T-Zell-Studien von Miltenyi initiiert, welche nicht spezifisch für die MB-CART20.1 Melanoma-Studie waren, jedoch die Grundlage für entsprechende Analysen im Rahmen dieser Studie hätten darstellen können. Die Assay-Entwicklung verzögerte sich jedoch erheblich, da die initialen Analysestrategien nicht erfolgreich

waren. Dies führte dazu, dass Miltenyi Biotec mehrfach Proteine nachproduzieren und bereitstellen musste, um die Entwicklung voranzutreiben.

Daher wurde schließlich entschieden, dass der anti-Interferon-gamma ELISPOT in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung (R&D) von Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG durchgeführt werden soll. Diese Entscheidung wurde getroffen, um die Kontrolle über den Assay-Prozess zu behalten und die Entwicklung effizienter zu gestalten.

Analyse verschiedener Zytokine im Rahmen der Begleitforschung

Im Rahmen der Begleitforschung wurden verschiedene Zytokine in eingefrorenen Serumproben analysiert. Hierfür wurde ein externes Labor identifiziert und als qualifizierter Service Provider für Miltenyi ausgewählt. Ein Master Service Agreement, das die Probenanalyse in diesem Labor ermöglichte, wurde unterzeichnet. Im zweiten Quartal 2023 wurden die Serumproben vom TRIM-Team an das entsprechende Labor geschickt. Die dort gewonnenen Daten wurden anschließend vom TRIM-Team analysiert, um sie als Pharmakodynamik-Parameter zu nutzen. Diese Analysen sind entscheidend für das Verständnis der Zytokinprofile und deren Bedeutung im Kontext der klinischen Studie.

Entwicklung und Optimierung der MACSima Analytik

Im Rahmen der fortlaufenden und anhaltenden Entwicklung und Optimierung der MACSima-Analytik wurde der fluoreszenzmikroskopische Nachweis verschiedener Marker auf unterschiedlichen Materialien, wie Biopsien oder fixierten Blutzellen, weiterentwickelt. Ein Panel zur mikroskopischen Unterscheidung von T-Zellen, einschließlich CAR T-Zellen, B-Zellen und malignen Zellen, wurde erfolgreich abgeschlossen.

Im Detail wurde die Unterscheidung von CAR T-Zellen und CD3+ T-Zellen auf Schnittpräparaten etabliert. Ebenso wurde die Unterscheidung von CD19+ B-Zellen und CD3+ T-Zellen auf Schnittpräparaten entwickelt und umgesetzt, s. Abb. 4. Parallel dazu wurde die Sammlung von Tumorbiopsien abgeschlossen, um eine umfassende Datenbasis für die Analysen zu schaffen.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Biopsien und fixierten Blutzellen wurden vollständig durchgeführt. Die Auswertung dieser Aufnahmen erfolgte mit der Unterstützung von Pathologin T. Wantenaar, um sicherzustellen, dass die Interpretation der Daten präzise und wissenschaftlich fundiert ist. Diese Entwicklungen und Optimierungen waren entscheidend, um die Leistungsfähigkeit der MACSima-Analytik weiter zu verbessern und deren Anwendung in der klinischen Forschung zu erweitern.

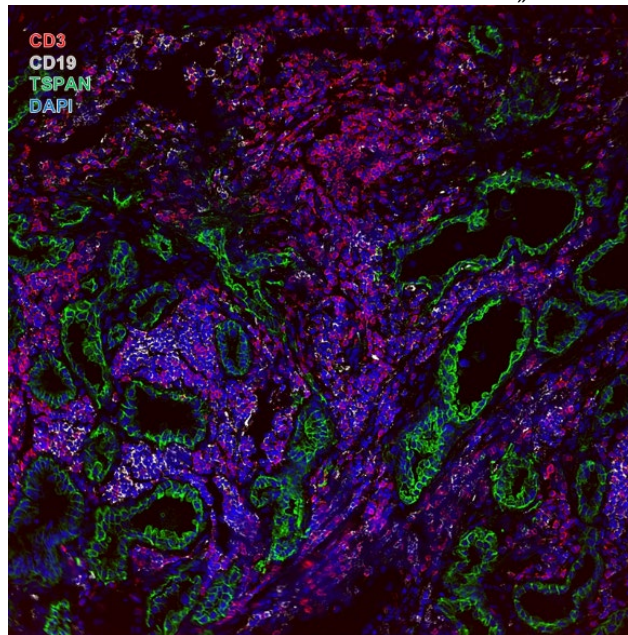


Abb. 4: Example for MICS analysis on tumor sections: surface markers (CD3+ T cells, CD19+ B cells), intracellular markers (DAPI), subcellular localization (TSPAN)

Teilprojekt UKK/UKR

Das Arbeitspaket zur Begleitforschung an der Universitätsklinik Köln, und später am Leibniz-Institut für Immuntherapie (LIT) des Universitätsklinikums Regensburg, untersuchte die funktionelle Kapazität von CD20 CAR T-Zellen aus der Produktion für die Studie, um die CAR vermittelte Aktivierung der Patienten-T-Zellen zu beschreiben. Des Weiteren wurden die Voraussetzungen zu einer produktiven CAR T-Zell Aktivierung auf der Seite der Melanom-Zelle untersucht, um die initialen Prozesse auf der Ebene der Zellmembran besser zu verstehen.

(1) Funktionale Kapazität der CD20 CAR T-Zellen aus zwei dezentralen Produktionsstätten

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde eine dezentrale CAR T-Zell Produktion mit zwei Produktionsstellen (Miltenyi Biotec, MHH) gewählt. UKK/UKR bearbeitete die zentrale Frage, wie sich die Zellprodukte aus den zwei Produktionsorten hinsichtlich ihrer funktionalen Kapazität darstellen. Die Frage ist relevant, um die Validität einer dezentralen CAR T-Zell Produktion im Rahmen einer klinischen Studie zu definieren.

Alle T-Zellprodukte konnten Dosis-abhängig durch TCR/CD28 Stimulation zur IFN- γ Freisetzung aktiviert werden, was die grundsätzliche Aktivierbarkeit der T-Zellen anzeigt. Es zeigten sich erwartungsgemäß inter-individuelle Unterschiede im quantitativen, aber nicht qualitativen Ausmaß der T-Zell Aktivierung. Tumorzellen mit hoher und niedriger CD20 Expression (CD20^{high} Jeko bzw CD20^{low} Nalm6) induzierten CD20 CAR T-Zellen zu einer CAR-vermittelten, Antigen-abhängigen Zytokin-Freisetzung abhängig von dem CD20 Expressionsniveau.

Bindung an CD20+ Zellen induzierte weiterhin eine Amplifikation der CD20 CAR T-Zellen, wobei die Amplifikation nach Kontakt mit CD20^{high} Jeko Zellen höher war als nach Kontakt mit CD20^{low} Nalm6 Zellen. Weiterhin wurde in allen untersuchten CAR T-Zell Produkten eine zytolytische Antwort

induziert, angezeigt durch erhöhtes CD107a als Marker für lytische Degranulation. Auch hier induzierten CD20high Jeko cells eine stärkere lytische Degranulation als CD20low Nalm6 Zellen.

Im Tumorgewebe wird eine repetitive Exposition mit Antigen erwartet. Deswegen wurde die CD20 CAR T-Zell Aktivierung unter *in vitro* Bedingungen repetitiver Antigen Stimulation (“stress test”) nach 4 Runden Exposition mit CD20high Jeko und CD20low Nalm6 Zellen untersucht. Interessanterweise wurden CD20high Jeko Zellen unvermindert in allen Runden eliminiert; CD20low Nalm6 Zellen wurden nur initial, in späteren Runden jedoch nur unvollständig eliminiert, was eine nachlassende Re-Aktivierbarkeit der CD20 CAR T-Zellen unter Bedingungen geringer CD20 Antigen Menge anzeigt. Korrespondierend nahm die Anzahl der CAR T-Zellen in späteren Runden ab, während die CAR T-Zellen initial eine starke Amplifikationskapazität zeigten.

Zusammenfassend zeigten die CAR T-Zell Produkte, abgesehen von inter-individuellen Unterschieden, gleichermaßen funktionale Kapazität hinsichtlich Zytokin-Freisetzung, Amplifikation, lytische Degranulierung und Eliminierung der Zielzellen. Die Zellprodukte von beiden Produktionspartnern sind gleichermaßen funktional. (Aleksandrova et al., *Frontiers Immunol.* 2024, 15, 1328368 (2024). doi: 10.3389/fimmu.2024.1328368)

(2) Voraussetzungen für eine produktive CAR T-Zell Aktivierung: biophysikalische Eigenschaften der Zielstruktur auf Melanom-Zellen

Die Bindung der CAR scFv Bindedomäne an das Antigen ist der initiale Schritt für eine CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung. Die Aktivierungsstärke wird durch die Bindungsaffinität sowie die Position des erkannten Epitopes auf dem Zielantigen relativ zur Membran beeinflusst und kann durch das CAR-Design variiert werden. Dagegen ist der Einfluss der zellulären Avidität als Ergebnis multipler Rezeptor-Ligand Interaktionen sowie der Mobilität des Zielantigens auf der Zelloberfläche derzeit weniger verstanden.

Um die initialen Prozesse der CAR T-Zell Aktivierung durch Melanom-Zellen besser zu verstehen, wurde der Einfluss der Membran-Topologie am Beispiel zweier „Extrem“-Antigene beim Melanom untersucht: High molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA), auch als MCSP bekannt sowie Melanotransferrin (p97). HMW-MAA bildet große Cluster im lipid raft und zeigte eine geringe spontane Mobilität auf der Zellmembran, während p97 eine hohe Membran-Mobilität aufwies. UKK/LIT entwickelte entsprechende CARs, die HMW-MAA bzw. p97 mit ähnlicher Affinität binden. Die Erkennung des HMW-MAA durch CAR T-Zellen führte zu einer weniger effizienten Synapsenbildung und anschließenden T-Zell Aktivierung als die Bindung an das mobile p97 Antigen auf derselben Melanom-Zelle. Eine Veränderung der Diffusions-Mobilität des Zielantigens führte zu einer veränderten CAR T-Zell Aktivierung, Signalaktivierung und Auslösung von Effektorfunktionen nach Bindung. Durch diese Arbeiten zeigten wir, dass die Membran-Mobilität des Zielantigens und die Zuordnung in einem lipid raft, neben den bekannten Einflussgrößen, wesentlich die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung und letztlich die therapeutische Effizienz beeinflusst.

(3) CD20 CAR T-Zellen haben ein hohes tonisches Signal verbunden mit Exhaustion.

Im Vergleich zu dem CD19 CAR des gleichen Designs hat der CD20 CAR ein höheres Expressionsniveau auf der CAR T-Zelle, obwohl beide CARs von dem gleichen Vektor mit dergleichen Expressionskassette exprimiert werden. Im Vergleich dazu liegt der bispezifische CD20-CD19 CAR auf dem Expressionsniveau des CD19 CAR. Offensichtlich ist die erhöhte Expression eine intrinsische Eigenschaft des CARs und sehr wahrscheinlich vermittelt durch die CD20 scFv Domäne. Deswegen untersuchte UKK/UKR, ob bei CD20 CAR T-Zellen Marker erhöht sind, die mit einem dysfunktionalen

Status („exhaustion“) verbunden sind. Tatsächlich geht das hohe CD20 CAR Expressionsniveau mit erhöhter PD-1 Expression einher, was auch für CD20-CD19 CAR T-Zellen beobachtet wurde. Zum Vergleich ist die Induktion der PD-1 Expression bei CD19 CAR T-Zellen weitaus geringer als bei CD20 CAR T-Zellen. Je höher die CD20 CAR Expression auf T-Zellen, so höher ist auch die PD-1 Expression (Abb. 12). Obwohl kein kausaler Beweis, so scheint das erhöhte Expressionsniveau des CD20 CAR mit einer erhöhten Exhaustion einherzugehen. Die Schlussfolgerung deckt sich mit der Beobachtung einer frühzeitigen Reduktion lytischer Kapazität bei repetitiver Stimulation mit Zielzellen geringer CD20 Expression (Abb. 5).

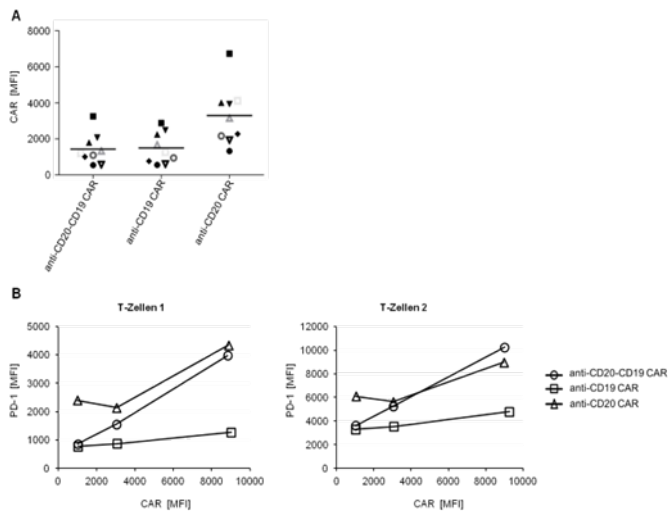


Abb. 5: T cells were engineered with the respective CAR using the same retroviral vector backbone and recorded for CAR expression by flow cytometry using an anti-IgG1 antibody directed towards the common extracellular spacer domain. The mean fluorescence intensity (MFI) indicating the level of CAR expression on surface was plotted for two T cell donors (A). Upon culture in vitro, CAR T cells expressed PD-1 dependent on the level of CAR expression (B). Note that CD19 CAR T cells expressed substantially lower PD-1 levels than CD20 CAR or CD20-CD19 CAR T cells despite the same CAR level.

Das Arbeitspaket 4 konnte damit erfolgreich abgeschlossen werden.

AP5 (Projektmanagement)

Die wichtigsten Aktivitäten sind im Folgenden zusammengefasst:

- Koordination Konsortialvertrag und VAV, Anpassung des Konsortialvertrags aufgrund des Projektleiterwechsels (Prof. Hinrich Abken von Köln nach Regensburg)
- Koordination der Zusammenarbeit zwischen Projektverbund und Projektträger, Absprache und Beantragung von Laufzeitverlängerungen
- Ausfertigung von Gesamt-Zwischenberichten im Namen des Konsortiums für den Projektträger
- Organisation von jährlichen Verbundmeetings sowie Scientific Advisory Board Meetings mit Prof. Carl June, Prof. Ulrich Kalinke, Prof. Waseem Qasim in den Jahren 2016 und 2017.
- Design einer Website für das Projekt : www.CD20-CAR-TIME.de
- Unterstützung von Publikationen des Konsortiums (siehe Pkt.6)

2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Verbundpartner Miltenyi Biotec

	Vorkalkulation (€)	Nachkalkulation (€)
Material	141.290,98	139.870,67
Personalkosten	1.944.632,62	1.941.710,03
Reisekosten	6.506,76	2.889,99
Sonstige unm. Vorh.kosten	1.279.575,00	1.736.712,78
Kosten innerbetr. Leistungen	85.593,64	340.964,85
Summe	3.457.599,00	4.162.148,32

Die nachkalkulatorischen Kosten des Projektes haben sich beim Verbundpartner Miltenyi Biotec gegenüber der Vorkalkulation deutlich erhöht, was hauptsächlich durch Mehrausgaben im Bereich der sonstigen unmittelbaren Vorhabenkosten verursacht wurde. Die beschriebenen Verzögerungen und Schwierigkeiten im Projektverlauf haben das geplante Kostengerüst stark belastet. Die zusätzlich erforderlichen Arbeiten in AP1 „Präklinische Forschung“ für die Erlangung der Studienzulassung machten zusätzliche Personalausgaben und eine Umwidmung von Mitteln nötig. In der Kostenposition „sonstige unmittelbare Vorhabenkosten“ wurden die Kosten für die klinische Studie abgerechnet. Darunter die Kosten für Patientenversicherung und Behandlungskosten, das Studienmanagement, das Studien-Monitoring, das Datenmanagement, die Biometrie, die Pharmakovigilanz und Gebühren für Amendments und Beratungsleistungen. Die über das geplante Budget hinausgehenden Kosten konnten aus Eigenmitteln gedeckt werden.

Verbundpartner MHH

Position	Finanzplan (€)	Verausgabte Mittel (€)
0812 Beschäftigte E12-15	455.153,60	446.776,21
0817 Beschäftigte E1-11	200.791,09	200.791,81
0831 Gegenstände <410€	325,20	0,00
0835 Vergabe von Aufträgen	34.365,35	25.951,23
0843 Sonstige allg. Verwaltungsausgaben	165.109,64	152.995,13
0846 Dienstreisen	2.340,73	2.575,28
0850 Gegenstände/Investitionen > 410€	155.978,39	156.367,57
Summe	1.014.064,00	985.457,23

Beim Verbundpartner MHH wurde der Personaleinsatz dem Projektverlauf angepasst, so dass die durch unvorhersehbare Verzögerungen verursachte längere Projektlaufzeit kostenneutral umgesetzt werden konnte. Da ein Teil der - den gesetzlichen Vorgaben entsprechenden - Qualitätskontrolle in-house durchgeführt werden musste, wurden bei der Vergabe von Aufträgen (Position 0835) Mittel eingespart.

Verbundpartner UKK/UKR

	Gesamt-finanzierungsplan (€)	Entstandene Ausgaben (€)
Personalkosten	586.500,00	590.418,32
Reisekosten	5.000,00	87,00
Verbrauchsmittel	128.000,00	129.014,53
Summe	719.500,00	719.519,85

Im Teilprojekt des Verbundpartners UKK/UKR konnte die geplante Finanzierung des Projektes weitestgehend eingehalten werden. Leichte Abweichungen ergaben sich durch erhöhte Ausgaben der Personalmittel aufgrund von Tarifsteigerungen, die durch verminderte Ausgaben für Reisetätigkeiten insbesondere während der Corona-Pandemie ausgeglichen werden konnten.

3. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Mit der Richtlinie zur Förderung von „Innovationen für die individualisierte Medizin“ hat das BMBF das Bundesinteresse beschrieben, indikationsbezogene therapeutische und präventive Ansätze mit Modellcharakter für die individualisierte Medizin zu fördern (Modul „Therapie – Präklinik und klinische Studien der Phasen I und II“). Der hier verfolgte Ansatz betrifft eine innovative individualisierte Immuntherapie mit genetisch modifizierten T-Zellen für Krebserkrankungen und liegt damit im zentralen Fokus des formulierten Bundesinteresses. Ziel des Projekts war die Untersuchung der Wirksamkeit der CAR T-Zelltherapie gegen solide Tumoren, für die es keine Behandlungsalternativen mehr gibt. Die frühe klinische Studie besaß einen sehr hohen Forschungs- und Neuheitscharakter und damit ein hohes wissenschaftliches Risiko, da eine solche auf Patienten-spezifischen CD20 CAR T-Zellen basierende Studie bislang weltweit noch nicht umgesetzt wurde.

Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit im hier berichteten Projekt ist durch die Erreichung der gesetzten Ziele und die erzielten Ergebnisse klar belegt. Die durchgeführten Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten haben maßgeblich zur Erweiterung des Wissensstandes und

zur Innovation im Bereich der Translation von CAR T-Zelltherapien in die Klinik beigetragen. Die erfolgreiche Umsetzung des Projekts unterstreicht die Relevanz und Effektivität der eingesetzten Methoden und Ressourcen, was die initiale Förderungsentscheidung als fundiert und zielgerichtet bestätigt.

4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Geschäftsfeldentwicklung:

Hauptgeschäftsfeld von Miltenyi Biotec ist der globale Forschungsmarkt, auf dem sich das Unternehmen in den letzten 35 Jahren mit der MACS-Technologie etabliert hat. Allerdings wächst der Firmenumsatz mit Produkten für klinische Anwendungen derzeit am stärksten mit 25% pro Jahr (durchschnittliches Firmenwachstum 10%) und klinische Produkte machen insgesamt bereits mehr als die Hälfte des Umsatzes aus. Daher zielt die langfristige Unternehmensstrategie darauf ab, vielversprechende erfolgreiche Forschungsprodukte in die klinische Anwendung zu transferieren, um dort neue Geschäftsfelder zu erschließen und sich so am Markt breiter aufzustellen. Derzeit befindet sich das Unternehmen an der Schwelle der Entwicklung zu einem Provider für individualisierte Therapieverfahren. Mit CD20CAR-TIME sollte diese Schwelle überschritten und langfristig ein noch deutlicheres Wachstum im klinischen Markt erreicht werden.

Auf dem Weltmarkt beobachtet man zur Zeit eine enorme Dynamik bei der Entwicklung und Anwendung von CAR T-Zelltherapien, und es werden mittlerweile Milliardenbeträge in die Marktzulassung investiert⁸. Außerdem engagieren sich vermehrt Pharma-Unternehmen wie Novartis, Roche, GlaxoSmithKline oder Pfizer in diesem Marktsegment. Viele Akteure in diesem Bereich arbeiten bereits mit Miltenyi zusammen, da die Firma mit dem CliniMACS Prodigy® der einzige Anbieter auf dem Weltmarkt ist, der ein System zur GMP-konformen Herstellung von genetisch-modifizierten T-Zellen in einem automatisierten geschlossenen System entwickelt hat. Entsprechend hat Miltenyi hier ein Alleinstellungsmerkmal (USP, **Unique Selling Proposition**).

Miltenyi will sich allerdings nicht auf die Rolle als Zulieferer von Technologien beschränken sondern eigene Zelltherapeutika entwickeln. Deshalb initiiert die eigens zu diesem Zweck gegründete Tochterfirma **Miltenyi Biomedicine GmbH** als Sponsor vermehrt eigene klinische Studien wie z.B. die hier beschriebene MB-CART20.1, die langfristig einen wichtigen Beitrag zum Unternehmenserfolg leisten sollen. Da diese Projekte aber sehr teuer und zudem hochriskant sind, war die BMBF-Förderung ein wichtiger Baustein für Miltenyi zur Umsetzung innovativer Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten.

Obwohl die eigentliche klinische Studie die Wirksamkeit von CD20 CAR T-Zellen bei der Behandlung von Melanom-Patienten nicht nachweisen konnte, hatte das Projekt dennoch eine enorm positive Auswirkung auf die wissenschaftliche und ökonomische Entwicklung von Miltenyi Biotec sowie allgemein auf das Feld der Zell- und Gentherapie in Deutschland.

Ein wesentlicher Erfolg des Projekts war seine Rolle als **Tür-Öffner**. So markierte es die erste klinische CAR T-Studie für Miltenyi Biotec und die erste Genehmigung einer CAR T-Studie in Deutschland durch

⁸ Übersicht in: **June CH, Riddell SR, Schumacher TN (2015): Adoptive cellular therapy: a race to the finish line.** Sci Transl Med 7(280):280.

das Paul-Ehrlich-Institut (PEI). Dies war ein bedeutender Meilenstein, der den Weg für zukünftige Forschung und Entwicklung in diesem Bereich ebnete.

Ein weiteres zentrales Ergebnis des Projekts war der Aufbau **regulatorischer Expertise**. Miltenyi Biotec konnte umfangreiche Kenntnisse und Fähigkeiten im Bereich der Herstellungsgenehmigung, der Erstellung des Investigator's Brochure (IB), des Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD) und der Clinical Trial Application (CTA) entwickeln. Diese Expertise führte zur Erstellung von Blueprints und ATMP-Trainings, die sowohl intern als auch extern wertvoll sind.

Technologisch ermöglichte das Projekt signifikante Fortschritte. Dazu gehörten die Entwicklung präklinischer *in vitro*- und *in vivo*-Modelle sowie die GMP-konforme Umsetzung des T-Zell-Transduktionsprozesses auf dem CliniMACS Prodigy. Darüber hinaus wurden Fortschritte bei lentiviralen Vektoren, QC-Assays, Immunmonitoring und der begleitenden Forschung erzielt. Besonders hervorzuheben sind die gesammelten Daten zur Sicherheit, Toxizität und Wirksamkeit von CD20 CAR T-Zellprodukten. Ein weiterer bedeutender Fortschritt war der Proof-of-Concept für **dezentrales Manufacturing**, dessen Ergebnisse derzeit in einem Manuskript zur Revision stehen.

Übergreifend führte das CAR-TIME-Projekt zu mehreren wichtigen Innovationen. Es diente als **Basisinnovation** und Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen, insbesondere für die Behandlung anderer Tumorarten. Diese Technologie hat das Potenzial, in einem breiteren Spektrum der Onkologie angewendet zu werden. Außerdem ermöglichte das Projekt die Initiierung weiterer klinischer CAR T-Studien bei Miltenyi Biotec, nicht nur in Deutschland, sondern auch in der EU und den USA.

Ein bemerkenswerter Meilenstein war die Gründung der **Miltenyi Biomedicine GmbH** im Jahr 2020. Diese neue Tochtergesellschaft ist ein direktes Ergebnis der im CAR-TIME-Projekt begonnenen Entwicklungen und stellt einen wichtigen Schritt in der Weiterentwicklung und Kommerzialisierung von Zell- und Gentherapien dar.

Insgesamt zeigt sich, dass trotz des fehlenden Nachweises der Wirksamkeit der CD20 CAR T-Zellen bei Melanom-Patienten das Projekt weitreichende positive Auswirkungen hatte. Es hat nicht nur die **wissenschaftliche und technologische Grundlage für zukünftige Entwicklungen** gelegt, sondern auch Miltenyi Biotec als führendes Unternehmen in der Zell- und Gentherapie etabliert und somit maßgeblich zu einer Weiterentwicklung dieses innovativen Forschungsfeldes in Deutschland beigetragen, von der nicht nur Patienten sondern auch die akademische und industrielle Forschung profitieren werden. Somit hat das Projekt übergreifend einen signifikanten sozio-ökonomischen Mehrwert generiert, der in der nahen Zukunft noch weiter wirtschaftlich und wissenschaftlich-technisch verwertet werden wird.

Wissenschaftlich-technische Verwertung:

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Zelltherapeutika als Herstell- und Prüfeinrichtung der MHH und seiner Entwicklungsabteilung GMP-DU konnte mit diesem Projekt beispielhaft gezeigt werden, wie die für die Herstellung von CAR T-Zellen notwendigen komplexen Prozessabläufe **dezentral** abgebildet werden können: die Erzeugung von genmodifizierten T-Zellen erfordert sequenzielle Prozessschritte bestehend aus T-Zell-Separation und -Aktivierung, Transduktion und anschließender Zellexpansion. Dieser Prozess kann im Zusammenspiel mit der Qualifizierung spezifischer Geräte und der Validierung von Methoden insbesondere der Qualitätskontrolle zukünftig als Matrize dienen um die effektive dezentrale Translation weiterer Gentherapeutika in die klinische Anwendung zu ermöglichen. Vorausgesetzt entsprechende Strukturen und Expertise sind vorhanden, ist die translationale

Umsetzung in die klinische Anwendung im akademischen Umfeld möglich. Dies erlaubt eine dezentrale automatisierte Herstellung von CAR-T-Zellen, die insbesondere bei nicht kryokonservierten Zellprodukten und frühen Phase I/II Studien von Bedeutung ist. Neben malignen Erkrankungen ergeben sich weitere Anwendungsmöglichkeiten für die adoptive Immuntherapie, insbesondere bei immunvermittelten Erkrankungen wie dem breiten Spektrum der Autoimmunkrankheiten.

Darüber hinaus werden die Verbundpartner zu gegebener Zeit nach Absprache gemeinsam oder individuell ihre wissenschaftlichen Erkenntnisse in Form von Publikationen, Vorträgen und Postern in Fachzeitschriften und auf Kongressen der Forschungsgemeinschaft sowie der Öffentlichkeit zugänglich machen.

5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens

Der Einsatz von CAR T-Zelltherapien bei Krebserkrankungen ist weiterhin ein stark wachsendes Themenfeld, auf dem Forschung in großem Umfang erfolgt. Der globale CAR T-Zellmarkt soll bis 2032 mehr als 16\$ Milliarden⁹ betragen. Generell ist hierbei zwischen Erfolgen im Bereich der hämatologischen Tumore, die also das blutbildende System betreffen (bspw. Leukämien und Lymphome) und den soliden Tumoren, die Gewebe und Organe inklusive Melanomen betreffen, zu unterscheiden. Die größten translatorischen Erfolge sind während der Durchführung des Vorhabens im Bereich der hämatologischen Tumore erzielt worden, für die es mittlerweile kommerziell verfügbare CAR T-Zellmedikamente gibt (bspw. Kymriah (Novartis), Yescarta (Kite Pharma)) und weitere Medikamente befinden sich in Zulassungsstudien (bspw. Zamtocabtagene autoleucler von Miltenyi Biotec). Auf dem Gebiet der soliden Tumore wurden ebenfalls Fortschritte erzielt, jedoch ist der Wert dieser Therapie bei soliden Tumoren nach wie vor uneindeutig und wird durch mehrere Hindernisse eingeschränkt, darunter die begrenzte Tumorerfassung und -infiltration, das Vorhandensein einer immunsuppressiven Tumor-Mikroumgebung sowie unerwünschte Nebenwirkungen im Zusammenhang mit einer solchen Therapie¹⁰.

Neben den beschriebenen Aspekten haben auch weitere Zelltypen wie natürliche Killerzellen, tumorinfiltrierende Lymphozyten und Makrophagen das Interesse von WissenschaftlerInnen geweckt und werden auf ihre therapeutischen Kapazitäten untersucht. Genauso hat sich das Forschungsfeld -nicht zuletzt wegen der bahnbrechenden Erfolge während der Coronapandemie- für den Einsatz von RNA-basierten Technologien im Bereich der Tumorstimmung geöffnet. Neben dem bisherigen Fokus auf CAR Monotherapien werden zunehmend auch Kombinationstherapien (CAR T-Zellen zusammen mit Chemo-/Radiotherapie, Checkpoint-Inhibitoren oder anderen Zellarten) erforscht und selbst der gänzlich neue Ansatz der *in vivo* Gentherapie (direkte Injizierung des Vektors in den Menschen, ohne die aufwändige Zell-Entnahme und *ex vivo* Herstellung von CAR T-Zellen) gewinnt zunehmend an Momentum¹⁰.

Mit großem Erfolg werden CAR T-Zelltherapien mittlerweile, unabhängig von Krebserkrankungen, auch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt, wie unter anderem die letzte Fallserie aus Erlangen¹¹ zeigt.

⁹ CAR-T Cell Therapy Market Size, Share | Analysis Report [2032] (fortunebusinessinsights.com)

¹⁰ Maalej, K.M., Merhi, M., Inchakalody, V.P. et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer* 22, 20 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01723-z>

¹¹ Müller F, Taubmann J, Bucci L, et al. CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease - A Case Series with Follow-up. *N Engl J Med*. 2024;390(8):687-700. doi:10.1056/NEJMoa2308917

Dort wurden PatientInnen mit Systemischem Lupus Erythematosus (SLE), idiopathischer entzündlicher Myositis und systemischer Sklerose mit CD19 CAR T-Zellen behandelt und der Zelltransfer scheint machbar, sicher und wirksam zu sein.

6. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11

Gemeinsame Veröffentlichungen des Verbundes:

- Christoph Priesner, Krasimira Aleksandrova, Ruth Esser, Nadine Mockel-Tenbrinck, Jana Leise, Katharina Drechsel, Michael Marburger, Andrea Quaiser, Lilia Goudeva, Lubomir Arseniev, Andrew D. Kaiser, Wolfgang Glienke, and Ulrike Koehl. *Automated Enrichment, Transduction, and Expansion of Clinical-Scale CD62L+ T Cells for Manufacturing of Gene Therapy Medicinal Products*. Human Gene Therapy 2016, 27:10; DOI: 10.1089/hum.2016.091
- Hadenfeld M, Rauser G, Koehl U, Abken H, Apel M. *CAR-T-Zellen gegen malignes Melanom – Automatisierung für die personalisierte Krebstherapie*. Biospektrum 2016;22:496-498
- Zuther K, Glienke W, Priesner C, Rauser G, Abken H, Köhl U. *Individualisierte Therapie mit CAR-exprimierenden Immunzellen*. Journal Onkologie 2/2017
- Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, Melk A, Kubaink F, Abken H., Hombach H, Aktas M, Essl M, Bürger I, Kaiser A, Rauser G, Jurk M, Goudeva L, Glienke W, Arseniev L, Esser R, Köhl U. *Functionality and Cell Senescence of CD4/ CD8-Selected CD20 CAR T Cells Manufactured Using the Automated CliniMACS Prodigy® Platform*. Transfus Med Hemother. 2019;46(1):47-54. doi:10.1159/000495772
- Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, Aktas M, Apel M, Assenmacher M, Bürger I, Richter A, Altfrohne P, Schubert C, Holzinger A, Barden M, Bezler V, von Bergwelt-Baildon M, Borchmann P, Goudeva L, Glienke W, Arseniev L, Esser R, Abken H, Köhl U; *Automated manufacturing and characterization of clinical grade autologous CD20 CAR T cells for the treatment of patients with stage III/IV Melanoma*. Front Immunol 2024 Sep 25;15:1328368. doi: 10.3389/fimmu.2024.1328368
- Lock D, Mockel-Tenbrinck N, Drechsel K, et al. *Automated Manufacturing of Potent CD20-Directed Chimeric Antigen Receptor T Cells for Clinical Use*. Hum Gene Ther. 2017;28(10):914-925. doi:10.1089/hum.2017.111

Geplante Veröffentlichungen des Verbundes:

- Hombach, A., Szöör, A., Czaspar, M.,, Vereb, G., Abken, H., Target antigens with higher mobility on the surface of cancer cells enable the formation of larger synapses and provoke more efficient CAR redirected T cell activation, in preparation.
- Clinical Trial Paper in preparation