

## „Herstellung von Myelom-CAR-Produkten mittels DNA Vektoren“

Antragsteller: Dr. Patrick Schmidt, NCT Heidelberg

- Abschlussbericht -

Das vorrangige Ziel dieses Projektes war es, Prozesse und Protokolle zu entwickeln und zu validieren, die die Herstellung von myelomspezifischen CAR-T-Zellen ermöglichen. Dies sollte im großen Maßstab und mit Ausgangsprodukten durchgeführt werden, die den strengen Regeln der „Guten Herstellungspraxis“ genügen. Diese umfasst behördliche Vorgaben, die eingehalten werden müssen, wenn das Produkt als Arzneimittel in Studien später eingesetzt werden soll.

Im beantragten Projekt wurde ein neues Vektorsystem getestet. Während derzeit die meisten CAR T Zellen mit viralen Vektoren hergestellt werden, wurde hier ein DNA Vektor verwendet, der sogenannte nS/MARt. Dieser wurde in der Arbeitsgruppe Dr. Harbottle entwickelt und erlaubt einen Gentransfer in T Zellen, ohne dass die DNA in das Genom der Zelle integrieren muss, was einen erheblichen Sicherheitsvorteil darstellt. Als Zielstruktur für die Antikörper-Bindungsdomäne wurde BCMA ausgewählt; ein im Myelom überexprimiertes Zelloberflächen Molekül, das bereits in anderen CAR T Studien als Angriffspunkt verwendet wird. Das gesamte Konstrukt stellt einen CAR der 3. Generation aber auf DNA-Basis dar.

Zunächst wurde in ausreichendem Maße Vektor-DNA benötigt, die in speziellen Bakterienstämmen hergestellt und aufgereinigt wurde. Die gewonnene und aufgereinigte „nS/MARt-BCMA-CAR“ DNA erfüllte die Qualitätskriterien nach GMP (Endotoxin-, Mykoplasmen- und keimfrei). Wir bestätigten mittels Sequenzierung die Identität des Vektors und haben erfolgreich einen *potency*-Assay durchgeführt. In diesem Assay wird die Aktivität von Zellen, die mit dem neuen Vektor modifiziert wurden, überprüft. Die so gewonnene DNA wurden dann für zwei CAR-T Herstellungsläufe im klinischen Maßstab eingesetzt. Dafür wurde, basierend auf unserer Publikation, das CliniMACS Prodigy Gerät zur Sortierung und Kultivierung von T-Zellen, sowie das ExPERT GTx Gerät zur Elektroporation von hohen Zellzahlen herangezogen. Der CliniMACS Prodigy erlaubt es, den gesamten Prozess in einem geschlossenen System durchzuführen, was die Sicherheit in der Herstellung erhöht. Das Gerät zur Elektroporation wird verwendet, um die DNA in die Zellen zu transferieren.

Zwar wurde nicht die erforderliche Anzahl von CAR-T Zellen erreicht, die eine infundierbare Dosis darstellen würde. Aber die Expressionsstärke des CARs auf den lebenden Zellen entsprach den Spezifikationen.

Die durchgeführte Fehlersuche identifizierte eine Kontamination des Vektorbatches mit genomischer Bakterien-DNA aus der Produktion, die bei der Aufreinigung nicht herausgefiltert wurde. Die kommerziell erhältlichen Systeme zur Aufreinigung versprechen zwar eine effektive Filterung der genomischen DNA, allerdings scheinen Spuren von Kontamination für fragile Zellen wie T-Zellen durchaus eine Rolle zu spielen.

Wir haben daraufhin den DNA-Batch mittels enzymatischem Verdau weiter aufgereinigt und in Versuchen im kleinen Maßstab getestet. Hier zeigte sich eindeutig, dass der weiter gereinigte Batch zu einer viel höheren Überlebensrate der T-Zellen nach DNA-Transfer führte, ohne dass die Menge an CAR Molekülen auf der Oberfläche reduziert war. Wir werden folglich dieses Kriterium als Spezifikation in unseren GMP-Herstellprotokollen verankern.

Ein weiterer wichtiger Erkenntnisgewinn des Projektes bestand in einer Optimierung der Aufarbeitung des eingefrorenen Startproduktes. Es galt zu verhindern, dass zu viele Zellen nach dem Auftauschritt noch während des ersten Tages der Kultivierung absterben. Dies mindert nämlich nicht nur die absolute Zellzahl in der Produktion, sondern führt durch die Sekretion genomischer DNA und von Proteinen durch sterbende Zellen zur Viskosierung der Kultur, die den weiteren Prozessablauf erschwert. Es wurde ein sehr guter Weg gefunden, diese Probleme zu verhindern und zu erreichen, dass die Zellzahl innerhalb der geforderten Spezifikationen liegt.

In einem weiteren Teilprojekt wurde ein Elektroporationsprotokoll für Myelom-CAR-T-Zellen unter Nutzung des kürzlich entwickelten, integrierten Elektroporators im CliniMACS Prodigy System entwickelt. Die gefundenen Bedingungen erlauben nun eine Elektroporation sowohl im kleinen als auch im großen, klinischen Maßstab.

Zusammengefasst erlaubte die Förderung dieses Projektes durch „Myelom heilen e.V.“ die Durchführung von wichtigen Experimenten, deren Erkenntnisse uns einen weiteren Schritt zu Anwendung am Patienten geführt hat.