

# SAXOCELL®

## Abschlussbericht Teil I: Kurzbericht

**Berichtszeitraum: 01.10.2021 – 30.09.2024**

### **Verbundvorhabentitel:**

SaxoCell: Depletion autoimmunspezifischer B-Lymphozyten durch „chimäre Antigenrezeptor (CAR)" - Natürliche Killerzellen zur Therapie autoimmuner Erkrankungen aus dem endokrinen und neurologischen Formenkreis (SaxoCell CAReNK-AID)

### **Einreichender Zuwendungsempfänger:**

Technische Universität Dresden: 03ZU1111DA

---

**Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter\*in**

GEFÖRDERT VOM



 Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

GEFÖRDERT VOM



**CLUSTERS  
4 FUTURE**  
Innovationsnetzwerke  
für unsere Zukunft



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

**Koordinator:**

**Prof. Dr. med. Torsten Tonn**

Experimentelle Transfusionsmedizin (ETM)

Med. Fakultät Carl-Gustav Carus, TU Dresden

**Partner inklusive Förderkennzeichen:**

**Technische Universität Dresden: 03ZU1111DA**

**Prof. Dr. Achim Temme**

Med. Fakultät, TU Dresden (NCH-FOR)

**Prof. Dr. Stefan R. Bornstein**

Med. Klinik III, UKD (MK III) TU Dresden

**Prof. Ezio Bonifacio**

Center for Regenerative Therapies Dresden

**Universität Leipzig: 03ZU1111DB**

**Prof. Dr. Achim Aigner**

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie (UL) Universität Leipzig

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03ZU1111DA und 03ZU1111DB gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

**Verantwortliche Autoren**

Prof. Dr. med. Torsten Tonn

## **1. Technischer und wissenschaftlicher Stand bei Vorhabenbeginn**

Autoimmunerkrankungen betreffen über 10 % der Weltbevölkerung und umfassen mehr als 100 verschiedene Krankheiten. Über 30 % davon werden durch autoreaktive B-Zellen verursacht, die Autoantikörper produzieren und gesundes Gewebe angreifen. Schwere Erkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses (SLE), systemische Sklerose, Myasthenia gravis und multiple Sklerose betreffen allein in den USA und Europa über 3,9 Millionen Menschen und führen oft zu erheblichem Leid, Organversagen und Tod. Die derzeitigen Therapien basieren meist auf unspezifischer Immunsuppression, die Symptome lindert, aber keine Heilung bietet und oft mit schweren Nebenwirkungen einhergeht. Fortgeschrittene Fälle werden mit Rituximab behandelt, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20, der B-Zellen eliminiert und klinische Verbesserungen bewirken kann. Viele Patienten sprechen jedoch nicht oder nur vorübergehend auf die Behandlung an, da Rituximab das Gewebe nicht ausreichend durchdringt und autoreaktive B-Zellen überleben. Eine effektive Therapie fehlt bislang, was den dringenden Bedarf an innovativen Lösungen unterstreicht.

## **2. Aufgabenstellung und Vorarbeiten bei Vorhabenbeginn**

Ziel des CAREnK-AID-Projekts war die Entwicklung von chimären Antigenrezeptor (CAR) NK-Zellen (natürliche Killerzellen) zur Behandlung und optimalen, dauerhaften Heilung von Autoimmunerkrankungen. NK-Zellen weisen aufgrund ihrer nachgewiesenen Wirksamkeit in der Krebsbehandlung ein günstiges therapeutisches Profil für die Eliminierung von B-Zellen auf und gelten im Vergleich zu T-Zellen als sicherer. Zudem können NK-Zellen allogene aus verschiedenen Spendern gewonnen werden, was eine ungerichtete Herstellung größerer Chargen für mehrere Patienten in Batch-Produktion ermöglicht und die Herstellungskosten erheblich senkt.

In diesem Projekt verfolgten wir zwei Ansätze: Zum einen die Entwicklung von CAR-NK-Zellen, die alle B-Zellen ansprechen – ein Ansatz, der bei verschiedenen B-Zell-bedingten Immunerkrankungen Anwendung finden kann, jedoch im therapeutischen Fenster über mehrere Monate mit einem hohen Infektionsrisiko wegen insgesamt fehlender B-Lymphozyten, verbunden sein kann. Daher wurde in einem zweiten Ansatz die Entwicklung spezifischerer CAR-NK-Zellen angestrebt, die ausschließlich autoreaktive B-Zellen angreifen und dabei die gesunden B-Zellen unberührt lassen. Eine Herausforderung der CAR-NK-Zelltherapie besteht im Vergleich zu CAR-T-Zellen im ineffektiven Gentransfer und der mangelnden Expansionsfähigkeit der NK-Zellen, was ebenfalls Gegenstand der Optimierungsarbeiten in diesem Projekt war.

Um in diesem anspruchsvollen Projekt erfolgreich zu sein, haben wir ein starkes CAREnK-AID-Konsortium aufgebaut, das über umfassende Expertise in den kritischen Bereichen unseres Vorhabens verfügt. So bringt beispielsweise Prof. Dr. med. Torsten Tonn mehr als 20 Jahre Erfahrung in der Entwicklung und genetischen Modifikation von NK-Zellen sowie in der klinischen Translation von NK-Zellprodukten mit. Darüber hinaus profitierte das Projekt von der Entwicklung einer Feeder-Zell-Linie zur Expansion von NK-Zellen im Labor von Prof. Dr. Achim Temme, welche weiter modifiziert und an die spezifischen Anforderungen der Expansion von CAR-NK-Zellen für autoimmune Indikationen angepasst wurde. Die Expertise im Gentransfer wurde durch das Labor von Prof. Dr. Achim Aigner eingebracht, der über eine langjährige Erfolgsbilanz in der Entwicklung von Nanopartikeln verfügt, die Nukleinsäuren in verschiedene Zelltypen transferieren können. Ein weiteres Ziel des Projekts war es, diese Nanopartikel für den Gentransfer in NK-Zellen zu entwickeln. Die Identifikation eines spezifischen Targets zur selektiven Erkennung autoreaktiver B-Zellen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Ezio Bonifacio übernommen, der über fundierte Kenntnisse in der Target-Identifikation im Bereich der Autoimmunität verfügt. Aus klinischer Perspektive bringt

das Team von Prof. Dr. med. Stefan Bornstein umfangreiche Erfahrung in der präklinischen und klinischen Entwicklung von Therapien für Autoimmunerkrankungen aus dem Bereich der Rheumatologie ein.

### **3. Ablauf des Vorhabens, wesentlichen Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen**

Im Rahmen von Arbeitspaket (AP) 1 wurde ein optimiertes CD19-spezifisches CAR-Konstrukt entwickelt, das anschließend für die genetische Modifikation von NK-Zellen verwendet wurde, um CD19.CAR-NK-Zellen zu generieren. Die Transduktionseffizienz wurde optimiert, um eine hohe CAR-Expression zu erreichen, eine starke Zytotoxizität gegen CD19-positive B-Zellen sicherzustellen und gleichzeitig Off-Target-Effekte zu vermeiden. Zudem wurden die Kulturbedingungen für ein optimales Wachstum und eine hohe Funktionalität der NK-Zellen unter GMP-konformen Bedingungen optimiert. Weiterhin wurde ein kliniktauglicher Prozess zur GMP-konformen Produktion von NK-Zellen entwickelt.

In AP2 wurde eine neuartige Feeder-Zelllinie entwickelt, die das CD19-Antigen mit optimierten Bindungseigenschaften exprimiert, um CD19.CAR-NK-Zellen gezielt zu binden und zu aktivieren. Parallel dazu wurden mutierte Versionen des CD19-Binders erzeugt, um die Bindungsaffinität an die entwickelten Feeder-Zellen weiter zu verbessern. Mit diesem System konnten CD19.CAR-NK-Zellen erfolgreich hergestellt werden, die eine hohe Funktionalität aufwiesen.

In AP3 wurden mehrere neuartige Nanopartikel für den nicht-viralen Gentransfer entwickelt, die in Zelllinien und primären humanen T-Zellen eine überlegene Transfektionseffizienz im Vergleich zu Standardverfahren zeigten. Allerdings erwiesen sich diese Nanopartikel in NK-Zellen als weniger effizient. Aus diesem Grund wurde die Anwendung dieser Nanopartikel auf die genetische Modifikation von T-Zellen für die nächste Förderphase priorisiert. Ein separater Bericht zu diesem AP wurde durch den Zuwendungsempfänger Universität Leipzig: 03ZU1111DB erstellt.

In AP4 wurden vielversprechende Zielstrukturen für zwei relevante Autoimmunindikationen identifiziert. Diese Targets dienten als Basis für die Entwicklung neuer CARs, die eine hohe Bindung an die entsprechenden autoreaktiven Autoantikörper zeigten. Anschließend wurden diese CARs zur genetischen Modifikation von NK-Zellen verwendet, welche eine hohe CAR-Expression aufwiesen und spezifisch durch autoreaktive B-Zell-Rezeptoren (BCR) aktiviert wurden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelten BCR-spezifischen CAR-NK-Zellen selektiv B-Zellen eliminierten, die den entsprechenden autoreaktiven BCR exprimierten.

AP5 beinhaltete die präklinische Validierung der optimierten CD19.CAR-NK-Zellen in immundefizienten Mausmodellen. Dabei konnte eine hohe Wirksamkeit sowie ein gutes Sicherheitsprofil nachgewiesen werden.

Die vielversprechenden Ergebnisse führten zu einer weiteren Stärkung der Zusammenarbeit innerhalb des SaxoCell-Konsortiums. Darüber hinaus konnten durch das Projekt sowohl externe akademische als auch industrielle Partner für die nächste Phase des SaxoCell-Vorhabens gewonnen sowie relevante Daten für künftige Förderanträge generiert werden.

Das Projekt erreichte erfolgreich alle Meilensteine im vorgesehenen Zeitrahmen und legt eine solide Grundlage für die klinische Translation. Darüber hinaus wurden im Rahmen des Projekts schutzfähige geistige Eigentumsrechte (IP) entwickelt, die als Basis für ein geplantes Spin-Off der TU Dresden dienen werden.

# SAXOCELL®

**Abschlussbericht Teil II: eingehende Darstellung pro Zuwendungsempfänger**

**Berichtszeitraum: 01.10.2021 – 30.09.2024**

**Verbundvorhabentitel:**

SaxoCell: Depletion autoimmunspezifischer B-Lymphozyten durch „chimäre Antigenrezeptor (CAR)" - Natürliche Killerzellen zur Therapie autoimmuner Erkrankungen aus dem endokrinen und neurologischen Formenkreis (SaxoCell CAReNK-AID)

**Einreichender Zuwendungsempfänger:**

Technische Universität Dresden: 03ZU1111DA

---

**Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter\*in**

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

GEFÖRDERT VOM



**CLUSTERS  
4 FUTURE**  
Innovationsnetzwerke  
für unsere Zukunft



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

**Koordinator:**

**Prof. Dr. med. Torsten Tonn**

Experimentelle Transfusionsmedizin (ETM)

Med. Fakultät Carl-Gustav Carus, TU Dresden

**Partner inklusive Förderkennzeichen:**

**Technische Universität Dresden: 03ZU1111DA**

**Prof. Dr. Achim Temme**

Med. Fakultät, TU Dresden (NCH-FOR)

**Prof. Dr. Stefan R. Bornstein**

Med. Klinik III, UKD (MK III) TU Dresden

**Prof. Ezio Bonifacio**

Center for Regenerative Therapies Dresden

**Universität Leipzig: 03ZU1111DB**

**Prof. Dr. Achim Aigner**

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie (UL) Universität Leipzig

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03ZU1111DA und 03ZU1111DB gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

**Verantwortliche Autoren**

Prof. Dr. med. Torsten Tonn

## **1. Zusammenfassende Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung sowie zur Notwendigkeit und Angemessenheit der durchgeführten Arbeiten**

### Notwendigkeit:

Die Entwicklung neuer Therapien für Autoimmunerkrankungen ist dringend erforderlich, da bestehende Behandlungen oft nur symptomatisch wirken, mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind und keine langfristige Heilung ermöglichen. Besonders die gezielte Eliminierung autoreaktiver B-Zellen stellt eine zentrale Herausforderung dar, da bisher verfügbare B-Zell-depletierende Therapien nicht ausreichend spezifisch sind. Das CAREnK-AID-Projekt adressierte diesen dringenden Bedarf, indem es einen innovativen zellbasierten Therapieansatz mit chimären Antigenrezeptor (CAR)-modifizierten NK-Zellen entwickelte. Diese Methode hat das Potenzial, selektiv pathogene B-Zellen zu eliminieren, ohne gesunde Immunfunktionen zu beeinträchtigen. Die Ergebnisse des Projekts liefern eine vielversprechende Grundlage für zukünftige klinische Anwendungen und könnten eine effektive Therapieoption für Patienten mit Autoimmunerkrankungen bieten.

Alle im Projekt durchgeführten Arbeiten waren notwendig, um das übergeordnete Projektziel zu erreichen.

### Angemessenheit:

Die im CAREnK-AID-Projekt durchgeführten Arbeiten waren methodisch und wissenschaftlich fundiert sowie angemessen, um die gesetzten Ziele zu erreichen. Die Wahl von CAR-NK-Zellen als therapeutische Plattform basierte auf umfassenden Vorerkenntnissen aus der Onkologie und erwies sich als vielversprechend aufgrund ihres günstigen Sicherheitsprofils. Die enge interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb des Konsortiums förderte eine effiziente Umsetzung der Forschungsaufgaben und ermöglichte wesentliche Fortschritte in der Entwicklung dieser innovativen Therapie. Die erzielten Ergebnisse unterstreichen die wissenschaftliche Relevanz und das Potenzial des Ansatzes, wodurch die eingesetzten Ressourcen in vollem Umfang gerechtfertigt sind.

### Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung:

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten, ebenso der Zeitplan im Hinblick auf den Gesamtzeitraum des Projekts.

Allerdings wurde vom ursprünglichen Zeitplan in Bezug auf einzelne Arbeitspakete und Meilensteine abgewichen, da unerwartete – sowohl positive als auch negative – Ergebnisse eine Anpassung erforderlich machten, um konkrete und verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Dies betraf insbesondere die strukturelle Inkompatibilität eines BCR-Targets mit der CAR-Anwendung. Daher haben wir ein alternatives, passendes Zielmolekül identifiziert, das zwar nicht ursprünglich in der Vorhabenbeschreibung vorgesehen war, aber klinisch hochrelevant ist und letztlich zur erfolgreichen Generierung von CAR-NK-Zellen führte.

Diese Änderungen hatten keinen Einfluss auf die geplanten Ausgaben und führten weder zu Mehr- noch zu Minderausgaben.

## **2. Beschreibung des Projekts und der Ergebnisse / Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten im Detail**

### **AP 1. Entwicklung und Etablierung eines Prozesses zur GMP-konformen Herstellung von CAR-NK Zellen im klinischen Maßstab (ETM)**

Ziel dieses Arbeitspakets war die Entwicklung eines CAR-NK Zellprodukts, das zu einer Depletion menschlicher B-Zellen, einschließlich autoreaktiver B-Zell-Antikörper, führen sollte. Diese Therapie sollte zu einer Wiederherstellung des B-Zellkompartiments von Vorläuferzellen führen, was zu einer langfristigen oder dauerhaften Behandlung von ansonsten unbehandelbaren schweren Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses (SLE), Diabetes mellitus Typ 1, systemischer Sklerose und anderen führen könnte. Wir haben einen Übersichtsartikel zu diesem Thema veröffentlicht (*Steenblock, Eitler 2023; DOI: 10.37349/eemd.2023.00002*).

#### **1.1: GMP-konformer Herstellprozess von anti-CD19 CAR-NK-Zellen**

In diesem Arbeitspaket (AP) haben wir gemäß Projektplan das anti-CD19 CAR Konstrukt kloniert und durch lentiviralen Gentransfer in eine klinisch anwendbare NK-92 Natürliche Killer (NK) Zelllinie transduziert. Wir konnten eine hohe CAR-Expression und eine spezifische Zytotoxizität gegen CD19-positive B-Zelllinien nachweisen. Zunächst haben wir primäre NK-Zellen, die aus peripherem Blut isoliert wurden, mit CD19.CAR transduziert und anschließend ebenfalls eine spezifische Zytotoxizität gegen CD19-positive Targets zeigen können. Wir haben weiterhin primäre NK-Zellen aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut auf Wachstum und Viabilität in verschiedenen GMP-konformen Medien getestet und das optimal geeignete Medium identifiziert.

Obwohl die lentivirale oder retrovirale Transduktion eine Standardmethode für die CAR-Expression in NK-Zellen ist, könnte die virale Integration in die genomische DNA theoretisch zu einer malignen Transformation führen. Auch, wenn das für NK Zellen bisher nicht gezeigt wurde, so haben sekundäre Leukämien in CAR-T behandelten Krebspatienten diese Frage kürzlich aufgeworfen. Die FDA kam zu dem Schluss, dass zwar ein gewisses Risiko besteht, der Nutzen bei schweren Erkrankungen wie Krebs aber überwiegt. Bei Autoimmunerkrankungen ist dieser Vorteil in der Nutzen/Risikoabwägung nicht gegeben und wir sehen daher einen Vorteil für NK Zellen als Träger von CAR. Nichtsdestotrotz haben wir die lentiviralen Partikel titriert und die Mindestmenge an viralen Partikeln pro Zelle getestet, um das Risiko einer unerwünschten viralen Integration in ungünstige DNA-Regionen zu minimieren. Wir haben daran gearbeitet, die Reagenzien in Forschungsqualität durch Reagenzien in GMP-Qualität zu ersetzen. Leider führte dies zu einer geringeren Transduktionseffizienz. Deswegen haben wir alternative lentivirale Hüllen getestet und konnten zeigen, dass mit einer alternativen lentiviralen Hülle klinisch relevante Transduktionseffizienzen unter GMP-konformen Bedingungen erreicht werden können. Wir haben weiterhin gezeigt, dass unsere lentiviral produzierten CD19.CAR NK-Zellen in vitro effizient B-Zellen aus menschlichem Blut eliminieren können, ohne andere Immunzellen wie T-Zellen oder Monozyten zu beeinflussen.

Parallel dazu haben wir einen GMP-konformen Herstellungsprozess für aus peripherem Blut isolierte NK-Zellen im klinischen Maßstab etabliert. Für die Prozessentwicklung zur Herstellung von NK-Zellen

wurden primäre NK-Zellen immunomagnetisch aus Apheresematerial gesunder Spender isoliert, indem CD3<sup>+</sup>-Zellen zunächst depletiert und anschließend CD56<sup>+</sup>-Zellen angereichert wurden. Alternativ erfolgte eine gleichzeitige Depletion von T und B Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-Zellen). Um eine optimale Funktionalität zu gewährleisten, wurden die NK-Zellen nach der Isolierung für 16 Stunden aktiviert. Die Kultivierungsbedingungen wurden durch den Vergleich verschiedener „Good Manufacturing Practice“ (GMP) konformer Zellkulturmedien, Zytokine Konzentrationen und Zellaussaatdichten im kleinen Maßstab optimiert. Die kultivierten NK-Zellen wurden auf Reinheit, Viabilität, Proliferation und Funktionalität getestet. Die Halbwertszeit des Produkts wurde in verschiedenen Formulierungsmedien anhand von Viabilitäts- und Zytotoxizität verglichen. Die besten Parameter wurden in ein Herstellungsverfahren für NK-Zellen im klinischen Maßstab überführt und in einem Reinraum unter GMP-Bedingungen validiert, gefolgt von Untersuchungen zur Haltbarkeit des Produkts. Alle drei im klinischen Maßstab hergestellten Produkte haben die Spezifikationskriterien erfüllt

### **1.2: Entwicklung und Validierung geeigneter chimärer Antigenrezeptoren (CAR) für die Verwendung in NK Zell-basierten Therapien von Autoimmunerkrankungen**

In diesem Arbeitspaket haben wir uns gemäß Projektplan mit der Entwicklung eines optimierten CAR-Konstrukts zur Anwendung bei Autoimmunerkrankungen beschäftigt. Die weiterentwickelten CD19.CAR-NK-Zellen zeigten im Vergleich zur bisherigen CD19.CAR-Variante eine verbesserte Zytotoxizität gegenüber CD19<sup>+</sup> Zielzellen wie B-Zelllinien sowie ein günstigeres Sicherheitsprofil. Diese Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag zur weiteren Optimierung von CAR-NK-Zellkonstrukten mit dem Ziel, die therapeutische Wirksamkeit bei gleichzeitig hoher Sicherheit zu steigern. Zudem konnten wir für primäre NK-Zellen nachweisen, dass das neue CAR-Konstrukt sowohl eine erhöhte Viabilität und verbessertes Wachstum als auch eine anhaltend hohe Zytotoxizität gegenüber CD19<sup>+</sup> Zielzellen vermittelt. Die von uns entwickelte CAR-Konstruktion ist neuartig und bietet im Vergleich zur klassischen CD19.CAR-Variante entscheidende Vorteile für den Einsatz bei Autoimmunerkrankungen. Dieses CAR-NK-System kann zukünftig auch zur Optimierung von Konstrukten genutzt werden, die im Rahmen von AP3 entwickelt wurden.

### **1.3: Entwicklung eines Verfahrens zur Kryokonservierung der Anti-CD19 CAR-NK-Zellen**

Die erfolgreiche Kryokonservierung von NK-Zellen ist ein entscheidender Faktor, um ein gebrauchsfertiges („off-the-shelf“) Zelltherapieprodukt bereitzustellen, das sich einfach transportieren, lagern und bei Bedarf durch Klinikpersonal an Patient:innen verabreichen lässt. Im Gegensatz zu T-Zellen führt das Auftauen kryokonservierter NK-Zellen jedoch häufig zu erheblichen Zellverlusten, was unter anderem auf ihren hohen Gehalt an vorgeformten lytischen Granula zurückzuführen ist. Zudem zeigen aufgetaute NK-Zellen häufig eine eingeschränkte Expansionsfähigkeit und reduzierte Funktionalität, was die klinische Wirksamkeit deutlich beeinträchtigen kann. Ziel dieses Arbeitspakets war daher die Optimierung des Kryokonservierungsprozesses für NK-Zellen. Zu den zentralen Einflussfaktoren zählen dabei die Auswahl geeigneter Kryokonservierungslösungen sowie der physiologische Ausgangszustand der Zellen vor dem Einfrieren. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene GMP-konforme Kryokonservierungsprotokolle mit einem Standardprotokoll verglichen.

Die besten Protokolle zeigten eine deutlich höhere Zellviabilität und -erholung nach dem Auftauen und ermöglichten eine schnellere funktionelle Regeneration der NK-Zellen.

Zudem expandierten die NK-Zellen unter den optimalen Bedingungen mindestens siebenfach stärker als jene, die mit dem Standardprotokoll behandelt worden waren. Die Zytotoxizität der aufgetauten Zellen wurde anschließend in einem Langzeit-Zytotoxizitäts-Assay auf Basis von Live-Cell Imaging gegen NALM-6-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen, die mit dem optimierten Kryokonservierungsprotokoll behandelt wurden, die Zielzellen signifikant effektiver abtöteten.

Diese Erkenntnisse sind essenziell für die Entwicklung verbesserter Kryokonservierungsstrategien und bilden eine wichtige Grundlage für die klinische Anwendung von NK-Zelltherapien.

### **Zeitplanung und Ausgaben von AP1**

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Die Zeitplanung im Sinne des Gesamt-Zeitraums wurde eingehalten.

## **AP 2. Optimierung der Zellexpansion von gegen autoimmune B-Lymphozyten gerichteten CAR-NK Zellen (NCH-FOR)**

### **AP 2.1. Herstellung und Evaluation von Feederzelllinien mit Expression der CD19-Ektodomäne (ECD) mit und ohne Mutationen des FMC63-Konformationsepitops**

Für die Umsetzung des AP 2.1. wurden 11 unterschiedliche c-myc-Epitop-gekoppelte CD19-ECDs *in silico* designt, welche das Konformationsepitop für den FMC63-Antikörper des CD19-CARs abbilden und zusätzlich N-terminal ein c-myc-Epitop aufwiesen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Einzel- und/oder Doppelmutationen im FMC63-Konformationsepitop, wobei ein wildtypisches Konstrukt ohne weitere Punktmutationen als Vergleich mitgeführt wurde. Nach Synthese der verschiedenen CD19-ECDs wurden diese erfolgreich in lentivirale Vektoren ligiert und mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Nach transienter Verpackung von lentiviralen Partikeln, anschließender Transduktion und Antibiotikaselektion wurden insgesamt 22 PC3-PSCA-basierte Feederzelllinien erfolgreich hergestellt. Diese Feederzelllinien sind durch eine stabile Expression der Transgene IL-2 bzw. IL-2 und membranständiges IL-15 (mIL-15d) sowie der Expression der unterschiedlichen CD19-ECDs auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert. Nach Titrationsstudien mit einem FMC63-spezifischen Antikörper gegen die verschiedenen CD19-ECDs wurden die  $K_D$ -Werte, also die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen CD19-ECDs zu dem Antikörper, bestimmt. Auf Grundlage der generierten Ergebnisse wurde letztlich ein CD19-ECD-Konstrukt (Nummer 8) mit einer 10-fach verringerten Affinität im Vergleich zur wildtypischen CD19-ECD für eine spezifisch *ex vivo* Expansion von primären anti-CD19-CAR-NK-Zellen ausgewählt. Die Umsetzung des AP 2.1. lag in der Zeit- und Kostenplanung des Projektvorhabens und ist erfolgreich abgeschlossen.

### **AP 2.2. Validierung der Expansion von anti-CD19-CAR-NK-Zellen durch CD19-ECD-Feederzelllinien**

Für die Generierung von primären anti-CD19-CAR-NK-Zellen wurden insgesamt 3 unterschiedliche CD19-CARs hergestellt, welche sich hinsichtlich ihrer Affinität zur CD19-Ektodomäne unterschieden. Es wurden zum einen FMC63-Hybridom- und CAT13.1E10-Hybridom-abgeleitete scFv-Fragmente eingesetzt, welche über eine Transmembrandomäne mit dem zytosolischen Signaladapter DAP12 fusioniert waren. Neben den resultierenden, DAP12-basierten CD19-CAR und CD19-CatCAR wurde ein CD19-ModCAR hergestellt, bei dem die Orientierung der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen des FMC63-scFv in umgekehrter Reihenfolge eingebracht wurden. Diese CD19-CARs wurden zunächst lentiviral in eine Testzelllinie (HEK293T) eingebracht und erfolgreich auf deren Zelloberfläche mittels durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen. Durch Titrationsstudien mit einem kommerziellen Fluorochrom-gekoppelten CD19-Protein wurden die K<sub>D</sub>-Werte der unterschiedlichen CD19-CARs durchflusszytometrisch bestimmt. Entgegen den Erwartungen zeigte sich eine in etwa gleiche Affinität der FMC63- und CAT13.1E10-scFv-basierten CARs. Anschließend wurden primäre NK-Zellen aus Buffy Coats gesunder Spender:Innen isoliert, transduziert und im 24-Well-Format expandiert. Durch Modifizierungen des bestehenden Protokolls konnten erfolgreich Transduktionseffizienzen von bis zu 55 % erreicht werden. Unter Ausnutzung verschiedener Expansionsprotokolle konnte eine selektive Expansion von CAR-positiven NK-Zellen festgestellt werden. Die Expansion der anti-CD19-CAR-NK-Zellen wurde ab dem 5. Tag nach Transduktion mit den lentiviralen CAR-Konstrukten durch eine Erschöpfung der NK-Zellen limitiert. Eine zusätzliche Modifikation der anti-CD19-CAR-Konstrukte mit kostimulatorischem CD25 (alpha-Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors) konnte der Erschöpfung der anti-CD19-CAR-NK-Zellen nicht deutlich entgegenwirken. Insgesamt konnte jedoch ein stabiles Protokoll etabliert werden, welches eine erfolgreiche Herstellung von anti-CD19-CAR-NK-Zellen ermöglicht und in größere Maßstäbe skalierbar ist. Die Umsetzung des AP 2.2 lag in der Zeit- und Kostenplanung des Projektvorhabens und wurde erfolgreich abgeschlossen. Zukünftige Optimierungsarbeiten, welche u.a. die Einbeziehung einer zusätzlichen 4-1BB-Signaladapterdomäne beinhalten, können die Effizienz der anti-CD19-CAR-NK-Zell-Expansion weiter verbessern helfen.

### **AP 2.3. *In vitro* Zytotoxizität der hergestellten anti-CD19-CAR-NK-Zellen**

Die in AP 2.2 generierten und expandierten anti-CD19-CAR-NK-Zellen wurden mittels *Time-Lapse*-Fluoreszenzintensitätsmessung von mKATE2-markierten Zielzellen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Dabei kamen mehrere Zielzelllinien zum Einsatz, die endogenes CD19 auf ihrer Oberfläche aufwiesen (Daudi, NALM-6, Raji) bzw. negativ für CD19 waren (Oci-AML3). Die Daudi-, NALM-6- und Raji-Leukämiezellen wurden, wie erwartet, durch anti-CD19-CAR-modifizierte NK-Zellen kontinuierlich eliminiert, während eine signifikant verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen gegen CD19-negative Oci-AML3-Zellen zu beobachten war, die auf die intrinsische Zytotoxizität von NK-Zellen zurückzuführen war. In allen Fällen vermittelte der in NK-Zellen transduzierte Kontroll-CAR (MR1.1-CAR) mit Spezifität gegen den mutierten EGFRvIII-Rezeptor signifikant weniger Zytotoxizität als die CD19-CARs, welches vergleichbar war mit der intrinsischen Zytotoxizität von nicht-transduzierten NK-Zellen (WT).

Die CD19-CARs wurden zusätzlich in die permanente, KIR-negative NK-Zelllinie YTS eingebracht und bewirkten eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität der NK-Zellen gegen K562-Zellen mit ektopischer Expression der CD19-Ektodomäne, während wildtypische K562-Zellen nicht eliminiert wurden. In gleicher Weise wurden CD19-positive Daudi-, Raji- und NALM-6-Leukämiezellen eliminiert,

während die CD19-negative Oci-AML3-Zelllinie kein Ziel für die anti-CD19-CAR-modifizierten YTS-Zellen, wildtypische YTS-Zellen und YTS-Zellen mit Expression eines Kontroll-CARs mit Spezifität für EGFRvIII (MR1.1-CAR) darstellten. Die Umsetzung des AP 2.3 lag in der Zeit- und Kostenplanung des Projektvorhabens und wurde erfolgreich abgeschlossen.

### **Zeitplanung und Ausgaben von AP2**

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Die Zeitplanung im Sinne des Gesamt-Zeitraums wurde eingehalten.

### **AP 3. Entwicklung optimierter Nanopartikel-Systeme für Gentransfer in NK-Zellen (UL)**

Zu diesem AP gehört ein getrennter Bericht der Arbeitsgruppe von Prof. Achim Aigner, Rudolf-Böhm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig.

### **AP 4. Identifizierung von Autoantikörper-Epitopen bei Autoimmunerkrankungen (CRTD)**

#### **AP 4.1. GAD65-, IA-2- und Proinsulin-Epitop-Konstrukte**

Wir haben entschieden, uns zunächst auf das Typ 1 Diabetes Autoantigen („T1D01“) zu konzentrieren, da wir relativ schnell eine Sammlung von Anti-T1D01 Antikörpern, welche die wichtigsten Epitope in diesem Protein erkennen, zusammenstellen konnten. Diese Antikörper sind die Voraussetzung, um die Funktionalität der Epitope der rekombinanten CAR- Konstrukte zu testen. Dafür werden membrangebundene, gegen T1D01- Epitope gerichtete IgG- Konstrukte in B Zelllinien exprimiert, welche als Bindungspartner für die CAR- Konstrukte dienen.

Wir haben die Sequenzen von vier Anti-T1D01 Antikörpern ermittelt. Drei davon waren veröffentlicht oder stammten aus unseren eigenen Vorarbeiten (M13, 96/3, C11) und die Sequenz des vierten, 76f4b, haben wir mittels Sequenzierung der entsprechenden Hybridoma- Zelllinie erhalten. Wir haben alle vier Antikörper *in vitro* produziert, um genügend Material für die Verifizierung und Entwicklung der CAR-Zelllinien zur Verfügung zu haben. Konstrukte, welche die Sequenzen einer membrangebundenen Form dieser Antikörper enthalten, wurden ebenfalls gebaut. Diese werden in der B-Zelllinie NALM-6, zusammen mit einem Konstrukt, welches die Sequenz von CD79A und CD79B enthält, co-exprimiert. CD79A und CD79B werden für die Expression von IgG an der Membranoberfläche benötigt. Die finalen Zelllinien werden zum Austesten der rekombinanten T1D01 CAR-Konstrukte benutzt. Rekombinante T1D01 Konstrukte, welche aus der intrazellulären Domäne (IC, AA605-979), der PTP-Domäne (AA699-979) oder der Juxtamembran- Domäne (AA605-699) bestehen, wurden schon im Vorgang zum Messen von Autoantikörper mittels Radioimmun- Assay (RIA) benutzt. Wir haben deshalb genau diese Bereiche für das Design der chimären CAR Antigen- Konstrukte benutzt.

#### **AP 4.2. Acetylcholinrezeptor- und MuSK-Epitopkonstrukte**

Die wichtigsten Epitope des Acetylcholinrezeptors befinden sich auf der extrazellulären Domäne (AA25-232) der alpha-Untereinheit (Gen: CHRNA1). Wichtig sind AA67-76 („Main Immunogenic Region“, MIR) und die Bungarotoxin-Bindungsstelle B3 (AA 177-208). Da die Struktur des Acetylcholinrezeptors, eines

Proteins mit vier Transmembrandomänen, sehr komplex ist, haben wir zunächst 17 rekombinante Domänen, basierend auf der 3D-Struktur der CHRNA1, in denen MIR und B3 enthalten sind, für die *in vitro* Expression und Testung entworfen und konstruiert. Die rekombinanten Domänen wurden N- oder C-terminal mit der NanoLuciferase (NLuc) fusioniert und die Funktionalität dieser Fusionsproteine in unserem LIPS-System getestet. Dazu wurden die Fusionsproteine in HEK-Zellen hergestellt und anschließend mittels Immunpräzipitation auf ihre Bindungsfähigkeit an zwei kommerzielle Antikörper (Epitope: AA 3-381 und 21-230) getestet. Da die Antikörper keines der getesteten Konstrukte binden konnten, wurden *in vitro* 5 rekombinante Antikörper hergestellt, deren Sequenzen in der Literatur beschrieben wurden und welche die MIR- und B3-Domänen auch *in vitro* spezifisch binden können (MIR spezifisch: 637, G10, A60, D6; B3 spezifisch: B3). Alle 5 Antikörper wurden im IgG-ELISA erfolgreich getestet, konnten aber keines der Fusionsproteine binden, mit Ausnahme einer N-terminalen Fusion (AA20-210), die sehr schwach gebunden wurde. Aufgrund dieser Erkenntnis, und der Folgerung, dass die Fusionsproteine nicht funktionell sind, wurden 6 weitere Fusionsproteine hergestellt, die MIR und Bungarotoxin-Bindungsstelle B3 abdecken und zwischen AA210 und 232 enden; auch diese wurden nicht von den vorhandenen Antikörpern gebunden. Wir haben dann versucht, das Konstrukt AA20-210 zu optimieren, indem wir einerseits einen Linker (GGGG) zwischen die Acetylcholinrezeptordomäne und den NLuc-Reporter einfügten und andererseits den Cys-Loop der extrazellulären Domäne durch den entsprechenden Cys-Loop aus *Lymnea stagnalis* ersetzten. Letztere wurde als hydrophiler und damit löslicher beschrieben und soll mit der Mutation T141N eine sehr starke Bindung an Bungarotoxin gezeigt haben (Lazaridis et al, 2014). Leider haben beide Optimierungsvarianten die Bindung an die getesteten Antikörper nicht verbessert. Somit konnten bisher keine Informationen über funktionelle Domänen gewonnen werden und das Design der chimären CAR-Konstrukte konnte nicht erfolgen. Der Acetylcholinrezeptor wird derzeit nicht weiterverfolgt, da wir andere Antigene identifiziert haben, die vielversprechender sind.

Ein solches ist haben wir identifiziert Autoantigen intern benannt „AA01“. Wir haben drei verschiedene Antikörper gegen AA01 *in vitro* produziert, um genügend Material für die Verifizierung und Entwicklung von CAR-Zelllinien zu haben. Bisher konnten zwei Antikörper gegen AA01 erfolgreich an den entsprechenden CAR-Zelllinien getestet werden. Ein Konstrukt, das die Sequenzen einer membrangebundenen Form eines der beiden Antikörper enthält, wurde konstruiert und wird derzeit zusammen mit einem Konstrukt, das die Sequenzen von CD79A und CD79B enthält, in der B-Zelllinie NALM-6 co-exprimiert. Die endgültigen Zelllinien werden für die Testung der rekombinanten AA01-CAR-Konstrukte verwendet.

#### **AP 4.3. Chimäre Antigen-Konstrukte**

In diesem AP war geplant, die in AP4.1 und 4.2 identifizierten Zielstrukturen in ein CAR-Konstrukt zu integrieren und so transgene CAR-NK-Zellen herzustellen. Die ersten klinischen Daten zu CD19-CAR-T-Zellen, die zur Behandlung von SLE-Patienten mit Autoimmunerkrankungen eingesetzt wurden, zeigen, dass diese Strategie ausreicht, um alle Entwicklungsstadien der B-Zellen zu eliminieren, die zur Krankheitsentstehung beitragen. Daher würde die Entwicklung eines dualen CARs, der sowohl für den autoreaktiven B-Zell-Rezeptor (BCR) spezifische CARs als auch CD19-CARs enthält, keinen

therapeutischen Vorteil bieten. Stattdessen wäre ein einzelnes, BCR-selektives CAR, das gezielt nur die autoreaktiven B-Zellen angreift, von großem Vorteil. Ein solcher Ansatz würde ausschließlich autoreaktive B-Zellen eliminieren, während gesunde B-Zellen, die für den Antikörperschutz gegen Infektionskrankheiten essenziell sind, unberührt blieben. Diese Konstrukte sollen im Gegensatz zu CD19.CAR spezifisch nur autoreaktive B-Zellen zerstören und es ist davon auszugehen, dass die Patienten während der Therapie keine intravenösen Immunglobuline erhalten müssen.

Aus diesem Grund haben wir identifizierte Peptide genutzt und ein CAR der zweiten Generation entwickelt. Wir haben die zwei besten Peptide ausgesucht: eines aus dem Type 1 Diabetes assoziierten Antigen T1D01 und AA01. Ein CAR Konstrukt, welches das erste identifizierte autoreaktive von Epitop T1D01 (T1D01.CAR) enthält wurde kloniert und durch lentiviralen Gentransfer in NK-Zellen eingebracht. Wir konnten T1D01.CAR auf der Zelloberfläche nachweisen. Die Expression von T1D01.CAR musste über mehrere Schritte optimiert werden, final konnte aber eine stabile CAR-Expression in über 60% der Zellen erreicht werden. Diese Zellen zeigten eine spezifische Funktionalität, gezeigt anhand eines Degranulationsassays nach Stimulation mit immobilisierten autoreaktiven Antikörpern gegen das T1D01-Protein. Darüber hinaus konnten wir mittels eines Co-Kultur Assays, die Abtötung der P18-Zelllinie nachweisen, die mit anti- T1D01-Antikörpern beladen wurde – ein Surrogat-Assay für autoreaktive B-Zellen.

Als nächstes haben wir CAR-Konstrukte, welche das autoreaktive Epitop AA01 enthalten, hergestellt und damit NK-Zellen transduziert. Das AA01-CAR zeigte in NK-92 eine hohe Oberflächenexpression in über 95% der Zellen, die auch über lange Zellkulturzeiten stabil war. Wir konnten das AA01-CAR auch in primäre NK-Zellen transduzieren, wobei in diesen Zellen die CAR-Expression zunächst niedriger war. Dies sollte jedoch durch die Verwendung des überlegenen Lentivirus-Envelopes, der in AP1 identifiziert wurde, verbessert werden. Die Funktionalität der CAR-NK-Zellen wurde durch einen Degranulationsassay gegen immobilisierte autoreaktive Antikörper nachgewiesen. Die Testung der Zytotoxizität gegen patientenabgeleitete autoreaktive B-Zellen gestaltet sich schwierig, da diese Zellen im peripheren Blut nur in sehr geringer Anzahl vorhanden sind. Daher haben wir den anti-AA01-B-Zell-Rezeptor in die humane B-Zell-Linie NALM-6 kloniert (siehe AP2) und diese als Modell für Killing-Assays spezifischer AA01-autoreaktiver B-Zellen verwendet. Dabei konnten wir eine gezielte Zytotoxizität nachweisen, was darauf hinweist, dass die CAR-NK-basierte Eliminierung autoreaktiver B-Zellen ein funktioneller Ansatz ist, der weiterentwickelt und in die klinische Anwendung überführt werden kann.

Diese Daten dienen auch als Grundlage für die nächste Förderphase, in der das Spektrum der autoreaktiven CARs erweitert werden kann, um eine CAR-NK Zellbibliothek für die personalisierte Therapie von B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen zu etablieren.

#### **Zeitplanung und Ausgaben von AP4**

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Die Zeitplanung im Sinne des Gesamt-Zeitraums wurde eingehalten.

### **AP 5. Präklinische in vivo-Validierung der CAR-NK-Zellen (Med. Klinik III)**

#### **AP 5.1. Validierung der CAR-NK-Zellen in NOD-SCID Mäusen**

In diesem Arbeitspaket haben wir die präklinische Wirksamkeit verschiedener CD19.CAR-NK-Zell-Konstrukte getestet, die in AP 1.2 hergestellt wurden. Diese wurden in immundefizienten NOD-SCID-Mausmodellen untersucht. Im ersten Pilotexperiment konnten wir eine zunehmende Tötungs-Effizienz bei optimierten CD19.CAR-NK-Zellen zeigen. Dieser Trend war jedoch nicht statistisch signifikant.

#### **AP 5.2. Humanisiertes Mausmodell für Typ-1-Diabetes**

Im Laufe des Projekts wurden neue Erkenntnisse veröffentlicht, die zeigen, dass CD19.CAR-T-Zellen erfolgreich zur Behandlung des systemischen Lupus erythematoses (SLE) eingesetzt werden können. Daher haben wir uns entschieden, unsere selbst entwickelten CAR-NK-Zellen in präklinischen Mausmodellen für SLE zu testen. Tatsächlich erfordern die derzeit laufenden klinischen Studien mit CAR-T-Zellen keine humanisierten Mausmodelle, da es derzeit keine geeigneten humanisierten Mausmodelle für SLE gibt, die im Vergleich zu NSG-Mäusen aussagekräftigere Daten zur Wirksamkeit und Sicherheit liefern würden. Ermutigt durch vielversprechende Ergebnisse aus AP 5.1 haben wir stattdessen das Injektionsprotokoll optimiert und die Anzahl der Mäuse erhöht, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass optimierte CD19.CAR-NK-Zellen CD19-exprimierende B-Zellen erfolgreich eliminieren konnten. Diese Daten sind vielversprechend für die klinische Translation der optimierten CD19.CAR-NK-Zellen.

#### **Zeitplanung und Ausgaben von AP5**

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Die Zeitplanung im Sinne des Gesamt-Zeitraums wurde eingehalten.

### **3. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Autoimmunerkrankungen stellen eine große Gruppe volkswirtschaftlich relevanter Erkrankungen dar, die trotz erheblicher Fortschritte in der konventionellen Therapie in vielen Fällen weiterhin einen hohen ungedeckten medizinischen Bedarf (unmet medical need) aufweisen. Erste klinische Studien mit CAR-T-Zellen zur Behandlung schwerer Autoimmunerkrankungen wie SLE sind vielversprechend und haben zu kompletten Remissionen in Patienten geführt. Der Einsatz von CAR-T-Zellen bringt jedoch Herausforderungen hinsichtlich Sicherheit und finanzieller und produktionstechnischer Verfügbarkeit mit sich.

NK-Zellen haben sich in klinischen Studien zur Krebsbehandlung als sicher erwiesen, und wir gehen davon aus, dass ein solches Produkt für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen auf große Nachfrage stoßen wird, insbesondere in Indikationen, bei denen nur ein geringes Risiko akzeptiert wird. Angesichts der großen Zahl an Patienten mit Autoimmunerkrankungen erscheint das Marktpotenzial dieses Produkts besonders attraktiv.

Im Projekt CARENK-AID haben wir neuartige, patentierbare CAR-NK-Zellen entwickelt, die ein hohes wirtschaftliches Potenzial besitzen und das Potenzial haben, zu einem kommerziellen Produkt für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen weiterentwickelt zu werden. Konkret haben wir optimierte

CAR-Vektoren entwickelt, die eine bessere Persistenz und höhere Sicherheit erzielen, sowie neue Antigenstrukturen für Autoimmunerkrankungen identifiziert, um das CAR-Targeting effektiver und spezifischer zu gestalten.

In diesem Projekt lag unser Fokus auf NK-Zellen, da sie im Gegensatz zu T-Zellen universell für mehrere Patienten einsetzbar sind und sich ideal für eine „off-the-shelf“-Produktion eignen, was zu einer Reduzierung der Produktionskosten führt und daher von großem wirtschaftlichem Interesse ist. Um die Anzahl der Dosen pro Charge zu maximieren, haben wir ein einzigartiges Feeder-Zellsystem entwickelt, mit dem Ziel, ein kryokonserviertes Produkt herzustellen.

Die in diesem Projekt gewonnenen Daten sollen als Grundlage für weitere Drittmittelprojekte dienen, welche die Produkt- und Prozessentwicklung sowie die Automatisierung des Verfahrens vorantreiben. Ziel ist es, ein Technology Readiness Level zu erreichen, das für private Investoren attraktiv ist.

Falls unser Förderantrag erfolgreich ist und das Projekt bewilligt wird, planen wir, innerhalb der nächsten zwei Jahre ein Spin-off an der TU Dresden zu gründen. Zwei Jahre später ist die Durchführung einer ersten klinischen Studie vorgesehen, die teilweise durch private Investoren finanziert werden soll. Diese Ausgründung soll dazu beitragen, den Standort Deutschland im Bereich der Zell- und Gen-Therapie-Biotechnologie zu stärken.

Das Projekt adressiert neue und grundlegende Fragestellungen in einem hochrelevanten und sich derzeit rasant entwickelnden Feld zellbasierter Therapieansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Wir haben Daten generiert, aus denen – unabhängig von einer möglichen kommerziellen Verwertung der Ergebnisse – davon auszugehen ist, dass die im Rahmen von CARENK-AID erzielten Erkenntnisse nach Ablauf der ersten Förderphase in international sichtbaren Publikationen mit hohem Impact veröffentlicht werden.

Wir haben technische Lösungen entwickelt, die in ein klinisches Produkt überführt werden können, das einen therapeutischen Fortschritt in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen darstellen könnte und ein hohes Potenzial hat, den betroffenen Patienten zugutezukommen. Obwohl die klinische Wirksamkeit noch nicht bekannt ist, liefern bereits jetzt die Teilprojekte wichtige Erkenntnisse zur Rolle von NK-Zellen bei Autoimmunerkrankungen sowie zur genetischen Modifikation von NK-Zellen, aus denen sich möglicherweise weitere innovative Therapiekonzepte ableiten lassen.

Der wissenschaftliche Nutzen der Teilprojekte beschränkt sich nicht nur auf den Therapieansatz der CAR-NK-Zelltherapie für Autoimmunerkrankungen, sondern kann auch zu relevanten Erkenntnissen in anderen Forschungsbereichen beitragen. Dazu zählen insbesondere die Optimierung von CAR-Vektoren, der Gentransfer sowie die Expansion von NK-Zellen, die auch für die CAR-NK-Zelltherapie in der Onkologie von hoher Relevanz sind.

Die veröffentlichten Daten werden außerdem dazu beitragen, weitere wissenschaftliche Netzwerke für Folgeprojekte aufzubauen und die Zelltherapiekonzepte für einen erfolgreichen klinischen Einsatz weiter zu optimieren. Zur Wahrung des Neuheitsanspruchs für Patentanmeldungen sind Veröffentlichungen frühestens zwei Jahre nach Projektende zu erwarten.

#### **4. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Während der Laufzeit des CAREnK-AID-Projekts wurden zahlreiche Fortschritte auf dem Gebiet der zellulären Immuntherapie, insbesondere im Bereich der CAR-T-Zellen, durch andere Forschungsgruppen und Unternehmen erzielt.

Die ersten klinischen Studien am Menschen mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen zeigten ermutigende und langanhaltende klinische Wirksamkeit bei SLE und anderen Autoimmunerkrankungen (Mackensen 2022, DOI: 10.1038/s41591-022-02017-5; Muller 2024, DOI: 10.1056/NEJMoa2308917). Diese Daten sind von großer Bedeutung, da sie einen klinischen Proof of Concept liefern, dass die Therapie schwerkranke Autoimmunpatienten heilen kann. Allerdings ist die autologe CAR-T-Zelltherapie sehr kostspielig, technologisch und logistisch anspruchsvoll und schränkt den Zugang für eine größere Anzahl von Patienten erheblich ein.

NK-Zellen haben das Potenzial, als "off-the-shelf"-Produkt verwendet zu werden, dass in allogenen Therapieansätzen einsetzbar ist. Dies könnte die Produktionskosten senken und die Therapie nicht nur preislich, sondern auch logistisch für mehr Patienten zugänglich machen. Darüber hinaus haben NK-Zellen ein deutlich besseres Sicherheitsprofil im Vergleich zu T-Zellen gezeigt – ein besonders kritischer Faktor im Bereich der Autoimmunerkrankungen, im Gegensatz zur Onkologie.

Die während des Projekts gewonnenen Erkenntnisse wurden regelmäßig mit den neuesten wissenschaftlichen Veröffentlichungen abgeglichen, um die eigene Strategie anzupassen und die Effizienz der entwickelten Technologien zu optimieren. Zudem erfolgte eine kontinuierliche Beobachtung des regulatorischen Umfelds, um die zukünftige klinische Translation der im Projekt entwickelten CAR-NK-Zellen bestmöglich vorzubereiten.

#### **5. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF**

Auf Basis der oben beschriebenen Ergebnisse werden derzeit zwei Patentanmeldungen vorbereitet. Nicht patentsensible präklinische Daten zu CD19-CAR-NK-Zellen wurden bereits in *Frontiers in Immunology* veröffentlicht (DOI: 10.3389/fimmu.2023.1226518). Darüber hinaus wurde im Rahmen des CAREnK-AID-Projekts ein Übersichtsartikel publiziert, der die wissenschaftlichen Grundlagen, technologischen Entwicklungen und potenziellen klinischen Anwendungen von CAR-NK-Zellen für Autoimmunerkrankungen zusammenfasst (DOI: 10.37349/eemd.2023.00002).

Um die Patentstrategie nicht zu gefährden, erfolgt die Veröffentlichung weiterer projektrelevanter Daten erst nach Erreichen der Prioritätsanmeldung. Die Manuskripte sind bereits in Vorbereitung und werden nach erfolgten Patentanmeldungen in renommierten Fachzeitschriften eingereicht. Zudem sind Präsentationen auf internationalen Konferenzen geplant, um die Ergebnisse einem breiten wissenschaftlichen Publikum zugänglich zu machen.