

gefördert vom



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Schlussbericht zum Vorhaben COMMUTE (03GW0341)

'Wirkstofftransport: Kombinatorisches und multidisziplinäres Targeting von effektiven
Gentherapie Vektoren'

Teilprojekt P5

Zuwendungsempfänger:	Prof. Dr. med. Friedrich Nolte
Ausführende Stelle:	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) Institut für Immunologie
Vorhabenbezeichnung:	Targeting von AAV9 auf Muskelzellen und Glioblastomzellen
Förderkennzeichen:	16GW0341
Laufzeit:	01.03.2021 - 30.11.2024

1. Kurze Darstellung

1.1 Hintergrund und Aufgabenstellung

Adeno-assoziierte Viren (AAV) bilden als Vektoren die Grundlage für hochwirksame und sichere Gentherapeutika. Sie sind bereits für die Behandlung verschiedener Erkrankungen zugelassen und können als Genschleusen durch die Übertragung von Nukleotidsequenzen mutierte Gene reparieren oder ersetzen. Die breite Anwendung und systemische Gabe von AAV-Vektoren steht jedoch der Herausforderung gegenüber, gezielt bestimmte Organe und Zelltypen anzusteuern. Zwei besonders schwer zu erreichende Zielstrukturen sind die Muskulatur, einschließlich der Skelettmuskulatur, des Herzens und des Zwerchfells, die bei schweren Erkrankungen wie der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) betroffen sind, sowie das zentrale Nervensystem (ZNS), das durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt ist. Diese Barriere erschwert den Zugang von AAV-Vektoren zu erkrankten Gehirnzellen oder zu Gehirntumoren wie Glioblastomen.

Das übergeordnete Ziel von COMMUTE war die Entwicklung effizienter und sicherer AAV-basierter Therapeutika für die Gentherapie von Muskeldystrophien und Glioblastomen mittels gerichteter AAV-Vektoren. Das Projekt des Koch-Nolte Labors am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf konzentrierte sich darauf, AAV9 gezielt auf Muskelzellen und Glioblastome auszurichten, indem Zell-spezifische Nanobodies in die AAV-Kapsidstruktur integriert wurden. Nanobodies sind kleine, lösliche, einzelne Immunglobulin-Domänen der besonderen Antikörper von Kameliden wie Lamas und Alpakas. Die Nanobodies wurden so ausgewählt, dass sie spezifisch an Zelloberflächenproteine binden, die auf Muskelzellen oder Glioblastomzellen überexprimiert werden.

1.2 Stand der Wissenschaft und Technik

Die Entwicklung von gerichteten AAV-Vektorpartikeln ist ein aktives Forschungsfeld, das Vektortypen hervorbringt, die auf spezifische Zelltypen, Gewebe und Tierarten zugeschnitten sind. Das Hauptziel dieser Entwicklungsarbeiten ist eine verbesserte *in vivo* Gentransduktion der Zielzellen in räumlich und zeitlich kontrollierter Weise. Hierzu wird einerseits die Expression des Transgens gesteuert durch Veränderung von regulatorischen Sequenzen innerhalb des Vektorgenoms und andererseits die Zelleintrittsmerkmale der Vektorpartikel modifiziert. Bei der Modifikation der Vektorpartikel wird zwischen rationalem Design und Bibliotheks-basierten Ansätzen unterschieden. Beide Strategien wurden im COMMUTE Verbundprojekt verfolgt und miteinander kombiniert.

Bibliotheks-basierte Ansätze beruhen auf einer sehr großen Anzahl von Kapsidvarianten, die auf ihrer Oberfläche randomisierte, kurze Peptide von ca. 7-9 Aminosäuren tragen. Aus diesen Bibliotheken werden entweder *in vitro* in Zellkulturen oder *in vivo* in Versuchstieren Varianten mit den gewünschten Eigenschaften selektiert, z.B. solche, die eine verbesserte Gängigkeit der Blut-Hirn-Schranke aufweisen.

Das Koch-Nolte Labor verfolgt die Strategie des rationalen Kapsid-Designs auf Basis der langjährigen Expertise in der Herstellung von Nanobodies (löslichen Einzeldomänen-Antikörpern), die spezifisch gegen Membranproteine gerichtet sind. In einer richtungsweisenden Proof-of-Concept Studie in Zusammenarbeit mit dem Grimm-Labor in Heidelberg konnten wir zeigen, dass sich die Transduktionseffizienz und der zelluläre Tropismus von AAV-Vektoren mithilfe von Membranprotein-spezifischen Nanobodies um das 50- bis 500-fache steigern lassen¹. Hierzu wurde ein Nanobody gegen ein spezifisches Membranprotein in eine exponierte Oberflächenschlaufe des VP1-Kapsidproteins von AAV2 integriert – ohne dabei die Effizienz der Vektorproduktion zu beeinträchtigen. Da es pro AAV-Kapsid lediglich 3–5 Kopien des VP1-Proteins gibt, lässt sich das VP1-Nanobody-Fusionsprotein von AAV2 auch mit den VP2- und VP3-Kapsidproteinen von AAV9 oder anderen AAV-Serotypen kombinieren. Der Nanobody lässt sich in einer „Legostein-ähnlichen

¹ Eichhoff AM, [...], Grimm D, Adriouch S, Koch-Nolte F. Nanobody-Enhanced Targeting of AAV Gene Therapy Vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Sep 16;15:211-220. doi: 10.1016/j.omtm.2019.09.003.

Bauweise“ austauschen – gegen Nanobodies, die an ein spezifisches Membranprotein binden, das z. B. auf der Oberfläche von Skelettmuskel- oder Glioblastomzellen hoch-exprimiert ist.

1.3 Ablauf des Vorhabens

Das Ziel von COMMUTE war, Engpässe zu überwinden, die die Entwicklung effizienter und sicherer AAV-Therapeutika für die intravenöse Gentherapie von Muskeldystrophien und ZNS-Tumoren behindern. Zu diesen Engpässen gehören die geringe Zellspezifität der AAV-Vektoren und die mangelnde Erreichbarkeit des ZNS. Das Gesamtvorhaben beinhaltete folgende Schritte:

(i) Die Selektion neuer gerichteter AAV-Varianten aus randomisierten AAV-Kapsidbibliotheken in Tiermodellen.

(ii) Die Etablierung rationaler Targeting-Strategien durch Insertion von Membranprotein-spezifischen Liganden, die mit den verbesserten Kapsiden kombiniert werden können.

(iii) Die Validierung der neuartigen Vektoren in präklinischen Modellen der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und des Glioblastoms, im Vergleich zu etablierten AAV-Konstrukten, die therapeutische Gene exprimieren.

Für dieses Vorhaben wurde ein Konsortium an Experten gebildet, bestehend aus Forschungsgruppen an fünf verschiedenen Standorten in Deutschland:

Koordinator (Partner 1, P1): Prof. Dr. Dirk Grimm, Universitätsklinikum Heidelberg

P2: Prof. Dr. Hildegard Büning, Hannover Medical School

P3: Prof. Dr. Christian Buchholz, Paul-Ehrlich-Institut Langen

P4: Prof. Dr. Oliver Müller, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

P5: Prof. Dr. Friedrich Nolte, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Das Teilvorhaben des Koch-Nolte Labors am UKE in Hamburg befasste sich mit der rationalen Targeting-Strategie unter Verwendung von Nanobodies, die an Membranproteine binden, die spezifisch auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert werden (Skelettmuskel- und Glioblastomzellen). Diese Targeting-Strategie sollte mit den selektionierten Kapsid-Varianten der anderen Partner kombiniert und final in präklinischen Modellen evaluiert werden.

1.4 Wesentliche Ergebnisse und Kooperationen

Das Koch-Nolte Labor hat erfolgreich Glioblastom- und Muskel-gerichtete AAV-Vektoren generiert - durch die Insertion von Nanobodies gegen Zelloberflächenproteine der Zielzellen. Hierfür wurden geeignete Membranproteine recherchiert, spezifische Nanobodies selektiert und die Bindung an Zielzellen validiert. Die bereits etablierte Technologie der Insertion von Nanobodies in das VP1 Kapsidprotein von AAV2 wurde auf den Serotyp AAV9 übertragen. Dieser wurde zusätzlich mit einer Mutation verändert, die die Bindung an den natürlichen Rezeptor hemmt und die Transduktion von *off-target* Organen, insbesondere der Leber, senkt. Die ausgewählten Nanobodies wurden erfolgreich in das Rezeptor-verblindete AAV9-Kapsid insertiert und zusätzlich mit selektionierten AAV-Varianten der Kooperationspartner Prof. Dirk Grimm, Prof. Hildegard Büning und Prof. Oliver Müller kombiniert. Einige der hergestellten Nanobody-tragenden Glioblastom- und Muskel-gerichteten AAV zeigten eine stark verbesserte Transduktion der jeweiligen Zielzellen, sowohl im Vergleich mit Zellen, die das Membranprotein nicht exprimierten als auch im Vergleich mit AAVs, die den Nanobody nicht tragen.

In einem präklinischen Mausmodell konnte mit einem Lead-Kandidaten das *Proof-of-Concept* erbracht werden, dass Nanobody-tragende Muskel-gerichtete AAV Skelett- und Herzmuskulatur ~100fach besser transduzieren als Kontroll-AAV ohne Nanobody bei gleichzeitig stark reduzierter Transduktion der Leber und anderer *off-target* Organe.

2. Ausführliche Darstellung

2.1 Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Rahmen des Vorhabens hat das Koch-Nolte Labor geeignete Membranproteine für das Nanobody-vermittelte Targeting von Skelett- und Glioblastomzellen mit AAV-Vektoren ermittelt. Zum Projektstart wurde zunächst eine eingehende Literaturrecherche durchgeführt. Anschließend wurden bereits in der Arbeitsgruppe entwickelte Nanobodies sowie publizierte Nanobodies gegen ausgesuchte Membranproteine als rekombinante Schwere-Ketten-Antikörper hergestellt. Die Bindung dieser Antikörper an etablierte humane und murine Glioblastomzelllinien (U87, GL261) und humane Glioblastom-Patientenproben wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei bestätigte sich, dass Membranproteine, die an purinergen Signalwegen beteiligt sind wie P2X7, CD73 und CD39 sowie Checkpoint-Inhibitoren wie PD-L1, häufig auf der Zelloberfläche dieser Zellen überexprimiert sind. Im Vergleich zum ursprünglichen Vorhaben zeigte sich, dass CD73, P2X7 und PD-L1 aufgrund höherer Expression besser geeignet sind als CD39. Als Target für Skelettmuskel-gerichtete Nanobody-AAV wurde ein GPI-verankertes Ektoenzym identifiziert. Die Auswahl geeigneter Nanobodies stellte das Erreichen des ersten Meilensteins von Arbeitspaket 1 dar.

Die selektionierten Nanobodies wurden mittels genetischer Insertion in das AAV-Kapsid eingebaut. Die im Koch-Nolte Labor etablierte Technologie der Insertion von Nanobodies in das Kapsid des Serotyps AAV2 wurde hierfür wie geplant auf den Serotyp AAV9 übertragen, der besser für die Transduktion von Muskelzellen geeignet ist und bereits in geringem Maße die Bluthirnschranke überschreiten kann. Das Kapsid von AAV9 wurde weiterhin durch eine Mutation so verändert, dass die Bindung an den natürlichen Rezeptor gehemmt und die Transduktion der Leber reduziert wird. Die ausgewählten Nanobodies wurden in das Kapsid der Rezeptor-verblindeten AAV9 Variante in das Kapsidprotein VP1 inseriert. Nanobody-tragende AAV-Vektoren wurden mittels transienter Transfektion in HEK293 Zellen hergestellt und aus Zellysaten und -überständen geerntet. Der erfolgreiche Einbau der Nanobodies in das AAV9 Kapsid wurde mittels Western Blot bestätigt, womit der zweite Meilenstein des Arbeitspakets 2 erreicht wurde.

In Zellkulturen zeigten die Nanobody-tragenden Glioblastom-gerichteten AAV9 eine stark verbesserte Transduktion von Glioblastomzellen im Vergleich zu unmodifiziertem AAV9 oder AAV9 mit inseriertem Kontroll-Nanobody, sowohl von etablierten murinen und humanen Zelllinien als auch von primären Patientenproben. Die verbesserte Transduktion wurde durchflusszytometrisch durch Nutzung des Reportergens GFP als übertragenes Transgen der AAV-Vektoren analysiert. Die Nanobody-tragenden Muskel-spezifischen AAV9 zeigten *in vitro* in Zellkulturen von humanen und murinen Zelllinien, die stabil oder transient mit dem Membranprotein transfiziert waren, ebenfalls eine starke Expression des GFP-Reportergens. Die Ergebnisse validierten das Erreichen des wichtigen, dritten Meilensteins des Arbeitspakets 3.

Drei Nanobodies - zwei Glioblastom/ZNS-spezifische Nanobodies und ein Muskel-spezifischer Nanobody - wurden wie geplant mit geeigneten, selektionierten Kapsidvarianten der Grimm-, Büning- und Müller-Labore kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass einige Kombinationen mit hoher Ausbeute und effizientem Einbau der Nanobodies produziert und gereinigt werden konnten, während sich andere weniger effizient produzieren ließen. Bei Transduktion der Zielzellen *in vitro* bestätigte sich das Ergebnis, wobei einige Kombinationen die Transduktion der Zielzellen erheblich verbesserten und andere Kombinationen keinen Vorteil gegenüber den Nanobody-tragenden Rezeptor-verblindeten AAV2 oder AAV9 Varianten darstellten. Der Meilenstein des Arbeitspakets 4, die Generierung von Vektorvarianten mit hoher Ausbeute, wurde für einige Nanobody-tragende AAV-Varianten erreicht.

Die Muskel-gerichteten AAV9 Varianten wurden im Mausmodell mit einem Transgen evaluiert, das für das Enzym Luciferase kodiert, welches bei Gabe des Substrats Luciferin messbares Licht erzeugt. Hierbei zeigte sich eine um das 100fach verstärkte, spezifische Transduktion der Skelett- und Herzmuskulatur mit den Nanobody-tragenden AAV im Vergleich zu Kontroll-Vektoren ohne

Nanobody und im Vergleich zu Mäusen, in denen das Membranprotein genetisch inaktiviert war. Zudem war die Transduktion der Leber und anderer *off-target* Organe stark reduziert. Der fünfte Meilenstein der Validierung der Spezifität der besten Nanobody-tragenden AAV-Vektoren wurde somit für die Muskel-gerichteten Vektoren erreicht.

Eine Evaluation der Glioblastom-gerichteten Nanobody-AAV im Mausmodell konnte während der Laufzeit des Vorhabens nicht erfolgen. Die Versuche werden in Kooperation mit Forschern der neurochirurgischen Klinik am UKE im Rahmen eines von der Deutschen Krebshilfe geförderten Projekts fortgeführt.

Im Grimm Labor wurde eine umfangreiche Bibliothek an AAV-Varianten mit individuellen Barcodes produziert. Die Bibliothek enthält die wichtigsten selektionierten Peptid-tragenden AAV Kapside der Labore Grimm, Büning und Müller sowie Kombinationen mit den Protein-Liganden (DARPin, Nanobodies) der Buchholz und Koch-Nolte Labore und etablierte Vektoren. Diese barcodierte Bibliothek wird im Nachgang des COMMUTE Vorhabens im Großtiermodell evaluiert, um Lead-Kandidaten als Voraussetzung für klinische Phase-I/-II Studien im Menschen zu ermitteln.

Zusammenfassend hat das Teilprojekt des Koch-Nolte Labors durch die erfolgreiche Selektion und Insertion von Muskel- und Glioblastom-spezifischen Nanobodies in AAV-Vektoren die Ziele des COMMUTE Vorhabens vorangetrieben: die Entwicklung effizienter und sicherer AAV-Therapeutika für die intravenöse Gentherapie von Muskeldystrophien und ZNS-Tumoren.

2.2 Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die beantragten Personalmittel wurden wie geplant für die in diesem Vorhaben tätige Wissenschaftlerin Dr. Anna Marei Mann verwendet und zeitweise auch für technische Assistentinnen. Sachmittel, Dienstreisen und die sonstigen allgemeinen Verwaltungsausgaben wurden im geplanten Rahmen verausgabt.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Die Notwendigkeit der im COMMUTE Projekt geleisteten Arbeiten basiert auf dem akuten, ungedeckten Bedarf an zielgerichteten und wirksamen Therapien für Hirntumore wie dem Glioblastom und Muskeldystrophien wie Duchenne. Die Behandlungsmöglichkeiten für Glioblastompatienten sind begrenzt und die Standardtherapie aus Bestrahlung, Operation und Chemotherapie verlängert die Lebenszeit nur gering (15-18 Monate). Für die Behandlung von Duchenne Muskeldystrophie wurde im Jahr 2023 von der FDA die AAV-basierte Gentherapie 'Elevidys' zugelassen. Die Zulassung birgt Hoffnung und verdeutlicht das Potenzial AAV-basierter Therapien. Da die verwendeten Vektoren jedoch nicht Muskel-spezifisch sind, besteht weiterhin die Notwendigkeit die Effizienz AAV-basierter Therapien zu verbessern und damit Dosis und Nebenwirkungen zu reduzieren. Die im Rahmen des COMMUTE Projekts vom Koch-Nolte Labor geleisteten Arbeiten waren vor diesem Hintergrund notwendig und angemessen, um die Entwicklung von effizienten und sicheren AAV-Therapeutika voranzutreiben.

2.4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der vom Koch-Nolte Labor im Rahmen des COMMUTE Vorhabens verfolgte Ansatz der Ausrichtung von AAV-Vektoren auf Muskel- und Glioblastomzellen mithilfe von Membranprotein-spezifischen Nanobodies konnte erfolgreich umgesetzt werden. Die entwickelten Nanobody-tragenden AAV-Varianten sind potentiell für die humane Gen- und Tumorthherapie nutzbar, insbesondere für die Behandlung von Tumorerkrankungen des zentralen Nervensystems und muskulären Erkrankungen wie der Duchenne Muskeldystrophie. Der Zuwendungsempfänger Prof. Friedrich Nolte und das Team der um die im COMMUTE-Vorhaben tätige Wissenschaftlerin Dr. Anna Marei Mann werden die Verwertung der entwickelten Nanobody-tragenden AAV-Varianten im Rahmen des Programms 'Go-Bio *initial*' des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt weiter vorantreiben. Konkret geplant ist hierfür die Ausarbeitung eines Verwertungsfahrplans für die Entwicklung von Nanobody-AAV Therapeutika zur

Behandlung von Glioblastom und Muskeldystrophie. Hierfür wird das Marktpotenzial und die Konkurrenzsituation betrachtet und eine professionelle Freedom-to-Operate Analyse durchgeführt.

Die technische Weiterentwicklung der Glioblastom-gerichteten Nanobody-AAV wird außerdem von Prof. Friedrich Nolte und Dr. Anna Marei Mann im von der Deutschen Krebshilfe geförderten Projekt 'National Hub for Nanobody Cancer Theranostics' (THUNDER) zusammen mit Glioblastom-Experten an den Universitätskliniken in Hamburg und Bonn verfolgt. Die Muskel-spezifischen Nanobody-AAV werden im Rahmen einer von der Werner Otto Stiftung geförderten Doktorarbeit weiterentwickelt.

Insgesamt werden die Ergebnisse des COMMUTE Projekts sowohl akademisch-wissenschaftlich als auch industriell-wirtschaftlich weiterverfolgt und verwertet.

2.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Vorhabens wurde die im Koch-Nolte Labor entwickelte Technologie der Insertion von Membranprotein-spezifischen Nanobodies in AAV Kapside zur Verbesserung der Zellspezifität auch von anderen Forschungsgruppen verifiziert. Hamann et al. veröffentlichten 2021 die verbesserte Transduktion von humanen T-Zellen durch Nanobody-tragende AAV2 Vektoren². Bisher wurde von anderen keine verbesserte Transduktion von Skelettmuskulatur oder Glioblastomen mit Nanobody-tragenden AAV-Vektoren publiziert. Der COMMUTE-Verbundpartner (P3) Christian Buchholz veröffentlichte präklinische Ergebnisse der Therapie von Glioblastomen mit einer Kombination aus DARPin-tragenden AAV-Vektoren und CAR-NK-Zellen, die das Potential rationaler Targeting-Strategien für AAV-Vektoren unterstreicht³.

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Erfolgte Veröffentlichungen:

Hambach J, Mann AM, Bannas P, Koch-Nolte F. Targeting multiple myeloma with nanobody-based heavy chain antibodies, bispecific killer cell engagers, chimeric antigen receptors, and nanobody-displaying AAV vectors. *Frontiers in Immunology* 2022 Nov 2;13:1005800.

Demeules M, Scarpitta A, Hardet R, Gondé H, Abad C, Blandin M, Menzel S, Duan Y, Rissiek B, Magnus T, Mann AM, Koch-Nolte F, Adriouch S. Evaluation of nanobody-based biologics targeting purinergic checkpoints in tumor models *in vivo*. *Frontiers in Immunology* 2022 Oct 19;13:1012534.

Mann AM, Schäfer W, Adriouch S, Börner K, Grimm D, Braren I, Koch-Nolte F. Enhanced Transduction of P2X7-Expressing Cells with Recombinant rAAV Vectors. *Methods Mol Biol.* 2022; 2510:129-144.

Geplante Veröffentlichungen:

Geplant ist eine Veröffentlichung der Ergebnisse zu Glioblastom-gerichteten Nanobody-AAV in einer Sonderausgabe des Journals 'Neuropharmacology', Ende 2025.

Die Publikation der Ergebnisse zu Muskel-gerichteten Nanobody-AAV ist nach Abschluss vertiefender *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse in einem geeigneten Fachjournal geplant.

² Hamann MV et al. Improved targeting of human CD4+ T cells by nanobody-modified AAV2 gene therapy vectors. *PLoS One.* 2021 Dec 20;16(12):e0261269.

³ Strecker MI, [...], Buchholz CJ, Burger MC. AAV-mediated gene transfer of a checkpoint inhibitor in combination with HER2-targeted CAR-NK cells as experimental therapy for glioblastoma. *Oncoimmunology.* 2022 Oct 11;11(1):2127508.