

SAXOCELL®

Abschlussbericht Teil I: Kurzbericht

Berichtszeitraum: 15.10.2021 – 14.10.2024

Verbundvorhabentitel:

SaxoCell: Etablierung einer Plattform für die automatisierte Herstellung allogener
CAR-NK-Zelltherapeutika zur Behandlung spezifischer Krebserkrankungen
(SaxoCell_CARNK4)

Einreichender Zuwendungsempfänger:

Dr. Jens Pahl, Affimed GmbH 03ZU1111CE

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. Dr. Ulrike Köhl, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie
IZI & Universität Leipzig, 03ZU1111CA**

Dr. Anna Dünkel und Dr. Paul Franz

Partner inklusive Förderkennzeichen:

PD Dr. M. Hänel, Klinikum Chemnitz gGmbH, 03ZU1111CB

Prof. Dr. Ulrich Hacker, UCCL Krebszentrum Leipzig, 03ZU1111CC

Prof. Dr. med. Uwe Platzbecker, Medizinische Klinik I, 03ZU1111CC

Dr. Jens Pahl, Affimed GmbH 03ZU1111CE

Dr. Dominika Lukas, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, 03ZU1111CD

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03ZU1111CA gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

Verantwortliche Autoren

Dr. Dominik Schmiedel; Dr. Thomas Grunwald;

Dr. Claire Fabian; Sandra Palm;

Dr. Sebastian Huhn; Dr. Jens Pahl

Etablierung einer Plattform für die automatisierte Herstellung allogener CAR-NK-Zelltherapeutika zur Behandlung spezifischer Krebserkrankungen

Im Projekt CAR-NK4.0 arbeiten die akademischen Partner Fraunhofer IZI, Universität Leipzig und das Universitätsklinikum sowie das Klinikum Chemnitz gemeinsam mit der Affimed GmbH und der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG an dem gemeinsamen Ziel, eine KI-gestützte CAR-NK-Zellplattform (CAR-NK4.0) und einen vollautomatischen Herstellungsprozess für eine Phase I-Studie eines allogenen, zielgerichteten CAR-NK-Ansatzes zur Behandlung von myeloischen Neoplasien zu entwickeln. In diesem ehrgeizigen Projekt wird der innovative Herstellungsprozess für CAR-NK Zellen weiterentwickelt und gleichzeitig wird die Effektivität der CAR-NK Zellen durch verschiedene Strategien, wie z.B. duales Targeting, AAV-vermittelten und lentiviralen Gentransfer und neuartige Methoden zur Zellaktivierung optimiert.

In einer Proof-of-Concept-Studie wurde seitens der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG ein digital gesteuertes, automatisiertes Verfahren zur Herstellung chimärer Antigenrezeptor (CAR)-tragender primärer natürlicher Killerzellen (NK) entwickelt. Dieser sogenannte Natural Killer Cell Transduction (NKCT) Prozess wurde auf dem CliniMACS Prodigy® am Fraunhofer IZI erfolgreich implementiert. Die notwendigen Qualitätskontrollen wurden innerhalb des Projektes gemeinsam erarbeitet. Der erfolgreiche Tech-Transfer führte zur Planung und Durchführung von CAR-NK-Zell-Herstellungsläufen in Leipzig unter Verwendung eines Vektors, welcher von Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG bereitgestellt wurde. Diese Prozesse sind bereit, um in eine GMP-Umgebung transferiert zu werden.

Im Lauf des Projektes wurde bei Miltenyi Biotec ein verbesserter target-spezifischer CAR lentiviraler Vektor in präklinischer Qualität hergestellt. Passend dazu wurde ein Prozess zur Herstellung von verbesserten target-spezifischen CAR-NK-Zellen im small-scale Bereich etabliert und verifiziert. Das Konstrukt wurde in Hinblick auf verschiedene prozess-kritische Parameter optimiert. Die Herstellung von weiter optimierten target-spezifischen NK Zellen auf der Miltenyi-proprietären CliniMACS Prodigy Plattform wurde durchgeführt. Eine weitere Überführung des Vektorkonstruktes in die klinische Forschung ist somit möglich. Das Ziel des Arbeitspaketes wurde erreicht und eine verbesserte CAR-NK-Zell Funktionalität durch weiteres Genetic Engineering erreicht.

Für die klinische Translation der Anwendung der CAR-NK-Zellen wurden durch das Klinikum Chemnitz gGmbH in Zusammenarbeit mit dem Uniklinikum Leipzig Studienkonzepte für die Umsetzung einer interventionellen Phase I/IIa-Studie konzeptioniert. Die Studienprotokolle wurden auf die Behandlung von Patienten mit ungünstiger Prognose und ohne Transplantationsoption mit zielspezifische CAR-NK-Zellen („Bridging to Transplantation“) adaptiert und ein generalisierter Ansatz einer Dosis-Eskalations-Studie bei CD123-positiven

myeloischen Erkrankungen wurde verfolgt. Die Studienprotokolle wurden konzipiert, Endpunkte definiert, der Studienplan statistisch validiert und Monitoring Pläne erarbeitet. Eine Standardisierung konnte in Zusammenarbeit mit SaxoCellClinics erfolgen. Die Umsetzung der Studienprotokolle ist an die Durchführung notwendiger, präklinischer Untersuchungen und eine geeignete Studienfinanzierung gekoppelt. Parallel wurde mit der Einführung der CAR-T-Zelltherapie am Klinikum Chemnitz 2022 eine geeignete Infrastruktur für klinische ATMP-Untersuchen geschaffen. Darüber hinaus stärkte die zelltherapeutische Expertise aller Projektpartner die geplante Studienqualität.

Am Fraunhofer IZI wurden zudem kontinuierlich primäre NK-Zellen aus Patientenmaterial isoliert, um alle Projektpartner mit standardisierten, expandierten NK-Zellen im Labormaßstab für ihre jeweiligen Experimente zu versorgen. Dadurch konnte die Effektivität der CAR-NK-Zellen durch verschiedene Strategien optimiert werden.

Zum einen wurde der Fokus auf die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit Multiplem Myelom (MM) gelegt. Hierbei wurde der Ansatz der Entwicklung von bi-spezifischen CAR-Designs auf der Grundlage von Antikörperfragmenten, die gegen MM-Marker gerichtet sind, verfolgt. In Leipzig, wurde die Herstellung von CAR-NK-Zellen unter Verwendung retroviraler Vektoren zur genetischen Modifikation optimiert, und die bi-spezifische Ausrichtung auf MM-spezifische Tumormarker wurde erfolgreich an Tumorzelllinien getestet [PS1]. Zudem wurden gegen MM-Marker gerichtete CAR-T-Zellen und CAR-NK-Zellen (BCMA, SLAMF7, CD38) verglichen. Während unsere in vitro Versuche eine ähnliche Effizienz beider Zelltherapien gegen Multiple-Myelom-Zellen aufwiesen, zeigten CAR-NK-Zellen ein besseres Sicherheitsprofil, da sie weniger inflammatorische Zytokine ausschütteten und weniger Schäden an gesunden Geweben verursachten.

Des Weiteren wurde am Fraunhofer IZI untersucht, ob die zytotoxische Effizienz von CAR-NK-Zellen durch eine Kombination mit multispezifischen Innate Cell Engagern (ICE®) der Firma Affimed gesteigert werden könne. Als wissenschaftliche Grundlage diente die Beobachtung, dass nur etwa die Hälfte der genetisch modifizierten NK-Zellen tatsächlich CAR-Proteine exprimieren. Hingegen wird der Zytotoxizitätsrezeptor CD16A übergreifend durch NK-Zellen exprimiert und kann mit Hilfe multispezifischer ICE® aktiviert werden. Die Affimed GmbH produzierte für das Projekt erfolgreich ICE® gegen die B-Zell-assoziierten Tumorantigene CD19 und CD20 mit hoher Reinheit und Stabilität. Die am Fraunhofer IZI durchgeführten funktionellen Tests bestätigten ein verbessertes Zytotoxizitätspotential von NK-Zellen nach Behandlung mit CD19 und CD20 ICE®. Im weiteren Verlauf wurde die Wirksamkeit der ICE®-Moleküle in Kombination mit gegen CD19 gerichteten CAR-NK-Zellen untersucht. Dafür wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Uniklinikum Chemnitz geeignetes Spendermaterial identifiziert und für funktionelle Analysen zur Verfügung gestellt. Es konnte gezeigt werden,

dass insbesondere CD20 ICE®-Moleküle die Aktivität von CD19 CAR-NK-Zellen gegen aus Patienten gewonnene maligne B-Zell-Lymphomzellen steigern konnten.

Darüber hinaus wurde am Fraunhofer IZI in Zusammenarbeit mit dem Uniklinikum Leipzig zum ersten Mal eine effiziente, durch AAV-Vektoren vermittelte Transgenexpression in primären menschlichen NK-Zellen gezeigt. Eine breite Palette von AAV-Vektoren wurde auf ihre Aufnahme und Transgenexpression in NK-Zellen getestet. Optimierte Transduktionsbedingungen erhöhten die eGFP-Transgenexpression auf etwa 80 %. Dieses Protokoll konnte auch auf humane NK-Zelllinien (NK-92) übertragen werden. Als Proof-of-Concept wurden NK-Zellen mittels AAV-Vektoren mit CD4-CARs ausgestattet. Diese CD4-CAR-NK-Zellen zeigten eine CD4-spezifische erhöhte Zytotoxizität gegenüber CD4⁺-Zellen im Vergleich zu nativen oder CD19-CAR-exprimierenden NK-Zellen.

Im Rahmen der Projektlaufzeit wurde somit eine automatisierte, KI-gestützte Herstellungsplattform für CAR-NK-Zellprodukte am Standort Leipzig installiert. Parallel dazu wurde das Vektor-Ausgangsmaterial optimiert. Für die klinische Translation wurden an den Klinikstandorten in Leipzig und Chemnitz erhebliche theoretische Vorarbeiten geleistet.

Gleichzeitig wurden neue Ansätze zur Steigerung der Effektivität der CAR-NK-Zellen hinsichtlich der Behandlung von MM-Patienten, der Nutzung von AAV-Vektoren und einer Kombination der CAR-NK-Zellen mit ICE® untersucht. Mit den vielversprechenden Ergebnissen konnte der Grundstein für die Entwicklung alternativer Herstellungsprozesse gelegt werden.

SAXOCELL®

Abschlussbericht Teil II: Eingehende Darstellung

Berichtszeitraum: 15.10.2021 – 14.10.2024

Verbundvorhabentitel:

SaxoCell: Etablierung einer Plattform für die automatisierte Herstellung allogener
CAR-NK-Zelltherapeutika zur Behandlung spezifischer Krebserkrankungen
(SaxoCell_CARNK4)

Einreichender Zuwendungsempfänger:

Dr. Jens Pahl, Affimed GmbH 03ZU1111CE

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. Dr. Ulrike Köhl, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie
IZI & Universität Leipzig, 03ZU1111CA**

Dr. Anna Dünkel und Dr. Paul Franz

Partner inklusive Förderkennzeichen:

PD Dr. M. Hänel, Klinikum Chemnitz gGmbH, 03ZU1111CB

Prof. Dr. Ulrich Hacker, UCCL Krebszentrum Leipzig, 03ZU1111CC

Prof. Dr. med. Uwe Platzbecker, Medizinische Klinik I, 03ZU1111CC

Dr. Jens Pahl, Affimed GmbH 03ZU1111CE

Dr. Dominika Lukas, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, 03ZU1111CD

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03ZU1111CA gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

Verantwortliche Autoren

Dr. Jens Pahl

Entwicklung und Präklinische Validierung von CAR-NK-Zellprodukten in Kombination mit bispezifischen Innate Cell Engager (ICE®) zur Behandlung Verschiedener Krebserkrankungen

Das Forschungsvorhaben AP4 befasste sich mit dem Ziel die zytotoxische Aktivität von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) spezifisch gegenüber Tumorzielzellen mit Hilfe von durch Affimed entwickelten tetravalenten, bispezifischen Innate-Cell-Engagern (ICE®) zu steigern. Hierbei lag der Fokus auf mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) modifizierte NK-Zellen (CAR-NK-Zellen). Diese Arbeiten unterlagen dem Forschungsprogramm zur Verstärkung der Effektorzytotoxizität (B) und waren im Gesamtkontext darauf ausgerichtet, die therapeutische Wirksamkeit gegen Tumore zu optimieren. Wesentliche Fortschritte umfassten die erfolgreiche präklinische Entwicklung geeigneter ICE® Molekülkandidaten gegen verschiedene Tumorantigene, sowie deren biophysikalische Charakterisierung und funktionelle Validierung in relevanten Zytotoxizitätsassays. In enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Grunwald am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) konnte experimentell gezeigt werden, dass spezifische Kombinationen von ICE® mit CAR-NK-Zellen zu vielversprechenden präklinischen Ergebnissen hinsichtlich einer verstärkten Aktivierung führen. Insbesondere die Kombination von gegen das Tumorantigen CD20 gerichteten ICE® (d.h. CD20-spezifischen ICE®) und CD19-spezifischen CAR-NK-Zellen (CAR19-NK-Zellen) veranschaulichte das Potential, die Gesamtaktivität der NK-Zellen gegenüber aus Patienten isolierten Tumorzelllinien zu steigern [1]. Die erzielten Forschungsergebnisse bilden eine solide Grundlage für die weitere präklinische Entwicklung und potenzielle Translation in klinische Anwendungen, mit dem Ziel, die Ansprechrate und die Ansprechtiefe in Patienten zu verbessern.

Ursprüngliche Aufgabenstellung und Wissenschaftlicher Stand

Im ersten Schritt sollte im Rahmen des Forschungsprojekts AP4 untersucht werden, ob sich die durch ICE® induzierte zytotoxischer Aktivität von unmodifizierten NK-Zellen in ihrem Ausmaß von der zytotoxischer Aktivität von CAR-NK-Zellen unterscheidet. Im zweiten Schritt sollte experimentell ermittelt werden, ob eine Zugabe von ICE® die zytotoxische Aktivität von CAR-NK-Zellen fördern kann.

Die wissenschaftliche Grundlage für diese Fragestellungen basierte auf der Erkenntnis, dass NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Tumorbekämpfung spielen, jedoch ihre Wirksamkeit begrenzt ist, bedingt durch verschiedene Resistenzmechanismen von Tumorzellen und auch der Tumorumgebung, die selektiv im Laufe der Tumorevolution unter dem Druck des Immunsystems entstanden sind [2] [3] [4]. Durch gezielte genetische Modifikationen können NK-Zellen mit chimären

Antigenrezeptoren (CAR) ausgestattet werden, um NK-Zellen in die Lage zu versetzen spezifisch Tumorantigene zu erkennen und Tumorzellen zu bekämpfen. Herkömmliche genetische Modifikationsmethoden erreichen allerdings selbst unter optimierten Bedingungen nur eine Rate von 23-83% [5]. Das bedeutet, dass in diesem Fall ein finales CAR-NK-Zellprodukt aus einem Gemisch aus CAR-NK-Zellen und unmodifizierten NK-Zellen besteht und somit nur der Anteil der tatsächlich CAR-transduzierten NK-Zellen zielgerichtet gegen das Tumorantigen wirken kann. Um die Ansprechrate zu erhöhen, beruht der Ansatz dieses Forschungsprojekts darauf, eine zusätzliche Aktivierung über den NK-Zell-Rezeptor CD16A zu induzieren. CD16A fungiert dabei als funktionelles Zielantigen für bispezifische ICE® auf NK-Zellen und wird auf mehr als 90% von NK-Zellen exprimiert [6]. CD16A und CAR nutzen vergleichbare nachgelagerte aktivierende cytoplasmatische Signalwege bzw. Adaptorproteine [7] [8], wodurch eine vergleichbare oder sogar synergistische Wirkantwort induziert werden könnte, oder es aber zu einer Interferenz kommen könnte. Daraus leitete sich die Fragestellung ab, ob durch ICE® aktivierte NK-Zellen eine vergleichbar starke zytotoxischer Aktivität ausüben könnten wie CAR-NK-Zellen. Ferner wurde vermutet, dass in Gegenwart von ICE® auch der Anteil unmodifizierter NK-Zellen im Gemisch mit CAR-NK-Zellen zur verstärkten zytotoxischen Aktivität befähigt werden könnten.

Übersicht der Projektarbeiten

Im Rahmen des Arbeitspakets 4 (AP4) wurde die „Etablierung und präklinische Entwicklung eines optimierten Tumorantigen-spezifischen CAR-NK-Zellproduktes in Kombination mit bispezifischen ICE® zur Behandlung verschiedener solider und/oder hämatologischer Tumoren“ angestrebt. Dieses Arbeitspaket wurde in mehrere Unterarbeitspakete unterteilt, die verschiedene Aspekte der Entwicklung und Validierung umfassten. Zusammenfassend wurden folgende Aufgabenstellungen erfolgreich bearbeitet: die Identifizierung, Herstellung und Charakterisierung wirksamer ICE® Moleküle gerichtet gegen CD19 und CD20 für eine Kombinationstherapie mit CAR-NK-Zellen, gefolgt von der funktionellen Charakterisierung der etablierten ICE® Konstrukte hinsichtlich zytotoxischer Aktivität im Zusammenspiel mit CAR-NK-Zellen. Die Kombination von CAR-NK-Zellen mit ICE® verfolgte zwei Hauptansätze: Erstens die Co-stimulation und damit maximierte Aktivität der CAR-NK-Zellen (letztlich vor allem mit Fokus auf CD19-spezifische CAR-NK-Zellen (CAR19-NK-Zellen plus CD19-spezifische ICE®) und zweitens das duale Targeting mittels zweier Tumorantigene, um einen höheren Selektionsdruck auf den Tumor auszuüben (letztlich vor allem mit Fokus auf CAR19-NK-Zellen plus CD20-spezifische ICE® oder CD30-spezifische ICE®).

Das Unterarbeitspaket AP 4.1 befasste sich mit der Konzeptionierung, Herstellung und Optimierung von CAR-Vektoren und CAR-NK-Zellen und wurde durch den Kollaborationspartner am IZI durchgeführt.

Das Unterarbeitspaket 4.2 behandelte das "Design und der Herstellung verschiedener tetravalenter bispezifischer ICE[®] gegen ausgewählte Tumorantigene sowie der Validierung aktiver ICE[®] in Bezug auf Stabilität und Affinität gegenüber CD16A und Tumorantigenen". Dieses Arbeitspaket wurde durch Affimed durchgeführt. Neben den am IZI generierten CAR-Vektorkonstrukten, die im Laufe des Projektfortschritts auf CD19 eingegrenzt wurden, wurden bioaktive ICE[®] Konstrukte für die Vergleichsstudien hergestellt, die an das äquivalente CD19 Tumorantigenepitop binden oder ein Tumorantigenepitop auf CD20 erkennen (duales Targeting). Die Produktion dieser Antikörper basierte auf Affimeds ROCK[®] Plattformtechnologie, welche aufgrund ihrer Modularität für verschiedene Zielantigene adaptiert werden kann [9]. Um eine optimale strukturelle Funktionalität zu erzielen, wurden verschiedene Tumorantigensequenzen im Zusammenspiel mit CD16A-targeting Antigensequenzen generiert und getestet. Zu den verwendeten Methoden gehörten durchflusszytometrische Untersuchungen zur Interaktionen und Bindungsdauer der ICE[®] Konstrukte mit Tumortargetmolekülen an der Zellmembran von unmodifizierten NK-Zellen und CAR-NK-Zellen sowie biomechanische Analysen.

Anschließend befasste sich das Unterarbeitspaket 4.3 mit der funktionellen Validierung der etablierten ICE[®] Konstrukte hinsichtlich Bindungseigenschaften an CAR19-NK-Zellen und zytotoxischer Aktivität von CAR19-NK-Zellen, welche in Zusammenarbeit von Affimed und IZI durchgeführt wurde. Hierbei wurden vor allem zellbasierte Zytotoxizitätsassays von unmodifizierten NK-Zellen (Mock-Kontrolle) und CAR19-NK-Zellen nach Interaktion mit entsprechenden Zielzellen durchgeführt sowie der Aktivierungsstatus von NK-Zellen, wie zum Beispiel ihr Degranulierungsstatus, untersucht. Hierbei wurde in Proof-of-Concept-Experimenten durch Affimed die Zytotoxizität von transient exprimierende CAR19-NK-Zellen in Kombination mit CD19-, CD20- und CD30-spezifischen ICE[®] untersucht. Parallel wurden in einer erweiterten Studie beim Kollaborationspartner am IZI stabil exprimierende CAR19-NK-Zellen in Kombination mit CD19- und CD20-spezifischen ICE[®] untersucht, dessen erzielte Daten gegenwärtig für ein gemeinsames Manuskript zur wissenschaftlichen Veröffentlichung vorbereitet werden.

Das Unterarbeitspaket 4.4 betraf die Testung der Wirksamkeit von CAR19-NK-Zellen plus ICE[®] in einem präklinischen *In-Vivo*-Mausmodell basierend auf einer CD19⁺ Tumorzelllinie. Aufgrund einer bereits hohen Hintergrundaktivität von aktivierten NK-Zellen im verfügbaren Mausmodell, wurde stattdessen ein Therapie-relevanteres *In-Vitro*-Modell mit aus Patienten

isolierten primären Tumorzellen als Zielzellen aufgesetzt. Dieses Arbeitspaket wurde am IZI durchgeführt.

Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

AP4.2: Konzeptionelle Entwicklung und Herstellung von ICE®

Im Rahmen des WP4.2 wurden signifikante Fortschritte bei der Produktion und Charakterisierung von ICE® Molekülen erzielt. Hierbei war ein wesentlicher Baustein das Upscaling der Produktion eines neuen CD19/CD16 bispezifischen ICE® Molekülkandidaten sowie zwei nicht-CD19 bindender Kontrollmoleküle. Die Prozesse umfassten die transiente Produktion von drei ICE® Konstrukten im 10L Bioreaktor gefolgt von ihrer Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie (pSEC) sowie ihrer analytischen Charakterisierung mittels UV-Spektroskopie, SDS-Page und analytischer SEC-MALS HPLC. Die erzielten Produkte wiesen Reinheiten von über 92% (aSEC) auf, und die Produktionsmengen betragen 185 bis 198 mg.

Neben der Weiterentwicklung der Produktionsprozesse erfolgte parallel das konzeptionelle Design und die Produktion von CD20/CD16A und EpCAM/CD16A bispezifischen ICE® Konstrukten. CD19/CD16A und CD20/CD16A ICE® waren für hämatologische B-Zell-assoziierte Tumorentitäten zusammen mit CAR19-NK-Zellen bestimmt. Währenddessen diente der EpCAM/CD16A ICE® beispielhaft für solide Tumorentitäten in zukünftigen Vergleichsstudien. Die Klonierung und Expression wurden in stabilen CHO-Zellklonen durchgeführt, gefolgt von der Aufreinigung und Analyse analog zu den CD19/CD16 ICE® Molekülen. Auch hier wurden Reinheiten von über 92% (aSEC) erreicht. Die Produktionsmengen betragen für CD20 ICE® 239 mg und für EpCAM ICE® 52 mg.

Ein essentieller Bestandteil der Charakterisierung neuer ICE® Moleküle liegt in der Ermittlung ihrer Effizienz die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen zu aktivieren und somit die Lyse spezifisch gerichtet auf die Tumorzellen zu vermitteln, die das Zielantigen auf der Zelloberfläche zur Expression bringen. Hierzu wurden vierstündige Co-kulturen von aus dem Blut aufgereinigten NK-Zellen mit Calcein-beladenen Tumorzelllinien durchgeführt. Als Indikator für die Lyse fungierte die spezifische Menge an Calcein, welches beim Zelltod in den Kulturüberstand freigesetzt wird. In Gegenwart steigender Konzentrationen des CD20/CD16A ICE® wurde eine NK-Zell-abhängige Lyse von RAJI-Zellen (CD20 hoch exprimierend) induziert, d.h. Antikörper-vermittelte, NK-Zell-abhängige Lyse (ADCC), während keine substantielle Aktivität durch die Negativkontroll-Konstrukte RSV/CD16A und CD20/RSV verzeichnet wurde, welche keine Bindung zu CD20 bzw. zu CD16A vermitteln können (Abb. 1A). Insgesamt zeigte sich, dass CD20/CD16A ICE® eine stärkere maximale Lyse bei gleichzeitig geringeren Konzentrationen, d.h. höhere Potenz und folglich geringere

EC50-Werte, im Vergleich zum CD20-spezifischen Antikörper Rituximab induzierte (n=3/3). Weiterhin wurde die ADCC Aktivität eines CD19/CD16A ICE® bestätigt (Abb. 1B, n=3/3). Die CD19/CD16A ICE® und CD20/CD16A ICE® wurden im weiteren Projektverlauf in Kombination mit CAR19-NK-Zellen getestet.

Des weiteren wurde die ADCC Aktivität des EpCAM/CD16A ICE® Konstrukts bestätigt. ADCC gegenüber HCT-116 Zellen (EpCAM hoch exprimierend) und MDA-MB-231 Zellen (EpCAM niedrig exprimierend) wurde mit einer ähnlich hohen Wirksamkeit induziert, während die Potenz gegenüber EpCAM hoch exprimierender Targetzellen stärker ausgeprägt war (Abb. 1C-D, n=4/4). Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse die erfolgreiche Entwicklung bioaktiver ICE® Moleküle gegen verschiedene Tumorantigene.

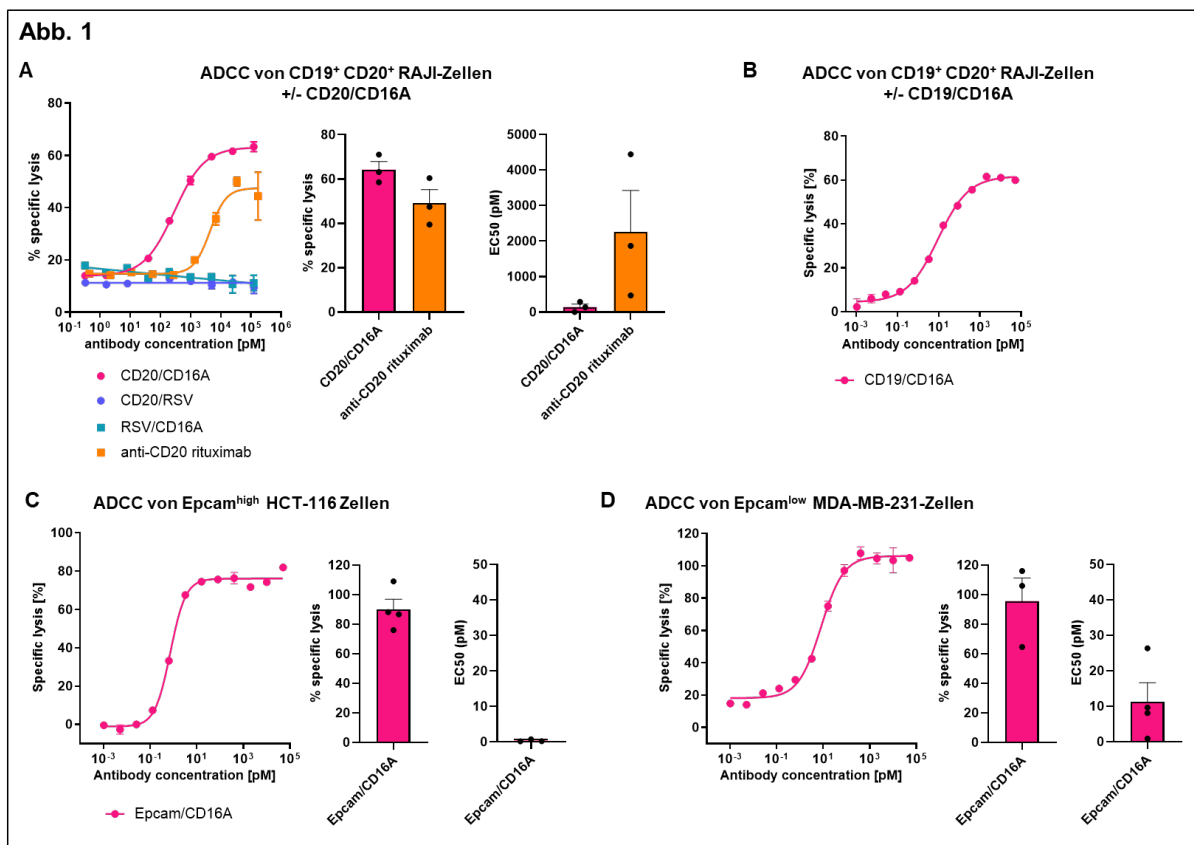


Abb. 1: ICE®-vermittelte ADCC gegenüber Tumorzelllinien

NK-Zellen wurden aus peripherem Blut gesunder Donoren mittels magnetischer Separation aufgereinigt. Die Zytotoxizität der NK-Zellen wurde anschließend in vierstündigen Co-kulturen mit Calcein-beladenen Tumorzelllinien (5:1 E:T) in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an CD20/CD16A (A), CD20-spezifischer IgG1 Rituximab (A), CD19/CD16A (B), oder EpCAM/CD16A ICE® (C-D), wie dargestellt, entsprechend gegenüber der Tumorzelllinien CD19⁺ CD20⁺ RAJI (A-B), EpCAM^{high} HCT-116 (C) und EpCAM^{low} MDA-MB-231 (D) gemessen. Als Indikator für die NK-Zell abhängige spezifische Lyse der Tumorzellen fungierte die spezifische Menge an Calcein, welches beim Zelltot in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Die zur halbmaximalen Lyse führenden Konzentrationen indizierten als EC50-Werte die Potenz der zytotoxischen

Wirksamkeit. Repräsentative und kumulative Ergebnisse der im Duplikat erfolgten Einzelmessungen (Mittelwert +SEM, n=3-4) sind dargestellt.

WP4.3: Funktionelle Validierung der Kombination von ICE[®] und CAR-NK-Zellen

Für die Proof-of-Concept-Experimente wurden nicht-expandede NK-Zellen mittels nicht-viraler Transfektion bzw. Elektroporation mit einem CD19-spezifischen CAR-Konstrukt der zweiten Generation (CAR19-CD28-CD3 ζ) transient modifiziert. Nach iterativen Optimierungsschritten der Transfektionsbedingungen und der Auswahl des Expressionsvektors, konnten Expressionsraten an CAR-positiven NK-Zellen von bis zu 60% erzielt werden. Hierbei wurde die CAR-Expression mit Hilfe eines an den CAR bindenden, rekombinanten CD19 Proteins in Kombination mit einem Fluoreszenz-aktiven Detektionsreagenz mittels Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nachgewiesen.

Eine verstärkte zytotoxische Aktivität der CAR19-NK-Zellen wurde gegenüber CD19-positiven Daudi-Zellen im Vergleich zu Mock-behandelten Kontroll-NK-Zellen bestätigt (Abb. 2A und B, n=13/13). Hierbei gab es keine Korrelation zwischen der CAR19 Expressionsrate und der CAR19-vermittelten Lyse (Abb. 2C). Anschließend wurde getestet, ob die Zugabe von ICE[®] die zytotoxische Aktivität der CAR19-NK-Zellen steigern könne. Bei ca. 50% der Proben zeigte sich ein Trend zu einer höheren Gesamtyse der Daudi-Zellen durch CAR19-NK-Zellen in Gegenwart von CD19-spezifischen ICE[®] trotz hoher experimenteller Heterogenität (Abb. 2A und D, n=6/13). Weiterhin zeigte sich ein Trend zur leicht erhöhten Gesamtyse von CD19⁺ CD20⁺ Daudi-Zellen und RAJI-Zellen durch CAR19-NK-Zellen mittels CD20-spezifische ICE[®] (Abb. 2E, n=1/1). Letzteres Ergebnis korrelierte mit den am IZI erweiterten Studiendaten, die demonstrierten, dass insbesondere CD20-spezifische ICE[®] die Aktivität von stabil exprimierender CAR19-NK-Zellen gegenüber Tumorzelllinien und primären, aus Patienten isolierten B-CLL Tumorproben verstärken konnte.

Um expliziter die Wirksamkeit des dualen Targetings beispielhaft für eine Tumorentität mit heterogener Antigenexpression zu untersuchen, wurden CAR19-NK-Zellen sowohl mit CD19⁺ Zielzellen als auch CD30⁺ Zielzellen in Kombination mit CD30-spezifischen ICE[®] getestet. CAR19-NK-Zellen zeigten eine vergleichbar ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber CD19⁺ Zielzellen in Gegenwart von CD30⁺ Zielzellen und CD30-spezifischen ICE[®] (Abb. 3, n=5/5). Weiterhin wurde die Aktivität von CAR19-NK-Zellen gegenüber CD30⁺ Zielzellen mit Hilfe von CD30-spezifischen ICE[®] induziert, auch in Gegenwart von CD19⁺ Zielzellen (Abb. 3, n=5/5). Diese Ergebnisse demonstrieren das Potential des dualen Targetings und stellen heraus, dass CAR19-NK-Zellen auf verschiedene Zielzellen via verschiedene Spezifitäten mittels CAR und CD16A über ICE[®] simultan ansprechen können. Abschließend

veranschaulichen diese Proof-of-Concept-Experimente die funktionelle Validierung von CAR-NK-Zellen in Kombination mit ICE® und bestätigen das Potenzial dieses kombinierten Ansatzes für die Tumorthherapie.

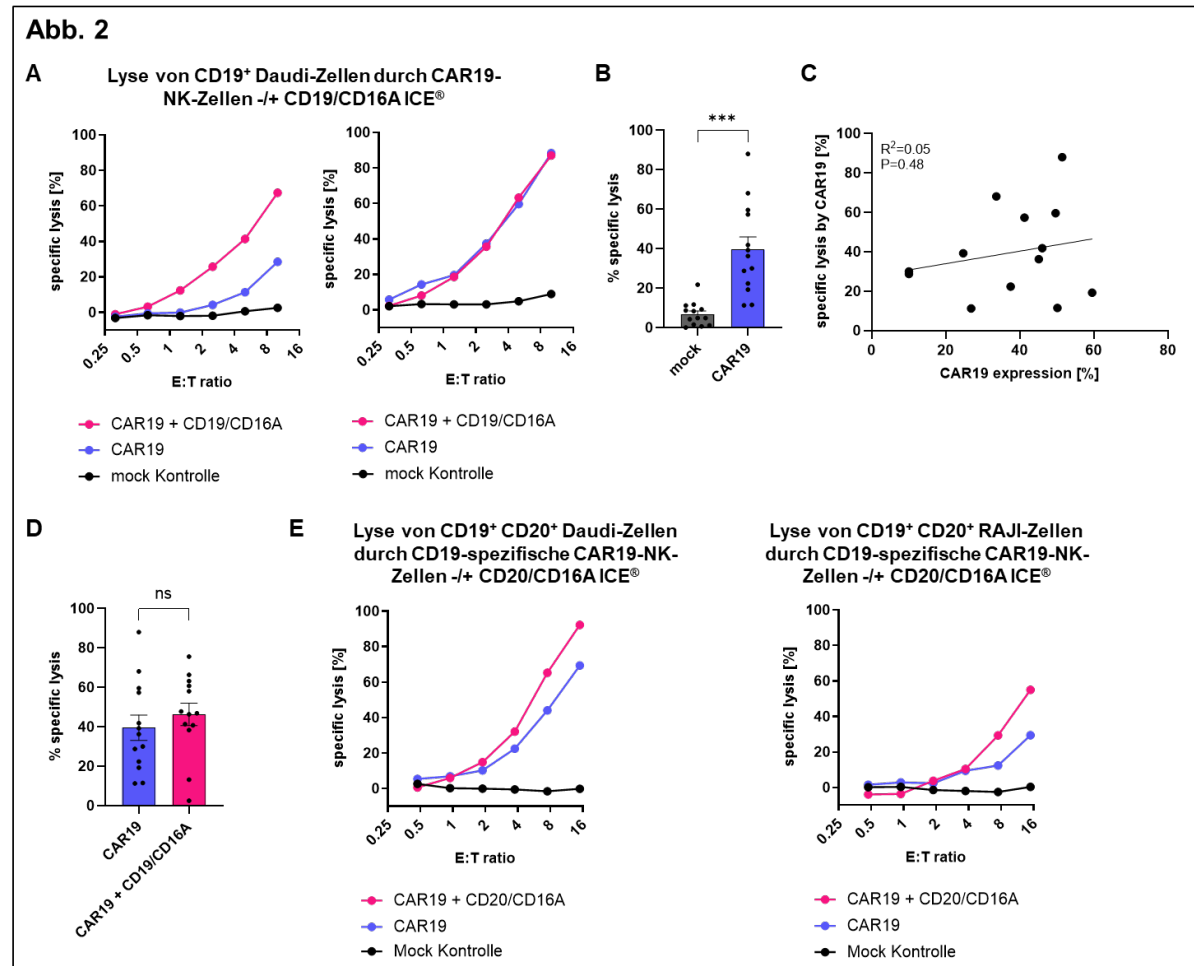


Abb. 2: CD19/CD16A und CD20/CD16A ICE® verstärken die Zytotoxizität von CAR19-NK-Zellen

NK-Zellen wurden mittels transients Transfektion bzw. Elektroporation (Amaxa 4D-Nucleofector) mit einem CD19-spezifischen CAR der zweiten Generation (CAR19-CD28-CD3ζ) modifiziert unter Verwendung folgender Parameter: 5×10^6 NK-Zellen resuspendiert in 100 μ L Amaxa Nucleofector Solution P3 + Supplement, versetzt mit 4 μ g Vektor-DNA (100 μ L) pro Küvette; Programm DK-100; abschließend 24h Inkubation der elektroporierten NK-Zellen vor nachfolgender Untersuchungen. Die Mock-Kontrolle wurde ohne Vektor-DNA der Elektroporation unterzogen. Zytotoxizitätsmessungen wurden analog zur Beschreibung von Abb. 1 durchgeführt. **(A-B+D)** Lyse von CD19⁺ CD20⁺ Daudi-Zellen durch CAR19-NK-Zellen +/- CD19/CD16A ICE® oder Mock-Kontroll-NK-Zellen. **(C)** Korrelation bzw. Abhängigkeit der CAR19-vermittelten Lyse von der CAR19 Expressionsrate. **(E)** Lyse von CD19⁺ CD20⁺ Daudi-Zellen bzw. CD19⁺ CD20⁺ RAJI-Zellen durch CAR19-NK-Zellen +/- CD20/CD16A ICE® oder Mock-Kontroll-NK-Zellen. Repräsentative und kumulative Ergebnisse der im Duplikat erfolgten Einzelmessungen (Mittelwert +SEM; Student-T-Test, ns = $P > 0.05$, *** = $P \leq 0.001$; n=13) sind dargestellt.

Abb. 3

Lyse von CD30⁺ CD19⁻ Karpas-299-Zellen durch CD19-spezifische CAR-NK-Zellen
-/+ CD30/CD16A ICE® in Gegenwart von CD19⁺ CD30⁻ Daudi-Zellen und vice versa

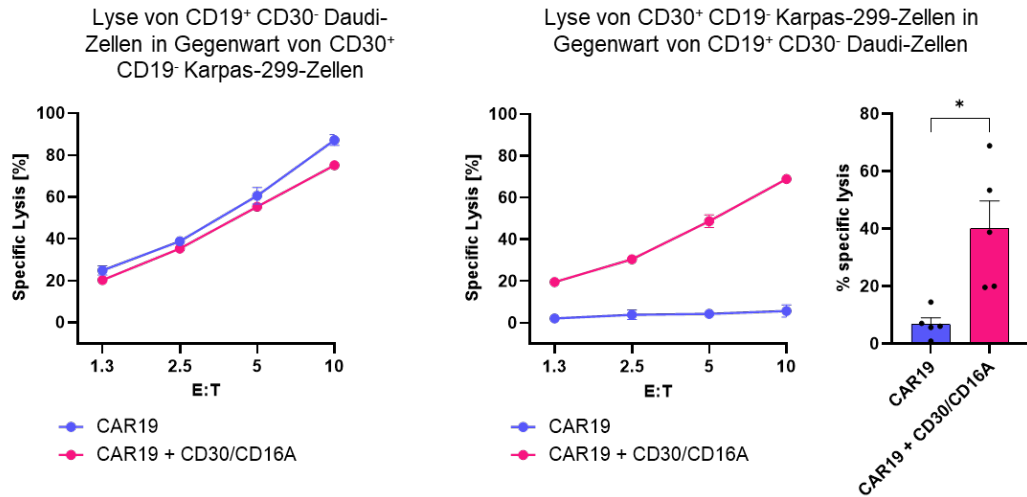


Abb. 3: Duales Targeting mit CD30/CD16A und CAR19-NK-Zellen gegenüber einem exemplarisch heterogenen CD19⁺ und CD30⁺ Tumorzellgemisch

NK-Zellen wurden mittels transients Transfektion bzw. Elektroporation hergestellt wie in Abb. 2 beschrieben. Zytotoxizitätsmessungen wurden analog zur Beschreibung von Abb. 1 durchgeführt. In Ergänzung wurden die Zytotoxizitätsmessungen mit Calcein-beladenen CD19⁻ CD30⁺ Karpas-299-Zellen in Gegenwart von unbeladenen ‚Bystander‘ CD19⁺ Daudi-Zellen, die als funktionell CD30 negativ beschrieben werden [10] [11], durchgeführt in Gegenwart von CD30/CD16A ICE®. Als Kontrolle wurden diese Messungen mit Calcein-beladenen CD19⁺ Daudi-Zellen, in Gegenwart von unbeladenen ‚Bystander‘ CD19⁻ CD30⁺ Karpas-299-Zellen durchgeführt. Repräsentative und kumulative Ergebnisse der im Duplikat erfolgten Einzelmessungen (Mittelwert +SEM; Student-T-Test, * = P ≤ 0.05, n=5) sind dargestellt.

WP4.4: In-vivo-Testung

Während die Etablierungsstudien zur Beurteilung der Aktivität von CAR19-NK-Zellen in vollständig immundefizienten NSG-Mäusen beim Kollaborationspartner am IZI geplant waren, deutete eine parallel hierzu durch Affimed durchgeführte In-Vivo-Pilotstudie auf ein unzureichendes therapeutisches Fenster für hochaktive NK-Zellen plus ICE® im verfügbaren Mausmodell hin. Das durch den Kollaborationspartner am IZI entwickelte alternative In-Vitro-Modell ermöglichte physiologisch relevantere Ergebnisse, da es besser Tumorheterogenitäten (z.B. divergierende Ansprechrate durch CAR-NK-Zellen sowie natürliche CD19 Expressionslevel), abdeckte. Die am IZI erzielten Ergebnisse demonstrierten eindrücklich, dass ICE® eine vergleichsmäßig hohe Wirksamkeit induzieren können, während CD20-spezifische ICE® die Gesamtaktivität von CD19-spezifischen CAR-NK-Zellen verstärken können.

Abschlussbetrachtung des wissenschaftlichen und therapeutischer Nutzens

Die Entwicklung neuartiger Immuntherapien gegen Tumorerkrankungen ist ein wichtiges Forschungsfeld mit hoher klinischer Relevanz. Während CAR-T-Zelltherapien bereits signifikante Erfolge für bestimmte hämatologische Malignitäten gezeigt haben, verbleiben erhebliche Herausforderungen in der therapeutischen Breite und insbesondere für solide Tumorentitäten. CAR-NK-Zellen und NK-Zell-basierte Immuntherapieansätze im Allgemeinen bieten wichtige sicherheitsrelevante Vorteile gegenüber CAR-T-Zellen. In diesem Kontext wurde publiziert, dass CAR-NK-Zellen im Vergleich zu CAR-T-Zellen mit einem milderen Nebenwirkungsprofil assoziiert sind und vor allem ein signifikant geringeres Risiko für schwere Komplikationen (z.B. Zytokin-Freisetzungssyndrom, Immun-Effektor-Zell-assoziiertes Neurotoxizitätssyndrome, vaskuläres Permeabilitätssyndrom) aufweisen [12] [13]. Allerdings wurde während der Konzeption von AP4 angenommen, dass die Wirksamkeit von CAR-NK-Zellen verstärkt werden könnte, denn typischerweise bringen selbst unter optimierten Bedingungen nur 23-83% der NK-Zellen einen CAR zur Expression in Abhängigkeit des verwendeten Transduktionssystems [5]. Daher stellt die Kombination von CAR-NK-Zellen mit ICE® einen innovativen, flexiblen und unkomplizierten Ansatz dar, um diese Limitation zu überwinden, eine signifikant größere Anzahl an NK-Zellen spezifisch zur Tumorerkennung zu befähigen und so die therapeutische Wirksamkeit zu steigern.

Insgesamt könnte eine Kombination von CAR-NK-Zellen mit ICE® mehrere Vorteile im Rahmen zielgerichteter Immuntherapien liefern. Zum einen könnte die Ansprechtiefe der Wirksamkeit durch eine gesteigerte Gesamtaktivität erhöht werden. Zum anderen bietet diese Kombination die Möglichkeit des dualen Targetings, indem durch genetische Modifikation eher komplex herzustellende CAR-NK-Zellen mit Hilfe der flexiblen, modularen Plattformtechnologie der ICE® mit einer zweiten Spezifität ausgestattet werden könnten. Dies wurde mit Hilfe der Kombination von CD19-spezifischen CAR-NK-Zellen und CD20 bzw. CD30-spezifischen ICE® in diesem Projekt exemplarisch adressiert. Darüber hinaus vermag das duale Targeting auch der Entwicklung von Tumorresistenzen und Antigen-Escape entgegenzuwirken, sowie eine verbesserte Ansprechrate gegenüber heterogenen Tumorentitäten mit verschiedenartiger Tumorantigenexpression erzielen. Dies könnte insbesondere in Therapieansätzen für solide Tumore nützlich sein, die gekennzeichnet sind von einer hohen Rate an Resistenzmechanismen, Antigen-Escape und einer geringeren Ansprechrate NK-Zell-basierender Immuntherapien. Die durch den Kollaborationspartner am IZI erzielten Ergebnisse wurden auf der SITC-Konferenz 2023 auf einem wissenschaftlichen Poster vorgestellt [1].

Referenzen

- [1] Ciulean S.I. et al., „Redirecting NK cell cytotoxicity by innate cell engagers: a differentiated and innovative approach compared to CAR-NK cells,“ *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, Bd. 11, pp. doi: 10.1136/jitc-2023-SITC2023.0329, 2023.
- [2] Chen S.C. and Mellmann I., „Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle,“ *Immunity*, Bd. 39, Nr. 1, pp. 1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012, 2013.
- [3] Schreiber R.D. et al., „Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion,“ *Science*, Bd. 331, Nr. 6024, pp. 1565-70. doi: 10.1126/science.1203486, 2011.
- [4] Pahl J and Cerwenka A., „Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity,“ *Immunobiology*, Bd. 222, Nr. 1, pp. 11-20. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.012, 2017.
- [5] Colamartino M. L. et al., „Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector,“ *Front Immunol*, Bd. 16, p. 10:2873. doi: 10.3389/fimmu.2019.02873, 2019.
- [6] Pinto S. et al., „Reimagining antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer: the potential of natural killer cell engagers,“ *Trends Immunol*, Bd. 43, Nr. 11, pp. 932-946. doi: 10.1016/j.it.2022.09.007, 2022.
- [7] Aguilar O.A. et al., „The CD3 ζ adaptor structure determines functional differences between human and mouse CD16 Fc receptor signaling,“ *J Exp Med*, Bd. 219, Nr. 5, p. e20220022. doi.org/10.1084/jem.20220022, 2022.
- [8] Andrea A.E. et al., „A structural, genetic and clinical comparison of CAR-T cells and CAR-NK cells: companions or competitors?,“ *Front Immunol*, Bd. 4, Nr. 15, p. 1459818. doi: 10.3389/fimmu.2024.1459818, 2024.
- [9] Ellwanger K. et al., „Redirected optimized cell killing (ROCK®): A highly versatile multispecific fit-for-purpose antibody platform for engaging innate immunity,“ *MAbs*, Bd. 11, Nr. 5, pp. 899-918. doi: 10.1080/19420862.2019.1616506, 2019.
- [10] Gruss H.J. et al., „Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines,“ *Blood*, Bd. 83, Nr. 5, pp. 2045-2056. doi.org/10.1182/blood.V83.8.2045.2045, 1994.
- [11] Wahl A.F. et al., „The Anti-CD30 Monoclonal Antibody SGN-30 Promotes Growth Arrest and DNA Fragmentation in Vitro and Affects Antitumor Activity in Models of Hodgkin's Disease,“ *Cancer Res*, Bd. 62, Nr. 13, p. 3736–374, 2002.
- [12] Baroni M. L. et al., „41BB-based and CD28-based CD123-redirection T-cells ablate human normal hematopoiesis in vivo,“ *J Immunother Cancer*, Bd. 8, Nr. 1, pp. e000845. doi.org:10.1136/jitc-2020-000845, 2020.
- [13] Caruso S. et al., „Safe and effective off-the-shelf immunotherapy based on CAR-CD123-NK cells for the treatment of acute myeloid leukaemia,“ *J Hematol Oncol*, Bd. 15, Nr. 1, pp. 163. doi.org:10.1186/s13045-022-01376-3, 2022.