

Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger

Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Durchführende Stelle

Prof. Dr. Horst Schrotten / Prof. Dr. Christian Schwerk, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Verbundprojekt

Transferrinrezeptor-vermittelte Transzytose eines TNFR2 Agonisten über die Blut-Hirn Schranken (BrainAim)

Teilvorhaben

BCSFB-Transport von „maßgeschneiderten“ Biologika

Förderkennzeichen

16GW0325

Bewilligungszeitraum

01.02.2021 – 31.07.2024 (einschließlich genehmigter kostenneutraler Laufzeitverlängerung um 6 Monate)

1. Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Vorhabens „BrainAim“ war die Bereitstellung eines Agonisten des TNFR2 in das ZNS, bei dem es sich um ein Mutein des TNF handelt, das selektiv TNFR2 aktiviert. Einer Prodrug-ähnlichen Form des Agonisten, der eine geringe systemische TNFR2-Aktivierung aufweist, sollte mit Hilfe eines Proteinanteils die Passage über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Blut-Liquor-Schranke (BCSFB) ermöglicht werden. Unter Verwendung einer ZNS-Zell-Zielstrategie sollte eine zielgerichtete Clusterbildung und spezifische Aktivierung von TNFR2 nur an den Zielzellen des ZNS erfolgen. Verteilung, Wirksamkeit, Verträglichkeit und Spezifität des Agonisten sollten *in vitro* in Modellen der BHS und der BCSFB sowie *in vivo* in Tiermodellen getestet werden. Im Verlauf des Vorhabens sollte der Agonist einer umfassenden physikalisch-chemischen Optimierung unterzogen werden.

Ziel des in Mannheim durchgeführten Teilprojekts 4 war die Etablierung und Charakterisierung des ZNS-Transports der maßgeschneiderten Biologika in humanen *in vitro* Modellen der BCSFB.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Dieses Verbundprojekt baute auf einer interdisziplinären Zusammenarbeit von fünf Projektpartnern auf.

- UHEID: Universität Heidelberg, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (Prof. Fricker); Projektkoordination, *in vitro* und *in vivo* Modelle der BHS.
- MEDMA: Medizinische Fakultät Mannheim, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin (Prof. Schrotten, Prof. Schwerk); *in vitro* Modelle der BCSFB.
- USTUTT: Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunology (Dr. Fischer); TNF Biologie und Wirkstoffentwicklung.
- SRCBS: Universität Stuttgart, Stuttgart Research Center Systems Biology (Prof. Morrison); *in silico*-geführte Optimierung von ZNS-Targeting und Transport.
- YUMAB: YUMAB GmbH, Braunschweig (Dr. Schirrmann); Entwicklung optimierter humaner Antikörper gegen TfR und relevante Zellen des ZNS.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Gesamtprojekt war auf eine Laufzeit von 36 Monaten ausgelegt und wurde von Prof. Fricker (Universität Heidelberg) koordiniert. Im Rahmen des in Mannheim durchgeführten Teilprojekts (sollten die folgenden fünf Arbeitspakete durchgeführt werden:

WP4-1: Charakterisierung von HIBCPP Zellen in Bezug auf die Expression von TfR und TNFR2.

WP4-2: Transport von Biologika über die BCSFB *in vitro*.

WP4-3: Optimierung des Modellsystems.

WP4-4: Transport von Biologika über ein Zwei-Zelltyp-Modell.

WP4-5: Analyse der Auswirkungen von Entzündungszuständen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden**
- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste**

Bei der BHS und der BCSFB handelt es sich um hochselektive semipermeable Barrieren, welche den Zugang von Therapeutika in das ZNS einschränken. Die BHS trennt das ZNS vom zirkulierenden Blut und wird durch das Hirndothel in Verbindung mit Astrozyten und Perizyten gebildet. Die BCSFB befindet sich am *Plexus choroideus* und trennt Blut und Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) voneinander; das morphologische Korrelat der BCSFB sind die Epithelzellen des *Plexus choroideus*. Aufgrund eines Mangels an brauchbaren humanen *in vitro* Modellen der BCSFB hat sich die Forschung in der Vergangenheit auf die BHS konzentriert. Da auch die BCSFB als kritischer Eintrittsort für Medikamente in das ZNS angesehen werden kann, hat die Einbeziehung von BCSFB *in vitro* Modellen zur Etablierung eines optimalen ZNS-Verabreichungssystems ein hohes wissenschaftliches und therapeutisches Potenzial.

Der Stand von Wissenschaft und Technik auf den von diesem Vorhaben berührten Arbeitsgebieten wurde durch aktuelle Informationsrecherchen ermittelt. Nach Kenntnisstand war das Vorhaben nicht bereits Gegenstand anderweitiger Forschungen/Entwicklungen/Untersuchungen/Patente und es standen der Projektdurchführung und einer späteren Ergebnisverwertung keinerlei Schutzrechte und Schutzrechtsanmeldungen entgegen.

5. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

HIBCPP Zellen wurden erfolgreich in Bezug auf die Expression von TfR und TNFR2 charakterisiert (WP4-1). Der Transport von „BrainAim-Molekülen“ über HIBCPP Zellen wurde etabliert und für Schlüssel-moleküle analysiert (WP4-2). Ein Zwei-Zelltyp-Modell der BCSFB basierend auf Epithelzellen (HIBCPP Zellen) und Endothelzellen (iHCPeNC) des humanen *Plexus choroideus* wurde etabliert (WP4-3). Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aufnahme und Transport im Zwei-Zelltyp-Modell verglichen zur HIBCPP Zell-Monokultur mit geringerer Effizienz stattfindet (WP4-4).

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern durchgeführt. Maßgeschneiderte Biologika wurden von „YUMAB“ und „USTUTT“ zur Verfügung gestellt. Ergebnisse der Charakterisierung der HIBCPP-Zellen und des Transports der Biologika über die BCSFB *in vitro* wurden mit den Ergebnissen von „UHEID“ an der BHS abgeglichen und an „SRCBSB“ weitergegeben. Es gab keine Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger

Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Durchführende Stelle

Prof. Dr. Horst Schrotten / Prof. Dr. Christian Schwerk, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Verbundprojekt

Transferrinrezeptor-vermittelte Transzytose eines TNFR2 Agonisten über die Blut-Hirn Schranken (BrainAim)

Teilvorhaben

BCSFB-Transport von „maßgeschneiderten“ Biologika

Förderkennzeichen

16GW0325

Bewilligungszeitraum

01.02.2021 – 31.07.2024 (einschließlich genehmigter kostenneutraler Laufzeitverlängerung um 6 Monate)

1. Aufgabenstellung

Folgende Hauptziele des Gesamtvorhabens können definiert werden:

- Funktionalisierung einer prodrug-ähnlichen Form eines TNFR2-Agonisten, der eine geringe systemische TNFR2-Aktivierung aufweist, mit einem Proteinanteil, der die Passage über die BHS und BCSFB ermöglicht
- Einsatz einer ZNS-Zell-Zielstrategie zur Induktion einer zielgerichteten Clusterbildung und der daraus folgenden robusten spezifischen Aktivierung von TNFR2 nur an den Zielzellen des ZNS
- Einsatz hochmoderner humaner *in vitro* BHS/BCSFB- und *in vivo* Tiermodelle, um die Verteilung, Wirksamkeit, Verträglichkeit und Spezifität von ZNS-gerichteten TNFR2-Agonisten präzise zu testen
- Durchführung einer umfassenden physikalisch-chemischen Optimierung von ZNS-gerichtetem TNFR2 zur Verbesserung der ZNS-Biodistribution und der Arzneimittelreaktion.

Dafür wurden in diesem Teilvorhaben (Teilvorhaben 4) Epithelzellen des *Plexus choroideus* (HIBCPP-Zellen) zunächst in Bezug auf die Expression von Transferrin-Rezeptor (TfR) und TNFR2 charakterisiert. Anschließend wurde der Transport der zu untersuchenden Biologika über die BCSFB mit Hilfe der HIBCPP Zellen *in vitro* analysiert. Weiterhin war geplant ein optimiertes Zwei-Zelltyp-Modellsystem der BCSFB bestehend aus Epithel- und Endothelzellen des *Plexus choroideus* zu generieren und den Transport der Biologika über dieses Zwei-Zelltyp-Modell zu untersuchen. Die Aufnahme der Biologika in die *Plexus choroideus* Endothelzellen sollte zusätzlich unter *flow* Bedingungen, welche den Fluss in den Blutgefäßen im *Plexus choroideus* imitieren, analysiert werden. Da ZNS-Entzündungszustände ein Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen sind, sollten diese in den Modellsystemen induziert und die Auswirkungen auf den Transport der Biologika analysiert werden.

2. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1. WP4-1: Charakterisierung von HIBCPP Zellen in Bezug auf die Expression von TfR und TNFR2.

Ziel dieses Arbeitspaketes war Verifizierung der Expression von TfR1 und TNFR2 auf der Oberfläche von HIBCPP Zellen. Parallel wurde die Expression der beiden Rezeptoren in immortalisierten humanen Endothelzellen des Plexus choroideus (iHCPEC) mitbestimmt, da diese in einem geplanten Zwei-Zelltyp-Modell der humanen BCSFB als Endothelkomponente eingesetzt werden sollen.

Die Expression von TfR1 und TNFR2 wurde zunächst auf RNA-Ebene mit Hilfe von RT-PCR (Abbildung 1A) und auf Protein-Ebene durch Western Blotting (Abbildung 1B) detektiert. Um die Menge der beiden Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu quantifizieren, wurde eine quantitative Durchflusszytometrie unter Anwendung des QIFIKITs® an einem FACSCanto II durchgeführt (Abbildung 1C). Basierend auf einer Standard-Kurve mit kalibrierten *beads*, die mit einer exakt definierten Menge an monoklonalen Antikörpern beschichten waren, wurde die Anzahl an TfR1 auf der Oberfläche der HIBCPP Zellen mit ca. 56.000 ± 19.000 , und die Anzahl an TNFR2 mit 900 ± 270 pro Zelle bestimmt. Die absoluten Rezeptorzahlen flossen in die *in silico* unterstützte Optimierung von ZNS *targeting* und Transport ein (SRCBSB, Prof. Morrison; Teilvorhaben 5 im Gesamtprojekt). Es ist anzumerken, dass Konfluenz und Zellkultur-Passage der HIBCPP Zellen eine Rolle bei der Anzahl der Rezeptoren spielen können.

Die Ziele dieses Arbeitspaketes wurden vollumfänglich erfüllt.

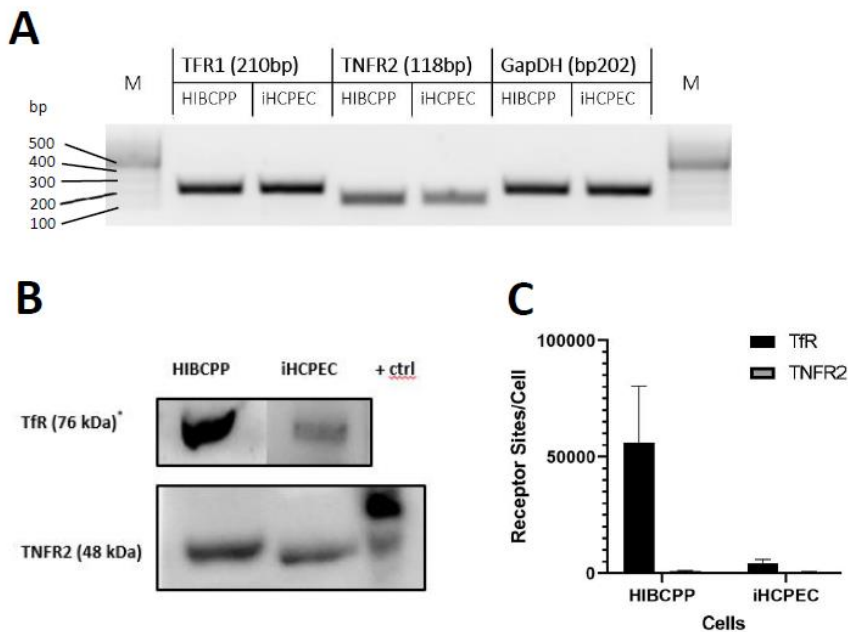


Abbildung 1. Charakterisierung der Expression von TfR1 und TNFR2 in HIBCPP Zellen und in iHCPEC. (A) RT-PCR von TfR1 und TNFR2 und GAPDH (Kontrolle). (B) Western Blot von TfR und TNFR2 auf Proteinextrakten von HIBCPP Zellen und von iHCPEC; *: TfR Banden sind von zwei verschiedenen Western Blots. (C) Durchflusszytometrische Bestimmung der Mengen von TfR und TNFR2 auf der Oberfläche von HIBCPP-Zellen und von iHCPEC.

2.2. WP4-2: Transport von Biologika über die BCSFB *in vitro*.

Als Zielrezeptor für Rezeptor-vermittelten Transport der Biologika wurde TfR1 ausgewählt. In diesem Arbeitspaket sollte der Transport der verschiedenen Biologika über die BCSFB *in vitro* mit Hilfe des HIBCPP Zell-Modells evaluiert werden. Für die Transport-Studien wurden HIBCPP-Zellen auf Zellkultur-Filtereinsätzen angezogen. Die Barriere-Integrität der HIBCPP-Zellen wurde während der Experimente durch Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) und des parazellulären Flusses von FITC-markiertem Inulin überwacht.

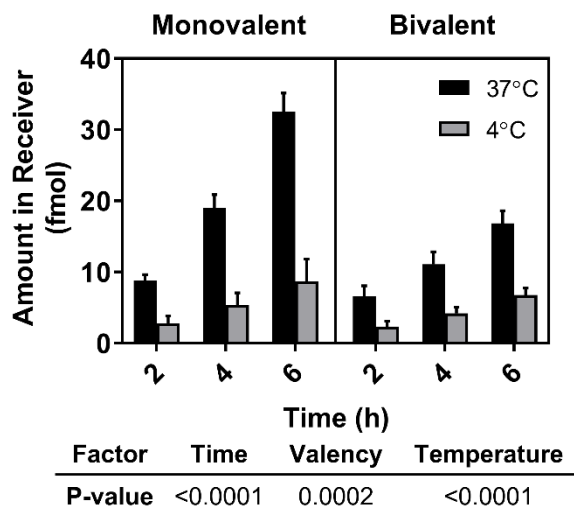
Zytotoxizität der „BrainAim-Moleküle“

Nach Bereitstellung durch den Projektpartner wurde zunächst die Zytotoxizität der „BrainAim-Moleküle“ gegenüber den HIBCPP Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die „BrainAim-Moleküle“ bei den standardmäßig eingesetzten Konzentrationen und auch dem längsten Zeitverlauf der Tests keine signifikante Zytotoxizität gegenüber HIBCPP Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen aufweisen.

Transport von „BrainAim-Molekülen“

Die Transporteigenschaften ausgesuchter „BrainAim-Moleküle“ über die BCSFB *in vitro* wurde in Zusammenarbeit mit UHEID (Prof. Fricker; Teilvorhaben 3 im Gesamtprojekt) nach dem Pulse-Chase-Protokoll etabliert. Zur Validierung von HIBCPP Zellen als Modell für Rezeptor-vermittelte Transzytose wurde in ersten Versuchen der Transport des Brainshuttle™-Moduls von Trontinemab (im Folgenden Brainshuttle (BS) genannt) untersucht, das ein therapeutisch validierter Antikörper ist. Sowohl die monovalente Form von BS (BS^{Mono}) als auch die bivalente Form (BS^{Bi}) wurden durch aktiven Transport über die HIBCPP Zell-Barriere transportiert (Abbildung 2A), wobei BS^{Mono} besser transportiert wurde als BS^{Bi}, was in Übereinstimmung mit früheren Studien ist (Niewoehner et al., 2014; PMID: 24411731). Dies wurde trotz der erwarteten, überlegenden Bindung von BS^{Bi} an HBCPP Zellen beobachtet (Abbildung 2B).

A



B

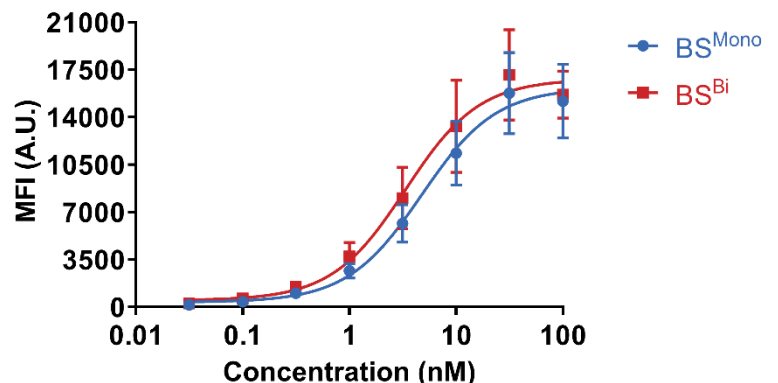
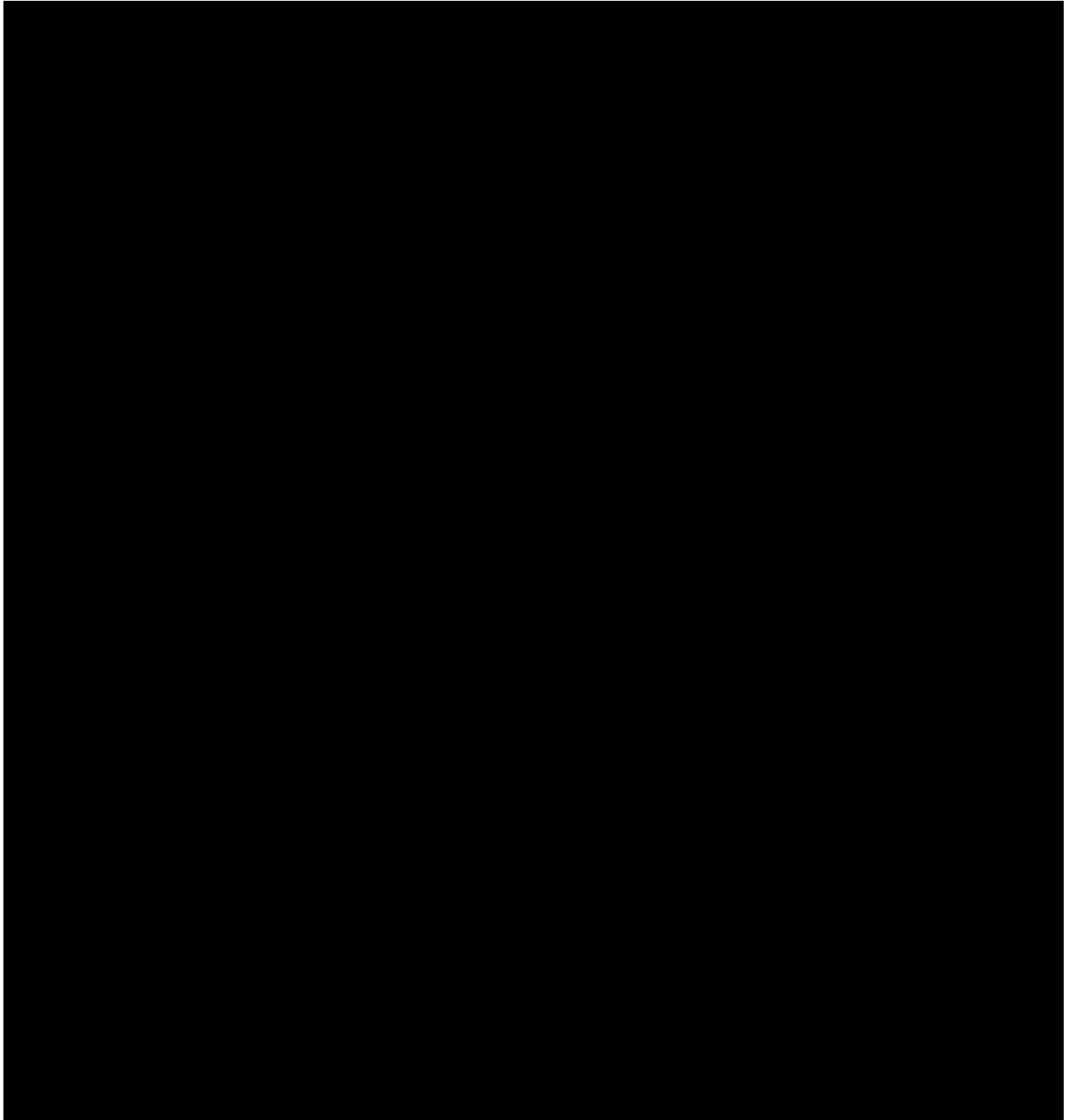
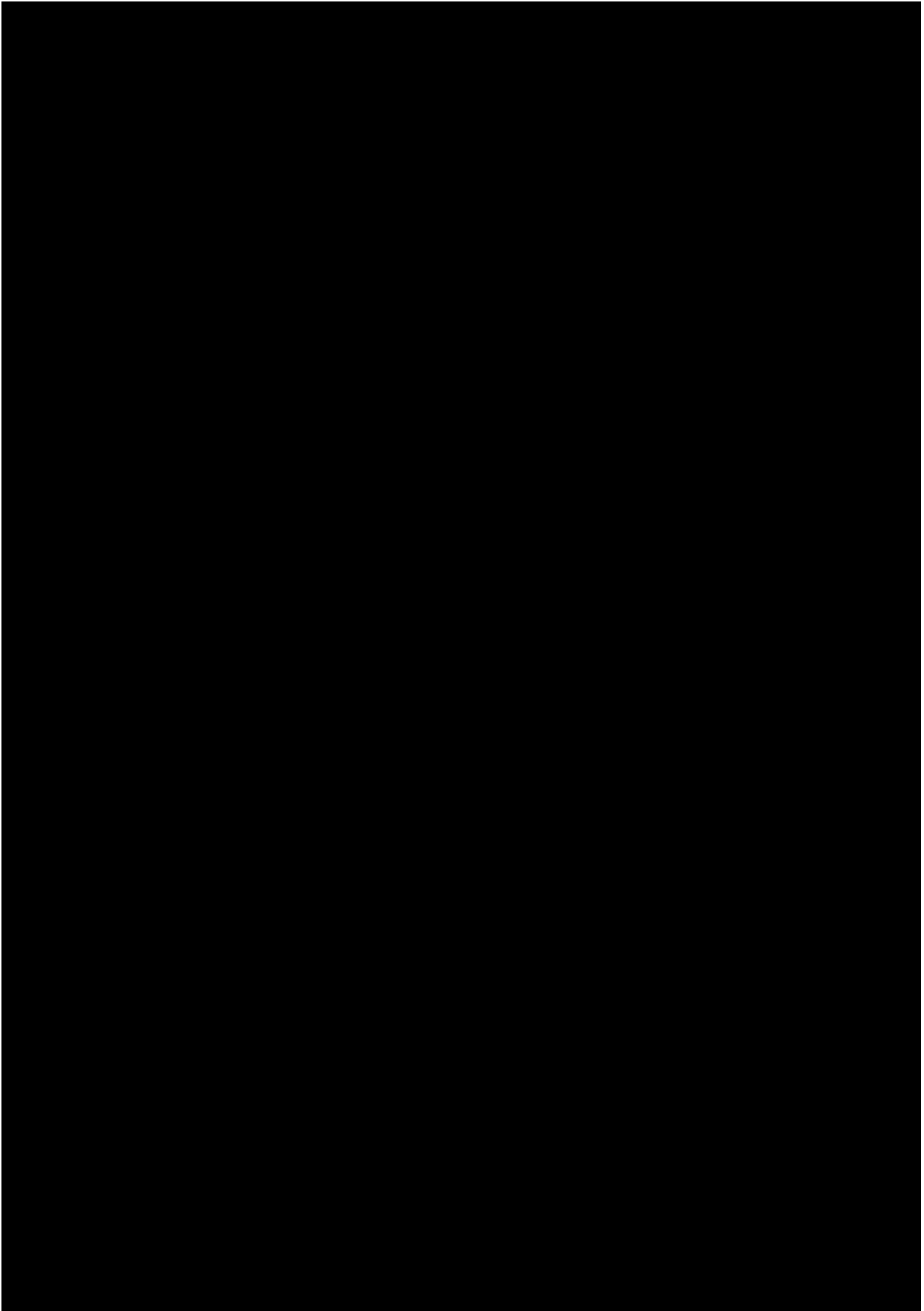


Abbildung 2. Validierung von HIBCPP Zellen als Modell für Rezeptor-vermittelte Transzytose über die BCSFB. (A) Transzytose von BS^{Mono} (monovalent) und BS^{Bi} (bivalent) zu verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C und 4°C. (B) Bindung an HIBCPP Zellen wurde für BS^{Mono} und BS^{Bi} mit Hilfe von Durchflusszytometrie untersucht.

Von den Projektpartnern YUMAB (Dr. Schirrmann; Teilvorhaben 6 im Gesamtprojekt) und USTUTT (Dr. Fischer; Teilvorhaben 2 im Gesamtprojekt) wurden Antikörper mit Komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementarity-determining regions* (CDRs)), die an rekombinantes humanes TfR-Protein und an TfR auf der Oberfläche transfizierter HEK Zellen binden, identifiziert, und als humane IgG-Antikörper hergestellt. Diese IgG-Antikörper wurden im HIBCPP Zell-Modell auf ihre Transzytose-Aktivität hin untersucht.

Der nachfolgende Abschnitt ist als vertraulich einzustufen und nicht für die Veröffentlichung vorgesehen, da eine Publikation und Patentanmeldung noch ausstehen.





Intrazelluläre Lokalisierung.

Die intrazelluläre Lokalisierung der „BrainAim-Moleküle“ in Endosomen und die Bestimmung der endocytischen Ansäuerung mit Hilfe von pHrodo Farbstoffen wurde im Verlauf des Projektes nicht untersucht.

Die wichtigsten Ziele dieses Arbeitspaketes (Etablierung und Bestimmung des Transports ausgesuchter Biologika/„BrainAim-Moleküle“ über die BCSFB *in vitro*) konnten erfüllt werden.

2.3. WP4-3: Optimierung des Modellsystems.

WP4-3.1: Etablierung eines Zwei-Zelltyp Modells.

Zur Zeit des BrainAim Projektes wurde im antragstellenden Labor parallel ein Zwei-Zelltyp-Modell mit Plexus choroideus Epithelzellen (HIBCPP Zellen) auf der Unterseite und *Plexus choroideus* Endothelzellen auf der Oberseite von Zellkultur-Filtereinsätzen etabliert (Muranyi et al., 2022; PMID: 35633941), um ein *in vivo* näheres Modellsystem zur Verfügung zu haben (Abbildung 6A). Dieses weist eine verbesserte Barrierefunktion (gemessen TEER) im Vergleich zu dem nur aus HIBCPP Zellen bestehenden Ausgangsmodell auf (Abbildung 6B). In weiteren Studien kann der Einfluss des Endothels auf die Funktion von TfR und TNFR2 Im Zwei-Zelltyp-Modell evaluiert werden. Alternativ können HIBCPP Zellen auf der oberen Filterseite gezüchtet und die Endothelzellen im unteren Kompartiment kultiviert werden.

WP4-3.2: Kultur und Analyse von *Plexus choroideus* Endothelzellen unter *flow* Bedingungen.

Mit diesem Teil des Arbeitspakets wurde im Verlauf des Projektzeitraums nicht begonnen. Dies gefährdet den Erfolg des Gesamtprojekts nicht.

Als wichtiges Ziel dieses Arbeitspaketes wurde im antragstellenden Labor ein optimiertes Zwei-Zelltyp *in vitro* Model der humanen BCSFB etabliert.

2.4. WP4-4: Transport von Biologika über ein Zwei-Zelltyp-Modell.

Initiale Validierungen wurden durchgeführt und ein Nachweis für die Transzytose von Transferrin erbracht. Es wurde versucht aufzuzeigen, ob die Ko-Kultur von HIBCPP Zellen mit iHCPEnC einen Einfluss auf die Aufnahme oder Transzytose von TfR Liganden hat. Vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aufnahme/Transzytose zwischen Monokultur und Ko-Kultur einem gleichen Muster folgt, allerdings mit geringerer Menge/Effizienz im Zwei-Zelltyp-Modell verglichen zur HIBCPP Zell-Monokultur. Dies könnte auf eine unzureichende Zeit für den Transfer durch die Endothelzellenschicht während der einstündigen Pulsphase oder auf den fehlenden Blutflussdruck, der eine Perfusion der Moleküle durch die Endothelzellenschicht verursacht, wie dies für *in vivo* Bedingungen beschrieben wird. Weiterführende Experimente würden eine detaillierte Analyse ausgewählter BrainAim-Moleküle im Zwei-Zelltyp-Modell einschließen.

2.5. WP4-5: Analyse der Auswirkungen von Entzündungszuständen.

Mit diesem Arbeitspaket wurde im Verlauf des Projektzeitraums nicht begonnen. Dies gefährdet den Erfolg des Gesamtprojekts nicht.

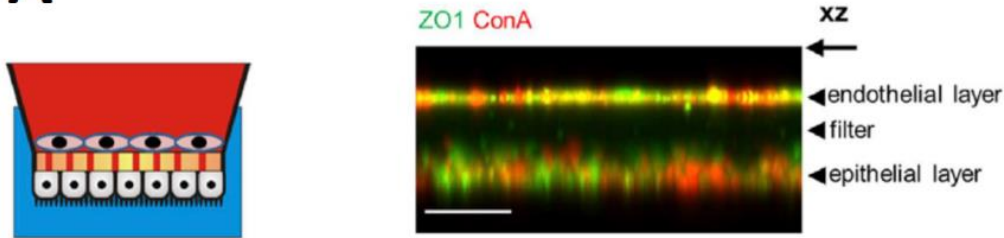
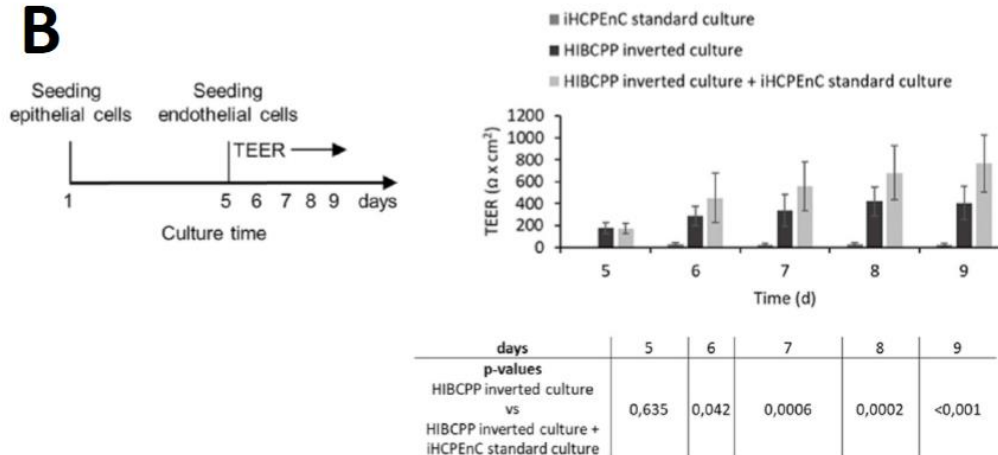
A**B**

Abbildung 6. Zwei-Zelltyp-Modell der BCSFB. (A) Links: Schematische Darstellung des *in vitro* Zwei-Zelltyp-Modells, bestehend aus einem Blutkompartiment (rot), das die iHCPEnC enthält, und der Liquorseite (blau) mit den HIBCPP-Zellen. Rechts: Immunfluoreszenzanalyse des Zwei-Zelltyp-Modells mittels konfokaler Spinning-Disc-Mikroskopie in XZ-Ansicht zeigt die Endothel- und Epithelzellschichten, gefärbt mit einem Antikörper gegen ZO1 (grün) und dem Plasmamembranmarker Con A-Rhodamin (rot). Maßstabsbalken, 30 μ m. (B) Experimenteller Ablauf und funktionelle Analyse des Zwei-Zelltyp-Modells. HIBCPP-Zellen wurden in der Umkehrkultur gezüchtet, an Tag 5 wurden iHCPEnC auf der Oberseite der Filtermembran ausgesät. Der TEER von HIBCPP-Zellen, die in Ko-Kultur mit iHCPEnC über 4 Tage (bis Tag 9) gezüchtet wurden, wurde mit dem TEER von HIBCPP-Zellen oder iHCPEnC in Einzelkultur verglichen. Unterhalb der Grafik sind die p-Werte für den statistischen Vergleich von HIBCPP-Zellen allein mit HIBCPP-Zellen in Ko-Kultur angegeben. Mindestens 3 biologische und technische Replikate wurden in die Analyse einbezogen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (aus Muranyi et al., 2022; PMID: 35633941).

3. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel (0812): 252.021,42 €

Für Durchführung der Studie wurden Postdoktoranden (E13) bezahlt (Mai 2021 bis Oktober 2023: Dr. Fatemeh Dabbagh; Oktober 2023 bis Juli 2024: Dr. Walter Muranyi). Da im Rahmen dieses Projektes eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung von 6 Monaten durchgeführt wurde, wurden Sachmittel in Personalmittel umgewandelt.

Sachmittel (0843): 20.776,98 €

Die eingesetzten Sachmittel wurden zur Durchführung der Studie verwendet.

4. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Alle durchgeführten Arbeiten waren im Rahmen der Projektplanung notwendig und angemessen. Die Mittel wurden im Projekt sinnvoll und sparsam verwendet.

5. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Es haben sich keine Änderungen des Verwertungsplans ergeben. Das Vorhaben hat weiterhin einen klar erkennbaren Anwendungsbezug, BCSFB *in vitro* Modelle zur Testung und Optimierung von Transport und Wirkung maßgeschneiderter Wirkstoffe sind für die Pharmaindustrie ebenfalls weiterhin von hohem Interesse. Es wurden Daten generiert, die in angesehenen wissenschaftlichen Journalen mit peer review publiziert werden können.

6. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Uns sind keine entsprechenden Veröffentlichungen zum Wirkstoff-Transport von „maßgeschneiderten“ Biologika über die BCSFB bekannt.

7. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Geplante Veröffentlichungen:

- Transferrin receptor-mediated transcytosis of bivalent antibodies (working title)

Weiterhin wurde im Rahmen dieses Projektes ein Übersichtsartikel zum Thema „BCSFB *in vitro* Modelle und ihre Anwendungen bei der Entwicklung von (Neuro)pharmazeutika“ publiziert:

- Dabbagh, F., Schrotten, H., Schwerk, C. (2022). *In vitro* models of the blood-cerebrospinal fluid barrier and their applications in the development and research of (neuro)pharmaceuticals. *Pharmaceutics* 14, 1729.