This project has received funding from the Eurostars-2 joint programme with co-funding from the European Union Horizon 2020 research and innovation programme

Schlussbericht zum Vorhaben

„Erforschung des Potenzials und der Grenzen von EL-mab zur Behandlung von Pankreas- und Ovarialkarzinompatienten“

im Rahmen des Eurostars Projekts

E114014 - ELEVATE

„Developing a personalized biological therapy for the treatment of pancreatic and ovarian cancer“

Prof. Dr. Susanne Sebens

Institut für Experimentelle Tumorforschung

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel &

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Arnold-Heller-Str. 1, Gebäude U30, Eingang 1

24105 Kiel

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin.

Förderkennzeichen: 01QE2007C
Projektlaufzeit: 01.09.2021 – 31.08.2023

1. Wissenschaftlicher Hintergrund

Das duktale Pankreasadenokarzinom (PDAC) und Ovarialkarzinom (OC) sind zwei der aggressivsten Tumore, die meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden und schlecht auf bisherige Therapien ansprechen. Damit haben betroffene Patienten* mit einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 5% bzw. 17% nach wie vor eine extrem schlechte Prognose. Therapien mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) haben die Behandlung von vielen Krebserkrankungen verbessert, nicht jedoch die des PDAC und OC. Daher stellt der neuartige EL-mab, ein personalisierter mAb, der das Molekül L1CAM auf Tumorzellen bindet, ergänzt durch eine sensitive Diagnostik eine vielversprechende Therapiestrategie zur Verbesserung der Behandlung von PDAC und OC Patienten dar.

2. Ziel des Projektes

Das gesamte Projekt zielte darauf ab, die Entwicklung und Testung neuartiger Antikörperkonstrukte EL-mab für diagnostische und therapeutische Zwecke voranzutreiben, um damit die Grundlage für eine klinische Studie zu liefern. Das Projekt wurde zusammen mit den Projektpartnern Elthera GmbH (Schweiz), iCellate (Schweden) sowie TARGOS (Deutschland) durchgeführt.

Die Aufgabe des Instituts für Experimentelle Tumorforschung (IET) im Rahmen dieses geplanten Projektes war es, Patientenproben und korrespondierende klinische Daten für die Entwicklung der Diagnostik mit EL-mab in Gewebe- und korrespondierenden Blutproben zu sammeln und den Kooperationspartnern zur Verfügung stellen sowie die therapeutische Wirksamkeit von EL-mab in präklinischen Studien prüfen.

Dafür war das IET in die Arbeitspakete 1, 2 und 5 involviert. Inhalte der Arbeitspakete sowie die durch das IET geleisteten Arbeiten und Ergebnisse sind im nächsten Kapitel dargelegt. Die wesentlichen Ergebnisse werden beschrieben und die besonders wichtigen zusätzlich als Abbildungen dargestellt.

3. Arbeitspakete und wesentliche Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Sammlung und Aufbereitung der Patientenproben (Gewebe und Blut) sowie Versand an die Kooperationspartner

Aufgabenbereich 1.1: Sammlung und Aufarbeitung von zusammengehörenden Blut- und Tumorgewebeproben von Krebspatienten im Rahmen des Biobankings am IET

Aufgabenbereich 1.2: Organisation von Verpackung und Versand von Blutproben und sowie in Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Tumorgewebe an die Konsortiumspartner

Ergebnisse: Die Nutzung der Patientenmaterialien und assoziierter klinisch-pathologischer Daten, die den Projektpartnern in pseudoanonymisierter Form zur Verfügung gestellt wurden, für Forschungszwecke und dieses Projekt war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt worden und von jedem Patienten wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt.

Da zum einen Pandemie-bedingt die Anzahl an operablen PDAC und OC Patienten im Vergleich zu den Vorjahren, auf Basis derer die Patientenrekrutierungskalkulation basierte, deutlich geringer war, und zum anderen seitens des Projektpartners iCellate längere Etablierungsarbeiten für die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) mit EL-mab notwendig waren, hat es in Absprache mit allen Projektpartnern bei der Patientenrekrutierung folgende Änderungen gegeben:

1. Es wurden neben Patienten mit einem PDAC, anstelle von Patienten mit einem OC Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (CRC) in die Studie aufgenommen. Im Gegensatz zum PDAC und OC handelt es sich beim CRC um einen deutlich häufigeren Tumor. Zudem ist die Datenlage zu L1CAM und seiner Rolle in der Tumorprogression sowie zum Potenzial als therapeutisches Target im PDAC und CRC am umfangreichsten.
2. Da weniger Patienten als geplant eingeschlossen werden konnten, wurde ferner beschlossen, dass – sofern möglich – von den eingeschlossenen Patienten auch Blutproben im Verlauf der Therapie gesammelt werden, um zu untersuchen, ob und wie sich die Präsenz von CTC mit und ohne L1CAM Expression unter Therapie zu untersuchen.

Insgesamt wurden 72 Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen jeweils 2 Transfix-Röhrchen mit Blut direkt am Tag der Blutentnahme an den Projektpartner iCellate zur Detektion von CTC sowie der Charakterisierung dieser bzgl. der L1CAM Expression mit EL-mab geschickt wurden. Darüber hinaus wurden 2 ml Plasma/Patient an den Projektpartner Elthera für die Detektion von löslichem L1CAM mit EL-mab versandt. Von allen Patienten wurden von den korrespondierenden Paraffin-eingebetteten Tumorgeweben (bzw. bei den benignen Erkrankungen Gewebe des erkrankten Organsystems) jeweils 10 2 µm dicke Schnitte angefertigt und an den Projektpartner TARGOS für die immunhistochemische Analyse von L1CAM mittels EL-mab geschickt. Der Tabelle 1 sind Angaben zum Patientenkollektiv zu entnehmen. Die Arbeiten im Rahmen dieses Arbeitspaketes waren somit die Grundlage für sämtliche Untersuchungen der anderen Projektpartner, in denen die Nutzbarkeit von EL-mab als *compagnion diagnostic* getestet wurde.

Tabelle 1: Übersicht über die eingeschlossenen Patienten, von denen Blut und Gewebe an die Projektpartner versendet wurden

	Pankreasadeno-karzinome	**Gutartige Erkrankungen des Pankreas**	**Kolorektaladeno-karzinome**	**Gutartige Erkrankungen des Darms**
Anzahl Patienten	18	8	37	9
Alter	71 (37-83)	58 (50-74)	65 (37-85)	43 (29-72)
Geschlecht	7/11	6/2	16/21	4/5

(weiblich/männlich)				
UICC Stadium				
UICC 0			1	
UICC I	6		5	
UICC II	7		10 (6x IIa, 4xIIb)	
UICC III	2		9 (2xIIIa, 4xIIIb, 3xIIIc)	
UICC IV	3		12	

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zur Bearbeitung dieses Arbeitspaktes sind: Pipettenspitzen, Pipetten, Schraubröhren, Circulating Tumour Cell TransFix Tubes, Monovetten (Li-Hep-Gel, K-EDTA), Multi-Adapter Monovette, Vernichtungsbeutel

Arbeitspaket 2: Translationale Pharmakologie von EL-Mab

Aufgabenbereich 2.1: Korrelation der L1CAM Expression mit der Effektivität von EL-Mab

- Generierung von verschiedenen Tumorzelllinien mit definierter L1CAM Expression

- Validierung der L1CAM Expression in den generierten Zelllinien auf RNA- und Proteinebene

Aufgabenbereich 2.2: Bestimmung synergistischer Effekte von EL-mab und Immun-/Chemotherapien

- Behandlung von Tumorzelllinien mit definierter L1CAM Expression mit EL-mab allein und in Kombination mit Chemotherapie

- Behandlung von Tumorzelllinien mit definierter L1CAM Expression mit EL-mab allein und in Kombination mit Immuncheckpointinhibitoren und Analyse des Tumorzelllyse durch zytotoxische CD8+ T-Zellen

- Aufklärung der mechanistischen Ursachen für eine synergistische Wirkung von EL-mab

Ergebnisse:

In Rücksprache mit allen Projektpartnern wurde beschlossen, dass wir uns bei der translationalen Pharmakologie von EL-Mab auf PDAC-Zellen fokussieren, da beim PDAC die klinische Notwendigkeit von effektiveren Therapiestrategien deutlich höher ist als beim CRC, so dass schnellstmöglich umfassende Daten zur therapeutischen Wirksamkeit von EL-mab bei dieser Tumorentität generiert werden sollten.

Aufgabenbereich 2.1: Korrelation der L1CAM Expression mit der Effektivität von EL-mab

Es standen PDAC-Zelllinien mit definierter L1CAM-Expression (niedrig bzw. keine versus hohe L1CAM Expression) bereits zur Verfügung bzw. wurden neu generiert. Bevor die Zelllinien an die Projektpartner Elthera und ICELLATE zur Durchführung der in ihren Projekten geplanten Versuche zur Verfügung gestellt wurden, wurde alle Zelllinien mit ihren Varianten mittels RT-PCR und immunzytochemischer Färbung hinsichtlich der L1CAM Expression charakterisiert. Folgende Zelllinien wurden an die Projektpartner versendet: PT-45-P1 L1CAM+ und PT45-P1 mock (L1CAM-), Panc1 L1CAM^{high} (L1CAM+) und Panc1 L1CAM^{low} (L1CAM-), Panc89 Paraclone (L1CAM+) und Panc89 Holoclone (L1CAM-). Die meisten Versuche zur Testung der therapeutischen Wirksamkeit von EL-mab wurden mit den jeweiligen Zellvarianten der beiden PDAC-Zelllinien Panc1 sowie Panc89 durchgeführt (Abbildung 1).

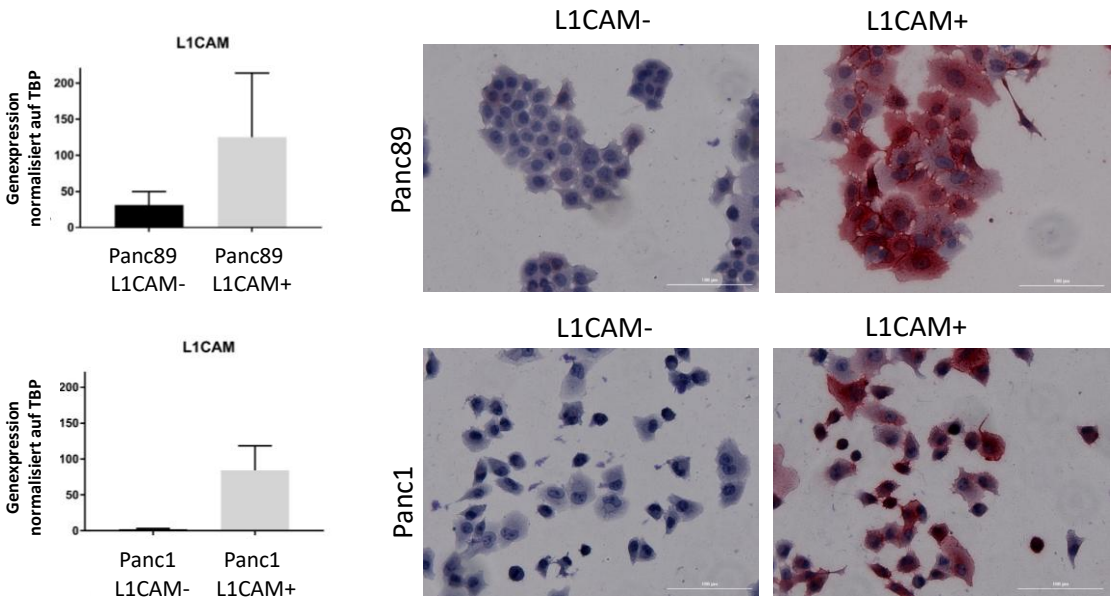

Abbildung 1: Charakterisierung der L1CAM Expression in den Zellvarianten der beiden PDAC-Zelllinien Panc89 und Panc1 auf RNA-Ebene mittels RT-PCR (linke Seite), dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, sowie auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung (rechte Seite). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, der Maßstab je Bild beträgt 100 µm.

Darüber hinaus wurde eine kleine Validierungsstudie mit der PDAC-Zelllinie LüPanc-1, deren parentale Population aus L1CAM+ und L1CAM- Zellen besteht und von der verschiedene Zellklone mit unterschiedlicher L1CAM Expression isoliert wurden. Abbildung 2 zeigt die Verteilung L1CAM+ Zellen in den verschiedenen Zellklonen der LüPanc-1 Zellen.

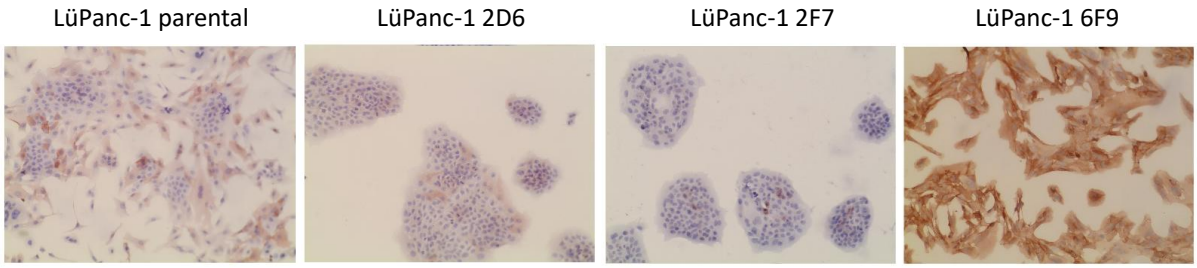

Abbildung 2: Charakterisierung der L1CAM Expression der verschiedenen Zellvarianten der PDAC-Zelllinie LüPanc-1 auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, die bei 260-facher Vergrößerung gemacht wurden.

Aufgabenbereich 2.2: Bestimmung synergistischer Effekte von EL-mab und Immun-/Chemotherapien

Zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit von EL-mab (allein und in Kombination mit anderen Therapeutika) wurden zunächst Titrations- und Kinetikversuche zur Ermittlung der zu verwendenden EL-mab Konzentrationen und optimalen Messzeitpunkte durchgeführt. Ferner wurden verschiedene Readout-Verfahren getestet und verglichen, u.a. Konfluenzmessung sowie Celltox- und Propidiumjodid-Färbung mittels automatisierter Mikroskopie mit dem NyOne Imager bzw. Detektion eines Caspase-abhängig abgespalteten Neoepitops von Zytokeratin 18, welches im Überstand der Zellen mittels M30-Cytodeath-ELISA detektiert werden kann. Letztere Methode bietet den Vorteil bei Austestung in stromaangereicherten Tumormodellen (siehe weiter unten), nur den Therapieinduzierten Zelltod der PDAC-Zellen zu detektieren.
Am aussagekräftigsten erwiesen sich hierbei die Hoechst (Lebendzell)-Färbung sowie der M30-Cytodeath-ELISA. Zur Austestung standen zwei unterschiedliche EL-mab-Konstrukte zur Verfügung: 1. ein L1CAM-Drug Konjugat (L1CAM-ADC) und 2. ein bispezifischer anti-CD3/L1CAM EL-mab. Von beiden EL-mab Konstrukten standen seitens des Kooperationspartners Elthera jeweils 2 Varianten zur Verfügung. Beim L1CAM-ADC handelte es sich dabei um gleiche L1CAM-Antikörperkonstrukte, an die jeweils unterschiedliche Toxine gekoppelt waren. Bei den beiden bispezifischen EL-mab unterschieden sich die beiden Varianten jeweils in der Affinität des CD3 bindenden Antikörperteils.

Alle EL-mab Konstrukte wurden zunächst als Monotherapie getestet, um deren alleinige Wirksamkeit bei den verschiedenen Zellmodellen zu überprüfen. Als Vergleich erfolgte eine Behandlung mit dem Zytostatikum Gemcitabin, welches entsprechend der Leitlinie zur Behandlung von PDAC-Patienten in der adjuvanten und palliativen Therapie zum Einsatz kommt.
Die wesentlichen Befunde mit den **beiden L1CAM-ADC** sind wie folgt:
Die Behandlung mit den L1CAM-ADC führte in Panc89 und Panc1 Zelllinien mit unterschiedlicher L1CAM-Expression zu einer signifikanten Wachstumsminderung in L1CAM hoch exprimierenden Zellen, wodurch die Spezifität der L1CAM-ADC bestätigt werden konnte. In höheren L1CAM-ADC

Konzentrationen (100 nM bei L1CAM-ADC 1 und 10 nM bei L1CAM-ADC2) führte die Behandlung zur Reduktion der Lebendzellzahl der PDAC-Zellen unabhängig des L1CAM-Status, was auf zusätzliche L1CAM-unabhängige Effekte hinweist. Außerdem schienen die Effekte des L1CAM-ADC2 stärker ausgeprägt zu sein als die des L1CAM-ADC1, da hier bei einer Konzentration von 1 nM stärkere Effekte erzielt wurden als mit 20 nM L1CAM-ADC2 (Abbildung 3). Ähnliche Effekte konnten in den LüPanc-1 Zellvarianten beobachtet werden, bei denen eine Behandlung mit L1CAM-ADC zur stärksten Tumorzellreduktion im LüPanc-1 6F9 Klon, deren Zellen die stärkste L1CAM Expression im Vergleich zu den anderen Zellvarianten aufwies (Abbildung 2), führte. Ferner führte eine einmalige Behandlung mit dem L1CAM-ADC zu keiner Resistenzbildung, da Zellen, die eine L1CAM-ADC Behandlung überlebt hatten, expandiert werden konnten und erneut mit dem L1CAM-ADC behandelt wurden, ähnlich auf die 2. Behandlung ansprachen wie auf die erste. Mittels Western Blot Analysen wurde untersucht, ob es durch die Behandlung mit L1CAM-ADC zu einer Aktivierung von L1CAM abhängigen Signalwegen kommt. Erste Versuche weisen darauf hin, dass es nach L1CAM-ADC Behandlung in L1CAM exprimierenden Tumorzellen zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges kommt. Inwiefern diese Aktivierung zum beobachteten therapeutischen Effekt beiträgt, bleibt noch zu klären.

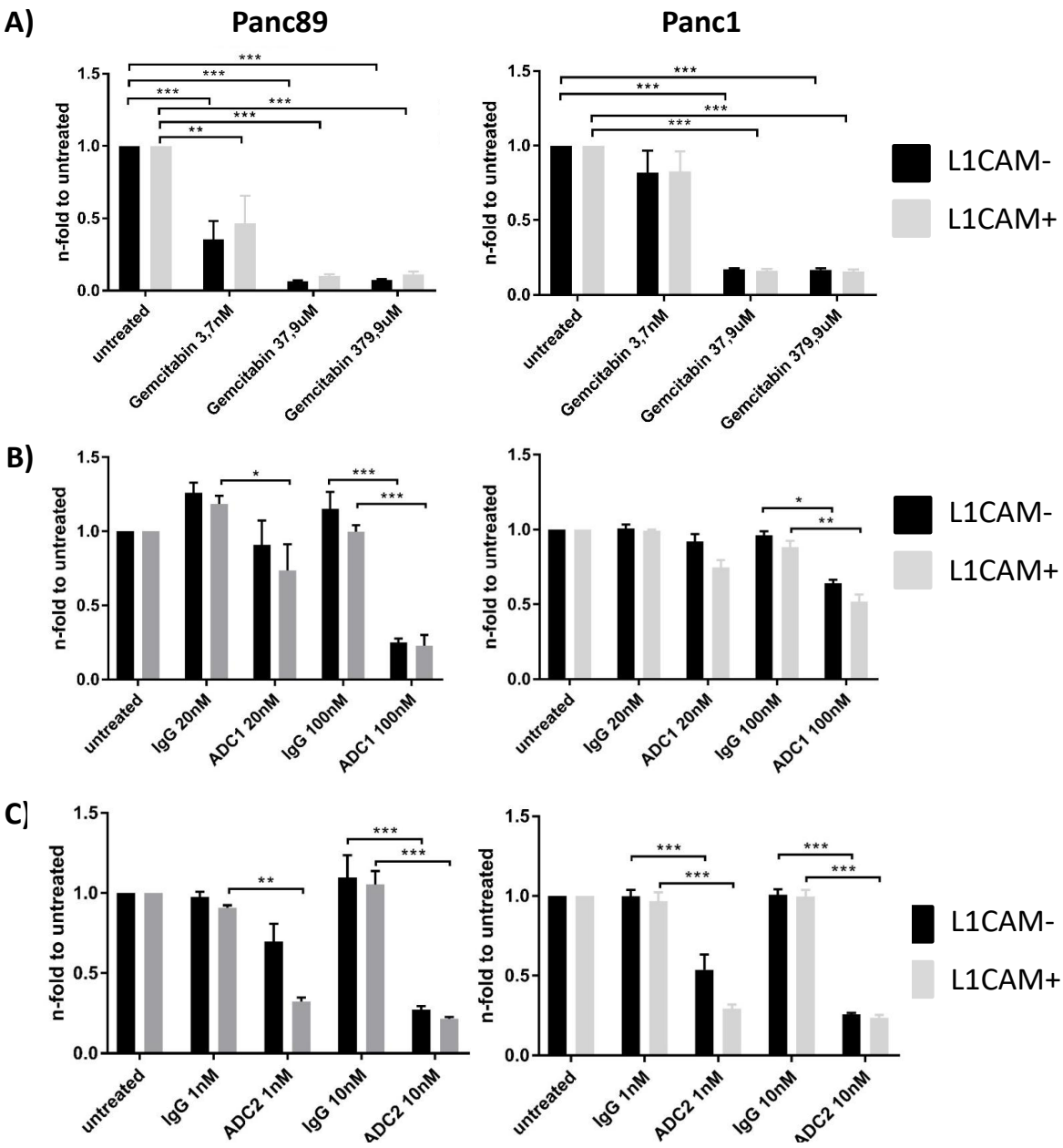

Abbildung 3: Therapeutische Effekte von der Behandlung mit Gemcitabin bzw. L1CAM-ADC auf Panc89 und Panc1 Zellen mit unterschiedlicher L1CAM Expression. Panc89 und Panc1 Zellen mit und ohne L1CAM Expression wurden unbehandelt belassen oder mit (A) Gemcitabin, (B) ADC1, (C) ADC2 oder dem (B+C) Kontroll-Antikörper in den angezeigten Konzentrationen für 72 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Hoechst-Färbung ermittelt. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte und SEM normalisiert auf die unbehandelten Zellen. Anzahl der unabhängigen Experimente: n= 3.Signifikanzen werden wie folgt dargestellt: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Die Behandlung von Tumorzellpopulationen mit definiertem Anteil an L1CAM+ Zellen ergab, dass in der Zellpopulation mindestens 50% L1CAM+ Zellen vorhanden sein müssen, so dass ein therapeutischer Effekt vergleichbar einer Population mit 100% L1CAM Zellen zu verzeichnen ist (Abbildung 4). PDAC-Zellpopulationen, die von Natur aus L1CAM+ und L1CAM- Zellen aufweisen und damit heterogen in Bezug auf L1CAM sind, sprechen ebenfalls auf eine Behandlung mit L1CAM-ADC an. Wobei es auch hier scheint, dass die Verminderung der Tumorzellzahl mit der Anzahl an L1CAM+

Tumorzellen korreliert und eine Mindestmenge an Tumorzellen mit L1CAM Expression vorhanden sein muss, damit ein signifikanter Effekt erzielt werden kann. Diese Ergebnisse deuten ferner darauf hin, dass freies Toxin aus L1CAM-positiven Zellen in benachbarte Zellen diffundieren kann und somit auch in L1CAM-negativen Zellen Apoptose initiieren kann.

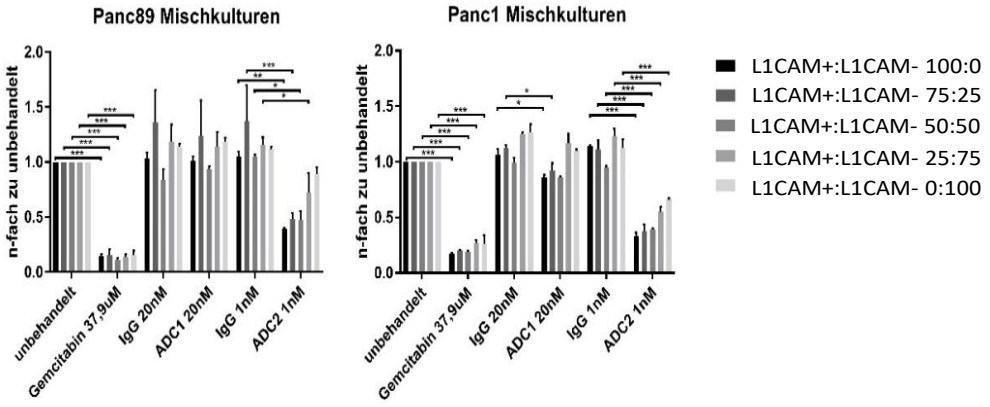

Abbildung 4: Therapeutische Effekte von Gemcitabin und L1CAM-ADC auf Panc89 und Panc1 Mischkulturen. Panc89und Panc1 Zellen mit definierter L1CAM Expression wurden im Verhältnis 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 und 0:100 ausgesät. Die Mischpopulationen wurden mit Gemcitabin (37,9 µM), L1CAM-ADC1 (20 nM), L1CAM-ADC2 (1 nM) bzw. dem Kontrollantikörper in der entsprechenden Konzentration für 72 Stunden behandelt. Gesamtzellzahlen ermittelt durch Hoechstfärbung der jeweiligen Mischpopulationen nach Behandlung dargestellt als n-fach zu den jeweils unbehandelten Zellen. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte und SEM. Anzahl der unabhängigen Experimente: n= 3. Signifikanzen werden wie folgt dargestellt: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Im Weiteren wurde überprüft, ob der Einsatz von L1CAM-ADC in sequenziellen und gleichzeitigen Behandlungen mit Gemcitabin die therapeutische Effizienz weiter steigern kann. In Vorversuchen wurde ein L1CAM induzierender Effekt in Panc89 L1CAM-Zellen nach einer Behandlung mit Gemcitabin für 48 h nachgewiesen. Die sequenziellen Behandlungen mit einer Behandlung aus Gemcitabin gefolgt von einer Behandlung mit L1CAM-ADC (und umgekehrt) zeigten, dass diese Therapieansätze zu einer besseren Effizienz in Bezug auf die Inhibierung des Zellwachstums und die Induktion des Zelltods im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltherapien führen. Es zeigte sich erneut eine höhere therapeutische Wirksamkeit von L1CAM-ADC2 im Vergleich zu L1CAM-ADC1, daher sind in Abbildung 5 nur die Daten mit L1CAM-ADC2 gezeigt.

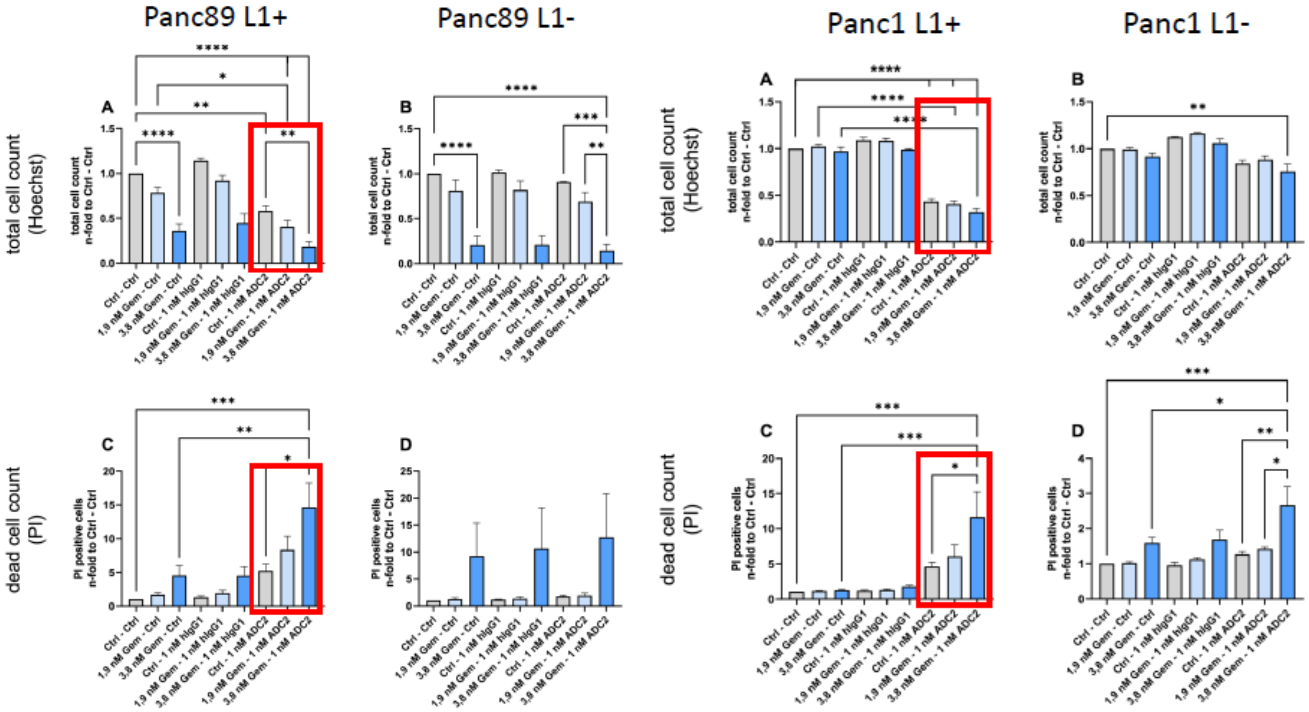

Abbildung 5: Therapeutische Effekte einer sequentiellen Behandlung aus Gemcitabin gefolgt von L1CAM-ADC in Panc89 und Panc1 Zellen mit unterschiedlicher L1CAM Expression. Panc89 und Panc1 Zellen mit und ohne L1CAM Expression wurden unbehandelt belassen (Ctrl) oder mit 1,9 nM oder 3,8 nM Gemcitabin für 48 Stunden behandelt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden entweder in frischem Medium alleine oder versetzt mit 1 nM Kontrollantikörper (hIgG1) oder L1CAM-ADC2 für 72 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Hoechst-Färbung sowie Anzahl an toter (PI positiver) Zellen ermittelt. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte und SEM normalisiert auf die unbehandelten Zellen. Anzahl der unabhängigen Experimente: n= 3.Signifikanzen werden wie folgt dargestellt: p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***, p < 0,0001 = *.***

Auch in diesen Versuchen wurden Zellpopulationen mit definierten Anteilen von L1CAM+ und L1CAM- PDAC Zellen verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Effizienz mit dem zunehmenden Anteil an L1CAM exprimierenden Zellen steigt, wobei optimale Effekte bei einem Prozentsatz von mindestens 50 % (Panc1) bzw. 75 % (Panc89) L1CAM+ Zellen in der Gesamtzellpopulation beobachtet wurden. Simultane Behandlungen mit L1CAM-ADC2 und Gemcitabin erzielten hingegen nur geringfügig höhere therapeutische Effekte in der Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zu den sequenziellen Schemata.

In der Zusammenschau lässt sich schlussfolgern, dass vor allem L1CAM-ADC2 in einer sehr geringen Konzentration von 1 nM signifikante anti-tumorigene L1CAM spezifische Effekte in verschiedenen Tumorzellmodellen erzielen konnte. Ein Anteil von 50% an L1CAM exprimierenden Tumorzellen erscheint notwendig, um den maximal zu erwartenden Effekt zu erzielen. Eine sequentielle Behandlung aus L1CAM-ADC und Gemcitabin scheint zu einer weiteren Verstärkung des anti-tumorigenen Effekts zu führen, was eine solche Kombinationstherapie als vielversprechend

erscheinen lässt. Die Testung von L1CAM-ADC in orthotopen PDAC-Maustumormodell stützen die oben beschriebenen Befunde und untermauern das große Potenzial von EL-mab in der Behandlung des PDAC.

Die wesentlichen Befunde mit den beiden **bispezifischen EL-mab** sind wie folgt:

Als erstes wurde die anti-tumorigene Wirkung der bispezifischen EL-mab unter Verwendung von humanen CD8+ T Zellen durchgeführt, die aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von gesunden Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation und negativer magnetischer Separation isoliert wurden. Es wurden nur CD8+ T Zellen mit einer Reinheit von ≥ 80% verwendet. Es kamen zum einen unstimulierte (naive) und zum anderen stimulierte CD8+ T Zellen zum Einsatz. Letztere wurden generiert, in dem die frisch isolierten CD8+T Zellen für 4 Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern sowie IL-2 stimuliert wurden. Die Behandlung mit dem bispezifischen EL-mab führte in Gegenwart von aktivierten CD8+ T Zellen bereits nach 8 Stunden zu einer sehr effizienten dosisabhängigen (1-100 pM) Zelllyse L1CAM exprimierender PDAC Zellen (Zelllinien Panc89 und Panc1) und zwar bei einem sehr geringen Tumorzell-Effektorzellverhältnis von 1:5. Aber auch in Gegenwart von nicht aktivierten CD8+ T Zellen wurden o.g. Effekte beobachtet, allerdings nicht nach 8 Stunden, sondern erst nach 48 Stunden Behandlungs- und Kultivierungszeit. Solche Effekte wurden nicht bei PDAC Zellen ohne L1CAM-Expression beobachtet, was die Spezifität dieser immuntherapeutischen Strategie untermauert.

Die Behandlung mit dem bispezifischen EL-mab führte ebenfalls zu einer sehr effizienten dosisabhängigen Zelllyse L1CAM exprimierender PDAC Zellen in Gegenwart von PBMC von Gesundspendern, hier in einem Tumorzell-Effektorzellverhältnis von 1:10 und nach 48 Stunden Behandlungs- und Kultivierungszeit (Abbildung 6). EL-mab 1 (bAB1) zeigte in allen Testungen eine stärkere Wirkung als EL-mab 1 (bAB2), was mit der höheren Affinität des Antikörpers gegenüber CD3 korrelierte.

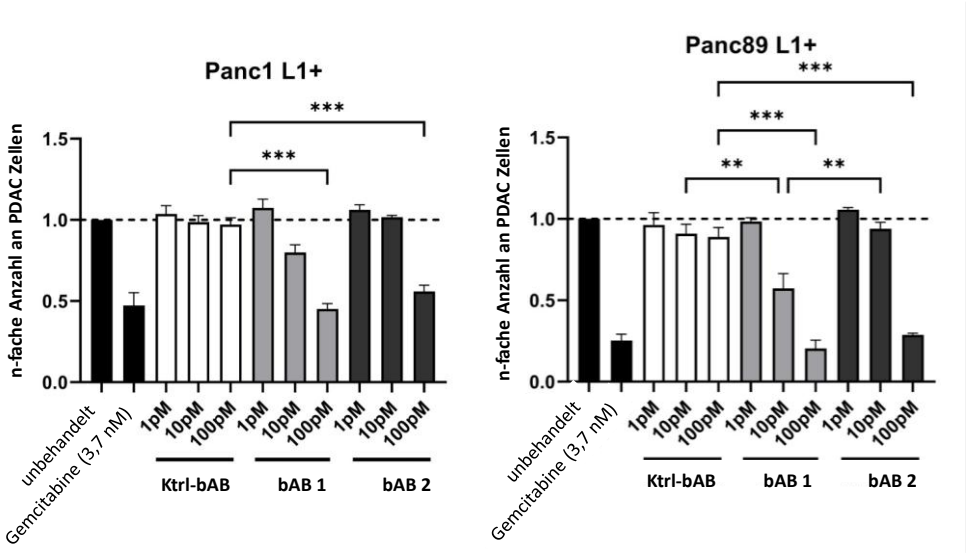

Abbildung 6: Therapeutische Effekte von der Behandlung mit bispezifischen EL-mab auf L1CAM exprimierende Panc89 und Panc1 Zellen in Gegenwart von PBMC gesunder Spender. Panc89 und Panc1 Zellen mit L1CAM Expression wurden zusammen mit PBMC gesunder Spender in einem Tumorzell-Effektorzellverhältnis von 1:10 kokultiviert und unbehandelt belassen oder mit Gemcitabin, dem Kontroll-Antikörper (Ktrl-bAB), dem bispezifischen EL-mab1 (bAB1) bzw. EL-mab2 (bAB2) in den angezeigten Konzentrationen für 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Hoechst-Färbung ermittelt. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte und SEM normalisiert auf die unbehandelten Zellen. Anzahl der unabhängigen Experimente: n= 3.Signifikanzen werden wie folgt dargestellt: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Auch in diesen Versuchen wurden von den Panc89 und Panc1 Zellen Mischpopulationen mit definierten Prozentsätzen von L1CAM+ und L1CAM- PDAC Zellen verwendet, um zu testen, ab welcher Menge an L1CAM exprimierenden Zellen eine vergleichbare Tumorzelllyse erzielt werden kann als mit einer Tumorzellpopulation aus 100% L1CAM+ Tumorzellen. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 100 pM EL-mab bei Panc1 Zellen bereits mit 25% L1CAM+ Zellen zu einer vergleichbaren Tumorzelllyse führte wie bei einer Panc1 Zellpopulation mit 100% L1CAM+ Zellen, wohingegen bei Panc89 Zellen die Reduktion der Tumorzellzahl mit der Menge an L1CAM exprimierenden Tumorzellen in der Population korrelierte.

Bei der Verwendung von PBMC aus dem Blut von PDAC-Patienten konnten ebenfalls therapeutische Effekte beobachtet werden, wobei diese deutlich heterogener ausfielen und zwischen den Patienten variierten (Abbildung 7). So waren im Gegensatz zu PBMC von Gesundspendern, bei denen eine Konzentration von 100 pM EL-mab zu einer Tumorzelllyse von mindestens 50% führte, bei Testung mit den PBMC eines PDAC Patienten bei dieser Konzentration keinerlei Tumorzelllyseaktivität zu verzeichnen (Abbildung 7, Patient 2), wohingegen bei Verwendung von PBMC eines anderen PDAC-Patienten bereits bei einer Konzentration von 10 pM EL-mab eine starke Reduktion der Tumorzellzahl zu verzeichnen war (Abbildung 7, Patient 3).

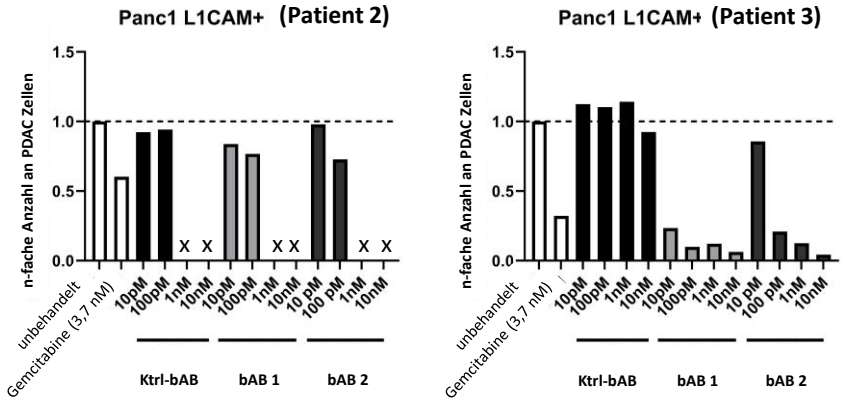

Abbildung 7: Therapeutische Effekte von der Behandlung mit bispezifischen EL-mab auf L1CAM exprimierende Panc1 Zellen in Gegenwart von PBMC von PDAC-Patienten. Panc1 Zellen mit L1CAM Expression wurden zusammen mit PBMC von PDAC-Patienten in einem Tumorzell-Effektorzellverhältnis von 1:10 kokultiviert und unbehandelt belassen oder mit Gemcitabin, dem Kontroll-Antikörper (Ktrl-bAB), dem bispezifischen EL-mab1 (bAB1) bzw. EL-mab2 (bAB2) in den angezeigten Konzentrationen für 48 Stunden

behandelt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Hoechst-Färbung ermittelt. Säulendiagramme zeigen die Werte mit den Zellen von zwei Patienten, jeweils normalisiert auf die unbehandelten Zellen. X= aus Mangel an PBMC erfolgte keine Behandlung mit dieser Konzentration an EL-mab.

Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass die Stärke der Tumorzelllyse offenbar mit der Immunzellzusammensetzung sowie dem Aktivierungsstatus der CD4+ und CD8+ T Zellen im Blut der Patienten korrelieren.

Einhergehend mit der erhöhten PDAC-Zelllyse in Gegenwart von CD8+ T Zellen bzw. PBMC und bispezifischen EL-mab waren die Spiegel an CD8+ T Zelleffektormolekülen (z.B. Granzyme A+B, Perforin) auf RNA Ebene in den Effektorzellen sowie im Zellkulturüberstand erhöht. Hier korrelierte der Anstieg dieser Effektormoleküle mit der Reduktion der Tumorzellzahl, d.h. die Effekte waren stärker ausgeprägt bei Verwendung von 100 pM EL-mab im Vergleich zu 10 pM EL-mab. Insgesamt untermauern diese Ergebnisse die EL-mab vermittelte Aktivierung des zytotoxischen Effektorphänotyps gegenüber L1CAM exprimierenden PDAC Zellen.

Die Ergebnisse mit dem bispezifischen EL-mab untermauern die Wirksamkeit dieser Therapiestrategie zur effektiven T-Zellvermittelten Eleminierung von PDAC-Zellen, und das in Gegenwart von selbst geringen Mengen an Effektorzellen. Dieses ist insofern von Wichtigkeit, da das PDAC Stroma in der Regel durch eine geringe Anzahl an CD8+ T Zellen ausgezeichnet ist.

Eine Limitation der bisherigen Untersuchungen ist jedoch, dass die Wirksamkeit von EL-mab nur in reinen Tumorzellmodellen getestet wurde, in denen bisher die 3D Architektur sowie die komplexe Zusammensetzung eines Tumors (und vor allem des PDAC) nicht berücksichtigt wurde.

Um diesen wichtigen Aspekt, der die Effektivität dieser Therapiestrategie maßgeblich beeinflussen kann, Rechnung zu tragen, wurde mit der Etablierung der Austestung an sogenannten Organotypic Tissue Slices (OTS) begonnen. Hierfür wird frisches Tumorgewebe in 300 µm dicke Schnitte geschnitten und in einem speziellen Kulturansatz kultiviert. In dieser Weise bleibt die Gewebearchitektur und vor allem die Stromazusammensetzung inkl. T-Zellen sowie anderer Immunzellen, Karzinom-assoziierten Fibroblasten und der Extrazellulären Matrix für mehrere Tage erhalten. Um in diesem Modell die therapeutische Wirksamkeit von EL-mab nachzuweisen, war es wichtig ein Readout-System zu etablieren, welches verlässlich die PDAC-/Epithelzellapoptose anzeigt. Ferner ist es wichtig, dass die Tumorarchitektur mit allen seinen Stromazellen über den Versuchszeitraum erhalten bleibt. Bevor mit den EL-mab Testungen begonnen wurde, wurden OTS an verschiedenen Kulturzeitpunkten in dünnere Schnitte geschnitten und dann immunhistochemisch auf verschiedene Stromazellmarker gefärbt. Hier zeigte sich, dass es innerhalb von 6 Tagenkulturdauer zu keiner nennenswerten Änderung der Stromazellzusammenstzung kommt. Eine erste Testung des bispezifischen EL-mab mit einem PDAC-OTS konnte zeigen, dass es nach Behandlung mit dem bispezfischen EL-mab2 (bAB2) im Vergleich zu einem unbehandelten OTS zu

einem deutlichen Anstieg an CD8+ T Zelleffektormolekülen sowie Caspase-abhängig gespaltenem Keratin 18 (cck18) im Überstand kam, welches mit dem M30 Cytodeath ELISA gemessen wurde (Abbildung 8). Der Anstieg war am deutlichsten nach einem Tag Behandlung zu verzeichnen. Diese Daten weisen auf die Wirksamkeit dieses Antikörpers selbst im komplexen Tumorkontext hin. Weitere Testungen des EL-mab sind zur Validierung notwendig, wobei bereits Versuche mit zwei weiteren OTS durchgeführt wurden, bei denen momentan die Auswertung sowie die Korrelation der induzierten Tumorzellapoptose mit der Stromazusammensetzung sowie L1CAM Expression der Tumorzellen erfolgen.

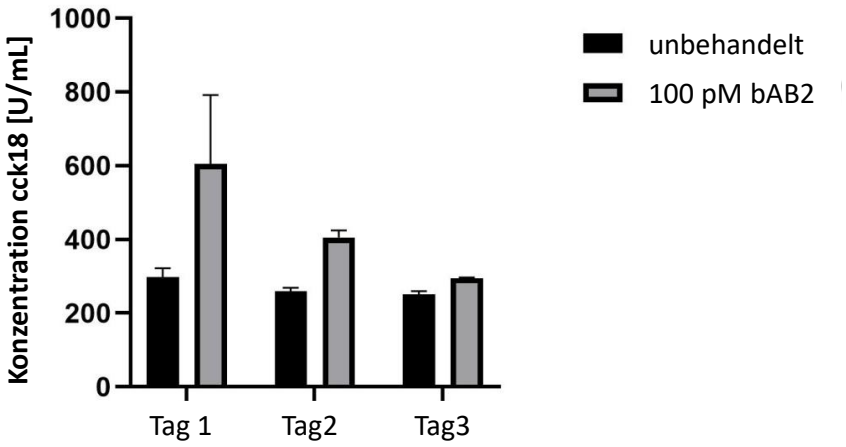

Abbildung 8: Therapeutische Wirksamkeit des bispezifischen EL-mab2 (bAB2) in einem Organotypic Tissue Slice (OTS) eines PDAC-Patienten. Ein OTS eines PDAC Patienten blieb unbehandelt und ein anderer wurde mit 100 pM des bispezifischen EL-mab2 (bAB2) für die angezeigten Zeiten behandelt. An den entsprechenden Zeitpunkten wurde Überstand entnommen und die Menge an Caspase-gespaltenem Keratin 18 (cck18) mittels M30 Cytodeath ELISA bestimmt.

Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen mit beiden EL-mab Konstrukten laufen momentan folgende Untersuchungen:

1. Testung von EL-mab in Kombination mit Immuncheckpointinhibitoren (welches eigentlich als Teil von Arbeitspaket 2 geplant war, aber wegen der bevorzugten Etablierung der OTS als patienten-nahes Tumormodell erst jetzt bearbeitet wird)
2. Testung von EL-mab in verschiedenen stromaangereicherten 3D Kulturen, z.B. mit Karzinom-assoziierten Fibroblasten, Makrophagen, Bakterien, um dezidiert zu überprüfen, ob die Wirksamkeit von EL-mab durch bestimmte Komponenten des Tumorstromas bzw. durch die 3D Architektur des Tumors beeinflusst wird. Diese Untersuchungen sollen ferner dazu beitragen zu prüfen, ob bestimmte Tumorbedingungen gegeben sein müssen, damit diese therapeutische Strategie wirksam ist. Als 3D Kulturen kommen neben den OTS (die aufgrund der geringen Anzahl an operablen Patienten nur limitiert zur Verfügung stehen) Tumorsphäroide sowie Organoide zum Einsatz.

Die im Arbeitspaket 2 erzielten Ergebnisse haben nicht nur wesentlich dazu beigetragen, die therapeutische Wirksamkeit von EL-mab zu prüfen und aufzuzeigen, sondern dadurch dass es in weiten Teilen durch Nachwuchsforschende bearbeitet wurde, hat das Projekt maßgeblich zur Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses beigetragen. Folgende Abschlussarbeiten wurden erfolgreich (alle mit sehr guten Noten) abgeschlossen: Masterarbeit „Therapeutische Wirksamkeit von toxin-konjugierten L1CAM Antikörpern in Pankreaskarzinomzellen“ durch Frau M.Sc. Annika Brauer, Masterarbeit „Therapeutic efficacy of L1 cell adhesion molecule antibody drug conjugates in combination therapies in pancreatic cancer cells“ durch Herrn M.Sc. Alexander Jochimsen und die Bachelorarbeit „Therapeutic efficacy of novel L1 cell adhesion molecule specific antibody drug conjugates in pancreatic cancer cells with different plasticity“ durch Herrn B.Sc. Philipp Putze.
Darüber hinaus hat die Medizinstudentin Charlotte Kayser ihre medizinische Doktorarbeit „Therapeutic effect of L1CAM-CD3 bispecific antibodies in pancreatic ductal adenocarcinoma“ in dem Projekt angefertigt, deren Ergebnisse sie momentan zusammenschreibt. Zusammen mit ihr hat Dr. Anna Maxi Wandmacher als *Clinician Scientist* wesentliche Arbeiten bei der Testung der bispezifischen Antikörper übernommen und die Ergebnisse bereits auf einer Tagung präsentiert (siehe Punkt 6). Alle Nachwuchsforschenden sind weiterhin in der Forschung aktiv. So fertigt Frau Annika Brauer in meiner Arbeitsgruppe seit Juli 2022 ihre naturwissenschaftliche Doktorarbeit, dessen Fokus auf der weiteren Erforschung dieser Therapiestrategie liegt. Frau Dr. Anna Maxi Wandmacher arbeitet ebenfalls im Rahmen ihres Forschungsprojektes weiter an dieser Therapiestrategie. Das Projekt hat somit nachhaltig zur Sicherung von wissenschaftlichen Fachkräften im Wissenschaftsbereich beigetragen. In Vorbereitung auf den geplanten Drittmittelantrag fertigen zur Zeit zwei Medizinstudenten ihre Doktorarbeit an und untersuchen dabei den Einfluss von verschiedenen Stromazellkomponenten (u.a. Karzinom-assoziierten Fibroblasten, Makrophagen, Bakterien) auf die therapeutische Wirksamkeit von EL-mab.

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zur Bearbeitung dieses Arbeitspaktes sind: Reagenzien für RNA Isolation, Reverse Transkription sowie RT-PCR (z.B. L1CAM Human RT PCR Primer Set, RevertAid h M-MuLV Transkriptase, RiboLock, Oligo (DT) Primer, peqGold Total RNA Kit, LightCycler480Sybr Green), Zellkulturmaterialien für 2D und 3D Zellkulturen (z.B. Zellkulturflaschen, Platten, serologische Pipetten verschiedener Größen, CellTracker Farbstoffe, RPMI 1640 Medium sowie Mediumzusätze, Accutase), Materialien für die Isolation von PBMC und CD8+ T Zellen (z.B. Pancoll, MojoSort Kits), Reagenzien für die Detektion von sezernierten Effektormolekülen (LEGENDPlex Reagenzien inkl. Capture Beads), Färbungen (z.B. Paraformaldehyd, Antikörper, AEC Substrate kit). Von technischer Seite wurde dieser Projektteil in der Anfangsphase des Projektes durch Frau Maike Witt-Ramdohr unterstützt.

Arbeitspaket 5: Korrelation der Behandlungsergebnisse von EL-Mab- mit diagnostischen Parametern

Aufgabenbereich 5.1:

- Zusammenstellung und Vergleich der Befunde aus den präklinischen Versuchen und aus der Analyse von Patientenproben
- Korrelation der L1CAM Expression mit Tumoransprechen aus den verschiedenen Behandlungsschemata in vivo
- Zusammentragen klinisch-pathologischer Daten zu allen Patientenproben und Korrelation mit L1CAM Expression

Ergebnisse:

Für alle eingeschlossenen Patienten wurden folgende klinisch-pathologische Daten zusammenbetragen: Alter, Geschlecht, TNM Staging und Grading, CA19-9 und CEA Spiegel, Angaben zur Familiengeschichte und zur (neo)adjuvanten Behandlung.

Die präklinischen Studien weisen darauf hin, dass mindestens 50% einer Tumorzellpopulation L1CAM exprimieren muss, damit eine vergleichbare therapeutische Aktivität von EL-mab wie bei 100% L1CAM positiver Zellen beobachtet werden kann. Die Ergebnisse aus den präklinischen Studien zur therapeutischen Wirksamkeit konnten bisher noch nicht mit den Ergebnissen aus der diagnostischen Testung von EL-mab in Einklang gebracht werden, da noch die letzten Färbungen und sich daran schließenden Auswertungen durch andere Projektpartner ausstehen.

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zur Bearbeitung dieses Arbeitspaktes sind: Die Zusammenstellung der klinisch-pathologischen Daten sowie der relevanten *in vitro* Ergebnisse erfolgte durch Unterstützung durch die medizinisch technische Assistentin Frau Iris Kosmol.

In der Zusammenschau haben diese Arbeiten sowie das gesamte ELEVATE Projekt dazu beigetragen, dass die Firma LegoChem als Partner gewonnen werden konnte, der nun das Projekt in die klinische Entwicklung bringt (siehe auch Punkt 4).

4.Voraussichtliche Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse sowie konkrete Planungen für die nähere Zukunft

Für das IET lag eine wichtige Ergebnisverwertung im weiteren Ausbau der Biomaterialbank. Im Rahmen von ELEVATE wurden Gewebe- und Blutproben von Krebspatienten sowie Patienten mit gutartigen Erkrankungen der jeweiligen Organsysteme gesammelt, aufgearbeitet und aufbewahrt. Die nicht für die Studie genutzten Probenanteile stehen damit unmittelbar für weitere Projekte zur Verfügung. Diese sowie die Ergebnisse aus den präklinischen Untersuchungen in ELEVATE sind die

Basis für ein bereits geplantes Drittmittelprojekt, wodurch weitere Finanzmittel dem Institut zugeführt werden können.

Im Antrag war ferner in Aussicht gestellt, dass Erlöse für EL-mab durch den Abschluss eines Lizenzvertrags mit einem Industriepartner generiert werden (geplant 2025). Das ELEVATE Projekt war so erfolgreich, dass die Lizenzvereinbarung entgegen dem ursprünglichen Plan bereits zustande gekommen ist und die klinische Erprobung gemäß den aktuellen Zeitplänen Mitte 2025 beginnen wird. Über die Lizenzgebühren und Erlöse kann aus Vertraulichkeitsgründen momentan keine Aussage gemacht werden.

Die mit dem Projekt erfolgte Masterarbeit und damit der erfolgreiche Studienabschluss von Annika Brauer hat die Grundlage dafür gelegt, Frau Brauer als wissenschaftliche Mitarbeiterin für die Anfertigung ihrer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe weiter zu beschäftigen. Frau Brauer arbeitet im Rahmen dieser weiter auf der präklinischen Evaluierung von EL-mab in den patienten-nahen Tumormodellen und ist auch maßgeblich an der Erstellung der geplanten Manuskripte beteiligt.

5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens während der Projektlaufzeit von anderer Stelle

Während der Projektlaufzeit ist laut ClinicalTrials.gov keine klinische Studie beendet bzw. begonnen wurden, in der L1CAM als therapeutische und/oder diagnostische Zielstruktur in der Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere PDAC oder CRC genutzt wurde. Die gelisteten Veröffentlichungen in PubMed beziehen sich vornehmlich auf die Rolle und den Nutzen von L1CAM als diagnostische und therapeutische Zielstruktur beim Endometriumkarzinom.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Aufgrund von patentrechtlichen Gründen ist bisher keine Veröffentlichung der Ergebnisse in einer Fachzeitschrift erfolgt. Da die Patentsituation nun geklärt ist, wird daran gearbeitet, die Manuskripte (eines zur therapeutischen Wirksamkeit von L1CAM-ADC und eines zur therapeutischen Wirksamkeit des bispezifischen EL-mab) zusammen zu stellen, welche Ende 2024/1. Quartal 2025 zur Publikation eingereicht werden sollen.

Ergebnisse aus diesem Projekt wurden jedoch als Kongressbeiträge bei folgenden Konferenzen präsentiert:

Beitrag: **"Therapeutic efficacy of L1CAM antibody drug conjugates in the treatment of pancreatic cancer"** präsentiert von Annika Brauer auf dem 21st International AEK Cancer Congress in Kassel (15.2-17.2.2023)

Beitrag: **"Neue L1CAM-gerichtete bispezifische Antikörper vermitteln effektive Antikörper-vermittelte Lyse von Pankreaskarzinomzellen durch T-Zellen**" („Novel L1CAM-directed bispecific antibodies mediate effective antibody-dependent pancreatic cancer cell killing by T-cells“) präsentiert von Dr. Anna Maxi Wandmacher auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen

und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie in Hamburg (13.10.-16.10.2023)

* Geschlechtsneutral (m/w/d)