

## Teil I zum Schlussbericht: Kurzbericht

### Zuwendungsempfänger:

Fkz 13N15988  
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG  
Friedrich-Ebert-Str. 68  
51429 Bergisch Gladbach

### Vorhabenbezeichnung:

Verbundprojekt: Fighting Cancer with Optimal Personalized Immunotherapies (IMAGINE)  
Teilvorhaben: Maßgeschneiderte optische Sonden für die hochauflösende Mikroskopie und Verifizierung der Analyse von CAR T-Zellen

### Laufzeit des Vorhabens und Berichtszeitraum:

01.10.2021 bis 30.09.2025

### Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand an den angeknüpft wurde

Jährlich erkranken Millionen Menschen an Krebs und neue Immuntherapien mit gentechnisch veränderten Abwehrzellen (CAR T-Zellen) bieten vielversprechende Ansätze. Um diese Therapien gezielt steuern zu können, müssen Tumorantigene und CAR-Rezeptoren präzise nachgewiesen werden. Der Verbund IMAGINE entwickelt dafür eine automatisierte Mikroskopie-Plattform, die diese Strukturen erstmals mit höchster Genauigkeit im klinischen Alltag sichtbar macht. Die Präzision und Sensitivität der hochauflösenden Mikroskopie hängt neben der Qualität der Mikroskop-Plattformen auch im Wesentlichen von der Qualität der verwendeten optischen Sonden ab. Das Ziel unseres Teilprojekts war es daher maßgeschneiderte neuartige Sonden zu entwickeln, die sich durch eine verbesserte Detektion von Zellantigenen auszeichnen und diese den Projektpartnern zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus war geplant die Mikroskopie-Plattformen des Verbundes zu verifizieren und die Kompetenz der Methodik mit durchflusszytometrischen Analysen zu vergleichen. Aktuelle Forschungsarbeiten zur Entwicklung optischer Sonden für die hochauflösende Mikroskopie fokussierten sich bei Projektstart vor allem auf die Optimierung von Fluoreszenzfarbstoffen, Linkersystemen und spezifischen Markierungsmolekülen wie Antikörpern oder Peptiden. Kombinierte Ansätze, die zudem kleinere fluoreszenzmarkierte Antikörperfragmente zur präzisen Quantifizierung von Zielmolekülen auf CAR T-Zellen nutzen, waren kaum etabliert, und auch gängige Verfahren wie die Durchflusszytometrie stießen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit bei der hochsensitiven Analyse von CAR T-Zellen an ihre Grenzen.

### Ablauf des Vorhabens

Innerhalb des Verbundprojekts IMAGINE haben wir das Teilprojekt „Maßgeschneiderte optische Sonden für die hochauflösende Mikroskopie und Verifizierung der Analyse von CAR T-Zellen“ bearbeitet. Das Teilprojekt war in 2 Arbeitspakete (AP) aufgeteilt:

- AP1: Antikörper-Farbstoffkonjugate für dSTORM und DNA PAINT
- AP2: Verifikation der neuen Super-Resolution Mikroskopie Systeme für CAR T-Zell-Therapie Applikationen

Innerhalb des AP 1 wurden gemeinsam mit den Verbundpartnern Zelltypen und Oberflächenantigene definiert, die für die Detektion von Tumorzellen und CAR T-Zellen verwendet werden sollen. Im zweiten Schritt haben wir verschiedene Konjugationsmethoden, Antikörpertypen (Vollantikörper,

Antikörper-Fragmente und Nanobodies) und Fluorochrome getestet. Die vielversprechendsten Ansätze wurden weiterentwickelt und die daraus resultierenden Konjugate wurden von den Partnern Massive Photonics/Arbeitsgruppe Jungmann und der Arbeitsgruppe Sauer getestet. Die Rückmeldung der Kooperationspartner und die entsprechende Lieferung weiterer Konjugate wurde im Einklang mit den Testungen kontinuierlich fortgesetzt.

Innerhalb des AP2 erfolgte die Verifizierung eines der zwei im Verbundprojekt entwickelten Mikroskopie-Systeme. Es wurden technische Kenngrößen (Sensitivität und Spezifität) der quantitativen Detektion mittels Titration von Antikörperfluoreszenzsonden für die Analyse von Zelloberflächenproteinen getestet. Anschließend erfolgte ein Vergleich mit einer Referenzmethode, der Durchflusszytometrie. Eine Testung des zweiten Systems konnte nicht erfolgen, da es innerhalb des Projekts nicht wie geplant zur Verfügung stand.

### Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Im Rahmen des Arbeitspakets 1 wurde die Entwicklung von Antikörper-Farbstoffkonjugaten für die Super-Resolution-Mikroskopie erfolgreich umgesetzt. Dabei konnten innovative Biokonjugationsmethoden etabliert werden. Für die DNA-PAINT-Anwendung führte die Entwicklung einer ortsselektiven Biokonjugationsmethode zur Einreichung einer Patentanmeldung beim Europäischen Patentamt sowie zur Entwicklung von Daten für eine peer-review Publikation (in Vorbereitung). Es wurde eine Reihe von Konjugaten hergestellt, die ein breites Spektrum an für die Projektpartner relevanten Spezifitäten abdecken. Diese Konjugate wurden an die Labore von Prof. Markus Sauer und Prof. Ralf Jungmann ausgeliefert und dort umfassend getestet. Mehrere der Konjugate waren hocheffektiv. Viele der rekombinanten Antikörper (REAs) von Miltenyi zeigten geeignete Eigenschaften für dSTORM-Super-Resolution-Mikroskopie (z. B. starke Bindung, geringer unspezifischer Hintergrund). DNA-PAINT-Konjugate, die aus diesen erfolgreichen Kandidaten mithilfe der oben erwähnten ortsselektiven Methode hergestellt wurden, zeigten eine überlegene Leistung im Vergleich zu gängigeren Konjugationsmethoden. Insbesondere wiesen unsere DNA-PAINT-Konjugate eine höhere Markierungseffizienz auf: sowohl als sogenannte stochastische Markierungsmethoden, die Lysin-Seitenketten adressieren, als auch enzymatische Methoden, etwa mikrobielle Transglutaminase (mTG). Die enge Zusammenarbeit mit den beteiligten Forschungseinrichtungen war entscheidend für die Validierung der Konjugate und Methoden unter praxisnahen Bedingungen und trug wesentlich zur erfolgreichen Umsetzung des Arbeitspakets bei.

Arbeitspaket 2 widmete sich der Verifikation des innerhalb des IMAGINE-Verbundes neu entwickelten Mikroskopie-Systems „Klinik“. Zur Vorbereitung dieser Verifikation wurden neue Antikörper-Farbstoffkonjugate hergestellt und gezielt auf relevanten Zielzellen titriert. Anschließend erfolgten vergleichende Experimente auf der Mikroskopie-Plattform und mittels Durchflusszytometrie. Durch den direkten Vergleich der analytischen Sensitivität konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelte Mikroskopie-Plattform eine höhere Empfindlichkeit aufweist als die Referenzmethode. Damit wurde die Leistungsfähigkeit des Systems erfolgreich nachgewiesen.

Die Zusammenarbeit mit den Projektpartnern verlief effektiv, unterstützt durch regelmäßige Treffen und Abstimmungen sowie der oben genannten Bereitstellung der Konjugate.

Die Projektpartner waren:

- Universität Würzburg Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik
- Universitätsklinikum Würzburg, Cellular Immunotherapy of Malignant Diseases Medizinische Klinik und Poliklinik II
- Max-Planck-Institut für Biochemie, Research Group Molecular Imaging and Bionanotechnology
- Massive Photonics GmbH
- T-CURX GmbH