

Vorläufiger allgemeinverständlicher Abschlussbericht zum Projekt
„Adapter CAR T-Zellen (AdCAR-T) zur Behandlung von Weichteilsarkomen“

Antragssteller:

Christian Seitz, Dr. med.

Ärztliche Leitung Stammzelltransplantation, Zell- und Gentherapie
Hopp-Kindertumorzentrum Heidelberg (KITZ)
E-mail: christian.seitz@kitz-heidelberg.de

Peter Lang, Prof. Dr. med.

Stellvertretender ärztlicher Direktor Abteilung I, Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie, Bereichsleiter Stammzelltransplantation
E-mail: peter.lang@med.uni-tuebingen.de

Jörg Fuchs, Prof. Dr. med.

Ärztlicher Direktor Abteilung V, Kinderchirurgie und Kinderurologie
Referenzchirurg für Weichteilsarkome, Nierentumore, Lebertumore, Neuroblastome
E-mail: joerg.fuchs@med.uni-tuebingen.de

Zunächst möchten wir uns herzlich für die Projektförderung durch die **Gesellschaft für KinderKrebsForschung (GKKF)** bedanken. Wesentliche Ziele der Förderung konnten erfolgreich bearbeitet bzw. weiterentwickelt werden. Dies soll im folgendem, vorläufigen Abschlussbericht skizziert werden. Ein finaler Abschlussbericht wird nach Veröffentlichung aller projektbezogener Publikationen nachgereicht.

Ziele des geplanten Vorhabens

Folgende Hypothesen sollten im beantragten Forschungsvorhaben bearbeitet werden:

- 1) AdCAR-T bieten eine vielversprechende Behandlungsalternative für Patientinnen und Patienten mit Weichteilsarkomen mit nicht R0 resezierbarer, z.B. bei thorakaler Lokalisation, und disseminierter Erkrankung zur Verbesserung des Gesamtüberlebens und der Lebensqualität.
- 2) Ein umfassendes Verständnis des spezifischen Tumor Mikromilieus (TME) von Weichteilsarkomen und dessen immunsuppressiver Mechanismen ermöglicht eine evidenzbasierte Optimierung der AdCAR-T Therapie mittels CAR-T Engineering und Kombinationsbehandlung.

Das beantragte Forschungsvorhaben gliederte sich in drei Zielsetzungen:

- A) Präklinische Evaluation unterschiedlicher Zielantigene und Adapterformate zur Behandlung von Weichteilsarkomen mittels AdCAR-T
- B) Umfassende funktionelle Charakterisierung des TME auf zellulärer und proteomischer Ebene mittels automated ultra-high content Imaging
- C) Evidenzbasierte Optimierung der AdCAR-T Therapie mittels CAR-T Engineering und Kombination von therapeutischen Strategien

A) Präklinische Evaluation unterschiedlicher Zielantigene und Adapterformate zur Behandlung von Weichteilsarkomen mittels AdCAR-T

CAR-T sind spezialisierte Immunzellen, die durch genetische Veränderung Tumorzellen gezielt erkennen und zerstören können. Um die Funktion dieser Zellen besser kontrollieren zu können wurde ein neuartiges System, **AdCAR-T**, entwickelt, welches erlaubt, CAR-T ein und auszuschalten sowie zeitgleich mehrere Zielstrukturen auf Krebszellen anzugreifen. Hierzu wird die Erkennung von Zielantigenen von der Aktivierung der CAR-T entkoppelt. Um dies zu erreichen, werden Adaptermoleküle generiert. Hierzu werden z.B. monoklonale Antikörper mit einer Biotin-Markierung versehen. Das Adaptermolekül kann nun an die Zielstruktur auf Tumorzellen binden. Die AdCAR-T wiederum erkennen die Biotin-Markierung wodurch eine gegen die Tumorzellen gerichtete T-Zell-Antwort induziert wird, welche zur Elimination der Tumorzelle führt.

Im aktuellen Projekt wurden Adaptermoleküle gegen auf **Weichteilsarkomen** häufig exprimierte Oberflächenantigene HER2, EGFR, GD2 und CD276 entwickelt und präklinisch getestet. Alle evaluierten Adaptermoleküle zeigten eine hochspezifische *in vitro* Aktivität, sowohl hinsichtlich der AdCAR-T Aktivierung als auch der Lyse von Tumorzellen. Im Gegensatz dazu konnte in einem orthotopen intramuskulären Xenograftmodell für Rhabdomyosarkom keine relevante *in vivo* Aktivität gezeigt werden. Um das System *in vivo* zu optimieren, fokussierte sich die weitere Testung auf die **Zielstruktur CD276**. CD276 wird auf vielen soliden Tumorerkrankungen exprimiert. In einem weiteren Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit der Firma Miltenyi Biotec eine vollkommen neuartige Art von Adaptermolekülen, basierend auf Fab-Fragmenten, gegen CD276 entwickelt. Diese zeigten in Modellen von Lungenkrebs sehr vielversprechende *in vitro* und *in vivo* Aktivität. Die Arbeit konnte 2025 im Journal of Hematology&Oncology (IF: 40.4) veröffentlicht werden (Kristmann, B., Werchau, N., Suresh, L., Pezzuto, E. L., Scheuermann, S., Krost, S., Schilbach, K., Moustafa-Oglou, M., Mast, A.-S., Droste, M., Felsberger, A., Kiefer, L., Abramowski, P., Zender, L., Mittelstaet, J., & Seitz, C. M. (2025). *Targeting CD276 with Adapter-CAR T-cells provides a novel therapeutic strategy in small cell lung cancer and prevents CD276-dependent fratricide*. *Journal of Hematology & Oncology*, 18(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13045-025-01729-8>). *In vivo* Aktivität konnte ebenfalls in einem disseminierten Modell für Rhabdomyosarkom nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich die antitumorale Wirkung bei etablierten Tumoren als unzureichend. Dies ist nicht ungewöhnlich und bestätigt vorherige Studien, u.a. Sullivan PM et al Mol Cancer Therp. 2022 (DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-22-0059), die im selben Modell ebenfalls keine antitumorale Aktivität von CAR-T als Monotherapie zeigen konnten. Basierend auf diesen Daten, wurde das translationale Potential im Setting einer makroskopischen Erkrankung als gering bewertet und im Weiteren der Fokus auf potenzielle Kombinationstherapien, wie in C) beschrieben, gelegt.

B) Umfassende funktionelle Charakterisierung des TME auf zellulärer und proteomischer Ebene mittels Automated Ultra-high Content Imaging

Um das TME von kindlichen Weichteilsarkomen umfassend beschreiben zu können, wurde zunächst ein Panel von >100 Markern für **Ultra-high Content Imaging** etabliert. Das Panel basiert auf einem zuvor etablierten und publizierten Panel (Scheuermann, S.,

Kristmann, B., Engelmann, F., Nuernbergk, A., Scheuermann, D., Koloseus, M., Abed, T., Solass, W., & Seitz, C. M. (2024). Unveiling spatial complexity in solid tumor immune microenvironments through multiplexed imaging. *Front Immunol*, 15, 1383932. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1383932>.). Mit Hilfe der Ultra-high Content Imaging Plattform **MACSima** (Miltenyi Biotec) wurden Schnitte von primären Sarkomen bzw. Rezidiven untersucht. Ein Großteil der Proben stammte aus dem INFORM Register, sodass zusätzlichen Sequenzierungsdaten für die Analyse zur Verfügung stehen. Zur Finanzierung der Imaging Untersuchungen und Ergänzung mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung, wurden zusammen mit Kristian Pajtlér (KITZ Heidelberg) und Thomas Grünewald (KITZ Heidelberg) erfolgreich Mittel bei der DFG beantragt. Insgesamt wurden 89 kindliche Sarkome mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung und 47 mittels Ultra-high Content Imaging untersucht. Der aktuelle Datensatz umfasst > 800.000 Einzelellen. Die bioinformatische Analyse ist noch nicht abgeschlossen. Ein umfassendes Manuskript, welches die zelluläre Zusammensetzung kindlicher Sarkome in räumlicher und funktioneller Auflösung beschreibt, soll in Q1 2026 abgeschlossen werden. Die vorläufigen Analysen zeigen einen **prädominanten TME-Phänotyp**, welcher durch perivaskuläre Infiltrate immunsuppressiver Makrophagen und Fibroblasten, der Ausgrenzung von Effektorzellen, insbesondere von T-Zellen und einer hohen Expression von CD276 auf Tumorzellen gekennzeichnet ist. Diese Erkenntnisse erklären mitunter die insuffiziente Aktivität von CAR-T gegen Sarkome und bietet die wissenschaftliche Grundlage für die Entwicklung rationaler Kombinationbehandlungen.

C) Evidenzbasierte Optimierung der AdCAR-T Therapie mittels CAR-T Engineering und Kombination von therapeutischen Strategien

Basierend auf ersten Erkenntnissen aus A) und B) fokussierte sich die Arbeit in C) auf die Entwicklung von Kombinationbehandlungen mit dem Ziel der Modulation des TME. Analysen CAR-T-resistenter Xenografttumore zeigten deutlich eine räumliche Ausgrenzung von CAR-T und ein immunsuppressives TME. Dieser Erkenntnisse spiegeln sich in der Analyse von Patientenmaterial unbehandelter Sarkome. Unter der Hypothese, dass eine Umprogrammierung des TME, hinsichtlich einer Inflammationsreaktion, die Infiltration und Aktivität von CAR-T-Zellen verbessern sollte, wurden zunächst *in vitro* unterschiedliche immunstimulierende Moleküle getestet. Zusätzlich wurde, zusammen mit Steve Gillies (Boston) und Karin Schillbach (UKT Tübingen), ein gegen CD276 gerichtetes, IL2-Rezeptor und IL12-Rezeptor stimulierende Fusionsprotein entwickelt. Die beiden vielversprechendsten Kandidaten des *in vitro* Screens, XS15, ein Toll-like-Rezeptor1/2 Agonist und das erwähnte Fusionsprotein wurden *in vivo* getestet. Beide Kandidaten führten in Kombination mit anti-CD276-CAR-T zu einer vollständigen Elimination großer, etablierter Rhabdomyosarkome in dem oben beschrieben Tumormodel. Während die Therapie mit XS15 mit erheblicher Toxizität verbunden war, zeigte das Fusionsprotein nur milde Nebenwirkungen und eine spezifische Aktivität auch bei intravenöser und subkutaner Applikation. Die spezifische TME-modulierende Wirkung des Fusionsproteins konnte zusätzlich in einem immunkompetenten, syngenem Rhabdomyosarkom-Model bestätigt werden. Ein Manuskript, dass die Entwicklung und funktionelle Charakterisierung des Fusionsproteins sowie die Kombination mit CAR-T beschreibt, soll in Q4 2025 fertiggestellt werden. Zusätzlich wird aktuell eine Phase I/II-Studie (HOTSARC) vorbereitet. Eine Finanzierung wird über das NCT OCT2 Programm beantragt.