

Sachbericht Teil 1 – Kurzbericht

FKZ: 03COV06B PT-Bearb.: Fr. Temp

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2021 - 31.12.2024

Berichtszeitraum: 01.04.2021 - 31.12.2024

Leibniz-Institut für Virologie (LIV)
Martinistr. 52, Geb. N63, 20251 Hamburg

Projekträger Jülich (PTJ)
Forschungszentrum Jülich GmbH (FZJ), Nachhaltige regionale Innovationen
Postfach 61 02 47
10923 Berlin

Vorhaben

CORONA - PlasmaPlusCorona – Plasmabasierte Desinfektion des Respirationstraktes zur Senkung der SARS-CoV-2 Viruslast *in vitro* und *in vivo* - Teilvorhaben 3: *in vivo* Untersuchungen

Die SARS-CoV-2 Pandemie stellte trotz enormer Fortschritte in der Entwicklung von Impfstoffen und antiviralen Wirkstoffen eine große Belastung für die Gesundheitssysteme, die Wirtschaft und die Gesellschaft dar. Dabei bleiben Interventionsmaßnahmen zur Reduktion der Viruslast bei schweren COVID-19 Erkrankungen weiterhin begrenzt. Zusätzlich stellen weitere respiratorische Viren wie das hochpathogene H5N1 Influenzavirus mit hohem pandemischem Potenzial ein enormes Risiko für die Bevölkerung dar. Daher, ist es nach wie vor unerlässlich, für zukünftige Pandemien therapeutische Maßnahmen zu entwickeln, welche die Viruslast senken und somit die Mortalität erheblich reduzieren können.

Das vorliegende Versuchsvorhaben hat das Ziel, den innovativen therapeutischen Einsatz von Plasmaquellen gegen respiratorische Viren wie SARS-CoV-2 und Influenza in einem Tiermodell zu evaluieren und so einen Beitrag zur Bekämpfung zukünftiger Pandemien zu leisten. Die technischen Arbeitsziele des Teilvorhabens bestehen in der Etablierung eines präklinischen SARS-CoV-2 Tiermodells zur Testung von Plasmaquellen, sowie der Evaluierung möglicher Toxizitäten der Plasmabehandlung und dessen antiviraler Wirksamkeit im Hamstermodell. Die durchgeführten Studien lassen sich in 3 Arbeitspakete unterteilen, deren Ergebnisse im Folgenden geschildert werden sollen.

Die Etablierung eines präklinischen Tiermodells bildet eine wesentliche Voraussetzung für die umfassende Wirksamkeitsprüfung der Plasmaquellen *in vivo* (Arbeitspaket 1). Wir konnten am Leibniz-Institut für Virologie (LIV) eine erfolgreiche Infektion mit SARS-CoV-2, mit anschließender Bestimmung des Virustropismus in respiratorischen und peripheren Organen etablieren. Zudem wurden Entzündungsmarker in der Lunge und im Blutplasma und histopathologische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Virusinfektion, mittels Multiplex oder RT-qPCR erfolgreich etabliert und gemessen. Unsere Daten zeigen, dass eine SARS-CoV-2 Infektion zu einer systemischen Infektion führt, mit Virustitern in peripheren Organen (u.a. Geschlechtsorgane & Gehirn), jedoch mit der höchsten Viruslast in der Lunge (Stanelle-Bertram *et al.*, Cell Rep Med. 2023). Somit stand das präklinische Tiermodell zur Evaluierung der Plasmaquellen gegen SARS-CoV-2 zur Verfügung. Das zweite Arbeitspaket umfasste Arbeitsziel die Etablierung eines *low toxicity* Protokolls zur lokalen Desinfektion des oberen Respirationstrakts mittels Plasma-Jet im Hamstermodell. Der Umbau des Plasma-Jet inklusive einer Halterung und einem Abstandhalter für die sichere Behandlung der Tiere wurde in Zusammenarbeit mit den Kollegen aus dem Institut für Plasmaforschung und Technologie

(INP) in Greifswald durchgeführt. Um eine mögliche Toxizität zu ermitteln, wurden Syrische Goldhamster über drei Tage jeweils mit 30 Sekunden (s) oder 60s Plasma behandelt. Um eine mögliche Schädigung der Mundschleimhaut oder der Lunge mit den Gasen alleine beurteilen zu können, wurden Kontrolltiere nur mit dem Gasgemisch Neon/CO₂ behandelt. Es zeigte sich, dass die Hamster, die entweder mit 60s Plasma oder 60s Gasgemisch behandelt wurden, mehr Gewicht verloren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren und den Tieren, die mit 30s Plasma behandelt wurden. Es konnten keine Unterschiede in der Immunantwort in den Tracheen und Lungen nach Plasmabehandlung festgestellt. Jedoch im respiratorischen und olfaktorischen Epithel zeigten weibliche Hamster nach 60s Plasma- oder Gasbehandlung eine erhöhte Entzündungsreaktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Für anschließende Infektionsversuche wurde daher eine Behandlungsdauer von 30s als geeignet festgelegt. Im dritten Arbeitspaket erfolgte die Ermittlung der Viruslast nach Plasmabehandlung. In diesem Arbeitspaket sollte unter Anwendung der *low toxicity* Protokolle (erstellt in Arbeitspaket 2) die Wirksamkeit der Plasmaquellen hinsichtlich der Reduktion der SARS-CoV-2 Viruslast untersucht werden. In Absprache mit unseren Kollegen am INP und Forschungszentrum Borstel (FZB) haben wir uns entschieden, die ersten Infektionsexperimente vorerst mit dem 2009 pandemischen Influenzavirus H1N1 (2009 pH1N1) im BSL-2 Labor durchzuführen. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Wahl des 2009 pH1N1 für die Experimente im Detail in „Sachbericht Teil 2 - Eingehenden Darstellung“ begründet wird. Dafür wurden Syrische Goldhamster mit dem 2009 pH1N1 intranasal infiziert oder als Kontrolle mit PBS behandelt und 24 Stunden nach Infektion an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 30s mit Plasma behandelt. Kontrollgruppen erhielten nur Plasma ohne Virus. Es zeigte sich, dass Plasma-behandelte, infizierte Hamster im Vergleich zu Kontrollen weniger Gewicht verloren. Außerdem zeigten sie signifikant geringere Lungengewichte sowie leicht reduzierte Virustiter und eine signifikant reduzierte pro-inflammatorische Immunantwort, darunter reduzierte Mengen an IL-6 und Makrophagen-Entzündungsproteine (MIP-1 α , MIP-1 β). Die Lungen wiesen zudem eine reduzierte Makrophageninfiltration auf. Die histologische Auswertung der Lungen steht noch aus.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass das vorliegende Versuchsvorhaben erfolgreich abgeschlossen wurde: ein Tiermodell für die *in vivo* Wirksamkeitsprüfung der Plasmaquellen wurde erfolgreich etabliert. Weiterhin wurde ein *low toxicity* Protokoll entwickelt, welches für die erfolgreiche antivirale Wirksamkeit im Hamstermodell verwendet wurde.

Obwohl die ursprünglich vorgesehene Testung des DBD-Luft-Systems im Hamstermodell am LIV nicht realisiert werden konnte, sind wir der Überzeugung, dass die im Rahmen des Vorhabens generierten Daten einen substanziellen wissenschaftlichen Mehrwert darstellen. Sie liefern ein belastbares *proof of concept* und bilden eine vielversprechende Grundlage für die Weiterentwicklung innovativer therapeutischer Ansätze. In enger Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern des INP und FZB wird ein erstes Manuskript vorbereitet, das zeitnah veröffentlicht wird. Die vielversprechenden Ergebnisse des Projekts bieten eine potenzielle Grundlage für die klinische Anwendung des Plasmaverfahrens, insbesondere in der Patientenbeatmung bei zukünftigen Pandemien, unabhängig von der Virusätiologie. Die positiven Befunde aus dem Vorhaben unterstreichen das wirtschaftliche Potenzial, insbesondere für Hersteller von Beatmungssystemen oder großflächiger Desinfektionsmaßnahmen während Pandemien. Weiterhin ist denkbar, die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse auf andere respiratorische Erreger mit pandemischem Potenzial, wie SARS-CoV-2 und hochpathogene H5N1 Influenza A Viren zu translatieren.

Sachbericht Teil 2 – Eingehende Darstellung

FKZ: 03COV06B PT-Bearb.: Fr. Temp

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2021 - 31.12.2024

Berichtszeitraum: 01.04.2021 - 31.12.2024

Projekträger Jülich (PTJ)
Forschungszentrum Jülich GmbH (FZJ), Nachhaltige regionale Innovationen
Postfach 61 02 47
10923 Berlin

Vorhaben

CORONA - PlasmaPlusCorona – Plasmabasierte Desinfektion des Respirationstraktes zur Senkung der SARS-CoV-2 Viruslast *in vitro* und *in vivo* - Teilvorhaben 3: *in vivo* Untersuchungen

Einleitung:

Die aktuelle Coronavirus-Pandemie führt erneut vor Augen, dass zoonotische Viren jederzeit Artgrenzen überspringen und von Tier auf den Menschen übergehen können. Entstehen beim Artensprung neue Virus Serotypen, gegen die es keine Immunität in der Bevölkerung gibt und die die Fähigkeit erlangt haben von Mensch-zu-Mensch zu transmittieren, kann solch ein Ereignis eine Pandemie unvorhersehbarer Größe hervorrufen. Hierbei gelten Influenza A Viren als Paradebeispiel für pandemische Viren zoonotischen Ursprungs, die im letzten Jahrhundert für drei und in diesem Jahrhundert für eine Pandemie verantwortlich waren.

Molekulare Marker der Interspeziesübertragung sind bei Influenza A Viren gut erforscht und werden routinemäßig in der Virus Surveillance eingesetzt, um rechtzeitig sog. emerging viruses zu identifizieren und geeignete Maßnahmen zur Eindämmung ihrer Ausbreitung einzuleiten. Solch ein Überwachungssystem war für Coronaviren nicht hinreichend ausgebaut. Die effektivste Maßnahme in der Pandemie ist die Entwicklung eines Impfstoffes gegen den neuen Viruserreger.

Trotz enormer Fortschritte bei der Entwicklung von Impfstoffen und antiviralen Wirkstoffen, zeigen ältere Patienten und Patienten mit Vorerkrankungen schwere Verläufe und werden häufiger mit einer sehr hohen Viruslast auf die Intensivstation eingeliefert. Wobei die Interventionsmaßnahmen für die Reduktion der Viruslast bei den schweren COVID-19 Erkrankungen auf den Intensivstationen momentan begrenzt sind. Zudem müssen Patienten auf der Intensivstation künstlich beatmet werden, wobei das behandelnde medizinische Personal mit den hohen Viruslasten der Patienten exponiert und damit einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt wird. Viele schwer erkrankte COVID-19-Patienten kämpfen nicht allein mit dem Coronavirus, sondern auch mit zusätzlichen bakteriellen Infektionen, was das Immunsystem zusätzlich schwächt.

Es ist daher nach wie vor unerlässlich, therapeutische Maßnahmen zu entwickeln, welche die Viruslast senken und somit die Mortalität erheblich reduzieren können. Dies ist nur durch komplementäre und interdisziplinäre Arbeiten zu erreichen. Als Voraussetzung für die

Evaluierung neuer antiviraler Maßnahmen müssen vorerst Tiermodelle entwickelt werden, welche die Klinik widerspiegeln.

Anhand des aktuellen Standes der SARS-CoV-2 Forschung gilt der Syrische Goldhamster als der Goldstandard in der Erforschung der Viruspathogenese und als präklinisches Tiermodell zur Evaluierung von präventiven und therapeutischen Maßnahmen gegen COVID-19.

Im Rahmen unserer bisherigen Experimente mit dem Syrischen Goldhamster und SARS-CoV-2 konnten wir diese Befunde ebenfalls reproduzieren und die enorme Bedeutung des Hamstermodells als präklinisches Tiermodell bestätigen. Unsere Vordaten zeigen, dass eine SARS-CoV-2 Infektion zu einer systemischen Infektion mit Virustitern in peripheren Organen (u.a. Geschlechtsorgane & Gehirn) führt, jedoch mit der höchsten Viruslast in der Lunge.

Vorherige Publikationen zeigen, dass syrische Goldhamster ebenfalls für eine Infektion mit Influenza A Viren anfällig sind, vor allem für die Subtypen H1N1 und H3N2. Die Infektion führt bei den Tieren zu leichten Gewichtsverlusten und ähnlich einer SARS-CoV-2 Infektion, zur hohen Viruslasten in der Lunge und Tracheen, aber keiner Mortalität.

Heute spielt die Plasmatechnologie in der Medizin nicht nur bei der Desinfektion von Oberflächen eine wichtige Rolle, sondern wird zunehmend auch zur Förderung der Wundheilung (durch Abtöten von Bakterien) eingesetzt. Zudem gibt es bereits Hinweise, dass kaltes Plasma die Viruslast u.a. von Enteroviren in der Zellkultur erheblich reduzieren kann.

Basierend auf diesen vielversprechenden Daten aus der Bakteriologie, stellen wir die Hypothese auf, dass die Plasmatechnologie auch zur Reduktion der Viruslast bei einer Influenza A Virus bzw. einer SARS-CoV-2 Infektion eingesetzt werden kann.

Bevor die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete (APs) vorgestellt werden, soll in Kürze auf die bewilligten und im Verwendungsnachweis aufgezeigten Personalmittel eingegangen werden (Positionen 0812 und 0817). Über den kompletten Projektzeitraum wurden die Arbeiten federführend von einer erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiterin (PostDoc, Position 0812) durchgeführt. Für eine effiziente Bearbeitung der dem Projekt zugrundeliegenden komplexen Fragestellungen war es notwendig, dass bereits ausreichend Kenntnisse und Fähigkeiten in virologischen, molekularbiologischen und biochemischen Techniken bestehen. Durch Verzögerung im Ausschreibungsprozess könnte die Position der technischen Assistenz (Position 0817) erst im Herbst 2021 besetzt werden, was zu Mitteleinsparung geführt hat. Um das Projekt bis Dezember 2024 nach der kostenneutralen Laufzeitverlängerung im November 2023 abschließen zu können, wurde eine Umschichtung der Mittel beantragt: 25.848,91 Euro aus den Wissenschaftlermitteln (Position 0812) von insgesamt 62.185,91 Euro an Personalmitteln wurden auf Technikerstellen (Position 0817) übertragen, zusätzlich wurden 10.708,24 Euro aus den Sachmitteln in Personalmittel umgewidmet. In den ersten drei Jahren des Projekts wurde durch eine gleichmäßige Verteilung der Mittel zwischen PostDoc und Techniker die notwendige Basis geschaffen, um das Vorhaben erfolgreich voranzubringen. Danach lag der Fokus auf den experimentellen Wiederholungen und der praktischen Umsetzung durch die technische Assistentin. Die Supervision der Experimente, die Datenanalyse und die Fertigstellung der erforderlichen Dokumentation durch die Wissenschaftlerin wurden für ein weiteres Jahr durch eigene Mittel finanziert. Die enge Zusammenarbeit von PostDoc und technischer Assistenz war zwingend erforderlich, um die geplanten Arbeitspakete erfolgreich zu bearbeiten und abzuschließen. Zudem erfolgte eine Änderung bezüglich der bewilligten Mittel für Gegenstände (Position 0850). Das ursprünglich vorgesehene Tiernarkosegerät (*RAS-4 Rodent Anesthesia System*)

wurde nicht aus den bewilligten Projektmitteln, sondern aus verbleibenden Mitteln der Arbeitsgruppe finanziert. Diese Entscheidung erfolgte, da die Anschaffung nicht ausschließlich dem Projekt, sondern auch zukünftigen tierexperimentellen Arbeiten der Arbeitsgruppe zugutekommt. Die entsprechenden Projektmittel wurden daher im November 2023 ebenfalls sachgerecht in Personalkosten umgewidmet.

Umfassende Darstellung der Arbeitspakete

Das Ziel dieses Teilvorhabens ist es, den therapeutischen Einsatz von Plasmaquellen gegen respiratorische Viren wie SARS-CoV-2 und Influenza in einem Tiermodell zu evaluieren.

Im Folgenden werden jetzt die Ergebnisse der jeweiligen Arbeitspakete auch unter Berücksichtigung der Position 0843 (Verbrauchsmittel) des Verwendungsnachweises im Detail beschrieben. Dabei sollen auch insbesondere Abweichungen zur genehmigten Projektplanung dargelegt werden. Für die Arbeitspakete AP3.1, AP3.2 und AP3.3 werden die Ergebnisse der Etablierung eines präklinischen SARS-CoV-2 Tiermodells zur Testung von Plasmaquellen, sowie der Evaluierung möglicher Toxizitäten der Plasmabehandlung und dessen antiviraler Wirksamkeit im Hamstermodell vergleichend gegenübergestellt.

Arbeitspaket AP 3.1: SARS-CoV-2 Hamstermodell

Die Etablierung eines präklinischen Tiermodells bildet eine wesentliche Voraussetzung für die umfassende Wirksamkeitsprüfung der Plasmaquellen bzw. plasmabasierten Verfahren *in vivo*. Dies ist Teil des Arbeitspakets AP 3.1. SARS-CoV-2 Hamstermodell. Wir konnten am Leibniz-Institut für Virologie (LIV) erfolgreich ein präklinisches Hamstermodell zur Untersuchung der SARS-CoV-2 Pathogenese mit anschließender Bestimmung des Virustropismus in respiratorischen und peripheren Organen etablieren. Dafür wurden weibliche und männliche syrische Goldhamster mit SARS-CoV-2 infiziert, als Kontrolle wurden die Tiere mit PBS behandelt. Nach intranasaler SARS-CoV-2 Infektion verlieren gesunde Hamster ohne Komorbiditäten bis zu 20% ihres ursprünglichen Gewichtes im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren. Nach zwei Wochen erholen sich die Tiere weitestgehend. Die SARS-CoV-2 Infektion im Hamster ist daher als moderat anzusehen. Wir konnten zeigen, dass infizierte Hamster sehr hohe Virustiter in der Lunge, aber auch in anderen extrapulmonalen Organen sowie im Blutplasma aufweisen. Zudem wurden Entzündungsmarker in der Lunge und im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach Virusinfektion mittels Multiplex oder RT-qPCR gemessen. Hier konnten wir zeigen, dass infizierte Hamster eine signifikant erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort, u.a. IL-6, IL-1 β , IL-1ra und Makrophagen-Entzündungsproteine (MIP-1 α und MIP-1 β) nach SARS-CoV-2 Infektion aufweisen. Zudem konnte histologische Untersuchung eine massive Infiltration von Entzündungszellen in der Lunge durch die SARS-CoV-2 Infektion nachweisen. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits publiziert (Stanelle-Bertram *et al.*, Cell Rep Med. 2023).

Unsere Daten zeigen, dass eine SARS-CoV-2 Infektion zu einer systemischen Infektion führt, mit Virustitern in peripheren Organen (u.a. Geschlechtsorgane & Gehirn), jedoch mit der höchsten Viruslast in der Lunge. Somit stand das präklinische Tiermodell zur Evaluierung der Plasmaquellen gegen SARS-CoV-2 zur Verfügung.

Arbeitspaket AP3.1 (Meilenstein 1 „Erfolgreich etabliertes SARS-CoV-2 Hamstermodell“) wurde daher im Januar 2022 (Projektmonat 10) nach Plan abgeschlossen.

Für die Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurden u.a. Goldhamster, Zellen, Zellkulturmedien und -zusätze, Seren, Plastikware, fertige Reaktionssysteme (sogenannte Kits) zur Messung der Zytokine und Chemokine, sowie zur RNA Isolation, cDNA Herstellung und RT-qPCR kommerziell erworben (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0843).

Arbeitspaket AP 3.2: Mechanismen und Toxizität der Plasmabehandlung

Das zweite Arbeitspaket umfasst die Evaluierung möglicher Toxizitäten der Plasmabehandlung im Hamstermodell. Es sollte die Testung und Etablierung eines *low-toxicity* Protokolls zur lokalen Desinfektion im oberen (Nase, Mund, Rachen, Trachea) Respirationstrakt mit dem Plasma-Jet, in Abwesenheit einer Virusinfektion untersuchen. Hier ist es wichtig zu erwähnen, dass die Genehmigung unseres ersten Tierversuchsantrags, aufgrund von vielen Nachfragen und einer Überlastung der Behörde, unerwartet mehr Zeit als geplant in Anspruch genommen hat. Der innovative Ansatz unserer Vorhaben und die daraus resultierenden Auflagen und Nachfragen der Tierversuchsbehörde führten zur Verzögerung in der Durchführung der Tierexperimente. Zudem wurde unser Zeitplan aufgrund der Lieferschwierigkeiten von Neon Gas am Anfang des Ukraine-Krieges verschoben. Der Umbau des Plasma-Jet inklusive einer Halterung und einem Abstandhalter für die sichere Behandlung der Tiere wurde in Austausch mit den Kollegendes INP für den Ansatz im Tierexperiment durchgeführt. Im Vergleich zur ursprünglichen Planung erfolgte der Auf- und Umbau des Plasma-Jets zunächst im Sicherheitslabor Stufe 2, um uns die Gelegenheit zu geben, mit diesem neuartigen System im Labor vertraut zu machen. Aufgrund der einzigartigen Plasma-Jet-Anwendung *in vivo* wurde ein *Standard Operation Procedures (SOPs)* zur Nutzung des Plasmagerätes zur lokalen Desinfektion im Tier in Absprache mit dem INP in Greifswald etabliert. Dies war notwendig, um eine sichere Anwendung für die Experimentatoren und Tiere zu gewährleisten.

Um eine mögliche Toxizität zu ermitteln, wurden unterschiedliche Behandlungsdauern über mehrere Tage im weiblichen und männlichen Hamster untersucht. Die Tiere wurden 1x täglich (jeweils zur gleichen Uhrzeit), über 3 Tage, jeweils für 30s oder 60s behandelt. So sollte der maximale Behandlungserfolg gewährleistet werden, ohne die Tiere dabei zu sehr zu belasten. Um eine mögliche Schädigung der Mundschleimhaut mit den Gasen alleine beurteilen zu können, wurden Kontrolltiere nur mit dem Gasgemisch Neon/CO₂ (ohne Plasma), jeweils für 30s oder 60s behandelt. Während der Behandlung wurden die Tiere mit einer Isofluran Inhalationsnarkose sediert. Die Tiere wurden täglich gewogen und am Tag 4 nach Behandlung erfolgte die Organentnahme. Um die mögliche Toxizität zu ermitteln wurden Mundbereich, Trachea und Lunge mittels Histologie untersucht und die Zytokin- und Chemokinantwort (Eotaxin, GM-CSF, IFN- γ , IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF- α und VEGF) in der Lunge, Trachea und im Blutplasma nach abgeschlossenen Behandlungen bestimmt. Wir konnten zeigen, dass die Hamster, die entweder mit 60s Plasma oder 60s Gasgemisch behandelt wurden, mehr Gewicht verloren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren und den Tieren, die 30s mit Plasma behandelt wurden. Um mögliche Infiltration der Lunge zu überprüfen, wurde am Tag 4 nach abgeschlossener Behandlung die gesamte Lunge gewogen. Hier konnten wir keine Unterschiede zwischen beiden Behandlungszeiten und den unbehandelten Kontrolltieren detektieren. Zudem konnte keine erhöhte Immunantwort in der Lunge, Trachea und im Blutplasma von Hamstern, nach abgeschlossener Plasma Behandlung, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden.

Um mögliche Gewebeschäden in der Lunge nach Plasmabehandlung weiter zu untersuchen, wurden histologische Färbungen der Lunge von weiblichen und männlichen Hamstern nach 30s und 60s Plasma und Gas-Behandlung durchgeführt. Hier wurde das respiratorische und olfaktorische Epithel der Goldhamster auf Gewebeeränderungen untersucht. Wir konnten beobachten, dass die weiblichen Hamster, die entweder mit 60s Plasma oder 60s Gasgemisch behandelt wurden, eine signifikant erhöhte Entzündung in den respiratorischen Epithelien im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigen. Zudem konnten wir zeigen, dass die 60s Plasma-behandelten weiblichen Hamster signifikant erhöhte entzündliche Läsionen in den oberen respiratorischen Epithelien im Vergleich zu den 30s Plasma-behandelten weiblichen Hamstern aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten männliche Hamster, die mit 30s und 60s Plasma behandelt wurden, eine vergleichbare leichte Entzündung des respiratorischen Gewebes wie die Gas-behandelten und die unbehandelten Kontrolltiere. Des Weiteren konnten wir auch keinen signifikanten Unterschied in der Entzündung der respiratorischen Epithelien der männlichen Hamster zwischen der 30s und 60s Plasmabehandlung beobachten. Die histologische Untersuchung der Lunge wurde noch nicht für beide Geschlechter finalisiert. Wir können zusammenfassend sagen, dass die Behandlung mit 30s Plasma oder Gasgemisch zu keiner signifikanten Veränderung in der Lunge sowohl der weiblichen als auch männlichen Hamster führt. Basierend auf dem Gewichtsverlust und den Zytokindaten wurde für die anschließenden Infektionsversuche mit H1N1 Influenza eine Behandlungsdauer von 30s als geeignet festgelegt.

Die Verträglichkeitsprüfung und die Gewebsuntersuchung der Lunge im Toxizitätsmodell nach 14 Tagen wurden in das Arbeitspaket 3.3 verschoben, um die Anzahl der Tiere im Sinne des 3R (*reduce, refine, replace*) Prinzips für die ethischen Handlungsgrundsätze in der Forschung mit Tieren zu reduzieren. Da wir uns entschieden haben, die Behandlung mit 30s weiterzuverfolgen, werden nur die möglichen langfristigen Gewebsschäden nach 30s Plasmabehandlung untersucht. Im Gegensatz zur ursprünglichen Planung konnte die Testung des DBD-Luft und DBD-Aerosol-Systems im Hamstermodell bisher nicht am LIV in Hamburg durchgeführt werden. Der Umbau des DBD-Aerosol-Systems für die *in vivo* Experimente im Hamster am INP hat mehr Zeit in Anspruch genommen als ursprünglich geplant. Zudem wurde durch die Testung und Vergleich des DBD-Luft und DBD-Aerosol-Systems von Seiten der Kollegen am INP entschieden, dass für weitere Untersuchungen das DBD-Aerosol-System ungeeignet ist und die weiteren Experimente mit DBD-feuchter Luft durchgeführt werden. Auch wenn die Arbeit mit dem DBD-System nicht wie geplant durchgeführt werden konnte und das zugehörige Arbeitspaket 3.2 daher nicht vollständig abgeschlossen werden konnte, konnten dennoch wichtige wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen werden. Diese gewonnenen Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis des Gesamtzusammenhangs bei und stellen einen wertvollen Beitrag zum Projekt dar. Insgesamt bewerten wir den Verlauf dieses Arbeitspakets daher trotz der Einschränkungen als positiv.

Arbeitspaket 3.2 wurde im August 2023 teilweise abgeschlossen (AP 3.2.1, AP 3.2.2) und damit einige Monate später als ursprünglich antizipiert. Dies ist in erster Linie bedingt durch die bereits erwähnte Verzögerung des Tierversuchsantrages und den Lieferschwierigkeiten von Neon Gas.

Für die Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurden u.a. Kohlendioxid und Neon-Gas Flaschen, Goldhamster Zellen, Zellkulturmedien und -zusätze, Seren, Plastikware, fertige Reaktionssysteme (sogenannte Kits) zur Messung der Zytokine und Chemokine, sowie

zur RNA Isolation, cDNA Herstellung und RT-qPCR kommerziell erworben (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0843). Zudem wurden für die sichere Plasma-Jet Behandlung ein Geräte- und Labortransportwagen sowie ein Ozon-Gaswarngerät erworben (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0850).

Arbeitspaket AP 3.3: Viruslast nach Plasmabehandlung

Das dritte Arbeitsziel ist die Ermittlung der Viruslast nach Plasmabehandlung. In diesem Arbeitspaket sollte unter Anwendung der *low toxicity* Protokolle (erstellt in Arbeitspaket 3.2) die Wirksamkeit der Plasmaquellen hinsichtlich der Reduktion der SARS-CoV-2 Viruslast untersucht werden. Im Gegensatz zu den beantragten Vorhaben wurde in Absprache mit unseren Kollegen am INP und FZB entschieden, die ersten Experimente unter Anwendung der *low toxicity* Protokolle (AP 3.2) vorher mit dem 2009 pandemischen Influenza Virus im BSL2-Labor zu testen.

Dies war damit zu begründen, dass parallel zur SARS-CoV-2-Pandemie bereits eine neue potenzielle Bedrohung durch hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) des Subtyps H5N1 identifiziert wurde. Die WHO stuft aviäre Influenzaviren diesen Subtyp als Erreger mit dem höchsten pandemischen Potenzial ein.

Aktuell gibt es keine effektive antivirale Therapie oder Impfstoffe gegen HPAIV. Daher ist es dringend erforderlich, neue therapeutische Ansätze gegen diese Viren zu identifizieren und zu erforschen. Unsere Arbeitsgruppe untersucht seit Jahren die molekularen Mechanismen der interspeziesübergreifenden Transmission und der Pathogenese von saisonalen und pandemischen Influenza A Viren. Die im Rahmen der Influenzaforschung in Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse und unsere gesammelte Expertise können wir gezielt auf dieses Vorhaben übertragen. Darüber hinaus streben wir an, die Anwendung der Plasmabehandlung auf weitere respiratorische Viren auszuweiten. Dies würde es uns ermöglichen, die neuartige Plasmatechnologie im BSL-2-Labor zu etablieren. Vor dem Hintergrund der aktuellen Entwicklungen haben wir daher beschlossen, unsere Anstrengungen zunächst auf die Plasma-Therapie gegen Influenzaviren zu fokussieren. Als Modellvirus nutzen wir dabei das niedrigpathogene pandemische H1N1-Influenzavirus von 2009 (2009 pH1N1 IAV) als Blaupause.

Dafür wurden die Hamster mit dem H1N1 Influenzavirus infiziert oder mit PBS als Kontrolle behandelt, 24 Stunden nach Infektion wurden die Hamster an drei aufeinanderfolgenden Tagen für 30s mit Plasma behandelt. Als Kontrolle wurden Hamster nur mit Plasma behandelt. Am Tag 4 nach Infektion erfolgte die Organentnahme. Um die effektive antivirale Wirksamkeit der Plasma Behandlung zu ermitteln, wurden nach Organentnahme Parameter im Blut, oralem Abstrich, Trachea, Lunge und Mundbereich erhoben (z.B. Histologie, Viruslast & Immunantwort). Weiterhin wurden Gewicht, Mortalität sowie das äußerliche Krankheitsbild inkl. Gewichtsverlauf der Tiere bis zur Organentnahme aufgezeichnet.

Wir konnten zeigen, dass die infizierten Hamster behandelt mit 30s Plasma signifikant weniger Gewicht verlieren als die infizierten Kontroll-Hamster. Zudem wiesen die infizierten, plasma-behandelten Hamster am Tag der Organentnahme signifikant geringere Lungengewichte im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren auf, was auf eine reduzierte Infiltration hindeutet. Die Plasma-behandelten infizierten Hamster zeigten leicht reduzierte Virustiter in den Lungen und orale Abstriche im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren, diese Unterschiede waren leider nicht signifikant. Wir konnten zudem zeigen, dass die Plasma-behandelten infizierten Hamster eine allgemeine reduzierte pro-inflammatorische Immunantwort zeigen im Vergleich zu den

infizierten Kontrolltieren. Interessanterweise konnten wir in der Lunge der infizierten Plasma-behandelten Hamster signifikant reduzierte Expressionslevel von IL-6 und Makrophagen-Entzündungsproteinen (MIP-1 α und MIP-1 β) im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren beobachten. In der Trachea konnten wir ebenfalls ein signifikant reduziertes IL-6 Expressionslevel in den infizierten Plasma-behandelten Hamstern im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren beobachten.

Diese ersten Daten zeigten, dass eine Plasmabehandlung höchstwahrscheinlich in der Lage ist, den Influenzainfektionsverlauf zu verbessern. Um die Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, zu untersuchen, wurden weitere Experimente geplant. Da unsere bisherigen Daten darauf hindeuten, dass die angeborene und adaptive Immunantwort hier möglicherweise Einfluss nimmt, wurden die infiltrierenden Immunzellen mittels Bronchoalveolärer Lavage (BAL) sowie die gesamten Immunzellen der Lunge untersucht, um potenzielle Veränderungen durch die Plasmabehandlung und Influenzainfektion hinreichend zu eruieren. Um die nicht im ursprünglichen Vorhaben geplanten Experimente zur Untersuchung möglicher Unterschiede in der Immunantwort durchführen zu können, wurde eine Tierversuchsänderungsanzeige bei der zuständigen Behörde eingereicht. Dabei wurde die Umwidmung bereits beantragter Tiere sowie die Genehmigung zusätzlicher Tiere beantragt und bewilligt.

Anschließend wurden die Influenzainfektions- und Plasmabehandlungsexperimente gemäß unserem etablierten *low toxicity* Protokoll in Goldhamstern durchgeführt. Leider konnten wir nicht den zuvor beobachteten protektiven Effekt der Plasmabehandlung auf den Influenzavirusinfektionsverlauf reproduzieren. Wir konnten keine Verbesserung des Infektionsverlaufs und keine Reduktion der Virustiter in der Lunge der infizierten Tiere nach Plasmabehandlung beobachten. Durch die Komplexität des Aufbaus der Plasma-Quelle und da es sich bei unserem Plasma-Jet um einen Prototyp und kein im Handel erhältliches Produkt handelt, ist eine mögliche Fehlerquelle nicht komplett auszuschließen.

Um dies zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Experiment durchgeführt, in dem Influenzavirussuspensionen mit Plasma für 1; 2,5; 5; 7 und 10min behandelt und anschließend die Virustiter bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den Vordaten konnten wir hier leider keinen antiviralen Effekt der Plasmabehandlung beobachten. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde von den Kollegen am INP eine neue Plasma-Quelle entwickelt und am LIV eingebaut. Der neue Plasma-Jet wurde anschließend *in vitro* mit einer Influenzavirussuspension getestet. Hier konnte wieder eine erfolgreiche Reduktion der Virustiter abhängig von der Länge der Plasmabehandlung beobachtet werden. Die Plasmabehandlung führte bereits nach 2,5 min Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Virustiter und nach 5 min konnten keine infektiösen Viruspartikel mehr detektiert werden.

Somit konnten wir, mit dem neuen zur Verfügung gestellten Plasma-Jet, die antivirale Aktivität gegen Influenza *in vitro* erfolgreich zeigen. Zusätzlich wurden humane Lungenepithelzellen (Calu-3 Zellen) mit Influenza infiziert, 24h nach Infektion mit Plasma für 1, 5 und 10min behandelt und anschließend die Virustiter bestimmt. Wir konnten zeigen, dass bereits 5 min Plasmabehandlung zu einer signifikant reduzierten Viruslast in infizierten Lungenepithelzellen führt. Diese *in vitro*-Experimente waren nicht Teil des ursprünglichen Versuchsplans und stellen eine Abweichung vom ursprünglich vorgesehenen Vorgehen dar. Dennoch lieferten sie entscheidende Erkenntnisse zur antiviralen Wirksamkeit der Plasmabehandlung, sowohl bezüglich der direkte Wirkung auf das Virus als auch auf infizierte Lungenepithelzellen. Damit haben wir verschiedene Kontrollmechanismen eingebaut, um einen Ausfall der Plasma-Quelle möglichst schnell zu detektieren und eingreifen zu können. Da die beantragten Tiere aber

bereits verwendet wurden, wurde ein neuer Tierversuchsantrag bei der Behörde gestellt und die Infektion für die Untersuchung der infiltrierenden Immunzellen in der BAL und Lunge nach Influenzainfektion und Plasmabehandlung wiederholt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Plasmabehandlung zu einer Verschiebung der infiltrierenden Immunzellen nach Influenzainfektion führt. Wir konnten nach Plasmabehandlung eine signifikante Reduktion der Makrophagen in der Lunge zeigen. Dies war, im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren ebenfalls mit einer erhöhten Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in der Lunge assoziiert.

Um den Einfluss der Plasmabehandlung auf die Regenerationsphase sowie mögliche Langzeitfolgen in den Lungen der Hamster nach Influenzainfektion und Plasmabehandlung zu untersuchen, wurden zusätzlich Gewichtsverlust und Überleben über 14 Tage nach Infektion der Hamster untersucht. Zusätzlich erfolgte am Tag der Euthanasie (14 d.p.i.) die Entnahme von Blut, Lunge, Trachea und Kopf zur Analyse von Fibrose-Biomarkern sowie für histologische und immunologische Untersuchungen. Wir konnten keinen Unterschied im Gewichtsverlauf zwischen Gas-Kontrolltiere, Plasma-behandelte und den PBS-Kontrolltieren feststellen. Somit führte die Plasma- oder Gas-Behandlung allein zu keiner Langzeitbelastung der Tiere. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Genen, die eine zentrale Rolle bei der Epithelregeneration und Lungengewebereparatur nach Entzündungen spielen (z. B. *TGF-β1*, *TGF-β2*, *PDGF*), in den plasmabehandelten, infizierten Tieren signifikant erhöht war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Dies deutet darauf hin, dass die Plasmabehandlung eine verbesserte Lungenheilung im Langzeitverlauf unterstützen könnte. Die histologischen Auswertungen der Lunge und der oralen Schleimhaut für die akute Phase (4 d.p.i.) sowie für mögliche Langzeitfolgen (14 d.p.i.) stehen derzeit noch aus.

Die Messung der Lungenfunktion bei den Hamstern konnte im Rahmen dieses Vorhaben nicht durchgeführt werden, da die Versuche mit dem 2009 pH1N1 Influenzaviren im BSL-2-Labor stattfanden, während sich das erforderliche Lungenfunktionsmessgerät im BSL-3-Labor befindet. Ein Transfer des Geräts oder der Tiere war aus biosicherheitsrechtlichen Gründen nicht möglich. Dennoch lassen unsere Fibrose-assoziierte Biomarkerdaten eine Langzeitverbesserung der Lungengesundheit nach Plasmabehandlung im Vergleich zu dem infizierten Kontrollhamster vermuten. Wie oben bereits erläutert, konnte die ursprünglich vorgesehene Testung des DBD-Luft-Systems im Hamstermodell am LIV nicht realisiert werden. Wir sind dennoch überzeugt, dass die im Rahmen des Vorhabens generierten Daten einen substanziellen wissenschaftlichen Mehrwert darstellen. Sie liefern einen belastbaren „*proof-of-concept*“ und bilden eine vielversprechende Grundlage für die Weiterentwicklung innovativer therapeutischer Ansätze.

Zusammenfassend konnte das Arbeitspaket 3.3 im Dezember 2024 insgesamt abgeschlossen werden, auch wenn einzelne Teilaspekte nicht vollständig umgesetzt werden konnten. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die hier dargestellten *in vitro* Daten nicht Bestandteil des ursprünglich beantragten Vorhabens waren. Die Verzögerung im Ablauf war teilweise auf den unerwarteten Ausfall des Plasma-Jets und die daraus notwendige Wiederholung des Tierversuchs zurückzuführen, was im Vorfeld weder absehbar noch vermeidbar war.

Für die Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurden u.a. Kohlendioxid und Neon-Gas Flaschen inkl. Zubehör, Goldhamster, Zellen, Zellkulturmedien und -zusätze, Seren, Plastikware, fertige Reaktionssysteme (sogenannte Kits) zur Messung der Zytokine und Chemokine, sowie zur RNA Isolation, cDNA Herstellung und RT-qPCR kommerziell erworben (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0843). Zudem wurden Antikörper, Lösungen und Kits für die FACS Messung erworben (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0843).

Abschließende Beurteilung, Verwertbarkeit der Ergebnisse & Weiterführende Studien

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arbeitspakete 3.1 bis 3.3 insgesamt erfolgreich abgeschlossen werden konnten, auch wenn nicht alle Teilziele innerhalb des ursprünglich vorgesehenen Zeitrahmens erreicht wurden. Die Ursachen für die entstandenen Verzögerungen wurden in den vorangegangenen Zwischenberichten sowie in der vorliegenden Darstellung ausführlich erläutert. In der Gesamtheit sind diese Tierexperimente als „*proof-of-concept*“ von großer Bedeutung, um den Grundstein für eine klinische Weiterentwicklung der Plasmabehandlung zu legen.

Im nächsten Schritt soll untersucht werden, ob die Plasmabehandlung auch in der Lage ist, den Krankheitsverlauf einer SARS-CoV-2-Infektion im Hamstermodell positiv zu beeinflussen. Da die Infektion in diesem Modell eher mild verläuft, wäre es sinnvoll, mit einer höheren Virusdosis zu arbeiten, um potenzielle Unterschiede im Krankheitsverlauf deutlicher sichtbar zu machen.

Basierend auf unseren bisherigen Erkenntnissen wäre es denkbar, ein Mausmodell zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit der Plasmabehandlung gegenüber Influenzaviren zu etablieren, da die Influenzainfektion im Hamstermodell zu mild verläuft.

Der Erfolg des vorliegenden Projekts ist maßgeblich auf eine enge Zusammenarbeit und regelmäßigen Austausch mit den Partnern im Verbundvorhaben und eine Bündelung unterschiedlicher Expertisen zurückzuführen. Auch wenn die Daten aus unseren Vorhaben in wissenschaftliche Konferenzen und Meetings vorgestellt wurden, wurden während der gesamten Förderperiode monatlich vorwiegend Online-Meetings mit den Verbundpartnern abgehalten. Dies führte dazu, dass die ursprünglich veranschlagten Reisekosten nur zu einem kleinen Teil abgerufen wurden (vgl. Verwendungsnachweis, Position 0846). In Zusammenarbeit mit den Projektpartnern im Verbund wird zurzeit ein erstes Manuskript für eine Veröffentlichung erarbeitet, wodurch auch dem Auftrag der Leibniz-Institute zur Verbreitung von Forschungsergebnissen Rechnung getragen wird. Die vielversprechenden Ergebnisse des Projekts bieten eine potenzielle Grundlage für die klinische Anwendung des Plasmaverfahrens, insbesondere in der Patientenbeatmung bei zukünftigen Pandemien.

Die gewonnenen Daten aus dem Verbundprojekt könnten als Grundlage für den Einsatz des Verfahrens in der unterstützenden Patientenversorgung, unabhängig von der Virusätiologie dienen. Die positiven Befunde aus dem Vorhaben unterstreichen das wirtschaftliche Potenzial, insbesondere für Hersteller von Beatmungssystemen oder für die großflächige Desinfektion von Oberflächen während einer Pandemie. So kann gegebenenfalls langfristig ein wirtschaftlicher Nutzen aus dem Projekt gezogen werden. Weiterhin ist die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen zur Vorstellung unserer Forschungsergebnisse für das Jahr 2025 geplant.

Abschließend soll nochmal betont werden, dass das hier vorgestellte innovative Konzept auch als Blaupause für die Translation auf andere respiratorische Infektionserreger mit hohem pandemischem Potential (z.B. SARS-CoV-2 und hochpathogene aviäre Influenza A Viren) dienen kann. Aktuelle Entwicklungen, insbesondere mit Bezug auf den anhaltenden Ausbruch von Vogelgrippe (H5N1) Infektionen weltweit, verdeutlichen nochmal die allgegenwärtige Gefahr für das Entstehen einer weiteren Pandemie und erfordern die Zusammenarbeit von Wissenschaftlern unterschiedlicher Disziplinen für die Entwicklung von geeigneten Therapeutika in der Zukunft.