Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

Berichtszeitraum: 15.10.2021 – 14.10.2024

Verbundvorhabentitel:

SaxoCell: Krebsimmuntherapie mit CAR T-Zellen der nächsten Generation (UltraCAR-T)

Koordinator:

Prof. Dr. med. Michael Hudecek,

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI

& Universitätsklinikum Würzburg

Partner:

Christian Söllner, T-CURX GmbH

Prof. Dr. Dr. Ulrike Köhl,

Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie Leipzig (IZI)

Förderkennzeichen:

A (FHG IZI) 03ZU1111BA

B (T-CURX) 03ZU1111BB

Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter*in

Die CAR-T-Zelltherapie ist eine innovative und effiziente Behandlungsmöglichkeit für bestimmte Krebsarten. Hierbei wird den Patienten Blut entnommen und die körpereigenen T-Zellen werden im Labor genetisch so verändert, dass sie Krebszellen erkennen und eliminieren können. Hierfür werden die T-Zellen mit einem sogenannten Chimären Antigen Rezeptor (= CAR) ausgestattet, der bösartige Zellen anhand bestimmter Marker erkennen kann. Die so optimierten CAR-T-Zellen werden anschließend den Patienten verabreicht und können die Tumorzellen bekämpfen.

Hauptziel des UltraCAR-T Kooperationsprojekt zwischen dem Fraunhofer IZI und dem Biotech-Unternehmen T-CURX war es, neue innovative CAR-T-Zellprodukte zu entwickeln und ihre Herstellung zu optimieren, um diese Therapie zu verbessern und für neue Krebsarten und mehr Patienten verfügbar zu machen. Durch eine vereinfachte, verkürzte und automatisierte Herstellung können Kosten gesenkt und das Gesundheitssystem somit geschont werden.

Im Fokus des Arbeitsprogrammes stand dabei unter anderem, neue Marker auf Krebszellen zu identifizieren. Anschließend sollten T-Zellen mit geeigneten CARs ausgerüstet und in ihrer Wirksamkeit gegen entsprechende Krebszellen getestet werden. Darüber hinaus sollte die Sicherheit dieses neuartigen Zellprodukts getestet und die Herstellung der Zellen verbessert werden.

T-CURX hatte im Vorfeld einen neuen Marker, der spezifisch für Akute Myloische Leukämie (AML) und Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) Zellen ist, identifiziert und einen geeigneten CAR gegen diesen Marker entwickelt. Für diese beiden Erkrankungen besteht ein großer Bedarf für neue, wirksame Therapieformen. Im Rahmen des Saxocell-Projektes wurden T-Zellen, die mit diesem CAR ausgestattet waren, erneut umfänglich auf ihre Funktionstüchtigkeit getestet. So konnte gezeigt werden, dass sie entsprechende Tumorzellen eliminieren können.

Aufgrund dieser vielversprechenden Daten führte T-CURX ein Beratungsgespräch mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als der für Biomedizinprodukte zuständigen Bundesoberbehörde durch, um zu erörtern, welche prä-klinischen Daten für die die Genehmigung einer klinischen Studie mit diesen spezifischen CAR-T-Zellen erhoben werden müssen. Das PEI bestätigte, dass der Hauptfokus der prä-klinischen Daten auf der Sicherheit und Verträglichkeit des Zellprodukts liegt. Es wurde vom PEI empfohlen eine sogenannte Kreuzreaktivitätsstudie mit humanen Geweben durchzuführen, um das Risiko von Nebenwirkungen bei Anwendung dieser CAR-T-Zellen zu prüfen. Diese Studie wurde durchgeführt und bestätigte, dass der Marker nicht auf Zellen von gesundem Gewebe vorhanden ist, was eine Reaktion der CAR-T-Zellen gegen dieses Gewebe auslösen könnte.

Da die CAR-T-Zellherstellung bisher meist sehr langwierig und teuer ist, war ein weiteres Ziel der Projektpartner, ein kürzeres, optimiertes und möglichst automatisiertes Herstellungsprotokoll zu entwickeln. Dabei wurde getestet, ob CAR-T-Zellen auch innerhalb von einer Woche und ohne die Verwendung von Viren produziert werden können. Es zeigte sich, dass die Herstellung in 7 Tagen möglich ist, und diese CAR-T-Zellen viabel und voll funktionstüchtig sind. Hierdurch können Kosten gesenkt und die Produktverfügbarkeit drastisch erhöht werden.

Für die Automatisierung der Herstellung wurden verschiedene Geräte getestet und eine Marktanalyse durchgeführt. Eine komplette Automatisierung der Herstellung der CAR-T-Zellen in 7 Tagen wurde für ein Gerät bestätigt. Im Folgeprojekt von Saxocell soll nun eine weitere alternative Plattform für diese Zwecke getestet werden.

Aufgrund dieser Resultate, plant T-CURX seine CAR-T-Zellherstellungsprozesse in Zukunft deutlich zu verkürzen und zu automatisieren. Nach umfassender Testung könnten die so optimierten Produktionsprozesse gegebenenfalls zukünftig auch für die Herstellung klinischer CAR-T-Zellprodukte verwendet werden.

In einem weiteren Projektteil verfeinerte T-CURX seine Protokolle für die hochauflösende Mikroskopie, um mehrerer Marker pro Zelle gleichzeitig sowie den CAR zu färben. Hierfür wurden zunächst verschiedene Färbeprotokolle und Antikörpermengen getestet. Es wurden Protokolle für die mehrfache Markerfärbung sowie die Färbung von CAR-Molekülen erfolgreich etabliert. Durch den Einsatz dieser hochauflösenden Mikroskopierverfahren können Therapieerfolge und die Sicherheit von Produkten künftig besser vorausgesagt und monitoriert werden.

Darüber hinaus arbeiteten Fraunhofer IZI und T-CURX daran, die präklinische und klinische Entwicklung mittels gelenkter Datenerhebung und Einsatz von Algorithmen und maschinellen Lernens zu optimieren und zu beschleunigen. Hierdurch soll die Entwicklung und Zulassung innovativer CAR-T-Zellprodukte vereinfacht werden.

Im Zuge des UltraCAR-T Projektes wurden umfassende Datensätze zur Gen- und Proteinexpression während des CAR-T-Zellherstellungsprozesses erhoben und kuriert. In Kooperation mit der SaxoCellOmics-Plattform wurden Zellprodukte des optimierten Herstellungsprozesses auf ihr Genexpressionprofil untersucht. Diese Daten zeigen, dass insbesondere die Herstellungsdauer Einfluss auf die T-Zellfitness und Funktion nehmen. Bei einer kürzeren Herstellungsdauer ist von einer höheren Fitness der Zellen auszugehen.

Gleichzeitig wurden zahlreiche Daten zur Anti-Tumor-Wirksamkeit und Sicherheit erhoben, so dass diese Ergebnisse in Korrelation gesetzt werden können. Um hierfür einen verlässlichen KI-Algorithmus zu entwickeln, werden noch weitaus mehr Datensätze benötigt, an denen weiterhin gearbeitet wird. Es wird intensiv an der Konzeptentwicklung gearbeitet, um Herstellungs- und Therapieerfolge anhand von Biomarkern und mithilfe maschinellen Lernens zu prognostizieren.

Viele Ergebnisse des UltraCAR-T Projekts fließen bereits jetzt in die Produktentwicklung von T-CURX ein. Eine klinische Studie, in welcher neuartige CAR-T-Zellen gegen den hier getesteten Marker zum Einsatz kommen, wird derzeit vorbereitet. Auch die Verkürzung des Herstellungsprotokolls und verschiedene tierversuchsfreie Testmethoden kommen bei der Umsetzung dieser Studie direkt zum Einsatz. Das Projekt konnte somit in besonderem Maße dazu beitragen, dass das strategische Ziel des Zukunftsclusters SaxoCell, neue hochwertige Wertschöpfungsketten in der Zellulären Medizin zu erschließen, erreicht wird und Firmen, Krankenhäuser, das Gesundheitssystem und natürlich die Patienten unmittelbar davon profitieren. Die fruchtbare Zusammenarbeit zwischen Fraunhofer IZI und T-CURX wird weiterhin in der zweiten Saxocell Umsetzungsphase im SB-TRACT Teilprojekt fortgeführt.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II: eingehende Darstellung pro Zuwendungsempfänger

Berichtszeitraum: 15.10.2021 – 14.10.2024

Verbundvorhabentitel:

SaxoCell: Krebsimmuntherapie mit CAR-T-Zellen der nächsten Generation (UltraCAR-T)

Koordinator:

Prof. Dr. med. Michael Hudecek,
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI
& Universitätsklinikum Würzburg

Partner:

Christian Söllner, T-CURX GmbH
Prof. Dr. Dr. Ulrike Köhl,
Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie Leipzig (IZI)

Förderkennzeichen:

A (FHG IZI) 03ZU1111BA
B (T-CURX) 03ZU1111BB

Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter*in

Primäres Ziel des UltraCAR-T Kooperationsprojekts zwischen dem Fraunhofer IZI und dem Biotech-Unternehmen T-CURX war es, neue innovative CAR-T-Zellprodukte zu entwickeln, zu testen und für die klinische Anwendung vorzubereiten, um mittelfristig hochwertige Wertschöpfungsketten mit innovativen und effizienten Zelltherapeutika zu erschließen. Im Fokus des Arbeitsprogrammes standen dabei zum einen die Charakterisierung und Validierung neuer Zielantigene und der entsprechenden CAR-T-Zellprodukte für neue Anwendungen und Märkte sowie zum anderen die Entwicklung verbesserter CAR-T-Zellherstellungsprotokolle und zuverlässiger, einfacher und tierversuchsfreier präklinischer Testsysteme. Langfristiges Ziel der Kooperation war es, Entwicklungs- und Lieferzeiten für CAR-T-Zellprodukte generell zu verkürzen, Kosten zu senken und somit die sozioökonomische Effizienz dieser Therapieform zu steigern.

Um ein erstes innovatives CAR-T-Zellprodukt für die Anwendung in einer klinischen Studie vorzubereiten, sollte zunächst die Validierung des ersten Krebs-Targets und eines passenden CAR-T-Zellproduktes erfolgen. Dabei gelang es im Rahmen des Ultra-CAR-T Projektes, ein Lead-Target-Antigen als geeignetes Ziel einer CAR-T-Zellbehandlung zu bestätigen. Hierdurch entstehen exzellente Verwertungsmöglichkeiten für T-CURX und weitere strategischen Partner aus der pharmazeutischen Industrie. Darüber hinaus konnten unterschiedliche manuelle und automatisierte Entwicklungs- und Herstellungsplattformen am Fraunhofer IZI und bei T-CURX getestet und deutlich optimiert werden. Das hier gewonnene Wissen zur verbesserten und verkürzten CAR-T-Zellproduktion sowie der zuverlässigen, zulassungsrelevanten Produkttestung fließt dabei unmittelbar in die Entwicklung neuer CAR-T-Zellprodukte bei T-CURX und Fraunhofer IZI ein.

T-CURX verfügt über eine innovative Target- und Produktpipeline und proprietäre CAR-T-Zelltechnologien. Dazu gehören ein neuartiges CAR-Format (ultramodularer CAR für maximale Anti-Tumorwirkung), eine neuartige virus-freie Gentransfertechnologie (ultraschneller automatisierter Herstellungsprozess) und neuartige Sicherheitstechnologien (ultraschnelles An- und Ausschalten der CAR-T Zellen zur Therapiesteuerung). Die umfangreiche Expertise von T-CURX trug maßgeblich zum Erfolg des Ultra-CAR-T Projektes bei. Anhand der Plattform Technologien von T-CURX können die erzielten Ergebnisse des Projektes, auch auf weitere Produkte aus der Entwicklungspipeline von T-CURX übertragen werden und somit unmittelbar verwertet werden.

Zu Beginn wurden für das Ultra-CART Vorhaben die folgenden Ziele definiert:

1. Ziel: Präklinische und klinische Validierung neuer Zielantigene und proprietärer CAR-T-Zell Produkte mit optimierter Anti-Tumor-Wirksamkeit.

2. Ziel: Validierung und Einsatz neuartiger Testverfahren für die präklinische Analyse von Sicherheit und Wirksamkeit der proprietären CAR-T-Zellprodukte, u.a. in mikrophysiologischen 3D Gewebemodellen und mit hochauflösenden Mikroskopierverfahren.

3. Ziel: Validierung und Einsatz eines optimierten und skalierbaren Herstellungsprozesses für die proprietären CAR-T-Zellprodukte mit virus-freiem Transposon-basiertem Gentransfer in einen geschlossenen, automatisierten Herstellungsprozess.

4. Ziel: Einsatz hochauflösender Mikroskopieverfahren für die Detektion von Zielantigenen auf Tumorzellen und die Detektion von CAR-Molekülen auf T-Zellen für die Therapiesteuerung und Monitorierung.

5. Ziel: Standardisierung der translationalen und klinischen Entwicklung und Datenerhebung für die Etablierung von Verfahren des maschinellen Lernens und von Algorithmen der künstlichen Intelligenz zur weiteren Beschleunigung und Skalierung der Entwicklung von neuartigen CAR-T-Zellprodukten und anderen ATMPs.

Alle genannten Ziele wurden im Rahmen der Förderperiode erreicht. Die erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern T-CURX und Fraunhofer IZI wird im Rahmen der zweiten Saxocell Umsetzungsphase im SB-TRACT Teilprojekt sowie in weiteren Kooperationsprojekten weitergeführt.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitspakete erfolgreich bearbeitet:

Arbeitspakete 1: Zunächst führte T-CURX konfirmatorische Experimente mit einem vielversprechendsten CAR-Konstrukt zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) durch. Der CAR targetiert dabei ein neues Antigen, welches noch nicht in der CAR-T-Zelltherapie verwendet wird. Seit Beginn der Förderperiode wurden darüber hinaus keine neuen CAR-T-Zellprodukte zur Behandlung von AML oder CLL zugelassen, was die Notwendigkeit und Dringlichkeit der Forschungstätigkeit in diesem Feld nachdrücklich bestätigt.
Die funktionellen Tests zeigten, dass die CAR-T-Zellen von gesunden Donoren sowie von AML- oder CLL-Patienten auf die Stimulation mit Antigen-positiven Zielzellen u.a. mit Lyse und

Proliferation reagieren. *in vivo* eliminieren die CAR-T-Zellen Tumorzellen und stoppen das Tumorwachstum. Das CAR-T-Zellprodukt erfüllt also alle wesentlichsten Funktionen, die für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung erforderlich sind.

Es konnte somit ein geeignetes Target-Antigen sowie ein korrespondierendes Lead-CAR-T-Zellprodukt definiert werden. Das Arbeitspaket 1 wurde erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen.

Arbeitspaket 2: Aufgrund der vielversprechenden Daten mit den CAR-T-Zellen aus Arbeitspaket 1, führte T-CURX ein Scientific Advice Meeting mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als der für Biomedizinprodukte zuständigen Bundesoberbehörde durch, um zu erörtern, welche prä-klinischen Daten für die die Genehmigung einer klinischen Studie mit diesen spezifischen CAR-T-Zellen erhoben werden müssen. Das PEI bestätigte, dass der Hauptfokus der prä-klinischen Daten auf der Sicherheit und Verträglichkeit des Produkts liegt und die Wirksamkeit zunächst eine nachgeordnete Rolle spielt. Aufgrund fehlender Spezies-Kreuzreaktivität mit dem CAR-Konstrukt bzw. fehlender Antigenexpression in verschieden Versuchstierarten, wurde vom PEI empfohlen eine sog. Tissue Cross Reactivity Studie mit humanen Geweben *in vitro* durchzuführen.

Um den klinischen Transfer zu beschleunigen, wurde mit der Firma Labcorp eine erfahrene und international ausgewiesene CRO für die Durchführung dieser Tissue Cross Reactivity Studie zur Expression des Target Antigens beauftragt. Hierbei wurden umfassende immunhistochemische Analysen an Gewebeschnitten humaner Gewebe durchgeführt, um das Bindeprofil von spezifischen, kommerziellen Antikörpern zu testen. Nach anfänglicher Etablierung von Färbeprotokollen wurden Kryoschnitte von Kontrollmaterial und humanem Gewebe gefärbt. Insgesamt ergab sich keine unerwartete, spezifische Färbung eines normalen Gewebes und somit insgesamt ein für die CAR-T-Zelltherapie geeignetes Expressionsprofil des Antigens.

Um auch eine Reaktivität des Zellproduktes gegen gesunde hämatopoeitische Zellen vollständig auszuschließen, wurden weitere Assays etabliert, bei denen CAR-T-Zellen unter anderem mit hämatopoetischen Stammzellen und Mastzellen co-kultiviert und der Grad einer potentiellen *on-target off-tumor* Lyse ermittelt wurden.

Darüber hinaus wurde die Etablierung von weiteren tierversuchsfreien Testsystemen vorangetrieben. Hier wurde die Verwendung von 3D-Organoiden aus Patientenprimärmaterial

etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Organoide bei ausreichender Antigenexpression mithilfe von CAR-T-Zellen eliminiert werden können. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, um die Expression von Zielantigenen mittels hochauflösender Mikroskopie auf Tumorzellen nachzuweisen (siehe auch Arbeitspaket 4).

Sicherheitsrelevante Tissue Cross Reactivity Studien bestätigten ein geeignetes, sicheres Expressionsprofil des Zielantigens. Die durchgeführten Versuche erfolgten in Absprache mit der Bundesoberbehörde PEI, so konnte die Angemessenheit und Notwendigkeit der durchgeführten Methoden bestätigt werden und die Durchführung nicht-relevanter Tierversuche verhindert werden.
Aufgrund der vielversprechenden Daten bezüglich der Eignung des Zielantigens, hat T-CURX nun ein CAR-Konstrukt mit seinem ultramodularen Format designt und bereitet derzeit eine klinische Studie mit CAR-T-Zellen, die dieses vielversprechende Zielantigen targetieren vor.
Das Arbeitspaket 2 wurde erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen.

Arbeitspaket 3: In den vergangenen Jahren wurden verschiedene stark verkürzte Prozesse für die schnellere, virusbasierte CAR-T-Zellherstellung vorgestellt und getestet, z.B. die T-Charge Plattform von Novartis. Um auch die virusfreie, transposonbasierte Herstellung von CAR-T-Zellen deutlich zu verkürzten wurde der gegenwärtig 12-tägige manuelle Herstellungsprozess mit einem 7-tägigen Produktionsprozess verglichen. Dazu wurden Zellen an Tag 7 und Tag 12 der Herstellung entnommen und weitreichend charakterisiert. Zellzahlen, Viabilität der Zellen und die Transfektionsraten bestätigen, dass eine Verkürzung des Herstellungsprotokolls auf 7 Tage möglich ist.
Wie erwartet war die Ausbeute an CAR-T-Zellen bei allen Prozessarmen an Tag 7 noch nicht so hoch wie an Tag 12. Dafür waren sowohl Viabilität und als auch der Anteil an CAR+ Zellen im Endprodukt an Tag 7 höher als an Tag 12. In funktionellen Tests zeigten CAR-T-Zellen, die an Tag 7 geerntet wurden vergleichbare Ergebnisse mit Hinblick auf Zytotoxiziät und proliferativer Kapazität verglichen mit Zellen aus einem zwölftägigen Herstellungsprozess. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass eine Prozessverkürzung auch mit transposonbasiertem Gentransfer möglich ist. Hierdurch können Kosten gesenkt und die Produktverfügbarkeit drastisch erhöht werden.

Darüber hinaus sollte getestet werden, ob eine verkürzte Herstellung auch in einem vollautomatisierten System möglich ist. Die Herstellung von CAR-T-Zellen mittels Sleeping Beauty Transposontechnologie zeigten vielversprechende Ergebnisse im vollautomatischen,

geschlossenen System. Dies ermöglichte die Erstellung einer SOP für einen 7-tägigen, automatisierten CAR-T-Zellherstellungsprozess.
Im Verlauf des Projektes konnte T-CURX einen weiteren Bioreaktor für die verkürzte Kultivierung und Expansion von CAR-T-Zellen testen. Dieses System konnte jedoch den antizipierten Herstellprozess nicht optimal abbilden.
Darüber hinaus führten die Projektpartner erneut eine umfassende Marktrecherche in Bezug auf geeignete Systeme durch. Für diese Recherche wurde im Besonderen nach Systemen gesucht, welche Zellseparation, Zellanreicherung, Zellaktivierung, Genübertragung, Zellvermehrung und Ernte abbilden können. Daraus ergab sich, dass weitere Reaktoren und Systeme für eine automatisierte Herstellung in Frage kommen könnten. Dies soll deshalb in der zweiten Umsetzungsphase von Saxocell im Rahmen von SB-TRACT getestet werden.

Die Verkürzung der CAR-T-Zellherstellung ist von großer Relevanz, zeigen doch die Daten verschiedener akademischer Arbeitsgruppen und Firmen vielversprechende Ergebnisse in virusbasierten Prozessen. Im Rahmen des Saxocell Projektes ist es gelungen einen siebentägigen, manuellen, transposonbasierten Herstellungsprozess zu etablieren und die resultierenden CAR-T-Zellen umfassend zu testen. Automatisierte Systeme wurden zu diesem Zweck ebenfalls evaluiert und teilweise getestet. Diese Ergebnisse können direkt verwertet werden. T-CURX plant seine CAR-T-Zellherstellungsprozesse deutlich zu verkürzen und zu automatisieren. Nach umfassender Testung könnten die so optimierten Produktionsprozesse gegebenenfalls zukünftig auch für die Herstellung klinischer Produkte verwendet werden. Das Arbeitspaket 3 wurde erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen.

Arbeitspaket 4: Im Arbeitspaket 4 arbeitete T-CURX daran, die hochauflösende Mikroskopie mittels dSTORM zu verfeinern und die Färbung mehrerer Zielantigene pro Zelle zu etablieren. Hierdurch soll es in Zukunft möglich sein, therapierelevante Zielantigene zu finden und ihre Expression auf erkranktem und gesundem Gewebe zu ermitteln. Außerdem sollte die Färbung des CAR-Moleküls auf T-Zellen ermöglicht werden, um Expressionsmuster und Kinetik in Zukunft einfacher und präziser zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst verschiedene Färbeprotokolle und Antikörpertitrierungen für unterschiedliche Zielantigene vorgenommen.
Es wurde eine Methode entwickelt, um die Expression des Zielantigens aus Arbeitspaketen 1-3 auf Tumorzellen (AML) und gesunden Zellen (Hämatologischen Stammzellen) zu ermitteln. Darüber hinaus wurden Protokolle zum Nachweis weiterer Tumorantigene und anderer Oberflächenmoleküle mittels dSTORM getestet. So konnte u.a. die Expression unterschiedlicher Myelom-Zielantigene auf verschiedenen Zelllinien verglichen werden. Im Anschluss wurde ein Protokoll etabliert, um mehrere Antigene gleichzeitig auf derselben Zelle

zu färben. So wurde die Expression von CD3, CD2 und CD28 zeitglich auf T-Zellen gefärbt und eingemessen.
Darüberhinaus wurde ein Protokoll etabliert, um CAR-Rezeptoren auf T-Zellen zu färben und mittels dSTORM nachzuweisen.

Es wurden SOPs für die mehrfache Antigenfärbung sowie die Färbung von CAR-Molekülen mittels dSTORM erfolgreich erprobt. Durch den Einsatz dieser hochauflösenden Mikroskopierverfahren können Therapieerfolge und die Sicherheit von Produkten künftig besser vorausgesagt und monitoriert werden.
Das Arbeitspaket 4 wurde erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen.

Arbeitspaket 5: In diesem Arbeitspaket arbeiteten Fraunhofer IZI und T-CURX daran, die präklinische und klinische Entwicklung mittels gelenkter Datenerhebung und Einsatz von Algorithmen und maschinellen Lernens zu optimieren und zu beschleunigen. Hierdurch soll die Entwicklung und Zulassung innovativer CAR-T-Zellprodukte vereinfacht werden.
Im Zuge des UltraCAR-T Projektes wurden umfassende Daten zur Gen- und Proteinexpression während des CAR-T-Zellherstellungsprozesses erhoben und kuriert.

Zunächst wurde das genomischen Expressionsprofils in T-Zellen während der CAR-T-Zellherstellung durchgeführt. Hierfür wurden T-Zellen am Tag der T-Zellisolation, der Elektroporation und der Ernte mittels Nanostring-Analyse an „bulk“ T-Zellpopulationen untersucht. Die Nanostring-Analyse ist eine standardisierte und relativ preiswerte „Einstiegstechnologie“, die zur Vorbereitung der aufwendigeren (und auch kostenintensiveren) Analysen auf der OMICS Plattform eingesetzt wurde. Es wurden zwei verschiedene Herstellungsprotokolle getestet, welche sich u.a. in Medium, Aktivierungsreagenz, Elektroporationsgerät und Kulturdauer unterschieden. Außerdem wurde die Verwendung zweier verschiedener CAR-Konstrukte miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Benutzung unterschiedlicher Herstellungsprotokolle zu einzelnen signifikanten Unterschieden im Genexpressionsprofil der geernteten T-Zellen führte. Die Änderungen im Genexpressionsprofil spiegelten sich auch in der Proteinexpression wider, was anhand von stichprobeartigen durchflusszytometrischen Messungen bestätigt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Herstellungsdauer Einfluss auf T-Zellfitness und Differenzierung nehmen.
In Kooperation mit der SaxoCellOmics-Plattform wurden anschließend Zellprodukte des optimierten Herstellungsprozesses aus Arbeitspaket 3 mittels Einzelzellsequenzierung bezüglich ihres Transkriptionsprofils untersucht. Dabei wurde die Heterogenität der T-Zellen

zum Leukapheresezeitpunkt, nach Aktivierung und am Herstellungsende (Tag 7 und Tag 12) analysiert. Wie erwartet zeigten die Zellen des Startmaterials einen deutlich naiveren Phänotyp als die modifizierten und kultivierten Zellen. T-Zellen, die an Tag 7 geerntet wurden, befanden sich in einem stark proliferativen Zustand und könnten sich daher bei einer Anwendung im Patienten noch sehr gut vermehren und somit geringere Startzellzahlen ausgleichen. Auch der Anteil der erschöpften Zellen war an Tag 7 deutlich geringer als bei CAR-T-Zellen, die bis Tag 12 kultiviert wurden. Daher ist hier von einer höheren Fitness der Zellen aus der 7-tägigen Herstellung auszugehen.

Gleichzeitig wurden zahlreiche Daten zur Anti-Tumor-Wirksamkeit und Sicherheit erhoben, so dass die Ergebnisse in Korrelation gesetzt werden können. Um hierfür einen verlässlichen KI-Algorithmus zu entwickeln, werden noch weitaus mehr Datensätze benötigt, an denen weiterhin gearbeitet wird. Es wird intensiv an der Konzeptentwicklung gearbeitet, um Herstellungs- und Therapieerfolge anhand von Biomarkern und mithilfe maschinellen Lernens zu prognostizieren. Die bereits erhobenen umfassenden Datensätze werden in die Produktentwicklung von T-CURX unmittelbar einfließen.
Das Arbeitspaket 5 wurde erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen.

Die wissenschaftliche und wirtschaftliche Nutzung der erhobenen Daten ist durch die innovative Target- und Produktpipeline von T-CURX gewährleistet, die über Anwendungen in der Krebsmedizin hinaus Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen, und perspektivisch degenerative Erkrankungen und Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems einschließt. Das UltraCAR-T Projekt konnte somit in besonderem Maße dazu beitragen, dass das strategische Ziel des Zukunftsclusters SaxoCell, neue hochwertige Wertschöpfungsketten im Zukunftsfeld der Zellulären Medizin zu erschließen und dabei Sachsen und Deutschland in eine weltweit führende Position zu bringen, erreicht wird. Die fruchtbare Zusammenarbeit zwischen Fraunhofer IZI und T-CURX wird in der zweiten Saxocell Umsetzungsphase im SB-TRACT Teilprojekt fortgeführt.