

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Zuwendungsempfänger:

Technische Universität Dresden

Verbundvorhabentitel: Präklinische Entwicklung von allogenen schaltbaren universellen CART-T-Zellen sowie CAR-Tregs (AlloCARTreg)

Verantwortlicher Autor:

Prof. Dr. Martin Bornhäuser

Förderkennzeichen:

03ZU1111AA

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03ZU1111AA gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei dem Autor.



Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

Berichtszeitraum: 01.01.2022– 30.09.2024

Verbundvorhabentitel: Präklinische Entwicklung von allogenen schaltbaren universellen CAR-T-Zellen sowie CAR-Tregs (AlloCARTreg)

Koordinator:

Prof. Dr. Martin Bornhäuser

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Partner:

Dr. Anke Fuchs

Center for Regenerative Therapies Dresden, Technische Universität Dresden

Prof. Dr. Frank Buchholz

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Förderkennzeichen:

03ZU1111AA

Prof. Martin
Bornhäuser

Digital signiert von Prof. Martin Bornhäuser
DN: cn=Prof. Martin Bornhäuser, o=DE,
ou=Universitätsklinikum Carl Gustav Carus,
ou=Med. Klinik I,
email=martin.bornhaeuser@ukdd.de
Grund: Ich habe dieses Dokument überprüft
Datum: 2025.03.28 13:04:59 +0100'

Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter*in

Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde:

Das Projekt AlloCARTreg knüpft an den Fortschritt in der Entwicklung CAR-modifizierter Effektor-T-Zellen (CAR-T) an, die in den letzten Jahren die Behandlung bestimmter Lymphome und Leukämien revolutioniert haben. Trotz hoher Remissionsraten sind kommerziell verfügbare CAR-T-Produkte weiterhin mit erheblichen Nebenwirkungen und hohen Kosten verbunden, insbesondere aufgrund der patientenspezifischen Herstellung aus patienteneigenen (autologen) Zellen und immunvermittelter Komplikationen.

Ziel des AlloCARTreg-Projektes war es, allogene - aus gesunden Spendern gewonnene T-Zellen - präklinisch zu entwickeln. Dabei sollten zunächst Effektor-T-Zellen entwickelt werden, wie sie für die Krebstherapie eingesetzt werden könnten (AlloCART), um die Technologie dann auf immunsuppressive regulatorische T-Zellen (AlloCARTreg) zu übertragen, welche bei Graft-versus-Host Reaktion und Autoimmunität eingesetzt werden könnten. Da die Generierung von ad hoc verfügbaren Zellprodukten eine der größten Herausforderungen hinsichtlich einer breiten Anwendbarkeit von T-Zelltherapeutika für eine größere Zahl an Patienten darstellt, sollten durch gezielte Editierung von T-Zellen HLA-ausgewählter Spender zunächst universell einsetzbare RevCAR-Effektor-T-Zellen im Labormaßstab und anschließend suppressive RevCAR-Treg Zellen in therapeutischer Menge und Qualität generiert werden. Als Ausgangsmaterial sollte Apheresat mit Nabelschnurblut verglichen werden.

Die wesentlichen Meilensteine von AlloCARTreg wurden wie folgt festgelegt:

- A) Optimierung der Gen-Editierung im Bereich des T-Zell-Rezeptors sowie die präklinische funktionelle Testung von RevCAR-T und RevCAR-Tregs
- B) Skalierung der RevCAR-Tregs auf klinisches Niveau gemäß Good Manufacturing Practice (GMP) als Voraussetzungen für die perspektivische Erlangung einer Herstellungserlaubnis für die klinische Prüfung bei Patienten mit schwerer akuter Graft-versus-Host-Erkrankung.

Die Projektpartner **Feldmann** und **Bachmann** (HZDR) haben mit der UniCAR und RevCAR Adapter-Technologie einen innovativen Ansatz entwickelt, der durch ein 2-Komponenten-System universell einsetzbare CAR Produkte schafft, die durch austauschbare Adaptoren (sog. Targeting-Module) bei verschiedenen Krankheiten zum Einsatz kommen können. Ein weiterer zentraler Aspekt ist die gezielte Ausschaltung des endogenen T-Zell-Rezeptors, um die Spezifität und Verträglichkeit aus gesunden Spendern gewonnener Zellen zu maximieren. Da herkömmliche Gen-Editierungsmethoden oft unerwünschte genetische Veränderungen verursachen, sind präzisere Technologien erforderlich, um diese Risiken zu minimieren. In diesem Kontext wurde die Expertise von **Frank Buchholz**, einem Pionier in der Entwicklung proprietärer Genom-Editierungs-Technologien für gentherapeutische Anwendungen, gezielt eingebunden. Darüber hinaus bietet die CAR-Technologie großes Potenzial für Erkrankungen jenseits von Krebs. Insbesondere regulatorische T-Zellen (Tregs) gewinnen an Bedeutung, da sie mittels CARs gezielt an Geweben andocken und zur Behandlung von Autoimmun- sowie Entzündungserkrankungen eingesetzt werden könnten. Die Entwicklung ungerichteter regulatorischer T-Zellen als Therapeutikum zur Behandlung der GvHD wurde maßgeblich durch **Anke Fuchs** auf dem Campus vorangetrieben, ebenso wie die Etablierung eines automatisierten

Herstellungsprozesses. Durch **Martin Bornhäuser** wurde langjährige Expertise in der Anwendung zellulärer Therapien in Hämatologischen Erkrankungen eingebunden.

Ablauf des Vorhabens

Ziel des Vorhabens war es, zunächst die notwendigen Herstellungsschritte für universell einsetzbare und schnell verfügbare Effektor-T-Zellen zu etablieren, die mittelfristig für eine gerichtete Krebstherapie (AlloCART) von großem Interesse sind. Darauf aufbauend sollte die Herstellung der suppressiven Untergruppe Treg der T-Zellen entwickelt werden, die bei entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunität eingesetzt werden könnten (AlloCARTreg).

Hierfür erfolgten im ersten Schritt Testungen mit leicht verfügbaren Effektor-T-Zellen aus gesunden Spender*innen. Zum einen mit dem Ziel die Einbringung von Andockungsmolekülen auf Gen-Ebene zu optimieren und zum anderen, um nachzuweisen, dass die Adaptermoleküle an die gewünschten Zellstrukturen anheften. Im Anschluss folgte die Etablierung gentechnischer Werkzeuge zum gezielten Ausschalten der natürlichen Andockungsmoleküle (Rezeptoren) der Zellen sowie die Analyse deren Präzision. Die so generierten AlloRevCART Zellen wurden dann umfangreichen Charakterisierungs- und Funktionalitätsanalysen unterzogen.

Die Entwicklung der analogen Modifizierung der äußerst seltenen immunsuppressiven T-Zell-Untergruppe, der regulatorischen T-Zellen (Treg), bedurfte im ersten Schritt die Austestung von idealem Ausgangsmaterial gesunder Spender und optimaler Zellisoliationsstrategien für Treg. Für die Generierung von AlloRevCAR-Treg wurden Herstellungsprotokolle der AlloRevCART-Zellen auf Treg übertragen, modifiziert und optimiert. Die Endprodukte wurden anschließend phänotypisch und funktionell charakterisiert.

Wesentliche Ergebnisse

Im Rahmen des Projekts wurden bedeutende wissenschaftlich-technische Fortschritte erzielt. Regulatorische T-Zellen (Treg) aus Apheresat und Nabelschnurblut wurden phänotypisch charakterisiert, und ein GMP-kompatibler Isolationsprozess für Treg aus beiden Zellquellen mit verbesserter Reinheit entwickelt. Zudem wurde ein skalierter, GMP-gerechter Herstellungsprozess für RevCAR-transduzierte Tregs aus adultem Apheresat etabliert, und mehrere automatisierte Herstellungsläufe mit klinisch relevanter Ausbeute erfolgreich abgeschlossen.

Für die RevCAR-Treg-Therapie bei akuter Graft-versus-Host-Erkrankung (aGvHD) konnte ein im entzündeten Gastrointestinaltrakt überexprimiertes Protein als Ziel-Marker identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden Gewebe-spezifische Targeting-Module exprimiert und aufgereinigt.

Darüber hinaus wurden Fortschritte in der genetischen Modifikation von T-Zellen erzielt. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) wurde mittels CRISPR/Cas in T-Effektor- und regulatorischen T-Zellen ausgeschaltet. Neue hocheffiziente epigenetische Editoren für die sichere Ausschaltung des TCR Komplexes wurden etabliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass allogene RevCAR T-Zellen, welche mit der epigenetischen Editierung behandelt wurden, keine Veränderung in ihrem zytotoxischen Potenzial, ihrer Aktivierung, Erschöpfung und Zytokinsekretion aufwiesen. Außerdem konnten auf transkriptioneller Ebene keine Off-target Effekte festgestellt werden.



Sachbericht zum Verwendungsnachweis
Teil II: eingehende Darstellung pro Zuwendungsempfänger

Berichtszeitraum: 01.01.2022 – 30.09.2024

Verbundvorhabentitel: Präklinische Entwicklung von allogenen schaltbaren universellen CART-T-Zellen sowie CAR-Tregs (AlloCARTreg)

Koordinator:

Prof. Dr. Martin Bornhäuser
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Partner:

Dr. Anke Fuchs
Center for Regenerative Therapies Dresden, Technische Universität Dresden
Prof. Dr. Frank Buchholz
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Förderkennzeichen:

03ZU1111AA

Prof. Martin
Bornhäuser

Digitally signed by Prof. Martin Bornhäuser
DN: cn=Prof. Martin Bornhäuser, o=DE,
ou=Universitätsklinikum Carl Gustav Carus,
ou=Med. Klinik I,
email=martin.bornhaeuer@ukdd.de
Grund: Ich habe dieses Dokument überprüft
Datum: 2025.03.28 13:05:24 +01'00'

Datum, Unterschrift Zuwendungsempfänger/Projektleiter*in

Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

Die Einbindung der AG Feldmann/Bachmann des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR) als Entwickler des Adapter-CAR Systems UniCAR erfolgte über einen Kooperationsvertrag als assoziierter Partner. Seit initialer Antragstellung wurde das UniCAR-System hinsichtlich Flexibilität und Effizienz weiterentwickelt. So wurden mit dem sogenannten RevCAR-System verbesserte universelle CAR-Konstrukte geschaffen, die lediglich ein Peptid-Epitop anstatt eines Antikörper-Fragments (scFv) enthalten. RevCAR Konstrukte sind in ihrer Sequenz daher kleiner, das gentechnische Einbringen ist somit erleichtert. Dies eröffnet die zukünftige Option einer kombinierten Einschleusung unterschiedlicher genetischer Informationen. RevCAR-Konstrukte neigen zudem im Gegensatz zu UniCAR kaum zu einer Background-Aktivierung (tonic signaling) durch Clusterbildung. Aufgrund dieser Vorzüge wurde von allen Projektbeteiligten beschlossen, ein Endprodukt mit RevCAR System anstatt UniCAR zu entwickeln.

AP 1 – Allo RevCAR-T

1.1 Etablierung und Optimierung TCR-Gen-Editing von RevCAR-T - Team FB, AFe/MB, AF

Im Rahmen des Projekts wurde eine neue Klonierungsarchitektur entwickelt, die eine effiziente Assemblierung epigenetischer Editoren ermöglicht. Dabei konnte bestätigt werden, dass epigenetisches Silencing am effektivsten ist, wenn der Editor in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstartstelle eines Gens angesetzt wird. Außerdem wurde ein hoch-optimierter epigenetischer Editor (CRISPRoff-V3.2) entwickelt.

Die Untersuchungen zur Silencing-Effizienz verschiedener Strategien führten zu der Erkenntnis, dass die Komplexität des *TRA*-Locus ein erhebliches Hindernis für ein effektives TCR-Silencing in polyklonalen T-Zellen darstellt. Daher wurden alternative Ansätze getestet, und das vielversprechendste Targeting mit einer Effizienz von 90% konnte identifiziert werden.

Die zunächst in der T-Zelllinie Jurkat etablierte Methode konnte erfolgreich in primären T- und CAR-T-Zellen angewandt werden, in dem sie gleich hohe Effizienzen erzielten. Die Stabilität des Silencings war in primären T-Zellen sogar höher als in der Jurkat Modellzelllinie.

1.2 Präklinische Charakterisierung AlloRevCAR-T - Team FB, AFe/MB, AF

Wie auch bei der Jurkat-T-Zelllinie verringerte sich allerdings der Anteil der CD3 negativen primären T-Effektorzellen über einen Zeitraum von 17 Tagen von ~90% auf ~60% in Abhängigkeit ihrer Aktivierung (wurden die T-Zellen nicht aktiviert, blieb das Silencing stabil).

Nach dem Silencing des endogenen TCR sollten die Zellen gegen die Aktivierung durch α CD3/ α CD28-Reagenzien, die wir für die T-Zell-Expansionskultur verwenden, resistent sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Verringerung der TCR-negativen Population hauptsächlich auf die Aktivierung verbleibender TCR⁺ T-Zellen durch CD3/CD28-Bindung zurückzuführen ist. Diese polyklonale Aktivierungsmethode schafft demnach den kontaminierenden Zellen, die noch einen TCR exprimieren, einen

Wachstumsvorteil. Wurde der Aktivierungsschritt übersprungen, zeigte die TCR-negative Population nach zwei Wochen in der Tat keine Verringerung. Allerdings ist auch die Gesamtexpansion der T-Zellen ohne Aktivierungsschritt sehr gering.

Demnach wurde ein RevCAR-T-Zell-Expansionsprotokoll mit optimiertem Workflow etabliert, welches eine Expansion der Zellen erlaubte, ohne deren epigenetisches Silencing zu verlieren. Anschließend wurden diese Zellen phänotypisch und funktionell charakterisiert.

Meilenstein 1: Ein optimiertes Gen-Editing Protokoll zur Inaktivierung des endogenen T-Zellrezeptors von Rev-CAR-T-Zellen wurde etabliert und das Arbeitspaket konnte erfolgreich abgeschlossen und der Meilenstein erfüllt werden.

AP 2 – Allo RevCAR-Tregs

2.1 Etablierung Herstellung von RevCAR-modifizierten Treg aus Nabelschnurblut und Apheresat - Team AF, AFe/MB

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung (aGVHD) ist mit ca 50% der Patienten eine der häufigsten Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Die akute GvHD ist eine entzündliche Erkrankung, die insbesondere den Magen-Darm-Trakt, die Haut und die Leber betrifft. Das von uns als Zielstruktur gewählte Protein wird im gesunden menschlichen Darm exprimiert und bei Entzündungen hochreguliert, was mit Hilfe des Labors von R. Wehner/M. Schmitz bestätigt werden konnte. Targeting-Module für dieses Protein wurden für das RevCAR-System im Labor Feldmann erfolgreich hergestellt.

Die AG Fuchs konnte in Zusammenarbeit mit der AG Feldmann die Isolation von Treg (in hoher Reinheit) etablieren. Dabei wird zunächst eine Subpopulation der T-Zellen magnetisch angereichert (MACS-Technologie) und dann mit einem GMP-kompatiblen Zellsorter gesortet. In einer Serie von Experimenten wurde der optimale Einsatz aller Reagenzien, Antikörper, Zelldichten für alle Isolationsschritte ermittelt. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden sowohl mit Apheresat gesunder freiwilliger Spender, als auch mit Nabelschnurblut der Frauenklinik des Universitätsklinikums Dresden sowie der DKMS-Nabelschnurblutbank sehr hohe Reinheiten erzielt. Nabelschnurblut zeigte den Vorteil, dass kostenintensive magnetische Voranreicherungen vor der Zellsortierung nicht notwendig waren. Zudem zeigte die detaillierte phänotypische Charakterisierung einen für die klinische Anwendung vorteilhaften Phänotyp, der sich auch in einer entsprechenden Marker-Expression widerspiegelte.

Im nächsten Schritt wurde die Expansion der Treg-Zellen ausgehend von dem durch die AG Fuchs bereits etablierten GMP-Protokollen optimiert. Medienzusätze wurden angesichts der verbesserten Reinheit adaptiert und unterschiedliche T-Zell Stimulations-Reagenzien verglichen. Das optimierte Isolations- und Expansionsprotokoll wurde sodann für adulte Treg erfolgreich GMP-kompatibel automatisiert und aufskaliert und mehrere Läufe abgeschlossen.

In Kooperation mit der GMP-Facility des CRTD folgte dazu zunächst ein Vor-Anreicherungsprozess auf dem CliniMACS. Nach sich anschließender Zellsortierung zeigte sich eine äußerst hohe Reinheit an Treg. Die lentivirale Transduktion dieser Treg erfolgte automatisiert im geschlossenen System durch Expertise und Infrastruktur

der AG Feldmann/Bachmann. Die Endprodukte nach genetischer Modifikation und Expansion zeigten eine hohe Reinheit, Transduktionseffizienz und Zellzahl und somit eine ausreichende Ausbeute für eine prospektive, klinische Anwendung.

In weiterführenden durchflusszytometrischen Analysen wurde der Anteil kontaminierender Zellen ermittelt, die eine gegenteilige Wirkung am Zielorgan hervorrufen könnten. Während sich anfangs ein leichter Anstieg dieser Zellen im Kulturverlauf zeigte, konnte dies durch Optimierung im Folgenden vermieden und die Transduktionsrate innerhalb der kontaminierenden Zellpopulationen als gering ermittelt werden.

Meilenstein 2 (Machbarkeitsbeurteilung RevCAR-Tregs) wurde damit erfüllt.

2.2 Evaluation und Optimierung TCR-Gen-Editing von RevCAR-Tregs - Team AF, FB

Zunächst konnte gezeigt werden, dass ein CRISPR/Cas-Knockout des endogenen TCRs auch in regulatorischen T-Zellen hocheffizient funktioniert. Der Expansionsprozess im Anschluss muss jedoch noch optimiert werden.

Bei der Anwendung des epigenetischen Silencing in regulatorischen T-Zellen gab es initiale Probleme mit der Vitalität nach der Elektroporation. Verschiedene Elektroporationsprogramme wurden getestet, um eine wirksame Transfektion von Tregs zu erreichen. Das optimierte Protokoll bietet nun eine hohe Wirksamkeit des epigenetischen Silencings bei Gewährleistung adäquater Vitalität. Das Silencing sollte nun in den regulatorischen T-Zellen mehrerer Spender angewendet werden, um eine Spender-abhängige Variabilität ausschließen zu können. Außerdem ist eine detaillierte phänotypische Charakterisierung der editierten Zellen geplant.

2.3 Präklinische Charakterisierung von RevCAR-Tregs - Team AF, AFe/MB

Die im klinischen Maßstab hergestellten Tregs wiesen eine hohe Reinheit gemessen an der Expression eines Treg-charakteristischen Markers auf. Ein wichtiger Faktor, da Tregs mit geringerer Expression dieses Markers das Risiko tragen, unter Entzündungsbedingungen ihre suppressiven Eigenschaften zu verlieren. Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wurden die RevCAR Endprodukte mittels Massenzytometrie (CyTOF) phänotypisiert. Die Tregs wiesen eine hohe Expression co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Moleküle auf. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass die Tregs ein starkes Homing-Potenzial besitzen. Die RevCAR-Treg Produkte zeigten einen für die klinische Anwendung vorteilhaften Phänotyp. Zudem konnte anhand der Analyse Treg charakteristischer Marker die phänotypische Stabilität auch unter proinflammatorischen Bedingungen bestätigt werden.

RevCAR Treg zeigten gute suppressive Eigenschaften, welche durch die genetische Modifikation nicht beeinflusst wurde.

Die spezifische Aktivierungskapazität der RevCAR-Tregs konnte mit einem Aktivierungstest bestätigt werden.

2.4 Aufskalierung AlloRevCAR-Tregs - Team AF, AFe/MB

Wie in 2.1. beschrieben wurde der Herstellungsprozess für RevCAR Treg bereits frühzeitig aufskaliert und die Endprodukte von klinisch relevanter Zellzahl in 2.3. genauestens analysiert.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Bewilligte Positionen Finanzposition	Bewilligte Mittel (Euro)	Verausgabte Mittel (Euro)	Saldo (Euro)
Beschäftigte E12 – E15 (812)	437.289,54	390.154,52	47.135,02
Vergabe von Aufträgen (835)	17.318,00	12.626,84	4.691,16
Verbrauchsmaterial (838)	305.275,00	367.167,72	- 61.892,72
Dienstreisen Inland (846)	576,00	691,20	- 115,20
Summe Direkte Kosten	760.458,54	770.640,28	- 10.181,74

Kurze Erläuterungen zu den einzelnen bewilligten Positionen

Wissenschaftliches Personal

Die für die Bearbeitung der Arbeitspakete 1.1, 1.2 und 2.2 vorgesehene Doktorandenstelle wurde erfolgreich zum 01.02.2022 besetzt (AG Frank Buchholz).

Die für die Bearbeitung der Arbeitspakete 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 vorgesehene Doktorandenstelle wurde zum 01.02.2022 und die für die Bearbeitung der Arbeitspakete 1.1, 1.2, 2.1, 2.3 und 2.4 Postdoktorandenstelle zum 01.10.2022 erfolgreich besetzt (AG Anke Fuchs).

Position Vergabe von Aufträgen

Die Sequenzierungen wurden nicht wie ursprünglich geplant am MPI-CBG durchgeführt, sondern konnten durch im Labor etablierte Sequenziertechniken sowie unter anderem durch Microsynth erfolgreich realisiert werden (AG Frank Buchholz). Die durch AG Fuchs veranlassten Aufträge wurden durchgeführt und die Position entsprechend verausgabt.

Position Verbrauchsmaterial

Der Mehrbedarf an Verbrauchsmaterialien in den Arbeitspaketen 1.1. / 1.2 und 2.2 resultierte aus der Notwendigkeit, verschiedene alternative Ansätze zur effizienten epigenetischen Stilllegung des TCRA-Lokus in primären T-Zellen zu erproben. Insbesondere führten die Durchführung eines umfassenden gRNA-Screenings, die Analyse positiver Treffer mittels Deep Sequencing sowie die Optimierung des Targeting-Ansatzes zu einem erhöhten Verbrauch an Reagenzien für Zellkultur, Nukleinsäure-Amplifikation und Sequenzierung. Darüber hinaus erforderte die Evaluierung des alternativen Targetings der eine zusätzliche gRNA-Design- und Validierungsphase, wodurch der Bedarf an spezifischen Enzymen, Oligonukleotiden und Transfektionsreagenzien weiter anstieg (AG Frank Buchholz).

Bei den durch AG Fuchs abgerufenen Verbrauchsmitteln kam es zu einem geringen Mehrbedarf durch Preisanpassungen der Verbrauchsmittel seitens der Hersteller nach Beantragung, der jedoch keiner Umwidmung bedurfte.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die verausgabten Mittel wurden entsprechend der Antragstellung zweckgebunden eingesetzt und orientierten sich an den geplanten sowie durchgeführten Experimenten zur erfolgreichen Umsetzung des Projekts. Sowohl die personellen Ressourcen als auch die benötigten Verbrauchsmaterialien waren essenziell, um die experimentellen Ansätze effizient durchzuführen. Die angefallenen Kosten waren somit notwendig, um die wissenschaftlichen Ziele des Projekts zu erreichen und die geplanten Forschungsarbeiten erfolgreich umzusetzen.

Voraussichtlicher Nutzen / Verwertungsplan

Es ist anzunehmen, dass die erfolgreiche Umsetzung der "off-the-shelf" Adapter-CAR-T-Technologie für regulatorische T-Zellen (Treg) mit GMP-konformem Herstellungsprotokoll auf ein großes Interesse im Bereich Hämatologie/Onkologie sowie Zelltherapie treffen wird. Akademische und kommerzielle Partner dürften insbesondere an der Weiterentwicklung und Skalierung dieser innovativen Zelltherapie interessiert sein. Die Zusammenarbeit mit dem SaxoCell-Netzwerk und Partnern wie u.a. der DKMS StemCellBank (Kooperationsvertrag ist bereits unterzeichnet) erlaubt die Umsetzung in einem größeren Maßstab. Ferner erlaubt die Expertise in klinischen Prüfungen der Phasen I-II (Early Clinical Trial Unit) der Med. Klinik und Poliklinik I den frühzeitigen Zugang auf Machbarkeits- und Effizienzdaten. SaxoCellutions wird die Einreichung der notwendigen Dossiers bei den zuständigen Behörden unterstützen. Langfristig wird die Zusammenarbeit mit kommerziellen Partnern angestrebt, die Skalierbarkeit der Zelltherapie unterstützen und eine europäische Zulassung ermöglichen. Da allogene CAR-Treg-Zellen insbesondere für seltene Erkrankungen (Orphan Diseases) relevant sind, ist eine Zulassung möglicherweise bereits auf Basis von Phase-I/II-Studiendaten mit Expansionskohorten möglich. Nach erfolgreichen Verhandlungen mit den Kostenträgern könnte die Therapie als Neue Untersuchung- und Behandlungsmethode (NUB) oder durch Zusatzentgelte (ZE) in die Regelversorgung aufgenommen werden.

Die "off-the-shelf" Verfügbarkeit der durch die innovative RevCAR-Technologie universell einsetzbaren allogenen CAR-Treg-Zellen erweitert hierbei das Anwendungsspektrum erheblich, insbesondere im Bereich der Autoimmunerkrankungen.

In der zweiten Förderperiode ist nun angedacht, den GMP-gerechten aufskalierten Prozess analog für Nabelschnurblut-Tregs zu entwickeln, um das beste Ausgangsmaterial bestimmen zu können. Die Einreichung von Unterlagen für eine Herstellungserlaubnis und eine Phase-I-Studie ist für das Ende der zweiten Förderperiode geplant. Die proprietäre Genom-Editierungs-Technologie der AG Buchholz sowie die flexiblen CAR-Plattformen des Kooperationspartners HZDR stellen ein Alleinstellungsmerkmal dar, das eine erfolgreiche Umsetzung mit internationaler Wahrnehmung begünstigt. Die Veröffentlichung der präklinischen Studien zur GMP-gerechten Herstellung ist für 2025 vorgesehen.

Bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Chroma Medicine – Epigenetic editing CAR T cells

<https://ashpublications.org/blood/article/142/Supplement%201/3446/499718/Durable-Multiplex-Epigenetic-Editing-for>

Chroma Medicine – Patent (US20240076678A1)

<https://patents.google.com/patent/US20240076678A1>

Veröffentlichungen

1. **Schönberg PY**, Muñoz-Ovalle Á, Paszkowski-Rogacz M, Crespo E, Sürün D, **Feldmann A** and **Buchholz F** (2025) A pooled CRISPR screen identifies the T α 2 enhancer element as a driver of *TRA* expression in a subset of mature human T lymphocytes. *Front. Immunol.* 16:1536003. doi: 10.3389/fimmu.2025.1536003
2. **Santosh Nirmala S**, Kayani K, Gliwiński M, **Hu Y**, Iwaszkiewicz-Grześ D, Piotrowska-Mieczkowska M, Sakowska J, Tomaszewicz M, Marín Morales JM, Lakshmi K, Marek-Trzonkowska NM, Trzonkowski P, Oo YH, **Fuchs A**. (2024) Beyond FOXP3: a 20-year journey unravelling human regulatory T-cell heterogeneity. *Front Immunol.* 2024 Jan 12;14:1321228. doi: 10.3389/fimmu.2023.1321228. PMID: 38283365; PMCID: PMC10811018.