

ProtaGene CGT GmbH | Im Neuenheimer Feld 582 | 69120 Heidelberg

Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR),
DLR-Projektträger
Gesundheitsforschung
Heinrich-Konen-Straße 1
53227 Bonn
Germany

ProtaGene CGT GmbH
Im Neuenheimer Feld 582
69120 Heidelberg
Germany

Phone +49 6221 42790-0
www.protagene.com

Dr. Richard Gabriel
VP R&D ProtaGene CGT
Richard.gabriel@protagene.com

Heidelberg, 23. Dezember 2025

Förderkennzeichen: 01GM2006B

Vorhaben: "DBAGeneCure - Präklinische Studie zur Sicherheit und Wirksamkeit einer lentiviral-vermittelten Gentherapie für die Behandlung von Patient*innen mit Diamond Blackfan Anämie"

Ausführende Stelle: ProtaGene CGT GmbH

Projektleiter: Dr. Richard Gabriel

Betreff: Sachlicher Verwendungsnachweis

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Geplante und durchgeführte Arbeiten

Die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) ist eine seltene, angeborene Erkrankung, die sich überwiegend in Form einer Anämie manifestiert und durch eine gestörte Bildung roter Blutkörperchen (Erythropoese) gekennzeichnet ist. Sie geht häufig mit weiteren angeborenen Fehlbildungen sowie einem erhöhten Risiko für maligne Erkrankungen einher. Etwa 75 % der Fälle sind auf heterozygote Mutationen in Ribosomenprotein-(RP)-Genen zurückzuführen, insbesondere im Gen RPS19 (ca. 25%), aber auch in anderen Ribosomenproteinen wie RPL5 (ca. 7-11%).

Die derzeit verfügbaren Therapieoptionen umfassen die Gabe von Kortikosteroiden und lebenslange Bluttransfusionen. Die einzige etablierte kurative Behandlung ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation, deren Anwendung jedoch durch die Verfügbarkeit geeigneter Spender sowie das Risiko einer Graft-versus-Host-Erkrankung und weiterer immunologischer Komplikationen eingeschränkt ist.

Ziel des Konsortiums DBAGeneCure war es, die Sicherheit und Wirksamkeit einer lentiviral vermittelten Gentherapie als alternative kurative Methode für Patientinnen und Patienten mit DBA und RPS19-Mutation zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten die Grundlage für eine nachfolgende klinische Gentherapiestudie bilden.

1.1. Ursprüngliche Vorhabensbeschreibung

Im Projekt war vorgesehen, die für lentivirale Vektoren validierte Methode der Integrationsstellenanalyse mittels Shearing Extension Primer Tag Selection Ligation Mediated PCR (S-EPTS/LM-PCR) auf den therapeutischen Vektor zu adaptieren. Parallel sollten präklinische Studien durchgeführt werden, bei denen Zellen von DBA-Patienten mit einem lentiviralen Vektor transduziert und anschließend in Mäuse transplantiert werden. Die Proben dieser Mäuse sollten mittels Integrationsstellenanalyse untersucht werden. Die erzielten Daten sollten in einer Datenbank gesammelt werden, um Integrationsprofile studienintern und -übergreifend zu vergleichen und klonales Tracking zu ermöglichen. Ziel war die Identifizierung eines potenziell DBA-spezifischen Integrationsprofils sowie die Bewertung der Sicherheit des Vektors. Im Falle klonaler Dominanz sollten funktionale Analysen wie RNA-Sequenzierung und RT-PCR zur Untersuchung möglicher vektorvermittelter Gendysregulationen folgen. Abschließend war geplant, gemeinsam mit den Konsortialpartnern den Orphan-Drug-Status für den entwickelten DBA-Gentherapie-Vektor in Europa und den USA zu beantragen und bei der EMA ein „Investigational Medicinal Product“-Dossier zur Vorbereitung einer klinischen Phase-I/II-Studie einzureichen.

1.2. Änderungen im Arbeitspaket

Die Herstellung des lentiviralen Vektors in GMP-konformer Qualität verzögerte sich jedoch erheblich, sodass die geplanten Transduktionen und nachfolgenden Mausexperimente nicht durchgeführt werden konnten. Um die bewilligten Mittel dennoch sinnvoll einzusetzen, wurde in Abstimmung mit dem Verbundkoordinator eine Anpassung des Arbeitsplans erarbeitet.

In den Laboren des Verbundkoordinators wurden ergänzend Studien zur Funktionalität alternativer Genmodifikationsverfahren durchgeführt. Während lentivirale Vektoren als etabliertes und sicheres Mittel der Gentherapie gelten, sind ihre Herstellungskosten und -dauer für eine breite Anwendung im Gesundheitssystem nur schwer tragbar. Daher wird Gene-Editing als vielversprechender Ansatz erforscht. Hierbei werden „Designer-Nukleasen“ wie CRISPR/Cas eingesetzt, um kurative Gene gezielt in die DNA der Empfängerzellen einzufügen. Die Herstellung

dieser Werkzeuge ist deutlich schneller und kostengünstiger als die Produktion lentiviraler Vektoren.

Im Projekt wurde ein CRISPR/Cas-Ansatz verfolgt, um einen DBA-initiierten RPL5-Gendefekt in hämatopoetischen Stammzellen zu reparieren. Der Zuwendungsempfänger konnte Sicherheitsanalysen nicht nur für lentivirale Vektoren, sondern auch für geditierte Zellprodukte bereitstellen. Da hierfür Proben zeitnah verfügbar waren, konnten die Arbeiten am geänderten Arbeitspaket unmittelbar beginnen. Diese Anpassung wurde am 07. September 2023 beantragt und vom Zuwendungsgeber am 29. September 2023 genehmigt.

Gegen Ende des ursprünglichen Projektzeitraums wurde zusätzlich eine Verlängerung bis zum 30. Juni 2025 bewilligt, um die Bearbeitung des geänderten Arbeitsplans fortzuführen. Da die Herstellung des therapeutischen lentiviralen Vektors weiterhin nicht abgeschlossen werden konnte, wurde die Sicherheitsanalyse des geditierten Materials priorisiert. Die technischen Voraussetzungen, die geplanten Arbeiten sowie die im Bewilligungszeitraum erzielten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

1.3. Alternatives Arbeitspaket: Geneditierungsansatz für RPL5-Defekt

Im Rahmen des Konsortiums wurde parallel zum ursprünglich geplanten lentivirus-vermittelten Gentherapieansatz für RPS19-defiziente Patientinnen und Patienten ein alternativer Ansatz zur Geneditierung für den RPL5-Gendefekt verfolgt. Hierzu wurde eine homologe Rekombinations-(HR)-basierte Strategie für RPL5-defiziente hämatopoetische Stammzellen (HSCs) entwickelt, die für die meisten Mutationstypen in diesem Gen geeignet ist. Der Ansatz nutzt das CRISPR/Cas9-System in Kombination mit adeno-assoziierten Virusvektoren des Serotyps 6 (AAV6), die eine codonoptimierte RPL5-cDNA-Sequenz (CoRPL5) enthalten.

Im Rahmen der präklinischen Arbeiten wurden unterschiedliche Dosierungen sowohl einzelsträngiger (ssAAV6) als auch selbstkomplementärer (scAAV6) Vektoren in CD34+-Zellen aus Nabelschnurblut (CB) und Knochenmark (BM) getestet. Die Transplantation dieser geditierten CD34+-Zellen in NBSGW-Mäuse zeigte eine hohe Engraftment-Kapazität sowie keine Beeinträchtigung des Differenzierungspotenzials nach Anwendung des Geneditierungsprotokolls. Die aus diesen Experimenten gewonnenen geditierten Zellen sowie Proben aus den transplantierten Mäusen sollten genutzt werden, um sicherheitsrelevante Erkenntnisse über das Gene-Editing-Verfahren zu gewinnen. Im Vordergrund stand die Untersuchung potenzieller OFF-Target-Modifikationen, die entstehen können, wenn die gRNA des CRISPR/Cas9-Systems nicht ausschließlich an die Zielsequenz bindet, sondern auch an ähnliche Sequenzen im Genom und dort unerwünschte Veränderungen wie Insertionen oder

Deletionen verursacht. Darüber hinaus sollten auch die ON-Target-Modifikationen an der RPL5-Zielsequenz charakterisiert werden. Neben dem gewünschten Einbau der therapeutisch wirksamen cDNA können hier auch unmodifizierte Wildtyp-DNA sowie unerwünschte Veränderungen wie größere Deletionen, Inversionen oder Translokationen auftreten. Solche Modifikationen stellen potenziell ein erhebliches Sicherheitsrisiko dar.

Zusätzlich war die Analyse der Integrationsstellen des verwendeten AAV-Donorvektors vorgesehen. Bei AAV-Vektoren sind integrierte Sequenzen häufig nur partiell vorhanden und teilweise rearrangiert. Die beim Zuwendungsempfänger etablierte Target Enrichment Sequencing (TES)-Methode eignet sich besonders für diese Analysen, da sie im Gegensatz zu PCR-basierten Verfahren auch Teilstücke des integrierten Vektors erfassen kann, bei denen Primerbindestellen fehlen. Aufgrund des limitierten Untersuchungsmaterials sollten beide TES-basierten Methoden kombiniert werden, um eine parallele Anreicherung sowohl der ON- und OFF-Target-Zielsequenzen als auch der AAV-Integrationsstellen zu ermöglichen.

1.4. Angedachte Arbeiten im Arbeitspaket

Ein wesentlicher Teil der geplanten Arbeiten konzentrierte sich auf die Adaptierung der TES-Methode, um eine parallele Anreicherung sowohl der AAV-Integrationssequenzen als auch der relevanten genomischen Zielregionen zu ermöglichen. Dies erforderte umfangreiche methodische Anpassungen, einschließlich der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen, der Auswahl und Validierung spezifischer „Baits“ sowie der Festlegung geeigneter Protokollparameter für die gleichzeitige Anreicherung beider Sequenztypen.

Darüber hinaus war die Entwicklung einer leistungsfähigen bioinformatischen Analysepipeline von zentraler Bedeutung. Diese sollte in der Lage sein, ON-Target-Modifikationen wie den korrekten Einbau der therapeutischen cDNA sowie unerwünschte Veränderungen (z. B. Deletionen, Inversionen, Translokationen) zuverlässig zu identifizieren und zu quantifizieren. Ebenso sollten potenzielle OFF-Target-Ereignisse detektiert werden, die durch unspezifische Bindung der CRISPR/Cas9-gRNA an ähnliche Sequenzen im Genom entstehen können. Die bioinformatische Strategie sollte die Entwicklung von Algorithmen zur präzisen Zuordnung von Sequenzierungsdaten, die Implementierung von Qualitätskontrollen sowie die Integration statistischer Verfahren zur Bewertung der Modifikationshäufigkeit umfassen.

1.5. Erzielte Ergebnisse

Geneditierung ist eine bahnbrechende Technologie mit dem Potenzial, genetische Erkrankungen zu behandeln und die menschliche Gesundheit zu verbessern. Fortschritte wie CRISPR-Cas9 haben Geneditierung zugänglicher und effizienter gemacht und damit den Weg für bedeutende Fortschritte in Medizin und Biotechnologie geebnet. Ein wesentliches Sicherheitsproblem bleibt jedoch bestehen: unbeabsichtigte Veränderungen im Genom, sogenannte Off-Target-Effekte. Diese können zu schädlichen Folgen führen, einschließlich der Störung lebenswichtiger oder krebsassoziiertes Gene. Da sich Werkzeuge der Geneditierung weiterentwickeln, ist die Verbesserung ihrer Präzision und die Minimierung von Off-Target-Effekten entscheidend, um Risiken zu reduzieren und eine sichere Anwendung zu gewährleisten.

Gängige Methoden zur Erkennung und Charakterisierung von Off-Target-Ereignissen – wie GUIDE-seq, BLESS und DISCOVER-seq – sind vor allem für die Entwicklungsphase von Geneditierungswerkzeugen geeignet. Sie beruhen häufig auf exogenen Markierungen, erfordern lebende oder aktiv teilende Zellen oder setzen eine Fixierung zum Zeitpunkt der Doppelstrangbruch-Induktion voraus. Diese Abhängigkeit von Echtzeit-Reparaturprozessen, begrenzte Sensitivität und komplexe Workflows erschweren die routinemäßige, skalierbare Überwachung von Patientenproben nach der Behandlung.

Um diesem Bedarf zu begegnen, wurde in diesem Arbeitspaket ein fortschrittlicher Target Enrichment Sequencing (TES)-Ansatz zur Off-Target-Erkennung und -Charakterisierung entwickelt und als Proof of Concept validiert. Die Methode eignet sich sowohl für nicht-klinische als auch für klinische Anwendungen und verwendet eine Reihe von RNA-Sonden, die DNA-Proben für die bekannte On-Target-Stelle sowie für über 1.500 vorhergesagte CRISPR-Cas9-Off-Target-Schnittstellen anreichern. Der experimentelle Workflow wurde mithilfe einer neuartigen Knock-in-HDR-basierten Strategie optimiert, die auf den RPL5-Lokus abzielt, der am Diamond-Blackfan-Anämie-Syndrom beteiligt ist. Der Ansatz ist besonders vorteilhaft für die Analyse knapper oder wertvoller Proben.

1.5.1. Methodenetablierung für TES-basierte Off-Target-Detektion

Im Rahmen der experimentellen Methodenetablierung für TES-basierte Off-Target-Detektion wurden potenzielle Off-Target-Stellen zunächst *in silico* anhand definierter Mismatch-Kriterien zur gRNA unter Berücksichtigung des PAM-Motivs (NRG) ausgewählt. Für jede Position wurden die flankierenden Sequenzen extrahiert sowie deren Lage in repetitiven Regionen analysiert. Für alle

ausgewählten Off-Target-Stellen wurden RNA-Baits generiert, jeweils upstream und downstream der Zielstelle. Insgesamt wurden etwa 1.650 vorhergesagte Off-Target-Stellen adressiert (Gesamtabdeckung ca. 0,5–1,5 Mbp). Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina Paired-End-Technologie, mit einer parallelen Sequenzierung von Proben durch Barcodes sowie Unique Molecular Identifiers (UMIs) zur Deduplikation und Fehlerkorrektur.

Die Wetlab-Arbeiten umfassten die Fragmentierung der DNA durch Sonikation und die Ligation von Adaptoren inklusive UMIs. Es wurden verschiedene DNA-Mengen getestet, und zur Sensitivitätskontrolle wurden Plasmide mit bekannten Modifikationen in definierter Menge der genomischen DNA zugefügt. Erste bioinformatische Analysen dienten der Verifizierung der angereicherten Off-Target-Stellen sowie der Ermittlung der Sequenzierungstiefe (Coverage) pro Zielregion.

Untransduzierte Proben dienten als Negativkontrolle zur Quantifizierung von Hintergrundsignalen, während als Positivkontrollen künstliche Off-Target-Sequenzen mit definierten Modifikationen und nicht-homologen Flanken in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Pro Off-Target-Stelle wurde die Zahl der detektierten Moleküle quantifiziert; für eine ausreichende Sensitivität des Ansatzes sind mehrere Tausend unterschiedliche Moleküle pro Zielregion erforderlich. Die Methode erlaubt die Detektion und Quantifizierung von Insertionen und Deletionen (Indels), Translokationen, Vektor-Integrationen und SNPs und stellt damit ein zentrales Instrument zur Sicherheitsbewertung und zur Überwachung der genomischen Integrität dar.

1.5.2. Bioinformatische Entwicklung: Design, Implementierung und Datenanalyse

Zur Auswertung der mittels TES erzeugten Daten wurde eine modulare, skalierbare bioinformatische Strategie entwickelt. Der Workflow umfasst (a) ein Preprocessing-Modul sowie (b) ein Downstream-Analyse-Modul. Die Pipeline wurde über mehrere Sequenzierläufe und experimentelle Bedingungen hinweg etabliert und iterativ hinsichtlich Genauigkeit und Rechenaufwand optimiert.

Preprocessing

Im Preprocessing wurden die Schritte Trimming, Mapping und Deduplikation umgesetzt. Jedes Read-Paar enthält einen molekularen Barcode auf den R1- und R2-Reads. Da der von Agilent bereitgestellte Agent Trimmer hinsichtlich der Verwendung im kommerziellen Umfeld beschränkt ist, wurde eine eigene Trimming- und Barcode-Extraktionsstrategie entwickelt und implementiert. Während der Barcode-Extraktion wurden Basen mit geringer Qualität sowie Sequenzierreads mit

generell geringer Qualität entfernt. Die Skripte wurde an mehreren Proben getestet und ein Benchmarking wurde durchgeführt. Zusätzlich wurden gängige Trimmer wie fastp, cutadapt und Trimmomatic evaluiert und die eigenen Skripte entsprechend optimiert, um robuste Ergebnisse zu erzielen.

Die Qualitätsgefilterten, getrimmten Reads wurden mit BWA-MEM aligned. Zur Reduktion von Fehlzuordnungen in homologen oder repetitiven Regionen wurde eine Zwei-Stufen-Mapping-Strategie etabliert: zunächst ein Mapping gegen das Gesamtgenom ohne Einschränkungen, anschließend ein Remapping der nicht in den Zielregionen liegenden Reads ausschließlich gegen die Regionen von Interesse. Diese Strategie reduziert Bias durch Homologie und steigert die Abdeckung in schwach abgedeckten Zielregionen, erhöht jedoch die Rechenzeit durch zusätzliche Mapping- und Filterzyklen.

Zur Bestimmung der tatsächlichen Molekülzahlen in den Zielregionen wurden Unique Molecular Identifiers (UMIs) genutzt. Für die Deduplikation kam ein Open-Source-Tool zum Einsatz, das für UMI-basierte Workflows geeignet ist. Zwar empfiehlt das Agilent-Protokoll „Agent Creak“, dieses ist jedoch für eine kommerzielle Anwendung nicht verfügbar. Alternative Tools wie Picard und Samtools wurden geprüft, lieferten für das angestrebte Ziel aber nicht die optimale Leistung. Die Deduplikationsstrategie wurde daher mehrfach verglichen und parametrisch optimiert, um verlässliche Molekülzählungen zu gewährleisten.

Downstream-Datenanalyse

Die Downstream-Analyse umfasste Coverage-Analysen, die Identifikation von Insertionen und Deletionen (Indels) sowie die Detektion von Translokationen. Für die Coverage-Analyse wurde bestimmt, welche Regionen von Interesse in welcher Tiefe abgedeckt sind. Hierfür wurden bedtools eingesetzt. Nach der Deduplikation erfolgten weitere Filterungen, unter anderem die Entfernung zufälliger Off-Target-Mappings. Für jede Zielregion wurden die Tiefe (Reads pro Region) und der abgedeckte Anteil (Anzahl der mit mindestens einem Read abgedeckten Basen innerhalb der Region) berechnet.

Zur Detektion kleiner Insertionen und Deletionen wurden CRISPResso2 und das R-Paket crisprVariants evaluiert und miteinander verglichen; beide lieferten in den Tests zufriedenstellende Ergebnisse. Für die Erstellung konsistenter Zusammenfassungen und Visualisierungen über viele Proben wurden eigene Auswertungsskripte entwickelt, die automatisch Ergebnistabellen generieren und Normalisierungen gegenüber Mock- bzw. Kontrollproben durchführen. Da in diesem Projekt über 1.600 Regionen analysiert wurden, war die vollumfängliche Indel-Analyse rechenintensiv; die weitere Optimierung von Analyse-Strategie und Effizienz ist daher vorgesehen.

Translokationen gehören zu den schwierigeren Variantenklassen. Während *crispr* Variants viele komplexe Ereignisse als chimerisch oder andere strukturelle Varianten meldet, wurde zur gezielten Translokationsdetektion ein eigener Algorithmus entwickelt. Die Methode wertet sowohl Split-Reads als auch sogenannte „discordant“ Read-Paare aus. Ereignisse, die durch beide Evidenztypen gestützt werden, werden als hoch vertrauenswürdig klassifiziert; alle übrigen als weniger vertrauenswürdig. Detektierte Translokationen werden weiter in duplizierte oder intrachromosomale Translokationen, Inversionen und interchromosomale Translokationen kategorisiert.

Bei der Entwicklung lag der Fokus gleichermaßen auf Analysegenauigkeit und Recheneffizienz. Trimming und Coverage-Analysen wurden optimiert und parallelisiert, um mit steigender Read-Zahl gut zu skalieren. Mapping, Deduplikation, Indel-Calling und Translokationsdetektion wurden iterativ in Bezug auf Tool-Auswahl, Parameter und Filterstrategien verfeinert, um Laufzeit und Speicherbedarf gegenüber den ersten Prototypen deutlich zu reduzieren – bei gleichbleibender oder verbesserter Ergebnisqualität. Nachfolgende Arbeiten zur weiteren Automatisierung und Parallelisierung sind initiiert.

Die im Projekt entwickelte Methode ermöglicht die Detektion verschiedener Modifikationstypen, darunter Insertionen und Deletionen (Indels), Translokationen, Vektor-Integrationen und SNPs, und stellt damit ein wichtiges Instrument für die Sicherheitsbewertung und die Überwachung der genomischen Integrität in der Entwicklung und Anwendung von Geneditierungstechnologien dar. Darüber hinaus konnten interne Kontroll-DNA-Sequenzen mit bekannten Verhältnissen kleiner Insertionen-Deletion-Mutationen mit hoher Präzision und Genauigkeit nachgewiesen werden. Diese hohe Leistungsfähigkeit wurde auch für die Erkennung weniger häufiger genetischer Veränderungen wie chromosomaler Translokationen bestätigt. Die Fähigkeit, Mutationen mit niedriger Frequenz zu identifizieren, stellt sicher, dass selbst gering auftretende genomische Veränderungen mit potenziell bedeutenden biologischen Auswirkungen zuverlässig erkannt und analysiert werden. Die Methode kann durch die Verwendung sequenzspezifischer Sonden für jeden Geneditierungsansatz angepasst und qualifiziert werden. Sie bietet somit ein wertvolles Werkzeug zur Identifizierung und Charakterisierung potenzieller Off-Target-Stellen in der Analyse von Gentherapieproben. Neben der Unterstützung der Bewertung von Präzision und Effizienz während der Entwicklung von Geneditierungstherapien ermöglicht sie eine genaue Überwachung der genomischen Stabilität in Patientenproben und dient letztlich als entscheidendes Instrument für die Sicherheitsbewertung während des gesamten Entwicklungsprozesses.

2. Verwendung der Zuwendung im Bewilligungszeitraum

Im Rahmen des bewilligten Förderprojekts wurde die Verwendung der Zuwendung gemäß dem angepassten Arbeitsplan und den genehmigten Änderungen umgesetzt. Während der Projektlaufzeit konnten keine Proben im Rahmen des ursprünglich beantragten Arbeitspakets 3 bearbeitet werden (siehe Abschnitt Abweichungen gegenüber der aktuell bewilligten Gesamtvorkalkulation). In Abstimmung mit dem Koordinator des Verbundprojekts wurde am 07. September 2023 eine Anpassung des Arbeitsplans beantragt, die vom Zuwendungsgeber am 29. September 2023 genehmigt wurde. Zusätzlich wurde am 21. Dezember 2023 sowie am 30. September 2024 die Verlängerung des Bewilligungszeitraums bis zum 30. Juni 2025 beantragt, um die Bearbeitung des geänderten Arbeitsplans sicherzustellen.

Da im Verlauf der Verlängerung absehbar war, dass aufgrund fortbestehender Verzögerungen bei der Herstellung des Probenmaterials keine oder nur eine sehr geringe Anzahl lentiviral transduzierter Proben im Bewilligungszeitraum analysiert werden konnte, wurde der Schwerpunkt der Arbeiten auf die bewilligte Erweiterung des Arbeitspakets gelegt. Dies umfasste Analysen zur „ON und OFF-target“ – Bestimmung von geneditiertem Material (siehe Abschnitt Abweichungen gegenüber der aktuell bewilligten Gesamtvorkalkulation). Bis zum Ende des Bewilligungszeitraums standen die vorgesehenen Proben für die Integrationsstellenanalyse in lentiviral transduzierten Zellen weiterhin nicht zur Verfügung, sodass sämtliche im Projekt entstandenen Kosten auf Arbeiten des geänderten Arbeitspakets entfielen.

2.1. Materialkosten

Die Materialkosten beliefen sich auf insgesamt 52.894,67 EUR. Der größte Anteil entfiel auf Materialien im Zusammenhang mit Next Generation Sequencing, insbesondere für die Adaptierung des TES-Protokolls zur ON-/OFF-Target-Anreicherung und Quantifizierung der Geneditierung. Hierfür war es erforderlich, verschiedene Protokollvarianten zur Generierung von Sequenzierlibraries durch tatsächliche Sequenzierung zu testen. Die Tests umfassten unterschiedliche DNA-Input-Mengen, PCR-Zyklen vor der Anreicherung, Konzentrationen der „Baits“ sowie die Untersuchung von Sättigungseffekten. Zur Kostenersparnis wurden diese Versuche zunächst im kleineren Maßstab auf einem Illumina MiSeq-Gerät durchgeführt. Nach Etablierung des Wetlab-Protokolls erfolgte die Vorbereitung für die Hochdurchsatzsequenzierung auf einem Illumina NovaSeq-Gerät. Für die Integrationsstellenanalyse des AAV-Vektors in Kombination mit der Anreicherung von ON- und OFF-Target-Zielsequenzen war es notwendig, die Konzentration und das Verhältnis der spezifischen Baits experimentell zu bestimmen und

durch Sequenzierung sowie nachfolgende bioinformatische Analyse mögliche gegenseitige Beeinflussungen auszuschließen. Auch hier wurden Vorversuche zur Kostenreduktion auf einem MiSeq-Gerät durchgeführt. Rund 10.000 EUR entfielen auf Kits und Reagenzien für die Anreicherung von Zielregionen im Genom mittels TES sowie für die gleichzeitige Anreicherung dieser Zielregionen zusammen mit AAV-Vektorsequenzen für die Integrationsstellenanalyse. Die verbleibenden Materialkosten betrafen allgemeines Verbrauchsmaterial sowie Kits, beispielsweise für die Extraktion von Nukleinsäuren und die Messung der DNA-Konzentration. Die einzelnen Positionen können der Belegliste als Anlage zum rechnerischen Verwendungsnachweis entnommen werden.

2.2. Personalkosten

Die Personalkosten beliefen sich auf insgesamt 107.076,76 EUR. Rund 60.000 EUR entfielen auf die Etablierung und Testung der Methoden im Labor. Die Adaptierung des Laborprotokolls zur Anreicherung von Zielsequenzen für ON-/OFF-Target-Analysen erforderte neben den Laborarbeiten eine intensive Planung und Datenanalyse zur Optimierung der Einzelschritte, um eine ausreichende Datentiefe trotz begrenztem Ausgangsmaterial zu erreichen. Weitere rund 47.000 EUR entfielen auf die bioinformatische Datenanalyse sowie die Entwicklung einer effizienten Analysepipeline. Die Strategie wurde in mehreren Iterationen optimiert, um Genauigkeit und rechnerische Effizienz zu erhöhen. Teilweise mussten alternative Tools entwickelt werden, da öffentlich verfügbare Software häufig nur für nicht-kommerzielle Nutzung freigegeben ist. Die Berechnung der Personalkosten erfolgte nach der pauschalierten Kostenabrechnung. Die „Übersicht Personalkosten bei pauschalierter Abrechnung“ sowie die „Ermittlung des Jahresstundensatzes“ sind als Anlage 2 dem zahlenmäßigen Verwendungsnachweis beigefügt.

2.3. Abweichungen gegenüber der aktuell bewilligten Gesamtvorkalkulation

Im Rahmen des bewilligten Förderprojekts wurde für den verlängerten Bewilligungszeitraum eine aktualisierte Gesamtvorkalkulation erstellt, die die geplanten Kosten für Material und Personal sowie den angepassten Arbeitsplan berücksichtigt. Ziel des Projekts war die Durchführung präklinischer Untersuchungen unter Verwendung eines therapeutischen Vektors, einschließlich sicherheitsrelevanter Analysen. Im Folgenden werden die kalkulierten und tatsächlich angefallenen Kosten gegenübergestellt und die Gründe für die Abweichungen erläutert. In der aktuell gültigen Gesamtvorkalkulation vom 29. Oktober 2024 für den verlängerten

Bewilligungszeitraum sowie den angepassten Arbeitsplan wurden Gesamtkosten in Höhe von 79.921,78 EUR für Material und 277.160,15 EUR für Personal veranschlagt.

Im vorliegenden Verwendungsnachweis werden demgegenüber deutlich geringere Ausgaben ausgewiesen: Die tatsächlichen Materialkosten belaufen sich auf 52.894,67 EUR, die Personalkosten auf 107.076,76 EUR. Dies entspricht einer Minderverwendung gegenüber der Vorkalkulation von 27.027,11 EUR bei Material sowie 170.083,39 EUR bei Personalkosten.

2.4. Begründung der Abweichungen:

Der ursprüngliche Arbeitsplan des Konsortiums sah die Durchführung präklinischer Untersuchungen unter Verwendung des therapeutischen Vektors vor. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeiten war die Analyse der Sicherheit der transduzierten Zellen mittels Integrationsstellenanalyse, die durch den Zuwendungsempfänger erfolgen sollte. Hierfür war vorgesehen, dass die Konsortialpartner entsprechendes Probenmaterial bereitstellen.

Wie bereits im Antrag zur Anpassung des Arbeitsplans vom 07. September 2023 sowie im Antrag auf Laufzeitverlängerung vom 30. September 2024 dargelegt, verzögerte sich die Herstellung des lentiviralen Vektors und damit die Bereitstellung des erforderlichen Probenmaterials aufgrund technischer Schwierigkeiten bei einem Verbundpartner erheblich. Trotz dieser Verzögerungen war vorgesehen, nach Fertigstellung des Materials die geplanten Sicherheitsuntersuchungen an den präklinischen Proben durchzuführen.

Aufgrund der erheblichen Verzögerung war jedoch bereits absehbar, dass keine oder nur eine deutlich geringere Anzahl an Proben zur Verfügung stehen würde. Trotzdem wurde sichergestellt, dass die ursprünglich geplanten Arbeiten dennoch im Rahmen der bewilligten Zuwendungen umgesetzt werden könnten und bewilligte Mittel für diese Arbeiten zurückgehalten. Da jedoch bis zum Ende des Bewilligungszeitraums keine Proben für die Integrationsstellenanalyse bereitgestellt wurden, konnten die hierfür vorgesehenen und reservierten Mittel nicht eingesetzt werden.

2.5. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten

Die im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten waren notwendig, um die wissenschaftlichen und technologischen Ziele des geänderten Vorhabens trotz der eingetretenen Verzögerungen zu erreichen. Der ursprüngliche Arbeitsplan sah präklinische Untersuchungen unter Verwendung eines therapeutischen Vektors vor, einschließlich sicherheitsrelevanter

Analysen wie der Integrationsstellenanalyse. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei den Verbundpartnern verzögerte sich die Herstellung des erforderlichen Probenmaterials erheblich, sodass die geplanten Arbeiten in dieser Form nicht umgesetzt werden konnten.

Um die Projektziele dennoch im Rahmen der bewilligten Zuwendung zu realisieren, wurde der Arbeitsplan in Abstimmung mit dem Zuwendungsgeber angepasst. Die Erweiterung des Arbeitspakets zur Durchführung von Analysen zur „ON- und OFF-target“-Bestimmung bei geneditiertem Material war sowohl wissenschaftlich als auch methodisch sinnvoll, da diese Untersuchungen einen zentralen Beitrag zur Bewertung der Sicherheit und Effizienz von Geneditierungsverfahren im Kontext der Entwicklung einer Therapie zur Behandlung der Diamond Blackfan Anämie zu leisten. Die Arbeiten waren erforderlich, um Daten für die Risikobewertung und die Weiterentwicklung der angewandten Technologien zu generieren.

Die Angemessenheit der Projektarbeiten ergibt sich aus der konsequenten Ausrichtung auf die geänderten Projektziele und die effiziente Nutzung der bewilligten Mittel. Die eingesetzten Ressourcen für Material und Personal wurden ausschließlich für die Etablierung und Optimierung der notwendigen experimentellen und bioinformatischen Methoden verwendet. Dies umfasste die Entwicklung von Protokollen für die Anreicherung und Sequenzierung relevanter Zielregionen sowie die Implementierung einer leistungsfähigen Analysepipeline. Die durchgeführten Arbeiten stellen eine wesentliche Grundlage für die zukünftige Anwendung und Bewertung von Geneditierungsverfahren zur Behandlung der Diamond Blackfan Anämie dar und sind daher sowohl im Hinblick auf die wissenschaftliche Zielsetzung als auch auf die wirtschaftliche Mittelverwendung als angemessen zu bewerten.

3. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Entsprechend der Vorhabensbeschreibung sollten die im Gesamtkonsortium erzielten präklinischen Ergebnisse genutzt werden, um regulatorische Schritte einzuleiten und die Grundlage für eine klinische Gentherapiestudie zu schaffen. Durch Verzögerungen bei der Herstellung des therapeutischen Vektors wurde es jedoch notwendig, das Arbeitspaket anzupassen. Infolgedessen änderte sich auch der Verwertungsplan, um den neuen Rahmenbedingungen gerecht zu werden.

Die ursprüngliche Ausgangslage, der angepasste Verwertungsplan sowie die zukünftigen Pläne sind im Folgenden dargestellt.

3.1. Ursprünglicher Verwertungsplan laut Vorhabenbeschreibung

Zu Beginn des Projekts war vorgesehen, auf Basis der präklinischen Ergebnisse einen Antrag bei der European Medicines Agency (EMA) sowie der U.S. Food and Drug Administration (FDA) einzureichen, um für die geplante Gentherapie bei Diamond-Blackfan-Anämie den Orphan-Drug-Status in Europa und den USA zu erlangen. Dieser Status sollte regulatorische Vorteile und Unterstützung für die Entwicklung einer Therapie für eine seltene Erkrankung sichern.

Parallel dazu sollte ein Investigational Medicinal Product (IMP) Dossier erstellt werden, das als Grundlage für die Durchführung einer klinischen Gentherapiestudie dient. Darüber hinaus war geplant, die Ergebnisse der präklinischen Arbeiten zu nutzen, um eine Lizenz für den entwickelten Gentherapievektor an ein pharmazeutisches Unternehmen zu vergeben, das über die notwendige Kapazität und Erfahrung verfügt, um die verbleibenden Schritte bis zur therapeutischen Anwendung bei Patientinnen und Patienten umzusetzen.

Bis zur erfolgreichen Patentierung des Vektors sollten die Ergebnisse geschützt werden, während gleichzeitig die wesentlichen Erkenntnisse in peer-reviewed Fachzeitschriften, auf wissenschaftlichen Konferenzen sowie in Treffen mit Patientenorganisationen veröffentlicht werden sollten, um Transparenz und Wissenstransfer sicherzustellen.

3.2. Anpassungen im Verwertungsplan laut Änderungsantrag

Im Verlauf des Projekts wurde die Zielsetzung angepasst, da sich die Rahmenbedingungen und verfügbaren Ressourcen verändert hatten. Der Fokus verlagerte sich zunehmend auf die Analyse der Spezifität und potenzieller Off-Target-Effekte nach Behandlung von Patientenzellen mit Designernukleasen. Diese Anpassung erwies sich als sinnvoll, da die hierfür erforderlichen Optimierungsschritte unabhängig durchgeführt werden konnten und zusätzliches Probenmaterial beim Kooperationspartner verfügbar war oder sich in der Herstellung befand.

Der Verwertungsplan für das Gesamtkonsortium blieb zunächst unverändert. Im weiteren Verlauf ergaben sich jedoch sowohl für das Konsortium als auch insbesondere für den Zuwendungsempfänger neue Schwerpunkte, bedingt durch die Verzögerungen bei der Herstellung eines therapeutischen lentiviralen Vektors. Durch die Anpassung der Methodik und die Weiterentwicklung bestehender Protokolle zur Sicherheitsanalyse von Gentherapien mit integrierenden Vektoren konnten wir wertvolle Erfahrungen mit gene-editierten Materialien sammeln. Mit den verfügbaren Ressourcen war es möglich, aussagekräftige Analysen zur Integration und zu potenziellen Off-Target-Effekten zu entwickeln. Allerdings fehlte der Zugang

zu ausreichend modifiziertem Probenmaterial, um die entwickelte Methodik unter realen Bedingungen zu validieren und in ein marktfähiges Serviceangebot zu überführen.

Im Rahmen des Projekts wurde eine TES-basierte Methode zur Detektion von Off-Target-Ereignissen und Integrationsanalysen etabliert. Die im Projekt entwickelten Methoden und Analysen bilden eine robuste Grundlage für die Sicherheitsbewertung von Gen-Editing-Technologien. Die Kombination aus einer hochsensitiven TES-basierten Methode und einer modularen bioinformatischen Pipeline ermöglicht die Detektion und Quantifizierung verschiedener Modifikationstypen, darunter Insertionen und Deletionen (Indels), Translokationen, Vektor-Integrationen und SNPs.

Die Methode zeigte eine hohe Sensitivität und Präzision bei der Analyse von Geneditierungsereignissen und erlaubt die zuverlässige Erkennung selbst seltener genetischer Veränderungen. Die erzielten Ergebnisse bestätigen die hohe Leistungsfähigkeit der entwickelten Ansätze und ihre Eignung für die Anwendung in präklinischen und klinischen Kontexten.

Durch diese Arbeiten haben wir zusätzliches Know-how für die Sicherheitsbewertung von Gen-Editing-Technologien aufgebaut. Damit wurde nicht nur die geänderte Zielsetzung des angepassten Arbeitsplans erfüllt, sondern auch eine strategische Grundlage für die zukünftige Nutzung geschaffen. Dieses Wissen ist eine entscheidende Basis für die Erweiterung unseres Angebots und die Positionierung als kompetenter Partner für die Analyse von Gentherapieansätzen.

3.3. Konkrete Planungen

Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen soll die Evaluierung des Geneditierungs-Therapieansatzes für RPL5-Mutationen bei Diamond-Blackfan-Anämie erfolgen, um die klinische Relevanz und das Potenzial für eine zukünftige Therapie zu prüfen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sollen gemeinsam mit dem Verbundkoordinator in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift publiziert werden.

Parallel dazu wird ein Serviceangebot für Entwickler von Gentherapien im Bereich Gen-Editing etabliert. Dieses Angebot umfasst die Sicherheitsanalyse von Gen-Editing-Ansätzen, insbesondere die Detektion und Verifikation von Off-Target-Effekten sowie – bei Bedarf – die Analyse von Integrationsstellen der verwendeten Donorkonstrukte. Darüber hinaus wird das Serviceangebot das Monitoring behandelter Patientinnen und Patienten in klinischen Studien einschließen.

Diese Erweiterung unseres Serviceportfolios in einem dynamisch wachsenden Markt stärkt die Wettbewerbsfähigkeit unseres Unternehmens und trägt zur Stärkung des Standorts Deutschland

im Bereich der Entwicklung neuartiger Therapien bei. Durch den gezielten Ausbau unserer Kernkompetenz in der Sicherheitsanalyse klassischer Gentherapien um die spezifische Expertise für die Sicherheitsbewertung von Gen-Editing-Technologien schaffen wir eine zusätzliche, strategisch bedeutende Kompetenz für zukünftige Kooperationen und Marktanforderungen.

3.4. Erfolge und geplante Veröffentlichungen

Die während der Projektlaufzeit generierten Sequenzierdaten sowie ergänzende Experimente, die nach Abschluss der Projektlaufzeit unter Verwendung der entwickelten Labormethoden durchgeführt und sequenziert wurden, befinden sich derzeit in der abschließenden Analyse. Diese Analysen erfolgen auf Grundlage der im Projekt etablierten bioinformatischen Pipeline und sollen zeitnah finalisiert werden.

Ziel ist es, die gewonnenen Daten umfassend auszuwerten, um belastbare Aussagen zur Sicherheit und Effizienz des angewandten Geneditierungsansatzes sowie zur Integrationsstellenanalyse der AAV-Vektoren zu ermöglichen. Die Ergebnisse werden in enger Zusammenarbeit mit dem Verbundkoordinator interpretiert, in dessen Labor die Proben für die kombinierte Anreicherung von genomischen Zielsequenzen und AAV-Integrationsstellen hergestellt wurden.

Es ist vorgesehen, die finalen Ergebnisse in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift mit Peer-Review zu publizieren. Die Publikation soll nicht nur die methodischen Innovationen – insbesondere die kombinierte TES-basierte Anreicherung und die bioinformatische Analysepipeline – darstellen, sondern auch die sicherheitsrelevanten Erkenntnisse zu ON- und OFF-Target-Modifikationen sowie AAV-Integrationsmustern im untersuchten Geneditierungsansatz zur Behandlung von RPL5 vermittelter Diamond-Blackfan-Anämie dokumentieren. Damit leistet die Veröffentlichung einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung sicherer und effizienter Geneditierungsstrategien für seltene Erkrankungen wie die Diamond-Blackfan-Anämie.

Darüber hinaus wurden die Zwischenergebnisse des Projekts bereits auf wissenschaftlichen Fachtagungen präsentiert, um den Austausch mit der Fachcommunity zu fördern und die Sichtbarkeit des Projekts zu erhöhen. Die geplante Publikation sowie die bisherigen Präsentationen bilden die Grundlage für die zukünftige Verwertung der Ergebnisse in präklinischen und klinischen Studien und tragen dazu bei, die entwickelten Methoden als Standardverfahren für Sicherheitsanalysen in der Gentherapie zu etablieren.

Publikationsliste:

14. Mai 2025: Vortrag beim Annual Meeting American Society of Cell and Gene Therapy, New Orleans, LA, USA

Joanna Szumska-Aubermann¹, Muhammad Jamil¹, Manuel Palacios Pérez², Jorge Peral-Redruejo², Francisco Diaz Pascual¹, Raffaella Fronza¹, Saira Afzal¹, Juan Bueren², Susana Navarro², Richard Gabriel¹

Highly Sensitive Detection and Characterization of Intended and Unintended Gene Editing Events by TES.

1) ProtaGene CGT GmbH, 69120 Heidelberg, Germany.

2) Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; Instituto de Investigaciones Sanitarias. Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

09. Oktober 2025: Vortrag beim 32nd Annual Congress of the European Society of Gene and Gene, Sevilla, Spain

Manuel Palacios Perez et al.

Optimized therapeutic homologous recombination in RPL5-deficient Diamond-Blackfan anemia hematopoietic stem and progenitor cells

1) Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; Instituto de Investigaciones Sanitarias. Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

09. Oktober 2025: Posterpräsentation beim 32nd Annual Congress of the European Society of Gene and Gene, Sevilla, Spain

Joanna Szumska-Aubermann¹, Muhammad Ahmer Jamil¹, Manuel Palacios Pérez², Jorge Peral-Redruejo², Francisco Díaz Pascual¹, Raffaele Fronza¹, Saira Afzal¹, Juan Bueren², Susana Navarro Ordoñez², Richard Gabriel¹

Detection and characterization of gene editing event by highly sensitive TES-based method.

1) ProtaGene CGT GmbH, 69120 Heidelberg, Germany.

2) Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; Instituto de Investigaciones Sanitarias. Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.