

Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe 2 – Verbundvorhaben
„Zellfreie Produktion im größeren Maßstab zur Bereitstellung von
schwierig zu produzierenden Proteinen im Gramm-Bereich für
pharmazeutische, kosmetische und technische Anwendungen
(ThinkBig) – Teilprojekt B“

Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil II

FKZ	031B0830B
Laufzeit des Vorhabens	01.02.2020 – 31.03.2023

Autoren

Juliane Norf (MSc.)

E-Mail: j.norf@leniobio.com

Dr. Ricarda Finnern

E-Mail: r.finnern@leniobio.com

Einleitung und Projektbeschreibung

LenioBio ist ein Biotech-Unternehmen, das eine einzigartige und proprietäre, flexible Plattform für eine kostengünstige Proteinproduktion anbietet (AliCE®), die speziell auf die beträchtliche, aber unterversorgte Klasse von "schwierig zu exprimierenden (DTE) Proteinen" abzielt (diejenigen, die schlecht oder überhaupt nicht exprimieren, in den meisten Expressionssystemen) und Proteine, die dringend und schnell durch Entdeckungs- und Scale-up-Prozesse gebracht werden müssen, die andere Expressionssysteme aus technischer Sicht nicht liefern können (Abbildung 1). Im Projekt ThinkBIG wurde die industrielle Nutzbarkeit des zellfreien Expressionssystems basierend auf Tabak BY-2-Zellen durch Prozessentwicklung einer Lysatherstellung sowie der zellfreien Reaktion im Volumenbereich von bis zu 10 L ermöglicht. Für diese Entwicklung wurden wichtige Prozessschritte wie die Kultivierung der Tabak BY-2-Zellen, deren Protoplastierung und Evakuolierung sowie der Aufschluss der evakuolierten Protoplasten hinsichtlich einer Maßstabsvergrößerung untersucht, entwickelt und etabliert. Des Weiteren wurde gemeinsam durch beide Projektpartner die Entwicklung eines Bioreaktorverfahrens zur ausbeutestarken, zellfreien Proteinbiosynthese im 1 L- und 10 L-Maßstab etabliert. Der Anwendungsaspekt des Verfahrens sollte durch die Herstellung des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (hEGF, LenioBio GmbH), eines Antimalaria-Immunotoxins (FhG IME), und des technischen Enzyms Enterokinase (FhG IME) demonstriert werden.



Abbildung 1 Überblick über die Herstellung von AliCE® und die Verwendung zur Herstellung aller Arten von Proteinen für verschiedene kommerzielle Anwendungen wie Forschungsreagenzien, Diagnostika, Therapeutika und Impfstoffe.

1. Arbeitspaket 1 – Vergrößerter Prozess zur Evakuolierung

1.1. Rotoroptionen zur Maßstabsvergrößerung

Zur schnellen und kostengünstigen Bereitstellung von aktivem Lysat ist die Evakuolierung der Pflanzenprotoplasten ein unverzichtbarer Schritt. Um diesen Prozessschritt vom Labormaßstab über den pilot- bis hin zum industriellen Maßstab zu skalieren, wurden Strategien wie das Multiplexen des aktuellen Prozessprotokolls oder alternative, modifizierte Prozesse zur Entfernung der Vakuolen untersucht und auf ihre Umsetzbarkeit im Rahmen des ThinkBIG-Projekts diskutiert und bewertet. Ausgehend von der Geräteausstattung beider Projektpartner (4 x Beckman Avanti J-26 Zentrifugen) wurde bezüglich der Skalierung des Evakuolierungsschrittes folgendes bewertet: Ohne Änderung des Evakuolierungsprozesses (Mehrschicht-Dichtegradient in Ausschwingrotor (JS 5.3) und 50mL Zentrifugenbecher) konnten bei maximaler Auslastung aller verfügbaren Zentrifugen 28 Liter Zellmaterial zu ~0.5 L zellfreiem Lysat innerhalb eines Arbeitstages verarbeitet werden. Die Ausweitung des Prozesses auf zwei Zentrifugationsrunden (nur Evakuolierungsschritt) erlaubte die Herstellung von bis zu 1L Lysat aus 56L Zellkulturmaterial ohne gravierenden Verlängerung der Prozesszeit.

Der Betrieb der Beckman Avanti J-26 Zentrifugen mit einem Festwinkelrotor (JLA8.100) und 1L-Zentrifugenbechen ermöglichte, bei einmaligem Evakuolierungsschritt, die Herstellung von ~ 0.4 L zellfreiem Lysat aus 20L Zellkultur und bei maximaler Auslastung konnte 80L Zellmaterial zu 1.6 L Lysat verarbeitet werden. Die Eignung des Festwinkelrotors zur Entfernung der Vakuolen im Gradienten sowie die erfolgreiche Herstellung von aktivem Lysat (bis zu zu 3 g/L) wurde experimentell bestätigt). Eine Übersicht verarbeitbarer Mengen an Zellmaterial zur Herstellung von zellfreiem Lysat beim Einsatz aller Beckmann Zentrifugen Optionen ist in

Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Übersicht der verarbeitbaren Mengen Zellkultur und generierten Volumen an Protoplasten (PP), Miniprotoplasten (MPP) und zellfreiem Lysat. Berechnet für eine bzw vier identische Zentrifugen und Rotoren der Firma Beckman Coulter bei einmaliger Durchführung aller Prozessschritte von Zellernte bis Lysatklärung. * Durchläufe bezieht sich auf die Anzahl der Evakuierungsschritte, je Durchlauf verlängert sich die Prozesszeit um 1 Stunde [h], ** Referenzprozess im Labormaßstab, MA: Mitarbeiter.

Anzahl Zentrifugen	Rotor	Gefäße	Zellkultur	PP	MPP	Lysat	Qualität	Prozesszeit	Max Durchläufe*/Tag
			[L]	[L]	[mL]	[mL]	[g/L] eYFP	[h]/MA	
1**	J55.3	28x50 ml	6	0,7	45	120	3	6-8/2	2
4	J55.3	112x50 ml	28	3,7	180	560	3	8/2	2
1	JLA8.100	6x1 L	20	2,4	150	400	2,7-3	8-10/2	2
4	JLA8.100	24x1 L	80	9,6	590	1600	2,7-3	≥10/2-3	2

Die Kosten-Nutzen-Analyse zur Verwendung eines zonalen Rotors für den vorhandenen Zentrifugentyp der Firma Beckmann zeigte, dass dieser Ansatz aus mehreren Gründen ungeeignet war.

1. Eine Durchflusszentrifugation im zonalen Rotor erfordert teure Peripheriegeräte (Pumpe und Schläuche) und einen kostenintensiven Zentrifugenumbau (33.200 Euro Rotor + Umbau) und wurde auch als sehr experimentell und sehr aufwendig eingestuft.
2. Da eine kontinuierliche Zentrifugation mit Dichtegradienten nicht möglich ist und der Rotor nur im „Batch“-Modus mit einem Gesamtvolumen von 800mL (entspricht max. 500mL Protoplastenlösung) eingesetzt werden konnte bot diese Option bezüglich Skalierung keinen Mehrwert.

1.2. Skalierung des Dichtegradienten zur Evakuolierung

Im Rahmen des Projektes sollte das physikalische Trennverfahren mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation auch bei der Maßstabsvergrößerung dieses Prozessschrittes beibehalten werden. Die Verwendung einer inerten Substanz, aktuell Percoll, ermöglicht in einem Zentrifugationsschritt die Auftrennung von Zellorganellen gemäß ihrer Dichte, sodass sich Vakuolen aufgrund ihrer geringeren Dichte vom Rest der Zellen (mit einer höheren Dichte) separieren lassen. Zur Bereitstellung von Lysatvolumen im Maßstab von 1-10L wurde der Evakuolierungsprozess auf 1L Zentrifugenbecher transferiert. Experimentell konnte gezeigt werden, dass sich das Prinzip des Mehrschicht-Dichtegradienten im Ausschwingrotor von 50mL Zentrifugengefäßen (**Error! Reference source not found.**D) auf 1L Becher im Festwinkelrotor übertragen ließ (**Error! Reference source not found.**A-C). Nach identischer Prozesszeit erfolgte eine vergleichbare Verteilung der Protoplasten, Miniprotoplasten und Vakuolen (**Error! Reference source not found.**, B-D). Äquivalent zum kleineren Labormaßstab (Referenzmaßstab) wurden die Vakuolen-freien Miniprotoplasten, auch im größeren Maßstab, in einer reinen Gradientenschicht angesammelt und konnten aus den großen Gefäßen effizient isoliert werden. Diese Untersuchungen wurden sowohl für ein Evakuationsvolumen von 0.5L (getestet durch Fraunhofer IME) als auch für 1L pro Zentrifugenbecher (getestet durch LenioBio) mit Erfolg durchgeführt.

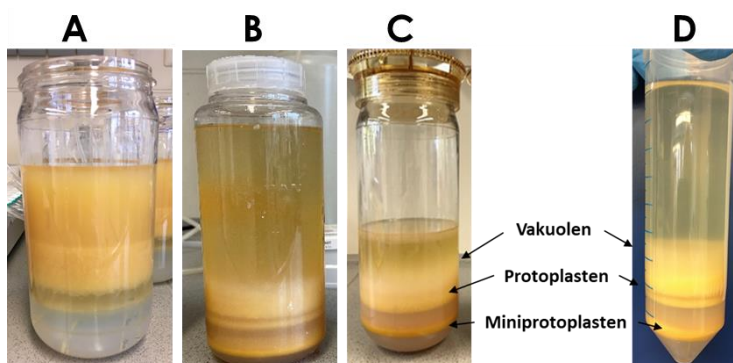


Abbildung 2 Skalierung des Dichtegradienten zur Evakuolierung in 1 L Zentrifugenbechern. Separation der Vakuolen von Protoplasten nach 1 h, 6800xg. A: Protoplasten auf Dichtegradient vor der Zentrifugation, B: Protoplasten im Dichtegradienten nach der Zentrifugation, 1L Volumen, C: Protoplasten im Dichtegradient nach der Zentrifugation, 0,5L Volumen, D: Kontrolle im Labormaßstab, Protoplasten im Dichtegradient nach der Zentrifugation.

Die Evakuierung von Protoplasten konnte somit von 28*30mL (ursprünglicher Laborprozess in 50mL Zentrifugengefäßen) auf 6*600mL (skalierter Laborprozess in 1L Zentrifugenbechern) in einem einzigen Zentrifugationsdurchlauf skaliert werden. Am derzeitigen Standort des LenioBio Technologie- & Innovationszentrums im Fraunhofer IME Gebäude in Aachen sind zeitgleich vier Zentrifugationsläufe (je Zentrifuge 30L Zellmaterial/3,6L Protoplasten) parallel möglich. Unter Einplanung aller vier verwendbaren Zentrifugen bei beiden Projektpartnern konnte eine Skalierung dieses Prozessschrittes von 6L Zellkultur/0.72L Protoplasten (Referenzprozess) auf 120L Zellkultur/3.6L Protoplasten erreicht werden, die final bei einmaliger Durchführung des Evakuierungsschrittes bis zu 2.4 L Lysat lieferte.

In mehreren Versuchen ausgehend von der identischen Menge an Startkultur, konnte belegt werden, dass während der Herstellung im Referenzmaßstab und im 1L-Becher vergleichbare Prozessvolumina erzielt werden (Abbildung 3 und

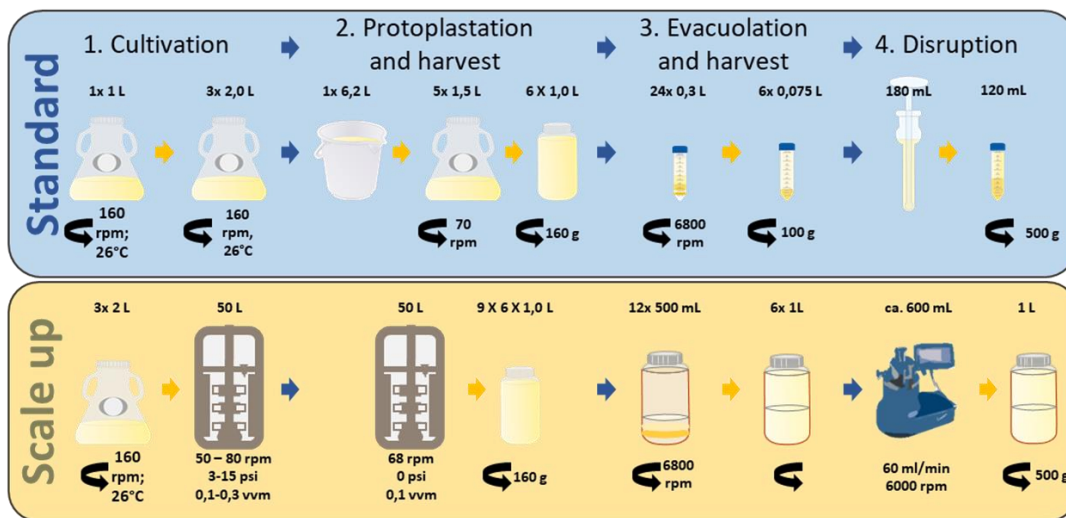


Abbildung 3 Standard: Ausgangsprozess zur Herstellung von ca. 120 ml Lysat. Scale up: Prozessaufbau für die Herstellung von ca. 1 L Lysat. Für die Herstellung von 10 L Lysat konnte der Scale up Prozess gestaffelt oder sequenziell durchgeführt werden.

). Das dabei entstandene Lysat zeigte zudem mit einer Lysataktivität von 2,5 bis 3 g/L für das Referenzprotein eYFP, bei beiden Projektpartnern eine Aktivität, die dem parallel durchgeführten Referenzprozess (3g/L) entspricht.

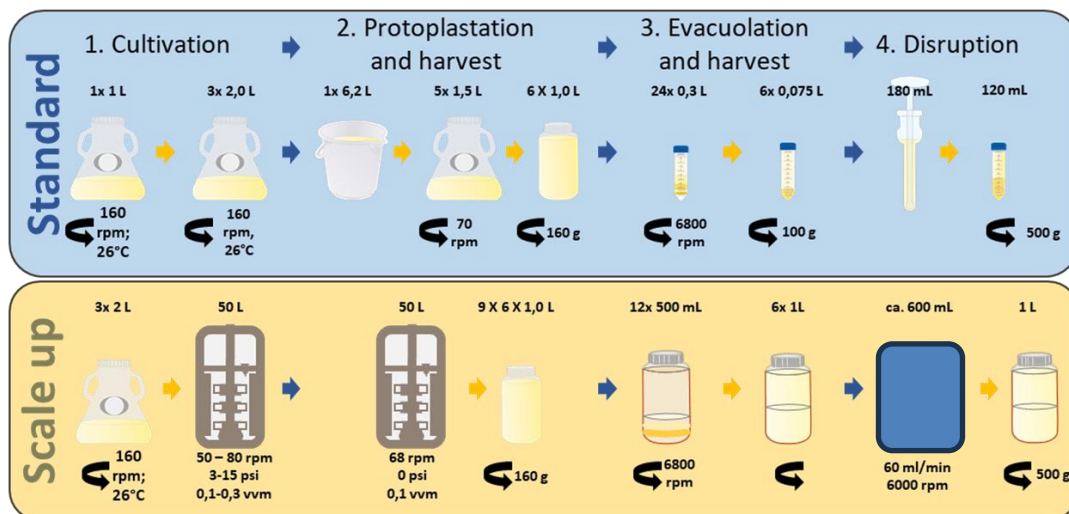


Abbildung 3 Standard: Ausgangsprozess zur Herstellung von ca. 120 ml Lysat. Scale up: Prozessaufbau für die Herstellung von ca. 1 L Lysat. Für die Herstellung von 10 L Lysat konnte der Scale up Prozess gestaffelt oder sequenziell durchgeführt werden.

Tabelle 2 Vergleich der Prozessvolumina zur Lysatherstellung im Labormaßstab und mit 1L-Becher Protokoll ausgehend von 6L und 72 L Zellkultur. PCV: gepacktes Zellvolumen, PP: Protoplasten, MPP: Miniprotoplasten, MPP*: gewaschene Miniprotoplasten.

Gefäße	Zellkulturvolumen [L]	PCV [%]	PP [ml]	MPP [ml]	MPP* MPP*	Rohlysat [ml]	Finales Lysat [ml]
Reference 50 ml	6	17	580	100	49	119	140
1 L Becher	6	17	400	100	45	100	124
12x1 L Becher	72	20	7200	1200	600	1400	1600

Zur Herstellung von Lysat über den 1L Maßstab hinaus (Projektziel 10L), konnten mehrfache (gestaffelte und sequenzielle) Durchläufe der Dichtezentrifugation im 1L Zentrifugenbecher durchgeführt werden.

1.3. Kostenreduzierung der Evakuolierung – Percoll® Alternativen zur Dichtezentrifugation

Während des Lysatherstellungsprozesses erfolgte die Entfernung der Vakuolen über einen Percoll® Dichtegradienten. Diese mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichteten inerten kolloidalen Siliziumdioxid-Partikeln kommen aufgrund Ihrer vorteilhaften Eigenschaften wie niedrige Viskosität, geringe Osmolalität und keine Toxizität gegenüber Zellen zum Einsatz, stellen jedoch, mit Fokus auf Maßstabsvergrößerung, einen erheblichen Kostenfaktor dar. Nach aktuellem Stand belaufen sich die Kosten für Percoll® pro Prozess auf 108 Euro zur Herstellung von 120mL Lysat (Labormaßstab/Referenzprozess) und 1080 Euro pro Liter Lysat (skaliertes Herstellungsprozess). Mit Blick auf die Herstellung von 10L Lysat belaufen sich die Kosten für den Dichtegradienten auf 10.800 Euro. Aus diesen Grund wurde im Rahmen des Projektes begonnen Alternativen zu Percoll® mit geringeren Anschaffungskosten zu identifizieren, die sich mit gleicher Qualität und Quantität zur Entfernung der Vakuolen in Dichtezentrifugationen eignen könnten. Neben dem finanziellen Aspekt, sind als alternative Substanzen idealerweise nur solche relevant, bei denen es sich um große nicht zytotoxische wasserlösliche Moleküle ohne Lösungsmittelverunreinigungen handelt, die keinen Einfluss auf die Lysataktivität haben. Eine Zusammenfassung von kommerziell erhältlichen Alternativen ist in Tabelle 2 gelistet. Günstige Alternativen wie Stärke sind aufgrund von Unlöslichkeit nicht praktikabel. Alternativen wie beispielsweise Nycodenz® brachten keinen Kostenvorteil, sind nicht in den prozessrelevanten Dichten erwerblich (Rotisep®) oder lassen sich nicht lösen (Ludox®). Tests mit Saccharose erzielten dagegen erfolgversprechendere Ergebnisse: In vereinfachten Gradienten wurden optisch und mikroskopisch eine dem Percollgradienten sehr ähnliche Auftrennung der Zellfraktionen (Protoplasten, Vakuolen und Miniprotoplasten) erzielt (Abbildung).

Tabelle 2 Kommerziell erhältliche Substanzen zur Dichtegradientenzentrifugation.

Substanz	Bemerkungen	Durchgeführte Experimente
Percoll®	Kolloidale Siliziumdioxid-Partikel, Standard	+
Saccharose	Kleines Molekül, hohe Dichte bei hohen Konzentrationen/Osmolalitäten	+
Nycodenz	Kostenintensiv	-
Stärke	Unlöslich in Wasser	+
PEG	Erfolgsversprechend, Molekülgröße beeinflusst Osmolalität	-
Rotisep/Cellpure	Dichte zu gering	-
Metrizamide	Kostenintensiv	-
Ludox	Kristallisiert bei relevanten Konzentrationen, unbeschichtet	+

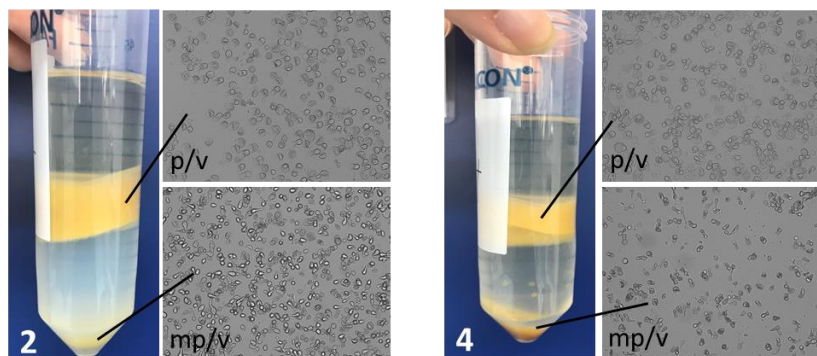


Abbildung 4 Einfluss von Sucrose als Percoll®-Alternative in vereinfachter Dichtegradientenzentrifugation. 30mL Protoplasten unterlegt mit 40% Percolllösung (2) und 40% Sucroselösung (4), nach 1-stündiger Zentrifugation bei 6800g. p/v: Protoplasten mit Vakuolen, mp/v: Miniprotoplasten und Vakuolen.

Da hohe Saccharose-Konzentrationen eine für die Protoplasten toxische Osmolalität mit sich bringen, wurde der Austausch des kostenintensiven Percoll® durch Saccharose im Verlauf des Projektes nicht weiter verfolgt. Die Implementierung einer kostengünstigeren Alternative zu Percoll® bei gleich bleibender Qualität des Lysats konnte bisher nicht umgesetzt werden, wird aber auch in der Zukunft weiterhin untersucht.

1.4. Optimierung der Evakuolierung

Die Effizienz mit der Vakuolen aus den Protoplasten entfernt und von den entstehenden Miniprotoplasten separiert werden bestimmt nicht nur die Qualität, sondern auch die Ausbeute an finalem zellfreiem Lysat. Die Osmolalität des Mediums, in dem sich die Protoplasten befinden, übt einen erheblichen Einfluss auf die Größe der Zellvakuolen aus. Daher besteht hypothetisch in deren Variation (z.B. kleineres Volumen, einheitliche Größe) ein großes Potenzial, die Evakuolierungseffizienz zu optimieren. Der Einfluss unterschiedlich osmotisch eingestellter Medien auf die Vakuolen Entfernung, sowie die Qualität des aus den Miniprotoplasten hergestellten Lysates wurden in Optimierungsexperimenten untersucht. Vergleichend zu der Zugabe von 0,36 Mol Sorbitol im Referenzprozess, wurde der Effekt der halben Menge (0,18 M), sowie der doppelten Menge (0,72 M) untersucht. Sowohl die Ausbeute an evakuolierten Miniprotoplasten (Zellzahl), die visuelle Beurteilung

der Gradientenschicht (Auftrennung der Zellfraktionen), als auch die mikroskopischen Analysen der jeweiligen Zellfraktionen bezüglich ihrer Reinheit bestätigten eine vergleichbare Entfernung der Vakuolen bei allen untersuchten Osmolalitäten. Anhand dieser „optischen Kriterien“ konnten unter allen Bedingungen Miniprotoplasten mit vergleichbarer Effizienz isoliert werden und somit ein signifikanter Einfluss der getesteten Osmolalität nicht festgestellt werden. Allerdings hat die Osmolalität einen großen Einfluss auf die Lysatqualität (Abbildung 5): Auf Lysatebene resultierten die osmotischen Bedingungen des Referenzprozesses im Vergleich zu den Lysaten mit verändertem osmotischen Druck in Lysat mit der höchsten Aktivität.

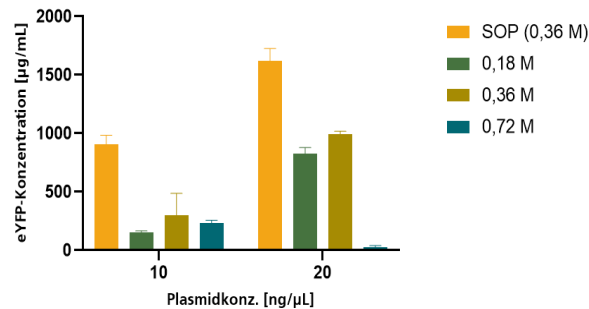


Abbildung 5 Einfluss Protoplasten Osmolalität auf Lysatqualität. Validiert für das Referenzprotein eYFP nach 48-stündiger Lysatreaktion. Zur Entfernung der Vakuolen im Dichtegradienten wurden die Medien der Protoplasten mit unterschiedlicher Osmolalität eingestellt (0,18 M, 0,36 M und 0,72 M), die im Referenzmedium (SOP) gemessenen 0,36 M wurden zur Kontrolle nochmals durch Mischen mit Sorbitol erzeugt.

1.5. Prozesskontrolle

An mehreren Stellen der Lysatherstellung ist eine genaue Zellzählung (Protoplasten, Miniprotoplasten) erforderlich, anhand derer der Erfolg und Fortschritt des Herstellungsprozesses bewertet werden kann. Diese Werte dienen im Herstellungsprozess als kritische Prozessparameter (critical process parameter CPPs). Grundvoraussetzung für die Prozesskontrolle ist eine robuste Möglichkeit der Zellzählung (Protoplasten/Miniprotoplasten), damit eine Vergleichbarkeit zum Referenzprozess möglich ist. Im Berichtszeitraum wurde diesbezüglich von beiden Projektpartnern der automatische Zellzähler Fluidlab300 (Anvajo) evaluiert, der durch die Kombination von spektrometrischen und mikroskopischen Messungen eine automatische und färbungsfreie Zellzählung verspricht. Seitens LenioBio wurden, auf Prozessebene der Miniprotoplasten, in mehrfachen Durchgängen und unterschiedlichen Verdünnungen manuelle mit automatisierten Zellzählungen verglichen, eine Korrelation bzw. ein gleicher Trend der relativen Zellzahlen (Zellen/mL) zwischen den Zählmethoden manuell/automatisch beobachtet (Abbildung 6) und der Nutzen des Gerätes während der Produktion von zellfreiem Lysat bestätigt. Die Anschaffung des Fluidlab300 (3015 Euro) ersetzt nun die manuelle Zellzählung von Protoplasten und Miniprotoplasten im Lysatherstellungsprozess.

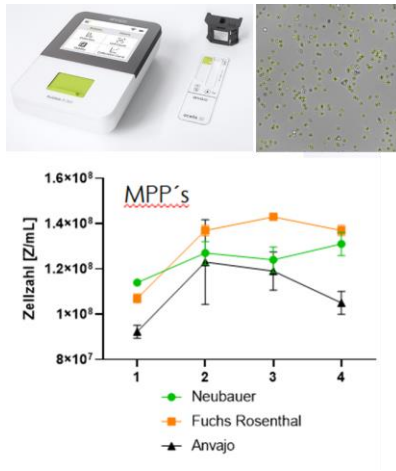


Abbildung 6 Vergleichende Zählung von Miniprotoplasten (= Zellen ohne Vakuole; Produkt des Evakuierungsprozessschrittes). Die Anzahl der Miniprotoplasten während des Herstellungsprozesses für Zell-freies Lysat wurde manuell in der Neubauer und Fuchs-Rosenthal Kammer, sowie automatisch mit dem Fluidlab300 bestimmt.

2. Arbeitspaket 2 – Vergrößerte Lysatpräparation

2.1. Aufschluss der Miniprotoplasten

Während der Lysatherstellung stellt die Homogenisierung der Miniprotoplasten einen kritischen Prozessschritt dar. Ein effizienter Aufschluss der Zellen, der zugleich die Zellorganellen schont und intakt lässt wird dabei angestrebt. Bei der Ermittlung geeigneter Aufschlussmethoden, die bis zum industriellen Prozessmaßstab skalierbar sind, wurden verschiedenste Ansätze evaluiert (Tabelle 4). Methoden wie French Press und Einfrieren/Auftauen erzielten keinen effizienten homogenen Aufschluss der Miniprotoplasten und ließen zu viele intakte Zellen zurück. Ultraschallaufschluss resultierte in nicht aktivem Lysat. Mit den zur Skalierung angedachten kommerziellen Homogenisatoren konnte ebenfalls kein aktives Lysat hergestellt werden, da bei deren Betrieb sehr hohe Drücke herrschen, welche die Zellorganellen zerstören. Erfolgsversprechende Qualität der Lysate lieferte das Vortexen der Miniprotoplasten und der spritzenvermittelte Aufschluss (**Error! Reference source not found.**).

Tabelle 4 Untersuchung von Miniprotoplast Aufschlussmethoden.

Methode	Gerät	Scherkraft	Skalierbarkeit	Kommerzielles Gerät
Scherkraft	Potter (tissue grinder)	Gering	Nein	Ja
Scherkraft/Turbulenzen	Vortex	Gering	Nein	Nein
Druckentlastung	Kanüle/Spritze	Gering	Nein	Nein
Druckentlastung	Homogenisator/Microfluidizer	Sehr hoch	Ja	Ja
Scherkraft/Turbulenzen	Mixer	Gering	Ja	Ja
Einfrieren/Auftauen	Gefrierschrank/Stickstoff	Gering	Nein	Ja

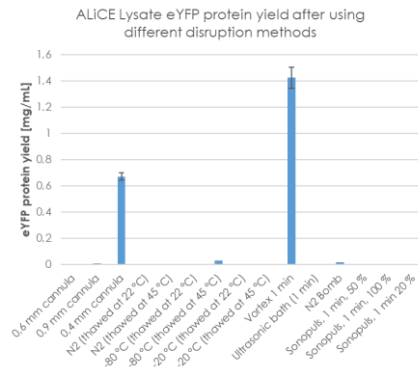


Abbildung 7 Untersuchung von Miniprotoplast-Aufschlussmethoden. Nur das Vortexen und der spritzenvermittelte (Cannula) Aufschluss resultierten in aktivem Lysat.

Mit Blick auf die Skalierbarkeit der Aufschlussmethode sowie Qualifizierungs/Validierungs - Möglichkeiten bei kommerziellen Geräten wurde für den Maßstabsvergrößerten Lysatprozess ein „High shear“ Mixer für den Zellaufschluss verwendet. Die damit hergestellten Lysate erzielten, vergleichbar zum Referenzmaßstab, bis zu 3 g/L des Referenzproteins eYFP und waren auch für mikrosomale Referenzproteine (GOx; bis zu 140 µg/mL) geeignet.

2.2. Sterile Produktion von Lysat

Bei einigen im Labormaßstab hergestellten Lysaten wurde im Verlauf der zellfreien Reaktion zur Ermittlung der Lysatqualität ein starkes bakterielles Wachstum beobachtet, welches sich sehr negativ auf die Proteinproduktion auswirkte. Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen während des Herstellungsprozesses wurde dieser auf einen semi-sterilen Prozess umgestellt. Neben einer verstärkten Personalhygiene (Kittel, Handschuhe, Haarnetz, Mundschutz) wurde mit der Implementierung von sterilisierten Gefäßen, sterilen Prozesslösungen/ -komponenten, sowie Zugangsbeschränkungen zu den Räumlichkeiten während des Herstellungsprozesses, die Produktionshygiene erhöht.

2.3 Umsetzbarkeitsanalyse für die 1 L Lysatherstellung

Unter Anwendung aller Prozessentwicklungen zur Skalierung des Herstellungsprozesses (Protoplastierung in der Fermenterbrühe (Bericht Projektpartner IME), Evakuierung und Homogenisation) wurden, in vier Durchläufen, je 630mL, 940mL und 930mL und 1150mL funktionales

Lysat hergestellt (Tabelle). Evaluiert durch beide Projektpartner erreichten diese Lysate zwischen 2.7 und 3g/L des Referenzproteins eYFP und bis zu 140 µg/mL des mikrosomalen Referenzproteins GOx.

Tabelle 5 Vergleich prozessrelevanter Volumina bei der Herstellung von 1 L zellfreiem Lysat.

	Startkultur	Proto-plasten	Mini-protoplasten	Lysat	Lysatqualität	Lysatqualität
	[L/PCV %]	[mL]	[mL]	[mL]	[g/L eYFP]	[µg/mL GOx]
Referenz-prozess	6L/17%	720	35-45	120	3 +/- 10%	50-80
1. 1 L Prozess	50L/10%*	4,6	180	624	2,7	90
2. 1 L Prozess	50L/20%	4,6	195	940	2,8	140
3. 1 L Prozess	50L/19%	6,9	230	930	3	74
4. 1 L Prozess	50L/17%	6,3	285	1150	Keine Daten	Keine Daten

2.4 Umsetzbarkeitsanalyse für die 10 L Lysatherstellung

Die zur Lysatherstellung nötigen Prozessschritte konnten durch Parallelisierung auf 10 L skaliert werden. Bedingt durch die räumlichen Gegebenheiten am derzeitigen Standort des LenioBio Technology & Innovation Centre im Fraunhofer IME Gebäude konnte am Beispiel des Prozessschrittes Evakuolierung für ein Zielvolumen von 10 L dies durch mehrere sequenzielle Zentrifugationsläufe in 2-3 parallelen Beckman Zentrifugen (je 6x 1 L) erreicht werden. Eine vergleichende Übersicht zur Herstellung von 1 L bzw. 10 L Lysat ist in Tabelle gegeben.

Tabelle 6 Schätzung des Arbeitsaufwands bei der Skalierung der Lysatherstellung im 10 L Maßstab, ausgehend vom 1 L Maßstab. STR, Rührkesselreaktor (stirred tank reactor). PCC, Pflanzenzellkultur (plant cell culture). PP, Protoplasten. Mega Zentrifuge, Fa. Beckman, 6x 1 L Fassungsvermögen.

Prozessschritt	1L Lysat Batch Prozess			10L Lysat Batch Prozess		
	Ausrüstung	Volumen	Wdh/Zeit	Ausrüstung	Volumen	Wdh/Zeit
		[L]			[L]	
PCC	STR	50	1x/3,5 Tage	STR	350	1x/3,5 Tage
Verdau	STR	60	1x/2h	STR	380	1x/2h
PP Sedimentation	-	-	-	-	190	1x/20min
PP Konzentration	3 x Mega Zentrifuge	60	5x/1h	3 x Mega Zentrifuge	190	15/2,5h
Evacuolation	3 x Mega Zentrifuge	7-8	1x/1h	3 x Mega Zentrifuge	49-56	3x 3h
Waschen	3 x Mega Zentrifuge	1-2	1x/0,5h	3 x Mega Zentrifuge	7-14	1-2x/0,5-1h
Aufschluss	High shear Mixer	1-2	1x/1h	High shear Mixer	7-14	1x/1h
Klärung	1 x Mega Zentrifuge	1,2	1x /0,3h	1 x Mega Zentrifuge	10	1x/0,3h

3. Arbeitspaket 3 – Entwicklung eines Bioreaktorprozesses

Ein wichtiges technologisches Ziel der LenioBio GmbH ist es, die Skalierbarkeit der zellfreien Proteinexpression sowohl vertikal (vom Mikroliter bis 100-L-Maßstab) als auch horizontal (Anwendung möglicher unterschiedlicher Reaktorsysteme pro Größenordnung Reaktionsvolumen) abzubilden. Abbildung verdeutlicht die beiden Arten der Skalierung. Die maximale Sauerstofftransferrate eines Bioreaktorsystems wurde als geeignetes primäres Scale-Up Kriterium identifiziert. Die Sauerstofftransferrate des Systems bei den gewählten Betriebsbedingungen sollte nicht unter ~20 mmol/L/h liegen. Das ThinkBIG-Projekt adressiert konkret die vertikale Skalierbarkeit von 1 L bis 10 L,

sowie die horizontale Skalierbarkeit mit Rollerflaschen, 2D-Waveback CT20 (Fa Celltainer) und DasGip (Fa Eppendorf).

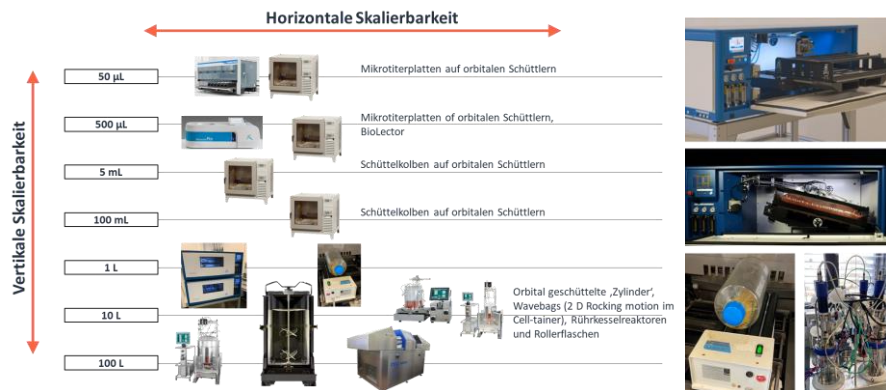


Abbildung 8 Horizontale und vertikale Skalierbarkeit der ALiCE Technologie für die Proteinexpression. Die vertikale Skalierbarkeit erstreckt sich über Reaktionsvolumina in mehreren Größenordnungen (gezeigt im Bereich 50 µL bis 100 L). Die horizontale Skalierbarkeit bezieht sich auf die Anwendbarkeit verschiedener Bioreaktorsysteme pro Größenordnung Reaktionsvolumen. Das ThinkBIG Projekt adressierte die vertikale Skalierbarkeit bis zum 10 L Liter-Bereich und in diesem eine horizontale Skalierbarkeit über Rollerflaschen, 2D-Wavebag- und Rührkessel-Bioreaktorsysteme.

3.1 Vergleich geeigneter, kommerzielle Bioreaktorsysteme

Tabelle 7 gibt eine Übersicht kommerziell erhältlicher Bioreaktorsysteme, welche zur Anwendung der vergrößerten zellfreien Reaktion geeignet sind. Für die Nutzung im ThinkBIG-Projekt wurden der klassische Rührkesselreaktor (System DasGip, Fa. Eppendorf) und Rollerflaschen zur Verwendung beim Projektpartner FhG-IME sowie eine weiterentwickelte Variante des Wavebagsystems (System CT20, Fa. Celltainer) zur Verwendung bei LenioBio ausgewählt. Das Wavebagsystem erreicht laut Hersteller einen ausreichend hohen Sauerstofftransfer ($k_L a$ -Werte von bis zu 500 h^{-1}) für die nötigen Reaktionsvolumina. Zum Vergleich können im Biostat RM Wavebag System laut Hersteller lediglich $k_L a$ -Werte von bis zu ca. 15 h^{-1} erzielt werden. Damit konnte ein ausreichend hoher Sauerstoffeintrag in die Lysatreaktion in letzterem System nicht gewährleistet werden. Ein weiterer Vorteil des CT20 Systems ist die Möglichkeit, Reaktionsvolumina von ca. 300 mL bis 10 L in einem Gerät zu realisieren. Zudem wird dazu lediglich ein Typ steriler Einwegbeutel benötigt.

Tabelle 7 Vergleich kommerzieller Bioreaktorsysteme für die zellfreie Proteinexpression im Liter-Maßstab

System (Hersteller)	DasGip (Eppendorf)	SB10-X (Kuhner)	Biostat RM (Sartorius)	CT20 (Celltainer)	Rollerflaschen
Reaktortyp	Rührkessel	Geschüttelter Zylinder	Wavebag	2D- Wavebag	Rolle
Reaktionsvolumina	200 – 10 L	Bis ~ 3 L realisierbar	1-100 L	~100 mL bis 17 L in einer Baggröße	10-100 ml
Sauerstoffeintrag	Submers	Oberflächenbegasung	Oberflächenbegasung	Oberflächenbegasung	Oberflächenbegasung
Leistungseintrag	Rührer	Orbitales Schütteln	Schaukel-bewegung	2D- Schaukelbewegung	Rollbewegung
Relevante Parameter	Submers-Begasungsrate, Rührgeschwindigkeit, Anzahl/Art Rührorgane	Zuluftbegasungsrate, Schüttelfrequenz	Zuluftbegasungsrate, Schaukelfrequenz, Auslenkungswinkel	Zuluftbegasungsrate, Schaukelfrequenz, Auslenkungswinkel	Keine
Bemerkungen	Bioreaktoren als Mehrweg- oder Einwegartikel verfügbar. Weit verbreiteter Reaktortyp.	Maschinenversion bis 2500L Reaktionsvolumen verfügbar	Geringe Scherbelastung im Reaktionsraum	Nur ein Typ von Einwegbeuteln für alle Reaktionsvolumina notwendig, erreicht $k_L a$ -Werte bis 500 1/h; Skalierung bis 200 L möglich	Parallelisierung möglich Industrielle Skalierung nicht möglich
	Schaumneigung bedingt durch Blasenbegasung sehr hoch.				Gasaustausch nicht optimal für die Proteinproduktion

3.2 Experimentelle Evaluierung CT20 (Fa. Celltainer)

Im Rahmen einer Teststellung wurde der CT20 auf die Eignung zur Anwendung im ThinkBIG Projekt experimentell bewertet. Die Verwendung nur eines Typs Reaktionsbeutel fiel dabei als besonders positiv auf. Um kleinere Reaktionsvolumina von mehreren hundert Millilitern zu ermöglichen, wird ein Teil des Beutels mit Plastikteilen abgesperrt. Dadurch entsteht ein länglicher Reaktionsraum, indem sich das Lysat entlangbewegt (Abbildung).

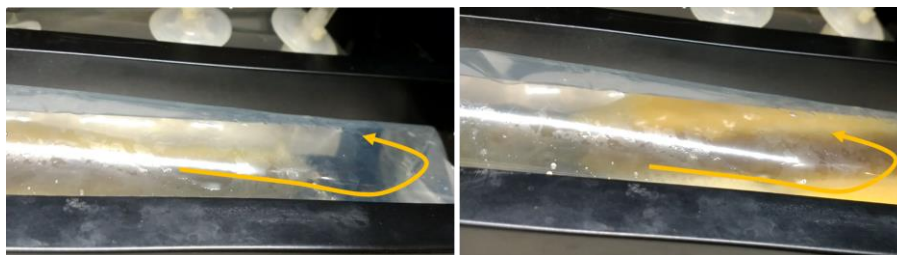


Abbildung 9 In Bewegung befindliches Lysat im CT20, gezeigt anhand zweier Screenshots aus einem Video. Die orangenen Pfeile deuten die Bewegungsrichtung des Lysats an. Linke Abbildung: Lysate in der Bewegung auf den rechten Rand zu. Rechtes Bild: Lysat in der teilweisen Umkehrbewegung.

Beim ALiCE® System handelt es sich um eine hoch konzentrierte Protein-haltige Lösung, die zur kontinuierlichen Versorgung mit molekular gelöstem Sauerstoff aus einer angrenzenden Gasphase, mechanisch durchmischt werden muss. Daher kommt es im Laufe der zellfreien Proteinproduktionsreaktion zu einer unvermeidlichen Schaumbildung. Somit ist die Neigung des Reaktorsystems zur Schaumbildung über den Verlauf der zellfreien Proteinproduktion ein relevanter Prozessparameter. Entsprechende Bewertung erfolgte qualitativ anhand von Fotografien des transparenten Reaktionsbeutels nach Ende der Lysatreaktion (Abbildung 10).

Durch die Oberflächenbegasung bei Umgebungsdruck wurde die Neigung zur Schaumbildung im CT20 als nicht kritisch eingestuft. Beobachtungen des Flüssigkeitsbewegung während der Reaktion haben

ergeben, dass der entstandene Schaum sich aufgrund des wechselnden Flüssigkeitsumlaufs, stets in der Mitte des Reaktorraums sammelt.

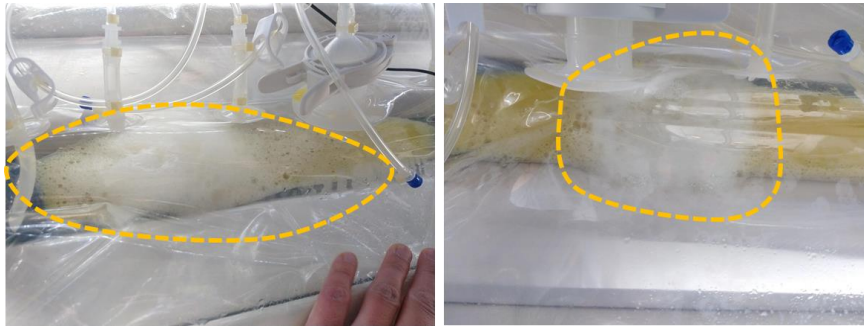


Abbildung 1 Schaumbildung nach abgeschlossener zellfreier Proteinexpression im CT20. Der während der Reaktion entstandene Schaum konzentriert sich in der Mitte der Reaktionsflüssigkeit. Das periodische Umwerfen der Flüssigkeit durch die 2-D Rocking Bewegung des CT20 befördert den Schaum immer wieder in die Mitte.

3.3 Abgasanalytik

Zur Abgasanalytik als Parameter der Prozesskontrolle wurde der BlueVary Offgas-Analysator (Fa. BlueSense) gewählt. Dieses System vereinfacht die Prozessoptimierung und ermöglicht kontinuierliche Online-Überwachung des Lysatreaktionsprozesses. Durch multiple Einsteckplätze für je nach Anwendung wählbare Sensorkartuschen ermöglicht das System die Messung zweier verschiedener Gase gleichzeitig. Zudem ist ein weiterer Steckplatz für eine Druck- und/oder Feuchtsensorpatrone vorhanden. Das Analysesystem ermöglicht die Identifizierung von Stoffwechselphänomenen und generiert wesentliche Prozessparameter. Zudem ist der BlueVary vom Labor- bis zum Industriemaßstab einsetzbar. Mit der zusätzlichen Möglichkeit der Abgasanalytik standen weitere online verfügbare Daten zur Echtzeit-Beurteilung der Lysatreaktion zur Verfügung.

3.4 Proteinexpression im CT20

Als Vorversuch wurde die eYFP Proteinexpression im CT20 mit einem Reaktionsvolumen von ~300 mL, im Vergleich mit einer parallelen Kontrollreaktion im 50 µL-Maßstab untersucht. Die Daten zeigten, dass das CT20 System generell für eine Proteinexpression im vergrößerten Maßstab geeignet ist. Mit der Möglichkeit online Daten aus der Lysatreaktion und dem Abgasstrom zu erfassen, konnte das dynamische Verhalten diverser Variablen, die mit der Proteinexpression indirekt verbunden sind, erfasst werden.

4 Arbeitspaket 4 – Plasmidpräparation

Das Design der Plasmid Konstrukte sowie die Präparation der Plasmide für dieses Projekt lag überwiegend im Aufgabenbereich des FhG IME.

Als vorbereitende Arbeiten zur Expression von humanem epidermalem Wachstumsfaktor (hEGF) wurden jedoch von LenioBio entsprechende Expressionsplasmide entworfen (mikrosomale vs. cytosolische Expression¹, N- vs C-terminaler Strep-tag, Abbildung 21).

¹ Die cytosomale Expression umfasst Transkription und Translation, während die mikrosomale Expression den zusätzlichen Schritt der Translokation in die Mikrosomen. Hier finden die post-translationalen Modifikationen an den neu translatierten Proteinen statt, z.B. Glykosylierung. Damit Protein zu den Mikrosomen translokiert werden, ist die Fusion mit einem Signalpeptid notwendig, im pALICE02 Vektor wird das Melletin Signalpeptid (MSP) verwendet.

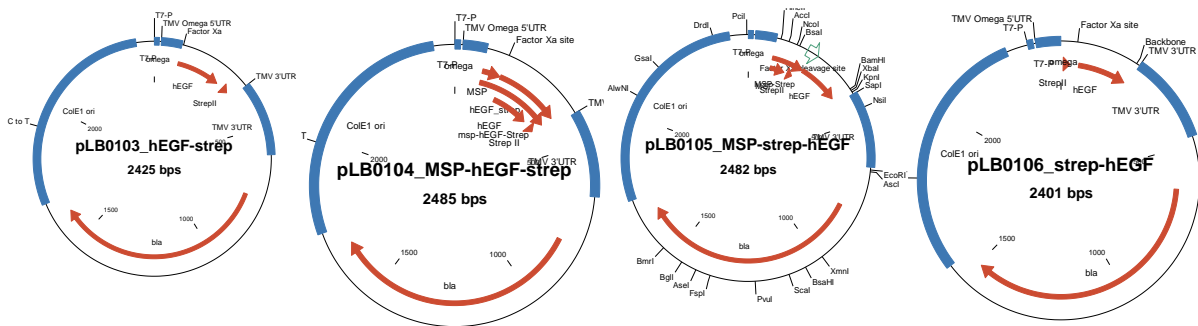


Abbildung 21 Übersicht über die konstruierten hEGF-Expressionsplasmide.

In entsprechenden Testproteinexpressionen durch LenioBio zeigte sich das Plasmid pLB0104 am besten geeignet (mikrosomale Expression, N-terminaler Strep-tag). Dass es sich bei dem exprimierten Protein tatsächlich um das Zielprotein handelt, konnte über Peptid-Mass-Fingerprinting bestätigt werden. Daher wurde das Plasmid pLB0104 für alle weiteren Expressionen verwendet.

Im Rahmen der Maßstabsvergrößerung wurden größere Plasmidmengen benötigt die teilweise durch dritt Anbieter Services (Twist, PlasmidFactory), als auch durch hauseigene Plasmidpräparation mit Hilfe von Giga-Prep kits der Firma Macherey & Nagel hergestellt wurden.

5 Arbeitspaket 5 – Vergrößerte zellfreie Reaktion

Für die beiden Referenzproteine eYFP (für cytosolische Expression) und Glucoseoxidase (GOx, für mikrosomale Expression) wurde die Proteinproduktion von 50 µL, 500 µL, 5ml, und 1000 ml gezeigt (**Error! Reference source not found.**).

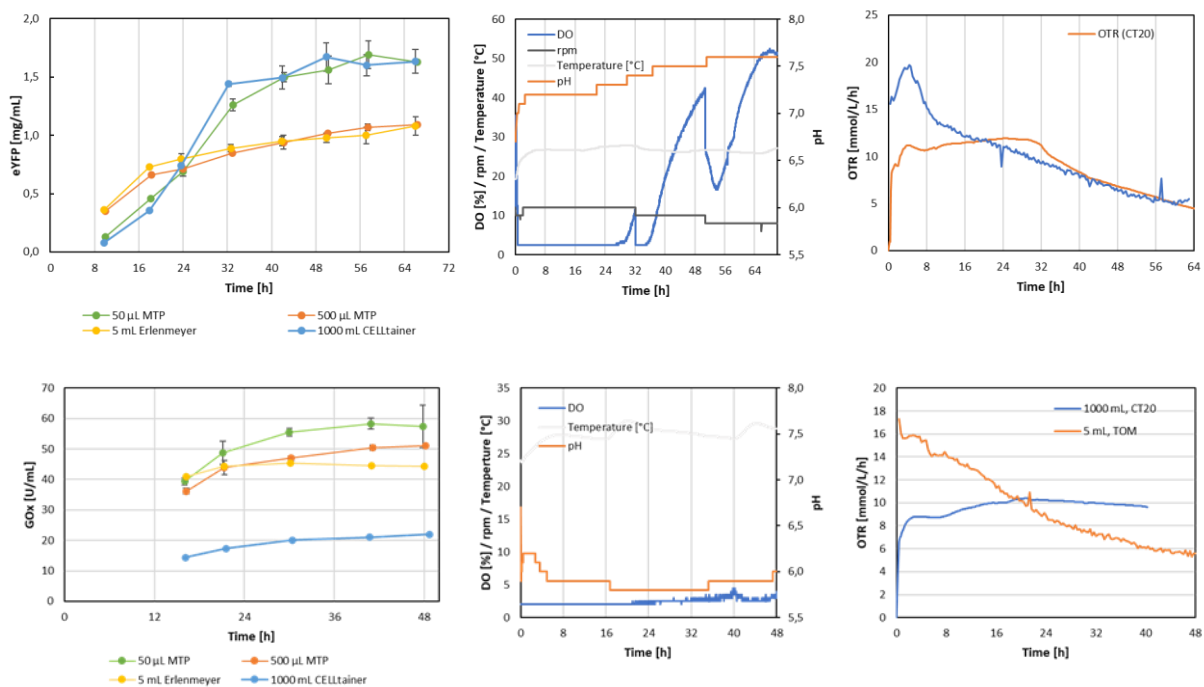


Abbildung 12 Oben: Expression des cytosolischen Referenzproteins eYFP in Reaktionsvolumina von 50 µL bis 1000 mL. LYCCE31XXR (nicht kommerzielle Lysat Spezifikation). Bedingungen CELLtainer CT-20, V = 1000 mL, 25 °C, Mittelposition, kleine Einsätze, anfänglich 12 rpm. Plasmid pLB0001, 5 ng/µL, Standard Mastermix Komposition, T7 = 0.2 % LBT7005, Begasungsrate 300 mL/min.

Unten: Expression des mikrosomalen Referenzproteins Glucoseoxidase (GOx) in Reaktionsvolumina von 50 µL bis 1000 mL. Lysate LYCCCE61XXR (nicht kommerzielle Spezifikation). Bedingungen CELLtainer CT-20, V = 1000 mL, 25 °C, Mittelposition, kleine Einsätze, 10 rpm. Plasmid pLB0077, 5 ng/µL, Standard Mastermix Komposition, T7 = 0.2 % LBT7005, Begasungsrate 300 mL/min.

Auf Basis dieser Datenlage konnte angenommen werden, dass eine Sauerstofflimitierte Lysatreaktion vorteilhaft für die eYFP Proteinexpression ist. Dabei kann festgehalten werden, dass die online erhobenen Daten aus der Lysatreaktion selbst und dem Abgasstrom wertvolle Indikatoren für den Prozessverlauf sind. Um diese allerdings mit der Expression eines Zielproteins zu korrelieren, um eine gezielte Prozesskontrolle zu ermöglichen, sind noch umfangreiche Datensätze zu generieren.

Die Expression der GOx zeigt in allen Arbeitsvolumina eine vergleichbare Sauerstoffsättigungsdynamik, während die jeweiligen Amplituden unterschiedlich sind. Der 1-L-Maßstab erreicht dabei lediglich ca. 1/3 der Werte der anderen Reaktionen. Ebenfalls unterscheiden sich die Atmungsraten aus dem 1-L und 5-mL Maßstab in qualitativer Hinsicht. Zu bemerken ist, dass die 1-L Reaktion an einem Sommertag stattgefunden hat und die Kühlkapazität des getesteten CT20-Geräts nicht ausgereicht hat. Dies ist deutlich im aufgezeichneten Temperaturverlauf sichtbar (**Error! Reference source not found.** unten rechts). Die Reaktionstemperatur (und damit die der parallelen Vergleichsreaktionen) sollte bei 25 °C liegen. Die Temperaturkurve ist jedoch auf c.a. 30 °C angestiegen. Aus diesem Grund wurde, der CT20 für die Anwendung der zellfreien Lysat Reaktion mit zusätzlicher Kühlkapazität ausgestattet.

Um Betriebsfenster der Parameter (Volumen, Rocking Frequenz, Anstellwinkel) beim Betrieb des CT20 zu erfassen, wurde das Sulfitoxidationssystem integriert. Dabei handelt es sich um eine Sulfithaltige gepufferte Lösung, die eine Sauerstoffsénke darstellt. In Verbindung mit dem BlueVary-Abgasanalysator wurde der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die maximale Sauerstofftransferrate quantitativ erfasst, um entsprechende Kennliniendiagramme aufzunehmen. Aus den mit dem Sulfitoxidationssystem aufgenommenen Kerndiagrammen liessen sich die in Tabelle 8 Optimalen Betriebsparameter für den Betrieb des CT20 bei 1 L und 10 L Reaktionsvolumen. Tabelle aufgeführten Betriebsparameter für die geplanten Reaktionen von 1L und 10 L Reaktionsvolumen schließen.

Tabelle 8 Optimale Betriebsparameter für den Betrieb des CT20 bei 1 L und 10 L Reaktionsvolumen.

Reaktionsvolumen [L]	Schüttelfrequenz [rpm]	Schwenkwinkel [°]	OTR [mmol/L/h]	Expansionskanäle
1	18-20	17-10,2	16,7-20	2-4
10	20-30	17	20	

6 Arbeitspaket 6 – Produkt- und Prozessevaluierung

LenioBio GmbH fokussierte sich auf die Produktion und Charakterisierung des humanen epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF). Siehe Bericht des FhG IME zur Produktion der Zielproteine Antimalaria-Immunotoxins und des technischen Enzyms Enterokinase.

6.1 Zielprotein – Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)

Bei dem Zielprotein humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF, Abbildung 13) handelt es sich um ein Molekül, das sowohl in der Kosmetikindustrie als auch in pharmazeutischen Therapiegebieten Anwendung findet. Die Klasse der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFs) wurde als erstes im Jahre 1962 von Cohen *et al.* beschrieben, nachdem sie entdeckten, dass die Injektion von Extrakten aus der

Speicheldrüse einer Maus, in neugeborene Mäuse ein frühzeitiges Öffnen der Augen, sowie vorzeitiges Zahnwachstum bewirkte. Dieser Wachstumsfaktor stimuliert vor allem das Zellwachstum sowie die Zellproliferation und -Differenzierung. Die primäre Rolle des EGF ist die Stimulation von Epithelzellen im Bereich von verwundetem Gewebe, damit die Wunde sich schließt. Des Weiteren hat es auch Funktionen in Fibroblasten, sowie in glatten Muskelzellen. Es wurde gezeigt, dass EGF die epidermale Regeneration von Fleisch-/Hautverletzungen bei Schweinen signifikant beschleunigt². Ebenso hat man bei Ratten beobachtet, dass Wundgewebe, welches für längere Zeit EGF ausgesetzt wurde, eine erhöhte Zugfestigkeit aufweist. **Error! Bookmark not defined..** Aufgrund der heilungsfördernden Eigenschaften, findet hEGF in der Medizin eine weite Anwendung, beispielsweise in der Behandlung von durch Diabetes bedingten chronischen Wunden und in der Krebstherapie.

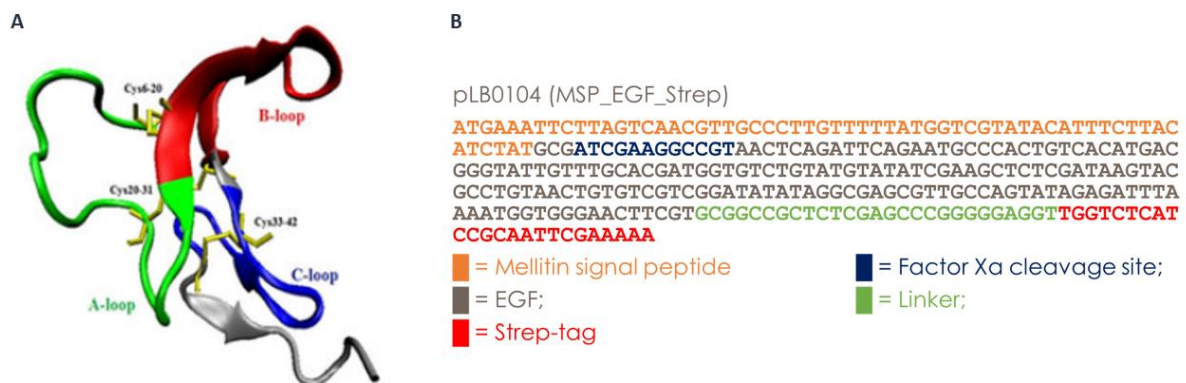


Abbildung 13 A: 3D Bändermodell der Tertiärstruktur von hEGF.

Quelle: Mehrabi *et al.* 2017 *Development of a human epidermal growth factor derivative with EGFR-blocking and depleted biological activities A comparative in vitro study using EGFR-positive breast cancer cells.* DOI: 103(2):275-285

B: hEGF Sequenz und flankierende Regionen. Mellitin Signalpeptide zur Generierung der Disulfidbindungen in den Mikrosomen, Strep-tag zur Aufreinigung des Proteins.

Humanes EGF ist ein relativ kleines Molekül, das aus 53 Aminosäuren besteht und über drei Disulfidbindungen verfügt^{3,4}. Es wird in Blutplättchen, Makrophagen und Monozyten gebildet. **Error! Bookmark not defined..** Genaugenommen wird zunächst eine Vorstufe gebildet, welche nach extrazellulärer Stimulation durch proteolytische Enzyme in EGF umgewandelt wird, das nun an einen entsprechenden Rezeptor, dem EGF-Rezeptor (EGF-R) binden kann. Der Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche von epidermalen Zellen sowie Fibroblasten. **Error! Bookmark not defined..**

Die entwickelte zellfreie Proteinproduktionsplattform erlaubt es, Proteine zu produzieren, die posttranslationale Modifikationen benötigen, um funktionell zu sein. Diese Proteine werden in den sogenannten Mikrosomen produziert, in denen Disulfidbindungen aufgebaut werden und Proteine glykosyliert werden. Mittels eines Signalpeptides – in AliCE das Mellitin Signalpeptid – wird die Proteinproduktion zu den Mikrosomen geleitet. Da hEGF drei Disulfidbindungen enthält, wurde ein

² Lillian B. Nanney, Epidermal and Dermal Effects of Epidermal Growth Factor During Wound Repair, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 94, Issue 5, 1990, Pages 624-629, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12876204>

³ Langhans, S.A. (2018). Epidermal Growth Factor (EGF). In: Choi, S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101919

⁴ Hong, Joon Pio MD, PhD; Jung, Heun Don MS; Kim, Yun Wha MS. Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF) to Enhance Healing for Diabetic Foot Ulcers. *Annals of Plastic Surgery* 56(4):p 394-398, April 2006. | DOI: 10.1097/01.sap.0000198731.12407.0c

entsprechendes Genkonstrukt generiert und als Plasmid (pLB0104) für die Proteinproduktion im BY-2-Lysat eingesetzt.

Im Rahmen der Testexpression und Analyse der Qualität des Zielproteins hEGF und zur Verifizierung des Expressionsplasmids wurde eine Testaufreinigung mittels 1-Schritt Affinitätschromatographie über den Strep-tag durchgeführt, um reines Probenmaterial zur Peptidmassenfingerprint (PMF)-Analyse zu erhalten (Abbildung 14). Neben der PMF-Analyse wurde auch die Aktivität des hEGF anhand dieser Proben im Vergleich mit kommerziell erhältlichem Material überprüft und verifiziert.

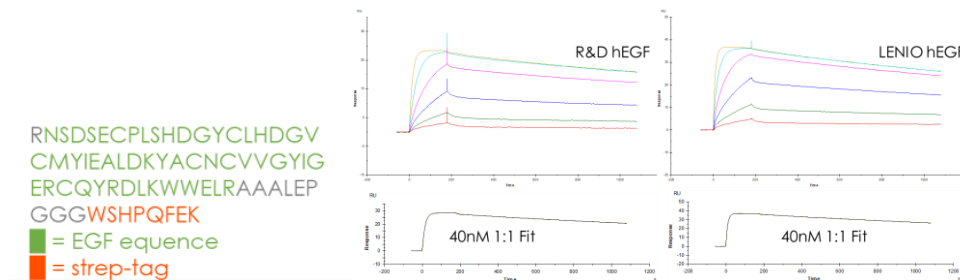


Abbildung 4 Links: Peptidmassenfingerprint des im BY-2-Lysat hergestellten hEGF. Die Massenbestimmung erfolgte im Linearmodus mittels MALDI-TOF-MS im Bereich 2000-20000 m/z. Die Messgenauigkeit liegt bei ca. +/- 1000 ppm. Neben dem Monomer wurde auch das Dimer detektiert.

Rechts: Funktionalitätsanalyse des produzierten hEGF im Vergleich mit einer kommerziell erhältlichen Probe (R&D Systems) anhand der Bindekapazitätsmessung mittels Biacore Interaktions-Analyse (SPR). Ein CM5Chip wurde mit ProteinA funktionalisiert, um die Bindung der extrazellulären Domäne des humanen EGF-Rezeptors fusioniert zur humanen Antikörper Fc-Domäne zu ermöglichen. Die Bindung des Liganden hEGF (LenioBio) und der kommerziell erhältlichen Probe konnte damit durchgeführt werden.

Die Aktivität des produzierten und aufgereinigten hEGF wurde im Vergleich mit einer kommerziell erhältlichen Variante durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance spectroscopy, SPR) erfolgreich nachgewiesen (Abbildung 4 rechts). Die entsprechende Analyse wurde vom Projektpartner FhG IME durchgeführt. Ausgehend davon, dass die aktiven Konzentrationen vergleichbar sind, ist das LenioBio-hEGF bei der Gesamt-Bindungsaktivität etwas besser als das kommerziell erhältliche hEGF – KD 129 vs 169. Dies mag auf eine schnellere K_a zurückzuführen sein.

6.2 Skalierung: Prozessentwicklung der Produktion, Aufreinigung und Charakterisierung des hEGF

Die 1L und 10 L hEGF Proteinproduktionen wurden im Cell-tainer CT-20. Abbildungen 15 und 16 zeigen exemplarisch einen 1 L und 10 L Produktionsansatz.



Abbildung 15 1 L hEGF Produktion im Cell-tainer. A: 1 L Lysat; B, C: Cell-tainer; D: Konzentriertes hEGF nach der Lyse der Mikrosomen.



Abbildung 16 10 L hEGF Produktion im Cell-tainer. A: 10 L Lysat; B: Lysatkomplementierung (Zugabe des hEGF Plasmids); C: hEGF Produktion im 10 L Cell-tainer Maßstab; D: Fermentationsprofil; OTR dunkelblau, DO orange, pH hellblau, Temperatur gelb.

Die Sauerstofftransferraten (OTR dunkelblau) und die Werte für den gelösten Sauerstoff (DO orange) (Abbildung 16D) im 10 L Proteinproduktionsansatz zeigen, dass das Lysat über den Zeitraum der Proteinproduktion von 48 Stunden den eingetragenen Sauerstoff konstant verbrauchte (Aktivität der Mitochondrien). Der stufenartige Verlauf der OTR-Kurve lässt sich dadurch erklären, dass während der Reaktion die Schüttelrate angepasst wurde, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und exzessive Schaumbildung, sowie starker Scherkräfte zu vermeiden. Der flache Verlauf der pH Kurve ist ebenfalls positiv zu deuten, dies zeigt, dass keine Kontamination vorhanden ist, die basische oder saure Stoffwechselprodukte ausschüttet. Die Temperaturkurve (gelb) zeigt nach wie vor einen Anstieg auf 30°C an. Die derzeitige Kühleinheit am Gerät erlaubt zurzeit keine genauere Temperaturregulation. Diese Beobachtung wird in der weitere Prozessoptimierung berücksichtigt.

Zurzeit verfügt LenioBio nicht über die Möglichkeit, die 10 L Reaktion in einer Charge aufzureinigen. Deshalb wurde nur 1 L aufgereinigt und die weiteren Chargen bei -80°C gelagert. Nach der Aufreinigung über Strep-Tactin, Größenverteilung und Aufkonzentration wurde mittels verschiedener Methoden (BCA, UV Absorptionsmessung) die Konzentration ermittelt, um eine Abschätzung der Ausbeuten des Prozesses über alle Skalierungen zu ermöglichen (Tabelle 9). Die Entwicklung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur spezifischen Messung von hEGF im Lysat und/oder nach der Aufreinigung konnte leider im Zeitrahmen des Projektes noch nicht etabliert und validiert werden.

Tabelle 9 Präsentiert die Ausbeuten der verschiedenen Proteinproduktions-Chargen ermittelt über UV Absorption Messung, sowie die finale Ausbeute in mg und die Ausbeute pro mL Lysat.

hEGF Chargenreferenz	Reaktionsvolumen	hEGF Konzentration [mg/mL]	Probenvolumen an aufgereinigtem hEGF [µL]	hEGF Ausbeute per ml Lysat* [µg/mL Lysat]
hEGF TB#02	10 ml	0,43	100	4,32
hEGF TB#03	10 ml	0,78	50	3,93
hEGF TB#04	10 ml	1,04	100	10,4
hEGF TB#05	100 ml	5,53	100	5,53
hEGF TB#06	100 ml	4,09	100	4,09
hEGF TB#07	100 ml	2,43	100	2,43
hEGF TB#08 mikrosomal	1 L	2,06	1200	2,47
hEGF TB#08 cytosolisch	1 L	3,39	3000	10,16
hEGF TB#08 kombiniert	1 L			12,63
hEGF TB#09 mikrosomal	10 L	0,711	1000	0,71
hEGF TB#09 cytosolisch	10 L	0,9082	1000	0,91
hEGF TB#09 kombiniert	10 L			1,62

*Im Zeitrahmen des Projektes war es leider nicht möglich, einen Prozess zu etablieren, der eine Quantifizierung der Proteinkonzentration im Lysat ermöglicht. Dadurch ist es zurzeit noch schwer möglich, die Proteinproduktionskapazitäten des Lysats zu bestimmen. Rückschlüsse werden immer noch über die aufgereinigten Proteinmengen getätigt. Der Verlust an Protein während der Aufreinigungsschritte kann dabei nicht berücksichtigt werden.

Zur Identifizierung von Monomeren und Oligomeren sowie zur Bestimmung der Stabilität von mit dem ALiCE System exprimierten Proteinen wurde das Prometheus Panta System angeschafft. Mit diesem System kann anhand von Backreflection, Dynamic light scattering (DLS) das Vorhandensein von Proteinaggregaten bestimmt werden. Zudem kann die Stabilität des Zielproteins mit Hilfe der Nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF) analysiert werden (Abbildung 17).

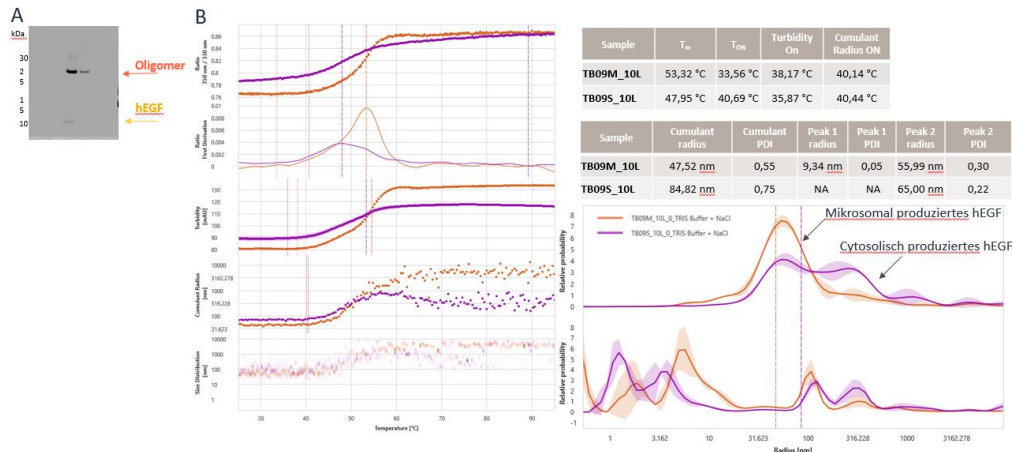


Abbildung 17 Analyse des hEGF mittels Prometheus Panta System. A: Detektion des aufgereinigten hEGF im Westernblot. B: Biochemische/Biophysikalische Charakterisierung des aufgereinigten hEGF sowohl von der cytosolischen als auch der mikrosomalen Fraktion.

Anhand der mit DLS generierten Daten lässt sich deutlich erkennen, dass das hEGF während der Aufreinigung aggregiert. Theoretisch hat hEGF einen Molekülradius von ca. 3 nm wenn es korrekt gefaltet ist, und einen Radius zwischen 30 und 35 nm in reduziertem Zustand (Keine Faltung, da Disulfidbrücken nicht ausgebildet sind.). DLS Analyse der im Rahmen des Think Big Projektes aufgereinigten Proben variiert zwischen 30 und 80 nm. Dies deutet darauf hin dass Stets die reduzierte (nicht korrekt gefaltete) Form des Proteins vorliegt und sich zudem Aggregate aus nicht gefaltetem Protein gebildet haben. Zudem bestätigt der polydispersitätsindex (PDI), die Anwesenheit von Aggregaten. Bei einem PDI Wert von bis zu 0,3 geht man von einer monodispersen Probe ohne Aggregaten aus. Ab einem PDI über 0,2 kann man von der Anwesenheit von Proteinaggregaten oder Oligomeren ausgehen. Zusätzlich lässt sich auch durch die mittels nanoDSF aufgenommenen Temperaturkurven bestätigen, dass bei einem Großteil der Chargen Aggregate aus ungefaltetem Protein vorlag. Die Kurven Zeigen nahezu alle einen flachen Verlauf mit wenig Steigung über den Temperaturverlauf hinweg. Die Trübung sowie das Tryptophan Fluoreszenzsignal (Ratio 350nm/330nm) sind von Anfang an hoch und steigt nicht mit Steigender Temperatur. Daher ist anzunehmen dass die Proteine bereits zu Anfang der nanoDSF Analyse nicht gefaltet waren.

Zusammenfassend konnte die hEGF Proteinproduktion von 50 µl auf 10 L im zellfreien BY-2-Lysat skaliert werden. Dies bedeutet eine 200.000 fache Skalierung. Das hEGF ist aktiv und bindet an seinen Rezeptor mit vergleichbarer Affinität wie ein kommerziell erhältliches Vergleichsprodukt. Leider war die Ausbeute insgesamt für das hEGF nicht sehr hoch was wahrscheinlich eher an den Auf Reinigungsprozessen als auf die Kapazität des Lysates zurückzuführen ist. LenioBio etabliert zurzeit Methoden, die eine Abschätzung der Proteinproduktions-effizienz im Lysat bestimmen kann. Mit der heutigen Erfahrung gehen wir davon aus, dass im Aufreinigungsprozess ungefähr 70% bis 90% der Proteinmenge verloren gehen. Unser Ziel ist es, 1 mg Protein aus unterschiedlichen Proteinklassen pro ml BY-2-Lysat zu produzieren. Für ein cytosolisches Referenzprotein wie eYFP liegt die Ausbeute bereits bei > 6 mg/ml. Für einen monoklonalen Antikörper wie Humira, welches in den Mikrosomen glycosyliert wird, bei 0,5 mg/ml.

LenioBio's CEO hat im April 2023 Takeda und Mitsubishi in Japan besucht, da sie sehr großes Interesse an hEGF haben, das im pflanzenbasierten BY-2-Lysat produziert wurde. Beide Firmen haben sich bereit erklärt, dass im ThinkBIG Projekt produzierte hEGF auf die Funktionalität in ihren Anwendungen zu testen.

Außerdem wird das EGF gerade auf Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf auf seine Funktionalität untersucht.

Tabelle 10 zeigt die Kosten für kommerziell erhältliches hEGF Forschungsmaterial. Die Kosten für das hEGF, das im Rahmen des ThinkBIG Projektes produziert wurde – ohne weitere Prozessoptimierungen und bei hohem Verlust in der Aufreinigung – liegt bei ungefähr 3400 €/mg in der Herstellung. Diese Analyse zeigt, dass die zellfreie Proteinproduktionsplattform sowohl für die Lysatherstellung als auch die Proteinproduktion erfolgreich skaliert werden konnte, die Kosten pro Milligramm aufgereinigtes Protein aber noch nicht wettbewerbsfähig sind. LenioBio ist dabei, die Kostenstruktur der Proteinproduktionsplattform weiter zu optimieren und zu modellieren. Die in der Zukunft zu erzeugenden Produkte müssen in den verschiedenen Märkten wettbewerbsfähig sein, um ein nachhaltiges Geschäft aufzubauen. Dabei liegt der Fokus besonders auf der Kostengestaltung (Geräte, Verbrauchsmaterialien, Personal, Prozesse, Allgemeinkosten) der zu verkaufenden Erzeugnisse (cost of goods sold CoGs). Zurzeit produziert LenioBio die auf dem Markt eingeführten Forschungskits mittels des 150 ml Laborprozesses, der als Ausgangspunkt für das ThinkBIG Projekt zur Verfügung stand. Mittelfristig will LenioBio die Plattform für Forschungsaspekte in größeren Volumina auf dem Markt platzieren. Langfristig wird aber die Herstellungserlaubnis für die Herstellung von Arzneimitteln angestrebt.

Tabelle 30 Preisliste für kommerziell erhältliches hEGF in Forschungsmaterial das als Standard für SDS-PAGE, Western Blot, ELISA oder als Medienzusatz verwendet wird.

Produkt	Hersteller	Expressionsorganismus	Aktivität	Preis per VE	Preis per mg
			[U/mg]	[€/VE mg]	[€]
hEGF	Active Bioscience	<i>E.coli</i>	$\geq 2 \times 10^5$	180 €/mg	180 €
rhEGF	Biomol	<i>E.coli</i>	1×10^7	679 €/100µg	~ 6790 €
rhEGF	Sigma Aldrich	<i>E.coli</i>	$\geq 1 \times 10^7$	407 €/500µg	~ 814 €
rhEGF	Sigma Aldrich	HEK 293	n/a	344 €/10µg	~34400 €
rhEGF	enquireBio	<i>E.coli</i>	1×10^7	352 €/1mg	352 €
rhEGF	Chemicon	<i>E.coli</i>	1×10^7	353 €/500µg	706 €
rhEGF	ScienCell	<i>E.coli</i>	1×10^7	316 \$/1mg	~286,97 €
rhEGF	Abcam	HEK 293	1×10^6	675 €/100µg	~6750 €
rhEGF	Gibco (Thermo)	<i>E.coli</i>	1×10^7	323 €/1mg	323 €
rhEGF	Invitrogen (Thermo)	<i>E.coli</i>	1×10^7	262 €/1mg	262 €
rhEGF	Abbeva	<i>E.coli</i>	n/a	475€/500µg	~950 €

7 Arbeitspaket 7 – Einhaltung industrieller Standards

Auf die Einhaltung industrieller und behördlicher Standards wird großen Wert gelegt, da die Herstellung pharmazeutischer Proteine für präklinische und klinische Studien den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis (GMP) unterliegt. Die Grundsätze für die pharmazeutische Entwicklung im Hinblick auf die behördlichen Erwartungen sind z. B. in ICH Q8 dargelegt. Das Grundprinzip ist, dass Qualität für ein Produkt konsequent sichergestellt wird, indem man das Produkt und den Prozess, mit dem es entwickelt und hergestellt wird, versteht und die mit der Herstellung des Produkts verbundenen Risiken kennt.

Während für Proteinprodukte, z. B. Antikörper, weltweit behördliche Standards zur Verfügung stehen, z. B. von der EMA und der FDA, muss der Herstellungsprozess der Lysatproduktion als neue Produktionsplattform in enger Zusammenarbeit mit den zuständigen Behörden erarbeitet werden.

Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen der zellfreien und der zellbasierten Herstellung von pharmazeutischen Produkten. Bei letzterem wird für jedes Produkt eine transgene Zelllinie erzeugt (z.B. CHO) und der gesamte Prozess der Zellkultivierung, Proteinreinigung und Qualitätskontrolle folgt den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis GMP.

PARADIGM SHIFT in biopharma manufacturing

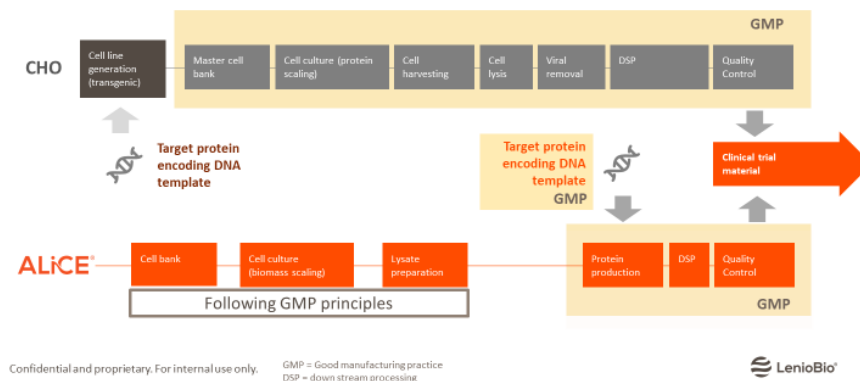


Abbildung 18 Vergleich der Herstellung von pharmazeutischen Proteinen mit dem zellfreien Expressionssystem ALiCE und einem CHO-basierten Produktionsprozess.

Das Lysat ist Zielprodukt-agnostisch, d. h. das Lysat kann für die Herstellung verschiedener Proteine verwendet werden. Da das zellfreie Lysate (ALiCE®) nicht Teil des medizinischen Endprodukts ist, kann es wahrscheinlich als ‚Rohmaterial‘ betrachtet werden. Sollten Bestandteile des Lysats im Endprodukt nachgewiesen werden, werden sie als Verunreinigungen eingestuft und müssen entfernt oder entsprechende Grenzwerte festgelegt werden.

Für die Proteinproduktion, also die Nutzung des zellfreien Systems zur Proteinexpression, gelten hingegen die gleichen Spezifikationen wie für zellbasierte Herstellungsverfahren. Von der Zugabe der für das Zielprotein kodierenden DNA über die Proteinproduktion bis hin zur Proteinreinigung und Qualitätskontrolle folgt die Produktherstellung in ALiCE den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis, wie sie in den behördlichen Richtlinien vorgeschrieben ist. Das Paul-Ehrlich-Institut hatte diese Vermutung bereits Anfang 2021 bestätigt (Abbildung).

Dear Dr. Frauenkron Machedjou,

thank you for your e-mail.

As your product, Alice, should possibly not be part of the final medicinal product, it is considered a "raw material".

Any residues of Alice in the product would be regulatory considered as "impurities".

I hope this information is helpful.

Kind regards
André Berger

Dr. André Berger
Medicinal Major Policy Issues /
Head of Innovation Office
--
Paul-Ehrlich-Institut
Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel
Federal Institute for Vaccines and Biomedicines
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen
Phone +49 6103 772 772
E-Mail Innovation@pei.de
>> www.pei.de

Das Paul-Ehrlich-Institut ist eine Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit.
The Paul-Ehrlich-Institut is an Agency of the German Federal Ministry of Health.



 Paul-Ehrlich-Institut 

Abbildung 19 Einschätzung des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) zur regulatorischen Bewertung von ALiCE.

Darüber hinaus steht LenioBio mit dem MHRA (britische Zulassungsbehörde) im Gespräch, um folgende Fragen zu beantworten:

Frage 1: LenioBio bittet um Einigung über die vorgeschlagene Definition der Ausgangsstoffe für Arzneimittel, die unter Verwendung des ALiCE-Lysates und der Proteinsequenzvorlage hergestellt werden?

Frage 2: Folglich bittet LenioBio um eine Einigung über den Punkt der Anwendbarkeit der GMP-Grundsätze und zweitens über den Punkt, an dem eine GMP-Zulassung für die Herstellung erforderlich ist.

Eines der Ziele von LenioBio ist es, im Jahr 2024 eine Klassifizierung der ALiCE-Plattform durch das deutsche Paul-Ehrlich-Institut, die englische MHRA, die europäische EMA und die amerikanische FDA zu erreichen. Zu diesem Zweck wird ein "CMC-Briefing-Paket" erstellt. LenioBio wird von Regulatory ExcelConsulting in England unterstützt.

Um die LenioBio Prozesse bereits behördenkonform zu dokumentieren und archivieren, hat LenioBio ein Qualitätsmanagement-Team etabliert, das sich auf die Prozessgestaltung und -prüfung der Lysatproduktion gemäß den aktuellen Industriestandards und GMP-Vorschriften konzentriert. Zu diesem Zweck wurden Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für alle Prozessschritte von der Zelllinienkultivierung über die Lysatproduktion bis hin zur Freigabe des Lysats für die Vermarktung des ALiCE-Kits oder die Eigenproduktion von Proteinen erstellt. Die SOPs, Masterdokumente und Arbeitsanweisungen befinden sich derzeit in der Validierung, werden regelmäßig genehmigt und freigegeben. Änderungen werden über eine Änderungsanforderung und Genehmigung (Change request) verfolgt. Darüber hinaus wird die Qualitätsmanagement-Software 'ConSense' für die Prozessdokumentation, Änderungskontrolle und Schulungen eingesetzt.

Ein wichtiger Aspekt bei der Lysatherstellung ist das Verständnis und die Kontrolle des Herstellungsprozesses und der Auswirkungen der einzelnen Prozessschritte aufeinander und auf die kritischen Qualitätsmerkmale (Abbildung). Qualitätskritische Prozessparameter, z. B. Temperatur, pH-Wert, Osmolalität, Konduktivität und Hygiene- und Umweltfaktoren werden derzeit definiert und überwacht. Darüber hinausgehende prozessbegleitende Kontrollen werden evaluiert und implementiert.



Abbildung 20 Übersicht relevanter Strategien zur Sicherung des Ansatzes "Quality-by-Design" (QbD). Quelle: <https://www.bioprocessonline.com/doc/the-importance-of-end-to-end-thinking-during-drug-product-development-0001>

Das Ausgangsmaterial für die ALiCE-Produktion ist die proprietäre Zelllinie BY-2 von LenioBio. Bereits in 2021/2022 wurde die Zelllinie durch CharlesRiver (<https://www.criver.com/>) analysiert. Die Zelllinie ist steril und Mykoplasmen frei (Abbildung).

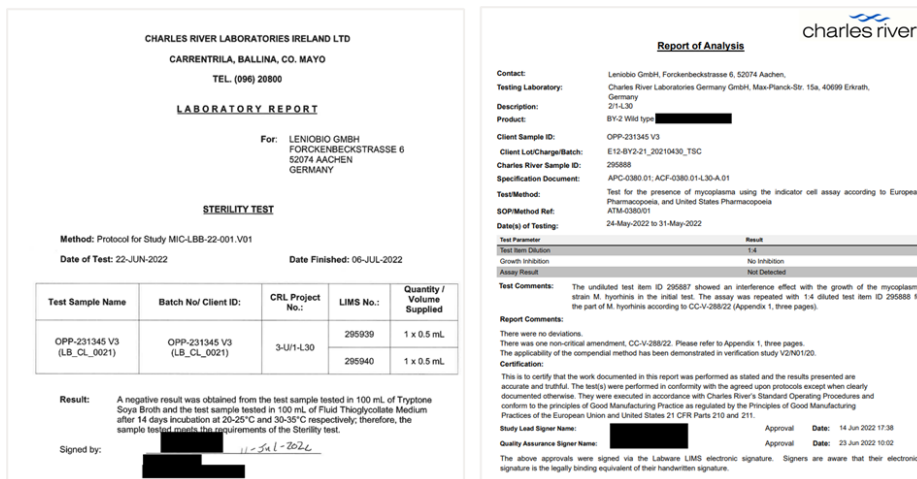


Abbildung 21 Zertifikate von CharlesRiver, dass die BY-2 Zelllinie steril und Mykoplasmen frei ist.

Im Frühjahr 2022 wurde die Firma CleanCells (<https://clean-cells.com/>) damit beauftragt, eine GMP Masterzellbank anzulegen. Das Team bei CleanCells wurde von LenioBio Mitarbeitern Vor-Ort im Umgang mit der Zelllinie vom Einfrieren, Auftauen, Kultivieren, erneutem Einfrieren, trainiert. Da es bei CleanCells keine Vorkenntnisse über die Kultivierung von BY-2 Zellen gab, gibt es einen sehr intensiven Austausch zwischen beiden Teams. Zurzeit läuft die Durchführbarkeitsstudie und dann wird die GMP-Masterzellbank erstellt. Diese Bank wird für weitere Zwecke sowohl bei CleanCells als auch bei LenioBio gelagert.

Darüber hinaus wird das Genom der produktionsrelevanten Zelllinie(n) in Zusammenarbeit mit dem Global Institute für Food Security (GIFS) in Kanada sequenziert und mit BY-2 Wildtyp-Zelllinien vom DSMZ in Deutschland und dem RIKEN BioResource Center in Japan verglichen.

8 Arbeitspaket 8 – Verwertung der Projektergebnisse

8.1 Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Die relevante Literatur und Patente wurden während des Projekts laufend nach neuen Erkenntnissen gescreent. Es wurden keine für das Vorhaben relevante Information identifiziert.

8.2 Jährliche Fortschreibung des Verwertungsplans

Der Verwertungsplan hat sich im Vergleich zum Projektantrag nicht geändert. Die im Projektantrag formulierten Erfolgsaussichten für die verschiedenen Verwertungsstränge sowie die jeweiligen Zeithorizonte sind unten aufgelistet. Durch die erfolgreiche Etablierung eines skalierbaren Lysat- (vom 150 ml zum 10 L Maßstab) und Proteinherstellungsprozesses (vom 50 ml zum 10 L Maßstab) konnten erste Projektergebnisse verwertet werden. Das ThinkBIG Projekt wurde durch LenioBio auf mehreren Konferenzen i) mit potentiellen kommerziellen Partnern (BIO 2022, San Diego, USA), und ii) auf Konferenzen z.B. der HCF7 (Halle, Deutschland) und der PEGS Europe (Barcelona, Spanien) vorgestellt.

a. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Im Berichtszeitraum wurden keine Erfindungen oder Schutzrechte angemeldet.

b. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten nach Projektende haben sich im Vergleich zum Projektantrag nicht geändert.

Nr.	Konkrete Verwertung	Zeithorizont (Jahre nach Projektende)	Aktuelle Verwertung
1	Erstellung von neuen SOPs zur Integrierung des entwickelten Prozesses im LenioBio Geschäftsmodell	1-2	SOPs und Arbeitsanweisungen wurden entwickelt und in das Qualitätsmanagement system (Consense) integriert
2	Kommerzialisierung von größeren zellfreien Lysaten (1L und 10L) durch LenioBio	2-3	Zellfreie Lysatherstellung 1 L- und 10 L-Maßstab etabliert. Prozessrobustness, d.h. hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Prozessschritte und der Qualitätsparameter unter Bearbeitung. Optimierung der Kostenstruktur der Proteinproduktionsplattform unter Bearbeitung.
3	Herstellung von Proteinen jeder Art, insbesondere von schwer herzustellenden Proteinen, für Kunden im größeren Maßstab durch LenioBio	2-n	LenioBio hat 2020 eine Proteinservice etabliert. In den folgenden Jahren wird der Proteinservice noch weiter ausgebaut, um auch größere Mengen an Proteinen für die Kunden und damit dem Markt zur Verfügung zu stellen. Darüberhinaus werden weitere analytische Methoden zur Qualitätskontrolle der produzierten Proteine etabliert. Die Kostenstruktur für die Proteinproduktionsplattform befindet sich in der Optimierung.
4	Aquise von industriellen und pharmazeutischen Großkunden und Kooperationsprojekten durch LenioBio	3-n	LenioBio ist bereits mit (Groß)kunden in Kontakt. Proof-of-Concept Studien sind bereits initiiert. Termsheets für Kollaboration sind in Verhandlung
5	Expandierung der Firma LenioBio GmbH und Schaffung von Arbeitsplätzen	3-n	Die LenioBio GmbH hat in den vergangenen drei Jahren mehr als 45 zusätzliche Arbeitsplätze geschaffen (Wissenschaftler, Prozessingenieure, Qualitätsmanager, Buchhalter etc.) Darüber hinaus ist die LenioBio dabei, geeignete Räumlichkeiten für die Forschung, Produktion und Verwaltung zu eruieren, um 2024/2025 in eigene Räumlichkeiten zu ziehen.

c. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Die wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten haben sich im Vergleich zum Projektantrag nicht geändert. Allerdings konnten einige Projektergebnisse wissenschaftlich verwertet werden.

Nr.	Konkrete Verwertung	Zeithorizont (Jahre nach Projektende)	Aktuelle Verwertung
1	Präsentation auf Konferenzen und Publikationen der Maßstabsvergrößerung der Lysatherstellung und zellfreien Reaktion in wissenschaftlichen Journalen	1	<p>Vortrag: Schillberg; Online ISPMF Conference (2021) doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153359</p> <p>Publikation: Buntru, Vogel, Finnern, Schillberg, 2022; Plant-based cell-free transcription and translation of recombinant proteins; PMID 35616861 DOI: 10.10007/978-1-0716-2241-4_8 (2022)</p> <p>Business Konferenz: Finnern; BIO2022 US</p> <p>Vortrag: Finnern; Hallo Konferenz Protein Engineering HCP7, Halle, Deutschland (2022); ALICE® Protein production made easy</p> <p>Vortrag und Poster: Finnern; 14th PEGS Europa, Spain; Protein & Antibody Engineering Summit (2022); Andreas Kiesling et al. ALICE® Simple reaction, radical results. Facile scaling of eukaryotic cell-free protein synthesis from microliters to liter volumes with consistent yields</p> <p>Poster: Finnern; 19th PEGS Boston, USA; The essential protein engineering & Cell therapy summit (2023); Andreas Kiesling et al. ALICE® Simple reaction, radical results. Facile scaling of eukaryotic cell-free protein synthesis from microliters to liter volumes with consistent yields</p> <p>Publikation: dasGupta et al., 2023; Scaling eukaryotic cell-free protein synthesis achieved with the versatile and high-yielding tobacco BY-2 cell lysate; PMID: 37376851 DOI: 10.1002/bit.28461</p> <p>Vortrag: Finnern; Future Trends in Mammalian Cell Biomanufacturing, University College, London, UK (2023); ALICE® Simple Reaction – Radical Results, Cell-Free Protein Production Scaled According to Customer's Needs</p> <p>Vortrag: Finnern; In vitro Biology Meeting, Norfolk, US (2023); ALICE® Simple Reaction – Radical Results, Cell-Free Protein Production Scaled According to Customer's Needs</p>
2	Verwendung der in ThinkBIG etablierten Maßstabsvergrößerung zur Produktion weiterer interessanter Proteinkandidaten zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des zellfreien Produktionssystems	1-4	Unter anderem hat LenioBio den therapeutisch relevanten monoklonalen Antikörper adalimumab (Humira) im größeren Maßstab produziert und charakterisiert. LenioBio nutzt Humira, um den industrialisierten Prozess im Hinblick auf Einhaltung von GMP relevanten Richtlinien (Lysat und Protein) zu evaluieren und zu validieren. Darüber hinaus werden die Kapazitätsvoraussetzungen und Kostenstrukturen evaluiert und optimiert, um die Plattform konkurrenzfähig im Markt zu platzieren.
3	Verwendung der in ThinkBIG etablierten Maßstabsvergrößerung für weitere Projektanträge, z.B. zur Etablierung metabolischer Stoffwechselwege zur zellfreien Herstellung von Metaboliten im größeren Maßstab	2-5	Abgabe des Projektantrages ThinkBIG2 zur Produktion von Metaboliten im größeren Maßstab in 2022

d. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der FE-Ergebnisse

Literatur und Patentapplikationen wurden regelmäßig überprüft, um patentierbare Teilbereiche schnellstmöglich zu schützen. Dadurch sollten vorhandene und neue Industriepartner für die Technologie als Auftraggeber gewonnen werden. Ein Folgeantrag ThinkBig2 zur Produktion von Metaboliten im größeren Maßstab wurde zusammen mit dem FhG IME eingereicht.

8.3 Vergleich des Stands des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung

Die Skalierung der zellfreien Technologie der Lysatherstellung und der Proteinherstellung konnten wie geplant durchgeführt werden. Die Lysatherstellung konnte bis zum 10 L Maßstab skaliert werden. Die Proteinproduktion konnte bis zum 1 L Maßstab sowohl im Rührkessel als auch im Cell-tainer durchgeführt werden. Der Cell-tainer konnte auch für die 10 L Proteinproduktion erfolgreich eingesetzt werden. Alle drei Zielproteine wurden bis zum 1 L Maßstab produziert und charakterisiert. Das hEGF (LenioBio GmbH) konnte auch im 10 L Maßstab produziert werden. Die Aufreinigung konnte allerdings nur in 1 L Chargen durchgeführt werden, da die Laborausstattung noch keine Aufreinigung im 10 L Maßstab zulässt.

Durch die COVID-19 Pandemie waren Reisen im ersten und zweiten Projektjahr nicht möglich, konnten aber im dritten Projektjahr wieder aufgenommen werden. Das ThinkBIG Projekt wurde durch LenioBio

auf mehreren Konferenzen i) mit potentiellen kommerziellen Partnern (BIO 2022, San Diego, USA), und ii) auf Konferenzen z.B. der HCF7 (Halle, Deutschland) und der PEGS Europe (Barcelona, Spanien) vorgestellt.

8.4 Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert?

Die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens haben sich im Vergleich zum ursprünglichen Antrag nicht verändert. Die zellfreie Produktion industriell relevanter Proteine konnte erfolgreich im 1 L Maßstab in den zwei verschiedenen Bioreaktorsystemen Cell-tainer (LenioBio GmbH) und dem Rührkesselbioreaktor (FhG IME) demonstriert werden. Die Produktion des hEGF wurde zudem im Cell-tainer im 10 L Maßstab erfolgreich demonstriert. Damit stehen skalierbare Prozesse für die industrielle Proteinproduktion bis zum 10 L Maßstab zur Verfügung. Prozessrobustness, d.h. hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Prozessschritte und der Qualitätsparameter sowie die Optimierung der Kostenstruktur der Proteinproduktionsplattform sind in Bearbeitung.

Auf die Einhaltung industrieller und behördlicher Standards wird großen Wert gelegt, da die Herstellung pharmazeutischer Proteine für präklinische und klinische Studien den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis (GMP) unterliegt. Die Grundsätze für die pharmazeutische Entwicklung im Hinblick auf die behördlichen Erwartungen sind z. B. in ICH Q8 dargelegt. Das Grundprinzip ist, dass Qualität für ein Produkt konsequent sichergestellt wird, indem man das Produkt und den Prozess, mit dem es entwickelt und hergestellt wird, versteht und die mit der Herstellung des Produkts verbundenen Risiken kennt. Das Lysat ist Zielprodukt-agnostisch, d. h. das Lysat kann für die Herstellung verschiedener Proteine verwendet werden. Da das zellfreie Lysate (ALiCE®) nicht Teil des medizinischen Endprodukts ist, kann es wahrscheinlich als ‚Rohmaterial‘ betrachtet werden. Sollten Bestandteile des Lysats im Endprodukt nachgewiesen werden, werden sie als Verunreinigungen eingestuft und müssen entfernt oder entsprechende Grenzwerte festgelegt werden.

Für die Proteinproduktion, also die Nutzung des zellfreien Systems zur Proteinexpression, gelten hingegen die gleichen Spezifikationen wie für zellbasierte Herstellungsverfahren. Von der Zugabe der für das Zielprotein kodierenden DNA über die Proteinproduktion bis hin zur Proteinreinigung und Qualitätskontrolle folgt die Produktherstellung in ALiCE den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis, wie sie in den behördlichen Richtlinien vorgeschrieben ist.

Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe 2 – Verbundvorhaben
„Zellfreie Produktion im größeren Maßstab zur Bereitstellung von
schwierig zu produzierenden Proteinen im Gramm-Bereich für
pharmazeutische, kosmetische und technische Anwendungen
(ThinkBig) – Teilprojekt B“

Abschlussbericht - Kurzbericht

FKZ	031B0830B
Laufzeit des Vorhabens	01.02.2020 – 31.03.2023

Autoren

Juliane Norf (MSc.)
E-Mail: j.norf@leniobio.com

Dr. Ricarda Finnern
E-Mail: r.finnern@leniobio.com

Das Projekt ThinkBIG startete im Februar 2020 mit einer Laufzeit von drei Jahren und wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institute IME (FhG IME) durchgeführt. Dieser Bericht ist eine Zusammenfassung der Aufgabenstellung und erzielten Ergebnisse.

Das Übergreifende Ziel des ThinkBIG Projektes ist das Ermöglichen der industriellen Nutzbarkeit des pflanzenbasierten zellfreien Expressionssystems ALiCE® in einem Volumenbereich von bis zu 10 L durch Prozessentwicklung der Lysatherstellung und Skalierung der Expressionsreaktion.

- Verbesserung der ALiCE® Plattform zur Proteinproduktion
- Skalierung der Plattform
- Erkundung des Marktes für potenzielle Kunden und Partner

Das ThinkBIG Projekt war in acht Arbeitspakete (APs) unterteilt, welche sich jeweils auf verschiedene Aspekte der Prozessoptimierung, Skalierung und Anwendung von ALiCE® fokussieren:

- ❖ AP1: Vergrößerter Prozess zur Evakuolierung
- ❖ AP2: Vergrößerte Lysatpräparation
- ❖ AP3: Entwicklung eines Bioreaktorprozesses
- ❖ AP4: Kostengünstige Plasmid Präparation (IME)
- ❖ AP5 : Vergrößerte Zellfreie Reaktion
- ❖ AP6: Produkt- und Prozessevaluierung
- ❖ AP7: Einhaltung Industrieller Standards
- ❖ AP8: Verwertung der Projektergebnisse

Zu Beginn des Projektes konnten mittels eines bereits etablierten Herstellungsprozesses 6 L BY-2-Hauptzellkultur zu 150 ml Lysat pro Herstellung verarbeitet werden. Die zellfreie Proteinproduktion konnte zu diesem Zeitpunkt im Mikroliter-Maßstab in Mikrotiterplatten bis zu einem Volumen von 6 ml in Zentrifugenröhrchen durchgeführt werden. Bei Abschluss des Projektes konnte die Lysatproduktion auf ein Volumen von 1 und 10 L und die Proteinproduktion vom Mikroliter-Maßstab auf 1L und 10 L skaliert werden.

Im Rahmen von ThinkBIG war das FhG IME an der Skalierung des Prozesses zur Lysatherstellung beteiligt, insbesondere bei der Optimierung der BY-2-Zellkultivierungs- und Protoplastierungsprozessschritte. Die LenioBio GmbH war für die Skalierung des Evakuolierungsprozesses sowie den Aufschluss der evakuolierten Protoplasten verantwortlich. Des Weiteren haben beide Projektpartner die Entwicklung eines Bioreaktorverfahrens zur ausbeutestarken, zellfreien Proteinbiosynthese im 1 L- und 10 L-Maßstab unter Verwendung handelsüblicher Reaktorgefäße etabliert.

Der Anwendungsaspekt des Verfahrens wurde durch die Herstellung des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (hEGF, LenioBio GmbH), eines Antimalaria-Immunitoxins (FhG IME), und des technischen Enzyms Enterokinase (FhG IME) demonstriert. Beide Projektpartner haben in enger Zusammenarbeit eine Analyse der regulatorischen Rahmenbedingungen zur Good Manufacturing Practice (GMP)-konformen zellfreien Lysat- und Proteinherstellung untersucht und die Erstellung von Standardarbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures, SOPs) und Arbeitsanweisungen (working instructions, WIs) initiiert.

Darüber hinaus ist die LenioBio GmbH dabei Kostenmodelle sowohl für die Lysat- als auch die Proteinproduktion zu erstellen und zu validieren, um die Cost of Goods (COGs) für den Vergleich mit anderen Technologien und die Einführung der zellfreien Proteinproduktion im größeren Maßstab in den Markt zu nutzen. Bereits 2018 brachte LenioBio das zellfreie Expressionsprodukt ALiCE® als Kit auf den Markt und ist jetzt dabei auch die größeren Lysatvolumina am Markt für die Produktidentifizierung und Entwicklung zu platzieren. Das mittelfristige Ziel ist es, die Lysatmengen zur Produktion von größeren Mengen an Proteinen für Forschungszwecke und zur Herstellung industrieller Grundstoffe zu

etablieren. Das langfristige Ziel ist es die Prozesse zur Lysat- und Proteinproduktion für den pharmazeutischen Markt zu etablieren.

Die Ergebnisse des ThinkBIG Projektes unterstützen diesen Ansatz, da sowohl die Lysatherstellung als auch die Proteinproduktion auf einen industriellen Maßstab skaliert werden konnten. Die Skalierung alleine reicht allerdings nicht aus. Der Prozess muss ‚robust‘ sein, das heißt jede Lysatherstellung und jede Proteinproduktion muss die gleichen Spezifikationen erfüllen.

Im ersten Projektjahr (2020-2021) wurde die Herstellung des BY-2-Lysats bereits im 1 L-Maßstab erfolgreich demonstriert. Die Bereitstellung der nötigen Plasmid-DNA Menge (FhG IME) für die zellfreie Reaktion im Maßstab von 1 L bzw. 10 L konnte durch Amplifikation der Plasmid-DNA in Bakterien mit anschließender Affinitätsreinigung ermöglicht werden.

Im zweiten Projektjahr (2021-2022) konnte die Lysatherstellung im 10 L-Maßstab prozesstechnisch optimiert werden. Dabei hat der Projektpartner Fraunhofer IME die Kultivierung der BY-2 Zellen im 50 L- und 350 L-Maßstab durchgeführt. Die anschließende Protoplastierung der Zellen erfolgte im Rührkessel. LenioBio GmbH konnte die Weiterverarbeitung der Protoplasten in einem skalierten Zentrifugationsprozess zur Entfernung der Vakuolen, den anschließenden Aufschluss der evakuierten Protoplasten und die Weiterverarbeitung zum zellfreien Lysat im 10 L-Maßstab optimieren. Ein Bioreaktorverfahren für die zellfreie Proteinproduktion im 1 L-Maßstab konnte in den drei verschiedenen Reaktionsgefäßen Rollflaschen (FhG IME), Rührkesselbioreaktor (FhG IME) und Beutel-Bioreaktor (CELL-tainer; LenioBio GmbH) erfolgreich demonstriert werden. Dabei wurden wichtige Reaktionsparameter für die zellfreie Reaktion im 1 L-Maßstab definiert. Darüber hinaus wurde die zellfreie Produktion der Modellproteine eYFP und GOx im Maßstab von 1 Liter im Rührkesselreaktor (FhG IME) sowie CELL-tainer (LenioBio GmbH) und somit eine 20.000-fache Skalierung der zellfreien Reaktion von 50 µL auf 1 L erreicht. Hervorzuheben ist, dass bei dieser immensen Maßstabsvergrößerung die hohen Produktausbeuten des zellfreien Tabaklysats erhalten blieben. Diese hervorragenden Ergebnisse bestätigen, dass eine Skalierung der Prozesse zur Lysatherstellung und der zellfreien Reaktion weder die Lysatqualität noch die Produktivität beeinträchtigt. Darüber hinaus wurden die drei Zielproteine, humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF; LenioBio GmbH), ein Antimalaria-Immuntoxin, bestehend aus einer Fusion von Granzyme B (Chymotrypsin ähnliche Serinprotease) mit einem MSP4- (merozoite surface protein-4) spezifischen scFv-Antikörper (GrB-scFv; FhG IME) und die aktive Domäne der bovinen Enterokinase (EKL; FhG IME) bereits im Maßstab von 50 µL erfolgreich produziert und standen damit für die Produktion im 1-L und 10-L Volumen bereit.

Im dritten Projektjahr (2022-2023) konnte die Produktion der Zielproteine im Mikrotiterplatten-Maßstab erfolgreich genutzt werden, um die Zielproteine GrB-scFv und EKL (FhG IME) sowie hEGF (LenioBio GmbH) zu reinigen und für erste Analysen der Akkumulation im BY-2-Lysat zu nutzen. Die Skalierung der zellfreien Reaktion zur Produktion von diesen industriell relevanten Proteinen im 1 L- bzw. 10 L- Maßstab konnten erreicht werden. Die Produktion in diesem großen Maßstab entspricht einer 20.000-fachen (1 L) bzw. 200.000-fachen Skalierung (10 L) der zellfreien Reaktion im Vergleich zum Standardreaktionsvolumen von 50 µL. LenioBio GmbH produzierte hEGF im Cell-tainer (1 L und 10 L) und das FhG IME die GrB-scFv und EKL im Rührkessel (1 L Maßstab). Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der erreichten Meilensteine.

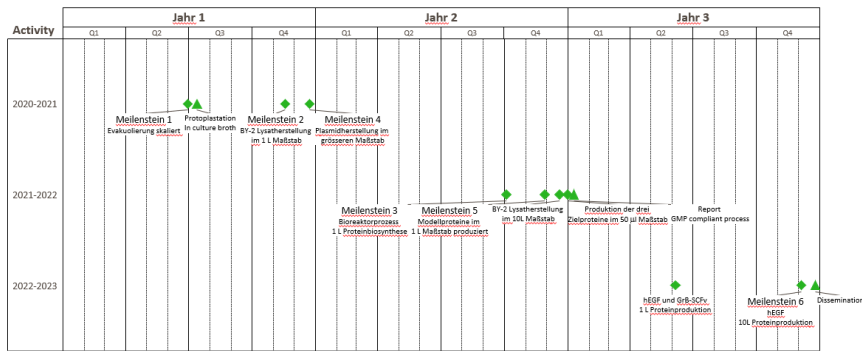


Abbildung 1 ThinkBIG Überblick Ergebnisse und Meilensteine.

Die Ergebnisse wurden a) auf Konferenzen durch Vorträge und Poster präsentiert und b) publiziert.

- Buntru et al., 2022; Plant-based cell-free transcription and translation off recombinant proteins; PMID 35616861 DOI: 10.1007/978-1-0716-2241-4_8 (2022)
- dasGupta et al., 2023; Scaling eukaryotic cell-free protein synthesis achieved with the versatile and high-yielding tobacco BY-2 cell lysate; PMID: 37376851 DOI: 10.1002/bit.28461

Das LenioBio Team ist in den drei Jahren des Projektes weiter gewachsen und umfasst heute 50 Mitarbeiter. 2021 wurde ein Qualitätsmanagementsystem implementiert und Standardarbeitsanweisungen geschrieben, trainiert, überwacht und kontrolliert. Darüber hinaus wurden das Business Development, Verkauf und Marketing weiter ausgebaut. Seit 2021 sind auch die neue Webseite und der Onlineshop geschaltet. In 2022 wurde auch ein Proteinservice etabliert, der es ermöglicht, sehr kundenzentriert Proteinproduktionen durchzuführen. LenioBio evaluiert derzeit den Umzug in eigene Büro-, Labor- und Produktionsräume im Raum Aachen. Dies soll bis Ende 2024 abgeschlossen sein.