Abschlussbericht

BMBF-Förderkennzeichen 16LW0353

BMBF Verbundprojekt CILIP2

„Neue Therapie für exokrine Pankreasinsuffizienz – rekombinante Pankreas-Ersatzenzyme aus Tetrahymena thermophila“

Teilvorhaben: präklinisches EPI-Modell und Mikrobiomstudien

Laufzeit: 1.7.2023 – 31.03.2024

Antragsteller und Projektleiter: Dr. Jürgen Schnekenburger

Biomedizinisches Technologiezentrum
Universität Münster
Dr. Jürgen Schnekenburger
Mendelstraße 17
48149 Münster
Tel.: +49 251 8352534
Fax: +49 251 8357938
E-mail: schnekenburger@uni-muenster.de

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung des Projektes 16LW0353 - 3 -

I.1. Aufgabenstellung des Forschungsvorhabens - 3 -

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde - 4 -

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens - 5 -

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde - 6 -

I.5. Zusammenfassung der wesentlichen Projektergebnisse: - 7 -

I.6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen - 8 -

II. Eingehende Darstellung des Projektes Nr. 016LW0353 - 9 -

A) Task AP 5.2 Aufstockung des Tiermodells - 9 -
B) Task AP 5.4 Tierhaltung Tiermodell - 9 -
C) Task AP 6.1 Mikrobiomdaten von Göttingen Minipigs - 10 -
D) Task AP 6.2 Mikrobiomdaten von EPI-Patienten - 10 -
E) Task AP 7.5 Projektkoordination - 10 -
F) Notwendigkeit der Zuwendung und Angemessenheit der geleisteten Arbeit - 10 -
G) Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse - 11 -
H) Darstellung des während der Durchführung Vorhabens bekannt geworden Fortschritts auf dem Gebiet des Auftrags bei anderen Stellen - 12 -
I) Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses nach § 11 - 12 -

I. Kurze Darstellung des Projektes 16LW0353

I.1. Aufgabenstellung des Forschungsvorhabens

Gesamtziel des Teilvorhabens des Biomedizinischen Technologiezentrums (BMTZ) der Medizinischen Fakultät der Universität Münster im Verbund CILIP2 war die präklinische Charakterisierung eines neuen Wirkstoffes zur Behandlung der exokrinen Pankreasinsuffizienz (EPI) und die Durchführung begleitender Mikrobiomstudien an Proben des Tiermodells und humaner EPI Patienten.

Gegenstand des Gesamtvorhabens war die präklinische Entwicklung von Cilase, ein rekombinantes Enzympräparat für Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz (EPI). Diese exokrine Pankreasinsuffizienz führt zu gefährlicher Mangelernährung durch eine gestörte Fettaufnahme. Der aktive Cilase Bestandteil ist eine Lipase, die von dem Ciliaten Tetrahymena thermophila sekretiert wird und anschließend durch Kristallisation kostengünstig und gut skalierbar gereinigt werden kann.
Im Teilvorhaben des Partners Universität Münster sollte die neu formulierte CILASE im EPI-Tiermodell Göttingen Minipigs getestet werden. Zudem sollte das Mikrobiom der Versuchstiere und von humanen Patienten auf EPI-Marker bzw. EPI-induzierte Veränderungen hin untersucht werden. Die Untersuchung des Mikrobioms von Göttinger Minipigs bei denen eine EPI induziert wurde und von EPI-Patienten der RUB soll Aufschluss über die Diversität des Mikrobioms und die Präsenz von Bakterien-Species geben, die als Marker oder weitere therapeutische Ziele dienen können. Diese Daten können zukünftig zur Verlaufskontrolle einer EPI Therapie und zur Patienten-Stratifizierung für klinische Studien eingesetzt werden. Mit den Ergebnissen des Teilvorhabens sollte der Partner Cilian die präklinische Entwicklung eines neuen Wirkstoffs (Cilase®) zur Behandlung der exokrinen Pankreasinsuffizienz (EPI) zum Abschluss bringen
Mit einer Studie des gastrointestinalen Mikrobioms von Göttinger Minipigs und betroffenen Patienten durch die Partner WWU und RUB sollten weitere einfach zugängliche Marker zum Status einer EPI und des Therapieerfolgs, insbesondere für klinische Studien geschaffen werden.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Biomedizinisches Technologiezentrum (BMTZ) ist eine Einheit der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster zur Entwicklung und Evaluierung von neuen Technologien in medizinischen Anwendungen und Umwelttechnologien. Zum Auftrag des BMTZ gehört mit forschenden Unternehmen bei der Entwicklung von neuen Technologien zur klinischen Anwendung zu kooperieren. Das BMTZ hat seinen Ursprung in einer Pankreas-Forschungsgruppe und ist daher sehr erfahren auf dem Gebiet der Pankreatitis-Forschung und der Verwendung von Pankreatitis-Tiermodellen. Im Rahmen dieser Forschung wurden sowohl die intrazellulären biochemischen Mechanismen, die zu einer vorzeitigen Protease-Aktivierung und damit zu einer akuten Pankreatitis führen können als auch die pathophysiologischen Prozesse und Einflußfaktoren im Tiermodell einer akuten Pankreatitis untersucht (Mooren et al. 2003, Weiss et al. 2003, Mayerle et al. 2005, Felderbauer et al. 2008 A, Felderbauer et al. 2008 B, Schnekenburger et al. 2008, Meister et al. 2010, Weber et al. 2010, Buchwalow et al. 2013, Schick et al. 2014). Außerdem wurde im Rahmen eines früheren Förderprojektes in Zusammenarbeit mit der Cilian AG ein Modell für die exokrine Pankreasinsuffizienz in Göttinger Minipigs etabliert, welches jetzt für zukünftige Projekte zur Verfügung steht (Luu et al. 2020).
Im Rahmen von BMBF, ZIM und EU geförderten Projekten wurden durch Mitarbeiter des BMTZ optische Systeme für die quantitative, labelfreie Zell- und Partikelanalyse entwickelt. Weiterhin existiert langjährige Erfahrung in der Analyse des gastrointestinalen Mikrobioms und der Anwendung von Tiermodellen zur Charakterisierung einer akuten Pankreatitis und einer exokrinen Pankreasinsuffizienz.
Im Vorläuferprojekt CILIP hat das BMTZ die vom Partner Cilian klonierten Tetrahymena Lipasen biochemisch charakterisiert und dazu für die vorgeschriebenen Tests SOP etabliert (Brock et al. 2016). Diese wurden im Anschluss an Cilian transferiert und dort weiter geführt. Mit den Partnern der RUB Bochum wurde das EPI-Tiermodell der Pankreasgang-ligierten Göttingen Minipigs entwickelt (Luu et al. 2018). WWU hat die den notwendigen Tierversuchsantrag gestellt und die für die Versuchsdurchführung notwendigen Mitarbeiter ausgebildet und geschult. WWU hat die Göttingen Minipigs beschafft und die Haltungsbedingungen der Tiere etabliert und optimiert. Dazu zählen die Optimierung des Tierfutters, die Beschaffenheit der Ställe, die Beschäftigung und das Enrichment der Tiere.
Das gastrointestinale Mikrobiom ist ein mittlerweile etablierter Marker und Einflussfaktor für Erkrankungen des Magen- und Darmtraktes und zahlreicher weiterer Organe. Die Mikroorganismen des Mikrobioms produzieren kleine Moleküle die in den Blutkreislauf aufgenommen werden können und darüber entzündliche, maligne und sogar neurologische Prozesse beeinflussen können. Das gastrointestinale Mikrobiom lässt sich über Next Generation Sequencing (NGS) der 16S RNA und die anschließende Zuordnung der erhaltenen Sequenzen zu bekannten Spezies sehr gut charakterisieren. Allerdings gibt es derzeit noch keine zuverlässigen Kriterien für die Zusammensetzung eines eher gesunden oder eher krankheitsförderlichen Mikrobioms. Das wird sich zukünftig mit der drastischen Zunahme der weltweit erhobenen Daten ändern. Die Mikrobiomanalyse wird sich zur Erfolgskontrolle einer EPI-Therapie und zur Stratifizierung von EPI-patienten eignen. Dazu werden im Projekt sowohl Daten aus dem Tierversuchsvorhaben als auch von EPI Patienten des Partners RUB untersucht und ausgewertet. BMTZ hat bereits Mikrobiomanalysen zur Verlaufskontrolle und der altersbedingten Entwicklung des EPI-Modells Göttingen Minipigs durchgeführt (Ritz et al. 2020). Weitere Tiermodelle wurden sowohl hinsichtlich des Mikrobioms als auch des damit verbundenen Metaboloms untersucht (Landsiedel et al. 2022).

Publizierte Vorarbeiten des BMTZ, die für das Teilvorhaben des BMTZ relevant sind:

Relevante Publikationen des BMTZ:

1. Landsiedel R, Hahn D, Ossig R, Ritz S, Sauer L, Buesen R, et al. Gut microbiome and plasma metabolome changes in rats after oral gavage of nanoparticles: sensitive indicators of possible adverse health effects. Particle and Fibre Toxicology. 2022;19(1).
2. Ritz S, Hahn D, Wami HT, Tegelkamp K, Dobrindt U, Schnekenburger J. Gut microbiome as a response marker for pancreatic enzyme replacement therapy in a porcine model of exocrine pancreas insufficiency. Microbial Cell Factories. 2020;19(1).
3. Luu AM, Brock A, Ritz S, Junghänel S, Aldag I, Edskes S, et al. Long term follow-up of a simplified and less burdened pancreatic duct ligation model of exocrine pancreatic insufficiency in Goettingen Minipigs. BMC Gastroenterology. 2020;20(1).
4. Brock A, Aldag I, Edskes S, Hartmann M, Herzog T, Uhl W, et al. Novel ciliate lipases for enzyme replacement during exocrine pancreatic insufficiency. European Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2016;28(11):1305-12.
5. Schick V, Scheiber JA, Mooren FC, Turi S, Ceyhan GO, Schnekenburger J, et al. Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. Gut. 2014;63(9):1469-80.
6. Buchwalow I, Schnekenburger J, Tiemann K, Samoilova V, Bankfalvi A, Poremba C, et al. L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. Sci Rep-Uk. 2013;3.
7. Weber IA, Buchwalow I, Hahn D, Domschke W, Lerch MM, Schnekenburger J. The potential role of kinesin and dynein in golgi scattering and cytoplasmic vacuole formation during acute experimental pancreatitis. Cell Research. 2010;20(5):599-602.
8. Meister T, Niehues R, Hahn D, Domschke W, Sendler M, Lerch MM, et al. Missorting of cathepsin b into the secretory compartment of ci-mpr/igfii-deficient mice does not induce spontaneous trypsinogen activation but leads to enhanced trypsin activity during experimental pancreatitis - without affecting disease severity. Journal of Physiology and Pharmacology. 2010;61(5):565-75.
9. Schnekenburger J, Schick V, Krüger B, Manitz MP, Sorg C, Nacken W, et al. The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts. Journal of Cellular Physiology. 2008;216(2):558-67.
10. Felderbauer P, Stricker I, Schnekenburger J, Bulut K, Chromik AM, Belyaev O, et al. Histopathological features of patients with chronic pancreatitis due to mutations in the PRSS1 gene: Evaluation of BRAF and KRAS2 mutations. Digestion. 2008;78(1):60-5.
11. Felderbauer P, Schnekenburger J, Lebert R, Bulut K, Parry M, Meister T, et al. A novel A121T mutation in human cationic trypsinogen associated with hereditary pancreatitis: Functional data indicating a loss-of-function mutation influencing the R122 trypsin cleavage site. Journal of Medical Genetics. 2008;45(8):507-12.
12. Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, Kellermann J, Ruthenbürger M, Weiss FU, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. Gastroenterology. 2005;129(4):1251-67.
13. Weiss FU, Simon P, Witt H, Mayerle J, Hlouschek V, Zimmer KP, et al. SPINK1 mutations and phenotypic expression in patients with pancreatitis associated with trypsinogen mutations. Journal of medical genetics. 2003;40(4).
14. Mooren FC, Hlouschek V, Finkes T, Turi S, Weber IA, Singh J, et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(11):9361-9.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilvorhaben des BMTZ trugt zu den **Arbeitspaketen AP5, AP6 und AP7** des Gesamtverbundes CILIP2 mit der Planung, Durchführung und Auswertung der Tierstudien an einem EPI Tiermodell mit Göttingen Minipigs bei (AP5). Dazu sollten die Erstellung der Studienprotokolle, Beschaffung und Überwachung der Versuchstiere und die Zusammenstellung und Auswertung der Versuchsdaten gehören. Ferner kümmerte sich das BMTZ um den Gesundheitszustand der Versuchstiere und stand im regulären Austausch mit den zuständigen Behörden. Zusätzlich wurde vom BMTZ das intestinale Mikrobiom der Versuchstiere über die gesamte Projektlaufzeit

untersucht und dokumentiert, um Veränderungen durch das Modell und während der Medikationen zu beobachten (AP6.1). Die Chirurgen des Partners RUB sollten die Ligatur des Pankreasgangs bei den Minipigs zur Etablierung des EPI-Modells mit den Tierärzten der WWU übernehmen. Zusätzlich sollten Mikrobiomdaten von Patienten mit einer EPI gesammelt und durch das BMTZ analysiert werden. Ziel der Untersuchungen war es, Responder und Non-Responder der konventionellen EPI-Therapie mit der α-Diversität des Mikrobioms und spezifischer Operational Taxonomic Units (OTU) zu korrelieren (AP6.2).
Die Arbeiten zur übergreifenden Projektorganisation und -steuerung sowie die Außendarstellung erfolgten zusammen allen Verbundpartnern in AP7.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ziel des Verbundprojektes CILIP2 war es, rekombinante Lipasen aus *Tetrahymena thermophila* in präklinischen EPI Modellen zu testen, und alle Voraussetzungen für die Genehmigung einer humanen Phase 1 Studie zu schaffen. Im Teilprojekt der Universität Münster wurde das EPI Modell Göttingen Minipigs fortgeführt und gastrointestinale Mikrobiomstudien zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufs und des Therapieerfolgs vorbereitet. Der wissenschaftliche und technische Stand an den im Projekt angeknüpft wurde bestand im Wesentlichen aus den Vorarbeiten der Projektpartner.
EPI Therapie: Die im Rahmen des KMU-innovativ Projektes „CILIP – Ciliaten-Enzyme mit rekombinanter Lipase zur Behandlung von Exokriner Pankreasinsuffizienz“ (01.05.2012 bis 30.04.2015) identifizierte Lipase aus *T. thermophila* wird rekombinant produziert. Das Enzym wird vom Produktionsorganismus in aktiver Form ins Fermentationsmedium sekretiert, bedarf keiner aufwendigen chromatographischen Isolierung, ist direkt korrekt gefaltet und deutlich magensaftresistenter als Pankreatin-basierte Präparate. Pankreatin wird aus den Bauchspeicheldrüsen von Schlachtschweinen aufgereinigt, was einen erheblichen Aufwand hinsichtlich Menge, Qualitätskontrolle und Produktsicherheit bedeutet. Bei Pankreation-Präparaten bestehen bei vielen Patienten Unverträglichkeiten, eingeschränkte Wirkung oder ethisch bzw. religiöse Bedenken. Aktuell verfügbare Pankreatin-Präparate sind nicht säurestabil und verlieren bei pH-Werten < 4, wie sie im Magen vorliegen, schnell ihre Aktivität. Daher werden sie mit einem Säureschutzmantel versehen, der die Enzyme bei der Magenpassage schützt, aber auch dazu führt, dass der Enzymmix erst im Dünndarm oberhalb von pH 5 freigesetzt wird, was zu einer verspäteten und ungenügenden Fettverdauung führen kann. Dieser Effekt wird noch dadurch verstärkt, dass der pH-Wert im oberen Dünndarm bei EPI-Patienten, durch die reduzierte Carbonat-Sekretion deutlich erniedrigt sein kann (Ovesen 1986, Todd et al. 2024). Alternative Verfahren zum Ersatz von Pankreatin-Produkten haben bislang nicht zum gewünschten Erfolg geführt.

Göttingen Minipig EPI Modell: Das hier verwendete EPI Modell von Pankreasgang-ligierten Göttingen Minipigs zum Test von Verdauungs-Enzympräparaten wurde im Vorgängerprojekt CILIP etabliert (Luu et al. 2020). Göttingen Minipigs wurden in der aktuellen Forschung zur Untersuchung der Pathologie einer EPI und der Wirkung etablierter EPI-Therapien eingesetzt. Dabei hat sich das Modell als allen anderen Tiermodellen deutlich überlegen erwiesen (Gregory et al. 2016, Kammlott et al. 2005, Schubert et al. 2022, Mößeler et al. 2012).

Gastrointestinales Mikrobiom: Die Mikroorganismen des Darms (Mikrobiom) sind Bestandteil wichtiger Stoffwechselprozesse und an der Aufrechterhaltung der Gesundheit bzw. bei Veränderungen in ihrer Zusammensetzung an der Entwicklung von Erkrankungen beteiligt. Das Mikrobiom

des Gastrointestinaltraktes verändert sich drastisch unter dem Einfluss einer EPI. Insbesondere die Abnahme der mikrobiologischen Diversität ist ein etablierter Marker sowohl für eine EPI als auch für einen Therapiererfolg (Ritz et al. 2020, Frost et al. 2021, Frost et al. 2021, Hankel 2020).

Literatur

1. L. Ovesen, F. Bendtsen, U. Tage-Jensen, N. T. Pedersen, B. R. Gram, and S. J. Rune, “Intraluminal pH in the Stomach, Duodenum, and Proximal Jejunum in Normal Subjects and Patients With Exocrine Pancreatic Insufficiency.” Gastroenterology. 1986 Apr;90(4):958-62. doi: 10.1016/0016-5085(86)90873-5.
2. Todd A, Bennett-Huntley E, Rosendahl J, Schnekenburger J, Uhl W. Comparative Investigation of pH–Dependent Availability of Pancreatic Enzyme Preparations In Vitro. Pharmaceuticals. 2024; 17(5):552. https://doi.org/10.3390/ph17050552
3. Luu AM, Brock A, Ritz S, Junghänel S, Aldag I, Edskes S, et al. Long term follow-up of a simplified and less burdened pancreatic duct ligation model of exocrine pancreatic insufficiency in Goettingen Minipigs. BMC Gastroenterology. 2020;20(1).
4. Gregory PC, Hoffmann K, Kamphues J, Möeler A. The Pancreatic Duct Ligated (Mini)pig as a Model for Pancreatic Exocrine Insufficiency in Man. Pancreas. 2016 Oct;45(9):1213-26. doi: 10.1097/MPA.0000000000000674. PMID: 27623555.
5. Mösseler A, Schwarzmaier T, Grunemann J, Gregory PC, Höltershinken M, Kamphues J. The growing pancreatic duct ligated pig as a model for exocrine pancreatic insufficiency in children: investigations to achieve sufficient vitamin A and vitamin E supply. J Anim Sci. 2012 Dec;90 Suppl 4:321-3. doi: 10.2527/jas.53775. PMID: 23365367.
6. Kammlott E, Karthoff J, Stemme K, Gregory P, Kamphues J. Digestibility rates of major and trace elements in pancreatic duct-ligated pigs. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2005 Apr-Jun;89(3-6):109-12. doi: 10.1111/j.1439-0396.2005.00540.x. PMID: 15787980.
7. Schubert DC, Mößeler A, Ahlfänger B, Langeheine M, Brehm R, Visscher C, Abd El-Wahab A, Kamphues J. Influences of exocrine pancreatic insufficiency on nutrient digestibility, growth parameters as well as anatomical and histological morphology of the intestine in a juvenile pig model. Front Med (Lausanne). 2022 Sep 9;9:973589. doi: 10.3389/fmed.2022.973589. PMID: 36160141; PMCID: PMC9505903.
8. S. Ritz, D. Hahn, H. T. Wami, K. Tegelkamp, U. Dobrindt, and J. Schnekenburger, “Gut microbiome as a response marker for pancreatic enzyme replacement therapy in a porcine model of exocrine pancreas insufficiency,” *Microb Cell Fact*, vol. 19, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12934-020-01482-2.
9. F. Frost *et al.*, “Long-term instability of the intestinal microbiome is associated with metabolic liver disease, low microbiota diversity, diabetes mellitus and impaired exocrine pancreatic function,” *Gut*, vol. 70, no. 3, pp. 522–530, Mar. 2021, doi: 10.1136/gutjnl-2020-322753.
10. F. Frost, F. U. Weiss, and M. M. Lerch, “The role of the microbiome in diseases of the pancreas,” *Internist*, vol. 63, no. 4. Springer Medizin, pp. 372–378, Apr. 01, 2022. doi: 10.1007/s00108-022-01276-1.
11. Hankel J, Mößeler A, Hartung CB, Rath S, Schulten L, Visscher C, Kamphues J, Vital M. Responses of Ileal and Fecal Microbiota to Withdrawal of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in a Porcine Model of Exocrine Pancreatic Insufficiency. Int J Mol Sci. 2022 Oct 2;23(19):11700. doi: 10.3390/ijms231911700. PMID: 36233002; PMCID: PMC9570030.

I.5. Zusammenfassung der wesentlichen Projektergebnisse:

Gesamtziel des Teilvorhabens des Biomedizinischen Technologiezentrums (BMTZ) der Medizinischen Fakultät der Universität Münster im Verbund CILIP2 war die präklinische Charakterisierung eines neuen Wirkstoffes zur Behandlung der exokrinen Pankreasinsuffizienz (EPI) und die Durchführung begleitender Mikrobiomstudien an Proben des Tiermodells und humaner EPI Patienten.

Im Projektzeitraum wurden die nachstehend aufgeführten Ergebnisse erzielt:

- Zur Aufstockung des Tiermodells wurden all Voraussetzungen für die Beschaffung und Operation zusätzlicher Göttingen Minipigs geschaffen.
- Das bestehende Tiermodell wurde hinsichtlich Futterzusammensetzung, Gesundheistmonitoring und Diagnostik der Bestandstiere optimiert.
- Zur Analyse der Mikrobiomdaten von Göttingen Minipigs wurde ein geeigneter Workflow und die zugehörigen Protokolle definiert.
- Zur Analyse des Mikrobioms humaner EPI-Patienten wurde der Workflow der Minipig-Mikrobiomanalyse angepasst und ein entsprechender Ethikantrag mit dem Projektpartner Ruhr-Universität Bochum vorbereitet.

Zusammenfassend musste das Teilprojekt des BMTZ durch die Insolvenz des Projektpartners CILIAN AG abgebrochen werden. Die Zielsetzungen wurde daher nicht erreicht und die Ausgabenplanung angepasst.

I.6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es erfolgte keine Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

II. Eingehende Darstellung des Projektes Nr. 016LW0353

Das Ziel des hier beantragten Teilvorhabens im Verbundprojekt CILIP2 war die präklinische Charakterisierung eines neuen Wirkstoffes zur Behandlung der exokrinen Pankreasinsuffizienz (EPI) und die Durchführung begleitender Mikrobiomstudien an Proben des Tiermodells und humaner EPI Patienten.
Im Berichtszeitraum (01.07.2023 – 31.03.2024) wurden im Vorhaben die nachstehend aufgeführten Arbeiten in den AP 5, AP 6 und AP 7 durchgeführt und Ergebnisse erzielt:

A) Task AP 5.2 Aufstockung des Tiermodells

Ziel dieses Tasks war es das Tiermodell der Exokrinen Pankreas Insuffizienz in Göttingen Minipigs zu erhalten und mit neuen Tieren zu ergänzen.

Zur Aufstockung des Tiermodells wurden in Zusammenarbeit mit den Tierärzten der Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE) und den Pankreas-Chirurgen des Projektpartners RUB die technischen Voraussetzung für die notwendigen Operationen geschaffen. Alle Geräte wurden überprüft, die Ausrüstung des OP-Raumes festgelegt und mit Dr. med. vet. Annika Mohr, Chirurgische Klinik, Universität Münster eine erfahrenen Anästhesistin für die Operationen gewonnen.

Mit dem Hersteller des Temperaturmanagementsystems Bair Hugger für die Sedierung während der Tierhaltung sowie als Unterstützung der Operationen wurde ein System ausgewählt und bei einem Vor-Ort Termin am getestet. Im Anschluss wurde das System beschafft.

Mit dem Züchter der benötigten Minipigs, Fa. Ellegard, Dänemark, wurden die Verfügbarkeit der benötigten Tiere, Lieferbedingungen und die Voraussetzungen zur Adaption besprochen. In der ZTE wurden die benötigten Haltungsflächen vorreserviert.

B) Task AP 5.4 Tierhaltung Tiermodell

Ziel dieses Tasks war es das Tiermodell der Exokrinen Pankreas Insuffizienz in Göttingen Minipigs weiterzuführen und die Tierhaltung zu verbessern

Das bestehende Tiermodell der Pankreasgang-ligierten Göttingen Minipigs wurde im Projekt fortgeführt und an das neue Projekt angepasst. Dazu wurde die Futterzusammensetzung überprüft und mit der ZTE verbessert. Insbesondere die Supplementierung mit fettlöslichen Vitaminen soll verbessert werden. Für die neue Futterzusammensetzung wurde eine Genehmigung bei der zuständigen Behörde beantragt. Zum Gesundheitsmonitoring der Bestandstiere wurde ein Gerät zur schnellen Zellanalyse im Urin (Fluidlab der Firma Anvajo) beschafft. Damit lassen sich entzündliche Erkrankungen des Urogenitaltrakts schneller diagnostizieren und behandeln.

Für die regelmäßigen Sedierungen zur Entnahme von Blutproben und die Operation weiterer Tiere wurde ein Temperaturmanagementsystem in Form einer regulierbaren Wärmedecke evaluiert und beschafft. Zur Auswahl von Narkose- und Ultraschallgeräten wurden Demonstrationen des jeweiligen Geräts durchgeführt und entsprechende Angebote eingeholt.

Zur Bestimmung der pH-Werte im Magen-Darm-Trakt der Minipigs sollte ein Smart Pill System eingesetzt werden. Die Messung der realen Werte dient der Bestätigung der verfügbaren Annahmen aus humanen Messungen und ist essentiell für die pH-sensitive Formulierung der Lipasen.

In Absprache mit dem Hersteller Medtronic wurde am 14.12.2023 das aktuelle System für orale Kapselaufnahme humaner Patienten vorgestellt und auf Eignung für Minipigs hin überprüft. Das System wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch mit Minipigs funktionieren. Daher wurde das Angebot aktualisiert und die Beschaffung vorbereitet. Der Beschaffungsprozess wurde durch das Projektende abgebrochen.

C) Task AP 6.1 Mikrobiomdaten von Göttingen Minipigs

Zur Durchführung der Mikrobiomstudien gab es umfangreiche Recherchen und Gespräche zur Durchführung und der Beteiligung von Analyse-Instituten. Mit Fa. Qiagen und dem Institut für Hygiene des Uniklinikums Münster fanden initiale Beratungen und Angebote zur Durchführung der Sequenzierungen und Datenanalyse für die Mikrobiomanalysen statt. Für das Projekt muss die Verfügbarkeit der Analytik in gleichbleibender Qualität über die Projektlaufzeit sicher gestellt werden. Da mit dem Institut für Hygiene bereits gemeinsame Erfahrungen und Publikationen bei Mikrobiomstudien bestehen und das Institut eine größere Flexibilität bei der Datenauswertung hat, wurde das Institut als Partner ausgewählt und zusammen der Workflow der Mikrobiomstudien erstellt.

Die notwendigen Protokolle für Mikrobiomstudien wurden erstellt und alle benötigten Reagenzien und Materialien beschafft. Die ersten Proben der Minipigs wurden gesammelt und lege artis gelagert. Die Arbeiten sollen in einem internen Folgeprojekt weiter geführt und abgeschlossen werden.

D) Task AP 6.2 Mikrobiomdaten von EPI-Patienten

Der Workflow der Mikrobiomanalyse und die zugehörigen Protokolle wurden auf humane Proben angepasst. Eine SOP zur Mikrobiomanalysen sowie ein Patientenfragebogen wurden im ersten Draft erzeugt. Mit den Partnern der RUB wurde der notwendige Ethikantrag für humane Mikrobiomstudien vorbereitet. Durch den Projektabbruch konnten der Ethikantrag und die Kollektion humaner Proben nicht weiter verfolgt werden.

E) Task AP 7.5 Projektkoordination

Im Projektzeitraum fanden regelmäßige Treffen mit den Projektpartnern sowohl online als auch vor Ort statt. Für den Kongress Digestive Disease Week, Washington DC, USA, wurde ein Beitrag von Cilian und Universität Münster zum CILIP-Projekt erarbeitet und eingereicht.

F) Notwendigkeit der Zuwendung und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Arbeiten der Universität Münster fanden im nichtwirtschaftlichen Bereich der Universität statt. Eigene Mittel standen für die Projektarbeiten nicht zur Verfügung. Für die Arbeiten im KMU innovativ Projekt CILIP2 war daher die Zuwendung durch das Teilprojekt notwendig. In der verkürzten Projektlaufzeit fanden die Arbeiten des Teilprojektes im vorgesehenen Umfang statt. Insbesondere die Tierhaltung des EPI Modells der Pankreasgang-ligierten Göttingen Minipigs wurde durch

intensive Arbeiten mit den Tieren verbessert. Dazu zählen die Optimierung der Futterzusammensetzung, der Vitaminsupplementierung, das Training der Tiere und die Blutentnahme. Für die Operation neuer Tiere wurde das Protokoll zur Operation mit den beteiligten Tierärzten, Tierschutzbeauftragten und Chirurgen verbessert. Diese Maßnahmen tragen unmittelbar zur weiteren Verwendung und Fortführung des EPI-Tiermodells bei.
Auch die Arbeiten zur Bestimmung des gastrointestinalen Mikrobioms in EPI Patienten und Versuchstieren haben mit umfangreichen Vorbereitungen und dem erstellen der benötigten Protokolle begonnen. Mit den erstellten SOP und Arbeitsabläufen können zukünftig entsprechende Mikrobiomstudien rasch und ohne lange Vorbereitung begonnen werden.

G) Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse

Durch die im Teilvorhaben der Universität Münster erarbeiteten Grundlagen der EPI Mikrobiomanalysen von Patienten und Versuchstieren, werden neue Applikationsbereiche für Mikrobiomanalysen in der präklinischen Forschung und dem Therapiemonitoring erschlossen, die für zukünftige Förderprojekte genutzt werden können.
Die innerhalb der verkürzten Projektlaufzeit erzielten Ergebnisse des Vorhabens werden von Universität Münster in Forschung und Lehre sowie im Rahmen neuer Forschungsvorhaben verwertet. Mit den Projektpartnern wird eine Weiterführung der vorgesehenen Projektarbeiten geplant, die auf dem Vorhaben CILIP2 beruht.

Die während der Durchführung des Forschungsvorhabens erzielten Ergebnisse und Erfahrungen werden in neue Projekte zur Entwicklung von Pankreasersatzenzymen eingebracht. Da sich aus dem verkürzten Projekt keine IP oder lizenzierbare Leistungen ergeben haben, besteht keine direkte wirtschaftliche Anschlussfähigkeit.

Universität Münster wird die Forschung zur EPI und zu Mikrobiom EPI Markern nach dem Projektende fortsetzen und nach Möglichkeit entweder im Rahmen weiterer Industriekooperationen oder öffentlicher Förderprojekte ausbauen.

H) Darstellung des während der Durchführung Vorhabens bekannt geworden Fortschritts auf dem Gebiet des Auftrags bei anderen Stellen

Es sind keine für das Vorhaben relevanten Fortschritte anderer auf demselben Gebiet bekannt geworden

I) Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses nach § 11

Die Ergebnisse des Teilprojektes wurden im Rahmen von peer-reviewed Zeitschriften und schriftlichen Konferenzbeiträgen veröffentlicht. Weitere Publikationen sind in Vorbereitung.

Peer Review Veröffentlichungen

Todd A, Bennett-Huntley E, Rosendahl J, Schnekenburger J, Uhl W. Comparative Investigation of pH–Dependent Availability of Pancreatic Enzyme Preparations In Vitro. *Pharmaceuticals*. 2024; 17(5):552. https://doi.org/10.3390/ph17050552

Conference Proceedings (zitierfähig):

Aldag, I., Edskes, S., Rossdorf, J., Uthoff, S., Hartmann, M. W., Herzog, T., Uhl, W., Junghänel, S. & Schnekenburger, J. (2024). Tu1459 THE RECOMBINANT CILIATE LIPASE CILIP IS A HIGHLY EFFECTIVE NOVEL EPI DRUG AND SUPERIOR TO ESTABLISHED PANCREATIN BASED THERAPIES. *Gastroenterology*, *166*(5), S-1349.