

Abschlussbericht zum DBU-geförderten Projekt

Entwicklung von Hochproduktionszelllinien für die ressourcenschonende Herstellung von Biopharmazeutika

Aktenzeichen: 32718/01-32
Projektbeginn: 14. Januar 2016
Laufzeit: 18 Monate

Projektleitung

Prof. Dr. Kerstin Otte

Institut für Angewandte Biotechnologie, Hochschule Biberach, Karlstrasse 10, 88400 Biberach
Tel.: 07251-582454

Email: otte@hochschule-bc.de

Wissenschaftlicher Mitarbeiter:

Dr. Benjamin Weis

Email: weis@hochschule-bc.de

Kooperationspartner

Dr. Nicole Faust, Dr. Silke Wissing

CEVEC Pharmaceuticals GmbH,

Gottfried-Hagen-Str 62, 51105 Köln

Tel: 0221-46020801, Faust@cevec.com, Wissing@cevec.com

06/02		Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	32710	Referat	32	Fördersumme	202.919 Euro
Antragstitel		Entwicklung von Hochproduktionszelllinien für die ressourcenschonende Herstellung von Biopharmazeutika			
Stichworte					
Laufzeit		Projektbeginn		Projektende	
18 Monate		15.1.2016			
Zwischenberichte		24.10.2016			
Bewilligungsempfänger		Hochschule Biberach Fakultät Biotechnologie Institut für Angewandte Biotechnologie 88400 Biberach / Riß			Tel 07351/582-454
					Fax 07351/582-119
					Projektleitung Prof. Dr. Kerstin Otte
					Bearbeiter Dr. Benjamin Weis / Dr. Simon Fradin
Kooperationspartner		CEVEC Pharmaceuticals GmbH Gottfried-Hagen-Str. 60 – 62 51105 Köln			
Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens					
<p>Biopharmazeutika sind hoch komplexe Proteinmedikamente, die von lebenden Zellen in Bioreaktoren produziert werden. Aufgrund des hohen Energiebedarfs im Fermentationsprozess, sowie des Verbrauchs an Wasser und Reinigungsmitteln bietet die Erhöhung der Prozessproduktivität ein großes Potential zur Umweltentlastung. Ein effizienter Weg zur ressourcenschonenden Produktion stellt die Steigerung der Prozesseffizienz durch Optimierung der Produktionszelllinie dar. Im aktuellen Projekt sollte eine neuartige Methode zur genetischen Optimierung von Produktionszellen genutzt werden, in der mikroRNAs (miRNAs) als „molekulare Werkzeuge“ durch stabiles Einbringen in eukaryontische Produktionszellen prozessrelevante zelluläre Vorgänge wie Expression von Proteinen und zelluläres Wachstum verändern können. Zur Modulation wurde ein neues humanes Zellsystem genutzt, die von primären humanen Amniozyten abgeleiteten immortalisierten CAP®-Zellen, welche in idealer Weise zur Produktion von Biopharmazeutika geeignet sind, da sie in Suspension kultiviert werden können und ein humanes Glykosylierungsmuster ermöglichen.</p>					
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden					
<p>An der Hochschule Biberach wurden die in eigenen Vorarbeiten identifizierten, potentiell produktionssteigernden miRNAs in modifizierte Expressionsvektoren subkloniert und zur Etablierung stabil miRNA-überexprimierender CAP®-Produktionszellen verwendet, die bereits einen therapeutischen Antikörper exprimierten (CAP-mAB). Nach Verifizierung der miRNA-Überexpression wurden die resultierenden stabilen miRNA-Produktionszellpools in verschiedenen Produktionsmaßstäben auf prozessrelevante Parameter wie Viabilität, Wachstum und Antikörperproduktion untersucht. Anschließend wurden die besten Produktionszelllinien zu CEVEC Pharmaceuticals transferiert, in einen miniaturisierten Produktionsprozess überführt und Prozessparameter unter Stressbedingungen vergleichend getestet. Zur Absicherung gegen unerwünschte Nebenwirkung die Wirkmechanismen der miRNA-induzierten Produktionssteigerung erfolgte parallel eine Analyse der miRNA-Targetgene durch Transkriptionsanalyse und pPCR. Die Arbeiten wurden von einer Ökobilanzierung durch das ifu Institut für Umweltinformatik Hamburg begleitet.</p>					
Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de					

Ergebnisse und Diskussion

Basierend auf einem vorangegangenen transienten miRNA-Screening an der Hochschule Biberach wurden 11 pro-produktive miRNAs stabil in CAP-mAb Zellen überexprimiert. Signifikante Überexpression konnte für 8 stabile Zellpools verifiziert werden, fehlende Überexpression in 3 Zellpools wurde auf bereits hohe Basalexpression in CAP Zellen oder fehlende Funktionalität der klonierten genomischen pre-miRNA Sequenz zurückgeführt. Alle stabilen Zellpools wurden kultiviert und analysiert. In kleinem 12-well-Kultivierungsmaßstab konnte eine Steigerung der Lebendzellichte für CAP-mAb-miR-136, -3074, -370 und -219 detektiert werden, welche eine signifikant gesteigerte Produktivität von 6 – 15 % zeigten. Diese Steigerung der Produktivität kann möglicherweise durch die erhöhte Viabilität erklärt werden. Im nachfolgenden Produktionsexperiment in vergrößertem Maßstab im 250ml-Schüttelkolben zeigten wiederum CAP-mAb-miR-3074, -miR-136 und miR-370 erhöhte Viabilität und Lebendzellichte. Diese Verbesserungen führten möglicherweise final zu signifikanter Steigerung im Antikörpertiter von 5.7 % und 8.9 % für CAP-mAb-miR-136 und CAP-mAb-miR-3074 im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach Transfer der Zellpools zu CEVEC Pharmaceuticals konnten die Daten bezüglich erhöhter Lebendzellichte in den CAP-mAb-miR-3074, miR-136 und miR-370 Zellpools im reguliertem Rührbioreaktor verifiziert werden. Zusätzlich wurde ein leicht protektiver Effekt unter Stressbedingungen (erhöhter oder abgesenkter DO) für die miRNA überexprimierenden Zellpools beobachtet werden. Die Überexpression von miR-136 und miR-3074 hatte dabei keinen Einfluss auf die Glykosylierung und damit die Produktqualität.

Die erzielten Produktivitätssteigerungen von 10 – 15 % in CAP-Produktionszellen sind im Vergleich zu Studien mit transienter Expression der ausgewählten miRNAs (Weis et al, submitted) sowie Optimierungen in CHO Produktionszellen eher moderat. Im Gegensatz zu CHO Zellen, welche eine lange Kultivierungshistorie sowie ein bekanntermaßen instabiles Genom besitzen, sind CAP-Zellen ein sehr junges Produktionssystem, welches unter kontrollierten Bedingungen etabliert wurde und möglicherweise genetisch stabiler und somit weniger einfach genetisch zu modulieren sind. Die erzielten Daten zeigen jedoch, dass auch CAP Zellen durch Einsatz der miRNA-Technologie genetisch optimiert werden können.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Produktionssteigerung durch miR-136 und miR-3074 wurden analysiert. So ist die Steigerung der Viabilität in durch miR-3074 möglicherweise auf die Hochregulation der pro-proliferativen und onkogenen miR-24 zurückzuführen. Zusätzlich hat die Herunterregulation der anti-proliferativen miR-509 möglicherweise positiven Einfluss auf Wachstum und Viabilität der Produktionszellen. Die Herunterregulation von Histon-kodierenden Genen in miR-136 überexprimierenden Zellen könnte zum generellen Anstieg der Transkription führen die Herunterregulation einer Peptidase zu vermindertem Abbau des Antikörpers könnte.

Die Evaluierung mittels Ökoeffizienzanalyse konnte durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde durch fehlende Informationen zu den Inhaltsstoffen des Mediums erschwert. Die Ergebnisse zeigen eine positive Tendenz, die jedoch als nicht signifikant einzuordnen ist, da hierfür keine ausreichende Erhöhung des Titers erreicht wurde. Es ist davon auszugehen, dass der Einsatz größerer Reaktoren als bislang verwendet, die sich abzeichnende Tendenz Richtung höherer Ökoeffizienz noch deutlich verstärken würde.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse des Projekts wurden in Vorträgen auf den Konferenzen „1st ESACT Frontiers Retreat“ in Lyon (2016), „Cell line development (CLD) Europe“ in Amsterdam (2016) und „2nd International Advanced Biomanufacturing Conference“ in Sheffield (2016) vorgestellt. Als Poster wurden die Daten auf dem „25th ESACT Meeting“ in Lausanne (2017) präsentiert. Die Ergebnisse flossen in die Publikation „Stable miRNA overexpression in human CAP cells: Engineering alternative production systems for advanced manufacturing of biologics using miR-136 and miR-3074“. Benjamin L. Weis, Nadine Guth, Simon Fischer, Silke Wising, Nicole Faust, Karl-Heinz Holzmann, René Handrick, Kerstin Otte. Submitted, ein.

Fazit

Ziel des gemeinsamen Forschungsprojektes war die signifikante Produktivitätssteigerung von humanen Expressionszelllinien zur Ressourcenschonung bei der Herstellung von Biopharmaka. Hierzu sollte erstmals die noch junge und hoch innovative miRNA-Technologie für humane CAP-Produktionszellen eingesetzt werden, die vom Kooperationspartner CEVEC Pharmaceuticals GmbH zur Verfügung gestellt werden. Die Überexpression von miRNAs konnte erfolgreich für CAP-Zellen etabliert werden. Für miR-136 sowie miR-3074 konnte in stabil überexprimierenden CAP-Zellpools eine signifikant gesteigerte Produktivität und verbessertes Wachstum erzielt werden. Zusätzlich wurde ein leicht protektiver Effekt unter Stressbedingungen erzielt. Die erzielte Produktivitätssteigerung fiel eher moderat aus im Vergleich zu zuvor durchgeführter transienter Überexpression und war in der Stärke abhängig von verwendeten Kultivierungsbedingungen. Molekulare Wirkmechanismen für die signifikante Produktivitätssteigerung bedingt durch Überexpression von miR-136 und miR-3074 konnten analysiert werden. Die Evaluierung mittels Ökoeffizienzanalyse konnte durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde durch fehlende Informationen zu den Inhaltsstoffen des Mediums erschwert. Die Ergebnisse zeigen eine positive Tendenz.

Inhaltsverzeichnis

1	Aktuelle Problemstellung und Ziel Projekts.....	Seite 6
2	Arbeitspakete.....	Seite 7
3	Ergebnisse	Seite 8
3.1	Ergebnisse Arbeitspaket 1	Seite 8
3.2	Ergebnisse Arbeitspaket 2a	Seite 11
3.3	Ergebnisse Arbeitspaket 2b	Seite 15
3.4	Ergebnisse Arbeitspaket 3	Seite 17
4	Diskussion	Seite 20
5	Öffentlichkeitsarbeit und Präsentationen	Seite 21
6	Gesamtfazit zum Projekt.....	Seite 22
7	Literatur.....	Seite 22
8	Anhang.....	Seite 25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Energiebedarf für Sterilisation, Reinigung, Einwegmaterialien und Gesamtverbrauch zur Zellkultivierung.

Abbildung 2: Kumulativer Energiebedarf und global warming potential und Wasserverbrauch einer 2.000 L Fermentationsanlage zur Herstellung rekombinanter Proteine mit tierischen Zelllinien während des gesamten Anlagenlebenszyklus.

Abbildung 3: Testung der Promotoraktivität.

Abbildung 4: Etablierung stabiler Zellpools.

Abbildung 5: Charakterisierung der stabilen Zellpools.

Abbildung 6: Upscale batch-Experiment.

Abbildung 7: ambr® 15 parallel cultivation.

Abbildung 8: IgG titer from the ambr® 15 parallel cultivation.

Abbildung 9: Osmotic shock experiment.

Abbildung 10: Identifizierung zugrundeliegender zellulärer Mechanismen.

Abbildung 11: Ökoeffizienzmatrix zum Vergleich der verschiedenen Szenarien.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Overview of the chosen cell culture conditions.

Tabelle 2: Ausgewählte differentiell regulierte Gene für CAP-mAb-miR-136 und -miR-3074.

Tabelle 3: Titer für die Szenarien im Erlenmeyerkolben sowie die Szenarien im 10 L-Maßstab.

1 Aktuelle Problemstellung und Ziel des Projekts

Biopharmazeutika sind vielversprechende, hoch effiziente, aber auch hoch komplexe Proteinmedikamente wie zum Beispiel monoklonale Antikörper, Zytokine und Peptidhormone für medizinische Anwendungsgebiete wie immunologische Erkrankungen und Krebs, Stoffwechsel, Hämatologie sowie Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Derzeit haben Biopharmazeutika bezogen auf den Umsatz einen Anteil von 19 Prozent am deutschen Gesamtpharmamarkt, die Tendenz ist nach wie vor steigend. Der größte Teil entfällt auf rekombinante Antikörper, die derzeit auch ca. 30 % aller in der klinischen Prüfung befindlichen Biopharmazeutika ausmachen. Biopharmazeutische Wirkstoffe zählen jedoch auch zu den teuersten Arzneimitteln und die Produktion erfolgt mit großem technischem und ressourcenaufwändigem Einsatz.

Die Herstellung komplexer Biopharmaka erfolgt mithilfe von tierischen Zelllinien, die gentechnisch modifiziert und zur großtechnischen Produktion als Suspensionszellen in Bioreaktoren kultiviert werden (Wurm 2004). Die weltweite Gesamtkapazität pharmazeutischer Produktionsanlagen übersteigt inzwischen 1.000.000 Liter (L). Die Zellkultivierung wird dabei entweder in Edelstahlfermentationsanlagen (Arbeitsvolumen bis 12.500 L) oder in Einwegbioreaktoren (Arbeitsvolumina bis 2.000 L) durchgeführt. Der notwendige Energiebedarf für beide Strategien ist sehr groß und liegt schon für eine Anlage mit einem Arbeitsvolumen von 1.000 L pro Kultivierung zwischen 1,2 und 2,25 MWh (Abb. 1).

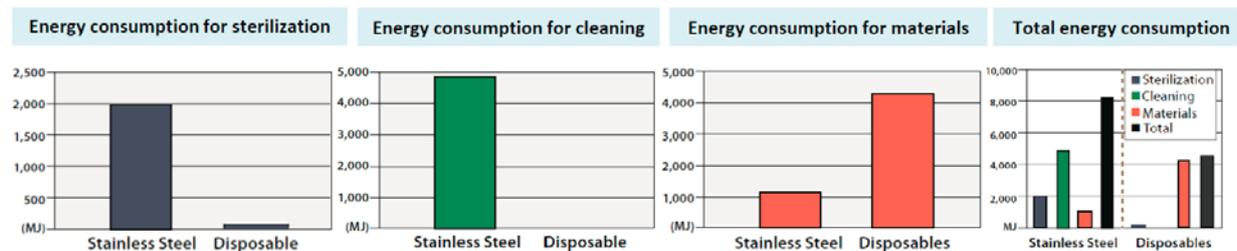


Abbildung 1: Energiebedarf für Sterilisation, Reinigung, Einwegmaterialien und Gesamtverbrauch zur Zellkultivierung. Verglichen werden Kultivierung in einer 1.000 L Edelstahl-Fermentationsanlage im Vergleich zu einem Einwegbioreaktor pro Kultivierung (Rawlings et al., 2009).

Über den gesamten Lebenszyklus einer Fermentationsanlage mit einem Arbeitsvolumen von 2.000 L gerechnet liegt der kumulierte Energiebedarf bei 1.000-1.600 MWh, das *global warming potential* (in CO₂-Äquivalenten) bei 200-350 Tonnen und der Gesamtwasserverbrauch bei 600.000-800.000m³ (Abb. 2). Weiterhin werden für die Reinigung von Edelstahlfermentern große Mengen Chemikalien wie Säuren und Basen sowie hochreines Wasser (water for injection, WFI) benötigt.

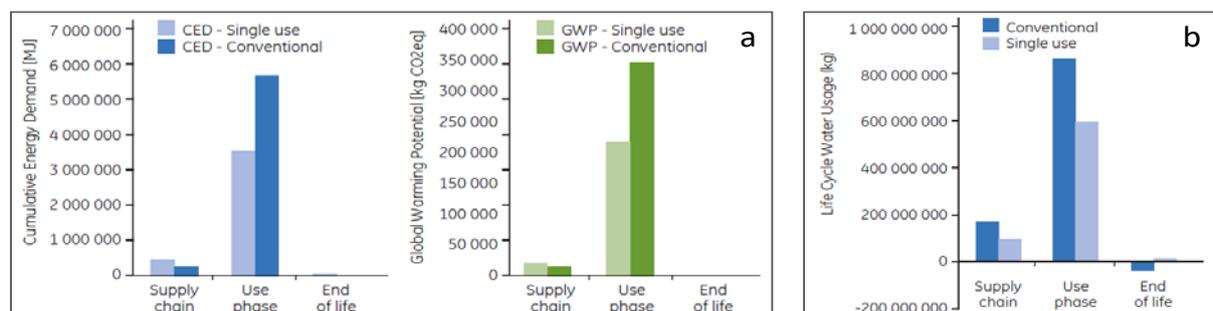


Abbildung 2: a) Kumulativer Energiebedarf und global warming potential und (b) Wasserverbrauch einer 2.000 L Fermentationsanlage zur Herstellung rekombinanter Proteine mit tierischen Zelllinien während des gesamten Anlagenlebenszyklus. ‚single use‘ entspricht einer Anlage mit Einwegbioreaktoren, ‚conventional‘ einer klassischen Edelstahl-Anlage; Quelle: Pietrzykowski et al., 2011).

Ein effektiver Weg zur Verringerung des Energiebedarfs, Wasserverbrauchs und Verbrauchs an Reinigungsmaterial liegt in der Steigerung der Prozesseffizienz im Fermentationsprozess für Biopharmazeutika. Diese Effizienzsteigerung führt zu einer Reduktion der benötigten Ressourcen und stellt damit eine wirkungsvolle Möglichkeit zur Verringerung der Umweltbelastung dar.

Zur Steigerung der Prozesseffizienz kommt der Optimierung der Produktionszelllinie neben der Optimierung von Prozessparametern eine stetig wachsende Bedeutung zu (Kim et al., 2012). Eine neuartige Methode zur genetischen Veränderung bietet die globale Modulation von gesamten Signalwegen durch mikroRNA (miRNA)-Regulatoren, welche als „molekulare Werkzeuge“ zur Modulierung von Genexpression in bereits etablierte Zelllinien eingebracht werden können. miRNAs sind kleine nicht-kodierende RNA Moleküle mit zentraler Bedeutung für viele biologische Prozesse. Diese nicht-kodierenden RNAs regulieren jeweils eine Vielzahl verschiedener Gene und fungieren somit als zentrale Regulatoren der Genexpression (Pasquinelli et al., 2012). Diese globale Genregulation macht sie zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für die Optimierung von Produktionszelllinien. Hierbei können miRNAs als „molekulare Werkzeuge“ durch transientes oder stabiles Einbringen in eukaryontische Produktionszellen prozessrelevante Vorgänge wie Expression von Proteinen und zelluläres Wachstum optimiert und zur Etablierung von Hochproduktionszelllinien genutzt werden.

Zur Herstellung von therapeutischen Antikörpern werden überwiegend *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen genutzt (Wurm 2004, Fliedl et al., 2014). Für diese Zellen wurde von uns und anderen bereits gezeigt, dass distinkte miRNAs einen positiven Einfluss auf Proteinproduktion und Zellwachstum haben und damit grundsätzlich als Werkzeuge für die Zelllinienentwicklung verwendet werden können (Barron et al., 2011, Druz et al., 2013, Jadhav et al., 2014, Fischer et al., 2014). Für andere Zellen wie z. B. humane Zelllinien liegen jedoch noch keine Arbeiten vor. Ein neues humanes Zellsystem zur stabilen Proteinexpression sind die von primären humanen Amniozyten abgeleiteten immortalisierten CAP[®]-Zellen (*CEVEC's Amniocyte Production*, CEVEC Pharmaceuticals GmbH, Schiedner et al., 2008). Diese Zellen sind in idealer Weise zur Produktion von Biopharmazeutika geeignet, da sie in Suspension in gerührten Bioreaktoren kultiviert werden können und ein humanes Glykosylierungsmuster der produzierten Proteine zeigen.

Ziel des Forschungsprojektes war daher die signifikante Produktivitätssteigerung von CAP-Expressionszelllinien zur Herstellung von Biopharmaka. Hierzu sollte erstmals die noch junge und hoch innovative miRNA-Technologie für humane CAP[®]-Produktionszellen eingesetzt werden, die von CEVEC Pharmaceuticals GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Dabei sollte evaluiert werden, ob miRNAs als „molekulare Werkzeuge“ in humanen Produktionszellen prozessrelevante zelluläre Vorgänge wie Expression von Proteinen und zelluläres Wachstum optimieren können. Eine weitere Steigerung der Prozesseffizienz mit dem Ziel der Ressourcenschonung sollte durch Anpassung der Prozessparameter nach Charakterisierung der modifizierten Zelllinie evaluiert werden. Begleitend sollte eine Ökobilanzierung durchgeführt werden.

2 Arbeitspakete

Das Gesamtprojekt war in drei Arbeitspakete aufgeteilt. Im Arbeitspaket 1 mit Start am 15. Januar 2016 wurden an der Hochschule Biberach (HBC) die in eigenen Vorarbeiten identifizierten, potentiell produktionssteigernden miRNAs in Expressionsvektoren subkloniert und zur Etablierung stabil überexprimierender CAP[®]-Produktionszellen (CAP-mAb) verwendet. Die resultierenden stabilen Produktionszellpools wurden auf prozessrelevante Parameter untersucht. Im Arbeitspaket 2a wurden die effizientesten Produktionszelllinien zu CEVEC

Pharmaceuticals transferiert, evaluiert sowie in einen miniaturisierten Produktionsprozess überführt. Parallel wurden im Arbeitspaket 2b zur Absicherung gegen unerwünschte Nebenwirkung die Wirkmechanismen der miRNA-induzierten Produktionssteigerung durch Transkriptionsanalyse und pPCR an der Hochschule Biberach analysiert. Arbeitspaket 3 umfasste die begleitende Ökobilanzierung durch das ifu Institut für Umweltinformatik Hamburg.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse Arbeitspaket 1 - Stabile miRNA Expression und Validierung (Hochschule Biberach)

Das initiale Kick-off Meeting mit allen Projektpartnern fand am 15. Februar 2016 in Köln bei CEVEC Pharmaceuticals statt. Hier wurden initiale Schritte zur Etablierung von stabilen miRNA-Zelllinien sowie die Rahmenbedingungen zur Aufnahme der relevanten Daten für die ökobilanzielle Bewertung des Ausgangsprozesses abgesprochen.

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Liste der sechs beantragten miRNAs durch weitere, potentiell pro-produktive miRNAs komplementiert, die in eigenen Vorarbeiten identifiziert wurden (Fischer et al., 2014). Zur Etablierung von stabilen, miRNA überexprimierenden Zelllinien wurde ein Expressionsvektor benötigt, in den die genomischen Sequenzen sowie flankierende Regionen der pre-miRNA kloniert werden konnten. Der von uns regelmäßig verwendete Expressionsvektor (miRNASelect™ pEGP-miR expression vector, Cell Biolabs Inc.) enthält jedoch eine Variante des EF-1 α Promotors (EF-1 α -long), welcher in CAP®-Zellen möglicherweise nicht aktiv ist. Daher wurde der im Plasmid befindliche EF-1 α -long-Promotor durch eine kurze EF-1 α Variante (EF1-short) und alternativ durch einen CMV-Promoter ersetzt. Zur Testung der Expressionsvektoren wurden in die drei Ausgangsvektoren (pEGP-EF1short, pEGP-EF1long, pEGP-CMV) die genomische Precursorsequenz für miR-136 kloniert. Nach Transfektion der drei miRNA-Plasmide sowie der entsprechenden Kontrollplasmide ohne miRNA (miR-NULL) konnte im Durchflusszytometer die Aktivität der Promotoren über gekoppelte GFP-Expression analysiert werden (Abb. 3). Hierbei zeigte sich, dass Vektoren mit CMV Promotor die mit Abstand höchste miRNA-Expression zeigten. Die durchschnittliche GFP-Fluoreszenz nach Transfektion hier mehr als 30-fach erhöht gegenüber beiden EF1-Promotoren. Im weiteren Verlauf des Projekts wurde der pEGP-CMV Vektor als Ausgangsplasmid genutzt.

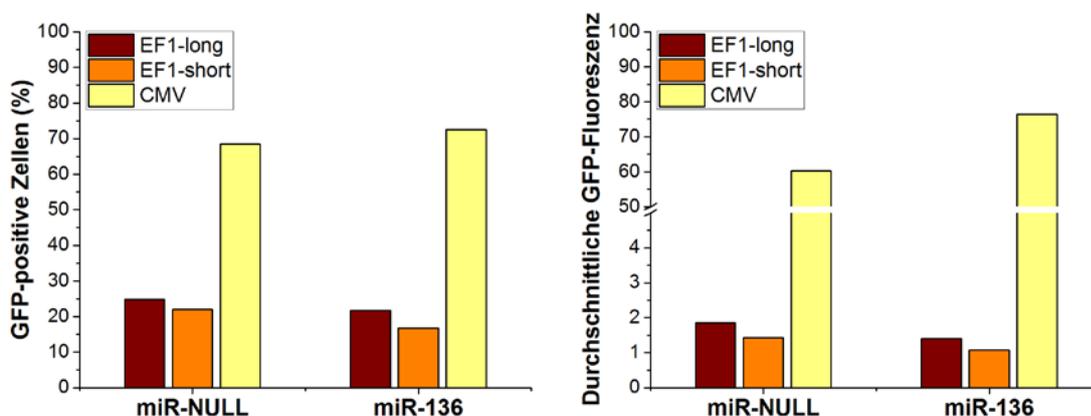


Abbildung 3: Testung der Promotoraktivität. Links: Transfektionseffizienz gezeigt durch GFP-positive Zellen. Bei beiden EF-1 Promoter-Plasmiden ist anzunehmen, dass die eigentliche Transfektionseffizienz weitaus höher ist, aber durch die schlechte GFP-Expression lässt sich dies nicht korrekt messen. Rechts: Durchschnittliche GFP-Fluoreszenz der kompletten Zellpopulation. Diese ist mehr als 30-fach höher für den CMV-Promoter als bei beiden Versionen des EF1-Promoters.

Zur Etablierung der finalen miRNA Expressionsplasmide wurde die genomische Sequenz aller miRNAs plus flankierender genomischer Sequenz (pre-miRNAs) entweder käuflich erworben (miRNA-1-1, -136, -219, -30a, -30e, -483 und -484) oder durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert (miRNA-370, -3074, -764 und -99b). Alle pre-miRNA Sequenzen wurden in den pEGP-CMV Vektor kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Zur Etablierung stabil miRNA-exprimierender CAP-Produktionszelllinien wurden alle miRNA-Expressionsplasmide sowie die miR-NULL Kontrolle durch Elektroporation in eine CAP-Zelllinie transfiziert, welche einen therapeutischen Antikörper exprimiert (CAP-mAb). Subsequente Antibiotikaselektion mittels Puromycin und Kultivierung über 40 Tage führte bei allen miRNA-Expressionskonstrukten sowie der Kontrolle zur stabilen Integration ins Genom und damit zu einem Überleben unter Selektionsdruck (Abb. 4).

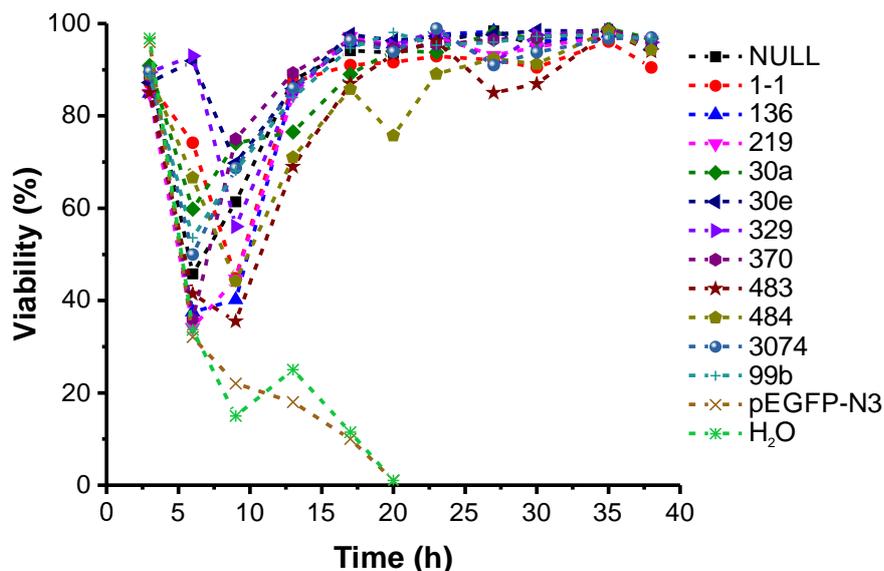


Abbildung 4: Etablierung stabiler Zellpools. Die Produktionszelllinie CAP-bmA wurde an Tag 0 mit den miRNA-Expressions-plasmiden sowie einer Negativkontrolle oder H₂O mittels Nucleofektion transfiziert. Am Tag 3 startete die Selektion durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin. Nach Ansteigen der Viabilität am Tag 13 wurde die Puromycinkonzentration auf 10 µg/ml erhöht und die Zellen bis zum Erreichen einer stabilen und hohen Viabilität weiter kultiviert.

Die Negativkontrollen (H₂O anstatt DNA und pEGFP-N3 (GFP-exprimierendes Plasmid ohne Puromycinresistenz)) starben durch die Wirkung von Puromycin. Anschließend wurde von den stabilen Zellpools mittels qPCR die Expression der jeweiligen muren miRNA nachgewiesen (Abb. 5A). Die meisten miRNAs konnten erfolgreich überexprimiert werden. Insbesondere für miRNA-1, -136, -483 und -3074 konnte die Expression um 500-10.000-fach gegenüber der Kontrolllinie gesteigert werden. MiR-219, 370, -30e und 30a zeigten eine moderate Überexpression von 5 bis 40-fach. Für miRNA-329, -484 und -99b konnte keine Überexpression nachgewiesen werden und somit wurden diese Zellpools nicht weiter bearbeitet.

Um zu evaluieren, ob die miRNA-Überexpression zu einer Steigerung der Produktivität führt, wurden alle miRNA-überexprimierenden, stabilen Zellpools in einem batch-Experiment im 12-well Maßstab kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellkonzentration, Viabilität und der Antikörpertiter gemessen (Abb. 5B, C, D).

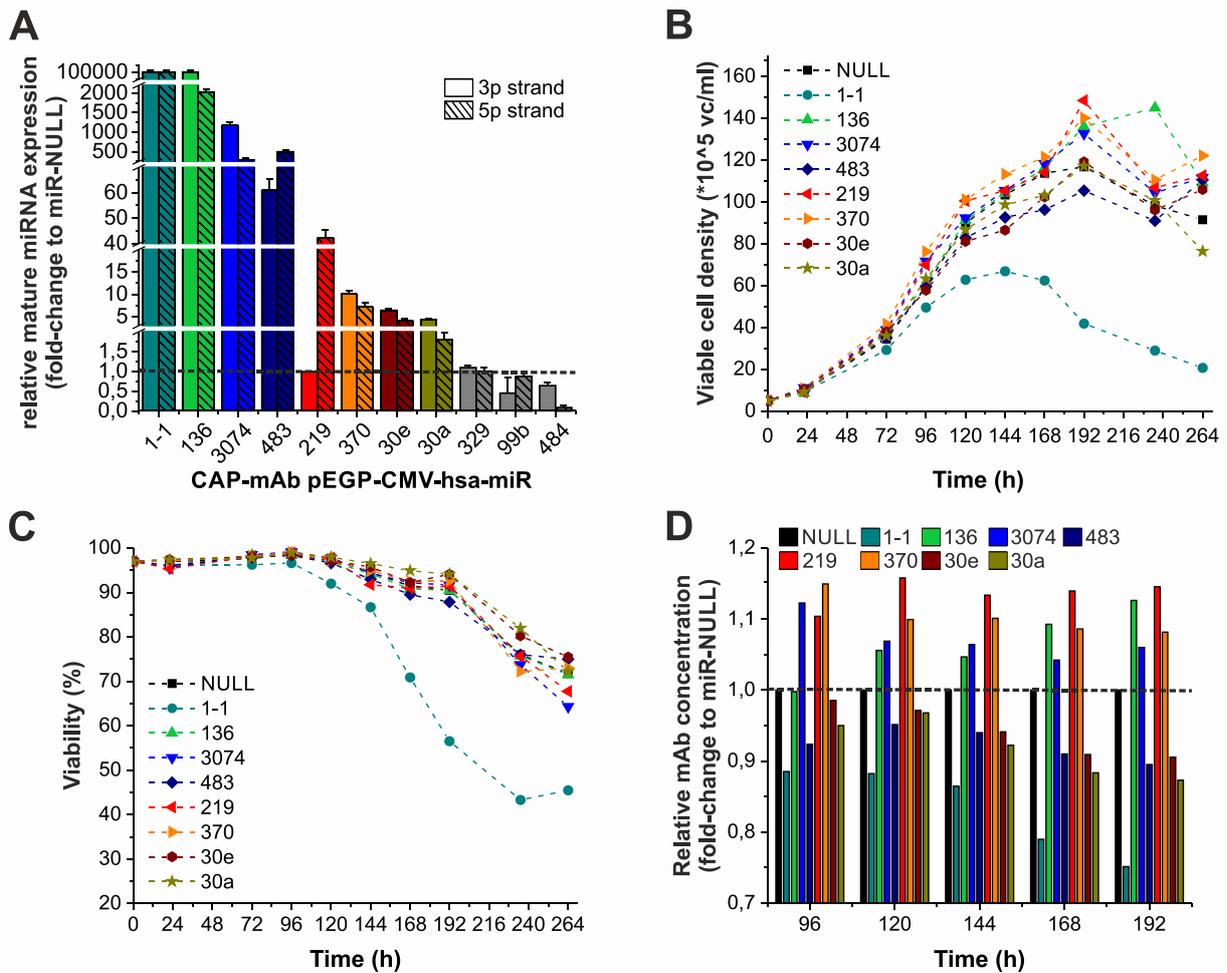


Abbildung 5: Charakterisierung der stabilen Zellpools. (A) Die stabilen Zellpools wurden auf Überexpression der miRNAs analysiert. Am Tag 32 nach Transfektion wurde RNA isoliert, reverse Transkription und qPCR der miRNA durchgeführt. Überexprimierende Zelllinien wurden in einem batch-Experiment im 12-well Maßstab hinsichtlich Zellkonzentration (B) und Viabilität (C) mittels Trypanblauausschluss überprüft. Die Antikörperkonzentration wurde mittels Protein A HPLC von Tag 4 bis 8 analysiert und als fold-change gegenüber CAP-mAb-miR-NULL gezeigt (D).

Eine moderate Steigerung der viablen Zelldichte (VCD) konnte für CAP-mAb-miR-136, -3074, -370 und -219 detektiert werden, CAP-mAb-miR-1-1 zeigte hingegen eine starke Reduktion im Zellwachstum und wurde daher verworfen (Abb. 5B). Die Viabilität war für alle Zellpools ähnlich, nur CAP-mAb-miR-1-1 zeigte eine starke Reduktion (Abb. 5C). Bezüglich der Produktion monoklonaler Antikörper konnten vier Zellpools mit gesteigerter Produktivität identifiziert werden. Dazu gehörten CAP-mAb-miR-136, -miR-3074, -miR-219 und -miR-370 mit einer Steigerung von 13%, 6%, 15% und 8% nach 192 Stunden.

Diese vier stabilen Zellpools mit Überexpression von miR-136, -3074, -219 und -370 wurden in einem vergrößerten Produktionsmaßstab in 250 ml Schüttelkolben untersucht (Abb. 6).

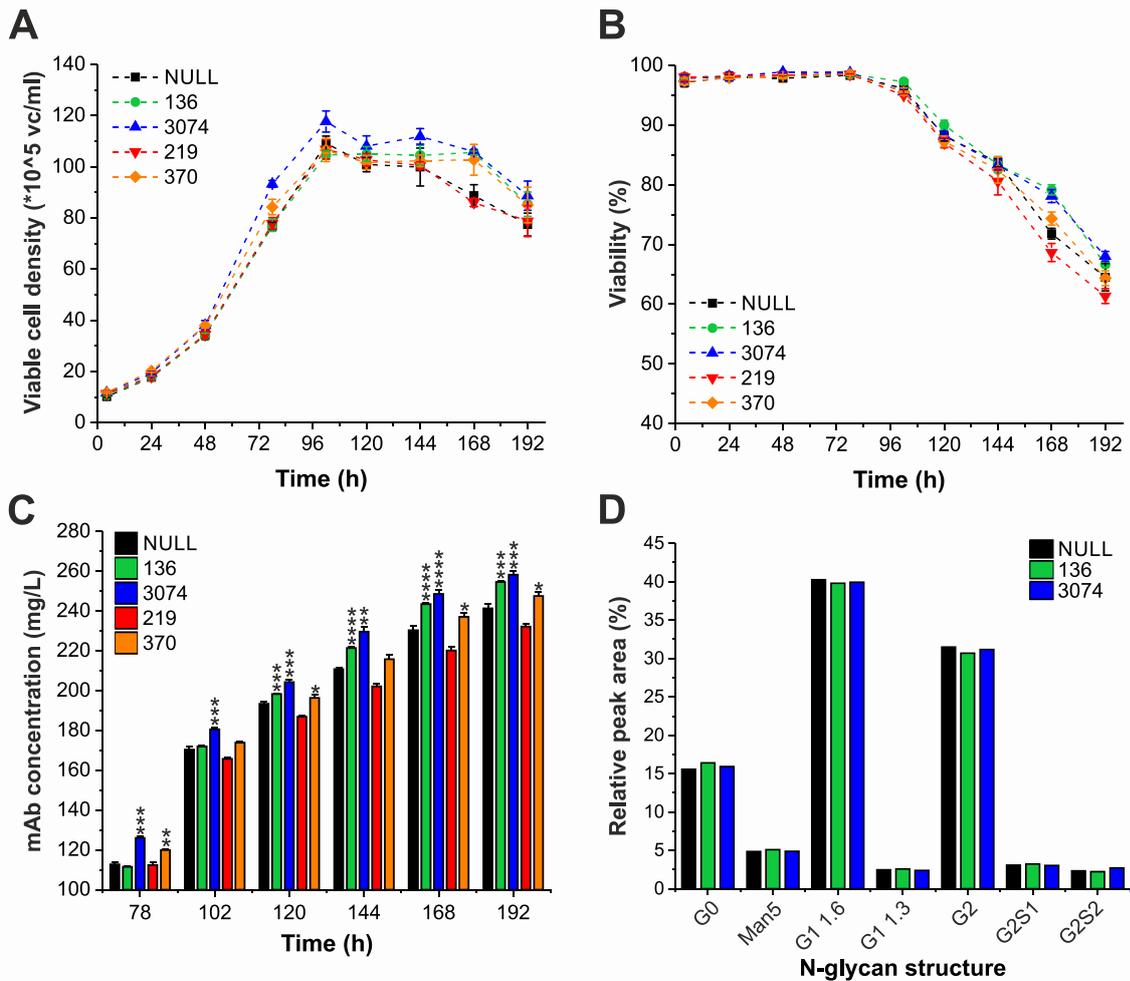


Abbildung 6: Upscale batch-Experiment. Stabile CAP-mAb-miR Zellpools wurden in 250 ml Schüttelkolben für 8 Tage kultiviert. Die Zellkonzentration (A) und Viabilität (B) wurde ab Beginn des Experiments bestimmt. Die Antikörperkonzentration wurde ab Tag 3 gemessen (C). Das Glykosylierungsmuster wurde durch hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) bestimmt (D).

CAP-mAb-miR-3074, -miR-136 und miR-370 zeigten leicht erhöhte VCD (Abb. 6A), CAP-mAb-miR-136 und -miR-3074 leicht erhöhte Viabilität (Abb. 6B). Diese Verbesserungen führten möglicherweise final zu einem signifikant erhöhten Antikörpertiter für CAP-mAb-miR-136 und CAP-mAb-miR-3074 von 5.7 % und 8.9 % im Vergleich zu CAP-mAb-miR-NULL nach 192h (Abb. 6C). Für miR-370 wurde in diesem Experiment nur eine schwach signifikante Erhöhung der Produktivität erreicht. Die nachfolgende Analyse der Glykanstruktur der produzierten Antikörper zeigte, dass die Überexpression von miR-136 und miR-3074 keinen Einfluss auf die Glykosylierung und damit keinen Einfluss auf die Produktqualität hat (Abb. 6D). Die stabilen Zellpools der miR-NULL, miR-136, miR-370 und miR-3074 wurden an CEVEC Pharmaceuticals übergeben.

3.2 Arbeitspaket 2a - Analyse der stabilen Zelllinien und Überführung in den Produktionsprozess (CEVEC Pharmaceuticals)

Frozen aliquots of the stable cell pools miR-NULL, miR-136, miR-370 and miR-3074 were transferred to CEVEC Pharmaceuticals. After thawing, cells were expanded and a research seed bank was prepared for each pool. Subsequently cells were tested negative for the presence of mycoplasma and positive for sterility.

To confirm the obtained antibody expression data from the University of Biberach a batch culture under controlled conditions was performed. In addition, potential protective effects of miRNA overexpression in cells that are stressed by e.g. physico-chemical stressing conditions were tested due to earlier findings in CHO cells where the overall effect of miRNAs was higher in low producer production cell lines compared to high producer cell lines (Fischer et al. 2014). Therefore we transferred the cell lines to a bioreactor platform system (ambr® 15, Sartorius). The ambr®15 system enables running 24 bioreactors in parallel (10 - 15 mL working volume) under controlled conditions (stirring, temperature, pH, dissolved oxygen (DO), process mode) and integrated cell counting. This allows screening of different cultivation conditions of selected generated pools side-by-side in stirred-tank bioreactor environment. In addition to regular cultivation conditions, three different stress conditions were tested, a decreased seeding cell density of 3×10^5 cells/mL, pH7,5 instead of 7,1, oxygen stress (DO), and an increased osmolarity of 350 mOsm/kg (see also Tabelle 1 for exact culture conditions). The cells were cultured for 7 days in batch mode in CAP CDM medium.

Tabelle 2: Overview of the chosen cell culture conditions. Shifts from pH 7,1 to pH 7,5, from 40 % DO to 30 % or 50 %, and osmolarity up to 350 mOsm/kg were performed on day 3 in order to support cell growth during the early batch culture and apply stress conditions to cells at logarithmic growth.

ID	Temp. (°C)	rpm	Seeding cell density (#/mL)	pH	DO (%)	Osmolarity (mOsm/kg)
1	37	1300	1,00E+06	7,1	40	275-295
2	37	1300	3,00E+05	7,1	40	275-295
3	37	1300	1,00E+06	7,5	40	275-295
4	37	1300	1,00E+06	7,1	30	275-295
5	37	1300	1,00E+06	7,1	50	275-295
6	37	1300	1,00E+06	7,1	40	350

Abbildung 7 shows the viable cell densities and cell viabilities over the course of the batch culture of CAP-mAb-miR-NULL, -miR-136, -miR-370 and -miR-307. Due to a failure of a cell culture vessel, the CAP-mAb-miR-NULL culture for osmotic stress died post seeding.

Overall, some differences could be detected. In the cultures grown under standard conditions, the CAP-mAb-miR-370 pool grew faster during the early exponential growth phase compared to the other pools (Abb. 7A), resulting after 168 h batch culture in viable cell densities from $1,1$ to $1,3 \times 10^7$ cells/mL. While applying different stress conditions, a similar observation could be made for low %DO stress with a shift from 40 % to 30 % at 72 h of culture. Here all miRNA pools grew faster in the early exponential growth phase compared to the CAP-mAb-miR-NULL (Abb. 7D), resulting after 168 h culture in batch in viable cell densities of 1 to $1,3 \times 10^7$ cells/mL. Finally, after applying high %DO stress with a shift from 40 % to 50 % at 72 h of culture, CAP-mAb-miR-3074 reached a higher viable cell density than the other pools of approximately 2×10^6 cells/mL higher than the other pools at 120 h of culture (Abb. 7E), with a decline at 168 h culture resulting in a similar range of viable cell density for all pools (approximately $1,1 \times 10^7$ cells/mL). None of the cellular stress tested in this experiment led to a lethal effect on the cell culture, also not on the CAP-mAb-miR-NULL control. Average cell doubling time did not change after applying the stress. In detail the average doubling time over the first five days of culture (taking in account all the conditions per pool, $n = 5$ for CAP-miR-Null and $n = 6$ for all the other pools) were very similar with CAP-miR-136 = 35 ± 1 h, CAP-miR-370 = 35 ± 2 h, CAP-miR-3074 = 35 ± 1 h, only the CAP-miR-NULL control had a slightly higher average cell doubling time with miR-Null = 36 ± 1 h. Cell viabilities were comparable for all cultures (Abb. 7G).

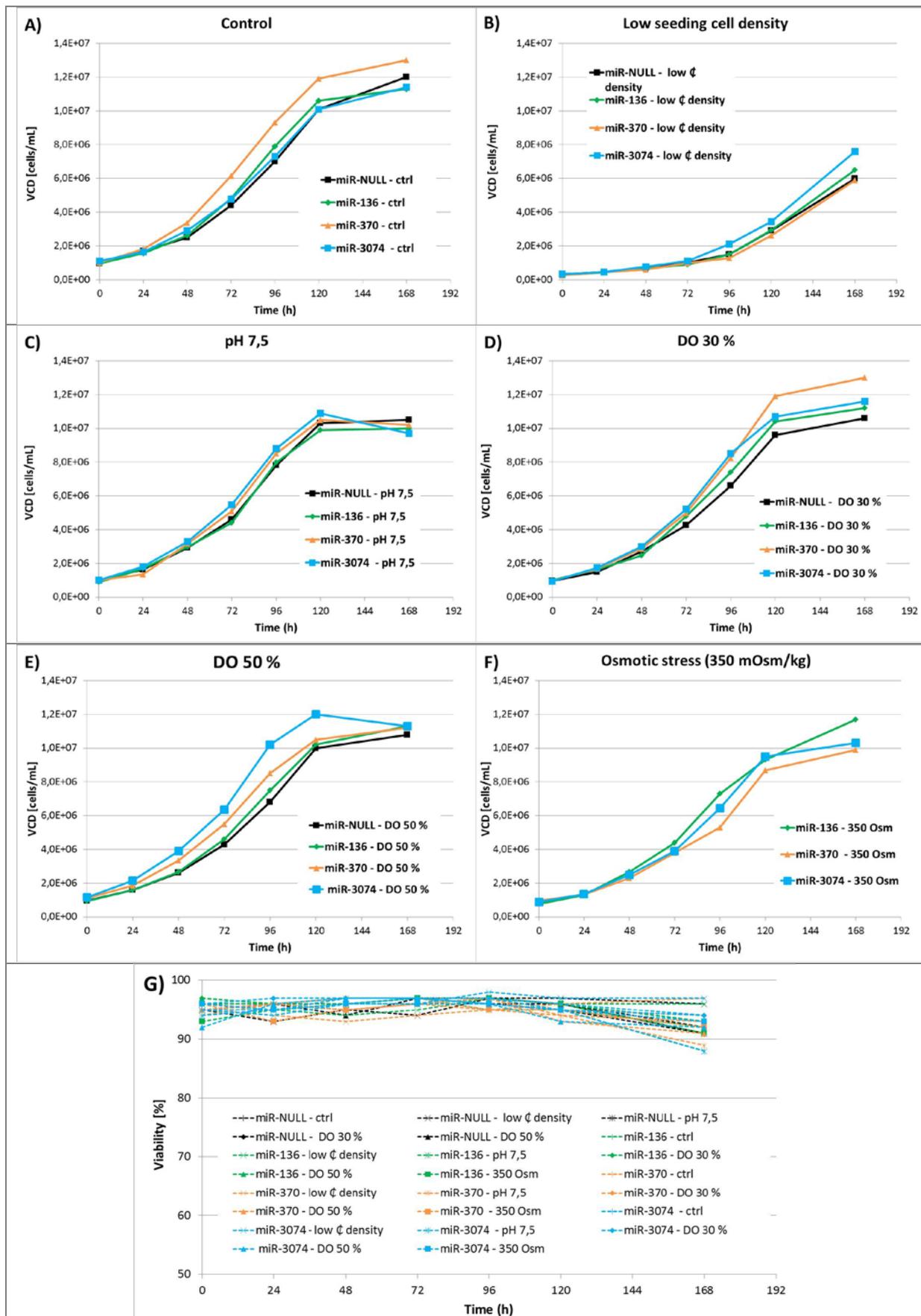


Abbildung 7: ambr® 15 parallel cultivation. Stable miR expressing cell lines were cultivated for 7 days at 15 ml scale. Six different culture conditions were applied. Viable cell density (VCD, A-F) and cell viability (G) were determined automatically daily.

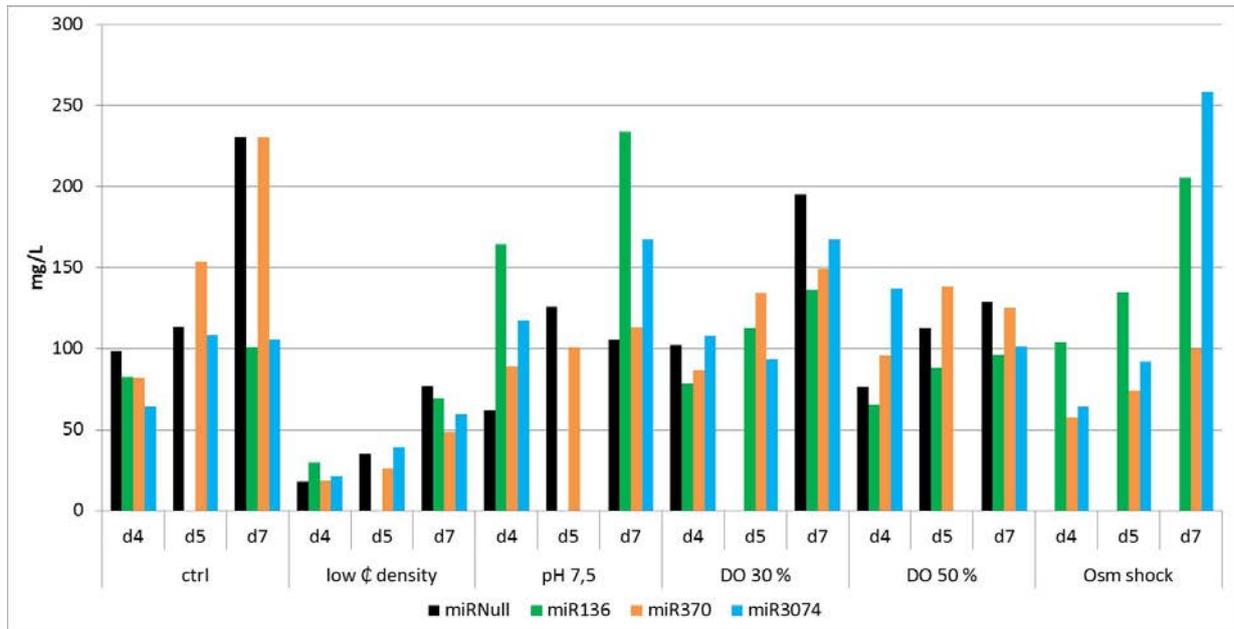


Abbildung 8: IgG titer from the ambr® 15 parallel cultivation. IgG titer at day 4, day 5, and day 7 were determined by human IgG sandwich ELISA. Product titers are displayed for each of the six culture conditions tested depending on the data available. The product titers are calculated based on duplicate per point and weighted average calculation (BioRad ELISA device + software).

Abbildung 8 displays the mAb concentration obtained during the course of the parallel bioreactor cultivation experiment. Under control conditions (ctrl), the pool CAP-mAb-miR-370 was comparable to the CAP-mAb-miR-NULL control, whereas the pools CAP-mAb-miR-136 and CAP-mAb-miR-3074 were lower, especially at day 7. When stress stimuli were applied there were alterations between the different miRNA overexpressing CAP-mAb pools detectable. For the CAP-mAb-miR-NULL pool and the -miR-370 pool all cellular stress conditions led to decreased productivity compared to the respective non-stressed cultures. However, for CAP-mAb-miR-136 all cellular stress applied, except low seeding density and higher %DO (50 %), led to an increase in productivity most pronounced in samples in which either pH or osmolarity was increased. In addition, CAP-mAb-miR-3074 displayed a similar pattern, all cellular stress applied, except low seeding density and higher %DO (50 %), led to an increase in productivity most pronounced in the osmotic shock sample.

In order to examine the positive effect on productivity in the CAP-mAb-miR-136 and -miR-3074 pools in more detail (especially including the missing -miR-Null control lost in this experiment) a follow-up experiment was performed. For this, the CAP-mAb-miR-NULL, -miR-136, and -miR-3074 were cultured in a larger scale at 125 mL shake flasks at standard cultivation conditions (37 °C, 185 rpm, 5 % CO₂, seeding density 1x10⁶ cells/mL, pH and DO uncontrolled). On day 3 cells were treated with sorbitol as before to induce an osmotic shock (Abbildung 9).

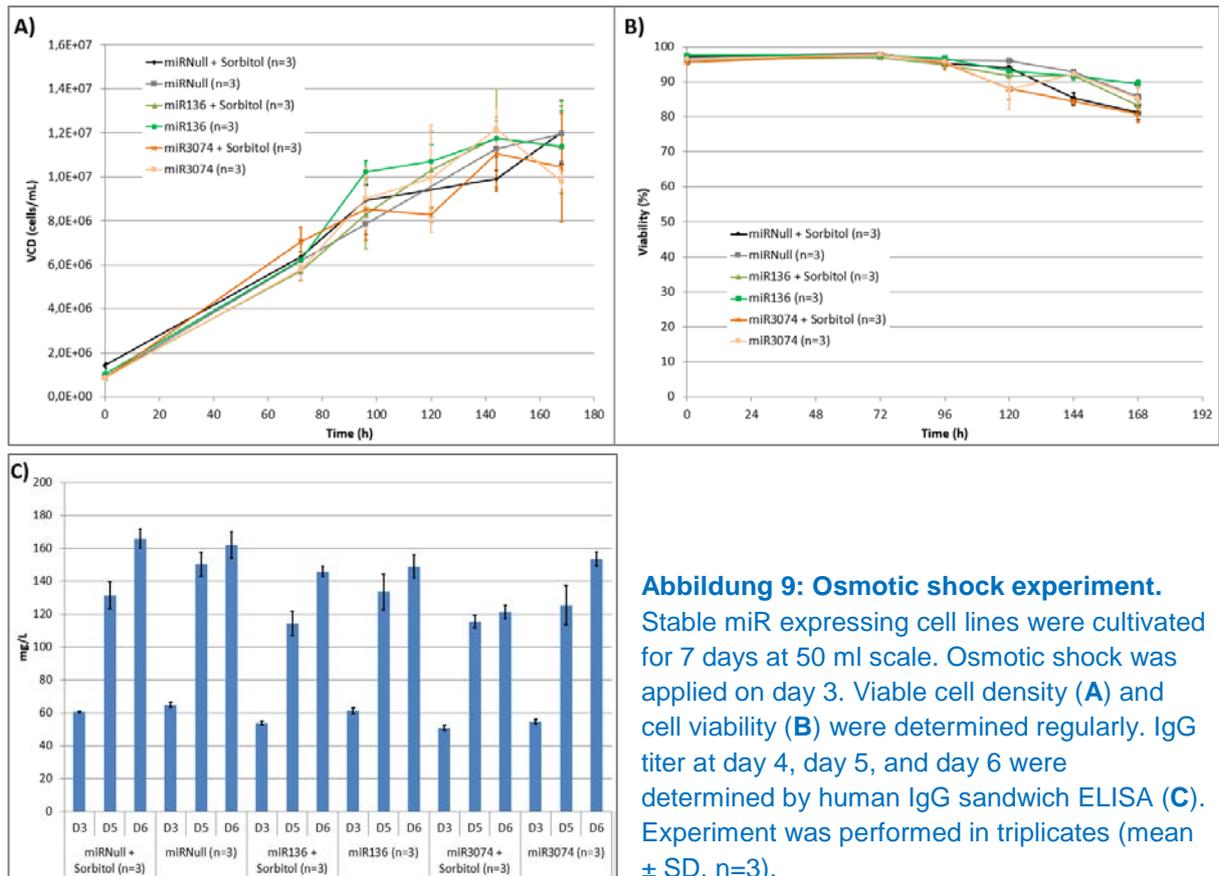


Abbildung 9: Osmotic shock experiment. Stable miR expressing cell lines were cultivated for 7 days at 50 ml scale. Osmotic shock was applied on day 3. Viable cell density (A) and cell viability (B) were determined regularly. IgG titer at day 4, day 5, and day 6 were determined by human IgG sandwich ELISA (C). Experiment was performed in triplicates (mean \pm SD, n=3).

In this osmotic shock experiment performed in shake flasks, all three pools tested displayed comparable cell growth performance, regardless if an osmotic stress was applied or not.

In contrast to the previous experiment, which was performed under controlled conditions in micro culture vessels, during this shake flasks experiment no positive impact of the miRNAs tested could be observed after applying osmotic shock conditions as mAb productivity was comparable in all three cell pools tested.

3.3 Teilprojekt 2b - Aufklärung des zellulären Wirkmechanismus (Hochschule Biberach)

miRNAs als kleine nicht-kodierende RNA Moleküle führen ihre regulative Funktion in der Zelle durch Bindung an Ziel-mRNAs aus, welche nachfolgend abgebaut oder deren Translation inhibiert wird. Durch die nur unvollständige Bindung an die Zielsequenz in der 3' untranslatierten Region der Ziel-mRNA können miRNAs eine Vielzahl an mRNAs regulieren und fungieren daher als zentrale Netzwerkregulatoren in vielen zellulären Prozessen. Um zugrundeliegende zelluläre Mechanismen für erhöhte Proteinproduktion durch miRNA Überexpression zu analysieren, wurde die differentielle Genexpression in den Produktionszellen nach stabiler Überexpression von miR-3074 und miR-136 im Vergleich zur Negativkontrolle mittels Affimetrix Microarray Technologie untersucht. In miR-136 überexprimierenden CAP-Zellen wurden verglichen mit CAP-mAb-miR-NULL vierzig Gene als signifikant differentiell reguliert gefunden. 25 dieser Gene waren lange, nichtkodierende RNAs (lncRNAs), deren Funktion völlig unbekannt ist (Daten nicht gezeigt), 11 Gene kodieren für Proteine oder miRNAs (Tabelle 2). Für CAP-mAb-miR-3074 wurden 42 Gene als differentiell reguliert identifiziert, wovon 31 nicht-kodierende RNAs mit unbekannter Funktion waren, proteinkodierende Gene und miRNAs sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Ausgewählte differentiell regulierte gene für CAP-mAb-miR-136 und –miR-3074. Dargestellt ist der fold-change im Vergleich zu CAP-mAb-miR-NULL nach Expressionsanalyse mittels Affimetrix Microarray Technologie (Universität Ulm, Core Facility Genomics).

CAP-mAb-miR-136				
Gensymbol	Genname	Accession	Fold-change	p-value
USP17L15	Ubiquitin specific peptidase	NM_001256894	0.59	0.044
MIR4311	microRNA 4311	MI0015841	0.59	0.021
USP32P2	Ubiquitin specific peptidase	NR_003554	0.60	0.013
HIST1H2A	Histone Cluster 1, H2AA	NM_170745	0.62	0.024
LILRA6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A	NR_104098	0.64	0.0089
HIST1H2BB	Histone Cluster 1, H2BB	NM_021062	0.64	0.0059
IGIP	IgA-inducing protein	NM_001007189	1.56	0.0060
ALG10B	Alpha-1,2-glucosyltransferase	NM_001013620	1.61	0.039
RTL1	Retrotransposon-like 1	NM_001134888	1.97	0.012
CAP-mAb-miR-3074				
Gensymbol	Genname	Accession	Fold-change	p-value
OR1E2	Olfactory receptor	NM_003554	0.51	0.029
OR2M7	Olfactory receptor	NM_001004691	0.59	0.008
OR5R1	Olfactory receptor	NM_001004744	0.63	0.025
MIR509-3	microRNA 509-3	MI0005717	0.51	0.047
MIR1205	microRNA 1205	MI0006338	1.69	0.032
MIR24	microRNA 24	MI0000080	2.5	0.0004

Die differentielle Genregulation im Microarrayexperiment durch Überexpression von miR-3074 oder miR-136 im Vergleich zu miR-NULL ist in Abb. 10 A und B dargestellt, die Validierung erfolgte durch qPCR Experimente. Für CAP-mAb-miR-3074 wurde die Reduktion der Expression für zwei olfaktorische Rezeptoren (OR2M7 und OR5R1) und pre-miR-509-3 sowie die Erhöhung der Expression von pre- und mature miR-24 bestätigt (Abb. 10C). Für CAP-mAb-miR-136 Zellpools konnten USP17L15, HIST1H2AA und HIST1H2BB, sowie LIRA6 in qPCR Experimenten validiert werden (Abb. 10D).

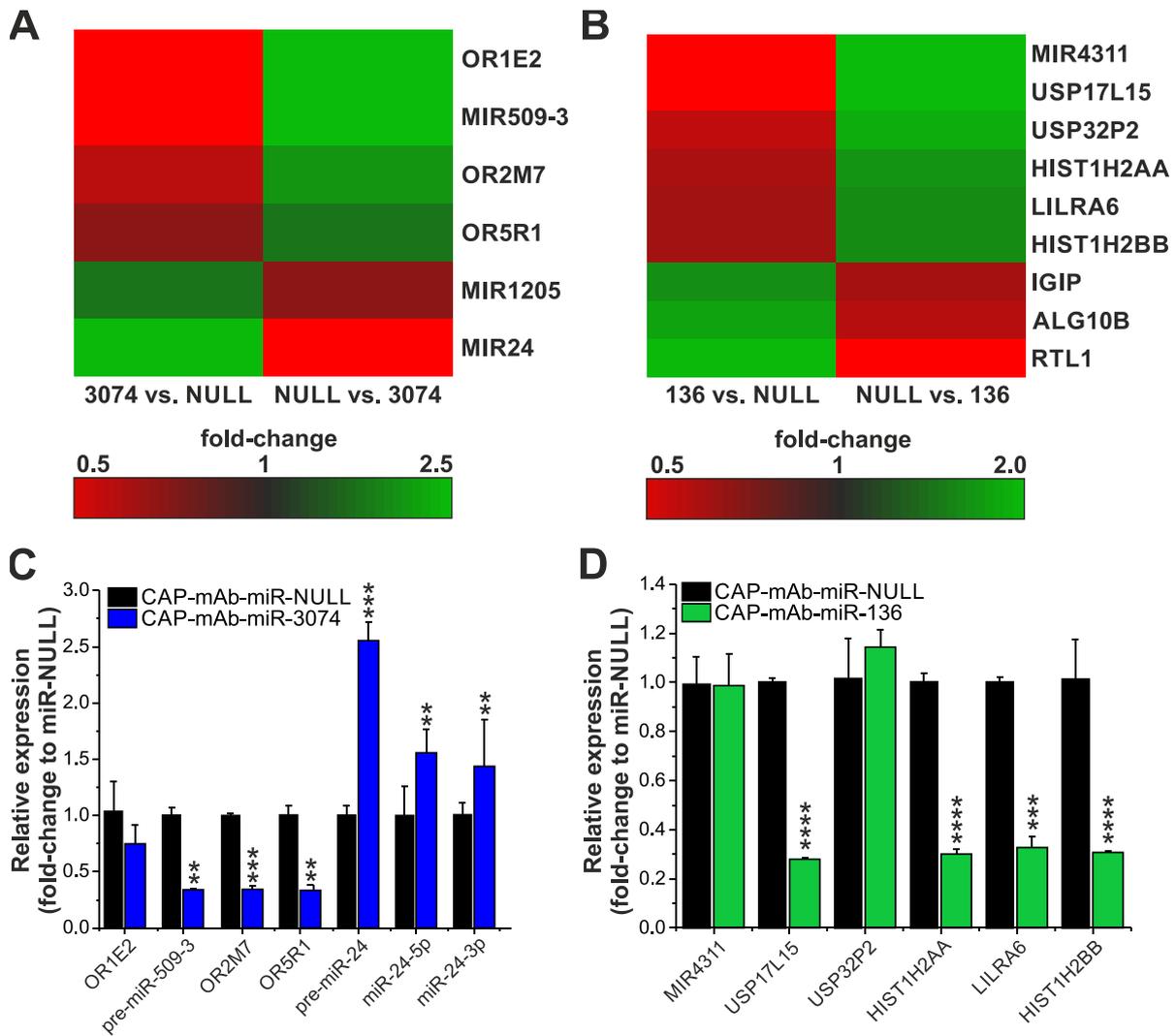


Abbildung 10: Identifizierung zugrundeliegender zellulärer Mechanismen. (A, B) Differentielle Genregulation wurde mit Affymetrix human gene Chip 2.0 für CAP-mAb-miR-NULL, CAP-mAb-miR-136, CAP-mAb-miR-3074 analysiert. (C, D) Differentiell regulierte Gene von A und B wurden mittels qPCR in technischen Triplikaten validiert und als fold-change verglichen mit CAP-mAb-miR-NULL dargestellt.

3.4 Arbeitspaket 3 - Begleitende Ökobilanzierung (ifu Institut Hamburg)

Dieses Arbeitspaket umfasste die Analyse der Ökoeffizienz der im Projekt erreichten Ergebnisse. Eine Ökobilanz ist eine ganzheitliche Umweltbewertung eines Produktes. Durch die Einbeziehung aller Vorketten wird sichergestellt, dass Umweltauswirkungen nicht unbemerkt in andere Lebenszyklusphasen verlagert werden. Wird diese Sichtweise ergänzt durch die ökonomische Perspektive, spricht man von Ökoeffizienz. Das Ergebnis kann dann in einer sogenannten Ökoeffizienzmatrix dargestellt werden. Das Vorgehen in diesem Arbeitspaket orientiert sich an den entsprechenden Normen für die Erstellung von Ökobilanzen (ISO 14040/44) sowie die Erstellung von Ökoeffizienzanalysen (ISO 14045).

Gegenstand der Analyse sind die im Projekt durchgeführten Arbeiten. Es werden die folgenden Szenarien bewertet:

Kultivierung der folgenden Zellpools im Schüttelkolben (50ml Maßstab):

- CAP-mAb-miR-Null
- CAP-mAb-miR-136
- CAP-mAb-miR-219
- CAP-mAb-miR-370
- CAP-mAb-miR-3074

Kultivierung der folgenden Zellpools im Maßstab 10 L:

- CAP-mAb-miR-Null
- CAP-mAb-miR-136
- CAP-mAb-miR-370
- CAP-mAb-miR-3074

Um die Vergleichbarkeit herzustellen wird der Titer mit einbezogen. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die gleiche Menge der Zielsubstanz (1 g Antikörper) im Medium. Die Ergebnisse werden relativ zueinander dargestellt.

Zur Bewertung wurden Daten von der Hochschule Biberach sowie CEVEC Pharmaceuticals genutzt. Für die Kultivierung im Einweg-Erlenmeyerkolben (50 ml Medium im 250 ml Kolben) stellte die Hochschule Biberach Daten zu Materialverbrauch, Vorgehen und erreichten Titern zur Verfügung. CEVEC Pharmaceuticals stellte Daten zur Modellierung für die Szenarien der Kultivierung im 10 L-Maßstab zur Verfügung. Für den Materialverbrauch wurden vornehmlich Daten aus Arbeiten mit 1 L Arbeitsvolumen genutzt. Weiteres Material (Reaktor) wurde für das Modell ergänzt. Die Versuche, wie die Zellpools auf verschiedene Bedingungen reagieren, wurden von CEVEC im Schüttelkolben (50 mL Medium, n=3) durchgeführt. Es wurde jeweils die Variante bewertet, bei dem der Titer den höchsten Durchschnittswert erreichte. 3 zeigt die Titer für alle Szenarien.

Tabelle 3: Titer für die Szenarien im Erlenmeyerkolben sowie die Szenarien im 10 L-Maßstab. Für letztere ist zusätzlich die Stressbedingung angegeben, bei der dieser Titer erreicht wurde.

	Szenarien Erlenmeyerkolben	Szenarien 10 L	
	Titer (mg/L)	Titer (mg/L)	Stressbedingung
CAP-mAb-miR-NULL	241,39	230	ctrl
CAP-mAb-miR-136	254,61	234	pH 7,5
CAP-mAb-miR-219	232,25		
CAP-mAb-miR-370	247,58	230	ctrl
CAP-mAb-miR-3074	258,27	258	Osm shock

Zur Bewertung wurden in der Stoffstromanalyse-Software Umberto NXT Universal v7.1 ein Stoffstrommodell aufgebaut, das über die Anpassung von Parametern alle Szenarien abbilden kann. Die Systemgrenzen wurden so gewählt, dass alle Vorketten der eingesetzten Materialien (etwa Chemikalien, Gase und Verbrauchsmaterialien wie Schüttelkolben) und Energien beinhaltet. Die Analytik wurde nicht mit einbezogen.

Das Hintergrundsystem, das die Lebenszyklusperspektive realisiert, wurde überwiegend mit Datensätzen aus der Sachbilanzdatenbank ecoinvent v3.3 erstellt. Als geographische Verortung wurde Europa gewählt. Es wurde das System Model "Allocation, cut-off" genutzt. Als Bewertungsmethode wurde EcoIndicator99 ausgewählt. Dies ist ein sogenannter Single-Score-Indicator. Durch die Nutzung einer solchen Methode wird die Darstellung in der Ökoeffizienzmatrix ermöglicht.

Für einige Materialien mussten Datensätze neu erstellt bzw. angepasst werden. Für wenige Materialien, die in kleineren Mengen vorhanden sind wurde eine Methode angewandt, bei der ökologische Rucksack anhand von Molekülstrukturmerkmalen abgeschätzt wird (entwickelt von Wernet et al., 2009). Für Energieverbräuche konnten keine Messwerte vor, daher wurden die Prozesse mit Hilfe von Literaturwerten (bspw. Biwer 2003) unter Berücksichtigung ihrer physikochemischen Eigenschaften modelliert. Aus Geheimhaltungsgründen lagen für das genutzte Medium nur wenige Informationen vor. Die bekannten Inhaltsstoffe sind in den entsprechenden Konzentrationen im Modell berücksichtigt.

Preise von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden großteils von CEVEC zur Verfügung gestellt und durch eigene Recherchen ergänzt. Als ökonomische Dimension werden die Kosten von Materialien und Energie genutzt. Dieses Vorgehen ist zweckmäßig für den gegebenen Entwicklungsstand des Prozesses. Diese Werte sind ebenfalls im Stoffstromnetz enthalten. So ist die Berechnung von sowohl der ökologischen als auch der ökonomischen Dimension mittels des gleichen Stoffstrommodells möglich.

Abbildung 11 zeigt die Ökoeffizienzmatrix. Eine solche Matrix ist jeweils geeignet, um Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Je weiter ein Datenpunkt im 90°-Winkel über der diagonalen Linie liegt, desto größer ist die Ökoeffizienz im Vergleich zu den anderen bewerteten Alternativen. Daraus folgt, dass sich die Punkte mit der größten Ökoeffizienz in Richtung der oberen rechten Ecke orientieren. Weiter folgt daraus, dass es immer zwei Möglichkeiten gibt, die Ökoeffizienz zu erhöhen: Die Verminderung der Umweltwirkung oder eine Reduzierung der Kosten.

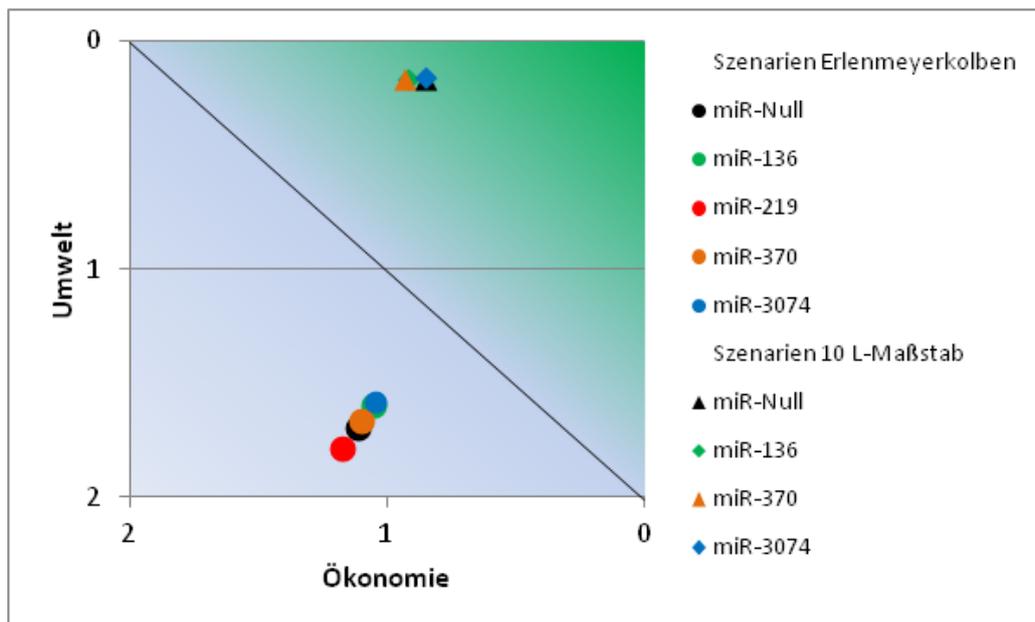


Abbildung 11: Ökoeffizienzmatrix zum Vergleich der verschiedenen Szenarien. Alle runden Datenpunkte wurden an der HS Biberach in Schüttelkolben-Experimenten erhoben. Alle eckigen Datenpunkte (Dreiecke und Rauten) bilden die Kultivierung im größeren Maßstab bei CEVEC ab. Die Ergebnisse sind normalisiert dargestellt und beziehen sich jeweils auf die gleiche Menge der Zielsubstanz.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass sich die Ergebnisse in zwei Clustern gruppieren: Die Szenarien im Einweg-Erlenmeyerkolben sind unter der schrägen Linie zu finden, die Szenarien im 10 L-Maßstab befinden sich über dieser Linie. Letztere sind also als ökoeffizienter zu bewerten. Hierbei ist wichtig zu wissen, dass beide Gruppen jeweils vom Einsatz der nach der Kultivierung entsorgten Behältnissen (Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat bzw. Single-Use-Reactor) dominiert werden, deren Einfluss in den 10 L-Szenarien relativ geringer ausfällt.

4 Diskussion

Ein effektiver Weg zur Verringerung des Energiebedarfs, Wasserverbrauchs und Verbrauchs an Reinigungsmaterial liegt in der Steigerung der Prozesseffizienz im Fermentationsprozess für Biopharmaka. Im aktuellen Projekt sollte eine neuartige Methode zur genetischen Optimierung von Produktionszellen genutzt werden, in der miRNAs als „molekulare Werkzeuge“ durch stabiles Einbringen in eukaryontische Produktionszellen prozessrelevante zelluläre Vorgänge wie Expression von Proteinen und zelluläres Wachstum verändern können. Zur Modulation wurde ein neues humanes Zellsystem genutzt, die von primären humanen Amniozyten abgeleiteten immortalisierten CAP[®]-Zellen, welche in idealer Weise zur Produktion von Biopharmazeutika geeignet sind, da sie in Suspension in gerührten Bioreaktoren kultiviert werden können und ein humanes Glykosylierungsmuster der produzierten Proteine zeigen.

Basierend auf einem vorangegangenen Screening wurden 11 miRNAs ausgesucht und stabil in CAP-mAb Zellen überexprimiert. Signifikante Überexpression konnte für 8 stabile Zellpools verifiziert werden, fehlende Überexpression in 3 Zellpools kann auf bereits hohe Basalexpression in CAP-Zellen oder fehlende Funktionalität der klonierten genomischen pre-miRNA Sequenz zurückzuführen sein.

Alle stabilen, miRNA überexprimierenden Zellpools wurden kultiviert und Produktionsparameter gemessen. In einem kleinen Produktionsmaßstab konnte eine Steigerung der Lebendzellichte für CAP-mAb-miR-136, -3074, -370 und -219 detektiert werden, welche auch gesteigerte Produktivität von 6 – 15 % nach 3 Tagen Kultivierungsdauer zeigten (Abb. 5). Diese Steigerung der Produktivität kann möglicherweise durch die erhöhte Viabilität erklärt werden.

Im nachfolgenden Produktionsexperiment in vergrößertem Maßstab von 250 ml im Schüttelkolben zeigten wiederum CAP-mAb-miR-3074, -miR-136 und miR-370 leicht erhöhte Viabilität und Lebendzellichte (Abb. 6). Diese Verbesserungen führten möglicherweise final zu signifikant erhöhtem Antikörpertiter für CAP-mAb-miR-136 und CAP-mAb-miR-3074 von ca 6 und 9 %i. Die Überexpression von miR-136 und miR-3074 hatte dabei keinen Einfluss auf die Glykosylierung und damit die Produktqualität.

Die in Biberach erzeugten Daten bezüglich erhöhter Lebendzellichte in den CAP-mAb-miR-3074, miR-136 und miR-370 Zellpools im Vergleich zur NULL Kontrolle konnten von CEVEC Pharmaceuticals im reguliertem Rührbioreaktor verifiziert werden. Zusätzlich wurde ein leicht protektiver Effekt unter Stressbedingungen (erhöhter oder abgesenkter DO) für die miRNA überexprimierenden Zellpools beobachtet werden.

Die unter Produktionsbedingungen an der Hochschule Biberach beobachteten Produktivitätssteigerung von 10 – 15 % in CAP-Produktionszellen ist als eher moderat anzusehen im Vergleich zu Optimierungen in CHO Produktionszellen (Fischer et al., 2017, Strotbek et al., 2013). CHO Zellen haben eine lange Kultivierungsgeschichte und sowie ein bekanntermassen instabiles Genom (Baik and Lee, 2017a, Baik and Lee, 2017b, Wurm, 2013). Im Gegensatz hierzu sind CAP-Zellen ein sehr junges Produktionssystem, welches unter kontrollierten Bedingungen etabliert wurde (Schiedner et al., 2008). Daher sind CAP-Zellen möglicherweise genetisch stabiler und somit weniger einfach genetisch zu modulieren, welches die eher moderaten Produktionssteigerungen erklären könnte. Auch im Vergleich zu früheren Studien mit transienter Expression der ausgewählten miRNAs, in denen vielversprechende Aktivitäten von bis zu 25 % Produktionssteigerung in CAP-Zellen erzielt wurden (Weis et al, submitted), ist die stabile Expression als eher moderat anzusehen. Auch dieser Unterschied mag in der eher erschwerten genomischen Modulation von CAP-Zellen begründet sein.

Die moderate, aber signifikant Erhöhung der Antikörpertiter in den CAP-mAb-miR-136 und CAP-mAb-miR-3074 Kulturen wurde allerdings unter Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor bei CEVEC Pharmaceuticals nicht verifiziert. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedlich

verwendeten IgG Detektionsmethoden zurückzuführen. Im Gegensatz zur Hochschule Biberach, verfügt CEVEC nicht über eine Möglichkeit zur Messung der Antikörpertiter mittels Protein A HPLC, aus diesem Grund wurde die Detektion mittels ELSIA durchgeführt. Allerdings weist diese Detektionsmethode eine inter- und intra- Assay Variabilität auf, die deutlich über der zur erwarteten Produktionssteigerungen liegt.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Produktionssteigerung durch miR-136 und miR-3074 bei gleichbleibender Glykosylierung der produzierten Antikörper konnten durch Microarray-Experimente und qPCR analysiert werden. So ist die Steigerung der Viabilität in durch miR-3074 möglicherweise auf die Hochregulation von miR-24 zurückzuführen, die durch ihre proliferative und onkogene Funktion zu erhöhter Zelldichte und somit zu erhöhter Produktivität führen könnte (Chen et al., 2016, Zhao et al., 2015, Zhang et al., 2016). Zusätzlich hat möglicherweise die Herunterregulation von miR-509 durch ihre bekannte anti-proliferative Funktion positiven Einfluss auf Wachstum und Viabilität der Produktionszellen (Wang et al., 2017, Wang et al., 2016). Die Herunterregulation von Histon-kodierenden Genen in miR-136 überexprimierenden Zellen könnte zum generellen Anstieg der Transkription führen und damit mehr mRNA für die Produktion von Antikörpern liefern. Zusätzlich wurde eine Peptidase (wurde USP17L15, *Ubiquitin specific peptidase*) herunterreguliert, was zu vermindertem Abbau des Antikörpers führen könnte.

Begleitend wurde eine Ökobilanzierung durchgeführt. Abbildung 3 erweckt den Anschein, dass im Projektverlauf eine Steigerung der Ökoeffizienz erreicht wurde. Schließlich befinden sich die Szenarien im 10 L-Maßstab über der Diagonalen, während die Szenarien mit 50 ml Volumen, deren Daten aus Experimenten stammen, die zeitlich früher im Projekt liegen, unter der diagonalen Linie zu finden sind. Die Deutung der Matrix sollte jedoch sehr vorsichtig geschehen: Die Ergebnisse der Ökobilanz werden stark durch die einmalige Verwendung der Behältnisse dominiert. Rawlings et al. haben 2009 Arbeiten veröffentlicht, die unter den angenommenen Bedingungen die Vorteilhaftigkeit von Einwegbioreaktoren aufzeigen. Alle Szenarien nutzen ausschließlich Einweg-Behältnisse. Bei größeren Arbeitsvolumina tragen diese, relativ gesehen, weniger zum Ergebnis bei als bei kleineren (wie den Szenarien im Erlenmeyerkolben). So werden die Szenarien mit größeren Arbeitsvolumina vorteilhaft bewertet, obwohl dort niedrigere Titer erreicht werden (siehe Tabelle 2). Es ist davon auszugehen, dass der Einsatz größerer Reaktoren als bislang im Projekt verwendet, die sich abzeichnende Tendenz Richtung höherer Ökoeffizienz noch deutlich verstärken können.

Bei der Deutung der Ergebnisse sollte zudem beachtet werden, dass das Medium nicht zufriedenstellend abgebildet wurde und damit sicherlich in dieser Analyse unterschätzt wird. Mit den vorliegenden Daten lässt sich bezüglich der Ökoeffizienz keine signifikante Steigerung im Projektzeitraum erkennen. Für eine deutliche Steigerung der Ökoeffizienz, wäre eine deutliche Steigerung des erreichten Titers erforderlich. Dieser kann zudem eine Hebelwirkung für einen effizienteren Ablauf von Downstream-Prozessen entfalten. Optimal wäre dies bei gleichzeitiger Verkürzung der Kultivierungsdauer. Der größere Hebel liegt jedoch in einem höheren Gehalt der Zielsubstanz.

5 Öffentlichkeitsarbeit und Präsentationen

Präsentationen und Vorträge

Benjamin Weis	1st ESACT Frontiers Retreat, Lyon, 2016 Titel: "Generation of high production cell lines for a sustainable production of biopharmaceuticals"
Kerstin Otte	Cell line development (CLD) Europe, Amsterdam, 2016

Kerstin Otte Titel: "The latest research findings on engineering cell lines by using microRNAs"
2nd International Advanced Biomanufacturing Conference, Sheffield, 2016
Titel: "Effective MicroRNAs for Next-Generation CHO Cell Engineering"

Posterpräsentation

Benjamin Weis 25th ESACT Meeting, Lausanne, 2017
Title: "Cell line engineering using miRNAs in a novel human production cell line. Further Authors: Benjamin L. Weis, Nadine Guth, Silke Wissing, Nicole Faust, Rene Handrick, Kerstin Otte

Publikation

Stable miR-3074 overexpression in human CAP cell lines: Engineering alternative production systems for advanced manufacturing of biologics. Benjamin L. Weis, Nadine Guth, Simon Fischer, Silke Wissing, Nicole Faust, Karl-Heinz Holzmann, René Handrick, Kerstin Otte. Submitted to Biotechnology and Bioengineering.

6 Gesamtfazit zum Projekt

Ziel des gemeinsamen Forschungsprojektes war die signifikante Produktivitätssteigerung von humanen Expressionszelllinien zur Ressourcenschonung bei der Herstellung von Biopharmaka. Hierzu sollte erstmals die noch junge und hoch innovative miRNA-Technologie für humane CAP-Produktionszellen eingesetzt werden, die vom Kooperationspartner CEVEC Pharmaceuticals GmbH zur Verfügung gestellt werden.

Die Überexpression von miRNAs konnte erfolgreich für CAP-Zellen etabliert werden. Für miR-136 sowie miR-3074 konnte in stabil überexprimierenden CAP-Zellpools eine signifikant gesteigerte Produktivität und verbessertes Wachstum erzielt werden. Zusätzlich wurde ein leicht protektiver Effekt unter Stressbedingungen erzielt. Die erzielte Produktivitätssteigerung fiel eher moderat aus im Vergleich zu zuvor durchgeführter transienter Überexpression und war in der Stärke abhängig von verwendeten Kultivierungsbedingungen. Die erzielten Daten zeigen jedoch, dass auch CAP Zellen durch Einsatz der miRNA-Technologie genetisch optimiert werden können. Molekulare Wirkmechanismen für die signifikante Produktivitätssteigerung bedingt durch Überexpression von miR-136 und miR-3074 konnten analysiert werden.

Die Evaluierung mittels Ökoeffizienzanalyse konnte durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde durch fehlende Informationen zu den Inhaltsstoffen des Mediums erschwert. Die Ergebnisse zeigen eine positive Tendenz. Diese ist in einer Größenordnung, die nicht als signifikant einzuordnen ist. Mit den Zelllinien, die Gegenstand dieser Bewertung waren konnte im Projektverlauf keine hierfür ausreichende Erhöhung des Titers erreicht werden.

7 Literatur

Baik JY, Lee KH. A framework to quantify karyotype variation associated with CHO cell line instability at a single-cell level. *Biotechnol. Bioeng.* 2017a, 114:1045–1053.

Baik JY, Lee KH. Growth Rate Changes in CHO Host Cells Are Associated with Karyotypic Heterogeneity. *Biotechnol. J.* 2017b, doi: 10.1002/biot.201700230.

Barron N, Kumar N, Sanchez N, Doolan P, Clarke C, Meleady P, O'Sullivan F, Clynes M. Engineering CHO cell growth and recombinant protein productivity by overexpression of miR-7. *J Biotechnol.* 2011, 151(2), 204-11

- Biwer A. Modellbildung, Simulation und ökologische Bewertung in der Entwicklung biotechnologischer Prozesse. Dissertation. 2003.
- Chen L, Luo L, Chen W, Xu HX, Chen F, Chen LZ, Zeng WT, Chen JS, and Huang XH. MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion by targeting p53: miR-24 targeted p53. *Biomed. Pharmacother.* 2016, 84, 1113–1118.
- Druz A, Son YJ, Betenbaugh M, Shiloach J. Stable inhibition of mmu-miR-466h-5p improves apoptosis resistance and protein production in CHO cells. *Metab Eng.* 2013, 16, 87-94.
- ecoinvent Centre (2017):ecoinvent v3.3. Dübendorf, Schweiz
- Fischer S, Buck T, Wagner A, Ehrhart C, Giancaterino J, Mang S, Schad M, Mathias S, Aschrafi A, Handrick R, Otte K. A functional high-content miRNA screen identifies miR-30 family to boost biopharmaceutical production in CHO cells. *Biotechnol J.* 2014, 10, 1279-92.
- Fischer S, Paul AJ, Wagner A, Mathias S, Geiss M, Schandock F, Domnowski M, Zimmermann J, Handrick R, Hesse F, Otte K. MiR-2861 as novel HDAC5 inhibitor in CHO cells enhances productivity while maintaining product quality. *Biotechnol Bioeng.* 2015, 112(10), 2142-53.
- Fischer S, Marquart KF, Pieper LA, Fieder J, Gamer M, Gorr I, Schulz P, Bradl H. miRNA Engineering of CHO Cells Facilitates Production of Difficult-to-Express Proteins and Increases Success in Cell Line Development. *Biotechnol Bioeng.* 2017, 114 (7), 1495–1510.
- Fliedl L, Grillari J, Grillari-Voglauer R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *N Biotechnol.* 2014, 32(6), 673-9.
- International Organization for Standardization (2012): Environmental management - Eco-efficiency assessment of product systems - Principles, requirements and guidelines (ISO 14045)
- International Organization for Standardization (2006): Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework (ISO 14040)
- International Organization for Standardization (2006): Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines (ISO 14044).
- Jadhav V, Hackl M, Klanert G, Hernandez Bort JA, Kunert R, Grillari J, Borth N. Stable overexpression of miR-17 enhances recombinant protein production of CHO cells. *J Biotechnol.* 2014, 175, 38-44.
- Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012, 13(4), 271-82.
- Pietrzykowski M, Flanagan W, Pizzi V, Brown A, Sinclair A, Monge M. An environmental life-cycle assessment comparing single-use and conventional process technology. *BioPharm International.* 2011, 24, 30-38.
- Rawlings B, Pora Helene. Environmental Impact of Single-Use and Reusable Bioprocess Systems *BioProcess International.* 2009, Feb, 18-25.
- Schiedner G, Hertel S, Bialek C, Kewes H, Waschütza G, Volpers C. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection. *BMC Biotechnol.* 2008, Feb 12, 8-13.
- Schoellhorn M, Fischer S, Wagner A, Handrick R, Otte K. miR-143 targets MAPK7 in CHO cells and induces a hyperproductive phenotype to enhance production of difficult-to-express proteins. *Biotechnol Prog.* 2017, doi: 10.1002/btpr.2475
- Strotbek M, Florin L, Koenitzer J, Tolstrup A, Kaufmann H, Hausser A, Olayioye M. Stable microRNA expression enhances therapeutic antibody productivity of Chinese hamster ovary cells. *Metab Eng.* 2013, 20,157–166.
- Wang P, Deng Y, and Fu X. MiR-509-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer by targeting YWHAG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 482, 935–941.
- Wang XH, Lu Y, Liang JJ, Cao JX, Jin YQ, An GS, Ni JH, Jia HT, and Li SY. MiR-509-3-5p

- causes aberrant mitosis and anti-proliferative effect by suppression of PLK1 in human lung cancer A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 478, 676–82.
- Wernet G, Papadokonstantakis S, Hellweg S, Hugnerbühler K. Bridging data gaps in environmental assessments: Modeling impacts of fine and basic chemical production. *Green Chemistry.* 2009, 11, 1826-1831.
- Weis BL, Guth N, Fischer S, Wissing S, Faust N, Holzmann KH, Handrick R, Otte K. Stable miR-3074 overexpression in human CAP cell lines: Engineering alternative production systems for advanced manufacturing of biologics. Submitted to *Biotechnol Bioeng.*
- Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotech.* 2004, 22, 1393-1398.
- Zhang H, Duan J, Qu Y, Deng T, Liu R, Zhang L, Bai M, Li J, Ning T, Ge S, Wang X, Wang Z, Fan Q, Li H, Ying G, Huang D, Ba Y. Onco-miR-24 regulates cell growth and apoptosis by targeting BCL2L11 in gastric cancer. *Protein Cell* 2016, 7, 141–151.
- Zhao G, Liu L, Zhao T, Jin S, Jiang S, Cao S, Han J, Xin Y, Dong Q, Liu X, and Cui J. Upregulation of miR-24 promotes cell proliferation by targeting NAIF1 in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2015, 36, 3693–701.

8 Anhang

Kooperationsvertrag Hochschule Biberach / CEVEC Pharmaceuticals

Kooperationsvereinbarung

zwischen

CEVEC Pharmaceuticals GmbH
Gottfried-Hagen-Str 62, 51105 Köln

vertreten durch den Geschäftsführer Herrn Frank Ubags

- nachfolgend „**CEVEC**“ genannt -

und

Hochschule Biberach
für ihr Institut für Angewandte Biotechnologie (IAB)
Karlstraße 11, 88400 Biberach

vertreten durch den Rektor Prof. Dr.-Ing. Thomas Vogel

- nachfolgend „**HBC**“ genannt -

- nachfolgend einzeln und gemeinsam „**Partner**“ genannt -

wird zur gemeinsamen Durchführung des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (nachfolgend „**DBU**“ genannt) geförderten Kooperationsprojektes „**Förderinitiative Nachhaltige Pharmazie 3: Entwicklung von Hochproduktionszelllinien für die ressourcenschonende Herstellung von Biopharmazeutika**“

- nachfolgend „**Projekt**“ genannt -

Folgendes vereinbart:

Präambel

Als Kooperationsprojekt sieht das Projekt eine arbeitsteilige Kooperation der Partner, namentlich der HBC als Bewilligungsempfänger und CEVEC als Kooperationspartner, vor. Den von beiden Partnern erstellten Förderantrag hat im Außenverhältnis die HBC als federführender Projektkoordinator bei der DBU gestellt.

Die Partner vereinbaren, im Rahmen dieses Projektes gemäß den nachfolgenden Bestimmungen zusammenzuarbeiten.

1. Gegenstand der Vereinbarung / Förderbedingungen der DBU

- 1.1 Der Gegenstand der Vereinbarung ist die Zusammenarbeit der Partner bei der Durchführung des von der DBU geförderten und im Rubrum bezeichneten Projekts.
- 1.2 Inhalt und Umfang der von den Partnern zu erbringenden Leistungen sowie der hierfür maßgebliche Zeitplan ergeben sich aus der Vorhabensbeschreibung sowie dem Arbeits- und Zeitplan des beigefügten Förderantrags (**Anlage 1**) in der Fassung des ebenfalls beigefügten Bewilligungsschreibens der DBU unter Aktenzeichen 32718/01-32 vom 06.07.2015 nebst Anlagen sowie den beigefügten Verfahrensbestimmungen und der Hin-



weise und Erläuterungen aus dem Infoblatt „Finanzielle Abwicklung und Verwendungsnachweis“ (**Anlage 2**). Die Anlagen 1 und 2 sind Bestandteil dieser Vereinbarung.

- 1.3 Der Kooperationspartner CEVEC verpflichtet sich gegenüber der HBC als Bewilligungsempfänger zur Einhaltung der Förderbedingungen der DBU, insbesondere der Verfahrensbestimmungen, etwaiger im Bewilligungsschreiben nebst Anlagen genannter Fördervoraussetzungen und Bewilligungsaufgaben sowie der Hinweise und Erläuterungen aus dem Infoblatt „Finanzielle Abwicklung und Verwendungsnachweis“ (Anlage 2). Eine ausdrückliche Erwähnung einzelner Förderbedingungen in den nachfolgenden Bestimmungen dient lediglich der Klarstellung und Hervorhebung und bedeutet nicht, dass die übrigen Förderbedingungen keine Geltung beanspruchen sollen.

2. Durchführung der Arbeiten

- 2.1 Die Partner verpflichten sich zur Erfüllung der zur Durchführung des Projekts notwendigen und aufeinander abgestimmten Aufgaben und Teilaufgaben gemäß der Vorhabensbeschreibung und dem Arbeits- und Zeitplan einschließlich aller Aktualisierungen.
- 2.2 Im Übrigen ist jeder Partner für die Durchführung der von ihm gemäß dem Förderantrag übernommenen Forschungs- und Entwicklungsaufgaben selbst verantwortlich.
- 2.3 Entscheidungen über die Organisation oder Inhalte des Projektes sollen im Einvernehmen getroffen werden.
- 2.4 Die Partner tauschen alle Informationen aus, die zur Durchführung des Projekts notwendig sind, und werden sich über die bei Durchführung des Projekts erzielten Arbeitsergebnisse gegenseitig informieren.
- 2.5 Auf Verlangen geben sich die Partner jederzeit Auskunft über den Stand des Projektes. Die Partner ermöglichen der DBU oder ihren Beauftragten die Besichtigung des Projektes.

3. Koordination

- 3.1 Projektkoordinator für das Projekt ist die HBC; Ansprechpartner ist dort *Prof. Dr. Kerstin Otte*.
- 3.2 Der Projektkoordinator hat insbesondere die Aufgabe, die Arbeiten der einzelnen Partner sachlich und zeitlich zu koordinieren. Treten Abweichungen vom Arbeits- und Zeitplan auf, wird er CEVEC und die DBU als Fördermittelgeber möglichst frühzeitig darauf aufmerksam machen und Maßnahmen zur Überwindung eingetretener Schwierigkeiten vorschlagen.
- 3.3 CEVEC wird den Projektkoordinator unverzüglich über alle Umstände informieren, die den erfolgreichen Abschluss eines Teils oder des gesamten Projekts aus fachlichen, technischen, wirtschaftlichen oder tatsächlichen Gründen nachhaltig gefährden. Dies gilt auch für die Einhaltung der Termine. Der Projektkoordinator informiert sodann die DBU.
- 3.4 Der Projektkoordinator oder sein Beauftragter bereitet die zur Durchführung des Arbeits- und Zeitplans notwendigen Arbeitssitzungen (in der Regel einmal pro Halbjahr) vor, lädt hierzu mit einer angemessenen Frist unter Beifügung der Tagesordnung ein, führt den Vorsitz bei den Arbeitssitzungen und ist für die Erstellung und den Versand der Sitzungsprotokolle verantwortlich. An den Sitzungen nehmen Vertreter beider Partner teil.
- 3.5 Jeder Partner wird einen für seine Arbeiten zuständigen Ansprechpartner benennen (mit Adresse, Rufnummer und E-Mail) (Teilprojektleiter). Ein Wechsel eines Teilprojektleiters ist dem Projektkoordinator mitzuteilen. Die Partner werden sich hinsichtlich des von ihnen jeweils benannten Teilprojektleiters um weitgehende Personalkontinuität bemühen.

Teilprojektleiter CEVEC: *Dr. Nicole Faust*
CEVEC Pharmaceuticals GmbH, Gottfried-Hagen-Str 62, 51105 Köln
Telefon: 0221-46020801, E-Mail: faust@cevec.com

Teilprojektleiter HBC: *Prof. Dr. Kerstin Otte*
Hochschule Biberach, Institut für Angewandte Biotechnologie (IAB), Karlstraße 10, 88400
Biberach
Telefon: 07351-582454, E-Mail: otte@hochschule-bc.de

- 3.6 Dem Projektkoordinator obliegt die Sammlung der Berichte von allen Partnern nach vorangegangener fachlicher Prüfung und zusammenfassender Bewertung sowie die Erstellung von Berichten über das gesamte Projekt gemäß den Förderbedingungen des Bewilligungsschreibens (Anlage 2). Die Berichte leitet der Projektkoordinator dem Projektträger zu. Hierfür müssen dem Projektkoordinator die entsprechenden Berichte von CEVEC vorgelegt werden, und zwar mindestens 4 Wochen vor Abgabetermin an die DBU gemäß den Förderbedingungen des Bewilligungsschreibens.

4. Rechte am Ergebnis / Schutzrechte

- 4.1 Als Arbeitsergebnisse werden alle Ergebnisse einschließlich der erstellten Berichte und Unterlagen bezeichnet, die von den Partnern bei Durchführung ihrer Arbeit im Rahmen des Projekts erzielt werden (z.B. Know-how, Erfindungen, urheberrechtlich geschützte Ergebnisse, Software).
- 4.2 Jedem Partner gehören die bei ihm entstehenden Arbeitsergebnisse.
- 4.3 Jeder Partner ist vorbehaltlich der Verpflichtungen der HBC gegenüber der DBU aus dem Bewilligungsschreiben und den zu Grunde liegenden Förderbedingungen, die insoweit auch im Verhältnis zwischen der HBC und CEVEC zur Anwendung gelangen, berechtigt, in eigenem Namen und auf eigene Kosten Schutzrechte anzumelden, aber verpflichtet, den jeweils anderen Partner über solche Anmeldungen im Rahmen dieses Projektes zu informieren.
- 4.4 Arbeitsergebnisse, an denen Mitarbeiter beider Partner beteiligt sind, gehören den Partnern gemeinsam.
- 4.5 Für gemeinschaftliche Erfindungen werden sich die Partner innerhalb der vom Gesetz über Arbeitnehmererfindungen (ArbnErfG) vorgegebenen Inanspruchnahmefristen über Anmeldung (einschließlich Federführung im Einzelfall), Aufrechterhaltung und Verteidigung von Schutzrechten und Kosten abstimmen und darüber eine schriftliche Vereinbarung treffen, wobei im Grundsatz die Kosten von den Partnern entsprechend ihren Erfindungsanteilen zu tragen sind. Die Partner werden darauf hinwirken, dass Erfindungsanteile durch die Erfinder einvernehmlich festgelegt und protokolliert werden.
- 4.6 Soweit ein Partner kein Interesse hat, im Rahmen des Projekts entstandene Erfindungen zum Schutz anzumelden, eine entsprechende Schutzrechtsanmeldung weiter zu verfolgen oder ein im Rahmen des Projekts erteiltes aufrecht zu erhalten, hat er - soweit ihm das rechtlich und tatsächlich möglich ist - seine Rechte dem anderen Partnern zur Übernahme anzubieten. Die Rechtsübertragung ist gesondert zu regeln. Das Angebot hat so rechtzeitig zu erfolgen, dass der andere Partner die zur Rechtssicherung erforderlichen Maßnahmen innerhalb vorgegebener gesetzlicher Fristen, insbesondere innerhalb der für Schutzrechtsanmeldungen unter Inanspruchnahme von Prioritäten einzuhaltenden Jahresfrist, vornehmen kann. Das Optionsrecht muss innerhalb von 12 Wochen in Form einer schriftlich verbindlichen Annahme ausgeübt werden. Die Verpflichtung, Schutzrechte zur Übernahme

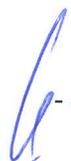
anzubieten, endet 12 Monate nach Ende dieser Vereinbarung. Der die Rechte anbietende Partner hat bei der Rechtsübertragung mitzuwirken.

- 4.7 Die Regelungen in Ziffer 4.6 gelten entsprechend für Erfindungs- und Schutzrechtsanteile.

5. Nutzungsrechte

- 5.1 Bei der Nutzung der Arbeitsergebnisse verpflichten sich die Partner zur Einhaltung der maßgeblichen Förderbedingungen der DBU, insbesondere Ziffer XIV. (3) der Verfahrensbestimmungen, wonach die Partner Dritten auf Verlangen an den Rechten am Ergebnis und an urheberrechtlich geschützten Teilen des Ergebnisses zu branchenüblichen Bedingungen ein nichtausschließliches und nichtübertragbares Benutzungs- bzw. Nutzungsrecht zu erteilen haben. Um der Klarheit willen, verpflichtet sich CEVEC jedoch zu keiner Erteilung von Rechten an Dritte, die über die Nutzung der in der im Projekt generierten und in Anlage 1 genannten Produktionszelllinien hinausgehen. Im Übrigen sind die Partner nach Maßgabe der folgenden Bestimmungen zur Nutzung der Arbeitsergebnisse berechtigt.
- 5.2 Jeder Partner ist berechtigt, die bei ihm im Rahmen des Verbundprojektes entstandenen Arbeitsergebnisse uneingeschränkt zu nutzen; Ziffer 4 dieser Vereinbarung bleibt unberührt.
- 5.3 Die Partner räumen einander für die Zwecke und die Dauer der Durchführung des Projektes an Arbeitsergebnissen i. S. d. Ziffer 4.1 und an projektbezogenen Ergebnissen, die bei Beginn des Projektes vorhanden sind (z.B. Know-how, Erfindungen, urheberrechtlich geschützte Ergebnisse, Software), ein nicht ausschließliches, nicht übertragbares und unentgeltliches Nutzungsrecht ein, soweit Verträge mit Dritten nicht einer solchen Nutzungseinkräumung entgegenstehen.
- 5.4 Nach Ende und abhängig vom Erfolg des Projektes, d.h. im Falle einer beobachteten Steigerung der Produktivität unter Nutzung der miRNA Technologie wie auf Seiten 10 und 11 der Anlage 1 vermerkt, werden sich die Partner weitere Nutzungsrechte an den Arbeitsergebnissen zu marktüblichen Bedingungen einräumen. Bei der Bemessung der Lizenzgebühr im Falle einer Erfindung sollen die Rechtsinhaber Beiträge des jeweils anderen Partners berücksichtigen, die als notwendig, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Erfindung zu werten sind. Über den kommerziellen Gebrauch von Gemeinschaftserfindungen und die Einkräumung von Nutzungsrechten an Gemeinschaftserfindungen werden sich die beteiligten Partner einvernehmlich unter Berücksichtigung ihrer Erfinderanteile abstimmen. Darüber hinaus hat jeder Partner nach Beendigung des Verbundprojektes ein nicht ausschließliches, nicht übertragbares, nicht unterlizenzierbares und unentgeltliches Nutzungsrecht an allen Arbeitsergebnissen für seine eigenen wissenschaftlichen Zwecke in Forschung und Lehre.
- 5.5 Jeder Partner erkennt an, dass Benutzungshandlungen im Rahmen der Bearbeitung des Projekts hinsichtlich der von den anderen Partnern erlangten Informationen und Gegenständen kein Vorbenutzungsrecht begründen.
- 5.6 Ergeben sich unmittelbar aus dem Projekt wirtschaftliche Gewinne, so ist dieses der Geschäftsstelle der DBU über den Projektkoordinator umgehend mitzuteilen. Die DBU kann bei Projektförderung in Form eines Zuschusses aus solchen Gewinnen ganz oder teilweise die Rückzahlung der Fördersumme verlangen. Gewinne bis zu 50.000,00 € bleiben außer Ansatz.

24.



6. Kostentragung / Abwicklung der Finanzierung

- 6.1 Jeder Partner hat seinen Teil des Projekts innerhalb seines eigenen Finanz- und Kostenplans (Anlage zum Bewilligungsschreiben) durchzuführen und trägt die ihm im Rahmen der Durchführung dieser Vereinbarung entstehenden Kosten selbst (unter Verwendung der Zuwendung der DBU).
- 6.2 Der Bewilligungsempfänger HBC ist als Projektkoordinator für die finanzielle Abwicklung des Projekts gegenüber der DBU verantwortlich. Neben den eigenen Mitteln ruft die HBC auch die Mittel für CEVEC bei der DBU ab und leitet diese an CEVEC weiter.
- 6.3 CEVEC verpflichtet sich zur zweckgerichteten Verwendung der Mittel sowie zur Übernahme des Eigenanteils in Höhe von 62.951 Euro.
- 6.4 CEVEC verpflichtet sich zur Freistellung der HBC gegenüber der DBU aufgrund etwaiger sich aus der Nichteinhaltung der Verpflichtung unter Ziffer 6.3 ergebender Nachteile sowie etwaiger von der DBU gegenüber der HBC geltend gemachter Rückforderungen der von der HBC an CEVEC weitergeleiteten Fördermittel.
- 6.5 CEVEC verpflichtet sich gegenüber der HBC zur Einhaltung der Hinweise und Erläuterungen aus dem Infoblatt „Finanzielle Abwicklung und Verwendungsnachweis“ (Bestandteil von Anlage 2), insbesondere zur Übermittlung aller für den Verwendungsnachweis gegenüber der DBU notwendigen Kostennachweise und Belege.

7. Sonstige Zusammenarbeit

Die Partner erbringen jeweils die ihnen in der Vorhabensbeschreibung zugeordneten Leistungen eigenverantwortlich und im eigenen Interesse. Rechtsgeschäfte eines Partners mit Dritten im Zusammenhang mit der Durchführung des Projekts erfolgen im eigenen Namen und auf eigene Rechnung der jeweiligen Partei. Die Partner sind nicht berechtigt, rechtsgeschäftliche Erklärungen im Namen des anderen Partners abzugeben bzw. Verträge im Namen des anderen Partners abzuschließen. Jeder Partner stellt sicher, dass die Regelungen dieses Vertrages auch durch die von ihm beauftragten Dritten entsprechend eingehalten werden.

8. Vertraulichkeit / Veröffentlichungen

- 8.1 Die Partner werden die erkennbar vertraulichen Informationen, die ihnen im Rahmen dieser Vereinbarung vom jeweils anderen Partner übermittelt wurden, bis 3 Jahre nach Beendigung dieser Vereinbarung vertraulich behandeln und Dritten gegenüber nicht offenlegen.
- 8.2 Die Verpflichtungen gemäß Ziffer 8.1 gelten nicht für solche Informationen, die nachweislich
- durch Publikationen oder dergleichen allgemein bekannt sind oder
 - ohne Verschulden des empfangenden Partners Gemeingut werden oder
 - die ohne Verpflichtung zur Vertraulichkeit einem Partner durch Dritte überlassen wurden oder
 - vor Mitteilung durch einen anderen Partner dem empfangenden Partner bereits bekannt waren oder
 - das Ergebnis von Arbeiten von Mitarbeitern des empfangenden Partners sind, ohne dass die betreffenden Mitarbeiter Zugang zu den Informationen hatten oder

- auf Grund behördlicher oder gerichtlicher Anordnung offengelegt werden müssen.
- 8.3 Die Partner werden auch gegenüber ihren Mitarbeitern im Hinblick auf die Vertraulichkeit der Informationen nach diesen Vorschriften die üblichen und zumutbaren Maßnahmen treffen.
- 8.4 Die Ergebnisse des geförderten Vorhabens sind der Öffentlichkeit zugänglich zu machen, vorzugsweise durch Publikation in gängigen Fachorganen, durch geeignete Veranstaltungen oder durch Aufnahme in Datenbanken. Die DBU ist im Rahmen ihrer Zwecksetzung zur Verwertung (auch publizistisch) des jeweiligen Projektes und der Projektergebnisse (auch auszugsweise) einschließlich der Bilder und eventueller Filme berechtigt (nichtausschließliches Nutzungsrecht).
- 8.5 Jeder Partner kann seine eigenen Arbeitsergebnisse veröffentlichen. Dabei ist in geeigneter Form auf das Projekt und die Förderung durch die DBU gemäß Ziffer XII. 3. (3) der Verfahrensbestimmungen (Bestandteil von Anlage 2) hinzuweisen.
- 8.6 Veröffentlichungen, die vertraulich zu behandelnde Informationen oder Arbeitsergebnisse des anderen Partners enthalten, bedürfen der vorherigen schriftlichen Zustimmung des jeweils betroffenen Partners. Der Projektkoordinator ist hierüber ebenfalls zu informieren. Kein Partner darf seine Zustimmung, ggfs. unter der Auflage von Änderungen oder Streichungen, unbillig verweigern. Widerspricht er einer ihm vorgelegten Veröffentlichung (Originaltext) nicht binnen vier Wochen nach Eingang der vollständigen Unterlagen, gilt seine Zustimmung als erteilt.

9. Dauer der Kooperationsvereinbarung / Kündigung

- 9.1 Diese Vereinbarung tritt zu Beginn der Laufzeit des Projektes am 01.01.2016 in Kraft und endet mit Ablauf des Bewilligungszeitraums, soweit sie nicht vorher gekündigt oder sonst wie beendet wird. Ziffern 3.6, 4, 5, 6, 8, 10, und 11 gelten nach Beendigung der Vereinbarung weiter.
- 9.2 Jeder Partner ist berechtigt, diese Vereinbarung aus wichtigem Grund zu kündigen. Einen wichtigen Grund stellt insbesondere die wesentliche Einschränkung oder Modifizierung der Förderung, die Einstellung oder Reduzierung der Förderung gegenüber einem oder beiden Partnern dar oder der Umstand, dass die Ergebnisse zeigen, dass die Zielsetzung des Verbundvorhabens nicht realisiert werden kann. Die Kündigung ist schriftlich der DBU sowie dem anderen Partner mitzuteilen. Der kündigende Partner wird einen Abschlussbericht erstellen sowie auf Wunsch die vom anderen Partner erhaltenen Unterlagen, Dokumentationen, Datenträger und Objekte zurückgeben.
- 9.3 Im Falle des Ausscheidens eines Partners gemäß Ziffer 9.2
 - beschränken sich seine Rechte auf die ihm bis zum Zugang der Kündigung mitgeteilten Ergebnisse des anderen Partners;
 - bleiben die dem anderen Partner durch die vorliegende Vereinbarung eingeräumten Nutzungs- und Benutzerrechte an seinen projektbezogenen Ergebnissen und Arbeitsergebnissen unberührt;
 - gelten Ziffern 3.6, 6, 8, 10 und 11 über das Vereinbarungsende hinaus.
- 9.4 Die Kündigung eines Partners wird im Hinblick auf die Folgen für das Gesamtprojekt mit der DBU abgestimmt.

10. Gewährleistung / Haftung

- 10.1 Die Partner werden die von ihnen im Rahmen des Projektes übernommenen Arbeiten sachgemäß und nach bestem Wissen unter Berücksichtigung des Standes von Wissenschaft und Technik ausführen. Die Haftung für die Richtigkeit der im Rahmen dieses Vertrages übermittelten Ergebnisse ist ausgeschlossen. Die Partner übernehmen keine Gewähr dafür, dass die von ihnen aufgrund dieser Zusammenarbeit erarbeiteten Arbeitsergebnisse frei von Schutzrechten Dritter sind und dass spezifische Arbeitsergebnisse erreicht werden. Sobald einem Partner jedoch solche Schutzrechte bekannt werden, wird er die anderen Partner darüber unterrichten.
- 10.2 Die Vertragspartner haften einander – gleich aus welchem Rechtsgrund – nur für Vorsatz und grobe Fahrlässigkeit. Dies gilt auch für ihre gesetzlichen Vertreter sowie ihre Erfüllungs- und Verrichtungsgehilfen. Diese Haftungsbegrenzung findet keine Anwendung bei Verletzungen des Lebens, des Körpers oder der Gesundheit.
- 10.3 Dritten gegenüber haftet nur jeweils der Vertragspartner, der den Schaden verursacht hat; er hat die anderen Partner insoweit freizustellen.

11. Schlussbestimmungen

- 11.1 Sollte eine Bestimmung dieser Vereinbarung unwirksam sein oder werden, so berührt dies die Wirksamkeit der übrigen Bestimmungen dieser Vereinbarung nicht. An die Stelle der unwirksamen Bestimmung soll vielmehr rückwirkend eine Regelung treten, die rechtlich zulässig ist und dem Sinn und Zweck der ursprünglichen Bestimmung am nächsten kommt.
- 11.2 Kein Partner ist berechtigt, mit Wirkung für den anderen Partner ohne dessen vorherige ausdrückliche schriftliche Zustimmung Verpflichtungen zu übernehmen.
- 11.3 Änderungen und Ergänzungen dieser Vereinbarung bedürfen der Schriftform. Auf dieses Formerfordernis kann nur schriftlich verzichtet werden.
- 11.4 Ein gesellschaftsrechtliches oder gesellschaftsähnliches Verhältnis soll durch diese Vereinbarung nicht begründet werden.
- 11.5 Evtl. Meinungsverschiedenheiten aus dieser Vereinbarung, auch solche, die erst nach ihrer Beendigung entstehen, versuchen die Partner gütlich beizulegen. Gelingt dies nicht, soll zunächst die DBU gebeten werden, einen Meinungsausgleich herbeizuführen.
- 11.6 Die Rechte der DBU bleiben von dieser Vereinbarung unberührt und gehen dieser vor.
- 11.7 Anwendbares Recht ist deutsches Recht unter Ausschluss der Kollisionsregelungen des internationalen Privatrechts.

Anlagen:

1. Förderantrag einschließlich Vorhabensbeschreibung sowie Arbeits- und Zeitplan
2. Bewilligungsschreibens der DBU unter Aktenzeichen 32718/01-32 vom 06.07.2015 nebst Anlagen sowie den beigefügten Verfahrensbestimmungen und der Hinweise und Erläuterungen aus dem Infoblatt „Finanzielle Abwicklung und Verwendungsnachweis“

JA.

 - 7 -

Unterschriften

CEVEC Pharmaceuticals GmbH

Köln, den 9.12.2015



Herr Frank Ubags

Geschäftsführer

Hochschule Biberach

Biberach, den 11.12.2015



i.V. Prof. Dr.-Ing. Annette Schafmeister

Prorektorin für Forschung und Weiterbildung