

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF- Programm

Sondierungsphase im Förderrahmen GBi2S: Entwicklung eines lichtaktivierbaren, biosynthetischen Proteinklebstoffs für die Human- bzw. Zahnmedizin (Dental-Fix).

Förderkennzeichen:

16LW0054

Zuwendungsempfänger:

Technische Universität Berlin, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

Ausführende Stelle:

Technische Universität Berlin – Institut für Biotechnologie – Fachgebiet
Bioverfahrenstechnik – ACK24, Ackerstraße 76, 13355 Berlin

Projektleitung:

Herr Prof. Neubauer

Projektlaufzeit:

01.10.2021 bis 30.09.2022

"Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 16LW0054 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

Schlussbericht zu Nr. 3.2

I. Darstellung

1. Aufgabenstellung

Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung ausgeschriebene Förderinstrument der Sondierungsphase stellte die erste Stufe von zwei aufeinander aufbauenden Fördermöglichkeiten dar. Die Sondierungsphase diente dabei als erste einjährige Stufe dazu, die Idee zu einem Projekt für ein marktfähiges Produkt weiterzuentwickeln und die evaluierte Idee in einem Förderantrag für die nächste Stufe des Förderprogramms, der Machbarkeitsphase abzufassen. Dabei konnten externe Wirtschaftsexperten hinzugezogen werden und Kontakte mit Kooperationspartnern geknüpft werden. In der Machbarkeitsphase, als zweijährige zweite Stufe kann das Produkt bis zur Marktreife entwickelt werden. Es besteht dann auch die Möglichkeit eine Anschlussfinanzierung zur Platzierung, Ausgründung oder Weiterentwicklung zu beantragen, falls dies nicht mit den Projektpartnern aus der Wirtschaft alleine realisiert werden kann.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Insbesondere in der Zahnmedizin besteht ein großer Bedarf nach biokompatiblen Klebstoffen, die in wässriger Umgebung anwendbar sind. Diese könnten zur Therapie von degenerativen Erkrankungen des Zahnhalteapparats, dabei vor allem der Parodontitis oder zur Befestigung von Zahnimplantaten eingesetzt werden. An der Technischen Universität Berlin konnte ein vielversprechendes Verfahren entwickelt werden, um Klebproteine mariner Muscheln zu produzieren, deren adhäsive Eigenschaften zielgerichtet durch Bestrahlung mit UV-Licht freigesetzt werden können. Da in Vorläuferprojekten erste Erfahrungen mit dem Muschelklebstoff gesammelt und auch schon auf ihre Verwertbarkeit bewertet werden konnten, sollte in der Sondierungsphase vorrangig ein Konsortium für die weitere Projektphase gebildet werden. Es sollten die medizinischen Anforderungen mit Hilfe von Experten aus Medizin und Materialwissenschaften bestimmt und durch einen Experten aus dem Wirtschaftsbereich die Marktfähigkeit des Produkts untersucht werden. Dazu sollte eine Marktstudie bei einem externen Dienstleister beauftragt werden. Dies sollte einen wichtigen Beitrag zur Produktausrichtung und Produktentwicklung liefern. Zudem sollte die Patentstrategie mithilfe einer externen FtO-Analyse weiterentwickelt werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die grundlegende Herausforderung des Projektes war die Bildung eines Konsortiums bestehend aus Partnern aus der Wissenschaft. Firmen waren als Projektpartner nicht zulässig und konnten nur über Unteraufträge beteiligt werden. Da schon eine längerfristige Zusammenarbeit zwischen dem Arbeitskreis Biokatalyse des Instituts für Chemie der Fakultät II, geleitet von Prof. Nediljko Budisa und des Fachgebiets Bioverfahrenstechnik des Instituts für Biotechnologie der Fakultät III, geleitet vom Antragsteller Prof. Peter Neubauer besteht, konnte diese Kooperation innerhalb der Technischen Universität Berlin in diesem Projekt einfach weitergeführt werden. Da die Zeit, in der zu beantragenden Machbarkeitsphase, mit zwei Jahren für die Umsetzung des Projektes als sehr knapp angesehen wurde, richtete sich der Fokus bei der Bildung des weiteren Projektkonsortiums vor allem auf forschungsstarke Abteilungen von Universitäten und Wissenschaftsinstitutionen aus der näheren Umgebung. Dabei wurde davon ausgegangen, dass aufgrund der Schwierigkeit und Komplexität der einzelnen durchzuführenden Arbeitspakete eine intensive Abstimmung mit allen Partnern aus dem Projektkonsortium notwendig sein wird. Wie in der Projektausschreibung gefordert, musste dabei auf die Entwicklung eines Projektkonsortiums entlang der Wertschöpfungskette geachtet werden, um bei der anschließend geplanten Verwertung, sowohl Zulieferer als auch Partner für den Vertrieb oder Kunden zu haben. Im speziellen Fall des vorliegenden Projektes ist die Entwicklung eines Medizinproduktes der Klasse III geplant. Da der Kosten- und Zeitrahmen der Machbarkeitsphase bei weitem nicht den reell notwendigen Aufwand abdeckt, ein Medizinprodukt für den dentalmedizinischen Bereich zu entwickeln, ist als realisierbares Ziel die Entwicklung des Medizinprodukts in so einen technischen Reifegrad angestrebt, der die Weiterentwicklung bis zur Marktreife in einem Ausgründungsprojekt, wie GO-Bio oder EXIST-Forschungstransfer ermöglicht.

Dazu wurde ein Konsortium mit zwei starken Abteilungen der Charité Universitätsmedizin Berlin gebildet, dem Lehrstuhl Zahnärztliche Prothetik, Alterszahnmedizin und Funktionslehre von Prof. Florian Beuer und der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie von Prof. Katja Kotsch. Für analytische Fragestellungen wurde Prof. Dr. Lorenz Adrian hinzugezogen, er ist habilitierter Biochemiker und Mikrobiologe und leitet den Lehrstuhl Geobiotechnologie am Institut für Biotechnologie der TU Berlin und das Department Umweltbiotechnologie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ in Leipzig. Für materialwissenschaftliche Fragestellungen wurde Dr. Gerhard Kalinka als langjähriger

wissenschaftlicher Mitarbeiter der BAM Bundesanstalt für Material-forschung und -prüfung, einer Ressortforschungseinrichtung des Bundeswirtschaftsministeriums gewonnen.

Weiter wurden im Unterauftrag neben der Pharmapartnerin Dendropharm GmbH, die schon Erfahrung in der Entwicklung von GMP-konformen Formulierungen vorweisen kann, auch die Wirtschafts- und Patentberatung ConsulTech GmbH als erfahrene Expertin im Pharmabereich in die Projektplanung integriert.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand des Vorhabens

Miesmuscheln bilden einen zahlreiche Fasern umfassenden Anhaftungsapparat (Byssus), der in einem Protein-haltigen adhäsiven Plaque endet. Die darin vorkommenden Muschel-adhäsiven Proteine (MAPs) sind entscheidend für die starke, permanente Bindung der Muscheln an Oberflächen in wässriger Umgebung. Die nicht-kanonische Aminosäure (nkAAs) 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) ist essentiell für die Klebewirkung der MAPs. Muscheln bilden DOPA durch posttranslationale Modifikation von Tyrosin, wobei MAPs bis zu 30 mol% aus der nkAA bestehen. Aus chemischer Sicht verfügt die Brenzcatechin-Seitenkette von DOPA sowohl über gute Quervernetzungseigenschaften (Kohäsion), als auch über ausgeprägte Fähigkeiten Metalle (z.B. Fe^{3+}) zu koordinieren und H-Brücken auszubilden (Adhäsion). Im Zusammenspiel mit DOPA spielen auch die zahlreich vorhandenen Lysin-Reste eine wichtige Rolle bei der Adhäsion auf Oberflächen in wässriger Umgebung. In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien angewandt, um die DOPA-haltigen Proteine zu gewinnen. Während die direkte Isolation aus Muscheln aufwendig und unökonomisch ist, wurden Muschel-inspirierte Polymere chemisch synthetisiert oder rekombinante Produktionsverfahren angewendet. Während synthetische Polymere oft eine geringere Adhäsion als Muschel-Proteine zeigen, werden rekombinante Verfahren in konventionellen Expressionssystemen wie *E. coli* durch die fehlende Möglichkeit der Einführung posttranslationaler Modifikationen limitiert. Zwar können die Tyrosin-haltigen MAPs nach Reinigung nachträglich mit Tyrosinase inkubiert werden, um eine Hydroxylierung zu DOPA zu erhalten, allerdings ist die enzymatische Hydroxylierung ineffizient. Alternativ wurde ein Verfahren beschrieben, in dem DOPA in Tyrosin-auxotrophen *E. coli* Wirtsstämmen durch Ausnutzung der Substrattoleranz der endogenen *E. coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase anstelle von Tyrosin in Muschelproteine eingebaut wird. Diese Methode weist mehrere Nachteile auf: Erstens ist ein quantitativer Austausch von Tyrosin durch DOPA schwer möglich, sodass

heterogene Proteingemische entstehen. Zweitens führt die spontane Oxidation von DOPA zu Dopachinon zu einer Verringerung der adhäsiven Eigenschaften der MAPs. Drittens ist der Proteom-weite Einbau von DOPA an Stelle von Tyrosin toxisch für den Wirtsorganismus, was die zu erwartende Ausbeute limitiert. Während Muscheln durch Redox-Kopplung einen Mechanismus besitzen, um das DOPA/Chinon Verhältnis zu steuern, ist dies in einem rekombinanten Prozess schwer. Das im Arbeitskreis Biokatalyse etablierte neue Verfahren umgeht diese Nachteile bei der rekombinanten Produktion von MAPs in *E. coli*. Dabei wird durch orthogonale Translation das fotoaktivierbares DOPA-Derivat o-Nitrobenzyl-DOPA (ONB-DOPA) ortsspezifisch an mehreren Positionen in das Protein eingebaut. Das Verfahren beruht auf der Suppression von Stoppcodons, wobei nkAAs *in-vivo* an Stelle von *amber* Stoppcodons (UAG) in Proteine eingebaut werden. Hierzu werden orthogonale Aminoacyl-tRNA Synthetase (aaRS)/tRNA-Paare verwendet, die keine Kreuzreaktivität mit der Wirtszell-Translationsmaschinerie (aaRS, tRNA) aufweisen. Durch Veränderung des aktiven Zentrums der aaRS kann die Aktivierung der gewünschten nkAA ermöglicht werden.

Basierend auf der *M. jannaschii* Tyrosyl-tRNA Synthetase (MjTyrRS) wurde eine neue aaRS entwickelt, welche den spezifischen Einbau der Aminosäure ortho-Nitrobenzyl-DOPA (ONB-DOPA) in Proteine ermöglicht. Die fotolabile ONB-Schutzgruppe wurde in zahlreichen Studien verwendet, um die Produktion von fotoaktivierbaren Proteinen zu ermöglichen, wobei eine Abspaltung durch Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) erfolgt. Dies hat den Vorteil, dass die unerwünschte Oxidation von DOPA verhindert und die Klebewirkung bei Bedarf durch Lichtbestrahlung aktiviert werden kann, indem dabei die fotolabile ONB-Schutzgruppe abgespalten wird.

Für die pharmazeutische Verwendung des Klebeproteins muss auch die Synthese der Vorprodukte unter GMP-Bedingungen erfolgen. Zur Vermeidung von toxischen Nebenprodukten muss deshalb die Synthese enantioselektiv durchgeführt werden. Das gelingt über die Herstellung der natürlichen L-Form der DOPA-Grundstruktur. Die lichtabspaltbare Schutzgruppe wird regioselektiv in das DOPA-Gerüst eingeführt. Es konnte eine lineare Synthese dargestellt werden, die mit Hilfe von Schutzgruppen die 3-Position für die Nitrobenzylgruppe direkt anspricht. Eine unspezifische Herstellung würde im Gegensatz im Nachgang der Synthese eine aufwendige Trennung der Isomeren notwendig machen.

Auf *E. coli* basierte Herstellprozesse für Wirkstoffe sind heute als etabliert anzusehen, zahlreiche Anwendungen belegen dies. Eine große Herausforderung besteht

allerdings immer noch in der Entwicklung der Prozesse, da Fall-abhängig eine optimale Expression der Proteine oder eine optimale Produktsynthese gefunden werden muss. Gerade bei der Maßstabsvergrößerung können Probleme auftreten: durch längere Mischzeiten können Gradienten in der Umgebungsbedingung auftreten, die die Syntheseleistung beeinträchtigen und die Produktqualität erheblich beeinflussen können. Dies führt insgesamt zu langen Entwicklungszeiten mit nach wie vor erheblichen finanziellen Risiken, die zu Beginn der Prozessentwicklung kaum absehbar sind.

Um dieses Risiko zu vermindern, wurden in den letzten Jahren im Rahmen einer zunehmenden Parallelisierung und Automatisierung mehr und mehr Verfahren entwickelt, im kleinen Maßstab Entwicklungszeiten durch Mehrfach-Kultivierungen zu verkürzen. Gleichzeitig erlaubt ein gesteigener Grad an Monitoring, Datenbehandlung und Modell-gestützter Versuchsplanung eine zielgerichtete Entwicklung. Um Einflüsse der Maßstabsvergrößerung frühzeitig im Labormaßstab in die Prozessentwicklung mit einzubeziehen, wurden sog. scale down Konzepte entwickelt, die Gradienten in der Flüssigphase in großen Reaktoren wiederum in kleinen Reaktoren nachahmen. Werden diese Gradienten frühzeitig mit einbezogen, können die Risiken des Scale-up frühzeitig erkannt und reduziert werden.

Weitere Prozessrisiken bestehen bei der Maßstabsvergrößerung nicht nur innerhalb einer Kultivierung, sondern auch beim notwendigen Transfer der Kultur zwischen verschiedenen Reaktorgrößen. Dies ist notwendig, da zur Sicherstellung eines hinreichend großen Leistungseintrages üblicherweise ein Rührkesselreaktor mit minimal $\frac{1}{3}$ des Maximalvolumens betrieben werden kann. Daher müssen in verschiedenen Stufen davor in kleineren Maßstäben Vorkulturen geführt werden. Neben einer unzureichenden Sauerstoffversorgung besteht gerade unter Produktionsbedingungen für Wirkstoffe ein gewisses Kontaminationsrisiko. Zudem entstehen in den meisten Prozessen längere Phasen mit gehemmtem Wachstum, die wiederum Produktivität und Produktqualität beeinträchtigen können. Ein Weg, diese Transferphasen zu umgehen, stellen geschüttelte Bioreaktoren dar. Diese können aufgrund der nicht notwendigen Einbauten in einem extrem weiten Volumenbereich betrieben werden. Allerdings besitzen die meisten dieser geschüttelten Reaktoren so einen geringen Leistungseintrag, dass sie sich nicht für aerobe *E. coli* Kulturen eignen. Eine Ausnahme bietet der 2-dimensionale wellendurchmischte Einwegbioreaktor CELL-tainer®. Als weltweit einziger Schüttelreaktor werden ähnliche Gasmassentransferraten erreicht wie in Rührkesselreaktoren. Das Konzept wurde am

Fachgebiet Bioverfahrenstechnik weiterentwickelt, sodass nun eine kleine parallele Variante bis 2 x 1L Kultivierungsvolumen und zwei größere Varianten bis zu einem Kultivierungsvolumen von 150 L zur Verfügung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kulturen mit einem so geringen Startvolumen betrieben werden können, dass auf eine Vorkulturführung weitestgehend verzichtet werden kann. Weiterhin besitzen Einwegreaktoren den großen Vorteil der geringeren Investitionskosten, da auf ein Dampfnetz zur Sterilisation verzichtet werden kann. Gleichzeitig sind die Einwegbeutelkosten des Reaktors durch die fehlenden Einbauten gering und nicht Prozess-relevant.

Verfahren wie die Fluoreszenzmikroskopie zur Überprüfung der Expression sowie die Durchflusszytometrie zur Bewertung der Vitalität und Viabilität werden schon länger durchgeführt, um neben Konzentrationen von Komponenten in der Gas- und Flüssigphase Prozesse zu bewerten. Allerdings geschieht dies durch *off-line* Messungen, die einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand erfordern und der oben beschriebenen Parallelisierung im Wege stehen. In vorausgegangenen Arbeiten wurden Geräte und Methoden entwickelt, die eine zellphysiologische Bewertung durch *at-line* bzw. *on-line* Messung und vollautomatisiert erlauben. Diese, teilweise Einzelzell-basierten Methoden wurden in zahlreiche Prozesse integriert und mit entsprechender Datenauswertung zur Optimierung eingesetzt.

Diese Methodik wurde in einem Vorläuferprojekt ebenfalls eingesetzt und genutzt, um die Prozessentwicklung zu beschleunigen. Ebenso wurde ein komplexes Medium für einen optimierten Stamm auf Basis von *E. coli* B95ΔA entwickelt, welches eine um bis zu 30fach erhöhte Proteinproduktion erlaubt. Auf Basis von *E. coli* B95ΔA wurde ein Stamm entwickelt, der von allen bekannten Nitroreduktasen befreit ist und damit *meta*-oNB-DOPA einbaut ohne es im Nachgang zu reduzieren. Es wurden weiterhin erste makroskopische Klebeversuche durchgeführt, die die Funktionalität des Konzepts nachweisen. Ebenso wurde die Analytik für Proteine und Peptide die nicht-kanonische Aminosäuren enthalten weiterentwickelt. Es wurde in standardisierten Versuchen die Biokompatibilität des Muschelproteins nachgewiesen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben den im anschließenden Antrag auf Projektförderung aufgenommenen Projektpartnern Charité Universitätsmedizin, Bundesanstalt für Materialprüfung – BAM und Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, konnte mit der Firma ConsulTech GmbH ein erfahrener Partner als Marktexperte gewonnen werden, der neben der

Erstellung der geforderten Marktanalyse sowie der FtO-Analyse auch zur Erstellung der Projektskizze beitrug. So wurde gemeinsam eine Entwicklungsstrategie entwickelt und ein Arbeitsplan diskutiert, der eine realistische Perspektive für die Produktentwicklung eröffnet. Dies ist hervorzuheben, da Produktentwicklungen in der Biotechnologie oft an einem Mangel an Erfahrungen und einer realistischen Herangehensweise scheitern. Weiter wurde gemeinsam eine Verwertungsstrategie entwickelt, die es erlaubt in wenigen Jahren ein erstes Produkt für die Dentalmedizin zu entwickeln, welches ein attraktives wirtschaftliches Potential hat.

In einer Marktstudie wurde der Wettbewerb untersucht und die Grundlage für eine Entwicklungsstrategie für ein Klebergel zur Therapie der Parodontitis gelegt.

In der FtO-Analyse wurde der Stand der Technik in Patenten untersucht um sicherzustellen, dass keine Rechte Dritter verletzt werden.

Mit dem vom BMWi geförderten ZIM-Netzwerks „NetPhaSol“ wurde intensiv beim Aufbau der Gruppe der Kooperationspartner für die Machbarkeitsphase als auch für die spätere Etablierung eines Netzwerks für die weitere Entwicklung und nachgehende Vermarktung des zu entwickelnden Produkts zusammengearbeitet. So konnte das NetPhaSol-Netzwerkunternehmen Dendropharm GmbH, als Partner im Unterauftrag für die Entwicklung der Formulierung gewonnen werden.

II. Nachweise

1. Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Erledigung Arbeitspakete Stand 31.12.2022 (Zwischenbericht)

1. Ergebnisstand (1 = nicht begonnen, 2 = begonnen, 3 = fast abgeschlossen, 4 = abgeschlossen)					
Lfd. Nr.	Arbeitspaket	1	2	3	4
1.1	Organisation und Evaluation der Marktanalysen				x
1.2	Aufbau eines Projektteams und eines Partnernetzwerks für die Machbarkeitsphase				x
1.3	Planung der notwendigen Entwicklungsschritte mit Partnern und Experten			x	
1.4	Evaluierung der Schutzrechte zur Definition des „freedom-to-operate“				x
1.5	Organisation des Projektantrags für die Machbarkeitsphase			x	

Erledigung Arbeitspakete Stand 31.01.2023

1. Ergebnisstand (1 = nicht begonnen, 2 = begonnen, 3 = fast abgeschlossen, 4 = abgeschlossen)					
Lfd. Nr.	Arbeitspaket	1	2	3	4
1.1	Organisation und Evaluation der Marktanalysen				x
1.2	Aufbau eines Projektteams und eines Partnernetzwerks für die Machbarkeitsphase				x
1.3	Planung der notwendigen Entwicklungsschritte mit Partnern und Experten				x
1.4	Evaluierung der Schutzrechte zur Definition des „freedom-to-operate“				x
1.5	Organisation des Projektantrags für die Machbarkeitsphase				x

Arbeitspakete:

1.1 Organisation und Evaluation der Marktanalysen

Das Ziel von Arbeitspaket 1.1, war die „Organisation und Evaluation der Marktanalysen“ und als Ergebnis sollte eine schriftlich abgefasste Marktanalyse erstellt und evaluiert werden. Mit dem Unterauftragnehmer mussten die Zielmärkte weiter geschärft und der Rahmen und der Umfang der Marktanalyse, oder der Marktanalysen bestimmt werden. Nach Erstellung der Marktanalyse musste diese zusammen mit dem Unterauftragnehmer ausgewertet werden und die Ergebnisse der Studie für den Projektantrag für die Machbarkeitsphase aufgearbeitet werden.

Es wurde eine Marktanalyse, nach Ausschreibung, bei der Firma ConsulTech GmbH beauftragt, welche anschließend intern evaluiert und die Erkenntnisse daraus in den Projektanträgen weiterverwendet wurden.

Dabei zeigten sich drei wesentliche Vorteile des Klebergels gegenüber Konkurrenzprodukten: So ist die biotechnologische Herstellung des Muschel-basierten Proteins kostengünstiger als die Gewinnung aus tierischen oder menschlichen Komponenten und birgt nicht das Risiko der Übertragung infektiöser Agentien. Zudem stellt die Photoaktivierbarkeit ein Alleinstellungsmerkmal dar. Durch die Steuerung der

Klebewirkung durch Aktivierung mit einer Lichtquelle wird ein in der Zahnmedizin etabliertes Verfahren genutzt. Zuletzt verzichtet die biotechnologische Herstellung des Klebstoffs im Sinne des Tierschutzes auf den Einsatz lebender Tiere oder sonstiger tierischer Produkte zur Wirkstoffgewinnung.

Dieses Arbeitspaket konnte somit vollständig erfolgreich abgeschlossen werden und das Teilziel erfüllt werden.

1.2 Aufbau eines Projektteams und eines Partnernetzwerks für die Machbarkeitsphase

Das Arbeitspaket 1.2, „Aufbau eines Projektteams und eines Partnernetzwerks“ beinhaltete zwei Ziele: Ein Projektteam ist aufgebaut, Projektpartner für die Machbarkeitsphase sind identifiziert. Angebote für Unteraufträge liegen vor.

Es mussten von Projektbeginn an der Bedarf an externer Unterstützung bestimmt und geeignete Partner und Unterauftragnehmer identifiziert werden. Mit den Partnern musste die Projektbeteiligung eruiert und die Arbeitsteilung abgestimmt werden, dazu sollte ein hybrider (online, physisch) Workshop, auch unter Hinzuziehung von internationalen Experten veranstaltet werden. Von Unterauftragnehmern mussten die Angebote nach den entsprechenden gesetzlichen und universitätsinternen Vorgaben eingeholt, überprüft und mit Vergleichsangeboten verglichen werden.

Beide Ziele konnten vollständig und erfolgreich erfüllt werden. Es wurden sowohl ein Projektteam für die Machbarkeitsphase, als auch für das VIP+-Projekt gebildet. Auch konnte ein umfangreiches Partnernetzwerks gebildet werden.

1.3 Planung der notwendigen Entwicklungsschritte mit Partnern und Experten

Das Arbeitspaket 1.3 „Planung der notwendigen Entwicklungsschritte“ war durch die besondere Herausforderung gekennzeichnet, in dem vorliegenden zweistufigen Projekt den zeitlich fließenden Übergang von der Sondierungsphase in eine Machbarkeitsphase, an der eventuell weitere Partner beteiligt sind und größere Unteraufträge vergeben werden müssen, um dadurch eine eventuell notwendige Industriebeteiligung sicherzustellen. Die Partner sollten zwar schon direkt in der Anfangsphase des Sondierungsprojekts identifiziert und zur Antragstellung in der Machbarkeitsphase integriert werden, es sollte jedoch dann noch vor Beginn mit der Einstellung von Personal und der Auswahl und Bestellung von für das Machbarkeitsprojekt notwendigem Material und Investitionsgütern begonnen werden. Um wissenschaftliche Sichtbarkeit zu erreichen und neueste Informationen zum Stand

der Wissenschaft und Technik zu erlangen sollten bisherige Ergebnisse auf nationalen und internationalen Symposien präsentiert werden. Die Vorbereitungen konnten im Berichtszeitraum soweit abgeschlossen werden, dass sofort mit dem Anschlussprojekt hätte begonnen werden können. Sowohl die Entwicklungsschritte für die Machbarkeitsphase als auch für ein mögliches VIP+-Projekt konnten geplant werden. Da auch durch den Projektträger des VIP+-Projekts keine positive Förderentscheidung erfolgte, wurde weder mit der Einstellung von Personal, noch mit der Bestellung von Material begonnen. Die Ergebnisse wurden sowohl auf nationalen, wie auch auf internationalen Konferenzen präsentiert.

1.4 Evaluierung der Schutzrechte zur Definition des „freedom-to-operate“

Das Ziel von Arbeitspaket 1.4 war die „schriftliche Abfassung der FtO-Analyse und die Evaluierung der Schutzrechte“. Es mussten in vorliegendem Projekt die Schutzrechte unter Zuhilfenahme eines professionellen Partners gründlich evaluiert werden damit der dadurch gegebene, oder auch durch konkurrierende Schutzrechte eingeschränkte „freedom-to-operate“ definiert werden konnte. Die IP-Strategie musste entsprechend angepasst werden um spätere Einschränkungen bei der Vermarktung des Produkts vermeiden oder umgehen zu können.

Eine beim Europäischen Patentamt im Rahmen eines Vorläuferprojekts durchgeführte Patentanmeldung (Nummer EP17163362) und auch das beantragte PCT um die Erfindung auf internationaler Ebene zu schützen, wurden mittlerweile erteilt.

Es wurde eine FtO-Analyse, nach Ausschreibung, bei der Firma ConsulTech GmbH beauftragt, welche anschließend mit der Firma ConsulTech GmbH ausgewertet und anhand der Erkenntnisse daraus die Projektanträge entsprechend angepasst wurden. Dieses Arbeitspaket konnte somit vollständig erfolgreich abgeschlossen werden und das Teilziel erfüllt werden.

1.5 Organisation des Projektantrags für die Machbarkeitsphase

Das Ziel von Arbeitspaket 1.5 war die „Organisation des Projektantrags für die Machbarkeitsphase“ und die form- und fristgerechte Einreichung. Mit den für die Machbarkeitsphase identifizierten Projektpartnern musste der Projektantrag organisiert und abgefasst werden. Dazu mussten die notwendigen Unteraufträge bestimmt und die Kosten in ihrer Höhe quantifiziert werden. Es mussten alle notwendigen Gerätschaften identifiziert, deren Verfügbarkeit und Funktion geprüft und

mögliche Alternativen identifiziert werden. Fehlende Gerätschaften mussten als Investitionen in die Projektplanung mit aufgenommen werden. Zusätzliche für das Projekt notwendige Personen mussten identifiziert und geworben werden. Die administrativen Voraussetzungen für die Projektdurchführung mussten abgeklärt und erfüllt werden.

Dieses Arbeitspaket konnte vollständig bis zur Deadline abgeschlossen werden und der Meilenstein damit erfüllt werden. Allerdings wurde der Projektantrag in der finalen Auswahlrunde abgelehnt. Dem Projektteam wurde empfohlen den Projektantrag stattdessen bei VIP+ einzureichen. Dazu wurde ein Antrag auf kostenneutrale Verlängerung gestellt um diesen Projektantrag zu organisieren. Auch dieser Projektantrag konnte vollständig bis zur Deadline abgeschlossen werden, wurde jedoch auch in der finalen Auswahlrunde abgelehnt. Das Arbeitspaket konnte durch die Projektverlängerung somit übererfüllt werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Für das Projekt wurden insgesamt 119.713,34 EUR inklusive einer Projektpauschale von 19.952,22 EUR bewilligt. Die Mittel wurden bis auf einen Restbestand von 3.650,20 EUR projektspezifisch verwendet. Dabei wurden 72.374,92 EUR für Personalmittel (Organisation/Moderation) und 19.992,00 EUR für ein Marktwirtschaftsgutachten, sowie eine FtO-Analyse durch die ConsulTech GmbH ausgegeben.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Durch die Durchführung der Sondierungsphase konnte ein Kooperationsnetzwerk entlang der Wertschöpfungskette etabliert werden. Aus dem Kooperationsnetzwerk konnten dabei die Partner für das in der Machbarkeitsphase beantragte Kooperationsprojekt gewonnen werden. Darüber hinaus konnten weitere Netzwerkpartner zusammengebracht werden, die im weiteren Verlauf des Projektes und darüber hinaus als mögliche Zulieferer, Partner oder Kunden fungieren. In dem Netzwerk sind auch exzellenter Wissenschaftler und Ingenieure zusammengefasst, die sich kritisch mit der technischen und medizinischen Umsetzbarkeit der Produktidee befassen. In der Sondierungsphase wurde nicht nur, wie gefordert der Projektantrag für die Machbarkeitsphase von GO-Bio initial organisiert und eingereicht, sondern ebenfalls nachfolgend ein Antrag in der Förderlinie VIP*+ des BMBF.

4. Voraussichtlicher Nutzen

Die Erkenntnisse des Projekts fließen in die Entwicklung des Mfp-5 Proteins als Bestandteil für ein Klebergel für die Parodontitis-Behandlung in der Zahnmedizin ein. Das ermittelte Marktpotential im Bereich Dentalmedizin, sowie die festgestellten Vorteile gegenüber Wettbewerbslösungen, wie Photoaktivierbarkeit, Bioabbaubarkeit und antimikrobielle Eigenschaften steigern die Umsetzungs- und Transferchancen. Dabei sind nicht nur die Möglichkeiten als reines Klebergel im Bereich der Zahntaschen untersucht worden, sondern darüber hinaus auch die Funktionalisierbarkeit mit antimikrobiellen Eigenschaften.

Durch die Bildung des Kooperationsnetzwerks haben sich, auch unabhängig von dem in der Machbarkeitsphase umzusetzenden Projekt, Möglichkeiten ergeben durch Lizenzvergabe an die als Netzwerkpartner identifizierten KMU monetären Nutzen für die Hochschule zu generieren.

Der Aufbau eines langfristigen Verbundes (Firmen und Forschungsinstitute aus Chemie, Biotechnologie und Medizinbereich) führt projektunabhängig und langfristig zu Transfer aus der Forschung zu Nutzergruppen und in die beteiligten Institute zurück in Form von Anwenderdaten und bedarfsorientierten Fragestellungen.

Zudem wurde die wissenschaftliche Konkurrenzfähigkeit im Fachgebiet Biokatalyse der Technischen Universität Berlin gesteigert und *Know-How* erzielt. Eine Publikation in einem hochrangigen wissenschaftlichen Journal konnte weiter vorbereitet und die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen vorgestellt werden. Die Qualifizierung des wissenschaftlichen Nachwuchses konnte durch die Durchführung mehrerer Bachelorarbeiten unterstützt werden.

5. Bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen

Das Thema adhäsive Muschelproteine ist von großem Interesse und deshalb forschen auch viele Institutionen und kommerzielle Unternehmen an Lösungen und Produkten auf diesem Feld. So konnte Adhesys Medical mit dem „CUTIS Topical Skin Adhesive“ und dem „VIVO Surgical Sealant“ attraktive Produkte entwickeln, so dass das Unternehmen umgehend von der Grünenthal-Gruppe aufgekauft wurde, um die weitere Kommerzialisierung zu forcieren. Der Vorteil unseres Bioklebstoffs gegenüber diesen Produkten ist neben der vollständigen Bioabbaubarkeit auch die zielgerichtete Aktivierung durch Licht. Als Beschichtung in Zahntaschen ist es jedoch nicht geeignet, da die fehlende Bioabbaubarkeit den Heilungsvorgang behindern würde.

Ein auf der Arbeit von Guo *et al.* 10.1016/j.celrep.2022.111389 basierendes therapeutisches Gel für die Zahntaschen, setzt auf die Blockierung des Succinat-Rezeptors, was sich in ersten Versuchen als unterstützend bei der Parodontitis-Behandlung erwiesen hat. Allerdings ist der Ansatz so neu, dass er noch nicht über die Präklinik hinaus etabliert wurden.

In der Literatur sind eine Vielzahl weiterer Ansätze zu finden, die sich auf das Klebprinzip von Miesmuscheln berufen. Beispielhaft ist hier die Publikation "Rapidly light-activated surgical protein glue inspired by mussel adhesion and insect structural crosslinking" von Jeon *et al.*, in Biomaterials 67, 2015, 11-19 anzuführen. Dieser Ansatz ist schon deshalb als technologisch nicht äquivalent zu betrachten, da nicht über den Rahmen der kanonischen Aminosäuren hinausgegangen wird und mittels Lichtbestrahlung eine Quervernetzung der im Protein enthaltenen Tyrosin-Moleküle vermittelt wird. Dabei wird jedoch keine spezielle Hafteigenschaft auf unsterilen, feuchten Oberflächen dargestellt. Außerdem ist der Klebevorgang abhängig von der Quervernetzung in Gegenwart von Komplexen des Platinmetalls Ruthenium, welche als potentiell toxisch anzusehen sind.

6. Veröffentlichung der Ergebnisse

Aus dem Projekt Dental-Fix ergaben sich keine Veröffentlichungen.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Dental-Fix – Durchführung der Sondierungsphase der BMBF-Ausschreibung „GBi2S: GO-Bio initial“ mit dem Projekttitel „Entwicklung eines lichtaktivierbaren, biosynthetischen Proteinklebstoffs für die Human- bzw. Zahnmedizin“.	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Neubauer, Peter Prof. Dr.; Schipp, Christian Dipl.-Ing.	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.01.2023
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Technische Universität Berlin Straße des 17. Juni 135 10623 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 16LW0054
	11. Seitenzahl 21
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 0
	14. Tabellen 2
	15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Die Arbeiten in der Sondierungsphase wurden mit dem Ziel durchgeführt ein Konsortium und ein Kooperationsnetzwerk zu bilden um einen Antrag für die Machbarkeitsphase in dem zweistufigen Förderprogramm einzureichen, um eine Produktidee, in vorliegendem Fall ein Klebergel auf Basis des Kleberproteins Mfp-5 von Miesmuscheln, in Richtung Marktreife zu entwickeln. Es konnte ein Konsortium mit 5 Partnern aus dem gebildeten Kooperationsnetzwerk gewonnen und die Anträge fristgerecht in zwei unterschiedliche Förderausschreibungen des BMBF, „GO-Bio initial – Machbarkeitsphase“ und „VIP+“ eingereicht werden. Die Förderung für die Verwirklichung der Produktidee konnte bis jetzt noch nicht eingeworben werden. Deshalb gibt es bis jetzt noch kein Folgeprojekt.	
19. Schlagwörter Synthetische Biologie, Bioverfahrenstechnik, Dentalmedizin, Parodontitis	
20. Verlag	21. Preis