Abschlussbericht

Teilprojekt 1: BIOPHARM GmbH

Klonierung und Expression von Wachstumsfaktoren zur Geweberegeneration

Zuwendungsempfänger:	**Förderkennzeichen:**
BIOPHARM GmbH Czernyring 22 D-69115 Heidelberg	0313851A

Verbundprojekt:

Optimierung rekombinanter Wachstumsfaktoren für die klinische Anwendung

(Gesamtprojektleitung Dr. Frank Plöger, Biopharm GmbH, Heidelberg)

Teilprojekt:

Klonierung und Expression von Wachstumsfaktoren zur Geweberegeneration

Teilprojektleiter:

Dr. Frank Plöger

Laufzeit:

01.10.2006 bis 30.09.2009

Teilprojekt 2: Charité – Universitätsmedizin Berlin

Analyse des Wachstumsfaktors GDF-5 und dessen gezielte Modifikation für therapeutische Anwendungen

Zuwendungsempfänger:	**Förderkennzeichen:**
Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum 10117 Berlin	0313851B

Verbundprojekt:

Optimierung rekombinanter Wachstumsfaktoren für die klinische Anwendung

(Gesamtprojektleitung Dr. Frank Plöger, Biopharm GmbH, Heidelberg)

Teilprojekt:

Analyse des Wachstumsfaktors GDF-5 und dessen gezielte Modifikation für therapeutische Anwendungen

Teilprojektleiter:

Prof. Dr. Stefan Mundlos

Laufzeit:

01.10.2006 bis 31.12.2009

I. Übersicht

1. Aufgabenstellung

Die Wiederherstellung geschädigter Gewebe geschieht über körpereigene Regeneration, die durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren gesteuert wird. Dazu zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, deren Regulationsmoleküle mit verstärkender Wirkung (Agonisten) und abschwächender Wirkung (Inhibitoren / Antagonisten) und Signalmoleküle welche den Regenationsstimulus von der Zelloberfläche in das Zellinnere leiten. Regeneration basiert wesentlich auf der Aktivierung von körpereignen Stammzellen, die in verschiedene Zellarten differenzieren können und so für einen Ersatz der untergegangenen Zellen sorgen. In Abhängigkeit vom zu regenerierenden Zelltyp, verläuft der Regenrationsvorgang nach einem unterschiedlichen Muster ab. Während der Initialphase der Regeneration induzieren Wachstumsfaktoren die Migration und Differenzierung von Stammzellen, ähnlich wie es bei der Embryonalentwicklung der Fall ist. Bei vielen Krankheitsprozessen funktioniert diese regenerative Aktivierung von Signalmolekülen nicht mehr ausreichend, so dass ein ineffektiver Heilungsprozess zu einer chronischen Erkrankung führen kann. Eine therapeutische Regenerationsstrategie könnte somit durch die Manipulation und Aktivierung endogener regenerativer Prozesse erfolgen, indem geeignete Faktoren zum richtigen Zeitpunkt appliziert werden. Um dieser Fragestellung zu begegnen wurde als Projektziel die Entwicklung von optimierten Wachstumsfaktoren für die Geweberegeneration definiert. Ein Wachstumsfaktor, der für die Regeneration von Geweben besonders geeignet schien, war der Wachstums- und Differenzierungsfaktor rhGDF-5 (recombinant human Growth & Differentiation Factor-5).
Die Hautaufgabe der Biopharm innerhalb des Verbundprojektes war es den Wachstumsfaktor rhGDF-5 durch zielgerichtete Sequenzveränderungen für neue therapeutische Anwendungsbereiche zu optimieren. Die neuen Molekülvarianten wurden mittels mutagener PCR-Technik auf DNA-Ebene entwickelt. Für das Design der neuen Moleküle wurden sowohl Mutation die in Patienten vorkommen als auch kristallographische Strukturdaten des Moleküls herangezogen. Die neuen Proteinvarianten wurden in Bakterien exprimiert, in funktionelle Proteine gefaltet und chromatographisch gereinigt. In einem Bio-Assay wurde die biologische Aktivität der Proteinvarianten bestimmt und der AG Prof. Mundlos für weitere funktionelle Studien übergeben. Aufgrund des eingeschränkten Löslichkeitsprofils von rhGDF-5 wurden bei der Biopharm verschiedene Formulierungen für die Geweberegeneration erarbeitet.

2. Voraussetzung

Das Konsortium setzt sich aus der Arbeitsgruppen Prof. Mundlos (Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum, Berlin) und der Biopharm GmbH, Heidelberg zusammen. Der Partner ist Spezialist auf dem Forschungsgebiet der Wachstumsfaktoren und deren Regulationsmechanismen. Zur Durchführung der Teilprojekte konnte auf das vorhandene technische und methodische Know-how des Konsortialpartners zurückgegriffen werden. Biopharm war maßgeblich für das Moleküldesign, Klonierung, Expression und Bereitstellung der modifizierten Wachstumsfaktoren verantwortlich. In der Gruppe von Prof. Mundlos wurden die modifizierten Wachstumsfaktoren in *in vitro* und *in vivo* Modellen gezielt analysiert, um eine Aussage über das Regenerationspotential der verschiedenen Molekülvarianten zu erhalten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Biopharm GmbH

Arbeitspaket 1: Moleküldesign von rhGDF-5-Varianten

Auf Basis von molekularbiologischen Arbeiten sollten Protein-Varianten hergestellt werden. Hierzu wurde auf DNA-Ebene das gewünschte Protein geplant werden. Das daraus resultierende Protein mit veränderten Eigenschaften wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt.

Meilensteine:

6 und 18 Monate nach Projektbeginn: Abschluss der Klonierungsarbeiten von rhGDF-5-Varianten. Identifikation eines geeigneten Expressionssystems.
30 Monate nach Projektbeginn: Modifikation bereits erfolgreich getesteter rhGDF-5 Varianten und anschließende Expression

Arbeitpaket 2: Produktion von Faktoren

In das Arbeitspaket Produktion von Faktoren fielen die Proteinexpression und Aufreinigung der Faktoren, dazu wurden die etablierten Produktionsprozesse an eine Fermentation angepasst. Für die geplanten Proteine wurden Expressionsstudien durchgeführt, die auf die Optimierung des Expressionssystems ausgerichtet waren. Ein wesentlicher Bestandteil war das Aufreinigungsverfahren der produzierten Proteine inklusive der Renaturierungsbedingungen. Die in Prokaryonten exprimierten Proteine, mussten aufwendig mit chemischen Methoden nachträglich renaturiert werden, um die biologische aktive Form zu erhalten. Da die meisten von uns hergestellten Proteine aus zwei molekularen Untereinheiten bestehen (Homodimer), mussten durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt die monomeren Moleküle von den dimeren Molekülen abgetrennt werden. Auch die Entwicklung von Renaturierungsverfahren und die Optimierung der Ausbeute an biologisch aktiven Molekülen gehörte in dieses Arbeitsfeld.

Meilensteine:

12 Monate nach Projektbeginn: Expressionssystem ist etabliert für die Produktion von rhGDF-5-Varianten.
18 Monate nach Projektbeginn: Aufreinigungs- und Renaturierungsbedingungen sind etabliert. Kontinuierliche Bereitstellung von in *E. coli* exprimierten rhGDF-5 Proteinvarianten für den weiteren Projektzeitraum.

Arbeitspaket 3. Bioassays

Die hergestellten Wachstumsfaktoren wurden nach Aufreinigung, Formulierung und nach Aufbringung auf einen geeigneten Träger auf ihre biologische Aktivität getestet. Hierzu kamen bei BIOPHARM etablierte Zellkultursysteme zur Anwendung. Auch die begleitenden Untersuchungen wie Westen Blot Analyse oder ELISA während der Analyse der Ausbeute bei den Expressionssystemen oder die Verwendung als Detektionssystem innerhalb der Proteinaufreinigung fielen in dieses Arbeitspaket.

Meilensteine:

6, 18, 30 Monate nach Projektbeginn: Aussage über die biologische Aktivität der rhGDF-5 Varianten in Zellkultur liegt vor.

Arbeitspaket 4: Formulierung

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren für *in vitro* Assays und für präklinische Versuche, kann je nach Löslichkeitsverhalten der Faktoren, spezielle galenische Formulierungen erfordern. Auch bei dem Beschichten von Trägern mit Wachstumsfaktoren, müssen spezifische Eigenschaften an das Lösungsmittel gestellt werden. Die Regeneration der unterschiedlichen Gewebetypen erfordert die Optimierung geeigneter Trägermaterialien mit den entsprechenden rhGDF-5-