

## Abschlussbericht HOPE – Teilprojekt F: Technische Hochschule Mittelhessen

### Teil 1 (Kurzbericht)

Vorhaben (Verbundprojekt): Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst (HOPE)

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung BLE

Förderkennzeichen: 2818807F19

Projektlaufzeit: 15.04.2021 – 31.12.2024

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Projektkoordinator:

**Hochschule Bielefeld (HSBI)**, Prof. Dr. Anant Patel, WG Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, Faculty of Engineering Sciences and Mathematics, Interaktion 1, 33619 Bielefeld – Germany Tel. 0521-1067318, anant.patel@hsbi.de

Projektpartner:

**Technische Hochschule Mittelhessen (THM)**

Prof. Dr. Michael Wolff, Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie, Gutfleischstr. 3-5, 35390 Gießen – Germany, Tel. 0641-3092608, michael.wolff@lse.thm.de

**Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME)**

Dr. Kwang-Zin Lee, Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie, Ohlebergsweg 12, 35392 Gießen – Germany, Tel. 0641-97219150, kwang-zin.lee@ime.fraunhofer.de

**BIOCARE GmbH (BIO)**

Dr. Elisa Beitzen-Heineke, Wellenser Str. 57, 37586 Dassel-Markoldendorf – Germany, Tel. 05562-9505780, info@biocare.de

**Geohumus GmbH (GEO)**

Holger Behrens, Industriepark Allessa- Gebäude G32, Alt-Fechenheim 3, 60386 Frankfurt – Germany, Tel 069-47869480, info@geohumus.com

**Spargel- und Beerenanbau Winkelmann GmbH & Co. KG (WIN)**

Dr. Nadine Winkelmann, Nuttelner Str. 50, 32369 Rahden/Tonnenheide – Germany, Tel. 05771-970649, nw@spargelhof.de

Datum der Berichtseinreichung: **30.06.2025**

## Teil I – Kurzbericht Teilprojekt F – Technische Hochschule Mittelhessen

### 1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In den letzten Jahren haben Schadinsekten wie *Drosophila suzukii* und bodenbürtige Fraßschädlinge wie der Gefurchte Dickmaulrüssler und Junikäfer erhebliche Schäden in Beerenkulturen, und in der Folge erhebliche Ernteaufälle, verursacht. Hintergrund sind u. a. zunehmende Verbote chemischer Insektizide sowie eine steigende Ablehnung derselben durch Verbraucher.

Das Projekt HOPE konzentrierte sich auf die Entwicklung nachhaltiger Lösungen, die sowohl im konventionellen als auch im biologischen Anbau umweltfreundlich sind. Ziel war es, Landwirten effektive Alternativen zu den derzeitigen chemischen Insektiziden zu bieten, die zum Teil nur durch begrenzte Notfallzulassungen (Art. 53 der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009) erlaubt sind.

Das Projektziel von HOPE war ein ganzheitlicher Schutz für Beerenobst gegen Schädlinge wie *D. suzukii* und bodenbürtige Schädlinge, bei der zwei Hauptansätze verfolgt wurden: (1) **Oberirdischer Schutz:** Entwicklung einer Sprühapplikation basierend auf Virusformulierungen, die sich als wirkungsvoll gegen *D. suzukii* erwiesen sowie (2) **Unterirdische Bekämpfung:** Einführung einer Attract-and-Kill-Strategie mit entomo-pathogenen Pilzen zur Bekämpfung unterirdischer Schädlinge, kombiniert mit CO<sub>2</sub>-produzierenden Lockstoffen.

Zur Förderung innovativer und nachhaltiger Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau wurde das Vorhaben „Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst-HOPE“ vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) bewilligt (Laufzeit 04/2021-12/2024), von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) als Projektträger betreut, und das Verbundprojekt von der Hochschule Bielefeld (HSBI) koordiniert.

### 2. Ablauf des Vorhabens

Um das Teilvorhaben F der THM (AP 2) durchzuführen, erfolgte zunächst das Screening nach Viren mit insektiziden Eigenschaften gegen *D. suzukii* (AP 1 - IME) und wurde mit der Identifizierung zweier Viruskandidaten, Drosophila C Virus (DCV) und La Jolla Virus (LJV), erfolgreich abgeschlossen.

Die verfahrenstechnische Produktion (Massenvermehrung) der ausgewählten insektenpathogenen Viren wurde durch Etablierung eines robusten Kultivierungsverfahrens in Schneider S2-Zelllinien im Labormaßstab realisiert (AP 2 - THM) und für den Scale-up erfolgreich an den Industriepartner BIOCARE transferiert, ebenso wie die für die Prozessführung entwickelten notwendigen analytischen Methoden zur Quantifizierung beider insektenpathogenen Viren. Hierbei kamen jeweils qPCR-Methoden zum Einsatz. Die Raum-Zeit-Ausbeuten der Produktionsprozesse konnten nach einer Prozessoptimierung mittels statistischer Versuchsplanung durch die THM optimiert werden. Dabei wurden bei DCV  $10^6$  bis  $10^7$  Viruspartikel/ml und bei LJV  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  Viruspartikel/ml erreicht. Für die initialen Formulierungsversuche wurde ein Aufreinigungsprozess, basierend auf einer Klärung mittels Filtration und einer Sterischen Exklusionschromatographie (SXC), erfolgreich etabliert, mit viralen Ausbeuten von über 80%. Die SXC ist ökonomisch lediglich für die Formulierungsstudien relevant, nicht für die Anwendung im Feld. Um ein robustes Ausgangsmaterial für die Formulierungsstudien sicherzustellen, wurde der Aufreinigungsprozess entwickelt und aufgereinigte Virusproben den Kooperationspartnern FH Bielefeld und Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME) regelmäßig zur Verfügung gestellt.

Die weiteren Arbeitspakete wurden von den Kooperationspartnern bearbeitet und basierten auf der Entwicklung kostengünstiger technischer Formulierungsverfahren für Insektenviren auf Basis quervernetzter kationischer Polymere, bei der eine über mehrere Wochen formstabile Hülle für die Viren konstruiert wurde (AP3).

### **3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Durch die Zusammenarbeit der Forschungseinrichtungen und Unternehmen konnten vielversprechende Virusisolate wie das Drosophila C Virus (DCV) und das La Jolla Virus (LJV) identifiziert, deren Massenproduktion erfolgreich etabliert, und das Know-how an den Industriepartner BIOCARE transferiert werden. Verschiedene Formulierungen wurden entwickelt, um die insektenpathogene Wirksamkeit und Stabilität dieser Viren zu maximieren und die Anwendung im Freiland zu ermöglichen.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse von Teilprojekt F wurden auf jeweils einer Fachtagung im Inland und im Ausland vorgestellt und in der Forschung im Rahmen eines weiteren Projektes vertieft sowie neue Erkenntnisse in der Lehre im Bachelor- und Masterstudiengang Biotechnologie integriert.

## Abschlussbericht HOPE – Teilprojekt F: Technische Hochschule Mittelhessen

### Teil 2 - Ausführlicher Bericht

Vorhaben (Verbundprojekt): Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst (HOPE)

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung BLE

Förderkennzeichen: 2818807F19

Projektlaufzeit: 15.04.2021 – 31.12.2024

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Projektkoordinator:

**Hochschule Bielefeld (HSBI)**, Prof. Dr. Anant Patel, WG Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, Faculty of Engineering Sciences and Mathematics, Interaktion 1, 33619 Bielefeld – Germany Tel. 0521-1067318, anant.patel@hsbi.de

Projektpartner:

**Technische Hochschule Mittelhessen (THM)**

Prof. Dr. Michael Wolff, Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie, Gutfleischstr. 3-5, 35390 Gießen – Germany, Tel. 0641-3092608, michael.wolff@lse.thm.de

**Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME)**

Dr. Kwang-Zin Lee, Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie, Ohlebergsweg 12, 35392 Gießen – Germany, Tel. 0641-97219150, kwang-zin.lee@ime.fraunhofer.de

**BIOCARE GmbH (BIO)**

Dr. Elisa Beitzen-Heineke, Wellenser Str. 57, 37586 Dassel-Markoldendorf – Germany, Tel. 05562-9505780, info@biocare.de

**Geohumus GmbH (GEO)**

Holger Behrens, Industriepark Allessa- Gebäude G32, Alt-Fechenheim 3, 60386 Frankfurt – Germany, Tel 069-47869480, info@geohumus.com

**Spargel- und Beerenanbau Winkelmann GmbH & Co. KG (WIN)**

Dr. Nadine Winkelmann, Nuttelner Str. 50, 32369 Rahden/Tonnenheide – Germany, Tel. 05771-970649, nw@spargelhof.de

Datum der Berichtseinreichung: **30.06.2025**

## Teil II – Eingehende Darstellung

### 1. Durchgeführte Arbeiten insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung (Verwendung der Zuwendung, erzielte Ergebnisse)

#### 1.1 Problemstellung und Relevanz

Seit einigen Jahren sind besonders viele Beerenkulturen wie Heidel- oder Erdbeere durch das vermehrte und immer frühzeitigere ober- und unterirdische Auftreten von Schadinsekten bedroht [1-2]. In Kombination mit einem Verbot verschiedener chemischer Insektizide und einer steigenden Ablehnung durch Handel und Endverbraucher sehen sich viele Anbauer von Sonderkulturen mit steigenden Bekämpfungsproblemen und hohen Verdienstaussfällen konfrontiert [3]. Zudem erhöhen steigende Temperaturen und neue Schädlinge Ernteauffälle [4]. Besonders mehrjährige Kulturen wie die Heidelbeere, die erst ab 10 Jahren stabile Erträge liefert und über 35 Jahre im Bestand steht, sind betroffen, da Neuanpflanzungen mit erheblichen Kosten verbunden sind.

Oberirdisch wurden dunkle Beerenfrüchte in den letzten Jahren vermehrt von der Kirschessigfliege, *Drosophila suzukii*, geschädigt [5]. Das Insektenweibchen legt ihre Eier in die reifen Früchte, die dadurch unverkäuflich und zu einer Brutstätte neuer Generationen werden. Da ein Weibchen bis zu 400 Eier in ihrem Leben legen kann [6-7], potenziert sich das Problem schnell bis hin zum Totalausfall der Ernte. Die Zahl dieses Schadinsektes stieg seit Mitte des Jahrzehnts von einzelnen Sichtungen in Anlagen in Norddeutschland bis zu einem Maximum mit über 100 Tieren pro Einzelfall. Währenddessen blieb die Anzahl der möglichen Gegenmaßnahmen gleichbleibend gering.

Durch gesteigerte Auflagen beim Einsatz chemischer Insektizide sowie dem Wegfall von PSM-Zulassungen fehlen den Betreibern von Sonderkulturen langfristig die Planungsgrundlagen. Notfallzulassungen stellen aufgrund ihrer Einschränkungen keine langfristige Alternative dar.

Die Verwendung natürlicher Antagonisten wie wirtsspezifischer Viren hingegen verhindern eine Resistenzbildung bei den Zielorganismen und sind nützlingschonend [8]. Die Verwendung von rein biologischen Komponenten erlaubt eine Anwendung sowohl im konventionellen als auch im biologischen Beerenanbau.

## 1.2 Stand von Forschung und Praxis zu Projektbeginn

Insektenviren zählen zu den wirtschaftlich bedeutendsten biologischen Pflanzenschutzmitteln in Deutschland. Auf Basis von Granuloviren werden Obstschädlinge, insbesondere der Apfel- und der Schalenwickler, auf über 30% der kommerziellen Apfelanbauflächen kontrolliert [11]. Problematisch bleibt jedoch die Ausbringung dieser Viren, da sie umformuliert schnell an Wirkung verlieren. Eine ungeeignete Formulierung kann zudem die Wirkung reduzieren und muss präzise an den Organismus angepasst werden.

Zur biologischen Kontrolle von *Drosophila* bieten sich entomopathogene Viren an [9], da diese in der Regel nur eine Art befallen und damit für alle Nichtzielorganismen ungefährlich sind. Die vorwiegende Anzahl von *Drosophila* spezifischen Viren sind RNA-Viren [10]. Kürzlich wurden in Deutschland natürliche Viren der Kirschessigfliege identifiziert, die insektizide Eigenschaften haben. Neben dem bekannten *Drosophila A Virus* (DAV) und *Drosophila C Virus* (DCV) wurde ein neues Virus aus der Familie der *Iflaviridae* aus *Drosophila suzukii* isoliert, das LJV [8].

## 1.3 Zielsetzungen des Projekts, Innovationsgehalt und erwarteter Nutzen

Das Gesamtziel des Projektes ist der ober- und unterirdische, somit holistische Schutz von Beerenobst, besonders Heidelbeeren, gegen *Drosophila suzukii* und gegen Schaderreger wie Dickmaulrüssler und Scarabaeoidea. Dies sollte (1) mittels einer effektiven Sprühapplikation basierend auf einer neuartigen Virusformulierung und (2) einer innovativen Bodenformulierung, basierend auf dem Attract-and-Kill-Prinzip, mit einem entomopathogenen Nutzpilz als Kill-Komponente realisiert werden.

**Spezifisches Ziel von Teilprojekt F im Rahmen des AP 2 war die Etablierung robuster Produktionsplattformen für hoch schädlingsspezifische virale Wirkstoffkandidaten im Labormaßstab - auf der Basis der Auswahl geeigneter Wirkstoffkandidaten durch IME (AP 1) - sowie deren Charakterisierung und Aufreinigung für Formulierungsversuche zum Einsatz als biologische Insektizide zur Überführung in den Produktionsmaßstab.**

Aktuell basieren erste Optimierungen der Produktionsplattformen auf klassischen Insektenkulturmedien, die für pharmazeutische Proteine entwickelt wurden. Diese Medien sind jedoch für die Herstellung viraler Insektizide wirtschaftlich nicht geeignet. Daher müssen kostengünstigere bioökonomische Alternativen entwickelt werden, was in diesem Projekt nicht adressiert wurde, aber Gegenstand eines laufenden Forschungsprojekts an der THM ist. Dort werden Insektenzellmedien, einschließlich solcher für Schneider S2-Zellen, entwickelt, um

biotechnologische Produkte außerhalb des pharmazeutischen Bereichs wirtschaftlich zu produzieren.

Aus diesen Optimierungsversuchen der verfahrenstechnischen Produktionsprozesse wurde eine kontinuierliche Bereitstellung von Virusproben für die FH Bielefeld zur Entwicklung einer wirksamen Formulierung für den Virencocktail (AP 3) sowie für Wirksamkeitstest im Labor (IME/WIN) AP 6 und 7 (WIN) ermöglicht.

#### **1.4 Projektstruktur, Arbeitspakete und Zeitplan**

Das Projekt HOPE gliederte sich in sieben aufeinander abgestimmte Arbeitspakete (AP 1–AP 7), die in zwei Phasen unterteilt und über die Projektlaufzeit hinweg sukzessive oder parallel bearbeitet wurden. Die Planung sah eine initiale Laufzeit von drei Jahren vor (01/2021–12/2023).

##### Übersicht über die für Teilprojekt F relevanten Arbeitspakete:

**AP 1 – Screening nach Viren gegen *D. suzukii* (IME):**

In der Anfangsphase wurden potenziell wirksame insektenpathogene Viren identifiziert, die spezifisch gegen *Drosophila. suzukii* wirken. Das Screening diente der Selektion hoch virulenter Isolate als Grundlage für weitere Entwicklungen.

**AP 2 – Massenvermehrung ausgewählter Viren (THM, IME, BIO):**

##### ***AP 2.1 Entwicklung neuer Kultivierungsverfahren (THM / IME)***

Verfahrenstechnische Entwicklung hinsichtlich hoher Raum-Zeit-Ausbeute einschließlich bestmöglichem Infektions- & Erntezeitpunkt, Aufschlussmethoden, Klärung, Aufreinigung sowie Etablierung und Validierung notwendiger Prozessanalytik zur Produktquantifizierung (qPCR). Qualifizierung der Virusproben auf Infektiosität.

##### ***AP 2.2 Scale-up der Kultivierung (THM / BIO)***

Translation der Prozesstechnologie an den Kooperationspartner BIO für einen Scale-up des Produktionsprozesses und Überführung der Produktkandidaten aus AP 2.1 von kleinen Schüttelkolben zu kontrollierten Prozessbedingungen im 200L bis 300L Maßstab.

**AP 3 – Entwicklung von Formulierungsverfahren für Insektenviren (FHB, BIO):**

Neben der Entwicklung stabiler, sprühfähiger Formulierungen (AP 3.1) stand hier die Prozessüberführung in eine praxistaugliche Pilotproduktion (AP 3.2) im Fokus. Die Formulierungen sollten Lager- und UV-stabil sein und eine hohe biologische Wirksamkeit erhalten.

AP 6 – Wirksamkeitstests (IME, WIN):

In Laborstudien und Topfversuchen wurde die Effektivität der entwickelten Virus- und Pilzformulierungen gegen *D. suzukii* (AP6.1) sowie gegen bodenbürtige Schadinsekten (AP 6.2) untersucht. Diese Tests bildeten die Grundlage für die Auswahl geeigneter Kandidaten für die Freilandversuche.

AP 7 – Praxisnahe Versuche (alle Partner):

Im letzten Projektabschnitt wurden erfolversprechende Formulierungen aus AP 3 und AP 5 in Versuchen unter praxisnahen Bedingungen (Gewächshaus, Freiland) auf dem Gut Winkelmann vor Ort getestet.

## 1.5 Zeitliche Umsetzung und Anpassungen

Der ursprüngliche Gantt-Plan sah eine klare Staffelung der Arbeitspakete mit mehreren Meilensteinen vor. Aufgrund von Verzögerungen (v. a. durch Personalwechsel, und Corona pandemiebedingte Engpässe) wurde die Projektlaufzeit kostenneutral bis 31.12.2024 verlängert. Die Projektstruktur blieb weitgehend erhalten; einzelne Aktivitäten verschoben sich jedoch zeitlich. Die praxisnahen Versuche (AP 7), ursprünglich für 2023 geplant, wurden im erweiterten Projektzeitraum 2024 abgeschlossen.

**Das Teilprojekt F (AP 2.1 *Entwicklung neuer Kultivierungsverfahren*) der Technischen Hochschule Mittelhessen wurde erfolgreich planmäßig abgeschlossen.**

Die Überführung in den technischen Produktionsmaßstab musste aufgrund von Personalveränderungen bei BIO auf die Jahre 2023-24 verschoben werden. Daraus resultierend versorgte die THM die Projektpartner IME und FHB über den gesamten Projektzeitraum kontinuierlich mit Wirkstoffmaterial für Formulierungs- (AP 3) und Anwendungsversuche (AP 6, AP 7), was die Priorität der Entwicklung einer ökonomischen Alternative für die Kultivierungsmedien verschob. Die Medienentwicklung für Insektenzellen ist jedoch aktuell in einem Forschungsvorhaben in einem erweiterten Zusammenhang an der THM adressiert.

### Übersicht über die Meilensteine:

Meilenstein 1 (Q2/2022): Identifikation eines hoch virulenten Virus-Isolats gegen *Drosophila. suzukii* sowie eines wirksamen Pilzisolats gegen bodenbürtige Schädlinge im Labormaßstab.

Meilenstein 2 (Q3/2022): Entwicklung einer sprühfähigen Virusformulierung zur Überführung ins Scale-up.

Meilenstein 3 (Q4/2022): Auswahl geeigneter Materialien und Verfahren zur Herstellung von Granulaten/Kapseln auf Pilzbasis.

Meilenstein 4 (Q3/2023): Auswahl wirksamer Formulierungen für praxisnahe Freilandversuche.

Meilenstein 5 (Q1/2024): Nachweis der Wirksamkeit beider Formulierungen unter Freilandbedingungen.

## **1.6 Ergebnisse Teilprojekt F – Technische Hochschule Mittelhessen**

### Zusammenfassung AP 2:

Für die viralen Wirkstoffkandidaten DCV und LJV konnten Zellkultur-Produktionsverfahren mittels Schneider S2-Zelllinie im Labormaßstab mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute in Standard-Insektenzellmedien etabliert und charakterisiert werden [12 - 14]. Die Verwendung von SF9-Zellen resultierte in signifikant reduzierten Produktausbeuten und wurde daher nicht weiterverfolgt. Der hier angewandte Produktionsmaßstab umfasste 20 – 250 mL.

Die analytische Charakterisierung zur quantitativen Abschätzung der beiden Zielviren basierte auf einer TaqMan qPCR, wobei für die Quantifizierung infektiöser Viruspartikel TCID<sub>50</sub> [12] und FACS-Assays [13] eingesetzt wurden.

Der entwickelte Aufreinigungsprozess für die Formulierungsversuche basierte auf einer Klärung mittels sequenzieller Filtration (5µm und 0.45µm Porengröße) und einer nachgeschalteten SXC, die nach einer erfolgreichen Prozessoptimierung virale Ausbeuten im Bereich von 90 % erreichte. Das quantitative Monitoring des Herstellungsprozesses erfolgte über etablierte qPCR-Assays.

Das Verfahren erbrachte robuste Titer infektiöser Viren (DCV 10<sup>9</sup> bis 10<sup>10</sup>/ L qPCR, FACS, TCID<sub>50</sub>, LJV 10<sup>14</sup>/ L qPCR) bei einem weiten Bereich des kritischen Prozessparameters, der Multiplicity of Infection (MOI, 0.01 - 10) sowohl bei Viren aus nativer Kultur als auch nach der Aufreinigung (SXC). Über primäre Studien wurde die Infektiosität der per SXC aufgereinigten Proben verifiziert. Es wurden nur geringe Verluste der Infektiosität (< 10%) verzeichnet.

Materialien, die mittels Klärung und einer Kombination der Klärung mit SXC aufgereinigt wurden, wurden den Kooperationspartnern von der THM regelmäßig für Formulierungs- und Wirksamkeitsstudien zur Verfügung gestellt.

DCV und LJV unterscheiden sich im Laborversuch grundsätzlich in ihrer Wirkung auf die Wirtszellen. Das gut untersuchte DCV bewirkt – im Gegensatz zum erst kürzlich beschriebenen LJV – eine Lyse der S2-Zellen und ist ebenso hochvirulent gegenüber *Drosophila*-Fliegen. Eine Bestimmung infektiöser Titer mittels TCID<sub>50</sub> ist somit nur für DCV nicht aber für LJV anwendbar. Für LJV sind darüber hinaus bislang keine Antikörper für FACS erhältlich. Bestimmungen zur Infektiosität der Viren erfolgen aktuell mittels in vivo-Systemen an *Drosophila suzukii* Fliegen (IME).

Die hohe Raum-Zeit-Ausbeute des Produktionssystems stellt eine vielversprechende wirtschaftliche Ausgangsbasis für die Produktion dieser viralen Wirkstoffe dar, es besteht aber weiterhin Optimierungsbedarf hinsichtlich der Kosten der eingesetzten Zellkulturmedien. Die ökologischen Vorteile hinsichtlich ihrer biologischen Spezifität gegenüber Schadinsekten rechtfertigen eine zukünftige Optimierung.

Zusammenfassend wurde zeitgerecht für die wirksamen Virusisolate DCV und LJV eine Produktions- und Aufreinigungsplattform auch für größere Produktionsformate in Zellkulturen etabliert.

### Verfahrensentwicklung

THM und IME wählten zwei erfolgversprechende Virusisolate, das DCV und das LJV, als virale Insektizide zur Kontrolle von *D. suzukii* aus.

### Kultivierung/ Produktion von DCV

Nach initialen Vorversuchen mit Schneider 2 (S2)-Zellen und *Spodoptera frugiperda* 9 Insektenzellen (SF-9) wurden nachfolgende Kultivierungen im Labormaßstab in Schüttelkolben (Arbeitsvolumen 20 – 250 mL) ausschließlich mit S2-Zellen für die Etablierung einer künftigen technischen Produktion im Standardmedium (SF900II) und unter für S2-Zellen Standardbedingungen (initiale Zelldichte  $2 \times 10^6$ /mL, 28°C) durchgeführt (12).

DCV zeigt auf S2-Zellen zytopathogene Effekte, die zu einer Zelllyse führen, wobei die Viren im Wesentlichen freigesetzt werden. Der dennoch anschließende Zellaufschluss zur Freisetzung verbliebener intrazellulärer Viruspartikel erfolgte im Labormaßstab über eine Gefrier-Tau-Methode

(-80°C, 22°C). Die Klärung zur Entfernung der Zelltrümmer und restlichen Zellen erfolgte über eine Zentrifugation (25 min; 4°C und 5000g) und Filtration. Der Produktionsprozess von DCV wurde mittels statistischer Versuchsplanung hinsichtlich Mol (Multiplicity of Infection), ToI (Time of Infection) und ToH (Time of Harvest) mit Virusausbeuten von  $10^9$  -  $10^{10}$  /L (FACS, TCID<sub>50</sub>, qPCR, genomic copies equivalent, gce) optimiert.

Folgende weiteren Studien wurden durchgeführt:

(1) zur Unterstützung der Formulierungsstudien wurden die produzierten Viren chromatographisch mittels SXC aufgereinigt, und mehrere Chargen davon für FHB und IME für modellhafte Formulierungen unter optimierten Bedingungen und Wirksamkeitsstudien zur Verfügung gestellt.

(2) Für die Erhebung von Referenzdaten der DCV-Virentiter für die Entwicklung der Quantifizierung mittels qPCR wurde ein Infektions-Assay (TCID<sub>50</sub>) im Labor etabliert (12).

(3) Zur für die Anwendung der Viren als Insektizid notwendigen Differenzierung zwischen Gesamviruspartikeln und infektiösen Viruspartikeln wurde ein FACS-Assays als robustere Quantifizierungsmethode etabliert (13).

Kultivierung/ Produktion von LJV

Die Produktion von LJV unterscheidet sich in Produktivität und Habitus fundamental zu der von DCV. Aus analogen initialen Vorversuchen mit S2- und SF-9-Produktionssystemen wurden wiederum S2-Zellen für die Etablierung einer künftigen technischen Produktion ausgewählt (Zwischenbericht Berichtszeitraum 2022, [14]), LJV ist voraussichtlich gegenüber SF-9 Zellen nicht virulent. Da bei LJV kein zytopathischer Effekte beobachtet wurde, ist ein Zellaufschluss vor der Klärung zwingend notwendig.

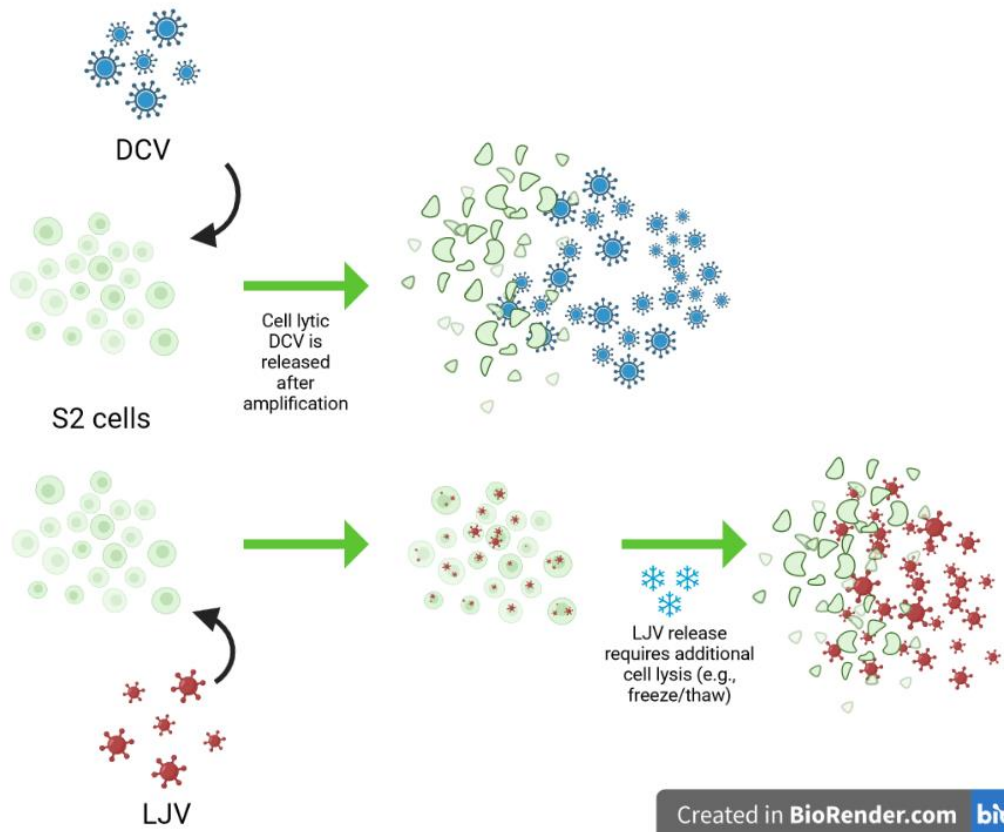


Abbildung 1: Lytische Effekte von DCV auf S2-Zellen (oben) bzw. chronische Infektion mit LJV und Auswirkung auf Virenfreisetzung und Aufarbeitung (unten).

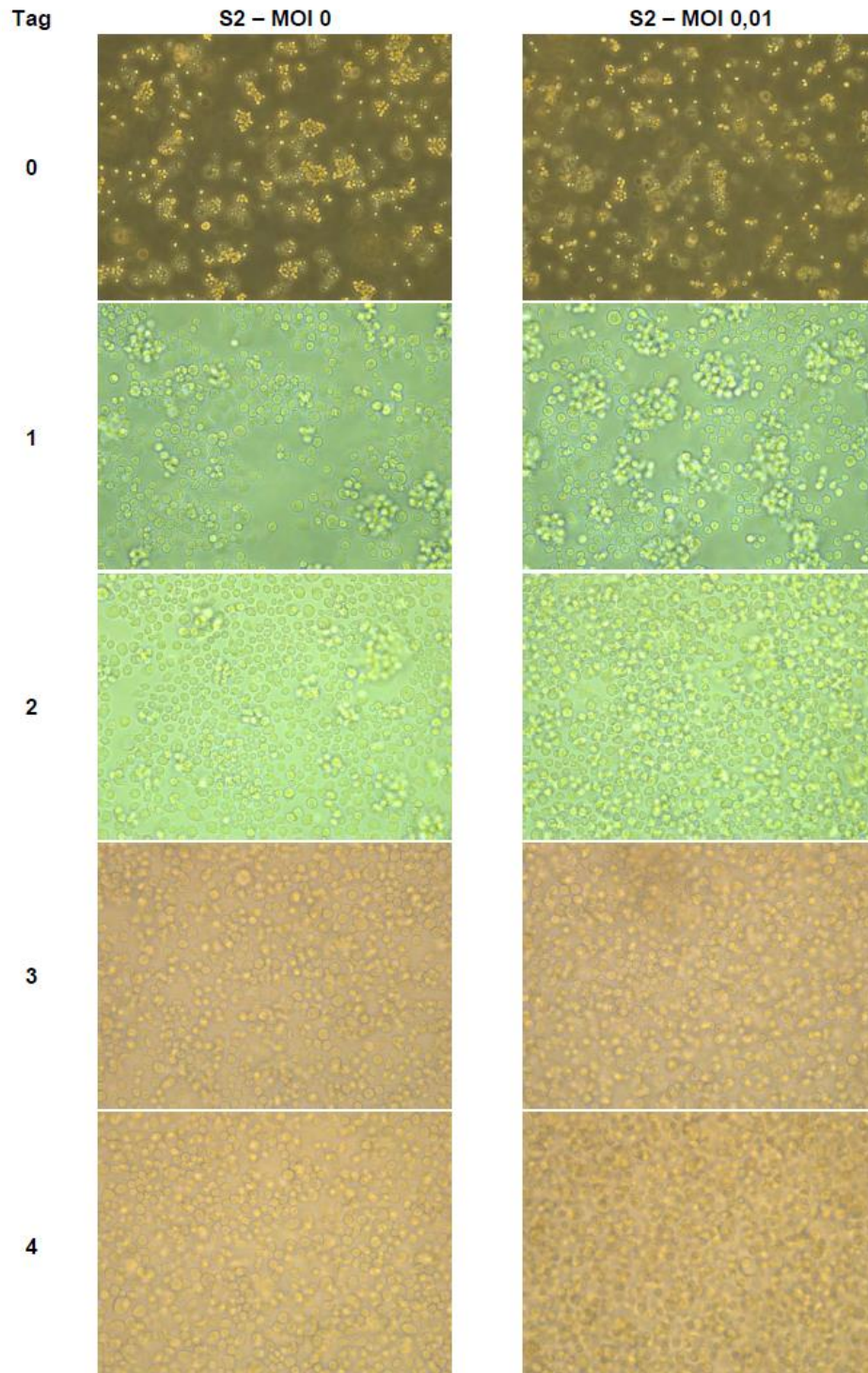


Abbildung 2: Aufnahmen Licht-Mikroskop von nicht-infizierten (MOI 0) und mit LJV infizierten (MOI 0,01) S2 Zellen bei 400x Vergrößerung in Abhängigkeit von der Zeit.

Der Produktionsprozess von LJV wurde hinsichtlich *Multiplicity of Infection* (MOI) und *Time of Harvest* (TOH) optimiert.

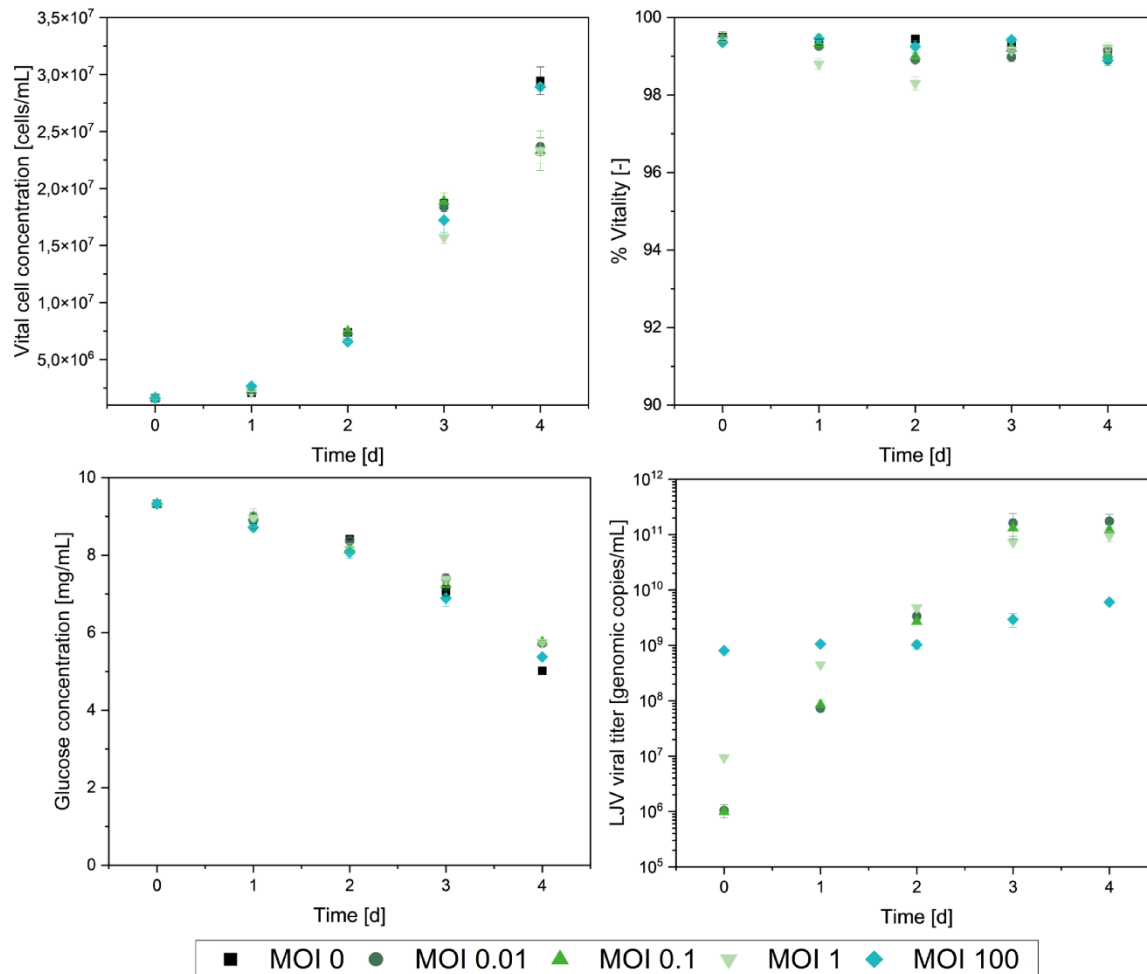


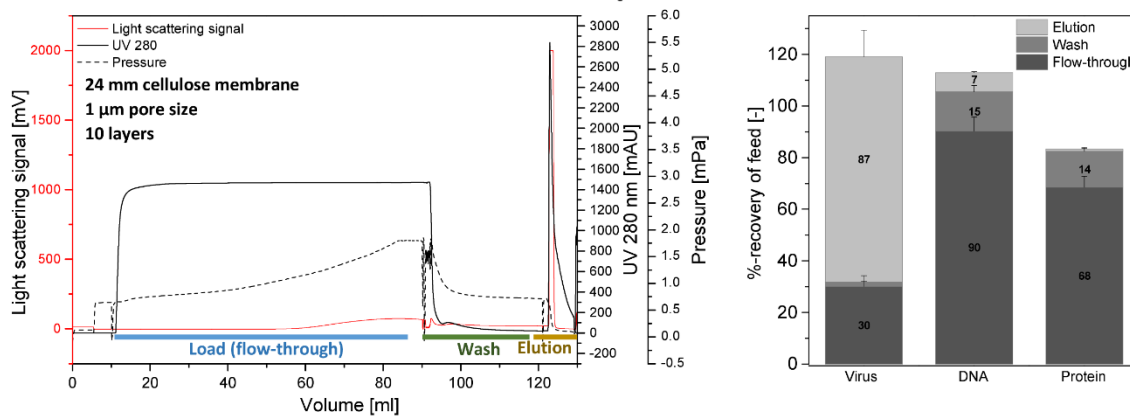
Abbildung 3: Exemplarische Prozessparameter für die Produktion von LJV in S2-Zellen in Abhängigkeit der MOI

Das S2-LJV Produzentensystem war in einem weiten MOI-Bereich produktiver als das DCV-System, wobei Virentiter von  $10^{14}$  bis  $10^{15}$ /mL (TaqMan qPCR, gce) erreicht wurden, was die Erwartungen, basierend auf Literaturwerten, übertraf. Diese wird sich positiv auf die Wirtschaftlichkeit der geplanten Insektizide auswirken.

## Aufreinigungsmethode für DCV und LJV

Die SXC-Methodik zur Aufreinigung ließ sich aus anderen der AG bekannten umhüllten Viren (z.B. Influenza Virus, OrfV, MVA) ableiten und kritische Prozessparameter für eine Ausbeute beider Viren von über 90% anpassen. Auch führte der Up-Scale im Labormaßstab zur Bereitstellung größerer Virenmengen mit einer Ausbeute von ca. 90% Viruspartikel nach Aufreinigung mittels SXC zu keiner Beeinträchtigung der Virusinfektiosität.

### DCV SXC purification



### LJV SXC purification

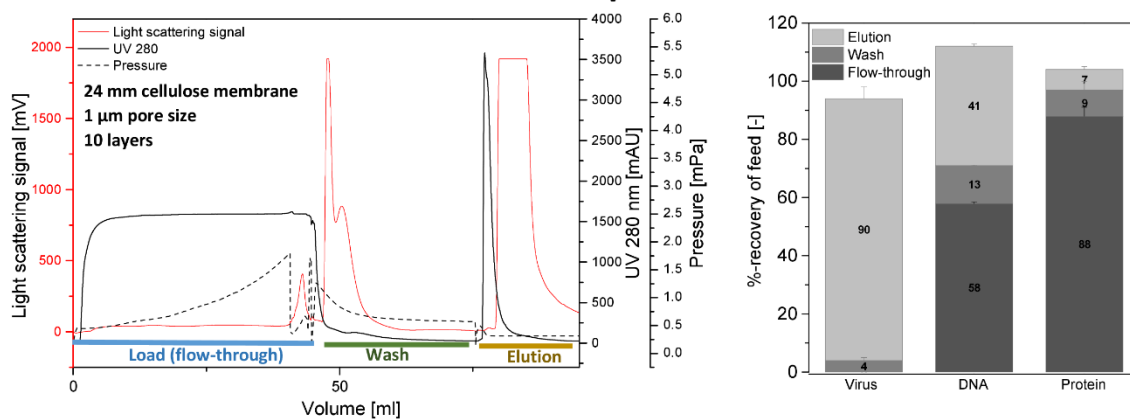


Abbildung 4: Exemplarische Ergebnisse der Aufreinigung der Wirkstoffkandidaten mittels SXC für optimierte Formulierungsstudien (AP3, FHB)

## 1.7 Vergleich mit Erwartungen / Zielerreichung

Beide Produktionssysteme zeigten eine erfreulich hohe Produktivität und die Produktionsverfahren können relativ robust betrieben werden. Die Aufreinigungsmethoden unter den eingesetzten Versuchsbedingungen zeigten bei unseren Versuchen keine signifikante Beeinträchtigung der viralen Infektiosität.

Für das erst vor kurzen beschriebene LJV können die analytischen Methoden TCID<sub>50</sub> und FACS noch nicht eingesetzt werden, da das LJV in S2- und Sf-9-Zellen nicht lytisch amplifiziert wird, und Antikörper gegen Oberflächenproteine von LJV kommerziell nicht erhältlich sind. Daher können derzeit Assays, die eine Aussagekraft auf die Infektiosität der Viren erlauben, lediglich mittels in vivo-Systemen (IME) über *D. suzukii* Fliegen erfolgen. Alternativ erfolgte das Monitoring des Herstellungsprozesses über einen qPCR-Assay (genomische Kopien).

Zusammenfassend wurde für die wirksamen Virusisolate DCV und LJV aus der Produktion in Insektenzellen eine Plattform zur Aufreinigung mittels SXC auch für größere Produktionsformate etabliert. Die entwickelte primäre Klärung ist ausreichend für die Formulierung agrarwirtschaftlicher Produkte.

## 1.8 Bewertung und Schlussfolgerungen

Beide Viren können in wirtschaftlich relevanten Ausbeuten produziert werden, so dass bei Vorliegen erfolgreicher Anwendungsstudien eine hervorragende wirtschaftliche Grundlage gegeben ist.

Die hohe Raum-Zeit-Ausbeute des Produktionssystems im Upstream ermöglicht so eine vielversprechende wirtschaftliche Ausgangsbasis im Vergleich zu chemischen Insektiziden, insbesondere unter der Berücksichtigung der ökologischen Vorteile, wie zum Beispiel der biologischen Spezifität bezüglich der Schadinsekten.

Die Produktionsplattform besitzt hohes Potenzial zur Übertragbarkeit auf weitere virale *Drosophila*-spezifische Antagonisten.

Zur Verbesserung der wirtschaftlichen Konkurrenzfähigkeit am Markt besteht weiterführender Optimierungsbedarf hinsichtlich der hohen Kosten für die Zellkulturmedien bei der Virusamplifikation, im Sinne eines bioökonomischen Ansatzes zur Medienentwicklung. Dies wird aktuell über ein weiteres Forschungsprojekt adressiert.

Für eine künftige Zulassung sind nähere Untersuchungen hinsichtlich Identität und Mutationsdynamik der viralen Wirkstoffkandidaten notwendig.

Weiterer Forschungsbedarf besteht für die unterschiedlichen zytopathologischen Effekte der beiden Viren in Zellkultur und Ihre Auswirkungen auf in vivo Systeme.

Zur Quantifizierung infektiöser Viruspartikel von LJV bedarf es langfristig der Entwicklung einer analogen Labormethodik (z.B. FACS Assay/Antikörper), wofür Antikörper der Oberflächenproteine benötigt werden.

## **2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Im Teilprojekt wurden die Positionen F0838 (Verbrauchsmittel) sowie F0846 (Reisekosten) gefördert, jedoch keine Personalkosten.

Die Verbrauchsmittel wurden für Chemikalien, Medien und Labormaterial verausgabt. Die Mittel für Reisekosten für die Teilnahme eines wissenschaftlichen Mitarbeiters (THM-finanziert) an einer Inlandtagung und einer Auslandstagung verausgabt (siehe auch Punkt 6).

## **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit**

Die von der THM geleistete Projektarbeit (Arbeitspaket 2) war eine wesentliche, notwendige und angemessene Voraussetzung, um die Ziele des Gesamt-Vorhabens erfolgreich umzusetzen. Die von der THM geleisteten Arbeiten führten dazu, dass die in den obigen Abschnitten aufgeführten wissenschaftliche Erkenntnisse und technischen Ergebnisse erreicht wurden und können für die nachfolgend angeführten Verwertungen genutzt werden.

## **4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Mit der Etablierung der dargestellten Produktions- und Aufreinigungsplattform sind die Voraussetzungen für die Entwicklung eines technischen Verfahrens für wirksame Formulierungen von Pflanzenschutzmitteln mit insektenpathogenen Viren geschaffen, um den Befall von Beerenobst durch *D. suzukii* auf ein wirtschaftlich vertretbares Maß zu reduzieren. Der Technologietransfer zu den am Förderprojekt beteiligten Industriepartnern ist erfolgreich erfolgt.

Die hier vorliegende Expertise zur Kultivierung und Aufreinigung von Viren ist grundsätzlich auf andere virale Wirkstoffkandidaten übertragbar und somit universell für weitere Projekte anwendbar. Hierzu zählen auch mögliche Prozessoptimierungen bereits zugelassener und vermarkteter Wirkstoffe.

Nach erfolgreichen Anwendungstests könnten für Bewirtschafter von Sonderkulturen, wie beispielsweise Heidelbeerkulturen, in Zukunft biologische Alternativen zu chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln verfügbar sein. Diese Alternativen weisen eine hohe virale Spezifität gegenüber Schädlingen auf.

Derartige virale Insektizide allein oder in Kombination mit anderen biologischen Pflanzenschutzmitteln stellen eine dringend benötigte insektenspezifische Alternative zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii* dar.

## **5. Bekannt gewordener Fortschritts anderer Stellen auf dem Gebiet des Vorhabens während der Durchführung des Vorhabens**

Für virale Insektizide gegen *Drosophila suzukii* sind im Verlauf des Förderzeitraums von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt geworden, die für die Verwertung der Projektergebnisse relevant sind oder diese in Frage stellen.

## **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses gem. Nr. 5 NABF**

Projektergebnisse wurden auf folgenden Konferenzen präsentiert:

K. Lothert, Y. Harsy, T., Gröb, K.-Z., Lee, M. W. Wolff, Development of cell culture-based production processes for insect viruses to enable targeted insecticide applications, 2023 DECHEMA Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2023 - Novel production routes and processes for bio-pharmaceuticals and industrial bioeconomy.

K. Lothert, Y. Harsy, T., Gröb, K.-Z. Lee, M. W. Wolff, Development of a cell culture-derived viral insecticide to control the spread of *Drosophila suzukii*, 2023 AIChE Annual Meeting

## **Anlagen**

- Literatur
- Posterbeiträge

## Anlage 1 - Literatur

- [1] Fritzpatrick, S.M. (2009) Insect life histories in fruit, shoot and root environments of cranberry and blueberry. ISHS Acta Horticulturae 810: IX International Vaccinium Symposium
- [2] Rodriguez-Saona, et al. (2019) Blueberry IPM: Past Successes and Future Challenges, Annual Review of Entomology, Vol. 64:95-114
- [4] Deutsch et al. (2018) Increase in crop losses to insect pests in a warming climate Science, Science 31 Aug 2018: Vol. 361, Issue 6405, pp. 916-919
- [5] Shower, R. et al. (2018) Insecticidal Activity of Photorhabdus luminescens against Drosophila suzukii. Insects 9, 4, 148
- [6] Kanzawa (1939), Studies on Drosophila suzukii Mats. Kofu. Review of Applied Entomology, 29, 622.
- [7] Walsh et al. (2011) Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential; Journal of Integrated Pest Management
- [8] a) Carrau et al., (2018) Identification and characterization of natural viruses associated with the invasive insect pest Drosophila suzukii, Journal of invertebrate pathology 154, 74-78
- b) Lee, K.Z. et al. (2017) Analysis of virus susceptibility in the invasive insect pest Drosophila suzukii, Journal of invertebrate pathology, 148, 138-141
- [9] Schetelig, M. F. et al. (2017) Environmentally sustainable pest control options for Drosophila suzukii, Journal of applied Entomology, DOI: 10.1111/jen.12469
- [10] Medd, N.C. et al., (2018) The virome of Drosophila suzukii, an invasive pest of soft fruit. VIRUS EVOLUTION 4, 1, UNSP vey009
- [11] Huber, J., (1998) Chapter Title: Europe, Editor: Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., Crook, N. E., Book title: Insect Viruses and Pest Management, Publisher: Willey and Sons, pages 201-215
- [12] Wachtberger, M. (2023) Process Optimization of the production of DCV with S2 cells, Masterarbeit, Technische Hochschule Mittelhessen

- [13] Schaaf, H.L.S. (2022) Etablierung eines Durchflusszytometriebasierten Immuntitrations-Assays für die Quantifizierung von infektiösen Drosophila-C Viren, Bachelorarbeit, Technische Hochschule Mittelhessen
- [14] Y. Harsy (2023) Entwicklung einer zellkulturbasierten Produktion von La Jolla Virus (LJV) als virales Insektizid zur Bekämpfung von Drosophila suzukii, FuE-Bericht, Technische Hochschule Mittelhessen

## Anlage 2 – Konferenzbeiträge

[1] K. Lothert, Y. Harsy, T., Gröb, K.-Z., Lee, M. W. Wolff, Development of cell culture-based production processes for insect viruses to enable targeted insecticide applications, 2023 DECHEMA Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2023 - Novel production routes and processes for bio-pharmaceuticals and industrial bioeconomy

[2] K. Lothert, Y. Harsy, T., Gröb, K.-Z., Lee, M. W. Wolff, Development of a cell culture-derived viral insecticide to control the spread of *Drosophila suzukii*, 2023 AIChE Annual Meeting