

Biotechnologie von morgen

TAK „Single-Use-Technologien in der biopharmazeutischen Produktion“

DIETER EIBL¹, REGINE EIBL¹, DETLEF EISENKRÄTZER², KARIN TIEMANN³

¹INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE, ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN, WÄDENSWIL, SCHWEIZ

²ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, PENZBERG

³DECHEMA E. V., FRANKFURT A. M.

DOI: 10.1007/s12268-013-0334-9
© Springer-Verlag 2013

■ Einweg- oder *single-use*-Systeme (SUS) sind Gegenstände, deren produktberührenden Teile nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt sind und nach ihrem Einsatz entsorgt werden. SUS gibt es in Spritzgussausführung und als flexible Beutel(*bag*)-Systeme, die aus Kunststoffen wie Polycarbonat, Polyethylen oder Ethylvinylacetat bestehen. Sie werden in der Regel vom Anwender gammasterilisiert und vorkonfektioniert bezogen und sind sofort einsetzbar. Aufwendige Vorbereitungsarbeiten wie Sterilisationen sowie Reinigungsarbeiten entfallen. Außerdem gelten SUS als biologisch sicherer als ihre konventionellen Gegenspieler aus Glas oder Edelstahl und weniger belastend für die Umwelt – trotz des Abfallanfalls. So erstaunt es auch

nicht, dass sich SUS, die ihren Ursprung in der Medizintechnik (Blutbeutel) und Lebensmitteltechnik (Verpackungen) haben, in der Entwicklung und Produktion von Biotherapeutika in den vergangenen zehn Jahren gut etabliert haben.

Der Anwender kann heute aus einer Vielzahl von Systemen für das *up-* und *downstreaming* auswählen. So existieren neben SUS für den alltäglichen Laborgebrauch (wie Spritzen, Pipetten, einfachen Kultivierungssystemen, Gas- und Flüssigkeitsfiltern) einfache, periphere Elemente (z. B. Schläuche, Beutel, Probenahme- und Transfersysteme, Konnektoren) und Equipment für Grundoperationen sowie Prozessplattformen (z. B. Mischer, Bioreaktoren, Pumpen, Zentrifugen, Membranadsorber). Mit der Verfügbarkeit von Bioreaktoren mit einem Volumen von bis zu zwei Kubikmetern und SUS für das *downstreaming*

und für die Abfüllung wurde schließlich der Grundstein für die Errichtung erster Produktionsstätten für monoklonale, therapeutische Antikörper und Vakzine gelegt, die komplett aus SUS aufgebaut sind (**Abb. 1**).

Therapeutische Antikörper

Aktuell werden therapeutische, kommerziell erhältliche Antikörper, die mehrheitlich in Säugerzellen exprimiert werden, bisher in hybriden Produktionsstätten hergestellt, in denen Stahl als Werkstoff gegenüber Kunststoff noch dominiert. SUS werden hier in erster Linie für die schnelle Prozessentwicklung sowie präklinische und klinische Musterproduktionen genutzt. Moderne Zellkulturmedien und Hochleistungszelllinien, die Antikörpertiter über fünf Gramm pro Liter garantieren, werden es jedoch zukünftig immer häufiger erlauben, die erforderlichen Antikörpermengen in Zwei-Kubikmeter-*single-use*-Bioreaktoren statt wie bisher in Zwölf-Kubikmeter-Zellkulturreaktoren aus Edelstahl zu produzieren. Dieser Trend wird durch neuartige, effiziente Prozesstechnologien wie dem XD Process der in den Niederlanden ansässigen DSM (mit dem sich die Antikörpertiter eines Zufütterungsverfahrens mehr als verdoppeln lassen) zusätzlich gefördert.

Eine Antikörperproduktion in *single-use*-Bioreaktoren setzt aber voraus, dass die Zulassungsbehörden den vermehrten Einsatz von SUS bewilligen, was wiederum die Beseitigung der aktuell existierenden Schwachstellen der SUS bedingt. Die wesentlichsten Schwachpunkte sind derzeit die *leachables* und *extractables* (Plastikadditive, Stabilisatoren und Bindersysteme), die von dem (aus mehreren Folienschichten bestehenden) Kunststoffbeutel in das Produkt (Kulturmedium oder Zellkulturbrühe mit sekretiertem Antikörper) migrieren können. Klare Regulatorien zu Nachweismethoden und Akzep-



▲ **Abb. 1:** *Single-use*-Produktionsstätte bei Rentschler Biotechnologie GmbH in Laupheim (mit freundlicher Genehmigung der Rentschler Biotechnologie GmbH).

tanzkriterien für *leachables* und *extractables*, aber auch erfolgreiche Aktivitäten in Richtung Beutelmaterialeoptimierung und -standardisierung werden zum zunehmenden Einsatz von SUS in kommerziellen Antikörperproduktionen beitragen.

Vakzine der neuen Generation

Einfacher als die Produktion therapeutischer Antikörper ist die Zulassung von Human- und Veterinärvakzinen, die in Verfahren mit Säuger- und Insektenzellen produziert werden. SUS sind für Impfstoffe der neuen Generation (wie z. B. *Virus-like-particle*-Vakzine) sehr gefragt, erlauben sie doch massive Zeiteinsparungen bei ihrer Entwicklung und Produktion, was im Fall saisonaler und pandemischer Impfstoffe wie gegen Influenza besonders wichtig ist. Darüber hinaus machen sie das Auslassen von Zwischenkultivierungsstufen (im Schüttelkolben oder der Spinnerflasche) möglich, indem in *Kryo-bags* (statt in *Kryo-vials*) eingefrorene Zellen der Arbeitszellbank zur direkten Inokulation des *seed*-Reaktors verwendet werden. Als *seed*-Bioreaktoren haben sich dabei wellendurchmischte SUS bewährt, wobei als Produktionsbioreaktor oft ein gerührtes SUS bevorzugt wird.

Stammzelltherapeutika

SUS sind vor allem wegen der hohen Flexibilität und Prozesszeitverkürzung für Antikörper- und Vakzinproduktionen vorteilhaft, sind aber keine Bedingung. Für die Produktion von Zelltherapeutika, die auf autologen (körpereigenen) und allogenen (körperfremden) Stammzellen basieren, werden sie aus Gründen der Biosicherheit zwingend. Das Zielprodukt sind bioaktive Zellen, die dem Patienten nach erfolgter Ernte und Aufarbeitung via Infusion zur Behandlung schwerer Erkrankungen (z. B. Krebs) verabreicht werden. Von großem Interesse sind humane, mesenchymale Stammzellen (z. B. aus dem Knochenmark), die sehr schmerzempfindlich sind und deren Erhaltung der biologischen Funktion die Gewährleistung ihrer Adhärenz voraussetzt. Soll in Suspension gearbeitet werden, muss deshalb die Eignung der auf dem Markt verfügbaren und für Säugerzelllinien entwickelten *single-use*-Bioreaktoren (einschließlich ihrer Peripherie) für Stammzellkultivierungen untersucht werden. Der Einfluss der hierfür benötigten Mikrocarrier in Verbindung mit dem Kulturmedium und seinen Additiven ist zu berücksichtigen. Benötigt werden *single-use*-Bioreaktoren, die aus-

reichend aktives Zellmaterial für patientenspezifische Therapien liefern und dabei die Expansionsraten der bisher eingesetzten planaren Systeme (Wannenstapel) übertreffen.

Neben *single-use*-Bioreaktoren zur Zellexpansion sind zukünftig ebenfalls *single-use*-Bioreaktoren gefragt, die gezielte Zelldifferenzierungen gestatten. Auch sind brauchbare SUS für die enzymatische Produkternte und die nachfolgenden Aufarbeitungsschritte (Zentrifugation, Zellselektion, Waschen, Abfüllen, Einfrieren) zum Teil bis jetzt noch nicht vorhanden. Bei ihrer Verwendung muss eine Zelldifferenzierung durch die Produkternte und -aufarbeitung vermieden werden.

„Grüne“ und mikrobielle Nischenprodukte

Ebenso wie die kommerzielle Produktion von Zelltherapeutika steckt die der „grünen“ Proteintherapeutika (die mit schnell wachsenden, pflanzlichen Suspensionszellen erfolgt) zurzeit noch in den Kinderschuhen. Die israelische Firma Protalix gilt als Pionier und Wegbereiter auf diesem Gebiet. Sie erhielt im Mai 2012 die FDA-Zulassung für ELEYSO, einem mit gentechnisch veränderten Karotenzellen in *single-use*-Blasensäulen produziertem Enzym zur Behandlung der Gaucherkrankheit. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die Firma greenovation, die in wellendurchmischten *single-use*-Bioreaktoren phototrophe Suspensionszellen von Moosen kultiviert. Wie bei Protalix sind die Zielprodukte verschiedene Proteintherapeutika (z. B. rekombinantes, menschliches Asialo-EPO [Erythropoietin]), die sich mit Säugerzellen nur schwer oder in schlechterer Qualität und teurer herstellen lassen.

Prinzipiell lassen sich für die Produktion von „grünen“ Proteintherapeutika die gleichen SUS verwenden wie für die Produktion mit Säugerzellen. Eine Ausnahme bilden Kulturbrühen, deren Viskosität im Verlauf der Kultivierung stark zunimmt, wodurch sich das anfänglich wasserähnliche Fließverhalten ändert. Für diesen Fall empfehlen sich im Hinblick auf die Verhinderung von Stofftransferlimitationen bei der Kultivierung *single-use*-Bioreaktoren, mit denen sich ein hoher Energieeintrag realisieren lässt. Das sind z. B. wellendurchmischte *single-use*-Bioreaktoren mit mehrdimensionaler Mischbewegung und orbital geschüttelte *single-use*-Bioreaktoren. Dies gilt übrigens auch für die Herstellung von Sekundärwirkstoffen mit pflanzlichen Suspensionszellen, die für kosmetische Applikationen momentan sehr

gefragt sind. Prominente Produktbeispiele sind RESISTEM (Sederma, Frankreich), die PhytoCellTech-Serien (Mibelle Biochemie, Schweiz) und die XTEMcell-Präparate der gleichnamigen Firma in Frankreich.

Jedoch werden auch in naher Zukunft die für Pflanzenzellen und ihre Produkte genutzten SUS ebenso Nischenapplikationen bleiben wie die für Mikroorganismen. Das betrifft vor allem Bioreaktoren für Hochzellichten, obgleich erste für Mikroorganismenkultivierungen modifizierte, gerührte und wellendurchmischte *single-use*-Versionen im Labor- und Pilotmaßstab auf dem Markt sind.

Temporärer Arbeitskreis „Single-Use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion“

Sowohl mit den neuen Anwendungsfeldern für SUS als auch mit ihren Limitationen (zu denen neben der *leachable/extractable*-Problematik die noch nicht ausgereifte Sensortechnik und fehlende Standardisierung zählen) beschäftigt sich der im Frühjahr 2010 gegründete Temporäre Arbeitskreis (TAK) „Single-Use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion“ der DECHEMA. Seine prioritären Ziele sind die Förderung der *single-use*-Technologie im deutschsprachigen Raum sowie die damit verbundene Aus- und Weiterbildung. ■



Dieter Eibl, Regine Eibl, Detlef Eisenkrätzer und Karin Tiemann (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dieter Eibl
Zürcher Hochschule für Angewandte
Wissenschaften
Institut für Biotechnologie, Fachstelle
Bioverfahrens- und Zellkulturtechnik
Campus Grüental
CH-8820 Wädenswil
Tel.: +41-(0)58-934-5711
Fax: +41-(0)58-934-550
dieter.eibl@zhaw.ch