

DECHEMA-Arbeitsausschuss ZELLKULTURTECHNOLOGIE

- BRENNPUNKTPAPIER -

PRÄAMBEL

Der Arbeitsausschuss Zellkulturtechnologie fokussiert auf Zell- und Gewebekulturtechnologien zur Gewinnung von Grundlagenwissen, zur pharmazeutischen Herstellung von Proteinen, Vakzinen, Zell- und Gewebepreparaten sowie zur Evaluierung von Arzneimitteln. Er richtet seine Aktivitäten nach dem größtmöglichen Handlungsbedarf in diesen drei Bereichen aus. Grundlage für die Erfassung und kontinuierliche Aktualisierung dieses Handlungsbedarfs ist das vorliegende Brennpunktpapier, welches im 2-Jahresrhythmus aktualisiert wird. In den vor uns liegenden zwei Jahren wird der Ausschuss besonders aktiv die Themenblöcke „Rationale Bioprozessentwicklung“ und „Organotypische *in vitro*-Modelle“ bearbeiten.

1 GEWINNUNG VON ZELLBIOLOGISCHEM GRUNDWISSEN

1.1 Rationale Bioprozessentwicklung

Trotz aller Fortschritte ist die Entwicklung von Fermentationsprozessen mit Säugerzellen in vielen Bereichen immer noch ein empirischer, auf Erfahrungen basierender Prozess, da das qualitative, insbesondere aber das quantitative Verständnis für die intrazellulären Vorgänge sowie deren Regulation nach wie vor sehr lückenhaft ist. Gleichzeitig besteht vor dem Hintergrund des steigenden Kostendrucks im Gesundheitswesen und des zunehmenden Wettbewerbs zwischen den pharmazeutischen Unternehmen (z.B. durch das Auslaufen des Patentschutzes einiger umsatzstarker Wirkstoffe und die Entwicklung von Biogenerika) ein hohes wirtschaftliches und gesellschaftliches Interesse an einer deutlichen Effizienzsteigerung in der Entwicklung und Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe mit tierischen Zelllinien.

Die Verknüpfung klassisch biotechnologischer Methoden mit der funktionellen Genomanalyse und der Bioinformatik begann vor einigen Jahren in der mikrobiellen Biotechnologie und führte inzwischen zu deutlichen Fortschritten bei der rationalen Generierung von Hochleistungsstämmen und der zielgerichteten Entwicklung optimierter Fermentationsverfahren.

Aufgrund ihrer Neuartigkeit haben entsprechende Technologien in der Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe mit tierischen Zelllinien bisher noch keine Verwendung gefunden, obwohl sich in einzelnen wissenschaftlichen Veröffentlichungen punktuell das Potential einiger der genannten Methoden abzeichnet.

In diesen Kontext ergeben sich folgende zukünftige Forschungsschwerpunkte:

Transkriptomanalyse

Während das Genom vieler Organismen (Mensch, Maus, Ratte) inzwischen sequenziert ist und damit durch kommerziell erhältliche oder speziell angefertigte Microarrays eine Genexpressionsanalyse möglich ist, existieren für den Hamster, das Hauptexpressionssystem der pharmazeutischen Biotechnologie, nur rudimentäre Sequenzinformationen. Einzig ein von der University of Minnesota, USA und dem Bioprocess Technology Institute, Singapur, initiiertes Konsortium mit derzeit neun großindustriellen Mitgliedern verfügt aus einem EST-Projekt über umfangreiche, aber nicht öffentlich verfügbare, Informationen über das aktive Genom von CHO-Zellen. Entsprechende europäische oder nationale Initiativen befinden sich derzeit erst in der Planungsphase, was einen klaren Standortnachteil bedeutet. Dringend geboten ist eine Sequenzierung des Gesamtgenoms einschließlich der nicht-kodierenden Bereiche, um über die aktiven Transkripte hinaus auch die Regulation der Transkription (z.B. über micro-RNA) und epigenetische Veränderungen der Zellen unter Prozessbedingungen analysieren und in der Zelllinien- und Prozessentwicklung frühzeitig berücksichtigen zu können. Die rationale Identifizierung besonders geeigneter Loci zur gerichteten Integration rekombinanter Zielgene bedingt ebenfalls die Kenntnis des Gesamtgenoms.

Proteomanalyse

Die Proteomanalyse tierischer Zellkulturen, z.B. um differentielle Expressionsunterschiede abhängig von Prozessbedingungen oder Zelleigenschaften zu erfassen, kann in erheblichem Maße von den Erfahrungen in der weißen Biotechnologie profitieren. Stimmen die Grundmethodiken der Proteomanalyse mikrobieller Systeme mit der bei tierischen Zellen auch überein, so müssen aber doch für mehrere spezifische Aspekte spezifische Lösungen erarbeitet werden. Dies betrifft vor allem die Kompartimentierung der Zellen (und damit die Organell-spezifische Proteinexpression) und die große Bandbreite posttranslatinaler Modifikationen.

Metabolomanalyse

Auf den ersten Blick erscheint die Analyse intrazellulärer Metabolitkonzentration am ehesten unverändert von der Analyse in mikrobiellen Systemen übernommen werden zu können, ist

die Mehrzahl der Stoffwechselwege doch zumindest ähnlich. Ungelöst sind derzeit aber zwei Problemfelder: Um ein zuverlässiges Abbild des Metaboloms unter Prozessbedingungen zu erhalten, ist ein sehr schnelles Quenching des Stoffwechsels notwendig. Die für mikrobielle Systeme entwickelten Technologien sind aufgrund der deutlich höheren Fragilität tierischer Zellen (wegen der fehlenden Zellwand) aber nicht verwendbar. Unterschiedliche Ansätze von Mikrowärmetauschern bis zu Filtrationsverfahren befinden sich hier bereits in der Entwicklung. Eine noch größere Herausforderung stellt aber die bei der Proteomanalyse bereits angesprochene Kompartimentierung der Zellen dar – es sei an dieser Stelle exemplarisch nur auf den Zentralstoffwechsel hingewiesen. Metabolite wie Citrat oder Pyruvat liegen sowohl cytoplasmatisch als auch intra-mitochondrial vor – allerdings in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen.

Stoffflussanalyse

Bieten die drei bisher genannten Methoden der funktionellen Genomforschung statische Momentaufnahmen aus denen sich erst durch differentielle Analyse zweier oder mehrere Prozesszustände Aussagen zum Einfluss des jeweils betrachteten Parameters ableiten lassen, so erlaubt die Stoffflussanalyse eine Aufnahme der intrazellulären metabolischen Dynamik. Die dabei bislang überwiegend eingesetzte steady-state Methode mit Isotopenmarkierung hat jedoch entscheidende Nachteile und wird zukünftig von einer zeitlich hochaufgelösten Metabolomanalyse abgelöst werden. Entsprechende Technologien zur Untersuchung mikrobieller Fermentationen wurden bereits entwickelt, sind aber nicht auf Säugerzellen übertragbar, so dass die Entwicklung spezifischer Techniken für Zellkulturen noch aussteht.

Handlungsbedarf

- *Sequenzierung des Hamstergenoms*
- *Design von Microarrays zur Transkriptomanalyse von CHO-Zelllinien*
- *Optimierte Methoden zur Isolierung von Zellorganellen für die Proteomanalyse*
- *Erstellung einer CHO-Proteomkarte*
- *Entwicklung schneller, schonender Quenchingmethoden zum Stopp des Zellmetabolismus für die Metabolomanalyse, idealerweise in hoher Zeitauflösung (<1s)*
- *Sensitive Quantifizierung intrazellulärer Metabolite*

1.2 Zell- und Gewebepreparate für die regenerative Medizin

Die Regenerative Medizin mit ihrer Teildisziplin Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres, innovatives und stark expandierendes Forschungsgebiet. Ziel der Regenerativen Medizin ist die vollständige und schonende Wiederherstellung zerstörter oder funktionsgestörter Zellen,

Gewebe oder Organe. Versteht man unter Tissue Engineering die Herstellung von einfachen und komplexen Geweben und Organen *in vitro*, oft auch unter Zuhilfenahmen von Biomaterialien, so weist der wesentlich weitere Begriff Regenerative Medizin auch auf einen Paradigmenwechsel in diesem Gebiet hin. Nicht die Herstellung von möglichst perfekten Ersatzteilen für den Körper steht nunmehr im Vordergrund, sondern das Ziel, mit möglichst geringen aber biologisch sinnvollen und wirkungsvollen Eingriffen den Körper selbst zur Regeneration zu bewegen, teilweise sogar den Körper als Bioreaktor zu nutzen. Das Spektrum der Methoden und Produkte reicht von der Stimulation der *in situ* Regeneration von Geweben durch Pharmaka oder Biologicals über Zelltherapien mit ausdifferenzierten somatischen Zellstämmen, sowie embryonalen oder adulten Stammzellen verschiedener Differenzierungszustände bis hin zum *in vitro* hergestellten Organersatz oder Biohybridorgan, das außer biologischen auch noch technische Komponenten enthalten kann. Biologen, Mediziner, Verfahrenstechniker, Chemiker und Materialwissenschaftler arbeiten im Idealfall integrativ zusammen.

Durch Veränderungen der Altersstruktur werden in den kommenden Jahrzehnten vermehrt Krankheiten bzw. deren Folgen zu therapieren sein, die zunehmende und dauerhafte Funktionsverluste von Zellen und Geweben bis hin zu Entartung und Organversagen verursachen. Dazu gehören, um nur einige zu nennen, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Gefäßkrankheiten, orthopädische Erkrankungen wie akute und degenerative Knorpel-, Knochen- und Zahnerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, MS und Nervenschädigungen, Zerstörungen der Haut durch akute und chronische Prozesse, immunologisch bedingte Krankheiten und Krebs. Viele dieser Krankheiten werden in Zukunft mit Hilfe der Regenerativen Medizin heilbar sein. Schon heute profitieren zahlreiche Patienten von solchen Produkten:

- ***In vitro* kultivierte, fast ausschließlich autologe Keratinozyten und Fibroblasten** werden in verschiedenen Darreichungsformen als Hautersatz bei Verbrennungen und zur Stimulierung der Heilung chronischer Wunden eingesetzt
- **kultivierte autologe Knorpel- und Knochenzellen**, die ihre Matrix selbst mitaufbauen, teilweise auch in Matrix integriert sind, werden zur Regeneration von Knorpel und Knochen nach Verletzungen transplantiert
- **komplexe Leberhybridorgane** werden als Überbrückung bei akutem Leberversagen eingesetzt
- **hämatopoetische Stammzellen** aus Knochenmark und Lymphozyten werden *in vitro* vermehrt, stimuliert und Krebspatienten zur Heilung infundiert.

Dies sind Beispiele für einige fortgeschrittene Aktivitäten auf diesem Gebiet, die bereits seit Jahren von einigen spezialisierten Biotech-Firmen vermarktet werden. Es handelt sich dabei vor allem um autologe Produkte, für die bisher keine Zulassung, sondern lediglich eine Herstellungserlaubnis erforderlich war. Die Entwicklung allogener Produkte, die in vieler Hinsicht wünschenswert wäre, stellt für die Firmen im Moment noch einen wesentlich höheren Aufwand dar, der zudem mit größeren Risiken behaftet ist.

Auch bei der Therapie vieler anderer Erkrankungen gibt es innovative neue Ansätze. Vor allem die neuen Erkenntnisse der Stammzellforschung und der Entwicklungsbiologie geben vielfältige Impulse: Die Regeneration von Nerven und Gefäßen, Stimulation von Angiogenese, Regeneration des Herzmuskels bei Herzinfarkten durch Transplantation differenzierter Zellen oder Stammzellen, Regeneration von Hirngewebe bei Schlaganfall durch Therapie mit neuronalen Stammzellen, die Herstellung eines *in vitro* Lymphknotens sind nur einige Beispiele aus dem breiten Spektrum der experimentellen Ansätze.

Regenerative Medizin heißt aber nicht nur, Produkte für die medizinische Anwendung zu entwickeln. Nur eine zur Produktentwicklung parallel verlaufende intensive Grundlagenforschung ermöglicht die Entwicklung optimal wirksamer, kausaler Therapien. Ein besseres Verständnis der vielfältigen Wechselwirkungen in Organen und Geweben, Grundlagenwissen über die Regulation der Zellfunktionen, Geweberegeneration und – differenzierung sowie Erkenntnisse über die Interaktionen verschiedener Zelltypen und der sie umgebenden Matrix sind der Motor für die Entwicklungen neuer Produkte und Therapien. Weitergehende Investitionen in die Grundlagenforschung sind daher für die erfolgreiche Entwicklung der Regenerativen Medizin unabdingbar.

Biomaterialien spielen eine wichtige Rolle innerhalb des neuen Konzepts der regenerativen Medizin. Natürliche und synthetische Polymere werden in immer größerer Zahl weiterentwickelt und mit viel Kreativität den komplexen Anforderungen der Regenerativen Medizin angepaßt. Sie können als Hydrogele, Folien, Mikrosphären, Membranen, Fasern, Folien, Schäume, Kapillarmembranen, gewobene textile Strukturen etc. verarbeitet werden. Biomaterialien werden als Trägermaterialien, dreidimensionale Gerüste, Bioreaktoren, immunisierende Membranen, Gefäße, Leitschienen für Nerven, Knochen- und Knorpelgrundsubstanz in Kombination mit Zellen und pharmazeutisch wirksamen Substanzen eingesetzt. Dabei müssen die Biomaterialien je nach Anwendungsgebiet vielfältige Forderungen erfüllen:

- Als Carrier für Zellen z.B. bei Haut- oder Gefäßersatz müssen sie Anheftung, Proliferation und die spezifischen Funktion von bestimmten Zellen ermöglichen. Um die Geweberegeneration zu ermöglichen, müssen sie resorbierbar sein, ohne dass

Abbauprodukte negative Auswirkungen auf umliegendes Gewebe, Immunsystem oder auf die Neubildung körpereigener extrazellulärer Matrix haben.

- Als Gerüstsubstanz beispielsweise für Knorpel oder Knochen muss ein Biomaterial zusätzlich noch zu Beginn hohe Stabilität und Formbarkeit besitzen, trotzdem aber allmählich umbaufähig und resorbierbar sein. Die Struktur aller Biomaterialien, die ein Wachstum von Zellen ermöglichen sollen, muss einen ausreichenden Austausch von Nährstoffen, Gasen und Stoffwechselprodukten sicherstellen. Struktur und Oberflächen müssen biokompatibel sein.
- Biomaterialien für die Rekonstruktion von Organen wie Leber oder Pankreas (sogenannte Hybridorgane) sind hingegen nicht resorbierbar und wirken immunisierend, um die Anstoßung der verwendeten allopathen oder xenogenen Zellen zu verhindern.

Technisch gesehen, lassen sich heute geeignete Biomaterialien mit immer neuen Eigenschaften und fast beliebigen Oberflächen herstellen. Doch auch hier sind bis zur Umsetzung in neue Medizinprodukte noch viele praktische Probleme zu lösen (reproduzierbare und ökonomische Produktion, Sterilisation und Lagerung, klinische Testung, Qualitätssicherung und Zulassung). Da diese Disziplin besonders von der interdisziplinären Zusammenarbeit profitiert, sollten die Rahmenbedingungen für diesen Austausch auf jeden Fall verbessert werden.

Trotz aller Erfolgsmeldungen und glänzender Aussichten ist die Regenerative Medizin aber noch von vielen Risiken bedroht. Zum einen waren viele der bisher am Markt gescheiterten Produkte bei extrem hohen Kosten nur geringfügig effektiver als vorhandene konventionelle Methoden, und zum anderen konnte bis heute für effektive Zellprodukte keine relevante Kostenerstattung erreicht werden. Die EU hat im November 2005 endlich eine neue Verordnung für neuartige Therapien (dies sind Gentherapie, Zelltherapie und Tissue Engineering) vorgeschlagen, die jetzt nach und nach ergänzt und diskutiert und hoffentlich bald alle parlamentarische Hürden genommen haben wird. Auch hier ist Informationsaustausch und Koordinierungsbedarf vonnöten. Erst wenn die Rahmenbedingungen stimmen, können in diesem Segment radikale Innovationen auf der Basis neuester Erkenntnisse zur Organ- und Geweberegeneration entwickelt und umgesetzt werden.

Führende Nation auf dem Gebiet der Regenerativen Medizin ist nach wie vor die USA. Südostasien investiert in den letzten Jahren ebenfalls sehr stark in diesen Bereich. Deutschland wird innerhalb der EU sowohl was die Forschung als auch was die Anzahl der Biotechnologieunternehmen, die sich mit diesem Thema befassen, als eine der führenden Nationen neben England, Frankreich und Schweden betrachtet. Es gilt, diese gute Position zu sichern bzw. auszubauen, was nur über eine entschlossene nationale

Entwicklungsstrategie erreicht werden kann, die in jeder Hinsicht unterstützt werden sollte. Diese soll ein investitions- und innovationsfreudiges Klima schaffen, eine wettbewerbsfähige klein- und mittelständige Industrie fördern, Koordinationsstellen für Forschung, klinische Anwendung und Öffentlichkeitsarbeit schaffen, die ethischen und regulatorischen Rahmenbedingungen innerhalb Europas vereinheitlichen sowie die Konzentration auf erreichbare, klinisch besonders relevante und erfolgsversprechende Ziele vorantreiben.

Handlungsbedarf

- *Entdeckung grundlegender Mechanismen adulter Organ- und Geweberegeneration*
- *Interaktionsforschung adulte Stammzellnische – differenziertes Gewebe*
- *Organotypische Zell-Matrix-Interaktion und Zell-Zell-Interaktion*
- *Technische Entwicklungen von organotypischen Kulturen und ihre Anwendung am Patienten*
- *Entwicklung adäquater Qualitätsmaßstäbe und Regularien*
- *Entwicklung und Testung "maßgeschneiderter Biomaterialien" für den jeweiligen Einsatzzweck*
- *Untersuchungen zur Resorption und zum Abbau im Menschen*

2 PHARMAZEUTISCHE HERSTELLUNG

2.1 Vakzine

Diploide Zellstämme werden bei der Weiterentwicklung von Impfstoffverfahren zunehmend von permanenten Zelllinien ersetzt. Diese zeichnen sich zunächst durch eine nicht begrenzte Teilungsfähigkeit aus. Beispiele für die Verwendung einer solchen Zelllinie ist die Produktion von Tollwut- und Poliovakzinen auf adhärennten Verozellen. Grundsätzlich können adhären wachsende permanente Zelllinien auch an das Wachstum in Suspensionskultur adaptiert werden. Die Zellen sind nach der Adaptation in der Lage, sich als Einzelzelle in der Nährlösung schwimmend zu vermehren.

Beginn der neunziger Jahre erfuhren virale Vektoren durch die expandierende Genterapie einen Aufschwung. So waren recht schnell leistungsfähige, sichere retrovirale Vektorsysteme und adenovirale Systeme mit hohem Titer sowie auf anderen Viren basierende Systeme (z.B. Herpesviren, Pockenviren, Adenovirus assoziierte Viren) aber auch nichtvirale Übertragungssysteme erhältlich, die ihren Einsatz in der Gen- und Immuntherapie fanden. Verschiedene Ansätze wurden und werden hier getestet, vielversprechend ist z.B. die Verwendung viraler Vektoren zur Modifikation von dendritischen Zellen, professionellen antigenpräsentierenden Zellen, oder auch die DNA-Vakzinierung. So können z.B. verschiedene Tumorantigene via adenoviralem Gentransfer präsentiert werden, um eine Immunantwort gegen die entsprechenden Tumoren hervorzurufen. Forschungsbedarf

besteht einerseits bei den Vektorsystemen und andererseits besonders bei den Prozeßsystemen. Trotz enormer Fortschritte zu Beginn der 90er und diskreter Highlights in den Folgejahren bei den Vektorsystemen, genannt sei z.B. die *in vivo* Stabilisierung von retroviralen Vektoren, besteht konkreter Handlungsbedarf. So steht die Erweiterung des Infektionspektrums auf nichtreplizierende Zellen bei vielen retroviralen Vektoren an. Bei adenoviralen Vektoren spielen Fragen der Sicherheit sowie der allein gegen den Vektor gerichteten Immunantwort eine Rolle. Das *in vivo* Targeting von viralen Vektoren stellt generell eine große Herausforderung dar und wird zur Zeit erst im Ansatz erforscht. Geeignete Systeme zur Darstellung viraler Vektoren im größeren Maßstab müssen entwickelt und effizientere Methoden des Downstream Processing gefunden werden, die eine höhere Ausbeute und Qualität garantieren. Von Interesse sind Methoden, um die Handhabbarkeit einiger viralen Vektoren, d.h. die technische oder physikochemische Stabilität, zu verbessern.

Handlungsbedarf

- *Etablierung neuer permanenter Zelllinien für die Herstellung von Vakzinen (Suspensionszelllinien)*
- *Optimierung der Virusvermehrung in permanenten Zelllinien unter Verwendung definierter Medien*
- *Nachweis der Wirksamkeit und Wirtschaftlichkeit von Vakzinen aus rekombinanten Zelllinien*
- *Entwicklung neuer Produktionsverfahren für die Gentherapie auf der Basis von viralen Vektoren*
- *Verbesserung der Aufreinigung viraler Vektoren*
- *Optimierung der Stabilität viraler Vektoren*

2.2 Therapeutische Proteine

Seit der Entdeckung der Methode zur Herstellung von Hybridomazellen für die Produktion monoklonaler Antikörper (mAK) durch Köhler und Milstein haben diese Proteine sehr bald eine umfangreiche Anwendung für diagnostische Zwecke gefunden. Anfängliche Erwartungen, die zuerst nur aus murinem Ursprung verfügbaren mAK auch beim Menschen für verschiedene therapeutische Zwecke einsetzen zu können, hatten sich jedoch zunächst nicht erfüllt. Gründe dafür waren u. a. die Immunogenität der Maus mAK im Menschen, die Unfähigkeit der Antikörper in solide Tumoren einzudringen und die Schwierigkeiten, die für eine Therapie nötigen großen Mengen wirtschaftlich herzustellen. Diese Probleme konnten in den letzten Jahren in einigen Fällen durch die Anwendung von geringer immunogenen chimaeren mAK (mAK Molekülen mit Komponenten sowohl von der Maus als auch vom

Menschen) oder humanisierten Maus mAK (bei denen nur noch die Antigen-bindende Region von der Maus stammt) oder sogar humanen mAK sowie durch verbesserte Produktionsmethoden gelöst werden. Beispiele hierfür sind die inzwischen für die therapeutische Anwendung am Menschen zugelassenen mAK Produkte "Reopro" bei angioplastischen Eingriffen, "Rituxan" gegen Non Hodgkin Lymphome, "Remicade" gegen Morbus Crohn, "Zenapax" und "Simulect" gegen Transplantationsabstoßung sowie "Herceptin" bei Brustkrebs. Eine erfolgreiche Entwicklung weiterer therapeutischer mAK ist zu erwarten. Insbesondere zur Behandlung verschiedener Krebsarten, zur Bekämpfung bakterieller Infektionen sowie zur Immunmodulation sind weit über 300 neue mAK in klinischen Prüfungen. Es besteht nach wie vor Bedarf an schnellen, kostengünstigen Technologien zur Generierung spezifischer Antikörper. Die Beeinflussung der Molekülstruktur und -qualität durch die Kultivierungsbedingungen ist gerade bei therapeutisch eingesetzten Proteinen von besonderer Bedeutung. Die Kultivierung von tierischen Zellen unter GMP-Bedingungen in großen Dimensionen stellt immer noch eine große Herausforderung dar. Mit dem Erreichen von Titern von über 19 g/l in den letzten Monaten hat die Zellkulturtechnologie hier aber bereits einen signifikanten Beitrag zur Verbesserung pharmazeutischer Herstellungsmethoden geleistet. Hier ist der Fokus in den letzten Jahren auf Innovationen im Downstream-Bereich gewechselt, die nicht Gegenstand der Ausschussarbeit sind. Im Zellkulturbereich konzentrieren sich die Ansätze nun auf die bereits in Kapitel 1.1. aufgeführten Herangehensweisen. Diese sollen in der Praxis der pharmazeutischen Herstellung zukünftig nachstehenden Handlungsbedarf bedienen:

Handlungsbedarf

- *Definierte Kulturmedienentwicklung*
- *Optimierte Kulturführung z.B. mittels Etablierung von Steuerungstechnologien auf der Basis "Künstliche Intelligenz" / Modellierung*
- *Schnellmethoden zur Bestimmung der Wirkstoffaktivität während der Prozessentwicklung*

2.3 Disposable-Technologie bei der Kultivierung tierischer Zellen

Als man in den 70iger und 80iger Jahren des letzten Jahrhundert begann, tierische Zellen in größerem Maßstab z. B. für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern zu kultivieren, kamen verstärkt Rollerbottles, Hohlfasermodule (z.B. das ENDOTRONICS-System) und Microcarrier (z.B. das VERAX-System) zum Einsatz. Als der Bedarf besonders bei den therapeutisch interessanten Proteinen anstieg, stieß man mit diesen Technologien bei der Maßstabsvergrößerung sowohl verfahrenstechnisch als auch in betriebswirtschaftlicher Hinsicht an Grenzen. Nachdem es dann gelang, CHO-Zelllinien in Suspension zu kultivieren, war es daher nahe liegend, die Erfahrungen der industriellen Mikrobiologie zu nutzen und

verstärkt den gerührten Kessel einzusetzen. Diese Technologie ist heute „state of the art“ und in der Industrie bis zu einer Kultivierungsdimension von 20 qbm etabliert. Ende der neunziger Jahre kamen dann die ersten Einweg-Bioreaktoren auf den Markt (z.B. Wave-Reaktor). Auslöser für die Entwicklung dieser Technologie waren weniger fachliche Unzulänglichkeiten bei der Kultivierung von tierischen Zellen in Edelstahl-Bioreaktoren, sondern eher betriebswirtschaftliche Gesichtspunkte. Die Etablierung von Edelstahl-Bioreaktoren und ihr Betrieb erfordern enorm hohe Investitionen und eine technologische Infrastruktur auf hohem Niveau. Besonders im Umfeld der GMP-konformen Produktion von Pharmaproteinen führen die Problemlösungen der Sterilisierbarkeit und Reinigbarkeit gegenüber der Single-Use-Technologie zu betriebswirtschaftlichen Nachteilen, die sich auf die Herstellkosten negativ auswirken. Im Gegenzug stellen sich aber andere Probleme mit der Disposable-Technologie ein: wird bei der Kultivierung in sog. SUB's (single use bioreactor) die gleiche Reproduzierbarkeit, Qualität der erfassten und erfassbaren On-Line-Daten bei vergleichbarem Arbeitseinsatz durch das Personal erreicht? Hinzu kommen Aspekte der Sterilität bzw. Sterilisierbarkeit (z.B. beim Transfer-System) oder der Qualität der verwendeten Einwegmaterialien (Extractables and Leachables) hinzu. Das Design von Produktionsstätten als auch die Arbeitsabläufe erfährt eine Veränderung (z.B. bei der Bereitstellung von Medien).

Nicht im Fokus der Betrachtungen des Arbeitsausschusses ist der Einsatz der Disposable-Technologie im Bereich des Downstream-Processing (z.B. Filtration oder Adsorption), der Produktlagerung oder des Filling and Packaging. In diesen Bereichen werden Einwegmaterialien seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt (Beispiel: Blutbeutel).

Handlungsbedarf

- *Bewertung der Disposable-Technologie sowohl unter Zellkultur-spezifischen als auch unter betriebswirtschaftlichen Aspekten, um ihre Nachteile aber auch Vorteile zu benennen und damit ihre Einsatzgebiete bei der Kultivierung von tierischen Zellen im großem Maßstab (> 100 Liter) besonders in einem GMP-Umfeld zu beschreiben*
- *Neutrale Vergleiche marktgängiger Disposable-Systeme unter Berücksichtigung aller Aspekte, da die Mehrzahl der bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema aus der Feder der Hersteller oder ihnen nahe stehender Organisationen kommen*

3 EVALUIERUNG VON ARZNEIMITTELN

3.1 Designerzelllinien

Die Identifikation und funktionelle Analyse von Proteinen und Substanzen erfordern die schnelle Produktion von Zellen und Proteinen für das High-Throughput-Screening (HTS).

Eine vorhersagbare, gut regulierbare Expression von Proteinen in Designerzelllinien würde die Untersuchung der Wirkung von Substanzen und Proteinen auf die Zellphysiologie oder den Organismus beschleunigen und verbessern. Dafür werden Proteine oder modifizierte Proteine in Zelllinien überexprimiert, in Zelllinien neu exprimiert, die das Protein normalerweise nicht exprimieren oder die Proteinexpression wird funktionell nihilisiert. Für die gezielte Expression werden die Gene mit physikalischen (Elektroporation, Injektion, Magnetismus), chemischen (Kalziumphosphat, kationische Liposomen, Polymeren, geladene nicht liposomale Komplexe) oder viralen Verfahren in die Zellen gebracht. Die verfügbaren Verfahren induzieren alle eine Stressantwort in den Zellen und die Effizienz und Dosierbarkeit sind bisher sowohl stark Zelltyp abhängig als auch nicht optimal regulierbar. Mit den vorhandenen viralen Systemen (Lentiviren, Adenoviren) können die meisten Zelltypen zwar effizient transfiziert werden aber ohne eine Regulierbarkeit der Genexpression. Diese Systeme unterliegen ferner alle der biologischen Sicherheitsstufe 2 was ihre Anwendbarkeit zusätzlich eingrenzt. Die Herstellung von Zelllinien, die bestimmte Gene gar nicht mehr ausdrücken ist bisher sehr aufwendig. Bei den gängigen Methoden wie siRNA, bei denen die spezifische RNA targetiert wird, kann nie die ganze RNA deletiert werden und die Expression ist zeitlich variable, was zu Interpretationsunsicherheiten führt.

Eine effiziente, reproduzierbare, gerichtete, einfache und zellschonende Überexpression beziehungsweise funktionelle Nihilierung von Proteinen in gut charakterisierten, möglichst pathophysiologisch relevanten Zelllinien würde die Auswahl und Erforschung von Substanzen revolutionieren. Dies wäre durch eine targetierte Expression in auf Expressionsstärke und Regulation klar definierten Chromosomenloki in Zelllinien, die metabolisch und biologisch-funktionell (Expressionsdaten, Signalweganalysen, Funktion) charakterisiert sind möglich. Bei der stabilen Expression rekombinanter Proteine sollte die eingeschleusten Gene durch die Verwendung von gut untersuchten Regulatorsequenzen für die Transkription, Translation und Lokalisation optimiert werden. Verfahren zur schnellen und günstigen Analyse und Herstellung von Genen, die in Bezug auf ihre Codons, ihre Leadersequenzen und ihre posttranslationalen Modifikationsstellen optimiert sind, würden die Proteinherstellung verbessern und verkürzen. Für viele Anwendungen ist eine gut kontrollierbare, induzierte Expression notwendig.

Für den gentherapeutischen Ansatz ist die Entwicklung sicherer und effizienter Übertragungssysteme und Vektoren von großer Bedeutung. Hierfür bieten Designerzelllinien ein ideales Untersuchungstool. Die Möglichkeit der spezifische Targetierung unterschiedlicher Designerzelltypen wäre sinnvoll und würde neue Anwendungsfelder für Forschung und Therapie erschließen.

Eine weitere interessanter Möglichkeit ist die Generierung von immortalisierten Designerzelllinien, die man gezielt zur Differenzierung in bestimmte Zelltypen induzieren kann. Dies könnte mit Zelllinien wie Fibroblasten, Teratokarzinomzellen oder Mesenchymzellen gelingen. Die Differenzierung könnte durch ein gezieltes Anschalten oder Ausschalten von Genen geschehen, induziert durch Substanzen, modifizierende RNA Moleküle oder durch in die Zelle transfizierte, induzierbare Regulatoren. Die Zelllinien sollten als Modelle auch *in vivo* einsetzbar sein und in ihren Eigenschaften möglichst der *in vivo* Situation nahe kommen.

Als Nachweissysteme für *in vitro* Untersuchungen kommen verbesserte, nicht-invasive Messverfahren wie die Impedanzmessung in Betracht. Vorstellbar sind auch kurzlebige, nicht zellschädigende, spezifische Liganden oder Substrate die mit Fluoreszenz oder Lumineszenz nachweisbar sind. Für *in vivo* Untersuchungen wären neben den vorhandenen Markerproteinen (wie GFP und Luziferase) nicht-toxische, kleine Proteinmarker interessant oder der Nachweis von spezifischen Analyten und Biomarkern.

Handlungsbedarf

- *Reproduzierbare Bereitstellung von physiologisch und pathophysiologisch relevanten, funktionell charakterisierten Zellen für 2D und 3D Kulturen*
- *Effiziente, nicht toxische Verfahren zur Proteinexpression in allen Maßstäben*
- *Effiziente Konstruktion von für die verschiedenen Anwendungen optimierter Gene*
- *Verbesserte Systeme für Optimierung, Targetierung und Induktion von exprimierten Proteinen (transient und stabil) für eine vorhersagbare, gut regulierte Expression von Proteinen*
- *Spezifische Targetierung von Designerzelltypen*

3.2 Organotypische *in vitro* Modelle

Die Bereitstellung geeigneter Säuger-Zellmodelle, mit und ohne Expression von heterologen Proteinen, für die Grundlagenforschung, die Medikamentenentwicklung, die Diagnostik und für die Therapie ist eine fächerübergreifende Disziplin und umfasst neben der Zellkulturtechnologie die Molekularbiologie, die Biotechnologie, die Virologie und die biochemische Analytik. Aufgrund der unterschiedlichen Ziele und Fragestellungen müssen interdisziplinär verschiedene zellkulturtechnologische Lösungen entwickelt werden wie reproduzierbare, gewebeähnliche Kultivierungsmethoden, die reproduzierbare Bereitstellung von physiologisch und patho-physiologisch relevante Zelllinien in größeren Mengen mit überschaubaren Kosten sowie effiziente, schnelle, reproduzierbare und nicht-toxische Expressionssysteme.

Zur Funktionsanalyse von Proteinen, zur Charakterisierung der Wirkung von Substanzen sowie zur Analyse von Signalwegen werden neuartige Zellmodelle mit hochsensitiven, spezifischen Nachweissystemen benötigt. Diese Zellmodelle sollten die Situation im Körper widerspiegeln und in größeren Mengen kultivierbar sein. Als Zellmodelle für die Untersuchung von Substanzen werden gegenwärtig immer noch überwiegend transformierte, immortalisierte Zelllinien verwendet, die über längere Zeiträume ohne große Veränderungen als Monolayerkultur kultiviert werden können. Die Verwendung von immortalisierten oder nicht transformierten Zellen in organähnlicher Anordnung steht noch in den Anfängen und ist zur Zeit noch sehr kostenaufwendig und arbeitsaufwendig. Die Generierung von speziellen Zelltypen aus adulten Stammzellen könnte hier eine deutliche Verbesserung darstellen wie auch die durch Expression bzw. Deletion bestimmter Gene maßgeschneiderten Zelllinien. Organ ähnliche Gewebekulturen wären denkbar durch eine Kombination von gezielter Stammzellendifferenzierung und der Verwendung von speziell beschichteten 3D Matrices zur Kultivierung der Zelltypen in einer definierten Anordnung. Hier ist noch wesentliche Grundlagenforschung zu betreiben.

Die Optimierung der Kulturmedien und Kultivierungssysteme ist ein weiterer wichtiger Bereich für Zellkulturtechniken zur Arzneimittelevaluierung. Ein optimiertes Medium sollte die Zellphysiologie und die Funktion der Zelle berücksichtigen. Das Medium sollte nur die Nährstoffe und Faktoren in ausreichenden Mengen enthalten, die nach Analyse der optimalen Bedingungen der Zelle in diesem bestimmten physiologischen Zustand essentiell sind. Diese Analyse sollte die Rolle anderer interagierender Zelltypen mit einschließen sowie die Verwendung von extrazellulären Matrixproteinen oder einen funktionellen Ersatz für diese Proteine. Modulare Kulturgefäße für eine flexible 3D Kultivierung verschiedener Zelltypen mit regulierbarer Perfusion wären dafür notwendig.

Handlungsbedarf

- *Reproduzierbare Bereitstellung von physiologisch und pathophysiologisch relevanten, funktionell charakterisierten Designerzelllinien*
- *Günstige, reproduzierbare Generierung von spezifischen Zelltypen oder Organen aus adulten Stammzellen*
- *Modulare Kulturgefäße für 3D Kultivierung verschiedener Zelltypen in Perfusionskultur*
- *Analyse des Bedarfs an Nährstoff und Faktoren von Zellen und Gewebeverbänden in verschiedenen physiologischen Zuständen zur Bereitstellung optimaler Nährmedien*
- *Spezifische Targetierung von Geweben*