

# Entwicklung und Produktion aus tierischer Zellkultur

## Rekombinante Faktoren der Blutgerinnung

BERTHOLD BÖDEKER

Viele der ehemals nur aus Blutplasma gewonnenen Proteine der Blutgerinnung werden aufgrund knapper Verfügbarkeit von Plasma sowie des potentiellen Risikos einer Viruskontamination über einzelne Plasma-Donoren alternativ über gentechnische Methoden hergestellt. Dies ist nicht nur sicherer und reproduzierbarer, sondern theoretisch auch in unbegrenzter Menge möglich.

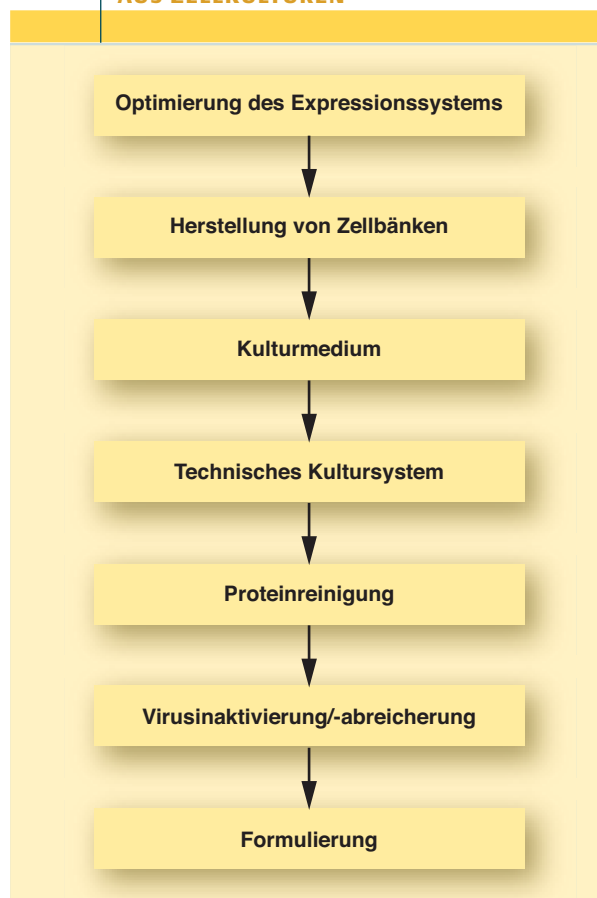
### Prinzip der gentechnischen Herstellung

In der Regel werden rekombinante Blutgerinnungsfaktoren aus tierischen Zellkulturen in gerührten Bioreaktoren in Fermentationsprozessen hergestellt. Die für eine erfolgreiche Produktion solcher Proteine aus Zellkulturen notwendigen Entwicklungsschritte sind in Abb. 1 dargestellt. Zuerst wird das humane Gen, das das Protein kodiert, über gentechnische Methoden isoliert und in eine immortalisierte tierische Zelllinie transferiert. Über einen oder mehrere in den Vektor integrierte Selektionsmarker werden stabil transgenierte Zellklone isoliert und anschließend auf die Produktion des rekombinanten Wirkstoffs analysiert. Die resultierenden Wirtszellen, auch als "Expressionssystem" bezeichnet, werden dann *in vitro* kultiviert und setzen das gewünschte humane Protein in das Kulturmedium frei. Die Zellen werden anschließend als Zellbank niedergelegt. Dies geschieht in zwei Stufen. Zuerst wird die so genannte *Master Cell Bank* (MCB) niedergelegt. Von dieser wird eine *Working Cell Bank* (WCB) abgeleitet. Zukünftig wird dann jeder Produktionszyklus mit Zellen der in flüssigem Stickstoff gefroren gelagerten WCB gestartet. Weitere wichtige Komponenten bei der Herstellung rekombinanter Proteine sind

- das Kulturmedium, in dem die Zellen wachsen und in das sie das Produkt freisetzen,
- das technische Kultursystem, welches zur industriellen Herstellung eingesetzt wird, um die Zellen unter kontrollierten Bedingungen zu vermehren,
- die anschließende Reinigung oder Aufarbeitung des Produktes zu hoher Reinheit und spezifischer Aktivität,
- die Formulierung und Fertigung des Endproduktes, was in der Regel über Gefriertrocknung realisiert wird, um eine lange Lagerstabilität zu erreichen,
- ein in die Aufarbeitung integrierter Virusinaktivierungsschritt bzw. das theoretische Virusabreicherungspotential der Reinigung, um die diskutierte, theoretische Möglichkeit einer Kontamination auszuschalten.

Eine Übersicht über die am weitesten entwickelten rekombinanten Faktoren der Blutgerinnung – Faktor VII (rFVII), Faktor VIII (rFVIII) und Faktor IX (rFIX) – ist in Tab. 1 dargestellt. Alle diese rekombinanten Proteine sind bereits weltweit als Medikamente zugelassen. Bei den rFVIII-Präparaten gibt es mehrere lizenzierte Produkte, die teilweise be-

**ABB. 1** ENTWICKLUNGSASPEKTE FÜR DIE HERSTELLUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS ZELLKULTUREN



**TAB. 1 | LIZENSIERTE REKOMBINANTE GERINNUNGSFAKTOREN**

Rekombinantes Protein	Kürzel	Handelsname	Firma	Zulassung
aktivierter Faktor VII	rFVIIa	NovoSeven®	Novo-Nordisk	1995
Faktor VIII	rFVIII	Recombinat®	Baxter Hyland Immuno	1992
		KOGENATE® Bayer	Bayer HealthCare	2000
		Helixate® NexGen	ZLB Behring	2000
		ADVATE®	Baxter Hyland Immuno	2003
		BDD-rFVIII	ReFacto®	Wyeth
Faktor IX	rFIX	Benefix®	Baxter Hyland Immuno	1997

reits Produkte der 2. Generation bzw. 3. Generation darstellen. Dabei ist anzumerken, dass Helixate® NexGen identisch mit KOGENATE® Bayer von Bayer HealthCare ist und von Bayer HealthCare hergestellt wird. Zusätzlich werden weitere rekombinante Plasmafaktoren, wie von-Willebrand-Faktor (VWF), Protein C und Antithrombin III, zurzeit präklinisch oder klinisch entwickelt [1].

Nachfolgend werden die Produktionsprozesse der zugelassenen, rekombinanten Gerinnungsfaktoren vergleichend nach den Kriterien Zelllinie und Kulturmedium, Zellkultivierung und Bioreaktoren, Proteinreinigung und Formulierung sowie Virussicherheit zusammengefasst. Da es sich um Industrieprozesse handelt, sind Detailinformationen teilweise nicht veröffentlicht. Die hier zusammengefassten Informationen beziehen sich auf mehrere Übersichtsartikel [2-6] sowie die jeweiligen Produkt-Monographien der Vertriebsfirmen.

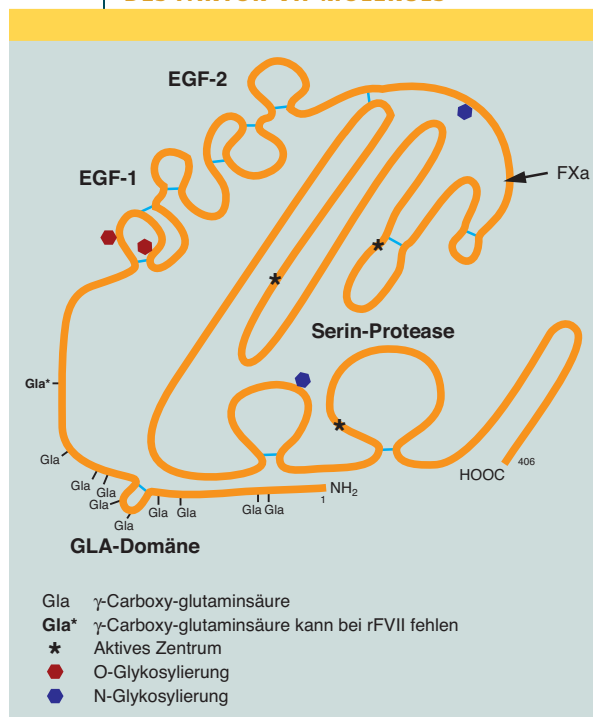
**Zelllinien und Kulturmedium**

Die wichtigsten Elemente der rekombinanten Zelllinien sind in Tab. 2 zusammengefasst.

**NovoSeven®:** Der humane Faktor VII besteht aus einem einkettigen Molekül von 406 Aminosäuren, das zur Aktivierung über eine spezielle Protease in die aktive zweikettige Form FVIIa überführt wird (Abb. 2). Die Gensequenz des Proteins wurde isoliert und in *Baby Hamster Kidney Cells* (BHK-Zellen) kloniert. Die Aktivierung zum zweikettigen Molekül erfolgt quantitativ im späteren Verlauf der Herstellung bei den beiden letzten Ionenaustausch-Chromatographien der Proteinreinigung, so dass das Endprodukt aktivierter Faktor VII (rFVIIa) ist. Das zur Produktion verwendete Kulturmedium enthält keine Zusätze humanen Ursprungs, wohl aber fötales Kälberserum zu Beginn der Kultivierung.

**Recombinat®**, **ADVATE®:** Das natürliche humane Faktor-VIII-Protein ist das größte bisher erfolgreich klonierte Molekül (Abb. 3). Es hat ein Molekulargewicht von ca. 320 kDa und ist hochgradig glykosyliert. Das Gen für FVIII wurde in *Chinese Hamster Ovary Cells* (CHO-Zellen) transfiziert. Um rFVIII in serumfreiem Medium zu stabilisieren, wurden die rekombinanten Zellen nachträglich mit dem Gen für humanen vWF transfiziert, so dass die Zellen rFVIII und rVWF zugleich exprimieren. Im Falle von Recombinat® enthält das Medium die bovinen Zusätze Insulin, Rinderserum-

**ABB. 2 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FAKTOR-VII-MOLEKÜLS**



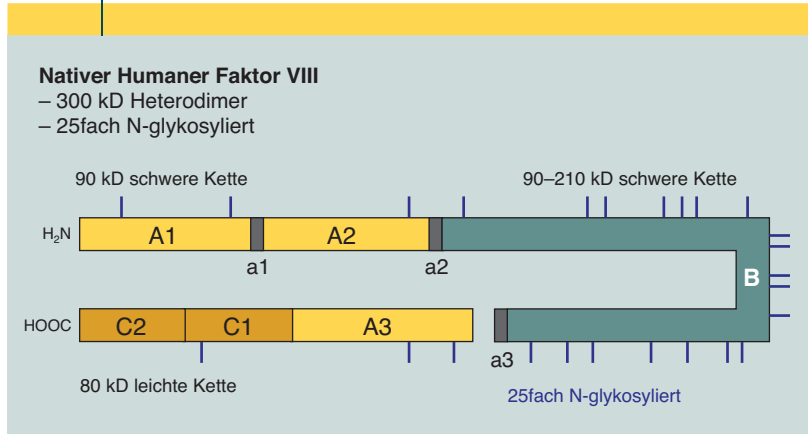
albumin und Aprotinin, einen Proteaseinhibitor. Die Weiterentwicklung ADVATE® hat als Verbesserung ein Medium ohne Zusatz tierischer und menschlicher Komponenten.

**ReFacto®:** Dieses Produkt ist im Unterschied zu den anderen rFVIII-Präparaten ein verkürztes Faktor-VIII-Molekül

**TAB. 2 | EXPRESSIONSSYSTEME DER LIZENSIERTEN REKOMBINANTEN GERINNUNGSFAKTOREN**

Protein	Zelllinie	exprimiertes Molekül
NovoSeven®	BHK	einkettiger humaner Faktor VII
Recombinat®/ADVATE®	CHO	vollständiger humaner Faktor VIII, Koexpression von humanem VWF
ReFacto®	CHO	B-Region verkürzter humaner Faktor VIII mit 14 Aminosäuren Peptid
KOGENATE® Bayer	BHK	vollständiger humaner Faktor VIII
Benefix®	CHO	humaner Faktor IX, Koexpression von PACE-Sol

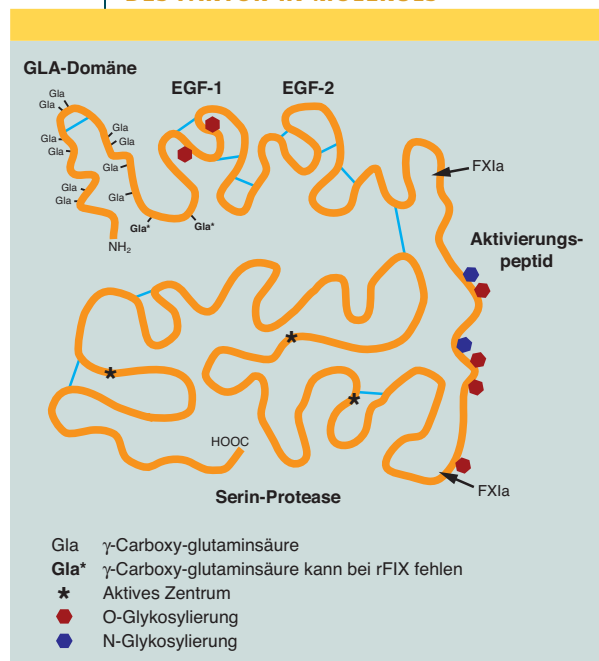
**ABB. 3 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FAKTOR-VIII-MOLEKÜLS**



mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, dem die für die biologische FVIII-Aktivität unwichtige mittlere B-Region fehlt. Hier sind die beiden aktiven 80-kDa- und 90-kDa-Seitenketten, direkt durch ein aus 14 Aminosäuren bestehendes Peptid verknüpft. Das zur Kultivierung verwendete Medium ist serumfrei und enthält Humanalbumin (HSA) und rekombinantes Insulin als Zusätze.

**KOGENATE® Bayer:** Das Gen für den natürlichen Faktor VIII wurde in BHK-Zellen transferiert und zu hoher Kopienzahl amplifiziert. Die Zellen sind an serumfreies Medium und Suspensionsbedingungen adaptiert, wobei die Stabilisierung des Faktor-VIII-Moleküls nicht über Koexpression mit vWF, sondern über synthetische niedermolekulare organische Substanzen im Kulturmedium erreicht wird. Letzteres enthält eine humane Albuminfraktion und rekombinantes Insulin als Additive.

**ABB. 4 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FAKTOR-IX-MOLEKÜLS**



**Benefix®:** Das humane Faktor-IX-Molekül ist ein Glykoprotein eines Molekulargewichts von 55 kDa (Abb. 4). Das isolierte Gen wurde in CHO-Zellen transfiziert. Das sekretierte Protein war zwar biologisch aktiv, enthielt aber 20 bis 30 % eines 18 Aminosäuren langen Propeptids, war also nicht vollständig prozessiert. Deshalb wurde in die rFIX-exprimierende Zelle zusätzlich das Gen für eine lösliche Form der Serinprotease PACE (PACE-Sol) transferiert, wonach das Propeptid vollständig zu biologisch aktivem rFIX prozessiert wurde. Das serumfreie Kulturmedium enthält keine Zusätze bovinen oder humanen Ursprungs.

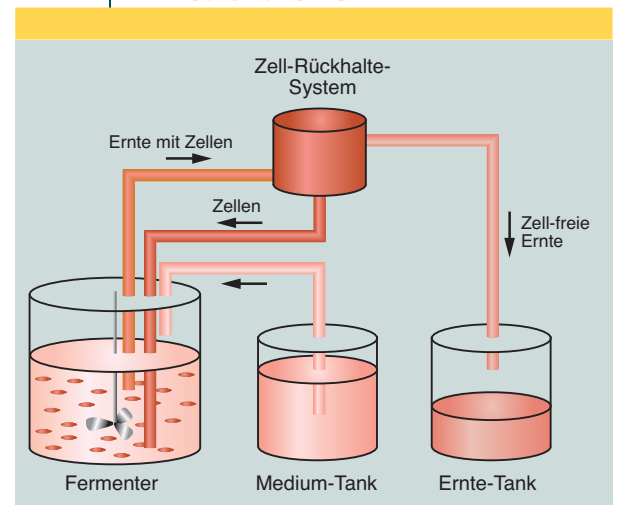
### Zellkultivierung und Bioreaktoren

Jeder Produktionszyklus wird mit einer Ampulle der eingefrorenen und charakterisierten Zellbank gestartet. Die Zellen werden aufgetaut und zuerst in Gewebekultureinrichtungen und anschließend in technischen Kultursystemen im großen Maßstab gezüchtet. In allen Fällen werden Suspensionskulturen unter kontrollierten Kulturbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt und Rührgeschwindigkeit in Fermentern als großtechnische Bioreaktoren verwendet. Unterschiede gibt es hinsichtlich der Prozessführung in Form eines kontinuierlichen oder ansatzweisen Verfahrens (*Batch*), die folgendermaßen realisiert sind:

- kontinuierliche Perfusionskultur bei hoher Zelldichte mit Zellrückführung;
- kontinuierliche Chemostatkultur ohne Zellrückführung;
- halbkontinuierlicher *Batch-Refeed*-Prozess bei geringer Zelldichte.

Bei der kontinuierlichen Perfusionskultur (Abb. 5) werden die Zellen im Fermenter kontinuierlich mit frischem Medium versorgt, während dasselbe Volumen an zellhaltiger Erntelösung permanent aus dem Fermenter abgeführt wird. Um die Zellmasse bei dieser kontinuierlichen Prozessführung zu erhalten, werden die Zellen aus dem Erntestrom über externe Zellretentionssysteme in den Fermenter zurückgeführt, so

**ABB. 5 | PRINZIP DER KONTINUIERLICHEN PERFUSIONSKULTUR**



**TAB. 3 | FERMENTATIONSSYSTEME DER LIZENSIERTEN REKOMBINANTEN GERINNUNGSFAKTOREN**

Protein	Kulturart	Prozessführung	Fermentergröße
NovoSeven®	adhärent auf Microcarriern	kontinuierliche Perfusion ( <i>Draw and feed</i> )	unbekannt
Recombinat®	Suspension	<i>Batch-Refeed</i>	2500 L
ADVATE®	Suspension	kontinuierlicher Chemostat	unbekannt
ReFacto®	Suspension	kontinuierliche Perfusion, Produktinduktion	500 L
KOGENATE® Bayer	Suspension	kontinuierliche Perfusion	100 L, 200 L, 500 L
Benefix®	Suspension	<i>Batch-Refeed</i>	2500 L

dass sehr hohe Zelldichten erreicht werden. Ein weiterer Vorteil der Perfusionskultur besteht in einer besseren Kontrolle der Kultur. So können die physiologischen Bedingungen für die Zellen konstant gehalten werden, indem die Perfusionssrate jeweils der aktuellen Zelldichte angepasst wird. Die kontinuierliche Chemostatkultur ist ein einfacher Ableger der Perfusionskultur, wobei jedoch kontinuierlich Zellsuspension ohne Zellrückführung aus dem Fermenter entfernt und durch frisches Medium ersetzt wird.

Bei *Batch*-Kulturen vermehren sich die Zellen im Bioreaktor bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase, setzen gleichzeitig Produkt frei und werden anschließend geerntet. Eine Variation der *Batch*-Kultur ist der wiederholte *Batch*-Prozess mit Mediumnachfütterung (*Batch-Refeed*-Prozess), bei dem am Ende einer Vermehrungsphase 80 bis 90 % der Fermenterlösung geerntet und durch dasselbe Volumen an frischem Medium ersetzt werden. Daraufhin durchläuft die Kultur einen weiteren Wachstumszyklus, an dessen Ende partielle Ernte und Mediumzufuhr wiederholt werden. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden, was einer halbkontinuierlichen Kultivierung entspricht.

Die wichtigsten Elemente der technischen Fermentation der verschiedenen lizenzierten Faktoren sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**NovoSeven®:** Die adhärent wachsenden Zellen werden auf Microcarriern im Fermenter kultiviert. Microcarrier sind beschichtete Polymerkugeln, auf denen sich die Zellen anheften und vermehren. Die besiedelten Microcarrier werden in Suspension gehalten. Die Produkternte erfolgt über einen Abzug von Kulturlösung mit anschließendem Auffüllen des Fermenters mit frischem Medium (*Draw-and-feed*-Prozess), wobei die besiedelten Microcarrier im Fermenter verbleiben. Dieser *Draw-and-feed*-Prozess wird mehrfach wiederholt. Über Fermentergröße und Fermentationsdauer liegen keine Informationen vor.

**Recombinat®:** Die Suspensionszellen werden in Fermentern von 250 L und 2500 L kultiviert, wobei der Produktionsfermenter maximal 55 Tage lang im *Batch-Refeed*-Prozess mit insgesamt 15 Zyklen einer Dauer von jeweils 3 Tagen gefahren wird. Nach jedem Zyklus werden 88 % der Kultur geerntet und durch frisches Medium ersetzt.

**ADVATE®:** Dieselbe Zelllinie wie für Recombinat® wird eingesetzt. Dabei werden die Produktionsfermenter im kontinuierlichen Chemostat-Verfahren mehrere Wochen

lang kultiviert und kontinuierlich produktthaltige Zellsuspension geerntet.

**ReFacto®:** Die Kultivierung zur Herstellung des verkürzten rFVIII-Produkts erfolgt zweiphasig. Zuerst werden die Zellen in einem 50-L- und einem 500-L-Fermenter als kontinuierliche Perfusionskultur mit Zellrückführung vermehrt. Wenn im 500-L-Fermenter die angestrebte Zelldichte erreicht ist, wird über die Zugabe von Butyrat sowie einer Änderung von pH-Wert und Temperatur die zweite Phase erhöhter Produktbildung induziert. Anschließend werden die Kulturen weiter im Perfusionsbetrieb gefahren, wobei kontinuierlich produktthaltige Erntelösung gesammelt wird.

**KOGENATE® Bayer:** Die rFVIII produzierenden Suspensionszellen werden in Fermentern der Größe 50 L, 100 L, 200 L und 500 L propagiert. Alle Fermenter werden als kontinuierliche Perfusionskultur mit Zellrückführung betrieben. Aus den Produktionsfermentern wird kontinuierlich Erntelösung gesammelt. Die maximale Fermentationszeit beträgt 185 Tage.

**Benefix®:** Die technische Kultivierung von rFIX erfolgt analog zur Herstellung von Recombinat® als *Batch-Refeed*-Prozess im 2500-L-Fermenter.

### Proteinreinigung und Formulierung

Die zellfreien und teilweise aufkonzentrierten Kulturernnten, die die verschiedenen rekombinanten Faktoren enthalten, werden über eine Sequenz chromatographischer Prozesse aufgearbeitet. Dabei wird das Produkt von Verunreinigungen der Zellen wie DNA oder Zellprotein des Kulturmediums sowie von Komponenten der Proteinreinigung getrennt. Dies wird über mehrere säulenchromatographische Schritte realisiert, bei denen Moleküle aufgrund unterschiedlicher Ladung, Molekülgröße oder Affinität voneinander getrennt werden. Teilweise ist in den Reinigungsprozess ein Virusinaktivierungsschritt mit Detergenz zur Inaktivierung umhüllter Viren oder eine terminale Virusfiltration durch eine Viren zurückhaltende Membran integriert. Anschließend wird das hochgereinigte Protein formuliert und lyophilisiert. Dabei kann die Formulierung HSA enthalten oder aber rein synthetisch sein.

Die Reinigungsschritte der fünf rekombinanten Faktoren sind in Tab. 4 zusammengefasst.

**NovoSeven®:** Die Aufarbeitung besteht aus vier Säulenchromatographien sowie einem Virusinaktivierungsschritt mit Detergenz. Der erste Schritt ist eine Ionenaustausch-

Chromatographie mit Q-Sepharose. Danach erfolgt die Virusinaktivierung und anschließend eine Immunaффinitäts-Chromatographie mit immobilisierten Antikörpern gegen FVII. Diese Matrix bindet spezifisch rFVII und ist der Hauptreinigungsschritt zur Abtrennung von Verunreinigungen. Es folgen zwei weitere Anionenaustauschschritte, die zu einer vollständigen Aktivierung des einkettigen rFVII zur zweikettigen aktivierten rFVII-Form führen. Das Endprodukt wird synthetisch mit den wichtigsten Bestandteilen Glycylglycin, Polysorbat 80, Manitol und Calcium formuliert.

**Recombinat<sup>®</sup>**: Die Proteinreinigung besteht aus drei Chromatographieschritten ohne zusätzliche Virusinaktivierung. Der erste Schritt ist eine Immunaффinitäts-Chromatographie mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen FVIII. Es folgen zwei nachgeschaltete Ionenaustausch-Chromatographien (Anionenaustauscher gefolgt von Kationenaustauscher). Die Formulierung von Recombinat<sup>®</sup> enthält HSA, Polyethylenglykol 3350, Histidin und Calcium.

**ADVATE<sup>®</sup>**: Die Proteinreinigung entspricht mit drei Chromatographieschritten der von Recombinat<sup>®</sup>, außer dass zusätzlich eine Virusinaktivierung mit Detergenz vor der letzten Chromatographiestufe durchgeführt wird. Die Formulierung ist synthetisch und enthält die Komponenten Trehalose, Polysorbat 80, Histidin, Glutathion und Calcium.

**ReFacto<sup>®</sup>**: Die Reinigung besteht aus fünf Chromatographieschritten und einem Virusinaktivierungsschritt mit Detergenz. Die erste Chromatographie verwendet den Kationenaustauscher SP-Sepharose. Anschließend folgen der Virusinaktivierungsschritt und eine Immunaффinitäts-Chromatographie, danach eine Anionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose sowie eine hydrophobe Interaktionschromatographie mit Butyl-Sepharose. Zuletzt wird eine Gelfiltration mit Superdex G200 durchgeführt, bevor das Produkt synthetisch in Gegenwart von Saccharose, Polysorbat 80, Histidin und Calcium formuliert wird.

**KOGENATE<sup>®</sup> Bayer**: Die Aufarbeitung besteht aus sechs Säulenchromatographien und einem Virusinaktivierungsschritt mit Detergenz. Der erste Schritt ist eine DEAE-

I-Anionenaustausch-Chromatographie. Anschließend wird die Virusinaktivierung durchgeführt. Der nächste Schritt ist eine Immunaффinitäts-Chromatographie. Darauf schließt sich eine Kupfer-IMAC-Metallchelate-Aффinitätschromatographie an, bei der das immobilisierte Kupfer den rFVIII komplexiert. Die letzten drei Stufen sind Gelfiltration, Kationenaustauscher und Anionenaustauscher, wobei letzterer hinsichtlich rFVIII im Durchfluss betrieben wird. Das Endprodukt wird über Ultra-/Diafiltration in eine synthetische Formulierung umgepuffert, die die Hauptkomponenten Saccharose, Polysorbat 80, Glycin, Histidin und Calcium enthält.

**Benefix<sup>®</sup>**: Die Aufarbeitung dieses Proteins besteht aus vier Chromatographiestufen sowie einer terminalen Filtration durch virussichere Membranen. Der erste Schritt ist eine Anionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose, die aufgrund der Moleküleigenschaften von rFIX im Pseudo-aффinitätsbetrieb arbeitet. Der nächste Schritt ist eine Matrex-Cellufine-Sulfat-Aффinitätschromatographie, gefolgt von einer Ceramic-Hydroxyapatit-Chromatographie, bei der Proteine aufgrund ihrer Ladung voneinander separiert werden. Hier werden speziell inaktive Formen von rFIX entfernt. Der letzte Säulenschritt ist eine Metallchelate-Aффinitätschromatographie (Chelat-EMD-Cu(II)-Chromatographie). Danach wird das Produkt durch eine Virosolve-70-Membran filtriert, bevor es mittels Ultra-/Diafiltration synthetisch mit den Hauptkomponenten Saccharose, Polysorbat 80, Glycin und Histidin formuliert wird.

### Virussicherheit

Wie aus jahrelanger klinischer Erfahrung ersichtlich ist, gewährleisten alle rekombinanten Präparate eine sehr hohe Virussicherheit. Generell gilt, dass das Risiko rekombinanter Proteine, Viren zu übertragen deutlich geringer ist als bei Plasmaprodukten. Dies gilt speziell im Hinblick auf Prionen, da sie in einem besser kontrollierbaren Prozess mit jeweils über die niedergelegte Zellbank definierten Ausgangssubstanzen hergestellt und zu höherer Reinheit aufgearbeitet werden.

Es bleibt jedoch auch bei den rekombinanten Präparaten ein theoretisches Restrisiko einer Virusverunreinigung, was entweder auf die Wirtszellen als potentiellen Trägern von Viren oder Virussequenzen (latente Viren) beruht, oder auf die biologischen Rohmaterialien, speziell denen bovinen oder humanen Ursprungs, oder auf eine während der Fermentation erworbene Viruskontamination, zurückgehen könnte.

Die Virussicherheit rekombinanter Proteine aus tierischer Zellkultur wird daher über mehrere Maßnahmen auf verschiedenen Ebenen sichergestellt, die einmalig in Form einer Validierung oder routinemäßig mit jedem Herstellungszyklus durchgeführt werden:

- Die Charakterisierung der verwendeten Zelllinien, was sowohl auf der Stufe der Zellbank als auch am Ende eines typischen Produktionslaufs im Fermenter durchgeführt wird. Dabei werden die Zellen und deren Kul-

**TAB. 4** REINIGUNGSPROZESSE DER LIZENSIERTEN REKOMBINANTEN GERINNUNGSFAKTOREN

Protein	Chromatographieschritte
NovoSeven <sup>®</sup>	4 Stufen: Ionenaustausch, Immunaффinität, Anionenaustausch, Anionenaustausch
Recombinat <sup>®</sup> /ADVATE <sup>®</sup>	3 Stufen: Immunaффinität, Anionenaustausch, Kationenaustausch
ReFacto <sup>®</sup>	5 Stufen: Kationenaustausch, Immunaффinität, Anionenaustausch, Hydrophobe Interaktionschromatographie, Gelfiltration
KOGENATE <sup>®</sup> Bayer	6 Stufen: Anionenaustausch, Immunaффinität, Cu-IMAC, Metallchelataффinität, Gelfiltration, Kationenaustausch, Anionenaustausch
Benefix <sup>®</sup>	4 Stufen: Anionenaustausch, Matrex-Cellufine-Sulfat-Aффinität, Ceramic-Hydroxyapatite, Metallchelate-Aффinität

turüberstand mit einer Vielzahl von *In-vivo*- und *In-vitro*-Tests auf mikrobielle und virale Kontamination untersucht. Hier zeigte es sich, dass alle verwendeten Zelllinien mit Ausnahme unvollständiger R-Typ-Partikel bei BHK-Zellen sowie A- und C-Typ-Partikel bei CHO-Zellen weder exogene noch endogene Viren enthalten und somit unbedenklich sind.

- Test eines jeden Fermentationsansatzes zum Abschluss der Kultivierung auf Virusfreiheit, was über *In-vitro*-Kultivationen mit verschiedenen Indikatorzelllinien nachgewiesen wird. Im Einzelfall können zusätzlich spezifische PCR-Tests auf Virus-DNA oder -RNA durchgeführt werden. Die Tests zeigen, dass sich keine exogenen Viren während der Zellkultivierungsphase vermehrt haben.
- Bei den Rohmaterialien biologischen Ursprungs wird über deren Herstellungsverfahren und Ursprungsort möglichst sichergestellt, dass keine Virusübertragung möglich ist. So hat das teilweise eingesetzte Humanalbumin pharmazeutische Qualität. Alternativ ist es jedoch von Vorteil, wenn das rekombinante Produkt ausschließlich mit synthetischen Rohmaterialien auskommt.
- Ein weiterer Aspekt der Virussicherheit ist das Virusabreicherungspotential während der Proteinreinigung. Es wird über Validierungsstudien in *Spiking*-Experimenten mit definierten Modellviren in einem maßstäblich verkleinerten Modell der Aufarbeitung durchgeführt. Dazu werden einzelne chromatographische Trennschritte, die Virusfiltration und/oder der Virusinaktivierungsschritt analysiert.

## Ausblick

Die Therapie mit gentechnisch hergestellten Gerinnungsfaktoren hat sich in der Zwischenzeit fest etabliert, wobei bei rFVIII bereits zwei Produkte der 2. Generation bzw. 3. Generation angeboten werden, die nicht nur einen aktiven Virusinaktivierungsschritt enthalten, sondern auch eine synthetische Formulierung und im Falle von ADVATE® auch ein albuminfreies Kulturmedium nutzen. Im Hinblick auf das erreichte Sicherheitsniveau treten weitere Aspekte wie die Anwenderfreundlichkeit in den Vordergrund. So wurde im Falle von KOGENATE® Bayer ein neues nadelloses Rekonstitutionssystem entwickelt, das fest mit der Produktflasche verbunden ist und das Risiko von Stichverletzungen reduziert.

Seit längerer Zeit wird daran gearbeitet, die klassische Substitutionstherapie durch Gentherapie zu ersetzen, wobei das jeweils fehlende Gen *ex vivo* oder *in vivo* direkt in Zellen des Patienten eingepflanzt wird. Diese Aktivitäten sind bisher wenig erfolgreich gewesen. Ob und wann sich diesbezüglich ein Durchbruch erzielen lässt, ist offen.

Sehr viel weiter in der Entwicklung sind dagegen Ansätze, die Wirksamkeit der applizierten Gerinnungsfaktoren zu erhöhen, um z.B. die Frequenz der Behandlung zu reduzieren. In diesem Zusammenhang wird z.B. an anderen Formulierungen wie einer Liposomen-Formulierung für rF-

VIII gearbeitet, was bereits in der frühen klinischen Erprobung ist. Ein weiterer Ansatz, um die therapeutische Wirksamkeit zu verlängern, besteht in der Entwicklung modifizierter FVIII-Moleküle, z.B. der Entwicklung von Muteinen, die definierte Aminosäure-Austausche in der jeweiligen Proteinsequenz haben. Diese Aktivitäten befinden sich jedoch noch im Forschungsstadium.

## Zusammenfassung

*Mehr als 17 Jahre klinische Erfahrung mit den rekombinanten Gerinnungsfaktoren FVIIa, FVIII und FIX haben gezeigt, dass die Herstellung dieser Proteine aus tierischer Zellkultur eine verlässliche und deutlich sicherere Alternative zu der herkömmlichen Substitutionstherapie mit Plasmafaktoren ist. Alle rekombinanten Faktoren werden in aufwendigen Fermentationsprozessen unter stringenter Kontrolle möglicher Sicherheitsrisiken zu Endprodukten hoher Reinheit aufgearbeitet. Zur weiteren Verbesserung des Therapiestandards werden neben den Aktivitäten in der Gentherapie neue Ansätze verfolgt, um z.B. die Aktivität des Faktor-VIII-Moleküls über eine Liposomen-Formulierung oder über Veränderung der Aminosäuresequenz zu verlängern und die Zahl der Injektionen für die Patienten zu verringern.*

## Zitierte Literatur

- [1] Mammen, F., Gellissen, G.: Gene technology - Advances in the treatment of hemostatic and thrombotic disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 27 (2001).
- [2] Boedeker, B.G.D.: Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations. *Semin. Thromb. Hemost.* 27 (2001), 385-395.
- [3] Jurlander, B., Thim, L., Klausen, N.K., et al.: Recombinant activated factor VII (rFVIIa): Characterization, manufacturing and clinical development. *Semin. Thromb. Hemost.* 27 (2001), 373-384.
- [4] Harrison, S., Adamson, S., Bonam, D., et al.: The manufacturing process for recombinant factor IX. *Semin. Hematol.* 35 (1998), 4-10.
- [5] Brackmann, H.-H., Schwaab, R., Oldenburg, J., Schramm, W.: Klinische Anwendung plasmatischer und rekombinanter Gerinnungsfaktoren, Uni-Med Bremen (2003), 104-112.
- [6] Ewenstein, B.M., Collins, P., Tarantino, M.D., et al.: Hemophilia Therapy Innovation: Development of an Advanced Category Recombinant Factor VIII by a Plasma/Albumin-Free Method. *Semin. Hematol.* 41 (2004), 1-18.

## Der Autor:



*Dr. rer. nat. Berthold Bödeker, (geb. 1953); 1973-1979 Chemiestudium und 1971-1982 Biologiestudium an der TU Braunschweig; 1982 Promotion an der TU Braunschweig mit wissenschaftlicher Arbeit an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF), Stöckheim; 1982-1983 Postdoc an der GBF im Bereich Immunologie/Zellbiologie; 1983-1988 Laborleiter bei der Bayer AG im Bereich Pharma in Wuppertal, zuerst im Forschungsinstitut Immunologie und Onkologie, danach im Institut für Biotechnologische Entwicklung; 1988-1993 Leiter der Entwicklung und Produktion biotechnologischer Produkte bei Miles Inc, Berkeley, USA; seit 1993 bei Bayer AG in wechselnden Positionen, zurzeit Leiter der Pilotanlagen und Zellbiologie bei Bayer HealthCare Pharma Biotechnologie.*

**Anschrift:** Dr. rer. nat. Berthold Bödeker, Bayer HealthCare AG, Product Supply Biotechnologie, Friedrich-Ebert-Str. 217, 42096 Wuppertal  
berthold.boedeker@bayerhealthcare.com