

Optimierung der Bioprozessentwicklung

Claudia M. Hüther und Kathrin Schmale, DASGIP GmbH, Jülich

Die biopharmazeutischen Märkte sind in den letzten beiden Jahrzehnten permanent gewachsen. Der weltweite Umsatz wird bis 2015 voraussichtlich auf 126 Mrd. EUR ansteigen; zwischen 2009 und 2016 gehen Analysten von Research & Markets von einem jährlichen Umsatzplus von durchschnittlich 11,2% aus. Um diese Erwartungen zu erfüllen, muss die Biotechnologie-Industrie allerdings ihre Entwicklungskosten senken, Fehler in der späten klinischen Entwicklung minimieren, die Entdeckung neuer Targets und Molekularklassen vorantreiben und die Prozessentwicklung insgesamt beschleunigen.

Die „Quality by Design“-Initiative (QbD) der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) bietet Orientierungshilfen zur Verringerung des regulatorischen Aufwands, der mit der Zulassung von Arzneimitteln verbunden ist. Verfahrensweisen werden rationalisiert, die Entwicklungszeiten für Medikamente verkürzt und die Arbeitsauslastung optimiert. In der Definition der FDA heißt es: „Quality by Design bezeichnet das Design und die Entwicklung eines Produkts und der dazugehörigen Herstellungsprozesse, die während der Produktentwicklung eingesetzt werden, um zu gewährleisten, dass das Produkt am Ende des Herstellungsprozesses stets die vorab definierte Qualität erreicht“.

Auch wenn die Vorteile von QbD vor allem in der Produktion zum Tragen kommen, wirkten sie bis in die frühesten Stadien der Produktentwicklung zurück. Die statistische Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE), maßstabsgetreue Prognose-Modelle und präzise Prozessanalysen während der Entwicklung fallen allesamt in den Bereich des QbD-Gedankens.

Technologie für die Bioprozessentwicklung

Die frühe Prozessentwicklung umfasst neben der Zelllinien- und Klonauswahl auch das Screening von Medien, Substratkomposition und Fütterungsstrategien sowie anderer Prozessbedingungen. Traditionell werden hierzu Schüttelkolben eingesetzt, obwohl deren Einschränkungen allgemein bekannt sind. Sie ermöglichen indirekt die Kontrolle von Temperatur, des Umgebungsgases und der Agitationsrate. Die Überwachung und Kontrolle von kritischen Prozessparametern wie beispielsweise dem pH-Wert, dem Gelöstsauerstoff (DO) oder das Anwenden von definierten Fütterungsprofilen sind mit diesen Gefäßen allerdings nicht möglich. Diese kritischen Faktoren beeinflussen jedoch das Verhalten, die Lebensfähigkeit und Produkti-

vität der Kulturen und damit letztendlich die Produktqualität und -stabilität. Die Auswahl von suboptimalen Klonen in einer frühen Entwicklungsphase ist bei der Verwendung von Schüttelkolben nichts Ungewöhnliches. Daraus kann eine verringerte Zellproduktivität und Produktqualität während der gesamten Entwicklung resultieren.

Dieses Risiko lässt sich eliminieren, wenn bereits während des Screenings Geräte verwendet werden, deren physikalische und mechanische Eigenschaften Bioreaktoren im Produktionsmaßstab so gut wie möglich imitieren. Auf diese Weise lässt sich das Ziel von QbD umsetzen, Qualitätsmaßnahmen, die bereits während der Entwicklung eingeleitet wurden, zu einer hohen Produktqualität zu führen.

Moderne Benchtop-Bioreaktoren verfügen über das Potential, die erforderliche Prozesskonsistenz zu gewährleisten. Bei den heutigen hochentwickelten Benchtop-Systemen werden Sensoren und IT-Steuermodule eingesetzt, um kritische Prozessparameter wie Temperatur, pH-Wert, Gelöstsauerstoff und Agitation zu überwachen und zu regeln. Wie in Bioreaktoren im Produktionsmaßstab erfolgen Begasung und Substratzufuhr

nach vordefinierten Einstellungen. Manche Benchtop-Bioreaktoren sind sogar mit einer Prozessanalytik zur Echtzeit-Überwachung von Abgasen, Nährstoffen, Biomasse und anderen Parametern ausgerüstet.

Mittlerweile bieten verschiedene Hersteller Benchtop-Bioreaktorsysteme (meist kleiner als 10 l) an, die sich – mit Ausnahme ihrer Größe – praktisch nicht von industriellen Bioreaktoren im Produktionsmaßstab unterscheiden. Identische Form-Verhältnisse ermöglichen beispielsweise die Berechnung von hydrostatischem Druck und Sauerstofflöslichkeit, während angepasste Agitationssysteme für vergleichbare Flüssigkeitsdynamik, Stoffübergang und Mischung sorgen. Wissenschaftler können somit anhand der Ergebnisse der Benchtop-Systeme bereits in der Prozessentwicklung das Zellwachstum und die Produktkinetik zum Beispiel eines 2.000 Liter-Bioreaktors vorhersagen.

Um in der Entwicklungsphase so viele Informationen wie nötig zu ermitteln, ist der Maßstab des Bioreaktors entscheidend. Üblicherweise werden Mikro- (unter 1 ml), Mini- (1 ml - 500 ml) und Benchtop-Maßstab (0,5 l - 10 l) definiert. Der Pilot- und Produktionsmaßstab umfasst normalerweise 10 l bis 100 l bzw. mehr als 100 l, auch wenn das spezielle Volumen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Produkt erheblich abweichen kann.

Typischerweise werden in der Prozessentwicklung Benchtop-Bioreaktoren mit Arbeitsvolumina von zwei bis drei Litern eingesetzt. Der vergleichsweise große Platzbedarf schränkt die Verwendung solcher Bioreaktoren bei hochgradig parallelen Screening-Schritten aber ein. Auch aufgrund ihres hohen Verbrauchs an wertvollen Materialien sind diese Systeme für schnelle Klon- und Zelllinien-Screenings oder die Medienentwicklung nicht optimal geeignet.

Häufig werden daher in der frühen Entwicklung Modelle im Mikrotiterplattenformat eingesetzt. Viele Experten sind der Ansicht, dass diese Systeme für grundlegende Screening-Experimente, nicht jedoch für ernsthafte Pro-



Abb. 1: Paralleles Benchtop-Bioreaktorsystem für die Zellkultur

zessentwicklungsarbeiten geeignet sind. Dr. Frank Baganz vom University College London hat den direkten Zusammenhang zwischen Bioreaktor-Größe und der daraus resultierenden Datenqualität wie folgt dargestellt: Je kleiner die Systeme sind, desto weniger sind sie in der Lage, aussagekräftige Prozessdaten zu liefern.

Mini-Bioreaktorsysteme liefern die größte Flexibilität

Das Merck Research Institute definiert das optimale Bioreaktor-System im Kleinmaßstab zur Prozessentwicklung als paralleles Bioreaktor-System mit mindestens 24 einzelnen Bioreaktoren und jeweils ca. 100 ml Arbeitsvolumen, doppelter Kapazität für Säugetierzellkulturen oder mikrobielle Fermentation und automatische Probennahme. Nur wenige handelsübliche Systeme erfüllen diese Kriterien für Bioreaktor-Systeme im Kleinmaßstab.

Miniaturisierte Benchtop-Bioreaktoren sind mit den verschiedensten Konfigurationen und Datenverarbeitungsleistungen erhältlich. Der Hauptfaktor bei der Beurteilung dieser Systeme ist das Maß an Übertragbarkeit des Labormaßstabs auf den Pilot-/Produktionsmaßstab. In Tabelle 1 sind die spezifischen Faktoren erläutert, welche bei der Beurteilung eines Benchtop-Systems zu berücksichtigen sind.

Fazit

Der wachsende Markt für Biopharmazeutika ist stark umkämpft. Sobald Patente auslaufen, sehen sich die Entwickler von Urheber-Produkten dem Wettbewerb von Wettbewerbern und Biosimilar-Entwicklern ausgesetzt. Unternehmen, die die Arzneimittelentwicklung rationalisieren, werden mit niedrigeren Entwicklungskosten, kürzeren Fristen und möglicherweise geringeren Herstellungskosten belohnt. Zur Ausschöpfung dieser Wettbewerbsvorteile müssen weder neue molekulare Targets oder Molekülklassen entdeckt noch eine vollkommen neuartige Prozessausrüstung oder Grundoperationen eingeführt werden: Diese Nutzeffekte sind bereits innerhalb der Unternehmen mit Prozessentwicklungskompetenzen vorhanden.

Moderne Benchtop-Bioreaktoren haben die Art und Weise verändert, wie die Hersteller von biopharmazeutischen Produkten die Prozessentwicklung standardisieren und rationalisieren. Diese Systeme, die die kritischen Aspekte der großtechnischen Fermentation und Zellkultur imitieren, bieten Daten- und Informations-Managementtools, die die Einhaltung behördlicher Vorgaben sowohl im Hinblick auf die Zulassung als auch auf die QbD-konforme Prozessentwicklung unterstützen.

Tab. 1: Bei der Auswahl geeigneter Bioreaktorsysteme sollten Anwender die Anforderungen an ihr neues System evaluieren, insbesondere mit Hinblick auf spezielle Erfordernisse des Entwicklungsprozesses und die spätere Produktion und Zulassung.

Faktoren für die erfolgreiche Wahl geeigneter Benchtop-Bioreaktortechnologie	
Arbeitsvolumen	Die Gefäßgröße variiert von einigen Mikrolitern bis hin zu mehreren hundert Millilitern. Mischverhältnisse, Gasaustausch und Aspekt-Ratio-Verhältnisse sollten vergleichbar mit größeren Systemen sein, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.
Prozessparameter	Die Überwachung der Prozessparameter im Rahmen der QbD-basierten Prozessentwicklung sollte der geplanten Prozessanalytik in den späteren Phasen entsprechen. Die kritischen Prozessparameter sollten sich systematisch erfassen lassen. Die Nutzer sollten auf die Möglichkeit zur Integration von Analysegeräten und Software sowie Automatisierungsoptionen achten.
Automatische Probennahme	Diese Funktion erspart die manuelle Probenentnahme aus dem Bioreaktor wie auch der weiteren Analyse dieser Proben. Es gilt jedoch zu beachten, dass die vollständige Automatisierung, beispielsweise durch Robotik, nicht die echten Prozessabläufe im größeren Maßstab dupliziert.
Parallelität	Es gilt hierbei die geeignete Anzahl an simultan geführten Prozessen zu ermitteln, die es ermöglichen die kritischen Prozessparameter zuverlässig einzugrenzen ohne eine übermäßige Datenflut zu generieren. Die Vergleichbarkeit der Messmethoden mit größeren Systemen muss dabei gewährleistet sein.
Einmal-Gefäße	Ebenso wie in der biopharmazeutischen Produktion verursachen Einmal-Gefäße zwar erhöhte Materialkosten, verkürzen jedoch die Leerlaufzeit zwischen einzelnen Prozessdurchläufen und machen Reinigung, Sterilisierung und die dabei nötige Validierung überflüssig.
Computerisierung	Hierzu zählen die Kontrolle der einzelnen Prozessparameter (pH, Temperatur, DO usw.) sowie die Datenerfassung, die Integration in den IT-Backbone (Archivierungssysteme, Prozessleitsysteme), Datenerfassung, -analyse und -speicherung. In diesem Zusammenhang sind die Schnittstelle und Benutzerfreundlichkeit von Bedeutung.
Scale-Up	Das Hauptziel von Scale-Down-Experimenten ist es, mit Hilfe der kleinvolumigen Kulturen das Verhalten im großen Maßstab vorherzusagen. Systeme, die diese prädiktive Funktion nicht besitzen, sind Schüttelkolben in keiner Weise überlegen. Zu berücksichtigende Faktoren sind das Formdesign des Bioreaktors, Rührung, Substratzufuhr, Prozessüberwachung, -kontrolle und -regelung sowie die Probennahme.
Platzbedarf	Miniaturisierte Benchtop-Bioreaktoren sollten einen Platzbedarf aufweisen, der Hinsichtlich Wartung, Betrieb, Service und Workflow gut zu handhaben ist. Anwender sollten sich der Kompromisse zwischen Reaktorgröße, Platzbedarf, Durchsatz und Datenqualität bewusst sein.
Modularität	Die Software sollte den Einsatz von zwei oder mehreren Mini-Bioreaktorsystemen ermöglichen und damit eine nahtlose Konnektivität für die Datenerfassung, -Analyse und -Transfer bieten.
Upgrading	Nutzer sollten berücksichtigen, dass Weiterentwicklungen bei Überwachungs- und Kontrollfunktionen auch nachträglich installiert werden können.
Konnektivität von externen Geräten und Software	Die nahtlose Integration von Laborgeräten wie Analysatoren (z.B. HPLC, Massenspektrometern oder Zellzählern), automatische Probennahme und Liquid-Handling ermöglicht das Ermitteln qualitativ hochwertiger Daten sowie das Verkürzen von Entwicklungsphasen. Das Einbinden gezielter Software unterstützt z.B. die Versuchsplanung nach den QbD-Vorgaben (Design of Experiments, DoE) und ermöglicht die QbD-konforme Dokumentation.

Potentielle Käufer von miniaturisierten Benchtop-Bioreaktoren sind gut beraten, eine Checkliste mit den Faktoren zu erstellen, die für ihre Arbeitsabläufe sowie ihre regulatorischen und wissenschaftlichen Bedürfnisse relevant sind. Dies wird ihnen angesichts der breit gefächerten Produktlandschaft dabei helfen zu beurteilen, welche dieser Faktoren die jeweiligen Systeme vorweisen können. Diese Funktionen und Anforderungen variieren abhängig von den aktuellen und zukünftigen Prozessentwicklungsanforderungen des Endnutzers.

Die führenden Anbieter von Benchtop-Bioreaktoren arbeiten stetig an der Verbesserung von Funktionalitäten und der Vorhersagbarkeit ihrer Miniatur-Systeme. Es ist davon auszugehen, dass in den kommenden Jahren eine breitere Palette an Geräten zur Verfügung stehen wird, die für das Screening und die frühe Prozessentwicklung konzipiert sind, insbesondere in einem Größenbereich der zwischen Mikro- und Benchtop-Geräten angesiedelt ist.

Literatur

- [1] US Biopharmaceutical Market – Trends, Forecast, Competition & Strategic Analysis (2009-2016), Markets and Markets, 2010
- [2] DePalma A, Microreactors Carve out Growing Niche, Genetic Engineering & Biotechnology News 30(3), 2010
- [3] Global Biopharmaceutical Market Report (2010-2015), International Market Analysis Research and Consulting Group (IMARC), 2010
- [4] US Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Quality Systems Approach to Pharmaceutical CGMP Regulations, 2006
- [5] Betts JI and Baganz F, Miniature bioreactors: current practices and future opportunities, Microbial Cell Factories 5(21): 2006
- [6] Bareither R and Pollard D, A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need, Biotechnology Progress 27: pp2-4, 2011

Korrespondenzadresse

Claudia M. Hüther
 DASGIP GmbH
 Rudolf-Schulten-Str. 5, 52428 Juelich
 c.huether@dasgip.de
 www.dasgip.com