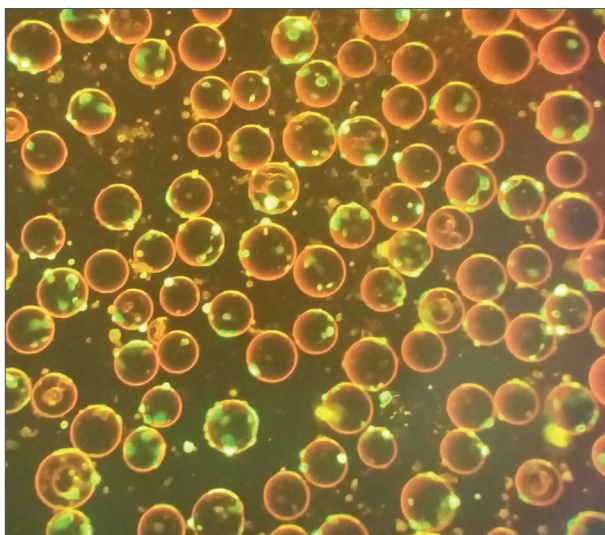


Tanja A. Grein

Herstellungsprozess für onkolytische Masernviren



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische
Technologie | Band 15

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

Herstellungsprozess für onkolytische Masernviren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieurin (Dr.-Ing.)

von M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) Tanja Anneliese Grein
geb. am 15. November 1984 in Schwalmstadt

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission:	Prof. Dr.-Ing. Kai Sundmacher	(Vorsitz)
	Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak	(Gutachter)
	Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner	(Gutachter)
	Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl	(Gutachter)

Eingereicht am: 03. Januar 2019

Promotionskolloquium am: 09. Juli 2019

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 15

Tanja A. Grein

Herstellungsprozess für onkolytische Masernviren

Shaker Verlag
Düren 2019

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2019

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7121-4

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

*Wir können den Wind nicht ändern,
aber wir können die Segel richtig setzen.*

(Aristoteles)

In Erinnerung an meine Eltern Gudrun und Gerhard Grein

Danksagung

Als Erstes möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen danken. Ich hatte das große Glück, in einem Institut arbeiten zu dürfen, in welchem gemeinsam Herausforderungen bewältigt und neue Impulse gesetzt wurden. Auch wenn die Themenschwerpunkte sehr unterschiedlich waren, ließ sich in gemeinsamen wissenschaftlichen Diskussionen immer eine problemorientierte Lösung finden.

Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak bedanken, der mir die notwendigen Freiheiten gab, um an einem solchen Thema arbeiten zu können. Ganz besonders durch die Unterstützung, welche ich in weniger leichten Phasen meines Lebens durch ihn und das Führungsteam des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie erfahren durfte, war es für mich überhaupt möglich, diese Dissertation zu Ende zu bringen.

Auch wenn mein Dank an dieser Stelle eigentlich nicht mit Worten auszudrücken ist, möchte ich ihm und den Abteilungsleitern des Bereichs Zellkulturtechnik Dr. Denise Salzig und Dr. Tobias Weidner, aber auch den „Masernjungs“ Dominik Jäger, Marco Kress, Felix Schwebel, Florian Petry, Daniel Loewe und Hauke Dieken sowie Miriam Blumenstock und Michaela Gilbert aus tiefstem Herzen danken.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärte, mich als Doktorandin in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen. Zudem möchte ich mich für die interessanten Diskussionen im Rahmen der Doktorandenseminare an der Otto-von-Guericke-Universität bedanken. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Pörtner für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten, danken.

Herrn Dr. Michael Mühlebach vom Paul-Ehrlich-Institut möchte ich dafür danken, dass er mir nicht nur das Masernvirus zur Verfügung stellte, sondern mich auch bei biologischen Fragen unterstützte.

Ohne finanzielle Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle auch beim Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanken. Nur durch die Bewilligung des Forschungsprojektes Onko-Vir (Nr. 03FH001IX5) im Rahmen der Ingenieurnachwuchsförderung konnte dieser Herstellungsprozess für onkolytische Masernviren entwickelt werden.

Danken möchte ich auch meiner Mentorin Frau Dr. Christina Zinecker, ohne die ich nie das „Abenteuer Promotion“ in Angriff genommen hätte.

Besonders glücklich kann ich mich schätzen, einen Freund und Mentor in Herrn Mehrdad Ebrahimi gefunden zu haben. Durch seine meist aufmunternden Worte und unsere tiefgehenden wissenschaftlichen und zum Teil philosophischen Diskussionen gelang es mir, meine Motivation aufrechtzuerhalten und mich auf das eigentliche Ziel zu konzentrieren.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Marion Klipp und Michaela Bechtel bedanken. Echte Freunde sind wirklich unbezahlbar.

Auch möchte ich nicht vergessen, meinen Geschwistern Kathrin und Andreas zu danken. Gemeinsam hatten wir in den letzten Jahren viel zu stemmen, dennoch ermöglichten sie es mir durch ihre Unterstützung, weiter an der Hochschule tätig zu bleiben, um meine Dissertation zu vollenden. Jeder kann sich wirklich glücklich schätzen, solche Geschwister zu haben, wie ich sie habe!

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern Gudrun und Gerhard Grein. Ohne deren großartige und liebevolle Unterstützung wäre ich niemals so weit gekommen. Sie lehrten mich immer, über den Tellerrand hinauszuschauen und die eigenen Schwächen nicht zu akzeptieren, sondern zu überwinden. Umso trauriger ist es, dass sie die Fertigstellung meiner Dissertation nicht mehr miterleben konnten.

Zusammenfassung

Die Überlebensrate von Krebspatienten im Endstadium ist noch immer sehr gering. Eine Alternative zu konventionellen Krebstherapien stellen onkolytische Viren dar. Ein vielversprechender Kandidat solcher onkolytischen Viren ist das Masernvirus. Aufgrund seiner natürlichen Affinität gegenüber Tumorzellen konnten bereits erste Erfolge in klinischen Studien verzeichnet werden. Die größte Herausforderung in der flächendeckenden Anwendung onkolytischer Masernviren sind die für die Therapie notwendigen hohen infektiösen Dosen (10^8 – 10^{11} TCID₅₀ per Dosis), welche nur schwer herzustellen sind. Dies ist durch die geringe Stabilität der Viren zu erklären. So hat die Infektiosität von Masernviren bei optimaler Wachstumstemperatur der Wirtszellen von 37 °C eine Halbwertszeit von gerade einmal einer Stunde.

Um dennoch ausreichend onkolytische Masernviren produzieren zu können, muss ein effizienter Produktionsprozess etabliert werden. Die Etablierung eines geeigneten Herstellungsprozesses kann nur nach erfolgter Charakterisierung jeder Prozesskomponente (biologisches System, Bioreaktorkonzept, Prozessüberwachung) erfolgsversprechend sein. Daher wurde in Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Wirtszellscreening durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass mit Zellen, welche adhären oder in Aggregaten wuchsen, im Vergleich zu Suspensionszellen bis zu einem Faktor von 10.000 höhere Masernvirusausbeuten (bis zu 10^9 TCID₅₀ mL⁻¹) erreicht werden konnten. Interessant war im Rahmen dieser Studie, dass eine hohe Infektionseffizienz nicht zwangsläufig zu einer hohen Masernvirusausbeute führte. Vielmehr konnte festgestellt werden, dass die Wirtszellen infektionsbedingt starben, bevor neue Masernviren gebildet wurden. Als geeignete Wirtszelllinien konnten Vero- und BJAB-Zellen identifiziert werden. Letztere zeigten jedoch nur dann hohe Masernvirusausbeuten, wenn diese Zellen sphärische Zellaggregate bildeten. Eine Übertragung der Masernvirusproduktion in BJAB-Zellen vom Schüttelkolben in einen Rührkesselreaktor (engl. *stirred tank reactor*, STR) war aufgrund der geänderten Strömungsbedingungen nicht erfolgreich. Demgegenüber konnte in Vero-Zellen ein höherer maximaler Virustiter im STR, verglichen zur Produktion in der T-Flasche, erreicht werden.

Diese hohen in Vero-Zellen produzierten Virustiter von 10^{10} TCID₅₀ mL⁻¹ konnten jedoch nur in engen Prozessgrenzen realisiert werden. Neben den in der Literatur beschriebenen kritischen Prozessparametern Temperatur und pH-Wert konnte ein Schubspannungslevel von $< 0,25$ N m⁻² für eine Masernvirusproduktion mit adhären Vero-Zellen im STR definiert werden. Einen weit größeren Einfluss auf die Produktivität der Wirtszellen hatte die Begasung. So reduzierte eine kontinuierliche Begasung den maximal erzielbaren Virustiter um mehr als 4- Log-Stufen.

Erfolgte die Ernte der Masernviren nicht zum optimalen Erntezeitpunkt, konnte eine vergleichbare Reduzierung der Masernvirusausbeute festgestellt werden. Durch die Nutzung der dielektrischen Spektroskopie als effektives Inline-Messsystem war es durch Detektion des zytopathischen Effektes möglich, den optimalen Erntezeitpunkt zu bestimmen. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die höchste aktive Viruskonzentration ca. 40 h nach dem globalen Maximum der Permittivität erreicht wird. Durch die Identifizierung des optimalen Erntezeitpunktes war es erstmals möglich, reproduzierbar in serumhaltigem und serumfreiem Medium Masernviren in hohen Konzentrationen herzustellen.

Abstract

Mortality rates in late-stage cancers are exorbitant. An alternative to commonly applied cancer treatments is the use of oncolytic viruses. One promising class of oncolytic viruses is the Measles virus due to its natural affinity to infect tumor cells. For a successful treatment of cancer patient high infective doses of more than 10^8 - 10^{11} of infective virus particles are required. In practice, however, a broad therapy concept is hampered due to a low virus stability of the Measles virus, as it shows a half-life of approximately of 1 h at 37°C (optimal growth temperature of host cells). As large amounts of infectious particles are needed for the treatment of cancer patients, a sufficient and fully characterized manufacturing process must be established.

One important component in Measles virus manufacturing is the host cell system. In this thesis, different host cell lines were screened with regard to a sufficient production of oncolytic Measles viruses. Compared to suspended cell lines, adherently growing cells and cells growing in aggregates showed higher virus titers up to 10^9 TCID₅₀ mL⁻¹. Interestingly, a high infection efficiency did not result in a high Measles virus yield. Rather, infected host cells died before Measles virus particles were produced. The highest productivity was achieved by Vero and BJAB cells, but only Vero cells maintained a high virus productivity when transferred to a stirred tank reactor (STR). Compared to the static cultivation system, higher virus titers of 10^{10} TCID₅₀ mL⁻¹ in STR could only be realized within a narrow range of process parameters. Shear stress levels of <0.25 N m⁻² could be identified as one critical processing parameter for the Measles virus production in Vero cells. Here, the interactions of microcarriers were identified as having a dominating effect on the Measles virus yield. Also gassing had a far greater influence on the host cells' productivity. Continuous aeration reduced the maximum achievable virus titer by more than 4 log steps. A comparable reduction in Measles virus yields could also be observed when the virus was harvested at the wrong time. By using dielectric spectroscopy as an effective inline measurement system, it was possible to determine the optimal time of harvest by detecting the cytopathic effect. As a result, it

was found that the highest active virus concentration was measured approximately 40 hours after the global maximum of permittivity.

By identifying the optimal time of harvest, it was possible for the first time to produce reproducible Measles virus in high virus titers in serum-containing and serum-free media.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielsetzung	1
1.1	Biopharmazeutika in der Krebstherapie	1
1.2	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	4
2	Grundlagen.....	9
2.1	Das onkolytische Masernvirus.....	9
2.2	Wirtszellsysteme zur Produktion onkolytischer Masernviren.....	14
2.3	Auswahl und Charakterisierung des Bioreaktorsystems zur Produktion von onkolytischen Masernviren.....	17
2.3.1	Bioreaktorsysteme	17
2.3.2	Bioreaktorcharakterisierung	20
2.4	Inline-Überwachung und Kontrolle der Masernvirusproduktion in dynamischen Kultivierungssystemen	33
2.4.1	PAT in der Zellkulturtechnologie.....	35
2.4.2	Dielektrische Spektroskopie	37
3	Material und Methoden	43
3.1	Das Virus	43
3.2	Offline-Analytik	43
3.2.1	Bestimmung der infektiösen Dosis	43
3.2.2	Offline-Zellquantifizierung	46
3.2.3	Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration.....	48
3.3	Charakterisierung von potenziellen Wirtszellen zur Masernvirusproduktion.....	49
3.3.1	Wirtszellen.....	49
3.3.2	Kultivierungsbedingungen der Wirtszellen	54
3.3.3	Masernvirusinfektion im kleinen Maßstab	56
3.4	Multiples Bioreaktorsystem.....	57
3.4.1	Verwendete Rührkessel	57
3.4.2	Aufbau und Funktion des Prozessleitsystems	58
3.4.3	Regelung der Prozessgrößen	59
3.5	Inline-Überwachung des Systems	61
3.6	Masernvirusproduktion im Bioreaktor	62
3.6.1	Definition der experimentellen Randbedingungen.....	62
3.6.2	Masernvirusproduktion in Suspensionszellen im Bioreaktor	64
3.6.3	Masernvirusproduktion in adhärent wachsenden Zellen im Bioreaktor	64
3.7	Datenerhebung	66

3.7.1	Technische Fehler der verwendeten Messmethoden.....	66
3.7.2	Randomisierte Versuchsdurchführung	68
4	Ergebnisse	71
4.1	Wirtszellauswahl	71
4.1.1	Wachstumscharakteristik der Wirtszellen.....	71
4.1.2	Wirtszellabhängige Masernvirusausbeute.....	73
4.2	Wirtszellauswahl zur Maserproduktion im Bioreaktor	77
4.2.1	Masernvirusproduktion in BJAB-Zellen	78
4.2.2	Masernvirusproduktion in Vero-Zellen im Bioreaktor	80
4.3	Einfluss geeigneter Inline-Messtechnik auf die erzielbaren Masernvirusausbeuten	84
4.3.1	Überwachung der Zelladhäsion an das Trägermaterial.....	84
4.3.2	Echtzeitüberwachung des Zellwachstums.....	88
4.3.3	Detektion des zytopathischen Effektes.....	88
4.3.4	Abschätzung des optimalen Erntezeitpunktes	93
4.4	Sensitivität der Masernvirusproduktion gegenüber Schubspannung	93
4.4.1	Wachstumsverhalten der Wirtszellen im Rührkesselreaktor	94
4.4.2	Einfluss der Schubspannung auf die Masernvirusausbeute	96
4.4.3	Einfluss von Begasung auf die Masernvirusausbeute	96
4.5	Einfluss der Multiplizität der Infektion auf die Masernvirusproduktion	103
4.6	Masernvirusproduktion in serumfreien Medien	105
4.6.1	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Masernvirusausbeute ..	106
4.6.2	Schersensitivität der Masernvirusproduktion im serumfreien Medium 108	
5	Diskussion.....	113
5.1	Virusausbeuten sind abhängig von der Wirtszelllinie.....	113
5.1	Die Masernvirusproduktion ist schersensitiv	118
5.1.1	Einfluss von Strukturänderungen der Zellaggregate.....	119
5.1.2	Negativer Einfluss von Mikrocarriern auf die Masernvirusproduktion 123	
5.1.3	Erniedrigung der Masernvirusausbeute durch Begasung	133
5.2	Inline-Überwachung der Masernvirusproduktion durch DS	136
5.3	Auswahl des Bioreaktorsystems.....	142
5.4	Überwachungssysteme für die Produktion von Masernviren in alternativen Bioreaktorsystemen	144

6	Schlussfolgerungen und Ausblick	147
7	Abkürzungsverzeichnis	150
8	Literaturverzeichnis	155
9	Abbildungsverzeichnis	177
10	Tabellenverzeichnis	181
11	Eigene Publikationen.....	182
12	Anhang.....	186