

**ACHEMA 2015 Trendbericht:**

**Single-Use (disposable)-Systeme in biopharmazeutischen Prozessen: Quo vadis?**

Regine Eibl, Dieter Eibl

Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften

Single-Use-Systeme (SUS) werden heute bei der Mehrheit der biopharmazeutischen Prozesse mit tierischen Zellkulturen eingesetzt. Am häufigsten werden Single-Use-Filter, Kunststoffbeutel für Lagerzwecke, Single-Use-Mischer und Single-Use-Bioreaktoren im Upstream Processing (USP) präklinischer und klinischer Musterproduktionen verwendet. Doch auch für das Downstream Processing (DSP) sowie die Formulierung und Abfüllung setzt die biopharmazeutische Industrie zunehmend auf SUS. Im Fokus aktueller Entwicklungen sind u.a. gerührte Single-Use-Bioreaktoren für Mikroorganismen. Bedarf besteht außerdem an Single-Use-Equipment für die Prozessierung von Stamm- und T-Zellen.

Single-Use (disposable)-Systeme sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Die Teile, die mit dem Produkt in Kontakt kommen, bestehen aus von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Kunststoffen wie zum Beispiel Polyethylen oder Polycarbonat. SUS sind in der Regel bereits durch den Hersteller beta- oder gamma-sterilisiert, weshalb sie sofort eingesetzt werden können (ready-to-use). Die Akzeptanz solcher SUS hat in den vergangenen 15 Jahren in der biopharmazeutischen Produktion stark zugenommen. Das betrifft vor allem Prozesse mit tierischen Zellkulturen, wo klein- und mittelvolumige Produkte wie therapeutische Antikörper, Hormone, Enzyme oder Impfstoffe schnell entwickelt und effizient hergestellt werden sollen. So wird aktuell davon ausgegangen, dass in 2/3 solcher Prozesse bei Neu-Etablierungen SUS bevorzugt werden.

Erklärt wird dieser Trend mit den gestiegenen Produkttitern (und damit verbundenen Reduktionen der Produktionsbioreaktorgröße auf 1 m<sup>3</sup> oder 2 m<sup>3</sup>) sowie den Vorteilen, die aus der Anwendung von SUS im Vergleich mit ihren wiederverwendbaren Gegenspielern aus Glas oder Stahl resultieren. Neben kürzeren Produktionszeiten (Sterilisations- und Reinigungsprozeduren entfallen) wird die

höhere Flexibilität (Produktwechsel können schneller vollzogen werden) und Sicherheit (minimiertes Risiko von Produktkreuzkontaminationen) genannt. Außerdem lässt sich durch SUS das Anfangsinvestment für eine Produktionsanlage um ca. 40% reduzieren; Realisierung und Inbetriebnahme lassen sich deutlich beschleunigen.

Single-Use-Equipment ist bei der Herstellung präklinischer- und klinischer Muster omnipräsent, während in kommerziellen biopharmazeutischen Produktionen weniger Gebrauch von ihm gemacht wird. Als Ursache dafür werden die noch existierenden Limitationen der auf dem Markt verfügbaren SUS angegeben.

**Leachables und Extractables (L&E) als Hauptschwachstelle von SUS**

Unter Leachables und Extractables (L&E) versteht man chemische Substanzen, die unter Prozessbedingungen bzw. einem Worst-Case-Szenario aus dem Kunststoff migrieren und das Produkt schädigen. Zurzeit sind fehlende Regulatorien für standardisierte Tests zum Nachweis von L&E respektive entsprechende Analysenprotokolle die größte

Schwachstelle von SUS. Daran hat auch die Identifizierung von bis(2,4-Di-Tert-Butylphenyl)Phosphat (bDtBPP) als cytotoxisches Leachable für verschiedene Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zelllinien bisher nichts ändern können. Die Resultate aus den Untersuchungen der Amgen-Spezialisten um Matthew Hammond förderten jedoch u.a. die Entwicklung robusterer und optimierter Filme (wie zum Beispiel des Aegis5-14 Films von ThermoFisher Scientific oder des Flexsafe S80 von Sartorius Stedim Biotech) für Lager-, Mischer- und Bioreaktorbeutel. Wie jüngste, auf einer DECHEMA-Empfehlung basierende Untersuchungen zeigen, konnte für Flexsafe S80, in dem die Konzentration des Antioxidants Irgafors 168 minimiert ist, eine das Zellwachstum inhibierende Wirkung sogar über CHO-Zellen hinaus ausgeschlossen werden.

Neben der DECHEMA, die mit ihrer Arbeitsgruppe „Single-Use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion“ an Empfehlungen und Richtlinien zur Standardisierung von SUS im deutschsprachigen Raum arbeitet, sind die in der Abbildung 1 aufgeführten Organisationen aktiv. Zusätzlich zur L&E-Problematik werden Fragestellungen zur

ASME	American Society of Mechanical Engineers	www.asme.org
ASTM	American Society of Testing and Materials	www.astm.org
BPOG	BioPhorum Operations Group	www.biophorum.com
BPSA	Bio-Process Systems Alliance	www.bpsalliance.org
DECHEMA	Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie	www.dechema.de
ELSIE	Extractables and Leachables Safety Information Exchange	www.elsiedata.org
ISPE	International Society for Pharmaceutical Engineering	www.ispe.org
PDA	Parenteral Drug Association	www.pda.org

Abb. 1: Organisationen, die die Implementierung von SUS unterstützen

Integrität, Lieferantenqualifizierung, Austauschbarkeit von Materialien und Komponenten sowie verfahrenstechnischen Charakterisierung von Single-Use-Bioreaktoren bearbeitet.

### Single-Use-Prozessplattformen, komplette Single-Use-USP-Linien und erste Single-Use-Fabriken

Trotz der aufgeführten Schwachstellen von SUS überwiegen ihre Vorteile, vorausgesetzt sie werden richtig ausgewählt und verwendet. SUS gibt es inzwischen für alle Prozessschritte des USP und DSP. Sogar für die Formulierung und Abfüllung ist geeignetes Single-Use-Equipment (Mischer, Transfersysteme, Dosiersysteme, Abfüllnadeln etc.) verfügbar. Komplette Single-Use-Produktionsstätten wie die von WuXi PharmaTech in Shanghai sind gegenwärtig aber trotzdem noch die Ausnahme. (ca. 10%). Mit ca. 75% dominieren hybride Produktionsstätten, in welchen Single-Use-Filter, Kunststoffbeutel für Lagerzwecke, Single-Use-Mischer und Single-Use-Bioreaktoren zusammen mit Equipment aus Edelstahl verwendet werden. Dabei haben sich von den Marktleadern für SUS (GE Healthcare, Pall Life Sciences, Merck MilliPore, Sartorius Stedim Biotech, ThermoScientific) konzipierte Prozessplattformen (z.B. für die Medienherstellung, die Fermentation, die Biomasseabtrennung, die Virusabtrennung- und -inaktivierung, die Formulierung und Abfüllung) durchgesetzt.

Die Tatsache, dass dieser Bereich trotz der Fortschritte im Single-Use-DSP immer noch ein Flaschenhals für Volumina größer 500 L ist (Limitation durch Single-Use-Zentrifugation, Single-Use-Protein A-Chromatographie, fehlende Sensortechnik), erklärt den aktuellen Trend zu Produktionsstätten mit komplett auf SUS basierendem USP (siehe Abbildung 2). Ein prominentes Beispiel für eine solche Produktionsstätte ist die 2000-L-Anlage von Shire in Lexington (Massachusetts). Mit der durch die European Medicines Agency (EMA) und FDA zur Behandlung der Gaucherkrankheit zugelassenen Velaglucerase Alfa wird sogar erstmals ein kommerzielles Biotherapeutikum in einer Produktionsstätte mit kompletter Single-Use-USP-Linie hergestellt. Doch ohne die skalierbare Single-Use-Bioreaktortechnologie und entsprechendes peripheres Equipment würden solche Produktionsstätten nicht existieren

### Neue Generation von Single-Use-Bioreaktoren

Tabelle 1 im Anhang enthält eine Aufstellung kommerziell erhältlicher Single-Use-Bioreaktoren vom Benchtop- bis zum Kubikmetermaßstab. Diese Übersicht erhebt keinen

Anspruch auf Vollständigkeit. Automatisierte Single-Use-Minibioreaktoren für Kultivierungen im Milliliterbereich wie der ambr15 sowie ambr250 (Sartorius Stedim Biotech, ehemals TAP Systems), die BioBLU 0.3 Systeme (Eppendorf), das Pall Micro-24 Bioreaktorsystem (Pall Life Sciences), der BioLector (mp2-labs), die ZRP Bioreaktoren der Serie H von Zellwerk und die MagDrive Minibioreaktoren der PBS Biotech wurden hier nicht berücksichtigt. Single-Use-Bioreaktoren für das Tissue Engineering wurden ebenfalls außen vor gelassen.

Die erfassten Bioreaktoren der verschiedenen Anbieter unterscheiden sich im Energieeintragsprinzip, der Größe sowie dem Material des Kultivierungscontainers, den Sensoren und der Kontrolleinheit. Sie werden sowohl für die Kultivierung in Suspension wachsender Zellen als auch adhärenter Zellen genutzt. Für Suspensionszellen sind mechanisch oder pneumatisch angetriebene Single-Use-Bioreaktoren einsetzbar. Adhärenz Zellen werden dagegen entweder in denselben Single-Use-Bioreaktoren auf Microcarriern oder in mechanisch angetriebenen, rotierenden Bettbioreaktoren bzw. hydraulisch angetriebenen Single-Use-Hohlfaserbioreaktoren, Parallelplattenbioreaktoren und Festbettbioreaktoren kultiviert.

Die Anwender greifen mehrheitlich auf mechanisch angetriebene, gerührte sowie wellendurchmischte Single-Use-Bioreaktoren zurück. Während wellendurchmischte Bioreaktoren (mit wenigen Ausnahmen) vornehmlich für Zellexpansionen verwendet werden, werden die Bioreaktionen in der Regel in gerührten Bioreaktoren durchgeführt. In den letzten drei Jahren wurde das Design verschiedener wellendurchmischter

und gerührter Single-Use-Bioreaktoren modifiziert, um ihr Handling zu vereinfachen sowie die tierische Zellkultur überschreitende Anwendungen abzudecken (vergleiche Tabelle 1). Auffallend ist hier die getätigte Entwicklung von gerührten Single-Use-Bioreaktoren für mikrobielle Prozesse. Die Sensortechnik wurde ebenso wie die Controller sowie die Überwachungs- und Steuerungssoftware der Single-Use-Bioreaktoren überarbeitet und erweitert. Das garantiert eine verbesserte Datenaufzeichnung und Prozessüberwachung. Als Folge der Weiterentwicklung der Single-Use-Bioreaktoren, aber auch durch Firmenfusionen (wie z.B. der von Xcellerex/GE Healthcare, Eppendorf/New Brunswick/DASGIP sowie ATMI/Pall Life Sciences) wurden Bioreaktor-namen teilweise geändert.

Neu in den Markt eingeführte Single-Use-Bioreaktoren wie der Allegro STR 200 von Pall und die magnetisch angetriebene Baureihe der Vertical-Wheel-Bioreaktoren von PBS Biotech (Vertical Wheel Bioreaktoren MagDrive) sind eher selten.

Um die Raum-Zeit-Ausbeute der mit tierischen Zellkulturen betriebenen Single-Use-Bioreaktoren zu erhöhen bzw. deren beschränkte Skalierbarkeit aufzuheben, setzen zahlreiche Prozessentwickler und Contract Manufacturing Organizations (CMO) auf die Tangentialflowfiltration (TFF). Sie kombinieren gerührte und wellendurchmischte Single-Use-Bioreaktoren mit externen Crossflow-Mikrofiltrationssystemen wie dem wiederverwendbaren Alternating Tangential Flow (ATF)-Modul von Refine (deren Bioprozesstechnologie heute Teil von Repligen ist) oder Single-Use-Hohlfasermodulsystemen anderer Anbieter (z.B. GE Healthcare, Spectrum



Abb. 2: SUS für das USP (mit freundlicher Genehmigung der Sartorius Stedim Biotech AG)



Laboratories). Dadurch werden kontinuierliche Perfusions-, Repeated Fed Batch-, konzentrierte Fed Batch- und konzentrierte Perfusionsprozesse möglich, deren Umsetzung durch neues peripheres Single-Use-Equipment in Form von Konnektoren, Membranventilen und Pumpen (siehe Abbildung 3) unterstützt wird.

### Neue Konzepte für das DSP: Klärung, Capture, Polishing

Mit den generierten Hochzelldichten (um  $10^8$  Zellen pro Milliliter) und mit den bis um den Faktor 10 höheren Produkttitern gehen neue Anforderungen an das DSP einher. Gleichzeitig ergibt sich eine Chance für innovative Konzepte im DSP, die eine Prozesskostenoptimierung erlauben. So wurde gezeigt, dass alternativ zur Single-Use-Zentrifugation Single-Use-Body-Feed-Filtrationsmodule des Typs Sartoclear Dynamics von Sartorius Stedim Biotech (Kieselgurfiltration) oder FILTRODISC BIO SD-Module von FILTROX für eine effiziente Klärung der Kulturbrühe im Produktionsmaßstab gebraucht werden können. Die Firma 3M setzt mit der Entwicklung des 3M Emphaze AEX Hybrid Purifiers (einem multifunktionellen Single-Use Purifier) ebenfalls bei den Klärungsschritten an, um die nachfolgenden teuren chromatographischen Aufreinigungsschritte zu entlasten.

Einige Anwender realisieren bereits kontinuierliche DSP-Prozesse, für die ASI kürzlich einen Single-Use-Wärmetauscher präsentierte. Die Hauptlieferanten von SUS bieten neben vollautomatisierten TFF-Modulen solche für Dia- und Virenfiltrationen sowie Single-Use-Chromatographiesysteme und Membranadsorber in unterschiedlichen Größen an. Verschiedene Biopharmazeutika-Produzenten und CMOs bevorzugen aber disposable Chromatographiesysteme, die mehrfach einsetzbar und vorgepackt sind. Beispielhaft sollen an dieser Stelle die mit Resin vorgepackten Open Platform Specified (OPUS)-Kolonnen von Repligen erwähnt werden, die die Aufreinigung von Kulturbrühen aus  $1\text{ m}^3$  und  $2\text{ m}^3$  Single-Use-Bioreaktoren sicherstellen, und die Chromatographiesäulen aus monolithischen Materialien von BIA Separations.



Abb. 3: Magnetschwebende Single-Use-Zentrifugalpumpenserie PuraLev und dazugehöriger Controller der Levitronix (mit freundlicher Genehmigung der Levitronix AG)

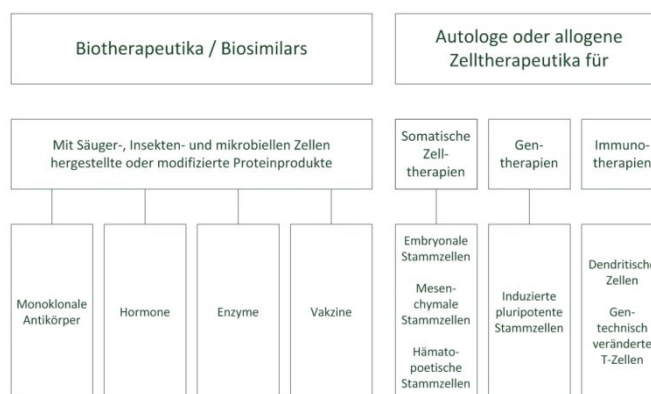


Abb. 4: Potentielle biopharmazeutische Produkte, die sich für den Einsatz von SUS anbieten

### Zusammenfassung und Ausblick

SUS sind in allen Bereichen biopharmazeutischer Prozesse mit tierischen Zellkulturen akzeptiert (Abbildung 4). An der Lösung der noch bestehenden Limitierungen (Standardisierung, Weiterentwicklung der Sensortechnik und Verbesserung der Automatisierungslösungen sowie Single-Use-Chromatographie im großen Maßstab) wird mit Hochdruck gearbeitet. Marktanalysen gehen deshalb für SUS von einem andauernden Wachstum von mindestens 15% pro Jahr aus. Dabei wird ihre Zunahme auch für kommerzielle Produktionen und mikrobielle Prozesse prognostiziert. Neben neu zu errichtenden, flexiblen, modularen Produktionsstätten für Biotherapeutika und Biosimilars wird wiederverwend-

bares Equipment bestehender Produktionsanlagen gegen SUS ausgetauscht werden.

Schließlich ist mit den zunehmenden Erfolgen zell-, gen- und immuno-therapeutischer Ansätze zukünftig Single-Use-Equipment für die Prozessierung (Zell-expansion, -differenzierung, -ernte sowie -reinigung) von Stamm- und T-Zellen verstärkt gefragt. Besonders für die induzierten pluripotenten Stammzellen, die sich durch eine sehr hohe Scherstress-Sensitivität auszeichnen, stellt sich die Frage, ob das für permanente Zelllinien entwickelte Single-Use-Equipment überhaupt genutzt werden kann.

### Weiterführende Literatur

- (1) 6th Annual Survey of the Single-use Bioprocessing Market. Aspen Brook (2014).
- (2) 11th Annual Report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production. BioPlan Associates (2014).
- (3) Technical Report No. 66. Application of Single-Use Systems in Pharmaceutical Manufacturing. PDA (2014).
- (4) Eibl, R. et al. Standardized cell culture test for the early identification of critical films for CHO cell lines and chemically defined culture media. DECHEMA Temporary Working Group on "Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacturing" (2014).

## Anhang

Tab. 1 Übersicht kommerziell erhältlicher, instrumentierter Single-Use-Bioreaktoren (Litermaßstab)

Reaktorkategorie	Reaktorname	Arbeitsvolumen [L]	Erfolgreicher Einsatz <sup>1</sup> zur Kultivierung von	Hersteller
Mechanisch angetrieben, wellendurchmischt	AppliFlex	0,5-25	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen, Algen <sup>2</sup>	Applikon
	CELL-tainer (20 L, 200 L)	0,015-150	Mikroorganismen	Cell tainer Biotech
		0,015-200	tierischen Zellkulturen	
	CellTumbler (diverse Systeme 50)	0,5-10	tierischen Zellkulturen	CerCell
	SmartRocker Bioreaktor	0,5-25	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen	Finesse
	Wave Bioreaktor System (System 20/50 und System 500/1000)	0,2-500	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen	GE Healthcare
	ReadyToProcess WAVE25	0,2-25		
	Xuri Cellbag Bioreaktor (System W5 und W25)	0,2-25	humanen Zellen (z.B. T-Zellen und Stammzellen)	
	Allegro XRS 20	0,1-20	tierischen Zellkulturen, Mikroorganismen und T-Zellen	Pall Life Sciences
BIOSTAT RM Bioreaktor (System 20/50 und System 200)	0,1-100	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen, Algen <sup>2</sup> und Mikroorganismen	Sartorius Stedim Biotech	
Mechanisch angetrieben, gerührt, rigider Kessel	CellVessel 21 und 23 Serie	0,250-75	tierischen Zellkulturen	CerCell
	CellVessel 21 und 23 Serie	0,25-1	Mikroorganismen	
	BactoVessel 25 Serie	2-75		
	CelliGen BLU Benchtop-Rührreaktor (BioBLU 1c, 5c, 14c, 50c)	0,25-40	tierischen Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	Eppendorf
	CelliGen BLU Benchtop-Rührreaktor (BioBLU 1f)	0,25-1,25	Mikroorganismen	
	DASGIP Parallel-Bioreaktor (BioBlock mit BioBLU 1c)	0,25-1,25	tierischen Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	
	DASGIP Parallel-Bioreaktor (BioBlock mit BioBLU 1f)		Mikroorganismen	
	Mobius CellReady 3 L Bioreaktor	1-2,4	tierischen Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	Merck Millipore
	UniVessel SU	0,6-2	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen, humanen Zellen (Stammzellen) und Mikroorganismen	Sartorius Stedim Biotech
SmartVessel <sup>3</sup> Single-Use-Bioreaktor	0,5-2,2	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen	Finesse	
Mechanisch angetrieben, gerührt, Kunststoffbeutel	Xcellerex XDR (10 L, 50 L, 200 L, 500 L, 1000 L, 2000 L)	4,5-2000	tierischen Zellkulturen	GE Healthcare
	Xcellerex XDR-50 MO Fermentor	10-50	Mikroorganismen	
	Mobius CellReady (50 L, 200 L, 1000 L <sup>3</sup> , 2000 L <sup>3</sup> )	10-2000 <sup>3</sup>	tierischen Zellkulturen	Merck Millipore
	Allegro STR (200 L, 1000 L <sup>3</sup> , 2000 L <sup>3</sup> )	60-2000 <sup>3</sup>	tierischen Zellkulturen	Pall Life Sciences
	PadReaktor (25 L, 50 L, 125 L, 250 L, 600 L, 1200 L) <sup>4,5</sup>	8-960	tierischen Zellkulturen	
	BIOSTAT STR (50 L, 200 L, 500 L, 1000 L, 2000 L <sup>3</sup> )	12,5-2000 <sup>3</sup>	tierischen Zellkulturen, humanen Zellen (Stammzellen) und Mikroorganismen	Sartorius Stedim Biotech
	HyPerforma S.U.B (50 L, 100 L, 250 L, 500 L, 1000 L, 2000 L)	25-2000	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen	ThermoScientific
	HyPerforma S.U.F (30 L, 300 L)	6-300	Mikroorganismen	
Mechanisch angetrieben, orbital geschüttelt	OrbShake Bioreaktor (SB-10X, SB-50X, SB-200X, SB-2500X)	1-2500	tierischen und pflanzlichen Zellkulturen, Mikroorganismen	Adolf Kühner
	Current Bioreaktor (5 L, 50 L, 150 L, 300 L)	0,5-300	tierischen Zellkulturen	Hangzhou Amprotein Bioengineering

Tab. 1 Fortsetzung

Reaktorkategorie	Reaktorname	Arbeitsvolumen [L]	Erfolgreicher Einsatz <sup>1</sup> zur Kultivierung von	Hersteller
Mechanisch angetrieben, rotierend	Vertical Wheel Bioreaktor MagDrive (PBS3 <sub>MAG</sub> , PBS15 <sub>MAG</sub> )	1,8-15	humanen Zellen (Stammzellen)	PBS Biotech
Pneumatisch angetrieben	CElIMaker Felix <sup>3</sup>	n.a.	tierischen Zellkulturen	Cellexus
	CElIMaker Regular und CElIMaker Plus (8 L, 50 L)	1-50	Mikroorganismen und Algen	
	Vertical Wheel Bioreaktor AirDrive (PBS 3 Air, PBS 15 AIR, PBS 80 AIR, PBS 500 AIR)	0,6-500	tierischen Zellkulturen	PBS Biotech
Hydraulisch angetrieben, Hohlfaserbioreaktor	Quantum Cell Expansion	Absolute Wachstumsfläche: 2,1 m <sup>2</sup>	Adhärenten tierischen Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen und T-Zellen)	Terumo BCT
Hydraulisch angetrieben, Parallelplattenbioreaktor	Xpansion Multiplatten-Bioreaktor (10 bis 200 Platten)	Absolute Wachstumsfläche: 0,06-12,2 m <sup>2</sup>	adhärenten tierische Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	Pall Life Sciences
Hydraulisch angetrieben, Festbettbioreaktor	Celligen BLU Festbettbioreaktor (5 L, BioBLU 5p) <sup>6</sup>	3,75 <sup>8</sup>	adhärenten tierische Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	Eppendorf
	iCELLis <sup>7</sup> (nano, 500)	0,04-25 <sup>8</sup>	adhärenten tierische Zellkulturen und humanen Zellen (Stammzellen)	Pall Life Sciences

n.a. not available, 1 Existenz von Application Notes und/oder Papern, 2 Version mit LED-Beleuchtung, 3 angekündigt, 4 kubischer Kunststoffbeutel, 5 Taumelrührer, 6 Fibra-Cel Carrier, 7 Polyester-Mikrofasern, 8 Arbeitsvolumen Festbett