



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

MALDI-TOF Massenspektrometrie Biotyping – *at-line* Analyse von rekombinanten Zelllinien

Autor: Sebastian Schwamb
Institut / Klinik: Institut für Molekular-und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Neben chemischen Pharmazeutika stellen rekombinant hergestellte, therapeutisch relevante Proteine, die sogenannten Biopharmazeutika, die zweite große Wirkstoffgruppe der Arzneimittel dar. Für deren Herstellung hat sich die Kultivierung tierischer Zellen, insbesondere Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, als Methode der Wahl durchgesetzt. Bereits 2011 wurden 7 der 10 weltweit umsatzstärksten Biopharmazeutika in CHO Zellen produziert.

Die kontinuierlich steigende Nachfrage von Biopharmazeutika stellen gemeinsam mit der 2004 veröffentlichten Leitlinie zur Einführung Prozessanalytischer Technologien (FDA; PAT-Leitlinie) bei biopharmazeutischen Herstellungsprozessen die treibende Kraft dar, Produktionsprozesse und vor allem das Prozess-Monitoring im Sinne eines detaillierteren Prozessverständnis zu optimieren.

Heute eingesetzte Standardmethoden des Prozess-Monitoring beschreiben die Abnahme der Zellvitalität zumeist indirekt über den Verlust der Membranintegrität. Dies ist im Falle des Zelltods durch Nekrose korrekt, allerdings bleiben so Prozesse des programmierten Zelltods, die im Falle der Kultivierung in Bioreaktoren die Hauptursache für eine Reduktion der Zellvitalität darstellen, unbeachtet. Wesentlich aussagekräftiger wäre die Analyse eines unmittelbar stressabhängigen Biomarkers, z.B. Veränderungen des Proteoms einer Zelle in Abhängigkeit ihres vitalitätsbezogenen zellphysiologischen Zustandes (vital, früh-, spät-apoptotisch).

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals die Anwendung des Intact Cell MALDI-TOF Massenspektrometrie (ICM MS) Biotypings als Analyse-Tool für die Detektion von Zellstress/Apoptose in suspensionsadaptierten CHO Kultivierungsprozessen beschrieben.

Im Rahmen einer Pilotstudie, die die Anwendbarkeit des ICM MS Biotyping für zwei nahe verwandte CHO Zelllinien untersuchte, konnten Veränderungen des zellphysiologischen Zustandes, die zu einer Reduktion der Zellvitalität führten, bis zu 24h früher als mit Standardmethoden und zeitgleich mit einem sensitiven off-line Apoptose-Marker (Caspase 9) detektiert werden. (Vergleichs-)Analysen von Proben diskreter Zustände (Apoptose induzierte Kulturen) in Kombination mit einer retrospektiven Datenauswertung ermöglichten die Identifikation einer kondensierten Apoptose-spezifischen MS Signatur (Klassifikator). Basierend auf dieser Signatur konnten Klassifikationsmodelle berechnet werden, die den zellphysiologischen Zustand unbekannter Proben lediglich basierend auf deren MS Spektren identifiziert.

Im Hinblick auf industrielle Zellkulturprozesse konnte ferner die Anwendbarkeit des ICM MS Biotyping auf geregelte Kultivierungen im Bioreaktor, verschiedene Prozessfahrweisen sowie die Übertragbarkeit der Methode auf weitere CHO-Zelllinien gezeigt werden. Der erfolgreiche Methodentransfer auf ein kompaktes Bench-top MS in Kombination mit der Tatsache, dass es sich hierbei um eine markierungsfreien (label-free) Methode handelt, könnten entscheidende Merkmale für eine steigende Akzeptanz der Methode sein.