

DAS TGC-VERFAHREN ZUR PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE

Aufgrund der kontinuierlich steigenden Zahl rekombinanter Proteine auf dem Weltmarkt, werden in Zukunft Verfahren nötig, die die schnelle und effiziente Herstellung von eukaryonten Produktionszelllinien erlauben und dem Anwender so deutliche Vorteile gegenüber der Konkurrenz verschaffen. Effektive Produktionszelllinien zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass mit ihnen bei geringen Kosten große Mengen an biologisch aktivem Protein herzustellen sind. Für die Herstellung solcher Zellen mußten bislang in der Regel ein bis zwei Jahre veranschlagt werden.

Das von der Firma tgcBIOMICS entwickelte TGC-Verfahren beschreitet einen völlig neuartigen Weg zur Transfektion eukaryonter Zellen und macht effiziente und stabile „high-producer-clones“ innerhalb nur weniger Monaten zugänglich.

WODURCH ZEICHNET SICH DAS TGC-VERFAHREN AUS?

Beim TGC-Verfahren wird die Transfektion der Ziel-DNA in die Zielzellen durch Anwendung sog. „Bakterieller Genfähren“ erreicht. Bakterielle Genfähren sind Bakterien, die fremde DNA unter eukaryonter Kontrolle auf Plasmiden enthalten und diese DNA in einem von tgcBIOMICS entwickelten Verfahren auf animale Zielzellen übertragen. Die Übertragung der DNA auf die eukaryonten Wirtszellen erfolgt mit dem Ziel, die Wirtszellen zur Produktion des Zielproteins zu veranlassen.

WIE FUNKTIONIEREN BAKTERIELLE GENFÄHREN?

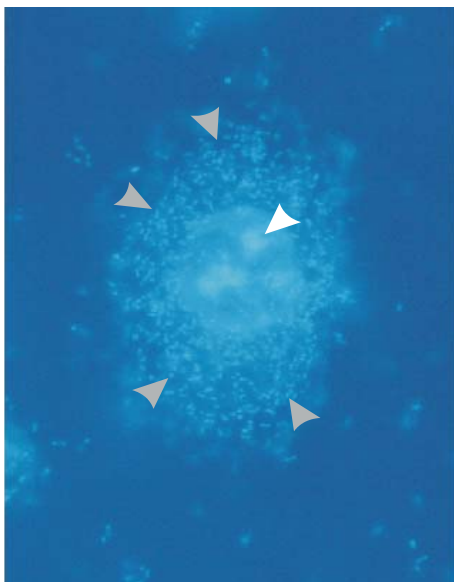


Abbildung 1: DNA-Färbung der mit Bakteriellen Genfähren infizierten Zellen. BHK21 Zellen mit Bakterien infiziert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Die grauen Pfeile weisen auf DNA der Bakteriellen Genfähren hin, der weiße Pfeil auf den eukaryonten Zellkern.

Bei den Bakteriellen Genfähren handelt es sich um spezielle Bakterien¹ mit einer Reihe spezifischer Eigenschaften. Die Genfähren enthalten das Zielgen auf einem episomal vorliegenden TGC-Plasmid, das in seiner Größe nicht beschränkt ist und daher mit beliebigen eukaryonten Promotoren, Enhancern u.ä. ausgestattet werden kann. Die Anzucht der Bakteriellen Genfähren erfolgt in einem vollsynthetischen Medium, sie werden anschließend zu den eukaryonten Zielzellen hinzugegeben. Die Infektion kann dabei je nach Wunsch mit oder ohne Zusatz von Serum erfolgen. Die Genfähren infizieren die eukaryonten Zielzellen und vermehren sich im Zytoplasma der Zellen. Zur Freisetzung der Ziel-DNA wird gezielt die Lyse der Bakteriellen Genfähren induziert,

¹ Die Bakterien sind in Europa zum Patent angemeldet, in den USA und Australien wurden sie bereits patentiert.

entweder durch die externe Gabe von Antibiotika oder durch die Aktivierung endogener Gene² der Bakteriellen Genfähren. Die freigesetzten TGC-Plasmide integrieren anschließend stabil ins Genom der eukaryonten Zellen. Damit sind die Voraussetzungen für die Expression des Zielgens mit Hilfe des zelleigenen eukaryonten Transkriptions- und Translationsapparates geschaffen. Noch sind nicht alle Details der Transfektion mittels des TGC-Verfahrens verstanden. Auf Grund der außerordentlich hohen Expressionsleistungen der mit dem TGC-Verfahren hergestellten

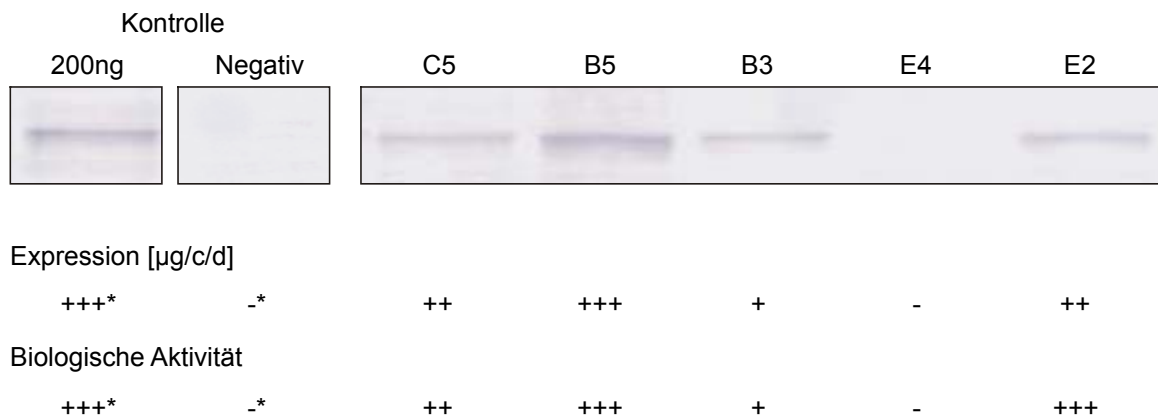


Abbildung 2: Expressionsleistung von Zelllinien hergestellt nach dem TGC-Verfahren. Die Abbildung zeigt einen Western-Blot von Zellkulturüberständen verschiedener nach dem TGC-Verfahren hergestellter Zelllinien. Die beim Partner von tgcBIOMICS analysierten Expressionslevel der Zellen und deren biologische Aktivitäten sind qualitativ im Vergleich zum vorgegebenen Standard (*) angegeben.

Zelllinien ist anzunehmen, dass die Transfektion mit Bakteriellen Genfähren zur Integration der TGC-Plasmide in chromosomalen „hot-spots“ führt, die sich durch eine hohe transkriptionelle Aktivität auszeichnen.

DIE BESONDERE LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TGC-VERFAHRENS!

In Kooperation mit einem großen pharmazeutischen Unternehmen konnten wir kürzlich die Leistungsfähigkeit des TGC-Verfahrens an einem im Markt eingeführten, komplexen Protein nachweisen. tgcBIOMICS erhielt das Zielgen vom Kooperationspartner. Nach Umklonierung des

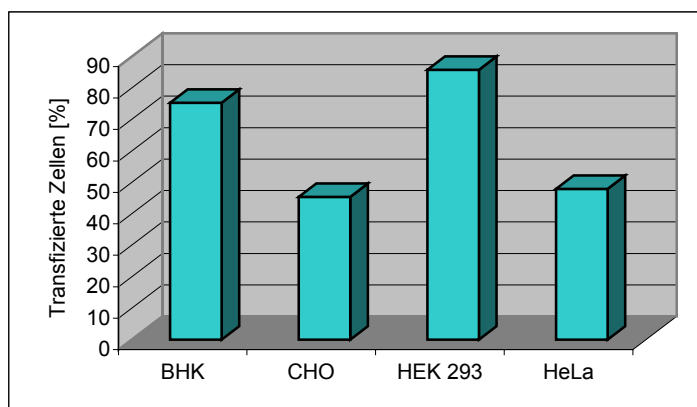


Abbildung 3: Effizienz des TGC-Verfahrens auf ausgewählten Zelllinien. Zellen wurden mit dem EGFP-Gen transfiziert und die Effizienz im FACS ermittelt.

Gen in das TGC-Plasmid wurden stabile Produktionszelllinien hergestellt. Die innerhalb von nur drei Monaten generierten Zelllinien sezernieren das Zielprotein effizient und mit hervorragender biologischer Aktivität (vergl. Abbildung 2). Die Zellen sind seit mehr als 30 Generationen stabil.

Mit diesen Arbeiten hat

² Zur Zeit noch in Entwicklung.

tgcBIOMICS seinen Kunden davon überzeugen können, weitere Zelllinien zur Produktion von rekombinanten Proteine für den pharmazeutischen Markt mit Hilfe des TGC-Verfahrens zu entwickeln.

WIE EFFIZIENT IST DAS TGC-VERFAHREN?

In Abbildung 3 ist die Effizienz der Transfektion mit dem TGC-Verfahren für eine Reihe von Zelllinien gezeigt, die für Produktionszwecke Standard sind. Von den vier hier dargestellten Zellen ist die minimale Tranfektionseffizienz für CHO Zellen bei 40%, die maximale bei HEK 293 Zellen über 80%. Der Anteil der toten Zellen liegt dabei je nach Zelllinie zwischen 5 und 20%, die hohen Transfektionsleistungen des TGC-Verfahrens gehen also nicht mit einer erhöhten Letalität einher.

DAS TGC-VERFAHREN GEHT SCHNELL!

Für die Durchführung des TGC-Verfahrens bis zum erzeugten „high-producer clone“ werden zwischen 3 und 6 Monaten veranschlagt, bei traditionelle Verfahren rechnet man dagegen mit ca 12-18 Monaten. Dabei dauert die eigentliche Transfektion nur 1-3 Tage (vergl. Abbildung 4) und unterscheidet sich damit nicht von herkömmlichen Verfahren. Der zeitliche Aufwand für die Herstellung von Produktions-Klonen mit dem TGC-Verfahren beruht im wesentlichen auf der Klonierung der Ziel-DNA und dem Screening der transfizierten Zellen. Beide Schritte lassen sich bei herkömmlichen Transfektions-Verfahren ebenfalls nicht beschleunigen.

Im Fall der Anwendung Bakterieller Genfähren ergeben sich Unterschiede zu konventionellen Verfahren durch die direkte Verfügbarkeit von Klonen mit hohen Expressionslevel. Bei konventionellen Tranfektionen muß dagegen häufig die Methode der Genamplifikation angewandt werden, um die Produktionsleistung zu steigern. Die Genamplifikation ist allerdings mit großem Zeitaufwand und deutlichen Kosten verbunden und kann zur Herstellung instabiler Klone führen.

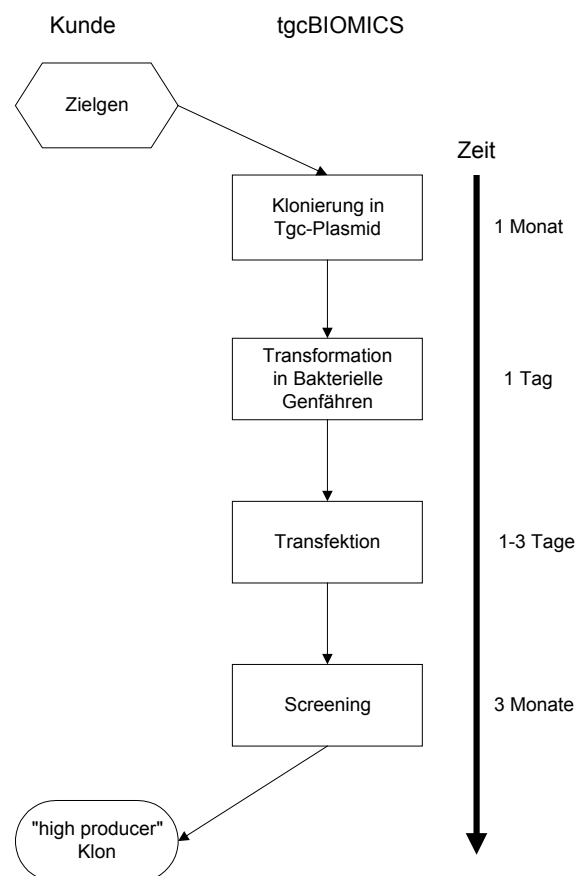


Abbildung 4: Zeitbedarf für die Herstellung von "high producer" Klonen mit dem TGC-Verfahren.

GIBT ES NACHWEISBARE RÜCKSTÄNDE DER INFEKTION MIT BAKTERIEN?

Bei der Lyse der Bakteriellen Genfähren werden die TGC-Plasmide freigesetzt und transfizieren anschließend die eukaryonten Zielzellen. Die chromosomale DNA der Bakteriellen-Genfähren ist nach allen bisherigen Untersuchungen nur passager für wenige Tage nach der Lyse nachzuweisen.

In stabil exprimierenden Zelllinien, den Produzenten der rekombinanten Proteine, konnten mit PCR-Analysen keine Spuren der chromosomalen Bakterien-DNA mehr nachgewiesen werden. Die Transfektion erfolgt offensichtlich ohne bleibende Rückstände der Infektion mit den Bakterien. Da zusätzlich bei Anzucht und Infektion mit den Bakteriellen-Genfähren nur vollsynthetische, exakt definierte Medien eingesetzt werden, werden die Voraussetzungen für eine Zulassung von Pharmazeutika, die mit solchen Zellen produziert werden, durch die Genehmigungsbehörden als günstig bewertet.

WOFÜR EIGNET SICH DAS TGC-VERFAHREN?

tgcBIOMICS sieht insbesondere drei Einsatz-Bereiche für das TGC-Verfahren:

- Die Herstellung von „high producer“ Klonen als Produktionszelllinien für die Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine zum Einsatz im pharmazeutischen und technischen Bereich.
- Die Herstellung eines Zellgemischs durch „transiente Transfektion“ (ohne Zellklonierung) um strategische Entscheidungen in der Phase der Produktentwicklung zu treffen. Mit dem TGC-Verfahren lässt sich schnell und effektiv der optimale Zelltyp für die Expression des Ziel-Proteins identifizieren. Alternativ können die transienten Zellgemische auch zur Produktion einer Pilotmenge an Protein für weiterführende biologische Analysen genutzt werden. Zur Weiterentwicklung der Proteine werden dann später stabile Zelllinien isoliert.
- Das TGC-Verfahren eignet sich zur Produktion toxischer Proteine im Batch-Verfahren. Dank der hohen Effizienz des Verfahrens ist die transiente Transfektion von Genen toxisch wirkender Proteine möglich. Die Proteine werden nur für kurze Zeit exprimiert bevor die Produzenten letal geschädigt sind. Die Batch-to-Batch Variationen können gering gehalten werden.

DAS TGC-VERFAHREN „BAKTERIELLE-GENFÄHREN“ BIETET:

- **HERSTELLUNG VON PRODUKTIONSZELLINIEN – SCHNELL UND KOSTENGÜNSTIG**
- **PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE – HOCHEFFIZIENT UND STABIL**
- **ZUGANG ZU PROTEINEN, DIE KONVENTIONELL NICHT HERSTELLBAR SIND.**

**DAS TGC-VERFAHREN LIEFERT PROTEIN PRODUKTIONZELLEN MIT ERHÖHTER PRODUKTIVITÄT
SCHNELLER, EFFIZIENTER UND KOSTENGÜNSTIGER ALS DIE VERFAHREN DER KONKURRENZ !**