This project has received funding from the Eurostars-2 joint programme with co-funding from the European Union Horizon 2020 research and innovation programme

Schlussbericht zum Vorhaben

„Design und Validierung aller Schritte zu einem GMP-konformen Produktionssystem für hoch-qualitative humane Plättchenlysate“

im Rahmen des Eurostars Projekts

E!113731 EXCELL

„Entwicklung eines neuen Standards in der Produktlandschaft humaner Plättchenlysate zur Revolutionierung der klinischen Zellherstellung“

Roman Goetzke-Braun, Anna Kolkmann, Hatim Hemeda

PL BioScience
Technologiezentrum Aachen
Dennewartstraße 25-27
52068 Aachen

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Förderkennzeichen: 01QE2033
Projektlaufzeit: 01.09.2020 – 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1 Kurzbericht 3
2 Darstellung der durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur Vorhabenbeschreibung 5
2.1 AP1 – Design- und Prozessentwicklung – Herstellung eines Fibrinogen-reduzierten und virusinaktivierten hPL 5
2.1.1 Fibrinogen-Depletion (Task 1.1) 5
2.1.2 Methoden zur doppelten Virusentfernung/-inaktivierung (Task 1.2) 5
2.1.3 Prozessintegrierung von Fibrinogen-Depletion und Virusinaktivierung (Task 1.3) und Performancemessung und Produktcharakterisierung (Task 1.4) 10
2.2 AP2 – Prozessentwicklung und Produktformulierung – gefriergetrocknetes, GMP-konformes hPL 11
2.2.1 Entwicklung und Optimierung des Gefriertrocknungsprozesses (Task 2.1) 11
2.2.2 Entwicklung und Optimierung der Produktformulierung (Task 2.2) 11
2.2.3 Produkt-Rekonstitution – Lösemittel und Protokoll (Task 2.3) 15
2.3 AP3 – Prozessvalidierung für die Herstellung von GMP-konformem hPL 16
2.3.1 Durchführbarkeit des Prozesses (Task 3.1) 16
2.3.2 Aseptische Validierung (Task 3.2) und Prozessvalidierung (Task 3.3) 16
2.4 AP4 – Validierung analytischer Methoden 18
2.4.1 Mikrobiologische Testmethoden (Task 4.1) 18
2.4.2 Produktcharakterisierung (Task 4.2) 18
2.4.3 Methoden zur Analyse der Produktperformance (Task 4.3) 18
2.5 AP5 – Regulatorische Konformität und Qualitätssicherung 22
2.5.1 Erstellung eines Product Master File (Task 5.1) 22
2.6 AP6 – Projektkoordination und Management 23
2.6.1 Internes Berichtswesen 23
2.6.2 Fortschritts- und Finanzberichterstattung 23
2.6.3 Management geistigen Eigentums 23
2.7 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 24
2.8 Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten 24
2.9 Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planung für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans 26
2.10 Der während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 27
2.11 Erfolgte/geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach NR. 5 der NKBF 28

1 Kurzbericht

Das Forschungsprojekt EXCELL (E113731) hat das Ziel, ein außergewöhnlich hochwertiges Produkt aus menschlichem Plättchenlysat (hPL) für Anwendungen in der Zellherstellung zu entwickeln. Durch einen neuartigen doppelten Virusinaktivierungsprozess wird unser Zellkultursupplement das Erste seiner Art sein, das nicht nur die aktuellen Produktanforderungen übertrifft, sondern auch den höchsten Qualitätsstandard für Anwendungen in der Zellherstellung setzt. Die Einführung eines eigens formulierten gefriergetrockneten Produkts wird eine gesteigerte Kosteneffizienz und Wettbewerbsfähigkeit bieten, um Hersteller von Zelltherapien anzuziehen und langfristig zu binden.
Die zunehmende klinische Entwicklung zellbasierter Therapien und die immer strengeren regulatorischen Anforderungen an Rohstoffe und Reagenzien in der Zellherstellung, schaffen eine Marktlücke für eine neue Generation von Zellkultursupplementen. Unser geplantes biologisches Produkt wird aktuelle Sicherheitsanforderungen übertreffen und eine herausragende Leistung bei der Zellherstellung bieten. EXCELL setzt einen neuen Standard für die Herstellung von Zelltherapien, die für die klinische Anwendung bestimmt sind.
Das Projekt wird Einnahmen aus dem Verkauf von GMP-konformen hPL-Produkten an Hersteller von Zelltherapien generieren, die den normativen und regulatorischen Anforderungen für Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) für die klinische Anwendung bei menschlichen Patienten entsprechen. Die Vermarktungsstrategie konzentriert sich auf den Direktvertrieb und den Aufbau eines globalen Vertriebsnetzwerks.

Im Rahmen des EXCELL Projekts im Zeitraum zwischen dem 01. April 2020 und dem 30. November 2023 wurden bedeutende Fortschritte erzielt. Insbesondere wurde eine neue Silica-basierte, patentierte Methode erfolgreich für die Fibrinogen (Fg)-Depletion aus hPL in kleinen, mittleren und großen (industriellen) Maßstäben (0,05 L bis 50 L Chargen) getestet, wodurch die Zuverlässigkeit der Methode zur Fg-Depletion unabhängig vom Produktionsmaßstab bestätigt wurde. Darüber hinaus wurde eine Chargengröße von 50 L erfolgreich validiert, wodurch die Produktion im großen Maßstab nachgewiesen werden konnte. Die viralen Inaktivierungsstudien, die die Gamma-Bestrahlung von FD-hPL einschließen, ermöglichten die Bestimmung der maximalen Strahlungsdosis, bei der das Produkt seine Bioperformance gerade noch aufrechterhalten kann. Es wurde zudem eine

Studie implementiert, um die Wirksamkeit der viralen Inaktivierung durch Gamma-Bestrahlung nachzuweisen. Alternative Methoden wie Röntgen- und E-Beam-Bestrahlung wurden getestet. Zu beachten ist, dass die Qualitätskontrolle (QC) und Leistungsprüfungen für alle Herstellungschargen implementiert und durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass das FD-hPL, das mit der neuen patentierten Methode hergestellt wurde, alle für dieses Produkt festgelegten Qualitätsparameter erfüllt und ein stabiles physikalisch-chemisches, biochemisches und funktionales Profil bei Lagerung bei 4°C (bis zu 6 Monate), bei -20°C und -80°C (bis zu 12 Monate) beibehält. Trotz der gemeldeten Verzögerungen bei der Durchführung experimenteller Aktivitäten, insbesondere derjenigen, die im Zusammenhang mit den viralen Inaktivierungsstudien von FD-hPL stehen, wurde das Projekt insgesamt erfolgreich umgesetzt, sowohl in Bezug auf die durchgeführten experimentellen Aufgaben als auch auf die finanzielle Ausführung.

Alle Forschungs- und Entwicklungstätigkeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Konsortialpartner Stemmatters (Barco, Portugal) durchgeführt.

2 Darstellung der durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur Vorhabenbeschreibung

2.1 AP1 – Design- und Prozessentwicklung – Herstellung eines Fibrinogen-reduzierten und virusinaktivierten hPL

2.1.1 Fibrinogen-Depletion (Task 1.1)

Anfängliche Versuche zur Fibrinogen (Fg)-Depletion in humanem Plättchenlysat (FD-hPL) durch Zugabe von Glycin zeigten, dass die Methode für hPL ungeeignet ist und trotz optimierter Reaktionsbedingungen keine effiziente Fibrinogen Fällung herbeiführte. Daher wurde in einem Folgeexperiment untersucht, ob eine Kombination aus $CaCl_2$ und Silica (SiO_2) Beads zu einer ausreichenden Fg-Depletion führt. Die Prozessoptimierung durch Verwendung einer Mischung aus 7,5 mM $CaCl_2$ und 0,02 % (w/v) SiO_2 und einer Inkubationstemperatur von 37°C konnte zu einer signifikanten Fg-Reduktion beitragen. QC- und Zellwachstumstests bestätigten eine hohe Produktqualität trotz Fg-Reduktion, weshalb anschließende Scale-Up Aktivitäten zum Test der neuen Silica-basierten Fg-Reduktionsmethode veranlasst wurden (1-15 L). In diesen Chargen wurden Fg-Werte < 5 µg/mL nachgewiesen, was die Zuverlässigkeit der Methode zur Entfernung von Fg aus hPL bei Anwendung in verschiedenen Produktionsmaßstäben bestätigte. Schließlich wurde die neue Silica-basierte FD-hPL-Herstellungsmethode erfolgreich für die Produktion im industriellen Maßstab (50 L) optimiert.

2.1.2 Methoden zur doppelten Virusentfernung/-inaktivierung (Task 1.2)

Um eine effiziente Entfernung von potenziellen Viren in hPL zu erzielen, wurde Nanofiltration, ein weit verbreitetes Verfahren in der Herstellung von Biologika und blutabgeleiteter Produkte, getestet. Der erste Versuch zur Nanofiltration mit 20 nm Porengröße in Zusammenarbeit mit den Anbietern Sartorius und Asahi Kasei war aufgrund von Filterverstopfung und reduzierter Fließgeschwindigkeit nicht erfolgreich, trotz Vorfiltration mit 0,22 µm Filtern. Interne Versuche zeigten, dass der Einsatz von zwei Vorfilterstufen mit 0,22 µm und 0,1 µm Filtern zu besseren Flussraten bei der Nanofiltration führte. Es wurde jedoch vermutet, dass die getesteten Systeme von Sartorius und Asahi Kasei dennoch für den Zweck der Nanofiltration von hPL nicht geeignet sind. Daher wurden

andere Nanofilter von Sartorius bestellt (Virosart HC-Filter), die für Blut- und Plasmaanwendungen validiert sind. Diese Filter versprechen eine ausgezeichnete Virusretention über das gesamte Fließprofil unabhängig vom Arbeitsdruck. Die Anwendung der Filter führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtproteinkonzentration, sowie der Konzentration der Wachstumsfaktoren EGF und PDGF-AB (bis zu 50% Reduktion). Weitere Experimente mit Nanofiltern wurden aufgrund der schlechten Ergebnisse nicht geplant, bzw. durch geführt.

Als Alternative zur Nanofiltration wurde FD-hPL mit geringen Dosen (5, 10 und 15 kGy) an der Technological Unit for Radiosterilization (UTR) innerhalb der technischen Hochschule in Lissabon (Instituto Superior Técnico, IST) Gamma-bestrahlt. Der Test ergab, dass das Produkt unabhängig von der angewandten Dosis alle Qualitätskriterien (QC) erfüllte und das Wachstum von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (hASCs) unterstützte. Anschließende Untersuchungen ergaben, dass die Bestrahlung von FD-hPL mit höheren Dosen (aufgrund technischer Probleme bei der Durchführung wurden anstelle von 25 bzw. 35 kGy, 32,3 sowie 42,8 und 46,5 kGy angewandt) keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtproteinkonzentration (4,5-6,5 g/dL) und den pH-Wert (7-9) hatten. Im Gegensatz dazu wurde die Bioperformance von FD-hPL, insbesondere die Proliferation von hASCs, bei den höheren Strahlendosen signifikant reduziert: im Vergleich zur Kontrollprobe (0 kGy), sank die Proliferation von hASCs auf 47,9% bei 32,3 kGy und auf 22,1% bei 42,8 kGy. Angesichts der genannten technischen Probleme wurde dieser Test wiederholt, um Strahlungsdosen von 15, 25 und 35 kGy zu testen. Der Gesamtproteingehalt und pH-Wert wurden von den verschieden Strahlendosen nicht beeinflusst (Abb. 1 und 2).

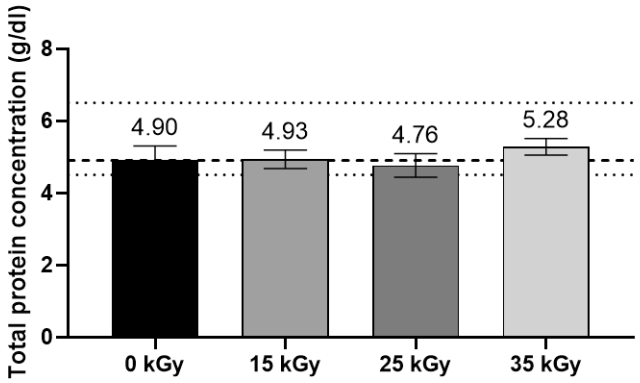

Abb. 1: Gesamtproteingehalt von FD-hPL, das mit 15, 25 und 35 kGy bestrahlt wurde im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (0 kGy).

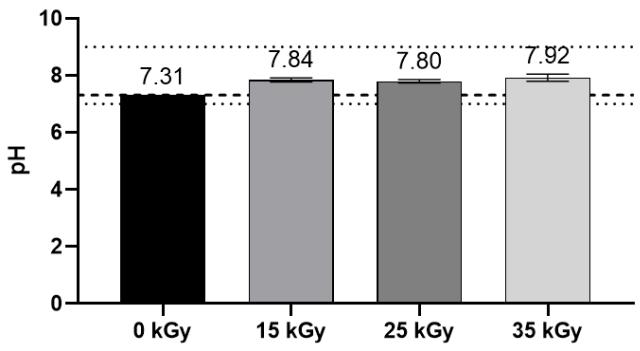

Abb. 2: pH-Wert von FD-hPL, das mit 15, 25 und 35 kGy bestrahlt wurde im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (0 kGy).

Das Wachstum der hASCs dagegen zeigte eine Abhängigkeit von der angewandten Gamma-Strahlendosis: im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 kGy) reduzierte sich das Wachstum der Zellen um ca. 25% bei einer Dosis von 25 kGy (74,9% Bioperformance) und um ca. 50% bei 35 kGy (51,6% Bioperformance) (Abb. 3).

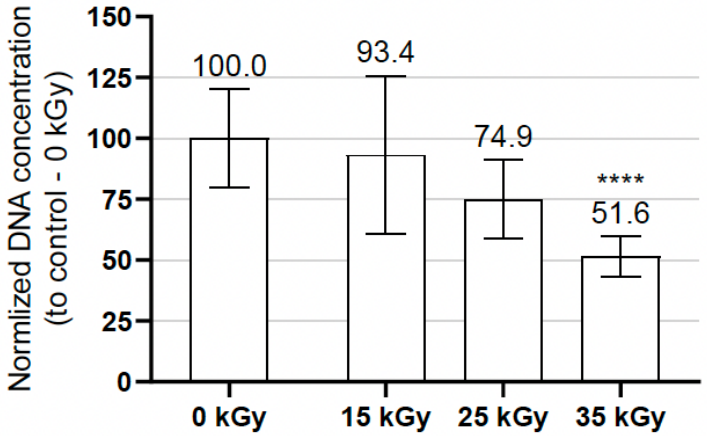

Abb. 3: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die mit FD-hPL, das mit 15, 25 und 35 kGy bestrahlt wurde, für 7 Tage kultiviert wurden. Alle Werte wurden auf die nicht-bestrahlten Kontrolle (0 kGy) normiert. (n = 3; ****p < 0,0001).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte die maximale Gammastrahlendosierung für die Viral Clearance von FD-hPL zwischen 25 und 35 kGy liegen, um ein hohes Maß an Virussicherheit zu gewährleisten und den Verlust der Produktwirksamkeit/Bioperformance zu minimieren. Eine Viral Clearance Studie, um die Wirksamkeit der Gammastrahlung bei dieser Dosis zu bewerten, wurde bereits im Juni 2023 bei dem Dienstleister ViruSure in Auftrag gegeben, um den experimentellen Teil planmäßig innerhalb der Projektlaufzeit abzuschließen.

Alternativ zur Gamma-Bestrahlung wurden auch andere Strahlungsquellen als potenzielle Virusinaktivierungsmethoden getestet: Röntgen- (X-Ray) und Elektronenstrahlung (E-Beam). Wie bereits beim Test mit Gammastrahlung zu beobachten war, wurden Gesamtproteinkonzentration (Abb. 4) und pH-Wert (Abb. 5) von FD-hPL durch Röntgen- oder Elektronenstrahlung nicht signifikant verändert im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollprobe (0 kGy) und beide Parameter lagen innerhalb der festgelegten QC-Bereiche (Gesamtproteinkonzentration: 4,5-6,5 g/dL; pH: 7-9).

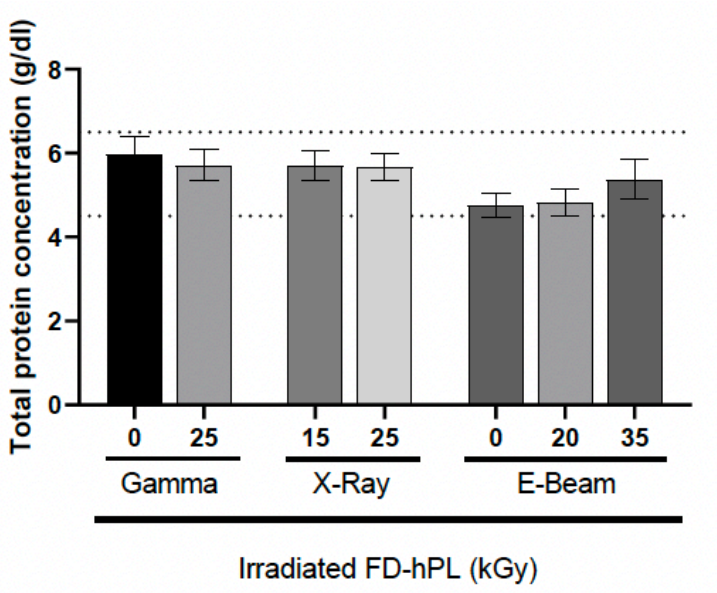

Abb. 4: Gesamtproteinkonzentration (g/dl) von FD-hPL, das mit verschiedenen Strahlenquellen bestrahlt wurde: Gamma (25 kGy), X-Ray (15 kGy; 25 kGy), und E-Beam (20 kGy; 35 kGy). Als Vergleich dient eine nicht-bestrahlte Kontrolle (0 kGy).

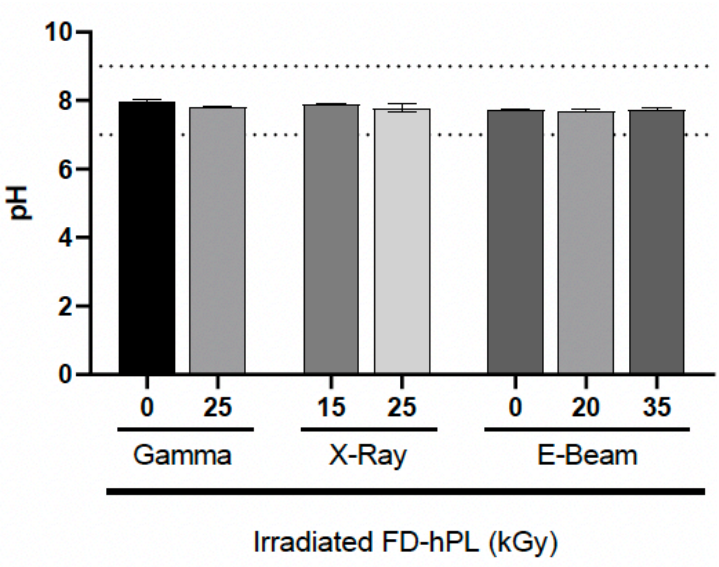

Abb. 5: pH-Wert von FD-hPL, das mit verschiedenen Strahlenquellen bestrahlt wurde: Gamma (25 kGy), X-Ray (15 kGy; 25 kGy), und E-Beam (20 kGy; 35 kGy). Als Vergleich dient eine nicht-bestrahlte Kontrolle (0 kGy).

Das Zellwachstum von hASCs wurde nach Röntgen- und Elektronenstrahlenbestrahlung im Vergleich zu Gammabestrahlung von FD-hPL-Proben analysiert (siehe Abb. 6). Im Gegensatz zur Gammastrahlung, beeinträchtigten die Röntgenstrahlung mit 15 und 25 kGy, sowie die Elektronenstrahlung mit 20 und 35 kGy die Proliferation von hASCs nicht signifikant im Vergleich zur nicht-bestrahlten FD-hPL-Probe.

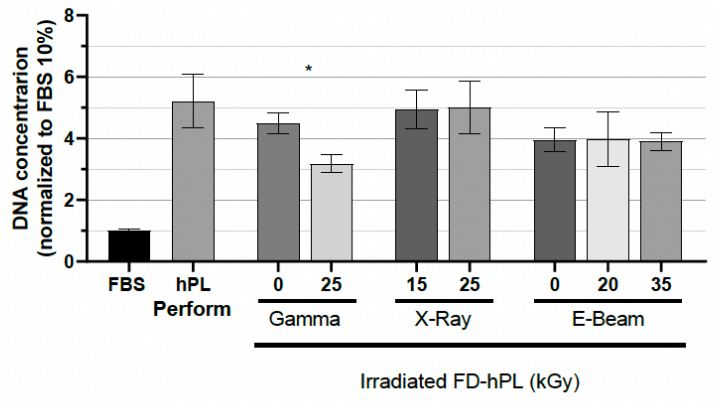

Abb. 6: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die 7 Tage lang mit FD-hPL Proben kultiviert wurden, die mit Gamma- (25 kGy), X-Ray- (15 kGy; 25 kGy) und E-Beam- (20 kGy; 35 kGy) Strahlung behandelt wurden. Die dsDNA Werte wurden auf hASCs normiert, die in 10% FBS wuchsen. Als Referenz wurde eine hASC-Kultur benutzt, die mit 5% ELAREM™ Perform (hPL, das nicht Fibrinogen-reduziert ist) kultiviert wurde. (n = 3; *p < 0,05).

Da die Proben für die Behandlung mit Elektronenstrahlung sich nur in flüssigem Zustand bestrahlen ließen, wurden zusätzlich Tests zur Gamma- und Röntgenbestrahlung von flüssigem FD-hPL im Vergleich zu gefrorenem hPL-Produkt durchgeführt. Damit sollte der Einfluss des Produktzustands während der Bestrahlung ermittelt werden (Abb. 7).

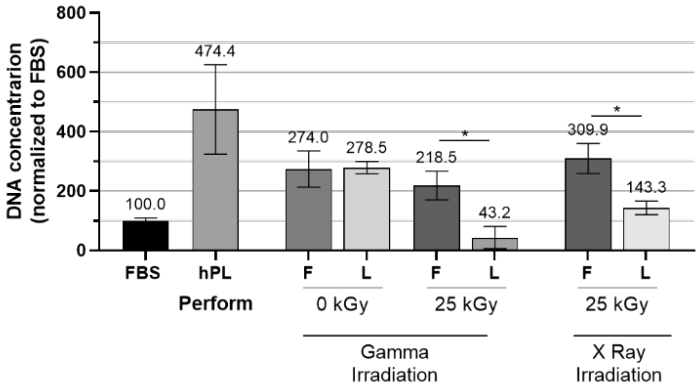

Abb. 7: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die 7 Tage lang mit FD-hPL Proben kultiviert wurden, die mit Gamma- (25 kGy) oder X-Ray- (25 kGy) Strahlung in flüssigem und gefrorenem Zustand behandelt wurden. Die dsDNA Werte wurden auf hASCs normiert, die in 10% FBS wuchsen. Als Referenz wurde eine hASC-Kultur benutzt, die mit 5% ELAREM™ Perform (hPL, das zusätzlich Heparin benötigt) kultiviert wurde. (n = 3; *p < 0,05).

Es wurde eine signifikante Abnahme der dsDNA-Konzentration bei FD-hPL-Proben beobachtet, die im flüssigen Zustand bestrahlt wurden (Gamma oder X-Ray), im Vergleich zu Proben, die im gefrorenen Zustand bestrahlt wurden (Abb. 7). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich auch im Vergleich zu nicht-bestrahlten, flüssigen Proben, was zuvor bei den bestrahlten Proben nicht beobachtet wurde (Abb. 6). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die weitere Entwicklung der Bestrahlung flüssiger FD-hPL-Proben zur Inaktivierung von Viren nicht weiterverfolgt.

2.1.3 Prozessintegrierung von Fibrinogen-Depletion und Virusinaktivierung (Task 1.3) und Performancemessung und Produktcharakterisierung (Task 1.4)

Es wurden Tests im Rahmen des festgelegten QC-Panels für das entwickelte FD-hPL-Produkt (ohne Virusinaktivierung) sowie für Rückstellmuster im Rahmen der Stabilitätsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass das FD-hPL-Produkt alle Qualitätsanforderungen. erfüllt. Darüber hinaus wurden Stabilitätsstudien (über 1, 3 und 6 Monate) für kleine Chargen (< 500 mL) abgeschlossen, wobei die Ergebnisse bestätigen, dass das FD-hPL seine Eigenschaften bei Lagerung bei 4°C, -20°C oder -80°C beibehält. Zusätzlich wurden Qualitätstests für die 35 L- und 50 L-Chargen von FD-hPL durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen, dass das Produkt bei 4°C bis zu 6 Monate haltbar ist und bei -20°C/-80°C bis zu 12 Monate. Eine weitere Charakterisierung umfasste die Quantifizierung von Wachstumsfaktoren (Multiplexing-Assay). Diese Analyse ergab Wachstumsfaktorkonzentrationen, die die im Bereich kommerzieller Referenzprodukte liegen, oder diese sogar übertreffen. Proteom Analysen zeigten, dass die Beta-Kette des Fibrinogen Moleküls im FD-hPL aufgrund der Depletion nicht mehr nachweisbar ist.
Derzeit werden die gleichen Analysen bezüglich Produkt- und Lagerstabilität intern auch für Gamma-bestrahltes FD-hPL mit verschiedenen Bestrahlungsdosen durchgeführt. Außerdem wurden FD-hPL Proben für eine Viral Clearance Studie an den Dienstleister ViruSure geschickt, um sie mit blutassoziierten Modellviren (Bovines Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) und porzines Parvovirus (PPV)) zu spiken und zu testen, mit welcher Dosis eine ausreichende Virusinaktivierung (> 4 log) erzielt werden kann. Aufgrund der Komplexität der Studie und begrenzter Kapazitäten bei ViruSure liegt der finale Bericht dazu erst im Juni 2024 vor. Eine vergleichbare Studie wurde mit KyooBe Tech und dem Fraunhofer IZI zur Inaktivierung von Zika und Poliovirus durch Elektronenbestrahlung (E-Beam) durchgeführt. Die Bestrahlung von FD-hPL mit bis zu 35 kGy führte jedoch zu keiner ausreichenden Virusinaktivierung (< 4 log), weshalb eine Folgestudie mit höheren Bestrahlungsdosen initiiert wurde.

2.2 AP2 – Prozessentwicklung und Produktformulierung – gefriergetrocknetes, GMP-konformes hPL

2.2.1 Entwicklung und Optimierung des Gefriertrocknungsprozesses (Task 2.1)

Die optimierten Parameter umfassen (i) die Gefriertemperatur (°C), (ii) die Gefrierdauer (Tage), (iii) den Behälter und (iv) das Volumen von FD-hPL pro Behälter. Gefriergetrocknete FD-hPL-Proben (48 Stunden lang bei -80°C eingefroren und dann 72 Stunden lang bei -80°C gefriergetrocknet) erschienen pulverförmig und gelblich, ähnlich wie gefriergetrocknetes Rinderserumalbumin (BSA). Die Charakterisierungsergebnisse des gefriergetrockneten FD-hPL umfassten den Gesamtproteingehalt und den pH-Wert, wobei die nach der Rekonstitution mit Wasser erhaltenen Werte ähnlich derer waren, die vor dem Gefriertrocknungsprozess gemessen wurden (d.h. nicht-lyophilisiertes FD-hPL). Insgesamt wurden keine Unterschiede im pH-Wert, im Gesamtproteingehalt und in der Zellproliferation (d.h. der Produktleistung) für die Proben festgestellt, die für 48 Stunden bei -20°C und -80°C eingefroren und für 72 Stunden gefriergetrocknet und danach mit Wasser rekonstituiert wurden.

2.2.2 Entwicklung und Optimierung der Produktformulierung (Task 2.2)

Die bekannten Proteinstabilisatoren Mannitol, Trehalose, und gereinigtes Gellangummi wurden als Stabilisatoren für die Langzeitlagerung von FD-hPL getestet. Gefriergetrocknete FD-hPL-Proben aus der ersten 50 L-Charge mit oder ohne Stabilisatoren, sowie entsprechende Kontrollen (nicht-gefriergetrocknetes FD-hPL), wurden bis zu 6 Monate bei Raumtemperatur (RT) oder 4°C gelagert. FD-hPL-Proben, die nach der Gefriertrocknung in Gegenwart von Mannitol mit 0,5 % w/v (M0,5) oder 1,0 % w/v (M1), oder gereinigtem Gellangummi mit 0,005 % w/v (GGp0,005), für einen Zeitraum von drei Monaten bei 4°C gelagert wurden, zeigten keine signifikante Reduktion der Gesamtproteinkonzentration (außer M0,5) (Abb. 8A). Im Gegensatz dazu, zeigte die Probe ohne Stabilisatoren (No stb) eine Reduktion der Gesamtproteinkonzentration, die unterhalb des festgelegten QC-Bereichs lag (4,5-6,5 g/dL). Bei der Lagerung bei RT führte nur die Bedingung T1 zu einer Stabilisierung der Gesamtproteinkonzentration innerhalb des festgelegten QC-Bereichs (Abb. 8B).

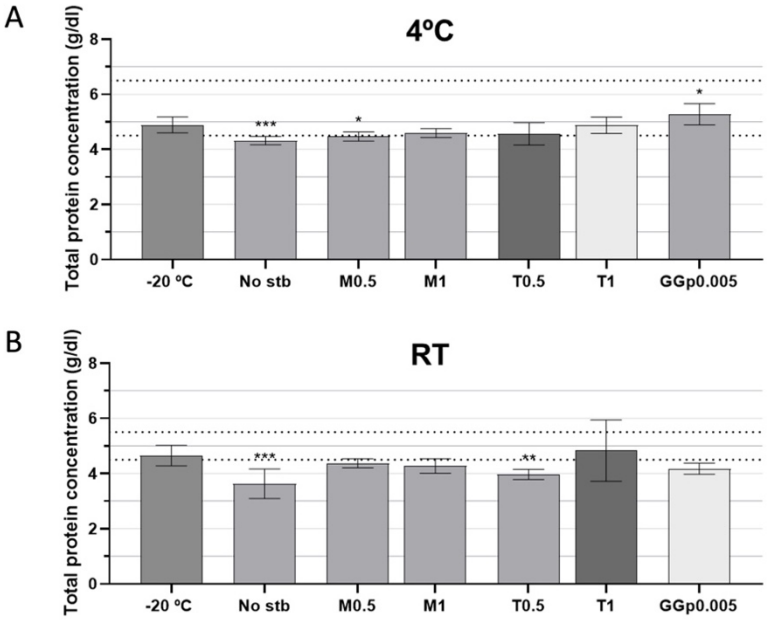

Abb. 8: Gesamtproteinkonzentration (g/dl) von gefriergetrocknetem FD-hPL im Vergleich zu einer nicht-gefriergetrockneten Kontrolle, die zuvor bei -20°C gefroren war. (A) Gefriergetrocknetes FD-hPL, das bei 4°C für drei Monate gelagert wurde (n = 3; *p < 0,05; ***p < 0,001). (B) Gefriergetrocknetes FD-hPL, das bei Raumtemperatur (RT) für drei Monate gelagert wurde (n = 3; **p < 0,01; ***p < 0,001). Die gestrichelten Linien zeigen den Akzeptanzbereich für die Gesamtproteinwerte an: 4,5-6,5 g/dL. No stb = gefriergetrocknetes FD-hPL ohne Zusatz von Stabilisatoren; M0.5 = Mannitol mit 0,5 % w/v; M1 = Mannitol mit 1,0 % w/v; T0.5 = Trehalose mit 0,5 % w/v; T1 = Trehalose mit 1,0 % w/v; GGp0.005 = gereinigtes Gellangummi mit 0,005 % w/v.

Die Lagerung der gefriergetrockneten FD-hPL-Proben über drei Monate bei 4°C oder RT hatte keinen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert im Vergleich zur gefrorenen Kontrollprobe (-20°C), selbst ohne Zusatz von Stabilisatoren (Abb. 9).

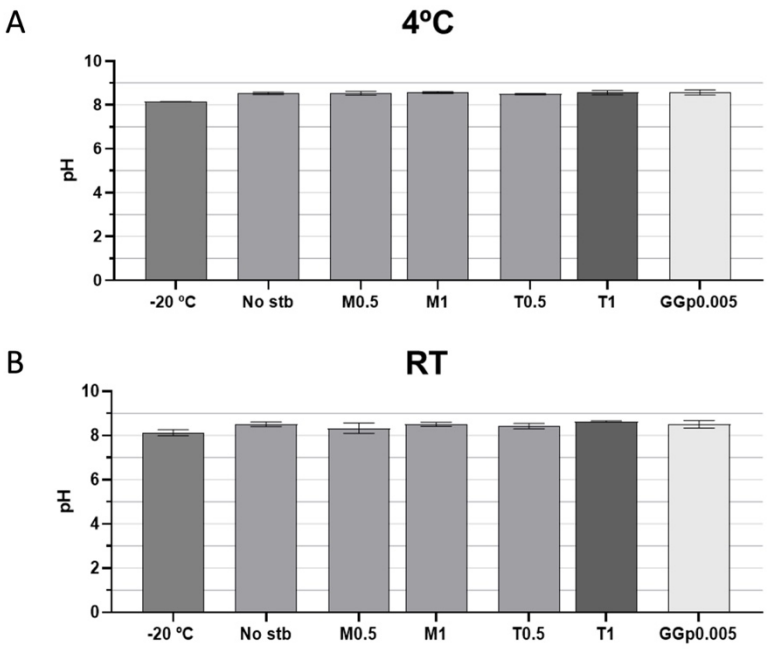

Abb. 9: pH von gefriergetrocknetem FD-hPL im Vergleich zu einer nicht-gefriergetrockneten Kontrolle, die zuvor bei -20°C gefroren war. (A) Gefriergetrocknetes FD-hPL, das bei 4°C für drei Monate gelagert wurde (n = 3). (B) Gefriergetrocknetes FD-hPL, das bei Raumtemperatur (RT) für drei Monate gelagert wurde (n = 3). No stb = gefriergetrocknetes FD-hPL ohne Zusatz von Stabilisatoren; M0.5 = Mannitol mit 0,5 % w/v; M1 = Mannitol mit 1,0 % w/v; T0.5 = Trehalose mit 0,5 % w/v; T1 = Trehalose mit 1,0 % w/v; GGp0.005 = gereinigtes Gellangummi mit 0,005 % w/v.

Nach drei Monaten Lagerung bei 4°C wurde keine signifikante Reduktion der hASC-Proliferation beobachtet mit FD-hPL Proben, die ohne Stabilisatoren gefriergetrocknet wurden, im Vergleich zur gefrorenen Kontrollprobe (-20°C) (Abb. 10). Eine statistisch signifikante Reduktion konnte jedoch bei Lagerung bei Raumtemperatur festgestellt werden, welche durch die Zugabe von 1% w/v Trehalose verhindert werden konnte.

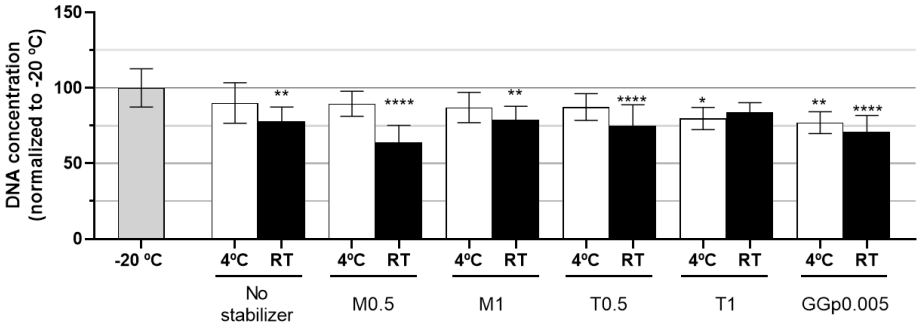

Abb. 10: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die in Medium kultiviert wurden, das mit gefriergetrockneten FD-hPL Proben gemischt wurde, die zuvor entweder bei 4°C, oder bei Raumtemperatur (RT) für drei Monate gelagert wurden. Alle Probenwerte wurden normiert auf Werte von hASCs, die mit einer gefrorenen und nicht-gefriergetrockneten Kontrollprobe (-20°C) kultiviert wurden (n = 3; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,001). No stb = gefriergetrocknetes FD-hPL ohne Zusatz von Stabilisatoren; M0.5 = Mannitol mit 0,5 % w/v; M1 = Mannitol mit 1,0 % w/v; T0.5 = Trehalose mit 0,5 % w/v; T1 = Trehalose mit 1,0 % w/v; GGp0.005 = gereinigtes Gellangummi mit 0,005 % w/v.

Gesamtproteinkonzentrationen und pH-Werte waren stabil und gemäß den Spezifikationen (pH-Wert: 6,5-8,5; Gesamtproteinkonzentration: 4,5-6,5 g/dL) bei allen FD-hPL Proben, die mit oder ohne Proteinstabilisatoren gefriergetrocknet und über einen Zeitraum von sechs Monaten bei 4°C oder RT gelagert wurden (Abb. 11).

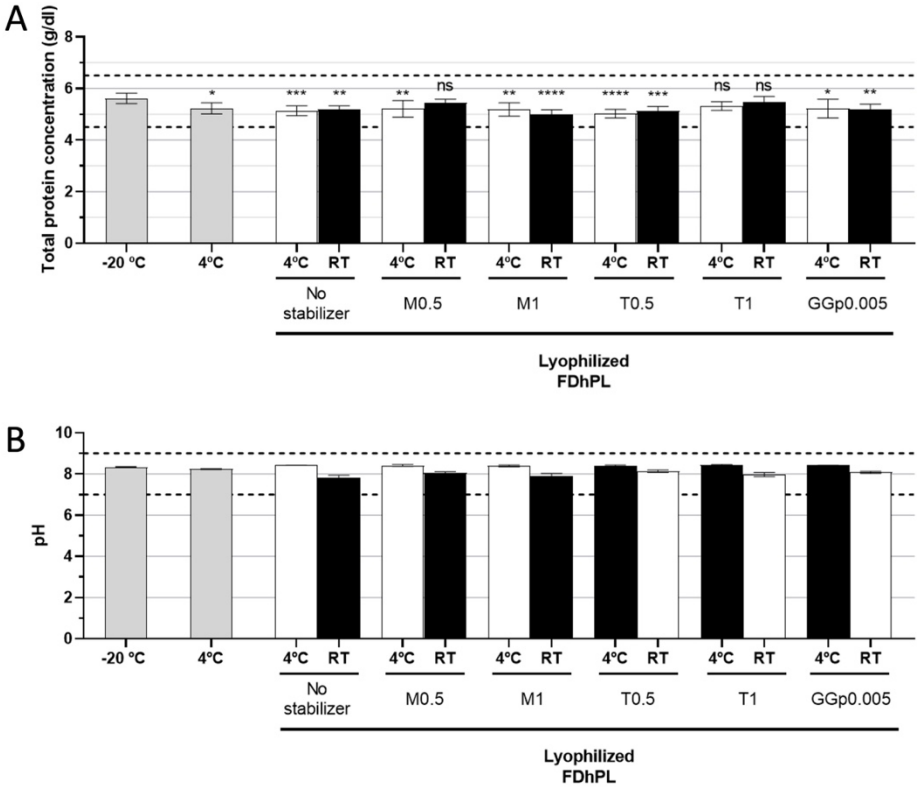

Abb. 11: (A) Gesamtproteinkonzentration (g/dl) und (B) pH von gefriergetrockneten FD-hPL Proben, die mit oder ohne Proteinstabilisatoren für sechs Monate bei 4°C oder Raumtemperatur (RT) gelagert wurden im Vergleich zu einer nicht-gefriergetrockneten Kontrolle, die zuvor bei -20°C gefroren war. Die gestrichelten Linien zeigen die Akzeptanzbereiche für die Gesamtproteinwerte (4,5-6,5 g/dL) und die pH-Werte (6,5-8,5) an. (n = 3; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001). No stb = gefriergetrocknetes FD-hPL ohne Zusatz von Stabilisatoren; M0.5 = Mannitol mit 0,5 % w/v; M1 = Mannitol mit 1,0 % w/v; T0.5 = Trehalose mit 0,5 % w/v; T1 = Trehalose mit 1,0 % w/v; GGp0.005 = gereinigtes Gellangummi mit 0,005 % w/v.

Das Wachstum von hASCs wurde nicht signifikant beeinflusst durch die Kultivierung mit FD-hPL, das mit oder ohne Stabilisatoren gefriergetrocknet und für 6 Monate bei 4°C gelagert wurde, im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollprobe (Abb. 12). Im Gegensatz dazu, zeigten hASCs in FD-hPL, das mit oder ohne Stabilisatoren gefriergetrocknet und bei RT für sechs Monate gelagert wurde, einen signifikanten Rückgang im Zellwachstum.

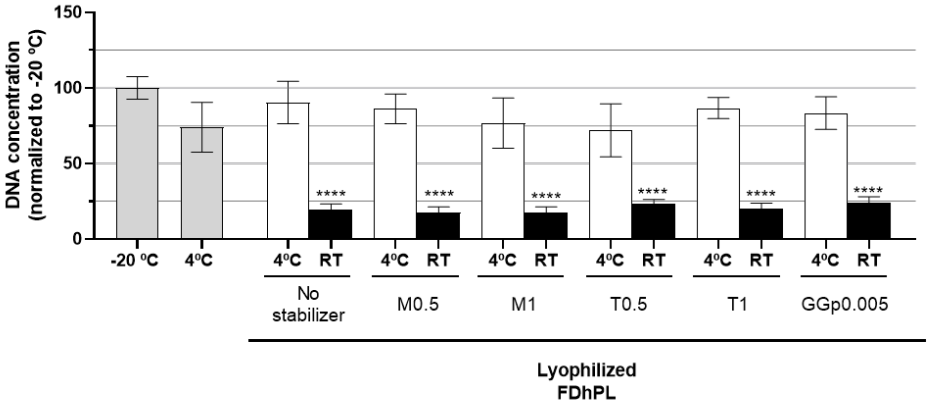

Abb. 12: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die in Medium kultiviert wurden, das mit gefriergetrockneten FD-hPL Proben kultiviert wurden, die zuvor entweder bei 4°C, oder bei Raumtemperatur (RT) für sechs Monate gelagert wurden. Alle Probenwerte wurden normiert auf Werte von hASCs, die mit einer gefrorenen und nicht-gefriergetrockneten Kontrollprobe (-20°C) kultiviert wurden (n = 3; ****p < 0,001). No stb = gefriergetrocknetes FD-hPL ohne Zusatz von Stabilisatoren; M0.5 = Mannitol mit 0,5 % w/v; M1 = Mannitol mit 1,0 % w/v; T0.5 = Trehalose mit 0,5 % w/v; T1 = Trehalose mit 1,0 % w/v; GGp0.005 = gereinigtes Gellangummi mit 0,005 % w/v.

Diese Ergebnisse zeigen, dass gefriergetrocknetes FD-hPL stabil bleibt bei Lagerung bei 4°C über einen Zeitraum von sechs Monaten. Bei diesen Lagerbedingungen ist der Zusatz von Proteinstabilisatoren nicht notwendig. Die Lagerung von gefriergetrocknetem FD-hPL bei RT ist hingegen nicht über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten zu empfehlen, wenn die Produktqualität aufrecht erhalten werden soll.

2.2.3 Produkt-Rekonstitution – Lösemittel und Protokoll (Task 2.3)

Gefriergetrocknetes FD-hPL wurde mit verschiedenen Lösungen rekonstituiert, inkl. Basalmedium (α-MEM), Wasser mit hohem Reinheitsgrad für die Molekularbiologie (MBW), Plasma-Lyte (intravenöse Elektrolytlösung) und Injektionswasser (WFI). Der Gesamtproteingehalt und pH-Wert nach Rekonstitution mit den verschiedenen Lösungen war jeweils gemäß der QC-Spezifikationen, während ein starker Anstieg der Osmolalität nach Rekonstitution mit Plasma-Lyte zu beobachten war (Daten werden hier nicht gezeigt). Durch Rekonstitution mit den verschiedenen Lösungen wurde ein leichter Rückgang des Zellwachstums beobachtet, außer nach Rekonstitution mit MBW (Abb. 13). Die gemessenen DNA Konzentrationen der hASCs nach Kultivierung mit den verschieden, rekostituierten FD-hPL Samples waren nicht signifikant unterschiedlich zu hASCs, die mit einer nicht-gefriergetrockneten Kontrollprobe kultiviert wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bioperformance des rekonstituierten FD-hPLs nicht vom jeweilig verwendeten Lösemittel abhängig ist.

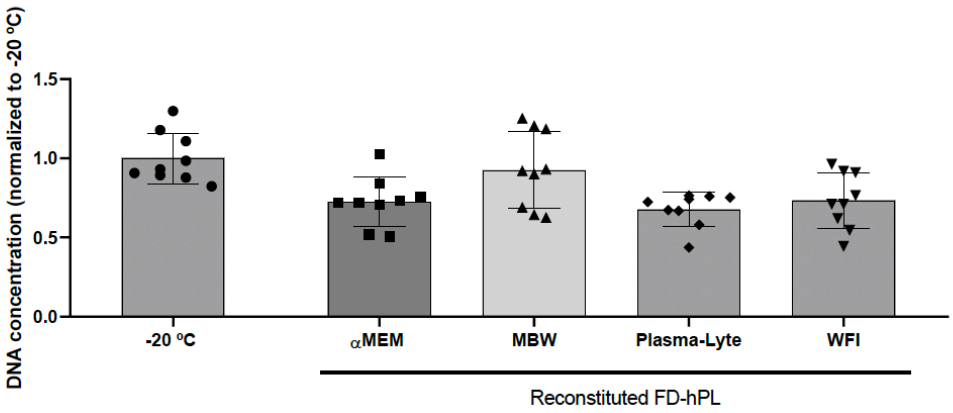

Abb. 13: dsDNA Quantifizierung von hASCs, die mit FD-hPL kultiviert wurden, das nach der Gefriertrocknung entweder mit Basalmedium (α-MEM), Wasser mit hohem Reinheitsgrad für die Molekularbiologie (MBW), Plasma-Lyte, oder Injektionswasser (WFI) rekonstituiert wurde. Die Ergebnisse wurden auf hASCs normiert, die mit einer gefrorene, nicht-gefriertrocknete Kontrollprobe (-20°C) kultiviert wurden.

2.3 AP3 – Prozessvalidierung für die Herstellung von GMP-konformem hPL

2.3.1 Durchführbarkeit des Prozesses (Task 3.1)

Die Herstellung eines 50 L Batch FD-hPL mit der neuen Silica-basierten Methode (s. 2.1.1) wurde erfolgreich implementiert. Die QC-Tests bestätigten, dass das so hergestellte FD-hPL alle kritischen Qualitätsattribute (CQA) erfüllt.

2.3.2 Aseptische Validierung (Task 3.2) und Prozessvalidierung (Task 3.3)

Es wurde bereits ein Protokoll zur Validierung des aseptischen Herstellungsverfahrens erstellt und die Dokumentation für die erforderlichen drei Medienfüllläufe erstellt. Die Validierung der aseptischen Abfüllung ist bereits abgeschlossen. Die Sterilität des Verfahrens wurde durch die aufeinanderfolgende Durchführung mehrerer Herstellungsläufe (5) im Maßstab von 50 Litern nachgewiesen.

Für die Prozessvalidierung wurde bereits eine 50 L-Charge FD-hPL unter GMP-Bedingungen hergestellt, was eine Maßstabsvergrößerung darstellt. Das hPL wurde aus Thrombozyten Konzentraten gesunder Spender hergestellt, die aus europäischen Blutzentren bezogen und negativ getestet wurden für HBsAg, HIV I/II-Antikörper, CMV, HCV, HBC-Antikörper, HIV, HCV, HBV, HAV, PVB19-NAT, Treponema pallidum und Syphilis. Unterschiedliche Volumina (50, 100 und 500 mL) an hPL wurden in PETG- und PET-Flaschen auf verschiedene QC-Parameter getestet (siehe Tab. 1). Für jeden Assay wurden Akzeptanzkriterien basierend auf festgelegten Spezifikationen definiert.

Internal Test	Method	Specification
Sterility	Eur.Ph. 10.0; 5.1.6.	No growth
Mycoplasma	Eur.Ph. 10.0; 2.6.21.	Not detected
Appearance	Eur. Ph. 10.0; 2.2.1.; 2.9.20.	Clear, yellow
pH	Eur.Ph. 10.0; 2.2.3.	7.0 - 9.0
Total protein	Eur.Ph. 10.0; 2.5.33. Bicinchoninic Acid Method (BCA)	> 2.1g/dL
Cell Growth Performance	DNA quantification of hASCs and HFF-1 by PicoGreen assay	Supports *in vitro* proliferation of adherent human cells, namely hASCs and HFF-1
Human Epidermal Growth Factor (hEGF)	Quantitative sandwich ELISA	Comparable, i.e., non-statistically different to final QC results
Human Platelet Derived Growth Factor AB (hPDGF-AB)	Quantitative sandwich ELISA	Comparable, i.e., non-statistically different to final QC results
Fibrinogen	Quantitative competitive ELISA	Comparable, i.e., non-statistically different to final QC results
Multiplex Assay: BDNF, BDNF, EGF, FGF-2, GM-CSF, HGF, IL-1β, IL-8, PDGF-BB, VEGF-A	ProcartaPlex Immunoassays	Comparable, i.e., non-statistically different to final QC results
External services	**Method**	**Specification**
Endotoxin	Eur. Ph. 10.0; 2.6.14.	< 10 EU/mL
Osmolality	Eur.Ph. 10.0; 2.2.35.	250 - 350 mOsm/kg

Tab. 1: Auflistung der Methoden zur Qualitätskontrolle (QC) zur Charakterisierung von FD-hPL.

2.4 AP4 – Validierung analytischer Methoden

2.4.1 Mikrobiologische Testmethoden (Task 4.1)

Die Tests zum Nachweis der Sterilität, von Mykoplasmen und Endotoxinen wurden nach den Richtlinien der European Pharmacopoeia (Eur.Ph.) durchgeführt: Eur.Ph. 10.0; 5.1.6 (Sterilität), Eur.Ph. 10.0; 2.6.21 (Mykoplasmen), and Eur.Ph. 10.0; 2.6.14 (Endotoxine). Für jede Methode wurde ein entsprechender Eignungstest durchgeführt.

2.4.2 Produktcharakterisierung (Task 4.2)

Es wurden abschließende Qualitätskontrollen durchgeführt. Dazu wurden FD-hPL-Proben in verschiedenen Stadien des Herstellungsprozesses (In-Prozess-Kontrolle - IPC) gesammelt: vor und nach der Fibrinogen-Fällung, sowie nach Filtration und Befüllung. Der Validierungsplan führt die durchgeführten Tests auf, um die Eignung der Assays sicherzustellen, einschließlich (i) Spezifität, (ii) Sensitivität, (iii) Robustheit und (iv) Reproduzierbarkeit.

2.4.3 Methoden zur Analyse der Produktperformance (Task 4.3)

Der Validierungsplan für die Cell Performance hatte zum Ziel, folgende Parameter festzulegen: (i) den Zelltyp, der getestet werden soll, (ii) das Zeitfenster für die Kultur/Expansion von Zellen im Medium, das mit FD-hPL angereichert ist, (iii) die zu verwendenden Kontrollen (z.B. FBS) und (iv) die Methode zur Quantifizierung der Zellproliferation (z.B. aktuelle Methode - Picogreen-Assay).
Stabilitätstests wurden an einer 50 L Test-Charge FD-hPL durchgeführt, die bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde: -80°C und -20°C (für 3, 6, 9 und 12 Monate), sowie 4°C (für 3 und 6 Monate). Das Endprodukt bestand die Sterilitäts- und Mykoplasmen Tests, was darauf hinweist, dass es unter aseptischen Bedingungen hergestellt wurde und innerhalb der Spezifikationsgrenzen lag (s. Abb. 14). Der Endotoxin Gehalt lag unter dem definierten maximalen Grenzwert. Die pH- und Osmolalitätswerte lagen innerhalb der angegebenen Spezifikationsgrenzen (Abb. 15 und 16). Die Konzentrationen an Gesamtprotein, EGF und PDGF-AB waren konsistent (Abb. 17 und 18), wobei im Vergleich zum Standard-Serumsupplement (FBS) für hASCs und HFF-1 eine verbesserte Cell Performance festgestellt wurde (Abb. 19). Verunreinigungen im Endprodukt wurden quantifiziert und als gering eingestuft. Insgesamt zeigten die Stabilitätstests, dass die 50 L

Test-Charge FD-hPL bis zu 6 Monate stabil blieb, selbst wenn sie bei 4°C gelagert wurde, und bis zu 12 Monate, wenn sie bei -20°C und -80°C gelagert wurde.

Sample /Test	IPC 1	Final QC	M3 / M6 / M9 / M12								
			Accelerated (4°C)			Long-Term (-20°C)			Long-Term (-80°C)		
	Pool I	Final Product	500 mL	100 mL	50 mL	500 mL	100 mL	50 mL	500 mL	100 mL	50 mL
Sterility (14 days at 32.5°C)	N/A	No growth	No growth								
Appearance	N/A	Clear; Yellow; no visible particles	Clear; Yellow; no visible particles								
Endotoxins (EU/mL)	N/A	<0.5	N/A								
Mycoplasma	Not detected	N/A	N/A								
Cell Growth Performance	N/A	Pass	Pass								
Filter Integrity Testing	N/A	Pass	N/A								

Abb. 14: Ergebnisse der Stabilitätsstudie der 50 L FD-hPL Testcharge. Proben wurden bei 4°C, -20°C und -80°C für 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monate in Flaschen mit verschiedenen Volumina (500, 100 und 50 ml) gelagert. IPC 1 = In-Prozess-Kontrolle 1; Final QC = Finale Qualitätskontrolle; N/A = nicht anwendbar.

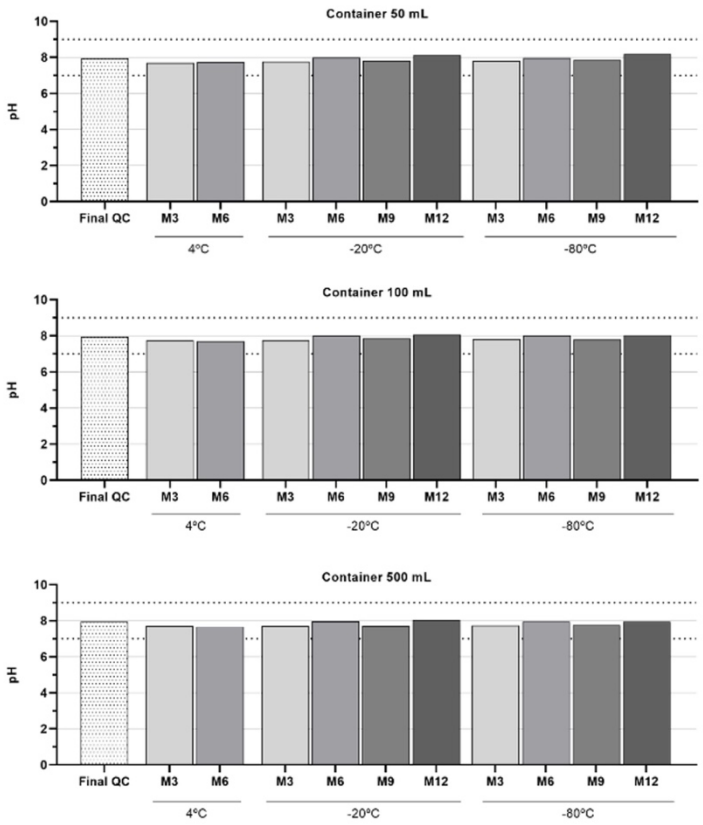

Abb. 15: pH-Ergebnisse, die mit verschiedenen Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monaten zur Messung der Stabilität von FD-hPL bei 4°C, -20°C und -80°C gemessen wurden. QC = Quality Control.

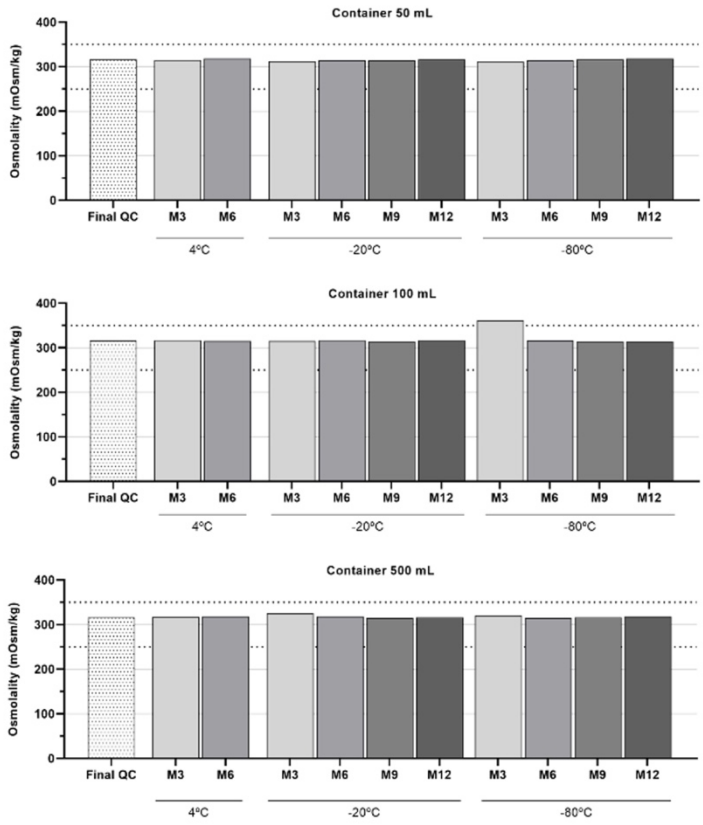

Abb. 17: Osmolality-Ergebnisse, die mit verschiedenen Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monaten zur Messung der Stabilität von FD-hPL bei 4°C, -20°C und -80°C gemessen wurden. QC = Quality Control.

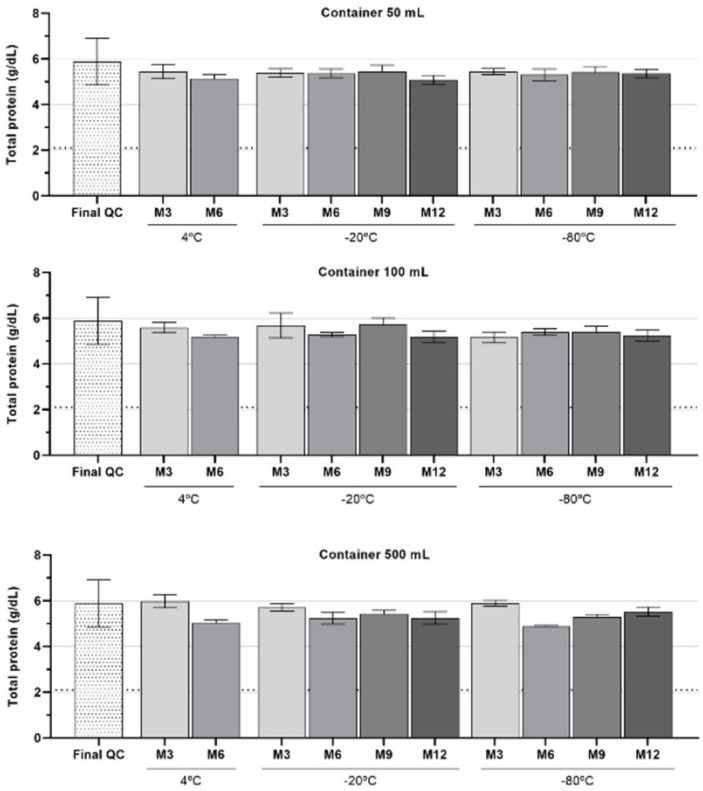

Abb. 16: Gesamtproteinmessungen verschiedener Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monaten zur Messung der Stabilität von FD-hPL bei 4°C, -20°C und -80°C. QC = Quality Control.

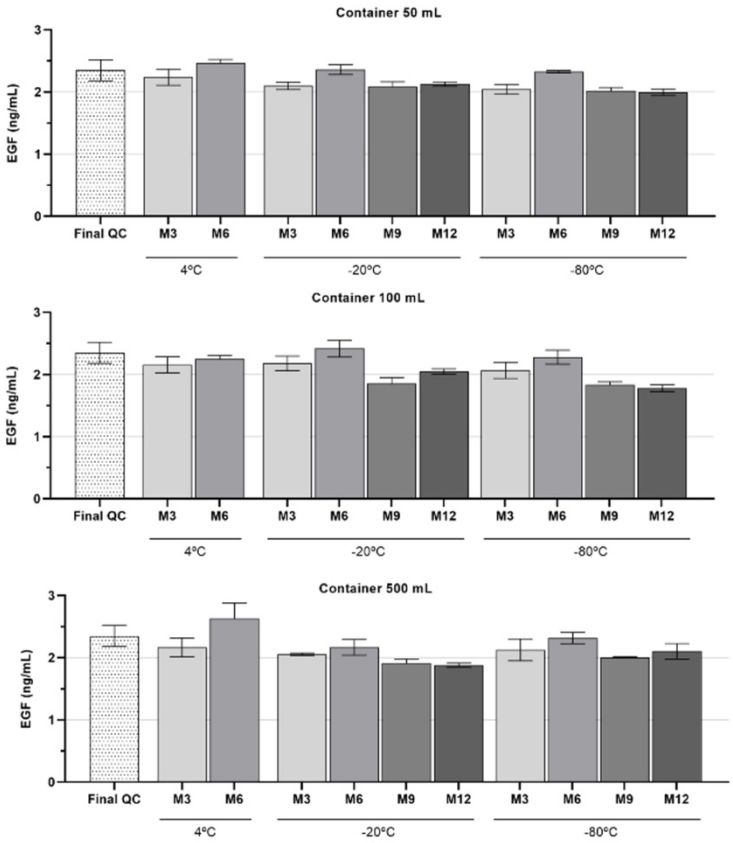

Figure 19: Konzentration an EGF verschiedener Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monaten zur Messung der Stabilität von FD-hPL bei 4°C, -20°C und -80°C. QC = Quality Control.

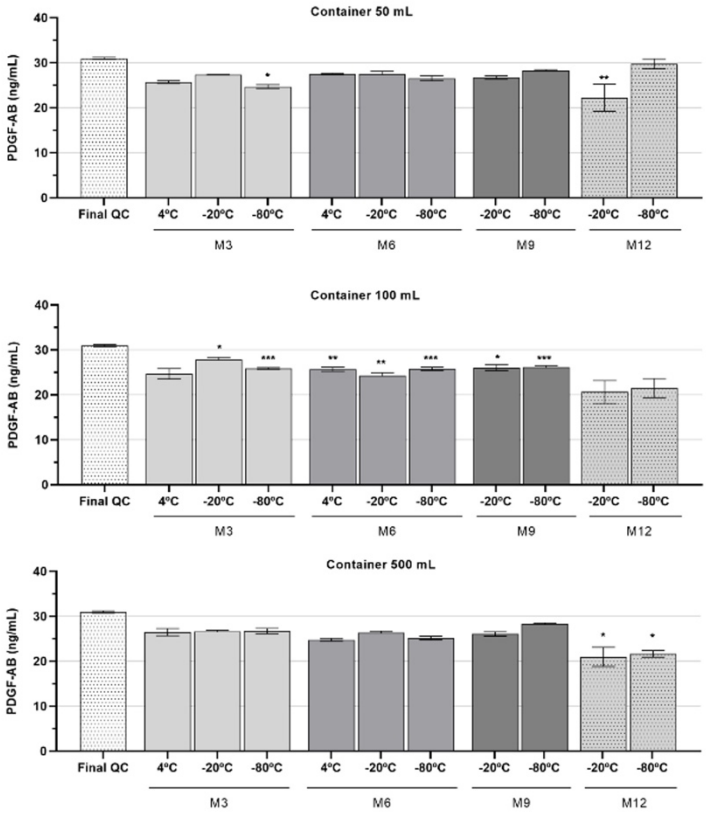

Figure 18: Figure 18: Konzentration an PDGF-AB verschiedener Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 (M12) Monaten zur Messung der Stabilität von FD-hPL bei 4°C, -20°C und -80°C (n = 3; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

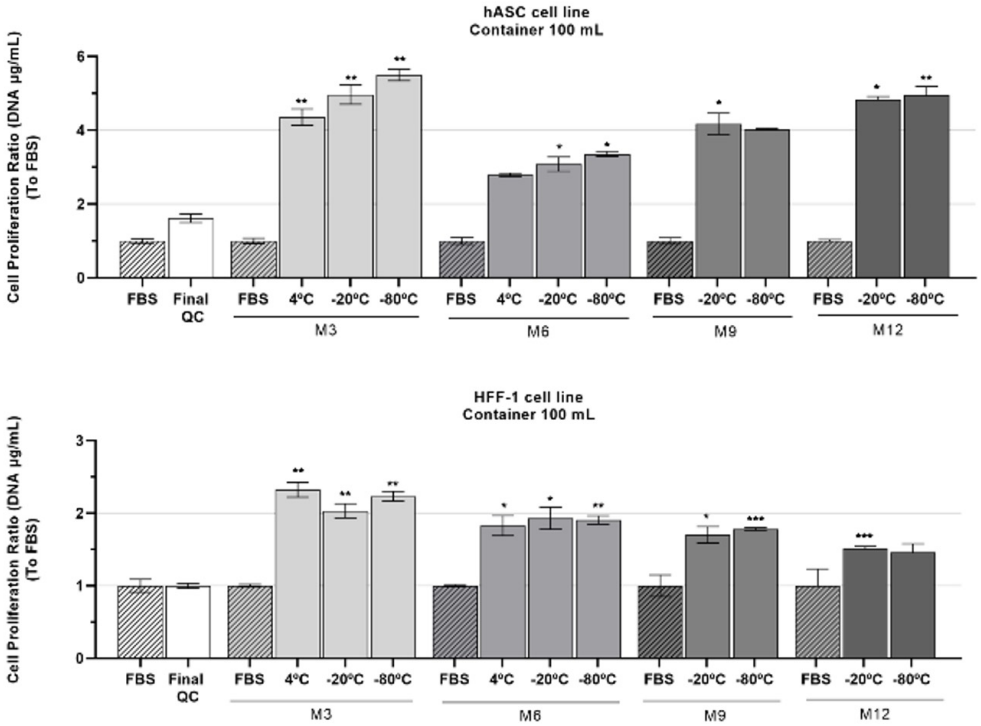

Figure 20: Cell Performance (Picogreen Assay, µg/ml) von hASCs und HFF-1. FD-hPL wurde in verschiedenen Packungsgrößen (50, 100, 500 ml) nach 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9) und 12 Monaten (M12) bei 4°C, -20°C und -80°C auf dessen Stabilität untersucht. Die Cell Performance wurde exemplarisch für die Packungsgröße 100 ml bestimmt und mit der finalen QC-Probe direkt nach Abfüllung verglichen (n = 3; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

2.5 AP5 – Regulatorische Konformität und Qualitätssicherung

2.5.1 Erstellung eines Product Master File (Task 5.1)

Die erste Version des Product Master File (PMF) wurde vorbereitet. Es enthält die bis dato gesammelten Daten und wissenschaftlichen Nachweise. Die Datei fasst den Herstellungsprozess zusammen, der alle Stadien des Prozesses umfasst, die festgelegt wurden, um das Endprodukt, lyophilisiertes FD-hPL, zu erhalten. Das Hauptziel besteht darin, Informationen zum Qualitätsmanagementsystem des Herstellers, zur Ausstattung, zu den Räumlichkeiten, zum Personal und zur prozessbezogenen Dokumentation bereitzustellen. Zusätzlich besteht die Datei auch aus einem Abschnitt, der sich auf die bislang gesammelten Daten zu Herstellungs- und Analysemethoden konzentriert.

2.6 AP6 – Projektkoordination und Management

2.6.1 Internes Berichtswesen

Die interne Berichterstattung wurde gemäß den Verfahren und Anweisungen, die in Abschnitt 6.3 des Förderantrags detailliert beschrieben sind, umgesetzt. Die Fortschrittsberichte wurden zwischen den Konsortialpartnern geteilt.

2.6.2 Fortschritts- und Finanzberichterstattung

Projektbezogene Fortschrittsberichte wurden gemäß den Vorgaben von EUREKA und dem Projektträger Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR) verfasst und pünktlich abgegeben. Die Finanz- und Budgetplanung wurde durch die Geschäftsführung durchgeführt und gesteuert. Die jährlichen Projektausgaben wurden intern erfasst und durch die Geschäftsführung geprüft.

2.6.3 Management geistigen Eigentums

Die neuesten Methoden zur Depletion von Fibrinogen in hPL wurden durch eine umfassende Literaturrecherche gesammelt, um eine innovative und wirtschaftlich tragfähige Alternative zu herkömmlichen Produktionsmethoden zu finden. Da Silica als potenzieller Kandidat identifiziert wurde und vielversprechende Ergebnisse in Vorversuchen erzielt wurden, wurde eine Freedom-to-Operate (FTO)-Analyse durchgeführt, um mögliche IP-Konflikte auszuschließen. Die vorläufige Version des Patentantrags wurde zusammen mit einer Patentanwaltskanzlei geteilt. Ein vorläufiger Patentantrag mit dem Titel "Stable human platelet lysate composition, methods and uses thereof" (P1241.8) wurde im Mai 2022 erfolgreich in Portugal (PT2022117969) eingereicht, gefolgt von einer europäischen Einreichung im August 2022 (EP4276173A1). Der Prozess für einen Patentantrag in Taiwan, der zwei Prioritäten (PT und EP) beansprucht, wurde Ende März 2023 ebenfalls gestartet.

2.7 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Position	Nettobetrag	Projektzeitraum	Verwendungszweck
1	17.500,00€	01.10.23-30.11.23	E-Beam Studie – AN: KyooBe Tech
2	22.270,00€	01.06.23-30.11.23	Gamma Studie – AN: ViruSure
3	4.110,00€	01.02.23-28.02.23	X-Ray Test – AN: Steris
4	55.097,72€	01.01.23-31.12.23	Personalkosten
5	57.929,68€	01.01.22-31.12.22	Personalkosten
6	35.637,22€	01.01.21-31.12.21	Personalkosten
7	37.658,22€	01.01.20-31.12.20	Personalkosten

Tab. 2: Auflistung der wichtigsten und größten Posten des zahlenmäßigen Nachweises. AN = Auftragnehmer.

Die für den Projektzeitraum bewilligten Mittel für Personal und Materialien (nicht aufgelistet) wurden vollständig ausgeschöpft. Aufgrund von Verzögerungen im Projektablauf konnten die Mittel für FE-Fremdleistungen nicht vollständig verwendet werden.

2.8 Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Jeder biotherapeutische Wirkstoff, einschließlich Zelltherapieprodukte, muss einen hohen Reinheits- und Sicherheitsstandard aufweisen. Biotechnologieprodukte, die Zellkulturen zur Herstellung von Biologika und ATMPs wie rekombinante Proteine, Impfstoffe, Plasmaprodukte oder zell- und genbasierte Therapeutika verwenden, sind äußerst anfällig für Kontaminationen mit endogenen Viren. Daher ist die Virussicherheit äußerst wichtig. Gemäß ICH Q5A(R2) kann Virussicherheit durch Einhaltung folgender Schritte erreicht werden:

1. Auswahl und Prüfung von Rohmaterialien auf unerwünschte Viren
2. Bewertung der Fähigkeit der Produktionsprozesse, infektiöse Viren zu beseitigen
3. Test des Produkts auf Virenlast in geeigneten Produktionsstufen

PL BioScience hat sich das Ziel gesetzt, Zellkultursupplemente von höchster Qualität und Sicherheit herzustellen, um den regulatorischen Anforderungen für die Entwicklung biotherapeutischer Produkte gerecht zu werden.

EXCELL zielt darauf ab, ein 'ready-to-use', steriles, Fibrinogen-reduziertes Produkt mit höchster Virussicherheit gemäß ICH Q5A(R2) herzustellen,

1. das mit virusgetesteten humanen Plättchen Konzentraten hergestellt wird
2. dessen Herstellung mindestens einen effektiven Virusinaktivierungsschritt beinhaltet
3. und dessen Virussicherheit durch eine validierte Virusstudie nachgewiesen wird.

Die in Teil II beschriebenen Projektarbeiten in der Zeit vom 01.09.2020 bis zum 30.11.2023 führten zu signifikanten Fortschritten auf diesen Gebieten. Durch die erfolgreiche Entfernung von Fibrinogen aus hPL (FD-hPL), sowohl im kleinen Labormaßstab als auch im großen industriellen Maßstab, konnte die Zuverlässigkeit der Methode gezeigt werden. Aufgrund des schonenden Prozesses blieben alle essenziellen Wachstumsfaktoren und Proteine im Produkt erhalten. Darüber hinaus wurde die Chargengröße von 50 L erfolgreich validiert, und somit der industrielle Maßstab des Prozesses unter Einhaltung aseptischer Kontrollparameter erreicht. Der neue Herstellungsprozess zur Fibrinogen-Depletion führt maßgeblich zu einer Qualitätssteigerung des Produkts, da es direkt und ohne Zusatz von Antikoagulanzien, die das Zellwachstum hemmen, benutzt werden kann.

In Bezug auf die Qualitätskontrolle (QC) wurden Tests zur Cell Performance Messung und Bestimmung der Fibrinogen-Konzentration erfolgreich validiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das FD-hPL, das mit der neuen patentierten Methode hergestellt wurde, alle für dieses Produkt festgelegten Qualitätsparameter erfüllt und sein Qualitätsprofil auch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen (4°C bis zu 6 Monate, oder -20°C/-80°C bis zu 12 Monate) beibehält.

In Bezug auf die Produktsicherheit, konnten wir die maximale Gamma-Bestrahlungsdosis bestimmen, bei der das Produkt seine Bioperformance beibehält (25-35 kGy). Ein ähnlicher Dosisbereich wird auch von Wettbewerbern eingesetzt, um eine potenzielle Viren erfolgreich in deren Produkten zu inaktivieren. Alternative Methoden wie Röntgenstrahlung (X-Ray) und Elektronenstrahlung (E-Beam) wurden parallel getestet, um letztendlich die effektivste und praktikabelste Methode zur Virusinaktivierung für den Herstellungsprozess auszuwählen. Um im nächsten Schritt die Effektivität der jeweiligen Methoden zu testen, wurden entsprechende Virusvalidierungsstudien durch externe Dienstleister, unter Einhaltung der Richtlinien für Virussicherheit von Biotechnologieprodukten (ICH Q5A(R2)), initiiert und durchgeführt. Diese Projektarbeiten stellen die Sicherheit des finalen Produkts sicher und ermöglichen dessen Einsatz in klinischen Studien und für die Herstellung von Biotechnologieprodukten, die später am Menschen angewendet werden.

2.9 Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planung für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der Nutzen, des in EXCELL entwickelten FD-hPL Produkts, liegt in seiner Fähigkeit, ein hochwertiges und sicheres Zellkultursupplement bereitzustellen, das den regulatorischen Anforderungen für die Entwicklung biotherapeutischer Produkte entspricht. Durch die Entfernung von Fibrinogen aus dem hPL wird eine verbesserte Qualität erreicht, da das Produkt ohne Zusatz von Antikoagulanzien direkt für das Zellwachstum verwendet werden kann. Dies ermöglicht eine effizientere und zuverlässigere Zellkultivierung, was wiederum die Herstellung von Biologika und Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) erleichtert und beschleunigt. Die Validierung der Produktqualität und -sicherheit unter verschiedenen Lagerungsbedingungen gewährleistet die Stabilität und Wirksamkeit des Produkts über einen längeren Zeitraum hinweg.

Die Ergebnisse der Projektarbeiten sind äußerst verwertbar, da sie nicht nur die Machbarkeit und Effektivität des Herstellungsprozesses eines neuartigen FD-hPLs demonstrieren, sondern auch die Einhaltung wichtiger Qualitäts- und Sicherheitsstandards belegen. Die erfolgreiche Validierung der Qualitätskontrolltests, sowie der Virusinaktivierungsmethoden, stellt sicher, dass das Produkt den Anforderungen der biopharmazeutischen Industrie gerecht wird und potenziell für den Einsatz in klinischen Studien und therapeutischen Anwendungen am Menschen geeignet ist.

Für die nähere Zukunft könnte eine weitere Skalierung der Produktionskapazitäten in Betracht gezogen werden, um die steigende Nachfrage nach hochwertigen Zellkultursupplementen zu decken. Wie im Verwertungsplan beschrieben, bietet das im Rahmen von EXCELL entwickelte hPL-Produkt neuartige Features: Fibrinogen-Depletion, Virusinaktivierung durch Bestrahlung, GMP-konformer Herstellungsprozess. Diese einzigartige Kombination aus Produktsicherheit und Qualität ist ein Alleinstellungsmerkmal für dieses Produkt und könnte die weltweite Erschließung neuer Märkte und die Stärkung der Wettbewerbsposition von PL BioScience ermöglichen. Darüber hinaus könnten weitere Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten durchgeführt werden, um die Produktleistung weiter zu optimieren und mögliche Verbesserungen oder Innovationen zu identifizieren, die die Produktqualität, Sicherheit und Effizienz weiter steigern könnten.

2.10 Der während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Über die im Abschlussbericht des E!113731 EXCELL Projekts genannten Entwicklungen hinaus wurden in folgendem Vorhaben projektrelevante Fortschritte erzielt:

Qualitätssicherung für die Herstellung von hPL – ISO 9001 und ISO 20399

Ende 2023 wurde das Qualitätsmanagementsystem von PL BioScience nach dem Standard ISO 9001:2015 zertifiziert. Für die Herstellung von HPL bedeutet dies, dass strenge Qualitätsstandards in jedem Schritt des Herstellungsprozesses eingehalten werden. Das Qualitätsmanagementsystem nach ISO 9001 ermöglicht es, Prozesse kontinuierlich zu überwachen, zu bewerten und zu verbessern. Durch regelmäßige interne Audits und Schulungen wird sichergestellt, dass das Team stets auf dem neuesten Stand ist und die Qualitätsversprechen gegenüber den Kunden eingehalten werden.
Außerdem wurde die Produktentwicklung im Rahmen des EXCELL Projekts anhand der ISO 20399 orientiert. Dieses Dokument legt Anforderungen fest und gibt Lieferanten und Anwendern von Hilfsstoffen (AMs) Leitlinien zur Verbesserung der Konsistenz und Qualität von AMs biologischen (menschlichen und tierischen) und chemischen Ursprungs, die bei der Herstellung von Zelltherapeutika und Gentherapieprodukten für den menschlichen Gebrauch verwendet werden. Das Dokument gilt für Materialien, die zur Zellverarbeitung verwendet werden, mit dem Wirkstoff in Kontakt kommen und nicht absichtlich Teil des endgültigen Zell- und Gentherapieprodukts sind. hPL wird als solcher Hilfsstoff definiert. Bisher gab es jedoch keinen passenden Standard für die Qualitätssicherung während der Herstellung von hPL. ISO 20399 gibt klare Empfehlungen bezüglich Produkttestung und Produktverifikation, sowie Prozessvalidierung. Außerdem werden klare Anweisung zur Virusinaktivierung gemacht: das Produkt muss gemäß ICH Q5A(R1) auf Virenkontaminationen getestet und die Effektivität von Virusinaktivierungsschritten durch Validierungsstudien nachgewiesen werden. ISO 20399 stellt einen klaren Bezugspunkt dar für die weitere Entwicklung des FD-hPL Produkts.

Übernahme eines Patents zur Virusinaktivierung von hPL durch Gamma-Bestrahlung

PL BioScience hat bereits ein Patent für ein optimiertes, Fibrinogen-reduziertes hPL angemeldet, da seine Zusammensetzung Heparin-frei ist (Patentantrag wird derzeit überprüft). Die Technologie von PL BioScience zur Entfernung von Fibrinogen unterscheidet

sich grundlegend von der Technologie anderer Wettbewerber. Darüber hinaus besaß Macopharma ein Patent, das eine Methode zur Virusinaktivierung durch Gammabestrahlung von gefrorenem hPL beschreibt (US10946046B2). Macopharma hat der Übertragung des Patents an PL BioScience zugestimmt und 2022 vertraglich festgesetzt. Beide beschriebenen Patente werden den einzigartigen Wert des Endprodukts steigern. Das Produkt wird dadurch die Wettbewerbsfähigkeit von PL BioScience verbessern.

2.11 Erfolgte/geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach NR. 5 der NKBF

Die in diesem Sachbericht zugrundeliegenden Ergebnisse wurden auf folgenden Kongressen in Form von wissenschaftlichen Vorträgen präsentiert:

- Goetzke R, Kolkmann A, Hemeda H. (2023). Evolving towards safer ancillary materials: viral clearance of human platelet lysate. 2023 Parental Drug Association (PDA) Viral Safety for ATMPs Workshop, Madrid, Spain

- F. Uber, Goetzke R, Isenhardt S, Gouw N, Hemeda H. (2023). Moving towards animal-free cell culture media: Human Platelet Lysate, an innovative solution for FBS. 2023 Workshop of The Austrian Society for Molecular Biosciences and Biotechnology (ÖGMBT), Wien, Austria

- Goetzke R, Kampsmann J, Uber F, Kolkmann A, Schmidt P, Hemeda H. (2021). Moving towards animal-free cell culture media: Human Platelet Lysate as surrogate solution for FBS. 9th Annual Meeting of the German Stem Cell Network (GSCN), Dresden, Germany

- Goetzke R, Kampsmann J, Kolkmann A, Hemeda H. (2021). Moving towards animal-free cell culture media: Human Platelet Lysate as a promising solution to FBS-related concerns. Laboratory Animal Science Day at the RWTH Aachen University Medical School, Aachen, Germany