

Segon – pferdefreundliches PMSG

Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Martina Lösle
und Prof. Dr. PhD
Thorsten Buch

Folgeprojekt von PR 2017-03
In vitro-Herstellung des Hormons PMSG



Das Hormon PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*), auch bekannt als eCG (*equine chorionic gonadotropin*), wird in der Anfangsphase der Trächtigkeit eines Pferdes produziert und unterstützt die Einnistung des Embryos. Dabei wandern Zellen vom Embryo in die mütterliche Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) ein. Dies führt zur Bildung von kraterartigen Vertiefungen, die als *Endometrial Cups* bezeichnet werden. Die Trophoblasten in den *Endometrial Cups* differenzieren sich zu nicht-invasiven, endokrinologisch aktiven Zellen und beginnen mit der PMSG-Produktion. Dies wird unter anderem zur Bestätigung der Trächtigkeit verwendet. Im Vergleich mit anderen Säugetieren besitzt das PMSG des Pferdes eine einzigartige, stark verzuckerte Struktur, die zu einer verlängerten Halbwertszeit im Blutplasma führt. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist seine hohe Wirksamkeit bei anderen Tierarten als Pferden, was es zu einem wichtigen Produkt in der Reproduktionsmedizin macht, beispielsweise bei der Verwendung in der Schweinezucht zur Östrussynchronisation und Follikelreifung. Alle Versuche, aktives PMSG *in-vitro* kommerziell zu produzieren, sind bisher erfolglos geblieben.

Ziel der Studie

Mit dieser Studie wollen wir die künstliche Herstellung des Moleküls PMSG ermöglichen. Wir haben in einem ersten Schritt (Projekt PR 2017-03) zunächst primäre PMSG-produzierende Zellen isoliert und immortalisiert, aber auch andere Zellen vergleichsweise genutzt. Diese sich endlos teilende Zellen wurden sodann in der Folgestudie (PR 2018-05) für den Einsatz als PMSG-Produzenten optimiert und die Bioaktivität wurde nachgewiesen. Mit der Fortführung des Projektes PR 2018-05 möchten wir eine grössere Produktionsmenge an PMSG erreichen und dessen Bioaktivität sowie Effizienz testen. Ziel ist es, dass die PMSG-Isolierung aus dem Pferd nicht mehr nötig sein wird.

Relevanz

Derzeit ist die einzige Quelle für kommerziell erhältliches PMSG die Isolierung aus dem Plasma trächtiger Stuten. Der Schweizer Tierschutzverein und die Deutsche Animal Welfare Foundation haben den Missbrauch von trächtigen Stuten aufgedeckt, die unter teilweise katastrophalen und unkontrollierten Bedingungen auf «Blutfarmen» weltweit gehalten werden, zum alleinigen Zweck der PMSG-Produktion (Abbildung 3). Berichten zufolge wurden mehr als 10 Liter Blut entnommen, was die nach den europäischen Tierschutzvorschriften gesetzlich zulässige Menge deutlich überschreitet. Darüber hinaus wurden Trächtigtkeitsabbrüche ausschliesslich für die PMSG-Produktion beobachtet. Um diesen Missbrauch einzudämmen, ist es unser vorrangiges Anliegen, PMSG *in-vitro* zu produzieren.

Versuchsaufbau und neue Resultate

In Kulturbedingungen wuchsen die PMSG-produzierenden (nicht-Pferde) Zelllinien um ein Vielfaches besser und konnten so in einer Menge hochgezogen werden, die es erlaubte ausreichend Zellkulturüberstand zu ernten. Dieser Prozess wurde weiter optimiert und Strategien zur Aufgleisung professioneller Produktion entwickelt und getestet. Wir haben uns dabei auf eine Zelllinie beschränkt um zunächst die Prozesslinie zu evaluieren. Zur Bewertung der unterschiedlichen Ansätze wurde die Wirksamkeit unseres PMSG über die Bioaktivität auch auf physiologischer Ebene nachgewiesen.

Der evaluierte Prozess besteht aus drei Teilen: Herstellung des Zellüberstandes, dessen Reinigung und die Konzentration der Substanz (Abbildung 1). Die Herstellung erfolgte in einem TubeSpin-Reaktor in unserem Labor und wurde erfolgreich auf eine industrielle Umgebung übertragen, wobei ein grösserer Biostirr-Reaktor ver-

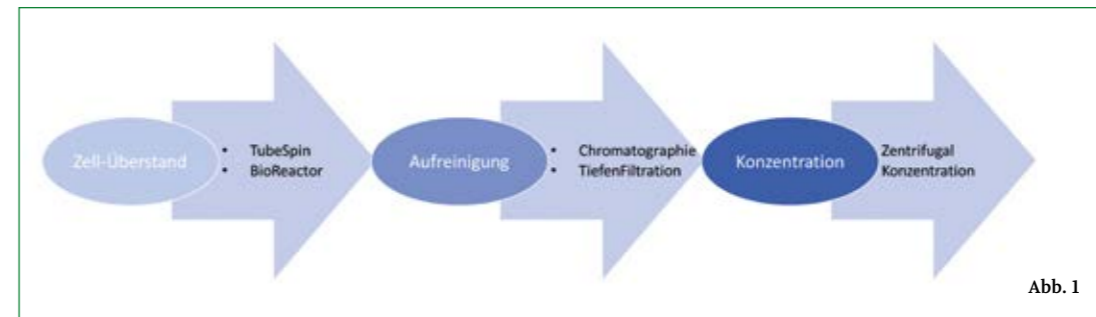


Abb. 1

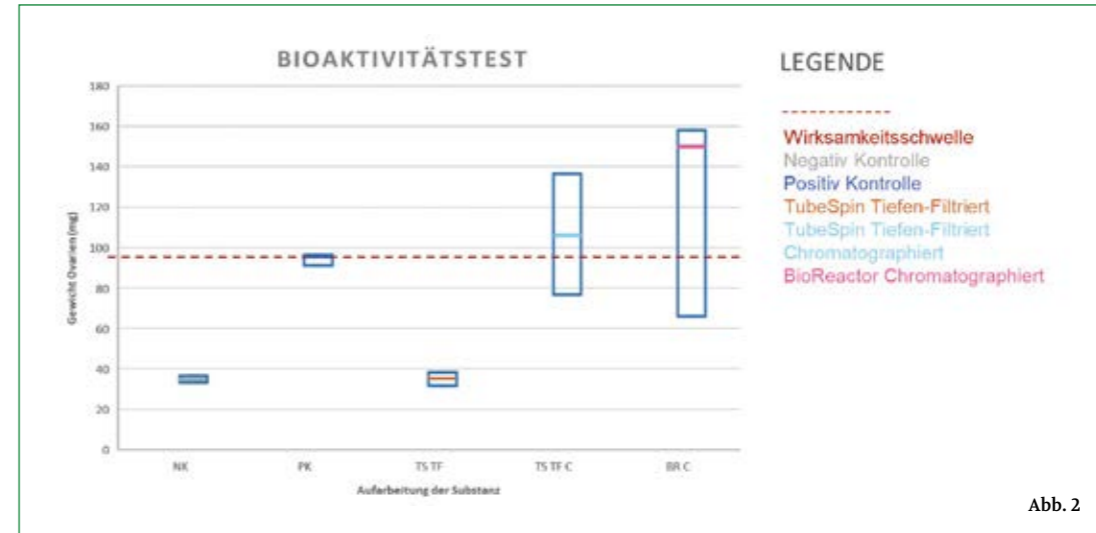


Abb. 2

wendet wurde. Der Überstand wurde zunächst mit molekularbiologischen Tests auf die PMSG-Konzentration untersucht, dann durch Tiefenfiltration und/oder chromatographische Methoden gereinigt und anschliessend konzentriert. Das gewonnene konzentrierte PMSG wurde in einem Bioaktivitätstest vergleichend auf seine Wirksamkeit geprüft (Abbildung 2).

Anhand der Ergebnisse konnten wir nachweisen, dass sich unsere Produktion im Labormassstab erfolgreich auf eine industrielle Umgebung übertragen lässt, ohne dass die Wirksamkeit beeinträchtigt wird. Derzeit scheint eine chromatographische Aufreinigung unverzichtbar. Dies sind entscheidende Erkenntnisse für die Planung der nächsten Schritte.

Ausblick

Wir haben nun unsere Aufmerksamkeit auf eine bestimmte Zelllinie gerichtet, die aussergewöhnliche Ergebnisse gezeigt hat, und sind bereit, mit der externen Produktion unter GMP-Standards (Good Manufacturing Practice) zu beginnen. Was die anderen Zelllinien betrifft, die bisher positive Ergebnisse im Bioaktivitätstest gezeigt haben, ist es unser Ziel, sie weiter zu verfeinern und zu bewerten, um ihr Potenzial zu maximieren. Dabei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der Aufreinigung und Konzentration



Abb. 3

im Labor. Weitere Tests werden durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit und Wirksamkeit der biologischen Wirkungen zu bestätigen und um eine optimale Kombination der Produktion, Aufreinigung und Konzentrierung zu ermitteln.

Abbildung 1: Schema der Stufen des Herstellungsprozesses. Der Zellüberstand wird im Labor in Tube Spin Reaktoren hergestellt, in industriellem Stetting im Biostirr-Reaktor. Alle Überstände werden mittels Tiefen-Filtration oder Chromatographisch aufgereinigt. Versuchsweise auch in Kombination. Danach erfolgt die Aufkonzentration des Produktes und der Pufferaustausch in ein Lösungsmittel, das im Bioaktivitätstest verwendet werden kann.

Abbildung 2: Testen der Wirksamkeit nach Prozess Optimierung: Negativ Kontrolle: Lösungsmittel ohne aktive Substanz, Positivkontrolle: kommerzielles PMSG. Produkt aus TubeSpin Reaktor mit anschließender Tiefen-Filtration zeigt keine Wirksamkeit. PMSG-Produktion aus TubeSpin Reaktor mit Tiefen-Filtration und anschließender chromatographischer Aufreinigung und Biostirr-Reaktor Produktion mit chromatographischer Aufreinigung zeigen eine Wirksamkeit in diesem Test. Alle Produktionen wurden nach der Aufreinigung auch aufkonzentriert. Für jede Messung gilt n = 3.

Abbildung 3: Nach Südamerika werden von der Animal Welfare Foundation auch auf Island «Blutfarmen» entdeckt, wo Stuten unter Stress Blut entnommen wird.