



Studie zur Anwendung von „disposable-bag“ (Einweg)-Bioreaktoren zur Produktion therapeutischer oder diagnostischer Agentien mit Zellkulturen

Kurzfassung

erstellt durch:

s & h Ingenieurgesellschaft mbH

Bremen, 19.11.2008

Inhalt

	Seite
1 Einleitung und Problemstellung	2
2 Generelle Übersicht und Einteilung zu Einweg-„bag“-Bioreaktoren	3
2.1 Statische „bag“-Bioreaktoren	4
2.2 Gerührte „bag“-Bioreaktoren	4
2.3 „Bag“-Bioreaktoren mit Vibromixer	4
2.4 „Wave-mixed“-Bioreaktoren	5
2.5 „Hybrid-bag“-Bioreaktoren	5
2.6. „Orbital shaker“-Bioreaktoren	6
3 Technologischer Vergleich von Einweg-Bioreaktoren zu Suspensions-Bioreaktoren (Edelstahl)	6
4 Ökonomische Aspekte	7
5 Literaturverzeichnis	8

Haftungsausschluss: Die in der Studie veröffentlichten Informationen, Adressen und Bilder wurden mit größter Sorgfalt recherchiert. Dennoch kann für die Richtigkeit keine Gewähr übernommen werden. Die Informationen und Bilder dienen ausschließlich zur persönlichen Information des Auftraggebers. Kein Teil dieser Studie darf ohne ausdrückliche schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden. Die Dokumente/Informationen können durch aktuelle Entwicklungen überholt sein.

Sofern spezielle Anbieter namentlich benannt werden, wurden diese mit größter Sorgfalt recherchiert. Es wird dennoch keine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit übernommen. Die jeweilige Reihung stellt keine Wertung dar.

1 Einleitung und Problemstellung

In der Pharmaproduktion werden überwiegend leistungsstarke Rührreaktoren aus Edelstahl eingesetzt, die meist eine Vergrößerung bewährter Technologien darstellen. Sie benötigen speziell ausgebildetes Personal, erfordern oft langwierige und kostspielige Qualifizierungs- und Validierungsverfahren, intensive Wartung und Instandhaltung. Hieraus resultieren hohe Produktionskosten. Eine attraktive Alternative sind Einweg-Bioreaktoren. Als kleine, modulare Anlagen sind sie rasch aufgebaut und in Betrieb zu nehmen. Sie sind leicht zu bedienen und können gezielt nach Kundenbedürfnissen produzieren [1]. Einweg-Systeme für die biotechnologische Produktion versprechen nicht nur geringere Produktionskosten, sondern auch höhere Produktivität und weniger Prozessrisiken [2]. Mit den Einweg-Bioreaktoren wird auch eine Lücke zwischen dem Upstream, in dem schon seit längerem Einweg-Systeme etwa zur Medienaufbereitung und –bereitstellung etabliert sind, und dem Downstream, wo es ebenfalls neue Entwicklungen mit Einweg-Systemen gibt, geschlossen. Eine Reihe von Firmen verfolgt zunehmend eine „one stop shop“-Strategie entlang der biopharmazeutischen Wertschöpfungskette, indem sie den Kunden Komplettlösungen bieten, die sowohl ihre Upstream- als auch Downstream-Prozesse umfassen [3].

Einweg-Kultivierungssysteme sind in der Zellkulturtechnik beispielsweise in Form von T- oder Roller-Flaschen vor allem im Laborbereich etabliert. Für die Produktion größerer Mengen an Pharmazeutika konnten sich lange Zeit lediglich Hohlfaser-Reaktoren als Alternative zu Rührreaktoren durchsetzen. In den 90er-Jahren entwickelte der amerikanische Zellbiologe Vijay Singh einen Einweg-Bioreaktor, der die sanfte Wellenbewegung des Meeres imitiert. Mit dieser „Wave“-Technologie wurde der Grundstein für die Einführung einer völlig neuen Kultivierungstechnik mit Einweg-Bioreaktoren in der Zellkulturtechnik gelegt. Mittlerweile werden mehr und mehr auch Anwendungen für mikrobielle Systeme vorgeschlagen [1].

Einweg-Bioreaktoren sind naturgemäß für den einmaligen Gebrauch bestimmt und müssen anschließend entsorgt werden. Sie bestehen meist aus einem Behälter zur Kultivierung der Zellen, welcher aus einem von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen Polymermaterial besteht, vorzugsweise aus Polyethylen, Polystyren, Polytetrafluorethylen oder Polypropylen, und welcher Normen wie USP Class VI oder ISO 10993 erfüllt. Der Kultivierungsbehälter ist meist durch gamma-Strahlung sterilisiert, zur sofortigen Verwendung verpackt und validiert. Nach Durchführung der Kultivierung und Ernte der Zellen oder des gewünschten Produktes wird der Behälter entsorgt. Mit einem frischen Behälter kann sofort eine neue Kultivierung gestartet werden, ohne dass lange Rüstzeiten (Reinigung, Sterilisation, Sterilkontrolle etc.) anfallen [1].

Einweg-Bioreaktoren wurden ursprünglich für kleinere Volumina (ca. 10-20 L) konzipiert, um Probleme in der frühen Entwicklungsphase eines pharmazeutischen Produktes lösen zu helfen. Hierzu gehören Aspekte wie

- Flexibilität, Kosteneffizienz, „time to market“
- Zeit bis zur ersten klinischen Phase
- kosteneffizientes Prozess-Design
- Flexibilität – „multiproduct facility“

- Skalierbarkeit von Ausrüstung und Material

Hier liegen Vorteile von Einweg-Bioreaktoren im Vergleich zu „klassischen“ Bioreaktoren aus Glas oder Stahl in [5,6]

- kurzen Rüstzeiten
- geringerem Reinigungsaufwand
- weniger Validierungen (Reinigung, Sterilisation, etc.)
- einfacherer Anpassung an wechselnde Anforderungen und damit eine hohe Flexibilität
- geringerem Kontaminationsrisiko
- niedrigeren Investitionskosten

Mittlerweile haben sich Einweg-Bioreaktoren auch für Volumina bis ca. 1.000 L etabliert. Hier sollen diese Systeme insbesondere bei Produktionen unter GMP-(Good Manufacturing Practice)-Bedingungen zu minimierten Prozesskosten, verringerter Entwicklungszeit sowie kürzerer „time-to-market“ für neue Produkte sorgen.

Aufgrund der attestierten Eigenschaften sowie dem steigenden Kostendruck in der pharmazeutischen Industrie hat die Akzeptanz von Einweg-Bioreaktoren in den letzten zehn Jahren zugenommen, was zwangsläufig auch zur Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher Reaktorkonzepte geführt hat [7,8]. Grundsätzlich kann man Einweg-Bioreaktoren in die folgenden drei Gruppen unterteilen: (1) traditionelle Kultivierungssysteme für kleine Volumina sowie deren Modifikationen, (2) Hohlfaser-Bioreaktoren und (3) Bioreaktorsysteme, die aus Kultivierungsbeuteln „bag bioreactors“ bestehen [9]. Letztere werden im Folgenden als Einweg-„bag“-Bioreaktoren ausführlicher diskutiert.

Eine Übersicht zu Anwendungsbeispielen findet sich bei Eibl und Eibl [1].

2 Generelle Übersicht und Einteilung zu Einweg-„bag“-Bioreaktoren

Zu den derzeit am Markt angebotenen Einweg-„bag“-Bioreaktoren gehören statische und gerührte Einweg-Bioreaktoren, Einweg-Bioreaktoren mit Vibromixern, „Wave“-Bioreaktoren, hybride Einweg-Bioreaktoren sowie sogenannte „Orbital Shaker“. Derzeit werden diese Systeme bevorzugt im Labor- sowie im Pilotmaßstab für die verschiedensten humanen und tierischen Zellen eingesetzt. Zu den bevorzugten Anwendungen gehören die Zellvermehrung, die Produktion rekombinanter Proteine, monoklonaler Antikörper, Viren oder viraler Impfstoffe. Dabei werden die Kultivierungssysteme im *batch*-, *fed-batch*- oder kontinuierlich im Perfusionsverfahren betrieben. Sowohl suspendierbare als auch adhären-te Zellen wurden erfolgreich kultiviert. Anwendungen mit mikrobiellen Systemen sind seltener zu finden.

Die nachfolgende Kategorisierung von Einweg-„bag“-Bioreaktoren orientiert sich an einem Vorschlag von Eibl und Eibl [1]. In **statischen** „bag“-Bioreaktoren wird keine zusätzliche Energie in das System eingeführt, um etwa das Durchmischungsverhalten oder den Sauerstoffeintrag zu verbessern. Im Gegensatz dazu wird bei dynamischen „bag“-Bioreaktoren das Wachstum der Zellen und/oder die Bildung eines gewünschten Produktes durch einen

spezifischen Leistungseintrag zur Verbesserung der Stofftransporteigenschaften intensiviert.

2.1 Statische „bag“-Bioreaktoren

Unter den Einweg-„bag“-Bioreaktoren repräsentieren statische, gas-permeable Kultivierungsbeutel die älteste und einfachste Variante für geschlossene Kultivierungssysteme [10,11,12]. Die angebotenen Typen differieren in Größe und Polymertyp und werden z.B. für die Expansion und Differenzierung von Zellen oder etwa auch zum Einfrieren der Zellen eingesetzt. Trotz der weiten Verbreitung im Labormaßstab oder im klinischen Bereich sind diese Systeme im Hinblick auf erreichbare Zelldichte bzw. Produktausbeute limitiert. Ähnlich wie in T-Flaschen oder „well-plates“ ergeben sich Limitierungen aufgrund der begrenzten Fläche für das Zellwachstum. Wesentliche Kultivierungsparameter wie Sauerstoffkonzentration und pH-Wert können nicht kontrolliert werden und die Systeme sind auf einen CO₂-Brutschrank angewiesen. Beimpfung und Mediumswechsel lassen sich nur manuell durchführen und bergen daher ein hohes Kontaminationsrisiko [12,13].

2.2 Gerührte „bag“-Bioreaktoren

Gerührte „bag“-Bioreaktoren wurden als Alternative zu klassischen Rührreaktoren konzipiert. Typischerweise wird dabei ein steriler Kunststoffbehälter in einen Stahltank gesetzt. In den Behälter wird ein Rührer eingeführt, um eine gute Durchmischung und ausreichende Stoffübergangseigenschaften zu gewährleisten. Prinzipiell sind diese Reaktoren entweder mit einem Rührer, der ein axiales Strömungsprofil erzeugt oder einem taumelnden Rührer sowie einem Begasungssystem (Ringbegaser oder Mikrosparger zur Erzeugung sehr feiner Blasen) ausgestattet, um eine ausreichende Homogenität (Konzentrationen an Sauerstoff, Substraten bzw. Zellen, Temperatur, pH) beziehungsweise eine adäquate Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Am Markt werden Systeme bis zu 1.000 L angeboten [1, 14-16]. Gerührte Reaktoren lassen sich mit Sensoren zur Messung von Temperatur, Sauerstoffgehalt oder pH-Wert ausstatten. Hierzu werden mittlerweile auch Einweg-Sensoren angeboten. Aufgrund dieser Sensortechnik lassen sich gerührte „bag“-Reaktoren besser kontrollieren sowie mit automatisierten Fütterungsstrategien betreiben. Die erreichbaren Zelldichten sind daher vergleichsweise hoch.

Zum Vergleich gerührter „bag“-Bioreaktoren und traditioneller Stahlkessel-Bioreaktoren werden häufig hydrodynamische Merkmale (Strömungsprofil, Mischverhalten, Scherstress, Temperaturprofil etc.) oder die Sauerstoffeintragsrate herangezogen. Eibl und Eibl [1] postulieren anhand dieser Daten und den im batch- bzw. Perfusionsbetrieb erzielten Zelldichten und Produktkonzentrationen, dass gerührte „bag“-Bioreaktoren eine gute Alternative zu gerührten Stahlreaktoren darstellen.

2.3 „Bag“-Bioreaktoren mit Vibromixer

Im Gegensatz zu gerührten Bioreaktoren, bei denen der Leistungseintrag ganz wesentlich durch die Rührerdrehzahl und somit durch die Rührerumfangsgeschwindigkeit bestimmt wird, wird bei „bag“-Bioreaktoren mit integriertem Vibromixer die Leistung durch eine vertikal oszillierende Welle, an deren Ende sich eine Lochplatte befindet, eingetragen. Die

Höhe des Leistungseintrags wird durch Schwingungsamplitude und -frequenz bestimmt. Die oszillierende Bewegung der Lochplatte erzeugt ein axiales Strömungsprofil, das Mischung und Gaseintrag bewirkt. Je nach Position der konisch gebohrten Löcher wird eine aufwärts gerichtete Strömung („riser“) oder eine abwärts gerichtete („downcomer“) erzeugt. Hierdurch wird eine Wirbelbildung unterdrückt [1,17].

2.4 „Wave-mixed“-Bioreaktoren

Die „Wave“-Technologie imitiert die sanfte Wellenbewegung des Meeres. Der „Wave-Bioreaktor“ besteht aus einer Wipereinheit und einer mit Gammastrahlen vorsterilisierten Einweg-Bioreaktorkammer aus Kunststoff, in dem die Zellen in Volumina von über 500 L kultiviert werden können. Der welleninduzierten Mischvorgang sorgt für eine optimale Durchmischung und Versorgung mit Sauerstoff sorgt und versetzt das Kulturmedium im Beutel in eine Wellenbewegung. Damit erneuert sich die Oberfläche zwischen der flüssigen und der überstehenden, gasförmigen Phase fortwährend und bewirkt einen blasenfreien Sauerstoffaustausch. Ohne invasive mechanische Rührer oder Belüfter wird das Kulturmedium durchmischt, die Zellen und sonstigen Partikel suspendiert. Mittlerweise werden am Markt verschiedene Systeme angeboten, die auf dem „Wave“-Prinzip basieren [18-34]. Alle diese Systeme lassen sich mit Sensoren zur Bestimmung von Temperatur, pH und Sauerstoffgehalt ausrüsten.

Die Funktionalität von „wave-mixed“-Bioreaktoren konnte für eine Vielzahl von Anwendungen gezeigt werden. Darüber hinaus wurden Studien zur Hydrodynamik und zum Sauerstoffeintrag für Volumina von 1 L, 10 L und 100 L Kulturvolumen durchgeführt, um einen Vergleich mit traditionellen Rührreaktoren zu ermöglichen. Es zeigt sich, dass Strömungsprofil, Mischzeit, Verweilzeitverteilung, spezifischer Leistungseintrag sowie der Sauerstoffeintrag von Parametern wie Kippwinkel, Kippfrequenz, Typ und Geometrie des Beutels und dem Kulturvolumen abhängen. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die erzielten Leistungsmerkmale für die Kultivierung tierischer und humaner Zellen adäquat sind. Bei mikrobiellen Systemen kann es aufgrund des dort höheren Sauerstoffbedarfes zu Limitierungen kommen [1,32,35].

2.5 „Hybrid-bag“-Bioreaktoren

Bei dem sogenannten „Hybrid-bag“-Bioreaktor werden Begasung und Durchmischung durch einen Begaser und magnetisch angetriebene Propellerrührer bewerkstelligt, die alle in den sterilen Beutel integriert sind. Die Begasung erfolgt im schlanken unteren Bereich des Beutels. Durch die aufsteigenden Gasblasen wird eine Aufwärtsströmung erzeugt, die durch die Propellerrührer unterstützt wird. Es kommt zu einer Umlaufströmung der Flüssigkeit, die eine ausreichende Durchmischung des Mediums gewährleistet. Zur Unterdrückung von Schaumbildung kann der Kopfraum mit Druck beaufschlagt werden. Auch diese Reaktoren lassen sich mit entsprechender Sensorik ausrüsten [36,37].

2.6 „Orbital shaker“-Bioreaktor

Von der Gruppe um Prof. Wurm, Lausanne wurden Einweg-Kultivierungssysteme entwickelt, bei denen ähnlich wie in herkömmlichen Schüttlern für Schüttelkolben eine kreisförmige Bewegung des Mediums zur Durchmischung und zur Verbesserung des Stofftransportes genutzt wird [38-40]. Ursprünglich wurden quadratische Gefäße bis zu Volumina von ca. 1 L eingesetzt, da diese durch die wie Stromstörer wirkenden Ecken eine gute Durchmischung gewährleisten. Mittlerweile werden im Labormaßstab, etwa für Screening- und Optimierungsexperimente, spezielle Kultivierungsröhrchen verwendet, die in ihren Dimensionen herkömmlichen Zentrifugenröhrchen angepasst sind. Wurm et al. konnten zeigen, dass die „Orbital shaker“-Technologie auch im Maßstab bis zu 200 L hervorragende Ergebnisse bei der Kultivierung tierischer und humaner Zellen bringt.

3. Technologischer Vergleich von Einweg-Bioreaktoren zu Suspensions-Bioreaktoren (Edelstahl)

Für die Kultivierung tierischer und humaner Zellen im Labor-, Pilot- und Produktionsmaßstab waren Suspensions-Bioreaktoren aus Glas (Labor) oder Edelstahl der Standard [9]. Diese „traditionellen“ Bioreaktoren erfordern erhebliche Investitionskosten aufgrund der erforderlichen Steriltechnik, „sterilisation-in-place“ (SIP), „cleaning-in-place (CIP) sowie die entsprechenden Validierungen. All dies bedingt eine umfangreiche Instrumentierung [4].

Einwegbioreaktoren werden von verschiedenen Autoren [1-4,41-43] verglichen mit ihren Gegenspielern aus Glas oder Edelstahl folgende Eigenschaften attestiert: Weil Einweg-Reaktoren nicht wieder verwendet werden, müssen sie nach einer Kultivierung nicht gereinigt werden. Verunreinigungen wie etwa Cross-Kontaminationen sind bei sachgerechter Handhabung in weitaus geringerem Maße zu erwarten. Zudem fällt der Aufwand für die Reinigungsvalidierung geringer aus. Aufwändige Spülprozesse, die viel gereinigtes Wasser verbrauchen, sind in geringerem Maße erforderlich. Einweg-Bioreaktoren werden wie andere Einweg-Produkte verbrannt. Stillstandszeiten durch Spülprozesse können ggf. verkürzt werden, was zu einer höheren Verfügbarkeit und ggf. Produktivität führen würde. Innerhalb kurzer Zeit können neue Ansätze erfolgen oder sogar ein Produktwechsel vollzogen („multi purpose“) werden. Die Validierung der Einweg-Reaktoren kann einfacher als diejenige von Edelstahl-Bioreaktoren sein.

Limitierende Faktoren für den Einsatz von Einweg-Bioreaktoren sind dagegen die Begrenzung im Maßstab, die noch nicht ausgereifte Einwegsensortechnik, die mögliche Abgabe sogenannter „Leachables“ und „Extractables“ durch das Kunststoffmaterial und die fehlende Erfahrung im Rahmen von Zulassungsverfahren mit Einweg-Bioreaktoren [1]. Ferner ist für mikrobielle Systeme die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff bei hohen Biomassekonzentrationen als problematisch anzusehen.

Derzeit wird der Einsatz von Einweg-Bioreaktoren bis zu Volumina von 2.000 L als realistisch und sinnvoll angesehen [43]. Bei größeren Volumina werden auch weiterhin Edelstahl-Bioreaktoren dominieren. Allerdings wird für die Zukunft erwartet, dass sich für viele Produkte der erforderliche Produktionsmaßstab verringern wird. Hierzu gehören etwa

Impfstoffe oder Zelltherapieprodukte, für die schon heute häufig Einweg-Bioreaktoren eingesetzt werden. Darüber hinaus wird erwartet, dass neue Wirkstoffe effizienter sind als herkömmliche und somit geringere Dosen verabreicht werden müssen, und dass die Produktionssysteme (z.B. zellspezifische Produktivitäten, Zellausbeute, Produktausbeute) sehr viel besser sein werden als bei den etablierten Produkten, bei denen die grundlegenden Entwicklungen vor 15-20 Jahren gemacht wurden. Zudem wird es mehr Nischenprodukte geben, die in kleineren Mengen benötigt werden. Diese lassen sich kostengünstig mit der Einweg-Technologie produzieren [43].

Die Einweg-Technologie findet nicht nur im Bereich Zellkultivierung zur Produktion von Wirkstoffen Anwendung, sondern zunehmend auch im Upstream- und im Downstream-Bereich. Im Upstream ist die Bereitstellung von Medien in Einweg-Containern bereits industrieller Standard. Für den Downstream-Bereich werden mittlerweile eine Vielzahl von Einweg-Systemen angeboten (z.B.: Filtrationssysteme, Membranchromatographie-Kartuschen). Darüber hinaus existieren technologisch ausgereifte Lösungen für aseptische Verbindungen, Schläuche, Adapter etc. als Einweg-Material. Die Verfügbarkeit dieser Technologien hat bei vielen Firmen zu einem Strategiewechsel bei der Prozessentwicklung geführt. Insbesondere Auftragsproduzenten (CMO's) sowie Biotech-Start-up's entscheiden sich immer häufiger für eine durchgängige Einweg-Strategie, da hier die Vorteile der Einweg-Technologie besonders zum Tragen kommen können.

4 Ökonomische Aspekte

Die ökonomischen Vorteile von Einweg-Bioreaktoren werden von verschiedenen Autoren [2,41,43] in niedrigeren Kosten, einfacherer Bedienung und kürzerer "time-to-market" im Vergleich zu „traditionellen“ Edelstahl-Bioreaktoren gesehen. Diese Schlussfolgerungen stützen sich allerdings auf wenige veröffentlichte Studien.) Je nach Anwendung könnten demnach bei Betriebskosten Einsparungen bis zu 20%, bei Reinigungs- und Validierungsprozessen bis zu 20-30% möglich sein. Darüber hinaus ließe sich danach die erforderliche Menge für Wasser (zu Reinigungszwecken) und somit der Aufwand für die Abwasserbehandlung erheblich reduzieren [43]. Andere Angaben schätzen die Reduktion der Gesamtprozesskosten je nach Anwendung durch Einweg-Reaktoren um 20–40 % [2,41]. Weiterhin können sich die Investitionskosten reduzieren [42]. Das Kontaminationsrisiko wird als niedriger angesehen [4].

Die für einen konkreten Prozess zu erwartenden ökonomischen Vorteile hängen stark von den individuellen Rahmenbedingungen ab und müssen vor einer Investitionsentscheidung bzw. der Errichtung einer Produktionsanlage in größerer Tiefe geprüft werden als in dieser Studie geleistet werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Eibl R, Eibl D (2009) In: Kasper, C.; M. van Griensven, R. Pörtner (eds.): Bioreactor Systems for Tissue Engineering; Series: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology , Vol. 112 ISBN: 978-3-540-69356-7
2. Kreuzburg J (2006) CHEManager 23
3. Monge M (2006) BioPharm International, November
4. Marjanovic D, Greller G (2007) BioPharm International, May
5. DePalma A (2006) GEN 26:60
6. Morrow KJ (2007) GEN 28:37
7. Flanagan N (2007) GEN 27:38
8. Eibl R, Eibl D (2007) PROCESS PharmaTEC 4:14
9. Eibl R, Eibl D; Pörtner R, Catapano G, Czermak P (2008) Cell and Tissue Reaction Engineering, Springer. ISBN 978-3-540-68175-5
10. Daley LP, Gagliardo LF, Duffy MS, Smith MC, Appleton JA (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12:380
11. Halberstadt, CR, Hardin R, Bezverkov K, Snyder D, Allen L, Landeen L (1994) Biotechnol Bioeng 43:740
12. Purdue, GF, Hunt JL, Still JM, Law EJ, Herndon DN, Goldfarb IW, Schiller WR, Hansbrough JF, Hickerson WL, Himmel HN, Kealey GP, Twomey J, MissavageAE, Solem LD, Davis M, Totoritis M, Gentzkow GD (1997) J Burn Care Rehab 18:52
13. Eibl R, Eibl D (2007) in: Pörtner, R. (ed.): Animal Cell Biotechnology – Methods and Protocols. Humana Press
14. Card C (2007) 20th ESACT meeting 2007, Dresden, Germany
15. Zijlstra, G (2007) 20th ESACT meeting 2007, Dresden, Germany
16. Castillo J, Vanhamel S (2007) GEN 27:40
17. Werner S, Nägeli M (2007) BioTec 3:22
18. Cronin CN, Lim KB, Rogers J (2007) Protein Sci 16:2023
19. Fries, S, Glazomitsky K, Woods A, Forrest G, Hsu A, Olewinski R, Robinson D, Chartrain M (2005) BioProcess Int 3:36
20. Genzel Y, Behrendt I, Koenig S, Sann H, Reichl U (2004) Vaccine 22:2202
21. Genzel Y, Olmer RM, Schaefer B, Reichl U (2006) Vaccine 24:6074
22. Hundt B, Best C, Schlawin N, Kassner H, Genzel Y, Reichl U (2007) Vaccine 25:3987
23. Negrete A, Kotin RM (2007) J Virol 145:155
24. Ohashi R, Singh V, Hammel JF (2001) 17th ESACT meeting 2001, Tylösand, Sweden
25. Schlaeppli JM, Henke M, Mahnke M, Hartmann S, Schmitz R, Pouliquen Y, Kerins B, Weber E, Kolbinger F, Kocher HP (2006) Protein Expres Purif 50:185
26. Singh V (1999) Cytotechnol 30:149
27. Slivac I, Srček VG, Radošević K, Kmetič I, Kniewald Z (2006) J Biosci 3:363
28. Tang YJ, Ohashi R, Hamel JP (2007) Biotechnol Prog 23:255
29. Weber W, Weber E, Geisse S, Memmert K (2002) Cytotechnol 38:77
30. Weber W, Bacchus W, Daoud-El Baba M, Fussenegger M (2007) Nucleic Acids Res 35:e116
31. Weber W, Stelling J, Rimann M, Keller B, Daoud-El Baba M, Weber CC, Aubel D, Fussenegger M (2007) PNAS 104:2643
32. Zijlstra G, Oosterhuis N (2007) 20th ESACT meeting 2007, Dresden, Germany
33. Hami LS, Chana H, Yuan V, Craig S (2003) BioProc J 2:23
34. Hamis LS, Green C, Leshinsky N, Markham E, Miller K, Craig S (2004) Cytotherapy 6:554
35. Eibl R, Eibl D (2006) In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds) Plant tissue culture engineering, series: Focus on biotechnology, vol 6. Springer, Dordrecht, p 203
36. Taylor, I. (2007) Biotechnica 2007 Hannover, Germany
37. Auton KA, Bick JA, Taylor IM (2007) GEN 27:42
38. Wurm FM (2004) Nat Biotechnol 22:1393
39. Wurm FM, Bernard A (1999) Curr Opin Biotechnol 313:156
40. N. Muller, P. Girard, D.L. Hacker, M. Jordan and F.M. Wurm (2005) Biotechnol Bioeng 89, 4: 400-6
41. Eibl R, Rutschmann K, Lisica L, Eibl D (2003) BioWorld 5
42. Mirasol F (2008) ISIS Chemical Business, March
43. D'Aquino R (2006) Chemical Engineering Progress, May