

Tissue Engineering

- Tissue Engineering: Gewebetechnik, Gewebezüchtung
- Definition: $\leadsto$ interdisziplinäres Arbeitsgebiet der Ingenieur- & (Lebens)wissenschaften (Medizin, Biologie, Immunologie, Materialwiss. & Chemie, Ingenieur- & Bioverfahrenstechniken)
 - $\leadsto$ Aufklärung grundsätzlicher Mechanismen & Funktionen in Geweben
 - $\leadsto$ Entwicklung biologischer Ersatzgewebe zur Unterstützung / Ersatz geschädigten / ausgefallenen Gewebes
 - $\leadsto$ regenerative Medizin: endogenes Regenerationspotential des Körpers (Selbstheilung) & Verwendung dabei wirkender Mechanismen & steuernder Moleküle
- menschl. Gewebe / Organe: $\leadsto$ Medizin: Organersatz
 - $\leadsto$ Industrie: Testsysteme
- Autotransplantation: aus eigenem Körper
- Allogtransplantation: von anderen Menschen
- Xenotransplantation: von Tieren
- Tissue Engineering: Gewebezucht im Labor
- Prinzip des TE: Gewebebiopsie $\rightarrow$ Zellisolation & -vermehrung $\rightarrow$ Zellaussaat auf Matrix (synthetisch / biologisch)
 - $\rightarrow$ Gewebekultivierung (Bioreaktor) $\rightarrow$ Implantation / Einsatz als Testsystem
- Bausteine des TE: Zellen & Zell-Zell-Interaktionen, Trägerstrukturen & Biomaterialien, Bioreaktor
- im Körper: 200 Zelltypen
- Zellquellen: chronische Wunden (gering Ausgangsmaterial) $\leftrightarrow$ Verbrannungen (wenig Ausgangsmaterial & schnelle Behandlung kritisch)
 - $\hookrightarrow$ verschiedene ZQ: Verfügbarkeit, Zeit, Reproduzierbarkeit, Eigenschaften
 - $\leadsto$ Spenderquellen:
 - autolog: vom selben Spender
 - allogon: von selber Spezies
 - xenogen: von anderer Spezies
 - $\leadsto$ Zelllinie: immortalisierte Zellen, unbegrenztes Teilungsvermögen
 - Herstellung:
 - zufällige Mutation: Tumorzelllinie
 - gezielte Veränderung Zelle mit Viren / Plasmiden
 - Veränderungen an ZL: Chromosomenzahl, Zellmembran, Wachstum ohne W. Faktoren
 - Beispiel HeLa: Epithelzellen Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) $\rightarrow$ 1. Impfstoff (Pinderlähmung)
 - Vorteile:
 - kommerziell erhältlich
 - einfache Kultivierung
 - viele Zelltyp. Merkmale, Fkt.en, Eigenschaften
 - unbegrenzt proliferationsfähig
 - gleichbleibende Qualität
 - Nachteile:
 - Immortalisierung $\rightarrow$ veränderte Eigensch.
 - verändertes Wachstumsverhalten
 - Ergebnisse wenig auf Gewbezellen übertragbar
 - kancerogen $\rightarrow$ keine Implantation
 - kontaminierte ZL
 - $\leadsto$ primäre Zellen: aus Gewebebiopsien isolierte Zellen $\rightarrow$ aufwändig
 - Vorteile:
 - Isolation aus Gewebe
 - „in vivo“ Eigenschaften
 - autolog verwendbar
 - funktionell, ausdifferenziert
 - Nachteile:
 - begrenzte Proliferation & Lebensdauer
 - Biopsiematerial begrenzt
 - Qualität von Spender & Kultivierung abh.
 - Kultivierung nur mit Antibiotika
 - keine Reinkultur nach Isolation
 - Dedifferenz. in andere Zelltypen
 - Kultivierung $\rightarrow$ Veränderung Zelleigenschaften

→ Stammzellen: (Vorläufer-) Zellen, die in versch. Zelltypen differenzieren können & Selbsterneuerungs- / -erhaltungspotential besitzen

- Erhalt: Signale von Außen (Cytokine, Hormone), ECM-Proteine, Matrixstruktur
 - Stammzellarten: embryonal (pluripotent), adult (multipotent), induziert pluripotent [totipotent]
- unipotent

↳ Selbstrenewung & Gewer- : differenzieren zu allen : diff. nur zu mehreren : diff. bar zu allen Zellen eines Embryos /
nung eines Zelltyps : Zellen eines Organismus : Zelltypen : Fetus + des entwickelten Organismus

~ embryonale SZ:

- entwicklungsbiologisches Modell: Bildung Embryoid Bodies (EBs) aus SZ $\rightarrow$ Rekapitulieren Embryonalentwicklung, Krankheitsmodelle
- regenerative Medizin
- humane in vitro Testsysteme: z.B. Kardiak Zellen für Erforschung v. Herzkrankheiten; Arzneimittelforschung
- Vorteile:
 - Nachteile:

- o unbeschr. proliferationsfähig (Telomerase)
- o wenig/keine Virusbelastung
- o pluripotent
- o aufwändig, teuer
- o nicht autolog einsetzbar
- o Gefahr Entartung $\rightarrow$ Krebs
- o Ethik
- o aufwändig Erlaubnis zu erhalten

- **Matrix**: Zell-Matrix-Interaktionen

→ ECM: • Definition: Gesamtheit aller Makromoleküle im tierischen Gewebe, die sich im Interzellularraum befinden & stützende / funktionelle Bedeutung haben; komplexes Geflecht

- Faser (Kollagen, elastische Faser) $\leftrightarrow$ nicht-faserbildende E(M)-Bestandteile (Proteoglykan (PGs), Glykosaminoglykan (GAGs), Fibronectin/Laminin, matrixelluläre Proteine)

- Funktionen: Formgebung, Adhäsion, Wachstum, Differenzierung, Proliferation, Migration, Differenzierung

- Knochen Zellen: Kalk, Augen (Kornhaut): durchsichtig, Sehnen (Zugfestigkeit), Basalmembran: Gitter

~) Trägerstrukturen (Biomaterialien): künstliche Matrix $\leftrightarrow$ biologische Matrix

- biolog. Matrix (ECM): regenerative Medizin
 - Dezellularisierung von Gewebe & Organen (Enzyme, chem. Behandlung)
 - ↳ Limitation: Zerstörung ECM-Proteine, Krankheitsübertrag, Mangel an Spenderorganen
 - rekombinante ECM-Proteine: Herstellung in anderen gentechnisch veränderten Organismen & Injektion in Zielgewebe
- Elektrospinning: Herstellung 3D micro-Umgebung für in vitro Testsysteme; rapid prototyping, bioprinting

- **Bioreaktoren:** Inkubatorsysteme für das TE

→ physiolog. Bed.en für verschiedene Gewebe, physikalische Reize (Druck, Fall etc.)

~ Monitoring: störungsfrei (Messung trans epithelial elektr. Widerstand (TEER))

↳ Inkubatorin: • für GMP (vaskularisierte) Trachea Transplantation: Sterilbank + Inkubator oder modulare Inkubatorsysteme.

- Nährstoffversorgung: einfache Gewebe ohne Verdauungssystem: Diffusion; komplexe Systeme: Versorgungssystem

- Entwicklungs- & Zellbiologie

↳ Zellen Träger / E(n) ↗

Engineering Tools / Bioreactors

↓ Analysemethoden (marker-frei) (Raman Mikrospekt., multiphoton imaging), Immunohistochemie, PCR, Mikroarray, Golgniktoph.

TE Implantat / Testsystem

- **Testsysteme** $\leadsto$ Hautäquivalente: einzelne Schichten in vitro noch nicht gut verwachsen

~) Darmtraktsystem: dynamisch $\rightarrow$ Ablösung der Zellen von Eintrittsmembran

~ Organ-on-a-chip-Systeme: Medikation, personalisierte Medizin

Fig. 1 Blindness

- Puncto ciego = blinder Fleck
- Retina: ~ Funktion: Wahrnehmung (Sensor, Sehen)
 - ~ Dicke ~ 450 μ m
 - ~ Photorezeptoren → Horizontal Zellen → Bipolar Zellen (ON & OFF) → amakrine Zellen
 - Zapfen & Stäbchen → Ganglienzellen (ON, OFF & ON/OFF), 40 Typen
 - ↳ rot, grün, blau → Dunkel- & Farbensinnen
- Optikusatrophy: Zerstörung Ganglienzellen → keine Hilfe mehr möglich, Zerstörung des Sehnervs
- Retina & Wiederherstellung:
 - ~ altersbedingte Makuladegeneration (Macula lutea = gelber Fleck), keine totale Blindheit → Stammzelltherapie
 - ~ diabetische Retinopathie
 - ~ Retinitis pigmentosa → Neuroprotektion
 - Gentherapie: ~ 200 involvierte Gene
 - ~ Achromatopsie: • komplette Farbblindheit, hohe Blendungsempfindlichkeit, stark reduzierte Sehschärfe
 - Ursache: Defekt Zapfen-Photorezeptoren (Defekt CNGB3-Gen)
 - Gentherapie: • Injektion von Adeno-assoziierten Viren (AAV) die gesundes Gen enthalten
 - Aktivierung durch Licht: Optogenetik, Funktionsverlagerung in Bipolarzellen
 - ↳ Problem: hohe Lichtintensität nötig: externe Lichtquelle nötig
 - Problem: genetisch determinierte Degeneration schreitet fort
- Implantat:
 - ~ elektrische Stimulation der Retina: • Limitation: räumliche & zeitliche Auflösung
 - Annäherung Signale an natürliche, Problem: Größe der Elektroden
 - ~ chemische Stimulation der Retina
- Was ist ein Vektor?
 - ~ Plasmidvektor = für Klonierung von Genen in der Gentechnologie/-transfer in der Gentechnik genutzte Plasmide
 - ~ bei Bakterien & Hefe vorkommend
 - ~ kleine zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle
 - ~ werden als unabhängige genetische Einheiten repliziert
 - ~ in Plasmide kann Gen, das geklont werden soll eingesetzt werden
- Was ist Optogenetik?
 - Kontrolle genetisch modifizierter Zellen mittels Licht, z.B. Funktionsverlagerung in die Bipolarzellen
 - nicht für humanen Einsatz geeignet
 - genetisch determinierte Degeneration schreitet trotzdem fort → trotzdem Erblindung
- Neuroprotektion: Blocker/Medikamente benutzen, um Retinitis pigmentosa vorzubeugen
- Retinitis pigmentosa: nur ein Zelltyp der Zapfen betroffen, andere Zellen funktionieren auch nicht mehr
 - Zell Neuropr.: Absterben anderer Zelltypen verhindern

Herstellung & Prüfung multivalenter Impfstoffe

Influenza

- große genetische Variabilität → Berücksichtigung der Virusstämme im Impfstoff, die in der nächsten Saison vermutet werden
- Herausforderungen Grippe-Impfstoffe:
 - ~ RNA-basierter einzelsträngiger Genom → Punktmutationen (Antigen-Drift), da RNA-Polymerasen keine Exonuklease-Fkt. (korrektur)
 - ~ multivalenter Impfstoff mit z.T. geringem Impfschutz
 - ~ evtl. pandemische zusätzlich zu saisonaler Influenza: Segmentaustausch bei Infektion der Zelle mit weiterem Influenzastamm
↳ Pandemien wie Schweine- oder Voglgrippe

- weltweite Durchseuchung: 3-5 Millionen Fälle schwerer Erkrankung, 290.000 - 650.000 Tote

- Gattung: Influenzavirus, Familie: Orthomyxoviridae, umhüllte Viren mit einzelsträngiger, segmentierter RNA mit negativer Polarität

- Aufbau Influenza Protein:

~ Ribonukleoprotein: Komplex { Virusgenom
Strukturell
replikationsrelevant } Proteine { Matrix M1 & Nukleoprotein NP
RNA-Polymerase PA, PA-bindende Proteine PB1, PB2

~ Membranproteine: Hämagglutinin (HA) } bei Influenza-B-Viren, bei (-A-V zusätzlich M2
Neuraminidase (NA) }

Antikörper nach Infektion & in geringem Umfang nach Impfung → Antigene f. Impfstoff

- Impfung: effizienteste & günstigste Methode zur Influenzainfektionsverhütung

Prophylaktische Influenza Impfstoffe

- Limitationen konventioneller Impfstoffe

~ Abhängigkeit von Ei-basierter Herstellung → zellkulturbasierte (kost., rekombinante Antigene, genteilsynthetische Vakzine

~ limitierte Verfügbarkeit → Technologietransfer, Kapazitäten erhöhen, thermische Stabilität erhöhen

~ lim. Wirksamkeit bei älteren & nativen Populationen → Immunogenität (mehr Antigen) & Immunantwort verbessern

~ geringe cross-Reaktivität → Immunantwort gegen konservierte Regionen (konstante, z.B. Stamm) der Antigene um Abhängigkeit von Membranproteinen zu senken, T-Zell Antwort & Impfschema verbessern

- Anforderungen an moderne Impfstoffe

~ Induktion Ag-spezifischer Ab & T-Zellen

~ Technologie: Ag-Design für bessere Wirksamkeit

~ Plattformtechnologien: schnelle, skalierbare Produktion

~ lang andauernder Schutz

~ nur eine Impfung für Schutz (kein Boost)

~ multivalente Impfstoffe

~ thermostabile Impfstoffe

~ flexible Applikationsrouten

~ Verfügbarkeit & Sicherheit

- Produktionszeit / Impfstoffverfügbarkeit ab Verfügbarkeit des Gen/Virus
konv. Eier-Herst.prozess > konv. Zellkulturprozess (MDCK, Vero, Baculovirus)
> rekombinante Proteine > DNA- / RNA-Herstellung

RNA-basierte Impfstoffe

- Wirkmechanismus: Viralinjektion → Aufnahme mRNA, Stimulation des angeborenen Immunsys., Expression & Präsentation des Zielmoleküls → Aktivierung adaptiver IS, Expansion Ag-spezifischer T- & B-Zellen → ausgeglichene zelluläre & humorale Immunantwort

Pharmakologie RNA-basierter Impfstoffe (Tierstudien)

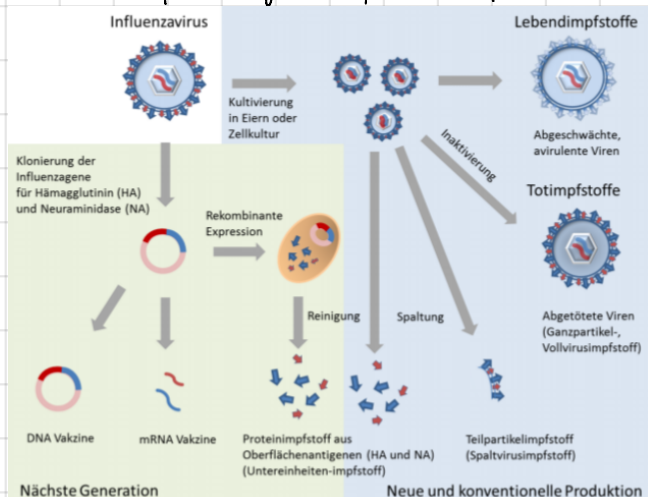
- Aktivierung spezifischer T-Zell- & humoraler Immunantwort

- Schutz vor letaler Infektion nach einer Impfung

- langanhaltender Schutz (Memory Zellen)

- Immunantwort gg. NP (Nanopartikel) mit Kreuzschutz

- Schutz gg. unterschiedl. Influenza-Stämme auch als multivalenter Impfstoff



Herstellung & Analyse multivalenter Impfstoffe

- regulatorische Anforderungen an die Analytik: $\rightarrow$ Qualifizierung/Validierung der analyt. Methoden
 - $\sim$ Identität, Reinheit, Gehalt der Wirkstoffe müssen analysiert werden
 - $\sim$ spez. analyt. Nachweismethoden für kritische Qualitätsattribute erforderlich

- Wirkstoff: mRNA

Produkt: RNA in LipidNP

Sichtprüfung Gehalt Integrität pH Osmolalität Proben Identität Endotoxine

Rest Lösemittel, Proteine, Plasmid DNA, bakterielle DNA Herstellungs- & -identität Sterilität Rest Lösemittel } $\sim$ Qualitätskontrollen

- Problem: Wirkstoffe nur geringfügig unterscheidbar, Gehalt & Identität müssen trotzdem nachgewiesen werden

- gleichzeitige Herstellung mono- & multivalent

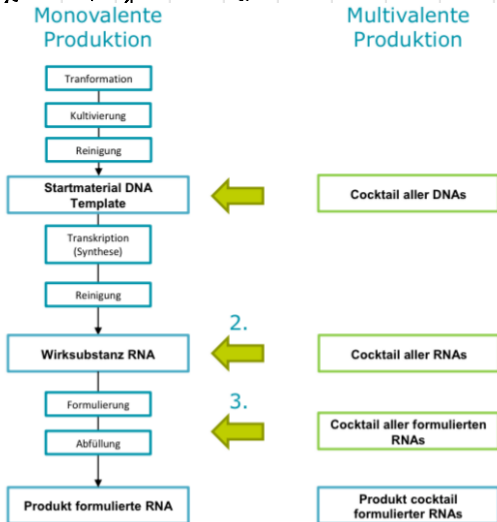
- alternative Methoden Bestimmung Identität & Reinheit:

$\sim$ digitale droplet PCR (ddPCR): präzisere Quantifizierung, Gehalt der Komponente gegenüber herkömmlicher qPCR

$\sim$ Sequenzadaptionierung RNA: gemeinsame Integritätsbestimmung & Aufreinigung v. RNA-Gemischen

$\sim$ PCR: Herstellung DNA-Templates für Synthese der RNA (Transkription)

1.



Entwicklung und Anwendung neuer Technologien für die biomedizinische Forschung und zelluläre Therapie

Dissoziation von festem Gewebe, Zellvorbereitung:

- Kombination enzymatischer Verdau & automatische mechanische Trennung → automatische Herstellung von Einzelzell-Suspensionen
- Integrität der Zellmembran (keine Veränderungen der Oberfl. epitope) & Funktionsfähigkeit der Zelle erhalten: Auswahl geeigneter Proteine

Auftrennung der verschiedenen Zellen:

- kleine superparamagnetische Partikel werden an spezifische Ab konjugiert
- die so markierten Zellen werden mit einem magnetischen Feld (mit großem Gradienten) in der Flüssigkeitssäule gehalten
- so wird die Anreicherung & Verarmung verschiedener Zelltypen auf direktem/indirektem Wege für die weitere Verwendung ermöglicht
- magnetische Zellsortierung ist ungiftig & bewahrt die Zellfunktionen
↳ direkt: Ab der an Zelle bindet besitzt magnetischen Partikel
↳ indirekt: 2. Ab der an 1. Ab bindet besitzt Partikel

Analyse der Zellen:

- REAfinity-Ab: ~ standardisierte/normgerechte Herstellung rekombinanter Ab
~ binden nicht mit unspezifischem FcγR-Teil des Abs
~ alle besitzen den gleichen Isotyp (monoklonaler IgG1-Ab)
~ ermöglichen standardisierte Zellanalysen wie Qualitäts- & prozessbegleitende Kontrollen
~ Phänotypisierung von Kardiomyozyten über Durchflusszytometrie, Immunofluoreszenz

Stammzelltherapie

- Neugeborenes: Herzzellen können sich aus PSC regenerieren, Narbenbildung beim Erwachen
~ regenerative Medizin: Ziel abgestorbenen/dysfunktionelles Gewebe & Zelltypen zu ersetzen
- induziert pluripotente SZ (iPSC): Gewinnung aus Patient selbst möglich
- Steuerung der Differenzierung über Transkriptionsfaktoren, Überwachung über Zelloberflächen-Marker
- Einpflanzen von Progenitorzellen in das Gewebe, Zellen differenzieren zu Kardiomyozyten
~ Reduzierung der Narbengröße um 20% ~ keine Teratom-Bildung
- Verwendung kardiovaskulärer Progenitorzellen zur Verhinderung von Herzversagen
- iPSCs können in die Zelltypen aller drei Gewebeschnitten differenziert werden & bieten eine gute Möglichkeit zu regenerativen Behandlungen, Erstellung von Krankheitsmodellen & Medikamentenentwicklung
- Zellprodukte für regenerative Therapien erfordern standardisierte Herstellungsprozesse & prozessbegleitende Qualitätskontrollen

Mikrophysiologische Systeme und Organ-on-a-chip

- Entwicklung von Medikamenten: langer (10-12 Jahre), ineffizient (10.000 → 1), teuer (>1 Mrd. € Prozess)

10.000 Prüfsubstanzen	} → < 250 Prüfsubstanzen	} → < 5 Prüfsubstanzen	} → 1 Medikament	} → (Kosten ~ 2 Mrd. € F&E - (Forschungs- & Entwickl.-) Kosten)
Wirkstoffentdeckung				
3-6 Jahre		4-5 Jahre	2 Jahre	
- Eroom's law: kontinuierlicher Abfall Produktivität (neue erprobte Medikamente / Mrd. F&E-Ausgaben) über letzte Jahrzehnte
- Übergang Vorklinik → Klinik wichtig aber ineffizient & problematisch; mehr Übertragbarkeit → sehr viel Einsparnis
- Tiermodelle: komplexe Gewebestruktur, Blutkreislauf, systemische Effekte } ≠ menschl. Körper
 - Zellassays: menschliche Gene, günstig, standardisierbar, automatisierbar
- Tierversuchszahlen steigend → 3R-Prinzip bei Tierversuchen: Replace (durch andere Methode), Reduce, Refine (Belastung verringern)
- Tiermodelle überwiegend Nagetiere: 95% Gene Maus-Mensch identisch, ähnliches Organsystem aber: nur teilweise menschl. Krankheitsverlauf
 - Vorteile: • kurze Generationszeiten ~ Nachteile: • unterschiedl. Lebenszyklen, Ernährung, Immunogen bei Krankheit/Verletzung
 - geringer Platzbedarf • unterschiedl. Physiologie (Herzschlag)
 - Inzucht → stammspezifische Resultate
- konventionelle Zellkultur: Biologie auf Plastik; Petri-Schalen, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten
 - Vorteile: standardisierbar, automatisierbar, günstig
 - Nachteile: • Monokulturen: keine Co-Kulturen, 3D-Strukturierung, Zell-Zell- / Zell-Matrix-WW
 - fehlende Perfusion • falsche Verhältnisse Zellen: Medium
 - = Durchblutung: Konzentrationen: Nährstoffe, Medikamente ↓, metabolischer Abfall ↑
- Organ-on-a-chip: Vereinigung Eigensch. Tiermodelle & Zellassays, Organoid (Miniaturisierung, Mensch)
 - miniaturisiert, mikrofluidisch perfundierte Systeme für die Kultivierung lebender Zellen zur Nachbildung physiologischer Organfunktionen
 - menschliches Gewebe (Quelle iPS/primäre Zellen) } physiologische (Mikro-) Umgebung } → mikrophysiologisches Organ-on-a-chip System
 - in vivo Struktur & Funktionalität } mikrofluidische Perfusion
- iPSC
 - Patienten- & Krankheits-spezifische Gewebe
 - Isolation adulter humaner Zellen (Fibroblasten, Keimbahnzellen) → Reprogrammierung durch Transgene (Rekorrin) → iPSC, in abo 3 Keimbahnen diff. bar
- O-o-a-C: Plattformen: Lunge, Haut, Darm ; Herz, Knochen ; Leber, Fett ; Neurone } → Emulation organtypischer Funktionen

Barriere systeme	mechan. Sys.	metabolische Sys.	neurale Sys.
------------------	--------------	-------------------	--------------
- Lung-on-a-chip: • Lungen in-vitro-Modelle: mechan. Stimulation durch Atembew., Luft-Flüss.-Interphase, immunkompetent-Ödem
 - ↳ flexible Membran Epithel-Endothelzellen, Atmungsbew., Nachbildung Immunantwort
- Liver-on-a-chip: • Leber in-vitro-Modelle: mehrschichtig, Integration nicht parenchymaler Zellen, langfristiger Erhalt Stoffwechselleistung
 - ↳ 2-Kammer-Modul (Endothel Seite, hepatäre Seite)
 - Immunantwort: • Entzündung: Verlust metab. Fkt., Entzündungsreaktion, Zelltod
 - Regeneration: Rekonstruktion organtypischer Fkt.en, Immuntoleranz, vitale Zellen
- Herz-on-a-chip: • Herz in-vitro-Modelle: spontane Kontraktion, koordinierte Reizweiterleitung, Medikamentenreaktion wie in-vivo
 - ↳ zentrale Kammerkammer & Versorgungskanäle (Blutgefäße), Vdg. über Mikrokanäle; Aufbringung Transportprozesse (diffusiv/konvektiv); ausgerichtete iPSC-Randomyozyten; physiolog. Effekt Sympathomimetikum (Schlagfrequ. & -kraft ↑)
- Möglichkeiten O-o-a-C: Produktivität (günstig, schnell, sicher) steigern, Medikamentenentw., Toxizität-Screening, Krankheitsmodelle, mechanistische Studien, personalisierte Medizin, Mikrobiom Forschung

Mikrofluidische Diagnostik und Point-of-Care-Systeme

Point-of-Care-Diagnostik

- Laboruntersuchungen ohne Zentrallabor, direkt am Patienten
- Vorteile: Ortsunabh., schnelle Diagnose; kein Labor notwendig, einfache Bedienung (ohne Spezialausbildung)
- direkte Tests: OP-Saal, Notfallstationen, hoch-infektiöse Krankheiten $\rightarrow$ Anw. in Entwicklungsländern
- Kosten für Gesundheitssys. $\downarrow$, Lebensqualität (psychischer Stress $\downarrow$), schneller Therapiebeginn, Gefahr Patientenprobenverwechslung $\downarrow$
- Zukunft: Miniaturisierung & Parallelisierung der Analysetechniken
- klassische (ELISA) $\leftrightarrow$ mikrofluidische Analyse bei HIV-Tests & Prostatakrebs
 - $\hookrightarrow$ kleine Volumina, schneller, günstiger, niedrigere Nachweisgrenze (Sensitivität), transportabel, automatisierbar, parallelisierbar
 - $\hookrightarrow$ kommerziell verfügbar & standardisiert
- Bsp. mikrofluidische Messung: Blutzuckermessung für Diabetiker
 - $\sim$ 1. mikrofluidisches System; biokatalytischer Sensor basierend auf Fluss durch Kapillarkräfte
 - $\sim$ basiert auf Enzymen (Glukose-Oxidase vom Schwarzhimmel Pilz Aspergillus niger)
 - $\sim$ Prinzip: Glukose $\xrightarrow{\text{Enzym}}$ $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \sim$ Strom

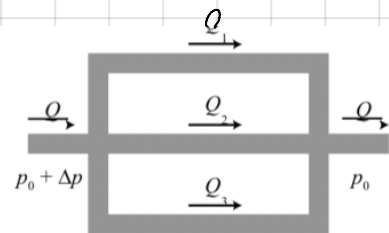
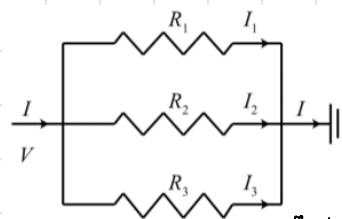
Grundlagen der Mikrofluidik

- Manipulation Flüss. auf kleinem (μ & n) Größenskalen
- Netzwerke von Mikro-Kanälen & -Kammern mit Ventilen, Pumpen & elektr. Komponenten
- Physik von Flüssigkeiten
 - $\sim$ Dichte ρ , inkompressibel für kleine Δp [mV]
 - $\sim$ Viskosität μ Widerstand bei Fluss (Deformation [Masse/Länge $\cdot$ Zeit], Newtonsche Fluids: $\tau_{yx} = \mu \frac{du_x}{dy} \rightarrow$ Schergerate)
 - $\sim$ Arten von Flüssen:
 - turbulent: stochastisch fluktuierende Geschw.
 - laminar: Fluss in parallelen Lagen ohne Vermischung
 - $\sim$ Reynolds-Zahl Re : Verhältnis Trägheit - Viskosität (Flussgeschw. relativ zu Viskosität)

$$Re = \frac{\text{Masse} \cdot \text{Geschw.}}{\text{Viskositätskoeff.}} = \frac{\rho \cdot v \cdot l}{\mu}$$
 (Ruhl Radius l durch Flüss. mit Geschw. $v \rightarrow Re$ ist abh. von Flüss. (ρ, μ) & Geometrie (l)
 $Re < 1$: laminar, $Re >> 1$: turbulent, zylindrische Röhre: Übergang ≈ 2000
 - $\sim$ Ursachen von Flüssen:
 - Scherung: Relativbewegung zweier Oberflächen
 - Druckdifferenz: Porosität (Fluss)
 - $\sim$ Netzwerke von Kanälen: Analogie elektr. Schaltkreise

Electrical relation	Fluid mechanical relation
$\Delta V = IR$	$\Delta p = QR_{Hf}$
$\sum_{k=1}^N I_k = 0$	$\sum_{k=1}^N Q_k = 0$
Power: $I \Delta V = I^2 R$	Power: $Q \Delta p = Q^2 R_{Hf}$
$j = \sigma E$ (Ohm's law)	$u_{avg} = -\frac{k}{\mu} \nabla p$ (Darcy's law)

Permeabilität k : abhängig von den Materialeigenschaften



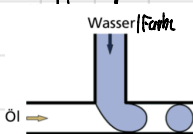
$\sim$ fluidischer Wid.: zylindr.: $R_{Hf} = \frac{8\mu L}{\pi r^4}$ rechteckig: $R_{Hf} = \frac{12\mu L}{h^3 \cdot w}$
 $\sim$ Kanalnetzwerke: parallel: $R = \sum R_i^{-1}$ seriell: $R = \sum R_i$

Tropfen-basierte Mikrofluidik

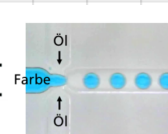
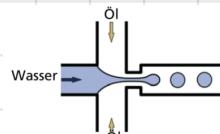
- Grundlage: Emulsion nicht mischbarer Flüssigkeiten [Misch: dispersungsl. Em. (unterschiedl. große Tröpfchen)]
- Konzept: $\sim$ Generierung Emulsionen in mikrofluid. Systemen
 - $\sim$ Mikrofluidik: Einstellung Größenverhältnisse $\rightarrow$ monodisperse (gleichförmige) Emulsionen

Mikrofluidische Tröpfchengenerierung

$\sim$ T-Junction



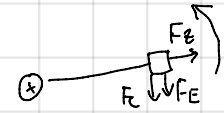
$\sim$ Fluss-Fokussierung



$\sim$ Einstellung Tr.-größe: relative Flussraten, Kanalgeometrien, Viskositäten

- Manipulation Tropfen: Mischen, Sortieren, Zwischenspeichern, Injektion von Flüss./ Zellen
- Anw.hsp.: Einzelzellanalyse: $\sim$ Zelleinzahl, Aufspaltung, Sortierung

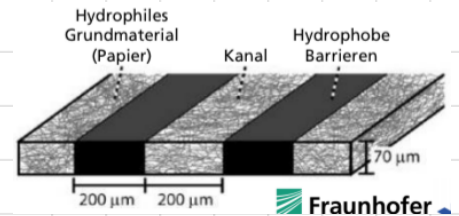
Zentrifugale Mikrofluidik

- Durchführung Assay durch Disk-Rotation
- Prinzip: Transport Fl. ohne ext. Pumpen: $\sim$ Zentrifugalkräfte (Coriolis- & Eulerkraft), Fluss nur nach außen $\textcircled{+}$ 
 - $\sim$ Kompression eingeschlossener Luft, Fl. in alle Richt. mögl.
- Flussrate abh. von Rotationsgeschw., radialer Abstand zum Zentrum, Kanalgeometrie, Flüss.eigenschaften.
- Bsp. Kompression eingeschlossener Luft: Rotation $\rightarrow$ Fl.fluss nach außen $\rightarrow$ Luft in Kammer komprimiert $\rightarrow$ Rotation langsamer/stoppt $\rightarrow$ Luft expandiert $\rightarrow$ generiert Fl.
 - $\sim$ Kapillar-Ventil
 - $\sim$ Hydrophobizität-Ventil (hydrophobe Membran)
 - $\sim$ Siphon-Ventil
- Kontrollierte Flüss.injektion durch spezielle Ventile: $\sim$ Kapillar-Ventil

- Anw.hsp.: Nachweis von bakteriellen Kampfstoffen (*Bacillus anthracis* & *Francisella tularensis*)

Papier-Mikrofluidik

- Prinzip: Kapillarkraft & Verdunstung von Flüss., unabh. von ext. Pumpen
- Material: Papier $\sim$ verpresste Cellulosefasern, hydrophil
 - $\sim$ Porengröße einstellbar
 - $\sim$ hydrophobe Barrieren (Patches zur Flüss.leitung/-separierung/-mischung)
- Anw.hsp.: Kombination mit enzymatischen Assays $\rightarrow$ Strukturierung Analyseregionen mit (kovalent) gebunden Enzymen & Farbstoffen
 - $\hookrightarrow$ mehrere unterschiedl. Analyseregionen $\rightarrow$ gleichzeitige Detektion versch. Parameter in einer Probe
- Auslesen z.B. mit Handylinse
- Vorteile: $\sim$ viele Herstellungsmethoden (Bedrucken, Betupfen, Ausschneiden, Laserstrukturierung)
 - $\sim$ einfache, schnelle Etablierung der Mkt. durch geringe Infrastrukturkosten
 - $\sim$ gute Verfügbarkeit in allen Größen & Dicken
 - $\sim$ einfach & gefahrlos entsorgbar (Verbrennen)



- $\sim$ sehr günstig
- $\sim$ Biokompatibilität
- $\sim$ keine Energiequellen notwendig

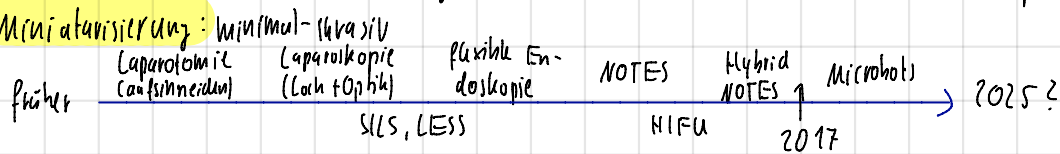
Operieren in der Zukunft

Kondratieff'scher Zyklus: (psycho)soziale Gesundheit, Biotechnologie

- Innovationsfelder in der interventionellen Medizin (Gegensatz v. konservativ, interventionell/konservativ: mit/ohne Operation)

~ Miniaturisierung ~ Computerisierung ~ Personalisierung ~ Biologisierung
~ Vernetzung/Kombinationen ~ Theragnostik (diagnostische Systeme mit integrierter Therapie)

- Miniaturisierung:



~ heute: Laparoskopie viel häufiger als Laparotomie

↳ „steif“ ↔ flexible Endoskopie: nutzt natürliche Öffnungen → Biopsieren & Operieren möglich (z.B. Darmspiegelung)

~ NOTES: Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery: Bsp. Mund → Magen, Loch durch Magenwand → Zyste aus Bauchhöhle entfernen → Clip zum Verschluss der Öffnung

~ HIFU: High Intensity Focused Ultrasound: ohne Haut zu zerstören Tumore verflüssigen durch hochenergetischen Ultraschall
↳ z.B. Prostatakrebs

~ Hybrid- NOTES: ein Zugang durch Nabel, um etwas „wegzuschieben (-halten)“ & ein Zugang der flexiblen Endoskopie

~ Mono-Port-Systeme (SLS)/ ersetzt 5 einzelne Trokare (Instrument um bei min. inv. Chirurgie Zugang zu einer Höhle-Laparoscopic-Single-Site-Sys. (LESS)) perihöle zu erhalten, problematisch bei Leuten mit sehr schwachem Bindegewebe & Nabelbruch

→ transgastrisch: durch Mund & Durchstoßung der Magenwand, alle Krankheiten im „kleinen Becken“

→ transkolisch: alle Organe im oberen Bauchraum → Leber etc. → vermeidet Retroflexion (Zurückbiegen) der Optik

~ RF-cutting + Wasserjet } 2,4 mm (Elektrosurgery, RF = Radio Frequency)
RF-coagulation

- Prozedur: 1) Markierung 2) Anheben durch Wasserstrahlkissen 3) Schneiden um Markierung herum
4) unter Tumor schneiden → ablösen

- Vorteile: sicher, einfach, schneller (kein Instrumentenwechsel, 8 in 1)

- Entlassung Patient nach 2 Tagen, nach einer Woche wieder arbeitsfähig

- Biologisierung: regenerative Medizin, Implantate, ...

~ Tissue Engineering ~ Implantate (künstlich, biologisch)

~ körpereigene Reparatur- & Regenerationsprozesse ausnutzen (Stammzellen)

~ Biologisierung v. Oberflächen, d.h. Verwendung autologen Materials zur Vermeidung von Entzündung & Abstoßung

~ Marktpotenzial: Orthopädie, Muskel..., Haut, Urologie, Zahnmedizin, Krebs, Kardiologie, ... → fast immer rote Zahlen (Kurz!)

~ Positionierung von regenerativen Zellen mit Wasserstrahltechnologie (Mucosa-Submucosa-Muscularis); ~ 30-80 bar

- Injektion durch Mucosa • Injektion (in Submucosa) • Spritzen (auf Submucosa)

- Personalisierung: jeder Mensch ist anders & jede Operation auch: Patient & Arzt

~ Bsp.: Optimierung Thermofusion (Vasoden/Gefäßversiegelung); Ziel: thermischer Lektalschaden ↓ (bis zu 40%) an hitzeempfindlichen Strukturen (z.B. Urethra)

~ Bsp.: Bauchfettverwachsung (Risiko Darmverstrickung (-Verstärkung) sekundär nach OP (contact coagulation - 85% Adhäsionsrate) ↔ Hybrid APC (neue Technologie - 2% Adhäsionsrate)

~ Bsp.: Medizin. 3D-Druck: • Herstellung Modelle für OP-Planung & -Training • passgenaue Implantate

- Herstellung Gewebe & Organe mit 3D-Bioprinting

→ komplex, viele Arbeitsschritte & Herausforderungen

- Computerisierung / Robotik

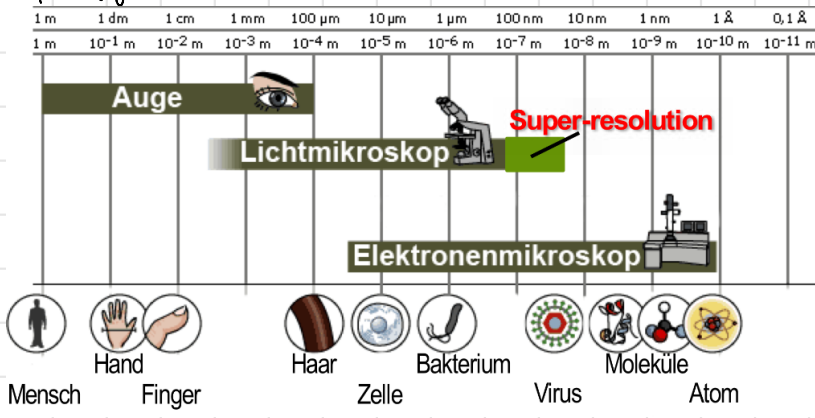
- ~> Da Vinci - System Marktführer; zitterfreies, präzises Operieren; Nachteil: improvisieren, individuelle Erfahrung, Haptik
 - Steuern des OP-Roboters:
 - Ergebnisse für Patienten noch nicht besser aber
 - wirtschaftlich, da mehr Operationen / Tag
- ~> Anwendung: Knie & Hüfte, Gehirn & Wirbelsäule (MIS), Gallenblase
- ~> herest. Roboter mit haptischer Technologie (misst z.B. Festigkeit des zu vernähenden Gewebes)
- ~> flexible endoskopische Robotik (minimalinvasiv)
 - Asian Technologie führend → als Aktuator + kleingelenkte Endoskopie
- ~> Pflugeroboter (Poreas)
- ~> Endoskopiekapsel „Pill“: pH-Sensor (Wirkstofffreisetzung gezielt), Kamera
- ~> Kriechende Milliroboter: z.g. Shom Kriechend: durch Magnetfeld
- ~> Magneto-elastisch verformbare Roboter

- Vermischung / Kombination

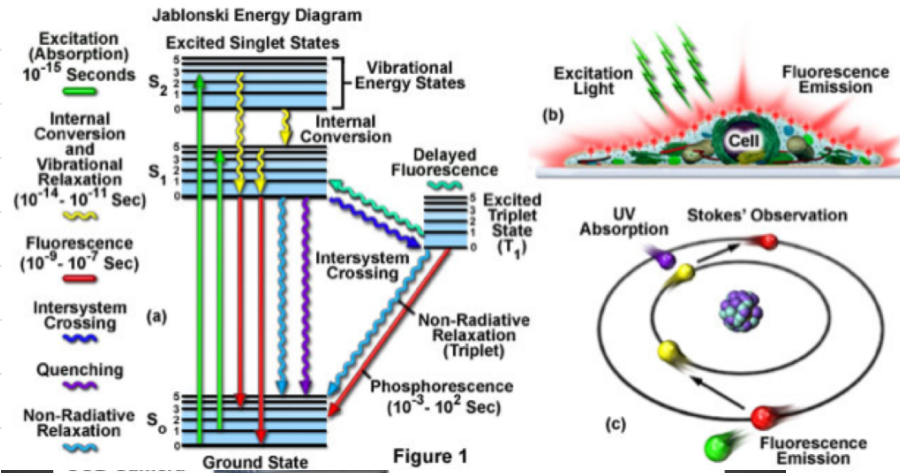
- ~> intraoperative Tumorduktion durch fluoreszierende Marker, die sich an Tumorzellen anheften
- ~> Bsp.: „sehendes Skalpell“: Gewebeduktion mit opt. Emissionsspekt. ; Prinzip: elektrochem. Funke liefert Informationen über den zu behandelnden Gewebetyp (falsch oder krank), Kalibrierung innerhalb 1s, Signal beim schneiden falls es falsch ist
- ~> Bsp.: „riechendes Skalpell“: Gew. det. mit massenspektrometr. Rauchgasanalyse; Prinzip: Differenzierung Tumor ↔ Gesundgewebe durch (VF-Rauchgas); Vorteil: sehr genau; Nachteil: (aktuell langsam, großes & schweres Gerät → Fortschritt)
- ~> Bsp.: flex. Endoskopie + Wasserstrahl + Elektrochir. + Diagnostik
- ~> Bsp.: RF Ablation in der Nadel → starke Applikation mit Gaskühlung
 - Radiofrequenz- & Kryotechnologie → auch für Diagnostik: Biopsie
- ~> Bsp.: flex. Endoskopie mit gleichzeitiger Ultraschallüberwachung → 3cm Tumore in 5min ↔ früher offenchirurgisch ca. 30 min
- ~> Kryo
 - Vorteile: keine Narben & Schmerzen
 - Nachteil: zeitversetzte Wirkung
 - Prinzip: frieren, auftauen, frieren, auftauen, ... → typisch für Lungenbiopsie
 - Kryobiopsie: • diagnostische Wertigkeit
 - Sicherheit: Blutungsrisiko
 - Kryoadhäsion vgl. Zunge am Latexkatheter

Live-cell imaging und Hochauflösungsmikroskopie

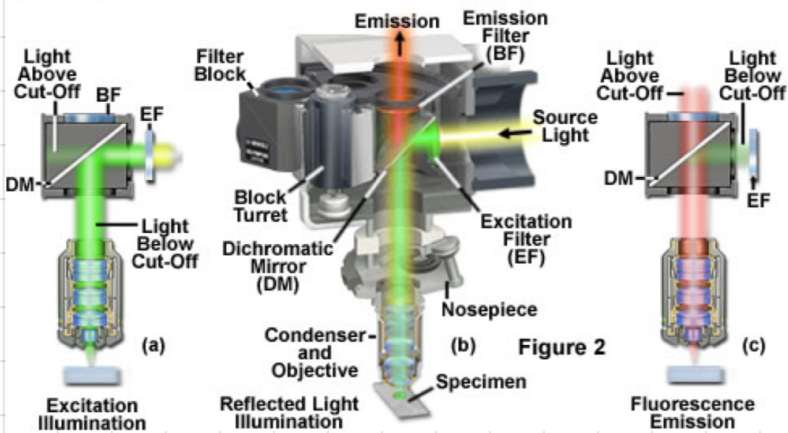
Auflösungsgrenzen



Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie



Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



Fluoreszenzfarbstoffe: absorbieren Licht einer spezifischen λ und emittieren Licht einer längeren (Stokes' shift)

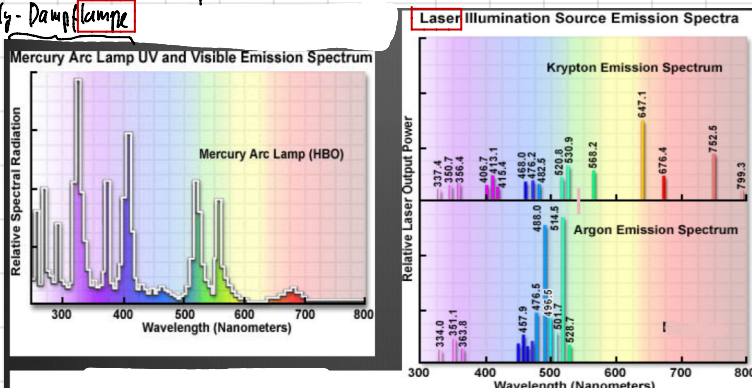
Beispiele: Excitation | Emission: $\rightarrow$ DAPI 358/461 $\rightarrow$ Fluorescein 495/525

Anregung $\rightarrow$ Rhodamine 552/596 $\rightarrow$ Texas Red 570/620

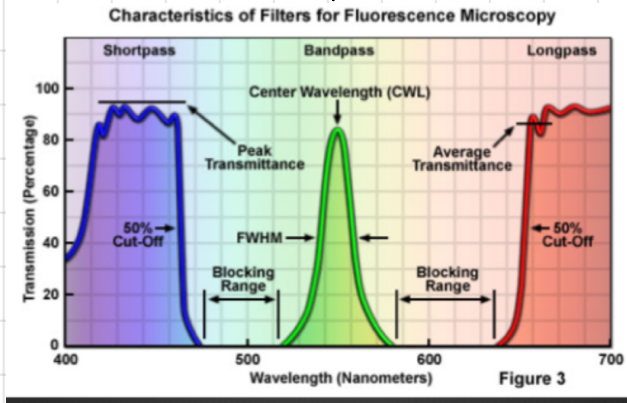
$\rightarrow$ Absorptions- & Emissionsspektrumprofil überlappen, Höhe des Emissionsprofils kleiner, da Licht wegen größerer λ kleinere Energie

Fluoreszenzlichtquellen

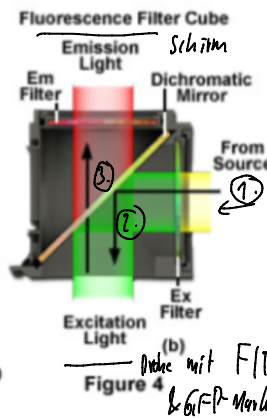
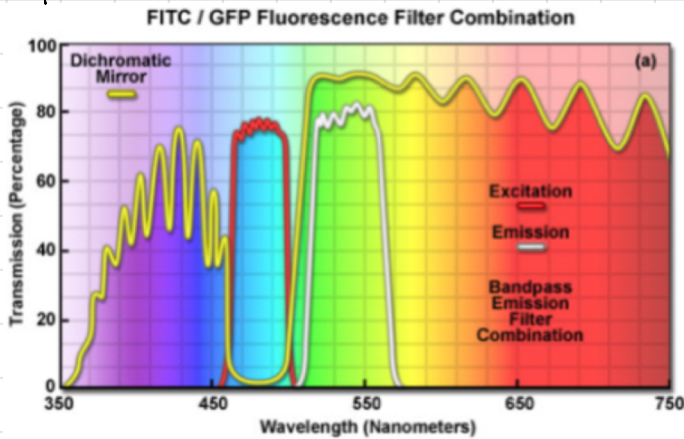
Hg-Dampflampe



- Fluoreszenzfilter; Arten: Bandpass & Edge filters (Short-/Longpass)



- Bsp.: FITC / GFP Filter



Dichromatische Mirror: Reflexion optimalerweise im Wellenlängenbereich des Anregungslichts, Transmission für Fluoreszenzlicht

- 1.) Ex-Filter filtert alle Wellenlängen außer Anregungswellenlängen heraus, Dichromatische Mirror reflektiert dieses
- 2.) Anregungslicht fällt auf Probe, Absorption des Anregungslichts, Emission Fluoreszenzlicht
- 3.) Dichromatische Mirror lässt Fluoreszenzlicht durch → Emissionslicht fällt z.B. auf einen Schirm

- fluoreszente Zellmarkierung: Herstellung fluoreszenter Proben

- Markierungstechniken

- ~ externe marker
 - membran-permeabel → pH, Spannung, Ca-sensitive Farbstoffe etc.
 - nicht membran-permeabel → Microinjektion etc.
 - ~ interne marker
 - Fluoreszenz Proteine
 - Autofluoreszenz
 - Lumineszenz
- Antikörperbasiert
spezifische Marker

- Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung → chem. Bl. unspezifischer aktiver Zentren um unspez. Färbung zu verhindern
 - ↳ Formaldehyd etc.
 - ↳ Durchlässigkeit Zellmembran ↑, Detergenzien
 - ↳ serum albumin - BSA, normal goat serum NGS

- DAPI: blaue Fluoreszenz, bindet an AT-Regionen der DNA (erkennt keine RNA), durch UV Strahlung angeregt, blau

- Alexa-488 Phalloidin: Phallootoxin, Label für F-actin (F-aktin), Alexa-488 an Phalloidin gebunden, blau-grün

- Anti-Tubulin Ab in Komplex mit Alexa 568 geladeten Sekundärantikörper, 1. Ab erkennt Struktur, 2. Ab den 1.

~ Vorteil: keine große Menge geladeter Primär-Ab nötig, Signalverstärkungseffekt (vgl. ELISA)

- bestimmte Zellen erkennen: spez. Proteine/Organelle identifizieren, Fluoreszenzfarbstoff an Ab binden (Primär/sekundär, direkt/indirekt), Ag-Erreichbarkeit (Fixierung/Permeabilisierung), 2-/3-fach Markierung mit verschiedenen Fl. Farbst. (alkalisch/natur. 1. Ab mit Enzym oder e⁻-dotierten Partikeln (für Elektronenmikr.) labeln

Interne Marker - fluoreszierende Proteine

- Plasmide
 - Plasmid: DNA-Ring, kann Protein codieren
 - Transfektion (Transfer Plasmid des Proteins in Zielzelle)
 - GFP (grün fl. Prot.) an zu untersuchendes Pr. hängen → Zellen prod. Zielpr. mit GFP
- (G)FP - Arten: CFP - cyan, YFP - gelb (enhanced GFP, hellgrün), BFP, VFP, mRFP1

- Brainbow: Neuronen mit versch. FP markieren
- fotoaktivierbare FP: Aktivierung → Verbreitung in der Zelle

Live-cell Fluoreszenz Mikroskopie (Lebendmikroskopie)

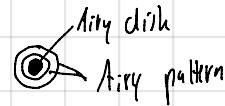
- Geschwindigkeit: schnell statt hohe LED-Quellen, externe Filter & Filterräder, Multi-Kamera
- Problem: Präparatdicke → Lösung: Konfokaler Trick, Reduzierung nicht-fokussierten Licht mit Lochblende (Pinhole)
 - ↳ fokale Ebenen zu gen. Bild zusammensetzen (Photo-multiplier detektor PMT)
- optische Stapel: → opt. Dicke abh. von λ , NA, n , (abh. & p: $d \sim p n \lambda / (NA)^2$)
 - Stacks müssen mit halber Dicke überlappen (Abtast-Theorem)
 - optische Schnitt & Stapel: 3D-Rekonstruktion

Konfokal vs. Weitfeld Mikroskop

- ⊕ Konfokal, scharfe optische Schnitte
 - Zusatzfunktion durch Laser-Steuereinheit: freies Zoomen, Blanking-Exper., selektive Pkt.messung (Spektroskopie)
- ⊖ Punktscan: langsam
 - Pinhole: Großteil der Photonen nicht detektiert

Hochauflösungsmikroskopie

- numerische Ap. NA: Maß in dem Objektiv Licht bündeln & kleine Probendetails auflösen kann
 - $NA = n \cdot \sin \alpha$, α : halber Öffn.winkel Obj.; größere NA: bessere Auflösung
- Point Spread Function und Airy disk
 - Airy disk: hüllmög. fokussierter Lichtpunkt perfekter Linse beugungsbedingt
 - Größe $r = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$
 - PSF: Bild punktförmigen Objekts; Ausdehnung: Maß f. Qualität des opt. Sys., für Objektiv & λ spezifisch
 - Bild Fluoreszenzmikr., komplett durch seine PSF erzeugt, Problem: Objekt: Original → Bild: schlechte Abb.
 - ↳ Deconvolution (Entfaltung): math. Trick zur PSF-Verbesserung



- Auflösungsgrenze Abbe: $d \sim \frac{\lambda}{NA}$, durchbrechen Super-resolution Mikroskopie

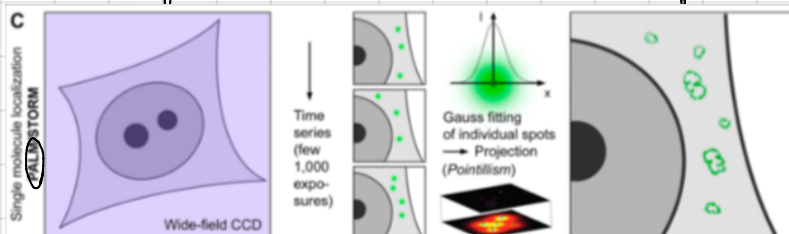
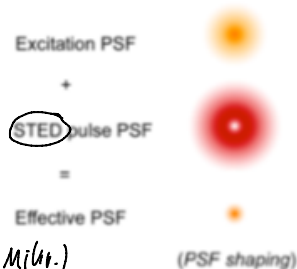
PSF Verbesserungsmöglichkeiten

- STED: Stimulated emission depletion (~stimulierter Emissionabbau) → scharfer, feinere Strukturen
- Lokalisationmikroskope (STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) / PALM (PhotoActivated Localization Microscopy))
 - sequentielle Aktivierung & Zeitabh. Lokalisation fotoaktivierbarer Fluorophore

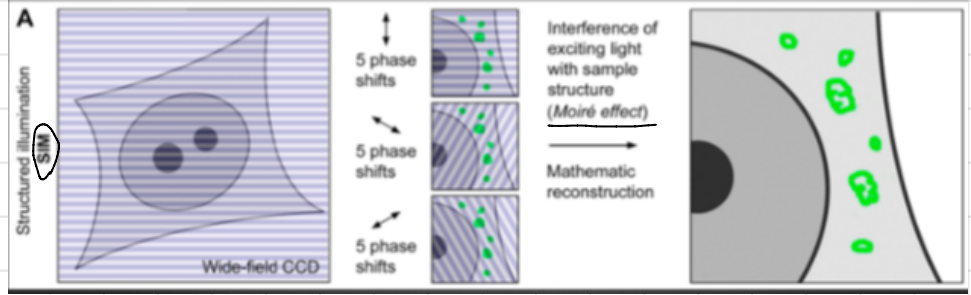
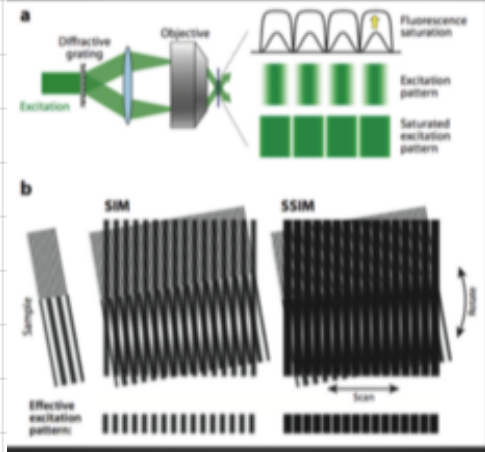
- nur Untergruppe der Ft.moleküle pro Zyklus aktiviert → Ft.mol. position über Centroid-Position einer einzelnen moleküls pro Bild bestimmen

- Untergr. wird dann deaktiviert → Nach: Fluorophore lokalisiert → Super-Resolution Bild

- FPALM: Fluorescence PALM
- iPALM: 3D PALM

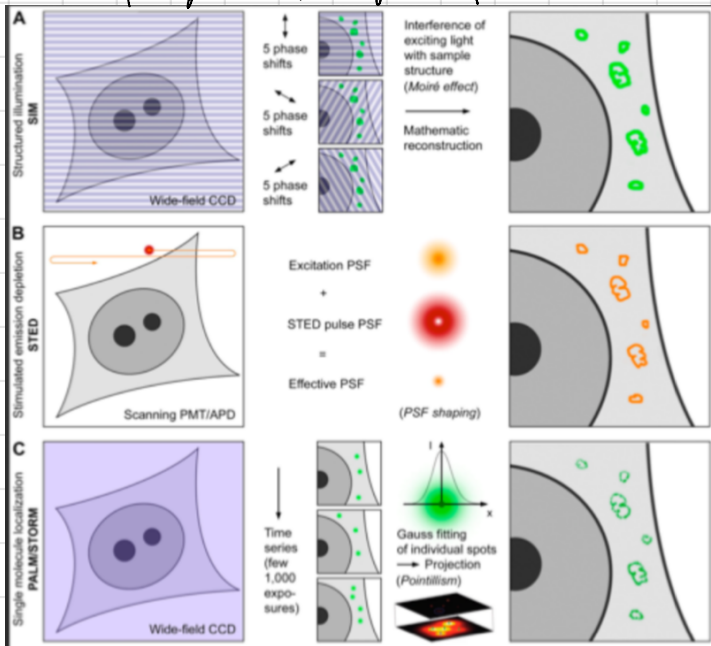


- SIM: structured illumination microscopy (strukturierte Beleuchtung)



- Zusammenfassung Hochauflösungsmikroskopietechniken:

Vergleich der Technologien:



Super-resolution technique used	3D-SIM	STED	PALM / STORM
Lateral resolution (xy)	90 – 120nm (wavelength dependent)	40 – 90nm (Hell group or commercial)	5 – 40nm (depending on setup)
Axial resolution (z)	200 – 250nm (wavelength dependent)	250 – 450nm (system dependent)	450nm (theoretical value)
Optical sectioning depth at super-resolution	~20µm (limitation depending on sample)	~100µm (but sample bleaching is critical)	up to 200nm (difficult to improve more)
# of different wavelength	max. 4	2 (difficult to choose)	1 (N-STORM for more)
Live-cell imaging?	Yes, but still very challenging!	Getting better but still a lot of bleaching...	No
Special dye requirements	No, works with normal fluorophores		PA-GFP (PALM) or mix with chemicals

~ räuml. Aufl. Mikroskopie nicht mehr durch Beugung begrenzt

~ 3D-Aufnahmen mit lateraler Aufl. bis ~ 10nm

axialer Aufl. bis ~ 40-50nm

~ Auflösung auf molekularem Niveau möglich

~ Aufl. abh. von Färbung, Probengröße & -qualität

~ in mehreren Farbk채n채len m枚glich → Untersuchung Interaktion / Koloaliation

~ live-cell-Aufnahmen bis in nm-Bereich m枚glich

- Ausblick

~ Weiterentw. bei molekularer Aufl. (wenige nm & darunter)

~ schnelle live-cell-HA-Mikr.: live-cell Mikr. auf molekularem Niveau

~ Fluoreszenzfarbstoff-Entw. Schl枚sselrolle f枚r Zukunft der HA-Mikr.:

- PALM/STORM: schnell, stabil, hell
- STED: neuer Laser λ , weniger Bleaching
- k枚rperliche Farbstoffe, z.B. Nanobodies

~ neue Technologie: Light sheet microscopy, Lattice light sheet: Bessel Strahl (wird nicht gebeugt, selbst-heilend durch he; Unterbrechung weitere Ausbreitung entlang der Strahlachse)

Rechtliche Rahmenbedingungen für Arzneimittel und Medizinprodukte

Teil 1: Arzneimittel

Grundlagen

- Europäische Rechtsgrundlagen
 - ~ EU: EG-Richtlinie 2001/83 & 2001/85 → Gemeinschaftsrecht Human- & Tiermedizin
 - ~ gegenseitige Anerkennung der Zulassungsverfahren innerh. EU
 - ~ zentrales Zulassungsverfahren (Verord. 726/2004)
- Deutsche Rechtsgrundlagen
 - ~ Courtygan-Fall → 1961 Arzneimittelgesetz (AMG): Sicherheit & ordnungsgemäße Versorgung mit AM
 - ~ Verbot, herkömmliches AM-Zulassungsverfahren, klinische Prüfung, Apothekenpflicht, Herstellungserlaubnis, Produktbeobachtung & Überwachung nach Zulassung

Was sind Arzneimittel?

- Anw. auf im Körper
- medizinische Zweckbestimmung (Diagnostika, Therapeutika, Prophylaktika)
- arzneiliche Wirkweise (pharmakologisch, immunologisch, metabolisch)
- Arzneimittelbegriff: objektiv-funktional (von wem wird es wozu verwendet? Festlegung durch Hersteller, muss allerdings obj. nachvollziehbar sein)
- Abgrenzung AM ↔ Medizinprodukte: MP nicht pharm., imm., metab., sondern physikalisch, mechanisch, physiko-chemisch

Zulassung von Arzneimitteln und Herstellungserlaubnis

- Herstellungserlaubnis
 - ~ bezogen auf Herstellung von Wirkstoffen & anderen zur AM-Herst. bestimmten Stoffen
 - ~ Hersteller nicht unbedingt auch pharmazeutisches Unternehmen
 - ~ Rechtsanspruch auf Erteilung
 - ~ Erlaubnisgeber: Roh- & Grundstoffproduktion & Stoffe mit noch nicht feststehender AM-Eigenenschaft
 - ~ Ausnahmen von Herstellungserl.:
 - Inhaber Apotheke
 - Träger Krankenhaus (Apothekengesetz)
 - Tierarzt (Tierärztliche Versorgung)
 - Großhändler für Umfüllen usw. ohne AM zu verändern, solange keine Abgabe an Verbraucher
 - Hersteller der homöopathischen „Wirkstoffe“ verarbeitet

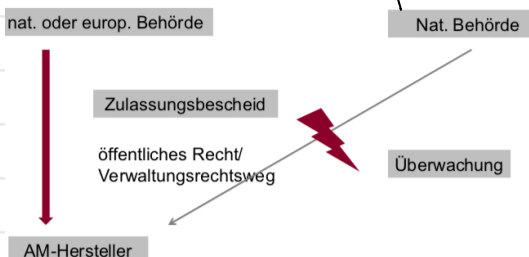
Zulassung von AM:

- ~ nur zugelassene Fertigarzneimittel verkehrsfähig
- ~ Verbot mit Erlaubnisvorbehalt

Schaubild Arzneimittelrecht

Über-/Unterordnungsverhältnis

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte



- Zentrales Zulassungsverfahren: EMA (European Medicines Agency), Behörde: Europäische Kommission
 - ~ für manche AM obligatorisch
 - Herstellung mit biotechnologischen Verfahren
 - Leistungsrisikoprüfung bei Tieren (z.B. Ertragsleistung erhöhen)
 - neuer Wirkstoff mit Indikation: Krebs, neurodegenerative Erkr., Diabetes, Autoimmunk., andere Immunschwächen, Viruserkr., erworbenes Immundefekt-Syndrom
 - AM für seltene Leiden (Orphan-drug) • AM für neuartige Therapien (ATMP) • monoklonale Antikörper
 - ~ optional:
 - AM mit neuem Wirkstoff ohne o.g. Indikation
 - AM bedeutende Innovation für Patienten
 - ~ ZZV erfolgreich: Zulassung in allen EU-Mitgliedstaaten ohne Zusatzl. Zustimmung der nationalen Behörden
- Dezentrales Zulassungsverfahren: Mutual Recognition Procedures
 - ~ Prüfung & Beurteilung im Referenzstaat → andere Staaten erkennen Beurteilung an → nationale Zulassung in einem Staat, dann idiosynkratische Anhänge in anderen Staaten
- Nationale Zulassung: Zuständig BfArM
 - ~ Risikoprüfung, Abwägung Gesundheitsgefährdungen
 - ~ Untersuchungen zu Qualität, therapeutischer Wirksamkeit & Unbedenklichkeit prüfen
 - ~ klinische Studien: Wirksamkeit AM nachweisen
- Unbedenklichkeit / Sicherheit
 - ~ bedenklich: AM mit Verdacht auf schädliche Wirkungen in mehr als dem vertretbaren Maß
- Nutzen-Risiko-Verhältnis: für Zulassung entscheidend
 - im Zsmh. mit Qualität, Sicherheit, Wirksamkeit

Klinische Prüfung

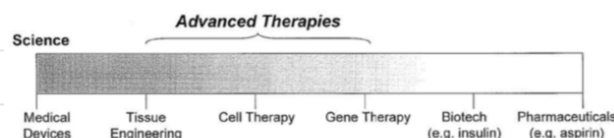
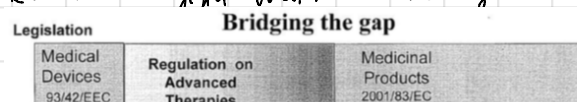
- AMG: Untersuchung Wirkungen, Nebenwirkungen zur Überzeugung von Unbedenklichkeit & Wirksamkeit
- Anforderungen: Ethikkommission, zuständige Bundesbehörde → sonst Straftat
- Voraussetzungen: Einwilligung, Prüfplan, Probandenversicherung, geeignete Prüfer, GCP-Vorschriften (good clinical practice)

Überwachung

- Pharmakovigilanz
 - ~ Erkenntnisse unerwünschte AM-Wirkung sammeln, auswerten & Aufsichtsbehörde melden
 - ~ Post-Market-Überwachung (da Studien nur wenige Probanden)
 - ~ Nutzen-Risiko-Verh. ungenügend → Zulassungswiderrufung
- Befugnisse der Behörde: Befreiungs-, Besichtigungs-, Einsichtsrecht, Auskunftspflicht
- Studienplanbeauftragter im Unternehmen → Gefahrenabwehr aufgrund eines Studienplans

Rechtliche Rahmenbedingungen für ATMP (Advanced Therapies Medical Products)

- Ausgangssituation
 - ~ früher: Bluttransfusionen, Stammzelltransplantationen, Rückübertragung autologer Zellen
 - ~ neuartige Produkte: xenoogene Zellen (Schwein), bis hin zu künstlichen Organen
 - neuartige Produkte ≠ AM ≠ MP → einheitl. EU-Standard gegen Wettbewerbsverzerrung
- Europäische zentrale Genehmigung für ATMP → bridging the gap
 - ~ Europarecht: Richtlinien & Verordnungen
 - Verordnung z.T. unmittelbar zellend. Recht (keine nationale Umsetzung erforderlich)



- ~ TE, somatische Zelltherapeutika & Gentherapeutika: Arzneimittel
- ~ AM-MP-Kombination (kombiniertes ATMP): Gesamtüberpr. durch EMA
- ~ europäisches, zentralisiertes Genehmigungsverfahren → Erleichterungen: Gehörnermäßigung
- ~ System der Rückverfolgbarkeit
- ~ Ausnahmen zentralisiertes GV: Krankenhausanwendung

Teil 2: Medizinprodukte

Grundlagen

- MP: Kleinfaktor bis medizinisches Großgerät
- Gefährdungspotential: Silikon-Skandal
- europäische Normen: gemeinsames Schutzniveau
- wegen PIP-Skandal: Änderung Regelungsregime: Verordnungen jetzt unmittelbar anwendbares Recht
- Zuständige Behörden / Stellen:
 - BfArM: klinische Prüfung, Klassifizierung, Überwachung
 - benannte Stelle (notified body): Zertifizierung / Konformitätsbewertung → TÜV
 - (Landesbehörde: Überwachung)

Medizinprodukterecht

Nat. Überwachungsbehörde



wichtige Begriffe:

- ~ CE-Kennzeichnung (Voraussetzung Inverkehrbringen & Inverkehrnahme)
- ~ Konformitätsbew. Verf.
- ~ grundlegende Anf.
- ~ Klassifizierung nach Risikoklasse I, IIa, IIb, III
- Zweck MPG: Sicherheit, Eignung, Leistung MP sichern
Schutz Patient, Anwender, Dritte

- MPG: ~ Instrumente, Apparate, Vorrichtungen, Software, Stoffe oder Zubereitungen aus Stoffen
 - ~ Veränd. anat. Aufbau / physiol. Verhalten, Empfangnisverhütung
 - ~ Hauptw. weder pharmakologisch, immunologisch oder metabolisch erzielt, Wirkungsweise darf durch AM unterstützt werden
- Definition MP: ~ negativ: nicht pharm., imm., metab. ~ positiv: physikalisch (Wundstülperverbände)
 - mechanisch (Gehhilfen)
 - physiko-chemisch (dentale Füllwerkstoffe)
- AMG / MP-Komb.: z.B. Kathetersatz mit Infusionslösung
- kein MP: AM, kosmetische Mittel, menschl. Blut, Plasma, Blutzellen, Transplantate / Gewebe (Zellen autolog, allogene, xenogene)
- Abgrenzung AM ↔ MP:
 - ~ Lufteinspritz: MP ↔ Kommonspritz AM, Hyaluronsäure als Schmier-/Gleitmittel & chirurgischen Eingriffen im Auge: MP
 - ↳ relevant: gleicher vergleichbarer Zweck ↔ unterschiedl. Wirkweise
 - ↳ wichtig: Konsequenzen f. Zulassungsverfahren, Werbung, Vertrieb, Erstattungsfähigkeit usw.
- Wirkstoffenthielt MP: Hauptwirkung durch MP → wenn z.B. beabsichtigter Zweck: Fixierung
 - ↳ AM-MP-Komb., wenn MP nur Trägermaterial für lokale Wirkstoffanwendung
 - ~ Konsultationsverfahren: Bewertung AM-Anteil
- AM-MP-Komb.: Behandlung als AM, wenn Hauptzweck AM, einheitlich verhandeltes Produkt, Verwendung nur in dieser Verbindung, nicht wiederverwendbar
 - ↳ MPG & AMG
 - AM-rechtliche Zulassung erforderlich, keine CE-Kennz.: Bsp.: vorgefüllte Fertigspritzen, Nikotin-, Antihemmapplaster, Kommonspritz

- Software als eigenständiges MP (Dietplanberatung, Therapieplanungsprogramme)
- Bedeutung der CE-Kennzeichnung: „Reisepass“ → Vermarktung in ganzem europ. Wirtschaftsraum; nicht an, den Harmonisierungs-
vorschriften der Gemeinschaft erfüllt sind

Klassifizierung und Zertifizierung

Warum MP-Klassifizierung?

- ~ ökonomisch nicht sinnvoll alle MP strengsten Prüfungsverfahren zu unterwerfen
- ~ Klassifizierung nach Gefährdungsgrad (Risikoklassen)
- ~ 4 Klassen:
 - I: orthopädische Hilfsmittel, Gehhilfen, Prothetikartikel, inkl. Istim & I messfunktion → 70%
 - IIa: Körpergeräte, Katheter, Ultraschallgeräte
 - IIb: Beatmungsgeräte, chirurgische Einmalprodukte
 - III: inaktive Implantate, Herzklappen



- Klassifizierung:
 - ~ Verletzbarkeitsbeurteilung & potentiell Risiko → risikogestuftes Ausmaß
 - ~ Kriterien: Zweck, Anwendungsort & -dauer, eingesetzte Technik
 - ~ BfArM entscheidet bei Meinungsverschiedenheiten zu benannter Stelle & Hersteller über Klassifizierung/ auch auf Antrag
- Zertifizierung:
 - ~ unabhängige benannte Stelle (TÜV, DEKRA), Stellen selbst zertifiziert
 - ~ innerhalb der EU freie Wahl durch Hersteller
 - ~ Klasse I evtl. Selbstzertifizierung
 - ~ Zertifizierung ist Voraussetzung für CE-Kennz.
 - ~ Hersteller: Konformitätsklärung

Klinische Bewertung

- Eignung für vorgesehenen Vorw. Zweck anhand von klinischen Daten → Risiko - Nutzen - Verhältnis
- Daten aus klinischer Prüfung / Studien über ähnliches Produkt, dessen Gleichwertigkeit nachgewiesen werden kann
- klin. Bew.:
 - ~ Literaturweg
 - ~ klin. Prüfung
 - ↳ nicht ausreichend bei neuem Gerät, starker Modifizierung, neuer Indikation, neuen, bisher unbekannten Materialien

Klinische Prüfung

- Zweck:
 - ~ Überprüfung, ob Produkt bei normalen Einsatzbedingungen Leistungsdaten entspricht
 - ~ unerwünschte Risiken & Nebenwirkungen
- Prüfer:
 - ~ Arzt (Ausnahme andere qualifizierte Person)
 - ~ mehrere Prüfer → 1 verantwortl. Hauptprüfer
 - ~ mehrere Prüfstellen → Sponsor ernannt einen Prüfer als Leiter der klinischen Prüfung
- Sponsor: Verantwortung für Veranstaltung, Organisation & Finanzierung der klin. Prüfung
- Voraussetzungen zur klin. Prüfung:
 - ~ Zustimmung Ethik-Kommission & Bundesbehörde
 - ~ positive Risiko-Nutzen-Abwägung
 - ~ Einwilligung vorhanden

§ 20 MPG	§ 21 MPG
gesunde Personen (Probanden)	kranke Personen (Patienten)
Abwägung der Risiken gegen die Bedeutung des MP für die Heilkunde	Abwägung des Risikos gegen den Nutzen für Leben und Gesundheit des Patienten
Grundregeln für klinische Prüfungen des MP	regelt Besonderheiten bei kranken Personen

Überwachung und Schutz vor Risiken

- MP-Anw. verköfen: zu gefährlich, Verfallsdatum abgelaufen, irreführende Berechnungen etc.
- allgemeine Anzeigepflicht für Hersteller, ZDV durch DIMDI (Deutsches Institut für medizinische Dokumentation & Information)
- Überwachung: zust. Behörde auf Landesebene
- MP - Beobachtungs- & Meldesystem

- MP - Sicherheitsplanverordnung: Vorkommnisse: Funktionsstörung (o.Ä.) mit unmittelbar/nachteiliger Tod / schwerwiegender Verschlechterung des Gesundheitszustands eines Patienten bzw. Risiko solcher Folgen durch MP besteht
- Sicherheitsbeauftragter MPG: jeder Hersteller
- MP - Sicherheitsplanverordnung: Korrektive Maßnahme (z.B. Rückruf)
- Meldepflicht in der klin. Prüfung, Zuständigkeit beim BfArM

Unterschiede AMG - MPG

- allgemeine Unterschiede
 - Inverkehrbringen:
 - AMG: behördl. Zulassung durch staatl. Behörde
 - MPG: Zertifizierung durch privatwirtschaftlich benannte Stellen
 - Rechtschutz:
 - AMG: Verwaltungsrecht
 - MPG: Zivilrechtsweg
 - Erstattung bei Krankenkassen
 - Haftung:
 - AMG: §§ 84 AMG
 - MPG: keine eigenen Haftungsregelungen
 - Werbung:
 - AM: unterfällt HWG, Werbung nur sehr eingeschränkt möglich
 - MP: HWG nur tw. auf MP anwenden
- spezielle Unterschiede:
 - keine klin. Bewertung (Liktaturweg) im AMG
 - MPG: keine Unterteilung in Phasen I - IV

Medizinprodukte vs. Arzneimittel	
Industrie	
heterogene Branche	homogene Branche
Produkte	
wirken überwiegend physikalisch	wirken pharmakologisch, immunologisch oder metabolisch
kurze Produktlebenszyklen	ausgedehnte Produktlebenszyklen
intensives Anwendertraining	Anwendertraining wenig intensiv
hohe Vertriebskosten	geringe Vertriebskosten
Gesetzliche Bestimmungen	
Neue Konzeption: erhöhte Eigenverantwortung der Hersteller	Alte Konzeption: vorschreibender Ansatz
Konformitätsbewertungsverfahren nach Risikoklasse	staatliches Zulassungsverfahren