

Verfahrensentwicklung und Charakterisierung der biopharmazeutischen Produktion von niedermolekularer polySia avDP20

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Daniel Boßmann, M.Sc. (RWTH)

2020

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD Dr. Sascha Beutel
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 21.09.2020

Die wichtigste Eigenschaft eines Wissenschaftlers ist die Fähigkeit zur Erkenntnis, dass man sich bei Zeiten von seinen lieb gewonnenen Ideen und Vorstellungen verabschieden muss.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Thomas Scheper und **PD Dr. Sascha Beutel** vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Projektes, die Betreuung und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an **PD Dr. Sascha Beutel** für die wissenschaftliche Betreuung und kompetenten Ratschläge. Zudem danke ich ihm für seine Hilfestellung, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Ebenfalls geht ein besonderer Dank an **Martina Weiß** für ihre hervorragende Hilfestellung und Unterstützung bei den nie enden wollenden Fragen und Problemen.

Der polySia-Gruppe um **PD Dr. Sascha Beutel**, **Dr. Ingo de Vries**, **Bastian Bartling** und **Johanna Rehfeld** danke ich für eine erfolgreiche Zeit und den Zusammenhalt. Bei den Projektpartnern **Prof. Dr. Harald Neumann**, **Dr. Jens Kopatz** und **Jonas Winkler** bedanke ich mich für eine spannende Zusammenarbeit und aufschlussreiche Diskussionen.

Dr. Christian Ude - der guten Seele des Technikums - danke ich ebenfalls für die vielen konstruktiven Diskussionen und Ideen, die Hilfestellungen bei Problemen jeglicher Art, aber vor allem für das freundschaftliche Miteinander.

Dr. Jens Claßen, **Dr. Julia Modrejewski**, **Florian Aupert** und **Tamanna Nagraik** danke ich für die herzliche Aufnahme im Büro 162. Die vielen Stunden der harten Arbeit, der konstruktiven Diskussionen, der abendlichen Biere und den lustigen Unterhaltungen waren mir eine große Freude. Auch bei den Neuzugängen des Büros, insbesondere **Jana Schellenberg** und **Johanna Rehfeld**, bedanke ich mich. Danke ich für die super Zeit!

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders nochmal bei **Dr. Jens Claßen** für die lange Zeit der Freundschaft bedanken. Die Zeit seit Beginn des Studiums hast Du für mich im positivsten Sinne geprägt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, **Heinz & Maria Boßmann**, sowie meinem Bruder, **Gerrit Boßmann**, bedanken. Ohne den Rückhalt und die Unterstützung meiner Familie, wäre mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei **Malena Knaack** bedanken. Danke für deine Unterstützung und dein Verständnis.

Kurzfassung

Polysialinsäure (polySia) wird in seiner Funktion als humanidentisches und anionisches Biopolymer für verschiedenste pharmazeutische Anwendungen umfassend untersucht. Insbesondere die niedermolekulare Form der polySia mit einer charakteristischen Kettenlänge von 20 ± 6 Sialinsäure-Monomeren (polySia avDP20) zeigt vielversprechende Ansätze in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

Die vorliegende Dissertation beschreibt einerseits die Entwicklung und Validierung einer analytischen Methode zur Charakterisierung der tatsächlichen polySia-Kettenlänge sowie die Quantifizierung definierter Kettenlängenbereiche mittels HPLC-CAD. Unter Betrachtung der GMP-Richtlinien nach ICH Q2(R1) wurden die Methoden in Hinblick auf die Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich sowie die Detektions- und Bestimmungsgrenzen validiert. Es konnte gezeigt werden, dass (Poly-) Sialinsäuren zwischen einem DP (*degree of polymerization*) von 1 ($MW = 309 \text{ g mol}^{-1}$) bis maximal DP65 in einem linearen Arbeitsbereich von $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ - 10 mg mL^{-1} detektiert werden können. In der Quantifizierungsanwendung konnte eine selektive Methode für langkettige (*long chain*, LC) polySia mit einem linearen Arbeitsbereich von $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ - 1 mg mL^{-1} und polySia avDP20 in einem Bereich von $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ - $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ entwickelt werden. Die entwickelte Analytik ist insbesondere in der zielgerichteten polySia avDP20-Produktion von hoher Relevanz.

Darüber hinaus wird in dieser Arbeit die Prozessentwicklung und -optimierung zur Produktion der humanidentischen polySia aus *E. coli* K1 sowie die Produktaufreinigung und Herstellung der biopharmazeutisch relevanten, niedermolekularen polySia avDP20 beschrieben. Die Kultivierungsbedingungen wurden zunächst durch eine Medienoptimierung in Schüttelkolbenversuchen verbessert. Nachfolgend wurde ein Prozess-Upscaling im Rührkesselreaktor in einem 1,5 L und 25 L -Maßstab durchgeführt. Bemessen an der Raum-Zeit-Ausbeute wurde die Produktivität um 227 % von $0,339 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,788 \text{ g L}^{-1}$ polySia gesteigert. In einem pO_2 -kontrollierten Zulaufbetrieb zur Hochzelldichtkultivierung konnte eine Steigerung der Produktivität um 47 % von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,7 \text{ g L}^{-1}$ polySia erreicht werden. Nach der Produktaufreinigung lag polySia in hochreiner Form mit einer Kettenlänge $> DP70$ vor. Nachfolgend wurde das langkettige polySia-Material zur pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 weiterverarbeitet. In der thermischen Hydrolyse wurden eine optimale Hydrolysedauer von ca. 55 min und eine Temperatur von $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt. In der chromatographischen Trennung von polySia avDP20 wurde ein dreistufiger Gradienten entwickelt, mit Hilfe dessen insgesamt 4,5 mg (6,1 % Ausbeute) niedermolekulare polySia mit einer Kettenlängen von $DP20 \pm 9$ isoliert werden konnten.

Schlüsselwörter: Polysialinsäure, Prozessentwicklung, Hochzelldichtkultivierung, GMP, Validierung, Membranadsorber

Abstract

Polysialic acid (polySia) is widely investigated in its function as a human-identical and anionic biopolymer for a wide variety of pharmaceutical applications. In particular, the low-molecular form of polySia with a characteristic chain length of 20 ± 6 sialic acid monomers (polySia avDP20) shows promising approaches in the treatment of neurodegenerative diseases.

In the first part, this dissertation describes the development and validation of an analytical method for the characterization of the actual polySia chain length as well as the quantification of defined chain length ranges by HPLC-CAD. In consideration of the GMP guideline ICH Q2 (R1), the methods were validated regarding selectivity, linearity, working range as well as limits of detection and determination. It has been shown that (poly) sialic acids can be detected between DP (*degree of polymerization*) from 1 ($MW = 309 \text{ g mol}^{-1}$) to a maximum of DP65 in a linear working range of $0.001 \text{ mg mL}^{-1} - 10 \text{ mg mL}^{-1}$. In the quantification application, a selective method for long chain (LC) polySia with a linear working range of $0.025 \text{ mg mL}^{-1} - 1 \text{ mg mL}^{-1}$ and polySia avDP20 in a range of $0.02 \text{ mg mL}^{-1} - 0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ was developed. The developed analytical method is of high relevance especially in the targeted polySia avDP20 production.

Furthermore, this work describes the process development and optimization to produce the human-identical polySia from *E. coli* K1 as well as the product purification and production of the biopharmaceutically relevant low molecular weight polySia avDP20. The cultivation conditions were initially optimized by medium optimization in shake flask experiments. Subsequently, a process upscaling was carried out in a stirred tank reactor in a 1.5 L and 25 L -scale. Based on the space-time yield, productivity was increased by 227 % from $0.339 \text{ g L}^{-1} - 0.788 \text{ g L}^{-1}$ polySia. In a pO_2 -controlled fed-batch process for high cell density cultivation, a further increase in productivity of 47 % from 1.3 to 3.7 g L^{-1} polySia was achieved. After product purification, polySia was received in a highly pure form with a chain length $> DP70$. Subsequently, the long chain polySia material was further processed into the pharmaceutically relevant polySia avDP20. In the thermal hydrolysis a time of about 55 min and a temperature of $90 \text{ }^\circ\text{C}$ were determined as optimal. In the chromatographic separation of polySia avDP20, a three-step gradient was developed successfully, whereby a total of 4.5 mg (6.1 % yield) of low molecular weight polySia with a chain length of $DP20 \pm 9$ was isolated.

Keywords: polysialic acid, process development, high cell density cultivation, GMP, validation, membrane adsorber

Kooperationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kooperationen mit unterschiedlichen Institutionen durchgeführt. Die hauptsächliche Zusammenarbeit fand mit dem Universitätsklinikum Bonn im Rahmen einer Förderung der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) statt:

Prof. Dr. Harald Neumann
Universitätsklinikum Bonn
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn (Deutschland)

Weitere kleinere Zusammenarbeiten, bei denen Materialien ausgetauscht worden sind, wurden mit der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt:

Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Medizinische Hochschule Hannover
Institut für Zelluläre Chemie
Carl-Neuberg-Str. 1
30625 Hannover (Deutschland)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Kurzfassung.....	V
Abstract	VI
Kooperationen	VII
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung und Motivation.....	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 (Poly-) Sialinsäuren	4
2.1.1 Die chemische Struktur der (Poly-) Sialinsäure.....	4
2.1.2 Natürliche Vorkommen und Funktionen	5
2.1.3 Medizinisch-/ pharmazeutische Anwendungsfelder	7
2.2 Qualitätsmanagement in der biopharmazeutischen Industrie	8
2.2.1 Validierung von analytischen Methoden	9
2.2.2 Pharmazeutische Prozessvalidierung.....	13
2.3 Biotechnologische Prozessentwicklung im Upstream	15
2.3.1 Maßstabsübertragung und Prozesstransfer	15
2.3.2 Prozesstechnische Verfahren zur Hochzeldichtekultivierung von <i>E. coli</i>	17
3 Biotechnologische Produktion von Polysialinsäure.....	19
4 Analytische Arbeiten zur Kettenlängencharakterisierung und -quantifizierung von (Poly-) Sialinsäure.....	21
4.1 Methodenentwicklung und -validierung zur Kettenlängen-charakterisierung mittels HPLC-CAD.....	23
4.1.1 Methodentransfer und Bestimmung der Detektionsgrenze.....	23
4.1.2 Bestimmung des minimal messbaren Molekulargewichts und der Linearität ...	26
4.1.3 Vergleichende Untersuchung von LC polySia mittels DMB-HPLC-FLD und HPLC-CAD.....	27

4.2	Methodenentwicklung und -validierung zur Quantifizierung von polySia mittels HPLC-CAD.....	28
4.2.1	Kalibration, Bestimmung der Linearität und Validierung	29
4.2.2	Vergleichende Anwendung von HPLC-CAD und TBA-Assay zur polySia-Quantifizierung.....	32
4.3	Zusammenfassung der analytischen Arbeiten.....	33
5	Upstream Prozess: Biotechnologische Produktion von LC polySia	35
5.1	Vergleich von Kultivierungsmedien im Schüttelkolben	35
5.2	Prozess-Upscaling der Kultivierung im Satzbetrieb.....	38
5.3	Prozess-Upscaling der Rührkesselreaktor-Kultivierung im pO ₂ -kontrolliertem Zulaufbetrieb.....	42
5.4	Prozesstransfer: Satzkultivierung im Einweg-Beutelreaktor.....	46
5.5	Zusammenfassung und Fazit zu den Upstream-Versuchen	49
6	Downstream Prozess: Aufreinigung von LC polySia	51
6.1	Produktaufreinigungsstrategie und Ausbeutebestimmung.....	51
6.2	Zusammenfassung und Fazit zu den Downstream-Versuchen.....	53
7	Produktion und Isolierung von polySia avDP20.....	55
7.1	Thermisch induzierte Hydrolyse zur Produktion von niedermolekularer polySia.....	55
7.1.1	Vergleichende Untersuchung der thermischen Hydrolyse von Colominsäure und LC polySia bei 65 °C.....	56
7.1.2	Untersuchung der thermischen Hydrolyse von LC polySia bei 90 °C.....	58
7.1.3	Untersuchung der Molekülstrukturstabilität von LC polySia bei 65 °C und 90 °C mittels ¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektroskopie	58
7.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur thermischen Hydrolyse von polySia... 60	
7.2	Verfahrensentwicklung zur Isolierung von polySia avDP20 mittels Membranadsorber-Applikation	61
7.2.1	Grobauflösende Trennung von niedermolekularen polySia-Kettenlängen mittels 10 %-Stufengradient	61
7.2.2	Hochauflösende Trennung von niedermolekularen polySia-Kettenlängen mittels 2 %-Stufengradient	63

7.2.3	3-Stufengradient zur gezielten Elution von polySia avDP20 und Abreicherung von Endotoxinen	65
7.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Membranadsorber-basierten Isolierung von polySia avDP20.....	67
8	Diskussion und Ausblick	69
9	Material und Methoden	73
9.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	73
9.2	Medien, Puffer und Lösungen	77
9.2.1	LB-Komplexmedium	78
9.2.2	Definiertes Minimal-Medium zur Hochzelldichtekultivierung	78
9.2.3	Definiertes Medium zur polySia Produktion.....	79
9.2.4	Bakterienstamm	80
9.3	Mikrobiologische Methoden.....	80
9.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	80
9.3.2	Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen.....	81
9.3.3	Anzucht der Vorkulturen.....	81
9.3.4	Bestimmung wachstumsspezifischer Parameter.....	81
9.4	Bioreaktorsysteme und Prozesssteuerungsstrategie	82
9.4.1	Glas-Rührkesselreaktor Biostat® Aplus	82
9.4.2	Edelstahl-Rührkesselreaktor Biostat® Cplus.....	83
9.4.3	Einweg-Beutelreaktor Biostat® RM Optical.....	84
9.4.4	Prozessautomatisierung mittels pO ₂ -kontrollierter Zulaufstrategie zur Hochzelldichtekultivierung	84
9.5	Offline-Analytik.....	86
9.5.1	Optischen Dichte	86
9.5.2	Biotrockenmasse.....	86
9.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	86
9.5.4	Bestimmung der polySia-Konzentration mittels TBA-Assay	87
9.5.5	Bestimmung der Glucosekonzentration.....	88
9.5.6	Bestimmung der Acetatkonzentration.....	88

9.6	Methoden zur Produktaufreinigung im DSP	89
9.6.1	Reifeprozess und Zellabtrennung	89
9.6.2	Produktaufkonzentrierung mittels Cross Flow Ultrafiltration	89
9.6.3	Ethanol-fällung.....	90
9.6.4	Behandlung mit Tonmineralien	90
9.6.5	Produktentsalzung mittels Cross Flow Dialtrafiltration	91
9.6.6	Produkt-trocknung mittels Lyophilisation	91
9.7	Methoden zur polySia avDP20 Produktion	91
9.7.1	Thermische Hydrolyse	91
9.7.2	Membranadsorber-basierte Fraktionierung mittels FPLC	91
9.8	Produktanalytik	93
9.8.1	Bestimmung der Endotoxinkonzentration	93
9.8.2	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration mittels NanoDrop™	93
9.8.3	DMB-Probenderivatisierung.....	94
9.8.4	polySia-Kettenlängencharakterisierung mittels HPLC-FLD und -CAD	94
9.8.5	HPLC-CAD zur polySia-Quantifizierung	95
9.8.6	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektroskopie	96
10	Literaturverzeichnis	97
11	Abbildungsverzeichnis	115
12	Betreute Abschlussarbeiten	117
13	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	118
	Lebenslauf.....	121

Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustauscherchromatographie	
AMD	altersbedingte Makuladegeneration	
API	active pharmaceutical ingredients	
BTM	Biotrockenmasse	[g L ⁻¹]
CAD	charged aerosol detector	
c _i	Konzentration der Substanz i	[g L ⁻¹]
CQA	critical quality attributes	
CV	column volume	
d ₀	Schütteldurchmesser	[mm]
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzen	
DP	degree of polymerization	
FLD	Fluoreszenzdetektion	
FPLC	fast protein liquid chromatography	
GAG	Glycosaminglykane	
GMP	good manufacturing practice	
HCP	host cell proteins	
HPLC	high pressure liquid chromatography	
k _{1a}	volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient	[s ⁻¹]
LOQ	Nachweisgrenze	
LOQ	Bestimmungsgrenze	
LPS	Lipopolysaccharid	
N	Bodenzahl	
n	Schüttelfrequenz/ Rührerdrehzahl	[rpm]
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül	
NMR	nuclear magnetic resonance	
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ = 600 nm	[-]
OTR	Sauerstofftransferrate	[mmol L ⁻¹ s ⁻¹]
OUR	Sauerstoffaufnahme	[mmol L ⁻¹ s ⁻¹]
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck	[%]
q	Begasungsrate	[vvm]
R	Auflösung	
ROS	reactive oxygen species	
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis	
SynCAM	synaptisches Zelladhäsionsmolekül	

t	Zeit	[h]
TBA	Thiobarbitursäure	
t_d	Teilungsrate	[h ⁻¹]
t_R	Retentionszeit	[min]
T	Temperatur	[°C]
V_L	Volumen der Fermentationsflüssigkeit	[L]
vvm	Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute	
$Y_{P/S}$	Produktausbeutekoeffizient bezüglich Substrat	[-]
$Y_{P/X}$	Produktausbeutekoeffizient bezüglich Biomasse	[-]
$Y_{X/S}$	Biomasseausbeutekoeffizient bezüglich Substrat	[-]

Griechische Symbole:

α	Trennfaktor	
μ	Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{max}	maximale Wachstumsrate	[h ⁻¹]

1 Einleitung und Motivation

Polysaccharide sind hochmolekulare Kohlenhydrate und übernehmen eine Vielzahl wichtiger Schlüsselfunktionen in den Organismen von Pflanzen, Tieren und Menschen sowie in Mikroorganismen [1,2]. Sie dienen unter anderem als Energiespeicher und Strukturbildner oder fungieren als Erkennungsmolekül in weitaus komplexeren biochemischen Prozessen. Polysaccharide bestehen aus α , β -glykosidisch-verknüpften Zuckern. Ein häufiger Baustein dieser Polymere ist Glucose. Pflanzen speichern z.B. Glucose in Form von Stärke beispielsweise als Amylose (poly- α -1,4-Glucose) oder als Amylopektin (poly- α -1,4- α -1,6-Glucose) zur mittel- bis langfristigen Energieversorgung ein. Dabei können die Stärkepolymere aus bis zu 1.200 Glucose-Einheiten bestehen. In Tieren oder Menschen wird Glucose in Form von sog. Glykogenen eingespeichert. Hierbei können die Polymerketten sogar aus bis zu 100.000 Glucose-Einheiten bestehen.

Ein in der Natur sehr häufig auftretendes Polymer ist die Cellulose. Diese besteht aus poly- β -1,4-Glucose und ist als lineares, wasserunlösliches Polysaccharid ein Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände. Darüber hinaus verfügt Cellulose über eine starke mechanische, chemische und enzymatische Stabilität. Aufgrund dessen findet Cellulose viele Anwendungsfelder, wie z.B. in der Papier- und Bekleidungsindustrie, als Zusatz in der Lebensmittelindustrie oder in derivatisierter Form als z.B. Celluloseacetat in der Membrantechnologie.

Jedoch bestehen Polysaccharide nicht nur aus Glucose. Glycosaminglykane (GAGs) sind bei Säugetieren weit verbreitet und bestehen aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten. GAGs haben wasserstrukturierende und viskositätserhöhende Eigenschaften und sind daher Bestandteil von Schleimen (Mucopolysaccharide). Hyaluronsäuren z.B. bestehen aus sich wiederholender *D*-Glucuronsäure und β -*N*-Acetyl-*D*-glucosamin. Ihre strukturellen Eigenschaften ermöglichen eine hohe Wasseraufnahme. Sie sind ein häufiger Bestandteil von Bindegeweben wie z.B. des Glaskörpers im Auge, welcher zu 2 % aus Hyaluronsäure und 98 % Wasser besteht [3].

Des Weiteren besitzen sog. Proteoglykane (stark glykosylierte GAGs) Zell-strukturierende, -stabilisierende oder schützende Funktionen und sind Hauptbestandteil von extrazellulären Matrices. Außerdem sind sie an der Signaltransduktion in Geweben oder als Erkennungsmolekül auf Zelloberflächen beteiligt [4,5].

Neben zahlreichen weiteren Oberflächenpolysacchariden stellt die Polysialinsäure (Abk. polySia) eine spezielle Gruppe dar. Das Vorkommen dieser α -2,8-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäure erstreckt sich über niedere Lebensformen wie Bakterien bis hin zu

hoch entwickelten Organismen wie den Säugetieren. Bei Säugern ist polySia an die Glykoproteine von Nerven- und Immunzellen gebunden [6,7]. Es übernimmt wichtige Funktionen in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Darüber hinaus ist polySia aber auch im adulten Nervensystem aktiv und tritt beispielsweise als posttranslationale Modifikation der fünften Immunglobulin (Ig5) -ähnlichen Einheit von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAM; CD56) oder CD36 auf [8,9]. Jüngste in vivo-Studien haben gezeigt, dass die künstliche Induktion der PolySia-Expression die Regenerationsfähigkeit beispielsweise im Gehirn erwachsener Mäuse und nach Verletzungen des Rückenmarks oder peripherer Nerven verstärkt [10,11].

Niedermolekulare Polysialinsäure wird als eine neue Substanzklasse in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), untersucht. Bei der AMD handelt es sich um eine Erkrankung der Netzhaut, die zum vollständigen Erblinden betroffener Patienten führen kann. Als Auslöser für die Erkrankung wird eine Überaktivierung des Immunsystems gesehen, wobei Fresszellen als Teil der Immunantwort toxische Sauerstoffradikale (ROS) absondern und maßgeblich zur Netzhautablösung beitragen. Im gesunden Gewebe kann diese Überaktivierung des Immunsystems und die Freisetzung der ROS durch die Bindung körpereigener Polysialinsäuren an den sog. SIGLEC-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert werden.

Eine biotechnologische Produktion der humanidentischen Polysialinsäure ist mittels *E. coli* K1 nachweislich möglich. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die intravitreale Injektion der biotechnologisch produzierten Polysialinsäure mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von DP20 (polySia avDP20) eine Freisetzung von ROS und inflammatorischer Botenstoffe unterdrückt werden können. Eine entzündungsbedingte Gefäßschädigung im Auge lässt sich somit verlangsamen [12].

Niedermolekulare polySia avDP20 soll daher als neue Wirkstoffklasse in der Behandlung der AMD validiert werden. Um die therapeutische Wirksamkeit von Polysialinsäure zu prüfen, müssen in der präklinischen Entwicklung verschiedene Schwerpunkte definiert und bearbeitet werden. Die Entwicklungsbereiche unterteilen sich hierbei in GMP-Produktion, pharmazeutische Toxikologie, klinische Prüfung und Businessplanung.

In der vorliegenden Arbeit werden die Themenschwerpunkte der GMP-Produktion bearbeitet. Hierbei soll ein effizienter Gesamtprozess zur biotechnologischen Produktion niedermolekularer Polysialinsäure entwickelt und optimiert werden. Im Upstream-Prozess sollen die Medienbedingungen in Hinblick auf gesteigerte Produktausbeuten optimiert und ein Upscaling bis hin zum 25 L Maßstab durchgeführt werden. Darüber hinaus soll zur Effizienzsteigerung des Prozesses eine Strategie zur Hochzelldichtekultivierung etabliert

werden. Im Downstream-Prozess soll der Wertstoff von kontaminierenden Medienbestandteilen und Proteinen sowie DNA oder Endotoxinen aufgereinigt werden. Des Weiteren soll ein Verfahren zur Herstellung der biopharmazeutisch relevanten niedermolekularen polySia avDP20 entwickelt werden, wobei eine thermische Hydrolyse und ein chromatographisches Verfahren mittels Membranadsorber zum Einsatz kommen. Unter Berücksichtigung von GMP-Vorgaben soll in der Prozessentwicklung ein schneller Technologietransfer in die biopharmazeutische Auftragsproduktion gewährleistet werden. Verschiedene Single-Use Applikationen kommen aus diesem Grund zum Einsatz. Außerdem soll zur Festlegung von Grenzwerten eine Prozess- und Produktcharakterisierung sowie -validierung durchgeführt werden. Unter anderem sollen hierfür neuartige analytische Verfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung der Polysialinsäurekettenlänge mittels HPLC-CAD entwickelt werden. Diese müssen ihrerseits unter Berücksichtigung international anerkannter Richtlinien untersucht und validiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 (Poly-) Sialinsäuren

2.1.1 Die chemische Struktur der (Poly-) Sialinsäure

Sialinsäuren gehören primär zu der Gruppe der Saccharide mit einem Zuckergerüst aus neun Kohlenstoffatomen. In wässriger Lösung erhält die Verbindung über die C₁-gebundene Carboxylgruppe ihren Säurecharakter (pK_s ~2,2) [13]. Neuraminsäure ist als eine von über 40 natürlich auftretenden Derivaten die einfachste Form der Sialinsäure und trägt eine C₅-gebundene Aminogruppe [13,14]. Die Derivate lassen sich in den meisten Fällen durch die Substitution der Amin- bzw. Hydroxylfunktion ableiten [15]. Die drei am häufigsten auftretenden Neuraminsäure-Derivate sind 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), 5-*N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc), 5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure (Kdn) und in Abbildung 2-1 A.-C. gezeigt. In der Natur treten Sialinsäuren häufig als Teile von biofunktionellen Polysacchariden auf, wobei die Bausteine über eine glycosidische Bindung zwischen den Hydroxylgruppen der Positionen C₂, C₈ und/oder C₉ verknüpft sind [16]. In der polymeren Form bilden Neu5Ac, Neu5Gc und Kdn die Hauptbestandteile der natürlich auftretenden Verbindungen. In Säugetieren und im Menschen findet sich ausschließlich die homologe α(2,8)-verknüpfte poly-5-*N*-Acetylneuraminsäure (Abbildung 2-1 D.).

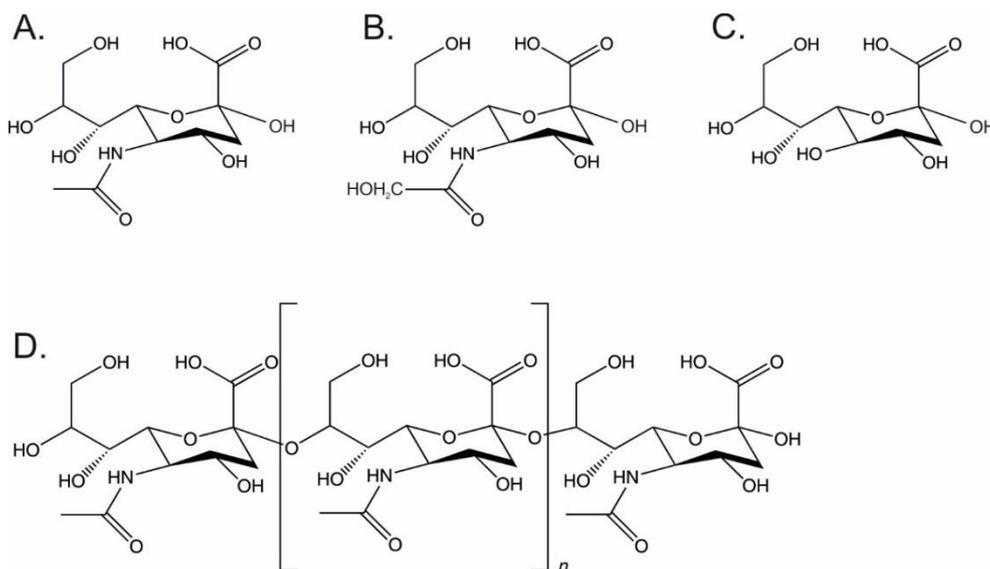


Abbildung 2-1: Chemische Struktur von A.: 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac); B.: 5-*N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc); C.: 5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure (Kdn); D.: α(2,8)-verknüpfte poly-5-*N*-Acetylneuramin-säure.

Die Polymerkettenlänge kann anhand des Polymerisationsgrades (*degree of polymerization*, DP) charakterisiert werden, wobei Oligosialinsäuren eine Länge von DP3 – DP7 und Polysialinsäuren eine Länge von \geq DP8 beschreiben [17]. Niedermolekulare polySia mit einer

Kettenlängen zwischen DP30 – 70 wird häufig auch als Colominsäure bezeichnet [18], während die hochmolekulare, langkettige polySia eine Kettenlänge von DP50 – 150 (LC polySia) und in manchen Fällen sogar bis DP400 besitzt [19–21].

In den nachfolgenden Kapiteln 2.1.2 und 2.1.3 erfolgt eine weitere Beschreibung der Polysialinsäure. Der Begriff Polysialinsäure (oder polySia) wird, falls nicht weiter erläutert, im Rahmen dieser Arbeit stellvertretend für die homopolymere $\alpha(2,8)$ -verknüpfte poly-5-*N*-Acetylneuraminsäure verwendet.

2.1.2 Natürliche Vorkommen und Funktionen

Polysialinsäuren sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorhanden. In Vertebraten kommen sie in nahezu allen Gewebeteilen vor. In Fischen zeigt sich hierbei die höchste strukturelle Vielfalt [22]. Homopolymere Formen der Polysialinsäure, bestehend aus Neu5Ac oder Kdn, treten jedoch ausschließlich in Säugetieren auf [9]. Im menschlichen Körper kann lediglich die homopolymere $\alpha(2,8)$ -verknüpfte poly-5-*N*-Acetylneuraminsäure nachgewiesen werden und zeigt eine ungleichmäßigen Verteilung in den Gewebeteilen. PolySia ist an der Entwicklung des zentralen Nervensystem beteiligt [23,24] und tritt als posttranslationale Modifikation auf der Zelloberfläche von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAMs) auf. In seiner Funktion als raumeinnehmendes Makromolekül und durch seine abstoßenden stereochemischen Eigenschaften als Polyanion kann polySia über die Bindung an Adhäsionsproteine den Zell-Zell-, sowie den Zell-Substrat-Kontakt sterisch regulieren [25–28]. Dies führt zu einer Isolation der Zelle und begünstigt somit wichtige zelluläre Prozesse [29].

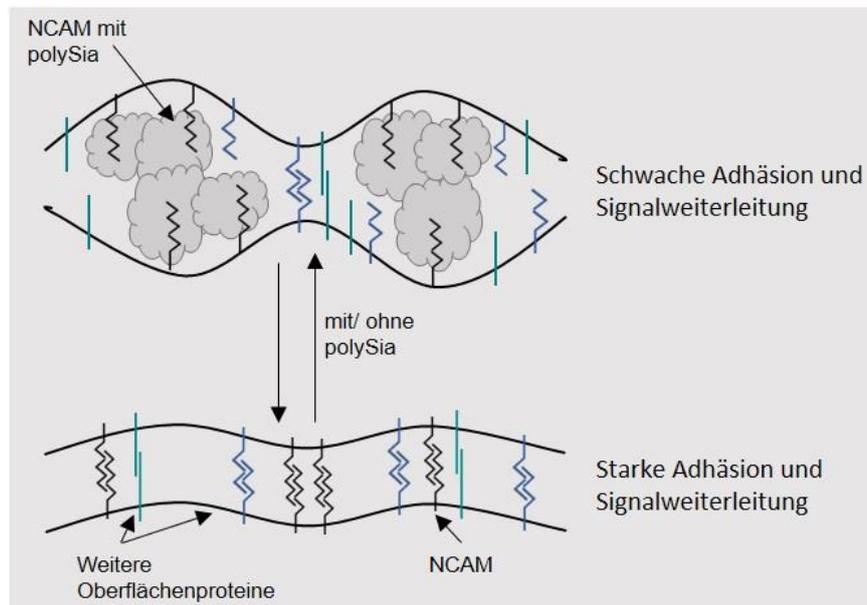


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des NCAM-vermittelten Zell-Zell-Kontaktes. Bei Anwesenheit von polySia am neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) kommt es zu einem erschwerten Zell-Zell-Kontakt. Bei Abwesenheit von polySia ermöglichen die NCAMs eine starke Adhäsion zwischen den Zellen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [30] erstellt.

Unter anderem ist polySia an der Zellmigration und -differenzierung des embryonalen Nervensystems beteiligt. Es fördert das Axonwachstum und die Entwicklung der neuronalen Plastizität im menschlichen Gehirn [26,31]. Zusätzlich interagiert es mit den zur SIGLEC-Familie gehörenden Rezeptoren des Immunsystems [32]. PolySia hat einen entscheidenden Einfluss bei der Synapsenausbildung und interagiert ähnlich wie beim NCAM mit den synaptischen Zelladhäsionsmolekülen (SynCAM) [33]. Des Weiteren lässt sich polySia in der Niere, in Natriummembrankanälen [34] und auf der Oberfläche bestimmter Tumore wiederfinden [35]. Eine besondere Bedeutung wird polySia in der Muttermilch zugetragen, wobei es endständig an heterogenen Polysacchariden vorkommt. Ein Zusammenhang zwischen dem Stillen von Säuglingen und dem Intelligenzquotienten dieser Probanden wurde untersucht, wobei man einen Einfluss der äußeren Zufuhr von Sialinsäuren und der Entwicklung des Gehirns vermutete [36,37].

Polysialinsäuren kommen nicht nur in Vertebraten und Säugetieren vor, sondern zeigen außerdem eine hohe Vielfalt bei Bakterien. Unter den Polysacchariden stellen sie jedoch nur einen kleinen Anteil dar. Die Polysaccharide sind bei Einzellern über Lipide an die Zelloberfläche gebunden, fungieren dort als Antigene und legen somit den Serotypen der Bakterien fest. Für *Escherichia coli* werden diese Antigene generell in O- und K-Serotypen unterschieden [38,39]. Beim O-Typen werden Lipopolysaccharide (LPS) über einen Lipid-A-Anker an die Zelloberfläche gebunden. Lipid A wird auch als Endotoxin bezeichnet und kann

bei einer Freisetzung im infizierten Wirt zu einer schweren Sepsis führen [40]. K-Serotypen bezeichnen Antigene, die bei Bakterien eine dichte Kapsel aus Polysacchariden auf der Zelloberfläche bilden [41] und zudem durch die Ausbildung einer Hydrathülle das Bakterium vor äußeren Einflüssen schützen und abschirmen [42,43]. Diese Polymerschicht wird auch als Glykokalix bezeichnet [44,45]. Insbesondere binden Bakterien wie *Escherichia coli* K1, *Pasteurella haemolytica* oder *Neisseria meningitidis* die humanidentische $\alpha(2,8)$ - verknüpfte poly-5-*N*-Acetylneuraminsäure über einen Phospholipidanker auf ihrer Zelloberfläche. Aufgrund dieser Oberflächenbeschaffenheit erschweren sie die humane Immunantwort [43] und können im schlimmsten Fall beim Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke eine schwere Meningitis verursachen [44].

2.1.3 Medizinisch-/ pharmazeutische Anwendungsfelder

Polysialinsäure besitzt verschiedene biologische Funktionen und bietet eine Vielzahl von medizinisch-pharmazeutischen Anwendungsmöglichkeiten.

Aufgrund der hohen Biokompatibilität von polySia sowie des gezielten Abbaus durch Endosialidasen wird im Bereich des Tissue Engineering ein Einsatz als Stützstruktur ermöglicht [46]. Hochmolekulare polySia kann in Kombination mit Hydrogelen [47] oder in der Beschichtung von Stützstrukturen die spezifische Anzucht von humanen Nervenzellen bevorteilen [48,49]. Weiterhin findet polySia Anwendung in der Impfstoffentwicklung zur Behandlung von Meningitis [16,33,50] und bietet als Tumor-assoziiertes Kohlenhydrat Behandlungsansätze in der Krebsforschung [16,31,33,51–53].

In der Medikamentenentwicklung und Formulierung führt eine Polysialisierung der Wirkstoffe, wie z.B. Insulin oder L-Asparaginase, zu einer verbesserten Wirksamkeit und -stabilität [16,54–59]. Die Halbwertszeit der Medikamente kann dadurch im menschlichen Organismus deutlich gesteigert werden [60]. In Tierexperimenten konnte dazu gezeigt werden, dass durch die Gabe von polysialisierten Insulin der Blutzuckerspiegel über einen verlängerten Zeitraum im Normalbereich gehalten werden konnte [16,57].

In der derzeitigen Forschung wird der Einsatz von niedermolekularer polySia zur Behandlung chronisch-entzündlicher, neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer oder die altersbedingte Makuladegeneration (AMD), untersucht [61,62]. Studien prognostizieren bedingt durch den demographischen Wandel und einer immer älter werdenden Bevölkerung einen Anstieg neuerkrankter Patienten mit einer AMD [63]. Die altersbedingte Makuladegeneration unterteilt sich in die feuchte und trockene AMD [64]. Während es für Patienten mit einer feuchten AMD bereits verschiedene Therapiemöglichkeiten mit *Vaskular*

Endothelial Growth Factors (VEGF) -Hemmern gibt [65–67], existieren für die Behandlung der trockenen AMD noch keine genehmigten Ansätze [65]. In der Pathophysiologie der trockenen AMD konnte gezeigt werden, dass die Erkrankung hauptsächlich auf die Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactiv oxygen species*, ROS) zurückzuführen ist und hat ein Absterben der Netzhaut zur Folge. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems wobei der Vorgang der Makuladegeneration stark durch Makrophagen und Mikroglia beschleunigt wird [65,68,69]. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die niedermolekulare polysialisierte avDP20 aufgrund ihres antiinflammatorischen Effekts auf humane Mikroglia und Makrophagen untersucht [7]. Durch Bindung von polysialisierte avDP20 an SIGLEC-11 Rezeptoren wird eine pro-inflammatorische Antwort der LPS-induzierten Mikroglia reduziert und eine Immunantwort gegen körpereigene, polysialisierte Zellen verlangsamt [7,70]. Außerdem wird bei humanen Makrophagen eine durch die Amyloid- β_{1-42} oder Zelltrümmer induzierte Produktion und Freisetzung von zellschädlicher ROS und Aktivierung mononuklearer Phagozyten durch polysialisierte avDP20 reduziert [7,46,71]. Im Mausmodell konnten bereits positive Effekte durch intravitreal-injizierte polysialisierte avDP20 gezeigt werden [65] und rechtfertigen weitere Untersuchungen zur Behandlung der trockenen AMD.

2.2 Qualitätsmanagement in der biopharmazeutischen Industrie

Eine der wichtigsten Anforderungen in der pharmazeutischen Industrie ist der Schutz von Verbrauchern und die Qualitätssicherung von Arzneimitteln [72–74]. Aus diesem Grund unterliegt dieser Industriezweig strengen Kontrollen und Auflagen [75] seitens zuständiger Behörden, wie z.B. EDQM, EMA, BfArM oder FDA. Auf internationaler Ebene lassen sich diese Richtlinien als Teil der Qualitätssicherung in der „Guten Herstellungspraxis“ (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) zusammenfassen. Qualitätsmanagementsysteme sind gemäß §3(1) des Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (Abk. AMWHV) verpflichtend für pharmazeutische Unternehmen. Das Leitdokument für Deutschland als Teil der Europäischen Union ist die Richtlinie 2003/94/EG und beinhaltet u.a. Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis in Bezug auf Qualitätsmanagement, Personal, Räumlichkeiten und Ausrüstung, Dokumentation, Produktion, Qualitätskontrolle, Auftragsherstellung, Beanstandung und Produktrückruf sowie Selbstinspektionen [76,77].

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse zur Prozessentwicklung und -validierung eines pharmazeutisch relevanten Produktes beschrieben und diskutiert. Daher werden in diesem

Kapitel die Vorschriften und Leitfäden zur Validierung von analytischen Verfahren und Prozessen in einem pharmazeutischen Umfeld einleitend vorgestellt.

2.2.1 Validierung von analytischen Methoden

Gegenstand der Validierung analytischer Verfahren ist es, die Qualifikation der Methoden anhand gut-dokumentierter, experimenteller Untersuchungen zu belegen [78]. Genauigkeit und Verlässlichkeit sind entscheidende Merkmale zur Sicherstellung der Qualität, der Sicherheit und der Wirksamkeit von Arzneistoffen bzw. -mitteln. Diesbezüglich werden bereits seit vielen Jahren regulatorische Anforderungen gestellt [78–82]. Die „*International Conference on the Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*“ (Abk. ICH) wurde 1990 als Forum zum konstruktiven Austausch von Aufsichtsbehörden und Industrie zur harmonisierten Einigung von Zulassungsanforderungen neuer Pharmazeutika zwischen Europa, USA und Japan initiiert. Die Qualitätsrichtlinie ICH Q2(R1) umfasst die Regularien zur Validierung von analytischen Verfahren und unterteilt sich in „Teil-I: Definition und Terminologie“ [78] und „Teil-II: Methoden“ [78]. Aufgrund des Harmonisierungsprozesses interkontinentaler Regularien kommt es zu gewissen Kompromissen und Inkonsistenzen. Laut ICH Q2A/B bedarf es „*dokumentierter Nachweise, dass das analytische Verfahren mit genügender und definierter Zuverlässigkeit die beabsichtigte Bewertung von Qualitätsmerkmalen des geprüften Produkts ermöglicht*“ (Zitat aus Manuskript [83], Quelle [84]). Aufgrund dessen werden in den ICH-Richtlinien die parameterbezogenen Anforderungen zur Methodvalidierung in Gehaltsbestimmung, Identitäts- und Reinheitsprüfung unterteilt. Die Reinheitsprüfung wird nach Vorgabe des Europäischen Arzneibuches [85] in Grenzprüfung (Limit-Test) und quantitativer Reinheitsprüfung unterteilt [86]. In Tabelle 2-1 sind die vorgegebenen Validierungsparameter der analytischen Verfahren gezeigt.

Im zweiten Teil der ICH Q2(R1) lassen sich zu den in Tabelle 2-1 aufgeführten Validierungsparametern weitere Detailbeschreibungen und deren Bestimmungsweisen finden. Bei der ICH handelt es sich um ein internationales Gremium von Zulassungsbehörden und pharmazeutischen Unternehmen und steht auf einer breiten Basis der sich mit Arzneimittelqualität befassenden Autoritäten und Marktteilnehmer. Den ICH-Richtlinien kommen daher nur allgemeine Gültigkeiten mit empfehlendem Charakter zu und bedürfen einer individuellen Ausgestaltung der analytischen Aufgaben im Hinblick auf Einzelheiten zur Wiederholung und Festlegung von Spezifikationen. Diese Vorgaben orientieren sich häufig am Stand der Wissenschaft für vergleichbare Methoden und/oder werden durch zuständige Zulassungsbehörden und staatliche Kontrolllaboratorien festgelegt. Zusammengefasst ist der gewählte Validierungsaufwand ein Ergebnis aus angestrebten

Methodenattributen, staatlichen Vorgaben und einer praktikablen Möglichkeit zur Durchführbarkeit [86].

Tabelle 2-1: Validierungsanforderungen nach ICH Q2(R1) [78].

Validierungsparameter	Qualitative Bestimmung	Reinheitsbestimmung	Quantitative Bestimmung	
	Identität	Quantität	Limit	Gehalt
Spezifität/Selektivität ^a	+	+	+	+
Linearität	-	+	-	+
Genauigkeit	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+
Präzision				
- Wiederholbarkeit	-	+	-	+
- Vergleichbarkeit/ Reproduzierbarkeit ^b	-	+	-	+
Detektionsgrenze (LOD)	-	-	+	-
Quantifizierungsgrenze (LOQ)	-	+	-	-

+/- normalerweise erforderlich/ nicht erforderlich; ^a fehlende Spezifität eines analytischen Verfahrens kann durch (eine) weitere Methode(n) unterstützt werden; ^b Reproduzierbarkeit nicht erforderlich für Genehmigung

Die „Robustheit“ ist ein weiterer Validierungsparameter analytischer Verfahren und wird gemäß der ICH-Richtlinien bei allen Prüfverfahren empfohlen [86]. Eine Eingliederung unter Betrachtung der Validierungsanforderungen wurde jedoch nicht vorgenommen.

Die *US Food and Drug Administration* (FDA) hat zur Validierung von analytischen Verfahren zwei Regelwerke mit allgemeinen Definitionen herausgegeben, wobei das Erste an den Anwender [80] und das Zweite an Inspektoren und Gutachter [81] gerichtet ist [87]. Die Arzneibuchkommission der EU hat ihrerseits einen „*Technical Guide*“ herausgegeben, welcher ebenfalls Richtlinien zur Validierung von analytischen Methoden beinhaltet. In beiden Fällen wurden die Definitionen und Vorgaben an die ICH-Richtlinien angeglichen. Viele dieser Regelwerke appellieren, dass der Umfang eines Validierungsprozesses und die Beurteilung der Güte eines analytischen Verfahrens im Ermessen des Analytikers liegt. Spezifische Vorgaben zu Grenz- oder Richtwerten der einzelnen Validierungselemente oder statistischen Auswertungen werden dementsprechend nicht gegeben [86,87].

Die zur Validierung von analytischen Messmethoden beschriebenen Parameter wurden in der ICH Q2(R1) definiert. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Parameter ausführlich beschrieben und ihre Bestimmungsweise erläutert.

Spezifität/ Selektivität

In der praktischen Anwendung von Richtlinien kommt es generell zu keiner Unterscheidung zwischen Spezifität und Selektivität. Vielmehr kommt es zu einer synonymen Verwendung beider Begriffe. Per Definition kommt es jedoch zu einer differenzierten Terminologie. Die Spezifität beschreibt hierbei die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne eine gegenseitige Störung zu erfassen und eindeutig zu identifizieren. Die Selektivität hingegen beschreibt die Fähigkeit einer Methode, Substanzen oder Substanzklassen ohne in der Probe enthaltene, verfälschende Komponenten zu erfassen [86]. Typische verfälschende Komponenten können z.B. Verunreinigungen, Abbauprodukte oder Matrizes (z.B. Säulenmatrizen) sein. Eine mangelnde Spezifität (= Selektivität) der zu validierenden, analytischen Methode kann durch andere, Ergebnisunterstützende Methoden kompensiert werden [78]. In der Gehaltsbestimmung eines Arzneistoffes oder der Quantifizierung von Verunreinigungen mittels HPLC-Methoden ist die Spezifität eines der wichtigsten Kriterien für die Güte der Trennung. Zur Beurteilung der Spezifität wird die Analytidentität durch z.B. den Vergleich von Retentions- bzw. Migrationszeiten detektierbarer Peaks abgesichert und mit Referenzsubstanzen verglichen. Ergänzend können weitere chromatografische Kenngrößen, wie die Auflösung R zweier kritischer Peakpaare, der Trennfaktor α oder die theoretische Bodenzahl N der einzelnen Peaks zur Beurteilung der Spezifität einer Methode herangezogen werden [84,86].

Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit, Ergebnisse mit direkt-proportionaler Konzentrationsabhängigkeit zum Analyten in einer Probe in einem zuvor festgelegten Arbeitsbereich zu bestimmen. Die lineare Konzentrationsabhängigkeit des Arzneistoffes sollte hierbei entlang des Arbeitsbereiches der analytischen Methode durch Verdünnung einer Analyt-Stammlösung und Messung von mindestens fünf randomisierten Konzentrationen evaluiert werden. Des Weiteren sollte eine visuelle Beurteilung des Analytsignals als Funktion der Konzentration erfolgen und durch geeignete statistische Auswertungsmethoden ergänzt werden. Die Überprüfung der Linearität erfolgt durch die Modellgleichung (Gleichung 2-1) und Zielfunktion (Gleichung 2-2) der linearen Regression, wobei das Prinzip der minimalen Summe der quadratischen Abweichung genutzt wird. In manchen Fällen ist zur Darstellung der Linearität zwischen den Probensignalen und der Analytkonzentrationen eine mathematische Transformation, z.B. Linearisierung durch eine log/log-Auftragung [88–91], nötig. Zur Beurteilung der Linearität und Regressionsanalyse

sollte der Regressionsplot inkl. des Korrelationskoeffizienten, des y-Achsenabschnitts, die Steigung der Regressionsgerade und die Residualsumme der quadratischen Abweichung gegeben werden.

Gleichung 2-1: $y_i = b + ax_i + \varepsilon_i$

x_i : Messwert, unabhängige Variable

y_i : Messsignal, abhängige Variable

b : y-Achsenabschnitt

a : Steigung

ε_i : Fehlerterm (Differenz zwischen Messwert und ausgeglichenen Wert)

Gleichung 2-2:
$$S = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - (b + ax_i))^2$$

S : Summe der quadratischen Abweichung

Die ICH schlägt in ihren Richtlinien einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,98$ als Maß für die Linearität vor, wobei dieser Wert lediglich die Güte der Korrelation zweier Werte in einem mathematischen Modell als Gerade oder Kurve beschreibt [84,86,87].

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich einer analytischen Methode ist der Bereich zwischen einer oberen und unteren Konzentration des Analyten in einer Probe (welche diese Konzentrationen beinhaltet), für den die analytische Methode eine angemessene Präzision, Genauigkeit und Linearität vorweist. Der Arbeitsbereich kann normalerweise direkt aus den Linearitätsuntersuchungen abgeleitet werden und ist abhängig von der vorgesehenen Methodenanwendung [78]. Für die Minimalbereiche werden gemäß der ICH Q2(R1) folgende Grenzwerte vorgeschlagen:

- In der Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen oder Fertigungsprodukten: 80 bis 120 % der zu erwartenden Analytkonzentration
- In der Gehaltseinheitlichkeit: mindestens 70 bis 130 % der zu erwartenden Analytkonzentration
- In der Bestimmung von Nebenprodukten: Ein den Behörden zu meldender Wert (Berichtsgrenze nahe der Bestimmungsgrenze die in der ICH Q3A Richtlinie

angegeben wird und von der Tagesdosis des entsprechenden Arzneistoffes abhängig ist [92]), bis 120 % der in der Spezifikation geforderten Grenze.

Prinzipiell werden Analyseergebnisse nur als zuverlässig angesehen, wenn sie im zuvor validierten und festgelegten Arbeitsbereich gemessen wurden.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ)

Die Nachweisgrenze einer analytischen Methode definiert die geringste, noch detektierbare Menge eines Analyten in einer Probe. Die Bestimmungsgrenze einer analytischen Methode hingegen beschreibt die geringste, noch quantifizierbare Menge eines Analyten in einer Probe. Hierbei sind eine ausreichende Präzision und Genauigkeit Voraussetzung. Die LOQ ist ein minimumsbegrenzender Parameter quantitativer Bestimmungsmethoden für Komponenten in Proben und wird insbesondere zur Bestimmung von Verunreinigungen und/oder Abbauprodukten verwendet. Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze analytischer Methoden eignen sich verschiedene Ansätze, die von der Art der Bestimmungsmethodik abhängig sind.

Zur Validierung instrumenteller, analytischer Methoden, z.B. HPLC, die ein Basislinienrauschen aufweisen, eignet sich vor allem der Ansatz basierend auf dem Signal-Rausch-Verhältnis (*Signal to Noise Ratio*, S/N). Das S/N wird hierbei durch den Vergleich von Messsignalen von Analytproben mit bekannter, minimaler Konzentration und Blindproben bestimmt. Für die LOD wird generell ein S/N von 3:1 bzw. 2:1 als akzeptabel angesehen, während für die LOQ ein S/N von 10:1 gefordert wird.

Darüber hinaus eignet sich zur Bestimmung der LOD und LOQ analytischer Methoden der Ansatz basierend auf einer Kalibrationskurve. Verschiedene Analytkonzentrationen im Arbeitsbereich der DL und QL sollten untersucht werden. Die Standardabweichung (des y-Achsenabschnitts) der Regressionslinie können hierbei als Standardabweichung der LOD und LOQ verwendet werden.

2.2.2 Pharmazeutische Prozessvalidierung

Die Prozessvalidierung wird als dokumentierter Beweis definiert, dass ein Prozess innerhalb von zuvor festgelegten Messgrößen verläuft und eine effektive und reproduzierbare Herstellung von Intermediaten oder aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (engl. *active pharmaceutical ingredients*, API) mit zuvor festgelegten Spezifikationen und Qualitätsmerkmalen gewährleistet [93]. Hierbei soll grundsätzlich den Fragen nachgegangen

werden, wie vertrauenswürdig ein Prozess ist, durch welche wissenschaftlich nachvollziehbaren Prozessmerkmale dies gezeigt und wie eine Prozessvalidität demonstriert werden kann [83]. Generell sollten alle Verfahren validiert werden, die als kritisch gegenüber der Qualität und Reinheit von APIs eingestuft werden, d.h. kritische Qualitätsmerkmale (engl. *critical quality attributes*, CQAs) und Kontrollstrategien müssen zuvor definiert werden (ICH Q8, [94]). Zur Validierung gibt es laut ICH Q7 drei verschiedene Ansätze: der prospektive, der simultane und der retrospektive Ansatz.

Die prospektive Validierung von API-Prozessen sollte vor einer kommerziellen Vermarktung der finalen Medikamente abgeschlossen sein und stellt den bevorzugten Ansatz zur Prozessvalidierung dar. Eine simultane Prozessvalidierung kann durchgeführt werden, wenn:

- nur eine begrenzte Anzahl von API-batches produziert wurde,
- API-batches nur unregelmäßig produziert werden, oder
- API-batches durch einen validierten, jedoch modifizierten Prozess produziert wurden.

Vor Abschluss der simultanen Prozessvalidierung können die batches nach einer gründlichen Untersuchung und Testung für eine kommerzielle Vermarktung des finalen Medikamentes freigegeben werden.

Die retrospektive Validierung basiert auf Grundlage bereits ermittelter Daten gut-etablierter Prozesse, die durch Änderung von z.B. Rohmaterialien, Ausrüstung, Systemen, Einrichtungen oder Produktionsprozessen keinen signifikanten Einfluss auf die API-Qualität hatten [93]. In einer offiziellen Bekanntmachung des Bundesministeriums für Gesundheit und des Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz vom 08.04.2019 wurde jedoch mitgeteilt, dass eine retrospektive Validierung als Ansatz nicht mehr akzeptiert wird [95].

Um bei einem Prozess Scale-Up vom Labor- über den Pilot- zum Produktionsmaßstab die Wiederholung von zeitaufwändigen und kostenintensiven Untersuchungen von CQAs für jede einzelne Skalierung zu vermeiden, ist das Dokumentieren von wichtigen Informationen während der Prozessentwicklung und -optimierung von großer Bedeutung. Diese Informationen können als Grundlage zur Rechtfertigung dienen, dass ein Prozess Scale-Up ohne Konsequenzen für die Produktqualität durchgeführt werden kann. Insbesondere kann dies für Produktionsprozesse variabler Größe von Vorteil sein, bei denen die Produktqualität prozessgrößenunabhängig ist. Andernfalls würde eine Revalidierung durchgeführt werden müssen [96].

2.3 Biotechnologische Prozessentwicklung im Upstream

2.3.1 Maßstabsübertragung und Prozesstransfer

Der Markt für biotechnologische Produkte steigt stetig. Allein im Jahr 2018 wurde mit Biopharmazeutika ein Umsatz von 11,4 Milliarden Euro erzielt und macht damit 27,4 % des gesamtdeutschen Pharmamarktes aus [97]. Aufgrund dessen wird die Entwicklung effizienter Bioprozesse mit hohen Ausbeuten im Produktionsmaßstab immer wichtiger [98]. Lösungsansätze für eine kostengünstige Bioprozessentwicklung und -optimierung bieten Durchmusterungsstudien in miniaturisierten Bioreaktorsystemen, z.B. Mikrobioreaktoren wie BioLector® von m2p-laps oder ambr® 15 von Sartorius, bei denen verschiedene Kultivierungsbedingungen im Hochdurchsatz parallel untersucht werden können [99,100]. Eine weitere Herausforderung stellt eine spätere Übertragung der im Kleinmaßstab entwickelten Kultivierungsstrategie auf industrielle Produktionsanlagen dar [98]. Für eine erfolgreiche Maßstabsübertragung existieren verschiedene Ansätze und Kenngrößen [101,102], die im Folgenden vorgestellt werden sollen. Eine geometrische Ähnlichkeit der Bioreaktorsysteme, z.B. die Form des Kessels, das Verhältnis zwischen Reaktorhöhe und -durchmesser (H/D) sowie das Verhältnis zwischen Rührer- und Reaktordurchmesser (d_R/D) [103], spielt für viele Kenngrößen eine entscheidende Rolle. In der Realität ist diese jedoch häufig nur schwer zu erreichen [102,104].

Die Rührergeschwindigkeit und die damit einhergehende Scherrate sind wichtige Parameter von Bioprozessen mit scherempfindlichen oder mycelbildenden Mikroorganismen. Es besteht eine Abhängigkeit zur Rührergeschwindigkeit und dem Reaktorinnendurchmesser. Bei einer Maßstabsvergrößerung kommt es im Reaktor bei konstanter Rührerspitzen-geschwindigkeit häufig zu einem verringerten Leistungseintrag; negative Auswirkungen auf die Sauerstofftransferrate sind die Folge [102,104].

Ein weiterer Ansatz in der Maßstabsübertragung ist die Betrachtung der Reynoldszahl des Rührers, die über verschiedene Maßstäbe konstant gehalten werden kann. Die Reynoldszahl ist als Kennzahl für Bioprozesse jedoch weniger geeignet, da hierbei der Einfluss der Begasung auf den Prozess unberücksichtigt bleibt [105]. Hinzukommend steigt i.d.R. die Reynoldszahl des Rührers mit dem Reaktionsvolumen [102,104].

In industriellen Bioreaktoren mit großen Reaktorvolumina gestaltet sich eine ideale Durchmischung als Herausforderung und ist i.d.R. nicht möglich [98]. Aufgrund dessen wird hierbei häufig die Mischzeit der Reaktoren als Kennzahl der Maßstabsübertragung herangezogen. Das Erreichen vergleichbarer Mischzeiten ist jedoch in konventionellen Reaktorsystemen variabler Maßstäbe kaum realisierbar. Während die Mischzeiten von

Reaktoren im Labormaßstab im niedrigen Sekundenbereich liegen, sind für industrielle Anlagen Mischzeiten von mehreren Minuten realistisch [102] und führen zum Entstehen von Substrat-, pH- oder pO_2 -Gradienten [98,104,106].

Eine häufig zum Einsatz kommende Kennzahl für die Maßstabsübertragung von biotechnologischen Prozessen ist der volumetrische Leistungseintrag [102]. Hierbei ergibt sich jedoch die Problematik, dass bei konstanten Leistungseintrag und zunehmenden Reaktorvolumen die Zirkulationszeit, die Mischzeit sowie die Rührerspitzen-geschwindigkeit und die damit einhergehende Scherrate steigen [107]. Eine Maßstabsübertragung basierend auf dem volumetrischen Leistungseintrag kann somit zu überdimensionierter und unnötig kostenintensiven Motoren führen [102,104].

Für viele Bioprozesse ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) eine wichtige Kennzahl zur Maßstabsübertragung, wobei eine ausreichende Sauerstoffversorgung essenziell für das Wachstum und die Produktbildung aerober Mikroorganismen ist. Grenzwerte von 10 bis 30 % Luftsättigung sorgen bei Kultivierung von z.B. Hefen oder *E. coli* bereits für optimale Bedingungen des Bioprozesses [102]. Die nicht-ideale Durchmischung innerhalb des Reaktors industrieller Anlagen kann bei einer Maßstabsübertragung basierend auf dem pO_2 zu starken Schwankungen führen [106]. Die Messung des pO_2 sollte daher an kritischen Bereichen des Reaktors, wie z.B. am Ort der Substratzugabe, durchgeführt werden, sodass ein Unterschreiten des kritischen pO_2 -Grenzwertes verhindert werden kann [104].

Der volumenbezogene Sauerstofftransportkoeffizient ($k_L a$) und die davon linear abhängige Sauerstofftransfer rate (OTR) sind eng mit dem im Medium vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck verknüpft. Der Sauerstoffeintrag in Bioreaktoren lässt sich mit dem Penetrationsmodell beschreiben. Hierbei wird unter Betrachtung der Oberflächenerneuerungs- oder der Zweifilmtheorie angenommen, dass der gesamte Sauerstofftransportwiderstand auf Seite der Flüssigphase liegt und die zelluläre Sauerstoffaufnahme rate der Sauerstofftransfer rate entspricht [108]. Für die OTR ergibt sich der in Gleichung 2-3 dargestellte Zusammenhang in Abhängigkeit zur Differenz zwischen der Sauerstoffsättigungskonzentration $c_{O_2}^*$ und der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration c_{O_2} im Medium [102]. Der $k_L a$ setzt sich aus dem flüssigkeitsseitigen Stoffdurchgangskoeffizienten k_L und der volumenspezifischen Stoffaustauschfläche a der Flüssigphase zusammen.

$$\text{Gleichung 2-3: } OTR = OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2})$$

OTR : Sauerstofftransfer rate, $mmol L^{-1}s^{-1}$

OUR : Sauerstoffaufnahme rate, $mmol L^{-1}s^{-1}$

$k_L a$: Volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s^{-1}

$c_{O_2}^*$: Sauerstoffsättigungskonzentration, $mmol L^{-1}$

c_{O_2} : Sauerstoffkonzentration im Medium, $mmol L^{-1}$

Der $k_L a$ ist abhängig vom Prozess und variiert im Prozessverlauf aufgrund von Änderungen der Medienzusammensetzung. Diesbezüglich eignet sich auch diese Kennzahl nur bedingt für eine Maßstabsübertragung von Bioprozessen [102]. Bei bekannten $k_L a$ und der Annahme, dass die Sauerstoffkonzentration im Medium $c_{O_2} = 0 mmol L^{-1}$ ist, kann unter vereinfachter Betrachtung die maximal mögliche Sauerstofftransferrate OTR_{max} im Bioreaktor für definierte Betriebsbedingungen im zellfreien Medium bestimmt werden. Unter der Voraussetzung, dass bei dieser OTR_{max} im Kleinmaßstab keine Limitierungen auftreten, kann diese Kennzahl zur Maßstabsübertragung verwendet werden [102,104].

Für eine erfolgreiche und reibungslose Maßstabsübertragung von Bioprozessen müssen sämtliche Parameter und Größen, die eine Kultivierung beeinflussen können, bekannt sein. Hinzukommend muss der Zusammenhang von einigen der beschriebenen Größen, wie Leistungseintrag und Rührerspitzen geschwindigkeit, berücksichtigt werden. Für die Maßstabsübertragung von biotechnologischen Prozessen zur Kultivierung von aeroben Mikroorganismen wie Hefe oder *E. coli* eignen sich vor allem Kennzahlen wie pO_2 , $k_L a$ oder OTR [102,104].

2.3.2 Prozesstechnische Verfahren zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli*

In der biotechnologischen Wert- und Wirkstoffproduktion gehört *E. coli* zu den wichtigsten Organismen. Zur Entwicklung eines effizienten Prozesses und zur Maximierung der volumetrischen Produktivität eignen sich vor allem Verfahren zur Hochzelldichtekultivierung. Das Erreichen hoher Zelldichten gestaltet sich als nicht trivial, sodass verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden müssen. U.A. muss die Akkumulation wachstumshemmender Stoffwechselnebenprodukte, wie z.B. Acetat oder Ammoniak, vermieden werden. Gleichzeitig müssen Nährstoffe in angemessener Konzentration im Medium vorliegen und dürfen weder in zu hoher, inhibierender bzw. zu niedriger, limitierender Menge vorhanden sein. Zu hohe Glucosekonzentrationen können z.B. als Folge des Überschussmetabolismus und einer unvollständigen Oxidation zu einer verstärkten Acetatbildung führen. Diesbezüglich wurden verschiedene Zulaufstrategien zur Hochzelldichtekultivierung entwickelt [109–113]. Im Folgenden werden verschiedene Verfahren der Bioprosesstechnik vorgestellt, über die ein Zulauf erfolgen und eine Akkumulationsprävention von Acetat gewährleistet werden kann. Generell lassen sich Zulaufstrategien in gesteuerte und geregelte Verfahren unterteilen [114].

Bei gesteuerten Verfahren erfolgt der Zulauf mit konstanter [115] oder variabler [116] Zulaufmenge anhand zuvor festgelegter Parameter. Dabei werden prozessspezifische Parameter oder daraus abgeleitete Größen nicht berücksichtigt. Bei einem exponentiellen Zulauf kann die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit konstant gehalten werden. Hierzu muss für das Erreichen optimaler Ergebnisse jedoch eine umfangreiche Kenntnis zum Wachstumsverhalten der Mikroorganismen vorhanden sein. Zusammenfassend besteht bei den gesteuerten Verfahren eine Abhängigkeit zum Wachstumsverhalten der Mikroorganismen und zur Medienzusammensetzung.

Bei geregelten Verfahren kann der Zulauf prinzipiell über drei verschiedene Varianten realisiert werden. Die Prozessgröße kann eine direkt messbare Betriebsvariable, wie z.B. pO_2 und pH im Medium oder der CO_2 -Gehalt der Abluft des Bioreaktors sein und wird durch den Zulauf auf einen konstanten Wert geregelt [109,116,117].

1. Bei pO_2 -geregelter Zulaufverfahren wird der Verbrauch vom gelösten Sauerstoff im Medium beim Wachstum der Bakterien ausgenutzt. Anhand des feedbackkontrollierten pO_2 -Signals wird der Zulauf des limitierenden Substrats in einen zuvor festgelegten Arbeitsbereich geregelt, welches unter der Bedingung eines substratlimitierten Organismus steigt und vice versa [117,118].

Alternativ kann der Prozess durch ein pH-kontrolliertes Zulaufverfahren geregelt werden. Unter substratlimitierenden Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Verstoffwechslung von organischer Säure und führt zu einer Freisetzung von Ammoniak ins Medium. Dies führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes und kann i.d.R. durch die automatische Zufuhr von entsprechenden pH-Stellmitteln kompensiert werden. Da der Stoffwechsel der Bakterien eng mit dem Sauerstoffverbrauch und der Kohlendioxidproduktion verknüpft ist, kann der Substratverbrauch anhand dieser Parameter bestimmt und der Zulauf geregelt werden [119].

2. Durch die Bestimmung der Biomassekonzentration kann z.B. die spezifische Wachstumsrate μ der Mikroorganismen indirekt erfasst und durch eine entsprechende Substratzufuhr auf einen konstanten Wert reguliert werden [120].
3. Die Konzentration eines limitierenden Substrats wird online überwacht und kann eine direkt erfasste Prozessgröße, wie z.B. μ durch einen computergeregelten Zulauf auf einen konstanten Wert geregelt werden [121].

Zusammenfassend führen die oben beschriebenen Verfahren bei erfolgreicher Implementierung der Zulaufstrategie zu einer optimalen Nährstoffversorgung und Biomassewachstum. Die Akkumulation wachstumshemmender Stoffwechselnebenprodukte kann durch regulierte Wachstumsraten verhindert und Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 125 g L^{-1} und höher erreicht werden [122].

3 Biotechnologische Produktion von Polysialinsäure

Polysialinsäure wird für verschiedene biopharmazeutische Anwendungen untersucht. In der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen soll polySia avDP20 hierbei als biopharmazeutisch-relevante Substanz in klinischen Studien getestet werden [7,65]. Die Zulassung neuartiger Wirkstoffe und deren Produktion wird, z.B. seitens FDA und BfArM, streng reglementiert, sodass die Entwicklung eines GMP-konformen Produktionsverfahrens mit entsprechenden analytischen Methoden zur Prozesscharakterisierung und -validierung erforderlich wird. Die in Abbildung 3-1 präsentierte, schematische Darstellung zeigt den in dieser Arbeit aufgestellten Herstellungsprozess von polySia avDP20, welcher unter Berücksichtigung aktueller GMP-Regularien einen schnellen Transfer der Produktionsstrategie in eine Reinraum-Umgebung ermöglichen soll. Der Prozess ließ sich in drei grundlegende Teilsegmente aufteilen. Der erste Teil, der Upstreamprozess, umfasst hierbei die biotechnologische Produktion von LC polySia mittels *E. coli* K1 im Kultivierungsprozess und die nachfolgende Zellabtrennung. Im zweiten Teil, dem Downstreamprozess, wird LC polySia aus dem zellfreien Zentrifugationsüberstand aufgereinigt und von Kontaminanten wie Proteinen, DNA und Salzen separiert. Im letzten Teil des Produktionsprozesses wird die zuvor gewonnene und hochreine LC polySia mittels thermischer Hydrolyse und Ionenaustauschchromatographie zum Zielprodukt polySia avDP20 weiterverarbeitet und Endotoxine gleichzeitig abgereichert.

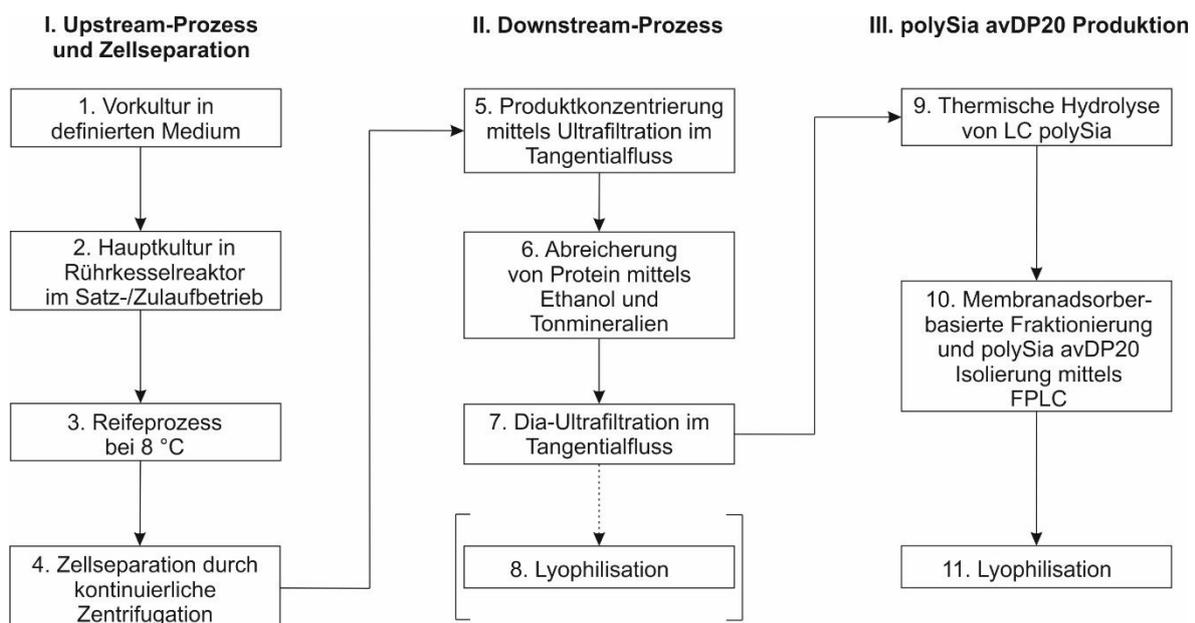


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des aktuellen polySia avDP20 Produktionsprozesses.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Upstream-Prozess hinsichtlich einer Hochzelldichtekultivierung optimiert und somit eine effiziente Produktion von polySia realisiert werden. Der

anschließende Downstream-Prozess konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben werden [77] und wurde in dieser Arbeit angepasst. Außerdem wurde der Prozess um den Schritt zur Produktion von polySia avDP20 erweitert. Darüber hinaus wurde neben dem Herstellungsprozess die Methodenentwicklung und -validierung eines analytischen Verfahrens zur Prozess- und Produktcharakterisierung mittels HPLC-CAD als zweiter Schwerpunkt bearbeitet. Im nachfolgenden Kapitel werden zunächst die analytischen Arbeiten zur Kettenlängen-Charakterisierung und Quantifizierung mittels HPLC-CAD vorgestellt. Im Anschluss werden die Ergebnisse zur biotechnologischen Produktion und Aufreinigung von LC polySia sowie der Weiterverarbeitung zu polySia avDP20 gezeigt.

4 Analytische Arbeiten zur Kettenlängencharakterisierung und -quantifizierung von (Poly-) Sialinsäure

Die Herstellung der biologisch aktiven und pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 bedarf zur Charakterisierung des Produktionsprozesses schneller und präziser analytischer Methoden. Die benchmarkenden Methoden, wie die DMB-HPLC-FLD (HPLC Analyse und Fluoreszenzdetektion (FLD) von 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzen (DMB) derivatisierten Analyten) zur polySia-Kettenlängenbestimmung sowie der Thiobarbitursäure (TBA)-Assay zur polySia-Quantifizierung, bieten hierbei lediglich eingeschränkte Möglichkeiten.

Die bereits vielseitig beschriebene DMB-HPLC-FLD ist derzeit die bevorzugte Methode zur Kettenlängencharakterisierung von polySia. Inoue et al. beschrieben hierbei eine ultrasensitive Methode zur Bestimmung des Polymerisationsgrades von polySia bis zu einer Kettenlänge von DP90 [123]. Demzufolge werden polySia-Proben mit DMB unter mild-sauren Bedingungen für 24 h derivatisiert. Das DMB reagiert dabei mit der α -keto-Carboxylgruppe am reduzierenden Ende der terminalen Sialinsäure [124]. Als Resultat der Säure-katalysierten Kondensationsreaktion entsteht das 6,7-Methylenedioxy-2(1H)-quinoxalin-Derivat [125] und kann mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion gemessen werden. Das DMB-polySia wird bei 372 nm angeregt und emittiert bei 456 nm.

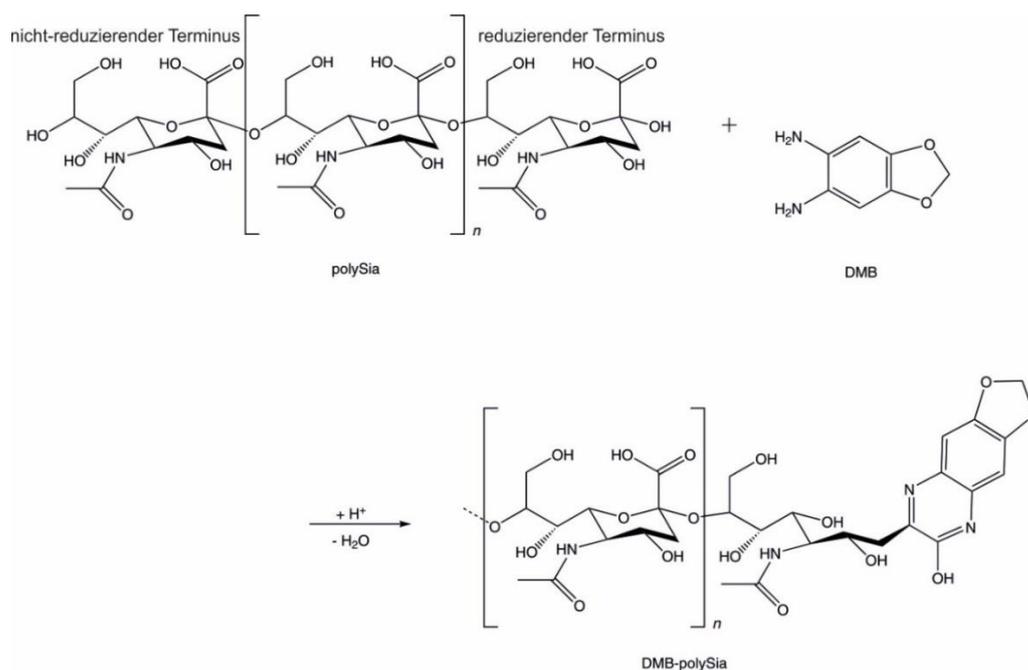


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion zwischen polySia und DMB unter mild-sauren Bedingungen zur Kettenlängencharakterisierung mittels HPLC-FLD Analyse zwischen 372 nm und 456 nm

Aufgrund der sauren Bedingungen während der Derivatisierung kommt es zu einer partiellen Hydrolyse der polySia und einer Produktion von Kettenlängen zwischen DP1 bis DPn (n = maximale Kettenlänge). Das primäre Abbauprodukt der Hydrolyse ist das monomere Neu5Ac [123,125–128], das unter den sauren Bedingungen akkumuliert wird. Hinzukommend wurden für längere polySia-Ketten höhere Depolymerisationsraten beobachtet [126]. Diese Gegebenheiten stellen gemäß der Interpretation der ICH Q6B Richtlinie [129] und in Hinblick auf eine effiziente polySia avDP20 Produktion deutliche Nachteile dar. Eine Bestimmung und Detektion der in den Fraktionierungsproben der polySia avDP20 Produktion tatsächlich enthaltenen polySia-Kettenlänge ist demnach nicht möglich. Diese Methode erfordert darüber hinaus eine aufwendige und zeitintensive Probenderivatisierung [126]. Außerdem muss DMB stabilisiert und vor Licht geschützt werden, wodurch sich eine hohe Fehleranfälligkeit ergibt [125].

Die Bestimmung freier Sialinsäure-Konzentrationen wird üblicherweise mittels des TBA-Assays und einer kolorimetrischen Messung durchgeführt [130,131]. Zur Quantifizierung von Oligo- und polySia wurde der Assay von Roy et al. zunächst modifiziert [132] und später durch Rode optimiert [2,133,134]. Die Methode umfasst ein vierstufiges Prozedere, wobei Oligo- und polySia zunächst unter sauren Bedingungen in die Sialinsäuremonomere mittels Phosphorsäure bei 70 °C für 18 h hydrolysiert werden. Die erhaltenen freien Sialinsäuren werden in der Gegenwart von Periodsäure zu β -Formylbrenztraubensäure oxidiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit Natriumarsenit reduziert. Zuletzt erfolgt eine Zugabe von Thiobarbitursäure und eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C, wobei das rötliche Chromophor Malondialdehyd-TBA₂ [135] entsteht, das quantitativ bei 549 nm detektiert werden kann. Nachteilig bei dieser Methode ist zum einen die lange Probenvorbereitung von ca. 19 h. Zum anderen kommt zur Detektion von polySia eine Hydrolyse der Polymerkette zum Tragen, sodass eine Quantifizierung spezifischer Kettenlängen in einer Probenmischung nicht möglich ist.

Alternativ bietet sich zur schnellen und zuverlässigen Untersuchung der polySia-Kettenlänge und -quantität, bzw. der Quantität der einzelnen definierten Kettenlängen, die apparative Anwendung der *charged aerosol detector* (CAD)-gekoppelten HPLC an [136]. CAD-Sensoren wurden in den letzten 16 Jahren entwickelt [137] und erlauben die Detektion von pharmazeutisch relevanten Komponenten, die keine eigene UV-Absorption aufweisen [136,138–144]. Der Detektor wird daher als „universell“ bezeichnet und ermöglicht die Detektion von allen nicht-flüchtigen und semi-flüchtigen (mit reduzierter Response) Analyten. Analytische Eigenschaften, wie z.B. die molare Absorption oder Protonenaffinität, sind stabil und zeigen keinen signifikanten Einfluss gegenüber der Response Magnitude. Der CAD ist mit Elutionsgradienten kompatibel und zeigt eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit. Bei

einer Detektion mittels CAD werden die Säuleneluenten zunächst mit Stickstoff zerstäubt. Nach der Evaporation bilden die trockenen Analyten Partikel und erhalten durch Kollision mit positiv-geladenen Stickstoff-Kationen eine Ladung. In der Detektorzelle wird anschließend die elektrische Ladung der Analyten gemessen. Da der CAD für nicht-flüchtige Analyten limitiert ist, dürfen ausschließlich flüchtige Puffer verwendet werden [145]. Hinzukommend haben die Flussrate, die Temperatur und die Zusammensetzung der mobilen Phase einen großen Einfluss auf das CAD-Signal [136,139,146]. Eine weitere Herausforderung in der Implementierung des CADs ist die Kalibration von Analyten, wobei eine nicht-lineare Abhängigkeit des Signals zur Peakfläche für höhere Analytkonzentrationen [137,147] und eine (semi-) lineare Abhängigkeit für geringe Konzentrationen beschrieben wird [91,148].

Die Methodenentwicklung und -validierung zur Prozess- und Wertstoffanalytik unterliegt vor allem im Kontext eines pharmazeutischen Umfeldes strengen Reglementierungen. Verschiedene GMP-Leitfäden bieten hierzu eine international akzeptierte Zusammenstellung solcher Validierungsmethoden an. Insbesondere im Leitfaden ICH Q2(R1) liegt der Fokus auf der Validierung analytischer Verfahren [149] und konnte zu Teilen in dieser Arbeit in der Methodenentwicklung zur (Poly-) Sialinsäure-Kettenlängencharakterisierung und Quantifizierung mittels HPLC-CAD bearbeitet werden. Einige dieser Ergebnisse wurden bereits in Boßmann et al. publiziert [150].

4.1 Methodenentwicklung und -validierung zur Kettenlängencharakterisierung mittels HPLC-CAD

4.1.1 Methodentransfer und Bestimmung der Detektionsgrenze

Die Performance der HPLC-CAD sollte zur Bestimmung des Polymerisationsgrades und Kettenlängencharakterisierung im Vergleich zur bereits etablierten DMB-HPLC-FLD Methode [123] untersucht werden. Ziel des Methodentransfers sollte sein, dass eine schnelle und verlässliche Probenanalytik ermöglicht werden kann und dass die Polymerstruktur durch die Bedingungen des Methodensetups unverändert bleibt. Zur Evaluierung des Methodentransfers wurde kommerzielle Colominsäure als Modellanalyt verwendet und der Polymerisationsgrad mittels DMB-HPLC-FLD und HPLC-CAD (Abbildung 4-2 a. und b.) vergleichend bestimmt. Darüber hinaus wurde zur Methodvalidierung der HPLC-CAD und zur Bestimmung der Sensitivität kommerzielle Oligosialinsäure mit einem charakteristischen Polymerisationsgrad von DP 4 (Abbildung 4-2 c.) sowie kommerzielle Colominsäure (Abbildung 4-2 d.) untersucht.

In Abbildung 4-2 a. und b. werden die Chromatogramme kommerzieller Colominsäure gezeigt, welche mittels DMB-Derivatisierung und HPLC-FLD Messung in a. und HPLC-CAD Messung in b. generiert wurden. In der Untersuchung von DMB-derivatisierter Colominsäure mittels Fluoreszenzdetektion wurde eine maximale Kettenlänge von \sim DP80 gemessen. Die Peakintensität nimmt mit steigender Kettenlänge ab, wobei die Signalintensitäten zwischen \sim 0 und 100 mV variieren. Die höchsten Peakintensitäten wurden hauptsächlich für Mono- und OligoSia gemessen. Dies ist ein typisches Verhalten der Polymerkettenlängenbestimmung mittels DMB-HPLC-FLD [134] und ein Resultat der unbeabsichtigten Akkumulation niedermolekularer Kettenlängen, die während der Derivatisierungsreaktion aufgrund der sauren Bedingungen durch partielle Hydrolyse der Polymerkette entstehen. Hinzukommend werden hochmolekulare Polymerketten leichter hydrolysiert und niedermolekulare Polymerketten gleichzeitig effektiver derivatisiert [126].

Das Chromatogramm der nicht-derivatisierten Colominsäure, welches mittels HPLC-CAD gemessen wurde, zeigte eine maximale Kettenlänge von \sim DP65 und variierende Signalintensitäten in einem Bereich zwischen \sim 0 und 20 mV. Anders als bei der DMB-HPLC-FLD wird bei der HPLC-CAD Messung kein Signal-verstärkendes Fluorophor verwendet. Das gemessene CAD-Probensignal stellt somit die tatsächliche Netto-Intensität des Analyten dar. Insgesamt wurde eine Signaldifferenz zwischen dem Proben- und Referenzsignal bei einer Retentionszeit zwischen \sim 50 bis 85 min gemessen. Der Anstieg des Probensignals und die Abgrenzung zur Referenz kann zum einen durch einen insuffizienten Elutionsgradienten hervorgerufen werden. Zum anderen stellen die hohen Salzkonzentrationen des Gradientenprofils eine Limitierung in der Elutionsperformance dar. Als Folge kommt es in beiden Fällen zu einer geringen Auflösung ($R_s < 1,5$) und einer Überlagerung der einzelnen Probenpeaks [151] und ist vor allem für Polysialinsäuren höheren Polymerisationsgrades beschrieben [21,126,152].

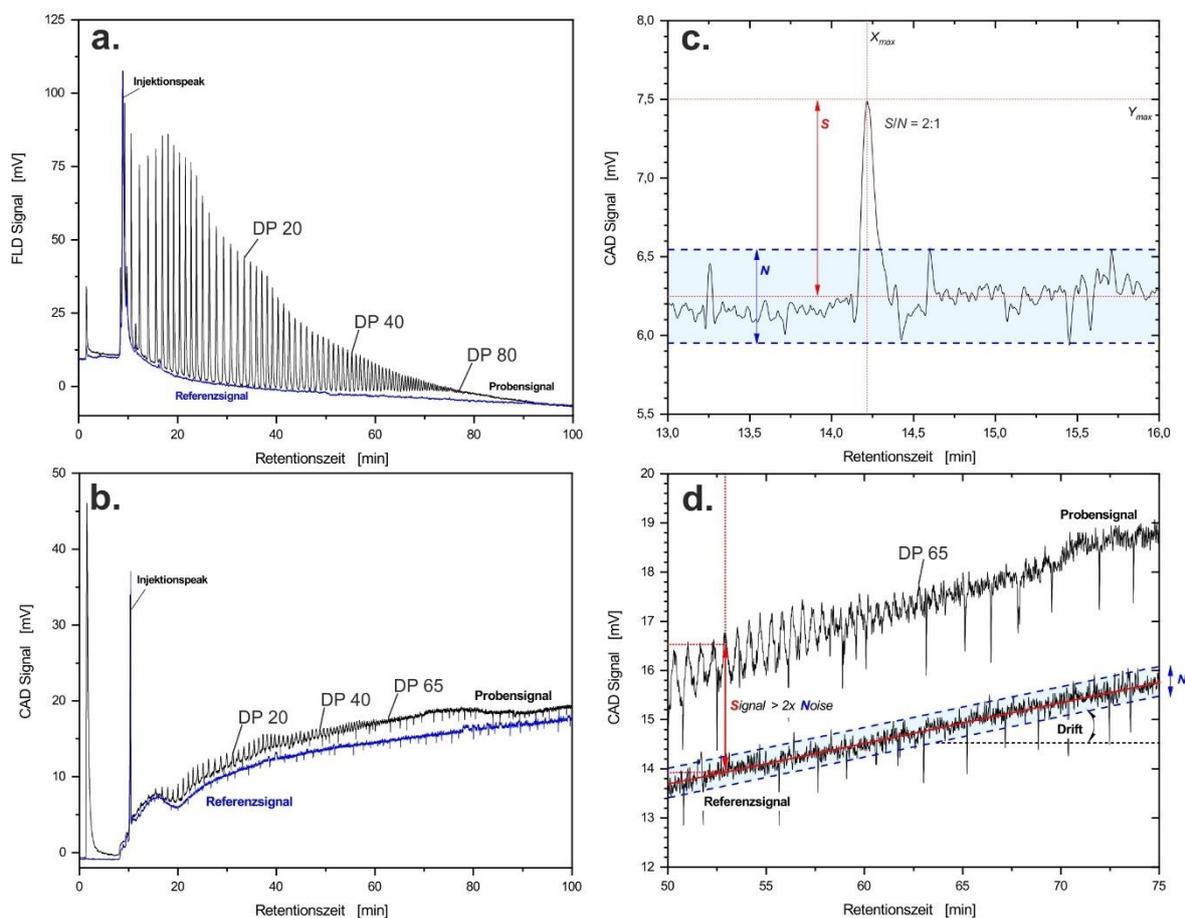


Abbildung 4-2: Messung von Referenzanalyten zur Methodenentwicklung und -validierung. DMB-HPLC-FLD Messung von DMB-derivatisierter Colominsäure (a.); HPLC-CAD Messung von Colominsäure (b.); Bestimmung von LOD mittels S/N am Beispiel des Referenzanalyten DP4 (c.). Das ermittelte S/N betrug 1,2 mV/ 0,6 mV und entspricht einem LOD von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; Bestimmung der maximal-detektierbaren Kettenlänge für Colominsäure in Abhängigkeit des S/N (d.). Zur Messung der Referenzsignale wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Um die HPLC-CAD Methode zur Kettenlängencharakterisierung zu validieren, wurde zunächst die Sensitivität bestimmt. Hierzu wurde die LOD anhand des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit einem S/N von 2:1 ermittelt [149]. Als Modellanalyten wurden ein kommerzieller OligSia-DP4-Standard und Colominsäure verwendet. Wie in Abbildung 4-2 c. zu sehen ist, konnte für das Signalrauschen ein Wert von $N = 0,6 \text{ mV}$ ermittelt werden. Das Detektionslimit für Analyten liegt demnach bei $S = 1,2 \text{ mV}$ und entspricht einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. In der Detektion von Colominsäure konnte eine maximale Kettenlänge von DP65 bestimmt werden (Abbildung 4-2 b. und d.). Zwar ist die Bestimmung höherer Kettenlängen unter Verwendung des $S/N = 2:1$ denkbar, jedoch müsste hierfür die Auflösung der Probenpeaks und der Elutionsgradient insbesondere für höhere Kettenlängenbereiche optimiert werden.

Zusammenfassend konnte die Methode zur Kettenlängencharakterisierung erfolgreich auf das CAD-Detektorsystem übertragen werden. Der Hauptvorteil dieser Methode ergibt sich

vor allem durch die direkte Probedetektion und der erheblichen Zeitersparnis von 24 h. Zudem ist der CAD äußerst zuverlässig und erlaubt die Detektion des Polymers ohne eine ungewollte Hydrolyse und damit verbundene Änderungen in der Struktur. Die HPLC-CAD ermöglicht demnach zum ersten Mal die Bestimmung der tatsächlichen Kettenlängenverteilung von polySia. In Abhängigkeit des S/N konnte gezeigt werden, dass der CAD sich zur Detektion von Kettenlängen bis maximal DP65 eignet. Die Detektion höherer Kettenlängen > DP65 ist prinzipiell denkbar. Hierzu müsste jedoch eine weitere Optimierung des Puffersystems und des Elutionsgradienten vorgenommen werden.

4.1.2 Bestimmung des minimal messbaren Molekulargewichts und der Linearität

Die HPLC-CAD soll in seiner Anwendung zur Kettenlängencharakterisierung eingesetzt werden. Dabei liegt der Anwendungsfokus vor allem auf der Prozessvalidierung zur gezielten Herstellung und Isolierung von polySia avDP20. Um eine präzise Kettenlängencharakterisierung zu gewährleisten, ist die Bestimmung des minimal messbaren Molekulargewichtes, bzw. des geringsten Polymerisationsgrades notwendig. Hierzu wurde kommerzielle Sialinsäure (Neu5Ac) sowie OligoSia mit Kettenlängen von DP2, DP4 und DP6 analysiert (Abbildung 4-3 a.). Zur zusätzlichen Methodvalidierung wurde die Linearität der Analyten durch Kalibration über mindestens fünf Konzentrationen bestimmt, wobei die Konzentrationen gegen die Peakflächen aufgetragen wurden (Abbildung 4-3 b.).

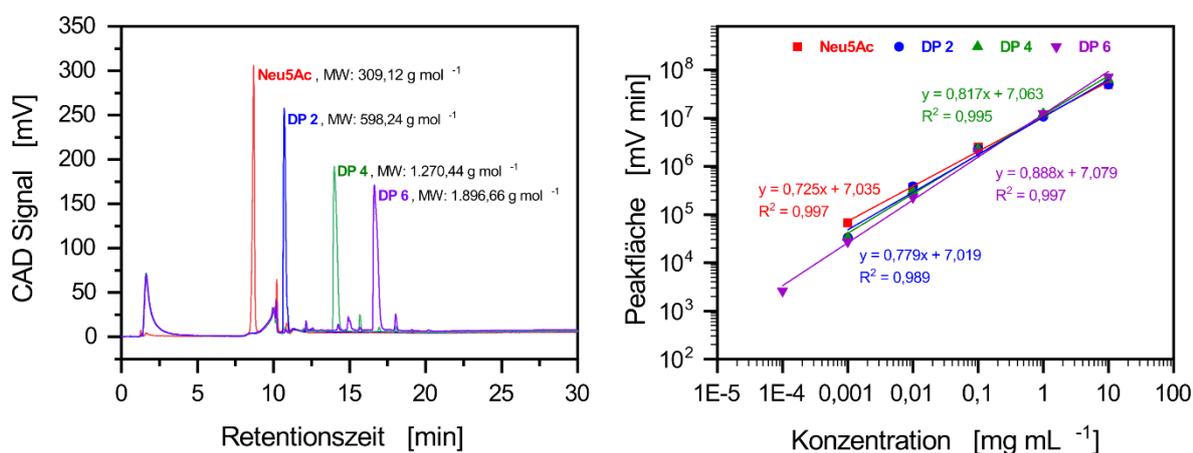


Abbildung 4-3: Messung von kommerziellen Referenzanalyten zur Methodencharakterisierung und -validierung. Messung der Referenzanalyten Neu5Ac (MW: 309,12 g mol⁻¹); DP2 (MW: 598,24 g mol⁻¹); DP4 (MW: 1.270,44 g mol⁻¹) und DP6 (MW: 1.896,66 g mol⁻¹) zur Bestimmung des minimal messbaren MW (a.). Zur charakteristischen Darstellung der Referenzanalyten wurde eine Konzentration von 1 g L⁻¹ eingesetzt. Kalibration der Referenzanalyten zur Untersuchung der Linearität durch log/ log-Auftragung der Konzentration gegen die Peakfläche (b.). Zur Kalibration wurden Konzentrationen in log-Stufen im Bereich zwischen 0,0001 bis 10 mg mL⁻¹ untersucht.

In Abbildung 4-3 a. sind die Probenpeaks der Referenzanalyten mit entsprechenden Molekulargewichten dargestellt. Hierbei wurde deutlich, dass mittels CAD die Detektion von niedermolekularer Sialin- bzw. Oligosialinsäuren mit hoher Präzision und Auflösung möglich ist. Ergänzend wurde, für die Anwendung der (Oligo-) Sialinsäure-Detektion, ein minimal messbares MW von 309 g mol^{-1} bestimmt, welches signifikant unterhalb des Literaturwertes von ca. 400 g mol^{-1} liegt [145,153]. Da das CAD-Signal häufig durch eine nicht-lineare Abhängigkeit für höhere Konzentrationsbereiche beschrieben wird, musste zur weiteren Methodvalidierung und Bestimmung der Linearität eine mathematische Modifizierung durchgeführt werden. Durch eine log/log-Auftragung der Analytkonzentrationen gegen die Peakflächen konnte die Linearität in einem Arbeitsbereich zwischen $0,001$ bis 10 mg mL^{-1} für Neu5Ac, DP2 und DP4 bzw. von $0,0001$ bis 10 mg mL^{-1} für DP6 ermittelt werden. Als Maß für die Linearität wurde für die getesteten Referenzanalyten durchschnittlich ein Korrelationskoeffizient von $R^2 \geq 0,99$ bestimmt und entspricht somit den Anforderungen der ICH. Als Resultat lässt sich zusammenfassen, dass mittels CAD nicht nur die Bestimmung von geringen Kettenlängen und Molekulargewichten möglich ist, sondern auch breite Konzentrationsbereiche sensitiv detektiert werden können.

4.1.3 Vergleichende Untersuchung von LC polySia mittels DMB-HPLC-FLD und HPLC-CAD

In diesem Versuch sollte die Performance der HPLC-CAD zur direkten Kettenlängen-Analyse von biotechnologisch produzierter LC polySia untersucht und mit der DMB-HPLC-FLD verglichen werden. Zur Bestimmung der Kettenlängenverteilung wurde LC polySia in einer Konzentration von 1 g L^{-1} eingesetzt. Als Probenreferenz wurde deionisiertes Wasser verwendet. Das Chromatogramm der Fluoreszenzdetektion und DMB-derivatisierter LC polySia ist in Abbildung 4-4 a. ersichtlich. Vergleichend dazu ist das Ergebnis der CAD-Detektion unbehandelter LC polySia in Abbildung 4-4 b. zu sehen.

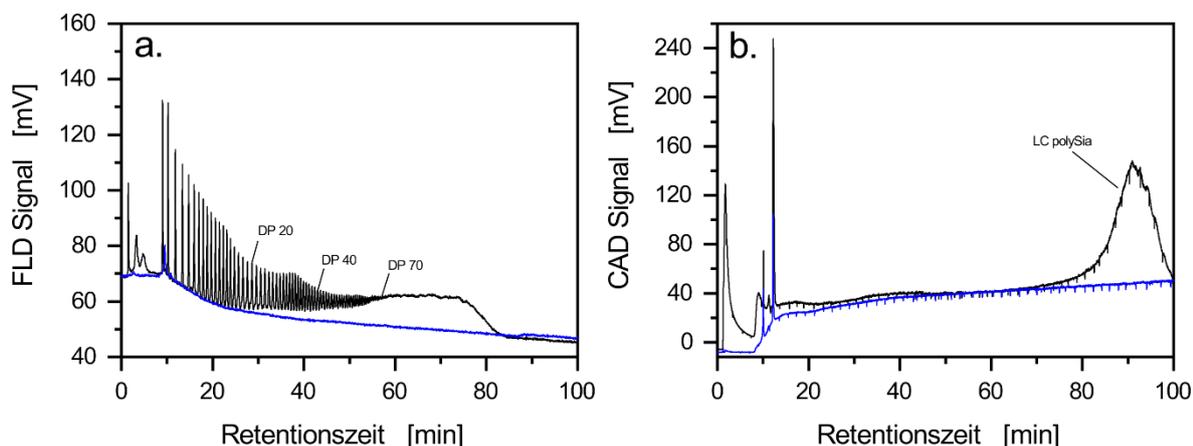


Abbildung 4-4: Messung von biotechnologisch produzierter LC polySia mittels DMB-HPLC-FLD (a.) und HPLC-CAD (b.). Die eingesetzte Konzentration von LC polySia betrug 1 g L^{-1} . Dargestellt sind die Probensignale (schwarz) und deionisiertes Wasser als Referenzsignale (blau).

In der Bestimmung der Kettenlängenverteilung von LC polySia konnte mittels DMB-Probenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion eine maximale Kettenlänge von $\sim \text{DP}70$ ermittelt werden (Abbildung 4-4 a.). In der Messung mittels CAD konnte ein Probensignal für LC polySia bei einer Retentionszeit ca. 90 min und einer Signalintensität von ca. 140 mV detektiert werden (Abbildung 4-4 b.).

Durch die DMB-Derivatisierung der Probe wird mittels HPLC-FLD zwar eine sensitive Bestimmung der polySia-Kettenlängenverteilung mit Peaks von DP1 bis ca. DP70 ermöglicht, jedoch kann dem entgegen die HPLC-CAD ein direktes und Massen-abhängiges Signal für LC polySia zuverlässig dargestellt werden. Außerdem konnte mittels CAD gezeigt werden, dass die Probe ausschließlich langkettige polySia enthält und, dass die Probe im Vergleich zur kommerziellen Colominsäure (Vergleich Kapitel 4.1.1, Abbildung 4-2 b.), keine detektierbaren Mengen niedermolekularer polySia beinhaltet. Zusammenfassend ermöglicht die CAD-Methode nicht nur eine qualitative Analytik für eine schnelle und direkte Kettenlängencharakterisierung, sondern auch die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung von polySia.

4.2 Methodenentwicklung und -validierung zur Quantifizierung von polySia mittels HPLC-CAD

Ein essenzieller Schritt in der Herstellung von polySia avDP20 ist die Validierung und Überwachung des Produktionsprozesses. Einer der kritischsten Parameter ist die Konzentrationsbestimmung von polySia, welche üblicherweise durch den TBA-Assay quantifiziert wird. Diese Methode hat zwei grundlegende Nachteile: Zum einen ist das

Methodenverfahren sehr zeitaufwändig, sodass die Quantifizierung von Proben etwa 19 h in Anspruch nimmt. Zum anderen kann mittels TBA-Assay lediglich die Gesamtheit an polySia in Proben quantifiziert werden. Eine Konzentrationsbestimmung von spezifischen Kettenlängen in polySia-Proben ist dementsprechend nicht möglich. In den Arbeiten zur polySia-Kettenlängencharakterisierung in Kapitel 4.1 konnten bereits erste Ergebnisse zur Detektion und Quantifizierung von kommerzieller oligoSia mittels HPLC-CAD gezeigt werden. In diesem Kapitel werden die Arbeiten zur Methodenentwicklung und -validierung zur Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia beschrieben. Im Gegensatz zur Kettenlängen-charakterisierung wurde hier ein modifizierter Stufengradient zur Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia neu entwickelt. Die für die Untersuchungen zum Einsatz kommende polySia avDP20 wurde in einer exemplarischen Fraktionierung und Isolierung mittels Membranadsorberchromatographie isoliert. Die Ergebnisse zu den Arbeiten zur Entwicklung und Optimierung der polySia avDP20-Produktion werden jedoch zu einem späteren Zeitpunkt in Kapitel 7.2 dargestellt und diskutiert.

4.2.1 Kalibration, Bestimmung der Linearität und Validierung

Einer der ersten Schritte in der Entwicklung einer neuen Quantifizierungsmethode ist die Bestimmung des Quantifizierungsbereichs. Dieser kann anhand einer Kalibration in Abhängigkeit des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bestimmt werden. Darüber hinaus soll die CAD-Methode in Hinblick auf eine eindeutige Peakdifferenzierung für polySia avDP20 und LC polySia sowie für verschiedene Konzentrationen der Referenzanalyten evaluiert werden.

Zur Kalibration wurden verschiedene Konzentrationen von polySia avDP20 in einem Bereich zwischen 0,005 bis 0,25 mg mL⁻¹ sowie von LC polySia in einem Bereich zwischen 0,01 bis 20 mg mL⁻¹ untersucht. Die resultierenden Peaks der Kalibrationsstandards wurden integriert und gegen die Konzentrationen aufgetragen.

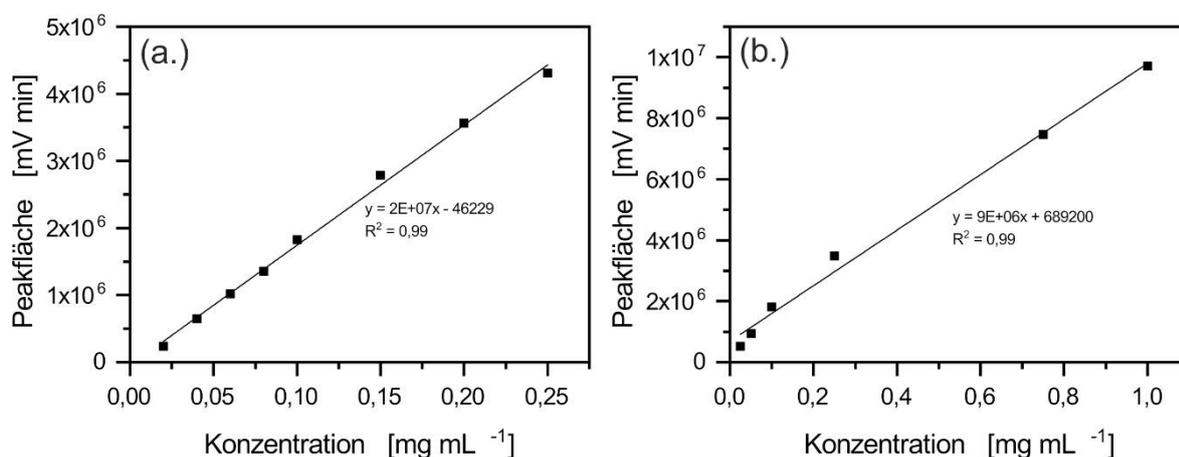


Abbildung 4-5: Kalibration von polySia avDP20 (a.) und LC polySia (b.). Beide Analyten konnten anhand einer linearen Regression mit $R^2 = 0,99$ beschrieben werden. Der lineare Arbeitsbereich für polySia avDP20 liegt zwischen 0,02 bis 0,25 mg mL⁻¹ und für LC polySia zwischen 0,025 bis 1 mg mL⁻¹.

In der Kalibration mittels CAD können niedrige Konzentrationsbereiche in der Regel mit einer (semi-) linearen Regression beschrieben werden, wohingegen höhere Konzentrationsbereiche eine quadratische Abhängigkeit zeigen [140,154,155]. In Abbildung 4-5 ist zu sehen, dass die Kalibrationen von polySia avDP20 und LC polySia mittels HPLC-CAD durch eine lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ beschrieben werden konnten. Die Anzahl der Kalibrationskonzentrationen von $n \geq 5$ sowie die Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 \geq 0,99$ entsprechen den Anforderungen nach ICH Q2(R1) [149]. Der lineare Konzentrationsbereich von polySia avDP20 liegt in einem Bereich zwischen 0,02 bis 0,25 mg mL⁻¹ und von LC polySia zwischen 0,025 bis 1 mg mL⁻¹. Der lineare Bereich der Kalibration stellt gleichzeitig den Arbeitsbereich der Quantifizierung dar. Außerdem konnte anhand der Kalibration die Bestimmungsgrenze ermittelt werden. Die Konzentrationsuntersuchung mittels HPLC-CAD ermöglicht dementsprechend eine Quantifizierung von polySia avDP20 mit einem LOQ von 0,02 mg mL⁻¹ und von LC polySia mit einem LOQ = 0,025 mg mL⁻¹. Eine erweiterte Quantifizierung von höheren Konzentrationsbereichen bis $c = 15$ mg mL⁻¹ ist durchaus denkbar [150]. Jedoch bedarf es hierfür einer Kalibration mit quadratischer Regression und zusätzlicher Methodvalidierung im zu untersuchenden Konzentrationsbereich.

Die CAD-Methode und die lineare Kalibration wurde in Hinblick auf eine selektive Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia validiert. Eine optimale chromatografische Auflösung und Basislinientrennung liegt bei 1,5, wohingegen für quantitative Peakauswertungen Auflösungen von $R_s \geq 0,8$ angestrebt werden [151].

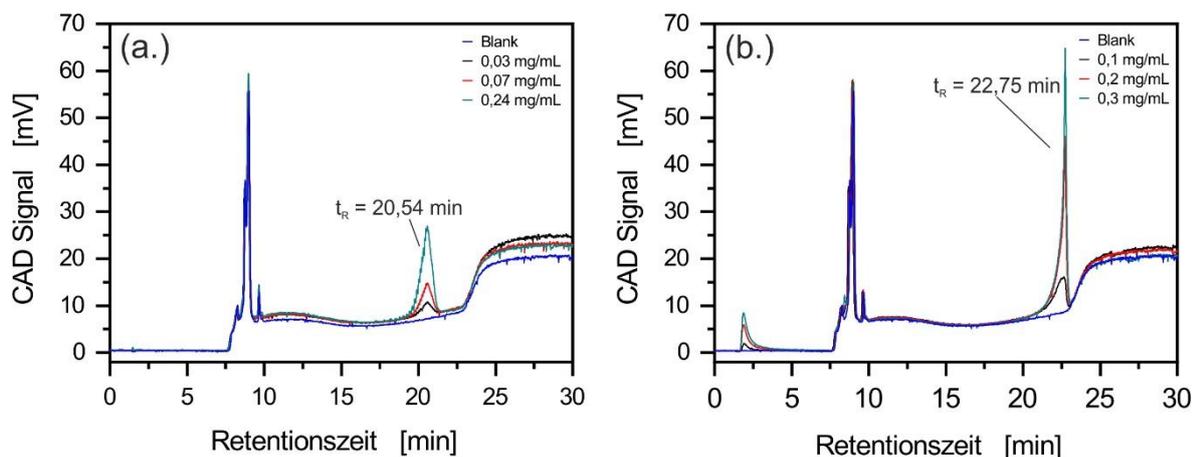


Abbildung 4-6: Validierung der Quantifizierungsmethode mittels HPLC-CAD und Untersuchung von Referenzstandards bekannter Konzentrationen für polySia avDP20 (a.) und LC polySia (b.).

Die Ergebnisse aus Abbildung 4-6 zeigen die Chromatogramme der Referenzstandards, wobei polySia avDP20 bei einer Retentionszeit von $t_{R1} = 20,54$ min mit einer Basispeakbreite von $w_1 = 1,6$ min und LC polySia bei $t_{R2} = 22,75$ min mit $w_2 = 0,86$ min eluiert. Die daraus berechnete Peakauflösung von $R_S = 1,8$ beschreibt eine selektive und valide Peaktrennung der zu quantifizierenden Analyten.

In der Quantifizierung der Referenzanalyten wurde zur Validierung der linearen Kalibration die relative Konzentrationsabweichung zwischen den Referenzstandards und den CAD-ermittelten Werten als rel. Abweichung in %-error berechnet (Tabelle 4-1) und dient als Maß der Methodenverlässlichkeit.

Tabelle 4-1: Referenzkonzentrationen im Vergleich zur HPLC-CAD Quantifizierung und linearer Regression.

	Referenzkonz. [mg mL ⁻¹]	HPLC-CAD Konz. [mg mL ⁻¹]	rel. Abweichung [%-error]
polySia	0,03	0,032	5
	0,07	0,072	3
avDP20	0,24	0,2395	0,2
	0,10	0,113	13
LC polySia	0,20	0,214	7
	0,30	0,327	9

In der Quantifizierung der Referenzanalyten bekannter Konzentrationen zeigte sich in der Detektion von polySia avDP20 eine hohe Korrelation zwischen den gegebenen Konzentrationen und den CAD-ermittelten Werten mit einer rel. Abweichung von ≤ 5 %. In der Quantifizierung von LC polySia konnte eine moderate Korrelation von ≤ 13 % ermittelt

werden. Im Vergleich zur CAD-Quantifizierung mittels quadratischer Regression der Kalibration [150], konnte hier eine leichte Verbesserung vor allem für die Konzentrationsbestimmung von polySia avDP20 erzielt werden. Zusammenfassend konnte die HPLC-CAD Methode erfolgreich modifiziert und zur differenzierten Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia evaluiert werden.

4.2.2 Vergleichende Anwendung von HPLC-CAD und TBA-Assay zur polySia-Quantifizierung

Die Evaluierung der chromatographischen polySia avDP20 Isolierung ist ein essenzieller Schritt in dessen Prozessentwicklung und -optimierung. Die Bestimmung der polySia Konzentration stellt hierbei einen kritischen Prozessparameter und dementsprechend ein Qualitätsattribut dar. Die HPLC-CAD ermöglicht als neue analytische Bestimmungsplattform eine schnelle und verlässliche Quantifizierung. Aktuell ist der TBA-Assay die benchmarkende Methode zur polySia-Quantifizierung. Um die neuentwickelte CAD-Methode zu evaluieren, wird die Quantifizierungsperformance von HPLC-CAD und TBA-Assay verglichen. Da die CAD-Methode primär in der Produktion und Isolierung von polySia avDP20 eingesetzt werden soll, werden für den Vergleich Proben aus einer exemplarischen Fraktionierung der polySia avDP20 Produktion analysiert.

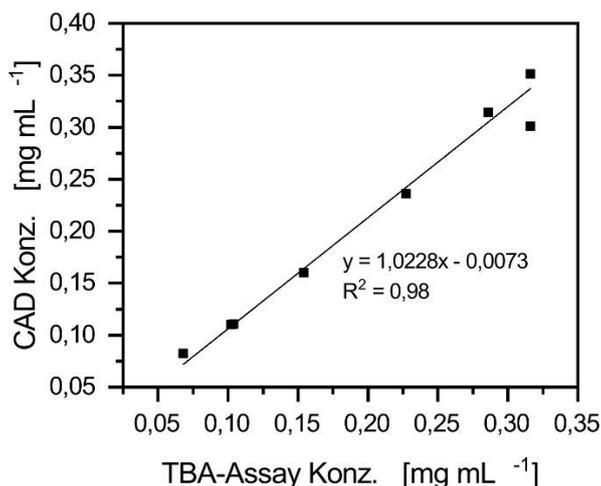


Abbildung 4-7: Korrelationsanalyse von TBA-Assay und HPLC-CAD zur Quantifizierung von polySia.

Die polySia-Konzentration der Fraktionierungsproben wurde mittels HPLC-CAD und TBA-Assay analysiert und in einem Korrelationsdiagramm gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4-7). Hierbei soll die Korrelationsanalyse als Maß der Vergleichbarkeit beider Methoden betrachtet werden. Folglich ist ein hoher Korrelationskoeffizient als hohe Verlässlichkeit der Methoden zu interpretieren.

Das Ergebnis der Korrelationsanalyse zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,98$ eine hohe Übereinstimmung beider Methoden zur Konzentrationsbestimmung von polySia. Für Konzentrationen $> 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ scheint die Abweichung zur Korrelation zu steigen und lässt sich damit begründen, dass die Konzentrationen hierbei außerhalb der Kalibration der HPLC-CAD liegen und eine Probenverdünnung vorgenommen werden müsste. Ein Einsatz der HPLC-CAD kann während der polySia avDP20 Produktion zur schnellen und zuverlässigen polySia-Quantifizierung verwendet werden und ist eine gute und valide Alternative zum TBA-Assay.

4.3 Zusammenfassung der analytischen Arbeiten

In diesem Kapitel wurden die Arbeiten zur Entwicklung und Validierung einer neuen Charakterisierungs- und Quantifizierungsmethode von polySia basierend auf der *charged aerosol detection* HPLC-Analyse vorgestellt.

Die HPLC-CAD konnte zum einen erfolgreich für eine schnelle Charakterisierung der polySia-Kettenlänge eingesetzt werden, wobei im Vergleich zur benchmarkenden DMB-HPLC-FLD eine signifikante Zeitersparnis und Reduktion der Analysezeit auf ca. 3 h erreicht wurde. Die HPLC-CAD ermöglicht hierbei die Detektion von Analyten ohne die Notwendigkeit einer zeitaufwändigen und fehleranfälligen DMB-Derivatisierung. Eine direkte Messung der tatsächlichen Kettenlänge wird bis zu einem Polymerisationsgrad von $\sim\text{DP}65$ erreicht. In Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte zur Kettenlängencharakterisierung ein LOD von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ermittelt werden. Außerdem ermöglicht die HPLC-CAD die Detektion von niedermolekularen (Oligo-) Sialinsäure-Standards mit einem minimalen MW von 309 g mol^{-1} und einer Linearität zwischen $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis 10 mg mL^{-1} . Des Weiteren war die Charakterisierung der biotechnologisch produzierten LC polySia möglich, wobei gezeigt werden konnte, dass aufgrund der Produktionsstrategie ausschließlich hochmolekulare polySia $> \text{DP}70$ isoliert wird.

Zum anderen konnte mittels HPLC-CAD eine schnelle und selektive Methode zur Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia entwickelt werden. In Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte eine lineare Kalibration und Bestimmung des LOQ durchgeführt werden. Für polySia avDP20 konnte in der Kalibration der lineare Bereich zwischen $0,02$ bis $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ und für LC polySia zwischen $0,025$ bis 1 mg mL^{-1} bestimmt werden. Darüber hinaus konnte die Quantifizierung der Analyten durch die selektive Messung von Referenzanalyten validiert und mit dem benchmarkenden TBA-Assay in einer Korrelationsanalyse mit hoher Übereinstimmung verglichen werden.

Die hier entwickelten und beschriebenen Methoden zur Kettenlängencharakterisierung und polySia-Quantifizierung mittels HPLC-CAD eignen sich dementsprechend in seiner Anwendung zur Charakterisierung und Optimierung der chromatographischen Isolierung und Produktion von polySia avDP20.

5 Upstream Prozess: Biotechnologische Produktion von LC polySia

Die Produktion und Aufreinigung von kommerziell erhältlicher Colominsäure sowie hochmolekularer polySia konnte bereits vielseitig beschrieben werden [1,2,77,156]. Zur Gestaltung eines effizienten und wirtschaftlichen Prozesses sind zur Steigerung der Produktivität fortlaufende Optimierungsarbeiten von großer Bedeutung. In der biotechnologischen Produktion von LC polySia ließ sich bislang eine indirekte Kopplung der Biomasse- und polySia-Ausbeute zeigen, wobei im Kultivierungsmedium nicht nur das verwendete Puffersystem, sondern auch die Wahl der Kohlen- und Stickstoffquelle einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Produktivität haben. Unter Berücksichtigung wirtschaftlicher Aspekte in einer effizienten Prozessführung rechtfertigt sich in diesem Zusammenhang neben dem Satzbetrieb die Etablierung eines geeigneten Zulaufbetriebs zur Hochzelldichtekultivierung. Zunächst wurde hierbei zum bereits beschriebenen polySia-Produktionsmedium nach Rodríguez-Aparicio et al. [77,156] das definierte Minimal-Medium zur *E. coli*-Hochzelldichtekultivierung nach Korz et al. [116] im Schüttelkolben vergleichend getestet und im Satzbetrieb untersucht. Nachfolgend wurde der Kultivierungsprozess auf das Rührkesselreaktor-System übertragen und vom 1,5 L auf ein 25 L Maßstab aufskaliert. Anschließend wurde eine pO_2 -kontrollierte Zulaufstrategie zur Hochzelldichtekultivierung getestet. Abschließend wurde die Kultivierung im Satzbetrieb auf das Einweg-Beutelreaktorsystem transferiert und die Kultivierungsperformance vergleichend zur Rührkesselreaktorkultivierung untersucht. In allen Versuchen diente neben den Ertrags-, bzw. Ausbeutekoeffizienten die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) als maßgebende Kenngröße des Bioprozesses und wurde zur Charakterisierung der Produktivität betrachtet.

5.1 Vergleich von Kultivierungsmedien im Schüttelkolben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Schüttelkolbenkultivierung zum Vergleich der Kultivierungsmedien nach Rodríguez-Aparicio et al. (Medium A) und nach Korz et al. (Medium B) beschrieben und anschließend im Hinblick auf die Produktivität bezüglich der Biomasse- und polySia-Bildung diskutiert. In einer jeweiligen Dreifachbestimmung werden hierzu in Abbildung 5-1 die OD_{600} und BTM als Maß für das Biomassewachstum gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen. Außerdem wird über den Kultivierungszeitraum der Verlauf des Glucoseverbrauchs unter gleichzeitiger Acetat- und polySia-Akkumulation gezeigt. Zusätzlich sind die relevanten Endwerte der Kultivierung sowie die berechneten Ausbeutekoeffizienten und RZA in Tabelle 5-1 ersichtlich.

Es ist erkennbar, dass unter Verwendung beider Medien innerhalb der ersten 4 h ein unlimitiertes, exponentielles Biomassewachstum mit $\mu_{\max} = 0,711 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ in Medium A und $\mu_{\max} = 0,774 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ in Medium B stattfand; dies weicht somit um ca. 13 - 64 % von den Literaturwerten von ca. $0,45 \text{ h}^{-1} - 0,67 \text{ h}^{-1}$ [111,112,157] ab. Da das Medium der Schüttelkolben in diesem Experiment mit Zellen aus der exponentiellen Phase der Vorkultur und einer Animpfdichte von $0,7 \text{ OD}_{600}$ inokuliert wurden, gab es keine Lag-Phase. Zum Ende der Kultivierung nach 7 h ist der Übergang in die stationäre Phase deutlich erkennbar.

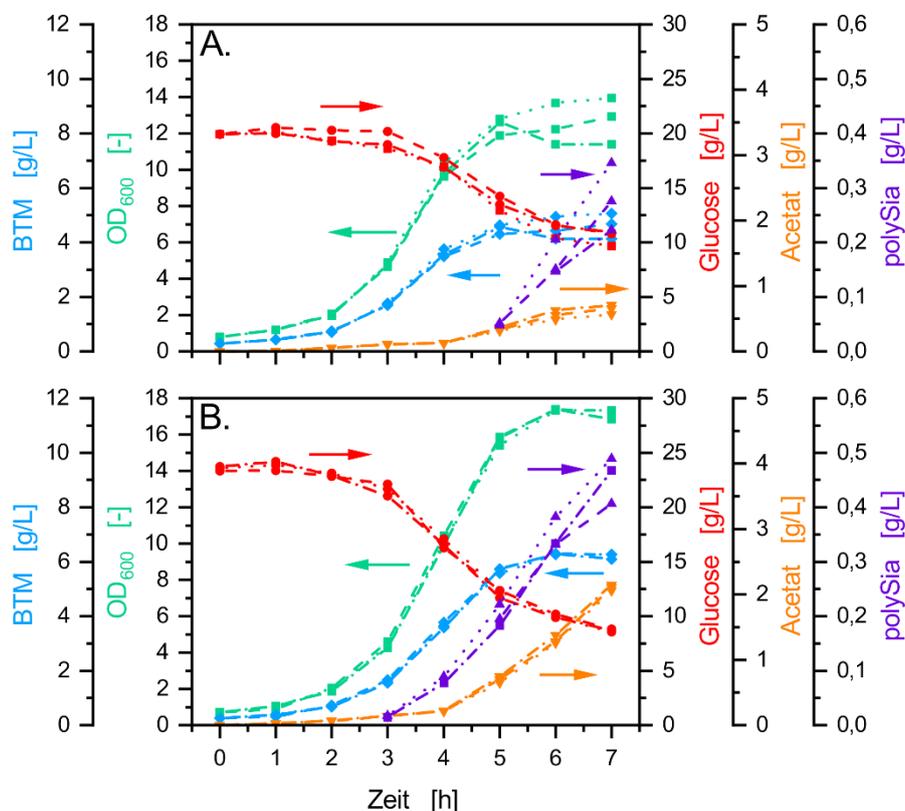


Abbildung 5-1: Vergleich von Kultivierungsmedien zur polySia-Produktion. **A.**: Definiertes Medium nach Aparicio et al. mit $c_{\text{Glc, Start}}: 20 \text{ g L}^{-1}$. **B.**: Definiertes Medium nach Korz et al. mit $c_{\text{Glc, Start}}: 25 \text{ g L}^{-1}$. Dargestellt ist in Grün: OD_{600} [-], Blau: $\text{BTM} [\text{g L}^{-1}]$, Rot: $\text{Glucose} [\text{g L}^{-1}]$, Orange: $\text{Acetat} [\text{g L}^{-1}]$ und Violett: $\text{polySia} [\text{g L}^{-1}]$. Versuchsbedingungen: $T: 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $n: 250 \text{ rpm}$; $d_0: 50 \text{ mm}$; $V_L: 50 \text{ mL}$; $\text{OD}_{600, \alpha}: 0,7$; $\text{pH}_\alpha: 7,5$.

Unter Verwendung von Medium A (Vergleich Abbildung 5-1 A.) wurde eine finale $\text{OD}_{600, \omega}$ von $13,2 \pm 0,60$ und eine BTM_ω von $5,3 \pm 0,33 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Über den gesamten Kultivierungszeitraum wurde insgesamt $9,5 \pm 0,56 \text{ g L}^{-1}$ Glucose verbraucht. Dies entspricht einem Biomasseausbeutekoeffizienten von $Y_{X/S} = 0,562 \pm 0,016 \text{ g BTM pro g Glucose}$. Aufgrund des sog. Überflusmetabolismus von *E. coli* kommt es bei hohen Glucosekonzentrationen und -aufnahme-raten sowie Sauerstoff-limitierenden, anaeroben Bedingungen vermehrt zur Bildung von Acetat [158–162]. Dies führt in Schüttelkolben ohne aktive pH-Regelung oder unzureichender Pufferung zur Ansäuerung des Mediums und einem damit einhergehenden pH-Shift. Nach etwa 5 h erreichte die Acetatkonzentrat im

Medium einen Wert von $0,339 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ und resultierte bis zum Ende der Kultivierung in einer finalen Konzentration von $0,645 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$. Außerdem konnte ein pH-Endwert von $\text{pH}_\omega = 4,8 - 4,9$ [2,109,163] gemessen werden. Das Zellwachstum kann dadurch signifikant beeinflusst worden sein und war vermutlich für den frühzeitigen Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase verantwortlich. Bis zum Ende der Kultivierung wurden außerdem $0,281 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ polySia im Medium akkumuliert, was den Literaturwerten entspricht [1,2,77]. Die daraus berechnete Raum-Zeit-Ausbeute beträgt hierbei $\text{RZA} = 0,040 \pm 0,007 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Darüber hinaus lassen sich die Produktausbeutekoeffizienten von $Y_{P/S} = 0,030 \pm 0,004 \text{ g polySia pro g Glucose}$ und $Y_{P/X} = 0,053 \pm 0,006 \text{ g polySia pro g BTM}$ berechnen. Diese Werte liegen leicht über den beschriebenen Literaturwerten und erklären sich vermutlich durch die Inokulation des Mediums mit Zellen aus der exponentiellen Phase der Vorkultur und dem entsprechend guten Wachstumsverhalten.

Vergleichend dazu konnte unter Verwendung von Medium B (Abbildung 5-1 B.) eine finale $\text{OD}_{600, \omega} = 17,4 \pm 0,047$ und eine $\text{BTM}_\omega = 6,6 \pm 0,094 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Über den Kultivierungszeitraum von 7 h wurden hierbei insgesamt $14,8 \pm 0,24 \text{ g L}^{-1}$ Glucose verbraucht. Dementsprechend ergab sich ein Biomasseausbeutekoeffizient von $Y_{X/S} = 0,447 \pm 0,012 \text{ g BTM pro g Glucose}$, der somit ca. 20 % geringer als für Medium A war. Am Ende der Kultivierung wurden $2,104 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium akkumuliert und ein finaler pH-Wert von $\text{pH}_\omega = 5,9 - 6$ gemessen. Obwohl eine deutlich größere Menge Acetat gebildet wurde, sank der pH-Wert in Medium B langsamer. Damit konnte in Medium B der pH-Wert besser gepuffert werden, was vermutlich ausschlaggebend für das höhere Biomassewachstum ist. Über den Kultivierungszeitraum von 7 h wurde polySia ins Medium freigesetzt und resultierte in einer finalen Konzentration von $0,454 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$. Die daraus berechnete Raum-Zeit-Ausbeute betrug hierbei $\text{RZA} = 0,065 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Dies bedeutet, dass unter Verwendung von Medium B rund 62 % mehr polySia produziert bzw. freigesetzt werden konnte. Unter Betrachtung der Produktausbeutekoeffizienten $Y_{P/S} = 0,031 \pm 0,003 \text{ g polySia pro g Glucose}$ und $Y_{P/X} = 0,069 \pm 0,006 \text{ g polySia pro g BTM}$ ist erkennbar, dass in Medium B pro g Glucose ca. 4 % und pro g BTM ca. 30 % mehr polySia gebildet wurden als in Medium A.

Tabelle 5-1: Gegenüberstellung der ermittelten Kultivierungs-Endwerte und berechneten Ausbeutekoeffizienten zum Vergleich von Medien zur polySia-Produktion. **Medium A:** polySia-Produktionsmedium nach Rodríguez-Aparicio et al. **Medium B:** Definiertes Minimal-Medium zur *E. coli*-Hochzelldichtekultivierung nach Korz et al.

Parameter		Medium A	Medium B	rel. Steigerung [%]
Zeit	[h]	7	7	0
OD _{600, ω}	[-]	13,2 ± 0,60	17,4 ± 0,047	32
BTM _{ω, berechnet}	[g L ⁻¹]	5,3 ± 0,33	6,6 ± 0,094	25
metabolisierte Glucose C _{Glc}	[g L ⁻¹]	9,5 ± 0,56	14,8 ± 0,24	56
C _{polySia, ω}	[g L ⁻¹]	0,281 ± 0,05	0,454 ± 0,03	62
μ _{max}	[h ⁻¹]	0,711 ± 0,01	0,774 ± 0,04	9
Y _{X/S}	[g g ⁻¹]	0,562 ± 0,016	0,447 ± 0,012	-20
Y _{P/S}	[g g ⁻¹]	0,030 ± 0,004	0,031 ± 0,003	4
Y _{P/X}	[g g ⁻¹]	0,053 ± 0,006	0,069 ± 0,006	30
RZA	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,040 ± 0,007	0,065 ± 0,005	62

Unter zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse in Kapitel 5.1 lässt sich schlussfolgernd sagen, dass eine Übertragung des Upstream-Prozesses zur polySia Produktion im definierten Minimal-Medium nach Korz et al. nicht nur erfolgreich war, sondern gleichzeitig zu einer signifikant höheren Produktausbeute und einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um 62 % geführt hat. Aufgrund dessen wird in den nachfolgenden Kapiteln der Produktionsprozess vom Schüttelkolben auf das Rührkesselreaktor-System übertragen und ein Prozess-Upscaling durchgeführt.

5.2 Prozess-Upscaling der Kultivierung im Satzbetrieb

Im Vergleich der Kultivierungsmedien in Kapitel 5.1 stellte sich heraus, dass sich das definierte Minimal-Medium nach Korz et al. aufgrund der besseren Raum-Zeit-Ausbeute zur Kultivierung von *E. coli* K1 und Produktion von polySia eignet. In diesem Kapitel wird die Übertragbarkeit der Kultivierung auf den Rührkesselreaktor gezeigt. Im Rahmen eines Prozess-Upscalings wurde die Reproduzierbarkeit des Kultivierungsverlaufs im 1,5 L (Biostat® Aplus) und 25 L (Biostat® Cplus) Maßstab in jeweiliger Doppelbestimmung untersucht und die gesammelten Ergebnisse mit Literaturwerten bereits publizierter Daten zur polySia Produktion verglichen.

Zur Gewährleistung reproduzierbarer Bedingungen im 1,5 und 25 L Fermentationsmaßstab, wurden die Prozessparameter gleich gehalten. Die Begasungsrate wurde über den gesamten Prozess auf 1 vvm eingestellt. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 600 rpm reguliert und entspricht der empfohlenen Höchstgeschwindigkeit des Rührermotors vom Biostat® Cplus System. Um während der Kultivierung eine Sauerstofflimitierung zu verhindern, wurde der pO_2 mit reinem Sauerstoff auf 30 % geregelt.

Wie bereits zuvor beschrieben, wurde zur Aufzeichnung des Biomassewachstums die OD und BTM bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der batch-Phase wurde die Glucose- und Acetatkonzentration ermittelt. Neben der polySia-Konzentration wurde in diesem Versuch zusätzlich die freigesetzte HCP (Abk. *host cell proteins*) -Menge erfasst. Die exemplarischen Daten der 1,5 L und 25 L-Kultivierung sind in Abbildung 5-2 dargestellt. Zusätzlich sind die relevanten Endwerte der Kultivierung sowie die berechneten Ausbeutekoeffizienten und RZA in Tabelle 5-2 zusammengefasst und vergleichend den Literaturwerten zur polySia-Produktion und Kultivierung im Medium nach Rodríguez-Aparicio et al. [77] gegenübergestellt.

Der pO_2 ist ein wichtiger online-Messwert und wird z.B. durch die Rührergeschwindigkeit, die Begasungsrate und dem Sauerstoffanteil in der Zuluft beeinflusst [164–167]. Unter konstanten Bedingungen kann der pO_2 indirekt einen Rückschluss auf das Biomassewachstum geben. Im Wachstum verbraucht der Organismus im Medium unter anderem Glucose und Sauerstoff, was somit zum Absinken des pO_2 führt. Der Organismus stellt nach vollständigem Verbrauch von Glucose den Metabolismus ein, was zum erneuten Anstieg des pO_2 führt [168]. Es ist zu erkennen, dass der online gemessene Sauerstoffpartialdruck mit dem Start der Kultivierung und dem Inokulationszeitpunkt innerhalb der ersten 3 h - 6 h von ca. 100 % auf 30 % abfiel. Anschließend schwankte der pO_2 um einen Wert von ca. 30 % und stieg am Ende der Kultivierung wieder plötzlich auf einen Wert von ca. 80 % an. Anscheinend gestaltet sich die Begasung und der Sauerstoffeintrag in das Medium im Biostat® Aplus mit einem Reaktorvolumen von 1,5 L als ineffizient, sodass die eingetragene Menge an Sauerstoff früher verbraucht wird und zu einem schnelleren Abfall des pO_2 auf 30 % nach 3 h führt. Der k_{La} -Wert könnte diesbezüglich für die maßstabsübergreifende Charakterisierung des Sauerstoffübergangs als Prozesskennzahl betrachtet werden, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert. Außerdem kann man anhand der Daten des 25 L Reaktors sehen, dass es bei der pO_2 -Regelung auf 30 % verstärkt zu Schwankungen im Bereich zwischen 20 % und 40 % kam. Diese lassen sich vermutlich auf eine reduzierte Sensitivität des PID (Abk. *proportional integral derivative*) -Reglers der DCU (Abk. *digital control unit*) zurückführen, welcher ein

breiteres *deadband* aufwies. Insgesamt konnte jedoch eine Sauerstofflimitierung während der Kultivierung erfolgreich verhindert werden.

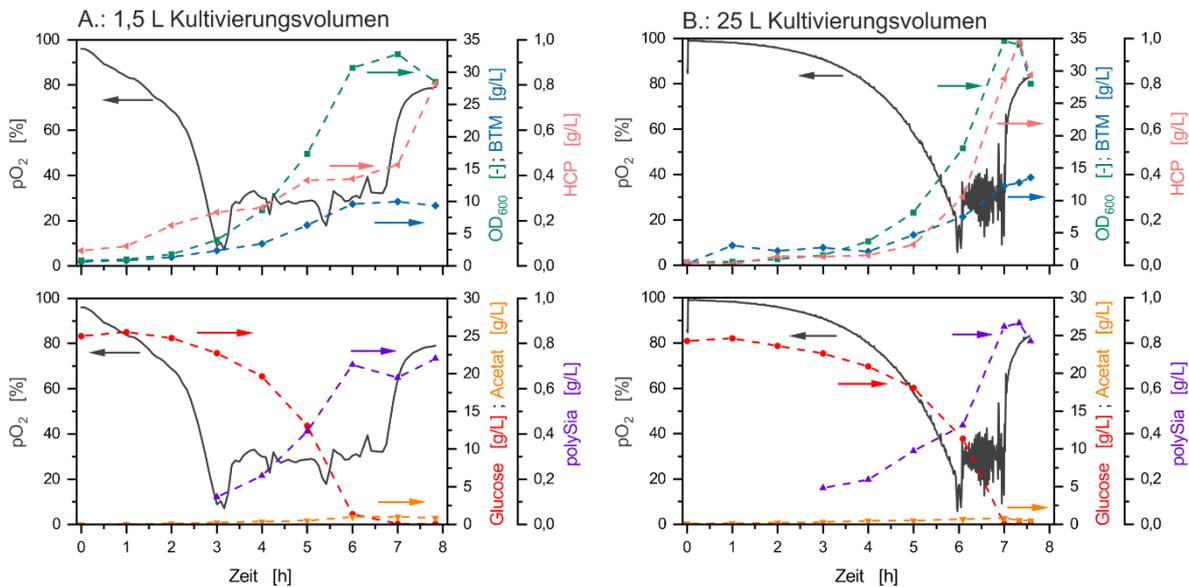


Abbildung 5-2: Vergleichende Darstellung von exemplarischen Kultivierungen im Satzbetrieb in unterschiedlichen Maßstäben. **A.:** Kultivierung im Biostat® Aplus mit 1,5 L Fermentationsvolumen und **B.:** Kultivierung im Biostat® Cplus mit 25 L Fermentationsvolumen. Dargestellt ist in Grau: pO₂ [%]; Grün: OD₆₀₀ [-], Blau: BTM [g L⁻¹], Rosa: HCP [g L⁻¹], Rot: Glucose [g L⁻¹], Orange: Acetat [g L⁻¹] und Violett: polySia [g L⁻¹]. Versuchsbedingungen: V_L: 1,5 L bzw. 25 L; T: 37 °C; n: 600 rpm; \dot{V} : 1,5 L min⁻¹ bzw. 25 L min⁻¹ (1 vvm); pO₂-Regelung auf 30 %, OD_{600, α} = 0,5 - 0,7. Kultivierung im definierten Minimal-Medium (pH 7,5) nach Korz et al., c_{Glc, α} : 25 g L⁻¹.

Es ist ersichtlich, dass nach einer kurzen Lag-Phase ein exponentielles Biomassewachstum mit $\mu_{\max} = 0,709 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ im Kultivierungszeitraum zwischen 2 und 6 h stattfindet. Die Wachstumsrate ist damit vergleichbar zu der zuvor bestimmten Wachstumsrate im Schüttelkolben. Zum Ende der Kultivierung nach $7,3 \pm 0,88 \text{ h}$ war der Übergang in die stationäre, bzw. letale Phase deutlich erkennbar. Hierbei konnte für die Biomasseproduktion eine finale OD_{600, ω} = $33,1 \pm 1,01$ und eine BTM _{ω} = $11,4 \pm 2,04 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden. Die Glucosekonzentration fiel in beiden Kultivierungen nach ca. 6 h -7 h unter die Nachweisgrenze von $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$. Gleichzeitig war ein plötzlicher Anstieg des pO₂ als indirekter Indikator des vollständigen Glucoseverbrauchs ersichtlich. Insgesamt wurden 25 g L^{-1} Glucose verbraucht. Hierbei ergibt sich demnach ein Biomasseausbeutekoeffizient von $Y_{X/S} = 0,455 \pm 0,082 \text{ g BTM pro g Glucose}$, was im Vergleich zu Literaturangaben einer Steigerung von 5 % entspricht. Gegen Ende der exponentiellen Phase wurde Acetat im Medium mit einer maximalen Konzentration von ca. $0,8 \text{ g L}^{-1} - 1 \text{ g L}^{-1}$ akkumuliert. Wird Glucose als primäre Kohlenstoffquelle für das *E. coli*-Wachstum limitierend, kann der Organismus in den Sekundärmetabolismus wechseln und das zuvor gebildete Acetat als Kohlenstoffquelle verstoffwechseln [168,169]. Diesbezüglich konnte bis zum Ende der Kultivierung eine Reduktion der Acetatkonzentration auf ca. $0,5 \text{ g L}^{-1} - 0,8 \text{ g L}^{-1}$ gemessen

werden. Des Weiteren war entlang der Kultivierungsdauer ein Anstieg der HCP-Konzentration zu beobachten. Die finale HCP-Konzentration betrug am Ende der Kultivierung $c_{\text{HCP}, \omega} = 0,864 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ und entspricht somit im Vergleich zur Literatur einer relativen Steigerung von 377 %. Die erhöhte Proteinlast könnte sich mit der chemischen Zusammensetzung des definierten Minimal-Mediums nach Korz et al. erklären, welches ursprünglich für die rekombinante Proteinexpression und Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* optimiert wurde [111,112] und dementsprechend zu einer gesteigerten Expression der HCPs im Produktionsorganismus *E. coli* K1 führte. Über die Kultivierungsdauer von ca. 7,3 h konnte eine maximale polySia-Konzentration von $c_{\text{polySia}, \omega} = 0,788 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ detektiert werden, was damit einer RZA von $0,110 \pm 0,018 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Somit konnte unter Verwendung des def. Minimal-Mediums im Rührkesselreaktor eine rel. Ausbeutesteigerung von 227 % erreicht werden. Außerdem wurden die Produktausbeutekoeffizienten berechnet und resultierten in $Y_{\text{P/S}} = 0,032 \pm 0,002 \text{ g polySia pro g Glucose}$ und $Y_{\text{P/X}} = 0,071 \pm 0,008 \text{ g polySia pro g BTM}$.

Tabelle 5-2: Gegenüberstellung der ermittelten Kultivierungs-Endwerte und berechneten Ausbeutekoeffizienten zur Untersuchung eines reproduzierbaren Prozess-Upscalings. Die gemittelten Werte umfassen hierbei die Daten der **A.**: 1,5 L und **B.**: 25 L Kultivierungen in jeweiliger Doppelbestimmung mit berechneten Standardabweichungen als Maß der Reproduzierbarkeit. Die Daten werden den Literaturwerten aus [77] gegenübergestellt und die rel. Steigerung berechnet.

Parameter		gemittelte Werte	Literaturwerte [77]	rel. Steigerung [%]
Zeit	[h]	$7,3 \pm 0,88$	$10,1 \pm 1,8$	-28
OD _{600, ω}	[-]	$33,1 \pm 1,01$	17,5	89
BTM _ω	[g L ⁻¹]	$11,4 \pm 2,04$	$8,7 \pm 1,7$	31
c _{HCP, ω}	[g L ⁻¹]	$0,864 \pm 0,07$	$0,181 \pm 0,05$	377
c _{polySia, ω}	[g L ⁻¹]	$0,788 \pm 0,06$	$0,339 \pm 0,02$	132
μ _{max}	[h ⁻¹]	$0,709 \pm 0,09$	$0,650 \pm 0,05$	9
Y _{X/S}	[g g ⁻¹]	$0,455 \pm 0,082$	$0,435 \pm 0,08$	5
Y _{P/S}	[g g ⁻¹]	$0,032 \pm 0,002$	$0,017 \pm 0,001$	85
Y _{P/X}	[g g ⁻¹]	$0,071 \pm 0,008$	0,039	81
RZA	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	$0,110 \pm 0,018$	0,034	227

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel ein erfolgreiches Prozess-Upscaling in den 1,5 L und 25 L -Reaktormaßstab gezeigt werden. Insgesamt ließ sich eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Kultivierungen und Skalierungen erreichen, wobei die Standardabweichung als Maß der Streuung um den Median in den ermittelten

Werten als gering einzuschätzen ist. Unter Verwendung des definierten Minimal-Mediums konnte in den batch-Kultivierungen im Rührkesselreaktor eine signifikante, rel. Steigerung der polySia-Ausbeute von 132 % und eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute von 227 % erreicht werden. Als nachteilig für die anschließende Produktaufreinigung zeigte sich in den Kultivierungen eine Steigerung der Proteinlast um 377 %. Eine entsprechende Anpassung der Aufreinigungsstrategie zur effizienten Proteinanreicherung wird hierzu nötig.

5.3 Prozess-Upscaling der Rührkesselreaktor-Kultivierung im pO₂-kontrolliertem Zulaufbetrieb

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Optimierung des polySia-Herstellungsprozesses hinsichtlich einer Ausbeutesteigerung ein Verfahren zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* K1 im Zulaufbetrieb entwickelt werden. Hierzu wurde eine pO₂-kontrollierte Zulauf-Strategie gewählt, welche ein Kohlenhydrat-limitierendes Biomassewachstum bei geringen Wachstumsraten erlaubt [112,116]. Eine Akkumulation von Wachstums-inhibierenden Nebenprodukten, wie Acetat, sollte dadurch verhindert werden.

Zur Charakterisierung der pO₂-kontrollierten Zulauf-Strategie und der dadurch angestrebten Hochzelldichtekultivierung wurde der Verlauf von zwei vergleichenden Fermentationen (Abbildung 5-3 A. und B.) über einen Zeitraum von ca. 26 h aufgezeichnet. Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit des Prozesses wurden die Kultivierungsbedingungen in beiden Versuchen gleich gehalten, wobei eine konstante Begasungsrate von 1 vvm und eine konstante Rührerdrehzahl von 600 rpm eingestellt wurde. Der pO₂ wurde analog zu den beschriebenen Kultivierungen in Kapitel 5.2 in der batch-Phase zunächst mit reinem Sauerstoff auf einen Wert von 30 % kontrolliert. In der nachfolgenden fed-batch-Phase gestaltete sich die Glucose-limitierende pO₂-Kontrolle über einen Feedback-Signal gekoppelten Zulauf auf einen Wert von 30 ± 5 %.

Um eine Charakterisierung des Prozesses und einen Vergleich mit den vorherigen Kultivierungen aufstellen zu können, wurde in dieser Versuchsreihe das Biomassewachstum über den gesamten Kultivierungszeitraum anhand des OD₆₀₀ und BTM untersucht. Des Weiteren wurden die Konzentrationen für Protein, Glucose, Acetat und polySia bestimmt. Die gemessenen und ermittelten Daten der Kultivierungen wurden gegen den Kultivierungszeitraum aufgetragen und sind in Abbildung 5-3 dargestellt. Darüber hinaus sind die relevanten Endwerte der Kultivierung sowie die berechneten Ausbeutekoeffizienten und RZA in Tabelle 5-3 zusammengefasst und vergleichend den Literaturwerten zur polySia-

Produktion und Kultivierung im Medium nach Rodríguez-Aparicio et al. [77] gegenübergestellt, wobei der Zulauf über eine festgelegte Wachstumsrate kontrolliert wurde.

Innerhalb der ersten 5 h der Kultivierungen war eine gleichmäßige Reduktion des pO_2 -Wertes von 100 % auf ca. 30 % ersichtlich. Anschließend schwankte der Wert um 30 %, bis er nach ca. 6 h sprunghaft auf ca. 70 % - 80 % anstieg. Im nachfolgenden Kultivierungszeitraum bis ca. 26 h schwankte der pO_2 erneut um einen Wert von ca. 30 %. In beiden Kultivierungen zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit des online gemessenen pO_2 -Wertes. Der pO_2 konnte in der batch-Phase durch eine Sauerstoffanreicherung der Zuluft erfolgreich auf einen Wert von ca. 30 % kontrolliert werden. Das Ende der batch-Phase wurde durch den sprunghaften Anstieg des pO_2 erfasst. Darüber hinaus konnte der pO_2 in der nachfolgenden fed-batch-Phase erfolgreich über die Zulaufrate des Feedings auf einen Wert von 30 ± 5 % kontrolliert werden.

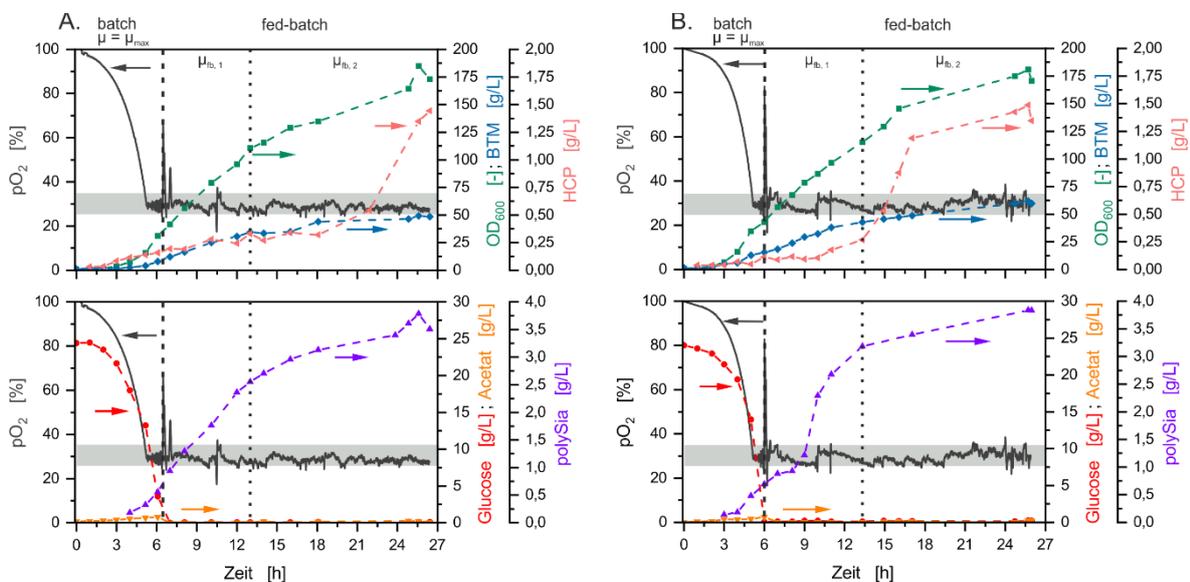


Abbildung 5-3: Darstellung der Nährkesselreaktor-Kultivierungen im pO_2 -kontrolliertem Zulaufbetrieb in Doppelbestimmung (A. und B.). Dargestellt ist in Grau: pO_2 [%]; Grün: OD_{600} [-], Blau: BTM [g L⁻¹], Rosa: HCP [g L⁻¹], Rot: Glucose [g L⁻¹], Orange: Acetat [g L⁻¹] und Violett: polySia [g L⁻¹]. Versuchsbedingungen: V_L : 20 L; T : 37 °C; n : 600 rpm; \dot{V} : 20 L min⁻¹ (1 vvm); pO_2 -Regelung auf 30 % mittels reinem Sauerstoff in der batch-Phase und Zulaufrate in der fed-batch-Phase (Grau-hinterlegter Bereich), $OD_{600, \alpha} = 0,7 - 0,8$. Kultivierung im definierten Minimal-Medium (pH 7,5) nach Korz et al., $c_{Glc, \alpha} = 25$ g L⁻¹.

In der batch-Phase der Kultivierung konnte ein unlimitiertes Wachstum mit einer maximalen Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,767 \pm 0,05$ h⁻¹ ermittelt werden. In der darauffolgenden, Glucose-limitierten fed-batch-Phase konnte ein reduziertes Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{fb,1} = 0,164 \pm 0,02$ h⁻¹ im Kultivierungszeitraum von ca. 6 h - 13 h (fed-batch-Phase 1) und anschließend mit $\mu_{fb,2} = 0,032 \pm 0,01$ h⁻¹ im Kultivierungszeitraum zwischen ca. 13 h - 26 h (fed-batch-Phase 2) beobachtet werden. Vergleichende Arbeiten

zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* in Glucose-Mineralsalz-Medien haben gezeigt, dass signifikante Mengen Acetat bei Wachstumsraten von $\mu = \mu_{\text{krit.}} > 0,35 \text{ h}^{-1}$ gebildet werden [121,170–172]. Diesbezüglich konnte in der fed-batch-Phase die spezifische Wachstumsrate durch die $p\text{O}_2$ -kontrollierte Zulaufstrategie und den Glucose-limitierenden Bedingungen erfolgreich unterhalb von $\mu_{\text{krit.}}$ gehalten werden. In der fed-batch-Phase 2 konnte eine weitere Reduktion der spezifischen Wachstumsrate beobachtet werden, was im Wesentlichen durch limitierende oder inhibierende Konzentrationen weiterer Medienbestandteile (wie z.B. NH_3 , Phosphat) oder metabolischer Nebenprodukte (wie z.B. Acetat, Lactat) hervorgerufen werden kann [173,174]. Neben Glucose und Acetat wurden keine weiteren Wachstumsrelevanten Medienbestandteile analysiert, sodass hierzu keine genaue Aussage getroffen werden kann. Da über den gesamten Prozess jedoch flüssiger Ammoniak zur pH-Kontrolle eingesetzt wurde, erscheint eine kritische Akkumulation von $\text{NH}_3 > 3 \text{ g L}^{-1}$ als wahrscheinlich [111,116].

Über den gesamten Zeitraum der Fermentation von $26,2 \pm 0,2 \text{ h}$ wurde Biomasse im Kulturmedium angereichert und resultierte in einer finalen $\text{OD}_{600, \omega} = 183,1 \pm 2,05$ und $\text{BTM}_{\omega} = 55,6 \pm 6,3 \text{ g L}^{-1}$. Die Glucosekonzentration fiel innerhalb der batch-Phase von 25 auf 0 g L^{-1} ab. Gleichzeitig war der sprunghafte Anstieg des $p\text{O}_2$ von ca. 30 % auf 70 % messbar und wurde von der $p\text{O}_2$ -kontrollierten Zulaufstrategie als Initiierung des Feedings erkannt. Während der fed-batch-Phase wurde der $p\text{O}_2$ mittels Glucose-Zulauf auf 30 % kontrolliert, wobei die Glucosekonzentration unterhalb eines Wertes von $c_{\text{Glc}} < 0,3 \text{ g L}^{-1}$ lag. Zur Charakterisierung der Hochzelldichtekultivierung lässt sich hierbei ein durchschnittlicher Biomasseausbeutekoeffizient von $Y_{X/S} = 0,264 \pm 0,006 \text{ g BTM pro g Glucose}$ (- 30 % rel. Steigerung) berechnen. Des Weiteren konnte in der batch-Phase eine Akkumulation von Acetat bis zu einer Konzentration von ca. $0,756 \pm 0,029 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden. In der nachfolgenden fed-batch-Phase wurde die Konzentration reduziert und konnte über den restlichen Kultivierungszeitraum unterhalb von $c_{\text{Acetat}} < 0,345 \pm 0,085 \text{ g L}^{-1}$ gehalten werden. Es ist zu erkennen, dass Acetat unter den Glucose-limitierenden Bedingungen des $p\text{O}_2$ -kontrollierten Zulaufs als Sekundärmetabolit von *E. coli* verwertet werden konnte und zu einer Reduktion der Konzentration führte. Darüber hinaus konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch die Glucose-limitierenden Bedingungen der Zulaufstrategie zu keiner Wachstums-inhibierende Akkumulation von kritischen Acetatsmengen $c_{\text{Acetat}} < c_{\text{krit.}} < 10 \text{ g L}^{-1}$ kam. Wie bereits zuvor beschrieben, werden über den gesamten Kultivierungszeitraum Proteine und polySia ins Medium freigesetzt. Am Ende der Kultivierung konnte eine finale Proteinkonzentration von $c_{\text{HCP}, \omega} = 1,5 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt werden, was einer rel. Steigerung von 330 % entspricht. Für das Zielprodukt polySia konnte eine finale Konzentration von $c_{\text{polySia}, \omega} = 3,7 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt werden und entspricht im Vergleich zu den Literaturwerten

einer rel. Steigerung von 182 %. Die entsprechenden Produktausbeutekoeffizienten wurden berechnet und resultierten in $Y_{P/S} = 0,018 \pm 0,001$ g polySia pro g Glucose (-35 % rel. Steigerung) und $Y_{P/X} = 0,067 \pm 0,005$ g polySia pro g BTM (-8 % rel. Steigerung). Die vergleichsweise geringeren Ausbeutekoeffizienten weisen darauf hin, dass der Organismus in der beschriebenen Prozessführung die zur Verfügung stehende Glucose im Hinblick auf die Biomasse und polySia-Produktion ineffizienter verwertet, jedoch trotzdem in gesteigerten Ausbeuten resultiert. Die Raum-Zeit-Ausbeute entsprach im pO_2 -kontrollierten Zulaufbetrieb einem Wert von $RZA = 0,130 \pm 0,005$ g L⁻¹ h⁻¹ und entspricht im Vergleich zur Literatur einer rel. Steigerung von 47 %.

Tabelle 5-3: Gegenüberstellung der ermittelten Kultivierungs-Endwerte und berechneten Ausbeutekoeffizienten zur Untersuchung eines reproduzierbaren Prozess-Upscalings im Zulaufbetrieb. Die gemittelten Werte umfassen hierbei die Daten der 20 L Kultivierungen in Doppelbestimmung (A. und B.) und die berechneten Standardabweichungen als Maß der Reproduzierbarkeit. Die Daten werden den Literaturwerten aus [77] gegenübergestellt und die rel. Steigerung berechnet.

Parameter		gemittelte Werte	Literaturwerte [77]	rel. Steigerung [%]
Zeit	[h]	26,2 ± 0,2	13,6	93
OD _{600, ω}	[-]	183,1 ± 2,05	24	663
BTM _ω	[g L ⁻¹]	55,6 ± 6,3	18	209
C _{HCP, ω}	[g L ⁻¹]	1,5 ± 0,02	0,340	330
C _{polySia, ω}	[g L ⁻¹]	3,7 ± 0,16	1,3	182
μ _{max}	[h ⁻¹]	0,767 ± 0,05	0,690	11
Y _{X/S}	[g g ⁻¹]	0,264 ± 0,006	0,380	-30
Y _{P/S}	[g g ⁻¹]	0,016 ± 0,001	0,027	-35
Y _{P/X}	[g g ⁻¹]	0,062 ± 0,005	0,072	-8
RZA	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,130 ± 0,005	0,096	47

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel eine erfolgreiche Etablierung einer Hochzelldichtekultivierung im pO_2 -kontrollierten Zulaufbetrieb gezeigt werden. Über die Zulaufstrategie konnte der pO_2 zuverlässig auf einen Wert von 30 % kontrolliert werden. Eine Acetat-Akkumulation konnte durch Glucose-limitierende Bedingungen und gezielte Reduzierung der Wachstumsrate auf $\mu < \mu_{krit.}$ verhindert werden. Die finale Produktausbeute konnte zu vergleichenden Prozessführungen um 182 % gesteigert werden. Obwohl für die Prozesskennzahlen der Biomasse- und Produktausbeutekoeffizienten leicht reduzierte Werte bestimmt wurden, konnte die Raum-Zeit-Ausbeute um 47 % gesteigert werden.

5.4 Prozesstransfer: Satzkultivierung im Einweg-Beutelreaktor

Die Kultivierung in Einweg-Beutelreaktoren haben in der biopharmazeutischen Produktion eine Reihe von Vorteilen. Beispielsweise werden solche Systeme durch den Hersteller vorsterilisiert und zertifiziert, sodass zeit- und kostenintensive Reinigungs- und Sterilisationsprozedere sowie deren Dokumentationen eingespart werden können. Eine Zulassung von Produktionsprozessen und Medikamenten sollen somit erleichtert werden. Außerdem erlauben diese Systeme eine hohe Flexibilität der Arbeitsvolumina sowie einen einfachen Prozesstransfer zur Produktion unter GMP-konformen Reinraum-bedingungen [175]. Die welleninduzierte Durchmischung ermöglicht einen homogenen und schonenden Sauerstoffeintrag über den Reaktorkopfraum. Der volumetrische Sauerstofftransferkoeffizient ist bei diesem System mit $\sim 47 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu klassischen Rührkesselreaktoren mit $\sim 392 \text{ h}^{-1}$ deutlich geringer [53,176]. Aus diesem Grund eignen sich welleninduzierte Beutelreaktoren vor allem für die Kultivierung von Scherstress-sensitiven Organismen mit vergleichsweise geringen Wachstumsraten und niedrigem Sauerstoffbedarf, wie z.B. Säugerzellen oder Basidiomyceten wie *Flammulina velutipes* und *Pleurotus sapidus* [53,176]. Sauerstoff-limitierende Bedingungen können in der Kultivierung von aeroben Bakterien mit hohem Sauerstoffbedarf und hohen Wachstumsraten durch eine kaskadierte Steigerung der Kippfrequenz und einer Sauerstoff-supplementierter Begasung verhindert werden [53,77].

In diesem Kapitel soll die exemplarische Kultivierungsperformance von *E. coli* K1 im 25 L Einweg-Beutelreaktor und unter Verwendung des definierten Minimalmediums nach Korz et al. zur polySia-Produktion untersucht werden. Die Prozess-Übertragbarkeit auf das Beutelreaktorsystem und die Produktivität liegen hierbei im Fokus und werden mit den Ergebnissen der Rührkesselkultivierungen verglichen.

Für den Transfer mussten verschiedene Prozesseinstellungen angepasst werden. Die Durchmischung des Reaktors wurde über die Kippfrequenz mit einem Kippwinkel von 10° ermöglicht. Die Begasungsrate musste auf $\dot{V} = 2,5 \text{ L min}^{-1}$ (0,1 vvm) reduziert werden, um ein frühzeitiges Verblocken der Abluftfilter und einen kritischen Anstieg des Beutelinndrucks zu verhindern. Die Sauerstoffversorgung sollte, wie zuvor beschrieben, über eine kaskadierte Steigerung der Kippfrequenz von 21 auf 42 rpm und einer subsequenten Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Zuluft realisiert und auf einen pO_2 von 40 % geregelt werden. Die online-Erfassung von pO_2 und pH erfolgte hierbei über eine optische Messung.

Zur Beurteilung des Sauerstoffeintrags ins Medium wurde in Abhängigkeit zum pO_2 die Kippfrequenz und der Sauerstoffanteil der Zuluft gemessen. Das Biomassewachstum wurde

anhand der OD_{600} und BTM aufgezeichnet. Zudem wurden die Konzentrations-Verläufe von HCPs, Glucose und polySia erfasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-4 ersichtlich. Darüber hinaus sind die relevanten Endwerte der Kultivierung sowie die berechneten Ausbeutekoeffizienten und RZA in Tabelle 5-4 zusammengefasst und vergleichend den gemittelten Werten der Kultivierungen im Rührkesselreaktor gegenübergestellt.

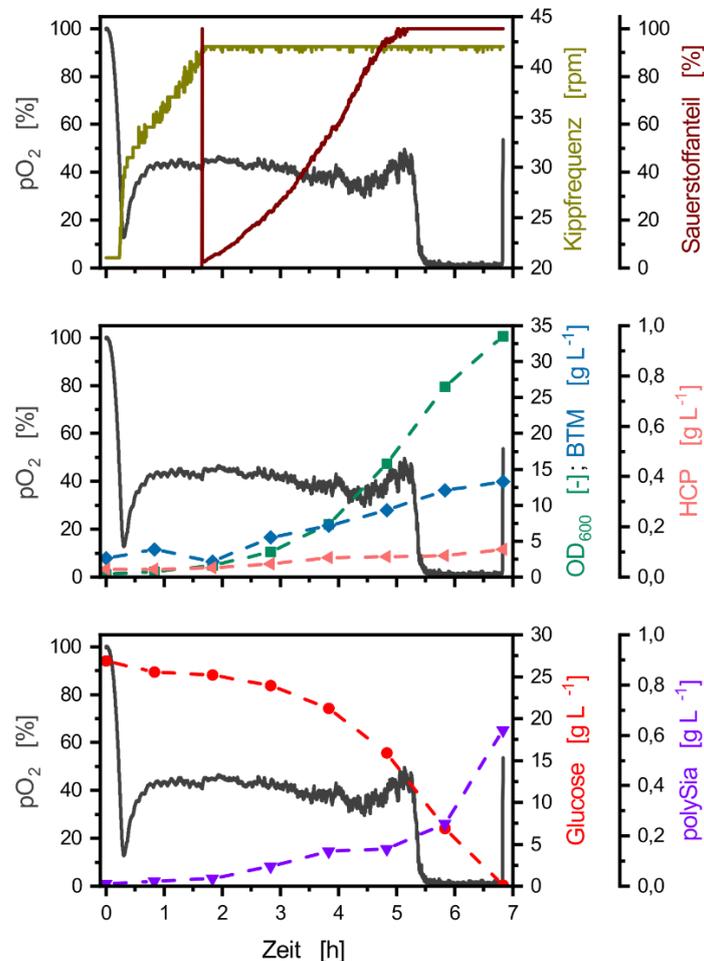


Abbildung 5-4: Darstellung der Kultivierung im 25 L Einweg-Beutelreaktor. Dargestellt ist in Grau: pO_2 [%]; Dunkelgelb: Kippfrequenz [rpm]; Dunkelrot: Sauerstoffanteil der Zuluft [%]; Grün: OD_{600} [-], Blau: BTM [$g L^{-1}$], Rosa: HCP [$g L^{-1}$], Rot: Glucose [$g L^{-1}$] und Violett: polySia [$g L^{-1}$]. Versuchsbedingungen: V_L : 25 L; T: 37 °C; V : 2,5 $L min^{-1}$ (0,1 vvm); pO_2 -Regelung auf 40 % durch Steigerung der Kippfrequenz und Sauerstoffanteil in der Zuluft, $OD_{600, \alpha} = 0,4$. Kultivierung im definierten Minimal-Medium (pH 7,5) nach Korz et al., $c_{Glucose} = 25 g L^{-1}$.

In Abbildung 5-4 ist zu erkennen, dass der pO_2 innerhalb der ersten 0,5 h der Kultivierung auf einen Wert von 100 % auf < 40 % fiel. Anschließend schwankte der pO_2 auf einen Wert von ca. 40 %. Nach ca. 5,5 h fiel der pO_2 auf < 3 %, bis dieser zum Ende der Kultivierung nach 6,8 h erneut anstieg. Die Kippfrequenz erreichte nach ca. 1,5 h der Kultivierung den maximalen Wert 42 rpm (*rocks per minute*). Gleichzeitig wurde der Anteil von reinem Sauerstoff in der Zuluft bis zu einer Kultivierungszeit von ca. 5,5 h von 0 auf 100 % gesteigert. Die Daten der Kultivierung zeigen, dass eine pO_2 -Regelung auf 40 % durch die

Steigerung der Kippfrequenz und Sauerstoffbegasung dementsprechend nicht möglich war, da diese frühzeitig deren Maxima erreichten. Eine Sauerstofflimitierung zwischen ca. 5,5 h - 6,8 h war die Folge.

Insgesamt ist im Kultivierungszeitraum bis ca. 6 h ein exponentielles Biomassewachstum mit $\mu_{\max} = 0,738 \text{ h}^{-1}$ ersichtlich. Nach Beendigung der Kultivierung konnte für die Biomasseproduktion eine finale $OD_{600, \omega} = 33,5$ und eine $BTM_{\omega} = 13,3 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden. Hierbei zeigt sich eine hohe Vergleichbarkeit zu den ermittelten Ergebnissen der Rührkesselreaktor-Kultivierungen im 1,5 L und 25 L -Maßstab (Vergleich Kapitel 5.2). Die Sauerstofflimitierung im Beutelreaktor schien hierbei keinen Einfluss auf das Biomassewachstum zu haben. Die Glucosekonzentration fiel innerhalb der batch-Phase gleichmäßig auf einen Wert $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ab. Für den Biomasseausbeutekoeffizienten konnte dementsprechend ein Wert von $Y_{X/S} = 0,532 \text{ g BTM pro g Glucose}$ berechnet werden. Für die finale HCP-Konzentration konnte zum Kultivierungsende ein Wert von $c_{\text{HCP}, \omega} = 0,110 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden. Dieser Wert ist im Vergleich zur Kultivierung im Rührkesselreaktor deutlich geringer. Eine naheliegende Begründung dieses Ergebnisses ist der vergleichsweise niedrige Scherstress im wellendurchmischten Beutelreaktor, wobei weniger Zellen lysieren und somit geringere Proteinnengen ins Medium freigesetzt werden. Über die Kultivierungsdauer von ca. 6,8 h konnte eine maximale polySia-Konzentration von $c_{\text{polySia}, \omega} = 0,620 \text{ g L}^{-1}$ detektiert werden und entspricht damit einer RZA von $0,098 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die daraus berechneten Produktausbeute-koeffizienten resultierten in $Y_{P/S} = 0,025 \text{ g polySia pro g Glucose}$ und $Y_{P/X} = 0,047 \text{ g polySia pro g BTM}$. Die geringere Produktausbeute im Beutelreaktor lässt sich ebenfalls durch den geringeren Scherstress erklären, wobei eine geringere polySia-Menge von der Zelloberfläche abgetrennt und ins Medium freigesetzt wird.

Tabelle 5-4: Darstellung der ermittelten Kultivierungs-Endwerte und berechneten Ausbeutekoeffizienten. Die ermittelten Werte umfassen hierbei die Daten einer exemplarischen 25 L Kultivierung im Einweg-Beutelreaktor. Die Daten werden den gemittelten Ergebnissen der Kultivierung im Rührkesselreaktor gegenübergestellt und die rel. Steigerung berechnet.

Parameter		Einweg- Beutelreaktor	Rührkessel- reaktor	rel. Steigerung [%]
Zeit	[h]	6,8	$7,3 \pm 0,877$	-7
$OD_{600, \omega}$	[-]	33,5	$33,1 \pm 1,008$	1
BTM_{ω}	$[\text{g L}^{-1}]$	13,3	$13,4 \pm 0,116$	-1
$c_{\text{HCP}, \omega}$	$[\text{g L}^{-1}]$	0,110	$0,864 \pm 0,071$	-87
$c_{\text{polySia}, \omega}$	$[\text{g L}^{-1}]$	0,620	$0,788 \pm 0,062$	-21
μ_{\max}	$[\text{h}^{-1}]$	0,738	$0,709 \pm 0,090$	4

$Y_{X/S}$	[g g ⁻¹]	0,532	0,455 ± 0,082	17
$Y_{P/S}$	[g g ⁻¹]	0,025	0,032 ± 0,002	-21
$Y_{P/X}$	[g g ⁻¹]	0,047	0,071 ± 0,008	-34
RZA	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,098	0,110 ± 0,018	-17

Insgesamt konnte in der exemplarischen 25 L Kultivierung im Einweg-Beutelreaktor eine vergleichbare Kultivierungsdauer und Biomasseproduktivität mit einer hohen Wachstumsrate erreicht werden. Aufgrund der geringen Schwerwirkung im wellendurchmischten Beutelreaktor wurde deutlich weniger Protein in das Medium freigesetzt, was enorme Vorteile für das nachfolgende DSP bietet. Gleichzeitig wurde jedoch auch ca. 20 % weniger Produkt von der Zelloberfläche gelöst, was in einer geringeren Gelöstmengung im Medium resultierte.

Die Sauerstofflimitierung gegen Ende der Kultivierung hatte anscheinend keinen Einfluss auf die Produktivität im Satzverfahren. Durch die Etablierung einer pO₂-kontrollierten Zulaufstrategie sind das Verhindern einer Sauerstofflimitierung und das Erreichen von Hochzellichten im Einweg-Beutelreaktorsystem denkbar.

5.5 Zusammenfassung und Fazit zu den Upstream-Versuchen

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den bestehenden Prozess zur polySia-Produktion zu optimieren und die Produktivität anhand maßgebender Kennzahlen zu charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Upstream zusammengefasst und den Literaturwerten zur bisherigen Produktionsstrategie gegenübergestellt.

Zunächst konnte im Schüttelkolben gezeigt werden, dass die Produktivität bemessen an der Raum-Zeit-Ausbeute unter Verwendung des definierten Minimalmediums nach Korz et al. um 62% gesteigert wurde. Anschließend konnte eine erfolgreiche Maßstabsübertragung im 1,5 L und 25 L Rührkesselreaktorvolumen durchgeführt werden. Bemessen am Sauerstoffpartialdruck pO₂, welcher hier als Kennzahl des Upscalings betrachtet wurde, zeigte sich eine zufriedenstellende Übertragbarkeit zwischen den Maßstäben. Darüber hinaus konnte durch die Systemübertragung eine weitere Steigerung der Produktivität um 227 % erreicht werden. Außerdem konnte ein Verfahren zur Hochzellichte-kultivierung im pO₂-kontrollierten Zulaufbetrieb etabliert werden, wobei im Vergleich zum bisherigen Prozess eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute von 47 % erreicht wurde. Abschließend konnte der Prozess auf das Einweg-Beutelreaktorsystem übertragen werden, wobei vergleichbare Biomasseausbeuten, jedoch 20 % geringere Produktausbeuten erreicht wurden. Insgesamt

konnte der Upstream-Prozess hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute erfolgreich optimiert werden.

6 Downstream Prozess: Aufreinigung von LC polySia

PolySia wird vom Produktionsorganismus *E. coli* K1 in der Glycokalix auf der Zelloberfläche gebildet und während der Kultivierung kontinuierlich ins Medium freigesetzt. Im Downstream-Prozess soll nun die freigesetzte polySia aufgereinigt und von Zellen, kontaminierenden Proteinen, DNA und Salzen abgetrennt werden.

6.1 Produktaufreinigungsstrategie und Ausbeutebestimmung

Die in dieser Arbeit zum Trage kommende Downstream-Strategie wurde essentiell von de Vries entwickelt und beschrieben [77]. Da im Upstream-Prozess höhere Zelldichten und gesteigerte Proteinlasten erreicht wurden, musste die Aufreinigungsstrategie angepasst werden, sodass eine effiziente Abreicherung von Zellen, Proteinen, DNA und Salzen gewährleistet werden konnte. Der Downstream-Prozess ist für die Produktaufarbeitung aus den Kultivierungen im 25 L Satzbetrieb des Rührkesselreaktors in Abbildung 6-1 gezeigt.

Nach Beendigung der Kultivierung wurde ein Reifeprozess der Kulturbrühe bei 8 °C für ca. 17 h über Nacht durchgeführt. Es wurde beschrieben, dass hierbei zellgebundene polySia ins Medium freigesetzt wurde und zu einer Steigerung der polySia-Konzentration um ca. 10 % führte. Darüber hinaus kam es durch den Reifeprozess zu einer Zellyse und einer Steigerung der Proteinlast von ca. 75 %.

Die Zellseparation erfolgte über kontinuierliche Zentrifugation, wodurch die Bakterienkultur effizient vom Medium abgetrennt werden konnte. Eine Limitation dieser Methode zeigte sich beim Zentrifugenkopf, welcher als Reservoir abgetrennter Zellen eine begrenzte Kapazität besitzt. Durch die erhöhte Zelldichte im Upstreaming wurde die maximale Kapazität des Rotors frühzeitig erreicht, sodass die Zentrifugation nach etwa 50 % prozessierter Kulturbrühe zum Entleeren unterbrochen werden musste. Eine weitere Herausforderung dieser Methode stellt die Zulassung für einen GMP-konformen Prozess dar. Alternativ bieten sich hierfür kosteneffiziente Einweg-Tiefenfiltereinheiten an, die sich sowohl zur Prozessierung von Hochzelldichten im Labor- und Pilotmaßstab als auch für den Produktionsmaßstab > 2.000 L im klinischen und kommerziellen Betrieb eignen [177]. Aus zeitlichen Gründen war eine Bearbeitung und Untersuchung dieser Tiefenfilter-Applikation im polySia-Aufarbeitungsprozess jedoch nicht möglich.

Zur Berechnung der Aufreinigungseffizienzen entlang der Downstreaming-Schritte wurden nach Zellabtrennung mittels kontinuierlicher Zentrifugation die Konzentrationen für polySia

und Protein bestimmt und als Ausgangswert mit 100 % dargestellt (Abbildung 6-1, 1). Das hierbei vorliegende Massenverhältnis von Protein zu polySia betrug $1,74 \text{ g}_{\text{HCP}} \text{ g}_{\text{polySia}}^{-1}$.

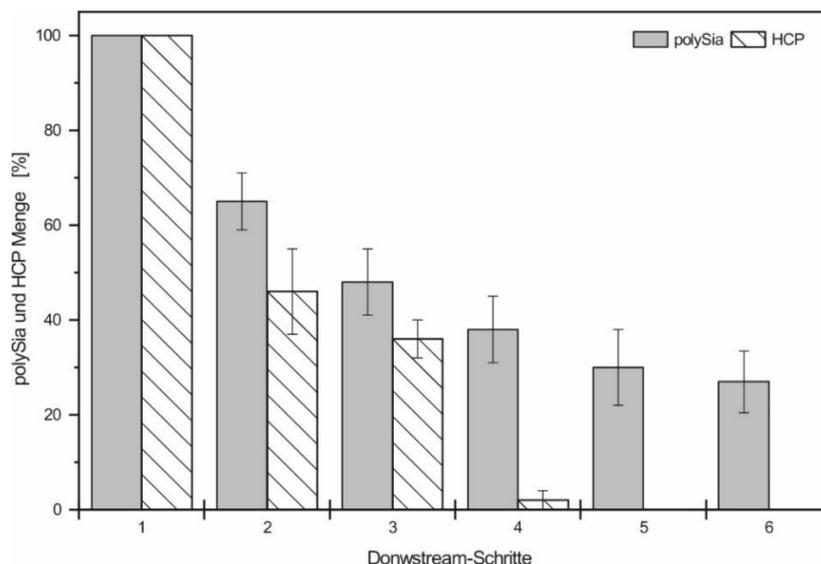


Abbildung 6-1: Ermittelte Ausbeuten zum Downstream-Verfahren zur Aufreinigung von LC polySia. Dargestellte Schritte beinhalten 1.: kontinuierliche Zentrifugation; 2.: Ultrafiltration (10 kDa) im Crossflow-Betrieb; 3.: Ethanol-fällung; 4.: Behandlung mit Tonmineralien; 5.: Dia-Ultrafiltration (5 kDa) im Crossflow-Betrieb; 6.: Lyophilisation. Am Ende des Downstream-Prozesses lag LC polySia mit einer Ausbeute von $27 \pm 6,5 \%$ vor.

Der zellfreie Zentrifugationsüberstand von ca. 25 L konnte im nächsten Schritt mittels Crossflow-Ultrafiltration erfolgreich reduziert und das Prozessvolumen mit der darin enthaltenen Produktfracht 50-fach ($V_{\text{Retentat}} \sim 500 \text{ mL}$) aufkonzentriert werden. Niedermolekulare Medienbestandteile und Wasser wurden permeatseitig über eine Membran mit einem MWCO von 10 kDa abgetrennt. Nach der Ultrafiltration konnte im Retentat eine Produktausbeute von $65 \pm 6 \%$ ermittelt werden. Da die Kettenlänge der produzierten polySia in einem Bereich zwischen DP1 - DP120 variiert [134], wurden aufgrund des MWCO polySia-Kettenlängen $< 10 \text{ kDa} \cong \text{DP } 35$ [77,134] über den Permeatfluss abgetrennt. Darüber hinaus wurde die Proteinfracht auf $46 \pm 9 \%$ reduziert. Das sich daraus ergebende Massenverhältnis betrug hierbei $1,23 \text{ g}_{\text{HCP}} \text{ g}_{\text{polySia}}^{-1}$. Dieser Downstream-Schritt führt zu einer erfolgreichen Produktkonzentrierung und lässt sich zudem problemlos in einen GMP-konformen Prozess etablieren. Das verwendete System ermöglicht den flexiblen Einsatz von verschiedenen Einweg-Produkten, wie z.B. Schläuchen, Pumpen- und Ventilköpfen sowie Membranen, die für die pharmazeutische Produktion zertifiziert und zugelassen sind. Weitere Informationen lassen sich hierzu im Anhang finden (Kapitel 9.1, Tabelle 9-2).

Die verbleibenden Proteine wurden mittels Ethanol-Fällung und anschließender Behandlung mit Tonmineralien nahezu vollständig entfernt. Aufgrund der erhöhten Proteinfracht musste der Schritt der Tonmineralienbehandlung zweimal durchgeführt werden. Die Proteinlast

konnte hierbei auf $< 0,09 \text{ g}_{\text{HCP}} \text{ g}_{\text{polySia}}^{-1}$ reduziert werden. Die Gesamtmenge an polySia wurde dementsprechend auf $38 \pm 7 \%$ verringert. Da die genaue Zusammensetzung der verwendeten Tonmineralien chargenabhängig und variabel ist, gestaltet sich hierbei die Zulassung für einen GMP-konformen Prozesses als erschwert. Alternativ könnten zur Proteinanreicherung Membranadsorber-basierte Einweg-Einheiten verwendet werden, wobei Proteine im Durchfluss von polySia abgetrennt werden könnten.

Nach erfolgreicher Abtrennung der Proteine wurde die polySia-enthaltene Prozesslösung mittels Dia-Ultrafiltration im Crossflow-Betrieb mit Reinstwasser entsalzt. Hierbei wurde eine Membran mit einem MWCO von 5 kDa verwendet. Die polySia-Ausbeute betrug $27 \pm 6,5 \%$. In früheren Arbeiten wurde die Produkt enthaltende Prozesslösung mittels Dialyseschläuchen über einen Gesamtzeitraum von ca. 72 h entsalzt [77,134]. Unter Verwendung der Ultrafiltrationsanlage konnte die Produktlösung auf ein finales Volumen von 250 mL aufkonzentriert und die Dialysezeit auf ca. 3 h reduziert werden. Als einfache und zuverlässige Prozesskontrolle wurde die Leitfähigkeit über den Dialysezeitraum erfasst. Beim Erreichen eines konstanten Leitfähigkeit-Wertes von ca. $1,2 - 2 \text{ mS cm}^{-1}$ wurde die Diafiltration beendet. Zur finalen Trocknung von LC polySia wurde die verbleibende Produktlösung lyophilisiert.

Am Ende des Downstream-Prozesses konnte aus dem 25 L Kultivierungsmaßstab ca. $5,9 \pm 0,38 \text{ g LC polySia}$ aufgereinigt werden. Kontaminierende Proteine wurden vollständig abgereichert. Die finale DNA-Konzentration betrug ca. $1,1 \mu\text{g}_{\text{DNA}} \text{ mg}_{\text{polySia}}^{-1}$. Außerdem konnte eine maximale polySia-Kettenlänge von $\geq \text{DP}80$ bestimmt werden. Da Endotoxine in diesem Prozess nicht abgereichert wurden, betrug die finale Endotoxinkonzentration ca. $235.086 \pm 110.000 \text{ EU mg}^{-1}$.

6.2 Zusammenfassung und Fazit zu den Downstream-Versuchen

Durch den hier dargestellten Downstream-Prozess konnte LC polySia aus der Kulturbrühe aufgereinigt werden, wobei Zellen, Proteine, DNA und Salze effizient abgereichert wurden. Die beschriebene Produkttrocknung mittels Lyophilisation ist hierbei optional. Da im Herstellungsverfahren von polySia avDP20 eine thermische Hydrolyse von LC polySia in wässriger Lösung vorgesehen ist, besteht die Möglichkeit einer direkten Prozessierung der entsalzten Produktlösung nach Diafiltration. Darüber hinaus konnte der Prozess durch die Implementierung der Diafiltration zur Entsalzung weiter optimiert werden. Die effiziente Entfernung von Endotoxinen mittels der nach de Vries beschriebenen NaOH-Behandlung und Anionenaustauscherchromatographie (AEX) Methode [77] wurde vernachlässigt. Da zur

polySia avDP20-Herstellung eine thermische Hydrolyse mit anschließender Membranadsorber-basierter AEX- (Abk. *anion exchange chromatography*) Fraktionierung vorgesehen ist, wird eine weitere Reduktion der Endotoxinbelastung erwartet.

7 Produktion und Isolierung von polySia avDP20

Polysialinsäure mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von DP20 (polySia avDP20) wird zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen untersucht [7,65]. Der pharmazeutisch relevante Kettenlängenbereich kann hierbei aus der zuvor biotechnologisch produzierten langkettigen polySia mittels thermischer Hydrolyse gewonnen werden. Die spontane, thermische Hydrolyse stellt derzeit die bevorzugte Methode zur Fragmentierung der polySia-Ketten dar. Da die thermische Behandlung von LC polySia zu einer unspezifischen Hydrolyse des Polymers führt, liegt der Wertstoff in einer inhomogenen Mischung unterschiedlicher Kettenlängen vor. Aufgrund der negativen Ladung der Polysialinsäure-Seitengruppen eignet sich zur Isolierung der polySia avDP20 vor allem die AEX.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Vorgang der thermischen Hydrolyse genauer charakterisiert und optimiert werden. Insbesondere der Einfluss der Hydrolysedauer und -temperatur soll hierbei untersucht werden. Zur Entwicklung und Etablierung eines GMP-konformen Produktionsprozesses soll zur chromatografischen Trennung von niedermolekularen polySia-Ketten die Applikation von Einweg-Membranadsorbentien untersucht werden. Der Fokus soll hierbei auf der Isolierung von möglichst spezifischen Kettenlängenbereichen liegen sowie der Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur Isolierung von polySia avDP20.

7.1 Thermisch induzierte Hydrolyse zur Produktion von niedermolekularem polySia

Bei der thermischen Hydrolyse zerfällt die polySia-Kette entsprechend der Hydrolysebedingungen spontan und unspezifisch in niedermolekulare Poly-, Oligo- und Monomere. In der pharmazeutischen Anwendung wird jedoch lediglich ein spezifischer Kettenlängenbereich mit einem DP von 20 ± 6 benötigt. Zur Produktion von polySia avDP20 eignen sich sowohl kommerzielle Colominsäure als auch die biotechnologisch produzierte LC polySia. Ziel der Hydrolyse ist die Akkumulation von polySia-Ketten bis zu einem maximalen Polymerisationsgrad von DP40, wobei, unter theoretischer Betrachtung, von einer Gaußverteilung der variierenden Kettenlängen mit einem quantitativen Maximum bei DP20 ausgegangen wird.

7.1.1 Vergleichende Untersuchung der thermischen Hydrolyse von Colominsäure und LC polySia bei 65 °C

In der Charakterisierung des Hydrolyseverhaltens wurde kommerzielle Colominsäure und biotechnologisch produzierte LC polySia in einer Konzentration von 1 g L⁻¹ in deionisiertem Wasser untersucht. Die Hydrolyse wurde bei einer Temperatur von 65 °C durchgeführt und zu definierten Zeitpunkten zwischen 0 min - 480 min terminiert. Die Kettenlängenverteilung wurde anschließend mittels der zuvor beschriebenen HPLC-CAD (Vergleich Kapitel 4.1) bestimmt.

Exemplarische Chromatogramme von Colominsäure und LC polySia sind zur Darstellung des Hydrolyseverlaufs und der zeitlichen Reduktion der Kettenlängen in Abbildung 7-1 gezeigt. Zur Bestimmung der optimalen Hydrolysebedingungen sind die gemittelten Werte des maximal detektierbaren Polymerisationsgrades gegen die Hydrolysedauer in Abbildung 7-2 aufgetragen.

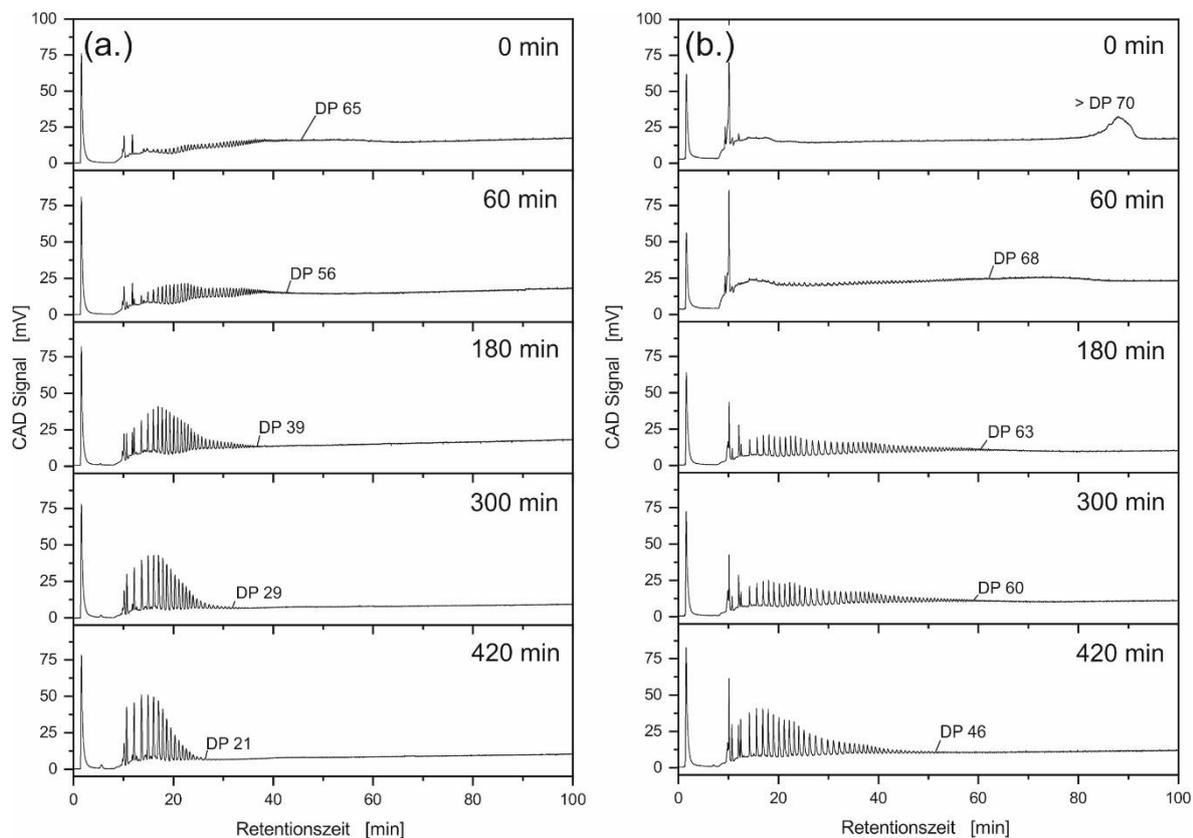


Abbildung 7-1: Chromatogramme der vergleichenden thermischen Hydrolyse von Colominsäure (a.) und LC polySia (b.) bei einer Temperatur von 65 °C. Zur Darstellung des zeitlichen Hydrolyseverlaufs sind exemplarisch die Chromatogramme der Proben mit einer Hydrolysedauer von 0, 60, 180, 300 und 420 min gezeigt. Die Bestimmung der Kettenlängenverteilung wurde mittels HPLC-CAD durchgeführt.

In Abbildung 7-1 a. sind die Chromatogramme kommerzieller Colominsäure in Abhängigkeit zur Hydrolysedauer ersichtlich. Im Chromatogramm der unhydrolysierten Colominsäure zum Zeitpunkt t_0 konnte eine Kettenlängenverteilung von DP1 - DP65 detektiert werden. Mit zunehmender Hydrolysedauer wurde die Kettenlänge reduziert und resultierte nach 420 min in einer maximalen Kettenlänge von $DP21 \pm 2$. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Peakintensitäten für niedermolekulare (Oligo-) Sialinsäuren mit zunehmender Hydrolysedauer stiegen und auf eine Akkumulation geringer Kettenlängen hindeuten [150].

Abbildung 7-1 b. sind die Chromatogramme der biotechnologisch produzierten LC polySia abgebildet. Zum Hydrolysezeitpunkt t_0 konnte die unhydrolysierte LC polySia mit einer Kettenlänge $> DP70$ bei einer Retentionszeit zwischen 80 - 100 min detektiert werden. Wie auch bei der Colominsäure wurde die maximale Kettenlänge mit steigender Hydrolysedauer reduziert und resultierte nach 420 min in einer maximalen Kettenlänge von $DP46 \pm 1$.

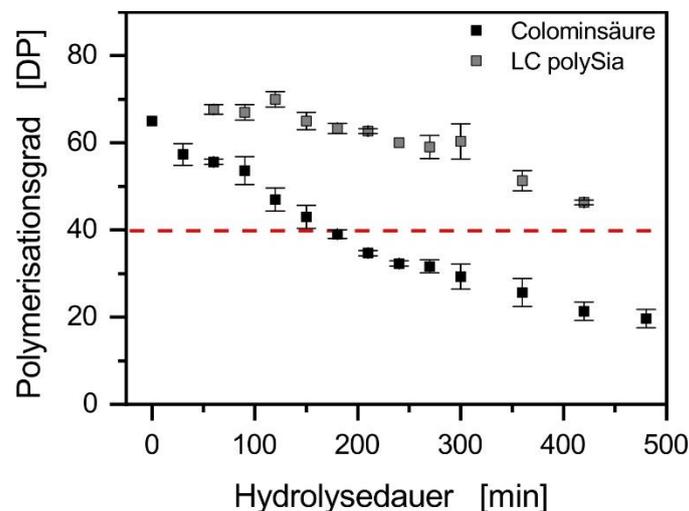


Abbildung 7-2: Charakterisierung des zeitlichen, thermischen Zerfalls von Colominsäure und LC polySia bei 65 °C durch Detektion des maximalen Polymerisationsgrades mittels HPLC-CAD in Dreifachbestimmung.

Die zusammengefassten Ergebnisse der Hydrolyseexperimente bei einer Temperatur von 65 °C zeigen in Abbildung 7-2 die maximalen Kettenlängen von Colominsäure und LC polySia in Abhängigkeit der Hydrolysedauer. Hierbei wird deutlich, dass für Colominsäure bereits eine Hydrolysedauer von ca. 180 min ausreicht, um die angestrebte Maximalkettenlänge von DP40 zu erreichen. Bei der Hydrolyse von LC polySia ist zu erkennen, dass der untersuchte Hydrolysezeitraum nicht ausreichte, um die angestrebte Maximalkettenlänge von DP40 zu erreichen. Aufgrund der Gegebenheit, dass die biotechnologisch produzierte LC polySia im Vergleich zur kommerziellen Colominsäure eine signifikant größere Kettenlänge bis ~DP160 aufweisen kann [134], wird zur Reduktion der Polymerkette in den angestrebten Bereich entweder eine längere Hydrolysezeit oder eine höhere Temperatur nötig.

7.1.2 Untersuchung der thermischen Hydrolyse von LC polySia bei 90 °C

Entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 7.1.1 wurde der Hydrolyseversuch von LC polySia bei einer erhöhten Temperatur von 90 °C wiederholt. Zur effizienten Anreicherung niedermolekularer polySia sollte das Polymer auf eine Maximalkettenlänge von DP40 reduziert werden. Die Hydrolysedauer der thermischen Behandlung wurde hierbei in einem Bereich zwischen 0 min - 180 min variiert. Die gemittelten Ergebnisse des maximal detektierbaren Polymerisationsgrades wurden gegen die Hydrolysezeit aufgetragen und in Abbildung 7-3 dargestellt.

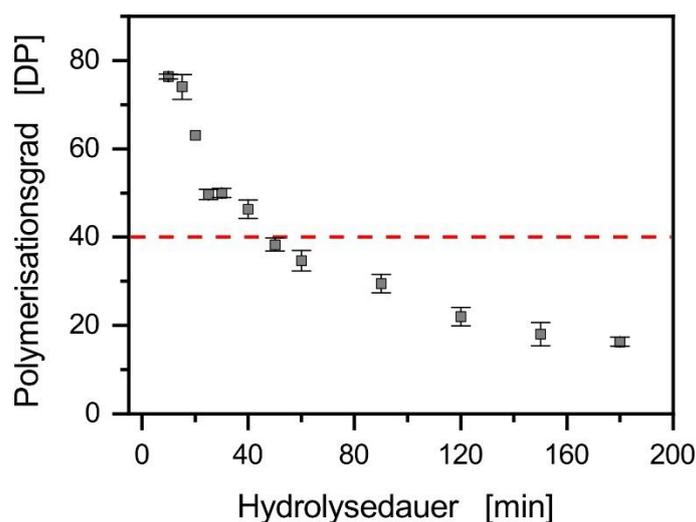


Abbildung 7-3: Charakterisierung des zeitlichen, thermischen Zerfalls von LC polySia bei 90 °C durch Detektion des maximalen Polymerisationsgrades mittels HPLC-CAD in Dreifachbestimmung.

Wie in Abbildung 7-3 zu sehen, wurde die durchschnittliche Kettenlänge von LC polySia $> DP70$ in einem Hydrolysezeitraum von 180 min auf eine maximale Kettenlänge von $DP16 \pm 1$ reduziert. In der Kettenlängenanalyse der hydrolysierten Proben zeigte sich, dass die maximale DP durch Erhöhung der Temperatur auf 90 °C deutlich schneller hydrolysiert und bereits nach einer Hydrolysedauer von ca. 50 min die angestrebte Kettenlänge von maximal $DP38 \pm 2$ erreicht wurde.

7.1.3 Untersuchung der Molekülstrukturstabilität von LC polySia bei 65 °C und 90 °C mittels 1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Aufgrund der hohen thermischen Belastung von polySia bei Hydrolysetemperaturen von 65 bzw. 90 °C, sollte eine Charakterisierung der chemischen Moleküle mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) durchgeführt werden, um

strukturverändernde Reaktionen, wie z.B. Maillardreaktionen der Aminverbindungen, auszuschließen. Hierzu sollte das Spektrum von unhydrolysierter LC polySia als Kontrolle den Spektren der 65 und 90 °C hydrolysierten polySia vergleichend gegenübergestellt werden. Zur Untersuchung wurde das Ascend 400 MHz mit Avance III Konsole und Prody BBFO probe (Burker Corporation) verwendet. Die polySia-Proben wurden zunächst lyophilisiert und zur Messung in einer Konzentration von 30 mg mL⁻¹ in Deuteriumoxid (D₂O) resuspendiert. Die NMR-Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jörg Fohrer (Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt.

In Abbildung 7-4 sind die Protonenspektren gezeigt und wurden mit einer Relaxionszeit von 2 s über eine spektrale Breite von 12 ppm aufgenommen. Die gezeigten Spektren wurden ohne Wasserunterdrückung aufgezeichnet.

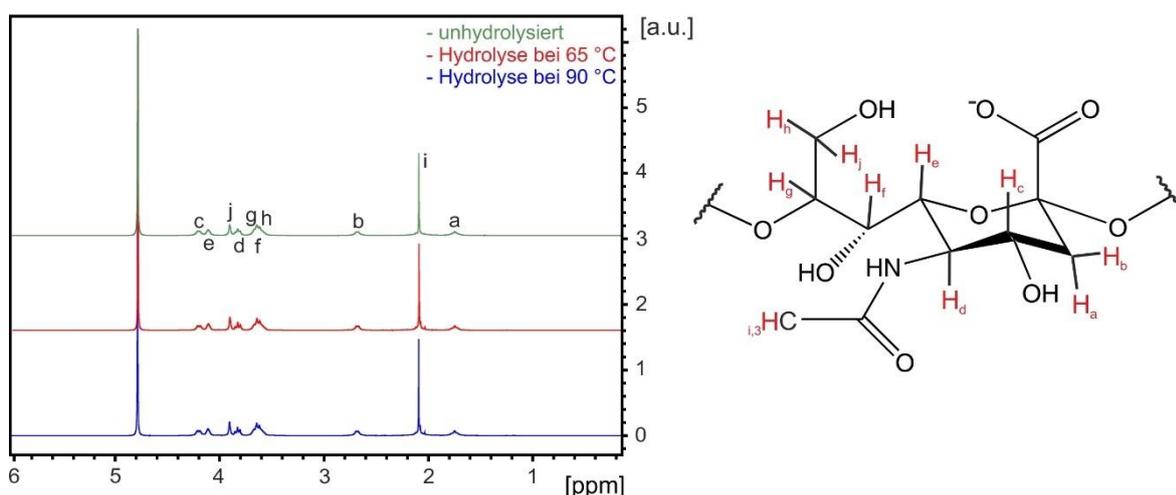


Abbildung 7-4: ¹H-NMR-Spektren zur Molekülstrukturanalyse von LC polySia unter verschiedenen Hydrolysebedingungen. Eine Zuordnung der Adsorptionsbanden ist anhand der nebenstehenden chemischen Struktur von polySia möglich.

Insgesamt ist zu erkennen, dass die Spektren der Proben identisch zur unhydrolysierten LC polySia sind. Durch Integration über die Peaks wurde bei den Proben und der Kontrolle die gleiche Anzahl an NMR-aktiven Wasserstoffatomen gefunden. Es ist jedoch zu beachten, dass lediglich das an die Amid-Funktion gebundene Wasserstoff außerhalb des dargestellten Bereichs bei ca. 8 ppm liegt. Der unspezifische Peak bei ca. 4,8 ppm ist auf das Lösemittel für den Austausch von Deuterium und Protonen zurückzuführen.

In Abbildung 7-5 sind die ¹³C-Spektren von Kontrolle und Proben vergleichend dargestellt. Die Spektren wurden breitbandenkoppelt mit einer Relaxionszeit von 3 s über eine spektrale Breite von 251 ppm aufgezeichnet.

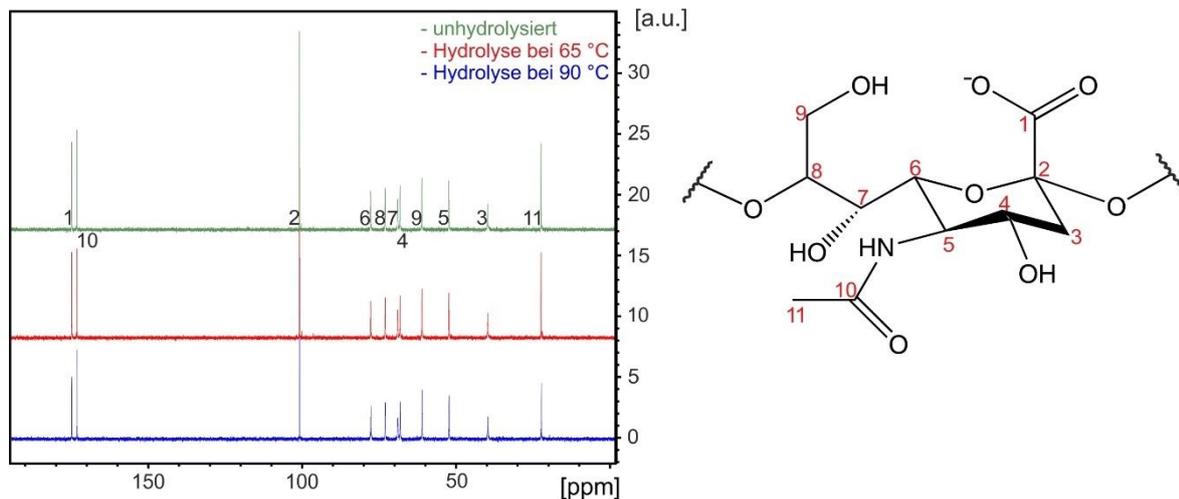


Abbildung 7-5: ^{13}C -NMR-Spektren zur Molekülstrukturanalyse von LC polySia unter verschiedenen Hydrolysebedingungen. Eine Zuordnung der Adsorptionsbanden ist anhand der nebenstehenden chemischen Struktur von polySia möglich.

Wie in den Spektren der Abbildung 7-5 zu sehen, konnten sowohl in der Kontrolle als auch in den Hydrolyseproben die 11 chemisch unterschiedlichen Kohlenstoffatome der Polysialinsäure-Einheit identifiziert werden. Die Methylgruppe ist bei einer chemischen Verschiebung von ca. 20 ppm zu erkennen. Bei einer chemischen Verschiebung von ca. 170 ppm - 180 ppm sind die Carbonylgruppen der polySia-Struktur detektierbar.

Somit konnte mittels der ^1H - und ^{13}C -NMR-Messung gezeigt werden, dass es aufgrund der hohen Hydrolysetemperatur, wie zunächst befürchtet, zu keiner chemischen Veränderung der Molekülstruktur kam. Der Einfluss durch mögliche Maillard-Reaktionen bzw. einer Abspaltung oder Konformationsänderung der Acetylgruppe ist auszuschließen, da sich sowohl das Kohlenstoff als auch die Wasserstoffatome der Methylgruppe eindeutig in den Spektren identifizieren lassen.

7.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur thermischen Hydrolyse von polySia

In der Charakterisierung der thermischen Hydrolyse von kommerzieller Colominsäure und LC polySia konnte gezeigt werden, dass sich Unterschiede in der Hydrolyse ergeben, um den angestrebten Kettenlängenbereich von maximal DP40 zu erhalten. Zur effizienten Hydrolyse von kommerzieller Colominsäure, welche eine durchschnittliche Kettenlänge von ca. DP70 aufweist, wurde eine Hydrolysedauer von ca. 180 min bei einer Temperatur von 65 °C ermittelt. Im Vergleich dazu wurde für die biotechnologisch produzierte LC polySia mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von DP120 - 160 eine Hydrolysedauer von ca. 55 min bei einer Temperatur von 90 °C bestimmt.

Darüber hinaus konnte das Probenmaterial unter den getesteten Hydrolysebedingungen mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Hieraus ging hervor, dass es zu keiner Veränderung der chemischen Molekülstruktur kam und eine Hydrolyse selbst bei hohen Temperaturen möglich ist.

7.2 Verfahrensentwicklung zur Isolierung von polySia avDP20 mittels Membranadsorber-Applikation

Im folgenden Kapitel werden die Arbeiten zur Entwicklung und Optimierung der chromatografischen Trennung von niedermolekularen Polysialinsäureketten sowie der Isolierung von polySia avDP20 mittels Membranadsorbertechnologie und FPLC vorgestellt. Hierbei sollen Einweg-Membranadsorber-Einheiten in den Produktionsprozess implementiert werden. Diese bieten den Vorteil einer schnellen und ökonomischen Prozessrealisierung [178]. Aufgrund der negativ geladenen Carboxylgruppen der polySia, eignen sich vordergründig stark basische Anionenaustauschermembranen (z.B. Sartobind® Q, Sartorius Biotech GmbH) zur chromatografischen Trennung der hydrolysierten polySia-Fragmente. Als Puffersystem wurde Ammoniumhydrogencarbonat verwendet. Dieses lässt sich nach der Fraktionierung vom Produkt rückstandslos mittels Gefriertrocknung entfernen, da es unter Vakuum zu Wasser, CO₂ und Ammoniak [179] zerfällt. Die Isolierung und Produktion der pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 in hochreiner Form sowie eine nachfolgende Medikamentenformulierung soll somit erleichtert werden.

In der Gradientenentwicklung sollte zunächst das chromatographische Trennverhalten der hydrolysierten polySia mittels Membranadsorber untersucht werden. Dabei sollte möglichst genau die Pufferkonzentration bestimmt werden, bei der polySia avDP20 eluiert. Abschließend sollte, basierend auf den zuvor ermittelten Daten, ein Gradient zur effizienten und gerichteten Fraktionierung von polySia avDP20 entwickelt werden.

7.2.1 Grobauflösende Trennung von niedermolekularen polySia-Kettenlängen mittels 10 %-Stufengradient

Zunächst sollte zur Fraktionierung von hydrolysiertes, niedermolekulare polySia mittels FPLC die Elutionsperformance von Einweg-Membranadsorbere charakterisiert werden. Zur Vergrößerung der Membranoberfläche wurden 3x 3 mL (*column volume*, CV = 9 mL) Sartobind® Q Membranadsorber mit einer Gesamtfläche von 330 cm² miteinander verbunden, sodass bei einer dynamischen Bindungskapazität von 0,25 ± 0,03 mg cm⁻² [180]

theoretisch insgesamt 82,5 mg polySia gebunden werden können. Biotechnologisch produzierte LC polySia wurde hierzu thermisch hydrolysiert. Nach Beladung der Membranadsorber erfolgte eine Elution gebundener polySia in 10 %-Stufen. Zur Bestimmung der Kettenlängenverteilung der fraktionierten polySia wurden die Proben zunächst lyophilisiert und anschließend mittels HPLC-CAD analysiert. Die Ergebnisse der CAD-analysierten Fraktionierungsproben sind in Abbildung 7-6 ersichtlich, wobei lediglich repräsentative Proben der Stufen 20 %, 30 % und 40 % dargestellt sind.

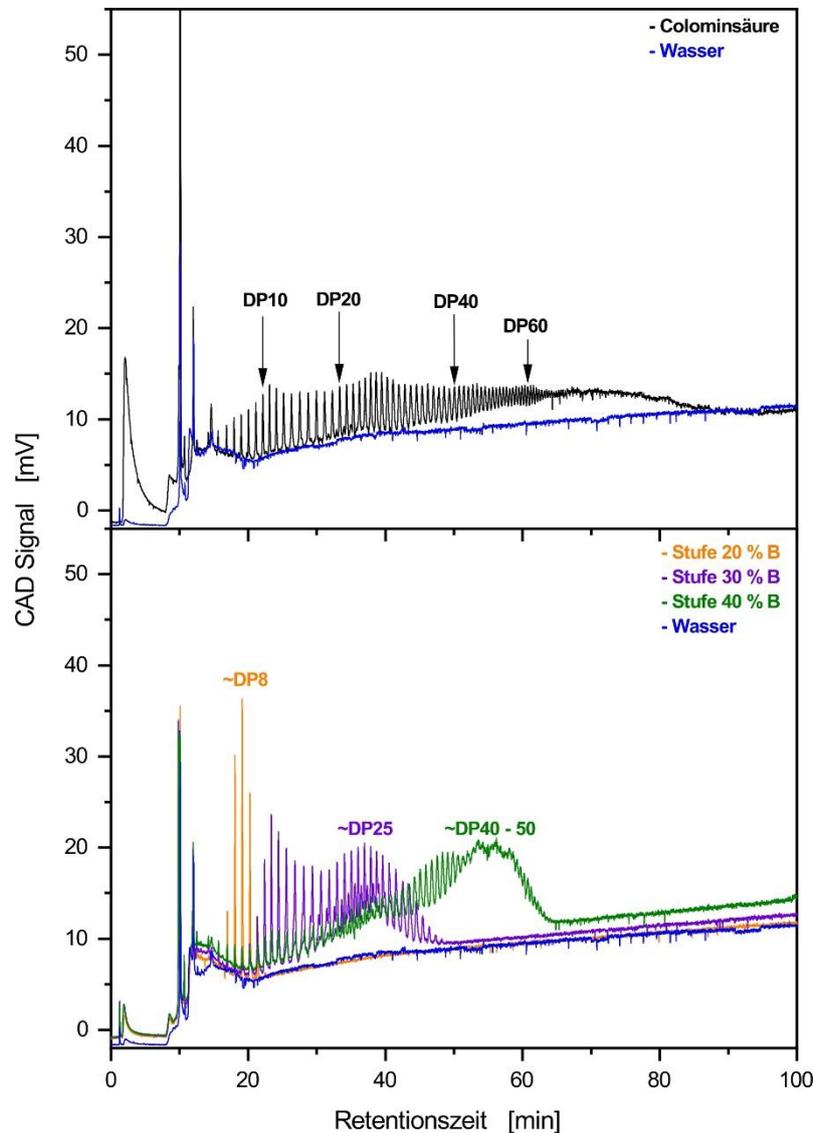


Abbildung 7-6: Charakterisierung des 10 %-Stufengradienten zur Membranadsorber-basierten Fraktionierung niedermolekularer polySia mittels HPLC-CAD. Kommerzielle Colominsäure wurde als Referenzstandard zur Bestimmung der Kettenlängenverteilung eingesetzt. Zur Charakterisierung des Gradienten wurden repräsentative Proben der 20 %, 30 % und 40 %-Stufen zur Darstellung der Fraktionierung gewählt.

In Abbildung 7-6 sind die Chromatogramme der Fraktionierungsproben der Stufen 20 %, 30 % und 40 % ersichtlich. In Abhängigkeit zum Referenzstandard Colominsäure konnte die

Kettenlängenverteilung der fraktionierten polySia bestimmt werden. Dementsprechend wurde in der 20 %-Stufe polySia mit einer durchschnittlichen Kettenlängen von ca. DP8, in der 30 %-Stufe polySia mit ca. DP25 und mit der 40 %-Stufe polySia mit ca. DP40 – 50 fraktioniert. Demgemäß führte eine konsekutive Steigerung des Puffer B-Anteils von 10 % zu einer Verschiebung der Kettenlänge von durchschnittlich ca. DP20. Im Vergleich zum Referenzsignal Wasser ist eine Erhebung des Basisliniensignals in den Fraktionen zu erkennen und kann als fraktionierungsbedingte Akkumulation von polySia einer definierten Kettenlänge interpretiert werden [150]. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass eine Fraktionierung von hydrolysiertes, niedermolekularer polySia mittels Membranadsorber möglich ist. Darüber hinaus konnte der Pufferanteil zur Elution von polySia avDP20 für einen Bereich zwischen 20 % - 30 % Puffer B eingegrenzt werden, was einer Molarität von ca. 0,28 mol L⁻¹ bis 0,38 mol L⁻¹ NH₄HCO₃ entspricht. Obwohl in den einzelnen Fraktionen eine klare Abgrenzung der Maximalkettenlänge erkennbar ist, enthalten diese, unabhängig von der Stufe, eine Überlagerung der Minimalkettenlängen. Bei einer sauberen Elution sollten sowohl eindeutige Maximal- als auch Minimalkettenlängen-Abgrenzungen erkennbar sein. Eine Erhöhung des Elutionsvolumens der Gradientenstufen könnte dies ermöglichen.

7.2.2 Hochauflösende Trennung von niedermolekularen polySia-Kettenlängen mittels 2 %-Stufengradient

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Fraktionierung (Vergleich 7.2.1) konnte der Anteil des Elutionspuffers zur angestrebten Isolierung von polySia avDP20 auf ca. 20 % - 30 % eingegrenzt werden. Um eine hochauflösende und gezielte Isolierung von polySia avDP20 zu realisieren, sollte der Elutionsgradient weiter optimiert und der Pufferanteil spezifiziert werden.

Diesbezüglich wurde in diesem Versuch eine Fraktionierung in 2 %-Stufen in einem Pufferbereich zwischen 20 % - 30 % durchgeführt. Die Fraktionierung, Probenvorbereitung und -analytik gestaltete sich dabei analog zu 7.2.1. In Abbildung 7-7 sind die Ergebnisse dargestellt.

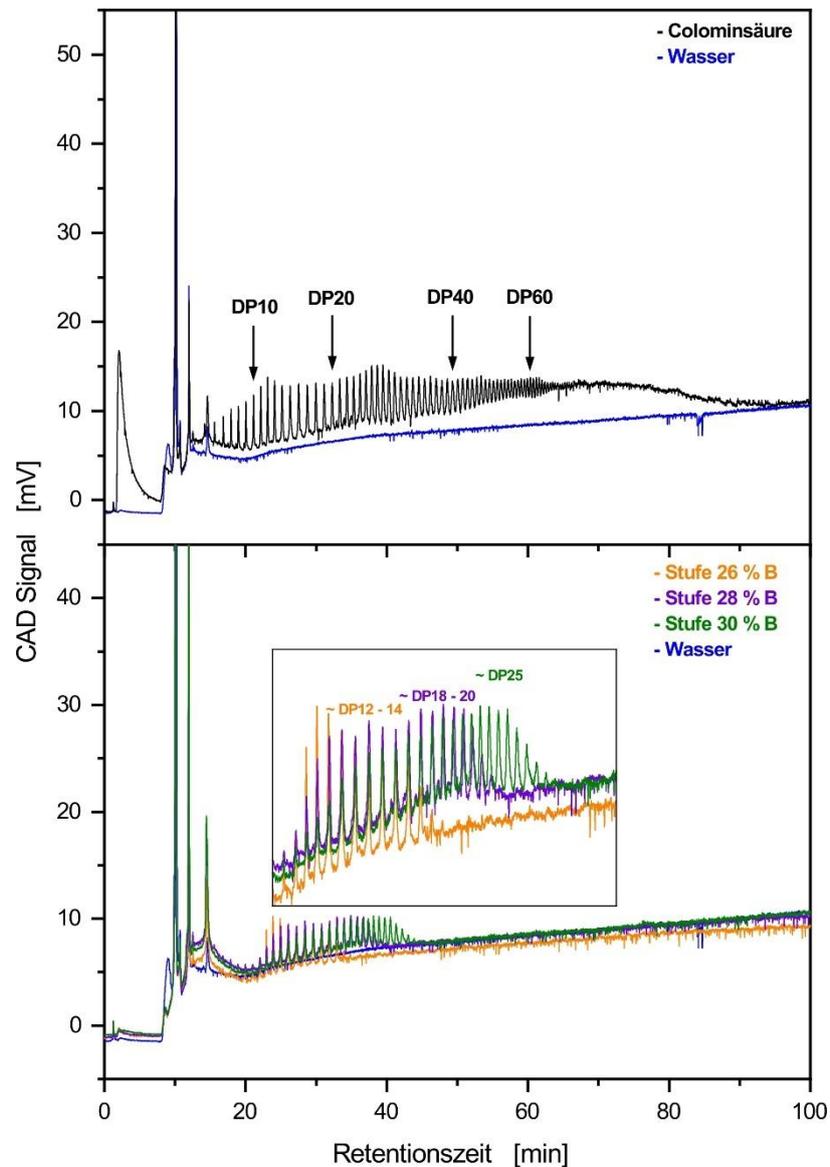


Abbildung 7-7: Charakterisierung des 2 %-Stufengradienten zur Membranadsorber-basierten Fraktionierung niedermolekularer polySia mittels HPLC-CAD. Kommerzielle Colominsäure wurde als Referenzstandard zur Bestimmung der Kettenlängenverteilung eingesetzt. Zur Charakterisierung des Gradienten wurden repräsentative Proben der 26 %, 28 % und 30 %-Stufen zur Darstellung der Fraktionierung gewählt.

Aus den Ergebnissen in Abbildung 7-7 wird ersichtlich, dass eine weitere Auftrennung der polySia-Kettenlängen durch Modifizierung des Elutionsgradienten möglich war. Mittels der 26 %-Stufe Puffer B war die Elution einer durchschnittlichen Kettenlänge von ca. DP12 – 14, mit der 28 %-Stufe die Elution von ca. DP18 – 20 und mit der 30 %-Stufe die Elution einer Kettenlänge von ca. DP25 möglich. Somit war durch die Elution mit dem 2 %-Stufengradienten eine höhere Auflösung der polySia-Kettenlängen möglich. PolySia avDP20 konnte in der 28 %-Stufe fraktioniert und identifiziert werden. Als Maß für die Auflösung wurde die Maximumverschiebung der Basislinienerhebung in den Fraktionen betrachtet. Dementsprechend war mit einer konsekutiven Steigerung des Puffer B-Anteils in 2 %-Stufen

eine Verschiebung der Kettenlänge von durchschnittlich ca. DP5 – 6 zu beobachten. Im Vergleich zur 10 %-Stufenelution in 7.2.1 war somit eine höhere Auflösung der Kettenlängen möglich. Außerdem konnte zur Isolierung von polySia avDP20 der Pufferanteil spezifiziert werden und entspricht in der 28 %-Stufe einer Molarität von ca. $0,352 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$.

7.2.3 3-Stufengradient zur gezielten Elution von polySia avDP20 und Abreicherung von Endotoxinen

Das übergeordnete Ziel der Gradientenentwicklung ist die gezielte Isolierung von polySia avDP20. Hierbei sollte ein dreistufiger Elutionsgradient entwickelt werden. PolySia avDP20 sollte hierbei aus der zuvor biotechnologisch-produzierten LC polySia gewonnen werden. Wie bereits in Kapitel 6 beschrieben, werden kontaminierende Endotoxine im Downstream Prozess bislang nicht vom Produkt abgetrennt und liegen in einer durchschnittlichen Konzentration von ca. $235.086 \pm 110.000 \text{ EU mg}^{-1}$ vor. Endotoxine sind Bestandteile der Zellmembran gram-negativer Bakterien und können beim Menschen starke gesundheitliche bis lebensbedrohlichen Auswirkungen haben [181–183]. Eine Membranadsorber-basierte Reduktion oder Abreicherung von Endotoxinen mittels Sartobind® Q ist möglich [180] und soll im Rahmen der Fraktionierungsarbeiten hinzukommend untersucht werden.

Zunächst sollen in einer ersten Stufe niedermolekulare polySia-Ketten < DP14 mit 20 % Puffer B von der Oberfläche des Membranadsorbers gewaschen werden. Im Kapitel 7.2.2 konnte gezeigt werden, dass biopharmazeutisch-relevante polySia einer Kettenlänge von DP18 – 20 bei $0,352 \text{ mol L}^{-1}$ (28 % Puffer B) eluiert werden kann. Daher soll in der zweiten Stufe nun die Zielkettenlänge von polySia avDP20 mit 28 % Puffer B isoliert werden. In der dritten Stufe sollen mit 80 % Puffer B die restlichen polySia-Ketten > DP26 eluiert werden. Im Rahmen der Entwicklung eines ökonomischen Prozesses und Produktrückgewinnung, könnte die polySia der dritten Stufe erneut thermisch hydrolysiert und in einer zweiten Fraktionierung zur polySia avDP20-Produktion eingesetzt werden. Diese Strategie wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht näher untersucht.

Nachfolgend sind die Ergebnisse des 3-Stufen-Gradienten zur gezielten Isolierung von polySia avDP20 in Abbildung 7-8 dargestellt, wobei die Kettenlängenverteilung in den Fraktionen mittels HPLC-CAD analysiert wurde. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die polySia-Konzentration in den Fraktionen mittels TBA-Assay ermittelt. Die Endotoxinkonzentration wurde in der Zielfraktion der Stufe 2 untersucht.

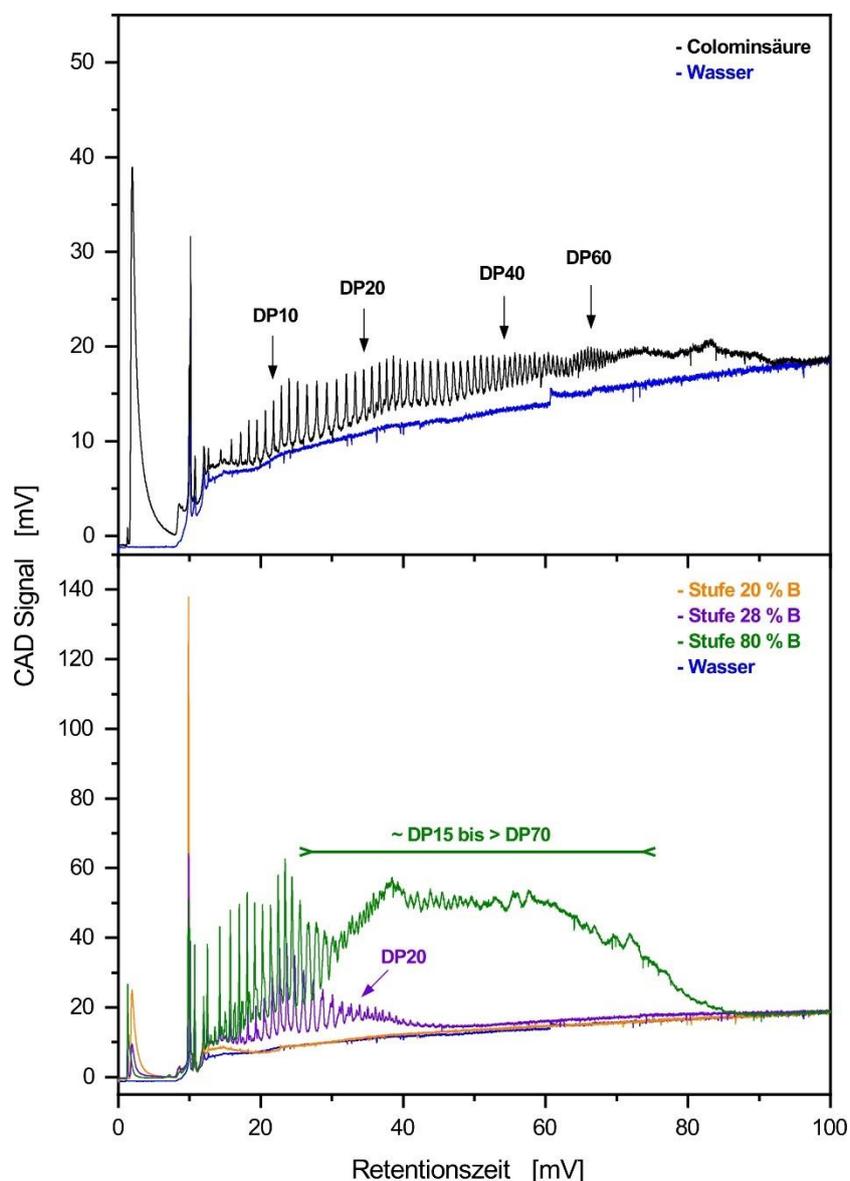


Abbildung 7-8: Charakterisierung des optimierten Stufengradienten zur gezielten Isolierung von polySia avDP20 mittels HPLC-CAD. Kommerzielle Colominsäure wurde als Referenzstandard zur Bestimmung der Kettenlängenverteilung eingesetzt. In der Abbildung sind die Chromatogramme der drei Stufen (20 %, 28 % und 80 %) des optimierten Gradienten dargestellt.

In Abbildung 7-8 ist zu sehen, dass in der ersten Elutionsstufe polySia-Ketten bis zu einer Länge von ca. DP10 abgetrennt wurden. In der zweiten Stufe wurde niedermolekulare polySia mit einer Kettenlängenverteilung von ca. DP12 – 29 isoliert, wobei ein Maximum der Basislinienerhebung bei ca. DP20 zu erkennen ist. In der dritten Stufe wurde polySia-Ketten einer Länge von ca. DP1 - >70 eluiert, wobei eine eindeutige Basislinienerhebung zwischen ca. DP15 - > 70 zu sehen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine gezielte Fraktionierung von definierten Kettenlängenbereichen prinzipiell möglich ist. In der ersten Stufe wurden ca. 0,8 mg polySia-

Ketten < DP10 eluiert. In Stufe 2 konnte polySia mit einer akkumulierten Kettenlänge von ca. DP20 \pm 9 in einer Menge von ca. 4,5 mg erfolgreich isoliert werden. In der dritten Stufe wurden polySia mit einer akkumulierten Kettenlänge von ca. DP15 – >70 und einer Ausbeute von ca. 68,2 mg eluiert. In den einzelnen Fraktionen kommt es zu einer Überlagerung der Kettenlängen. Zusätzlich sind in Stufe 2 und 3 polySia-Ketten einer Länge < DP10 detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass das Elutionsvolumen der einzelnen Stufen als zu gering gewählt wurde. Durch Erhöhung des Elutionsvolumens könnte eine effizientere Trennung und gesteigerte Ausbeute der Zielkettenlänge möglich werden. Eine weitere Optimierung des Gradienten ist notwendig, um polySia avDP20 im angestrebten Kettenlängenbereich vollständig zu isolieren. Darüber hinaus wird deutlich, dass ein signifikanter Teil der polySia trotz thermischer Hydrolyse eine Kettenlänge > DP40 besitzt. Zur Produktion von polySia avDP20 werden höhere Konzentrationen in der Hydrolyse eingesetzt und führen anscheinend zu einer höheren thermischen Stabilität der Polymerketten während der Hydrolyse. Eine weitere Optimierung und Untersuchung der thermischen Hydrolyse ist hierbei notwendig.

Insgesamt konnte in der Untersuchung zur Endotoxinanreicherung eine etwa 120-fache Reduktion der Endotoxinkonzentration von 284.697 \pm 14.106 auf 2.407 \pm 120 EU mL⁻¹ bestimmt werden. Dies entspricht einer finalen Endotoxinbelastung von 2.669 \pm 133 EU pro mg polySia avDP20. Für den Einsatz als Pharmazeutikum sollte die Endotoxinbelastung um zwei weitere log-Stufen reduziert werden, wobei sich verschiedene Verfahren, wie z.B. NaOH-Behandlung [180] oder der Einsatz von Affinitätssäulen [181], anbieten.

7.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Membranadsorber-basierten Isolierung von polySia avDP20

In den Arbeiten zur chromatographischen Trennung von niedermolekularer, hydrolysiertes polySia sowie der Isolierung von polySia avDP20 wurde die Anwendung von Einweg-Membranadsorbern gezeigt. In der Gradientenentwicklung konnte sowohl eine grobe Trennung von polySia-Ketten mit einer durchschnittlichen Fraktionierungsabstufung von ca. DP20 sowie eine feine Trennung mit einer durchschnittlichen Fraktionierungs-abstufung von ca. DP5 realisiert werden. Darüber hinaus konnte zur gezielten Elution von polySia avDP20 eine Pufferkonzentration von ca. 0,352 mol L⁻¹ identifiziert werden. Im einem finalen dreistufigen Elutionsgradient wurde so ca. 4,5 mg niedermolekulare polySia mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von DP 20 \pm 9 und einer finalen Endotoxinbelastung von etwa 2.669 \pm 133 EU mg⁻¹ isoliert. Die Elution des angestrebten Kettenlängenbereichs von DP20 \pm 6 konnte jedoch bislang nicht eindeutig erzielt werden. Weitere Optimierungen des

Gradienten zur gezielten Isolierung von polySia avDP20 sowie eine weitere Abreicherung der Endotoxinkonzentration werden hierzu nötig.

8 Diskussion und Ausblick

Die biotechnologische Prozessentwicklung zur Biopharmazeutikaproduktion umfasst eine Vielzahl von naturwissenschaftlichen Themengebieten und setzt breite Kenntnisse aus z.B. der Mikrobiologie, Biochemie und Zellkulturtechnik sowie aus der Verfahrenstechnik, Bioinformatik und Analytik voraus. Darüber hinaus ist ein sicherer Umgang und ein Verständnis für individuelle Zulassungsprozesse gemäß der Regularien seitens zuständiger Aufsichtsbehörden wie FDA oder BfArM von großer Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit wurde der biotechnologische Produktionsprozess zur Herstellung der pharmazeutisch relevanten und bioaktiven polySia avDP20 vorgestellt. Die zugrundeliegende Prozessentwicklung und -validierung wurde unter den Aspekten der „guten Herstellungspraxis“ (*good manufacturing practice*, GMP) durchgeführt. Eine schnelle und modulare Prozessauslegung zur Produktion unter Reinraumbedingungen, eine effiziente und ökonomische Produktivität sowie eine aussagekräftige Analytik zur Prozesscharakterisierung und -validierung standen hierbei im Fokus.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst die Entwicklung und Validierung eines analytischen Verfahrens zur Charakterisierung der polySia-Kettenlänge sowie zur Quantifizierung niedermolekularer polySia vorgestellt. Die als Benchmarkmethode verwendete DMB-HPLC-FLD zur sensitiven Kettenlängenbestimmung von Polysialinsäure zeigte einige Nachteile durch ihre zeitaufwändige und fehleranfällige Probenderivatisierung. Die mild-sauren Bedingungen der Derivatisierungsreaktion führen zu einer spontanen und ungewollten Hydrolyse der polySia-Kette und verfälschen somit die Analyseergebnisse. Eine Bestimmung der tatsächlichen Kettenlängenverteilung in den Proben war somit nicht möglich. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit eine neue analytische Methode zur Detektion der tatsächlichen Kettenlängenverteilung entwickelt, wobei eine direkte Messung der Proben durch die HPLC-CAD ermöglicht wurde. Durch den einfachen Austausch des Detektionssystems wurde ein schneller Methodentransfer und eine Detektion im Kettenlängenbereich von DP1 – 65 realisiert. In Anlehnung an die ICH Q2(R1)-Richtlinien konnte eine erste Methodvalidierung durchgeführt werden. Dementsprechend wurde anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (2:1; bzw. 1,2 zu 0,6 mV) ein LOD von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ermittelt. Außerdem ist zur Charakterisierung von niedermolekularer polySia die Bestimmung des minimal detektierbaren Molekulargewichts wichtig. Durch die Messung von kommerziellen Referenzstandard konnte die Detektion von Sialinsäure (Neu5Ac, DP1) mit 309 g mol^{-1} bestätigt werden und liegt damit deutlich unterhalb der bisher beschriebenen Literaturwerte. Eine Detektion dieser Referenzstandards war im linearisierten Bereich von $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ – 10 mg mL^{-1} möglich. Zuletzt konnte mittels der neuentwickelten HPLC-CAD

eine tatsächliche Kettenlänge der biotechnologisch produzierten polySia von \geq DP70 bestimmt werden. Der TBA-Assay stellt die gegenwärtige Standard-Methode zur Bestimmung freier Sialinsäuren dar, wobei zur Bestimmung der Polysialinsäurekonzentration zunächst eine chemisch-thermisch induzierte Hydrolyse der polySia-Kette in Monomere erforderlich ist. In der Produktion und Isolierung von niedermolekularer polySia wird zur Charakterisierung der Fraktionierungsperformance eine differenzierte Quantifizierung verschiedener Kettenlängenbereiche notwendig. Der TBA-Assay ermöglicht jedoch lediglich die relative Quantifizierung freier Sialinsäuren und eignet sich daher nicht zur Konzentrationsbestimmung bestimmter Kettenlängen. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit die HPLC-CAD-Methode zur differenzierten Quantifizierung von polySia avDP20 und LC polySia modifiziert. Wie auch schon zuvor wurde hier in Anlehnung an die ICH Q2(R1)-Richtlinien eine erste Methodvalidierung durchgeführt. In Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte eine lineare Kalibration und Bestimmung des LOQ durchgeführt werden. Für polySia avDP20 konnte in der Kalibration der lineare Bereich zwischen $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ - $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($\text{LOQ} = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) und für LC polySia zwischen $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ - 1 mg mL^{-1} ($\text{LOQ} = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) bestimmt werden. Darüber hinaus konnte die Quantifizierung der Analyten durch die differenzierte Messung von Referenzanalyten validiert und mit dem TBA-Assay in einer Korrelationsanalyse mit hoher Übereinstimmung von $R^2 = 0,98$ verglichen werden. Jedoch müssen zur ausführlichen Validierung der Methoden weitere Größen, wie z.B. Robustheit, bestimmt werden.

Im Rahmen der effizienten Prozessentwicklung wurde der bereits bestehende biotechnologische Produktionsprozess von LC polySia, bemessen an der Raum-Zeit-Ausbeute, optimiert. PolySia wird als Bestandteil der Glycokalix auf der Zelloberfläche von *E. coli* K1 B2032/82 gebildet. Hohe Zelldichten können somit zu einer hohen Ausbeute führen und rechtfertigten die Etablierung einer Hochzelldichtekultivierungsstrategie. Hierzu wurde unter Verwendung des viel beschriebenen Minimalmedium zur Hochzelldichtekultivierung nach Korz et al. die Produktivität im Schüttelkolben untersucht. Diese zeigte eine finale Produktkonzentration von $0,454 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, was einer Steigerung von 62 % entsprach. Der Prozess wurde im Satzbetrieb erfolgreich auf einen 1,5 L und 25 L Maßstab im Glas- und Edelstahl-Rührkesselreaktor übertragen. Die Produktivität konnte im Vergleich zum bestehenden Prozess um 227 % gesteigert werden und entsprach einer finalen Produktkonzentration von $0,788 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$. Zum Erreichen einer tatsächlichen Hochzelldichte war die Etablierung einer pO_2 -kontrollierten Zulaufstrategie nötig, wodurch eine weitere Steigerung der finalen Produktkonzentration auf $3,7 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ und der Produktivität um 47 % möglich war. Zudem konnte eine Acetat-Akkumulation durch die substratlimitierenden Bedingungen der zugrundeliegende Zulaufstrategie konstant unter

einer kritischen Konzentration gehalten werden. Aufgrund der biopharmazeutischen Anwendung von polySia sollte ein einfacher und schneller Prozesstransfer unter Reinraumbedingungen gewährleistet werden. Diesbezüglich wurde die Kultivierungsstrategie auf das Einweg-Beutelreaktorsystem im 25 L Maßstab übertragen. Im Satzbetrieb konnten hierbei zur Rührkesselkultivierung zwar vergleichbare Biomasseausbeuten von $13,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden, jedoch nur 20 % geringere Produktausbeuten von ca. $0,62 \text{ g L}^{-1}$. Aufgrund des schnellen und hohen Biomassewachstums konnte trotz maximaler Kippfrequenz und maximaler Sauerstoffbegasung eine Sauerstofflimitierung gegen Ende der Kultivierung nicht verhindert werden. Hinsichtlich eines erfolgreichen Transfers der Kultivierung sollte der Prozess weiter optimiert und eine pO_2 -Limitierung verhindert werden. In der darauffolgenden Produktaufreinigungsstrategie konnte langkettige polySia anhand des bestehenden Protokolls von Zellen, Proteinen, Medienbestandteilen und Salzen aufgereinigt werden. Aufgrund der gesteigerten Produktausbeute im USP wurde aus einer 25 L Kultivierung im Satzbetrieb eine finale polySia-Menge von $5,9 \pm 0,38 \text{ g}$ erhalten. Da kontaminierende Endotoxine im DSP nicht aktiv abgereichert wurden, enthielt das finale Produkt eine durchschnittliche Endotoxinbelastung von $235.086 \pm 1,1 \times 10^5 \text{ EU mg}^{-1}$.

In der weiteren Produktion der biopharmazeutisch relevanten polySia avDP20 wurde das langkettige Material thermisch zur niedermolekularen polySia hydrolysiert und in einem nachfolgenden Membranadsorber-basierten chromatographischen Verfahren mittels FPLC isoliert. Zunächst wurde hierzu das Hydrolyseverhalten von kommerzieller Colominsäure und LC polySia unter den thermischen Bedingungen vergleichend charakterisiert. Während bei Colominsäure der angestrebte Hydrolyseerfolg bereits nach 3 h und $65 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht wurde, musste LC polySia aufgrund des höheren Polymerisationsgrades bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 55 min hydrolysiert werden. Zur Überprüfung der Strukturstabilität von polySia bei 65 und $90 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde das hydrolysierte Material vergleichend mit der unhydrolysierten LC polySia im ^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum untersucht. Aufgrund der hohen Übereinstimmung aller Spektren und der Abwesenheit zusätzlicher Banden ist sowohl von einer hohen Strukturstabilität als auch von einer hohen Produktreinheit bezüglich der wasserstoff- und kohlenstoffhaltigen Verbindungen auszugehen. Im nachfolgenden chromatographischen Verfahren wurden Einweg-Membranadsorber-Einheiten erfolgreich zur Größentrennung und Fraktionierung hydrolysierter polySia untersucht und zur Isolierung von polySia avDP20 getestet. In der Gradientenentwicklung wurden Stufengradienten zur grob- und hochauflösenden Trennung (10 % und 2 %-Stufen) niedermolekularer polySia generiert, wobei Kettenlängenbereiche mit einer Sensitivität von ca. DP10 – 20 bzw. von ca. DP5 fraktioniert wurden. Darüber hinaus konnte der Pufferbereich zur gezielten Elution von polySia avDP20 mit einer Molarität von ca. $0,352 \text{ mol L}^{-1}$ eingegrenzt werden. Als Resultat konnte zur effizienten Elution von polySia

avDP20 ein dreistufiger Gradient entwickelt werden, wobei niedermolekulare polySia < DP10 in der ersten Stufe, polySia avDP20 mit einer Kettenlängenverteilung von \pm DP9 in der zweiten Stufe und langkettige polySia > DP30 in der dritten Stufe eluiert wurde. Insgesamt konnte so 4,5 mg polySia avDP20 isoliert werden, was einer Ausbeute von ca. 6,1 % der gesamt eingesetzten LC polySia entspricht. Höhere Ausbeuten werden bei einer weiteren Optimierung des Schritts der thermischen Hydrolyse denkbar. Durch die Membranadsorberbasierte Fraktionierung wurde die Endotoxinbelastung auf 2.669 ± 133 EU pro mg polySia avDP20 reduziert. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Prozessentwicklung und -validierung bieten eine hervorragende Grundlage zur biopharmazeutischen Produktion von polySia avDP20. Die gesteigerten Prozessausbeuten, die Untersuchung modularer und ökonomischer Prozessschritte mittels Einwegeinheiten sowie die Entwicklung neuer und aussagekräftiger Prozessanalysen ermöglichen eine effiziente Produktion im industrialisierten Umfeld.

9 Material und Methoden

9.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Dieses Kapitel beinhaltet die Beschreibung der verwendeten Materialien und Geräte die zur Durchführung und Auswertung der Versuch genutzt wurden.

Tabelle 9-1: Chemikalien

Chemikalie	CAS Nr.	Hersteller
Aceton	67-64-1	Carl Roth GmbH & Co.KG
N-Acetylneuraminsäure	126934-33-6	Carbosynth Limited
Albumin		AMRESCO Inc.
Ammoniak 25 % (w/w)	7664-41-7	Carl Roth GmbH & Co.KG
Ammoniumacetat	631-61-8	Carl Roth GmbH & Co.KG
Ammoniumhydrogencarbonat	1066-33-7	Sigma-Aldrich
Di- Ammoniumhydrogenphosphat	7783-28-0	Sigma-Aldrich
Borsäure	10043-35-3	Sigma-Aldrich
Calciumcarbonat	471-34-1	Carl Roth GmbH & Co.KG
Citronensäure-Monohydrat	5949-29-1	Sigma-Aldrich
Colominsäure	70431-34-4	Carbosynth Limited
Deuteriumoxid	7789-20-0	Carl Roth GmbH & Co.KG
Desmophen 3900		Bayer AG
Dextransulfat	9042-14-2	TDB Consultancy
EDTA (Triplex III)	60-00-4	Carl Roth GmbH & Co.KG
Eisen(III)-citrat Hydrat	3522-50-7	Sigma-Aldrich
Endotoxinfreies Wasser		GE Healthcare
Ethanol 96 %	64-17-5	Carl Roth GmbH & Co.KG
D-Glucose-Monohydrat	14431-43-7	Sigma-Aldrich
Glycerin	56-81-5	Carl Roth GmbH & Co.KG
Hefeextrakt	8013-01-2	Carl Roth GmbH & Co.KG
Kalium-Dihydrogenphosphat	7778-77-0	AppliChem GmbH
Di-Kaliumhydrogenphosphat	7758-11-4	Sigma-Aldrich
Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat	7791-13-1	AppliChem GmbH
Kupfer(II)-chlorid	7447-39-4	AppliChem GmbH
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	10034-99-8	AppliChem GmbH
Mangan(II)-chlorid	7773-01-5	AppliChem GmbH

β -Mercaptoethanol	60-24-2	Carl Roth GmbH & Co.KG
Methanol	67-56-1	Carl Roth GmbH & Co.KG
4,5-Methyendioxy-1,2-phenylendiamin (DMB)	81864-15-5	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	127-09-3	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumarsenit	7784-46-5	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	7647-14-5	VWR International
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumhydroxid	1310-73-2	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumphosphat	7601-54-9	Sigma-Aldrich
Natriumsulfat	7757-82-6	AppliChem GmbH
Natriumsulfit	7757-83-7	Sigma-Aldrich
Natriummolybdat(VI)-Dihydrat	10102-40-6	AppliChem GmbH
Oligosialinsäure (DP2, DP4, DP6)	149331-75-9 (DP2)	Carbosynth Limited
Periodsäure	10450-60-9	Carl Roth GmbH & Co.KG
Phosphorsäure	7664-38-2	AppliChem GmbH
2-Propanol	67-63-0	Carl Roth GmbH & Co.KG
Salzsäure, rauchend 37 %	7647-01-0	AppliChem GmbH
Sauerstoff	7782-44-7	Linde
Schwefelsäure	7664-93-9	Sigma-Aldrich
Stains-All	7423-31-6	Sigma-Aldrich
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	67-03-8	AppliChem GmbH
2-Thiobarbitursäure (TBA)	504-17-6	Sigma-Aldrich
Tonminerale (EX M 1753)		Clariant AG
Triethanolamin	102-71-6	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	76-05-1	Carl Roth GmbH & Co.KG
Tris-HCl	1185-53-1	Sigma-Aldrich
Trypton	91079-40-2	AppliChem GmbH
Zinkacetat-Dihydrat	5970-45-6	VWR International

Tabelle 9-2: Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifikation	Hersteller
Einweg-Beutelreaktor	Flexsafe® RM 20 L bzw. 50 L optical	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Endotoxin-Kartuschen	Endosafe® -PTS™ 10 – 0,1 EU mL ⁻¹	Charles River Laboratories
Kanülen	0,60 x 30 mm/465 7640; 0,80 x 120 mm/466 5643	B. Braun, Melsungen AG
Kryoröhrchen	1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG
Küvetten	PE, 1 mL	Sarstedt AG & Co. KG
Membranadsorber	Sartobind® Q, 3 mL, 8 mm	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Mikroreaktionsgefäße	1,5, 2 und 5 mL	VWR International
Mikrotiterplatte, Falcon®	96-Well, Schwarz/-klar, Flachboden mit Deckel	VWR International
Pipettenspitzen	0,1 – 20 µL, 2 – 200 µL, 50 – 1000 µL	VWR International
Spritzen	Omnifix® 50 mL, 20 mL, 1 mL	B. Braun, Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter	Minisart®, 0,2 µm Ø	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Sterilfilter	Sartolab® P20 und Vacuum Filtration Unit, 0,2 µm Ø	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zentrifugenröhrchen	Centrifuge Tube, 15 mL, 50 mL	Corning Incorporate

Tabelle 9-3: Geräte und Software

Gerät/ Software	Spezifikation	Hersteller
Abgasanalysator	BlueInOne Ferm	BlueSens Gas Sensor GmbH
Analysewaage	Cubis	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Autosampler	Triathlon	Spark Holland B:V:
BioPAT® MFCS	BioPAT® MFCS 3 und 4	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Brechungsindexdetektor	LaChrom RI-Detektor L- 7490	Merck KGaA
Biostat® Aplus	2 L Reaktorvolumen	Sartorius Stedim Biotech

		GmbH
Biostat® Cplus	30 L Reaktorvolumen	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Biostat® RM 20/50	25 L Reaktorvolumen	Sartorius Stedim Biotech GmbH
CAD-Detektor	Corona® CAD® Detector	ESA Biosciences Inc.
ChemDraw	ChemBioDraw 14.1	PerkinElmer
Cross Flow Anlage	Sartoflow® Smart	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Cross Flow Cartridge	Sartocon® Slice	Sartorius Stedim Biotech GmbH
	Hydrosart® Cassette, 10 und 5 kDa	
Dialysemembran	Visking®	Carl Roth GmbH & Co.KG
DO-Messsonde	OxyFerm FDA	Hamilton Company
Einweg-Beutelreaktor	Biostat® CultiBag RM 20/50	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Endotoxin-Messsystem	Endosafe®-PTS™ Cartridge Reader	Charles River Laboratories
Fluoreszenzdetektor	RF-20A	Shimadzu
FPLC-Anlage	ÄKTA™ pure 25 L, pump module P9 (bis 25 mL min ⁻¹ , UV (2 mm path length) monitor (UV U9-L), conductivity monitor C9 und fraction collector F9-C	GE Healthcare
FPLC-Software	Unicorn™ 6.4	
Gefrierschrank (-80 °C)		Thermo Fisher Scientific
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Glucoseanalysator	YSI 2900	YSI Incorporated
HPLC Anlage	1200 Series	Agilent Technologies
HPLC Anlage	VWR HITACHI Chromaster	VWR International
HPLC Pumpe		Agilent Technologies

HPLC Säule	DNAPac™ PA100	Thermo Fisher Scientific
HPLC Säule	Aminex® HPX-87H	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Inkubationsschrank	HAT-CH-4015 Basel	Infors HT AG
Kontinuierliche Zentrifuge	Heraeus™ Contifuge Stratos™	Thermo Fisher Scientific
OpenLAB®	OpenLAB® CDS Software	Agilent Technologies
pH-Messsonde	EasyFerm Plus	Hamilton Company
Photometer	Libra S80	Biochrom GmbH
Photometer	Multiskan® Spectrum	Thermo Fisher Scientific
Photometer	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Reinstwasseranlage	arium® 611	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Rührkesselreaktor	Biostat® A, 2 L, Glas	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Rührkesselreaktor	Biostat® Cplus, 30 L, Edelstahl	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Schüttelkolben	Einweg, mit Schikane, 500 mL	Corning Incorporated
Sterilbank	Herasafe™	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Heraeus™ Biofuge™ pico	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf AG
Trockenschrank		Memmert GmbH & Co. KG
UV-System		Intas Science Imaging Instruments GmbH
Zentrifuge	Multifuge™ X3 FR	Thermo Fisher Scientific

9.2 Medien, Puffer und Lösungen

Sofern nicht anderweitig beschrieben, werden die Komponenten zur Herstellung der Standard-Medien, Puffer und Lösungen in ddH₂O gelöst. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgt mit 1 M NaOH, bzw. 1 M HCl. Zur Sterilisation werden alle Lösungen für 21 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Thermolabile Substanzen und Lösungen werden sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Kapiteln und Methoden ersichtlich.

9.2.1 LB-Komplexmedium

Das Lysogeny Broth (LB) Komplexmedium wird zur Kultivierung von *E. coli* K1 und zur Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen verwendet. Das Medium besteht aus den in Tabelle 9-4 aufgeführten Bestandteilen, welche in 970 mL VE-Wasser gelöst werden. Der pH-Wert des Mediums wird anschließend auf pH 7 eingestellt und mit VE-Wasser auf ein finales Volumen von 1000 mL aufgefüllt. Zur Sterilisation wird das LB-Medium für 21 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 9-4: Zusammensetzung des LB-Mediums

Bestandteil	Konzentration [g L ⁻¹]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	10

9.2.2 Definiertes Minimal-Medium zur Hochzelldichtekultivierung

Die Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten Minimal-Mediums erfolgt nach Korz et al. [116]. Die Zusammensetzung des Minimal-Batchmediums ist in Tabelle 9-5 ersichtlich. Für ein einfaches Handling werden für Glucose (500 g L⁻¹), Magnesiumsulfat (500 g L⁻¹), Citronensäure (17 g L⁻¹) und Thiamin-HCl (60 g mL⁻¹) Stammlösungen hergestellt. Des Weiteren wird eine 10fach konzentrierte Phosphatlösung aus 133 g L⁻¹ Kaliumdihydrogenphosphat und 40 g L⁻¹ Diammoniumhydrogenphosphat angesetzt, wobei der pH-Wert der Phosphatlösung mit 4 N NaOH auf 7,5 eingestellt wird. Die Spurenelement-Stammlösung wird in einem 100fachen Ansatz hergestellt (Tabelle 9-6). Hierbei wird zunächst, zur Herstellung von 1 L 100x Spurenelement-Stammlösung, 10 g Fe(III)-citrat Hydrat in 400 mL ddH₂O bis zum vollständigen Auflösen für ca. 3 h gekocht. Parallel dazu werden die restlichen Komponenten in 500 mL ddH₂O gelöst. Anschließend werden beide Ansätze zusammengefügt und auf 1 L aufgefüllt. Die Zusammensetzung des Feed Mediums ist in Tabelle 9-6 ersichtlich, wobei die erforderliche Glucosemenge separat für das gewünschte Volumen eingewogen, in ddH₂O gelöst und für 21 min bei 121 °C autoklaviert wird. Die Stammlösungen von Glucose und Magnesiumsulfat werden zur Sterilisation ebenfalls für 21 min bei 121 °C autoklaviert. Thiamin-HCl und Spurenelemente-Lösung werden sterilfiltriert (Ø 0,22 µm). Die Thiamin-HCl Stammlösung wird in einem Volumen von 0,2 mL aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Lagerung der restlichen Stammlösungen erfolgt bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 9-5: Zusammensetzung des definierten Minimal-Batchmediums, pH 7,5

Medien-Komponente	Konzentration
Glucose	25 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	13,3 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 g L ⁻¹
Citronensäure	1,7 g L ⁻¹
100x Spurenelement-Lösung	1 %
Thiamin-HCl	4,5 mg L ⁻¹

Tabelle 9-6: Zusammensetzung der 100x Spurenelement-Lösung

Bestandteil	Konzentration
EDTA (Triplex III)	840 mg L ⁻¹
CoCl ₂	136,5 mg L ⁻¹
CuCl ₂	118,3 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	300 mg L ⁻¹
MnCl ₂	953,6 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	250 mg L ⁻¹
Zn(CH ₃ -COO) ₂ x 2 H ₂ O	1,3 g L ⁻¹
Fe(III)-citrat Hydrat	10 g L ⁻¹

Tabelle 9-7: Zusammensetzung des Feed Mediums

Medien-Komponente	Konzentration
Glucose	350 g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20 g L ⁻¹
100 x Spurenelement-Lösung	1,5 %

9.2.3 Definiertes Medium zur polySia Produktion

Das definierte Medium zur polySia Produktion wurde durch Rodríguez-Aparicio et al. [156] beschrieben und durch de Vries et al. modifiziert [77]. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 9-8 ersichtlich. Zur Herstellung des Batchmediums werden zunächst die Komponenten Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Calciumchlorid und Ammoniumsulfat eingewogen und in VE-Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert auf 7,5 mit 1 M NaOH und 1 M HCl eingestellt und nachfolgend bei 121 °C für 21 min autoklaviert. Die thermolabilen Spurensalze werden

separat in Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μm). Nachfolgend wird das Medium unter sterilen Bedingungen zusammengeführt und bei RT gelagert.

Tabelle 9-8: Zusammensetzung des definierten Batchmediums, pH 7,5

Medien-Komponente	Konzentration
Glucose	20 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,03 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	9,3 g L ⁻¹
K ₂ SO ₄	1,1 g L ⁻¹
NaCl	1,2 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g L ⁻¹
CaCl ₂	0,013 g L ⁻¹
Spurensalzlösung	1 mL L ⁻¹

Tabelle 9-9: Zusammensetzung der Spurensalzlösungen.

Medien-Komponente	Konzentration
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	150 g L ⁻¹
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1 g L ⁻¹

9.2.4 Bakterienstamm

Für die biotechnologische Produktion von langkettiger, hochmolekularer polySia wird der Stamm *Escherichia coli* B2032/82 Serotyp K1 (DSM-Nr. 107164) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein klinisches Isolat [133].

9.3 Mikrobiologische Methoden

9.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der *E. coli*- Stammkultur erfolgt in LB-Medium (Tabelle 9-4) oder nach den in 9.2.2 und 9.2.3 beschriebenen Minimal-Medien auf einem Schüttelinkubator (250 rpm, 37 °C).

9.3.2 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Für die Lagerung des in 9.2.4 beschriebenen *E. coli*-Stamms werden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Hierzu wird 1 mL der *E. coli*-Dauerkultur in 50 mL LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Über eine OD Messung kann die exponentielle Wachstumsphase ermittelt werden. Bei einer OD von ca. 0,7-1 werden 750 µL der Kulturbrühe mit 250 µL einer 80 %igen Glycerin-Lösung gemischt und bei -80 °C gelagert.

9.3.3 Anzucht der Vorkulturen

Die Anzucht der Vorkultur gestaltet sich parallel zu Kapitel 9.3.1 in 500 mL Schikane-Schüttelkolben mit einem maximalen Füllvolumen von 50 mL Medium. Zunächst wird in einer üT-Vorkultur 1 mL der Glycerin-Dauerkultur in LB-Medium für ca. 6 h vermehrt. Anschließend werden 20 µL der üT-Kultur in die üN-Vorkultur in Minimal-Medium überimpft und für 15 h kultiviert.

In der Untersuchung der Medien-abhängigen Produktivität im Schüttelkolben-Experimenten (Kapitel 5.1) wurden zunächst *E.coli*-Dauerkulturen in den entsprechenden Minimalmedien bis zum Erreichen des exponentiellen Wachstums bei einer OD von ca. 0,7 – 1 vermehrt. Nachfolgend wurde die Kulturbrühe in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 mL des entsprechenden Minimalmediums resuspendiert und anschließend die OD bestimmt. Das Inokulationsvolumen wird berechnet und die Hauptkultur mit einer einheitlichen Start-OD von 0,7 angeimpft. Anschließend wurden je 50 mL des inokulierten Mediums in 500 mL Schikane-Schüttelkolben überführt.

9.3.4 Bestimmung wachstumsspezifischer Parameter

Die spezifische Wachstumsrate des verwendeten Organismus lässt sich aus der exponentiellen Phase des Wachstums auf Glucose über die nachfolgende Gleichung 9-1 berechnen.

Gleichung 9-1:
$$\mu_{max} = \frac{\ln(\Delta X)}{\Delta t}$$

μ_{max} :	spezifische Wachstumsrate, h ⁻¹
ΔX :	Biomassedifferenz (OD)
Δt :	Zeitdifferenz, h

Als Maß für die Zellmasse X wird die Differenz der logarithmierten OD über den entsprechenden Fermentationszeitraum Δt eingesetzt.

Die Ausbeutekoeffizienten lassen sich mit den in Gleichung 9-2 gezeigten Formeln berechnen.

Gleichung 9-2:
$$Y_{X/S} = \frac{BTM_{\omega}}{m_{Glc}}; Y_{P/S} = \frac{m_{\omega, polySia}}{m_{Glc}}; Y_{P/X} = \frac{m_{\omega, polySia}}{BTM_{\omega}}$$

$Y_{X/S}$: Substrat-bezogener Biomasseausbeutekoeffizient, $g\ g^{-1}$

$Y_{P/S}$: Substrat-bezogener Produktausbeutekoeffizient, $g\ g^{-1}$

$Y_{P/X}$: Biomasse-bezogener Produktausbeutekoeffizient, $g\ g^{-1}$

Die Raum-Zeit-Ausbeute wird zur Beurteilung der Produktivität des Bioprozesses anhand der Gleichung 9-3 berechnet.

Gleichung 9-3
$$RZA = \frac{c_{\omega, polySia}}{\Delta t}$$

RZA : Raum-Zeit-Ausbeute, $g\ L^{-1}\ g^{-1}$

$c_{\omega, polySia}$: Produktendkonzentration, $g\ L^{-1}$

Δt : Kultivierungszeit, h

9.4 Bioreaktorsysteme und Prozesssteuerungsstrategie

Die Rührkesselkultivierung erfolgte in unterschiedlichen Maßstäben und Systemen. Die Kultivierung im 1,5 L Maßstab erfolgte in dem Glas-Bioreaktorsystem Biostat® Aplus mit einem Arbeitsvolumen von maximal 2 L. Die Kultivierung im 25 L Maßstab erfolgte in dem Edelstahl-Bioreaktorsystem Biostat® Cplus mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 30 L. Hinzukommend wurde in dem 25 L Einweg-Beutelreaktorsystem Biostat® RM 20/50 kultiviert. Die Reaktorsysteme setzen sich aus dem Reaktor mit angebundener Steuereinheit (*digital control unit*, DCU), einem Abgasanalysator und einem Computerterminal zur Datenaufzeichnung und Prozesssteuerung zusammen. Die verwendeten Reaktorsysteme sind Geräte vom Hersteller Sartorius Stedim Biotech GmbH.

9.4.1 Glas-Rührkesselreaktor Biostat® Aplus

Der Biostat® Aplus ist ein System bestehend aus einem 2 L Glasreaktor und einer Steuereinheit. Der Reaktor ist einwandig und kann über eine Heizmanschette temperiert

werden. Über den Reaktordeckel ragt hinzukommend ein Kühlfinger in den Reaktorinnenraum. Im Reaktordeckel sind vier Zu- bzw. Ableitungen für Korrekturmittelflüssigkeiten, Feed, Begasung, und Probenahme eingelassen. Hinzukommend sind zwei Standard-Ports für die für pH- und pO₂-Sonden, sowie ein Port für die Installation eines Thermoelements. Die Begasung wird über einen Ringsparger am Reaktorboden realisiert. Die Durchmischung des Reaktorinhalts erfolgt über ein Rührwerk mit drei an der Achse übereinander angebrachten Blattrührern. Die Abluft wird über einen am Deckel installierten Abgaskühler abgeführt. Der gesamte Reaktoraufbau kann in einem Laborautoklaven sterilisiert werden. Über die Steuereinheit können wichtige Prozessparameter, wie Temperatur (integrierter Thermostat), pH-Wert (Peristaltik-pumpwerk mit Korrekturmittelflaschen) und pO₂-Wert (variable Anpassung von Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate inkl. Gasmix) vollautomatisch reguliert werden. Alle Prozessdaten können hinzukommend über die betriebseigene MFCS-Software aufgezeichnet werden.

9.4.2 Edelstahl-Rührkesselreaktor Biostat® Cplus

Der Aufbau des Reaktorsystems Biostat® Cplus mit einem Arbeitsvolumen von maximal 30 L umfasst den Reaktorkessel und eine DCU. Der doppelwandige Reaktorkessel ist temperierbar und besitzt 25 mm Stutzen zur Installation von externen Geräten und Sonden zur Messung des pH, pO₂, Trübung, Temperatur oder Schaum. Die Durchmischung des Reaktorinhalts wird über einen im Deckel angebrachten Rührer mit drei an der Achse übereinander installierten Blattrührern realisiert. Die Begasung erfolgt über einen Ringsparger am Reaktorboden unterhalb des Rührers. Die Zu- und Abluft wird über Sterilfilter (\varnothing 0,22 μ m) am Reaktordeckel geleitet. Die Abluft wird über einen Abgaskühler abgeleitet. Der Deckel verfügt über verschiedene Ein- und Ausgänge für pH-Korrekturmittelflüssigkeit, Feed, Antischaum, Inokulum etc. Die Probenahme erfolgt über ein resterilisierbares Bodenablassventil unterhalb des Reaktorkessels. Die Reinigung und Sterilisation des fest installierten Reaktors erfolgt *in-place*. Über die DCU werden sämtliche Eingangssignale der Messsonden verarbeitet und die Temperatur (integrierter Thermostat), pH-Wert (Peristaltikpumpwerk mit Korrekturmittelflaschen) und pO₂-Wert (variable Anpassung von Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate inkl. Gasmix) vollautomatisch reguliert. Alle Prozessdaten können hinzukommend über die betriebseigene MFCS-Software aufgezeichnet und Prozessstrategien für Zulaufverfahren reguliert werden.

9.4.3 Einweg-Beutelreaktor Biostat® RM Optical

Die Kultivierung im Bioreaktor Biostat® RM 20/50 Optical wurde im 25 L Maßstab in Einwegbeutel Flexsafe® RM 50 L optical durchgeführt. Der Einweg-Beutelreaktor wird zunächst auf der Rockingplattform angebracht und über einen Sterilfilter (\varnothing 0,22 μm) mit dem Kultivierungsmedium befüllt. Die Temperierung erfolgt über eine Heiz-/Kühlspirale am Boden der Rockingplattform. Die Durchmischung des Reaktorinhalts erfolgt welleninduziert über die Rockingplattform. Hinzukommen wird die Zu- und Abluft über eine sterile Kopfraumbegasung realisiert. Der Beutel verfügt über zwei vorkalibrierte Sensorspots zur spektrometrischen Bestimmung des pH- und pO_2 -Wertes. Darüber hinaus verfügt der Beutel über ein steriles Probenahmesystem sowie zwei weitere Anschlüsse für pH-Korrekturmittelflüssigkeiten und Feed. Die DCU ermöglicht eine Verarbeitung der Prozessdaten sowie eine vollautomatische Prozesssteuerung, sodass die Temperatur (integrierter Thermostat), der pH-Wert (Peristaltikpumpwerk mit Korrekturmittelflaschen), der pO_2 -Wert (variable Anpassung von Rockingfrequenz und Begasungsrate inkl. Gasmix) geregelt werden können.

9.4.4 Prozessautomatisierung mittels pO_2 -kontrollierter Zulaufstrategie zur Hochzelldichtekultivierung

In der Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* im Edelstahl-Rührkesselreaktor Biostat® Cplus kam die in Abbildung 9-1 dargestellt pO_2 -kontrollierte Zulaufstrategie zum Einsatz. Das sog. „Rezept“ wurde mittels BioPAT® MFCS4 generiert und ermöglicht anhand des prozessspezifischen pO_2 einen vollautomatisierten Substratzulauf. Hierüber soll sichergestellt werden, dass in der Satzphase des Biowachstums Glucose vollständig erschöpft wird, bevor eine zusätzliche Zufuhr der hochkonzentrierten Substratlösung in der Zulaufphase gestartet wird.

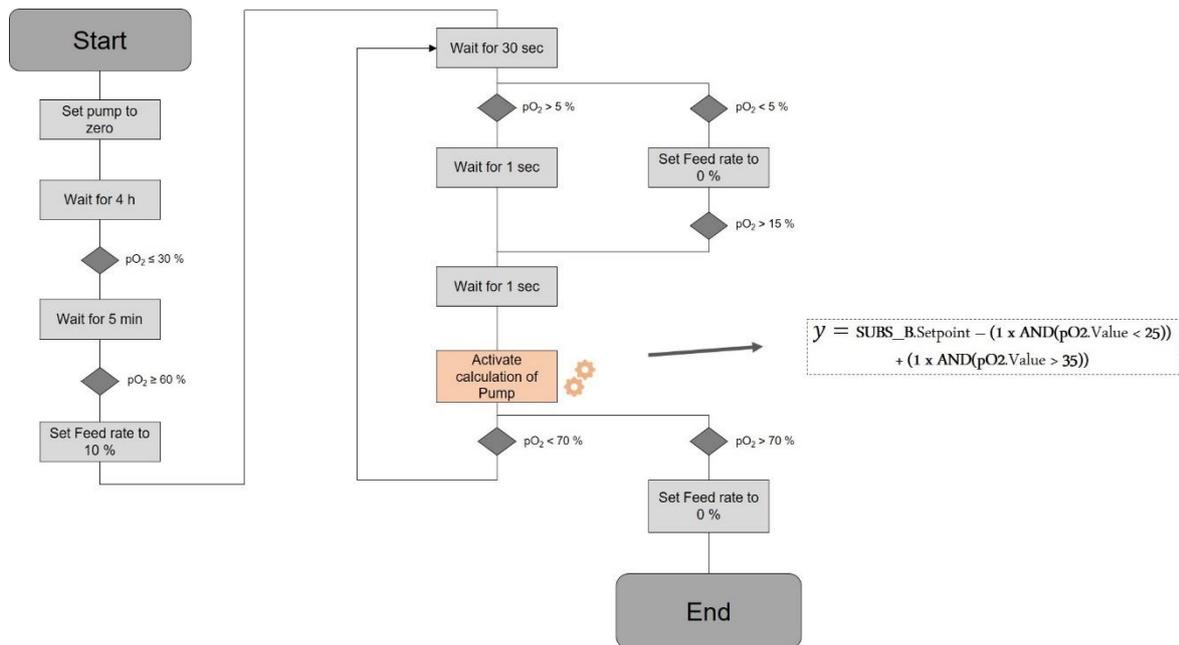


Abbildung 9-1: Schematische Darstellung der pO₂-kontrollierten Zulaufstrategie zur Hochzelldichtekultivierung

Das Rezept ist in drei Teile unterteilt und berücksichtigt die Überbrückung der Satzphase, die Berechnung und Regulierung der Zulauftrate sowie einen Kontroll-Loop zur Vermeidung eines Substratüberschusses.

Durch den ersten Teil des Rezeptes wird eine zuvor bestimmte und definierte Zeitspanne von 4 h überbrückt, bevor der pO₂-Wert aktiv betrachtet wird. Überschreitet der pO₂ nach Ablauf der Satzphase und vollständigen Glucoseverbrauchs einen zuvor definierten Wert von 60 %, wird der Zulauf initiiert und die Substratpumpenrate auf 10 % gesetzt.

Im zweiten Teil des Rezeptes wird die Substratpumpenrate unter Berücksichtigung des zuvor festgelegten pO₂-Setpoints von 30 % reguliert. Hierbei ist im Rezept ein Arbeitsbereich für den pO₂ von ± 5 % definiert. Beim Über- oder Unterschreiten dieses Arbeitsbereichs wird die Substratpumpenrate „SUBS_B.Setpoint“ neu berechnet und um 1 % gesteigert oder verringert. Somit wird ein sensibler Substratzulauf entsprechend der vorliegenden Biomasse ermöglicht.

Der dritte Teil des Rezeptes umfasst einen Kontroll-Loop, womit ein Substratüberschuss verhindert werden soll. Unterschreitet der pO₂ einen Wert von 5 % wird die Substratpumpenrate auf 0 % gesetzt. Erst nachdem ein pO₂-Wert von 15 % überschritten wird, erfolgt die Freigabe des Kontroll-Loops und die Substratzufuhr wird erneut gestartet.

Der Prozess wird automatisch beendet, wenn die Substratlösung verbraucht ist und der pO₂ einen Wert von 70 % überschreitet.

9.5 Offline-Analytik

9.5.1 Optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte von Kultivierungsproben erfolgt spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Zur Nullwert-Bestimmung wird eine 0,9 %ige NaCl-Lösung verwendet, da diese über ähnliche physiologische Eigenschaften wie die verwendeten Medien verfügt. Damit die Messung im linearen Bereich des Gerätes zwischen einer OD von 0,1 – 0,3 liegt, werden entsprechende Probenverdünnungen mit der Saline vorgenommen.

9.5.2 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) werden zunächst Mikroreaktionsgefäße für mindestens 48 h bei 65 °C getrocknet und, nach erfolgter Abkühlung im Exsikkator, deren Leergewicht ermittelt. Zum Zeitpunkt der Probenahme wird je 1 mL der Kulturbrühe in die Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 13000 rpm Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wird dekantiert, das Probenpellet für mindestens 48 h bei 65 °C getrocknet und anschließend gewogen. Die BTM ergibt sich aus der Differenz des Mikroreaktionsgefäßes mit Pellet und dessen Leergewicht.

9.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung löslicher Proteine die Methode nach Bradford angewendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird eine Verdünnungsreihe mit BSA als Proteinstandard in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 – 2000 µg mL⁻¹ angesetzt (Vergleich Tabelle 9-10). Anschließend werden 20 µL der Proben und BSA-Standards in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 300 µL Bradfordreagenz (Quick Start™ Bradford, Bio Rad Laboratories, Inc.) versetzt. Die Messung erfolgt nach 10-minütiger Inkubation bei RT und Lichtausschluss bei 595 nm. Durch Ableitung der Standardkurve kann die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden. Alle Verdünnungen wurden mit VE-Wasser durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Kultivierungsproben wurde die Kulturbrühe zunächst zentrifugiert (5 min, 4 °C, 13000 rpm Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific) und im Überstand gemessen. Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung.

Tabelle 9-10: BSA-Verdünnungsreihe

Standard	ddH ₂ O	BSA Stock	Finale BSA Konz. [µg/mL]
A	0 µL	300 µL des Stocks	2000
B	125 µL	375 µL des Stocks	1500
C	325 µL	325 µL des Stocks	1000
D	175 µL	175 µL von B	750
E	325 µL	325 µL von C	500
F	325 µL	325 µL von E	250
G	325 µL	325 µL von F	125
H	400 µL	100 µL von G	25
I	400 µL	0	0

9.5.4 Bestimmung der polySia-Konzentration mittels TBA-Assay

Die polySia-Konzentration wird mit dem TBA-Assay bestimmt. Zur Bestimmung der polySia-Konzentration wird eine Verdünnungsreihe mit kommerzielle Colominsäure (Colominsäure-natriumsalz, Carbosynth Limited) als Standard in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 – 1000 µg mL⁻¹ angesetzt. Zunächst werden 50 µL der Proben und Standards in 2 mL Reaktionsgefäße pipettiert. Zur Hydrolyse werden den Reaktionsansätzen 200 µL einer 0,5 M Phosphorsäure hinzugegeben und für 18 h bei 70 °C und 500 rpm im Thermocycler inkubiert. Nachfolgend wird der Reaktionsansatz durch Zugabe von 100 µL einer 0,1 M NaOH neutralisiert. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 100 µL Oxidationslösung (Tabelle 9-11) und eine Inkubation für 30 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermocycler. Anschließend wird dem Reaktionsansatz 500 µL der Reduktionslösung (Tabelle 9-12) zugegeben und es erfolgt eine Inkubation bei RT für 10 min. Im letzten Schritt wird dem Reaktionsansatz 500 µL der 3 %igen TBA-Lösung (Tabelle 9-13) zugegeben. Nach einer Inkubation von 13 min bei 95 °C werden je 200 µL der Reaktionsansätze in eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Photospektrometer (Multiskan®, Spectro, Thermo Fisher Scientific) gemessen. Zwischen den einzelnen Schritten müssen die Reaktionsansätze immer sorgfältig durchmischt werden. Alle Proben und Standards werden in einer Dreifachbestimmung gemessen und, wenn nötig, Verdünnungen mit VE-Wasser angesetzt.

Tabelle 9-11: Zusammensetzung der Oxidationslösung zur Herstellung von 50 mL.

Substanz	End-Konzentration	Einwaage/ Menge
Periodsäure	20 mM	2,28 g
1 M Phosphorsäure	5 mM	2,5 mL
VE-Wasser		á 50 mL

Tabelle 9-12: Zusammensetzung der Reduktionslösung zur Herstellung von 50 mL.

Substanz	End-Konzentration	Einwaage/ Menge
Natriumarsenit	38,5 mM	2,5 g
Natriumsulfat	50 mM	3,55 g
2 M Schwefelsäure	20 mM	5 mL
VE-Wasser		á 50 mL

Tabelle 9-13: Zusammensetzung der 3 %igen TBA-Lösung zur Herstellung von 50 mL.

Substanz	End-Konzentration	Einwaage/ Menge
2-Thiobarbitursäure	20 mM	1,5 g
3 M NaOH	1,2 % (v/v)	5 mL
VE-Wasser		á 50 mL

9.5.5 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt nach einer enzymatischen Nachweismethoden mittel YSI 2900 (YSI Incorporated). Die Glucosekonzentration kann im zellfreier Kulturüberstand in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 – 10 g L⁻¹ bestimmt werden. Falls nötig werden Verdünnungen mit VE-Wasser vorgenommen. Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit werden die Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

9.5.6 Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Acetatkonzentration der Kultivierungsproben kann mittels HPLC-DAD bestimmt werden. Zur Quantifizierung wird eine Standardreihe mit Natriumacetat in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,6 – 12 g L⁻¹ aufgenommen. Die Proben werden zunächst filtriert (\varnothing 0,2 μ m) und in HPLC-Vials überführt. Zur Quantifizierung wird die Polymersäule Aminex[®] HPX-87H (Bio Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Die Detektion erfolgt mit dem DAD-Detektor (Chromaster) bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Konfigurationen der HPLC zur Quantifizierung von Acetat sind in Tabelle 9-14 ersichtlich.

Tabelle 9-14: Konfiguration für die HPLC-DAD Messung zur Analyse von Acetat.

Betriebsparameter	Einstellungen
Eluent	0,05 M H ₂ SO ₄
Flussgeschwindigkeit	0,6 mL min ⁻¹
Säulentemperatur	55 °C
Injektionsvolumen	20 µL

9.6 Methoden zur Produktaufreinigung im DSP

9.6.1 Reifeprozess und Zellabtrennung

Nach dem Ende der Kultivierung wird die Kulturbrühe für ca. 15 – 20 h bei 7 °C gelagert. Durch diesen Schritt wird ein signifikanter Teil der zellgebundenen polySia ins Medium freigesetzt, sodass höhere Produktausbeuten im DSP erreicht werden.

Im Anschluss erfolgt die Zellabtrennung mittels kontinuierlicher Zentrifugation (Heraeus™ Contifuge Stratos™, Thermo Fisher Scientific). Hierzu muss der Zentrifugenkopf zunächst nach Anleitung zusammengesetzt werden. Die Zellabtrennung erfolgt bei 17000 rpm und 4 °C. Die Kulturbrühe wird mit einer externen Peristaltikpumpe bei einer Flussrate von 100 mL min⁻¹ in den Zentrifugenkopf befördert. Nach Prozessierung von ca. 12,5 L Kulturbrühe muss der Zentrifugenkopf entleert werden, um eine Überladung zu vermeiden.

9.6.2 Produktaufkonzentrierung mittels Cross Flow Ultrafiltration

Die ca. 25 L des Zentrifugationsüberstandes werden nachfolgend mittels Cross Flow Ultrafiltrationsanlage und einer Filtrationsmembran mit einem MWCO von 10 kDa (Sartoflow® Smart und Sartocoon® Slice Hydrosart®, Sartorius Stedim Biotech GmbH) auf ein Volumen von ca. 200 mL aufkonzentriert und geerntet. Um den Produktverlust möglichst gering zu halten, wird das System dreimalig mit je 100 mL VE-Wasser gespült, wodurch eine signifikante Menge des im Totvolumen enthaltenen polySia für das weitere DSP zu Verfügung steht. Über den Gesamten Prozess wird der Transmembrandruck auf ca. 2 bar über die Pumpenrate reguliert, wodurch ein Membran- und System-schädlicher Überdruck verhindert wird.

9.6.3 Ethanolfällung

Das Produktkonzentrat der Cross Flow Ultrafiltration wird in drei aufeinanderfolgenden Ethanolfällungsschritten weiter prozessiert. Hierbei werden je 100 mL Produktkonzentrat mit 440 mL 96 %igen Ethanol und 5 g NaCl gemischt, sodass eine Endkonzentration von 80 % (v/v) Ethanol eingestellt wird. Nach Ethanolzugabe wird die Produkt-Ethanol-Lösung unter rühren für je 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Präzipitat bei 4 °C und 4700 rpm für je 25 min abzentrifugiert (Multifuge™ X3 FR mit Ausschwingrotor Round bucket 75003608, Thermo Fisher Scientific). Zwischen den Fällungsschritten wird das Präzipitatpellet in 100 mL VE-Wasser resuspendiert. Nach dem finalen Fällungsschritt wird das gesamte Präzipitat in 400 mL VE-Wasser resuspendiert.

9.6.4 Behandlung mit Tonmineralien

Die Produktlösung der Ethanolfällung wird mit Tonmineralien (Muster: EX M 1753, Clariant AG) weiterbehandelt. Die Zusammensetzung der Tonmineralien ist *batch*-abhängig. Die durchschnittliche Zusammensetzung ist in Tabelle 9-15 ersichtlich. Zunächst werden 40 g Tonmineralien in 200 mL 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) unter rühren für 1 h bei RT equilibriert. Nachfolgend wird die Produktlösung hinzugegeben und unter rühren für 3 h bei RT inkubiert. Zuletzt werden die Tonmineralien durch Zentrifugation bei 4 °C, 4700 rpm für 25 min abgetrennt. Die Behandlung mit Tonmineralien wird daraufhin ein zweites Mal durchgeführt.

Tabelle 9-15: Herstellerangaben für die durchschnittliche Zusammensetzung von EX M 1753.

Bestandteil	Anteil [%]
Siliciumdioxid (SiO ₂)	56,9
Magnesiumoxid (MgO)	22,7
Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	6,7
Eisen(III)-oxid (Fe ₂ O ₃)	2,3
Kaliumoxid (K ₂ O)	1,4
Calciumoxid (CaO)	1,0
Titan(IV)-oxid (TiO ₂)	0,6
Natriumoxid (Na ₂ O)	0,4
Verlust bei Trocknung	7,7

9.6.5 Produktentsalzung mittels Cross Flow Dialtrafiltration

Zur Entsalzung wird die gesamte Produktlösung der Tonmineralienbehandlung zunächst mittels Cross Flow Ultrafiltration und einer Filtrationsmembran mit einem MWCO von 5 kDa (Sartoflow® Smart und Sartocoon® Slice Hydrosart®, Sartorius Stedim Biotech GmbH) auf ein Volumen von ca. 200 mL aufkonzentriert. Nachfolgend wird die Prozesslösung gegen VE-Wasser dialysiert, bis eine konstante Konduktivität von ca. 1,2 bis 2 mS cm⁻¹ erreicht wird. Die Produktlösung wird weiter auf ein Volumen von 50 mL aufkonzentriert und geerntet. Nachfolgend wird das System zweimalig mit je 100 mL VE-Wasser gewaschen, sodass ein finales Gesamtvolumen von ca. 250 mL Produktlösung vorliegt.

9.6.6 Produkttrocknung mittels Lyophilisation

Zur Abtrennung des Wassers und Trocknung von LC polySia wird die Produktlösung nach Dia-Ultrafiltration in 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von ca. 25 mL aufgeteilt und bei -80 °C für mindestens 3 h eingefroren. Anschließend wird das Produkt bis zur vollständigen Trocknung in der Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) bei -20 °C und 0,04 mbar lyophilisiert.

9.7 Methoden zur polySia avDP20 Produktion

9.7.1 Thermische Hydrolyse

Zur Produktion der biopharmazeutisch relevanten niedermolekularen polySia wird das biotechnologisch produzierte, langkettige polySia thermisch hydrolysiert.

In der Charakterisierung des Hydrolyseverhaltens (Vergleich 7.1) wird LC polySia in einer Konzentration 1 g L⁻¹ in VE-Wasser gelöst und zu je 1 mL in Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert. Die thermische Hydrolyse erfolgt im Thermocycler bei 65 bzw. 90 °C und wird zu definierten Probenahmezeitpunkten terminiert.

In der Produktion und Fraktionierung von polySia avDP20 wird entsprechend der maximalen Beladungsdichte der Membranadsorber LC polySia in 2 mL VE-Wasser gelöst und für 120 min bei 65 °C und 500 rpm im Thermocycler hydrolysiert (Vergleich 7.2).

9.7.2 Membranadsorber-basierte Fraktionierung mittels FPLC

In der Charakterisierung der Fraktionierungsperformance von Membranadsorbentien (Sartobind® Q, 3 mL, 8 mm, Sartorius Stedim Biotech GmbH) und FPLC (ÄKTA™ pure, GE

Healthcare) zur Produktion der pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 wurden verschiedene Gradienten entwickelt und untersucht. Über den gesamten Fraktionierungsprozess wird die Flussrate des FPLC-Systems auf 5 mL min^{-1} gesetzt. In der Fraktionierung werden 3x 3 mL Membranadsorber hintereinander gekoppelt und ergeben ein Gesamt-Säulenvolumen von $\text{CV} = 9 \text{ mL}$ (CV, column volume). Zunächst wird LC polySia unter den in 9.7.1 beschriebenen Bedingungen thermisch hydrolysiert und in 3 CV 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (Puffer A) aufgenommen. Anschließend werden die Membranadsorber mit 5 CV Puffer A equilibriert. Die Probenaufgabe erfolgt über den 150 mL-Loop. Nach Probenaufgabe wird der Membranadsorber mit 5 CV Puffer A gewaschen. Anschließend wird die hydrolysierte polySia über unterschiedliche Gradientenprofile mit 1 M Ammoniumhydrogencarbonat (Puffer B) eluiert. Die in dieser Arbeit untersuchten Gradientenprofile sind in Tabelle 9-16 bis Tabelle 9-18 gezeigt.

Tabelle 9-16: 10 %-Stufengradient.

Volumen [CV]	Fraktionsnr. [n]	Anteil Puffer B [% (v/v)]	NH₄HCO₃ [M]
5	1 – 5	0	0,1
5	6 – 10	10	0,19
5	11 – 15	20	0,28
5	16 – 20	30	0,37
5	21 – 25	40	0,46
5	26 – 30	50	0,55
5	31 – 35	60	0,64
5	36 – 40	70	0,73
5	41 – 45	80	0,82

Tabelle 9-17: 2 %-Stufengradient.

Volumen [CV]	Fraktionsnr. [n]	Anteil Puffer B [% (v/v)]	NH₄HCO₃ [M]
5	1 – 5	26	0,334
1	6	26 – 26,75	0,334 – 0,341
1	7	26,75 – 27,49	0,341 – 0,347
1	8	27,49 – 28,24	0,347 – 0,354
1	9	28,24 – 28,99	0,354 – 0,361
1	10	28,99 – 29,74	0,361 – 0,368
1	11	29,74 – 30,48	0,368 – 0,374
1	12	30,48 – 31,23	0,374 – 0,381

1	13	31,23 – 32	0,381 – 0,388
5	14 – 18	80	0,82

Tabelle 9-18: Dreistufengradient.

Volumen [CV]	Fraktionsnr. [n]	Anteil Puffer B [% (v/v)]	NH ₄ HCO ₃ [M]
5	1 – 5	20	0,28
8	6 – 13	28	0,352
5	14 – 18	80	0,82

9.8 Produktanalytik

9.8.1 Bestimmung der Endotoxinkonzentration

Zur Bestimmung der Endotoxinbelastung von biotechnologisch produzierter, langkettiger polySia sowie polySia avDP20 wurden Proben mittels Endosafe[®]-Cartridge Reader und Endosafe[®]-PTS[™]-System (Charles River Laboratories) untersucht. Getrocknete polySia-Proben werden zunächst mit endotoxinfreiem Wasser in einer Konzentration von 1 g L⁻¹ resuspendiert. Proben-Verdünnungen werden ebenfalls mit endotoxinfreiem Wasser vorgenommen. Zur Probenanalytik werden je 25 µL der Proben in die vier Vertiefungen der Endotoxinkartuschen pipettiert.

9.8.2 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration mittels NanoDrop[™]

Die Messung der DNA- und Proteinkonzentration im aufgereinigten Endprodukt erfolgt spektralphotometrisch mittels NanoDrop[™] (NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Gerät wird zunächst mit VE-Wasser kalibriert, sodass nachfolgend die Proben untersucht werden können. Das verwendete Volumen zur Kalibration und Probenanalytik beträgt 5 µL.

9.8.3 DMB-Probenderivatisierung

Zur Derivatisierung von polySia-Proben werden 50 μL der Proben und Referenzstandards in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Zur Probenderivatisierung werden zur Probe 80 μL frisch angesetzter DMB-Reagenz (Tabelle 9-19), 80 μL 0,2 M Trifluoressigsäure (TFA) und 20 μL VE-Wasser zugegeben. Der Reaktionsansatz wird unter Lichtausschluss für 24 h bei 10 $^{\circ}\text{C}$ und 500 rpm im Thermocycler inkubiert. Nachfolgend werden zur Terminierung der Derivatisierungsreaktion 20 μL 1 M NaOH zugegeben. Die Proben werden filtriert (\varnothing 0,2 μm) und zur Messung in HPLC-Vials überführt.

Tabelle 9-19: Zusammensetzung der DMB-Reagenz.

Substanz	End-Konzentration	Einwaage/ Menge
DMB	7 mM	1,6 mg
Natriumsulfit	12,5 mM	1,6 mg
β -Mercaptoethanol	80 mM	53,3 μl
VE-Wasser		ad 1 mL

9.8.4 polySia-Kettenlängencharakterisierung mittels HPLC-FLD und -CAD

Die polySia-Kettenlängencharakterisierung von DMB-derivatisierter Proben und Referenzstandards (Vergleich 9.8.3) erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion (RF-20A, Shimadzu). Die polySia-Kettenlängencharakterisierung von nicht-derivatisierten Proben und Standards erfolgt mittels CAD-Detektion (Corona[®] CAD[®] Detector, ESA Biosciences Inc.). Für die Messung der Proben wird die DNAPac[™] PA-100 Säule (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proben werden zunächst filtriert (\varnothing 0,2 μm) und zur Messung in HPLC-Vials überführt. Die Konfigurationen der HPLC sind in Tabelle 9-20 und das Profil zur Gradientenelution in Tabelle 9-21 ersichtlich.

Tabelle 9-20: Konfiguration der HPLC zur polySia-Kettenlängencharakterisierung mittels FLD und CAD.

Betriebsparameter	Einstellungen
Laufpuffer	deionisiertes Wasser
Elutionspuffer	4 M Ammoniumacetat
Flussgeschwindigkeit	1 mL min ⁻¹
Säulentemperatur	30 $^{\circ}\text{C}$
Injektionsvolumen	25 μL

Tabelle 9-21: Gradientenprofil der HPLC zur polySia-Kettenlängencharakterisierung mittels FLD und CAD.

Zeit [min]	Laufpuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
5	100	0
15	90	10
20	87	13
35	83	17
55	80	20
100	74	26
100,1	30	70
115	30	70
120	70	30
120,1	100	0
150	100	0

9.8.5 HPLC-CAD zur polySia-Quantifizierung

Zur Quantifizierung von polySia-Proben mittels HPLC wird die DNAPac™ PA-100 Säule (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proben werden zunächst filtriert (\varnothing 0,2 μ m) und zur Messung in HPLC-Vials überführt. Die Konfigurationen der HPLC sind in Tabelle 9-22 und das Profil zur Gradientenelution in Tabelle 9-23 ersichtlich.

Tabelle 9-22: Konfiguration der HPLC zur polySia-Quantifizierung mittels CAD.

Betriebsparameter	Einstellungen
Laufpuffer	deionisiertes Wasser
Elutionspuffer	4 M Ammoniumacetat
Flussgeschwindigkeit	1 mL min ⁻¹
Säulentemperatur	30°C
Injektionsvolumen	25 μ L

Tabelle 9-23: Gradientenprofil der HPLC zur polySia-Quantifizierung mittels CAD.

Zeit [min]	Laufpuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
5	100	0
5,1	99	1
12	99	1
20	74	26
20,1	30	70
35	30	70
35,1	100	0
66	100	0

9.8.6 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der chemischen Struktur von polySia wurden die Proben in einer Konzentration von 30 g L^{-1} in Deuteriumoxid (D_2O) gelöst. Weitere Informationen lassen sich dazu im Kapitel 7.1.3 finden.

10 Literaturverzeichnis

- [1] I. Bice, Optimierung der biosynthetischen Produktion von Polysialinsäure und Oligosialinsäure aus *Escherichia coli* K1. Hannover, Univ., Diss., 2012, Hannover, 2012.
- [2] B. Rode, Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1. Hannover, Univ., Diss., 2008 (Nicht für den Austausch).
- [3] R. Cummings (Ed.), Handbook of glycomics, 1st ed., Elsevier Acad. Press, Amsterdam u.a., 2009.
- [4] S. Ayad, The extracellular matrix factsbook, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1998.
- [5] C.J. Shaw, H. Chao, B. Xiao, Determination of sialic acids by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 913 (2001) 365–370. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01218-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01218-8).
- [6] H. Hildebrandt, A. Dityatev, Polysialic Acid in Brain Development and Synaptic Plasticity, *Top. Curr. Chem.* 366 (2015) 55–96. https://doi.org/10.1007/128_2013_446.
- [7] A. Shahraz, J. Kopatz, R. Mathy, J. Kappler, D. Winter, S. Kapoor, V. Schütza, T. Scheper, V. Gieselmann, H. Neumann, Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages, *Scientific Reports* 5 (2015) 16800. <https://doi.org/10.1038/srep16800>.
- [8] C.P. Johnson, I. Fujimoto, U. Rutishauser, D.E. Leckband, Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 137–145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410216200>.
- [9] M. Mühlenhoff, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998) 558–564.
- [10] C.K. Franz, U. Rutishauser, V.F. Rafuse, Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2081–2091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4880-04.2005>.
- [11] J.L. Brusés, N. Chauvet, M.E. Rubio, U. Rutishauser, Polysialic acid and the formation of oculomotor synapses on chick ciliary neurons, *J. Comp. Neurol.* 446 (2002) 244–256. <https://doi.org/10.1002/cne.10199>.

- [12] H. Neumann, PolySia_avDP20: Niedermolekulare Polysialinsäuren als neue Substanzklasse zur Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration, 2016. https://www.validierungsfoerderung.de/validierungsprojekte/polysia_avdp20 (accessed 30 October 2019).
- [13] C. Traving, R. Schauer, Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1330–1349. <https://doi.org/10.1007/s000180050258>.
- [14] A. Varki, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology* 2 (1992) 25–40. <https://doi.org/10.1093/glycob/2.1.25>.
- [15] R. Schauer, Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 485–499.
- [16] B.-X. Lin, Y. Qiao, B. Shi, Y. Tao, Polysialic acid biosynthesis and production in *Escherichia coli*: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7019-x>.
- [17] C. Sato, K. Kitajima, Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease, *J. Biochem.* 154 (2013) 115–136. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt057>.
- [18] E.J. MCGUIRE, S.B. BINKLEY, THE STRUCTURE AND CHEMISTRY OF COLOMINIC ACID, *Biochemistry* 3 (1964) 247–251. <https://doi.org/10.1021/bi00890a017>.
- [19] P.M. Drake, J.K. Nathan, C.M. Stock, P.V. Chang, M.O. Muench, D. Nakata, J.R. Reader, P. Gip, K.P.K. Golden, B. Weinhold, R. Gerardy-Schahn, F.A. Troy, C.R. Bertozzi, Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses, *J. Immunol.* 181 (2008) 6850–6858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6850>.
- [20] S. Inoue, Y. Inoue, Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31863–31870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103336200>.
- [21] D. Nakata, F.A. Troy, Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38305–38316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508762200>.
- [22] A. Reglero, L.B. Rodriguez-Aparicio, J. Luengo, Polysialic acids, *International Journal of Biochemistry* 25 (1993) 1517–1527. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(93\)90507-B](https://doi.org/10.1016/0020-711X(93)90507-B).

- [23] E.P. Weledji, J.C. Assob, The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM), *Ann. Med. Surg. (Lond)* 3 (2014) 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.06.014>.
- [24] R.L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 461–518. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2013>.
- [25] A. Acheson, J.L. Sunshine, U. Rutishauser, NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions, *J. Cell Biol.* 114 (1991) 143–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.143>.
- [26] B. Weinhold, R. Seidenfaden, I. Röckle, M. Mühlhoff, F. Schertzing, S. Conzelmann, J.D. Marth, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 42971–42977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511097200>.
- [27] U. Rutishauser, Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions, *Trends in Neurosciences* 19 (1996) 422–427. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10041-2](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10041-2).
- [28] I. Fujimoto, J.L. Bruses, U. Rutishauser, Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31745–31751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104525200>.
- [29] M. Husmann, J. Roth, E.A. Kabat, C. Weisgerber, M. Frosch, D. Bitter-Suermann, Immunohistochemical localization of polysialic acid in tissue sections: differential binding to polynucleotides and DNA of a murine IgG and a human IgM monoclonal antibody, *J. Histochem. Cytochem.* 38 (1990) 209–215. <https://doi.org/10.1177/38.2.1688896>.
- [30] U. Rutishauser, Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 26–35. <https://doi.org/10.1038/nrn2285>.
- [31] L.M. Krug, G. Ragupathi, C. Hood, C. George, F. Hong, R. Shen, L. Abrey, H.J. Jennings, M.G. Kris, P.O. Livingston, Immunization with N-propionyl polysialic acid-KLH conjugate in patients with small cell lung cancer is safe and induces IgM antibodies reactive with SCLC cells and bactericidal against group B meningococci, *Cancer Immunol. Immunother.* 61 (2012) 9–18. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1083-6>.
- [32] B. Khatua, S. Roy, C. Mandal, Sialic acids siglec interaction: A unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens, *Indian J. Med. Res.* 138 (2013) 648–662.

- [33] K.J. Colley, K. Kitajima, C. Sato, Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (2014) 498–532. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.976606>.
- [34] C. Zuber, P.M. Lackie, W.A. Catterall, J. Roth, Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 9965–9971.
- [35] X. Wang, X. Li, Y.-N. Zeng, F. He, X.-M. Yang, F. Guan, Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples, *Int. J. Mol. Med.* 37 (2016) 197–206. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2395>.
- [36] U. Yabe, C. Sato, T. Matsuda, K. Kitajima, Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13875–13880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300458200>.
- [37] B. Wang, J. Brand-Miller, The role and potential of sialic acid in human nutrition, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 1351–1369. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601704>.
- [38] C. Whitfield, I.S. Roberts, Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1307–1319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01276.x>.
- [39] S. Yang, D. Xi, F. Jing, D. Kong, J. Wu, L. Feng, B. Cao, L. Wang, Genetic diversity of K-antigen gene clusters of *Escherichia coli* and their molecular typing using a suspension array, *Can. J. Microbiol.* 64 (2018) 231–241. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0620>.
- [40] I. Orskov, F. Orskov, B. Jann, K. Jann, Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*, *Bacteriol. Rev.* 41 (1977) 667–710.
- [41] J.M. Bliss, R.P. Silver, Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 221–231. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6461357.x>.
- [42] G. Griffiths, B. Barrett, N. Cook, I.S. Roberts, Biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (1999) 507–512. <https://doi.org/10.1042/bst0270507>.
- [43] E. Vimr, S. Steenbergen, M. Cieslewicz, Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1, *Journal of Industrial Microbiology* 15 (1995) 352–360. <https://doi.org/10.1007/BF01569991>.

- [44] H. Baumann, J.R. Brisson, F. Michon, R. Pon, H.J. Jennings, Comparison of the conformation of the epitope of alpha(2--8) polysialic acid with its reduced and N-acyl derivatives, *Biochemistry* 32 (1993) 4007–4013. <https://doi.org/10.1021/bi00066a022>.
- [45] J.-L. Liu, X.-B. Zhan, J.-R. Wu, C.-C. Lin, D.-F. Yu, An efficient and large-scale preparation process for polysialic acid by *Escherichia coli* CCTCC M208088, *Biochemical Engineering Journal* 53 (2010) 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.015>.
- [46] K. Haastert-Talini, J. Schaper-Rinkel, R. Schmitte, R. Bastian, M. Mühlenhoff, D. Schwarzer, G. Draeger, Y. Su, T. Scheper, R. Gerardy-Schahn, C. Grothe, In vivo evaluation of polysialic acid as part of tissue-engineered nerve transplants, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 3085–3098. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0180>.
- [47] S. Berski, J. van Bergeijk, D. Schwarzer, Y. Stark, C. Kasper, T. Scheper, C. Grothe, R. Gerardy-Schahn, A. Kirschning, G. Dräger, Synthesis and biological evaluation of a polysialic acid-based hydrogel as enzymatically degradable scaffold material for tissue engineering, *Biomacromolecules* 9 (2008) 2353–2359. <https://doi.org/10.1021/bm800327s>.
- [48] Y. Haile, K. Haastert, K. Cesnulevicius, K. Stummeyer, M. Timmer, S. Berski, G. Dräger, R. Gerardy-Schahn, C. Grothe, Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid, *Biomaterials* 28 (2007) 1163–1173. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.030>.
- [49] S. Steinhaus, Y. Stark, S. Bruns, Y. Haile, T. Scheper, C. Grothe, P. Behrens, Polysialic acid immobilized on silanized glass surfaces: a test case for its use as a biomaterial for nerve regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 1371–1378. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3981-0>.
- [50] L.K.K. Tan, G.M. Carlone, R. Borrow, Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 1511–1520. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0906357>.
- [51] T. Liu, Z. Guo, Q. Yang, S. Sad, H.J. Jennings, Biochemical engineering of surface alpha 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32832–32836. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000573200>.
- [52] J. Heimburg-Molinaro, M. Lum, G. Vijay, M. Jain, A. Almogren, K. Rittenhouse-Olson, Cancer vaccines and carbohydrate epitopes, *Vaccine* 29 (2011) 8802–8826. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.009>.
- [53] I. de Vries, C. Busse, J. Kopatz, H. Neumann, S. Beutel, T. Scheper, Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor, *Eng. Life Sci.* 17 (2017) 723–731. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600220>.

- [54] T. Lindhout, U. Iqbal, L.M. Willis, A.N. Reid, J. Li, X. Liu, M. Moreno, W.W. Wakarchuk, Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 7397–7402. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019266108>.
- [55] A.I. Fernandes, G. Gregoriadis, Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1341 (1997) 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00056-3).
- [56] A.I. Fernandes, G. Gregoriadis, The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics, *International Journal of Pharmaceutics* 217 (2001) 215–224. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00603-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00603-2).
- [57] S. Jain, D.H. Hreczuk-Hirst, B. McCormack, M. Mital, A. Epenetos, P. Laing, G. Gregoriadis, Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1622 (2003) 42–49. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00116-8).
- [58] A. Constantinou, A.A. Epenetos, D. Hreczuk-Hirst, S. Jain, M. Wright, K.A. Chester, M.P. Deonarain, Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 924–931. <https://doi.org/10.1021/bc8005122>.
- [59] A. Constantinou, A.A. Epenetos, D. Hreczuk-Hirst, S. Jain, M.P. Deonarain, Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 643–650. <https://doi.org/10.1021/bc700319r>.
- [60] G. Gregoriadis, A. Fernandes, M. Mital, B. McCormack, Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1964–1969. <https://doi.org/10.1007/PL00000676>.
- [61] T. Jonsson, J.K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P.V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R.R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O.A. Andreassen, E.G. Jönsson, A. Palotie, T.W. Behrens, O.T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R.J. Watts, K. Stefansson, A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline, *Nature* 488 (2012) 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature11283>.
- [62] C.A. Augood, J.R. Vingerling, P.T.V.M. de Jong, U. Chakravarthy, J. Seland, G. Soubrane, L. Tomazzoli, F. Topouzis, G. Bentham, M. Rahu, J. Vioque, I.S. Young, A.E. Fletcher, Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye

Study (EUREYE), Arch. Ophthalmol. 124 (2006) 529–535.
<https://doi.org/10.1001/archopht.124.4.529>.

[63] F.G. Holz, H.M. Helb, A. Bindewald-Wittich, H.P.N. Scholl, Moderne Arzneimitteltherapie der altersabhängigen Makuladegeneration, Internist (Berl) 47 (2006) 192–198. <https://doi.org/10.1007/s00108-005-1545-z>.

[64] J.Z. Nowak, Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy, Pharmacol. Rep. 58 (2006) 353–363.

[65] M. Karlstetter, J. Kopatz, A. Aslanidis, A. Shahraz, A. Caramoy, B. Linnartz-Gerlach, Y. Lin, A. Lückoff, S. Fauser, K. Düker, J. Claude, Y. Wang, J. Ackermann, T. Schmidt, V. Hornung, C. Skerka, T. Langmann, H. Neumann, Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina, EMBO Mol. Med. 9 (2017) 154–166. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606627>.

[66] C.H. Meyer, F.G. Holz, Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: ranibizumab and bevacizumab, Eye (Lond) 25 (2011) 661–672. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.66>.

[67] S. Rofagha, R.B. Bhisitkul, D.S. Boyer, S.R. Sadda, K. Zhang, Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP), Ophthalmology 120 (2013) 2292–2299. <https://doi.org/10.1016/j.optha.2013.03.046>.

[68] T. Langmann, S. Fauser, Polysialinsäure zur Immunmodulation im Tiermodell der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), Klin. Monbl. Augenheilkd. 234 (2017) 657–661. <https://doi.org/10.1055/s-0043-105138>.

[69] J. Ambati, B.J. Fowler, Mechanisms of age-related macular degeneration, Neuron 75 (2012) 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.018>.

[70] S. Werneburg, F.F.R. Buettner, L. Erben, M. Mathews, H. Neumann, M. Mühlenhoff, H. Hildebrandt, Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages, Glia 64 (2016) 1314–1330. <https://doi.org/10.1002/glia.23004>.

[71] S. Spence, M.K. Greene, F. Fay, E. Hams, S.P. Saunders, U. Hamid, M. Fitzgerald, J. Beck, B.K. Bains, P. Smyth, E. Themistou, D.M. Small, D. Schmid, C.M. O'Kane, D.C. Fitzgerald, S.M. Abdelghany, J.A. Johnston, P.G. Fallon, J.F. Burrows, D.F. McAuley, A. Kissenpfennig, C.J. Scott, Targeting Siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle

abrogates inflammation, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015) 303ra140.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab3459>.

[72] J. Große, U. Ruch, G. Tiedemann, Qualitätsmanagement bei neu gegründeten Life-Science-Unternehmen, in: J. Becker, T.R. Villinger (Eds.), *Life Science Venturing: Herausforderung - Spezifika - Prozess*, Springer Gabler, Wiesbaden, 2017, pp. 97–116.

[73] A. Margulies, T. Kroner, A. Gaisser, I. Bachmann-Mettler (Eds.), *Onkologische Krankenpflege*, 6th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., 2017.

[74] C. Unger, H. Skottman, P. Blomberg, M.S. Dilber, O. Hovatta, Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) R48-53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn079>.

[75] R. Kühn, Qualitätssicherung in der pharmazeutischen Industrie am Beispiel einer Tabletten-Herstellung, *Chemie Ingenieur Technik* 65 (1993) 1243–1247. <https://doi.org/10.1002/cite.330651015>.

[76] G. Kutz, A. Wolff (Eds.), *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

[77] I. de Vries, Herstellung zelleigener Produkte mittels *Escherichia coli* in unterschiedlichen Bioreaktorsystemen, Hannover Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover.

[78] J. Singh, International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, *J. Pharmacol. Pharmacother.* 6 (2015) 185–187. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.162004>.

[79] United States Pharmacopoeial (Ed.), *United States Pharmacopoeia 24*, National Formulary 19, Section <1225>“Validation of Compendial Methods”, 2000.

[80] US Food and Drug Administration (Ed.), *Guidelines for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation*, 1987.

[81] US Food and Drug Administration (Ed.), *CDER Guideline on Validation of Chromatographic Methods, Reviewer Guidance of Chromatographic Methods*, 1994.

[82] US Food and Drug Administration (Ed.), *Draft Guidance Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000.

[83] Frank Lammers, *Qualitätsmanagement in der biopharmazeutischen Industrie: Zusammenfassung*, 2015.

- [84] S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011.
- [85] *Europäisches Arzneibuch: Amtliche deutsche Ausgabe*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2017.
- [86] Y. Bitar, *Entwicklung und Validierung chromatographischer bzw. elektrophoretischer Methoden zur Reinheitsprüfung von Arzneistoffen*. Würzburg, Univ., Diss., 2007.
- [87] J. Ermer (Ed.), *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2015.
- [88] S. Khoomrung, P. Chumnapan, S. Jansa-Ard, M. Ståhlman, I. Nookaew, J. Borén, J. Nielsen, Rapid quantification of yeast lipid using microwave-assisted total lipid extraction and HPLC-CAD, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4912–4919. <https://doi.org/10.1021/ac3032405>.
- [89] H.Y. Eom, S.-Y. Park, M.K. Kim, J.H. Suh, H. Yeom, J.W. Min, U. Kim, J. Lee, J.-R. Youm, S.B. Han, Comparison between evaporative light scattering detection and charged aerosol detection for the analysis of saikosaponins, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4347–4354. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.047>.
- [90] C.-C. Bai, S.-Y. Han, X.-Y. Chai, Y. Jiang, P. Li, P.-F. Tu, Sensitive Determination of Saponins in Radix et Rhizoma Notoginseng by Charged Aerosol Detector Coupled with HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32 (2008) 242–260. <https://doi.org/10.1080/10826070802603187>.
- [91] N. Vervoort, D. Daemen, G. Török, Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1189 (2008) 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.111>.
- [92] International Conference on Harmonization, ICH Harmonized Tripartite Guideline Q3A(R2): Impurities In New Drug Substances, 2006. <http://www.ich.org> (accessed 13 October 2019).
- [93] ICH Q7: good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients, 2nd ed., Maas & Peither, GMP Publ, Schopfheim, 2012.
- [94] ICH Q8 (R2) - pharmaceutical development: Original und deutsche Übersetzung, 2nd ed., Maas & Peither GMP-Verl., Schopfheim, 2011.
- [95] Bundesministerium für Gesundheit, Bekanntmachung zu § 2 Nummer 3 der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV), 2019.

- [96] European Medicines Agency, Guideline on process validation for finished products: information and data to be provided in regulatory submissions, 2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf (accessed 15 October 2019).
- [97] Lücke, J., Bädeker, M., Hildinger, M., Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2010: Biopharmazeutika: Wirtschaftsdaten und Nutzen für Patienten mit Autoimmunerkrankungen, The Boston Consulting Group GmbH, München, 2019.
- [98] R. Takors, Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions, *J. Biotechnol.* 160 (2012) 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.010>.
- [99] M. Funke, A. Buchenauer, U. Schnakenberg, W. Mokwa, S. Diederichs, A. Mertens, C. Müller, F. Kensy, J. Büchs, Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 497–505. <https://doi.org/10.1002/bit.22825>.
- [100] S. Rameez, S.S. Mostafa, C. Miller, A.A. Shukla, High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: reproducibility, scalability, and control, *Biotechnol. Prog.* 30 (2014) 718–727. <https://doi.org/10.1002/btpr.1874>.
- [101] F.R. Schmidt, Optimization and scale up of industrial fermentation processes, *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (2005) 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>.
- [102] B.H. Junker, Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (2004) 347–364. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70218-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70218-2).
- [103] M. Al-Rubeai (Ed.), *Animal cell culture*, Springer, Cham, 2015.
- [104] A. Schmieder, *Kontinuierliche Bioprozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren*. Dissertation, München, 2016.
- [105] L.-K. Ju, G.G. Chase, Improved scale-up strategies of bioreactors, *Bioprocess Eng.* 8 (1992) 49–53. <https://doi.org/10.1007/BF00369263>.
- [106] P. Neubauer, S. Junne, Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.001>.
- [107] D.E. Brown, Industrial-scale operation of microbial processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32 (1982) 34–46. <https://doi.org/10.1002/jctb.5030320108>.

- [108] H. Chmiel, *Bioprozesstechnik*, 3rd ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [109] S.Y. Lee, High cell-density culture of *Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology* 14 (1996) 98–105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).
- [110] D. Riesenberg, R. Guthke, High-cell-density cultivation of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol* 51 (1999) 422–430. <https://doi.org/10.1007/s002530051412>.
- [111] D. Riesenberg, High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (1991) 380–384.
- [112] D. Riesenberg, V. Schulz, W.A. Knorre, H.D. Pohl, D. Korz, E.A. Sanders, A. Ross, W.D. Deckwer, High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate, *J. Biotechnol.* 20 (1991) 17–27.
- [113] L. Yee, H.W. Blanch, Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia Coli*, *Nat Biotechnol* 10 (1992) 1550–1556. <https://doi.org/10.1038/nbt1292-1550>.
- [114] S. Kleist, Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase. @Bielefeld, Univ., Diss., 2002. <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:361-1997>.
- [115] H. Märkl, C. Zenneck, A.C. Dubach, J.C. Ogonna, Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor, *Appl Microbiol Biotechnol* 39 (1993) 48–52. <https://doi.org/10.1007/bf00166847>.
- [116] D.J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E.A. Sanders, W.D. Deckwer, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 39 (1995) 59–65.
- [117] Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K., Flaschel, E., Hochzelldichtefermentation zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Gentherapie und genetische Impfung., *BIOforum* (1999) 174–177.
- [118] K. Nakano, M. Rischke, S. Sato, H. Märkl, Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor, *Appl Microbiol Biotechnol* 48 (1997) 597–601. <https://doi.org/10.1007/s002530051101>.
- [119] S.Y. Lee, H.N. Chang, High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source, *Biotechnol Lett* 15 (1993) 971–974. <https://doi.org/10.1007/BF00131766>.

- [120] G. Macaloney, J.W. Hall, M.J. Rollins, I. Draper, K.B. Anderson, J. Preston, B.G. Thompson, B. McNeil, The utility and performance of near-infra red spectroscopy in simultaneous monitoring of multiple components in a high cell density recombinant *Escherichiacoli* production process, *Bioprocess Eng.* 17 (1997) 157–167. <https://doi.org/10.1007/PL00008962>.
- [121] T. Paalme, K. Tiisma, A. Kahru, K. Vanatalu, R. Vilu, Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 312–319. <https://doi.org/10.1002/bit.260350313>.
- [122] A. Castan, S.-O. Enfors, Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*, *Bioprocess Eng.* 22 (2000) 509–515. <https://doi.org/10.1007/s004499900094>.
- [123] S. Inoue, S.L. Lin, Y.C. Lee, Y. Inoue, An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis, *Glycobiology* 11 (2001) 759–767. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.9.759>.
- [124] C.E. Galuska, J.A. Dambon, A. Kühnle, K.F. Bornhöfft, G. Prem, K. Zlatina, T. Lütteke, S.P. Galuska, Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1229. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01229>.
- [125] S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura, Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids, *Anal. Biochem.* 164 (1987) 138–145. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90377-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90377-0).
- [126] S. Inoue, Y. Inoue, A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues, *Biochimie* 83 (2001) 605–613. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01307-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01307-4).
- [127] Z. Zhou, G. Liao, S. Stepanovs, Z. Guo, Quantifying the Efficiency of N-Phenyl-D-mannosamine to Metabolically Engineer Sialic Acid on Cancer Cell Surface, *J. Carbohydr. Chem.* 33 (2014) 395–407. <https://doi.org/10.1080/07328303.2014.933483>.
- [128] D.C. Baker (Ed.), *Sialic acids*, Academic Press is an imprint of Elsevier, Cambridge, MA, 2019.
- [129] European Medicines Agency, ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, 1999. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures->

acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf (accessed 14 October 2019).

[130] D. AMINOFF, Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids, *Biochem. J.* 81 (1961) 384–392. <https://doi.org/10.1042/bj0810384>.

[131] L. WARREN, The thiobarbituric acid assay of sialic acids, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1971–1975.

[132] R. Roy, R.A. Pon, Efficient synthesis of $\alpha(2\rightarrow8)$ -linked N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid disaccharides from colominic acid, *Glycoconj. J.* 7 (1990) 3–12. <https://doi.org/10.1007/BF01050399>.

[133] B. Rode, C. Endres, C. Ran, F. Stahl, S. Beutel, C. Kasper, S. Galuska, R. Geyer, M. Mühlenhoff, R. Gerardy-Schahn, T. Scheper, Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1, *J. Biotechnol.* 135 (2008) 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.03.012>.

[134] I. Bice, H. Celik, C. Wolff, S. Beutel, M. Zahid, B. Hitzmann, U. Rinas, C. Kasper, R. Gerardy-Schahn, T. Scheper, Downstream processing of high chain length polysialic acid using membrane adsorbers and clay minerals for application in tissue engineering, *Eng. Life Sci.* 13 (2013) 140–148. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200041>.

[135] D.R. Janero, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radical Biology and Medicine* 9 (1990) 515–540. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2).

[136] S. Inagaki, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 338–342. <https://doi.org/10.1002/bmc.751>.

[137] R.W. Dixon, D.S. Peterson, Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2930–2937. <https://doi.org/10.1021/ac011208l>.

[138] R.A. Moreau, The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector, *Lipids* 41 (2006) 727–734. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5024-7>.

[139] R.W. Dixon, G. Baltzell, Determination of levoglucosan in atmospheric aerosols using high performance liquid chromatography with aerosol charge detection, *Journal of Chromatography A* 1109 (2006) 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.021>.

- [140] P. Sun, X. Wang, L. Alquier, C.A. Maryanoff, Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors, *Journal of Chromatography A* 1177 (2008) 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.035>.
- [141] A. Błazewicz, Z. Fijałek, M. Warowna-Grześkiewicz, M. Jadach, Determination of atracurium, cisatracurium and mivacurium with their impurities in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with charged aerosol detection, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1266–1272. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.025>.
- [142] A. Błazewicz, Z. Fijałek, K. Sarna, M. Warowna-Grześkiewicz, Determination of Pancuronium and Its Impurities in Pharmaceutical Preparation by LC with Charged Aerosol Detection, *Chroma* 72 (2010) 183–186. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1623-9>.
- [143] T. Vehovec, A. Obreza, Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1549–1556. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.007>.
- [144] Y. Jiang, D. Hascall, D. Li, J.H. Pease, A charged aerosol detector/chemiluminescent nitrogen detector/liquid chromatography/mass spectrometry system for regular and fragment compound analysis in drug discovery, *J. Chromatogr. A* 1411 (2015) 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.112>.
- [145] M.W. Robinson, A.P. Hill, S.A. Readshaw, J.C. Hollerton, R.J. Upton, S.M. Lynn, S.C. Besley, B.J. Boughtflower, Use of Calculated Physicochemical Properties to Enhance Quantitative Response When Using Charged Aerosol Detection, *Anal. Chem.* 89 (2017) 1772–1777. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04060>.
- [146] T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, P. Sandra, Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3186–3192. <https://doi.org/10.1021/ac060078j>.
- [147] J.P. Hutchinson, J. Li, W. Farrell, E. Groeber, R. Szucs, G. Dicoski, P.R. Haddad, Universal response model for a corona charged aerosol detector, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7418–7427. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.056>.
- [148] J. Cazes (Ed.), *Encyclopedia of chromatography*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 2010.
- [149] P. Borman, D. Elder, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures, in: A. Teasdale, D.P. Elder, R.W. Nims (Eds.), *ICH quality guidelines: An implementation guide*, Wiley, Hoboken, NJ, 2018, pp. 127–166.

- [150] D. Boßmann, B. Bartling, I. de Vries, J. Winkler, H. Neumann, F. Lammers, S. Beutel, T. Scheper, Charged aerosol detector HPLC as a characterization and quantification application of biopharmaceutically relevant polysialic acid from *E. coli* K1, *Journal of Chromatography A* 1599 (2019) 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.069>.
- [151] M.H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015.
- [152] M.C. Cheng, S.L. Lin, S.H. Wu, S. Inoue, Y. Inoue, High-performance capillary electrophoretic characterization of different types of oligo- and polysialic acid chains, *Anal. Biochem.* 260 (1998) 154–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2701>.
- [153] M. Eckardt, M. Kubicova, T.J. Simat, Universal response quantification approach using a Corona Charged Aerosol Detector (CAD) - Application on linear and cyclic oligomers extractable from polycondensate plastics polyesters, polyamides and polyarylsulfones, *J. Chromatogr. A* 1572 (2018) 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.051>.
- [154] X.-K. Liu, J.B. Fang, N. Cauchon, P. Zhou, Direct stability-indicating method development and validation for analysis of etidronate disodium using a mixed-mode column and charged aerosol detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.041>.
- [155] C. Brunelli, T. Górecki, Y. Zhao, P. Sandra, Corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2472–2482. <https://doi.org/10.1021/ac061854q>.
- [156] L.B. Rodríguez-Aparicio, A. Reglero, A.I. Ortiz, J.M. Luengo, Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium, *Appl Microbiol Biotechnol* 27 (1988) 474–483. <https://doi.org/10.1007/BF00451616>.
- [157] K. Kovárová-Kovar, T. Egli, Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 646–666.
- [158] M. Akesson, P. Hagander, J.P. Axelsson, Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding, *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001) 223–230.
- [159] A.M. Jobé, C. Herwig, M. Surzyn, B. Walker, I. Marison, U. von Stockar, Generally applicable fed-batch culture concept based on the detection of metabolic state by on-line balancing, *Biotechnol. Bioeng.* 82 (2003) 627–639. <https://doi.org/10.1002/bit.10610>.

- [160] M. Losen, B. Frölich, M. Pohl, J. Büchs, Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1062–1068. <https://doi.org/10.1021/bp034282t>.
- [161] B. Xu, M. Jahic, G. Blomsten, S.O. Enfors, Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 51 (1999) 564–571.
- [162] B. Xu, M. Jahic, S.O. Enfors, Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 81–90. <https://doi.org/10.1021/bp9801087>.
- [163] G.W. Luli, W.R. Strohl, Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1004–1011.
- [164] V. Galvanauskas, O. Grigs, J. Vanags, K. Dubencovs, V. Stepanova, Model-based optimization and pO₂ control of fed-batch *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cultivation processes, *Eng. Life Sci.* 13 (2013) 172–184. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200012>.
- [165] R. Oliveira, J.J. Clemente, A.E. Cunha, M.J.T. Carrondo, Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation, *J. Biotechnol.* 116 (2005) 35–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.09.016>.
- [166] R. Oliveira, R. Simutis, S. Fayo de Azevedo, Design of a stable adaptive controller for driving aerobic fermentation processes near maximum oxygen transfer capacity, *Journal of Process Control* 14 (2004) 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2004.01.003>.
- [167] J. Vanags, V. Hrynko, U. Viesturs, Development and application of a flexible controller in yeast fermentations using pO₂ cascade control, *Eng. Life Sci.* 10 (2010) 321–332. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900112>.
- [168] P. Jurtshuk, *Medical Microbiology: Bacterial Metabolism*, 4th ed., Galveston (TX), 1996.
- [169] B. Enjalbert, P. Millard, M. Dinclaux, J.-C. Portais, F. Létisse, Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway, *Scientific Reports* 7 42135. <https://doi.org/10.1038/srep42135>.

- [170] H.-P. Meyer, C. Leist, A. Fiechter, Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media, *J. Biotechnol.* 1 (1984) 355–358. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(84\)90027-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(84)90027-0).
- [171] S.W. Brown, H.-P. Meyer, A. Fiechter, Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat, *Appl Microbiol Biotechnol* 23 (1985) 5–9. <https://doi.org/10.1007/BF02660110>.
- [172] D.W. Zabriskie, D.A. Wareheim, M.J. Polansky, Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology* 2 (1987) 87–95. <https://doi.org/10.1007/BF01569507>.
- [173] E.M. el-Mansi, W.H. Holms, Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 2875–2883. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-11-2875>.
- [174] R.A. Majewski, M.M. Domach, Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 732–738. <https://doi.org/10.1002/bit.260350711>.
- [175] R. Eibl, S. Kaiser, R. Lombriser, D. Eibl, Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 41–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2422-9>.
- [176] P. Jonczyk, M. Takenberg, S. Hartwig, S. Beutel, R.G. Berger, T. Scheper, Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems, *J. Biotechnol.* 167 (2013) 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.018>.
- [177] M. Felo, B. Christensen, J. Higgins, Process cost and facility considerations in the selection of primary cell culture clarification technology, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 1239–1245. <https://doi.org/10.1002/btpr.1776>.
- [178] A.A. Shukla, U. Gottschalk, Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing, *Trends in Biotechnology* 31 (2013) 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.004>.
- [179] J.E. House, Decomposition of ammonium carbonate and ammonium bicarbonate and proton affinities of the anions, *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters* 16 (1980) 185–187. [https://doi.org/10.1016/0020-1650\(80\)80118-8](https://doi.org/10.1016/0020-1650(80)80118-8).
- [180] I. de Vries, S. Schreiber, D. Boßmann, Z. Hellmann, J. Kopatz, H. Neumann, S. Beutel, Single-use membrane adsorbers for endotoxin removal and purification of

endogenous polysialic acid from *Escherichia coli* K1, *Biotechnol. Rep. (Amst)* 17 (2018) 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.02.001>.

[181] F.B. Anspach, Endotoxin removal by affinity sorbents, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49 (2001) 665–681. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00228-7).

[182] P.O. Magalhães, A.M. Lopes, P.G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T.C.V. Penna, A. Pessoa, Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10 (2007) 388–404.

[183] D. Petsch, T.C. Beeskow, F.B. Anspach, W.-D. Deckwer, Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 693 (1997) 79–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00013-3).

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Chemische Struktur von A.: 5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure (Neu5Ac); B.: 5- <i>N</i> -Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc); C.: 5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure (Kdn); D.: α -2,8-verknüpfte poly-5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.....	4
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des NCAM-vermittelten Zell-Zell-Kontaktes.....	6
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des aktuellen polySia avDP20 Produktionsprozesses.....	19
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion zwischen polySia und DMB unter mild-sauren Bedingungen zur Kettenlängencharakterisierung mittels HPLC-FLD Analyse zwischen 372 nm und 456 nm.....	21
Abbildung 4-2: Messung von Referenzanalyten zur Methodenentwicklung und -validierung.	25
Abbildung 4-3: Messung von kommerziellen Referenzanalyten zur Methodencharakterisierung und -validierung.	26
Abbildung 4-4: Messung von biotechnologisch produzierter LC polySia mittels DMB-HPLC-FLD (a.) und HPLC-CAD (b.).	28
Abbildung 4-5: Kalibration von polySia avDP20 (a.) und LC polySia (b.).	30
Abbildung 4-6: Validierung der Quantifizierungsmethode mittels HPLC-CAD und Untersuchung von Referenzstandards bekannter Konzentrationen für polySia avDP20 (a.) und LC polySia (b.).	31
Abbildung 4-7: Korrelationsanalyse von TBA-Assay und HPLC-CAD zur Quantifizierung von polySia.....	32
Abbildung 5-1: Vergleich von Kultivierungsmedien zur polySia-Produktion.....	36
Abbildung 5-2: Vergleichende Darstellung von exemplarischen Kultivierungen im Satzbetrieb in unterschiedlichen Maßstäben.....	40
Abbildung 5-3: Darstellung der Rührkesselreaktor-Kultivierungen im pO_2 -kontrolliertem Zulaufbetrieb in Doppelbestimmung (A. und B.).....	43
Abbildung 5-4: Darstellung der Kultivierung im 25 L Einweg-Beutelreaktor.....	47
Abbildung 6-1: Ermittelte Ausbeuten zum Downstream-Verfahren zur Aufreinigung von LC polySia.	52
Abbildung 7-1: Chromatogramme der vergleichenden thermischen Hydrolyse von Colominsäure (a.) und LC polySia (b.) bei einer Temperatur von 65 °C.....	56
Abbildung 7-2: Charakterisierung des zeitlichen, thermischen Zerfalls von Colominsäure und LC polySia bei 65 °C durch Detektion des maximalen Polymerisationsgrades mittels HPLC-CAD in Dreifachbestimmung.....	57

Abbildung 7-3: Charakterisierung des zeitlichen, thermischen Zerfalls von LC polySia bei 90 °C durch Detektion des maximalen Polymerisationsgrades mittels HPLC-CAD in Dreifachbestimmung.	58
Abbildung 7-4: ¹ H-NMR-Spektren zur Molekülstrukturanalyse von LC polySia unter verschiedenen Hydrolysebedingungen.....	59
Abbildung 7-5: ¹³ C-NMR-Spektren zur Molekülstrukturanalyse von LC polySia unter verschiedenen Hydrolysebedingungen.....	60
Abbildung 7-6: Charakterisierung des 10 %-Stufengradienten zur Membranadsorber-basierten Fraktionierung niedermolekularer polySia mittels HPLC-CAD.....	62
Abbildung 7-7: Charakterisierung des 2 %-Stufengradienten zur Membranadsorber-basierten Fraktionierung niedermolekularer polySia mittels HPLC-CAD.....	64
Abbildung 7-8: Charakterisierung des optimierten Stufengradienten zur gezielten Isolierung von polySia avDP20 mittels HPLC-CAD.....	66
Abbildung 9-1: Schematische Darstellung der pO ₂ -kontrollierten Zulaufstrategie zur Hochzelldichtekultivierung.....	85

12 Betreute Abschlussarbeiten

Bachelorarbeit: Sarah Deckelmann (2017): Produktion und Aufreinigung niedermolekularer Polysialinsäure.

Masterarbeit: Johanna Sophie Rehfeld (2019): Entwicklung und Charakterisierung eines chromatographischen Verfahrens zur Produktion niedermolekularer Polysialinsäure (Teile der Arbeit wurden in Kapitel 7 verwendet).

13 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Fachartikel (chronologisch, peer-reviewed)

- Bartling, B. (85 %), Rehfeld, J.S. (5 %), **Boßmann, D. (5 %)**, Vries, I., Fohrer, J., Lammers, F., Scheper, T., Beutel, S. (5 %) (2020): Determination of the Structural Integrity and Stability of Polysialic Acid during Alkaline and Thermal Treatment, *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules25010165> (Short Communication)
- **Boßmann, D. (85 %)**, Bartling, B. (5 %), de Vries, I. (5 %), Winkler, J., Neumann, H., Lammers, F., Beutel, S., Scheper, T. (5 %) (2019): Charged aerosol detector HPLC as a characterization and quantification application of biopharmaceutically relevant polysialic acid from *E. coli* K1, *J. Chromatogr. A*, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.069> (Research Article)
- de Vries, I. (60 %), Schreiber, S. (30 %), **Boßmann, D. (5 %)**, Hellmann, Z., Kopatz, J., Neumann, H., Beutel, S. (5 %) (2018): Single-use membrane adsorbents for endotoxin removal and purification of endogenous polysialic acid from *Escherichia coli* K1. *Biotechnology Reports*, 17, 110–116, DOI: 10.1016/j.btre.2018.02.001 (Research Article)

Tabelle 13-1: Verantwortungsbereiche der Autoren.

Verantwortungsbereiche an der Publikation						
Autoren	Konzept	experimentelles Arbeiten	Methodik	Verfassen des Manuskripts	Korrekturen der Revisionen und Editionen	Projekt-administration
Bartling, B.	a	a, b	a, b	a	a	
Boßmann, D.	a, b, c	a, b, c	a, b, c,	b	b	
Beutel, S.					a, b, c	a, b, c
Fohrer, J.		a	a			
Hellmann, Z.		c	c	c		
Kopatz, J.					c	
Lammers, F.				a, b	a, b	
Neumann, H.					b, c	
Rehfeld, J.		a	a	a		
Scheper, T.					a, b, c	
Schreiber, S.	c	c	c	c	c	
de Vries, I.	c	b, c	b, c	c	c	
Winkler, J.				b	b	

- a** Charged aerosol detector HPLC as a characterization and quantification application of biopharmaceutically relevant polysialic acid from *E. coli* K1
- b** Determination of the Structural Integrity and Stability of Polysialic Acid during Alkaline and Thermal Treatment

- c** Single-use membrane adsorbers for endotoxin removal and purification of endogenous polysialic acid from *Escherichia coli* K1

Konferenzbeiträge (chronologisch)

- Winkler, J., Rabe, A., Chhatbar, C., Shahraz, A., **Boßmann, D.**, Bartling, B., Beutel, S., Scheper, T., Prinz, M., Neumann, H. (2019): Anti-inflammatory effects of human-identical low molecular weight polysialic acid in experimental autoimmune encephalomyelitis, ImmunoSensation Cluster Science Days (Poster)

- **Boßmann, D.**, et al. (2018): Auslegung eines biopharmazeutischen Produktionsprozesses zur Herstellung von Polysialinsäure mittels Single-Use-Technologie, Chem. Ing. Tech., 9, 1248 – 1292, DOI: 10.1002/cite.201855311 (Poster)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Boßmann
Geburtsdatum, -ort: 11.01.1988 in Kleve
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung und Studium

seit 08/2016 **Leibniz Universität Hannover,**
Institut für Technische Chemie
Promotion in der Bioprozesstechnik, Prof. Dr. Scheper

10/2013 – 07/2016 **RWTH Aachen**
Studium der Molekularen und Angewandten Biotechnologie
(M.Sc.), Schwerpunkt: Verfahrenstechnik

10/2009 – 09/2013 **Fachhochschule Aachen,** Standort Jülich
Studium der Biotechnologie (B.Sc.)

09/2005 – 07/2008 **Erftgymnasium,** Bergheim
Abschluss Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse Biologie und Deutsch