

# Analytische Verfahren bei der biotechnologischen Produktion niedermolekularer Polysialinsäure

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von

Bastian Bartling, M. Sc. RWTH

[2021]

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

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

Tag der Promotion: 02.03.2021

*„Doch manche Dinge kann man nicht durch Nachdenken ergründen,  
man muss sie erfahren.“*

Michael Ende (1929 – 1995)

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Scheper** bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat, meine Dissertation am Institut für Technische Chemie anzufertigen. Ein besonderer Dank gilt auch **PD Dr. Sascha Beutel** für die fachliche Unterstützung und die gebotenen Möglichkeiten mich auch außerhalb des Projektes weiterzubilden. Die Bearbeitung des Themas hat mir immer sehr viel Freude bereitet. **PD Dr. Ulrich Krings** möchte ich für die Bereiterklärung zur Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ebenfalls möchte ich **Prof. Dr. Harald Neumann** von der Universität Bonn für die vielen Ratschläge und spannenden Zusammenarbeit bedanken. Herr **Dr. Florian Taft** von der Sartorius AG danke ich für die Bereitstellung von einigen Adsorber-Prototypen, die ich im Rahmen dieser Arbeit verwenden durfte. Auch **Dr. Jörg Fohrer** gilt ein großes Dankeschön für die Durchführung wichtiger NMR-Analysen.

Insbesondere möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn**, **Dr. Timm Fiebig** und **Dr. Christa Litschko** vom Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover für die großartige Kooperation und die Bereitstellung der rekombinanten Produktionsstämme bedanken. Die Zusammenarbeit und der wissenschaftliche Austausch haben mir sehr viel Spaß und Freude bereitet.

**Friedbert Gellermann** und **Thorsten Stempel** danke ich für ihren Humor und ihre Bereitschaft immer da zu helfen, wo es nötig ist. Ich bedanke mich ebenfalls bei **Martin Pähler** und **Martina Weiß**, die mir bei der Beschaffung von Labormaterialien und Durchführung einiger experimenteller Laborarbeiten zur Seite standen. Vor allem **Martina** gilt dabei ein spezieller Dank für ihre Geduld und ihre zahlreichen Tipps und Hilfe, auch wenn die Zeit es nicht immer zugelassen hätte. Auch ohne die Unterstützung von **Thorleif Hentrop**, **Kai Patzer**, **Cornelia Alic**, **Christiane Hellwig** und **Ulrike Dreschel** wäre die Arbeit am Institut nicht immer so problemlos verlaufen. Ein großer Dank gilt **Dr. Christian Ude** für seine Kreativität und die etwas eigene Herangehensweise, um kleine und große Fragestellungen innerhalb und außerhalb des Technikums zu beantworten.

Bei **Dr. Daniel Boßmann** und **Johanna Sophie Rehfeld** möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Kultivierungen und die Diskussion verschiedener Fragestellungen bedanken. Mein Dank gilt auch meiner Masterandin **Nora Carola Brüchle**, die mich und meine Arbeit mit großem Interesse und Engagement unterstützt hat.

---

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen weiteren **Mitarbeitern, Kollegen und Mitdoktoranden** bedanken, die dazu beigetragen haben, dass eine so großartige und unverwechselbare Atmosphäre am Institut herrschte. Ohne euch wäre die Zeit, die ich am Institut verbracht habe, nicht so großartig und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich werde mich immer gerne zurück erinnern.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem **Büro 165** danken. Vielen Dank an **Lena, Chantal, Katharina** und **Alina**, dass ihr mich damals so herzlich aufgenommen habt. Ein ebenso großer Dank gilt auch **Steffen, Lina, Sina** und **Jan** für die großartige Unterstützung und die lustige Büroatmosphäre.

Außerdem möchte ich all **meinen Freunden** und insbesondere **meiner Band** für all die lustigen und besonderen Momente danken, die wir schon erlebt haben.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern **Reinhard und Annegret Bartling** sowie meinem Bruder **Jannis Bartling** danken, die mir den Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht und mich in jeder Situation mit Rat und Tat unterstützt haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Frau **Ines Bartling**, die mir auch in schwierigsten Phasen immer wieder neuen Mut gegeben hat und mich aufgebaut hat, wenn es mal nicht so lief. Ich bin sehr froh, dass ich immer auf dich zählen kann und dass es dich gibt!

---

## Kurzfassung

Polysialinsäure (polySia) ist ein lineares Homopolymer aus  $\alpha$ 2,8- oder  $\alpha$ 2,9-verknüpften Monomeren der negativ geladenen *N*-Acetylneuraminsäure, das meist auf der äußeren Zellmembran bestimmter humanpathogener Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) K1 vorkommt. Darüber hinaus existiert die  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Form auch im zentralen Nervensystem des Menschen. Das Polymer ist aufgrund seiner biologischen Eigenschaften und Funktionen ein vielversprechendes Molekül zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD). Als potenzielles Arzneimittel unterliegen die Herstellung und Produktqualität den behördlichen Vorgaben des Good Manufacturing Practice (GMP). Daher wird polySia für gewöhnlich durch Kultivierung von *E. coli* K1 in vorsterilisierten Einweg-Beutelreaktoren produziert. Anschließend wird das Polymer unter Verwendung verschiedener Einweg-Prozesselemente wie Filtern und Membranadsorber in hochreiner Form aus dem Kulturüberstand gewonnen.

In dieser Arbeit wurde zunächst die konventionelle polySia-Produktion in *E. coli* K1 mit einem rekombinanten Ansatz in nicht-pathogenen *E. coli* BL21-Produktionsstämmen verglichen. Im Kulturüberstand des Wildtyps waren polySia-Konzentrationen von bis zu 774 ( $\pm$ 18) mg/L nachweisbar. In rekombinanten Produktionsstämmen konnten dagegen nur maximal 133 mg/L erreicht werden. Im Anschluss wurden prozessbedingte Verunreinigungen wie zelleigene Proteine (HCPs), DNA und Endotoxine über einen etablierten Reinigungsprozess entfernt, so dass 4,5 ( $\pm$ 0,5) g reine polySia aus einer 25 L *E. coli* K1-Kultur gewonnen wurden. Dies entspricht einer Ausbeute von 29 ( $\pm$ 5) %. Die Ausbeuten aus den Kulturüberständen der rekombinanten Produktionsstämme lagen mit 8 % - 15 % deutlich niedriger. Die hohen Endotoxinkonzentrationen im Kulturüberstand können während der Reinigung durch eine alkalische Lyse auf  $< 5$  EU/mg<sub>polySia</sub> reduziert werden. Um polySia produktschonender zu reinigen, wurde u. a. die hydrophobe Interaktionschromatographie zur Entfernung von HCPs und Endotoxinen getestet. Die Analyse des Endproduktes mittels HPLC-Analytik und NMR-Spektroskopie bewies, dass keine der verwendeten Methoden das Produkt schädigte. Aus der reinen polySia (Polymerisationsgrad: DP > 90) konnte anschließend pharmazeutisch relevante polySia (DP 21  $\pm$  4) über Thermolyse gewonnen werden.

**Schlüsselwörter:** Polysialinsäure, Bioprozesstechnik, Strukturintegrität, *Escherichia coli*, Good manufacturing practice, Membranadsorber

---

## Abstract

Polysialic acid (polySia) is a linear homopolymer of  $\alpha$ 2,8- or  $\alpha$ 2,9-linked monomers of the negatively charged *N*-acetylneuraminic acid, which exists mostly on the outer cell membrane of certain human pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*) K1. In addition, the  $\alpha$ 2,8-linked form also exists in the human central nervous system. Due to its biological properties and functions, the polymer is a promising molecule for the treatment of neurodegenerative diseases like age-related macular degeneration. As a potential drug, its manufacture and product quality must comply with the official guidelines of Good Manufacturing Practice (GMP). Therefore, polySia is usually produced by cultivation of *E. coli* K1 in pre-sterilized disposable bag reactors. Subsequently, the polymer is recovered in high-purity form from the culture supernatant using disposable process elements such as membrane adsorbers.

In this study, the conventional polySia production using *E. coli* K1 was first compared with a recombinant approach in non-pathogenic *E. coli* BL21 production strains. During the cultivation of *E. coli* K1 polySia concentrations of up to 774 ( $\pm$ 18) mg/L in the culture supernatant were determined. In recombinant production strains, however, only a maximum of 133 mg/L could be achieved. Subsequently, process-related impurities such as host cell proteins (HCPs), DNA and endotoxins were removed by an established purification process, so that 4.5 ( $\pm$  0.5) g pure polySia were recovered from a 25 L *E. coli* K1 culture. This corresponds to a yield of 29 ( $\pm$  5) %. Yield from the culture supernatants of the recombinant production strains significantly lower at 8 % - 15 %. The high endotoxin concentrations in the culture supernatant can be reduced to  $< 5$  EU/mg<sub>polySia</sub> by alkaline lysis. To purify polySia more gently, hydrophobic interaction chromatography was tested to remove HCPs and endotoxins. The analysis of the final product by means of HPLC analysis and NMR spectroscopy demonstrated successfully that none of the applied methods induces structural changes in the polymer. From pure polySia (degree of polymerization: DP > 90) pharmaceutically relevant polySia (DP 21  $\pm$  4) could then be obtained by thermolysis.

**Keywords:** Polysialic acid, Bioprocess engineering, Structural integrity, *Escherichia coli*, Good manufacturing practice, Membrane adsorber

---

# Inhaltsverzeichnis

Zitat .....	IV
Danksagung .....	VI
Kurzfassung .....	IVI
Abstract .....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IXI
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
Tabellenverzeichnis .....	XIII
1 Einleitung .....	1
2 Zielsetzung .....	2
3 Theoretische Grundlagen .....	3
3.1 Polysialinsäure – ein bakterielles Kapselpolymer .....	3
3.1.1 Bakterielle Kapselpolymere .....	3
3.1.2 Struktureller Aufbau von Polysialinsäure.....	4
3.1.3 Genetische Organisation und Biosynthese .....	5
3.1.4 Die Rolle der Polysialyltransferasen.....	9
3.2 Biopharmazeutische Bedeutung und Produktion von polySia .....	10
3.2.1 Technische Applikationsfelder für polySia .....	10
3.2.2 Biotechnologische Produktion in Bakterien.....	11
3.2.3 Isolation und Reinigung.....	12
3.3 Qualitätsmanagement und Produktsicherheit biologischer Wirkstoffe.....	14
3.3.1 Richtlinien und Vorgaben der „guten Herstellungspraxis“ .....	14
3.3.2 Strukturelle Integrität von biologischen Substanzen .....	15
3.3.3 Verwendung von nicht-pathogenen Bakterien.....	16



---

4	Experimentelle Arbeiten .....	18
4.1	Kultivierungsarbeiten.....	19
4.1.1	Optimierung der Anzucht der Vorkulturen im Schüttelkolben .....	19
4.1.2	Kultivierungsarbeiten im 2 L-Glasrührkessel .....	20
4.1.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 .....	20
4.1.2.2	Kultivierung von rekombinanten <i>E. coli</i> BL21 .....	22
4.1.3	Vergleich der 2 L-batch-Kultivierungen der verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämme ....	23
4.1.4	Kultivierungsarbeiten im 25 L-Einweg-Beutelreaktor .....	24
4.1.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 .....	25
4.1.4.2	Kultivierung von rekombinanten <i>E. coli</i> BL21 .....	26
4.1.5	Vergleich der Kultivierungen im Einweg-Beutelreaktor.....	28
4.1.6	Zusammenfassung der Kultivierungsarbeiten .....	29
4.2	Etablierte Aufreinigung von bakterieller Polysialinsäure.....	30
4.2.1	Herstellung von langkettiger endogener polySia aus <i>E. coli</i> K1.....	31
4.2.2	Reinigungsprozess für langkettige polySia aus rekombinanten <i>E. coli</i> BL21 ...	33
4.2.3	Thermische Hydrolyse im Prozessmaßstab .....	34
4.3	Entwicklung einer neuen Aufreinigungsstrategie für langkettige polySia .....	36
4.3.1	Optimierung der Crossflow-Ultrafiltration.....	37
4.3.2	Entfernung von proteinogenen Verunreinigungen.....	37
4.3.2.1	Ammoniumsulfatfällung .....	38
4.3.2.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	40
4.3.2.3	Salztolerante Anionenaustauscher.....	43
4.3.3	Entfernung von Endotoxinen.....	46
4.3.3.1	Alkalische Lyse .....	46
4.3.3.2	Applikation von Endotoxin-spezifischen Affinitätsäulen .....	47
4.3.3.3	HIC-Membranadsorber zur Endotoxinanreicherung.....	48

---

4.3.5	Zusammenfassung der Aufreinigung von polySia.....	49
4.4	Produktanalytik.....	50
4.4.1	Produktreinheit.....	50
4.4.1.1	Protein- und DNA-Analytik.....	50
4.4.1.2	Endotoxinanalytik.....	51
4.4.2	Produktcharakterisierung.....	52
4.4.2.1	Bestimmung der Kettenlängen der verschiedenen polySia Produkte .....	52
4.4.2.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie der heterologen polySia .....	53
4.4.3	Analytik zur Strukturintegrität .....	55
4.4.3.1	Bestimmung der Kettenlänge.....	55
4.4.3.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie nach alkalischer Lyse.....	57
4.4.3.3	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie nach alkalischer Lyse.....	58
4.4.4	Analytik zur intramolekularen Thermostabilität .....	59
4.4.4.1	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie nach Thermolyse .....	59
4.4.4.2	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie nach Thermolyse .....	60
4.4.5	Zusammenfassung der Produktanalytik.....	61
5	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	62
6	Material und Methoden .....	67
6.1	Material .....	67
6.2	Methoden .....	73
	Literaturverzeichnis .....	87
	Liste der Publikationen .....	96
	Lebenslauf .....	98

---

## Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustauschchromatographie
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AMWHV	Arznei- und Wirkstoffherstellungsverordnung
avDP20	Average degree of polymerization 20
BOM	Basis of mobility
BTM	Biotrockenmasse
CMP	Cytidin-Monophosphat
CV	Column volume (Säulenvolumen)
DMB	4,5-Methyldioxy-1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	Gehalt an gelöstem Sauerstoff
DP	Degree of polymerisation (Polymerisationsgrad)
EMA	European Medicine Agency
EPS	Exopolysaccharid
EU	Endotoxin units
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Fru-6-P	Fructose-6-Phosphat
GlcNAc-1-P	<i>N</i> -Acetylglucosamin-1-phosphat
GlcN-6-P	Glucosamin-6-Phosphat
GMP	Good manufacturing practice (gute Herstellungspraxis)
GT	Glycosyltransferase
HCDC	Hochzelldichtekultivierung
HCP	Host cell protein
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
KDN	2-Keto-3-desoxyonulonsäure
$k_{La}$	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient
<i>kps</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese-Genkomplex
KPS	Kapselpolysaccharid
LAL	<i>Limulus Amebocyten</i> Lysat
LB	Lysogeny broth

---

LPS	Lipopolysaccharid
ManNAc	Mannose- <i>N</i> -Acetat
MWCO	Molecular Weight Cutoff (Molekulargewichtsgrenze)
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NCAM	Neuronales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
<i>NmB</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe B
<i>NmC</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe C
NMR	Kernresonanzspektroskopie
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Open reading frame
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
polySia	Polysialinsäure
poly-ST	Polysialyltransferase
Rpm	Revolutions per minute
RPM	Rounds per minute
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
Sia	Sialinsäure
SIGLEC	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
ST	Sialyltransferase
STR	Stirred tank reactor (Rührkesselreaktor)
TBA	2-Thiobarbitursäure
TMD	Transmembrandomäne
UDP	Uridin-Diphosphat
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin
UV	Ultraviolett
μ <sub>max</sub>	Maximale spezifische Wachstumsrate
Y <sub>P/S</sub>	Ausbeutekoeffizient Produkt/Substrat
Y <sub>P/X</sub>	Ausbeutekoeffizient Produkt/Biomasse
Y <sub>X/S</sub>	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat

---

---

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure. ....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Molekularstrukturen von polySia.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kapselbiosyntheseegenclusters aus <i>E. coli</i> K1 .....	6
Abbildung 4: Darstellung der Biosynthese und Assemblierung von polySia in <i>E. coli</i> K1 .....	8
Abbildung 5: Pathomechanismus der trockenen altersbedingten Makuladegeneration und Wirkungsmechanismus der polySia .....	11
Abbildung 6: Struktur eines bakteriellen Lipopolysaccharides .....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der $\delta$ -laktionisierten Form von $\alpha$ 2,8-polySia. ....	15
Abbildung 8: Linearisierte Darstellung der genetischen Organisation der verwendeten Plasmide .....	17
Abbildung 9: Zeitverlauf einer typischen batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 im 2 L-STR.....	21
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 pKT774 im 2 L-STR .....	22
Abbildung 11: Zeitlicher Zeitverlauf einer typischen batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 im 25 L-Einweg-Beutelreaktor.....	25
Abbildung 12: Zeitverlauf der batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 pKT274 im 25 L Einweg Beutelreaktor.....	26
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE im 25 L-Einweg-Beutelreaktor .....	27
Abbildung 14: Schematische Darstellung des etablierten Produktionsprozesses für bakterielle polySia.....	30
Abbildung 15: Ausbeuten des Reinigungsprozesses von langkettiger polySia aus <i>E. coli</i> K1 .....	32
Abbildung 16: Ausbeuten des Reinigungsprozesses von langkettiger $\alpha$ 2,8-polySia aus <i>E. coli</i> BL21 mit dem Plasmid pKT774.....	33
Abbildung 17: Ausbeuten der polySia bei verschiedenen Sättigungsgraden von Ammoniumsulfat.....	39
Abbildung 18: Chromatogramm des HIC-Membranadsorbers für polySia .....	40
Abbildung 19: Evaluierung des HIC-Membranadsorbers für BSA .....	41

---

Abbildung 20: Durchbruchskurven von BSA des Sartobind® Phenyl bei verschiedenen Salz-Konzentrationen.....	42
Abbildung 21: Validierung des STIC-Membranadsorbers für polySia in KPP-Puffer .....	44
Abbildung 22: Validierung des Sartobind® STIC-Membranadsorbers für BSA in KPP-Puffer.....	45
Abbildung 23: Chromatogramme zur Charakterisierung der maximalen Kettenlängen von polySia .....	53
Abbildung 24: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der hergestellten polySia aus den verschiedenen Produktionsstämmen .....	54
Abbildung 25: Vergleich der maximalen Kettenlängen von polySia mit und ohne NaOH-Behandlung.....	56
Abbildung 26: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren zur Analyse der Strukturintegrität der polySia.....	57
Abbildung 27: <sup>13</sup> C-NMR-Spektren zur Analyse der Strukturintegrität der polySia.....	58
Abbildung 28: Vergleich der <sup>1</sup> H-NMR-Spektren von hochmolekularer und niedermolekularer α2,8-polySia.....	59
Abbildung 29: Vergleich der <sup>13</sup> C-NMR-Spektren von hochmolekularer und niedermolekularer α2,8-polySia.....	60

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Vorkulturbedingungen der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.....	20
Tabelle 2: Vergleich der batch-Kultivierungen der verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämme im 2 L-STR. ....	24
Tabelle 3: Vergleich der batch-Kultivierungen der verschiedenen <i>E. coli</i> Stämme im 25 L-CultiBag.....	28
Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse der prozesstechnischen Fraktionierung von kurzkettiger polySia. ....	35
Tabelle 5: Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	67
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Hersteller.....	69
Tabelle 7: Bakterielle Stämme mit relevanten Charakteristika und Quelle.....	71
Tabelle 8: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	71
Tabelle 9: Zusammensetzung des definierten Mediums nach Korz <i>et al.</i> [82].....	72
Tabelle 10: Antibiotika-Stammlösungen.....	72
Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen der LB-Vorkulturen.....	73
Tabelle 12: Kultivierungsbedingungen der Vorkulturen auf definiertem Medium.....	74
Tabelle 13: Zusammensetzung der Oxidationslösung.....	77
Tabelle 14: Zusammensetzung der Reduktionslösung.....	77
Tabelle 15: Zusammensetzung der TBA-Lösung.....	77
Tabelle 16: Mengen an Ammoniumsulfat zur Einstellung bestimmter Sättigungsgrade bei 20°C.....	79
Tabelle 17: Pufferzusammensetzung des Sartobind® Phenyl Membranadsorbers.....	80
Tabelle 18: Pufferzusammensetzung des Sartobind® STIC Membranadsorbers.....	81
Tabelle 19: Verwendete Puffer zur Applikation der Affinitätssäulen.....	83
Tabelle 20: Elutionsgradient zur Isolation kurzkettiger polySia in 3 Stufen nach [48].....	84
Tabelle 21: Zusammensetzung der DMB-Reagenzlösung.....	85
Tabelle 22: Gradientenprofil der DMB-HPLC.....	85

---

# 1 Einleitung

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes hat sich die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland geborener Menschen seit den 80er Jahren unabhängig vom Geschlecht um knapp 10 Jahre erhöht. Dies ist vor allem auf verbesserte Hygienebedingungen, eine bewusstere Lebensweise und Ernährung sowie generelle Fortschritte in der Medizin zurückzuführen. Aufgrund der allgemeinen Lebenszeitverlängerung unserer Gesellschaft ist gleichzeitig auch der Anteil von Menschen mit chronischen oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder altersbedingter Makuladegeneration deutlich angestiegen. Letzteres gilt dabei als häufigste Ursache für stark beeinträchtigende Sehstörungen im Alter in den westlichen Industrieländern. In Deutschland sind 3,5 Millionen, vorwiegend ältere Menschen ab 65 Jahren, von dieser Krankheit betroffen.

Aufgrund des demografischen Wandels sind neue Therapieansätze gegen solche neurodegenerativen Krankheiten erforderlich. Nach neuesten Erkenntnissen können die biochemischen Reaktionen, die altersbedingte Makuladegeneration auslösen, mit Hilfe einer speziellen körpereigenen Zuckerverbindung, der Polysialinsäure, reguliert werden. Um das therapeutische Potenzial dieses Polymers als neue Wirkstoffklasse zu validieren, müssen ausreichende Mengen von Polysialinsäure entsprechend den behördlichen Vorgaben produziert und die Wirkung und Dosierung charakterisiert werden.

Für die Produktion des Polymers könnten neben humanpathogenen Bakterien wie *Escherichia coli* K1 auch Laborsicherheitsstämme wie *Escherichia coli* BL21 verwendet werden, die bereits seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich zur Produktion rekombinanter Enzyme eingesetzt werden. Für die Kultivierung wird die Verwendung von welleninduzierten Einweg-Bioreaktoren gegenüber konventionellen Rührkesseln favorisiert, da diese Systeme die Übertragung des Prozesses in eine GMP-konforme Produktionsumgebung erleichtern. Für die anschließende Reinigung nach den Auflagen der pharmazeutischen Industrie gewinnt die Verwendung von chromatographische Einweg-Elementen zur Entfernung prozessbedingter Verunreinigungen gegenüber konventionellen Fällungsmethoden immer mehr an Bedeutung. Diese Module sind in der pharmazeutischen Industrie weitgehend akzeptiert und erleichtern daher die Herstellung eines qualitativ hochwertigen Produktes mit hohem Reinheitsgrad.



---

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit umfasst die Weiterentwicklung der biotechnologischen Herstellung von bakterieller polySia. In diesem Zusammenhang sollen die gesetzlichen Richtlinien und Vorgaben für Arzneimittel und Wirkstoffkandidaten sowie deren Produktion berücksichtigt werden. Um eine großtechnische Kultivierung humanpathogener Bakterien zu vermeiden, soll die konventionelle Produktion von hochmolekularer polySia in *E. coli* K1 mit einem rekombinanten Ansatz in nicht-pathogenen *E. coli* BL21-Produktionsstämmen verglichen werden. Neben der humanidentischen  $\alpha$ 2,8-verknüpften Form soll so auch die ausschließlich von *Neisseria meningitidis* Serotyp C gebildete  $\alpha$ 2,9-polySia produziert werden. Die Kultivierung der verschiedenen Stämme soll unter Hochzelldichtebedingungen in einem konventionellen Rührkessel und einem welleninduzierten Einweg-Beutelreaktor durchgeführt werden. Nach der Aufreinigung der Polymere aus dem Kulturüberstand über einen etablierten Reinigungsprozess sollen kritische Qualitätsmerkmale wie der Polymerisationsgrad und das glykosidische Verknüpfungsmuster mittels verschiedener Analysemethoden untersucht und miteinander verglichen werden. Die gereinigte polySia soll weiterhin verwendet werden, um neue Methoden zur Entfernung prozessbedingter Verunreinigungen wie zelleigene Proteine oder Endotoxine zu untersuchen. Kritische Prozessschritte in der Herstellung, wie die alkalische Lyse oder die Verwendung von adsorbierenden Tonmineralien, sollen so ersetzt und die GMP-Konformität des Gesamtprozesses sichergestellt werden. In diesem Zusammenhang soll auch genauer untersucht werden, ob die zur Reduktion hoher Endotoxinkonzentrationen verwendete NaOH-Behandlung hydrolytische Spaltungen der Polymerketten oder chemische Modifikationen einzelner Monomere hervorruft. Zur Produktion der pharmazeutisch relevanten niedermolekularen polySia soll die hergestellte hochmolekulare polySia thermolytisch gespalten werden.

---

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Polysialinsäure – ein bakterielles Kapselpolymer

#### 3.1.1 Bakterielle Kapselpolymere

Viele Bakterien produzieren eine große Anzahl unterschiedlicher Polysaccharide auf der äußeren Zellmembran. Diese Polysaccharide lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Die erste Gruppe der Exopolysaccharide (EPS) ist meist ohne feste Bindung an der Zelloberfläche fixiert und wird als Schleim an die Umgebung abgegeben [1–3]. Polysaccharide der zweiten Gruppe werden als Kapselpolysaccharide (KPS) bezeichnet. Dabei handelt es sich um Polymere, die meist über eine kovalente Bindung an Phospholipide an der äußeren Zellmembran verankert sind [2–4]. Einige Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimieren eine dicke Schicht aus KPS mit hoher Molekularmasse (>100 kDa) [5]. Diese Matrix umhüllt die Zellen vollständig und wird als Kapsel oder Glykokalyx bezeichnet [6, 7]. Als äußerste Oberfläche des Bakteriums definieren Kapseln die Interaktionen der Zellen mit der näheren Umgebung [8, 9]. KPS sind stark hydratisiert und besitzen einen Wasseranteil von bis zu 95 %. Die wasserbindende Eigenschaft verhindert die Austrocknung der Zellen [10].

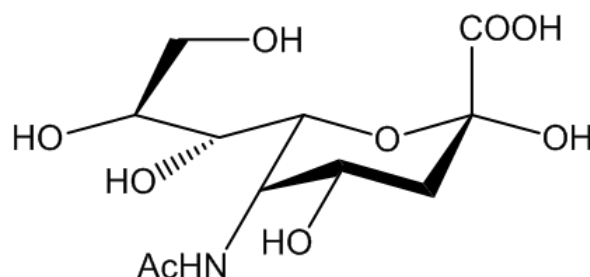
Darüber hinaus sind Kapseln bzw. KPS wichtige Virulenzfaktoren (K-Antigene) [6]. Sie bestimmen den Serotyp von Bakterien und maskieren die darunter liegenden Oberflächenmoleküle. Einige pathogene *E. coli* Stämme können dadurch sogar die Blut-Hirn-Schranke überwinden und eine Meningitis (Hirnhautentzündung) auslösen. Andere Vertreter werden mit Sepsis oder schweren Harnwegsinfektionen in Verbindung gebracht [11, 12]. Als Antigene verleihen Kapseln den Zellen Resistenz gegenüber der natürlichen Immunabwehr eines Wirtes und verhindern komplement-vermittelte Lyse und Phagozytose [13]. Zusätzlich schützen Kapseln die Zellen vor Antibiotika [2], invasiven Bakterien [14] oder Bakteriophagen [12]. Bakterielle Kapseln zeichnen sich durch eine große strukturelle Diversität ihrer jeweiligen KPS aus. Bis heute sind allein mehr als 80 strukturell unterschiedliche K-Antigene in *E. coli* bekannt, die auf Basis ihrer physikalischen, genetischen und biochemischen Eigenschaften in vier Gruppen unterteilt werden [8];

K-Antigene der Gruppe 1 (u. a. K30), Gruppe 3 (u. a. K10) und Gruppe 4 (u. a. K40) werden temperaturunabhängig exprimiert. Gruppe 1 und 4 K-Antigene sind im Gegensatz zu Gruppe 3 K-Antigenen sogar thermostabil. Im Vergleich zu Gruppe 1 K-Antigenen sind die Kapselstrukturen von K-Antigenen der Gruppe 4 vielfältiger und unterscheiden sich durch die Anwesenheit von Acetaminosacchariden in den Wiederholungseinheiten [8]. Die mit Abstand größte Gruppe stellen jedoch die K-Antigene der Gruppe 2 (u. a. K5, K12 und K92) dar.

Sie werden wie die K-Antigene der Gruppe 3 zusammen mit O-Antigenen exprimiert und sind ebenfalls sehr thermolabil [8]. Die Gruppe 2 K-Antigene unterscheiden sich auch von allen anderen Gruppen durch eine thermoregulierte Genexpression. So können Gruppe 2 Kapseln nur bei Temperaturen über 20 °C synthetisiert werden [8, 15]. Im Vergleich zu K-Antigenen der Gruppe 1 besitzen die K-Antigene der Gruppe 2 geringere Molekulargewichte und eine größere Ladungsdichte an negativ geladenen Monomeren [8, 16]. Dieser Gruppe wird auch das K1-Antigen von *E. coli* zugeordnet, welches unter dem Synonym Polysialinsäure bekannt und Gegenstand dieser Arbeit ist.

### 3.1.2 Struktureller Aufbau von Polysialinsäure

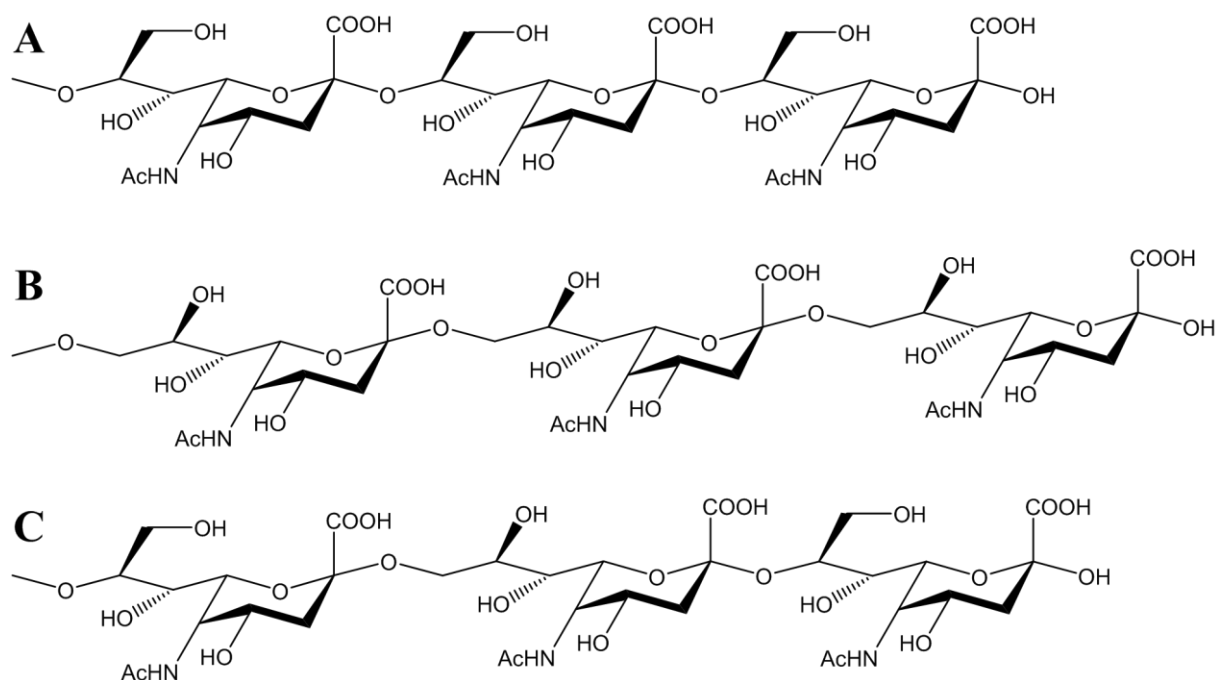
Die Bezeichnung Polysialinsäure (polySia) beschreibt lineare Homopolymere die aus Monomeren der Sialinsäure (Sia) aufgebaut sind und der Naturstoffklasse der Saccharide zugeordnet werden. Sia ist ein Derivat der Neuraminsäure, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht. Das Molekül ist eine relativ starke Säure ( $pK_s \sim 2,6$ ) und aufgrund des vorhandenen Carboxylrestes am C<sub>1</sub>-Atom negativ geladen [7]. Sia weisen eine bemerkenswerte strukturelle Diversität auf. Die größten strukturellen Variationen in der Natur vorkommender Sia liegen am C<sub>5</sub>-Atom. Die dort vorhandene Amino-Funktion kann durch Phosphorylierung, Sulfonierung und/oder Methylierung modifiziert werden, wodurch eine Stofffamilie mit über 50 natürlichen vorkommenden Varianten entstanden ist [17, 18].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Struktur von *N*-Acetylneuraminsäure.

In biologischen Systemen kommen vor allem *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 2-Keto-3-desoxyonulonsäure (KDN) vor. Das am häufigsten in der Natur vorkommende Mitglied aus der Gruppe der Sialinsäuren ist jedoch *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (Abbildung 1) [19]. Diese Variante trägt eine acetylierte Aminogruppe. PolySia entsteht in dem die einzelnen Neu5Ac-Monomere über eine glykosidische Bindung miteinander verknüpft werden. Hierbei gibt es weitere Variationen, die zu Unterschieden in den chemischen, strukturellen und immunologischen Eigenschaften der polySia-Ketten führen [20, 21]. Die bekannteste Form der

polySia wird als Kapsel von *E. coli* K1 synthetisiert und besteht aus  $\alpha$ 2,8-glykosidisch verknüpfter Neu5Ac (Abbildung 2A). Identische Kapseln wurden ebenfalls in *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) Serogruppe B (*NmB*), *Moraxella nonliquefaciens* und *Mannheimia haemolytica* nachgewiesen [13]. Dagegen synthetisiert *N. meningitidis* Serogruppe C (*NmC*) polySia mit  $\alpha$ 2,9-Verknüpfung (Abbildung 2B) [21]. In *E. coli* K92 wurde eine alternierende  $\alpha$ 2,8/ $\alpha$ 2,9-Verknüpfung (Abbildung 2C) zwischen den einzelnen Neu5Ac-Monomeren nachgewiesen [13]. Natürlich vorkommende polySia unterscheidet sich nicht nur in der Art der Bindung, sondern auch im Polymerisationsgrad (DP). Die Ketten von polySia können eine Länge von bis zu 400 verknüpften Monomereinheiten (DP ~400) erreichen [22].



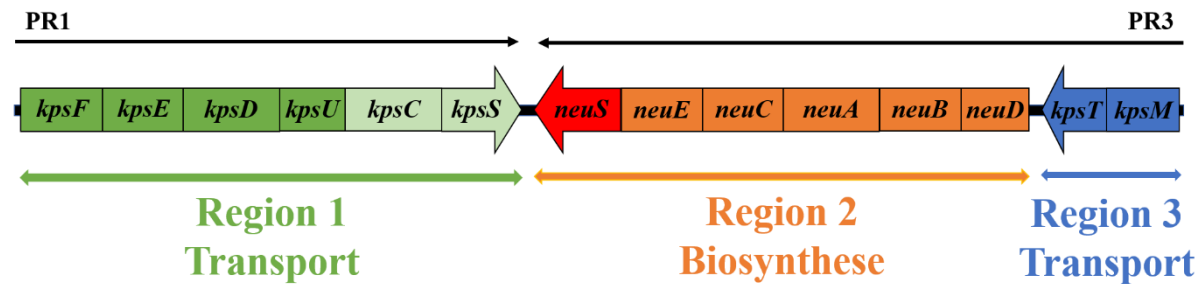
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Molekularstrukturen von polySia. *E. coli* K1 und *NmB* synthetisieren  $\alpha$ 2,8-verknüpfte polySia (A). In *NmC* wurde polySia mit  $\alpha$ 2,9-verknüpften Monomeren (B) nachgewiesen, während in *E. coli* K92 eine Form mit  $\alpha$ 2,8/ $\alpha$ 2,9-alternierendem Verknüpfungsmuster (C) existiert.

### 3.1.3 Genetische Organisation und Biosynthese

Die Gene zur bakteriellen Kapselpolymer Synthese sind oft innerhalb eines Clusters im Genom des jeweiligen Produktionsorganismus organisiert. Vor allem *E. coli* wird als Modellorganismus genutzt, um die Biosynthese und Funktion bakterieller Kapseln zu untersuchen [23, 24]. Da das Kapselbiosynthesecluster aus *E. coli* K1 mit am besten erforscht ist, soll anhand dieses Beispiels die genetische Organisation erklärt werden.

PolySia wird wie alle Gruppe 2 K-Antigene von Proteinen synthetisiert, die über den *kps* (Kapselpolysaccharid-Synthese)-Genkomplex codiert werden (Abbildung 3). Dieser Genkomplex ist an der Biosynthese, Modifikation und dem Export der polySia-Ketten

beteiligt [25]. Genkomplexe verschiedener Gruppe 2 K-Antigene besitzen eine konservierte Struktur und bestehen aus drei funktionellen Regionen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Kapselbiosyntheseclusters aus *E. coli* K1. Die Gene der Kapselbiosynthese und der ABC-abhängigen Translokation der fertigen polySia sind als orangene bzw. blaue Boxen dargestellt. Die grünen Gene sind ebenfalls am Transport beteiligt, in dem sie ein terminales Phospholipid synthetisieren (dunkelgrün) oder den Transfer vermitteln (hellgrün) [5]. Die schwarzen Pfeile indizieren die Richtung der Transkription [24].

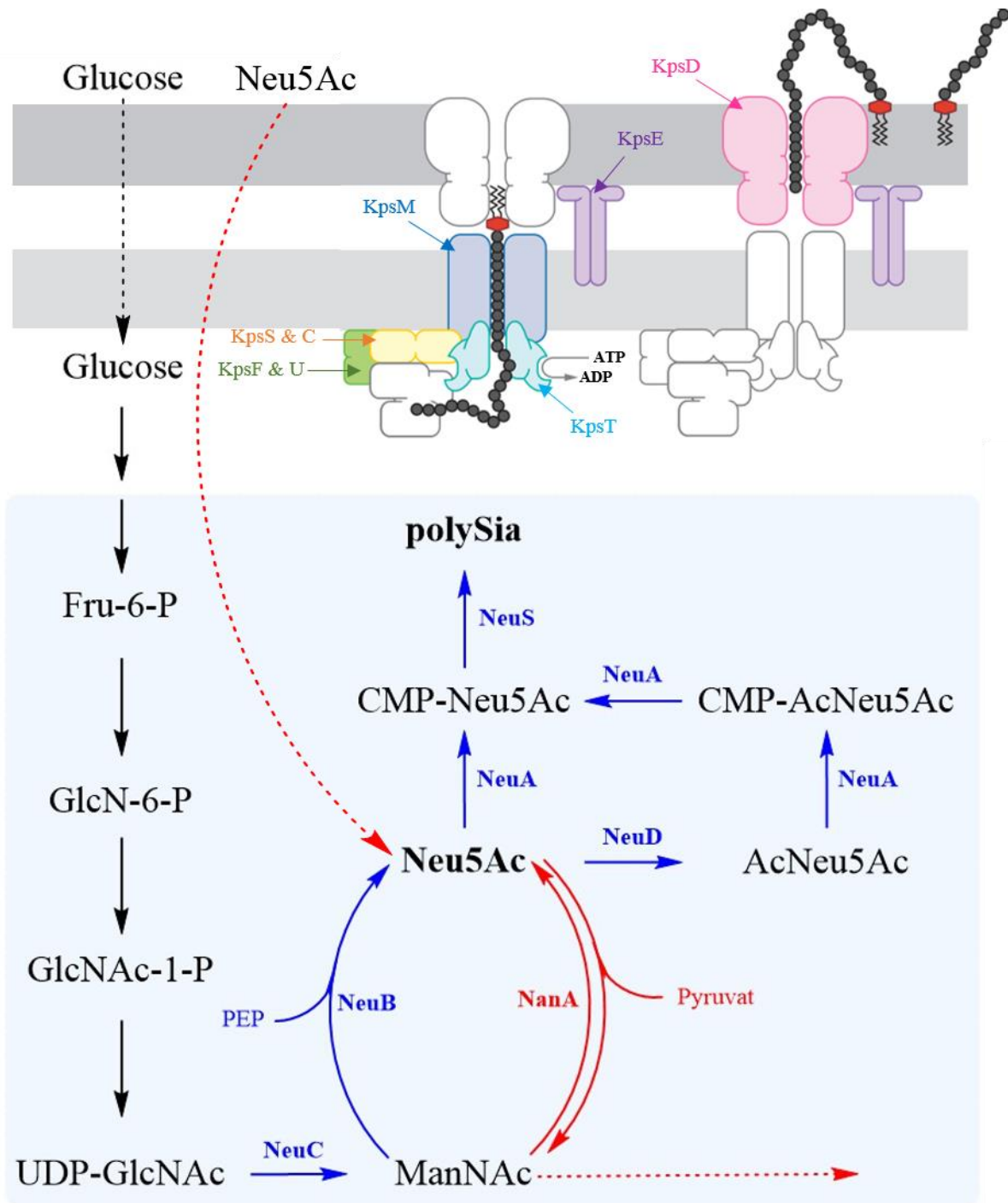
Die zentrale Region 2 enthält die *neu*-Gene und bestimmt den Serotyp des jeweiligen Bakteriums. In *E. coli* K1 werden hier Enzyme codiert, die zur Kapselbiosynthese benötigt werden und die Polymerisation von Neu5Ac katalysieren [16, 24]. Sie sind für die Zusammensetzung der Kapseln verantwortlich. Die flankierenden Regionen 1 und 3 codieren für Proteine des Polysaccharidtransportes (Abbildung 3). Die aus der Region 1 des *kps*-Genclusters codierten Enzyme setzen einen Glykolipid-Vorläufer zusammen, der an der Polymerisation beteiligt ist. Die fertige polySia wird per Translokation über einen ABC (ATP-Binding Cassette)-Transporter-abhängigen Exportkomplex aus dem Zytoplasma auf die Zelloberfläche gebracht (Abbildung 4) [26]. ABC-Transportsysteme ermöglichen einen aktiven ATP-vermittelten Transport biologischer Stoffe und besitzen zwei identische Transmembran-(TMD) und Nukleotid-bindende (NBD) Domänen [14]. Die konservierten Gene der Region 1 und 3 sind übertragbar und können zwischen *E. coli* Stämmen mit Gruppe 2 Kapseln transferiert werden [23].

Bakterien wie *E. coli* K1 können zwei unterschiedliche Wege nutzen, um polySia aus einzelnen Neu5Ac-Monomeren zu synthetisieren. Erstens ist *E. coli* K1 in der Lage freies Neu5Ac aus der näheren Umgebung über den spezifischen Sialinsäuretransporter NanT aufzunehmen [24]. Die genetische Information dieses Transporters ist gemeinsam mit fünf weiteren Genen im *nan*-Cluster lokalisiert. Hier werden die Enzyme des Sia-Katabolismus in *E. coli* K1 codiert. Das Bakterium kann so freie Sia auch als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen. Das Gen *nanA* codiert für eine Sialinsäurealdolase, welche intrazelluläres Neu5Ac in Mannose-*N*-Acetat (ManNAc) und Pyruvat spaltet (Abbildung 4). Es ist jedoch nicht aufgeklärt, ob das Enzym die Reaktion in beide Richtungen katalysiert [24]. ManNAc kann über weitere enzymatische

Reaktionen der zellulären Energiegewinnung oder Zellwandsynthese zur Verfügung gestellt werden.

Zweitens kann *E. coli* K1 bei Abwesenheit von freien Sialinsäuren in der näheren Umgebung Neu5Ac über *de novo* Synthese aus Glucose generieren. Dafür wird Glucose zunächst über die Zellmembran aufgenommen und u. a. über Fructose-6-phosphat (Fru-6-P) und Glucosamin-6-phosphat (GlcN-6-P) in *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat (GlcNAc-1-P) umgewandelt [27]. Durch den Transfer von Uridin-Diphosphat (UDP) wird GlcNAc-1-P in UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) konvertiert, welches anschließend über die Epimerase NeuC in ManNAc umgewandelt wird (Abbildung 4). Dieser Schritt ist die Umkehrreaktion der Sia-Aldolase NanA aus dem Sia-Katabolismus. ManNAc ist ein essenzielles Edukt von Neu5Ac [25, 28, 29]. Die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu ManNAc ist der erste wesentliche Schritt in der Biosynthese von Sia. Die Neu5Ac-Synthetase NeuB kondensiert anschließend ManNAc und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Neu5Ac [16].

Für die Polymerisation der einzelnen Neu5Ac-Moleküle ist die Polysialyltransferase NeuS verantwortlich. Dafür müssen freie Sialinsäuren zunächst aktiviert werden, indem sie mit Cytidin-Monophosphat (CMP) verknüpft werden. Dieser essenzielle Schritt wird von dem *neuA*-Produkt katalysiert. NeuA ist ein bifunktionales Enzym aus N-terminaler CMP-Neu5Ac Synthetase und C-terminaler Esterase [24]. Die CMP-Neu5Ac Synthetase katalysiert die Aktivierung von Neu5Ac zu CMP-Neu5Ac, dem Edukt aller bekannten Sialyltransferasen [25]. Vor der Aktivierung kann Neu5Ac über die Acetyltransferase NeuD auch an den Positionen 7 und 9 acetyliert werden (Abbildung 4). Die Esterase von NeuA konvertiert O-acetyliertes CMP-Neu5Ac wieder in die deacetylierte Form, so dass nur geringe Mengen von O-acetyliertem CMP-Neu5Ac in Polymere eingebaut werden [30]. Die genaue Funktion des *neuE*-Produktes ist noch nicht bekannt. Es könnte als Initiator für die polySia-Biosynthese dienen, indem es zum Beispiel Sialinsäure auf einen Lipidakzeptor transferiert.



**Abbildung 4:** Darstellung der Biosynthese und Assemblierung von polySia in *E. coli* K1. Neu5Ac kann aus Glucose synthetisiert oder aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden. Die blauen Pfeile stellen die Routen des Metabolismus für polySia aus dem *kps*-Cluster dar, während die roten Pfeile anabolische Pfade (*nan*-Cluster) zeigen; in Anlehnung an [25]. Das fertige Polymer wird anschließend über einen ABC-Transporter (KpsM und KpsT) auf die Zelloberfläche exportiert; in Anlehnung an [8].

Das fertige Produkt wird anschließend über einen ABC-Transporter aus dem Zytoplasma an die Zelloberfläche gebracht. In *E. coli* K1 besteht der ABC-Transporter aus zwei Dimeren des Nukleotidbindungsproteins KpsT (NBD), die mit dem Membranprotein KpsM (TMD) assoziiert sind. Um die Translokation der polySia aus dem Zytoplasma an die innere

Zellmembran zu ermöglichen, werden zusätzlich die Polysaccharid-Co-Polymerase (PCP-3) KpsE als inneres und KpsD als äußeres Membranpolysaccharid-(OPX)-Protein benötigt [17, 25]. Die Gene *kpsC* und *kpsS* codieren  $\beta$ -KDN-Transferasen, die an der Biosynthese eines Glykolipids beteiligt sind. Da nachgewiesen wurde, dass zum Export von polySia ausschließlich ein ABC-Transporter-abhängiger Weg genutzt wird, scheint dieser Poly-KDN-Linker als Initiator zur Translokation von Kapselpolysacchariden zu dienen und für die Anheftung an die Zelloberfläche verantwortlich zu sein [26]. Die Produkte von *kpsF* und *kpsU* sind Homologe zu Enzymen in Meningokokken, die an der Synthese von CMP-KDN im Lipopolysaccharid (LPS)-Metabolismus beteiligt sind. In *E. coli* ist die Funktion noch nicht eindeutig bestimmt. Aufgrund der Homologie wird vermutet, dass die Enzyme bei der Verknüpfung von KPS mit dem Lipidteil der Kapsel beteiligt sind [24].

### 3.1.4 Die Rolle der Polysialyltransferasen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, übernehmen Sialyltransferasen (STs) eine wichtige Schlüsselfunktion bei der Synthese von Sia-haltigen Polymeren und Glykokonjugaten. Die Enzyme katalysieren die Übertragung eines Sia-Restes von der aktivierten CMP-Form auf das nicht reduzierende Ende der wachsenden polySia-Kette [14]. STs lassen sich basierend auf den von ihnen gebildeten Verknüpfungen unterteilen [19]. In Bakterien wurden drei unterschiedliche Polysialyltransferasen (poly-STs) charakterisiert. Die aus *neuS* in *E. coli* K1 und *synD* in *NmB* codierten poly-STs bilden polySia mit  $\alpha$ 2,8-glykosidischer Bindungen, während die aus *synE* in *NmC* codierte poly-ST  $\alpha$ 2,9-verknüpfte polySia bildet. Eine dritte Variante mit alternierender  $\alpha$ 2,8/ $\alpha$ 2,9-Verknüpfung wird aus dem *neuS*-Gen in *E. coli* K92 codiert [14, 19].

Alle bisher bekannten STs wurden in der Carbohydrate Active enzymes (CAZy) Datenbank in verschiedene Glycosyltransferase (GT)-Familien gruppiert [31]. Die Unterteilung basiert auf der Homologie in den Proteinsequenzen. Die oben erwähnten bakteriellen poly-STs bilden die GT38-Familie. Die CAZy-Klassifikation verdeutlicht Unterschiede in der Sequenz, die wahrscheinlich auch in Strukturunterschieden zwischen verschiedenen poly-STs resultieren. So stimmt die Sequenz der *NmC* poly-ST nur zu ungefähr 30 % mit *NeuS* aus *E. coli* K1 überein, obwohl das Produkt der Enzyme identisch ist [16]. Dagegen haben die poly-STs aus *NmB* und *NmC* eine vergleichsweise hohe Sequenzähnlichkeit (75 %) und -identität (64 %), verknüpfen ihre Produkte aber unterschiedlich [32]. Im Allgemeinen weisen bakterielle poly-STs nur eine Sequenzidentität von maximal 33 % auf, obwohl die erzeugten Kapseln chemisch identisch sein können [17].

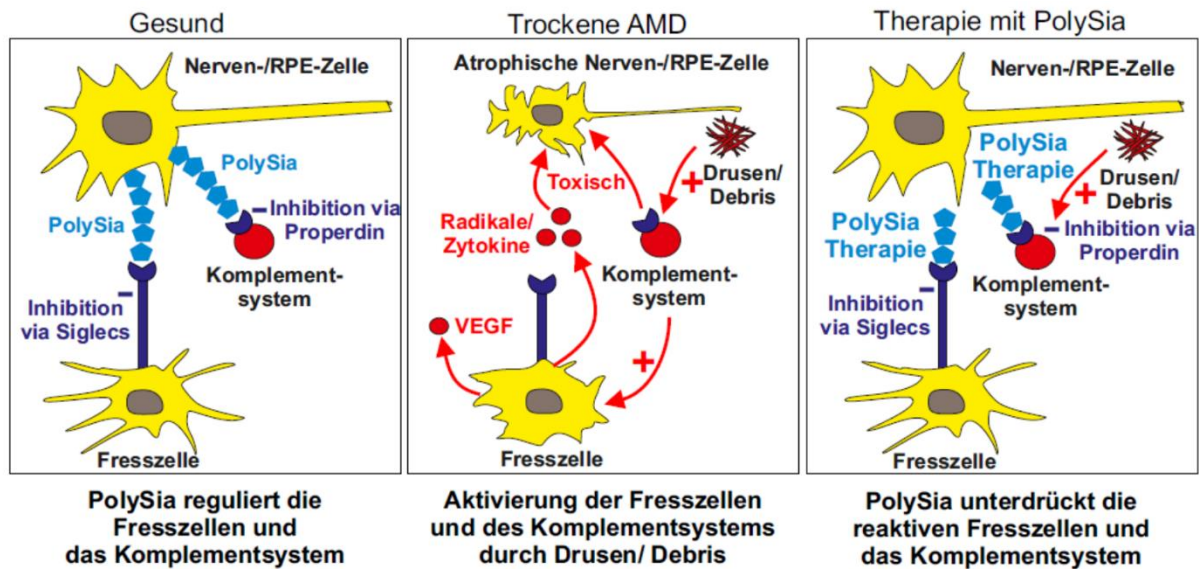


## 3.2 Biopharmazeutische Bedeutung und Produktion von polySia

### 3.2.1 Technische Applikationsfelder für polySia

Neben Prokaryoten wurde polySia auch bereits in höheren Wirbeltieren nachgewiesen. Im Menschen kommt ausschließlich die  $\alpha$ 2,8-homopolymere Form als posttranslationale Modifikation einiger weniger Glykoproteine vor [7]. Das bekannteste Beispiel ist das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) [33], welches u. a. die neuronale Plastizität, d. h. die Eigenart von Nervenzellen sich zwecks Prozessoptimierung in ihrer Anatomie zu verändern, beeinflusst [22, 34]. Darüber hinaus wurde  $\alpha$ 2,8-polySia auch in der Muttermilch oder in Natriummembrankanälen nachgewiesen und ist mit bösartigem Tumorwachstum und Metastasierung assoziiert [35–38]. Lange Zeit beschränkten sich die Erkenntnisse über die Funktion von polySia auf die Regulierung von Zell-Zell-Kontakten während der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Neuere Studien zeigen, dass sowohl lösliche als auch proteingebundene polySia wesentliche Funktionen bei der Kontrolle von Immunreaktionen übernehmen. Beispielsweise wirkt polySia entzündungshemmend auf Makrophagen und Mikroglia (Immunzellen des zentralen Nervensystems) durch Beeinträchtigung der Komplement-vermittelten Immunantwort [39–41].

Aufgrund dieser vielfältigen biologischen Funktionen, ist polySia für ein breites Feld biotechnologischer und medizinischer Applikationen von großem Interesse. Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen können die Funktionen von polySia jedoch stark vom individuellen Polymerisationsgrad abhängen. PolySia mit einer minimalen Kettenlänge von DP12 oder DP17 kann die Wirkung neurologischer Faktoren wie Neurotrophin, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren regulieren. Dabei kommt es zur Bildung spezifischer Komplexe [33, 42]. Eine bedeutende Erkenntnis ist die Wirksamkeit von polySia zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie trockener altersbedingter Makuladegeneration (AMD). Bei dieser Krankheit kommt es zu einer fehlgeleiteten Aktivierung von Makrophagen durch das Komplementsystem, woraus ein Verlust der Sehfähigkeiten resultiert. Die Fresszellen setzen reaktive Sauerstoffradikale frei, obwohl keine pathogenen Mikroben in der näheren Umgebung vorhanden sind (Abbildung 5). Diese wirken auch auf gesunde Zellen der Netzhaut toxisch und können Gewebestrukturen zerstören. In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass polySia mit einem durchschnittlichen DP von 20 (avDP20) Potenzial für einen Therapieansatz zur Behandlung der trockenen AMD bietet. PolySia avDP20 bindet an den SIGLEC11-Rezeptor der Fresszellen und unterdrückt so die Freisetzung der toxischen Radikale. Weiter kann polySia avDP20 an den Komplementregulator Properdin binden und die Aktivierung des Komplementsystems verhindern [40, 43].



**Abbildung 5:** Pathomechanismus der trockenen altersbedingten Makuladegeneration (AMD) und Wirkungsmechanismus der polySia; in Anlehnung an [43]. Polysialinsäuren intakter Zellen werden vom SIGLEC-11-Rezeptor fehlgeleiteter Fresszellen erkannt und schützen somit gesunde Zellen vor Komplement-vermittelter Schädigung.

Langkettige polySia ( $DP > 130$ ) ist vor allem für Applikationen im Tissue Engineering interessant. Aufgrund der guten Biokompatibilität kann polySia das Nervenzellenwachstum in Hydrogelen unterstützen [18, 44]. Weiterhin kann polySia kurzlebige Proteinwirkstoffe wie den Gerinnungsfaktor VIII stabilisieren [45]. Die Modifikation verbessert die Pharmakokinetik durch eine Erhöhung der Kreislauf-Halbwertszeit [46]. Abschließend bietet polySia Potenzial als Impfstoff gegen Meningokokken oder einen Behandlungsansatz in der Krebsimmuntherapie [17, 47].

### 3.2.2 Biotechnologische Produktion in Bakterien

In den letzten Jahren wurde eine Reihe an Strategien erprobt, um die polySia-Produktion zu intensivieren. Dabei wurden auch verschiedene Ansätze der chemischen und enzymatischen Synthese verfolgt. Allerdings erzielten diese Ansätze trotz hohem Zeitaufwand und Kosten nur geringe Ausbeuten [48]. Aus diesem Grund wird vor allem die biotechnologische Herstellung mittels bakterieller Stämme in Bioreaktoren von der Forschung favorisiert.

Gewöhnlicherweise wird polySia biotechnologisch durch Kultivierung von Bakterien wie *E. coli* K1 oder *N. meningitidis* produziert [49, 50]. Unter Verwendung von konventionellen Rührkesselreaktoren (stirred tank reactor; STR) für die großtechnische Produktion werden moderate Ausbeuten von 0,28 – 0,37 g/L im Kulturüberstand von *E. coli* K1 erzielt [49, 51]. Als Hauptsubstrate dienen hauptsächlich Glucose (C-Quelle) und Ammoniumsulfat

(N-Quelle). Neben konventionellen Rührkesselreaktoren wurde auch ein Prozess mit einem Einweg-Beutelreaktor validiert [52]. In diesem System erfolgt die Durchmischung und Sauerstoffversorgung der Zellen durch wechselseitiges Kippen und Kopfraumbegasung. Durch den damit verbundenen reduzierten Scherstress werden polySia-Konzentrationen von 0,25 – 0,3 g/L im Kulturüberstand erreicht [52, 53]. Höhere Ausbeuten von 0,95 – 1,35 g/L können durch Verwendung von D-Xylose mit einer proteinogenen Stickstoffquelle (L-Asparagin oder L-Prolin) erzielt werden. Allerdings erhöht die Verwendung dieser Medienbestandteile die Produktionskosten erheblich und ist deshalb unökonomisch für den Industriemaßstab [49, 54].

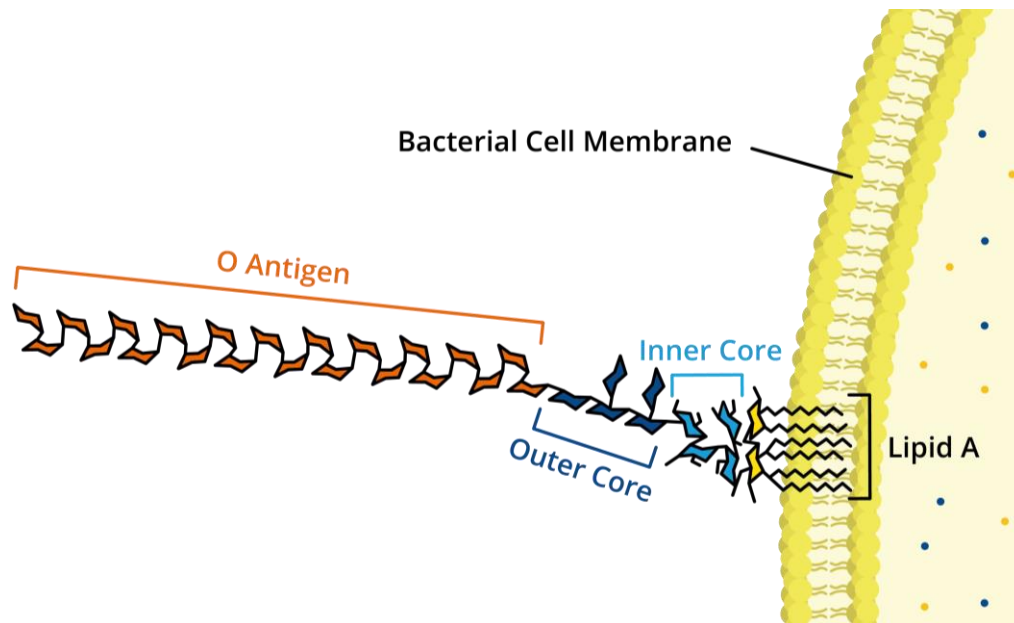
Als bakterielles Oberflächenpolymer hängen die erzielten Produktausbeuten von polySia nachweislich von den erreichten Zelldichten ab. In jüngsten Arbeiten wurde ein Prozess zur Hochzelldichtekultivierung für *E. coli* K1 etabliert [48]. Durch gezielte Erhöhung der produzierten Biomasse konnte auch die Produktausbeute gesteigert werden. Die Verwendung eines definierten Minimalmediums zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* erhöhte die finale Konzentration von polySia im STR auf 0,89 g/L. Bei einer Hochzelldichtekultivierung im welleninduzierten Beutelreaktor betrug die finale polySia-Konzentration ca. 0,6 g/L [48]. Weiterhin konnte die wirtschaftliche Effizienz gegenüber konventionellen Medien aufgrund höherer Wachstumsraten gesteigert werden.

### 3.2.3 Isolation und Reinigung

Um polySia als Biomaterial verfügbar zu machen, muss das Polymer nach der Produktion isoliert und gereinigt werden. Die Isolation erfolgt meist aus dem Kulturüberstand, um den Grad an Verunreinigungen möglichst gering zu halten. Die meisten beschriebenen Prozesse für polySia nutzen Filtrationstechniken oder organische Fällungen z. B. mit Ethanol, um prozessbedingte Verunreinigungen wie Wirtszellproteine (host cell proteins; HCPs) und DNA sowie Medienbestandteile zu entfernen [49, 55, 56]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Applikation chromatographischer Methoden z. B. der Ionenaustauschchromatographie (IEX), der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) oder der Affinitätschromatographie (AC) [53]. Mit diesen Methoden können Moleküle basierend auf Unterschieden z. B. in der Größe, Ladung oder Affinität voneinander getrennt werden. Bei mikrobiellen Produktionsstämmen wie *E. coli* ist es außerdem essenziell Endotoxine zu entfernen.

Endotoxine gehören zur Gruppe der Lipopolysaccharide (LPS) und werden von Gram-negativen Bakterien ähnlich wie polySia als Bestandteile der Zellmembran synthetisiert. Sie besitzen eine komplexe, heterogene Struktur und setzen sich aus drei unterschiedlichen

Bestandteilen zusammen: ein hydrophobes Lipid A, das sogenannte Kernoligosaccharid und ein hydrophiles Heteropolysaccharid (O-Antigen) (Abbildung 6) [57, 58]. Trotz Verankerung in der Zellwand des Bakteriums werden sie kontinuierlich in die Umgebung freigesetzt.



**Abbildung 6:** Struktur eines bakteriellen Lipopolysaccharides. Die unterschiedlichen Domänen sind in unterschiedlichen Farben (orange, blau und gelb) dargestellt; in Anlehnung an [59].

Für die Pharmaindustrie und den Gesundheitssektor stellt die Anwesenheit von Endotoxinen während des Produktionsprozesses eine große Herausforderung dar. Hohe Konzentrationen von Endotoxinen können Schockreaktionen oder Organversagen hervorrufen und unter Umständen zum Tod führen [60]. Endotoxine sind ähnlich wie polySia negativ geladen und besitzen ein vergleichbares Molekulargewicht. Daher ist die Reduktion hoher Endotoxin-Konzentrationen in der Kulturbrühe eine besondere Herausforderung für eine pharmazeutischen Herstellung von polySia [61]. Durch Implementierung verschiedener Trenntechniken wurde ein Prozess für hochreine, langkettige polySia validiert [62]. Proteinogene Verunreinigungen und DNA werden effizient über Crossflow-Ultrafiltration, Ethanol-fällung und Adsorption an Tonmineralien entfernt. Die Implementierung einer alkalischen Hydrolyse mit anschließender Fraktionierung über einen Anionenaustauscher reduziert den Endotoxingehalt auf ein akzeptables Niveau für pharmazeutische Anwendungen (Größenordnung: < 5 EU/mL) [53]. Als Wirkstoffkandidat ist jedoch nur polySia avDP20 von Bedeutung. Durch Inkubation der langkettigen polySia bei hohen Temperaturen (65 °C) zerfällt das Polymer unspezifisch in kleinere Fragmente, die mit einem Anionenaustauscher fraktioniert werden. Die Elution der Zielfraktion ist über einen Salzgradienten möglich [61, 63]. Die eingetragenen Salze werden abschließend über eine Diafiltration entfernt.

### **3.3 Qualitätsmanagement und Produktsicherheit biologischer Wirkstoffe**

#### **3.3.1 Richtlinien und Vorgaben der „guten Herstellungspraxis“**

Bei Arzneimitteln handelt es sich um Produkte, die sich schon in kleinsten Mengen unmittelbar auf den gesundheitlichen Zustand eines Menschen auswirken. Die Herstellung von Arzneimitteln wie Antibiotika, Hormonen oder Krebsmedikamenten und die Entwicklung neuer Wirkstoffe wie polySia avDP20 muss aus diesem Grund entsprechend sachgerecht durch pharmazeutische Hersteller und Gesundheitsunternehmen erfolgen. Nur so kann eine gleichbleibende Qualität und die Sicherheit biologischer Produkte nach dem Gebot des Patientenschutzes sichergestellt werden [64].

Zur Gewährleistung und Einhaltung eines solchen internationalen Qualitätsstandards werden klinische Präparate und Wirkstoffe sowie Kosmetika nach der „guten Herstellungspraxis“ (Good Manufacturing Practice; GMP) produziert. Dies sind behördliche Vorgaben, die konkrete Anforderungen an die Produktion und die Qualitätskontrolle von Wirkstoffen und Arzneimitteln stellen. Im europäischen Raum basieren diese gesetzlichen Vorgaben auf der Richtlinie 2003/94/EG [65]. Die Einhaltung der entsprechenden Normen wird von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency; EMA) überwacht. Darüber hinaus wird die Anwendung von GMP bei der Herstellung von Arzneistoffen in Deutschland durch die Arznei- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) reguliert [66].

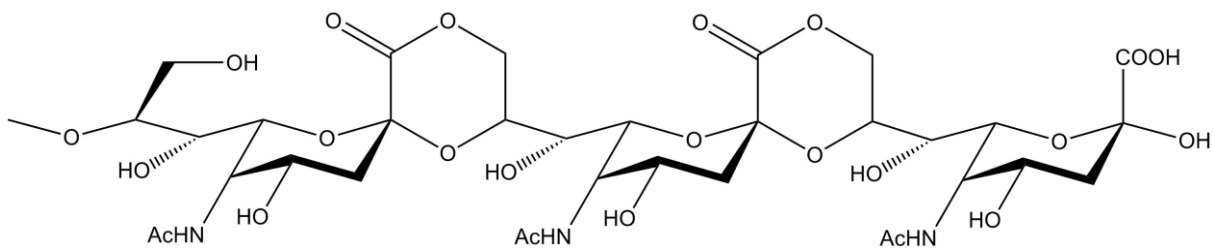
Der gesamte Herstellungsprozess eines Wirkstoffes muss zunächst validiert werden. Bei einer Validierung wird ein dokumentierter Beweis erbracht, dass ein pharmazeutischer Prozess unter gleichbleibenden Prozessbedingungen ein Produkt mit zuvor spezifizierten Anforderungen liefert [53, 63]. Alle Arbeitsschritte sowie die Reinigung und Sterilisation der Bioreaktoren müssen bei einer Validierung detailliert dokumentiert werden. Da dieser Aufwand zwar essenziell aber sehr zeit- und kostenintensiv ist, bietet sich hier die Verwendung von zertifizierten Einweg-Prozesselementen in der pharmazeutischen Produktion an [67, 68]. Zur Kultivierung von Bakterien können Einweg-Reaktoren verwendet werden, die eine einfache Handhabung erlauben. Bei der Produktreinigung können skalierbare Einweg-Filter und Membranadsorber mit spezifischen Liganden verwendet werden. Solche Einweg-Prozesselemente sind in der GMP-konformen Produktion akzeptiert. Die Qualitätskontrolle dieser Materialien ist bereits durch die Hersteller erfolgt, so dass aufwändige Präparations- und Evaluierungsschritte entfallen [53, 69].

Nur wenn die GMP-konforme Produktion gewährleistet ist, erhält ein Pharmazeutikum die Genehmigung der zuständigen Zulassungsbehörde für die Durchführung einer klinischen Studie. Dort wird in mehreren Phasen die Unbedenklichkeit eines Wirkstoffes an menschlichen Probanden getestet bevor er bei erfolgreicher Durchführung die Zulassung erhält [64, 70].

### 3.3.2 Strukturelle Integrität von biologischen Substanzen

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Biokonjugate für Biomaterialoberflächen von beispielsweise Implantaten ist es sehr wichtig, die strukturelle Integrität und Stabilität der verwendeten Biomoleküle sicherzustellen. Die strukturelle Integrität gewährleistet, dass Biomoleküle ihre spezifische Funktion korrekt ausführen können. Proteine adsorbieren aufgrund regionaler Eigenschaften in der Aminosäuresequenz an funktionelle Gruppen von Trägermaterialien und verlieren dabei gegebenenfalls ihre native Struktur [71]. In diesem Fall verliert das Protein auch seine biologische Aktivität und wird unbrauchbar.

Zucker wie Sia liegen in wässrigen Lösungen gewöhnlicherweise als ringförmige Pyranosen oder Furanosen vor. Unter bestimmten Bedingungen können diese Ringe sich jedoch öffnen und neue Polymerformen gebildet werden. In früheren Studien wurde bereits eine erhöhte Empfindlichkeit für polySia gegenüber sauren Bedingungen nachgewiesen. Niedrige pH-Werte begünstigen die interne  $\delta$ -Laktonisierung von polySia (Abbildung 7). Dabei assoziieren die Carboxylgruppe und die benachbarte Hydroxygruppe des C<sub>9</sub>-Atoms zu einem stabilen sechsköpfigen Ring [72, 73]. Durch diese Veränderungen der intramolekularen Struktur verliert das Molekül seine biologische Aktivität und natürlich Immunogenität.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der  $\delta$ -laktonisierten Form von  $\alpha$ 2,8-polySia.

Ein Verlust der biologischen Strukturintegrität von Kohlenhydraten kann ebenfalls durch chemische Modifikationen hervorgerufen werden. Durch Oxidation oder Reduktion können die zyklische Ringstruktur geöffnet oder funktionelle Gruppen partiell abgespalten werden. Solche Veränderungen können unter Umständen die Interaktionen der Polymere mit Antikörpern oder Rezeptoren einschränken. Ein bedeutendes Beispiel ist die technische Herstellung des Polymers Chitosan, welches zur Verkapselung medizinischer Wirkstoffe verwendet wird. Chitosan wird durch Deacetylierung von Chitin über alkalische Lyse gewonnen [74]. Die alkalische Lyse bietet gleichzeitig eine effiziente Methode, um Endotoxine bei der Herstellung biologischer Produkte aus Gram-negativen Bakterien zu entfernen [75]. Da die Methode im Vergleich zu anderen Methoden der Endotoxinentfernung sehr preiswert ist, wurde sie für die Herstellung hochreiner polySia adaptiert [53]. Allerdings liegt aufgrund der strukturellen Analogie von

Chitosan und polySia die Vermutung nahe, dass auch die Amino-Funktion am C<sub>5</sub>-Atom von polySia durch die alkalische Inkubation deacetyliert werden könnte. Das Verfahren steht auch im Verdacht Interferenzen in der intramolekularen Struktur hervorzurufen und therapeutisch relevante polySia avDP20 somit immunologisch unbrauchbar zu machen.

### 3.3.3 Verwendung von nicht-pathogenen Bakterien

Mikroorganismen, Zellkulturen und Endoparasiten werden allgemein als Biostoffe bezeichnet. Von einigen solcher Stoffe können gesundheitsschädliche Wirkungen ausgehen, weswegen alle Biostoffe einer Gefährdungsbeurteilung unterzogen werden müssen. Nur so können präventive Schutzmaßnahmen und Vorkehrungen getroffen werden. Biostoffe werden basierend auf dem individuellen Infektionsrisiko vier verschiedenen Risikogruppen zugeordnet. Dabei nimmt das Infektionsrisiko von Risikogruppe 1 zu Risikogruppe 4 zu.

Als neuroinvasives Bakterium ist *E. coli* K1 aufgrund seiner natürlichen Pathogenität der biologischen Risikogruppe 2 zugeordnet [76]. Laut Definition handelt es sich dabei um „Biostoffe, die eine Krankheit beim Menschen hervorrufen können und eine Gefahr für Beschäftigte darstellen können“ [77]. Die Verwendung dieses Stammes in einem späteren großtechnischen Prozess für polySia (avDP20) erfordert dementsprechend höhere Vorkehrungen bei der Sicherheit und Dokumentation. Auch *NmB* und *NmC* sind als Humanpathogene eingestuft und verkomplizieren daher ebenso die Auflagen zur Einhaltung der GMP-Richtlinien. Die Etablierung eines Prozesses, bei dem nicht-pathogene Sicherheitsstämme von *E. coli* eingesetzt werden, könnte das Problem umgehen.

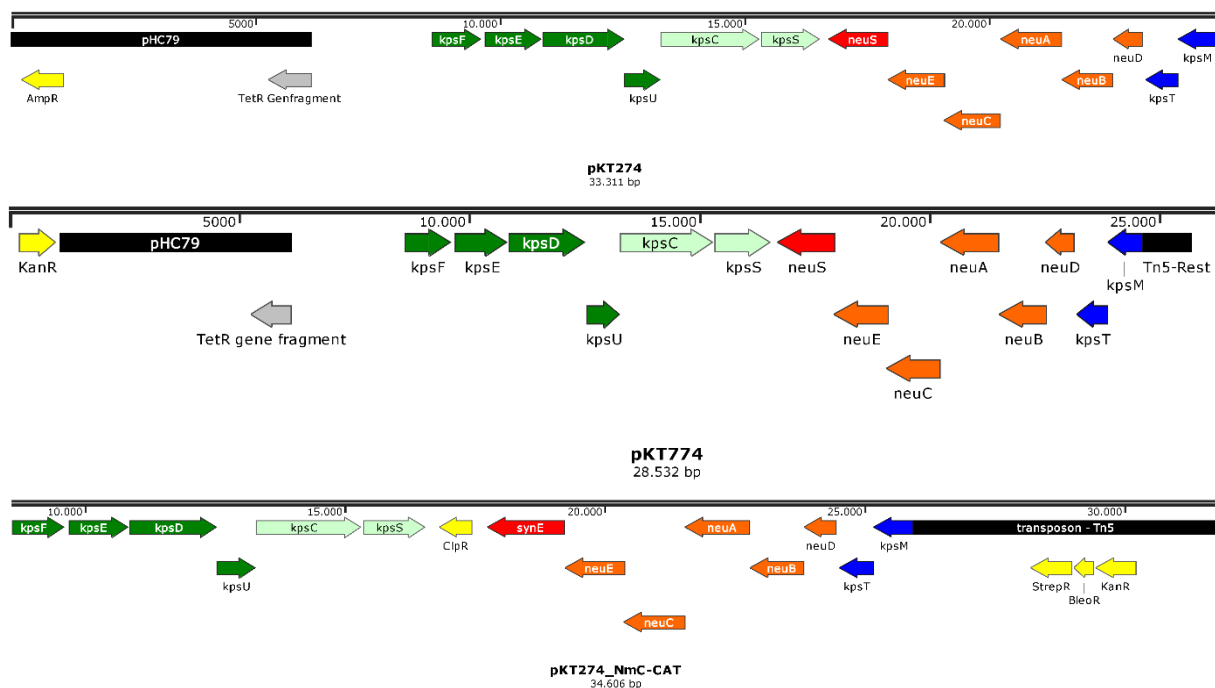
*E. coli* BL21 wird seit mehreren Jahrzehnten in Industrie und Forschung für die Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet [78]. Der Stamm ist als Biostoff der Risikogruppe 1 eingestuft und stellt aufgrund dessen kein besonderes Risiko für die menschliche Gesundheit dar [77]. *E. coli* BL21 ist von Natur aus nicht in der Lage polySia-Kapseln zu bilden. Interessanterweise wurden dennoch die Gene der Regionen 1 und 3 aus dem *kps*-Gencluster in *E. coli* BL21 nachgewiesen [79]. Analysen zeigten, dass der open reading frame (ORF) der Region 2 durch eine IS1-Insertion unterbrochen wird. Somit können die *neu*-Gene der Kapselbiosynthese nicht transkribiert werden [79].

Um die großtechnische polySia-Produktion mittels nicht-pathogener Bakterien zu realisieren, wurde *E. coli* BL21 genetisch modifiziert. Der Stamm wurde mit dem Plasmid pKT274 transformiert. Das verwendete Plasmid basiert auf dem Cosmid pHc79 [80] und enthält das vollständige *kps*-Gencluster zur Biosynthese von polySia in *E. coli* K1. Die Gentranskription wird über die nativen Promotoren reguliert. Die Expression des Regulatorproteins Rop sorgt

für eine geringe intrazelluläre Kopienanzahl in der Zelle. Die Existenz einer basis of mobility (BOM)-Region ermöglicht einen Transfer des Plasmides zwischen Zellen [81]. Zusätzlich ist das Transposon Tn5 enthalten, das für Streptomycin-, Bleomycin- und Kanamycin-Resistenzen codiert. Als Selektionsmarker ist das Ampicillin-Resistenzgen *ampR* vorhanden.

Durch Modifikation der Nukleotidsequenz des Plasmides wurden zwei weitere Varianten erzeugt. Das Plasmid pKT774 enthält die identische genetische Information des *kps*-Genclusters von *E. coli* K1. Hier wurde lediglich ein Großteil des Transposons Tn5 entfernt und *ampR* aus pHC79 durch das Neomycin-/Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Diese Resistenz ist der einzige Selektionsmarker dieses Plasmides. Vorversuche zeigten bereits, dass der Austausch des Selektionsmarkers die Kapseldichte beeinflussen könnte.

Im dritten Plasmid pKT274-synE wurde die genetische Information im *kps*-Gencluster modifiziert. Durch den Austausch von *neuS*, welches die poly-ST aus *E. coli* K1 exprimiert, durch *synE* aus *NmC*, soll eine Variante erzeugt werden, die  $\alpha$ 2,9-verknüpfte polySia synthetisiert. Als Selektionsmarker wurde hier zusätzlich das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) zwischen *kpsS* und *neuS* integriert. Alle drei Plasmidsequenzen sind als linearisierte Form in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8:** Linearisierte Darstellung der genetischen Organisation der verwendeten Plasmide. Die Gene der drei Regionen des *kps*-Clusters sind als grüne (Region 1), orangene (Region 2) und blaue (Region 3) Pfeile dargestellt. Die roten Pfeile stellen das Gen der poly-ST *neuS* (pKT274 und pKT774) bzw. *synE* (pKT274-synE) dar. Die gelben Pfeile bilden die unterschiedlichen Selektionsmarker ab.



---

## 4 Experimentelle Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hochmolekulare polySia mit verschiedenen *E. coli* Stämmen biotechnologisch produziert. Anschließend wurden etablierte und alternative Methoden zur Isolation und Reinigung der erzeugten polySia nach den Richtlinien des GMP untersucht und beurteilt. Zur besseren Übersicht werden die experimentellen Arbeiten in drei Teilbereiche unterteilt, die jeweils getrennt voneinander betrachtet werden.

- Der erste Abschnitt dieses Kapitels gibt einen Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten **Kultivierungsarbeiten**. Zur Produktion von polySia wurden neben dem bekannten *E. coli* K1 Stamm auch genetisch veränderte Stämme von *E. coli* BL21 in unterschiedlichen Bioreaktorsystemen kultiviert. Zur Beurteilung der Effizienz der Stämme wurden verschiedene Kennzahlen berechnet und diese untereinander verglichen.
- Im zweiten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse des **Downstream processing** vorgestellt. Um die verschiedenen Produkte zu charakterisieren, werden sie zunächst nach dem Stand der Technik isoliert und aufgereinigt. Gleichzeitig können so ausreichende Mengen des Produktes zur Verfügung gestellt werden, um anschließend neue Methoden und Verfahren zur GMP-konformen polySia-Produktion zu untersuchen.
- Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse zur **Produktanalytik** der erzeugten Polymere beschrieben. Da polySia für einen späteren Einsatz im medizinischen Sektor produziert wird, müssen eine entsprechende Reinheit und die Qualität des Produktes nachweisbar sein, um die Sicherheit des Produktes zu gewährleisten. Auch die Produkte der rekombinanten Stämme werden bezüglich Strukturintegrität und Kettenlänge mit dem Produkt des *E. coli* K1 Stammes verglichen.

## 4.1 Kultivierungsarbeiten

Das Ziel der Kultivierungsarbeiten ist die Herstellung von hochmolekularer polySia, aus der später die pharmazeutisch relevante polySia avDP20 gewonnen wird. Für die Produktion wird ein zuvor etablierter Prozess zur Hochzelldichtekultivierung (high cell density cultivation; HCDC) von *E. coli* K1 verwendet [48, 82]. Neben dem bekannten *E. coli* K1-Stamm werden in dieser Arbeit drei rekombinante Stämme, die auf dem Laborsicherheitsstamm *E. coli* BL21 basieren, kultiviert. Die Intention ist  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia zukünftig ohne Verwendung von humanpathogenen Bakterien zu produzieren. In Vorversuchen werden zunächst die Bedingungen zur Vorkulturanzucht in Schüttelkolben, basierend auf dem Wachstumsverhalten, analysiert und optimiert. Anschließend werden die drei rekombinanten *E. coli* BL21-Stämme in zwei verschiedenen Bioreaktorsystemen kultiviert. Dabei kommen ein konventioneller Glas-Rührkesselreaktor im 2 L-Maßstab und ein welleninduzierter Einweg-Beutelreaktor im 25 L-Maßstab zum Einsatz. Das Potenzial der rekombinanten Stämme wird basierend auf den erzielten Zelldichten und Produktausbeuten ermittelt und mit dem konventionellen Ansatz in *E. coli* K1 verglichen. Dabei werden auch Konzentrationen prozessbedingter Verunreinigungen wie HCPs oder des metabolischen Nebenproduktes Acetat bestimmt.

### 4.1.1 Optimierung der Anzucht der Vorkulturen im Schüttelkolben

Für eine großtechnische Produktion müssen Bakterien in mehreren aufeinanderfolgenden Kulturen angezogen werden, wobei das Arbeitsvolumen schrittweise erhöht wird. Dabei beeinflussen das Alter der Kultur, das verwendete Medium und der Zeitpunkt des Überimpfens das Wachstumsverhalten der Hauptkultur während der Produktion entscheidend [83]. Optimalerweise sollten die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase in den Reaktor überimpft werden. Für die Charakterisierung zur Vorkulturanzucht wurden alle *E. coli*-Stämme in einfachen Schüttelkolben kultiviert.

Wie in vorangehenden Arbeiten wurden neben einem komplexen Medium (LB-Medium; Tabelle 8) in dieser Arbeit auch definierte Medien für die Vorkulturanzucht verwendet [48, 62]. Dadurch wurden lange lag-Phasen in der Hauptkultur vermieden und der Eintrag undefinierter Medienbestandteile in die Hauptkultur minimiert [53, 62]. Die optimalen Zeitpunkte zum Überimpfen der Kulturen wurden experimentell anhand des Zellwachstums in LB-Medium und einem synthetischen HCDC-Medium nach Korz *et al.* (Tabelle 9) bei 37 °C ermittelt und mit der Anzucht von *E. coli* K1 verglichen.

Der Stamm mit dem Plasmid pKT774 erreichte im LB-Medium eine  $OD_{600} = 2$  rel. AU. Alle anderen Stämme wurden bei  $OD_{600} = 6$  rel. AU bis  $OD_{600} = 9$  rel. AU von dem komplexen Medium in das definierte Medium überimpft. In diesem Medium erreichten alle Stämme nach 12 - 15 h Inkubation eine  $OD_{600} = 11$  rel. AU bis  $OD_{600} = 13$  rel. AU. Durch den antibiotischen Selektionsmarker im Medium war das Wachstum der rekombinanten Stämme wesentlich langsamer im Vergleich zu *E. coli* K1. Nichtsdestotrotz wurden für alle Stämme optimale Bedingungen definiert, bei der sich die Kulturen zum Inokulationszeitpunkt der Hauptkultur in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Vergleich der Vorkulturbedingungen der verwendeten *E. coli* Stämme. Zur Anzucht der ersten Vorkultur wurden 50 mL Komplexmedium in 500-mL-Schüttelkolben mit Schikanen inokuliert. Die zweite Vorkultur wurde in identischen Schüttelkolben mit 100 mL definiertem Medium angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 RPM.

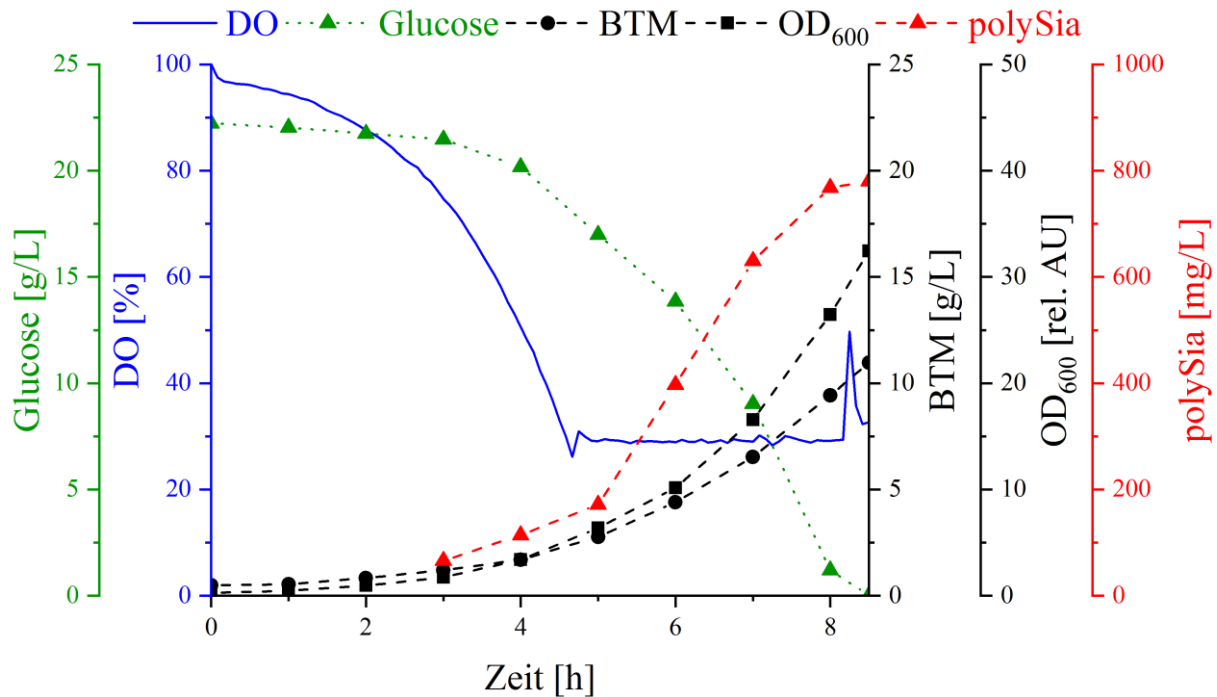
Parameter	<i>E. coli</i> K1 (WT)	<i>E. coli</i> BL21 pKT274	<i>E. coli</i> BL21 pKT774	<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE
LB (Volumen)	50 mL	25 mL	10 mL	50 mL
LB (Inkubationszeit)	5 h	6 h	9,5 h	13 h
VK-Volumen/ 100 mL MM	20 µL	200 µL	700 µL	700 µL
HCDC (Inkubationszeit)	12 h	14 h	15 h	12 h

#### 4.1.2 Kultivierungsarbeiten im 2 L-Glasrührkessel

Zur Produktion von polySia wurden alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme zunächst in einem STR im 2 L-Labormaßstab kultiviert. STRs sind etablierte Kultivierungssysteme, die seit mehreren Jahrzehnten sowohl in der industriellen Produktion als auch in der Forschung eingesetzt werden. Auch für die Produktion von bakterieller polySia konnte dieses System bereits in unterschiedlichen Maßstäben (2 L, 10 L, 30 L) etabliert werden [49, 51, 62, 84]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden insgesamt drei batch-Kultivierungen von *E. coli* K1 durchgeführt, während die Produktion von  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia in *E. coli* BL21 für jeden Stamm exemplarisch erfolgte.

##### 4.1.2.1 Kultivierung von *E. coli* K1

Die genauen Prozesseinstellungen der batch-Kultivierung von *E. coli* K1 sind in Kapitel 6.2.1.4 zusammengefasst. Zur Prozesscharakterisierung wurden während der Kultivierung verschiedene offline-Analysen durchgeführt. In Abbildung 9 ist exemplarisch der zeitliche Verlauf einer Kultivierung von *E. coli* K1 dargestellt.



**Abbildung 9:** Zeitverlauf einer typischen batch-Kultivierung von *E. coli* K1 im 2 L-STR. Dargestellt sind der Gehalt an gelöstem Sauerstoff (DO; blaue Linie), die Abnahme der Glucose-Konzentration (grünes Dreieck) und die Zunahme der Zelldichte (schwarzes Quadrat), die Konzentration der Biotrockenmasse (schwarzer Kreis) und die polySia-Konzentration (rotes Dreieck).

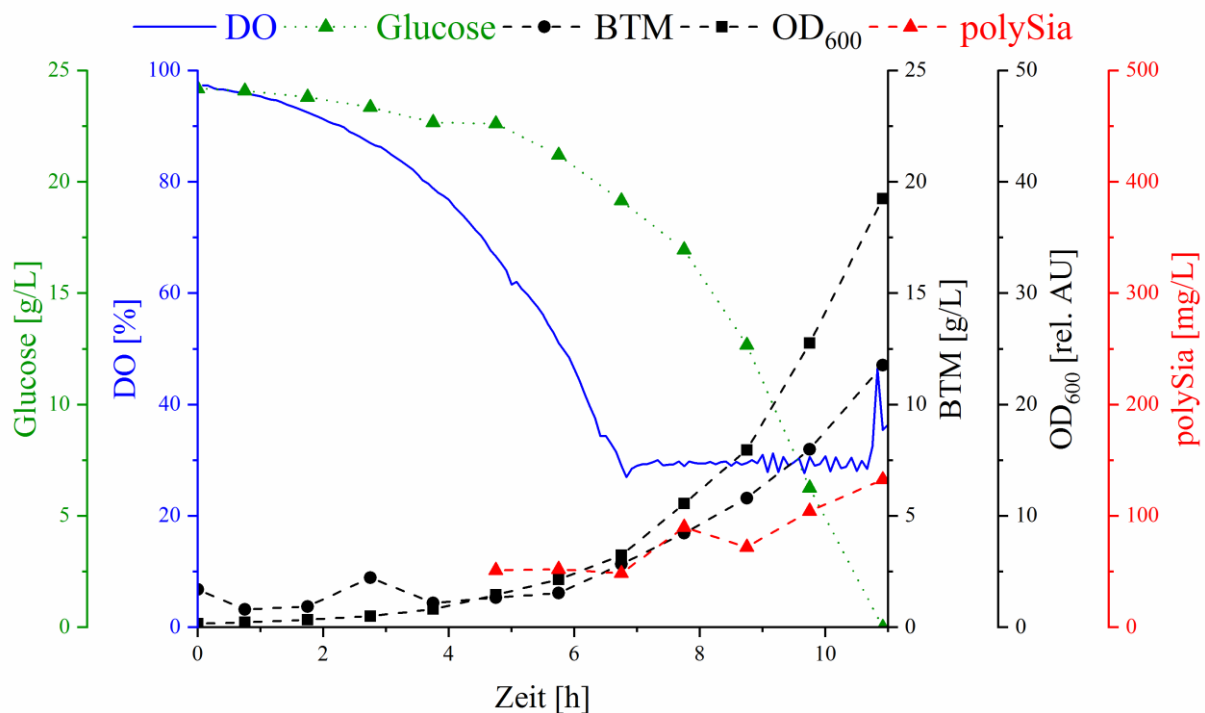
Die Kultivierung wurde mit der Inokulation des Reaktors auf  $OD_{600} = 0,3$  rel. AU gestartet. In den ersten 1,5 h befanden sich die Bakterien in der lag-Phase und adaptierten sich an die neue Umgebung. Anschließend gingen die Zellen in die exponentielle Phase über, was an dem dafür typischen Verlauf der Kurven der Zelldichte und Biotrockenmasse (BTM) zu erkennen ist. Während dieser Phase wurde anhand der  $OD_{600}$  eine maximale Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ) von  $0,69 (\pm 0,01)$  /h ermittelt. Gleichzeitig nahm der Gehalt an gelöstem Sauerstoff (DO) im Medium exponentiell ab und unterschritt nach 4,5 h den Grenzwert von 30 %. Daraufhin wurde der Wert über eine Zudosierung von reinem Sauerstoff in der Zuluft reguliert. Am Ende der Kultivierung lag der Sauerstoff-Anteil im Gasstrom bei 82 %.

Nach  $7,8 (\pm 0,8)$  h war die Glucose im Nährmedium vollständig verbraucht und die Kultivierung wurde beendet. Am Ende erreichte die Kultur eine  $OD_{600} = 30,8 (\pm 2,8)$  rel. AU. Dieser Wert korrelierte mit einer BTM von  $10,6 (\pm 0,7)$  mg/L. Die finale polySia-Konzentration im Kulturüberstand betrug  $774 (\pm 17)$  mg/L. Gleichzeitig erreichte die Konzentration an HCPs im Überstand einen Wert von  $129 (\pm 25)$  mg/L. Am Ende der Kultivierung hatten die Zellen auch  $0,9 (\pm 0,2)$  g/L Acetat im Medium angereichert. Diese Konzentration hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum [85]. Bei der Verwendung von 1 M NaOH anstelle einer 25 % Ammoniaklösung als basisches pH-Stellmittel wurde ein unvollständiger Verbrauch

der Glucose detektiert (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich war die Kultur durch die niedrige Konzentration der einzigen Stickstoffquelle Diammoniumhydrogenphosphat (Tabelle 9) limitiert.

#### 4.1.2.2 Kultivierung von rekombinanten *E. coli* BL21

Durch Expression der *E. coli* K1 Gene auf einem Plasmid und dem Austausch von *neuS* durch *synE* aus *NmC* können  $\alpha$ 2,8- oder  $\alpha$ 2,9 polySia in dem nicht-pathogenen Stamm *E. coli* BL21 exprimiert werden. Für die Produktion der rekombinanten  $\alpha$ 2,8- oder  $\alpha$ 2,9 polySia wurden drei Varianten des Stammes analog zu *E. coli* K1 unter Hochzelldichtebedingungen in einem 2 L-STR kultiviert. Im Gegensatz zu *E. coli* K1 wurde jede Kultivierung nur einmal durchgeführt. Exemplarisch ist in Abbildung 10 der Verlauf der Kultivierung des  $\alpha$ 2,8-polySia exprimierenden Stammes mit dem Plasmid pKT774 dargestellt.



**Abbildung 10:** Zeitlicher Verlauf der batch-Kultivierung von *E. coli* BL21 pKT774 im 2 L-STR. Der Stamm exprimiert  $\alpha$ 2,8-verknüpfte polySia. Dargestellt sind die DO (blaue Linie), die Abnahme der Glucose-Konzentration (grünes Dreieck), die Konzentration der Biotrockenmasse (schwarzer Kreis), die Acetat-Konzentration (schwarzes Quadrat) und die polySia-Konzentration (rotes Dreieck).

Die Kultivierung wurde ebenfalls durch Inokulation des Reaktors auf  $OD_{600} = 0,3$  rel. AU gestartet. Im Vergleich zu *E. coli* K1 benötigt der Stamm mit dem Plasmid pKT774 wesentlich länger, um sich an die Bedingungen im Reaktor zu adaptieren. In der 6-stündigen lag-Phase erreichten die Zellen eine  $OD_{600} = 4,3$  rel. AU. Dies entspricht einer BTM von 1,5 g/L. Danach

ging das Wachstum in die exponentielle Phase über, wobei ein  $\mu_{\max} = 0,42$  /h anhand der  $OD_{600}$ -Daten ermittelt wurde. Nach 10,9 h war die Glucose vollständig verbraucht. Am Ende der Kultivierung wurde eine  $OD_{600} = 38,5$  rel. AU ermittelt, dies korrelierte mit einer finalen BTM von 11,8 g/L. Gleichzeitig wurden eine finale Produkt-Konzentration von 133 mg/L und eine Protein-Konzentration von 195 mg/L im Kulturüberstand detektiert. Am Ende der Kultivierung wurden 2,5 g/L Acetat in der Kulturbrühe des Mediums gemessen.

Auch die anderen rekombinanten Stämme benötigten wesentlich länger, um die Glucose vollständig zu verstoffwechseln. Die Kultivierung des  $\alpha 2,8$ -polySia exprimierenden *E. coli* BL21 mit pKT274 wurde nach 10,7 h beendet. Dabei korreliert die finale  $OD_{600} = 39$  rel. AU mit einer BTM von 11,3 g/L. Im Überstand wurden am Ende der Kultivierung 82 mg/L polySia, 304 mg/L HCP und 1,6 g/L Acetat detektiert.

Die  $\alpha 2,9$ -polySia exprimierende *E. coli* BL21 Variante mit dem Plasmid pKT274-synE ging erst nach 9 h in die exponentielle Phase über. Diese Kultivierung wurde nach 18,2 h beendet. Nach dem vollständigen Glucose-Verbrauch wurden eine  $OD_{600} = 38,6$  rel. AU bei einer BTM von 11,9 g/L detektiert. Weiterhin wurde eine polySia-Konzentration von 127 mg/L bei einer Protein-Konzentration von 209 mg/L und einer Acetat-Konzentration von 1,5 g/L gemessen. Die Kultivierung der rekombinanten *E. coli* BL21 Stämme im STR verlief somit erfolgreich.

### 4.1.3 Vergleich der 2 L-batch-Kultivierungen der verschiedenen *E. coli*-Stämme

Um die Effizienz der einzelnen rekombinanten *E. coli* BL21 Varianten genauer zu beurteilen, wurden die relevanten Kennzahlen berechnet und den Werten von *E. coli* K1 gegenübergestellt. Die rekombinante Produktion der  $\alpha 2,8$ -polySia in *E. coli* BL21 (pKT274 und pKT774) erhöhte die Kultivierungsdauer um ca. 3 h gegenüber dem Wildtyp, während die Kultivierungsdauer für rekombinante  $\alpha 2,9$ -polySia sich um mehr als 10 h verlängerte. Die Exposition des antibiotischen Selektionsmarkers im Medium resultierte in erheblich längeren lag-Phasen und geringeren Wachstumsraten. Diese lagen in einem Bereich von 0,4 /h bis 0,42 /h und waren somit um 39 % - 42 % geringer gegenüber *E. coli* K1. Die Wachstumsraten entsprechen einer Verdopplungszeit von 90 - 98 min in der exponentiellen Phase. Alle *E. coli* BL21-basierten Stämme steigerten die BTM um 6 % - 12 % und auch die Protein-Konzentration im Überstand war am Ende der Kultivierung um 51 % - 136 % höher. Interessanterweise wurden trotz der etwas höheren Biomasserträge ( $Y_{X/S}$ ) in jedem rekombinanten Kulturüberstand signifikant niedrigere Produkt-Konzentrationen gemessen. Die höchste gemessene polySia-Konzentration erreichte nur 133 mg/L, wodurch die Produktivität verglichen mit *E. coli* K1 um fast 83 % geringer war. Die Produktausbeute ( $Y_{P/S}$ ) von *E. coli* K1 war im Vergleich zu den drei

rekombinanten Produktionsstämme zehnmal höher. Zur genauen Beurteilung der Effizienz der rekombinanten Produktion wurde die Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) für jeden Stamm ermittelt. Für den Referenzstamm wurde eine RZA von 0,099 ( $\pm 0,011$ )  $\text{g}_{\text{polySia}}/\text{L}/\text{h}$  bestimmt. Die RZA der rekombinanten *E. coli* BL21-Stämme erreichten lediglich 7 % - 12 % des Referenzwertes. Alle Werte der Kultivierungen des STR im 2 L-Labormaßstab sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Vergleich der batch-Kultivierungen der verschiedenen *E. coli*-Stämme im 2 L-STR. Die Ergebnisse für *E. coli* K1 ergeben sich aus den Mittelwerten von insgesamt drei batch-Kultivierungen. Im Gegensatz dazu erfolgte die Kultivierung jedes rekombinanten *E. coli* BL21-Stammes exemplarisch.

Parameter	<i>E. coli</i> K1	<i>E. coli</i> BL21 pKT274	<i>E. coli</i> BL21 pKT774	<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE
Zeit [h]	7,8 ( $\pm 0,8$ )	10,7	10,9	18,2
BTM [g/L]	10,6 ( $\pm 0,7$ )	11,3	11,8	11,9
polySia [mg/L]	774 ( $\pm 18$ )	82	133	127
HCP [mg/L]	129 ( $\pm 25$ )	304	195	209
$\mu_{\text{max}}$ [1/h]	0,69 ( $\pm 0,01$ )	0,42	0,42	0,40
$Y_{\text{P/S}}$ [ $\text{g}_{\text{polySia}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ ]	0,032 ( $\pm 0,001$ )	0,003	0,005	0,005
$Y_{\text{X/S}}$ [ $\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ ]	0,452 ( $\pm 0,071$ )	0,451	0,471	0,475
$Y_{\text{P/X}}$ [ $\text{g}_{\text{polySia}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ ]	0,074 ( $\pm 0,011$ )	0,007	0,011	0,011
RZA [ $\text{g}_{\text{polySia}}/\text{L}/\text{h}$ ]	0,099 ( $\pm 0,011$ )	0,008	0,012	0,007

#### 4.1.4 Kultivierungsarbeiten im 25 L-Einweg-Beutelreaktor

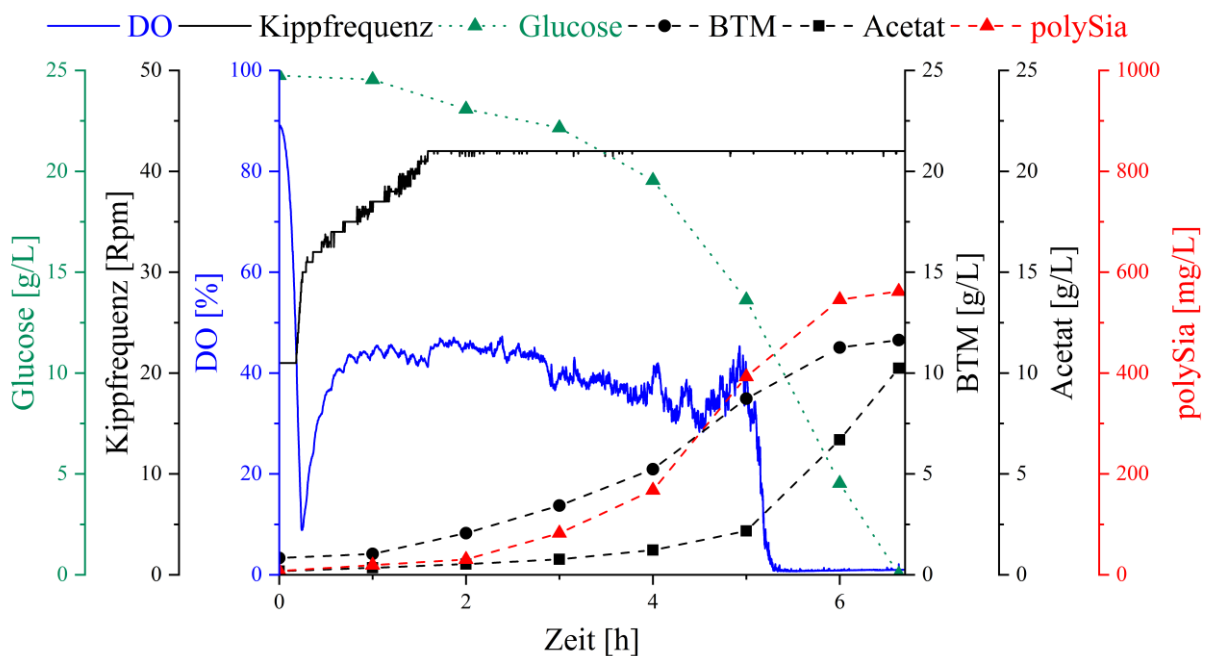
Bei der Herstellung von Pharmazeutika und klinischen Prüfpräparaten werden häufig zertifizierte Einwegbioreaktoren verwendet. Diese Systeme können auch den späteren Transfer von Produktionsprozessen in eine GMP-konforme Umgebung erleichtern [62]. Auch die biopharmazeutische Herstellung von polySia unter Verwendung des HCDC-Mediums wurde bereits in einem welleninduzierten Einweg-Beutelreaktor etabliert [48]. Dabei ist der Reaktorbeutel auf einer Plattform befestigt, die durch wechselseitiges Kippen eine Welle induziert und so den Reaktorinhalt durchmischt. In diesem System ist der Sauerstoffeintrag aufgrund der Kopfraum-Begasung deutlich geringer als im STR [86]. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung kann nur über eine Erhöhung der Kippfrequenz und Dosierung von Sauerstoff in der Zuluft gewährleistet werden. Zur Überwachung des Prozesses werden außerdem der pH-Wert und die DO über vorhandene Sensorspots gemessen. Alle verwendeten Prozesseinstellungen sind in Kapitel 6.2.1.5 beschrieben.

Zur technischen Produktion von polySia wurden alle verwendeten *E. coli*-Stämme in einem welleninduzierten Einweg-Beutelreaktor im 25 L-Labormaßstab kultiviert. Mit *E. coli* K1

wurden insgesamt drei batch-Kultivierungen durchgeführt, während die rekombinante  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia Produktion in *E. coli* BL21 für jeden Stamm exemplarisch erfolgte.

#### 4.1.4.1 Kultivierung von *E. coli* K1

Die Prozesseinstellungen während der batch-Kultivierung von *E. coli* K1 im 25 L-Einweg-Beutelreaktor wurden aus früheren Arbeiten übernommen [62]. Die online-Parameter wurden während der Kultivierung über eine entsprechende Software (BioPAT® MFCS, Sartorius Stedim Biotech GmbH) aufgezeichnet. Ergänzend wurden während der Kultivierung verschiedene offline-Analysen durchgeführt, um den Prozess zu charakterisieren. Abbildung 11 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf einer Kultivierung von *E. coli* K1.



**Abbildung 11:** Zeitlicher Verlauf einer typischen batch-Kultivierung von *E. coli* K1 im 25 L-Einweg-Beutelreaktor. Dargestellt sind die DO (blaue Linie), die Kippfrequenz (schwarze Linie) die Abnahme der Glucose-Konzentration (grünes Dreieck), die Zunahme der Konzentration der Biotrockenmasse (schwarzer Kreis), die Acetat-Konzentration (schwarzes Quadrat) und die polySia-Konzentration (rotes Dreieck).

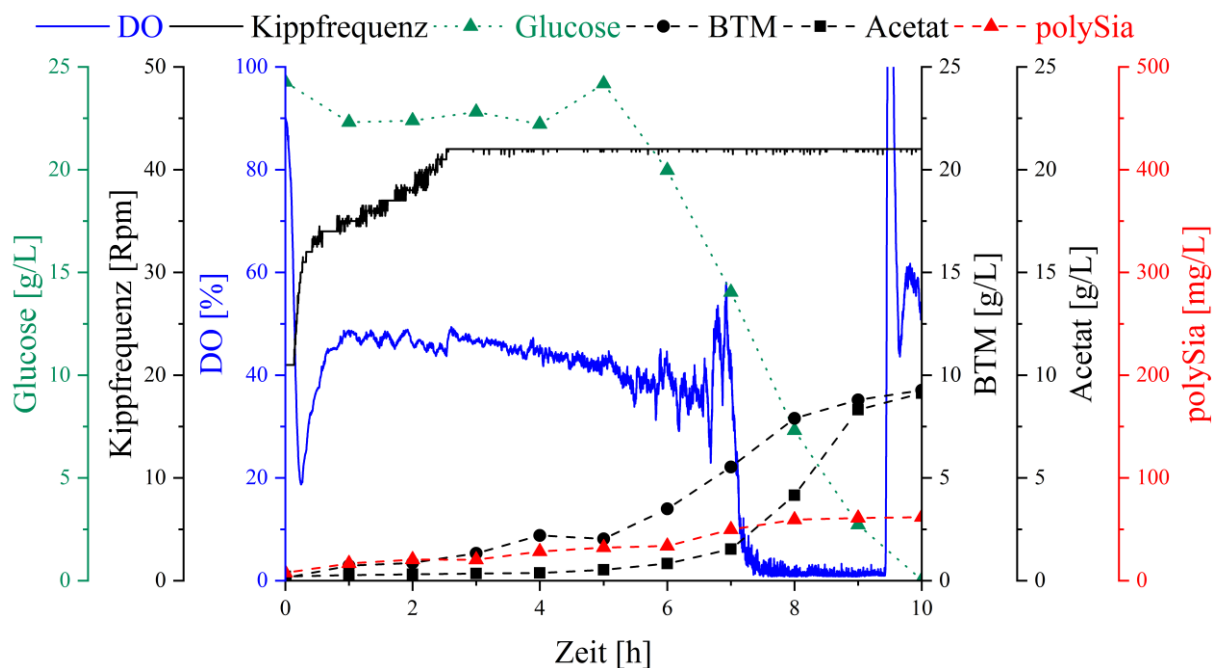
Aufgrund des deutlich niedrigeren Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ ) fiel der DO unmittelbar nach der Inokulation des Reaktors unter den Setpoint von 50 %. Durch eine Erhöhung der Kippfrequenz auf ein Maximum von 42 Rpm und Zudosierung von Sauerstoff im Luftstrom konnte der DO in den ersten 5 h auf über 40 % gehalten werden. In der exponentiellen Phase des Zellwachstums wurde anhand der  $OD_{600}$  ein  $\mu_{max} = 0,72 (\pm 0,02) /h$  ermittelt. Nach 5 h sank der DO vollständig ab, da der Sauerstoffanteil im Luftstrom nicht weiter erhöht werden konnte und die Glucose noch nicht vollständig verbraucht war. Die eintretende Sauerstofflimitierung verlangsamte das Zellwachstum bis zum Ende der



Kultivierung. Am zeitlichen Verlauf der BTM ist somit ein deutlich negativer Einfluss auf das Zellwachstum erkennbar. Die Glucose war nach 7,5 ( $\pm 1,3$ ) h vollständig verbraucht. Am Ende der Kultivierung erreichten die Zellen eine  $OD_{600} = 30 (\pm 0,7)$  rel. AU, eine BTM von 11,3 ( $\pm 0,4$ ) g/L bei einer polySia-Konzentration von 589 ( $\pm 23$ ) mg/L. Nach Beginn der Sauerstofflimitierung erhöhte sich die polySia-Konzentration im Kulturüberstand nur noch geringfügig. Gleichzeitig stieg jedoch die Acetat-Konzentration aufgrund der anaeroben Bedingungen von 2,1 g/L auf 10,2 g/L an. Vermutlich wurde der polySia-Metabolismus unterdrückt.

#### 4.1.4.2 Kultivierung von rekombinanten *E. coli* BL21

Die Produktion von  $\alpha 2,8$ - und  $\alpha 2,9$ -polySia in den rekombinanten *E. coli* BL21-Stämmen wurde unter identischen Prozessbedingungen zu der Kultivierung von *E. coli* K1 im Einweg-Beutelreaktor im 25 L-Maßstab durchgeführt. In Abbildung 12 ist zunächst exemplarisch der Verlauf der Kultivierung des  $\alpha 2,8$ -polySia exprimierenden Stammes mit dem Plasmid pKT274 dargestellt. Im Anschluss wird auch der Kultivierungsverlauf des  $\alpha 2,9$ -polySia produzierenden *E. coli* BL21-Stammes vorgestellt.



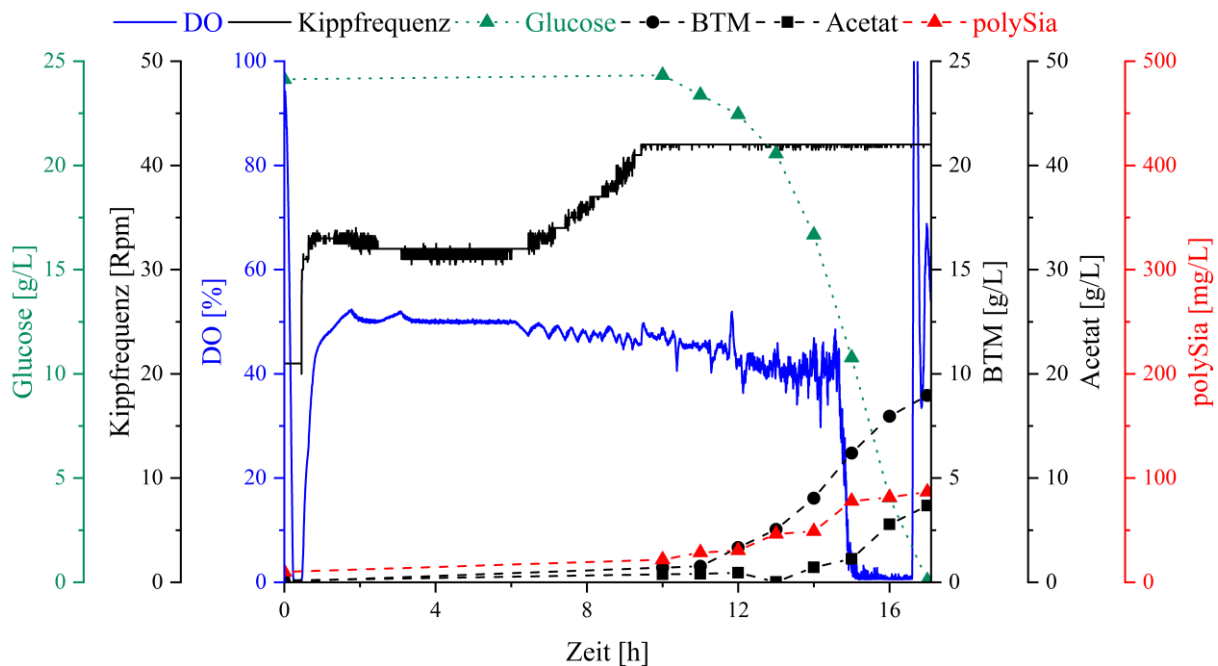
**Abbildung 12:** Zeitverlauf der batch-Kultivierung von *E. coli* BL21 pKT274 im 25 L-Einweg-Beutelreaktor. Dargestellt sind der Gehalt an gelöstem Sauerstoff (blaue Linie), die Kippfrequenz (schwarze Linie) die Abnahme der Glucose-Konzentration (grünes Dreieck), die Zunahme der Konzentration der Biotrockenmasse (schwarzer Kreis), die Acetat-Konzentration (schwarzes Quadrat) und die polySia-Konzentration (rotes Dreieck).

Wie zuvor bei der Kultivierung von *E. coli* K1 sank der DO auch bei der Kultivierung des  $\alpha 2,8$ -polySia exprimierenden Stammes mit dem Plasmid pKT274 nach der Inokulation des

Reaktors unter den Setpoint von 50 %. In den ersten 2 h wurde die Kippfrequenz erhöht und anschließend der Sauerstoffanteil in der Zuluft kontinuierlich erhöht, um den DO bei 50 % zu statieren. Nach 7 h lag der Sauerstoffanteil im Begasungsstrom bei 100 % und die Bakterien waren, wie zuvor bei *E. coli* K1 beobachtet, bis zum Ende der Kultivierung durch fehlenden Sauerstoff limitiert. Nach 10,4 h war keine Glucose mehr im Überstand der Kultur nachweisbar und die Kultivierung wurde beendet. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine  $OD_{600} = 33$  rel. AU bei einer BTM von 9,2 g/L gemessen. Die polySia-Konzentration im Kulturüberstand war mit 98 mg/L deutlich niedriger im Vergleich zur Kultivierung von *E. coli* K1 (siehe Kapitel 4.1.4.1). Gleichzeitig wurde eine Protein-Konzentration von 71 mg/L im Kulturüberstand gemessen. In der Phase des sauerstofflimitierten Zellwachstums stieg die Acetat-Konzentration von 1,5 g/L auf 9,1 g/L an, wodurch das Zellwachstum, wie zuvor schon bei *E. coli* K1 beobachtet, negativ beeinflusst wurde.

Die Kultivierung des anderen  $\alpha 2,8$ -polySia exprimierenden *E. coli* BL21-Stammes mit dem Plasmid pKT774 war trotz auftretender Sauerstofflimitierung bereits nach 9,3 h beendet. Am Ende der Kultivierung erreichte der Stamm eine  $OD_{600} = 36$  rel. AU. Dieser Wert korreliert mit einer BTM von 8,1 g/L. Im Überstand war eine polySia-Konzentration von 86 mg/L bei einer Protein-Konzentration von 56 mg/L messbar.

Abbildung 13 zeigt die Kultivierung von *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pKT274-synE im 25 L-Einweg-Beutelreaktor, welcher  $\alpha 2,9$ -polySia exprimiert.



**Abbildung 13:** Zeitlicher Verlauf der Kultivierung von *E. coli* BL21 pKT274-synE im 25 L-Einweg-Beutelreaktor. Dargestellt sind der Gehalt an gelöstem Sauerstoff (blaue Linie), die Kippfrequenz (schwarze Linie), die Abnahme der Glucose-Konzentration (grünes Dreieck), die Zunahme der Konzentration der Biotrockenmasse (schwarzer Kreis), die Acetat-Konzentration (schwarzes Quadrat) und die polySia-Konzentration (rotes Dreieck).

Wie zuvor im STR zeigte dieser Stamm auch im Einweg-Beutelreaktor eine charakteristische mehrstündige lag-Phase, in welcher die Zellen sich zunächst an die Bedingungen adaptierten. Die lag-Phase aller anderen Stämme war bedeutend kürzer. Nach der Inokulation des Reaktors sank die DO auf 0 % ab und stagnierte in den ersten 6 h der Kultivierung durch Regulation der Kippfrequenz auf 30 Rpm bei 50 %. Erst nach 9 h erreichte die Kippfrequenz das Maximum von 42 Rpm, wodurch die Zudosierung von Sauerstoff in den Reaktor initiiert wurde. Mit dem Übergang der Zellen in die exponentielle Phase nach 10 h erfolgte die erste Probennahme der offline-Analytik. Auch während dieser Kultivierung trat nach 15 h eine Sauerstofflimitierung auf. Nach 17,8 h war die Glucose im Kulturüberstand nicht mehr nachweisbar. Am Ende der Kultivierung erreichten die Zellen eine  $OD_{600} = 34$  rel. AU, was einer BTM von 9,1 g/L entspricht. Auch für diesen Stamm wurde nur ein geringfügiger Anstieg der polySia-Konzentration während der Sauerstofflimitierung im Reaktor beobachtet. Am Ende der Kultivierung wurden 93 mg/L polySia bei einer Protein-Konzentration von 72 mg/L im Kulturüberstand detektiert. Während des anaeroben Wachstums erhöhte sich die Acetat-Konzentration von 2,2 g/L auf 7,1 g/L. Wie bei den anderen Stämmen zuvor hatte auch hier die Sauerstofflimitierung einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum.

#### 4.1.5 Vergleich der Kultivierungen im Einweg-Beutelreaktor

Die experimentellen Ergebnisse der Kultivierungen der verwendeten *E. coli* BL21-Stämme wurden mit *E. coli* K1 verglichen und sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Vergleich der batch-Kultivierungen der verschiedenen *E. coli* Stämme im 25 L-CultiBag. Die Ergebnisse für *E. coli* K1 ergeben sich aus den Mittelwerten von insgesamt drei batch-Kultivierungen. Im Gegensatz dazu erfolgte die Kultivierung jedes rekombinanten *E. coli* BL21-Stammes exemplarisch.

Parameter	<i>E. coli</i> K1	<i>E. coli</i> BL21 pKT274	<i>E. coli</i> BL21 pKT774	<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE
Zeit [h]	7,5 ( $\pm 1,3$ )	10,4	9,3	17,8
BTM [g/L]	11,3 ( $\pm 0,4$ )	9,3	8,1	9,1
polySia [mg/L]	589 ( $\pm 23$ )	98	86	93
HCP [mg/L]	207 ( $\pm 38$ )	71	56	72
* $\mu_{max}$ [/h]	0,72 ( $\pm 0,02$ )	0,52	0,53	0,49
$Y_{P/S}$ [ $g_{polySia} / g_{Glucose}$ ]	0,024 ( $\pm 0,001$ )	0,004	0,003	0,004
$Y_{X/S}$ [ $g_{BTM} / g_{Glucose}$ ]	0,452 ( $\pm 0,019$ )	0,359	0,323	0,363
$Y_{P/X}$ [ $g_{polySia} / g_{BTM}$ ]	0,052 ( $\pm 0,004$ )	0,011	0,011	0,010
RZA [ $g_{polySia} / L/h$ ]	0,079 ( $\pm 0,011$ )	0,01	0,009	0,005

\*Die Wachstumsrate wurde aus der Phase des exponentiellen Wachstums ohne Sauerstofflimitierung bestimmt.

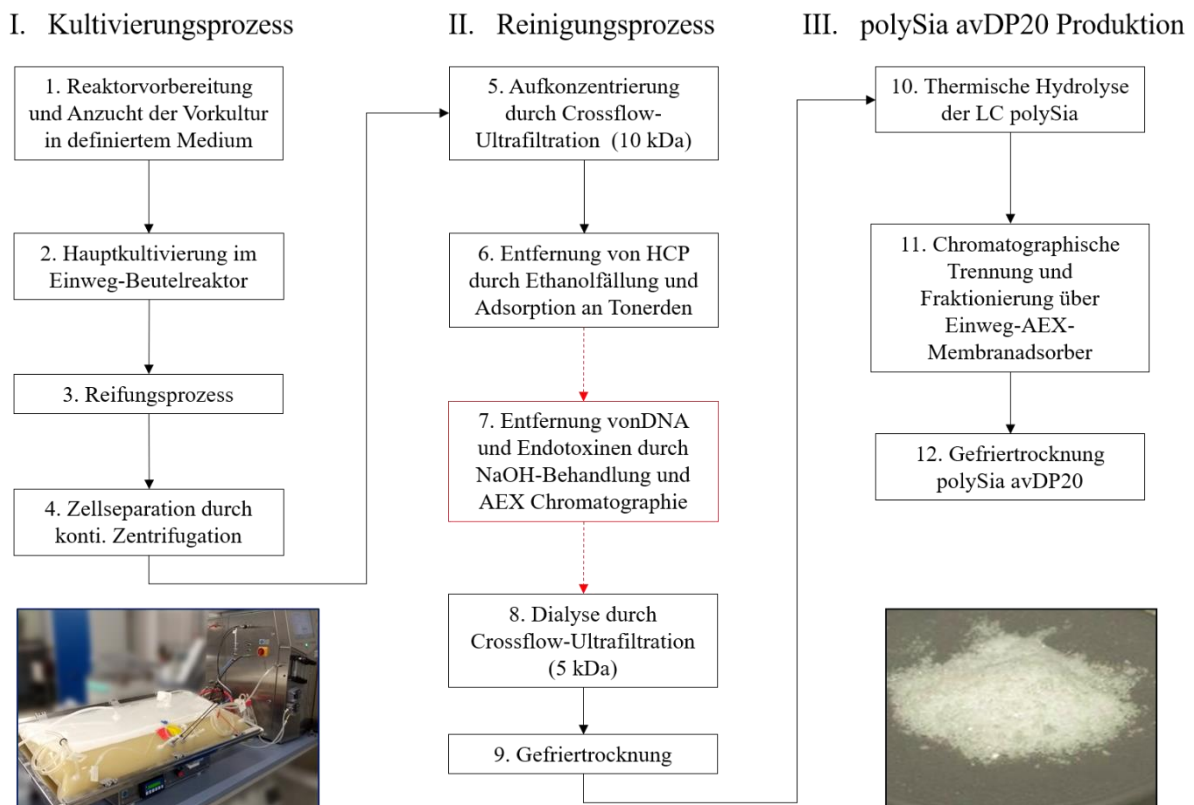
Im welleninduzierten Einweg-Beutelreaktor wurde das Zellwachstum aller verwendeten Stämme am Ende der Kultivierung durch eine auftretende Sauerstofflimitierung beeinflusst. Dies ist auf den schlechten Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ ) zurückzuführen [86,87]. Die daraus resultierenden Zelldichten und Biomassenerträge ( $Y_{X/S}$ ) der rekombinanten Stämme waren im Vergleich zu *E. coli* K1 um 17 % - 28 % geringer. Wie schon im STR (vgl. Tabelle 2) waren auch die während der unlimitierten exponentiellen Wachstumsphase berechneten  $\mu_{max}$  aller *E. coli* BL21-Stämme (0,49 /h - 0,53 /h) signifikant niedriger als die  $\mu_{max}$  von *E. coli* K1 (0,72 ( $\pm 0,02$ ) /h). Zusätzlich führten lange lag-Phasen, insbesondere bei dem  $\alpha 2,9$ -polySia-produzierenden Stamm, zu längeren Prozesszeiten. Die Produktausbeuten von *E. coli* K1 waren aufgrund der eintretenden Sauerstofflimitierung um 25 % geringer als im STR. Die höchste gemessene polySia-Konzentration für *E. coli* BL21 betrug 98 mg/L. Die höchste Produktausbeute ( $Y_{P/S}$ ) in *E. coli* BL21 lag mit 0,011  $g_{polySia} / g_{BTM}$  lediglich bei 17 % des Referenzstammes. Für *E. coli* K1 wurde eine RZA von 0,079 ( $\pm 0,011$ )  $g_{polySia} / L/h$  berechnet. Die RZAs der rekombinanten  $\alpha 2,8$ -polySia-produzierenden Stämme wurden mit lediglich 0,01  $g_{polySia} / L/h$  und 0,009  $g_{polySia} / L/h$  berechnet, während die RZA des Produktionsstammes für  $\alpha 2,9$ -polySia mit 0,005  $g_{polySia} / L/h$  sogar noch geringer war.

### 4.1.6 Zusammenfassung der Kultivierungsarbeiten

Anhand der durchgeführten Kultivierungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass sich der Laborsicherheitsstamm *E. coli* BL21 prinzipiell für die rekombinante Produktion von polySia eignet. Unter Verwendung von Schüttelkolben konnten die Anzuchtbedingungen der Vorkulturen aller Stämme optimiert werden. Zudem konnte eine Aufskalierung der Produktion in einen STR im 2 L-Maßstab und einen welleninduzierten Einweg-Beutelreaktor im 25 L-Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Sowohl im klassischen Rührkessel als auch im GMP-konformen Einweg-Beutelreaktor konnte polySia im Kulturüberstand aller rekombinanten Stämme nachgewiesen werden. Die Kultivierung von *E. coli* K1 als Referenzstamm auf einem synthetischen HCDC-Medium lieferte vergleichbare Ergebnisse zu vorherigen Arbeiten [48]. Die erzielten Ausbeuten der rekombinanten *E. coli* BL21-Stämme in den verschiedenen Reaktorsystemen waren ebenfalls untereinander vergleichbar. Allerdings ist die Produktivität von *E. coli* K1 wesentlich höher. Insgesamt wurden im STR höhere Produktausbeuten erzielt, da der polySia-Metabolismus und das Zellwachstum nicht durch anaerobe Bedingungen beeinträchtigt waren.

## 4.2 Etablierte Aufreinigung von bakterieller Polysialinsäure

Nach Abschluss des Kultivierungsprozesses wird die hergestellte polySia aus dem Kulturüberstand des Einweg-Beutelreaktors isoliert, um das Polymer für weitere Untersuchungen und Methodenentwicklungen zur Verfügung zu stellen. Die Reinigung des Produktes erfolgt über einen etablierten Prozess, der in Abbildung 14 beschrieben ist. Dabei können vor allem prozessbedingte Verunreinigungen wie HCPs und DNA sehr effizient über verschiedene Fällungs- und Filtrationsschritte entfernt werden [52]. Die Reduktion hoher Konzentrationen von Endotoxinen stellt jedoch immer noch eine große Herausforderung dar. Zur vollständigen Entfernung der Endotoxine aus der Prozesslösung kann der Prozess um eine alkalische Lyse ( $\text{pH} > 13$ ) und Fraktionierung mit einem Anionenaustauscher erweitert werden [53, 62]. In diesem Abschnitt wird zunächst die Aufreinigung der polySia-Produkte vorgestellt und miteinander verglichen. Anschließend wird die gereinigte langkettige polySia ( $\text{DP} > 90$ ) thermisch hydrolysiert, um die pharmazeutisch relevante polySia avDP20 zu erzeugen.

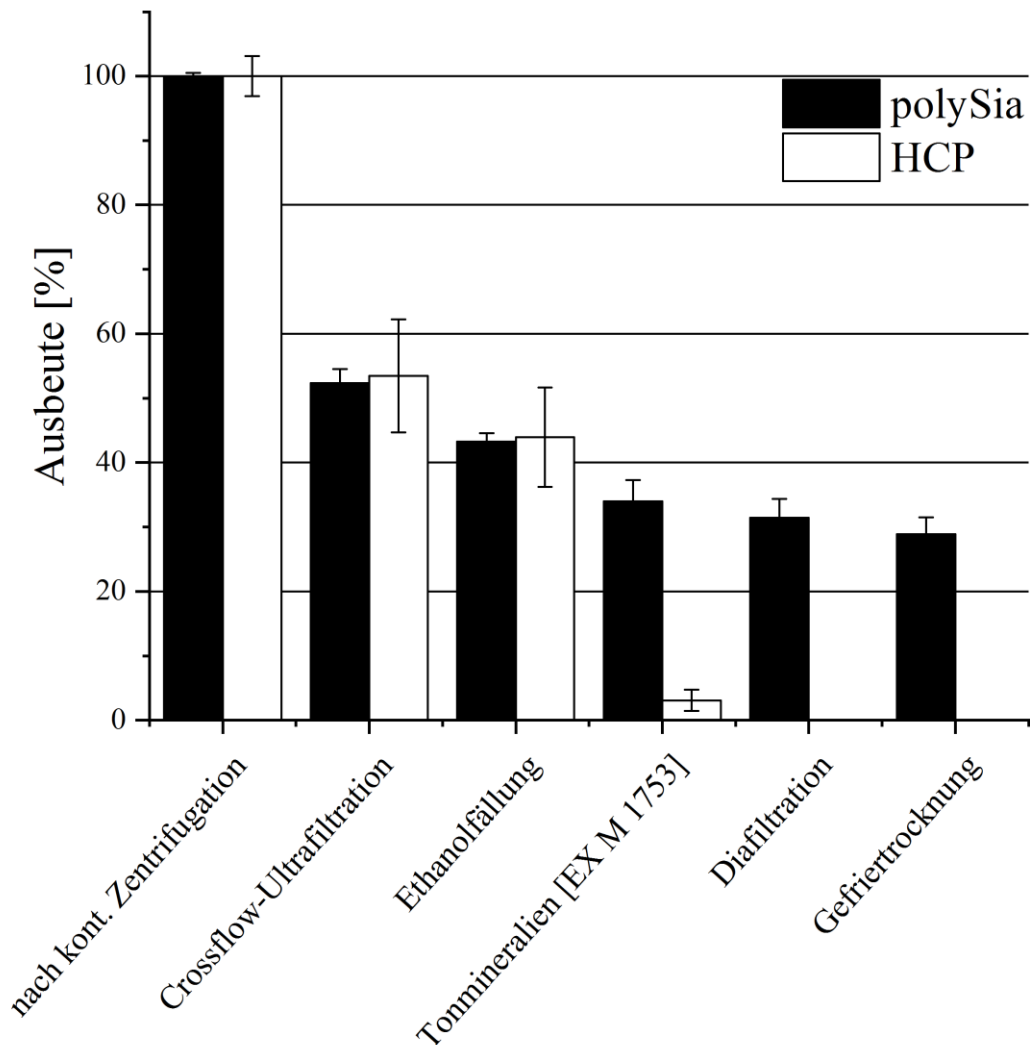


**Abbildung 14:** Schematische Darstellung des etablierten Produktionsprozesses für bakterielle polySia. Die polySia wird nach der Kultivierung der Bakterien in einem GMP-konformen Einweg-Beutelreaktor (I) aus dem Kulturüberstand gereinigt. Dabei kommen vor allem Filtrations- und Fällungstechniken zum Einsatz (II). Die NaOH-Behandlung (Schritt 7) wurde zunächst nicht durchgeführt, um negative Einflüsse auf die Strukturintegrität zu vermeiden. Das reine langkettige Material wird über eine Thermolyse in kleinere Fragmente gespalten, aus denen die pharmazeutisch relevante polySia avDP20 isoliert wird (III). Zur Erhöhung der Lagerstabilität wird das Produkt lyophilisiert; in Anlehnung an [53].

#### 4.2.1 Herstellung von langkettiger endogener polySia aus *E. coli* K1

Nach Beendigung des Kultivierungsprozesses wurde die zellhaltige Kulturbrühe im Reaktorbeutel steril für 17 h bei 8 °C gelagert, um die weitere polySia von der Zelloberfläche zu lösen [53]. Nach diesem Reifungsprozess erhöhte sich die Gesamtausbeute an polySia im Kulturüberstand um 10 % - 15 %. Die polySia-Konzentration lag bei 634 ( $\pm 13$ ) mg/L, während die Protein-Konzentration 275 ( $\pm 31$ ) mg/L erreichte. Nach der Lagerung wurden die Zellen über kontinuierliche Zentrifugation vom Produkt abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde anschließend über ein Crossflow-Ultrafiltrationssystem (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit einer Filterkassette mit einer Größenausschlussgrenze (molecular weight cut-off; MWCO) = 10 kDa aufkonzentriert. Nach diesem Prozessschritt stellte sich ein Verhältnis von etwa 0,44  $\text{g}_{\text{HCP}}/\text{g}_{\text{polySia}}$  ein. Da die Isolation der kurzkettigen polySia aus dem Permeat aufgrund der hohen Belastung mit kleineren Peptiden und Wirtszellproteinen, sowie unspezifischen Stoffwechselprodukten und restlichen Medienbestandteilen sehr schwierig ist, wird das Permeat verworfen.

Im weiteren Verlauf des Reinigungsprozesses wurden zunächst die eingetragenen HCPs aus dem Konzentrat entfernt. Dazu wurde die Prozesslösung in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit Ethanol bei einer Konzentration von 80 % (v/v) behandelt, um die HCPs auszufällen. Da sich auch die polySia im Präzipitat befand, wurde dieses nach jedem Zentrifugationsschritt im Reaktionspuffer resuspendiert. Dadurch konnte das Verhältnis weiter auf 0,3  $\text{g}_{\text{HCP}}/\text{g}_{\text{polySia}}$  reduziert werden. Die verbliebenen proteinogenen Verunreinigungen wurden anschließend durch Einsatz von Tonmineralien (EX M 1753, Clariant AG, Muttenz, Schweiz) als Adsorptionsmittel entfernt. Durch eine anschließende Sterilfiltration unter Verwendung der Crossflow-Ultrafiltrationsanlage (MWCO = 0,45  $\mu\text{m}$ ) konnten zusätzlich Partikel und Schwebstoffe abgetrennt werden. Die während des Prozesses eingetragenen Salze wurden ebenfalls über Crossflow-Diafiltration entfernt, so dass die polySia in einer wässrigen Lösung vorlag. Dabei wurde eine Filterkassette mit einem MWCO = 5 kDa eingesetzt. Zur Erhöhung der Lagerstabilität des Produktes wurde die polySia abschließend gefriergetrocknet [62].



**Abbildung 15:** Ausbeuten des Reinigungsprozesses von langkettiger polySia aus *E. coli* K1. Dargestellt sind die polySia-Ausbeuten (schwarze Balken) und die HCP-Ausbeuten (weiße Balken). Die Fehlerbalken verdeutlichen die Auswertung als Triplikate. Nach der Abtrennung der Zellen wurde die Konzentration von polySia im Kulturüberstand ermittelt und die absolute Ausgangsmenge des Produktes über das Arbeitsvolumen normiert.

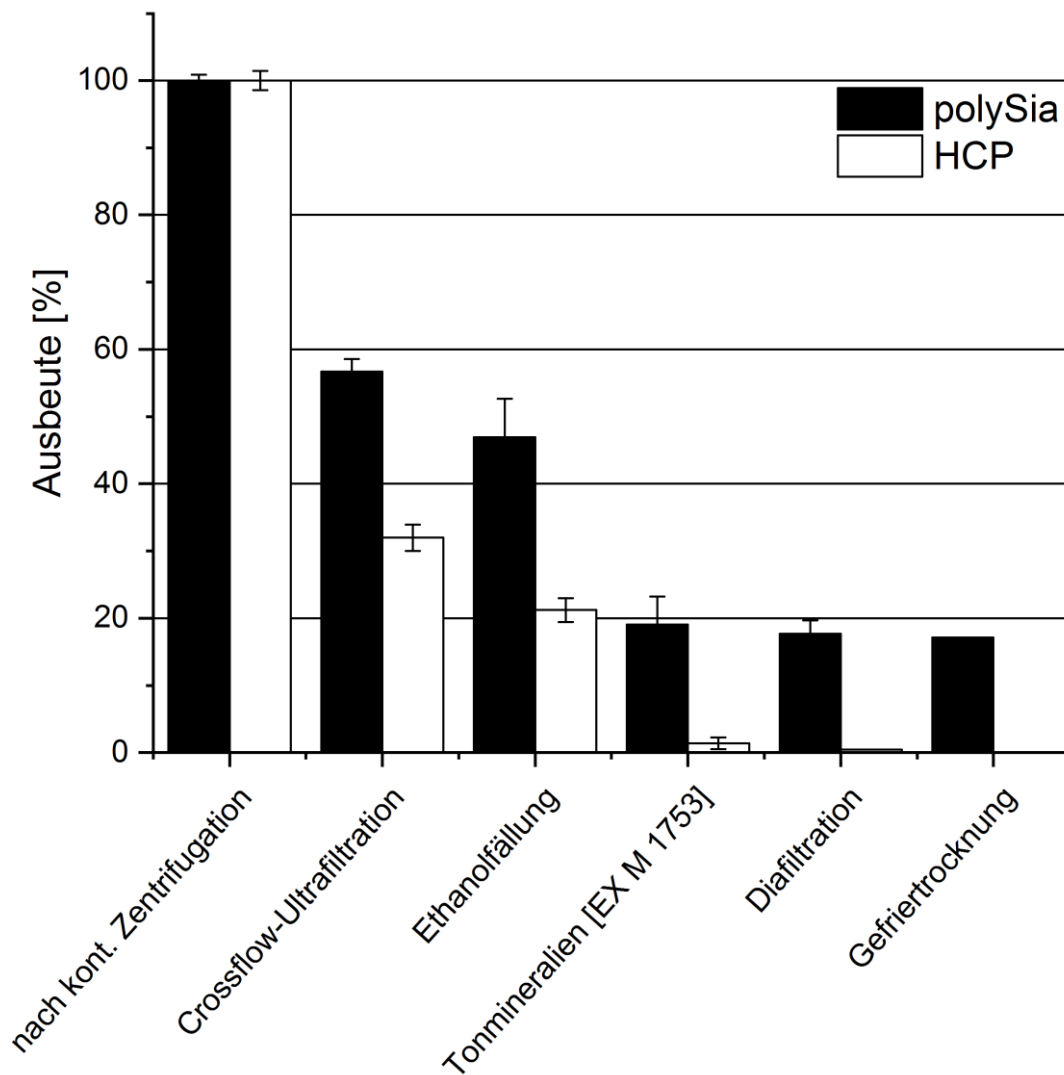
In Abbildung 15 sind die Ausbeuten von langkettiger polySia und HCP nach jedem Prozessschritt der Produktreinigung dargestellt. Aus den Ergebnissen ist erkennbar, dass bei der Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes annähernd die Hälfte des Produktes verloren ging, da polySia-Moleküle mit einer Kettenlänge aus weniger als 35 Monomeren die Membran passierten [51]. Dennoch bietet die Verwendung eines MWCO = 10 kDa eine effiziente Möglichkeit zur Abtrennung kleiner Moleküle, wie Peptide und Wirtszellproteine. Durch die folgenden Prozessschritte wurde die Belastung durch proteinogene Verunreinigungen weiter reduziert. Am Ende des Reinigungsprozesses waren keine Wirtszellproteine im Produkt mehr nachweisbar.

Die polySia-Ausbeute des verwendeten Prozesses betrug 29 ( $\pm 5$ ) % und liegt damit in einem vergleichbaren Bereich zu vorangegangenen Arbeiten [48, 62]. Dies entspricht einer absoluten

Menge von  $4,5 (\pm 0,5)$  g reiner polySia aus 25 L Kultur von *E. coli* K1. Aufgrund der höheren Zelldichten zum Ende der Kultivierung lag auch die Konzentration der Endotoxine mit  $2,08 \times 10^8$  EU/mg<sub>polySia</sub> signifikant höher als in der Literatur beschrieben [62]. Das Endprodukt wies eine Belastung von über  $1 \times 10^5$  EU/mg<sub>polySia</sub> auf, was dadurch zu erklären ist, dass während des Prozesses keine alkalische Lyse und Applikation von Anionenaustauschern zur Verringerung der Konzentration von Endotoxinen durchgeführt wurden [53].

#### 4.2.2 Reinigungsprozess für langkettige polySia aus rekombinanten *E. coli* BL21

Die mittels der rekombinanten *E. coli* BL21-Stämme produzierte  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia wurde über den gleichen Reinigungsprozess aus der Kulturbrühe des 25 L-Einweg-Beutelreaktors (siehe Kapitel 4.2.1) isoliert und gereinigt.



**Abbildung 16:** Ausbeuten des Reinigungsprozesses von langkettiger  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pKT774. Dargestellt sind die polySia-Ausbeuten (schwarze Balken) und die HCP-Ausbeuten (weiße Balken). Die Fehlerbalken verdeutlichen die Auswertung als Triplikate. Auch hier wurde die Ausgangsmenge nach der Zellseparation über die polySia-Konzentration und das Arbeitsvolumen normiert.



Abbildung 16 verdeutlicht, dass auch bei der Aufreinigung der heterologen polySia nahezu 50 % der Ausgangsmenge an polySia im Kulturüberstand nach der Aufkonzentrierung verloren ging. Interessanterweise kam es auch bei der Behandlung der heterologen polySia mit den adsorbierenden Tonmineralien zu signifikanten Produktverlusten. Dabei reduzierte sich die Produktmenge von 48 % auf 19 % der ursprünglich vorhandenen polySia. Bei der Aufreinigung der heterologen  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* BL21 pKT274 und der  $\alpha$ 2,9-polySia aus *E. coli* BL21 pKT274-synE waren die Produktverluste nach diesem Schritt noch größer. Die Konzentrationen von HCP und DNA lagen im finalen Produkt unterhalb der Nachweisgrenze. Am Ende des Reinigungsprozesses wurden für alle rekombinanten Stämme Ausbeuten zwischen 8 % und 15 % erzielt. Dies entspricht einer absoluten Menge von lediglich 91 mg bis 300 mg polySia nach der Trocknung. Die geringen Ausbeuten sind auch auf die deutlich niedrigeren polySia-Konzentrationen im Kulturüberstand aller rekombinanten Produktionsstämme im Vergleich zu *E. coli* K1 zurückzuführen. Dennoch konnte für jeden rekombinanten Produktionsstamm eine ausreichende Menge polySia aufgereinigt werden, um diese nachfolgend zu charakterisieren. Auf eine Endotoxin-Analytik wurde aus Kostengründen verzichtet, da die Produktausbeuten der rekombinanten Stämme zu diesem Zeitpunkt nicht rentabel für einen großtechnischen Prozess waren.

### 4.2.3 Thermische Hydrolyse im Prozessmaßstab

Zur anschließenden Herstellung der pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 wurde die langkettige polySia aus *E. coli* K1 verwendet und über eine Thermolyse in kleinere Fragmente gespalten. Dazu wurde die gereinigte polySia zunächst in einer wässrigen Lösung für 7 h bei 65 °C inkubiert. Die Isolation des Zielproduktes polySia avDP20 erfolgte über eine Fraktionierung der Fragmente mit unspezifischer Kettenlänge mit einem Anionenaustauscher. Zur Elution wurde eine kürzlich entwickelte Methode verwendet, bei der die Konzentration des verwendeten Ammoniumhydrogencarbonats in drei Stufen schrittweise von 0,28 M auf zuerst 0,35 M und dann auf 1 M erhöht wird. Die Methode ermöglicht die Isolation von polySia in einem Kettenlängenbereich von DP20  $\pm$  8. Das eluierte Material wurde anschließend in Gegenwart von Ammoniumhydrogencarbonat gefriergetrocknet, da das Salz in wässriger Umgebung in CO<sub>2</sub> und Ammoniak zerfällt und rückstandsfrei verdampft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode erstmals, basierend auf den in vorangegangenen Arbeiten definierten Bedingungen [48], im prozesstechnischen Maßstab durchgeführt.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Thermolyse zusammengefasst. Während der Thermolyse reduzierte sich die maximale Kettenlänge des Ausgangsmaterials von  $DP > 92$  auf  $DP 74$ . Während der Inkubation konnten keine Produktverluste z. B. durch Siedeeffekte des Wassers beobachtet werden. Durch die Elution konnte die Zielfraktion in einem Kettenlängenbereich von  $DP 21 \pm 4$  isoliert werden. Insgesamt wurden in dieser Fraktion  $155 \pm 4$  mg polySia gesammelt, was einer Produktausbeute von 10 % entspricht. Die Wiederfindungsrate nach der chromatographischen Separation der verschiedenen Kettenlängen lag bei  $> 97$  %. Interessanterweise war eine Quantifizierung der polySia-Konzentration über den konventionellen 2-Thiobarbitursäure (TBA)-Assay für die dritte Fraktion nicht möglich. Wahrscheinlich wurde der Assay durch die hohe Salzkonzentration gestört, weshalb die Auswertung über Auswiegen der getrockneten polySia erfolgte. Zudem wies diese Fraktion Reste des zur Elution verwendeten Salzes auf, das während der Trocknung nicht vollständig entfernt wurde.

**Tabelle 4:** Übersicht der Ergebnisse der prozesstechnischen Fraktionierung von kurzkettiger polySia.

<b>Fraktion</b>	<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> [M]</b>	<b>max. DP</b>	<b>DP mit max. Intensität</b>	<b>Masse [mg]</b>	<b>Ausbeute [%]</b>
0	0	>92	>92	1.498	100
1	0,28	18	$10 \pm 2$	$170 \pm 4$	12
2	0,35	25	$15 \pm 1$	$155 \pm 4$	10
3	1	74	$31 \pm 3$	1.132	76

### **4.3 Entwicklung einer neuen Aufreinigungsstrategie für langkettige polySia**

Durch den in Kapitel 4.2 beschriebenen Reinigungsprozess konnte langkettige polySia erfolgreich isoliert und aufgereinigt werden. Die während der Kultivierung eingetragenen proteinogenen Verunreinigungen und DNA können effizient über eine Kombination aus Fällung mit Ethanol und Behandlung mit Tonmineralien vom Zielprodukt entfernt werden. Der Prozess liefert Ausbeuten im Bereich von 25 % - 33 % an reiner polySia.

Die Konzentration von Endotoxinen ist jedoch sehr hoch, so dass die Produktqualität noch nicht ausreichend ist, um einen sicheren Einsatz im medizinischen Sektor zu gewährleisten. Außerdem müssen alle Schritte des Prozesses den Richtlinien des GMP nachkommen, um eine Zulassung von polySia zu präklinischen Studien zu gewährleisten. Insbesondere der Einsatz von adsorbierenden Tonmineralien könnte von den Aufsichtsbehörden als kritischer Schritt in einer späteren GMP-konformen polySia-Herstellung eingestuft werden. Bei den verwendeten Tonmineralien handelt es sich um Naturprodukte, welche Chargen-bedingten Schwankungen unterliegen [62]. Somit kann der Hersteller der Tonmineralien keine gleichbleibende Qualität des Materials gewährleisten. Dieses Problem überträgt sich auch auf den pharmazeutischen Unternehmer bzw. den Herstellungsprozess und die Qualität des potenziellen Pharmazeutikums. Schlussendlich ist so auch der Patientenschutz nicht ausreichend gewährleistet. Zusätzlich zeigte sich bei der Reinigung der heterologen polySia, dass dieser Prozessschritt eine Optimierung erfordert, da die Adsorption zu erheblichen Ausbeuteverlusten führte (siehe Kapitel 4.2.2). Außerdem können die vorhandenen HCPs durch die Ethanol-fällung nur unvollständig aus der Prozesslösung entfernt werden.

Aus diesen Gründen wurden im Rahmen weiterer Versuche neue Verfahren und Methoden für die polySia-Aufreinigung untersucht. Neben der GMP-Konformität der Methoden sollte das Endprodukt pharmazeutische Qualität aufweisen. Neben einer Salzfällung wurde unter anderem die Verwendung von Hydrophoben-Interaktions- und salztoleranten Anionenaustausch-Membranadsorber-Modulen zur Entfernung von Proteinen und Endotoxinen in Betracht gezogen.

### **4.3.1 Optimierung der Crossflow-Ultrafiltration**

Filtrationsprozesse sind einfache und preiswerte Verfahren in der biotechnologischen Aufarbeitung, um Zielprodukte aus einem unspezifischen Gemisch zu separieren. Auch in der polySia-Herstellung wurde ein Ultrafiltrationsverfahren etabliert, bei dem ein MWCO = 10 kDa verwendet wird [49, 51, 53]. Langkettige polySia ( $DP > 90$ ) besitzt eine hohe Wasserbindungskapazität und vergrößert über die daraus resultierenden Hydrathülle seine tatsächliche Molekülgröße um ein Vielfaches [88]. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob durch Verwendung einer größeren Trenngröße die Aufkonzentrierung der Prozesslösung optimiert werden kann.

Zur Optimierung der Ultrafiltration wurde zellfreier Kulturüberstand über eine Crossflow-Ultrafiltrationsanlage aufkonzentriert. Dabei wurde je eine Fraktion zellfreier Kulturüberstand bei dem etablierten MWCO = 10 kDa und dem nächstgrößeren MWCO = 30 kDa filtriert. Zur Beurteilung der Effizienz wurden die Prozessproben über den TBA-Assay und den Bradford-Assay analysiert.

Die Verwendung der zwei verschiedenen Trenngrößen resultierte in vergleichbaren Ausbeuten von polySia. Nach der Filtration mit MWCO = 10 kDa waren noch 67 % der Ausgangsmenge an polySia bei einem HCP-Restgehalt von 63 % vorhanden. Währenddessen wurden bei MWCO = 30 kDa etwa 60 % der Ausgangsmenge zurückgehalten. In dieser Fraktion wurde die Belastung durch HCP auf 44 % reduziert. Der Einsatz der größeren Trenngröße resultierte auch in einem langsameren Verblocken der Membran, wodurch die Arbeitszeit des Prozessschrittes aufgrund höherer Flussraten effektiv um 2 – 3 h gegenüber der Verwendung eines MWCO = 10 kDa reduziert wurde.

### **4.3.2 Entfernung von proteinogenen Verunreinigungen**

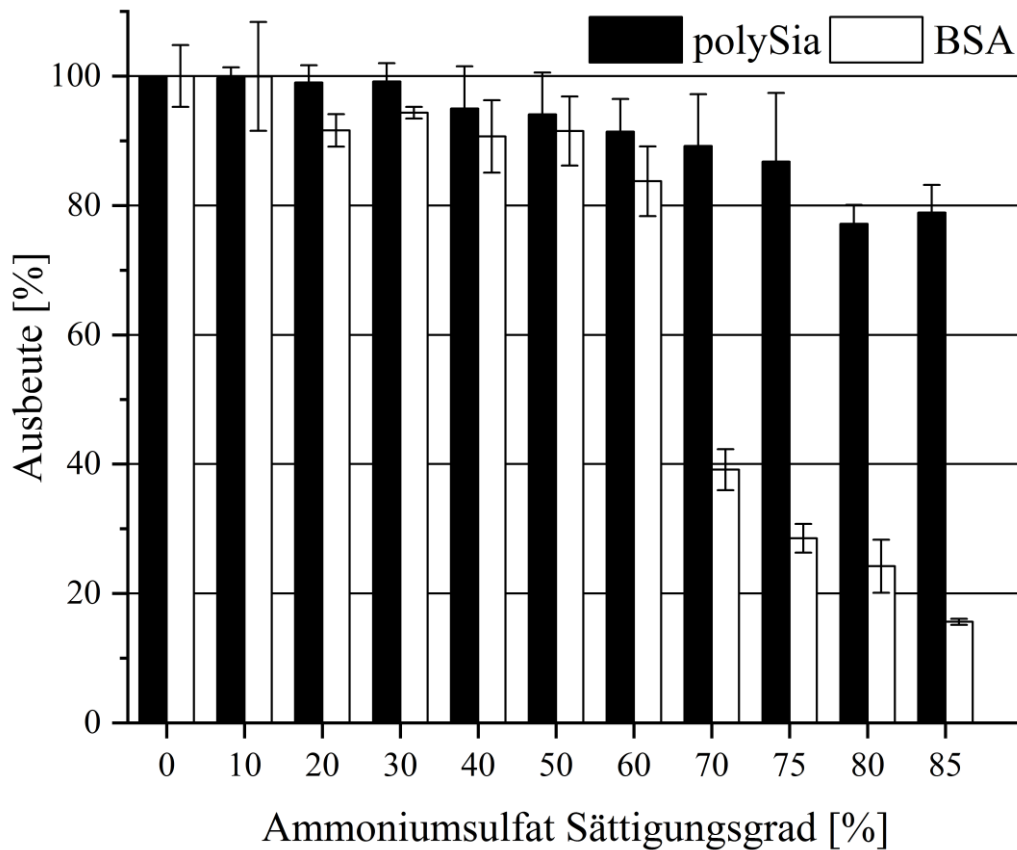
Für den eigenen Metabolismus und das Zellwachstum exprimieren Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Einige dieser zelleigenen Proteine können allerdings eine schädigende Wirkung auf die menschliche Gesundheit haben. Insbesondere bei der Herstellung von medizinisch relevanten Produkten müssen alle unerwünschten proteinogenen Nebenprodukte während des Reinigungsprozesses aus dem Zielprodukt vollständig entfernt werden. Die Reinigungsmethoden dürfen dabei keine gesundheitlichen Risiken bergen und müssen reproduzierbare Produktqualitäten gewährleisten. Da die als Adsorber verwendeten Tonmineralien Chargen-bedingten Qualitätsunterschieden unterliegen, wurden in diesem Kapitel alternative Methoden zur Entfernung von HCPs bei der polySia-Produktion getestet.

#### 4.3.2.1 Ammoniumsulfatfällung

Fällungsprozesse werden oft zu Beginn eines Reinigungsprozesses eingesetzt, um die groben Verunreinigungen zu entfernen. Neben organischen Lösemitteln können auch verschiedene Salze eingesetzt werden. Für Proteinfällungen ist Ammoniumsulfat aufgrund seiner kosmotropen Eigenschaft, der hohen Löslichkeit und geringen Kosten das Mittel der Wahl. Kosmotrope Salze fördern Proteinaggregation am effektivsten und begünstigen somit das Aussalzen, während chaotrope Salze sogar die Löslichkeit des Proteins erhöhen können [89]. Ein weiterer Vorteil von Ammoniumsulfat im Hinblick auf eine GMP-konforme Produktion von polySia ist, dass es sich hierbei nicht um ein Gemisch verschiedener Salze handelt und somit eine definierte Qualität gewährleistet ist.

Die Proteinfällung durch Ammoniumsulfat wurde als alternative Methode zur Entfernung von HCPs getestet. Dazu wurde ein Probenvolumen von 10 mL wässriger Lösung mit 1 g/L polySia und 1 g/L bovinem Serumalbumin (BSA), welches häufig als Modellprotein verwendet wird, mit verschiedenen Konzentrationen von festem Ammoniumsulfat versetzt. Nachdem sich das Salz unter Rühren vollständig löste, wurden gebildete Aggregate über Zentrifugation abgetrennt. Der Probenüberstand wurde anschließend über den TBA-Assay und den Bradford Assay vermessen, um Einflüsse der unterschiedlichen Sättigungsgrade auf polySia und Wirtszellproteine zu ermitteln.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, nahm die Menge an polySia und BSA im Probenüberstand bis zu einem Sättigungsgrad von 60 % ( $\cong 390 \text{ g/L} \approx 3 \text{ M}$ ) nur geringfügig ab. Eine weitere Erhöhung des Sättigungsgrades auf 70 % reduzierte die Proteinmenge im Überstand drastisch auf 39 % der Ausgangsmenge. Bei einem Sättigungsgrad von 85 % befanden sich lediglich noch 17 % der Ausgangsmenge im Überstand. Allerdings nahm ab einem Sättigungsgrad von 80 % auch die Konzentration der polySia im Überstand erkennbar ab, wodurch nur noch 78 % der ursprünglichen polySia im Überstand detektierbar waren. Hier liegt die Vermutung nahe, dass kurzkettige polySia, bei der die Hydrathülle weniger stark ausgeprägt ist, mit dem Protein aggregieren. Allerdings erlaubt der TBA-Assay keine Quantifizierung der Kettenlänge.



**Abbildung 17:** Ausbeuten der polySia bei verschiedenen Sättigungsgraden von Ammoniumsulfat. Dargestellt sind die polySia-Ausbeuten (schwarze Balken) und die HCP-Ausbeuten (weiße Balken). Die Fehlerbalken verdeutlichen die Auswertung als Triplikate.

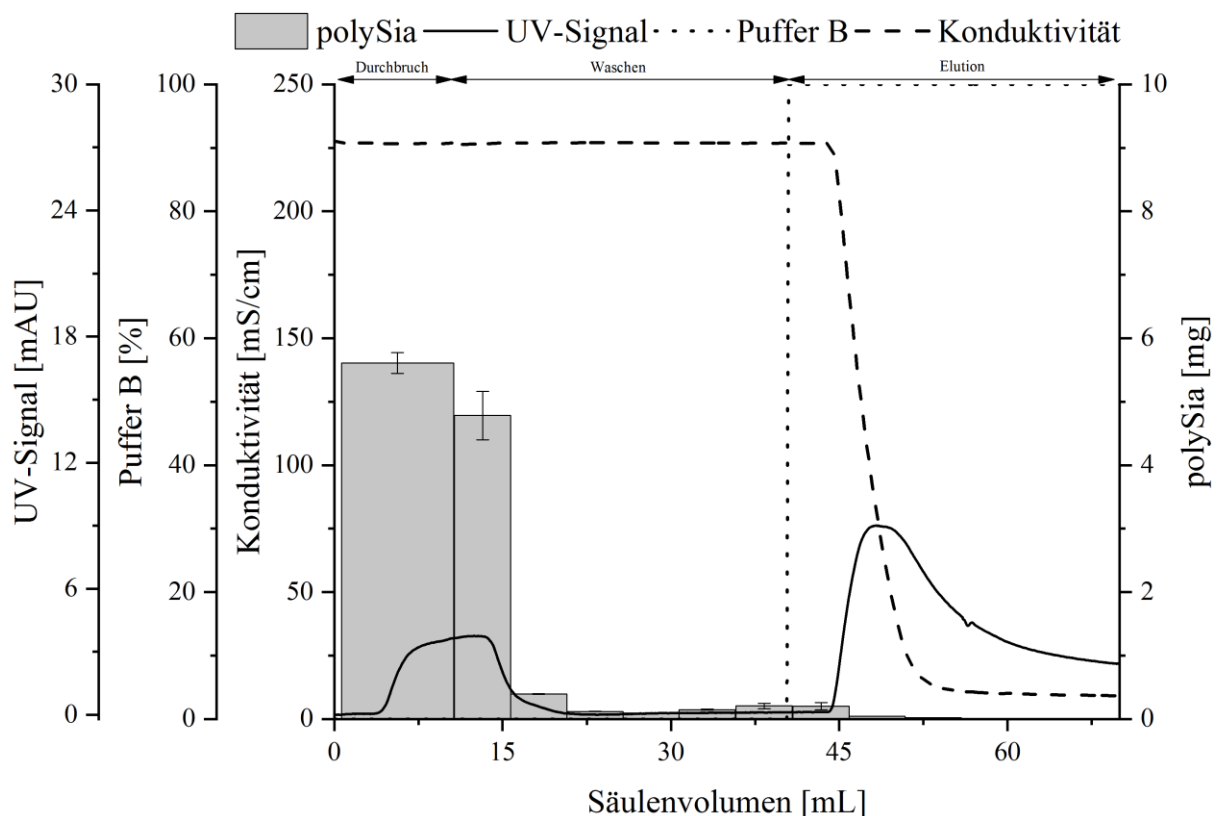
Der Versuch lieferte die Erkenntnis, dass ein vergleichsweise hoher Sättigungsgrad von 75 % ( $\approx 520 \text{ g/L} \approx 4 \text{ M}$ ) Ammoniumsulfat zur Ausfällung der proteinogenen Anteile in der Probenlösung notwendig ist. Im Gegensatz zur Ethanol-fällung verbleibt die polySia in Gegenwart dieser Salzkonzentrationen im Überstand und wird nicht zusammen mit den Wirtszellproteinen ausgefällt. Dies erlaubt eine bessere Trennung ohne das Produkt anschließend resuspendieren zu müssen.

Im nächsten Schritt wurde konzentriertes Retentat nach der Crossflow-Ultrafiltration (MWCO: 30 kDa) mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Analyse des Überstandes ergab, dass noch 84 % der Ausgangsmenge von polySia noch im Überstand vorhanden waren. Gleichzeitig wurde die absolute Menge an HCPs auf 15 % reduziert. Bei erfolgreicher Fällung war der Überstand anschließend klar. Allerdings waren die Ergebnisse im 25 L-Prozessmaßstab nicht konsistent reproduzierbar, wodurch die Methode als unzuverlässig eingestuft wurde.

### 4.3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Neben Fällungsmethoden werden in industriellen Herstellungsprozessen auch verschiedene chromatographische Trennverfahren (Ionenaustauscher-, Größenausschluss-, Affinitäts- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie) verwendet. Dabei stellen vor allem Membranadsorber eine attraktive Alternative gegenüber der konventionellen Säulenchromatographie dar, denn Membranadsorber zeichnen sich durch hohe Massentransferraten bei akzeptablen dynamische Bindungskapazitäten aus [90]. Zusätzlich sind sie einfach skalierbar und reduzieren Anschaffungs- und Prozesskosten. Als Einweg-Elemente sind Membranadsorber auch in der GMP-konformen Produktion akzeptiert [91]. In der polySia-Herstellung bietet die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Membranadsorbern neue Möglichkeiten zur effizienten Entfernung von HCPs nach den Vorgaben des GMP.

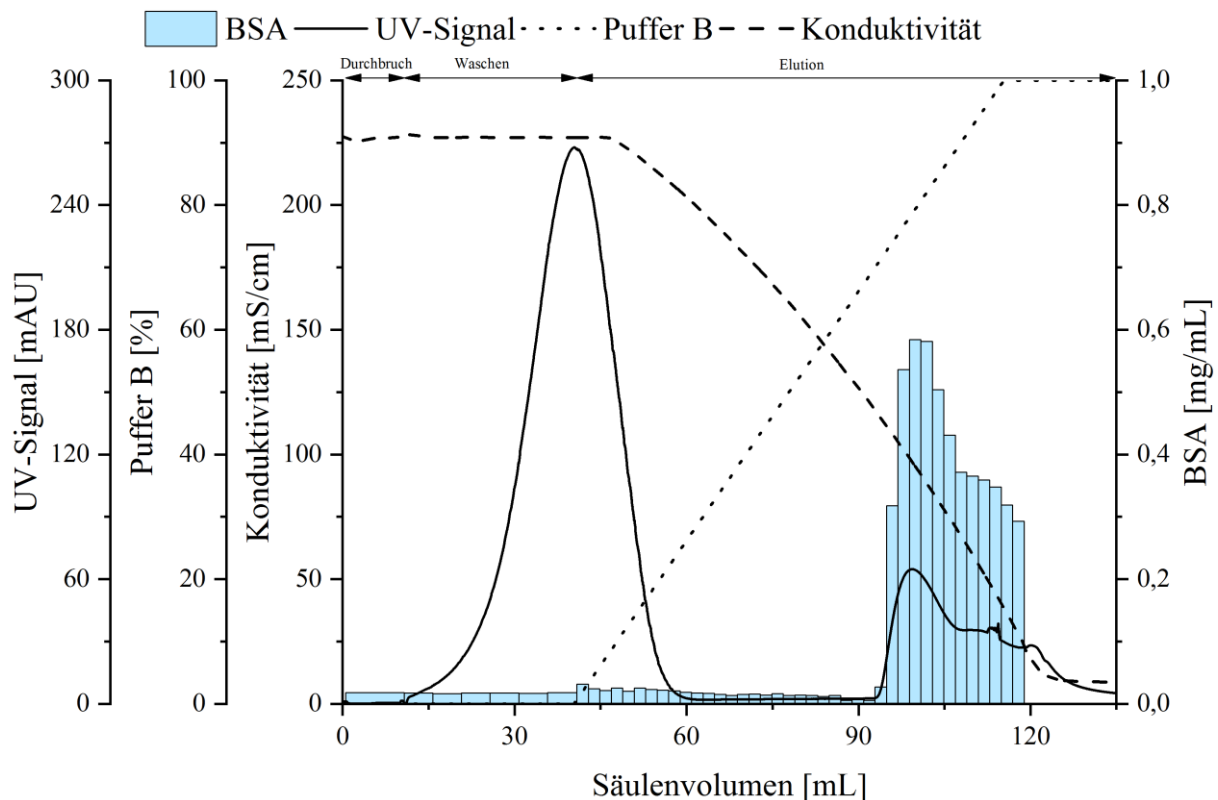
Die Evaluation der HIC wurde zunächst für langkettige polySia (DP > 90) in einem FPLC-System mit einem Sartobind® Phenyl nano (Membranfläche: 110 cm<sup>2</sup>, CV: 3 mL) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 50 mM Kaliumphosphat (KPP)-Puffer pH 7 mit 2 M Ammoniumsulfat verwendet. Zur Elution wurde ein 50 mM KPP-Puffer ohne Ammoniumsulfat verwendet. Das Modul wurde mit einem Probenvolumen von 10 mL mit 1,16 mg/mL polySia beladen.



**Abbildung 18:** Chromatogramm des HIC-Membranadsorbers für polySia. Die Auswertung der offline-Proben (graue Balken) zeigte, dass die polySia vollständig im Durchfluss isoliert wurde. Der Anstieg des UV-Signals während der Elution deutet auf eine Verunreinigung durch unspezifische Proteine hin.

Die Analyse der Probe mittels TBA-Assay zeigte, dass die langkettige polySia erwartungsgemäß nicht an den Liganden des Adsorbers gebunden hat und im Durchfluss isoliert wurde. Die Wiederfindungsrate lag bei > 94 %. Das Chromatogramm in Abbildung 18 zeigte außerdem einen Elutionspeak, nachdem die Ionenstärke reduziert wurde (45 - 50 mL). Die geringe Intensität des Signals ließ vermuten, dass in der Probe noch geringste Mengen an undefinierten proteinogenen Verunreinigungen wie kleine Peptide oder UV-absorbierende Metabolite vorhanden waren. Die Probenanalytik über den Bradford-Assay erbrachte keinen eindeutigen Beweis.

Im nächsten Schritt wurde das Bindungs- und Elutionsverhalten mit BSA als Modellprotein untersucht. Dazu wurde der Membranadsorber mit 10 mL einer 1,21 g/L BSA-Lösung beladen und über einen linearen Gradienten eluiert. Alle Puffer und Einstellungen wurden aus der oben aufgeführten Evaluierung für polySia übernommen.



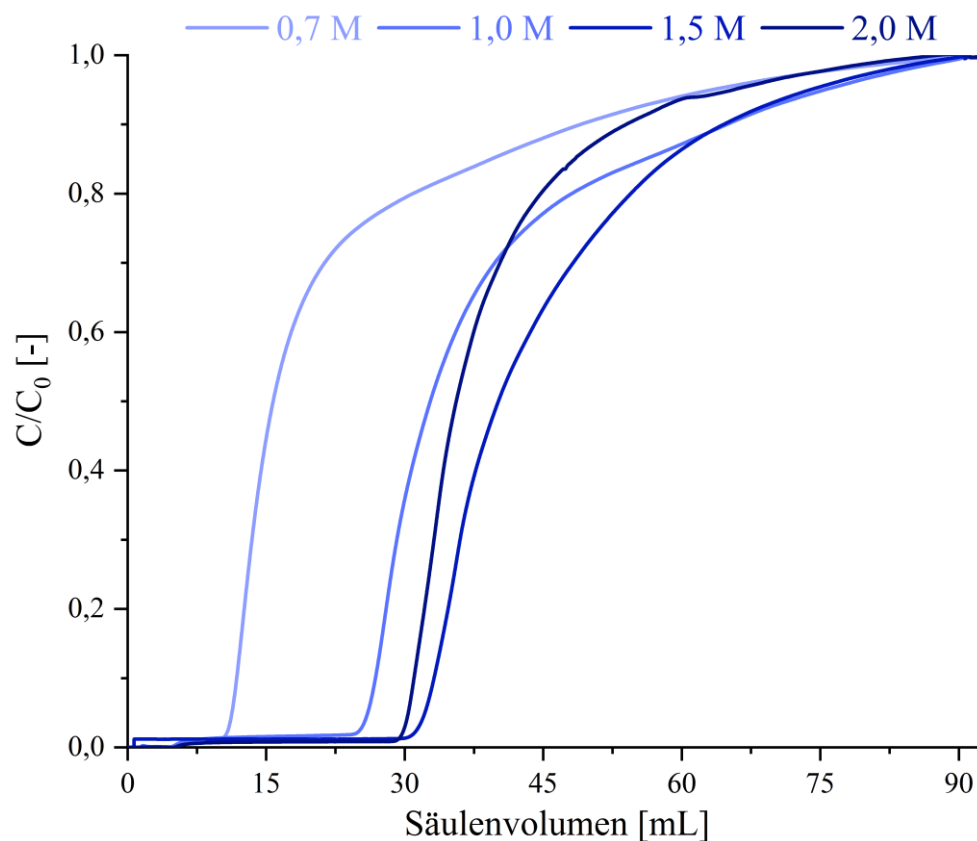
**Abbildung 19:** Evaluierung des HIC-Membranadsorbers für BSA. Die Auswertung der offline-Proben (blaue Balken) zeigte, dass das BSA zunächst vollständig an die Membran adsorbiert wurde. Zur anschließenden Elution wurde ein isokratischer Gradient verwendet, wobei die Ionenstärke kontinuierlich abgesenkt wurde.

Das in Abbildung 19 dargestellte Chromatogramm des FPLC-Laufes zeigt, dass die eingesetzte Menge an BSA vollständig bei den hohen Ionenstärken gebunden und auch nicht im Waschschrift eluiert wurde. Die Elution erfolgte zwischen 70 % Puffer B



(0,6 M Ammoniumsulfat) und 100 % Puffer B. Die Analytik der Proben über den Bradford-Assay bestätigte die Elution des Proteins. Allerdings betrug die Wiederfindungsrate lediglich  $> 85 \%$ . Vermutlich gingen die restlichen Mengen des aufgetragenen BSA beim anschließenden Reinigungsschritt verloren.

Zur weiteren Optimierung der Applikation des HIC-Membranadsorbers wurden die dynamischen Bindungskapazitäten für Proteine bei vier unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumsulfat bestimmt, um die optimale Salzkonzentration zu bestimmen, bei der die größte HCP-Menge mit der Membran gebunden werden kann. Der Sartobind® Phenyl-Adsorber wurde dazu für jede Salzkonzentration mit einem Probenvolumen von 90 mL mit 0,94 mg/mL überladen.



**Abbildung 20:** Durchbruchskurven von BSA des Sartobind® Phenyl bei verschiedenen Salz-Konzentrationen. Alle FPLC-Läufe wurden bei neutralem pH 7 durchgeführt.

Eine Übersicht der ermittelten maximalen dynamischen Bindungskapazitäten ist in Abbildung 20 gezeigt. Bei 0,7 M Ammoniumsulfat betrug die maximale dynamische Bindungskapazität  $0,087 \pm 0,002 \text{ mg/cm}^2$ . Der geringe Wert ist darauf zurückzuführen, dass die Salzkonzentration nur 10 % über der Grenzkonzentration von 0,6 M Ammoniumsulfat liegt, bei welcher die Proteine eluieren (siehe Abbildung 18). Die höchste dynamische Bindungskapazität wurde mit

$0,254 \pm 0,012$  mg/cm<sup>2</sup> für 1,5 M Ammoniumsulfat ermittelt. Bei einer Konzentration von 2 M Ammoniumsulfat kam es vermutlich zu Aggregation, wodurch sich die dynamische Bindungskapazität auf  $0,248 \pm 0,07$  mg/cm<sup>2</sup> reduzierte. Daher wurde für alle weiteren Versuche ein KPP-Puffer mit 1,5 M Ammoniumsulfat verwendet.

Nach der Validierung der Puffer-Bedingungen für den HIC-Adsorber wurde die Größe des Moduls für die Reinigung von polySia in den Prozessmaßstab aufskaliert. Für die Produktion wurde ein Sartobind® Phenyl 150 mL-Modul (Membranfläche: 5.500 cm<sup>2</sup>, CV: 150 mL) bei einer Flussrate von 150 mL/min verwendet. Als Prozessprobe wurde Crossflow-Retentat mit 2,79 g/L polySia und 0,46 g/L HCP verwendet, welches zuvor gegen 50 mM KPP-Puffer pH 7 diafiltriert wurde. Das Ammoniumsulfat wurde unmittelbar vor der Beladung des Moduls zugegeben. Die Beladung erfolgte unter Berücksichtigung der maximalen dynamischen Bindungskapazität ( $0,254 \pm 0,012$  mg/cm<sup>2</sup>). Die Wiederfindungsrate für polySia lag bei > 97 % während die Proteinbelastung auf < 4 % reduziert werden konnte. Dies entsprach einem Verhältnis von < 0,001 g<sub>HCP</sub>/g<sub>polySia</sub>. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von HIC-Membranen HCPs mit einer vergleichbaren Effizienz wie die Kombination aus Ethanol-fällung und Tonmineraladsorber entfernt, dabei jedoch zu geringeren Produktverlusten führt.

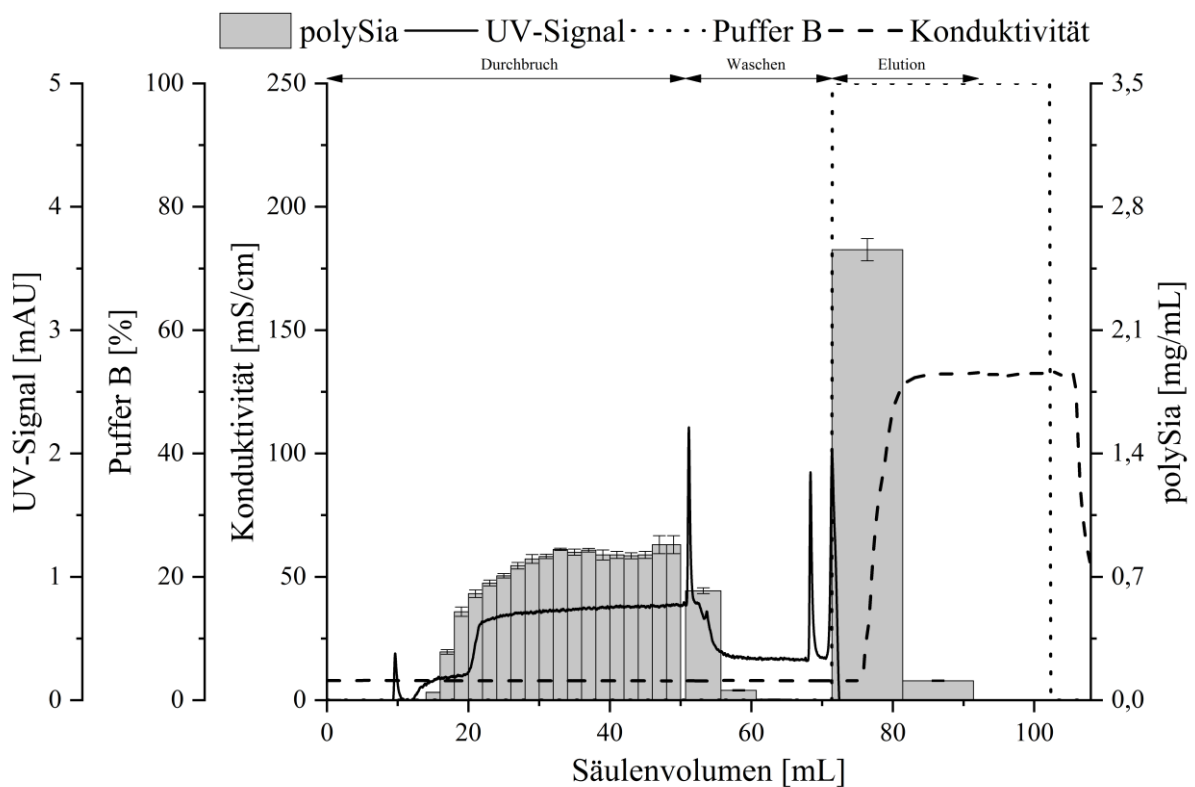
### 4.3.2.3 Salztolerante Anionenaustauscher

Neben HIC-Membranen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Sartobind® STIC-Membranadsorber zur Entfernung von HCP während der Aufreinigung von polySia getestet. Diese Membranen wurden spezifisch für die salztolerante Interaktionschromatographie (STIC) entwickelt. Als Ligand wird ein primäres Amin (PA) verwendet, wodurch die Bindung negativ geladener Moleküle bei höheren Salzkonzentrationen als von konventionell verwendeten starken Anionenaustauschern z. B. Q-Membranen bekannt möglich ist. Darüber hinaus hat der PA-Ligand auch die Eigenschaft polyvalente Anionen wie Phosphate zu binden [92]. Untersuchungen zeigten, dass Phosphat-haltige Puffer bereits in geringsten Konzentrationen (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) die Bindungskapazität von Proteinen an die STIC-Membran um über 90 % reduzieren [93]. Diese Eigenschaft ist für die polySia-Herstellung von Vorteil, um vorhandene HCPs im Durchfluss zu isolieren und das Polymer gleichzeitig mit der Membran zu binden.

Die Validierung der STIC-Membran für die polySia-Herstellung wurde im FPLC-System mit einem Sartobind® STIC nano (Membranfläche: 36,4 cm<sup>2</sup>, CV: 1 mL) durchgeführt. Zunächst wurde das Bindungs- und Elutionsverhalten von langkettiger polySia (DP > 92) untersucht. Für

die Versuche wurde der vom Hersteller empfohlene 20 mM KPP-Puffer pH 7 verwendet. Das Modul wurde mit einem Probenvolumen von 10 mL 1,12 mg/mL polySia beladen. Die Elution der polySia erfolgte mit 1,5 M Ammoniumsulfat über einen linearen Gradienten. Die polySia eluiert in einem Bereich von 20 % Puffer B (0,3 M Ammoniumsulfat) bis 56 % Puffer B (0,85 M Ammoniumsulfat), wobei die Wiederfindungsrate bei > 92 % lag (Ergebnisse nicht gezeigt).

Anschließend wurde die maximale Bindungskapazität für polySia bestimmt. Dazu wurde das Modul mit einem Probenvolumen von 50 mL mit 1,24 mg/mL polySia überladen. Zur Elution wurde 1 M Ammoniumsulfat verwendet. Das Chromatogramm des Laufes ist in Abbildung 21 gezeigt.

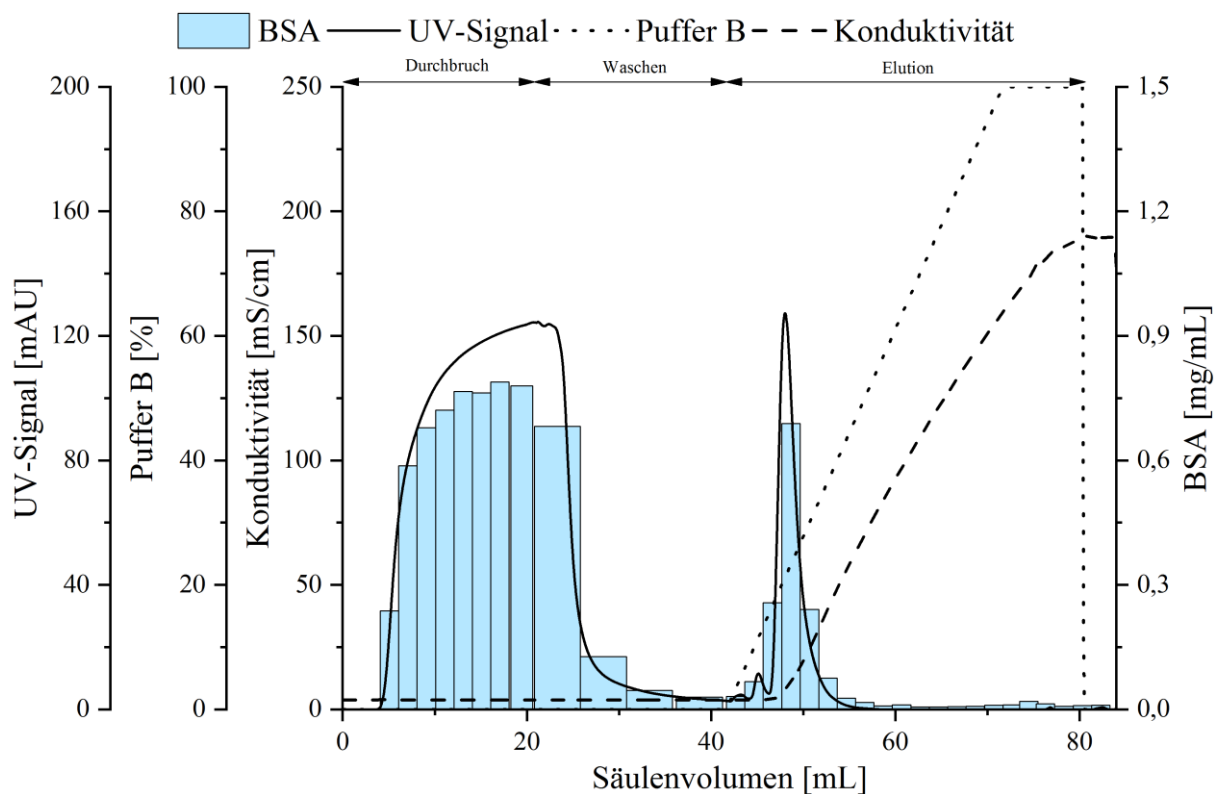


**Abbildung 21:** Validierung des STIC-Membranadsorbers für polySia in KPP-Puffer. Die Beladung des Membranadsorbers erfolgte bei neutralem pH 7.

Durch die gezielte Überladung des Moduls ging der Großteil der polySia im Durchfluss verloren. Für den Sartobind® STIC wurde eine maximale dynamische Bindungskapazität von  $0,56 \pm 0,02$  mg/cm<sup>2</sup> polySia ermittelt. Im Vergleich zu den bisher verwendeten Q-Membranen (dynamische Bindungskapazität:  $0,25 \pm 0,03$  mg/cm<sup>2</sup> polySia [62]) konnte somit über 114 % mehr polySia an die Membran gebunden werden. Da beschrieben ist, dass negativ geladene Moleküle wie DNA bei mehrfacher Verwendung des Membranadsorbers nicht mehr

vollständig eluiert werden, wurden insgesamt vier Läufe im FPLC-System durchgeführt. Dabei konnte keine Reduktion der maximalen dynamischen Bindungskapazität für polySia festgestellt werden. Pro Lauf wurden 27,5 mg - 29 mg polySia eluiert. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die verwendete polySia bereits vollständig von Verunreinigungen befreit war und die dynamische Bindungskapazität somit nicht durch DNA beeinflusst wurde.

Im nächsten Schritt wurde das Bindungs- und Elutionsverhalten für die STIC-Membran im FPLC-System untersucht. Die Evaluierung wurde mit dem zuvor verwendeten KPP-Puffer pH 7 unter erneuter Verwendung von BSA als Modellprotein durchgeführt. Dazu wurde das Modul mit einem Probenvolumen von 10 mL mit 0,92 mg/mL BSA beladen. Die Elution des Modellproteins erfolgte mit 1,5 M Ammoniumsulfat über einen linearen Gradienten.



**Abbildung 22:** Validierung des Sartobind® STIC-Membranadsorbers für BSA in KPP-Puffer. Die Auswertung der offline-Proben (blaue Balken) zeigte, dass der größte Anteil des BSA im Durchfluss isoliert wurde. Zur anschließenden Elution wurde ein linearer Gradient verwendet, wobei die Ionenstärke kontinuierlich erhöht wurde.

Das in Abbildung 22 dargestellte Chromatogramm des FPLC-Laufes zeigt einen großen Elutionspeak während der Beladung des Adsorbers (5 bis 25 mL), der durch den anschließenden Waschschritt ein starkes Tailing zeigte. Das Chromatogramm wies zwischen 0 % Puffer B und 25 % Puffer B (0,35 M Ammoniumsulfat) einen weiteren Elutionspeak auf. Über den Bradford-Assay konnte BSA in den Proben der entsprechenden Peaks nachgewiesen werden. Insgesamt wurden > 82 % der zu Beginn eingesetzten Proteinmenge im Durchfluss isoliert. In den

Elutionsfraktionen wurden  $> 16\%$  des eingesetzten BSA nachgewiesen, so dass die Gesamtwiederfindungsrate bei  $> 98\%$  lag. Unter den gewählten Bedingungen konnte im Vergleich zur HIC-Membran weniger Protein von der polySia abgetrennt werden. Allerdings kann die Effektivität dieser Methode über eine Erhöhung der Phosphat-Konzentration verbessert werden. Zugleich wird die polySia an die Membran gebunden und kann anschließend gezielt eluiert werden, wodurch ein späteres Umpuffern nicht erforderlich ist.

### 4.3.3 Entfernung von Endotoxinen

Endotoxine sind Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien wie *E. coli*. Bei der Verwendung dieser Bakterien in der biotechnologischen Produktion treten Endotoxinen als wesentliche Kontamination auf. Endotoxine lösen selbst in sehr niedrigen Konzentrationen ( $1 \text{ ng}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ) lebensbedrohliche Entzündungs- und Schockreaktionen aus [94]. Deshalb müssen hohen Konzentrationen von Endotoxinen insbesondere in therapeutischen Biomolekülen auf ein akzeptables Niveau reduziert werden. Zur Entfernung von Endotoxinen stehen unterschiedliche Verfahren wie Ultrafiltration, chromatographische Trenntechniken oder enzymatischer Abbau zur Verfügung [95]. Trotzdem stellt die Reduktion hoher Konzentrationen von Endotoxinen während der Herstellung und Weiterverarbeitung hochreiner polySia aufgrund struktureller und biologischer Gemeinsamkeiten eine besondere Herausforderung dar. Es konnten allerdings bereits einige vielversprechende Verfahren in der polySia-Herstellung etabliert werden [53]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die bestehenden Verfahren zur Entfernung von Endotoxinen hinsichtlich ihrer GMP-Konformität bestätigt und weitere Methoden für eine produktschonende Reinigung der polySia getestet werden.

#### 4.3.3.1 Alkalische Lyse

Eine kostengünstige Methode zur Entfernung von Endotoxinen ist die alkalische Lyse mit Natriumhydroxid (NaOH). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Entfernung von Endotoxinen während der Produktion von Poly(3-Hydroxybuttersäure) aus *E. coli* etabliert [75] und aufgrund der geringen Kosten und Effektivität für den Herstellungsprozess von langkettiger polySia adaptiert [53].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effizienz des Verfahrens und die Sicherheit des Produktes bestätigt werden. Dazu wurde eine polySia-Lösung mit hoher Endotoxinbelastung mit NaOH auf einen basischen pH-Wert  $> 13$  titriert. Nach einer Inkubation von 18 h wurde die Lösung mit Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 neutralisiert und die Endotoxinfragmente über einen

Anionenaustauscher im Durchfluss von der polySia separiert. Nach der alkalischen Lyse war kein signifikanter Produktverlust erkennbar. Die Wiederfindungsrate nach der Elution des Produktes lag bei > 95 % und die Endotoxinkonzentration lag in einem Bereich, der für pharmazeutische Applikationen akzeptabel ist (siehe Kapitel 4.4.1.2). Die Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen aus vorangehenden Arbeiten vergleichbar [62].

### **4.3.3.2 Applikation von Endotoxin-spezifischen Affinitätsäulen**

Für die Reduktion von Endotoxinen stehen auch kommerzielle Chromatographiesäulen (EndoTrap<sup>®</sup> HD, Hyglos GmbH, Bernried) zur Verfügung. Im Vergleich zur alkalischen Lyse bietet dieses Verfahren produktschonendere Applikationsbedingungen bei pH 7, so dass das Auftreten möglicher negativer Interferenzen auf die Strukturintegrität der polySia reduziert wird. Die verwendeten EndoTrap<sup>®</sup> HD-Säulen bestehen aus einer hydrophilen Affinitätsmatrix auf der ein LPS-spezifischer Bakteriophagen-Ligand immobilisiert ist. Der Ligand zeigt keine zytotoxischen Effekte, weshalb eine Applikation in GMP-regulierten Prozessen problemlos möglich ist. Der Wirkungsmechanismus basiert auf der Bindung der Endotoxine an den Liganden.

In vorherigen Arbeiten wurden die Säulen bereits erfolgreich für die Entfernung von Endotoxinen bei der polySia-Produktion unter Verwendung des kommerziellen Puffers (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) verwendet. In dieser Arbeit sollte der Probenpuffer angepasst werden, um ein Umpuffern der Prozessproben zu umgehen und den Arbeitsaufwand zu reduzieren. Laut Hersteller muss das Puffersystem eine minimale Konzentration von 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>-Ionen und kein Ammoniumsulfat beinhalten.

Für die Anpassung wurden neben dem kommerziellen Puffer je 50 mM KPP und 50 mM TRIS/HCl mit 700 mM NaCl und 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7 verwendet. Die Wiederfindungsrate von polySia lag bei allen Puffer-Systemen > 79 %, wobei der KPP-Puffer mit > 87 % die höchste Ausbeute erreichte. Die Konzentration von Endotoxinen konnte in allen Systemen in pharmazeutisch relevante Bereiche reduziert werden (siehe Kapitel 4.4.1.2). Auch hier wies die Probe im KPP-Puffer die geringste Konzentration von Endotoxinen auf. Trotz hoher Effizienz und der Zulassung für eine GMP-konforme Reinigung eignen sich die Säulen aufgrund der enormen Kosten sowie geringen Flussraten und Säulenvolumina jedoch nur für das Polishing kleinerer Mengen an polySia. Sie wurden für einen zukünftigen Prozess nicht in Betracht gezogen.

#### 4.3.3.3 HIC-Membranadsorber zur Endotoxinanreicherung

Die chemische Struktur von Endotoxinen ist sehr komplex und chemisch heterogen. Neben einer negativen Ladung sind sowohl hydrophobe als auch hydrophile Domänen vorhanden. Die Chromatographie bietet vermutlich die besten Möglichkeiten die strukturelle Diversität dieser Biomoleküle gezielt auszunutzen. Beispielsweise können Endotoxine über hydrophobe Wechselwirkungen des Lipid-A-Anteils an einen entsprechenden Liganden gebunden und so angereichert werden. Aus diesem Grund wurde der zuvor verwendete HIC-Adsorber (siehe Kapitel 4.3.2.2) auch für die Entfernung von bakteriellen Endotoxinen bei der polySia-Herstellung getestet.

Die Evaluierung der HIC-basierten Entfernung von Endotoxinen wurde zunächst im FPLC-System unter Verwendung eines Sartobind® Phenyl nano-Moduls durchgeführt. Das Modul wurde mit 10 mL Probenvolumen mit 1,22 mg/mL polySia mit  $> 10.000 \text{ EU/mg}_{\text{polySia}}$  bei 0,7 M Ammoniumsulfat beladen. Die verwendete Salzkonzentration ermöglicht die Integration dieses Schrittes an die Fraktionierung mittels Q-Membran [53]. Verunreinigungen, die an die Membran gebunden hatten, wurden in Abwesenheit von Ammoniumsulfat eluiert.

Die Analytik der getrockneten Proben zeigte, dass die polySia im Durchfluss mit einer Wiederfindungsrate von  $> 99 \%$  isoliert wurde. Die Endotoxinbelastung im gereinigten Produkt konnte auf  $> 3.000 \text{ EU/mg}_{\text{polySia}}$  reduziert werden.

Im Anschluss wurde die HIC-basierte Entfernung von Endotoxin unter Verwendung eines Sartobind® Phenyl 150 mL-Moduls im Prozessmaßstab durchgeführt. Die Wiederfindungsrate von polySia im Durchfluss lag bei  $> 98 \%$ . Das gefriergetrocknete Produkt wies eine Endotoxinbelastung von  $> 500 \text{ EU/mg}_{\text{polySia}}$  auf. Eine genauere Beschreibung der Ergebnisse mit Vergleich ist in Kapitel 4.4.1.2 aufgeführt.

#### 4.3.5 Zusammenfassung der Aufreinigung von polySia

Die produzierte langkettige polySia konnte über einen etablierten Prozess in stabiler Form isoliert werden [52]. Während die Ausbeuten bei der Reinigung der  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* K1 vergleichbar zu anderen Studien waren, wurden bei der Reinigung der in rekombinanten *E. coli* BL21 produzierten  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia deutlich geringere Ausbeuten erzielt. Vor allem die zur Adsorption von HCPs verwendeten Tonmineralien reduzierten die Produktausbeuten massiv und wurde als Indiz für eine notwendige Optimierung des Reinigungsprozesses genommen. Unter Berücksichtigung behördlicher Anforderungen für biopharmazeutische Produkte wurden verschiedene Methoden zur alternativen Entfernung von HCPs untersucht. Zunächst wurde die Fällung mit Ammoniumsulfat als Alternative zu den etablierten Fällungs- und Adsorptionsmethoden untersucht. Die Methode reduzierte zwar effektiv den Anteil proteinogener Verunreinigungen im Produkt, konnte aber keine konsistent reproduzierbaren Ergebnisse garantieren. Aus diesem Grund wurde die Applikation chromatographischer Einweg-Membranadsorbern gegenüber der Fällung mit Ammoniumsulfat favorisiert. Durch die Verwendung von HIC-Membranen konnte die Proteinbelastung nahezu vollständig reduziert und polySia im Durchfluss bei hohen Salzkonzentrationen isoliert werden. Da hier eine anschließende Entsalzung der Prozesslösung erforderlich ist, empfiehlt sich der Einsatz von STIC-Membranen. Diese boten die Möglichkeit unter Verwendung eines Phosphathaltigen Puffers, die langkettige polySia zu fraktionieren, während ein Großteil der Proteine im Durchfluss verblieb. Gleichzeitig konnte mehr als die doppelte Produkte Menge im Vergleich zu den etablierten Q-Membran mit der STIC-Membran gebunden werden. Allerdings konnte diese Methode noch nicht im Prozessmaßstab durchgeführt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Etablierung produktschonender Methoden zur effizienten Entfernung von Endotoxinen. Hierzu wurden sowohl LPS-spezifische Affinitätssäulen als auch HIC-Module getestet und mit der bereits etablierten alkalischen Lyse verglichen [53]. Über alle Methoden konnte die Konzentrationen von Endotoxinen im Ausgangsmaterial reduziert werden. Allerdings eignen sich die Affinitätssäulen trotz optimierter Puffer-Bedingungen aus Kostengründen lediglich für das Polishing kleinerer Mengen von polySia.

Die langkettige polySia wurde anschließend im Prozessmaßstab thermisch hydrolysiert, um die pharmazeutisch relevante polySia avDP20 zu gewinnen. Aus 1,5 g langkettiger polySia konnten  $155 \pm 4$  mg polySia mit einer Kettenlängenverteilung von  $DP\ 20 \pm 4$  erzeugt werden.



## 4.4 Produktanalytik

PolySia ist aufgrund der vielfältigen Eigenschaften ein interessantes biologisches Produkt für zahlreiche Applikationsfelder der Biotechnologie und Medizin. Dabei hängt das Einsatzgebiet maßgeblich von den Eigenschaften des Polymers z. B. dem Polymerisationsgrad oder dem glykosidischen Verknüpfungsmuster der Monomere sowie der Produktreinheit ab. Für eine Applikation als Beschichtungsmaterial im Tissue Engineering wird gewöhnlicherweise hochmolekulare polySia verwendet, wobei keine besonderen Anforderungen an die Produktreinheit gestellt werden [96]. Die Verwendung von polySia als biomedizinischer Wirkstoff erfordert dagegen neben einem GMP-konformen Produktionsprozess auch eine hohe Reinheit des Produktes. Da im Menschen lediglich polySia mit  $\alpha$ 2,8-glykosidischen Verknüpfungen nachgewiesen wurde, ist ausschließlich diese Form des Homopolymers für humanmedizinische Applikationen von Interesse. Die  $\alpha$ 2,9-verknüpfte Form wird hingegen als Impfstoff gegen Meningokokken verwendet [24]. Um gesundheitliche Schäden am Patienten zu verhindern, muss die hergestellte polySia einschlägig durch eine zuverlässige Produktanalytik charakterisiert werden, die ebenfalls den behördlichen Vorgaben und GMP-Richtlinien entspricht [63].

### 4.4.1 Produktreinheit

Um den Anforderungen der Behörden an die Qualität medizinischer Produkte nachzukommen, müssen Verunreinigungen, die während des gesamten Herstellungsprozesses eingetragen wurden, aus dem Endprodukt entfernt werden. Dabei kann es sich sowohl um Zellsubstrate, Medienbestandteile oder Antibiotika als auch Reagenzien, die während des Downstream Processings verwendet werden, handeln. Bei der polySia-Herstellung im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entfernung eingetragener HCP, DNA und insbesondere Endotoxine fokussiert.

#### 4.4.1.1 Protein- und DNA-Analytik

Die Konzentration von Proteinen und DNA in den Endprodukten der verschiedenen Produktionsstämme wurden über photometrische Messungen bei 260 nm und 280 nm sowie dem Bradford-Assay bestimmt. In allen polySia-Produkten, die nach dem Stand der Technik hergestellt wurden (siehe Kapitel 4.2), lag die Protein-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

Der DNA-Gehalt in der polySia aus *E. coli* K1 lag bei  $1,3 (\pm 0,2) \mu\text{g}_{\text{DNA}}/\text{mg}_{\text{polySia}}$ . In den Endprodukten der rekombinanten Produktionsstämme konnte dagegen keine bakterielle DNA nachgewiesen werden. Sowohl der Protein-Gehalt als auch der DNA-Gehalt sind mit den in vorherigen Arbeiten erzielten Reinheiten vergleichbar [48, 62, 63].

### 4.4.1.2 Endotoxanalytik

Die entzündungsfördernde Wirkung von Endotoxinen hängt von der Konzentration in der Produktdosis ab, die einem Patienten verabreicht wird. Zum Schutz des Patienten darf nach den von der Food and Drug Administration (FDA) festgelegten Normen bei der Verabreichung von Parenteralia, d. h. sterilen Lösungen ein Grenzwert von  $5 \text{ EU}/\text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$  nicht überschritten werden. Für intrathekale Arzneimittel, die direkt in den Liquorraum injiziert werden, gelten mit  $0,2 \text{ EU}/\text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$  noch strengere Auflagen [97].

Zur Entfernung bakterieller Endotoxine wurden verschiedene Methoden untersucht. Um die Reduktionsleistung der einzelnen Verfahren zu ermitteln, wurden die Konzentrationen von Endotoxinen vor und nach der Methodenapplikation über den *Limulus Amöbozyt Lysat* (LAL)-Test bestimmt. Das Reagenz wurde bereits seit mehreren Jahrzehnten von der FDA für quantitative Endotoxin-Testungen in der pharmazeutischen Formulierung akzeptiert [98].

Zunächst wurde eine Prozesslösung mit NaOH bei pH 13 behandelt und die polySia nach anschließender Neutralisation der Lösung an einen Anionenaustauscher fraktioniert. Dabei können die hydrolysierten Endotoxine im Durchfluss bereits bei geringen Ionenstärken eluiert werden [57]. Vor der NaOH-Behandlung wies die Probe eine Endotoxinkonzentration von  $> 1 \times 10^5 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$  auf. Durch die alkalische Lyse und anschließende Fraktionierung an den Anionenaustauscher konnte die Konzentration auf  $< 5 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$  reduziert werden. Dieser Wert ist mit Literaturwerten vergleichbar [53].

Außerdem wurde die polySia über Affinitätsäulen mit einem LPS-spezifischen Liganden in drei verschiedenen Puffersystemen (20 mM HEPES, 50 mM KPP und 50 mM TRIS) bei pH 7 gereinigt. Durch diese produktschonendere Alternative zur NaOH-Behandlung wurde die Endotoxinkonzentration in allen Endprodukten auf  $< 3 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$  reduziert. Die in KPP-Puffer gelöste polySia wies mit  $1,7 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$  die geringste Konzentration auf.

Ergänzend zu diesen beiden Ansätzen wurde die HIC-Membranchromatographie zur Reduktion der Endotoxinkonzentration während der polySia-Reinigung getestet. Die Reinigung wurde mit einer Probenlösung bei einer Endotoxinkonzentration von  $> 1 \times 10^4 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$  durchgeführt. Die Konzentration von Endotoxinen im finalen Produkt lag bei  $567 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{polySia}}$ . Damit führten alle Methoden zu einer effizienten Reduktion der Endotoxinkonzentration im finalen Produkt.

#### 4.4.2 Produktcharakterisierung

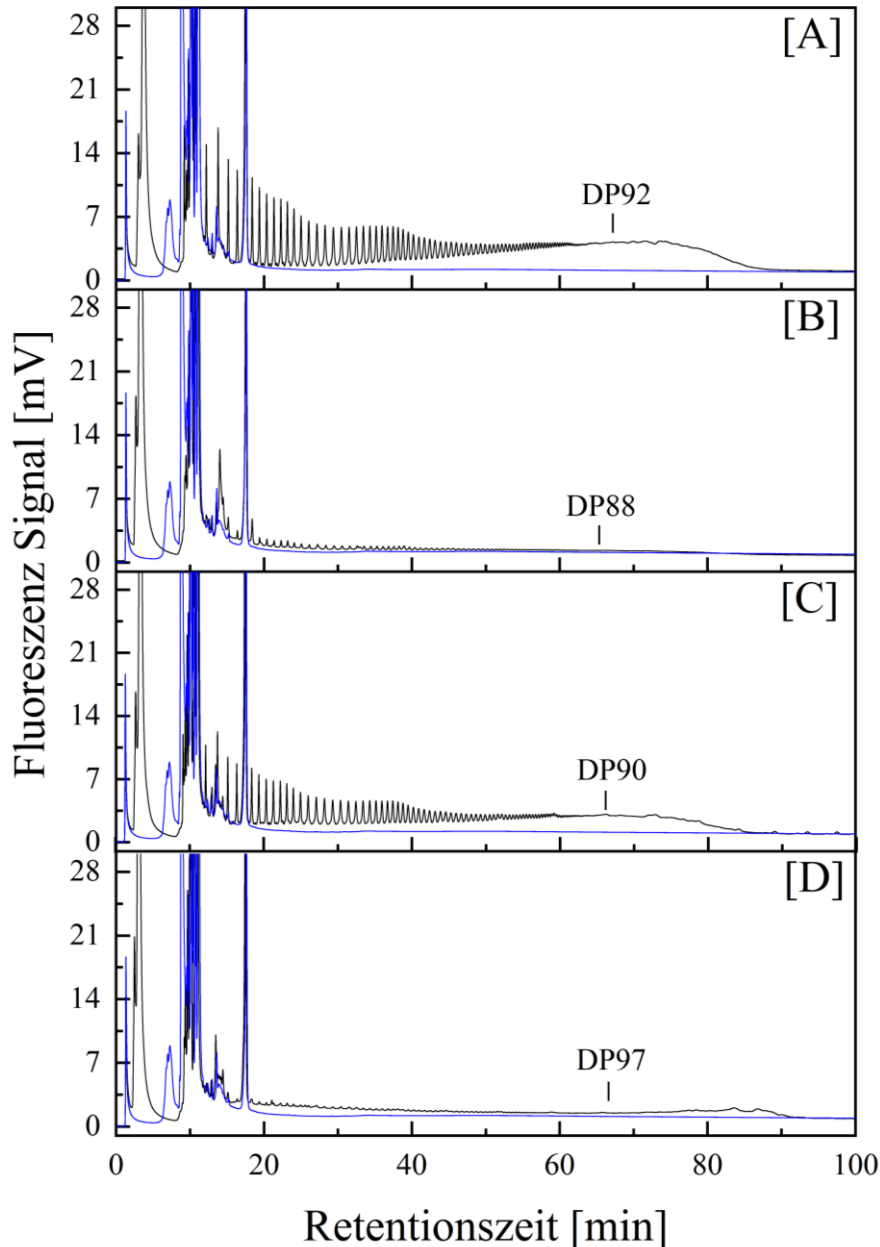
Da das Einsatzgebiet von polySia auch vom Polymerisationsgrad des Produktes abhängig ist, war die Bestimmung der maximalen Kettenlänge ein weiteres wichtiges Charakteristikum des erhaltenen Endproduktes. Durch Applikation einer HPLC-basierten Analytik lässt sich überprüfen, ob der maximale Polymerisationsgrad der hergestellten polySia aus den verschiedenen Produktionsstämmen vergleichbar ist. Über Unterschiede in der maximalen Kettenlänge lassen sich auch Interferenzen, die durch die unterschiedlichen Methoden während der Reinigung hervorgerufen werden könnten, identifizieren.

Ergänzend dazu wurde die Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie verwendet, um die glykosidischen Verknüpfungsmuster der Endprodukte zu analysieren und negative Einflüsse auf die Strukturintegrität, z. B. eine Deacetylierung der Aminofunktion, aufzudecken.

##### 4.4.2.1 Bestimmung der Kettenlängen der verschiedenen polySia Produkte

Die Bestimmung der maximalen Kettenlängen der hergestellten polySia-Produkte wurde über eine etablierte HPLC-basierte Methode durchgeführt. Zunächst wurden die einzelnen Sia-Monomere der polySia-Ketten mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Methylendioxy-1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid (DMB) markiert [99]. Diese Reaktion fand unter sauren Bedingungen statt, wodurch es zu einem partiellen Zerfall der polySia kam [63]. Anschließend wurde die markierte polySia über die HPLC mittels eines Anionenaustauschers in Kombination mit einem Fluoreszenzdetektor analysiert. Die einzelnen Peaks der in Abbildung 23 gezeigten Chromatogramme entsprechen je einem markierten Sia-Monomer, so dass die maximale Kettenlänge über die Anzahl der einzelnen Peaks bestimmt werden konnte. Für die Messungen wurden wässrige Lösungen der Produkte mit einer Konzentration von 1g/L verwendet. Als Referenzsignal wurde vollentsalztes Wasser (blaue Linie) verwendet.

Die Kettenlänge der polySia aus *E. coli* K1 konnte zu einem DP von 92 eindeutig ausgezählt werden. Der maximale DP der Endprodukte aus den rekombinanten  $\alpha$ 2,8-polySia-produzierenden Stämme lag in einem Bereich von DP88 bis DP90. Die Kettenlänge des  $\alpha$ 2,9-verknüpften Produktes konnte bis zu DP97 ausgezählt werden. In allen Proben nahm die Signalintensität mit zunehmendem DP ab, was auf eine Akkumulation von Sia-Monomeren bzw. OligoSia (DP < 10) aufgrund der sauren Bedingungen während der DMB-Derivatisierung hindeutet. Da sich das Fluoreszenzsignal nach einer Retentionszeit von 65 - 85 min von der Grundlinie abgrenzt, ist der tatsächliche DP vermutlich noch größer als im Chromatogramm auszählbar war. Die Verwendung von *E. coli* K1 als Expressionssystem beeinflusste weder die Peakintensitäten noch die maximale Kettenlänge.

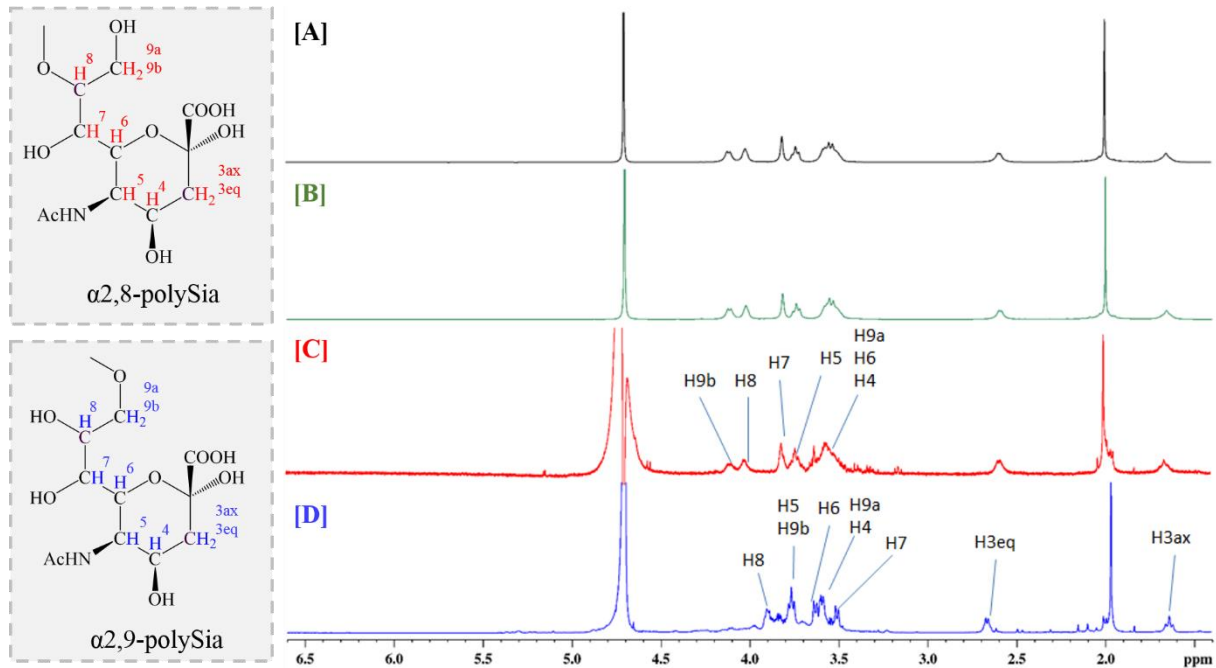


**Abbildung 23:** Chromatogramme zur Charakterisierung der maximalen Kettenlängen von polySia. Dargestellt sind die  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* K1 (A) und *E. coli* BL21 mit pKT274 (B) oder pKT774 (C) sowie die  $\alpha$ 2,9-polySia aus *E. coli* BL21 mit pKT274-synE (D). Zur Bestimmung der Kettenlängen wurde die Polymere zunächst mit DMB markiert.

#### 4.4.2.2 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie der heterologen polySia

In den letzten Jahrzehnten hat sich die NMR-Spektroskopie als effizientes Werkzeug zur Aufklärung molekularer Strukturen verschiedener Polysaccharide bewährt [100]. Die Methode untersucht die Wechselwirkung einzelner Atome mit anderen Atomen, die sich in der näheren Umgebung befinden. Alle NMR-Messungen dieser Arbeit wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Jörg Fohrer vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Zur Charakterisierung der Endprodukte aus den verschiedenen Produktionsstämmen und Identifikation der glykosidischen Verknüpfungsmuster wurden NMR-basierte Analysen durchgeführt. Dafür wurden  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der hergestellten polySia aus *E. coli* K1 und *E. coli* BL21 mit pKT274, pKT774 bzw. pKT274-synE aufgenommen. Zur Probenvorbereitung wurden ~30 mg polySia in 1 mL Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ) gelöst. Für die Aufnahme der Spektren wurde ein Ascend 400 MHz mit Avance III Konsole und Prodigy BBFO probe (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) verwendet.



**Abbildung 24:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der hergestellten polySia aus den verschiedenen Produktionsstämmen. Die Produkte aus den rekombinanten *E. coli* BL21-Stämmen mit den Plasmiden pKT274 (C), pKT774 (B) und pKT274-synE (D) wurden mit dem Produkt aus *E. coli* K1 (A) als Referenz verglichen.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einer Relaxationszeit von 2 s über ein Breitenspektrum von 12 ppm aufgenommen. Für eine bessere Auflösung ist in Abbildung 24 jedoch nur der Bereich bis 6,5 ppm dargestellt. Während der Messung wurde das Wassersignal unterdrückt. Die Gegenüberstellung der einzelnen Spektren und der Vergleich zu den publizierten Spektren von  $\alpha$ 2,8-polySia und dem  $\alpha$ 2,9-verknüpften NmC Kapselpolysaccharid erlaubte die Zuordnung aller beobachteten Signale [47, 101]. Alle  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigen die Signale für H3eq und H3ax von Sialinsäure. Im Spektrum der polySia aus *E. coli* BL21 mit pKT274 (Abb. 24.C) und pKT774 (Abb. 24.B) bestätigen die chemischen Verschiebungen für H9b, H8 und H7, die für  $\alpha$ 2,8-polySia charakteristisch sind. Das Spektrum der polySia aus *E. coli* BL21 mit pKT274 enthält einige unbekannte Signale bei einer chemischen Verschiebung von 3,6 ppm und im Bereich von 3,4 ppm und 3,1 ppm, die höchstwahrscheinlich auf prozessbedingte

Verunreinigungen zurückzuführen sind. Zusammenfassend bestätigen die hohe Identität mit dem *E. coli* K1-Referenzspektrum (Abb. 24.A) und zuvor veröffentlichten Spektren [47, 101], dass beide Polymere aus polySia mit  $\alpha$ 2,8-Verknüpfungsmuster bestehen.

Im direkten Vergleich aller Spektren unterscheidet sich das Spektrum der polySia aus *E. coli* BL21 mit pKT274-synE (Abb. 24.D) deutlich von dem  $\alpha$ 2,8-verknüpften Polymer. Gleichzeitig zeigen die chemischen Verschiebungen dieses Spektrums eine sehr gute Übereinstimmung zu den publizierten Daten von  $\alpha$ 2,9-verknüpfter polySia aus *NmC* [47]. Dieses Spektrum wurde als Grundlage für die Zuordnung der einzelnen Signalpeaks verwendet. Der wichtigste Unterschied weisen die für H9b, H8 und H7 beobachteten Signale auf, welche innerhalb des Spektrums nach rechts verschoben sind. Dadurch bestätigt sich weiter, dass die glykosidische Bindung in diesem Polymer anders platziert ist.

### 4.4.3 Analytik zur Strukturintegrität

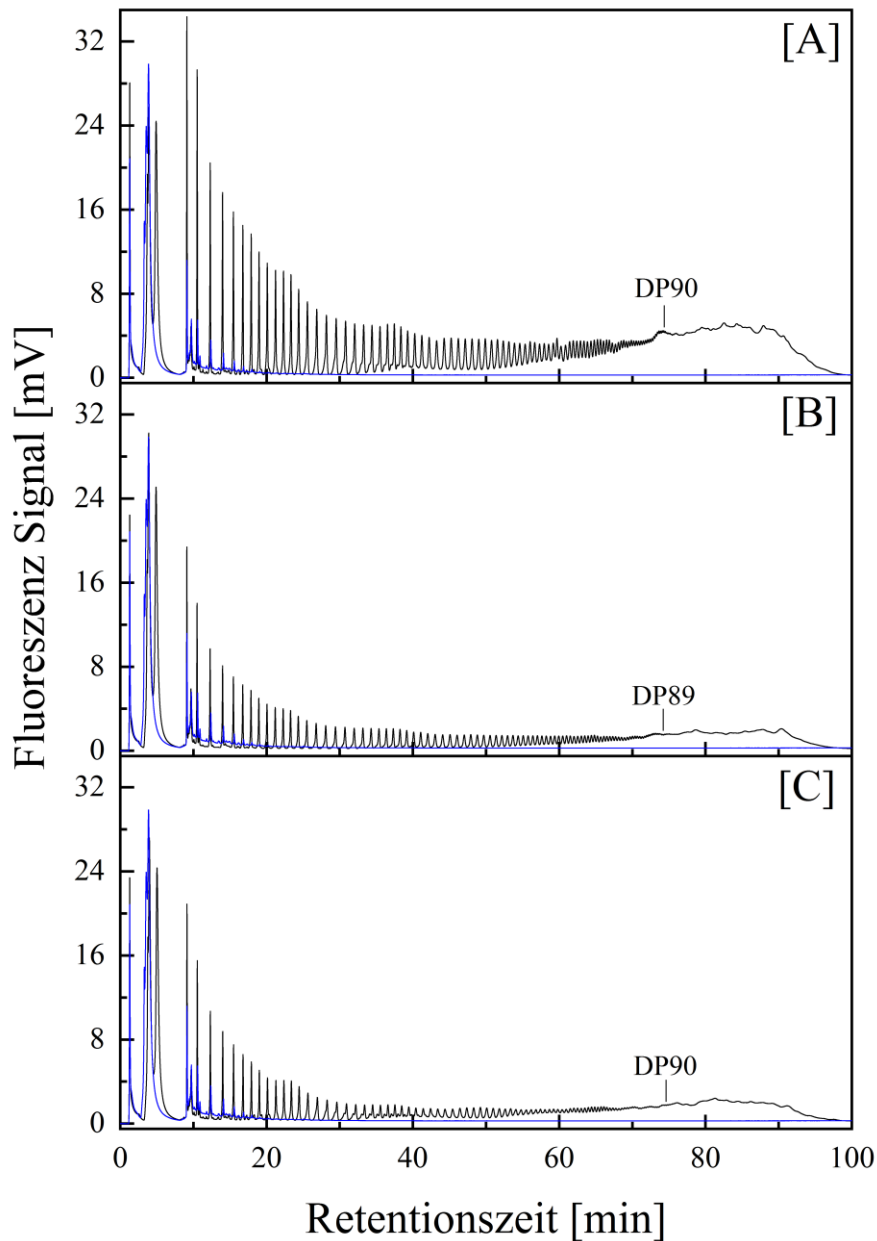
Während des Herstellungsprozesses wird unter anderem die alkalische Lyse verwendet, um die Konzentration der Endotoxine im Endprodukt auf ein akzeptables Niveau für pharmazeutische Applikationen ( $< 5 \text{ EU/mg}_{\text{polySia}}$ ) zu reduzieren. Entstehen unter diesen extremen Bedingungen produktbezogene Verunreinigungen, wie z. B. das  $\delta$ -Lakton der polySia (Abbildung 7), wirkt sich dies negativ auf kritische Qualitätsmerkmale (Kettenlänge und Strukturintegrität) aus und könnte in einem Verlust der gewünschten biologischen Aktivität resultieren. Aus diesem Grund muss sichergestellt sein, dass die intramolekulare Struktur und die Kettenlänge des Polymers während der Herstellungsprozesses nicht beeinträchtigt werden.

Um zu analysieren, inwiefern sich die NaOH-Behandlung auf die hergestellte polySia auswirkt, wurde NaOH-behandelte und unbehandelte  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* K1 einer Analyse mittels DMB-HPLC und NMR-Spektroskopie unterzogen.

#### 4.4.3.1 Bestimmung der Kettenlänge

Zunächst wurde untersucht, ob die Applikation der NaOH-Behandlung zu einer Reduktion der maximalen Kettenlänge der hergestellten polySia führt. Hierfür wurden die Kettenlängen von NaOH-behandelter und unbehandelter polySia mittels DMB-HPLC analysiert und miteinander verglichen. Als zusätzliche Referenz wurde eine polySia-Probe verwendet, die bei neutralem pH 7 über Endotoxin-spezifischen Affinitätssäulen gereinigt wurde.

Die Vorbereitung und anschließende Messung der Proben erfolgten wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.4.2.1). In allen Ansätzen wurde polySia-Lösung bei einer Konzentration von 1 g/L verwendet.

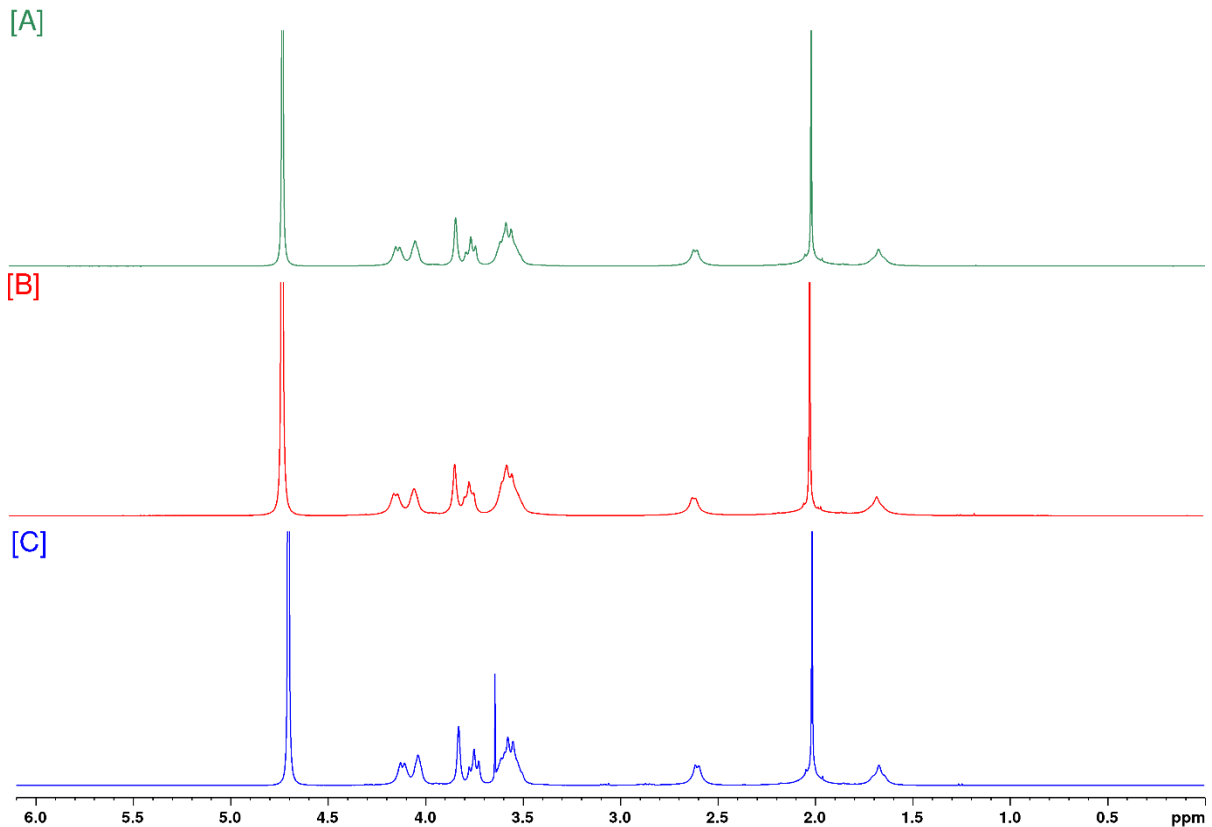


**Abbildung 25:** Vergleich der maximalen Kettenlängen von polySia mit und ohne NaOH-Behandlung. Das Ausgangsmaterial (A) wurde bei einem alkalischen pH-Wert ( $\text{pH} > 13$ ) inkubiert (B) oder über Endotoxin-spezifische Affinitätsäulen gereinigt (C).

Anhand der in Abbildung 25 gezeigten Chromatogramme konnte in allen Proben eine Kettenlänge von über 89 Monomeren nachgewiesen werden. Auch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Peaks war in allen Proben vergleichbar. Die Ergebnisse bestätigen, dass die im Herstellungsprozess verwendete alkalische Lyse die maximale Kettenlänge der polySia nicht beeinflusst.

#### 4.4.3.2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nach alkalischer Lyse

Um auszuschließen, dass die alkalische Lyse chemische Modifikationen wie z. B. eine Deacetylierung der einzelnen Monomere hervorruft, wurden NaOH-behandelte und unbehandelte polySia mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert. Die Vorbereitung und Messung der Proben erfolgten wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.4.2.2).



**Abbildung 26:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zur Analyse der Strukturintegrität der polySia. Die aufgenommenen Spektren von unbehandelter polySia (A) und NaOH-behandelter polySia (B) wiesen eine sehr gute Korrelation zu polySia, welche über Endotoxin-spezifische Affinitätssäulen gereinigt wurde (C), auf. Für die Messung wurde langkettige polySia aus *E. coli* K1 verwendet.

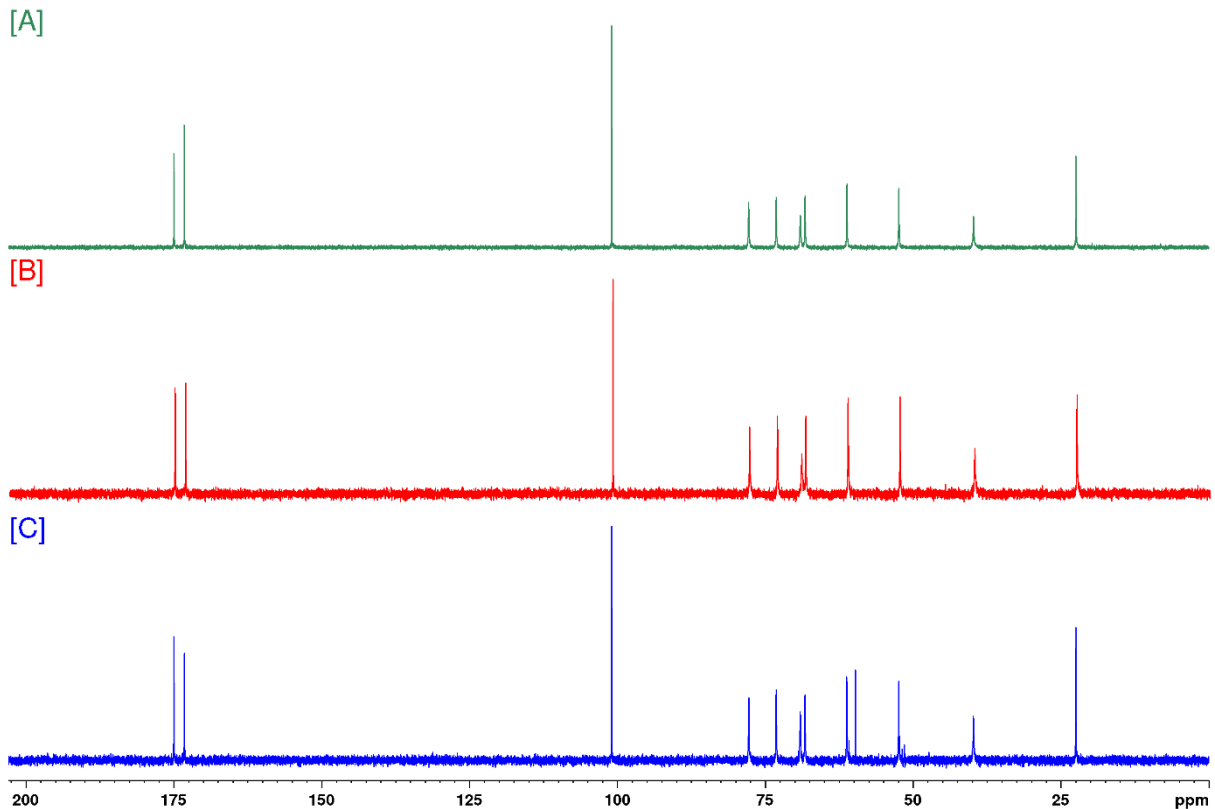
Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit einer Relaxationszeit von 2 s über ein Breitenspektrum von 12 ppm aufgenommen. Auch hier ist lediglich der Bereich bis 6 ppm dargestellt, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Während der Messung wurde das Wassersignal unterdrückt.

Alle in Abbildung 26 gegenübergestellten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren weisen eine sehr gute Korrelation zueinander auf. Durch den Vergleich zu dem in Abbildung 24 dargestellten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $\alpha 2,8$ -polySia aus *E. coli* K1 konnten alle auftretenden Signale zugeordnet werden. Das intensive Signal bei einer chemischen Verschiebung von 2 ppm weist auf die Methylgruppe am N-Acetylrest hin, wodurch eine Deacetylierung widerlegt wurde. Das zusätzliche Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3,6 ppm im Spektrum der über Affinitätssäulen gereinigten polySia (Abb. 26.C) deutet auf eine vorhandene unspezifische Verunreinigung hin.



#### 4.4.3.3 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie nach alkalischer Lyse

Ergänzend zu den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden auch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgenommen, um potenzielle Auswirkungen der alkalischen Lyse auf die strukturelle Integrität zu untersuchen. Alle  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit einer Relaxationszeit von 3 s über ein Breitenspektrum von 251 ppm aufgenommen. Dabei wurde das Wassersignal unterdrückt.



**Abbildung 27:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zur Analyse der Strukturintegrität der polySia. Die aufgenommenen Spektren von unbehandelter polySia (A) und NaOH-behandelter polySia (B) wiesen eine sehr gute Korrelation zu polySia, welche über Endotoxin-spezifische Affinitätssäulen gereinigt wurde (C), auf. Für die Messung wurde langkettige polySia aus *E. coli* K1 verwendet.

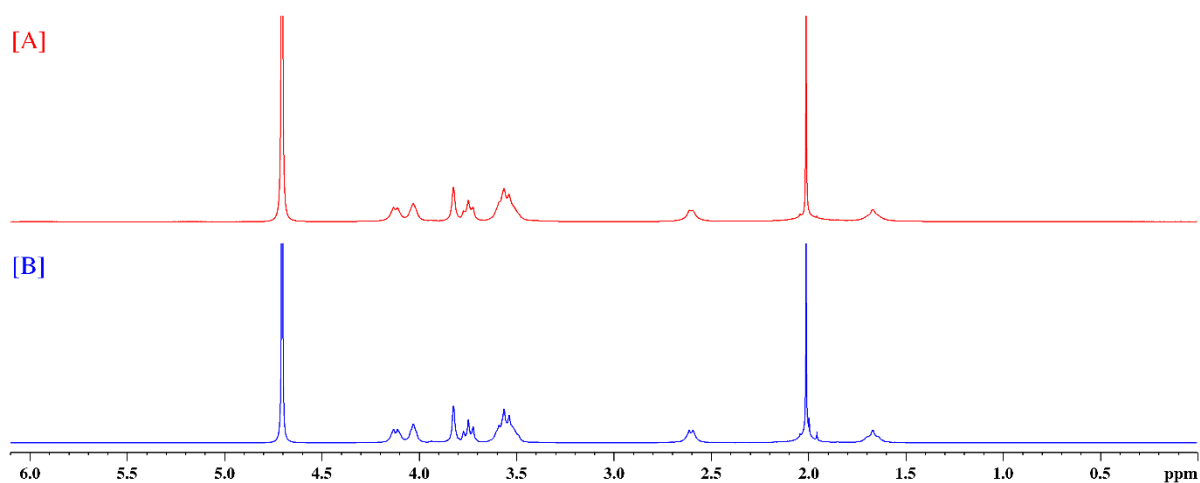
Alle aufgenommenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sind in Abbildung 27 dargestellt und zeigen eine sehr hohe Korrelation und sind mit bereits publizierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  $\alpha 2,8$ -polySia vergleichbar [49, 56]. Durch eine direkte Gegenüberstellung konnten alle Signale den elf charakteristischen C-Atomen von polySia zugeordnet werden und negative Einflüsse der verwendeten Prozessschritte auf die Strukturintegrität nochmals widerlegt werden. Die Signale bei einer chemischen Verschiebung von 173 ppm und 175 ppm, welche den zwei Carbonylgruppe von Neu5Ac zugeordnet werden, bestätigen dieses Erkenntnis. Wie bereits im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erschien auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Referenzprobe (Abb. 27.C) ein zusätzliches Signal bei einer chemischen Verschiebung von 60 ppm, welches auf eine kleine unspezifische alkohol- oder ether-haltige Verunreinigung hindeutet.

#### 4.4.4 Analytik zur intramolekularen Thermostabilität

PolySia ist ein thermolabiles Polymer, das bei höheren Temperaturen unspezifisch in kleinere Fragmente zerfällt [8]. Diese Eigenschaft konnte bereits erfolgreich genutzt werden, um die pharmazeutisch relevante polySia avDP20 über eine Thermolyse bei 65 °C aus langkettiger polySia zu gewinnen (siehe Kapitel 4.2.3). Gleichzeitig muss auch die Anwendung dieses Verfahrens den Erhalt der Strukturintegrität der erzeugten polySia avDP20 gewährleisten. Aus diesem Grund wurde das gewonnene Zielprodukt mittels NMR-Spektroskopie vermessen.

##### 4.4.4.1 <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie nach Thermolyse

Für die Analyse struktureller Interferenzen, die durch die Thermolyse hervorgerufen werden könnten, wurde zunächst ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von der hergestellten niedermolekularen polySia aufgenommen und mit dem Spektrum des langkettigen Ausgangsmaterials verglichen. Die Vorbereitung und Messung der Proben erfolgten wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.4.2.2).



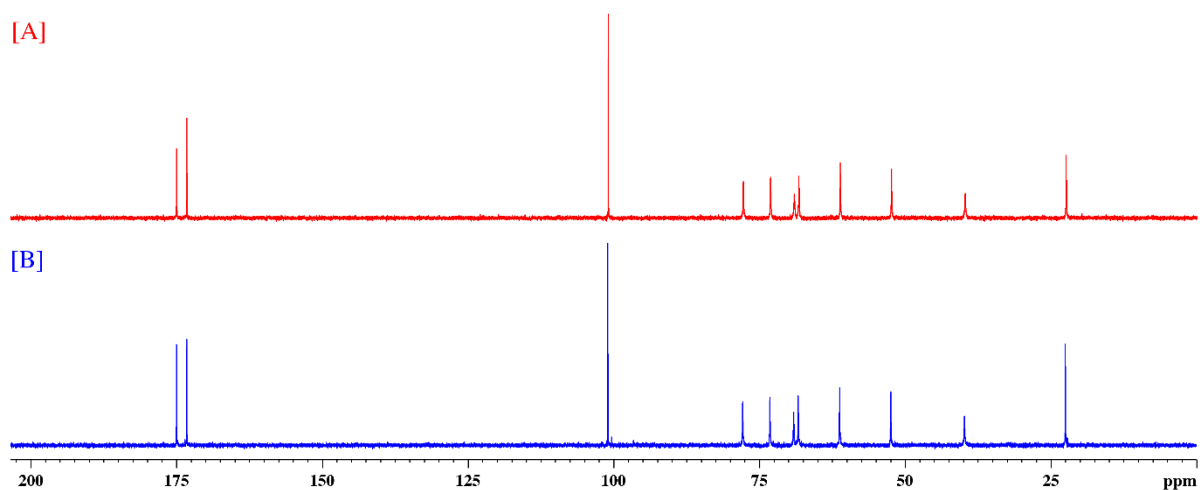
**Abbildung 28:** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von hochmolekularer (A) und niedermolekularer  $\alpha$ 2,8-polySia (B). Die niedermolekulare polySia (DP  $21 \pm 4$ ) wurde über eine Thermolyse bei 65 °C aus der hochmolekularen polySia (DP > 90) gewonnen. Die aufgenommenen Spektren weisen eine sehr gute Korrelation zueinander auf.

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit einer Relaxationszeit von 2 s über ein Breitenspektrum von 12 ppm aufgenommen. Auch hier ist lediglich der Bereich bis 6 ppm dargestellt, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Während der Messung wurde das Wassersignal unterdrückt.

Beide in Abbildung 28 gegenübergestellten <sup>1</sup>H-NMR-Spektren weisen eine identische Anzahl von Signalpeaks bei gleicher chemischer Verschiebung auf. Durch den Vergleich zum <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von  $\alpha$ 2,8-polySia in Abbildung 24 konnten alle auftretenden Signale zugeordnet und strukturelle Interferenzen aufgrund der Thermolyse ausgeschlossen werden.

#### 4.4.4.2 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie nach Thermolyse

Als zusätzliche Ergänzung zu den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden wie zuvor bei der Analyse zur alkalischen Lyse  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Alle  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit einer Relaxationszeit von 3 s über ein Breitenspektrum von 251 ppm aufgenommen. Dabei wurde das Wassersignal unterdrückt. Für eine bessere Auflösung ist in Abbildung 29 nur der Bereich von 0 ppm bis 200 ppm dargestellt.



**Abbildung 29:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von hochmolekularer (A) und niedermolekularer  $\alpha$ 2,8-polySia (B). Die niedermolekulare polySia ( $\text{DP } 21 \pm 4$ ) wurde über eine Thermolyse bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  aus der hochmolekularen polySia ( $\text{DP} > 90$ ) gewonnen. Die aufgenommenen Spektren weisen eine sehr gute Korrelation zueinander auf.

Auch die aufgenommenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zeigen eine sehr hohe Korrelation und sind mit bereits publizierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  $\alpha$ 2,8-polySia vergleichbar [49, 56]. Durch eine direkte Gegenüberstellung konnten alle Signale den elf charakteristischen C-Atomen von polySia zugeordnet werden. Auch die chemische Verschiebung aller Signale stimmt vollkommen überein und zeigt ebenso eine hohe Korrelation zu dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ 2,8-polySia, das in Abbildung 27 gezeigt ist. Der Vergleich aller Spektren ist eine zusätzliche Bestätigung, dass die Thermolyse keine chemischen Modifikationen innerhalb der Neu5Ac-Monomere hervorruft. Die Reaktionszeit der Thermolyse kann wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf  $90\text{ }^\circ\text{C}$  weiter reduziert werden, da frühere Studien zeigten, dass auch diese Temperatur keinen negativen Einfluss auf die Monomerstruktur hatte [48].

#### **4.4.5 Zusammenfassung der Produktanalytik**

Die verwendeten Methoden zur Produktanalytik bieten äußerst sensitive und effiziente Werkzeuge, um die hergestellte polySia aus den unterschiedlichen Produktionsstämmen einschlägig zu charakterisieren. Die langkettige polySia lag nach dem Reinigungsprozess in reiner Form vor. Über verschiedene Verfahren, die im Rahmen dieser Arbeit zur Entfernung von Endotoxinen getestet wurden, konnte die polySia in teilweise pharmazeutischer Qualität gewonnen werden. Dabei hatten sowohl die alkalische Lyse bei einem hohen pH-Wert als auch die Thermolyse zur Erzeugung der pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 keinen negativen Einfluss auf die maximale Kettenlänge oder strukturelle Integrität der hergestellten Produkte.

Die Verwendung von *E. coli* BL21 zur Produktion von  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-polySia resultiert in Polymeren mit vergleichbarer Kettenlänge zu  $\alpha$ 2,8-polySia aus *E. coli* K1. Durch NMR-Spektroskopie können die verschiedenen Verknüpfungsmuster der Monomere identifiziert und voneinander unterschieden werden.

---

## 5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Niedermolekulare polySia mit einer Kettenlänge aus 20 Sia-Monomeren ist ein potenzieller Wirkstoffkandidat zur Behandlung altersbedingter, trockener Makuladegeneration im Auge. Als bakterielles Kapselpolysaccharid kann dieses Polymer biotechnologisch über Kultivierung von *E. coli* K1 in verschiedenen Reaktorsystemen produziert, in reiner Form aus dem Kulturüberstand isoliert und über eine Thermolyse aus hochmolekularer polySia gewonnen werden. Für die Zulassung als Arzneimittel und Wirkstoffkandidat muss der gesamte Herstellungsprozess den behördlichen Vorgaben des GMP entsprechen und ein Produkt von hohem Reinheitsgrad liefern, ohne die Strukturintegrität des Produktes zu schädigen.

In dieser Arbeit sollte die biotechnologische Produktion humanidentischer  $\alpha$ 2,8-polySia gemäß den Richtlinien zur Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffkandidaten weiterentwickelt werden. Um zukünftig die großtechnische Kultivierung von humanpathogenen Bakterien wie *E. coli* K1 zu vermeiden, sollte die Produktion um einen rekombinanten Ansatz erweitert werden. Darüber hinaus sollten neue Methoden wie chromatographische Einweg-Prozesselemente untersucht werden, um diese in den Herstellungsprozess zu integrieren und GMP-Konformität zu gewährleisten. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Wahl produktschonender Bedingungen, um einen Verlust der biologischen Aktivität aufgrund chemischer Modifikationen zu vermeiden.

Humanidentische  $\alpha$ 2,8-polySia wird gewöhnlicherweise durch batch-Kultivierung von *E. coli* K1 produziert. Hierzu können neben Rührkesselreaktoren auch welleninduzierte Einweg-Bioreaktoren verwendet und so die spätere Übertragung des Prozesses in eine GMP-konforme Umgebung erleichtert werden [52]. Die Ausbeuten des Kapselpolysaccharides hängen dabei stark von den erreichten Zelldichten ab. Durch die Etablierung eines Hochzelldichteprozesses können die Produktausbeuten aufgrund höherer Zelldichten effektiv gegenüber konventionellen polySia-Medien gesteigert werden [48, 49, 52, 82]. Im direkten Vergleich beider Systeme wurden im Kulturüberstand des STRs höhere polySia-Konzentration im Vergleich zum Einweg-Beutelreaktor nachgewiesen. Durch die Kopfraum-Begasung des Einweg-Beutelreaktors war der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient ( $k_{La}$ ) deutlich geringer als im STR [87]. Im Verlauf der Kultivierung trat aufgrund des starken Zellwachstums und der hohen Initial-Konzentration von Glucose eine Sauerstofflimitation auf. Dieser Zustand begünstigt die Acetat-Produktion der Zellen und inhibiert gleichzeitig die metabolischen Routen der polySia-Synthese. Im Einweg-Beutelreaktor erreichte die Acetat-Konzentration sogar kritische Konzentrationen, die das Zellwachstum beeinträchtigten [49, 85].

Um das Eintreten einer Sauerstofflimitation zu verhindern, könnte die Anfangskonzentration der eingesetzten Glucose auf etwa 10 g/L reduziert werden. Zusätzlich könnte die Etablierung einer feeding-Strategie über eine DO-basierte Steuerung die Ausbeute weiter erhöhen und somit auch die Kosten pro Reaktorbeutel senken.

Die Prozessbedingungen von *E. coli* K1 wurden auf ein rekombinantes Expressionssystem in *E. coli* BL21 übertragen. Mit Hilfe der verwendeten Produktionsstämme konnte neben der  $\alpha$ 2,8-polySia auch das  $\alpha$ 2,9-verknüpften NmC Kapselpolysaccharid erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Dennoch war auch das Wachstum aller rekombinanten Stämme im Einweg-Beutlereaktor durch eine mangelnde Sauerstoffversorgung limitiert. Trotz vergleichbarer Zelldichten war die finale polySia-Konzentration im Kulturüberstand aller rekombinanten Produktionsstämme deutlich niedriger als im Vergleich zu *E. coli* K1. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte das Vorhandensein von zwei funktionellen Kapselexportsystemen in den rekombinanten Stämmen sein. Die genetischen Analysen früherer Studien verdeutlichen, dass *E. coli* BL21(DE3) lediglich die funktionellen Gene der Regionen 1 und 3 seines *kps* Genclusters codiert, während ein IS1-Element in Region 2 die Kapselexpression verhindert [79]. Obwohl die Gene der Regionen 1 und 3 hoch konserviert sind und zwischen Serotypen und sogar Spezies ausgetauscht werden können [26, 79], zeigte die Studie auch, dass durch die Expression der  $\beta$ -KDN-Transferasen KpsC und KpsS aus *E. coli* BL21(DE3) weniger *E. coli* K1-polySia synthetisiert wurde, als durch die Expression von endogenem KpsCS [79]. Folglich könnten sowohl BL21-KpsCS als auch andere BL21-Enzyme der Kapselbiosynthese den Kapselaufbau oder -export stören.

Anschließend wurde die hochmolekulare polySia über einen validierten Reinigungsprozess aus dem Kulturüberstand isoliert. Dabei wurden die HCP und bakterielle DNA erfolgreich aus dem Produkt entfernt. Um ein Endprodukt mit intakter Monomer-Struktur zu erhalten, wurden zunächst keine alkalische Lyse zur Reduktion vorhandener Endotoxine durchgeführt [53]. Aus diesem Grund wies das Endprodukt eine sehr hohe Belastung von über  $1 \times 10^5$  EU/mg<sub>polySia</sub> auf. Die Ausbeuten für polySia aus *E. coli* K1 nach der Reinigung betrugen 29 ( $\pm 5$ ) %. Über den Reinigungsprozess konnten entsprechend 4,5 ( $\pm 0,5$ ) g hochmolekulare polySia (DP > 90) aus einer 25 L Kultur gewonnen werden. Dieses Material wurde verwendet, um die Produktion der pharmazeutisch relevanten niedermolekularen polySia in den Prozessmaßstab zu skalieren. Über den zuvor entwickelten 3-stufigen-Gradienten konnten  $155 \pm 4$  mg polySia in einem Kettenlängenbereich von DP  $21 \pm 4$  isoliert werden. Dies entspricht einer Produktausbeute von 10 %. Leider ist eine gezielte Reduktion der Kettenlängenverteilung recht kompliziert, da diese nur durch Variation der Hydrolysezeit und -dauer beeinflusst werden kann.

Aus den Kulturüberständen der rekombinanten Produktionsstämme konnten lediglich 91 - 300 mg polySia isoliert werden. Die geringen Ausbeuten sind einerseits auf die deutlich niedrigeren Produkt-Konzentrationen im Kulturüberstand zurückzuführen, da bereits vor der Reinigung weniger absolutes Produkt vorhanden war. Andererseits ging während der Reinigung ein erheblicher Produktanteil durch die Applikation der adsorbierenden Tonmineralien verloren. So wurden lediglich 8 % - 15 % der ursprünglich vorhandenen polySia aus den Kulturüberständen der rekombinanten Produktionsstämme isoliert.

Die hohen Ausbeuteverluste während der Reinigung der rekombinanten Produkte und die kritischen Aspekte im Hinblick auf die Chargen-abhängige Zusammensetzung der Tonmineralien waren zwei wesentliche Gründe, um den bestehenden Prozess in Bezug auf eine Erhöhung der GMP-Konformität weiterzuentwickeln. In diesem Zusammenhang sollten vor allem auch produktschonende Methoden zur Entfernung von HCP und Endotoxinen untersucht werden.

Die Aufkonzentrierung des zellfreien Überstandes mittels Crossflow-Ultrafiltration konnte durch die Verwendung einer Membran mit einem MWCO = 30 kDa optimiert werden. Trotz des höheren MWCO waren die Ausbeuteverluste vergleichbar. Wie in vorherigen Arbeiten ging nahezu die Hälfte des Produktes verloren [48, 62]. Der Anteil an proteinogenen Verunreinigungen konnte dagegen um weitere 16 % reduziert werden. PolySia wird aufgrund seiner wasserbindenden Eigenschaften zurückgehalten, da das Molekül seine tatsächliche Größe durch eine Hydrathülle um ein Vielfaches vergrößert [13].

Zur Entfernung der HCP wurde zunächst die Ammoniumsulfatfällung als Alternative zur Ethanol-fällung und den adsorbierenden Tonmineralien untersucht. Durch diese Methode konnte der HCP-Anteil im Retentat um über 80 % gesenkt werden. Allerdings war die Qualität dieser Methode nicht konsistent reproduzierbar. Auch bei dem Versuch die Probe anschließend mittels Ethanol-fällung zu entsalzen ging das Produkt vollständig verloren. Aus diesem Grund sollte anstelle einer Fällungsmethode chromatographische Membranen zur Entfernung der HCPs verwendet werden. Dafür wurden hydrophobe Interaktionsmembranen und salztolerante Anionenaustauscher in Phosphat-gepufferten Systemen untersucht. Die Applikation beider Verfahren war bei neutralen pH-Werten möglich. Über die HIC-Membran konnte die polySia aufgrund ihres hydrophilen Charakters nahezu vollständig im Durchfluss isoliert werden, während die HCP effektiv mit der Membran gebunden wurden. Die Verwendung der STIC-Membran ermöglichte die erfolgreiche Fraktionierung der polySia über die negative Ladung des Moleküls. Dabei wurde ein KPP-Puffer verwendet. Die vorhandenen polyvalenten Anionen konkurrierten mit den HCP um den Liganden der Membran, so dass über 82 % der HCP im

Durchfluss entfernt wurden. Dieser Effekt könnte durch die bei höheren Phosphat-Konzentrationen von 50 - 100 mM weiter verstärkt werden. Zudem wurde mehr als doppelt so viel der polySia mit STIC-Membran im Vergleich zu den zuvor verwendeten Q-Membranen gebunden [53]. Im Gegensatz zur HIC erfordern die STIC-Membranen auch keine hohen Salzkonzentrationen. Daher könnte die Methode hinter der Crossflow-Ultrafiltration in den Gesamtprozess integriert werden. Dies erfordert aber einen zusätzlichen Sterilfiltrationsschritt zur Abtrennung unspezifischer Bestandteile, um ein Verblocken der STIC-Membran zu verhindern. Die Verwendung einer STIC-Membran bietet auch eine Möglichkeit, um niedermolekularer polySia aus dem Permeat aufzukonzentrieren und so die Produktverluste zu minimieren. Bisher wurde das Permeat verworfen, da vor allem die Belastung durch HCP eine Reinigung verkomplizierte.

Für die Aufreinigung von Biomolekülen aus Gram-negativen Bakterienkulturen, insbesondere für einen Einsatz im medizinischen Sektor, ist die vollständige Reduktion entzündungsfördernder Endotoxine essenziell. Durch die Applikation einer alkalischen Lyse bei  $\text{pH} > 13$  kann die Endotoxinkonzentration im Endprodukt auf  $< 5 \text{ EU/mg}_{\text{polySia}}$  reduziert werden [53]. Da die Methode im Verdacht steht chemische Modifikationen zu induzieren, wurden auch hier chromatographische Trenntechniken als produktschonendere Alternativen zur Entfernung der Endotoxine untersucht. Über LPS-spezifische Affinitätssäulen konnte die Endotoxinkonzentration auf pharmazeutisch akzeptable Niveaus reduziert werden. Die hohen Kosten, langsamen Flussraten und geringen Säulenvolumina ermöglichen jedoch nur eine Reinigung geringer Mengen. Als zweite Alternative wurden HIC-Membranen verwendet, da diese aufgrund ihres einfachen Handlings und Skalierbarkeit eine preiswertere Methode gegenüber den Affinitätssäulen bieten. Die Endotoxinbelastung im Endprodukt konnten durch die HIC-Membran auf  $567 \text{ EU/ mg}_{\text{polySia}}$  reduziert werden. Somit lag die Konzentration zwar noch über dem vorgeschriebenen Grenzwert. Sie kann aber während der Fraktionierung zur Produktion der pharmazeutisch relevanten polySia avDP20 weiter reduziert werden [97]. Zur weiteren Verbesserung kann der Laufpuffer optimiert werden. Endotoxine besitzen sowohl anionische, hydrophobe und hydrophile Domänen und bilden über unpolare Wechselwirkungen der Lipid-A-Anteile in wässrigen Lösungen Micellen aus [57, 95]. Durch Zugabe bivalenter Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  verschiebt sich das strukturelle Gleichgewicht der Endotoxine, wodurch die Bildung solch großer Aggregate begünstigt wird. Die Zugabe eines Chelators wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wirkt dem entgegen und verschiebt das Gleichgewicht zu freien Endotoxin-Molekülen [57]. Dadurch empfiehlt sich die Zugabe von EDTA zum Laufpuffer. Als freie Moleküle könnten die Endotoxine über die hydrophobe Lipid A-Domäne



besser mit dem Liganden der HIC-Membran interagieren und die Entfernungseffizienz des Membranadsorbers verbessert werden [57]. Aufgrund der dafür notwendigen hohen Salzkonzentrationen könnte die HIC im Anschluss an die Applikation der STIC-Membranen in den Prozess integriert werden. Abschließend können die Salze über eine Diafiltration entfernt und die Stabilität des Produktes durch Gefriertrocknung erhöht werden [62].

Über abschließende Analysen wurden die verschiedenen Produkte sowie potenzielle negative Auswirkungen einzelner Reinigungsschritte charakterisiert. Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigte, dass zwei der rekombinanten Stämme  $\alpha_{2,8}$ -verknüpfte polySia produzieren. Der Austausch von neuS mit synE im *kps* Gencluster ermöglicht jedoch auch die Synthese von  $\alpha_{2,9}$ -verknüpfter polySia in *E. coli* [19, 24]. Die maximalen Kettenlängen aller polySia-Produkte lagen bei  $\text{DP} > 90$ . Diese Werte sind mit den Ergebnissen früherer Arbeiten vergleichbar [62, 63]. Trotz der geringen Ausbeuten nach der Weiterverarbeitung war die rekombinante Herstellung von  $\alpha_{2,8}$ - und  $\alpha_{2,9}$ -polySia in *E. coli* erfolgreich.

Die Analysen zur Strukturintegrität konnten bestätigen, dass sowohl die sehr hohen pH-Werte während der alkalischen Lyse als auch die langen Inkubationszeiten bei 65 °C keine chemischen Modifikationen z. B. durch Deacetylierung der Amino-Funktion im Endprodukt hervorriefen [62]. Die NaOH-Behandlung bietet somit eine preiswerte und effiziente Möglichkeit, um polySia im industriellen Maßstab von Endotoxinen zu befreien. Anschließend kann die Zielfraktion mit avDP20 einfach und preiswert über Inkubation bei 65 °C und Fraktionierung mit einem starken Anionenaustauscher aus dem hochmolekularen Material gewonnen werden.

Bei der Abreicherung der Endotoxine kann eine partielle Veränderung einzelner Ketten jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher bietet die HIC-Membranchromatographie eine zuverlässige Alternative um Endotoxine produktschonend abzureichern. Die DMP-HPLC stellt nach wie vor eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der maximalen Kettenlänge dar. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die lange Inkubationszeit während der Markierung des Polymers mit dem Fluoreszenzfarbstoff DMB. Außerdem kann der Polymerisationsgrad aufgrund des partiellen Zerfalls während der Derivatisierung nur bis etwa  $\text{DP} = 90$  genau nachgewiesen werden. Da vor allem die Fraktionierung der niedermolekularen polySia eine schnelle und zuverlässige Analytik braucht, empfiehlt sich hier die Applikation einer HPLC mit Charged Aerosol Detector (CAD) [63]. Hierbei entfallen die langen Inkubationszeiten zur Markierung des Moleküls. Insgesamt konnten in dieser Arbeit wichtige Fortschritte bei der Herstellung und Reinigung von polySia nach den behördlichen Vorgaben für Arzneimittel erzielt werden.

---

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Technische Geräte

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind alle technischen Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 5:** Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät/ Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Affinitätssäule	EndoTrap <sup>®</sup> HD	Lionex GmbH
Crossflow	Sartocon <sup>®</sup> Slice Hydrosart <sup>®</sup>	Sartorius Stedium Biotech
Ultrafiltrationskassette	Cassette [MWCO: 5 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 0,45 µm]	GmbH
Crossflow	Sartoflow <sup>®</sup> Smart	Sartorius Stedium Biotech
Ultrafiltrationsanlage		GmbH
Sauerstoff-Messsonde	OxyFerm FDA	Hamilton Company
Einweg-Beutel-Reaktor (Rockerplattform und Steuereinheit)	Biostat <sup>®</sup> CultiBag RM 20/50	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Einweg-Beutel-Reaktor (Reaktorbeutel)	Flexsafe <sup>®</sup> RM 50L optical	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Endotoxin-Kartuschen	Endosafe <sup>®</sup> -PTS <sup>™</sup> 100 – 0,1 EU/mL	Charles River Laboratories
Endotoxin LAL Messsystem	Endosafe <sup>®</sup> nexgen-PTS <sup>™</sup>	Charles River Laboratories
Fluoreszenzdetektor	RF-20A	Shimadzu
FPLC-Anlage	ÄKTA <sup>™</sup> pure 25 L	GE Healthcare
Gefrierschrank (-80°C)		Thermo Fisher Scientific
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LSCplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Glucose Analysator	YSI 2900	YSI Incorporated
HPLC-Anlage	1200 Series	Agilent Technologies
HPLC-Anlage	VWR HITACHI Chromaster	VWR International
HPLC-Pumpe		Agilent Technologies
HPLC-Säule	DNAPac <sup>™</sup> PA100	Thermo Fisher Scientific

<b>Gerät/ Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Inkubationsschrank	Multitron Standard	Infors HT
Kältethermostat	Eco RE415	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG
Kontinuierliche Zentrifuge	Heraeus™ Contifuge Stratos™	Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen		Sarstedt AG & Co. KG
Küvetten		Sarstedt AG & Co. KG
Membranadsorber	Sartobind® Phenyl nano, 3 mL	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Membranadsorber	Sartobind® Phenyl 150 mL	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Membranadsorber	Sartobind® Q 75	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Membranadsorber	Sartobind® Q 75 mL	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Membranadsorber	Sartobind® STIC nano, 1 mL	Sartorius Stedim Biotech GmbH
pH-Messonde	EasyFerm Plus	Hamilton Company
Photometer	Libra S80	Biochrom GmbH
Photometer	Multiskan® Spektrum	Thermo Fisher Scientific
Nano-UV/VIS-Spektrometer	UV5 Nano	Mettler Toledo
Reinstwasseranlage	arium® 611	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Rührkesselreaktor (2 L)	Biostat Aplus	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Schüttelkolben (500 mL)		Corning Incorporated
Spritzen (20 mL, 50 mL)	Omnifix®	B. Braun Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter	Minisart®	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Sterilbank	Herasafe™	Thermo Fisher Scientific
Sterilfilter (Schlauch)	Sartobran® P300	Sartorius Stedim Biotech GmbH

---

<b>Gerät/ Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilfilter (Flaschen)	Fisherbrand™ PES Einweg-Flaschenaufsatzfilter [MWCO: 0,22 µm]	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf AG
Trockenschrank (70°C)		Memmert GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Heraeus™ Biofuge™ pico	ThermoFisher Scientific
Zentrifuge	Multifuge™ X3 FR	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen	Centrifuge Tubes (15 mL, 50 mL)	Corning Incorporated

### 6.1.2 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle 6 sind alle Chemikalien aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 6:** Verwendete Chemikalien und Hersteller

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ammoniak	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich
Ammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bovines Serum Albumin	Thermo Fisher Scientific
Bradford Quick Start™ Reagenz	Bio-Rad Laboratories
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cobald (II)-chlorid	Sigma Aldrich
Colominsäure	Carbosynth Limited
Desmophen 3900	Bayer AG
Deuteriumoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA (Triplex III)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisen(III)-citrat	Acros Organics
Eisensulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Eisensulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Endotoxin freies Wasser	GE Healthcare
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glucosemonohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumsulfat	Thermo Fisher Scientific
Kupferchlorid	Sigma Aldrich
Kupfersulfat	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumsulfat	AppliChem GmbH
Manganchlorid	Sigma Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumarsenit	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumpermanganat	Sigma Aldrich
Natriumphosphat	Sigma Aldrich
Natriumsulfat	AppliChem GmbH
Natriumsulfit	Thermo Fisher Scientific
Periodsäure	Sigma Aldrich
Phosphorsäure (85%)	Sigma Aldrich
Salzsäure (37%)	AppliChem GmbH
Sauerstoff	Linde plc
Schwefelsäure (96%)	Sigma Aldrich
Thiamin-HCl	Sigma Aldrich
2-Thioarbitursäure	Sigma Aldrich
Tonmineralien (EX M 1753)	Clariant AG
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Trypton	AppliChem GmbH

---

### 6.1.3 Bakterielle Stämme

Für die Kultivierungsarbeiten in dieser Arbeit wurden verschiedene bakterielle Stämme verwendet. Diese sind mit ihren relevanten Charakteristika und Quellen in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Bakterielle Stämme mit relevanten Charakteristika und Quelle

<b>Stamm</b>	<b>Relevante Charakteristika</b>	<b>Quelle</b>
<i>E. coli</i> B2032/82 K1	klinisches Isolat; DSM-Nr. 107164	[102]
<i>E. coli</i> BL21 pKT274	Amp <sup>R</sup> , pHC79 Derivat mit inseriertem Kapselsynthese ( <i>kps</i> ) Gencluster	Institut für klinische Chemie (Hannover)
<i>E. coli</i> BL21 pKT774	Kan <sup>R</sup> , pKT274 Derivat	Institut für klinische Chemie (Hannover)
<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE	Clp <sup>R</sup> , pKT274 Derivat; <i>E. coli</i> K1 Polysialyltransferase ersetzt durch <i>N. meningitidis</i> Serogroup C; $\Delta$ neuS::synE	Institut für klinische Chemie (Hannover)

### 6.1.4 Kultivierungsmedien

Zur Anzucht der Bakterien wurden verschiedene Flüssigmedien verwendet. Für die erste Vorkultur wurde ein komplexes LB-Medium [103] verwendet. Die Bestandteile werden in VE-Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit NaOH auf pH = 7,3 eingestellt und das Medium für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des LB-Mediums

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Hefeextrakt	5 g/L
Trypton	10 g/L
NaCl	10 g/L

Anschließend wurde eine zweite Vorkultur auf einem definierten Medium nach Korz *et al.* [82] angezogen. Die Bestandteile werden in VE-Wasser gelöst und der pH-Wert wird mit NaOH auf pH = 7,5 eingestellt. Zur Sterilisation wird das Medium filtriert (Trenngröße: 0,22 µm). Die Zusammensetzung des definierten Mediums ist in dargestellt.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des definierten Mediums nach Korz *et al.* [82]

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Glucose	25 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,3 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g/L
Citronensäure	1,7 g/L
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	1,2 g/L
Thiamin-HCl	4,5 mg/L
EDTA (Triplex III)	8,4 mg/L
CoCl <sub>2</sub>	1,36 mg/L
CuCl <sub>2</sub>	1,18 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg/L
MnCl <sub>2</sub>	9,53 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	1,5 mg/L
Zn(CH <sub>3</sub> -COO) <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	13 mg/L
Fe(III)-Citrat Hydrat	100 mg/L

### 6.1.5 Antibiotika

Zur Selektion und Kultivierung der rekombinanten Stämme, die verschiedene Plasmide tragen (siehe Tabelle 7), wurde zu dem jeweiligen Medium 1 mL/L einer spezifischen Antibiotika-Stammlösung gegeben. Die Konzentrationen und verwendeten Lösemittel sind in dargestellt. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

**Tabelle 10:** Antibiotika-Stammlösungen

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Lösemittel</b>	<b>Stamm</b>
Ampicillin	50 g/L	VE-Wasser	<i>E. coli</i> BL21 pKT274
Kanamycin	50 g/L	VE-Wasser	<i>E. coli</i> BL21 pKT774
Chloramphenicol	34 mg/L	96% Ethanol	<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE

## 6.2 Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Methoden beschrieben, die bei den Kultivierungsarbeiten, der Produktisolation und Aufreinigung und Produktanalytik verwendet wurden.

### 6.2.1 Kultivierungsarbeiten

#### 6.2.1.1 Stammhaltung

Für die Kultivierungsarbeiten wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet (Tabelle 7). Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden einzelne Kolonien der Bakterien von einer Agar-Platte in LB-Medium (Tabelle 8) inokuliert. Die Anzucht erfolgte in Schüttelkolben bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  rel. AU – 1 rel. AU. Die Hälfte der Kulturbrühe wurde mit 50% (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

#### 6.2.1.2 Anzucht der ersten Vorkultur

Zur Anzucht der Vorkulturen werden 500 µL einer Dauerkultur in Schüttelkolben mit Schikanen in eine entsprechende Menge LB-Medium (Tabelle 8) inokuliert. Die Inkubation erfolgt für einen definierten Zeitraum bei 37 °C und 200 RPM auf einem Schüttelinkubator. Da das eingesetzte Medienvolumen und die Inkubationszeit variieren, sind die Bedingungen der Vorkulturen in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Kultivierungsbedingungen der LB-Vorkulturen

<b>Stamm</b>	<b>Medienvolumen</b>	<b>Inkubationszeit</b>
<i>E. coli</i> K1	50 mL	5 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT274	25 mL	6 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT774	10 mL	9,5 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE	50 mL	13 h

#### 6.2.1.3 Anzucht der zweiten Vorkultur

Die Vorkultur für die Hauptkultivierung im Bioreaktor wird in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen angezogen. Dazu werden 100 mL des definierten Mediums (Tabelle 9) mit einer entsprechenden Menge der ersten Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgt für einen definierten Zeitraum bei 37°C und 150 RPM auf einem Schüttelinkubator. Da das eingesetzte Inokulationsvolumen und die Inkubationszeit variieren, sind die Bedingungen der Vorkulturen in Tabelle 12 zusammengefasst.



**Tabelle 12:** Kultivierungsbedingungen der Vorkulturen auf definiertem Medium

<b>Stamm</b>	<b>Inokulationsvolumen</b>	<b>Inkubationszeit</b>
<i>E. coli</i> K1	20 µL	12 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT274	200 µL	14 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT774	700 µL	15 h
<i>E. coli</i> BL21 pKT274-synE	700 µL	12 h

#### **6.2.1.4 Kultivierung im Rührkesselreaktor**

Die Kultivierungsarbeiten im 2 L-Labormaßstab werden mit dem Reaktorsystem Biostat® Aplus (Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt. Über die zugehörigen Ports im Deckel werden die Temperatursonde, die Gelöstsauerstoffelektrode (OxyFerm FDA, Hamilton Company) und die kalibrierte pH-Elektrode (easyFerm plus, Hamilton Company) installiert. Anschließend wird der Glaskessel mit 1,5 Liter Pufferlösung inklusive 0,25 µL/L Antischaummittel (Desmophen 3900, Bayer AG) befüllt und für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Nach der Sterilisation werden die Sonden und Schläuche für pH-Korrekturmittel (1 M HCl und 25% Ammoniak), sowie das Kühlaggregat und der Heizmantel an die Kontrolleinheit angeschlossen. Die restlichen Medienbestandteile werden über einen Sterilfilter in den Reaktor gepumpt. Anschließend wird das System mit synthetischer Luft bei einer Begasungsrate von 2 L/min (1 vvm) begast. Ein mechanischer Rührer sorgt für die kontinuierliche Durchmischung des Systems.

Am nächsten Morgen wird die nun polarisierte Gelöstsauerstoffelektrode kalibriert und der Reaktor auf eine Start-OD<sub>600</sub> = 0,4 rel. AU inokuliert. Die Kultivierung wird bei 37°C, neutralem pH 7,5 und einer Rührgeschwindigkeit von 600 RPM durchgeführt. Der Anteil an gelöstem Sauerstoff wird auf 30 % reguliert. Die Kontrolle des Prozesses erfolgt über die Software µDCU (Version 6.34, Sartorius Stedim Biotech GmbH). Der Prozessverlauf wird online über die Software BioPAT® MFCS (Version 2.1, Sartorius Stedim Biotech GmbH) aufgezeichnet.

#### **6.2.1.5 Kultivierung im Einwegbeutel-Reaktor**

Die Kultivierungsarbeiten im technischen 25 L-Produktionsmaßstab werden mit einem Einwegbeutel-Reaktor durchgeführt. An das verwendete Kontrollsystem (Biostat® CultiBag RM 20/50, Sartorius Stedim Biotech GmbH) wird eine Rockerplattform angeschlossen auf die ein Reaktorbeutel (Flexsafe® RM 50 optical, Sartorius Stedim Biotech GmbH) montiert wird. Der Reaktor wird über einen Sterilfilter (Sartobran® P300, Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit Medium befüllt, wobei 50 % des Gesamtvolumens für die Begasung über den Kopfraum

genutzt werden. Der Reaktor wurde mit 4 % (v/v) des gesamten Kulturvolumens beimpft. Der pH-Wert und der Anteil des gelösten Sauerstoffs werden optisch über vorinstallierte und kalibrierte Sensorspots überwacht.

Zu Beginn der Kultivierung wird der Reaktor auf eine  $OD_{600} = 0,4$  rel. AU inokuliert. Die Kultivierung wird bei  $37^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 25 % Ammoniak auf 7,5 reguliert. Der Anteil an gelöstem Sauerstoff wird durch kontinuierliche Erhöhung der Kippfrequenz (maximal 42 Rpm) und Dosierung von Sauerstoff auf 50 % reguliert. Die Begasung des Reaktors erfolgt mit einer Rate von 2,5 L/min (0,1 vvm). Der Prozessverlauf wird online über die Software BioPAT<sup>®</sup> MFCS (Version 4, Sartorius Stedim Biotech GmbH) aufgezeichnet.

### **6.2.1.6 Offline-Analytik von Kultivierungsproben**

Zur besseren Überwachung des Kultivierungsprozesses werden in stündlichen Intervallen 10 mL Proben aus dem Reaktor entnommen. Diese werden wie nachfolgend beschrieben analysiert.

#### **6.2.1.6.1 Bestimmung der optischen Dichte**

Das Zellwachstum wird durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge 600 nm ( $OD_{600}$ ) mit einem Photometer (Libra S80, Biochrom GmbH) gegen 0,9 % (w/v) NaCl verfolgt. Der lineare Bereich liegt zwischen 0,1 rel. AU – 0,3 rel. AU. Proben die einen Wert von 0,3 rel. AU überschreiten wurden entsprechend verdünnt.

#### **6.2.1.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse**

Zur Analyse der Biotrockenmasse-Konzentration wird 1 mL Probe in ein getrocknetes 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 13.000 RPM zentrifugiert (Heraeus<sup>™</sup> Biofuge<sup>™</sup> pico, Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wird verworfen und das Pellet für 72 h bei  $70^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Die Biotrockenmasse wird aus der Gewichts Differenz des getrockneten Pellet zum Leergewicht des Reaktionsgefäß ermittelt.

#### **6.2.1.6.3 Bestimmung der Glucosekonzentration**

Die Glucose-Konzentration der Kulturbrühe wird basierend auf einer enzymatischen Methode bestimmt. Dazu werden die Zellen aus der Kulturbrühe durch Zentrifugation für 5 min bei

13.000 RPM (Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific) abgetrennt. Der zellfreie Überstand wird mit dem YSI 2900 (YSI Incorporated) analysiert. Gegebenenfalls werden die Proben mit Analysepuffer in einen Bereich von 0 bis 10 g/L verdünnt.

### **6.2.1.6.4 Bestimmung der Acetatkonzentration**

Die Acetat-Konzentration der Kulturbrühe wird über eine HPLC Analyse mit einer Aminex® HPX-87H-Säule (Bio-Rad Laboratories) bei 55 °C und einer Flussrate von 0,6 mL/min bestimmt. Dazu werden 20 µL zellfreie Probe bzw. Standardlösung injiziert. Die Elution der Probe erfolgt mit 50 mM Schwefelsäure. Das Signal wird mit einem DAD-Detektor (Hitachi DAD 5430) bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen. Als Referenz wird eine Standardreihe von Natriumacetat im Bereich von 0,1 bis 20 g/L gemessen. Die Konzentration wird über die Integration der Peaks mit der Software OpenLab (Agilent Technologies) bestimmt.

### **6.2.1.6.5 Bestimmung der Protein-Konzentration**

Die Protein-Konzentration wird mit der Quantifizierungsmethode nach Bradford [104] bestimmt. Als Referenz wird kommerziell erhältliches Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 bis 2 g/L verwendet. Dazu werden 20 µL Probe bzw. Standardlösung mit 300 µL Bradford-Reagenz (Quick Start™ Bradford-Dye, Bio-Rad Laboratories GmbH) in einer Mikrotiterplatte versetzt. Die Proben werden 30 sec geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (Multiskan Spectro, Thermo Fisher Scientific).

### **6.2.1.6.6 Bestimmung der Polysialinsäurekonzentration**

Die Konzentration von Polysialinsäure wird mit einem modifizierten kolorimetrischen TBA-Assay nach Aminoff bestimmt [105,106]. Als Referenz wird kommerziell erhältliche Colominsäure (Carbosynth Limited) im Bereich von 0 bis 1 g/L verwendet. Zur Analyse werden 50 µL zellfreie Probe bzw. Standardlösung und 200 µL 50 mM Phosphorsäure in ein 2 mL-Reaktionsgefäß gegeben und für 18 h bei 70 °C und schüttelnd inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 100 mM Natronlauge neutralisiert. Nach Zugabe von 100 µL Oxidationslösung (siehe Tabelle 13) wird die Probe für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Weiterhin werden 500 µL Reduktionslösung (siehe Tabelle 14) zugegeben und die Probe für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem finalen Schritt wird die Probe durch Zugabe von 500 µL TBA-Lösung (siehe Tabelle 15) bei 95 °C für 13 min derivatisiert. 200 µL jedes

Ansatzes werden in eine Mikrotierplatte übertragen und anschließend die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 549 nm gemessen (Multiskan Spectro, Thermo Fisher Scientific).

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Oxidationslösung**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
Periodsäure	2,28 g	200 mM
1 M Phosphorsäure	2,5 mL	50 mM
Wasser	47,5 mL	

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Reduktionslösung**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
Natriumarsenit	2,5 g	385 mM
Natriumsulfat	3,55 g	500 mM
2 M Schwefelsäure	5 mL	200 mM
Wasser	45 mL	

**Tabelle 15: Zusammensetzung der TBA-Lösung**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
2-Thiobarbituräure	1,5 g	208 mM
3 M Natronlauge	5 mL	300 mM
Wasser	45 L	

### 6.2.2 Produktisolation- und aufreinigung

Zur Isolation und Aufreinigung der polySia aus der Kulturbrühe werden verschiedene Methoden verwendet die nachfolgend beschrieben sind. Da in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Reinigungsstrategien verfolgt werden, ist eine genaue Abfolge der einzelnen Schritte in Kapitel 4.2 und 4.3 beschrieben.

#### 6.2.2.1 Reifeprozess und Zellseparation

Nach Beendigung der Kultivierung wird die Kulturbrühe im Einwegbeutelreaktor für 17 h bei 8°C gelagert. Anschließend werden die Zellen durch kontinuierliche Zentrifugation (Heraeus™ Contifuge Stratos™, Thermo Fisher Scientific) abgetrennt. Die Kulturbrühe wird mit einer Flussrate von 100 mL/min aus dem Reaktor gepumpt und bei 17.000 RPM und 4 °C zentrifugiert.

### **6.2.2.2 Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes durch Crossflow-Ultrafiltration**

Der zellfreie Überstand wird im Anschluss durch Crossflow-Ultrafiltration (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) aufkonzentriert. Dabei werden Ultrafiltrationskassetten mit Trenngrößen von 10 und 30 kDa verwendet (Sartocon® Slice Hydrosart® Cassette, Sartorius Stedim Biotech GmbH). Das Probenvolumen wird dabei auf 500 mL reduziert. Der innere Druck des Systems wird über eine automatisierte Anpassung der Pumprate auf maximal 2 bar reguliert.

### **6.2.2.3 Ethanolfällung**

Die proteinogenen Verunreinigungen im Retentat werden durch Ethanol gefällt. Dazu wird festes NaCl (5 % (w/v)) zum Retentat gegeben und vollständig gelöst. Anschließend wird die Lösung mit 96 % (v/v) Ethanol auf eine finale Konzentration von 80 % (v/v) Ethanol verdünnt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wird für 30 min bei 4.700 RPM und 4 °C zentrifugiert (Multifuge™ X3 FR, Thermo Fisher Scientific) und anschließend in Wasser resuspendiert. Der beschriebene Ablauf wird insgesamt zweimal wiederholt. Nach dem finalen Fällungsschritt wird das Präzipitat in 500 mL Wasser gelöst.

### **6.2.2.4 Behandlung mit Tonmineralien**

Zur weiteren Reinigung wird die Probe nach Ethanolfällung mit Tonmineralien (EX M 1753, Clariant AG) behandelt. Zunächst werden pro 100 mL Probe 8 g Tonmineralien in 40 mL 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit neutralem pH 7 für 1 h unter Rühren equilibriert. Anschließend wird die Probe hinzugegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Danach werden die Tonmineralien durch Zentrifugation (Multifuge™ X3 FR, Thermo Fisher Scientific) für 75 min bei 4.700 RPM und 4 °C abgetrennt. Die Behandlung wird ein weiteres Mal wiederholt. Abschließend wird der Überstand durch die Crossflow-Ultrafiltration (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) unter Verwendung einer Ultrafiltrationskassette (Sartocon® Slice Hydrosart® Cassette, Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit einer Trenngröße von 0,45 µm sterilfiltriert.

### **6.2.2.5 Ammoniumsulfatfällung**

Die Ammoniumsulfatfällung wird als alternative Methode zur Ethanolfällung und anschließender Tonmineralienbehandlung durchgeführt. Zur Qualifizierung der Methode werden verschiedene Mengen an festem Ammoniumsulfat zu je 10 mL des Retentats der

Crossflow-Ultrafiltration gegeben (siehe Tabelle 16), um den optimalen Sättigungsgrad zur Fällung der zelleigenen Proteine zu bestimmen. Im technischen Maßstab wurde mit dem Salz durch langsame Zugabe eine Konzentration von 528 g/L eingestellt. Die Lösung wurde 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden proteinogene Aggregate durch Zentrifugation (Multifuge™ X3 FR, Thermo Fisher Scientific) für 60 min bei 11.000 RPM abgetrennt. Abschließend wird die Probe filtriert (Fisherbrand™ PES, Thermo Fisher Scientific).

**Tabelle 16:** Mengen an Ammoniumsulfat zur Einstellung bestimmter Sättigungsgrade bei 20°C

		<b>Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)</b>																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		<b>Zugegebene Menge an Ammoniumsulfat (g/L)</b>																
<b>Anfangskonzentration Ammoniumsulfat (%)</b>	0	65	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	622	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	522
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	441	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	275	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	65	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

### 6.2.2.6 Alkalische Inkubation

Zur weiteren Reinigung wird die Probe in einer alkalischen Umgebung inkubiert nachdem Ammoniumsalze vollständig entfernt wurden. Dafür wird der pH-Wert durch Titration mit Natronlauge auf pH 13 eingestellt. Die Lösung wird anschließend für 16 h unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit Salzsäure auf pH 7,4 neutralisiert, 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben und die Probe sterilfiltriert (Fisherbrand™ PES, Thermo Fisher Scientific).

### 6.2.2.7 Applikation von Membranadsorbertechnologie

Zur Entfernung von Kontaminanten wie Wirtszellproteinen, DNA und Endotoxinen werden verschiedene Membranadsorber-Module getestet. Die Evaluierung der unterschiedlichen Module wird in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

#### 6.2.2.7.1 Hydrophobe Interaktion mit dem Sartobind® Phenyl-Modul

##### Evaluation des Membranadsorbers

Zur Entfernung von zelleigenen Proteinen wird ein hydrophobes Interaktionsmodul getestet. Die Evaluation wird mit dem Modul Sartobind® Phenyl nano 3 mL (Membranfläche: 110 cm<sup>2</sup>, CV: 3 mL Sartorius Stedim Biotech GmbH) in einem FPLC-System (ÄKTA™ pure 25 L, GE Healthcare) verwendet. Der Prozess wird über die Systemsoftware Unicorn™ (Version 6.4, GE Healthcare) kontrolliert. Zur Evaluation werden jeweils eine 1 mg/mL polySia- und BSA-Stammlösung in Laufpuffer (pH = 7) (siehe Tabelle 17) verwendet. Das Modul wird zunächst für 30 min mit 1 M NaOH gereinigt und anschließend mit 20 CV Wasser gespült. Der Membranadsorber wird mit 5 CV Laufpuffer (pH = 7) (siehe Tabelle 17) equilibriert. Anschließend wird die Probe auf den Membranadsorber geladen und das Modul mit 5 CV Laufpuffer gewaschen. Zur Elution der Probe wird ein linearer Gradient mit 25 CV Elutionspuffer bei pH = 7 (siehe Tabelle 17) verwendet. Das Modul wird mit 5 CV Laufpuffer equilibriert, bevor es erneut beladen wird. Die Flussrate beträgt 10 mL/min, wobei ein maximaler Druck von 0,4 MPa nicht überschritten wird. Zur weiteren Probenanalyse werden 2 mL-Fractionen gesammelt.

**Tabelle 17:** Pufferzusammensetzung des Sartobind® Phenyl Membranadsorbers

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
Laufpuffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,672 g/L	50 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,154 g/L	
	<b>Ammoniumsulfat</b>	<b>264,24 g/L</b>	<b>2000 mM<sup>1</sup></b>
	<b>Ammoniumsulfat</b>	<b>198,21 g/L</b>	<b>1500 mM<sup>2</sup></b>
Elutionspuffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,672 g/L	50 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,154 g/L	

<sup>1</sup>Evaluation / <sup>2</sup>Aufreinigung im Prozessmaßstab

### Applikation im Prozessmaßstab

Zur Aufreinigung von Prozessproben wird die Modulgröße durch Verwendung von Sartobind® Phenyl 150 mL-Modulen (Membranfläche: 5500 cm<sup>2</sup>, CV: 150 mL Sartorius Stedim Biotech GmbH) auf skaliert. Das Modul wird zunächst für 30 min mit 1 M NaOH gereinigt und anschließend mit 20 CV Wasser gespült. Der Membranadsorber wird mit 5 CV Laufpuffer (siehe Tabelle 17) equilibriert. Die aufgetragene Probenmenge wird an die zuvor ermittelte maximale dynamische Bindungskapazität (siehe Kapitel 4.3.2.2.) angepasst. Nach einem Waschschrift mit 5 CV Laufpuffer wird die Probe isokratisch mit 5 CV Elutionspuffer (siehe Tabelle 17) eluiert, bevor es erneut equilibriert und beladen wird.

#### 6.2.2.7.2 Salztoleranter Anionenaustausch mit dem Sartobind® STIC-Modul

##### Evaluierung des Membranadsorbers

Die Entfernung proteinogener Verunreinigungen im Durchfluss mit gleichzeitiger Produktfraktionierung wird als Alternative zu den bisher etablierten Anionenaustauscher-Modulen getestet. Die Evaluation wird mit dem Modul Sartobind® STIC nano 1 mL (Membranfläche: 36,4 cm<sup>2</sup>, CV: 1 mL Sartorius Stedim Biotech GmbH) in einem FPLC-System (ÄKTA™ pure 25 L, GE Healthcare) verwendet. Der Prozess wird über die Systemsoftware Unicorn™ (Version 6.4, GE Healthcare) kontrolliert. Zur Evaluation werden jeweils eine 1 mg/mL polySia- und BSA-Stammlösung in Laufpuffer (pH = 7) (siehe Tabelle 18) verwendet. Das Modul wird zunächst für 30 min mit 1 M NaOH gereinigt und anschließend 30 CV Laufpuffer (pH = 7) (siehe Tabelle 18) equilibriert. Anschließend wird die Probe auf den Membranadsorber geladen und das Modul mit 20 CV Laufpuffer gewaschen. Zur Elution der Probe wird ein linearer Gradient mit 30 CV Elutionspuffer bei pH = 7 (siehe Tabelle 18) verwendet. Die Flussrate beträgt 10 mL/min, wobei ein maximaler Druck von 0,4 MPa nicht überschritten wird. Zur weiteren Probenanalyse werden 2 mL-Fractionen gesammelt.

**Tabelle 18:** Pufferzusammensetzung des Sartobind® STIC Membranadsorbers

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
Laufpuffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,869 g/L	20 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,262 g/L	
Elutionspuffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,869 g/L	20 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,262 g/L	
	Ammoniumsulfat	198,21 g/L	1500 mM



### **6.2.2.7.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie zur Endotoxinentfernung**

Um Endotoxine abzureichern wird die hydrophobe Interaktionschromatographie als produktschonendere Alternative zur alkalischen Inkubation getestet. Hierbei wird das Sartobind® Phenyl 150 mL-Modul mit den zuvor beschriebenen Bedingungen (siehe Kapitel 6.2.2.7.1) betrieben. Als Laufpuffer wird 50 mM KPP (pH = 7) mit 0,7 M Ammoniumsulfat und 1 mM CaCl<sub>2</sub> verwendet. Die verwendete Flussrate beträgt 150 mL/min. Nach vollständiger Elution aller unspezifisch gebundenen Kontaminanten wird der Membranadsorber mit 5 CV Laufpuffer equilibriert bevor erneut probe aufgetragen wird.

### **6.2.2.8 Abreicherung von Endotoxinen mittels Affinitätssäulen**

Als weitere produktschonendere Alternative zur Entfernung von Endotoxinen ohne alkalische Inkubation mit anschließender Fraktionierung über einen Anionenaustauscher werden EndoTrap® HD-Affinitätssäulen (Lionex GmbH) getestet. Dabei wird vor allem die Nutzbarkeit von Phosphat- und TRIS-Puffern gegenüber dem kommerziellen Puffer (siehe Tabelle 19) getestet, die bereits im Prozess verwendet werden. Die verwendeten Puffer und Lösungen werden mit endotoxinfreiem Wasser (HyPure™ Cell Culture Grade Water, GE Healthcare) angesetzt. Für die Untersuchung wird eine 1 mg/mL polySia-Stammlösung in unterschiedlichen Laufpuffern (siehe Tabelle 19) verwendet. Die EndoTrap® HD-Säulen werden zunächst mit 3 mL Regenerationspuffer (siehe Tabelle 19) gespült. Anschließend wird die Säule zweimal mit je 3 mL des verwendeten Laufpuffers equilibriert. Die Probe wird auf die Säule gegeben und nach dem Durchlauf in einem 50 mL-Reaktionsgefäß aufgefangen, wobei die Durchlaufgeschwindigkeit gravimetrisch ist.

**Tabelle 19:** Verwendete Puffer zur Applikation der Affinitätssäulen

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
EQ (pH = 7,5)	HEPES		20 mM
	NaCl		150 mM
	CaCl <sub>2</sub>		0,1 mM
KPP (pH = 7)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,672 g/L	50 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,154 g/L	
	NaCl	40,91 g/L	700 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,11 g/L	0,1 mM
TRIS (pH = 7)	TRIS-Base	6,057 g/L	50 mM
	NaCl	40,91 g/L	700 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,11 g/L	0,1 mM

#### 6.2.2.9 Diafiltration

Salzen, die im Laufe des Prozesses eingetragen werden, werden durch Diafiltration entfernt. Dazu wird eine Crossflow-Ultrafiltration (Sartoflow<sup>®</sup> Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) unter Verwendung von Ultrafiltrationskassetten mit einer Trenngröße von 5 kDa (Sartocon<sup>®</sup> Slice Hydrosart<sup>®</sup> Cassette, Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt. Als Kriterium zum Beenden des Schrittes dient ein konstanter Leitfähigkeitswert (< 1 mS/cm<sup>2</sup>).

#### 6.2.2.10 Gefriertrocknung

Um stabiles Produkt zu gewinnen, wird die Probelösung nach der Diafiltration gefriergetrocknet (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Die Lösung wird zunächst vollständig eingefroren und anschließend bei -20 °C und 0,1 mbar getrocknet.

#### 6.2.2.11 Produktion von kurzkettiger polySia

Die Temperatursensitivität von Polysialinsäure kann genutzt werden, um die glykosidischen Bindungen thermisch zu spalten und kurzkettige Moleküle zu synthetisieren. Dazu wird eine wässrige 1 g/L-Probelösung aus gereinigtem, langkettigem Material hergestellt und unter Rühren für 7 h bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Probelösung auf Raumtemperatur heruntergekühlt und 0,1 M festes Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)

hinzugegeben. Die Isolation des kurzkettigen Materials erfolgt über Fraktionierung an ein Sartobind® Q 75 mL-Modul. Der Membranadsorber wird mit einer peristaltischen Pumpe ohne Online-Kontrolle betrieben. Die Fraktionen mit verschiedenen Kettenlängen werden über einen etablierten Gradienten eluiert [48], wobei die Salzkonzentration in 3 Stufen schrittweise erhöht wird (siehe Tabelle 20). Abschließend wird die Probe in den unterschiedlichen Fraktionen gefriergetrocknet (6.2.2.10).

**Tabelle 20:** Elutionsgradient zur Isolation kurzkettiger polySia in 3 Stufen nach [48]

<b>Stufe</b>	<b>Volumen</b>	<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	<b>Kettenlänge</b>
Equilibrierung	5 CV	0,1 M	
Elution 1	5 CV	0,28 M	DP<20
Elution 2	5 CV	0,35 M	DP20 ±8
Elution 3	5 CV	1 M	DP>20

### 6.2.3 Produktanalytik

#### 6.2.3.1 Proteinanalytik

Ergänzend zum bereits beschriebenen Bradford Assay (6.2.1.6.5) wird die Protein-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (UV5Nano UV/VIS-Spektrometer, Mettler Toledo) bestimmt.

#### 6.2.3.2 DNA-Analytik

Die Konzentration bakterieller DNA im finalen Produkt wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (UV5Nano UV/VIS-Spektrometer, Mettler Toledo) bestimmt.

#### 6.2.3.3 Endotoxin-Analytik

Der Gehalt an Endotoxin einer Probe wird mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test gemessen. Dazu wird die Probe mit Endotoxin-freiem Wasser in einen Konzentrationsbereich von 0,1 – 10 EU/mL verdünnt. Anschließend werden je 25 µL Probe in die 4 Wells der Messkartusche (PTS100, Charles River Laboratories) gegeben und mit dem spezifischen Testsystem Endosafe® nexgen-PTS™ (Charles River Laboratories) analysiert.

### 6.2.3.4 Bestimmung der Kettenlänge

Die maximale Kettenlänge wird mit einer HPLC-basierten Messmethode bestimmt, bei der die Probe zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,2-Diamino-4,5-methylenoxybenzol (DMB) markiert wird [107]. Das DMB-Reagenz (siehe Tabelle 21) wird frisch angesetzt und vor Licht geschützt. Anschließend werden pro Reaktionsansatz 50  $\mu\text{L}$  Probelösung, 80  $\mu\text{L}$  DMB-Reagenz, 80  $\mu\text{L}$  20 mM Trifluoressigsäure (TFA)-Lösung und 20  $\mu\text{L}$  Wasser in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und lichtgeschützt für 24 h bei 500 RPM und 10 °C im Thermoblock inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  1 M NaOH beendet.

**Tabelle 21:** Zusammensetzung der DMB-Reagenzlösung

Bestandteil	Menge
DMB	0,0016 g
Natriumsulfit	0,0016 g
B-Mercaptoethanol	56,3 $\mu$
Wasser	943,7 $\mu\text{L}$

Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Proben erfolgt über eine DNAPac™ PA100-Anionenaustausch-Säule (Thermo Fisher Scientific). Für die Analytik werden 25  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Probe injiziert und mit einem Fluoreszenzdetektor (RF-20A, Shimadzu) bei einer Extinktionswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm detektiert. Die Flussrate wird auf 1 mL/min. Als Laufpuffer wird Reinstwasser verwendet. Die Elution der Probe erfolgt durch 4 M Ammoniumacetat über ein definiertes Gradientenprofil (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 22:** Gradientenprofil der DMB-HPLC

Zeit	Reinstwasser	4 M Ammoniumacetat
0 min	100% (v/v)	0% (v/v)
5 min	100% (v/v)	0% (v/v)
15 min	90% (v/v)	10% (v/v)
20 min	87% (v/v)	13% (v/v)
35 min	83% (v/v)	17% (v/v)
55 min	80% (v/v)	20% (v/v)
100 min	74% (v/v)	26% (v/v)
180 min	70% (v/v)	30% (v/v)

### **6.2.3.5 Strukturanalysen mittels NMR-Spektroskopie**

Zur Charakterisierung der intramolekularen Struktur werden Proben über NMR-Spektroskopie analysiert. Dazu werden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren der hergestellten polySia aufgenommen. Das getrocknete Material wird in Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ) mit einer Konzentration von 20 – 30 mg/mL gelöst. Die Messungen werden in einem Ascend 400 MHz und 600 MHz Messsystem mit Avance III Konsole und Prody BBFO probe (Bruker Corporation) durchgeführt. Die Auswertung und der Vergleich der Spektren erfolgen über die Software Topspin (Version 3.6.2, Bruker Corporation).

---

## Literaturverzeichnis

- [1] O. Adam, A. Vercellone, F. Paul, P.F. Monsan, G. Puzo, A nondegradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides, *Anal. Biochem.* 225 (1995) 321–327.
- [2] S. Sachdeva, R. V. Palur, K.U. Sudhakar, T. Rathinavelan, E. coli group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–19.
- [3] P. Cescutti, Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides, in: *Microb. Glycobiol.*, Elsevier Inc., 2010: pp. 93–108.
- [4] T. Janas, T. Janas, Membrane oligo- and polysialic acids, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 2923–2932.
- [5] L.M. Willis, C. Whitfield, KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 20753–20758.
- [6] C. Whitfield, I.S. Roberts, Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1307–1319.
- [7] 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.
- [8] C. Whitfield, Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 39–68.
- [9] F.A. Weisgerber, Christoph, Troy, Biosynthesis of the Polysialic Acid Capsule in *Escherichia coli* K1, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1578–1587.
- [10] J.W. Costerton, R.T. Irvin, K.J. Cheng, The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease, *Annu. Rev. Microbiol.* 35 (1981) 299–324.
- [11] T. Janas, T. Janas, Membrane oligo- and polysialic acids, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 2923–2932.
- [12] D. Scholl, S. Adhya, C. Merrill, *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 4872–4874.
- [13] R. Gerardy-Schahn, P. Delannoy, M. von Itzstein, *SialoGlyco Chemistry and Biology II*, 2015.
- [14] L.M. Willis, C. Whitfield, Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways, *Carbohydr. Res.* 378 (2013) 35–44.

- [15] N. Navasa, L.B. Rodríguez-Aparicio, M.Á. Ferrero, A. Moteagudo-Mera, H. Martínez-Blanco, Growth temperature regulation of some genes that define the superficial capsular carbohydrate composition of *Escherichia coli* K92, *FEMS Microbiol. Lett.* 320 (2011) 135–141.
- [16] I.S. Roberts, the Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 285–315.
- [17] K.J. Colley, K. Kitajima, C. Sato, Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (2014) 498–532.
- [18] J. Wu, X. Zhan, L. Liu, X. Xia, Bioproduction, purification, and application of polysialic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 9403–9409.
- [19] Y. Li, X. Chen, Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications., *Appl Microbiol Biotechnol.* 29 (2012) 997–1003.
- [20] J.C. Lindon, J.G. Vinter, M.R. Lively, C. Moreno, Conformational and dynamic differences between *N. meningitidis* serogroup B and C polysaccharides, using n.m.r. spectroscopy and molecular mechanics calculations., *Carbohydr. Res.* 133 (1984) 59–74.
- [21] A.K. Bhattacharjee, H.J. Jennings, C.P. Kenny, A. Martin, I.C. Smith, Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1926–1932.
- [22] 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.
- [23] A. Williams, R.J. Linhardt, M.A.G. Koffas, Metabolic engineering of capsular polysaccharides, *Emerg. Top. Life Sci.* 2 (2018) 337–348.
- [24] M.Á. Ferrero, L.R. Aparicio, Biosynthesis and production of polysialic acids in bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 1621–1635.
- [25] 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)
- [26] L.M. Willis, J. Stupak, M.R. Richards, T.L. Lowary, J. Li, C. Whitfield, Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 7868–7873.

- [27] J. Plumbridge, E. Vimr, Convergent Pathways for Utilization of the Amino Sugars, *Microbiology*. 181 (1999) 47–54.
- [28] N. Navasa, L. Rodríguez-Aparicio, M.Á. Ferrero, A. Monteagudo-Mera, H. Martínez-Blanco, Polysialic and colanic acids metabolism in *Escherichia coli* K92 is regulated by RcsA and RcsB, *Biosci. Rep.* 33 (2013) 405–415.
- [29] B. Revilla-Nuin, Á. Reglero, H. Martínez-Blanco, I.G. Bravo, M.A. Ferrero, L.B. Rodríguez-Aparicio, Transport of N-acetyl-D-mannosamine and N-acetyl-D-glucosamine in *Escherichia coli* K1: Effect on capsular polysialic acid production, *FEBS Lett.* 511 (2002) 97–101.
- [30] L. Song, H. Zhou, X. Cai, C. Li, J. Liang, C. Jin, NeuA O-acetyltransferase activity is specific for CMP-activated O-acetyl sialic acid in *Streptococcus suis* serotype 2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 (2011) 212–217.
- [31] B.I. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009).
- [32] F. Freiberger, H. Claus, A. Günzel, I. Oltmann-Norden, J. Vionnet, M. Mühlenhoff, U. Vogel, W.F. Vann, R. Gerardy-Schahn, K. Stummeyer, Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 1258–1275.
- [33] S. Ono, M. Hane, K. Kitajima, C. Sato, Novel regulation of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 3710–3722.
- [34] U. Rutishauser, Polysialic acid at the cell surface: Biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity, *J. Cell. Biochem.* 70 (1998) 304–312.
- [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.
- [36] R. Seidenfaden, A. Krauter, F. Schertzinger, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Polysialic Acid Directs Tumor Cell Growth by Controlling Heterophilic Neural Cell Adhesion Molecule Interactions, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 5908–5918.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] S. Kallolimath, A. Castilho, R. Strasser, C. Grünwald-Gruber, F. Altmann, S. Strubl, C.E. Galuska, K. Zlatina, S.P. Galuska, S. Werner, H. Thiesler, S. Werneburg, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn, H. Steinkellner, Engineering of complex protein sialylation in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 9498–9503.
- [40] 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, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–17.
- [41] 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)
- [42] Y. Kanato, K. Kitajima, C. Sato, Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization, *Glycobiology.* 18 (2008) 1044–1053.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] A. Weber, A. Engelmaier, J. Siekmann, P.L. Turecek, Polysialic Acid-Mediated Activity Measurement of Polysialylated Recombinant Coagulation Factor VIII., *J. Pharm. Sci.* 109 (2020) 966–974.
- [46] 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.
- [47] X. Lemercinier, C. Jones, Full <sup>1</sup>H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production, *Carbohydr. Res.* 296 (1996) 83–96.
- [48] J.S. Rehfeld, Entwicklung und Charakterisierung eines chromatographischen Verfahrens zur Produktion niedermolekularer Polysialinsäure (2019).

- [49] 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.
- [50] S. Sharma, S. Hanif, N. Kumar, N. Joshi, R. Rana, J. Dalal, D. Singh, M.K. Chhikara, Rapid processes for purification of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A and C, *Biologicals.* 43 (2015) 383–389.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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. Reports.* 17 (2018) 110–116.
- [54] 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 *E. coli* in defined medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1988) 474–483.
- [55] Z.Y. Zheng, S.Z. Wang, G.S. Li, X.B. Zhan, C.C. Lin, J.R. Wu, L. Zhu, A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 2405–2412.
- [56] 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, *Biochem. Eng. J.* 53 (2010) 97–103.
- [57] D. Petsch, F.B. Anspach, Endotoxin removal from protein solutions, *J. Biotechnol.* 76 (2000) 97–119.
- [58] P.O. Magalhães, A.M. Lopes, P.G. Mazzola, C. Rangel-yagui, T.C. V Penna, Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review, *Pharm. Sci.* 10 (2011) 1–15.

- [59] Abbildung6\_LPSmembrane, (n.d.). <https://thenativeantigencompany.com/endotoxin-testing-services/>.
- [60] Y. Li, D. Boraschi, Endotoxin contamination: A key element in the interpretation of nanosafety studies, *Nanomedicine*. 11 (2016) 269–287.
- [61] B. Bartling, J.S. Rehfeld, D. Boßmann, I. De Vries, J. Fohrer, F. Lammers, T. Scheper, S. Beutel, Determination of the Structural Integrity and Stability of Polysialic Acid during Alkaline and Thermal Treatment, *Molecules*. 25 (2019) 1–15.
- [62] I. de Vries, Herstellung zelleigener Produkte mittels *Escherichia coli* in unterschiedlichen Bioreaktorsystemen, (2018).
- [63] 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, *J. Chromatogr. A*. 20 (2019) 1–10.
- [64] R. Kühn, Qualitätssicherung in der pharmazeutischen Industrie am Beispiel einer Tabletten-Herstellung, *Chemie Ing. Tech.* 65 (1993) 1343–1247.
- [65] Bundesministerium für Gesundheit, Leitfaden der Guten Herstellungspraxis Teil II - Wirkstoffe, 2006 (2006) 11.
- [66] G. Kutz, A. Wolff, *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*, Wiley-VCH. (2007)
- [67] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2014, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 992–1000.
- [68] R. Eibl, D. Eibl, *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, John Wiley & Sons Inc., 211AD.
- [69] 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.
- [70] H. Kubinyi, Drug research: myths, hype and reality, *Perspectives (Montclair)*. 2 (2003)
- [71] B. Mena, C. Torres, M. Herrero, V. Rives, A.R.W. Gilbert, D.K. Eggers, Protein adsorption onto organically modified silica glass leads to a different structure than sol-gel encapsulation, *Biophys. J.* 95 (2008) L51–L53.
- [72] Y. Zhang, Y.C. Lee, Acid-catalyzed lactonization of  $\alpha$ 2,8-linked oligo/polysialic acids studied by high performance anion-exchange chromatography, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6183–6189.
- [73] M.C. Cheng, C.H. Lin, H.J.H.J. Lin, Y.P. Yu, S.H. Wu, Hydrolysis, lactonization, and identification of  $\alpha$ (2→8) /  $\alpha$ (2→9) alternatively linked tri-, tetra-, and polysialic acids, *Glycobiology*. 14 (2004) 147–155.

- [74] S.A. Hussain, H. Abdelkader, N. Abdullah, S. Kmaruddin, Review on micro-encapsulation with Chitosan for pharmaceuticals applications, *MOJ Curr. Res. Rev.* 1 (2018) 77–84.
- [75] S.Y. Lee, J. Il Choi, K. Han, J.Y. Song, Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2762–2764.
- [76] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, (n.d.). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-107164> (accessed July 22, 2020).
- [77] BAuA - Biostoffe - Einstufung von Biostoffen in Risikogruppen - Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, (n.d.). <https://www.baua.de/DE/Themen/Arbeitsgestaltung-im-Betrieb/Biostoffe/Einstufung.html> (accessed July 22, 2020).
- [78] T.S. Castiñeiras, S.G. Williams, A.G. Hitchcock, D.C. Smith, E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products, *FEMS Microbiol. Lett.* 365 (2018) 1–10.
- [79] E.N. Andreishcheva, W.F. Vann, Escherichia coli BL21(DE3) chromosome contains a group II capsular gene cluster, *Gene.* 384 (2006) 113–119.
- [80] B. Hohn, J. Collins, A Small Cosmid for Efficient Cloning of Large DNA Fragments, *Gene.* 11 (1980) 291–298.
- [81] J. Finnegan, D. Sherratt, Plasmid ColE1 conjugal mobility: The nature of bom, a region required in cis for transfer, *MGG Mol. Gen. Genet.* 185 (1982) 344–351.
- [82] 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.
- [83] H. Metz, Probleme der Optimierung von Fermentationsverfahren, *Chemie Ing. Tech. - CIT.* 43 (1971) 60–65.
- [84] R. Chen, J. John, B. Rode, B. Hitzmann, R. Gerardy-Schahn, C. Kasper, T. Scheper, Comparison of polysialic acid production in Escherichia coli K1 during batch cultivation and fed-batch cultivation applying two different control strategies, *J. Biotechnol.* 154 (2011) 222–229.
- [85] 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.

- [86] 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.
- [87] T. Dreher, U. Husemann, C. Zahnnow, D. de Wilde, T. Adams, G. Greller, High Cell Density *Escherichia coli* Cultivation in Different Single-Use Bioreactor Systems, *Chemie Ing. Tech.* 85 (2013) 162–171.
- [88] V. Saini, D. Lutz, H. Kataria, G. Kaur, M. Sc, The polysialic acid mimetics 5-nonyloxytryptamine and vinorelbine facilitate nervous system repair, *Nat. Publ. Gr.* (2016) 1–12.
- [89] Y. Marcus, Effect of Ions on the Structure of Water : Structure Making and Breaking Effect of Ions on the Structure of Water : Structure Making and Breaking, *Chem. Rev.* 109 (2009) 1346–1370.
- [90] C. Brämer, L. Tünnermann, A.G. Salcedo, O.W. Reif, D. Solle, T. Scheper, S. Beutel, Membrane adsorber for the fast purification of a monoclonal antibody using protein a chromatography, *Membranes (Basel)*. 9 (2019).
- [91] M. Phillips, J. Cormier, J. Ferrence, C. Dowd, R. Kiss, H. Lutz, J. Carter, Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing, *J. Chromatogr. A.* 1078 (2005) 74–82.
- [92] S.R. Holmes-Farley, W.H. Mandeville, J. Ward, K.L. Miller, Design and characterization of sevelamer hydrochloride: A novel phosphate-binding pharmaceutical, *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* 36 A (1999) 1085–1091.
- [93] S. Tolerant, M. Chromatography, Effect of Phosphate on Binding to Sartobind STIC ® PA, (n.d.) 20–21.
- [94] R. Ma, D. Di Fan, W.J. Xue, J.Y. Xing, C.H. Zhu, X.X. Ma, Endotoxin removal during the purification process of human-like collagen, *Sep. Sci. Technol.* 45 (2010) 2400–2405.
- [95] C.M. Ongkudon, J.H. Chew, B. Liu, M.K. Danquah, Chromatographic Removal of Endotoxins: A Bioprocess Engineer’s Perspective, *ISRN Chromatogr.* 2012 (2012) 1–9.
- [96] S. Bruns, Y. Stark, M. Wieland, F. Stahl, C. Kasper, T. Scheper, Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering: A model for peripheral nerve regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 81 (2007) 736–747.
- [97] M. Dawson, Endotoxin Limits For Parenteral Drug Products, *BET White Pap.* 1 (2017) 1–7.

- [98] FDA, 0027-Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers, Required. 1 (2012) 1–10.
- [99] S. Inoue, S.G. Lin, Y.C. Lee, Y. Inoue, An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis, *Glycobiology*. 11 (2001) 759–767.
- [100] W. Egan, T.Y. Liu, D. Dorow, J.S. Cohen, J.D. Robbins, E.C. Gotschlich, J.B. Robbins, Structural Studies on the Sialic Acid Polysaccharide Antigen of *Escherichia coli* Strain Bos-12, *Biochemistry*. 16 (1977) 3687–3692.
- [101] F. Michon, J.R. Brisson, H.J. Jennings, Conformational Differences between Linear  $\alpha(2\rightarrow8)$ -Linked Homosialooligosaccharides and the Epitope of the Group B Meningococcal Polysaccharide, *Biochemistry*. 26 (1987) 8399–8405.
- [102] M. Frosch, I. Roberts, I. Görden, S. Metzger, G.J. Boulnois, D. Bitter-Suermann, Serotyping and genotyping of encapsulated *Escherichia coli* K1 sepsis isolates with a monoclonal IgG anti K1 antibody and K1 gene probes, *Microb. Pathog.* 2 (1987) 319–326.
- [103] G. Bertani, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.* 62 (1951) 293–300.
- [104] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [105] L. Warren, The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1971–1976.
- [106] D. Aminoff, Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids., *Biochem. J.* 81 (1961) 384–92.
- [107] 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.

---

## Liste der Publikationen

### Fachartikel (chronologisch, peer reviewed)

**Bartling, B. (80 %)**; Bröchle, N.C.; Rehfeld, J.S.; Boßmann, D.; Fiebig, T.; Litschko, C.; Fohrer, J.; Gerardy-Schahn, R.; Scheper, T.; Beutel, S. Accelerated Production of  $\alpha$ 2,8- and  $\alpha$ 2,9-linked Polysialic Acid in Recombinant *Escherichia coli* using High Cell Density Cultivation, *Biotechnol. Reports* **2020**, *28*, *Research Article*, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00562

**Bartling, B. (85 %)**; Rehfeld, J.S.; Boßmann, D.; de Vries, I.; Fohrer, J.; Lammers, F.; Scheper, T.; Beutel, S. Determination of the Structural Integrity and Stability of Polysialic Acid during Alkaline and Thermal Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 165. *Research Article*, DOI: 10.3390/molecules25010165

Boßmann, D.; **Bartling, B. (5 %)**; de Vries, I.; Winkler, J.; Neumann, H.; Lammers, F.; Scheper, T.; Beutel, S. Charged aerosol detector HPLC as a characterization and quantification application of biopharmaceutically relevant polysialic acid from *E. coli* K1. *J. Chromatogr. A* **2019**, *20*, 1–10. *Research Article*, DOI: 10.1016/j.chroma.2019.03.069.

---

## Konferenzbeiträge und Vorträge (chronologisch)

**Bartling, B.;** Boßmann, D.; Scheper, T.; Beutel, S. 2019, Membrane adsorber technology for GMP-conform manufacturing of bacterial polysialic acid, *15<sup>th</sup> International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science*, Quedlinburg, Deutschland

**Bartling, B.;** Rehfeld, J.S.; Boßmann, D.; Scheper, T.; Beutel, S. **2020**, Biotechnologische Produktion von niedermolekularer Polysialinsäure für pharmazeutische Applikationen, Chemie Ingenieur Technik, 10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DECHEMA-Jahrestagung, Aachen, Deutschland, *Poster*, DOI: 10.1002/cite.202055084

## Betreute Abschlussarbeiten (chronologisch)

Masterarbeit: Nora Carola Brüche **2020**, Rekombinante Produktion von Polysialinsäuren in *Escherichia coli* (Teile der Arbeit wurden in Kapitel 3.1 und 3.4.2 verwendet)

Masterarbeit: Riekje Lühning **2020**, Optimierung der Kultivierung und Sporulationseffizienz von *Bacillus coagulans*



---

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Angaben**

Name: Bastian Bartling

Geburtsdatum: 15.12.1990

Geburtsort: Neustadt am Rübenberge

Nationalität: deutsch

## **Studium**

2018 – 2020 Promotionsstudium im Fach Chemie an der LeibnizUniversität Hannover

2014 – 2017 Masterstudium Mol. u. Ang. Biotechnologie an der RWTH Aachen

2010 – 2014 Bachelorstudium Biotechnologie/Bioinformatik an der Hochschule Emden/Leer

## **Schulbildung**

2007 – 2010 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Langenhagen

## **Beruflicher Werdegang**

2018 – 2020 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover