

Herstellung zelleigener Produkte mittels
Escherichia coli in unterschiedlichen
Bioreaktorsystemen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Ingo de Vries, MEng

geboren am 11.04.1990

in Norden

2018

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

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Universität Hohenheim

Tag der Promotion: 02.07.2018

*The ultimate measure of a man is not
where he stands in moments of comfort and convenience,
but where he stands at times of challenge and controversy.*

Martin Luther King, Jr.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Scheper** für die Möglichkeit, im Institut für Technische Chemie promovieren zu dürfen, bedanken. **PD Dr. Sascha Beutel** danke ich für die kompetenten Ratschläge und die große Unterstützung. Bei **Prof. Dr. Bernd Hitzmann** und **PD Dr. Ulrich Krings** bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Der Mechanikwerkstatt, namentlich **Thorsten Stempel** und **Friedbert Gellermann**, danke ich für die große Hilfe bei der Umgestaltung des Technikums und die allmorgendliche freundliche Begrüßung. **Martina Weiß** und **Martin Pähler** möchte ich für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten und die weiteren großen Hilfen danken. Ohne **Cornelia Alic**, **Ulrike Dreschel**, **Thorleif Hentrop**, **Kai Patzer**, **Dr. Ivo Havlik** und **Dr. Michael Dors** würde der Institutsalltag nicht so reibungslos verlaufen. Bei **Prof. Dr. Harald Neumann**, **Dr. Jens Kopatz** und den weiteren **Kooperationspartnern** bedanke ich mich für die spannende Zusammenarbeit und die aufschlussreichen Diskussionen. **Dr. Jörg Fohrer** danke ich für die Hilfe bei den NMR-Untersuchungen und **Dr. Patrick Lindner** für die Bereitstellung des Programms für die fed-batch-Kultivierungen. Bei **Dr. Christian Ude**, **Dr. Philipp Grünert**, **Dr. Patrick Jonczyk** und **Dr. Christopher Wagner** bedanke ich mich für die Einführung und Hilfen bei den Arbeiten im Technikum. **Dr. Thore Frister**, **Dr. Matthias Danzmann** und **Dr. Steffen Hartwig** danke ich für die Unterstützung bei der Eingewöhnung in die neue Arbeitsumgebung. **Laura Leykam**, **Mouna Ben Amor**, **Alina Mehl** und **Zawadi Hellmann** möchte ich für die engagierte und hilfreiche Mitarbeit im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten danken.

Dr. Christoph Busse, **Dr. Sarah Schreiber**, **Jan König**, **Daniel Boßmann** und der gesamten **Zellkultur** möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit in den unterschiedlichen Projekten danken. Bei den „Büroneulingen“ **Pia Gellermann** und **Marline Kirsch**, sowie **Svenja Bolten** und **Kimia Ekramzadeh** bedanke ich mich für die fröhlichen Abende und Unternehmungen. Auch die Abende mit dem

Danksagung

Brauteam und die Braukonteste haben immer viel Spaß gemacht und waren (teilweise) von großem Erfolg geprägt. Bei **Jonas Austerjost, Lukas Raddatz, Bastian Quaas** und **Elsa Friehs** möchte ich mich für die Begleitung seit der Masterarbeit bzw. Beginn der Promotion bedanken. Bei **Jonas Austerjost** möchte ich mich zudem für die Übernachtungsmöglichkeit in Hannover bedanken, sodass trotz teilweiser später Stunde keine Hotelbuchung nötig war. Dem gesamten Institut danke ich für insgesamt fast vier interessante und schöne Jahre in angenehmster Arbeitsatmosphäre!

Bei meinem gesamten **Freundeskreis aus Norden** bedanke ich mich für die stets schönen Treffen. Besonders **Clemens Weber, Ude Eilers** und **Phong Ngo** danke ich für die Freundschaft seit der Kindergartenzeit bzw. Beginn der Schulzeit.

Bei meinen Eltern **Gabriele und Wilhelm de Vries**, meinem Bruder **Holger de Vries** und dessen Freundin **Lena Hagen**, sowie meinen **Großeltern** bedanke ich mich für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen. Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Freundin **Jessica Willner**, auf deren Unterstützung und Rückhalt ich seit über acht Jahren immer zählen kann.

Vielen Dank, ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Kurzfassung

Polysialinsäure (PolySia) ist eine homopolymere Zuckersäure und ein vielversprechendes Molekül für unterschiedliche medizinische Anwendungen. Das Polymer ist ein potentielles Arzneimittel gegen entzündungsbedingte neurodegenerative Erkrankungen (z.B. altersbedingte Makuladegeneration) und andere chronische entzündungsbedingte Erkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit ist ein kompletter Produktionsprozess für humanidentische α -(2,8)-verknüpfte PolySia unter Verwendung in GMP-Umgebungen akzeptierter single-use Prozesselemente gezeigt. Die Kultivierung erfolgte in einem welleninduziert durchmischten Einweg-Beutel-Reaktor und vergleichend in einem Edelstahlrührkesselreaktor bis zu einem Volumen von 30 Litern. Die schonende welleninduzierte Durchmischung hatte keinen Einfluss auf die PolySia-Ablösung von der Zelloberfläche, $54 \pm 7\%$ der PolySia lag im Kulturüberstand vor (Konzentration: $300,9 \pm 19,8$ mg/L). Durch einen fed-batch-Prozess konnte die PolySia-Konzentration im Einweg-Beutel-Reaktor auf bis zu 1,05 g/L gesteigert werden. Nach dem Aufreinigungsprozess lag die PolySia langkettig (Polymerisationsgrad: 90 – 100 DP) und hoch rein vor (keine Protein- und DNA-Verunreinigungen nachweisbar, Endotoxingehalt < 3 EU/mg). Aus einer 10 L-batch-Kultivierung konnte mit dem entwickelten Prozess etwa 1 g reine PolySia gewonnen werden, dies entspricht einer Ausbeute von $29 \pm 7\%$. Kurzkettige PolySia für spezielle Anwendungen konnte durch eine thermische Hydrolyse gewonnen werden.

Schlüsselwörter: Good Manufacturing Practice, Polysialinsäure, single-use

Abstract

Polysialic acid (PolySia) is a homopolymeric sugar acid and a promising molecule for a variety of medical applications. The polymer is a potential drug against inflammatory neurodegenerative diseases (e.g., age-related macular degeneration) and other chronic inflammatory diseases.

In this study a complete production process for human-identical α -(2,8)-linked PolySia using single-use process elements well accepted in GMP environments is shown. The cultivation process was performed in a wave-induced mixed single-use bag reactor and as a benchmark also in a stainless steel stirred tank reactor up to a volume of 30 liters. The gentle wave-induced mixing had no influence on the PolySia release from the cell surface, 54 ± 7 % of PolySia was released into the culture supernatant (concentration: 300.9 ± 19.8 mg/L). Due to a fed-batch process, the PolySia concentration in the disposable bag reactor could be increased up to 1.05 g/L. After the purification process, the long-chain PolySia (degree of polymerization: 90 – 100 DP) was highly pure (no protein and DNA contaminants detectable, endotoxin content below 3 EU/mg). With the developed process 1 g pure PolySia could be obtained out of a 10 L batch-cultivation, which is a yield of 29 ± 7 %. Smaller PolySia fractions for specific applications could be produced by thermal hydrolysis.

Keywords: Good Manufacturing Practice, polysialic acid, single-use

Publikationsliste

Fachartikel (chronologisch, peer reviewed)

- **de Vries, I.** (85 %), Busse, C., Kopatz, J., Neumann, H., Beutel, S., Scheper, T. (2017): Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor. *Engineering in Life Sciences*, 17 (7), 723–731, DOI: 10.1002/elsc.201600220 (Research Article)
- Raddatz, L., **de Vries, I.** (30 %), Austerjost, J., Lavrentieva, T., Geier, D., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. (2017): Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Engineering in Life Sciences*, 17 (8), 931–939, DOI: 10.1002/elsc.201700055 (Research Article)
- Busse, C., Biechele, P., **de Vries, I.** (20 %), Reardon, K., Solle, D., Scheper, T. (2017): Sensors for disposable bioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 17 (8), 940–952, DOI: 10.1002/elsc.201700049 (Review)
- **de Vries, I.** (60 %), Schreiber, S., Boßmann, D., Hellmann, Z., Kopatz, J., Neumann, H., Beutel, S. (2018): Single-use membrane adsorbers for endotoxin removal and purification of endogenous polysialic acid from *Escherichia coli* K1. *Biotechnology Reports*, 17, 110–116, DOI: 10.1016/j.btre.2018.02.001 (Research Article)
- König, J. C., Steinwedel, T., Solle, D., Lindner, P., **de Vries, I.** (5 %), Hentrop, T., Findeis, M., John, G. T., Scheper, T., Beutel, S. (2018): Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, submitted (Research Article)

Konferenzbeiträge (chronologisch)

- Busse, C., **de Vries, I.**, Solle, D., Scheper, T. (2015): Online Überwachung des metabolischen Zustands in Kultivierungsprozessen mit dem ISICOM, 12. Dresdner Sensor-Symposium (Poster)
- **de Vries, I.**, Busse, C., Beutel, S., Scheper, T. (2016): Polysialinsäureproduktion in einem Einweg-Beutel-Reaktor, Chemie Ingenieur Technik, ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, DOI: 10.1002/cite.201650069 (Poster)
- König, J. C., Steinwedel, T., Solle, D., **de Vries, I.**, Findeis, M., John, G. T., Scheper, T., Beutel, S. (2017): Untersuchung von *E. coli* K1 batch-Kultivierungen mit einem neuartigen Fluoreszenzsensor, 13. Dresdner Sensor-Symposium (Poster)

Kooperationen

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

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

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

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

Kooperationen

der Universität Santiago de Compostela:

Desirée Teijeiro Osorio, PhD
University of Santiago de Compostela
Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases
Av. Barcelona 22
15782 Santiago de Compostela (Spanien)

und universitätsintern durchgeführt:

Prof. Dr. Peter Behrens
Leibniz Universität Hannover
Institut für Anorganische Chemie
Callinstraße 9
30167 Hannover (Deutschland)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Danksagung..... | IV |
| Kurzfassung | VI |
| Abstract..... | VII |
| Publikationsliste..... | VIII |
| Kooperationen | X |
| Abkürzungsverzeichnis..... | XIV |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Zielsetzung..... | 2 |
| 3. Theoretische Grundlagen..... | 3 |
| 3.1 Pharmazeutische Biotechnologie | 3 |
| 3.1.1 Arzneimittelentwicklung..... | 4 |
| 3.1.2 Qualitätssicherung und Good Manufacturing Practice..... | 8 |
| 3.1.3 Single-use Systeme in der Biotechnologie..... | 9 |
| 3.2 Polysialinsäure..... | 11 |
| 3.2.1 Chemische Struktur | 11 |
| 3.2.2 Natürliches Vorkommen und biologische Funktionen..... | 12 |
| 3.2.3 Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin | 14 |
| 4. Experimentelle Arbeiten | 17 |
| 4.1 Kultivierungsarbeiten | 19 |
| 4.1.1 Optimierung der Vorkultur | 19 |
| 4.1.2 Batch-Kultivierungen in verschiedenen Systemen | 20 |
| 4.1.3 Fed-batch-Prozess im Einweg-Beutel-Reaktor und Vergleich zum STR | 36 |
| 4.1.4 Fazit zu den Kultivierungsarbeiten..... | 43 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 4.2 Downstream Processing (DSP) | 43 |
| 4.2.1 Reifeprozess | 44 |
| 4.2.2 Zellabtrennung..... | 44 |
| 4.2.3 Aufkonzentrierung der PolySia..... | 45 |
| 4.2.4 Einfache und effiziente Entfernung von Proteinen | 46 |
| 4.2.5 Entfernung von Endotoxinen und DNA-Rückständen | 48 |
| 4.2.6 Entsalzung und Trocknung..... | 53 |
| 4.2.7 Zusammenfassung Downstream Processing..... | 53 |
| 4.3 Produktanalytik..... | 56 |
| 4.3.1 Produktreinheit..... | 56 |
| 4.3.2 Produktcharakterisierung | 62 |
| 4.3.3 Zusammenfassung Produktanalytik | 71 |
| 4.4 Stabilitätstests und Produktmodifikationen..... | 72 |
| 4.4.1 Stabilität in Kulturbrühe..... | 73 |
| 4.4.2 Stabilität aufgereinigter PolySia | 74 |
| 4.4.3 Stabilität unter Stressbedingungen und thermische Hydrolyse | 77 |
| 4.4.4 Zusammenfassung Stabilitätstests | 81 |
| 5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick..... | 83 |
| 6. Anhang..... | 87 |
| 6.1 Materialien und Methoden..... | 87 |
| 6.1.1 Materialien..... | 87 |
| 6.1.2 Methoden..... | 94 |
| Literaturverzeichnis | 116 |
| Unterstützende Arbeiten | 129 |
| Lebenslauf..... | 130 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| AMD | Altersabhängige Makuladegeneration |
| a.u. | Beliebige Einheit (arbitrary unit) |
| avDP 20 | Average degree of polymerization 20 |
| bp | Basenpaare |
| BTM | Biotrockenmasse |
| CHO | Chinese Hamster Ovary |
| CV | Säulenvolumen (column volume) |
| DMB | 4,5-Methylendioxy-1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DO | Gelöstsauerstoff (dissolved oxygen) |
| DP | Degree of polymerization |
| DSP | Downstream Processing |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EU | Endotoxineinheiten (Endotoxin units) |
| EX M | Experimentelles Muster |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| GCP | Gute Klinische Praxis (Good Clinical Practice) |
| GMP | Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice) |
| HCP | Host Cell Proteine |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| ICP-OES | Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma |
| Kdn | 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure |
| k_{La} | Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient |
| LAL | <i>Limulus Amebocyten</i> Lysat |
| LB | Lysogeny broth |
| LPS | Lipopolysaccharid |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| μ_{\max} | Maximale Wachstumsrate |
| Na-EDTA | Natrium-Ethylen-diamintetraessigsäure |
| NCAM | Neurales Zelladhäsionsmolekül |
| Neu5Ac | N-Acetylneuraminsäure |
| Neu5Gc | N-Glycolylneuraminsäure |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| ORK Feeder | Online Runge-Kutta Feeder |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> |
| PolySia | Polysialinsäure |
| ppm | Parts per million |
| rRNA | Ribosomale Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| Rpm | Revolutions per minute |
| rpm | Revolutions per minute |
| SIGLEC | Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin |
| SynCAM | Synaptisches Zelladhäsionsmolekül |
| STR | Stirred tank reactor |
| TBA | 2-Thiobarbitursäure |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| UV | Ultraviolett |
| VE | Voll entsalzt |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| vvm | Volume per volume per minute |
| $Y_{P/S}$ | Ausbeutekoeffizient Produkt/Substrat |
| $Y_{P/X}$ | Ausbeutekoeffizient Produkt/Biomasse |
| $Y_{X/S}$ | Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat |

1. Einleitung

Von Krankheiten bleibt niemand verschont. Gerade mit dem Alter wird der menschliche Körper für bestimmte Erkrankungen anfälliger. Durch den demographischen Wandel in Deutschland, verbunden mit der erhöhten Lebenserwartung, wird die Anzahl typischer neurologischer Alterserkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimer-Krankheit oder der Makuladegeneration, in den nächsten Jahrzehnten drastisch ansteigen. Um die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern, forschen Wissenschaftler weltweit an Lösungen, um neurologische Krankheiten zu behandeln.

Körpereigene Substanzen mit entzündungshemmender Wirkung, wie z.B. Polysialinsäure (PolySia) haben ein großes Potential für die Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen. PolySia ist ein Polysaccharid, welches beim Nervenwachstum und vielen Reaktionen von Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt. Neben der Präsenz im menschlichen Körper bilden einige Bakterien eine Schutzhülle aus humanidentischer PolySia aus, wodurch sie die menschliche Immunantwort umgehen können. Für die Herstellung großer Mengen PolySia für einen klinischen Einsatz eignen sich diese Bakterien (z.B. *Escherichia coli* K1). Der biotechnologische Herstellungsprozess umfasst die Vermehrung der Bakterien in einem Bioreaktor, die Isolierung der Substanz aus der Kulturbrühe und eine anschließende Charakterisierung des Produktes. Neben den gängigen wiederverwendbaren Prozesselementen werden in der modernen Biotechnologie vermehrt Einwegartikel nicht nur für einfache, sondern auch für komplexe Apparaturen wie Bioreaktoren verwendet.

2. Zielsetzung

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Gesamtprozesses für die Herstellung von Polysialinsäure, der eine Übertragung in eine GMP-konforme Produktionsumgebung erleichtert. Dazu sollen die komplexen, undefinierten Substanzen während des Produktionsprozesses minimiert und single-use Elemente in den Prozess eingebaut werden, die in GMP-Umgebungen anerkannt sind. Die Kultivierung soll in einem welleninduziert durchmischten Einwegsystem realisiert und mit dem etablierten Prozess in einem Rührkesselreaktor verglichen werden. Anschließend soll ein Aufreinigungsprozess zur Produktion hoch reiner PolySia entwickelt werden, der sowohl die Entfernung von Protein- und DNA-Rückständen als auch die Endotoxinabreicherung einschließt. Die hergestellte PolySia soll charakterisiert werden und erste Tests zur Herstellung kurzkettiger PolySia, die im Tierversuch altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen wie Makuladegeneration lindern konnte, durchgeführt werden. Zudem sollen Stabilitäts- und Löslichkeitstests durchgeführt werden, die Aufschluss über die möglichen Lagerungsbedingungen und die Möglichkeit eines späteren klinischen Einsatzes geben sollen.

3. Theoretische Grundlagen

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Pharmazeutische Biotechnologie

Die Biotechnologie kann wie in Abbildung 1 dargestellt in verschiedene Bereiche unterteilt werden. Die pharmazeutische Biotechnologie ist der roten Biotechnologie zuzuordnen und beschäftigt sich unter anderem mit der Herstellung hochwirksamer Biomoleküle [1].

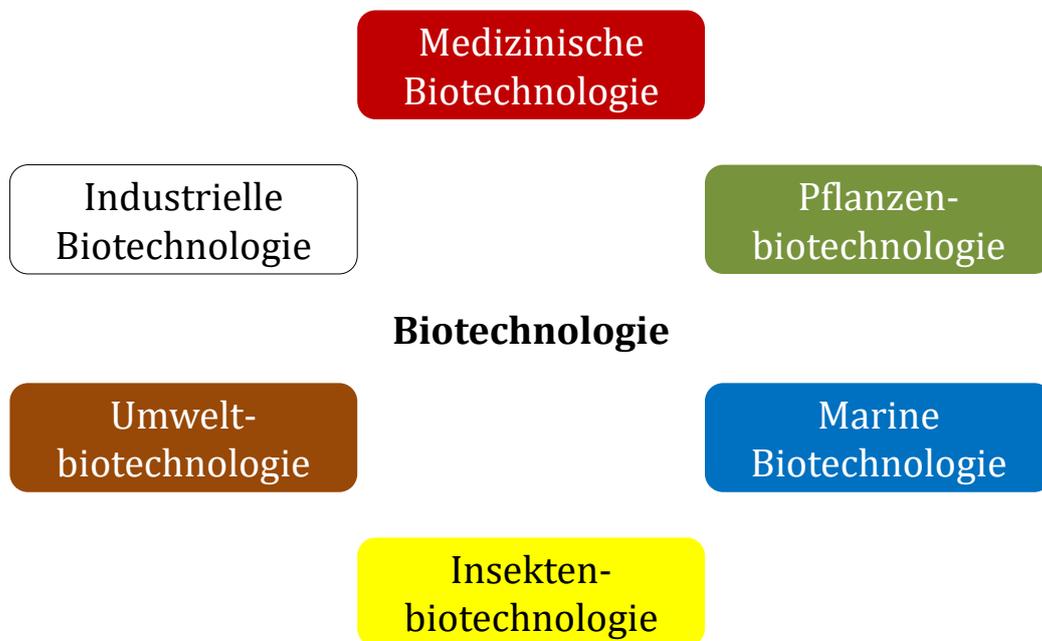


Abbildung 1: Einteilung der Biotechnologie in sechs Teilbereiche. Die Bezeichnungen der Teilbereiche und die Zuordnung einer bestimmten Farbe zu einem Teilbereich können je nach Quelle variieren.

Für die Produktion der Wirkstoffe werden neben Mikroorganismen und Säugetierzellen auch Pflanzenzellen sowie Insektenzellen eingesetzt [2]. Im

3. Theoretische Grundlagen

Vergleich zur Produktion mit Säugetierzellen bietet der Einsatz von Mikroorganismen den Vorteil einer virusfreien Produktion bei hohen Wachstumsraten und Produkttitern in verhältnismäßig günstigen Medien. Der meistgenutzte prokaryotische Organismus ist *Escherichia coli* (*E. coli*) [2]. Das gram-negative Bakterium kann für die Produktion verschiedenster Wirkstoffe genutzt werden. Niedermolekulare Stoffe werden zumeist in das Kulturmedium abgegeben, während hochmolekulare Stoffe (z.B. rekombinante Proteine wie Insulin) häufig als Aggregate, auch als Einschlusskörperchen (engl. inclusion bodies) bekannt, innerhalb der Zelle gebildet werden [3]. Die häufig nötige Rückfaltung eines in Einschlusskörperchen hergestellten therapeutischen Proteins stellt bei der Produktion in bakteriellen Expressionssystemen ebenso wie die fehlende Glykosylierung einen Nachteil im Gegensatz zur Produktion mittels Säugetierzellen dar [4–6].

3.1.1 Arzneimittelentwicklung

Heutzutage sind tausende Krankheiten bekannt, allein 6.000 – 8.000 Krankheiten werden den seltenen Krankheiten zugeordnet [7]. Der Bedarf an erfolgreichen Behandlungsmethoden ist riesig, wobei die meisten akuten Krankheiten gut behandelbar, viele chronische Erkrankungen jedoch nicht therapierbar sind [8].

Die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs beginnt mit dem intensiven Verständnis der Krankheit und der Identifizierung eines Angriffspunktes. Dabei stehen mit dem Krankheitsprozess assoziierte Moleküle (z.B. Enzyme, Rezeptoren oder Ionenkanäle) im Vordergrund [9]. Ausgehend vom Aufbau des Targets oder durch einen Reihentest einer Vielzahl von Testsubstanzen an dem isolierten Target oder ausgewählten Zellen können potentielle Ausgangssubstanzen (Leitstrukturen) gefunden werden [9].

3. Theoretische Grundlagen

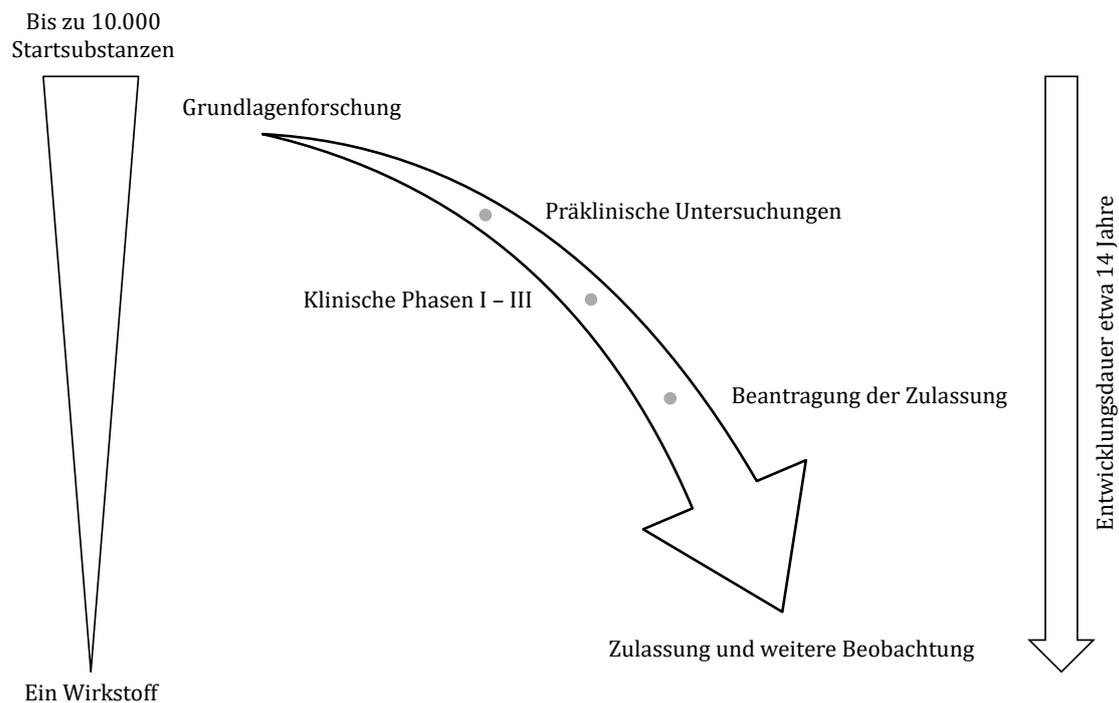


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der Arzneimittelentwicklung.

Durch einen chemischen Umbau der Ausgangssubstanz oder eine Kombination verschiedener Ausgangssubstanzen wird ein potentieller Wirkstoffkandidat gebildet [10]. Kritische Eigenschaften für einen Wirkstoffkandidaten sind die Selektivität gegenüber einem spezifischen Target, die Löslichkeit, das Verhalten im menschlichen Körper (Aufnahme, Verteilung, Abbau und Ausscheidung) und eine mögliche großtechnische Produktion.

Sind potentielle Wirkstoffkandidaten gefunden worden, werden diese in präklinischen Untersuchungen *in vitro* an aussagekräftigen Versuchsorganismen getestet, bevor Tests an Tieren durchgeführt werden [11]. Verlaufen die präklinischen Untersuchungen vielversprechend und zeigen kein vorhersehbares Risiko bei der Verabreichung beim Menschen, können nach Genehmigung der zuständigen Zulassungsbehörden die klinischen Studien beginnen [9]. Nach

3. Theoretische Grundlagen

erfolgreichen Tierexperimenten scheitern noch ca. 10 % der Wirkstoffe wegen unerwarteter Nebenwirkungen. Die meisten Wirkstoffe scheitern an mangelnder Wirksamkeit oder einer ungünstigen Pharmakokinetik [12, 13].

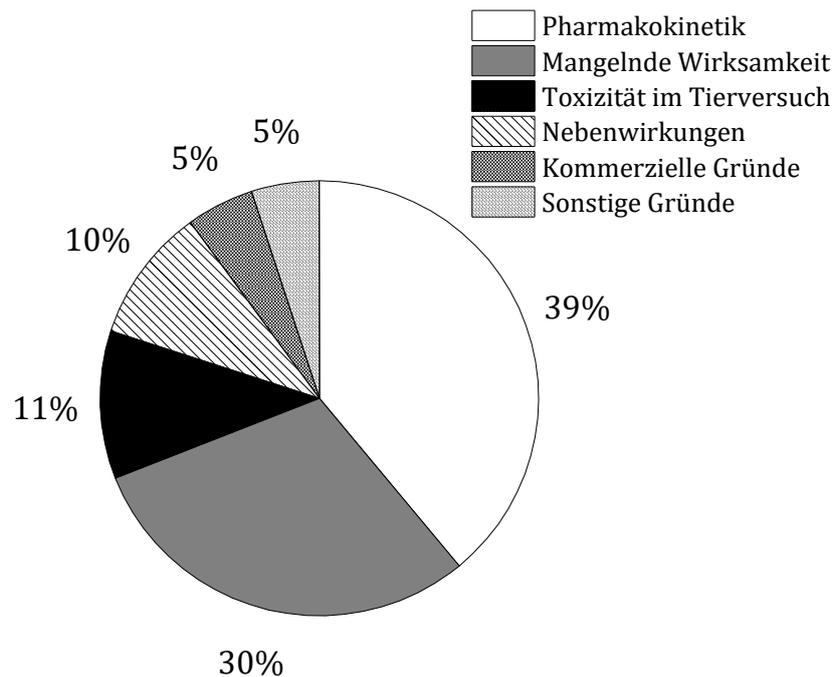


Abbildung 3: Gründe für das Scheitern eines Wirkstoffs nach [12, 13]. Daten bezogen auf 198 neuen chemischen Substanzen (Zeitraum: 1964 – 1985).

Prüfpräparate für die klinischen Studien sind wie Arzneimittel in der Europäischen Union, soweit anwendbar, nach den Richtlinien für Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) herzustellen (siehe Kapitel 3.1.2 Qualitätssicherung und Good Manufacturing Practice) [14]. Die klinischen Studien müssen nach den Richtlinien für Gute klinische Praxis (Good Clinical Practice, GCP) durchgeführt werden.

3. Theoretische Grundlagen

Klinische Studien werden in mehrere Phasen unterteilt. In der ersten Phase wird der Wirkstoff erstmals und noch ohne therapeutische Ziele an gesunden Probanden erprobt und dabei das Verhalten im menschlichen Körper (Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik) untersucht [15]. In Phase zwei wird die Wirksamkeit des Wirkstoffs an einer kleinen Gruppe von Patienten getestet [15]. Die Daten der Phase-I- und Phase-II-Studie dienen unter anderem dazu, eine geeignete Dosis und Darreichungsform für den neuen Wirkstoff zu finden [16]. Wird in Phase zwei eine Wirksamkeit nachgewiesen, erfolgen in Phase drei weitere Tests an einer großen Anzahl von Patienten [15]. In Phase drei werden üblicherweise Doppelblindstudien mit Vergleichswirkstoffen, z.B. der Standardtherapie oder Placebos, durchgeführt [15].

Nach erfolgreichem Abschluss der klinischen Phasen eins bis drei kann die Zulassung für das neue Medikament gegeben werden [17]. Anschließend wird das Medikament weiter beobachtet (Phase vier). Phase vier der klinischen Studien dient der Arzneimittelsicherheit (eventuelle Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten oder selten auftretende Nebenwirkungen) und liefert zusätzliche Informationen zur Wirksamkeit des Arzneimittels [16].

Der Gesamtprozess der Arzneimittelentwicklung dauert, beginnend mit den ersten Untersuchungen bis hin zur Zulassung durch die zuständige Behörde, durchschnittlich etwa 14 Jahre, wobei die klinischen Phasen eins bis drei den größten Anteil ausmachen [18–20]. Von bis zu 10.000 Substanzen, die in den ersten Untersuchungen in Betracht gezogen werden, erreichen durchschnittlich weniger als zehn Wirkstoffe die klinischen Studien, von denen anschließend im Durchschnitt ein Wirkstoff zugelassen wird [18, 21]. Je nach Therapieart und Entwicklungsfirma werden die Kosten für die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs auf eine halbe bis zwei Milliarden US-Dollar geschätzt, wobei die Entwicklungskosten je nach Schätzung stark schwanken [20, 22–24].

3. Theoretische Grundlagen

3.1.2 Qualitätssicherung und Good Manufacturing Practice

Die Qualitätssicherung in der pharmazeutischen Industrie wird hauptsächlich durch die strengen Auflagen bestimmt [25]. Dabei steht die spätere Sicherheit für den Anwender an oberster Stelle [26]. Bereits für die klinischen Studien muss das Prüfpräparat GMP-konform hergestellt werden, um die Probanden und Testpatienten nicht zu gefährden [27].

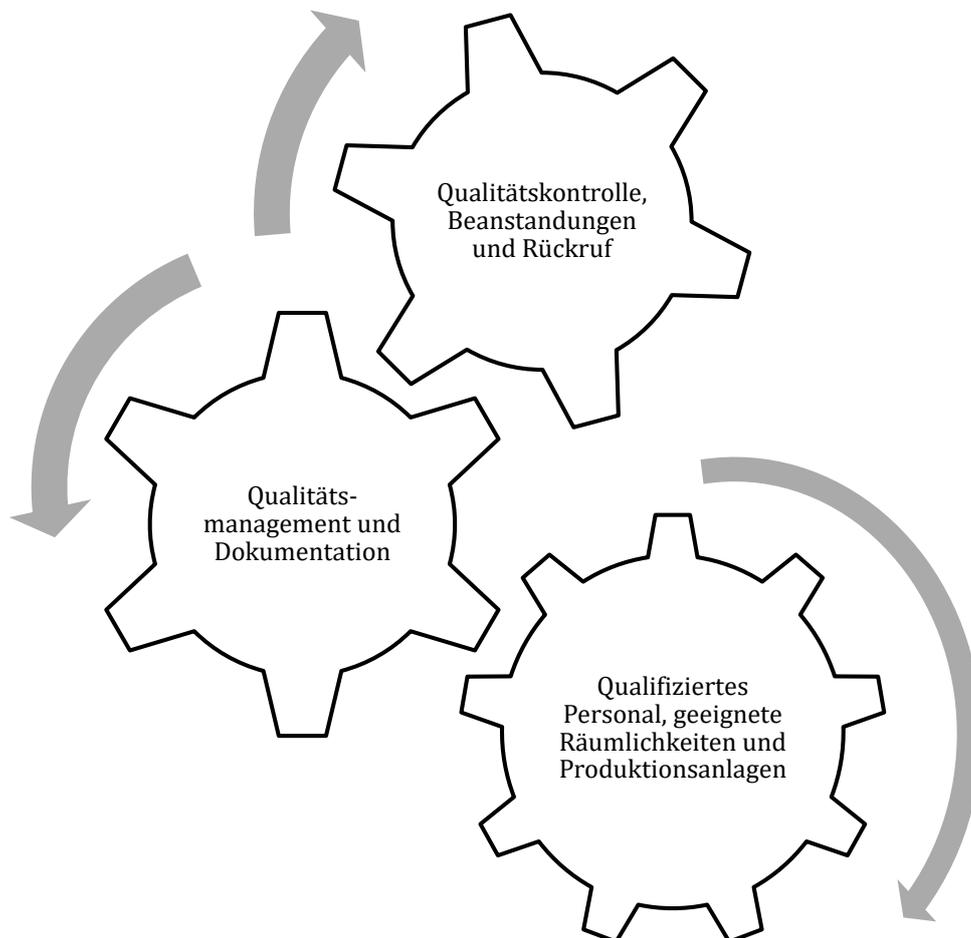


Abbildung 4: Ineinandergreifende Grundsätze der GMP-konformen Herstellung.

3. Theoretische Grundlagen

Good Manufacturing Practice (GMP) ist Teil der Qualitätssicherung. Für die Europäische Union ist die Richtlinie 2003/94/EG das zentrale Dokument [28]. Die Richtlinie schreibt vor, dass Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis in Bezug auf Qualitätsmanagement, Personal, Räumlichkeiten und Ausrüstung, Dokumentation, Produktion, Qualitätskontrolle, Auftragsherstellung, Beanstandungen und Produktrückruf sowie Selbstinspektionen festgelegt werden müssen.

Die Herstellung nach GMP-Richtlinien soll eine gleichbleibend hohe Qualität des Arzneimittels und eine hohe Patientensicherheit gewährleisten [29, 30].

3.1.3 Single-use Systeme in der Biotechnologie

Der Anteil an Einwegprozesselementen hat in der pharmazeutischen Industrie deutlich zugenommen [31]. Während Mikroreaktionsgefäße, Schläuche, Filter, Petrischalen, T-Flaschen und weitere Standardprozesselemente inzwischen selbstverständlich als Einwegartikel gelten, werden zunehmend auch komplexe Prozesselemente wie aufwändige Bioreaktoren für biotechnologische Herstellungsprozesse als Einwegelemente ausgelegt [32]. Dies bietet den Vorteil der erleichterten Dokumentation nach den GMP-Richtlinien, da kritische Prozessschritte wie die Reinigung und die bereits vom Hersteller durchgeführte Sterilisation entfallen [33]. Bei der Herstellung von Prüfpräparaten für die präklinischen Untersuchungen oder klinischen Studien sind die Einwegartikel auch wegen der niedrigeren Investitionskosten omnipräsent [32].

Für Kultivierungen sind verschiedene Reaktortypen kommerziell erhältlich. Neben den gängigen wiederverwendbaren Rührkesselreaktoren aus Edelstahl oder Glas gibt es Einwegreaktoren aus Plastik, wie z.B. Polyethylen [34]. Die Durchmischung

3. Theoretische Grundlagen

in einem Einwegreaktor kann durch Rühren, orbitales Schütteln oder eine wellenartige Bewegung realisiert werden [32].

Weitere Vorzüge der Einwegreaktoren sind eine hohe Flexibilität, ein verringertes Risiko für Produktkreuzkontaminationen bei Anlagen für unterschiedliche Produkte und eine relativ unkomplizierte Handhabung [33–35]. Hinzu kommt die Zeitersparnis sowohl beim Aufbau der Anlagen als auch während des Prozesses durch kürzere Totzeiten, da zum einen der Validierungsprozess entfällt und zum anderen der Reaktorbehälter vor und nach der Kultivierung nicht mehr gereinigt und sterilisiert werden muss [31, 33]. Nachteilig sind die wiederkehrenden Kosten bei der Anschaffung der Reaktorbehälter (bags), da diese nach jedem Gebrauch ausgetauscht werden müssen [31, 35]. Zudem ist das Volumen von Einwegreaktoren momentan auf 2.000 L begrenzt [35] und Überdruckkultivierungen für Hochzelldichteprozesse sind aufgrund der Materialeigenschaften nicht möglich. Leachables aus dem Plastikmaterial der Einwegartikel sind kritisch. Die Substanz bis(2,4-Di-tert-butylphenyl)phosphat (bDtBPP) wirkt z.B. wachstumshemmend auf CHO-Zellen und kann als Degradationsprodukt des Polymeradditivs tris(2,4-Di-tert-butylphenyl)phosphit freigesetzt werden [35–37]. Jedoch kann das Austreten von leachables durch speziell optimierte Filme (z.B. Flexsafe® S80, Sartorius Stedim Biotech GmbH oder Aegis™5-14, Thermo Fisher Scientific) minimiert werden [38, 39].

Einwegreaktoren werden vorwiegend dann verwendet, wenn hochwertige Produkte in geringer Menge hergestellt werden sollen [40]. Außerdem finden sie Einsatz in der Inokulumproduktion und Medienbereitstellung in industriellen Herstellungsprozessen [41].

3. Theoretische Grundlagen

3.2 Polysialinsäure

3.2.1 Chemische Struktur

Die in die Naturstoffklasse der Zucker eingeordnete Polysialinsäure (PolySia) ist aus Sialinsäuremonomeren aufgebaut. Sialinsäure gehört zu einer Familie von über 50 Derivaten der Neuraminsäure [42]. Neuraminsäure besteht aus neun Kohlenstoffatomen, mit einer Aminogruppe am Kohlenstoffatom fünf. Häufig ist die Aminogruppe acetyliert, was die am meisten verbreitete Form, die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), darstellt. Unterschiedliche Formen der Sialinsäuremonomere sind in Abbildung 5 gezeigt.

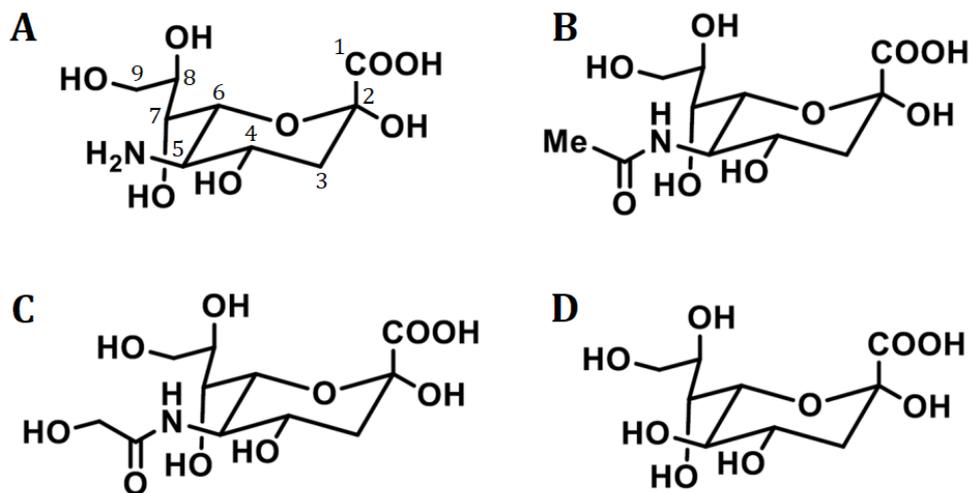


Abbildung 5: Chemische Struktur der Sialinsäurederivate. Dargestellt sind Neuraminsäure (A), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (B), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) (C) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (Kdn) (D) nach [43–45].

Polysialinsäuren bestehen aus mehr als zehn α -(2,8)- und/oder α -(2,9)-glykosidisch verknüpften Sialinsäuremonomeren [46]. In Säugetieren finden sich

3. Theoretische Grundlagen

α -(2,8)-glykosidisch verknüpfte Homopolymere. Humane PolySia besteht aus α -(2,8)-glykosidisch verknüpften N-Acetylneuraminsäuremonomeren (siehe Abbildung 6). Der beschriebene Polymerisationsgrad von PolySia reicht in der Regel von 50 – 150 Monomereinheiten bis zu vereinzelt sogar 400 Monomereinheiten [47–49].

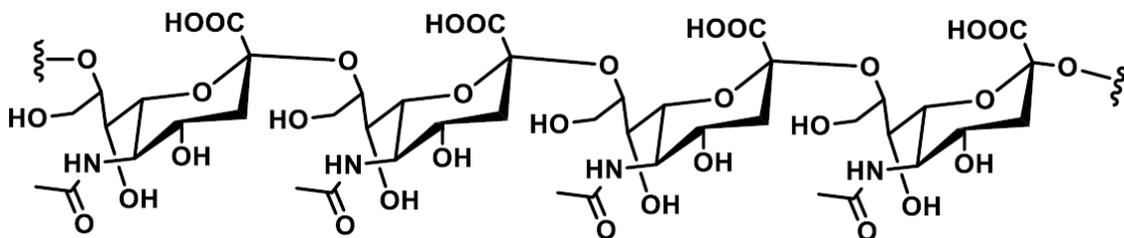


Abbildung 6: Chemische Struktur der α -(2,8)-glykosidisch verknüpften N-Acetylneuraminsäure nach [50].

3.2.2 Natürliches Vorkommen und biologische Funktionen

Polysialinsäure ist in Pro- und Eukaryonten präsent. Einige Bakterien wie *Neisseria meningitidis* B oder *Escherichia coli* K1 bilden PolySia als äußere Kapsel, Glykokalix, auf der Zelloberfläche aus [51, 52]. Die Glykokalix aus humanidentischer PolySia erschwert die Erkennung der Bakterien durch das humane Immunsystem (Molekulares Mimikry) [53], sodass die Bakterien im ungünstigsten Fall bei Überwindung der Blut-Hirn-Schranke eine bakterielle Meningitis auslösen können [51].

In Säugetieren hat PolySia unterschiedliche Funktionen. Das Polymer ist an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt [54]. PolySia ist an das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) gebunden, das eine zentrale Rolle bei der

3. Theoretische Grundlagen

Entwicklung und der Funktion des zentralen Nervensystems spielt [55]. NCAM reguliert Zell-Zell-, wie auch Zell-Substrat-Kontakte im Körper [56]. Wie in Abbildung 7 gezeigt, behindert PolySia sterisch und durch die abstoßenden stereochemischen Eigenschaften des Polyanions den Zell-Zell-Kontakt [57–59].

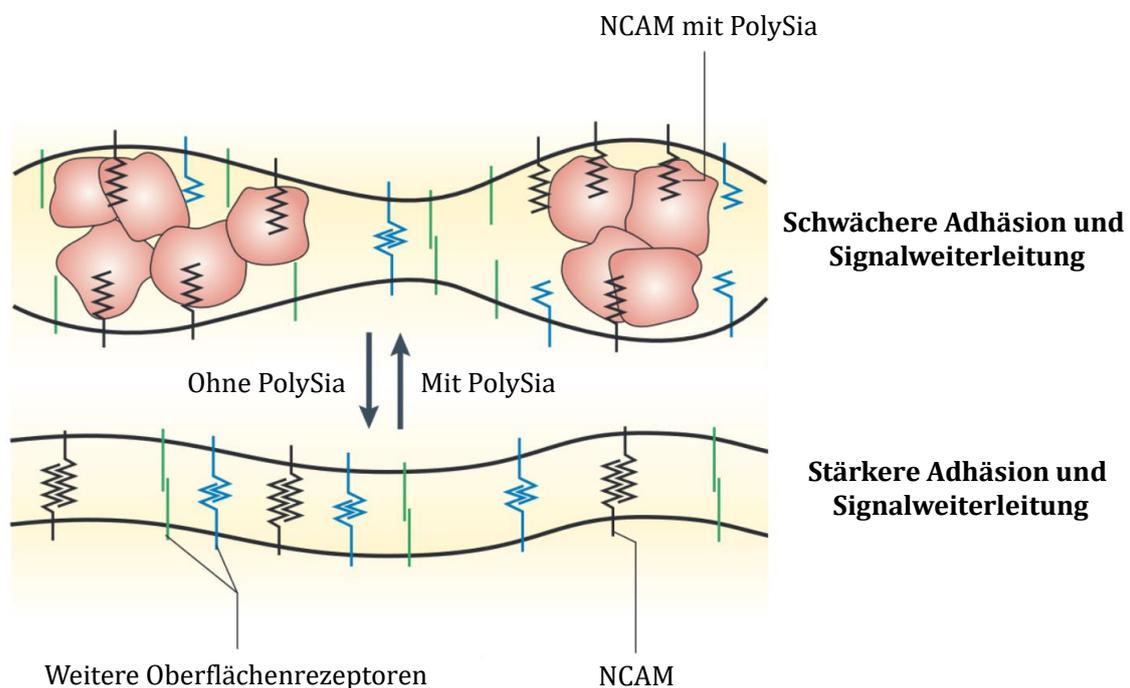


Abbildung 7: PolySia und das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM). Durch PolySia wird ein Zell-Zell-Kontakt erschwert, während ohne PolySia ein vollständiger Zell-Zell-Kontakt stattfindet nach [60].

Außerdem ist PolySia an der Zellmigration und der Zelldifferenzierung des embryonalen Nervengewebes, sowie dem Axonwachstum und der Entwicklung der neuronalen Plastizität im menschlichen Gehirn beteiligt [57, 61]. Zusätzlich

3. Theoretische Grundlagen

interagieren die Sialinsäuren mit zur SIGLEC-Familie gehörenden Adhäsionsmolekülen, die bei der Immunantwort von Bedeutung sind [62].

Neben NCAM ist unter anderem SynCAM, ein synaptisches Zelladhäsionsmolekül, mit PolySia modifiziert, welches bei der Synapsenausbildung mitwirkt [63].

PolySia ist nicht nur im zentralen Nervensystem präsent, sondern kann auch vermehrt auf der Oberfläche bestimmter Tumore nachgewiesen werden [64]. Darüber hinaus ist PolySia in der Muttermilch oder den Natriummembrankanälen zu finden [65, 66].

3.2.3 Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin

Die verschiedenen biologischen Funktionen machen PolySia interessant für unterschiedlichste Anwendungen.

Die gute Biokompatibilität und der gezielte Abbau durch spezifische Enzyme, den Endosialidasen, machen PolySia zu einem interessanten Material zur Unterstützung des Nervenzellenwachstums im Tissue Engineering [67, 68]. Hochmolekulare PolySia kann dabei in Kombination mit Hydrogelen [68] oder zur Beschichtung von Stützstrukturen genutzt werden [69, 70].

Die Modifikation von Wirkstoffen, z.B. L-Asparaginase oder Insulin, mit PolySia verbessert deren Pharmakokinetik [46, 71–76]. Therapeutische Proteine haben häufig nur verhältnismäßig geringe Halbwertszeiten im lebenden Organismus, welche durch die Verknüpfung mit PolySia verbessert werden können [77]. In Tierversuchen konnte mit PolySia-modifiziertes Insulin den Blutzuckerspiegel länger im Normalbereich halten, als unverändertes Insulin [46, 74].

Weiterhin wird PolySia in der Impfstoffentwicklung gegen Meningitiserreger eingesetzt [46, 63, 78]. Als Tumor-assoziiertes Kohlenhydrat gibt es außerdem

3. Theoretische Grundlagen

Behandlungsansätze unter Verwendung von PolySia in der Krebsimmuntherapie [46, 61, 63, 79, 80].

Niedermolekulare PolySia mit einer Kettenlänge von 20 Monomereinheiten (avDP 20) hat einen anti-inflammatorischen Effekt auf humane Makrophagen [81]. PolySia avDP 20 wird vom SIGLEC-11-Rezeptor erkannt, der auf humanen Makrophagen und Mikroglia, den Makrophagen des zentralen Nervensystems [82], exprimiert wird [81]. Eine Aktivierung des SIGLEC-11-Rezeptors durch PolySia reduziert die pro-inflammatorische Antwort der LPS-induzierten Mikroglia, wodurch die Immunantwort gegen körpereigene Zellen mit PolySia-Anteil unterdrückt wird [81, 82]. Zudem vermindert PolySia avDP 20 den oxidativen Burst humaner Makrophagen, der durch neuronale Zelltrümmer oder das fibrilläre Amyloid- β_{1-42} ausgelöst wird [81]. In Ko-Kulturen aus humanen Makrophagen und Neuronen reduziert PolySia den durch das fibrilläre Amyloid- β_{1-42} ausgelösten Verlust von Neuriten [81]. Diese unterschiedlichen Eigenschaften machen PolySia zu einem potentiellen Wirkstoff zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) [81, 83].

Altersbedingte Makuladegeneration ist für Menschen in den Industriestaaten die Hauptursache irreversibler Erblindung ab einem Lebensalter von 50 Jahren [84]. Es wird zwischen feuchter und trockener AMD unterschieden. Während feuchte AMD mit Hilfe von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Hemmern behandelt werden kann [83, 85, 86] gibt es für die trockene AMD noch keine genehmigte Behandlungsmöglichkeit [83]. Die chronische Aktivierung des Immunsystems unter Beteiligung des Komplementsystems, Aktivierung retinaler Phagozyten und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung und dem Krankheitsverlauf der AMD [83, 87]. Der SIGLEC-11-Rezeptor kann durch PolySia avDP 20 aktiviert werden, was zu einer Inhibierung der chronischen Prozesse führen kann. PolySia hemmt die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivität mononuklearer Phagozyten sowie laserinduzierte Gefäßundichtigkeit im Tierversuch [83]. Bereits bei einer niedrigen

3. Theoretische Grundlagen

Menge von 0,2 µg intravitreal injizierter PolySia avDP 20 können im Mausmodell positive Effekte beobachtet werden, was PolySia avDP 20 für die Behandlung von AMD attraktiv macht [83].

4. Experimentelle Arbeiten

In diesem Abschnitt sind der entwickelte Prozess zur Gewinnung von hochmolekularer PolySia, die anschließende Produktanalytik und mögliche Produktmodifikationen für den späteren medizinischen Einsatz dargestellt. Der gezeigte biotechnologische Herstellungsprozess von PolySia umfasste drei Teilgebiete.

- **Kultivierungsprozess**

Die Kultivierung von *E. coli* K1 zur PolySia-Produktion wird in unterschiedlichen Bioreaktorsystemen gezeigt. Der etablierte Kultivierungsprozess wurde in ein Einwegreaktorsystem übertragen, das die GMP-konforme Herstellung klinischer Prüfpräparate erleichtert.

- **Downstream Processing (DSP)**

Das DSP diente der Isolierung des Wertstoffes und der Abtrennung von Verunreinigungen, die durch Medienbestandteile oder während der Kultivierung in das Medium abgegebene Zellbestandteile das Produkt belasten.

- **Produktanalytik und -modifikation**

Nach dem Kultivierungsprozess und dem DSP wurde das Produkt auf Verunreinigungen getestet und charakterisiert. Zudem werden erste Möglichkeiten zur Herstellung kurzkettiger PolySia zum möglichen Einsatz gegen AMD gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

In Abbildung 8 wird der entwickelte Gesamtprozess der PolySia-Herstellung, der in den nächsten Kapiteln genauer beschrieben wird, gezeigt.

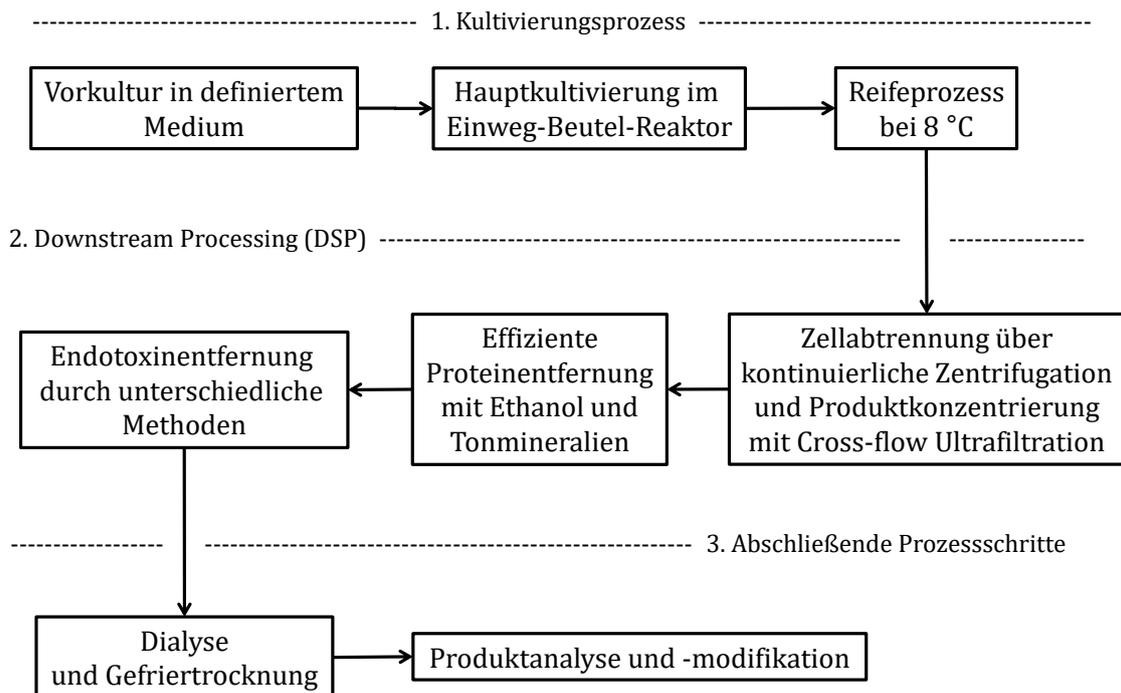


Abbildung 8: Gesamtprozess der PolySia-Herstellung.

Während das Ziel vorangegangener Arbeiten vor allem die Herstellung möglichst langkettiger PolySia für den Einsatz im Tissue Engineering war [43, 44], sollte in dieser Arbeit ein Prozess entwickelt werden, der den Aufbau einer GMP-konformen PolySia-Herstellung für die Produktion eines Prüfpräparats für klinische Studien erleichtert. Dazu sollten sowohl während des Kultivierungsprozesses als auch im Downstream Processing in GMP-Umgebungen anerkannte Einweegelemente etabliert, undefinierte Substanzen im

4. Experimentelle Arbeiten

Herstellungsprozess minimiert und erste Versuchsreihen zur Lagerstabilität und Methoden zur Herstellung kurzkettiger PolySia durchgeführt werden.

4.1 Kultivierungsarbeiten

Die Kultivierungsarbeiten wurden in unterschiedlichen Systemen durchgeführt. Neben einfachen Schüttelkolben für die Vorkulturen wurden für die Hauptkulturen zunächst weitverbreitete und für die PolySia-Produktion etablierte wiederverwendbare Rührkesselreaktoren [43, 44, 50, 88] bis zu einem Kulturvolumen von 30 L verwendet. Der etablierte Kultivierungsprozess wurde in ein welleninduziert durchmisches Einwegreaktorsystem bis zu einem Kulturvolumen von 25 L übertragen. Die Reaktorsysteme, die sich in ihrer Begasungs- und Durchmischungsstrategie deutlich unterscheiden, wurden hinsichtlich ihrer Eignung für die Produktion endogener PolySia mittels *E. coli* K1 verglichen, wobei sowohl die erreichte PolySia-Konzentration, die Kettenlänge und die Konzentration freigesetzter störender Zellbestandteile, wie Host Cell Proteine (HCP), betrachtet wurden. Zudem wird neben der Optimierung des Vorkulturmediums und den batch-Prozessen in diesem Abschnitt ein fed-batch Prozess im Einwegreaktorsystem vorgestellt mit dem Ziel, die PolySia-Ausbeute zu erhöhen.

4.1.1 Optimierung der Vorkultur

In den bisherigen Arbeiten wurde für den Kultivierungsprozess eine Vorkultur in komplexem Medium (LB-Medium) verwendet [43, 44, 50, 88]. Durch komplexe Medienbestandteile, wie Hefeextrakt, deren Zusammensetzung nicht genau

4. Experimentelle Arbeiten

definiert ist und chargenbedingten Schwankungen unterliegt, kommt es bei der Herstellung stark regulierter Produkte, wie Arzneimitteln, zu Schwierigkeiten bei der Prozessgenehmigung.

Die Umstellung auf ein definiertes Vorkulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) führte zu einer deutlich längeren lag-Phase von über 10 h im Vergleich zum komplexen Medium (lag-Phase etwa 4 – 5 h) bei direktem Animpfen aus der Gefrierkultur. Um lange lag-Phasen zu vermeiden, wurde die Kultivierung mit einer Vor-Vorkultur in komplexem Medium gestartet und diese nach 8 h Kulturzeit bei $OD_{600}=4$ bis $OD_{600}=6$ in definiertes Medium überimpft (Animpfmenge: 20 μ L). Durch die geringe Menge an Inokulum wurden nur minimale Bestandteile ($\sim 0,6 \cdot 10^{-5} \%$ bezogen auf 10 L Bioreaktorvolumen bei 300 mL Vorkultur) des komplexen Mediums in den Hauptprozess eingetragen.

Die Optimierung der Vorkultur steigerte zudem die Produktausbeute in der Hauptkultivierung und senkte die Proteinverunreinigungen (siehe Kapitel 4.1.2.2 Batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor).

4.1.2 Batch-Kultivierungen in verschiedenen Systemen

4.1.2.1 Batch-Kultivierungen im Rührkesselreaktor

Rührkesselreaktoren (stirred tank reactor, STR) werden in industriellen Herstellungsprozessen und im Forschungsbereich für unterschiedlichste Kultivierungsarbeiten verwendet und sind auch für die PolySia-Produktion etabliert. Der Rührkesselreaktor zeichnet sich durch einen hohen Sauerstoffeintrag, gute Regelbarkeit (z.B. Gelöstsauerstoffgehalt und pH-Wert) und Langlebigkeit aus. Für die batch-Kultivierungen im STR wurden zwei Systeme verwendet. Neben Kultivierungen im 10 L-Maßstab (Biostat® C, Sartorius Stedim Biotech GmbH ehemals B. Braun Biotech International GmbH) wurde ein Upscale

4. Experimentelle Arbeiten

auf einen Produktionsmaßstab von 30 L (Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt. Im 10 L-Maßstab wurden vier Kultivierungen durchgeführt, die Kultivierung im 30 L-Maßstab erfolgte exemplarisch.

4.1.2.1.1 10 L-Kultivierung im Rührkesselreaktor

Die Prozesseinstellungen wurden aus den vorherigen Arbeiten übernommen [43, 88]. Durch eine konstant hohe Rührerdrehzahl von 1.000 rpm konnte der Prozess ohne aktive Regulierung des Gelöstsauerstoffgehalts (DO) durchgeführt werden. Die Begasungsrate lag über den gesamten Prozess bei 10 L/min (1 vvm). Die Animpfmenge lag bei 3 % des Kulturvolumens (300 mL Vorkultur). Die online-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im STR sind in Abbildung 9 gezeigt.

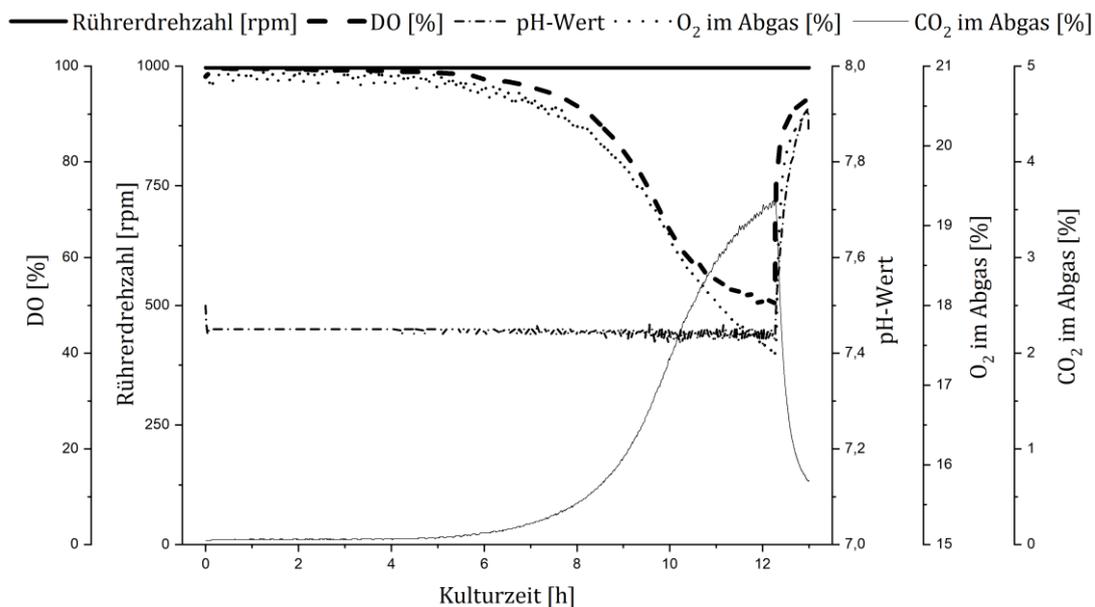


Abbildung 9: Online-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im STR. Die Rührerdrehzahl wurde während der gesamten Kultivierung konstant bei 1.000 rpm gehalten und der pH-

4. Experimentelle Arbeiten

Wert bei pH=7,5. Der Gelöstsauerstoffgehalt (DO) nahm mit zunehmender Biomassekonzentration ab. Bedingt durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien veränderte sich die O₂- und CO₂-Konzentration im Abgas.

Die Kultivierung verlief wie in der Literatur beschrieben [43, 44, 88]. Nach anfänglicher lag-Phase, in der eine Adaption des Organismus an die neue Kultivierungsumgebung erfolgte, ging die Kultur in die exponentielle Wachstumsphase über. Der Prozess wurde direkt nach Verbrauch des Substrats (Glucose) abgebrochen, um die Zellyse zu begrenzen, mit welcher der Eintrag von Host Cell Proteinen (HCP) und anderen Verunreinigungen in den Überstand verbunden ist.

Der 10 L-Kultivierungsprozess im STR dauerte bis zum Verbrauch der Glucose (Startkonzentration: 20 g/L) $10,1 \pm 1,8$ h. Es wurden $8,7 \pm 1,7$ g/L Biotrockenmasse (BTM) bei einer PolySia-Konzentration im Kulturüberstand von $339,3 \pm 22,7$ mg/L und einer Proteinkonzentration im Kulturüberstand von $180,9 \pm 50,6$ mg/L erreicht. Die PolySia-Gesamtkonzentration nach Ablösung mittels Ultraschallbehandlung lag bei $648,1 \pm 109,0$ mg/L. Entsprechend wurden während der Kultivierung 55 ± 8 % PolySia durch Scherstress oder Selbstspaltung von der Zelloberfläche in den Kulturüberstand abgelöst. Die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) lag bei $0,65 \pm 0,05$ /h. Die offline-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung sind in Abbildung 10 dargestellt.

4. Experimentelle Arbeiten

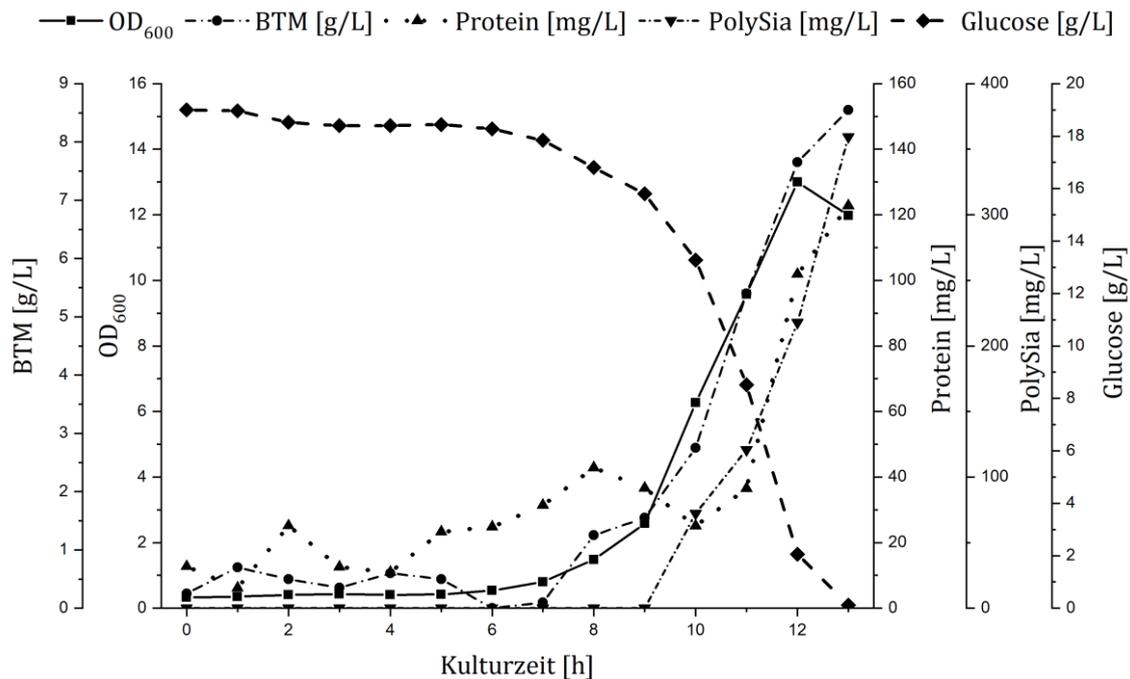


Abbildung 10: Offline-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im STR. Nach anfänglicher lag-Phase ging die Kultur in die exponentielle Wachstumsphase über. Die PolySia-Konzentration nahm verbunden mit der Zellkonzentration zu und auch die Menge an freigesetztem Protein stieg über die Kultivierungsdauer an.

4.1.2.1.2 Upscale auf 30 L im Rührkesselreaktor

Das maximale Kulturvolumen für einen batch-Prozess, das in den bisherigen Arbeiten beschrieben wurde, liegt bei 24 L [43]. Die Prozessaufskalierung auf ein Kulturvolumen von 30 L führte zu einer Erweiterung der Produktionskapazitäten hochmolekularer PolySia für die unterschiedlichen Anwendungsgebiete.

Die Prozesseinstellungen wurden aus dem 10 L-Maßstab auf das 30 L-System übertragen. Die Begasungsrate wurde auf 30 L/min (1 vvm) erhöht. Die Rührerdrehzahl (1.000 rpm) und der pH-Wert (pH=7,5) wurden konstant gehalten und die Animpfmenge dem Kulturvolumen angepasst (3 %, 900 mL Vorkultur).

4. Experimentelle Arbeiten

Wie in Abbildung 9 für den 10 L-STR gezeigt, konnte der Gelöstsauerstoffgehalt durch die hohe Rührerdrehzahl im 30 L-STR konstant über 60 % gehalten werden. Die offline-Daten der 30 L-Kultivierung sind in Abbildung 11 gezeigt und mit den Konzentrationswerten der 10 L-Kultivierung vergleichbar. Nach Glucoseverbrauch (~ 9 h Kulturzeit) lag die BTM-Konzentration bei 9 g/L, die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand bei 310 mg/L und die Proteinkonzentration im Kulturüberstand bei 130 mg/L. Der Anteil freigesetzter PolySia lag bei 53 % und μ_{\max} bei 0,55 /h. Wurde die Kultivierung anschließend fortgeführt, nahmen in der nächsten Stunde die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand um ~ 25 % auf 390 mg/L und die Proteinkonzentration im Kulturüberstand um ~ 7 % auf 139 mg/L zu. Neben Proteinen wurden in dieser Zeit, vermutlich bedingt durch die Zellyse, vermehrt weitere Zellbestandteile, wie Endotoxine oder DNA, freigesetzt, die die spätere Aufarbeitung der PolySia erschweren.

4. Experimentelle Arbeiten

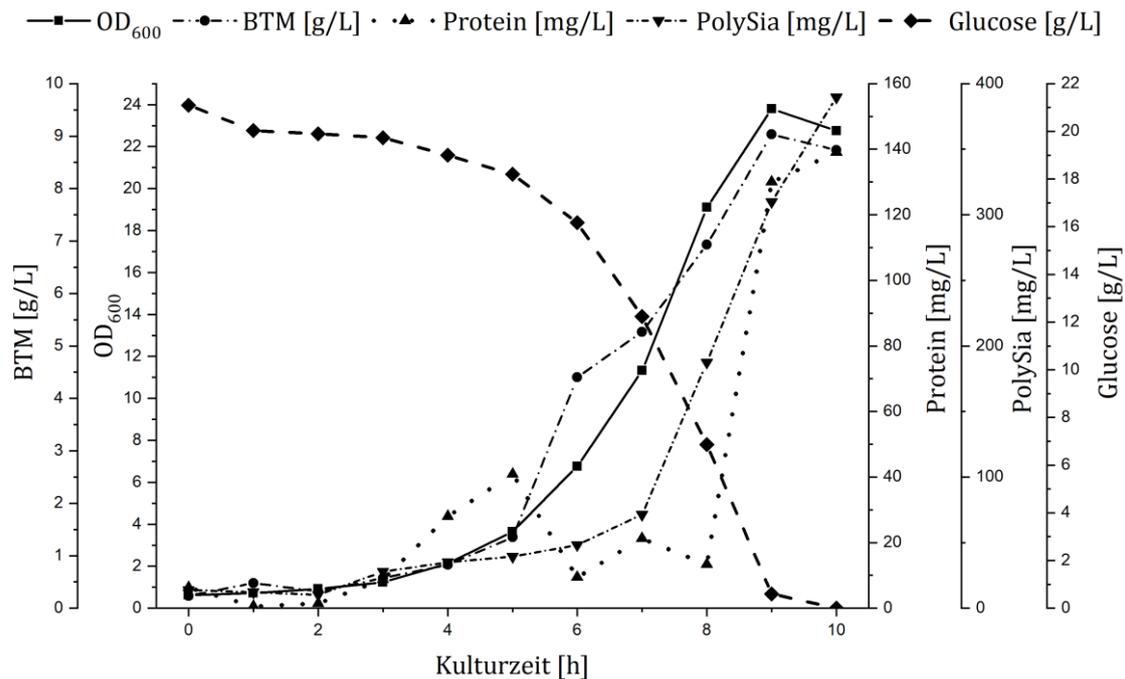


Abbildung 11: Offline-Daten einer 30 L-Kultivierung im STR. Die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand lag nach Glucoseverbrauch (~ 9 h) bei 310 mg/L, die BTM-Konzentration bei 9 g/L und die Proteinkonzentration im Kulturüberstand bei 130 mg/L. Während sich die PolySia- und Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand nach dem Glucoseverbrauch weiter erhöhten, stoppte das Zellwachstum und die BTM und OD₆₀₀ stiegen nicht weiter an bzw. sanken leicht.

4.1.2.2 Batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor

Einwegreaktoren werden häufig für die Herstellung von Prüfpräparaten für klinische Studien verwendet, da sie eine GMP-konforme Produktion verhältnismäßig geringer Wirkstoffmengen erleichtern (siehe Kapitel 3.1.3 Single-use Systeme in der Biotechnologie). In Hinblick auf eine PolySia-Produktion für einen möglichen Einsatz gegen neurodegenerative Erkrankungen (siehe Kapitel 3.2.3 Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin) sollte der etablierte Kultivierungsprozess für die PolySia-Produktion in ein Einwegreaktorsystem übertragen werden. Durch die Implementierung von Einwegelementen in den

4. Experimentelle Arbeiten

Produktionsprozess soll eine spätere Übertragung des Herstellungsprozesses in eine GMP-konforme Umgebung erleichtert werden.

Häufig eingesetzte Einwegreaktoren sind welleninduziert durchmischte Einweg-Beutel-Reaktoren [89]. Die Begasung erfolgt in diesen Reaktorsystemen über den Kopfraum. Bedingt durch die Unterschiede im Aufbau liegt der beschriebene volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient (k_{La} -Wert) im Einweg-Beutel-Reaktor bei 47 /h in einem Rührkesselreaktor hingegen bei 392 /h [90]. Dadurch eignet sich der Einweg-Beutel-Reaktor prinzipiell vor allem für langsam wachsende Zellen mit niedrigem Sauerstoffbedarf oder für anaerobe Organismen und nicht für schnell wachsende aerobe Bakterien wie z.B. *E. coli* [91]. Zusätzlich eignen sich Einweg-Beutel-Reaktoren aufgrund ihrer scherstressarmen welleninduzierten Durchmischung im Vergleich zu Rührkesselreaktoren besser zur Kultivierung scherstresssensitiver Organismen [92]. Der verhältnismäßig einfache Aufbau und der damit verbundene niedrigere Preis im Vergleich zu komplexeren Einwegreaktorsystemen machen den Einweg-Beutel-Reaktor mit welleninduzierter Durchmischung dennoch für aerobe bakterielle Herstellungsprozesse interessant.

Die batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor wurden mit dem CultiBag RM-System (Sartorius Stedim Biotech GmbH) im 10 L- (Beutelvolumen: 20 L) und 25 L-Maßstab (Beutelvolumen: 50 L) durchgeführt. Im 10 L-Maßstab wurden drei Kultivierungen durchgeführt, die Kultivierung im 25 L-Maßstab erfolgte exemplarisch. Ein Einweg-Beutel-Reaktor mit 50 L-Beutelvolumen ist in Abbildung 12 gezeigt.

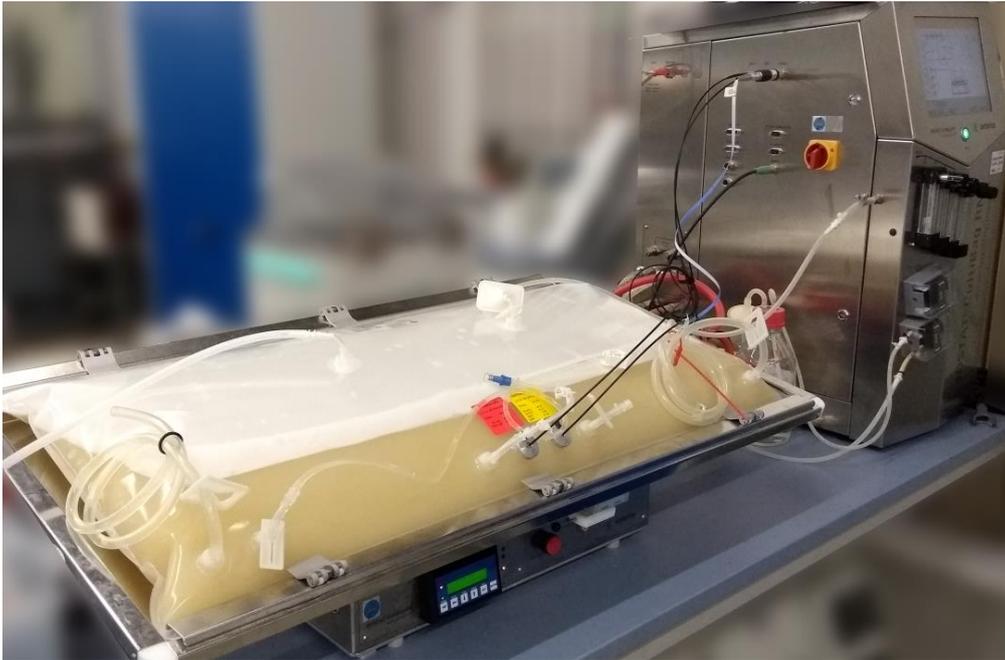


Abbildung 12: Einweg-Beutel-Reaktor auf Rockingplattform (50 L-Beutelvolumen). Der Einweg-Beutel wurde auf der Rockingplattform befestigt. Das Kulturvolumen betrug 25 L. Über Lichtleiter wurden die Signale des pH- und DO-Spots weitergeleitet. Die Begasung erfolgte über den Kopfraum.

4.1.2.2.1 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor

Die Prozesseinstellungen wurden vom Rührkesselreaktor an den Einweg-Beutel-Reaktor angepasst. Die Begasungsrate wurde auf 1 L/min (0,1 vvm) reduziert. Der Kippwinkel betrug 10°. Durch die geringe Begasungsrate sollte eine Verblockung des standardmäßig angebrachten Abluftfilters verhindert werden. Bei höheren Begasungsraten kam es, trotz angebrachter Filterheizung, bei einem maximalen Arbeitsvolumen im Einweg-Beutel-Reaktor (CultiBag RM 20, maximales Arbeitsvolumen: 10 L) in kürzester Zeit zu einer Verblockung des Abluftfilters. Der Gelöstsauerstoffgehalt konnte durch die Kombination aus Erhöhung der Kippfrequenz und Sauerstoffzudosierung zur Zuluft konstant bei über 40 % (Setpoint: 50 %) gehalten werden. Je nach dem online gemessenen Gelöstsauerstoffwert wurde die Kippfrequenz automatisch angepasst und

4. Experimentelle Arbeiten

nachdem die Kippfrequenz ihr Maximum (42 Rpm) erreichte, der Sauerstoffanteil in der Zuluft automatisch erhöht. Der pH-Wert wurde wie im STR auf pH=7,5 reguliert und die Animpfmenge betrug 3 % des Kulturvolumens. Die online-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor sind in Abbildung 13 gezeigt.

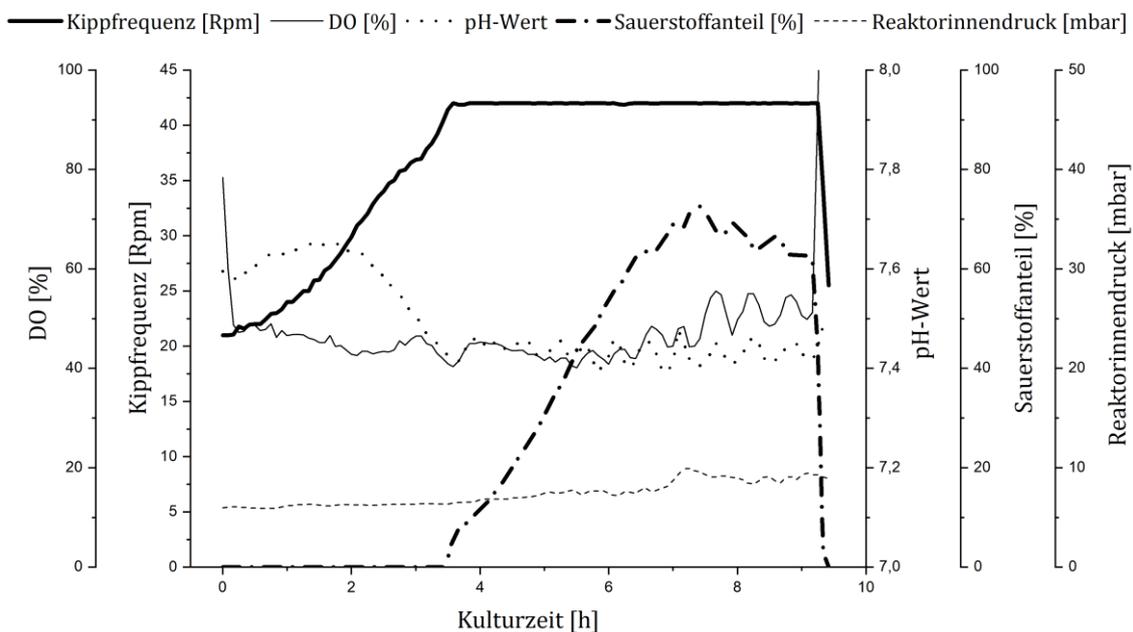


Abbildung 13: Online-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor. Der gelöste Sauerstoffgehalt (DO) wurde während der Kultivierung konstant bei über 40 % gehalten und über die Kippfrequenz und den Sauerstoffanteil in der Zuluft kontrolliert. Nach etwa 3 h erreichte die Kippfrequenz ihr Maximum von 42 Rpm und der Sauerstoffanteil wurde kontinuierlich erhöht. Der Reaktorinnendruck konnte über den Gesamtprozess konstant niedrig bei unter 20 mbar gehalten werden.

Durch die Erhöhung der Kippfrequenz, verbunden mit einer Sauerstoffzudosierung zur Zuluft, konnte der gesamte Kultivierungsprozess ohne Sauerstofflimitierung durchgeführt werden, wobei die Kippfrequenz bereits nach kurzer Zeit ihr

4. Experimentelle Arbeiten

Maximum von 42 rocks per minute (Rpm) erreichte. Bei geringer Biotrockenmassekonzentration von ~ 1 g/L musste bereits reiner Sauerstoff zur Zuluft beigemischt werden, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Am Ende der Kultivierung betrug der Anteil an zudosiertem Sauerstoff über 60 %.

Die 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor dauerte bis zum Verbrauch der Glucose (Startkonzentration: 20 g/L) $11,5 \pm 1,8$ h. Nach Glucoseverbrauch betrug die Biotrockenmassekonzentration $7,5 \pm 0,8$ g/L, die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand $300,9 \pm 19,8$ mg/L und die Proteinkonzentration im Kulturüberstand $108,8 \pm 41,5$ mg/L. Die Gesamtmenge an PolySia nach Zellaufschluss betrug $560,5 \pm 56,9$ mg/L. Entsprechend wurden 54 ± 7 % der PolySia während der Kultivierung von der Zelloberfläche in den Überstand abgelöst. Die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) betrug im Einweg-Beutel-Reaktor $0,64 \pm 0,10$ /h. Verglichen mit dem Rührkesselreaktor reichte der geringere Scherstress, der durch die welleninduzierte Durchmischung erzeugt wurde, aus um ähnlich viel Produkt von der Zelloberfläche abzulösen.

Durch den Einsatz von definiertem Medium für die Vorkultur konnte im Vergleich zu Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor mit einer Vorkultur in komplexem Medium die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand um 23 % (Endkonzentration mit Vorkultur in komplexem Medium: 245 ± 56 mg/L [40]) gesteigert und die Proteinkonzentration um 17 % (Endkonzentration mit Vorkultur in komplexem Medium: 132 ± 30 mg/L [40]) verringert werden. Die offline-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor sind in Abbildung 14 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

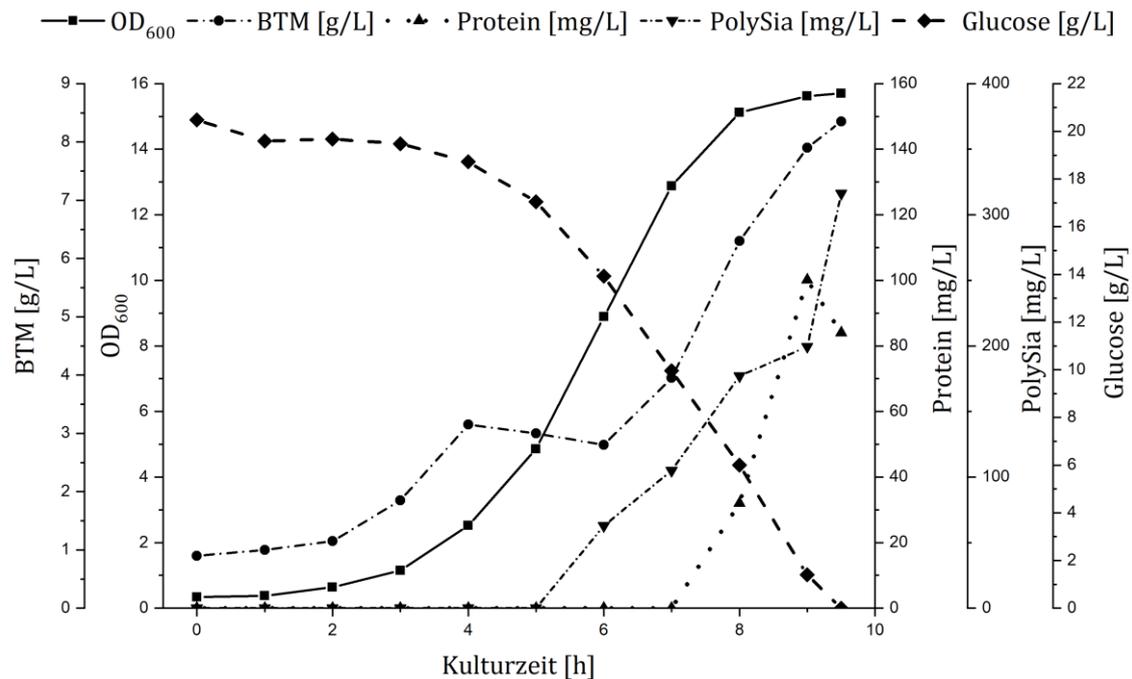


Abbildung 14: Offline-Daten einer typischen 10 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor. Nach etwa 1 – 2 h Kulturzeit ging die Kultur in die exponentielle Wachstumsphase über. Anschließend nahmen PolySia- und Protein-Konzentration verbunden mit der erhöhten Biomassekonzentration zu.

Im Einweg-Beutel-Reaktor konnte zudem auf die Zugabe von Antischaummitteln verzichtet werden, da die Schaumbildung wegen der welleninduzierten Durchmischung deutlich geringer ausfiel als im Rührkesselreaktor. Durch den Verzicht von Antischaummitteln während der Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor wurde die Menge an Verunreinigungen, die während des Downstream Processing entfernt werden mussten, reduziert.

4. Experimentelle Arbeiten

4.1.2.2.2 Upscale auf 25 L im Einweg-Beutel-Reaktor

Das Einwegreaktorsystem CultiBag RM (Sartorius Stedim Biotech GmbH) ermöglichte die einfache Prozessaufskalierung von einem 20 L-Beutelvolumen (maximales Arbeitsvolumen: 10 L) auf ein 50 L-Beutelvolumen (maximales Arbeitsvolumen: 25 L). Hierzu musste lediglich die Auflageplattform für die Reaktorbeutel ausgetauscht werden, während die Rockingplattform und Steuereinheit für beide Prozessmaßstäbe verwendet werden konnte. Ein 50 L-Reaktorbeutel auf der entsprechenden Auflageplattform ist in Abbildung 12 gezeigt.

Die Prozesseinstellungen wurden aus der 10 L-Kultivierung auf den 25 L-Kultivierungsmaßstab (50 L-Beutelvolumen) übertragen (Begasungsrate: 2,5 L/min, 0,1 vvm; Animpfvolumen: 3 %, 750 mL). Der pH-Wert (pH=7,5) und der Gelöstsauerstoffgehalt (Setpoint: 50 %) wurden konstant gehalten.

Die Kultivierung mit 25 L-Kulturvolumen verlief zunächst vergleichbar zu den 10 L-Kultivierungen. Nachdem die Kippfrequenz ihr Maximum (42 Rpm) erreichte, konnte der Gelöstsauerstoffwert über die Zudosierung von Sauerstoff zur Zuluft konstant über 40 % gehalten werden. Während der Kultivierung kam es jedoch im Gegensatz zum 10 L-Maßstab zu einer Erhöhung der Reaktortemperatur auf kurzzeitig bis zu 40 °C zwischen 5,5 h und 7,75 h Kulturzeit, da durch einen Wärmestau die Temperatur im 25 L-Maßstab ohne externes Kühlaggregat nicht konstant gehalten werden konnte. Mit externem Kühlaggregat konnte die Reaktortemperatur im Anschluss konstant bei 37 °C gehalten werden.

Nach Glucoseverbrauch (~ 8,5 h Kulturzeit) lag die BTM-Konzentration bei 6,1 g/L und die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand bei 432 mg/L. Durch die erhöhte Reaktortemperatur wurde das Zellwachstum ab einer Kulturzeit von ~ 6 h limitiert. Die erhöhte PolySia-Konzentration im Kulturüberstand ist vermutlich durch eine vorzeitige Zellyse aufgrund der Temperaturschwankungen zu erklären.

4. Experimentelle Arbeiten

Die offline-Daten der 25 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor sind in Abbildung 15 gezeigt.

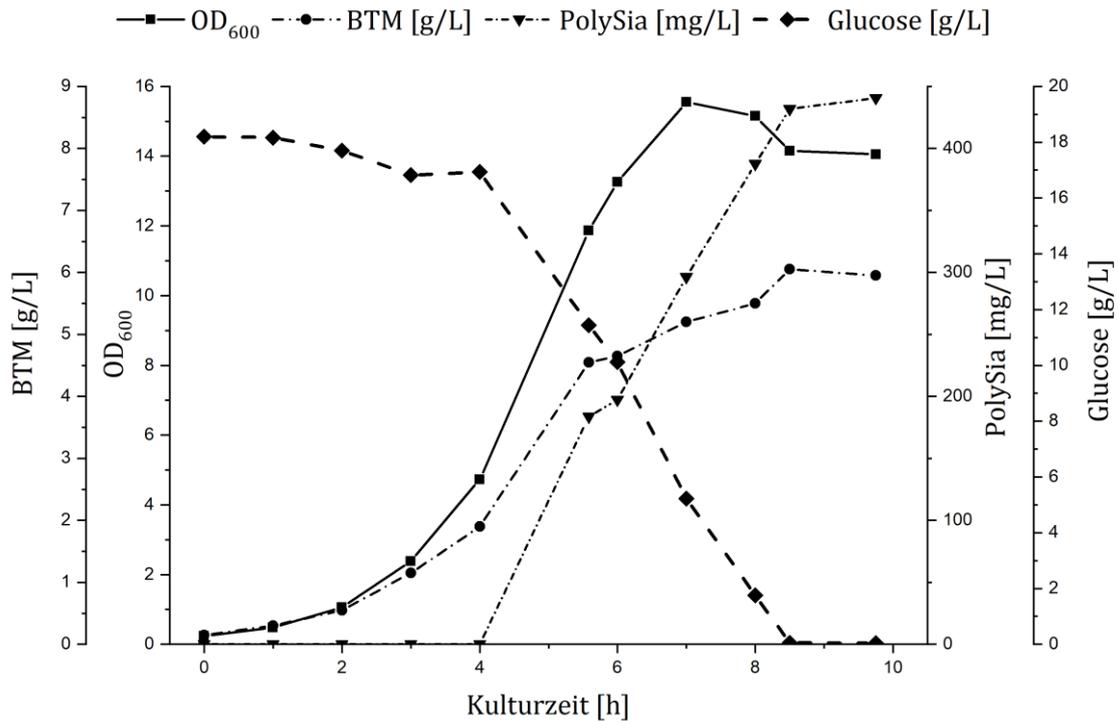


Abbildung 15: Offline-Daten einer 25 L-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor. Zwischen 5,5 h und 7,75 h Kulturzeit stieg die Reaktortemperatur kurzzeitig auf bis zu 40 °C an, wodurch das Zellwachstum beeinflusst wurde. Nach Glucoseverbrauch lag die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand bei 432 mg/L und die BTM-Konzentration bei 6,1 g/L.

Ein Upscale auf einen Maßstab von 25 L-Kulturvolumen konnte erfolgreich gezeigt werden, wobei durch eine konstante Reaktortemperatur das Zellwachstum optimiert werden könnte.

4. Experimentelle Arbeiten

4.1.2.3 Vergleich der batch-Kultivierungen

Im Folgenden werden die Kultivierungen im 10 L-Maßstab in den unterschiedlichen Systemen verglichen. Der Rührkesselreaktor und der Einweg-Beutel-Reaktor unterscheiden sich in ihrer Durchmischungs- und Begasungsstrategie. Die scherstressarme welleninduzierte Durchmischung und die reine Kopfraumbegasung, verbunden mit dem niedrigeren Sauerstoffeintrag im Einweg-Beutel-Reaktor, erforderten eine Anpassung der Prozesseinstellungen. Eine Zusammenfassung der Prozesseinstellungen im Rührkesselreaktor und Einweg-Beutel-Reaktor ist in Tabelle 1 gezeigt. Ein Vergleich der Kultivierungsergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Vergleich der Prozesseinstellungen in den Reaktorsystemen (10 L-Maßstab).

| Bezeichnung | Rührkesselreaktor | Einweg-Beutel-Reaktor |
|--|--------------------------|------------------------------|
| Temperatur | 37 °C | 37 °C |
| pH-Wert | 7,5 | 7,5 |
| Begasungsrate | 10 L/min (1 vvm) | 1 L/min (0,1 vvm) |
| Rührergeschwindigkeit/ Kippfrequenz | 1.000 rpm | Variabel |
| Sauerstoffzudosierung | Keine | Variabel |
| Gelöstsauerstoff (Setpoint) | Kein Setpoint | 50 % |

Die Temperatur und der pH-Wert konnten direkt aus dem Rührkesselreaktor auf den Einweg-Beutel-Reaktor übertragen werden. Im Gegensatz zum Rührkesselreaktor, der einen Abluftkühler besitzt, um die feuchte Abluft zu kondensieren und zurück in den Reaktorkessel zu leiten, verfügt der Einweg-Beutel-Reaktor über einen Abluftfilter, der beheizt wurde. Dennoch sammelte sich bei Begasungsraten > 0,1 vvm vermehrt Flüssigkeit vor dem Abluftfilter, die zu einer Verblockung des Filters führte, sodass die Begasungsrate angepasst werden

4. Experimentelle Arbeiten

musste. Bedingt durch den niedrigeren Sauerstoffeintrag im Einweg-Beutel-Reaktor war es zudem notwendig, zunächst die Kippfrequenz bis zum Maximum (42 Rpm) zu erhöhen und anschließend Sauerstoff zur Zuluft zu zudosieren, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden.

Während die Vor- und Nachbereitung der Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor aufgrund der überflüssigen Sterilisation (Medium wurde über einen Sterilfilter zugeführt) und Reinigung unkomplizierter und zeitschonender durchführbar war, war die Prozessführung im Rührkesselreaktor erleichtert. Während des Kultivierungsprozesses im Einweg-Beutel-Reaktor sollte stündlich der pH-Wert extern überprüft und bei einer Abweichung rekaliert werden. In Einwegreaktorsystemen werden Sensoren verwendet, welche die Kosten im Hinblick auf eine einmalige Nutzung rechtfertigen [93]. Jedoch sind diese Sensoren im Vergleich zu den wiederverwendbaren Sensoren stöempfindlicher, unter anderem nimmt die Messgenauigkeit optischer Sensoren, die für die pH-Wert- und DO-Wertmessung eingesetzt werden, bei erhöhter Lichteinstrahlung oder der Zugabe größerer Mengen pH-Korrekturmittel ab. Zudem musste im Einweg-Beutel-Reaktor der Reaktorinnendruck über den Prozess kontrolliert werden, da es auch bei der bereits niedrigen Begasungsrate zu einer Verblockung des Abluftfilters kommen kann.

Die Kultivierungsergebnisse waren in den beiden Reaktorsystemen ähnlich. Durch die einfachere Prozessführung war der Gesamtprozess im Rührkesselreaktor etwas kürzer (um 1,4 h) und es wurden eine höhere Biomasse- (um 1,2 g/L) und Produktkonzentration (um 38,4 mg/L) erreicht. Die Ablösung der PolySia von der Zelloberfläche wurde durch die unterschiedlichen Durchmischungsstrategien nicht beeinflusst. Trotz der schonenderen welleninduzierten Durchmischung im Einweg-Beutel-Reaktor lag der Anteil der von der Zelloberfläche abgelösten PolySia ähnlich hoch wie im Rührkesselreaktor, jedoch wurde weniger Protein freigesetzt, was eine anschließende Aufarbeitung erleichtert. Entsprechend wurde die PolySia bereits bei verhältnismäßig geringem Scherstress von der

4. Experimentelle Arbeiten

Zelloberfläche abgelöst. Der geringere Scherstress im Einweg-Beutel-Reaktor führte jedoch dazu, dass weniger Zellen lysierten, wodurch weniger Protein freigesetzt wurde. Zwischen den maximalen Kettenlängen der PolySia und den maximalen Wachstumsraten (μ_{\max}) konnten in beiden Systemen keine Unterschiede erkannt werden. Eine komplette Übersicht über den Vergleich der Kultivierungsergebnisse in den beiden Bioreaktorsystemen ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Vergleich der Kultivierungsergebnisse in den Reaktorsystemen (10 L-Maßstab).

| Ergebnis | Rührkesselreaktor | Einweg-Beutel-Reaktor |
|------------------------------|--|--|
| Kulturzeit | 10,1 ± 1,8 h | 11,5 ± 1,8 h |
| Biotrockenmasse | 8,7 ± 1,7 g/L | 7,5 ± 0,8 g/L |
| μ_{\max} | 0,65 ± 0,05 /h | 0,64 ± 0,10 /h |
| Kettenlänge | ~ 90 – 100 DP | ~ 90 – 100 DP |
| PolySia-Konzentration | 339,3 ± 22,7 mg/L | 300,9 ± 19,8 mg/L |
| PolySia im Überstand | 55 ± 8 % | 54 ± 7 % |
| Proteinkonzentration | 180,9 ± 50,6 mg/L | 108,8 ± 41,5 mg/L |
| $Y_{P/S}$ | 17,0 ± 1,1 mg _{PolySia} /g _{Glucose} | 15,0 ± 1,0 mg _{PolySia} /g _{Glucose} |
| $Y_{X/S}$ | 0,43 ± 0,08 g _{BTM} /g _{Glucose} | 0,37 ± 0,04 g _{BTM} /g _{Glucose} |

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der batch-Prozess zur PolySia-Herstellung unter Anpassung der Kultivierungsbedingungen erfolgreich in den Einweg-Beutel-Reaktor übertragen werden konnte. Eine Aufskalierung des Kultivierungsprozesses war in beiden Systemen (Rührkesselreaktor: 30 L-Kulturvolumen; Einweg-Beutel-Reaktor: 25 L-Kulturvolumen) möglich. Während die welleninduzierte Durchmischung im Einweg-Beutel-Reaktor eine Anpassung der Prozesseinstellungen voraussetzte, bot die Durchmischungsstrategie im Vergleich zur Durchmischung im Rührkesselreaktor den Vorteil, dass nach der Kultivierung weniger Protein bei ähnlich hoher Produktkonzentration im Kulturüberstand vorlag.

4.1.3 Fed-batch-Prozess im Einweg-Beutel-Reaktor und Vergleich zum STR

4.1.3.1 Fed-batch-Prozess im Einweg-Beutel-Reaktor

Neben batch-Kultivierungen, in denen sämtliche Medienbestandteile vor der Inokulation des Reaktors vorgelegt werden (außer pH-Korrekturmittel und Gase) [94, 95], gibt es fed-batch-Prozesse, in denen ein oder mehrere Medienbestandteile während der Kultivierung zugeführt werden und kontinuierliche Kultivierungsprozesse, in denen nicht nur Medienbestandteile zugeführt werden, sondern auch entsprechend Reaktorvolumen entnommen wird [94–96].

Neben dem gezeigten batch-Prozess wurde ein fed-batch-Prozess im Einweg-Beutel-Reaktor (CultiBag RM 20, Sartorius Stedim Biotech GmbH) entwickelt, um die Produktausbeute zu erhöhen.

Der fed-batch-Prozess wurde zunächst mit einer batch-Phase (Glucosestartkonzentration: 10 g/L) begonnen. Nachdem die Glucose verbraucht war, wurde die fed-batch-Phase gestartet. Der Volumenstrom der feed-Lösung (feed-Rate) wurde während der Kultivierung der Biomassekonzentration angepasst. Die Steuerung erfolgte über das Programm ORK (Online Runge-Kutta) Feeder 1000 (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover). Das für ideale Rührkesselreaktoren entwickelte Programm basiert auf dem Monod-Modell [97]. Die Differentialgleichungen wurden durch das Programm numerisch unter Nutzung des Runge-Kutta-Verfahrens der vierten Ordnung gelöst [97]. Die berechnete feed-Rate wurde direkt an die feed-Pumpe weitergeleitet [97]. Eine genaue Beschreibung des Programms ist in Kapitel 6.1.2.2.6 Kultivierungen im Beutel-Reaktor: fed-batch-Betrieb zu finden. Die verwendeten Startparameter, die aus vorherigen Kultivierungen übertragen wurden, sind in Tabelle 3 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

Tabelle 3: Startparameter zu Beginn der fed-batch-Phase (t_0) für das ORK Feeder 1000-Programm.

| Prozessparameter | Werte |
|---|---------------------------|
| Biomassekonzentration im Reaktor bei t_0 | 4 g/L |
| Substratkonzentration im Reaktor bei t_0 | 0,1 g/L |
| Reaktorvolumen bei t_0 | 8 L |
| Substratkonzentration der feed-Lösung | 200 g/L |
| Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat ($Y_{X/S}$) | 0,4 $g_{BTM}/g_{Glucose}$ |
| Eingestellte Wachstumsrate (μ_{set}) | 0,3 /h |

In den ersten Versuchen wurde eine reine Glucoselösung mit der Konzentration von 200 g/L als feed-Lösung verwendet. Dies führte in der fed-batch-Phase zu einem geringen Wachstum der Bakterien, da vermutlich andere fehlende Medienbestandteile zu einer Limitierung führten. Die Biotrockenmasse lag am Ende der Kultivierung bei 7,9 g/L. Trotz des limitierten Bakterienwachstums konnte die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand im Vergleich zum batch-Prozess mehr als verdoppelt werden (733 mg/L), während die Proteinkonzentration im Kulturüberstand mit 120 mg/L ähnlich gering war, wie in den batch-Kultivierungen.

In den folgenden Kultivierungen wurde die feed-Lösung angepasst und neben Glucose wurden auch Salze, Spurenelemente und Pufferbestandteile zugegeben (Zusammensetzung siehe Tabelle 15). Trotz der Medienanpassung fiel die Wachstumsrate mit 0,11 /h niedriger aus als die für das feed-Programm genutzte Berechnungsgrundlage (0,3 /h) für die feed-Rate, sodass nach 9 h Kulturzeit die zugegebene Glucose nicht mehr direkt verbraucht werden konnte und akkumulierte (siehe Abbildung 16). Daraufhin wurde das feed-Programm beendet und die Glucose manuell mit einer konstanten feed-Rate von 3,6 mL/min

4. Experimentelle Arbeiten

zugepumpt. Die offline-Daten einer fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor sind in Abbildung 16 gezeigt.

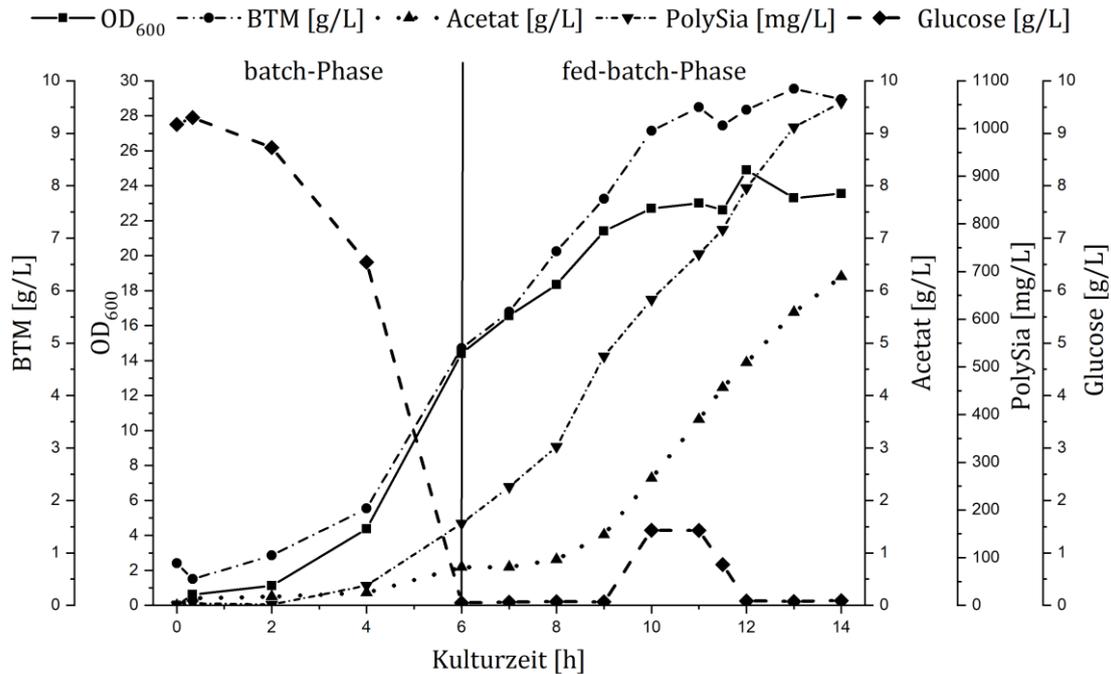


Abbildung 16: Offline-Daten einer fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor. Nachdem die batch-Phase beendet war (6 h Kulturzeit), wurde die fed-batch-Phase gestartet. Nach 9 h Kulturzeit konnte die Glucose nicht mehr direkt verstoffwechselt werden und akkumulierte, woraufhin das feed-Programm beendet wurde und die feed-Lösung manuell zugepumpt wurde. Die PolySia- und die Acetatkonzentration stiegen über die gesamte Kulturzeit an.

Die batch-Phase dauerte 6 h. Während der batch-Phase lag die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) bei 0,63/h, was mit den zuvor durchgeführten batch-Kultivierungen vergleichbar ist. Die Wachstumsrate während der fed-batch-Phase lag bei 0,11/h. Die PolySia-Konzentration nahm über den gesamten Kultivierungsprozess zu. Nachdem die Kultur ab etwa 10 h in die stationäre Phase

4. Experimentelle Arbeiten

übergang, wurde von den *E. coli*-Bakterien weiterhin PolySia in den Kulturüberstand abgegeben. Am Ende der Kultivierung wurden Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 9,7 g/L und eine PolySia-Konzentration im Kulturüberstand von bis zu 1,05 g/L bei einer Proteinkonzentration im Kulturüberstand von unter 150 mg/L erreicht. Die maximale Kettenlänge der PolySia entsprach dem im batch-Prozess ermittelten Polymerisationsgrad von 90 – 100 DP.

Im Vergleich zu den fed-batch-Prozessen mit einer reinen Glucoselösung als feed-Lösung konnte die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand um das bis zu 1,5-fache, im Vergleich zur batch-Kultivierung sogar um das etwa 3,6-fache erhöht werden. Der Anteil freigesetzter PolySia lag am Ende der fed-batch-Kultivierung bei 75 – 80 % und damit höher als im batch-Prozess (54 %), was durch die längere Kulturzeit erklärt werden kann. Das Nebenprodukt Acetat stieg am Ende der Kultivierung auf bis zu 6,3 g/L an.

Während des fed-batch-Prozesses wurde der Abluftfilter aus Sicherheitsgründen frühzeitig ausgetauscht, da bei erhöhtem Reaktorinnendruck (maximal 50 mbar) zwar die Begasung automatisch gestoppt wird, die feed-Pumpe jedoch nicht mit dem System gekoppelt war und auch bei hohen Drücken weiter feed-Lösung pumpen würde. Der Gelöstsauerstoffgehalt konnte während der Kultivierung durch die Regulierung über die Kippfrequenz und Sauerstoffzudosierung bei über 40 % gehalten werden. Die Kultivierung wurde nach 14 h Kulturzeit beendet, nachdem 1,5 L feed-Lösung während der fed-batch-Phase zugegeben wurde. Die online-Daten einer fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor sind in Abbildung 17 dargestellt.

4. Experimentelle Arbeiten

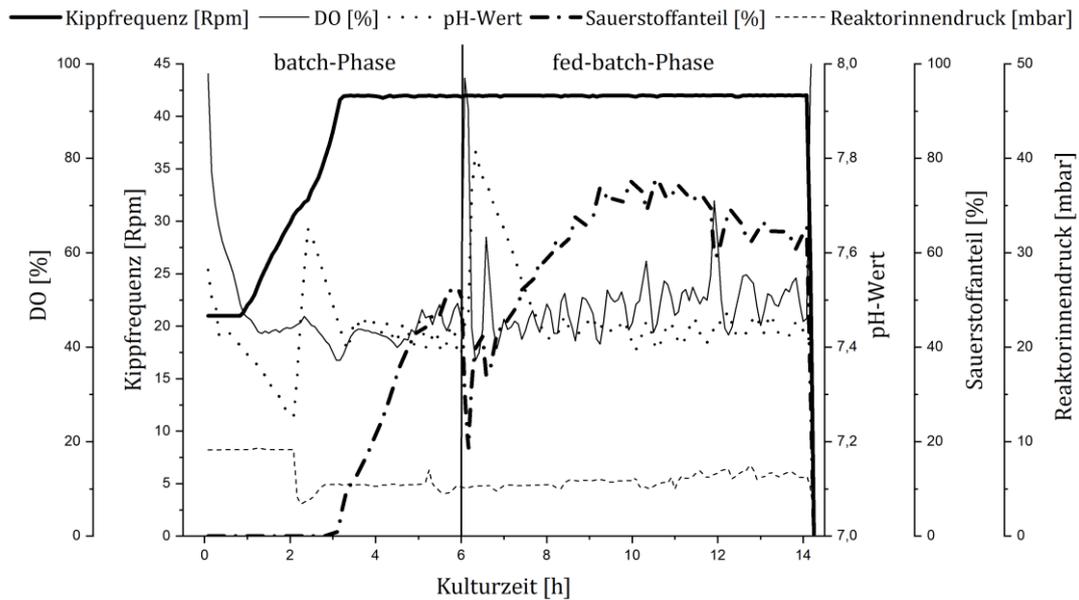


Abbildung 17: Online-Daten einer fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor. Der Gelöstsauerstoffgehalt (DO) konnte über den Prozess durch die Kombination aus Kippfrequenzerhöhung und Sauerstoffzudosierung über ~ 40 % gehalten werden. Die batch-Phase endete nach 6 h Kulturzeit, was durch einen kurzzeitigen Anstieg des Gelöstsauerstoffgehalts sichtbar wurde. Im Anschluss wurde feed-Lösung zugegeben. Der Abluftfilter wurde aus Sicherheitsgründen nach 2 h Kulturzeit ausgetauscht. Durch Rekalibrierungen während des Prozesses kam es teilweise zu einer sprunghaftigen Veränderung des gemessenen pH-Wertes.

4.1.3.2 Vergleich der fed-batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor und Rührkesselreaktor

In vorherigen Arbeiten wurden bereits fed-batch-Prozesse im Rührkesselreaktor durchgeführt [43]. Die Literaturwerte aus dem Rührkesselreaktor werden im Folgenden mit den Werten im Einweg-Beutel-Reaktor verglichen. Für den Vergleich werden die Ergebnisse der fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor mit angepasster feed-Lösung (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17) verwendet.

Die fed-batch-Kultivierung im Rührkesselreaktor wurde ebenfalls mit einem feed-Programm (Neu-ork, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover,

4. Experimentelle Arbeiten

Vorgängerversion des ORK Feeder 1000) gesteuert. Während der fed-batch-Phase konnte die angestrebte Wachstumsrate im Rührkesselreaktor nahezu auf dem angestrebten Wert von 0,3 /h gehalten werden [43]. Die Glucosekonzentration lag dauerhaft bei etwa 0,1 g/L, sodass es zu keiner Acetatbildung kam [43]. Insgesamt wurden während des Prozesses 2 L feed-Lösung (Glucosekonzentration: 200 g/L) im 10 L-Maßstab zugegeben [43]. Die Messwerte der Kultivierungen in den unterschiedlichen Systemen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Vergleich der fed-batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor und Rührkesselreaktor im 10 L-Maßstab. Die Messwerte für den Rührkesselreaktor beruhen auf Literaturwerten [43] und die Messwerte für den Einweg-Beutel-Reaktor auf den Ergebnissen der fed-batch-Kultivierung mit angepasster feed-Lösung.

| Messwert | Einweg-Beutel-Reaktor | Rührkesselreaktor [43] |
|---|--|--|
| Kulturzeit | 14 h | 13,6 h |
| Menge der feed-Lösung | 1,5 L | 2 L |
| Biotrockenmasse | 9,7 g/L | 18 g/L |
| μ_{\max} in der batch-Phase | 0,63 /h | 0,69 /h |
| μ_{\max} in der fed-batch-Phase | 0,11 /h | 0,28 /h |
| PolySia-Konzentration | 1,05 g/L | 1,30 g/L |
| Proteinkonzentration | 143 mg/L | 340 mg/L |
| $Y_{P/S}$ | 26,4 mg _{PolySia} /g _{Glucose} | 27,2 mg _{PolySia} /g _{Glucose} |
| $Y_{X/S}$ | 0,24 g _{BTM} /g _{Glucose} | 0,38 g _{BTM} /g _{Glucose} |
| $Y_{P/X}$ | 109,8 mg _{PolySia} /g _{BTM} | 72,2 mg _{PolySia} /g _{BTM} |

Durch das bessere Wachstumsverhalten der Bakterien in der fed-batch-Phase wurde im Rührkesselreaktor nahezu doppelt so viel Biomasse gebildet wie im Einweg-Beutel-Reaktor. Der Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat ($Y_{X/S}$) lag im

4. Experimentelle Arbeiten

Rührkesselreaktor bei $0,38 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ [43], während er im Einweg-Beutel-Reaktor $0,24 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ betrug. Trotz des geringeren Bakterienwachstums wurden im Einweg-Beutel-Reaktor ähnlich hohe PolySia-Konzentrationen im Kulturüberstand ($1,05 \text{ g/L}$) wie im Rührkesselreaktor ($1,30 \text{ g/L}$ [43]) erreicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Einweg-Beutel-Reaktor mit $109,8 \text{ mg}_{\text{PolySia}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ mehr Produkt pro Biomasse gebildet wurde als im Rührkesselreaktor ($72,2 \text{ mg}_{\text{PolySia}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ [43]). Dies zeigt, dass trotz des eingeschränkten Wachstums weiterhin PolySia von den Bakterien freigesetzt wurde und verhältnismäßig viel Produkt bei geringer Biomassekonzentration produziert werden konnte. Dies hat den Vorteil, dass durch die geringere Biomassekonzentration, verbunden mit der schonenderen welleninduzierten Durchmischung im Einweg-Beutel-Reaktor deutlich weniger Protein (143 mg/L) im Kulturüberstand zu finden war, als im Rührkesselreaktor (340 mg/L [43]). Während das Verhältnis von Protein zu PolySia im Rührkesselreaktor $0,26 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ betrug [43], lag das Verhältnis im Einweg-Beutel-Reaktor bei $0,14 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$, was eine spätere Aufarbeitung der PolySia aus dem Kulturüberstand erleichtert.

Insgesamt konnte mit dem gezeigten fed-batch-Prozess das Ziel einer erhöhten PolySia-Konzentration im Vergleich zum batch-Prozess erreicht werden. Die fed-batch-Kultivierung senkte zudem die Prozesskosten, da pro Einwegbeutel mehr Produkt hergestellt werden konnte. Die Fütterungsstrategie könnte jedoch weiter verbessert werden, um eine Akkumulation von Glucose während des Prozesses zu vermeiden, wodurch die Bildung von Acetat begünstigt wurde. Während das verwendete Programm die feed-Rate aus zuvor festgelegten Werten berechnete, wäre eine Regelung, die auf aktuellen Kultivierungsmesswerten beruht, optimal. Dies könnte zum Beispiel über eine Verbindung mit einem online-Glucosesensor oder über die Kopplung der feed-Rate an den Gelöstsauerstoffgehalt realisiert werden.

4. Experimentelle Arbeiten

4.1.4 Fazit zu den Kultivierungsarbeiten

Es konnte gezeigt werden, dass der Kultivierungsprozess zur PolySia-Herstellung aus dem Rührkesselreaktor in ein Einwegbioreaktorsystem übertragen werden konnte. Trotz der alternativen Durchmischungs- und Begasungsstrategie konnten vergleichbare Ergebnisse in Hinblick auf die Biomasse- und Produktausbeute erzielt werden. Zudem konnte sowohl im Rührkesselreaktor als auch im Einweg-Beutel-Reaktor eine Prozessaufskalierung aus dem 10 L-Maßstab auf bis zu 30 L Kulturvolumen durchgeführt werden. Durch einen fed-batch Prozess konnte die Produktausbeute im Einweg-Beutel-Reaktor um das 3,6-fache im Vergleich zum batch-Prozess gesteigert werden. Die Aufarbeitung der PolySia aus dem Kulturüberstand und die weitere Charakterisierung der hergestellten PolySia werden in den folgenden Kapiteln gezeigt.

4.2 Downstream Processing (DSP)

Nach dem Kultivierungsprozess wurde die hergestellte PolySia aus der Kulturbrühe isoliert. Dazu existieren verschiedene Prozessschritte, mit denen vor allem Proteinverunreinigungen effektiv abgetrennt werden können [43, 44, 50, 88]. Aufbauend auf den etablierten Protokollen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Aufarbeitungsprozess entwickelt, der neben Protein effizient weitere Verunreinigungen, wie DNA und Endotoxine entfernt, was für den medizinischen Einsatz unabdingbar ist. Der Aufarbeitungsprozess ist für den 10 L-Kultivierungsmaßstab im Einweg-Beutel-Reaktor gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

4.2.1 Reifeprozess

Der Einweg-Beutel-Reaktor ermöglicht eine einfache und sterile Lagerung nach dem Kultivierungsprozess. Dabei kann die Kulturbrühe direkt im Reaktorbeutel am gewünschten Ort gelagert werden. In dieser Arbeit wurde eine Lagerung der Kulturbrühe bei 8 °C für 17 h etabliert.

Nach der Lagerung lag die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand bei $332,6 \pm 36,3$ mg/L und die Proteinkonzentration bei $191,6 \pm 84,8$ mg/L. Durch die Lagerung konnte die PolySia-Konzentration im Kulturüberstand und damit die zur Aufarbeitung verfügbare PolySia um $\sim 10\%$ gesteigert werden. Die Gesamtkonzentration der PolySia blieb während der Lagerung unverändert, sodass keine PolySia neu gebildet wurde, sondern sich die vorhandene PolySia von der Zelloberfläche ablöste. Allerdings stieg auch die Proteinkonzentration im Überstand um $\sim 75\%$ an.

Neben der erhöhten verfügbaren Produktmenge für die weitere Aufarbeitung bot der Reifeprozess den Vorteil, dass der Kultivierungsprozess und die Zellabtrennung entkoppelt durchgeführt werden konnten. Insbesondere im universitären Bereich, in dem sich ein Herstellungsprozess im Schichtbetrieb schwierig gestaltet, erleichtert eine Entkopplung der Prozessschritte die Durchführbarkeit des Gesamtprozesses.

4.2.2 Zellabtrennung

Die Zellabtrennung kann auf unterschiedliche Weisen durchgeführt werden. In dem gezeigten Prozess wurden die Zellen nach dem Reifeprozess über kontinuierliche Zentrifugation entfernt. Neben kontinuierlicher Zentrifugation können auch Filtersysteme oder Separatoren zur Entfernung der Zellen eingesetzt werden. Für den späteren Prozess im Produktionsmaßstab bieten sich besonders

4. Experimentelle Arbeiten

Separatoren an, die jedoch erst ab etwa 100 – 200 L Kulturbrühe effektiv betrieben werden können.

Nach der kontinuierlichen Zentrifugation wies der Überstand eine Zusammensetzung von $\sim 0,6 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ auf. Wurde die Zellabtrennung direkt nach der Kultivierung ohne Reifeprozess durchgeführt, war der Proteinanteil mit $\sim 0,5 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ geringfügig niedriger.

4.2.3 Aufkonzentrierung der PolySia

Nach der Zellabtrennung wurden zunächst niedermolekulare Stoffe und Wasser abgetrennt, um das Flüssigvolumen für die weiteren Aufarbeitungsschritte zu reduzieren. Die Produktlösung wurde mittels Cross-flow Ultrafiltration (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) 40-fach aufkonzentriert (Endvolumen: 250 mL). Die verwendete Filterkassette hatte eine Membranausschlussgrenze von 10 kDa. Das verwendete System bietet durch austauschbare Schläuche und eine wechselbare Pumpeneinheit eine hohe Flexibilität und ist in GMP-Umgebungen anerkannt.

Das Konzentrat, das für die weitere Aufarbeitung verwendet wurde, hatte eine Zusammensetzung von $6.417 \pm 779 \text{ mg/L}$ PolySia und $2.539 \pm 783 \text{ mg/L}$ Protein (Verhältnis $\sim 0,4 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$). Neben Peptiden und kleinen Proteinen mit einer Größe unter 10 kDa, ging in diesem Aufarbeitungsschritt nahezu 50 % des Produktes verloren. Während PolySia mit einer Kettenlänge von über 35 DP durch die Membran zurückgehalten werden konnte, ging kurzkettige PolySia unter 35 DP im Permeatstrom verloren [88]. Außerdem wird die Membranausschlussgrenze für ideale, kugelförmige Moleküle angenommen, sodass teilweise auch größere, längliche Moleküle die Membran durchdringen können. Zudem ging Produkt durch das Totvolumen der Anlage und durch unspezifische Bindung an die Filterkassette

4. Experimentelle Arbeiten

verloren. Durch nachträgliches Spülen des Systems konnte die verbliebene PolySia aus dem System gewonnen werden, wobei dadurch das Volumen für die folgenden Aufarbeitungsschritte wieder erhöht wurde.

4.2.4 Einfache und effiziente Entfernung von Proteinen

Die während der Kultivierung freigesetzten Host Cell Proteine (HCP) wurden durch eine Kombination aus einer Fällung mit Ethanol und Adsorption an Tonmineralien entfernt.

Das Konzentrat der Cross-flow Ultrafiltration wurde zunächst in drei Schritten mit Ethanol ausgefällt und das Präzipitat zwischen den Fällungsschritten wieder in Wasser gelöst. Dabei fand sich der Großteil der PolySia im Präzipitat wieder, während ein Teil des Proteins im Überstand verblieb. Neben sich verändernden Ethanolkonzentrationen in den aufeinanderfolgenden Fällungsschritten (Erhöhung von 80 % v/v auf 90 % v/v) wurden unterschiedliche Zentrifugationszeiten getestet. Bei sich verändernden Ethanolkonzentrationen lag der Produktverlust bei 22 % [40], wohingegen durch längere Zentrifugationszeiten bei gleichbleibender Ethanolkonzentration von 80 % v/v der Produktverlust auf unter 10 % reduziert werden konnte. Durch die Ethanolfällung konnte das Verhältnis von Protein zu PolySia auf $\sim 0,3 \text{ g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ reduziert werden.

Um die verbliebende Proteinmenge zu entfernen, wurden Tonmineralien eingesetzt (EX M 1753, Clariant AG). Das Calciumbentonit hat eine Vielzahl potentieller Anwendungsgebiete z.B. als Adsorptionsmittel, Füllmittel oder als Katzenstreu. In dem gezeigten Prozess wurde die Eigenschaft der unspezifischen Proteinadsorption genutzt. Die Herstellerangaben für die durchschnittliche Zusammensetzung des Tonminerals nach zweistündiger Trocknung bei 110 °C

4. Experimentelle Arbeiten

sind in Tabelle 5 gezeigt. Da es sich bei dem Tonmineral um ein Naturprodukt handelt, kommt es zu chargenbedingten Schwankungen bei der Zusammensetzung.

Tabelle 5: Herstellerangaben für die durchschnittliche Zusammensetzung von EX M 1753.

| Bestandteil | Anteil |
|--|---------------|
| Siliciumdioxid (SiO₂) | 56,9 % |
| Magnesiumoxid (MgO) | 22,7 % |
| Aluminiumoxid (Al₂O₃) | 6,7 % |
| Eisen(III)-oxid (Fe₂O₃) | 2,3 % |
| Kaliumoxid (K₂O) | 1,4 % |
| Calciumoxid (CaO) | 1,0 % |
| Titan(IV)-oxid (TiO₂) | 0,6 % |
| Natriumoxid (Na₂O) | 0,4 % |
| Verlust bei der Trocknung | 7,7 % |

Durch die Behandlung mit Tonmineralien konnte das verbliebene Restprotein nahezu komplett entfernt werden. Die Restmenge an Protein lag unter 0,05 g_{Protein}/g_{PolySia}. Andere Kontaminanten waren noch nachweisbar, wie eine Restmenge an DNA in einer Größenordnung von 5,5 ± 0,5 mg_{DNA}/g_{PolySia} (photometrische Bestimmung, siehe Kapitel 6.1.2.4.2 DNA-Analytik) und eine verbliebene Endotoxinbelastung von > 1.000 EU/mg (LAL-Test, siehe Kapitel 6.1.2.4.3 Bestimmung der Endotoxinkonzentration). Im Anschluss konnte das Produkt dialysiert und gefriergetrocknet werden und ist für viele Anwendungen, wie z.B. Modifizierung von Oberflächen oder im Tissue Engineering einsetzbar. Für die Anwendung als potentiellies Arzneimittel ist es jedoch zwingend erforderlich den DNA- und Endotoxingehalt weiter zu senken.

4.2.5 Entfernung von Endotoxinen und DNA-Rückständen

Endotoxine sind negativ geladene, komplexe Lipopolysaccharide (LPS). Sie sind Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, wie *E. coli* K1. Bereits geringe Endotoxinkonzentrationen von 1 ng/(kg*h), bezogen auf das Körpergewicht, können beim Menschen ernstzunehmende negative Effekte auf die Gesundheit auslösen [98–100]. Die Beeinträchtigungen können von Fieber bis hin zu einem lebensbedrohlichen Schock reichen. Für die Entfernung der verbliebenen Verunreinigungen in der PolySia nach Proteinentfernung wurden unterschiedliche Methoden getestet.

Zum einen wurde die Probelösung zunächst mit Natriumhydroxid (NaOH) bei einem pH-Wert von pH=13 inkubiert und anschließend über Membranadsorber (Anionenaustauscher) weiterbehandelt (detaillierte Beschreibung in den Kapiteln 4.2.5.1 Natriumhydroxidbehandlung und 4.2.5.2 Membranadsorberbehandlung).

Zum anderen wurden als produktschonendere Methode bei physiologischem pH-Wert Affinitätssäulen mit spezifischen Liganden für die Endotoxinentfernung verwendet. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Säulen verschiedener Hersteller getestet (detaillierte Beschreibung in Kapitel 4.2.5.3 Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen).

4.2.5.1 Natriumhydroxidbehandlung

Natriumhydroxid (NaOH) wird für verschiedene Reinigungsprozesse verwendet und eignet sich für die Entfernung von Endotoxinen und anderen Verunreinigungen. Für Produkte aus *E. coli* sind z.B. Prozesse zur Abreicherung von Endotoxin aus Polyhydroxybuttersäure oder PolySia bekannt [101–103].

4. Experimentelle Arbeiten

Die Behandlung mit NaOH erfolgte bei pH=13 für 18 h. Anschließend wurde die Lösung auf pH=7,4 neutralisiert und filtriert. Durch die Behandlung mit NaOH konnte kein Produktverlust festgestellt werden und auch die maximale Kettenlänge und die Kettenlängenverteilung wurden nicht beeinflusst (siehe Kapitel 4.3.2.1 Kettenlängenbestimmungen). Ein Vergleich von Kernresonanzspektren (NMR) zeigte keine erkennbaren Unterschiede zwischen mit NaOH-behandelter und unbehandelter PolySia wie in Kapitel 4.3.2.2 NMR-Untersuchungen dargestellt.

4.2.5.2 Membranadsorberbehandlung

Die verbliebenen Verunreinigungsfragmente (z.B. Endotoxinfragmente) sollten im Anschluss an die NaOH-Behandlung mit Hilfe von single-use Membranadsorbern entfernt werden. Dazu wurden Membranen mit quaternären Ammoniumliganden verwendet, welche die negativ geladene PolySia adsorbieren können, während die Verunreinigungsfragmente nicht gebunden werden. Die Membranadsorber (Sartobind® Q, Sartorius Stedim Biotech GmbH) wurden zunächst in einem FPLC-System evaluiert und anschließend an den Maßstab des Produktionsprozesses angepasst.

4.2.5.2.1 Evaluation der Membranadsorber

Die Evaluation der Membranadsorber erfolgte im FPLC-System mit Sartobind® Q 75-Modulen (Membranfläche: 75 cm², Säulenvolumen (CV): 2,1 mL). Getestet wurden das Elutionsverhalten langkettiger PolySia (maximale Kettenlänge: 90 – 100 DP) und die maximale dynamische Bindungskapazität der Adsorbermodule.

4. Experimentelle Arbeiten

Die maximale dynamische Bindungskapazität für langkettige PolySia betrug $0,25 \pm 0,03 \text{ mg/cm}^2$. Zur Bestimmung wurden die Module mit PolySia überladen und nach einem Waschschrift die adsorbierte PolySia-Menge ermittelt. Die gebundene PolySia wurde über einen linearen Salzgradienten (1 M NaCl) eluiert und die Proben fraktioniert gesammelt. Das Elutionsverhalten ist in Abbildung 18 gezeigt. Nach der Beladung wurde der Membranadsorber mit geringer Salzkonzentration gewaschen, um nicht gebundene PolySia und unerwünschte Verunreinigungen (z.B. Endotoxinfragmente) zu entfernen. Anschließend wurde die an den Anionenaustauscher gebundene PolySia über einen linearen Natriumchloridgradienten eluiert. Die Elution der PolySia erfolgte zwischen 0,1 M und 0,75 M NaCl. Daraufhin wurde der Membranadsorber mit 1 M NaCl gewaschen, wobei keine weitere Elution von PolySia stattfand. PolySia, die vor der Membranadsorberbehandlung nicht mit NaOH behandelt wurde, zeigte keine Unterschiede hinsichtlich des Bindungs- und Elutionsverhaltens.

4. Experimentelle Arbeiten

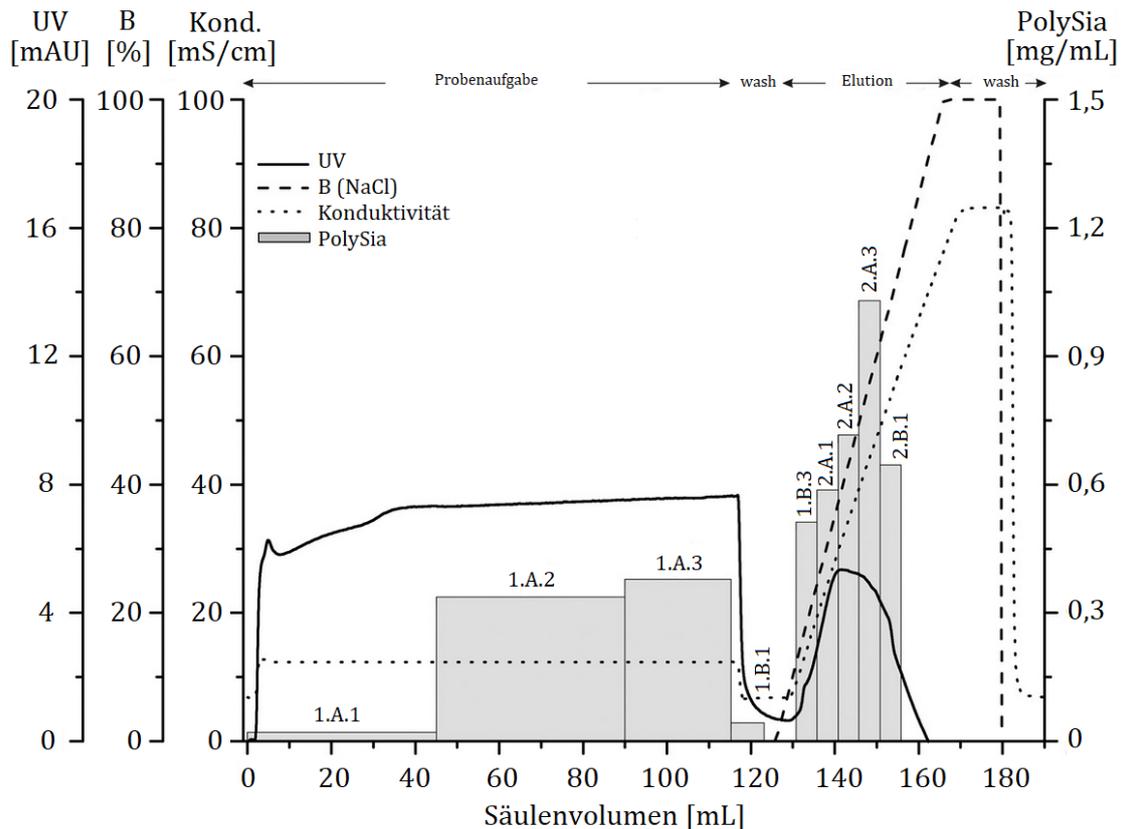


Abbildung 18: Evaluation der Membranadsorber in einem FPLC-System. Die Beladungsfractionen (1.A.1 – 1.A.3) zeigten eine steigende PolySia-Konzentration, nachdem die maximale dynamische Bindungskapazität erreicht war. Nach der Beladung und einem Waschschriff wurde die PolySia mit ansteigender NaCl-Konzentration (B) eluiert. Die Konduktivität stieg verbunden mit der erhöhten NaCl-Konzentration an. Die Elution erfolgte zwischen 0,1 M und 0,75 M NaCl. Das UV-Signal zeigte nur eine geringe Intensität, nachdem die Proteine bereits in den vorherigen Aufarbeitungsschritten entfernt worden waren.

4.2.5.2.2 Upscale der Aufreinigung mittels Membranadsorber

Nach der Evaluation der Membranadsorber für die Aufreinigung von PolySia wurde die Modulgröße an den Produktionsmaßstab angepasst. Für die Aufreinigung im Produktionsmaßstab wurden Sartobind® Q 75 mL-Module (Membranfläche: 2.700 cm², CV: 75 mL) verwendet. Verglichen mit der Evaluation, bei der die Elution mit einem linearen Gradienten durchgeführt wurde, fand im

4. Experimentelle Arbeiten

Produktionsmaßstab eine isokratische Elution der gebundenen PolySia mit 0,75 M NaCl statt, da bereits bei einer Salzkonzentration von 0,75 M NaCl die gesamte PolySia eluiert wurde und keine Fraktionierung nötig war.

Die Beladung im Produktionsmaßstab erfolgte nach der Equilibrierung mit maximal 600 mg langkettiger PolySia pro Durchlauf. Durch Einhalten der maximalen dynamischen Bindungskapazität der Module und zyklischem Beladen und Eluieren konnte kein signifikanter Produktverlust beobachtet werden. Der Endotoxingehalt der PolySia nach NaOH-Behandlung und Aufreinigung mittels Membranadsorbern lag bei < 3 EU/mg. Detaillierte Angaben und ein Vergleich zu den weiteren Verfahren sind in Kapitel 4.3.1.3 Endotoxinanalytik gezeigt.

4.2.5.3 Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen

Die Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen bot im Vergleich zur NaOH-Behandlung den Vorteil, dass die PolySia nicht bei hohen basischen pH-Werten behandelt werden musste. Die Säulen besitzen spezielle Liganden, die Endotoxine hochspezifisch binden. Es wurden zwei unterschiedliche Säulentypen getestet.

Die eingesetzten EndoTrap® HD-Säulen (Hyglos GmbH) besitzen einen LPS-spezifischen Bakteriophagen-Liganden, der keine zytotoxischen Effekte zeigt. Der Ligand der Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Column (Thermo Fisher Scientific) besteht aus modifiziertem ϵ -poly-L-Lysin.

Der Wirkmechanismus beider Systeme beruht auf der Bindung der Endotoxine an den Liganden. Neben der Endotoxinanreicherung wurde eine unspezifische Bindung der PolySia an die Liganden überprüft. Die eingesetzte Probenmenge wurde an die LPS-Bindekapazität der Affinitätssäule angepasst. Die LPS-Bindekapazität liegt bei den EndoTrap® HD-Säulen bei maximal 5.000.000 EU/mL

4. Experimentelle Arbeiten

Gel und bei der Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Column bei 2.000.000 EU/mL Gel. Das Gelvolumen liegt bei beiden Säulen bei 1 mL.

Vor der Probenaufgabe lag der Endotoxingehalt in den Proben zwischen 5.000 und 10.000 EU/mg. Mit den EndoTrap® HD-Säulen konnte der Endotoxingehalt in den Proben auf bis zu < 10 EU/mg reduziert werden. Auch mit der Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Column konnte der Endotoxingehalt reduziert werden, lag mit ~ 2.000 EU/mg jedoch nach der Behandlung noch deutlich höher. Die Probenwiederfindung für langkettige PolySia lag nach der Behandlung in beiden Systemen bei über 80 %. Die Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen könnte durch Anpassung des Probenpuffers oder wiederholte Anwendung der Affinitätssäulen optimiert werden. Durch die begrenzte Bindekapazität der Affinitätssäulen eignen sich die Systeme jedoch vor allem für das Polishing kleinerer Mengen an PolySia.

4.2.6 Entsalzung und Trocknung

Die im Prozess eingetragenen Salze wurden mittels Dialyse entfernt. Während der Dialyse mit einer Porengröße von 14 kDa ging 3 % der PolySia verloren.

Im finalen Produktionsschritt wurde die PolySia gefriergetrocknet. Durch die Trocknung konnte die Lagerstabilität der PolySia im Vergleich zum gelösten Zustand erhöht werden (siehe Kapitel 4.4.2 Stabilität aufgereinigter PolySia).

4.2.7 Zusammenfassung Downstream Processing

Durch den gezeigten Aufarbeitungsprozess konnte reine PolySia aus der Kulturbrühe gewonnen werden. Neben der entwickelten einfachen, und im

4. Experimentelle Arbeiten

Gegensatz zu vorherigen Prozessen zeitsparenden Proteinentfernung [43, 44, 50, 88], wurde das Downstream Processing um einen Reifeprozess und eine effektive Endotoxinentfernung erweitert. Ein Überblick mit den einzelnen Prozessschritten ist in Abbildung 19 dargestellt. Durch eine NaOH-Behandlung, die für die Endotoxinentfernung von in *E. coli* hergestellten Produkten wie Polyhydroxybuttersäure [101, 103] aber auch PolySia [102] beschrieben ist, konnte die Reinheit der hergestellten PolySia verbessert werden. Als produktschonendere Variante bei neutralem pH-Wert wurden Affinitätssäulen getestet, die eine Endotoxinentfernung ermöglichen, jedoch vornehmlich für das Polishing geringer PolySia-Mengen geeignet sind.

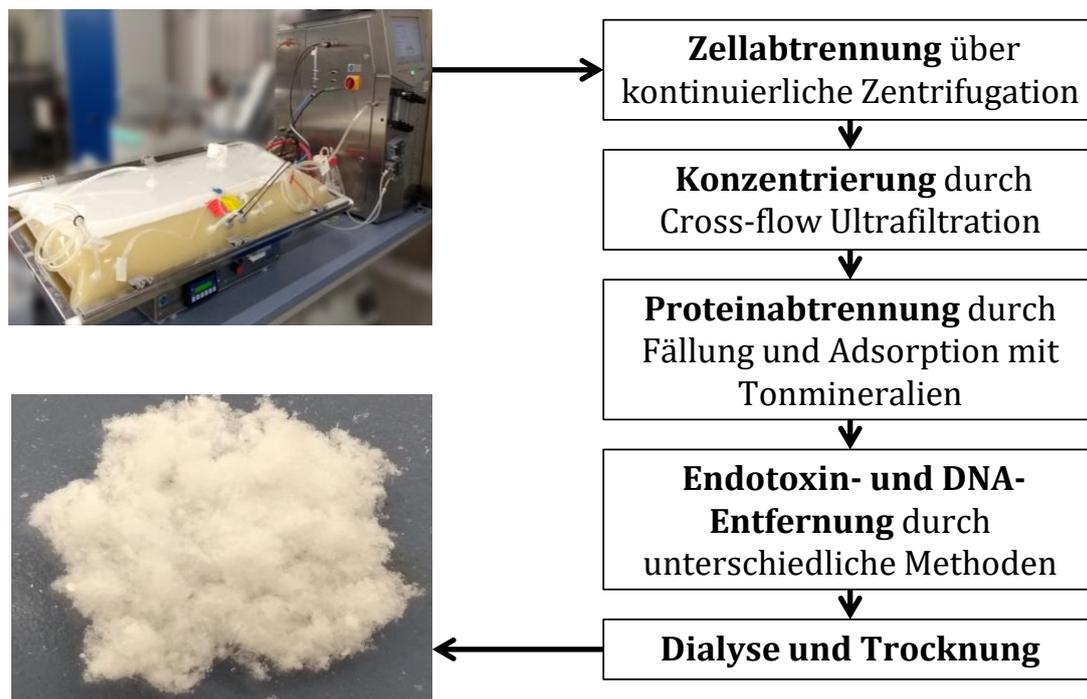


Abbildung 19: Zusammenfassung des Aufarbeitungsprozesses für PolySia.

4. Experimentelle Arbeiten

Die Ausbeute des gezeigten Prozesses mit NaOH-Behandlung und dem Einsatz von Membranadsorbentien zur Endotoxin- und DNA-Entfernung betrug $29 \pm 7\%$. Aus einer batch-Kultivierung im 10 L-Maßstab konnten entsprechend etwa 1 g langkettige PolySia gewonnen werden. In Abbildung 20 sind die Produktverluste und die Proteinanreicherung über den Gesamtprozess gezeigt. Nahezu 50 % der PolySia ging bei der Aufkonzentrierung mittels Cross-flow Ultrafiltration verloren. Am Ende des Aufarbeitungsprozesses war kein Protein mehr nachweisbar und der Endotoxingehalt lag bei unter 3 EU/mg. Die PolySia konnte als Feststoff gewonnen und im Anschluss an das Downstream Processing für den gewünschten Anwendungsbereich verwendet werden.

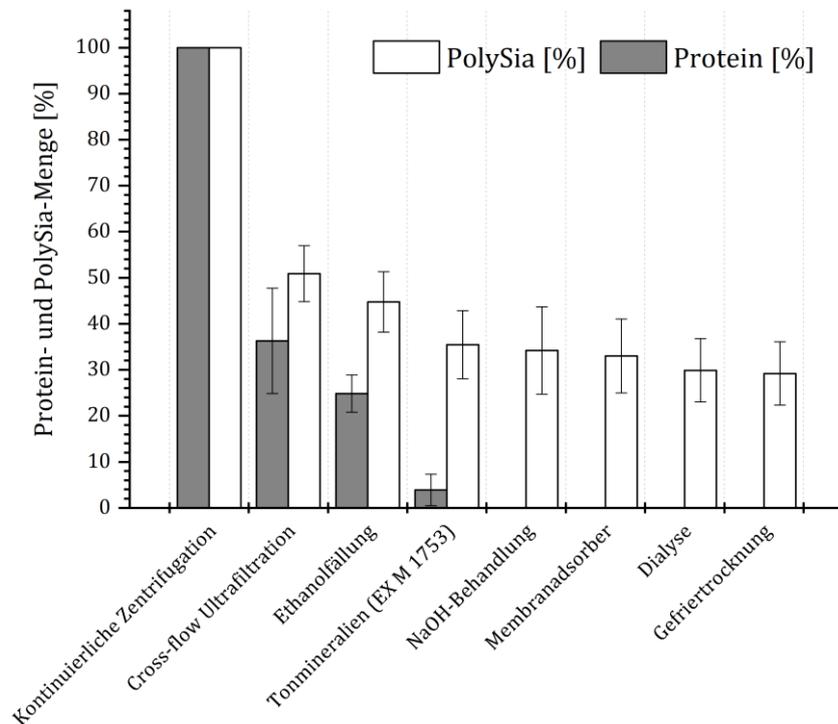


Abbildung 20: Ausbeuten der einzelnen Verfahrensschritte. Die Proteinmenge konnte über den Gesamtprozess effektiv reduziert werden. Nach dem Downstream Processing war kein Protein mehr nachweisbar und der Endotoxingehalt lag nach NaOH-Behandlung und dem Einsatz von Membranadsorbentien bei unter 3 EU/mg. Die Ausbeute des Aufarbeitungsprozesses lag bei $29 \pm 7\%$.

4. Experimentelle Arbeiten

Die hergestellte PolySia wird im folgenden Abschnitt ausführlich charakterisiert und mit kommerziell erhältlichen Produkten verglichen. Neben den Tests auf Verunreinigungen wurden der Polymerisationsgrad und ein möglicher Einfluss der NaOH-Behandlung auf die Produktstabilität untersucht.

4.3 Produktanalytik

Je nach Anwendungsgebiet sind unterschiedliche Merkmale der hergestellten PolySia entscheidend. PolySia kann im Tissue Engineering als Beschichtungsmaterial von Scaffolds eingesetzt werden. In diesem Fall sind besonders langkettige Polymere erwünscht und keine festen Grenzwerte für die Produktreinheit vorgeschrieben. Soll das hergestellte Material als Arzneimittel oder Medizinprodukt eingesetzt werden, ist, neben einem Herstellungsprozess gemäß den GMP-Richtlinien, eine hohe Produktreinheit vorgeschrieben.

Im Folgenden werden zunächst die Produktreinheit nach der Kultivierung und Aufarbeitung und anschließend die Produktmerkmale beschrieben. Dabei wird das hergestellte Material mit kommerziell verfügbaren Materialien (Sigma-Aldrich: Lot # SLBN1154 V; Carbosynth: Batch Number OC112981503) verglichen und der Einfluss unterschiedlicher Herstellungsbedingungen diskutiert.

4.3.1 Produktreinheit

PolySia ist ein interessantes Polymer für unterschiedliche medizinische Anwendungen (siehe Kapitel 3.2.3 Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin). Für medizinische Anwendungen ist eine hohe Produktreinheit Voraussetzung. Während des Herstellungsprozesses wurden Host Cell Proteine, DNA und

4. Experimentelle Arbeiten

Endotoxine von den Bakterien freigesetzt, die im Downstream Processing entfernt werden mussten. Neben den genannten Verunreinigungen wurde das Endprodukt auf Metallionenbelastung untersucht. Metallionen könnten unter anderem durch die während der Aufreinigungen verwendeten Tonminerale eingetragen worden sein (genaue Beschreibung in Kapitel 4.3.1.4 Metallionenanalyse).

4.3.1.1 Proteinanalytik

Im Endprodukt konnte mit den durchgeführten Methoden (photometrische Messung bei 280 nm und Bradford-Assay) bei einer Produktkonzentration von 10 g/L kein Protein nachgewiesen werden. Der Proteingehalt war unabhängig von der Kultivierungsmethode (batch oder fed-batch) und dem Reaktortyp (STR oder Einweg-Beutel-Reaktor). Auch der eingeführte Lagerungsprozess, der im Einweg-Beutel-Reaktor zu einem Anstieg der Proteinkonzentration in der Kulturbrühe führte, hatte keinen Einfluss auf den Proteingehalt des Endproduktes.

Vergleichend zu dem hergestellten Material zeigten auch die kommerziell erhältlichen Materialien keine nachweisbare Proteinbelastung.

4.3.1.2 DNA-Rückstände

Der DNA-Gehalt lag im Endprodukt bei $< 0,5 \text{ mg}_{\text{DNA}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ (photometrische Bestimmung). Bei den kommerziellen Produkten lag der DNA-Gehalt mit $< 0,8 \text{ mg}_{\text{DNA}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ etwas höher.

Aufgrund der Fehleranfälligkeit der photometrischen Methode wurde die DNA-Analytik erweitert. Dazu wurde eventuell vorhandene DNA zunächst mittels PCR

4. Experimentelle Arbeiten

vervielfacht und anschließend mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Als Positivkontrollen wurden die DNA von *E. coli* K12, der Kulturüberstand nach einer *E. coli* K1-Kultivierung und der Überstand nach Zellaufschluss von *E. coli* K1 verwendet. Als Negativkontrolle diente Wasser. Die Amplifizierung erfolgte über 40 Zyklen, dabei wurde die 16S rRNA im Bereich von 1.105 – 1.522 bp (418 bp) amplifiziert. Im Anschluss wurde die DNA mittels Gelelektrophorese getrennt und die Banden gefärbt (siehe Abbildung 21).

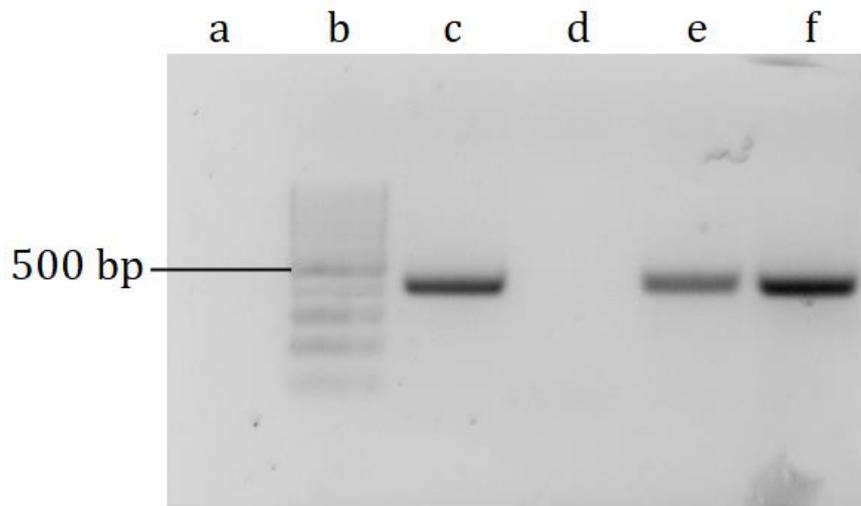


Abbildung 21: Agarosegel zur *E. coli*-DNA-Bestimmung nach Polymerase-Kettenreaktion. Im Endprodukt nach der Aufreinigung (d) und im Wasser (a) konnte keine DNA nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen, DNA von *E. coli* K12 (c), Kulturüberstand (e) und der Überstand von *E. coli* K1 nach Zellaufschluss (f) zeigten einen DNA-Gehalt. Die nachgewiesene DNA hatte eine Größe von ~ 400 bp, erkennbar anhand des Markers (b). Die Größe lag damit im erwarteten Bereich von 418 bp.

Die Positivkontrollen zeigten, dass die verwendete Methode zum Nachweis von *E. coli*-DNA geeignet ist. Am Ende der Kultivierung ließ sich DNA im

4. Experimentelle Arbeiten

Kulturüberstand nachweisen. Nach dem Zellaufschluss wurde die Intensität der Bande durch die freigesetzte DNA verstärkt. Die detektierte DNA hatte mit etwa 400 bp die erwartete Größe (418 bp). In der Negativkontrolle (Wasser) und dem Endprodukt nach dem Aufarbeitungsprozess konnten trotz der hohen Zyklenanzahl bei der PCR keine DNA-Rückstände nachgewiesen werden.

Die DNA-Analytik mittels PCR und Gelelektrophorese stellt eine verlässliche Alternative zur fehlerbehafteten photometrischen DNA-Bestimmung dar. Gerade in niedrigen Konzentrationsbereichen kam es bei der photometrischen Methode zu großen Messschwankungen. Lag die gemessene DNA-Konzentration bei der photometrischen Bestimmung unterhalb von $0,5 \text{ mg}_{\text{DNA}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$ konnte davon ausgegangen werden, dass auch mit der sensitiven PCR und Gelelektrophorese keine DNA mehr nachgewiesen werden konnte.

4.3.1.3 Endotoxinanalytik

E. coli K1 ist ein gram-negatives Bakterium und bildet Endotoxine. Endotoxine sind Lipopolysaccharide der äußeren Zellwand und müssen für einen medizinischen Einsatz zwingend aus dem Produkt entfernt werden, da sie beim Menschen ernstzunehmende Immunreaktionen auslösen können. Bezogen auf das Körpergewicht der Person liegt die durch die Food and Drug Administration (FDA) festgelegte maximal erlaubte Endotoxinkonzentration für die meisten Arzneimittel bei $5 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ [104]. Für intrathekal injizierte Medikamente gelten mit $0,2 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ strengere Richtlinien, da sie direkt in den Liquorraum injiziert werden [105].

Nach der Kultivierung lag die Endotoxinkonzentration im Kulturüberstand bei über $2 \cdot 10^7 \text{ EU}/\text{mg}_{\text{PolySia}}$. Durch den Aufarbeitungsprozess mit NaOH-Behandlung und dem Einsatz von Membranadsorbentien konnte die Endotoxinkonzentration im

4. Experimentelle Arbeiten

Endprodukt auf unter 3 EU/mg_{PolySia} reduziert werden. Die produktschonendere Endotoxinabreicherung bei neutralen pH-Werten mit Affinitätsäulen ergab eine Endotoxinkonzentration im Endprodukt zwischen < 10 EU/mg_{PolySia} bis ~ 2.000 EU/mg_{PolySia}. In den kommerziellen Produkten lag der Endotoxingehalt mit > 50.000 EU/mg_{PolySia} deutlich höher. Die Endotoxinkonzentration wurde auf Basis des Limulustests (LAL-Test) bestimmt, der auf dem Gerinnungseffekt des Blutes von Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) in Anwesenheit von Endotoxinen beruht.

4.3.1.4 Metallionenanalyse

Die Bestimmung von Elementverunreinigungen im Produkt wurde mittels optischer Emissionsspektrometrie (ICP-OES) durchgeführt. Die Proben wurden als Auftragsmessung bei der SGS Institut Fresenius GmbH vermessen.

Neben den Metallionen im Endprodukt wurden die Metallionen, die während der Tonmineralienbehandlung freigesetzt wurden, bestimmt (siehe Kapitel 4.2.4 Einfache und effiziente Entfernung von Proteinen). Die Bestimmung erfolgte für die Metallionen folgender Elemente: Al, Li, Na, Mg, K, Ca, Fe und Cu. Eine Zusammenfassung der Messergebnisse ist in Tabelle 6 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

Tabelle 6: Verunreinigungen durch Metallionen in den Proben.

| Kation | Puffer | Tonminerale | Endprodukt | Bestimmungsgrenze |
|---------------------|------------|-------------|------------|-------------------|
| Al ³⁺ | < 0,1 mg/L | 0,3 mg/L | 1,0 mg/L | 0,1 mg/L |
| Li ⁺ | < 0,5 mg/L | < 0,5 mg/L | < 0,5 mg/L | 0,5 mg/L |
| Na ⁺ | 1.070 mg/L | 964 mg/L | 54 mg/L | 0,5 mg/L |
| Mg ²⁺ | < 0,1 mg/L | 59 mg/L | < 0,1 mg/L | 0,1 mg/L |
| K ⁺ | < 5,0 mg/L | 21 mg/L | < 5,0 mg/L | 5,0 mg/L |
| Ca ²⁺ | < 1,0 mg/L | 17 mg/L | 3,0 mg/L | 1,0 mg/L |
| Fe ^{2+/3+} | < 0,1 mg/L | < 0,1 mg/L | < 0,1 mg/L | 0,1 mg/L |
| Cu ^{+ /2+} | < 0,1 mg/L | < 0,1 mg/L | < 0,1 mg/L | 0,1 mg/L |

Durch die Tonminerale wurden geringe Mengen an Aluminiumionen (0,005 mg/g_{Tonminerale}), Magnesiumionen (0,89 mg/g_{Tonminerale}), Kaliumionen (0,32 mg/g_{Tonminerale}) und Calciumionen (0,26 mg/g_{Tonminerale}) freigesetzt. Die Inkubationszeit und der Puffer (200 mL Natriumphosphatpuffer und 400 mL Wasser) wurden vergleichend zu den Prozessbedingungen gewählt.

Nach der Aufreinigung waren im Endprodukt nur noch geringe Mengen an Aluminiumionen (1,0 mg/g_{PolySia} $\hat{=}$ 0,1 %) und Calciumionen (3,0 mg/g_{PolySia} $\hat{=}$ 0,3 %) nachweisbar. Der Hauptanteil an nachweisbaren Metallionen waren Natriumionen (54,0 mg/g_{PolySia} $\hat{=}$ 5,4 %), was zeigt, dass die PolySia nach dem Downstream Processing hauptsächlich als Natriumsalz gewonnen wurde.

Aufgrund der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte, wie z.B. spezifischen Produktbindungen und der Dialyse, konnten die Metallionen im Endprodukt angereichert werden. Neben den Tonmineralen wurden Metallionen unter anderem durch das Kulturmedium (z.B. Spurenelemente) oder Pufferlösungen in den Prozess eingetragen.

4. Experimentelle Arbeiten

4.3.2 Produktcharakterisierung

Neben der Produktreinheit ist der Polymerisationsgrad für den späteren Anwendungsbereich ausschlaggebend. Ziel dieser Arbeit war es hauptsächlich, PolySia als Ausgangssubstanz für medizinische Tests zu produzieren. Hierbei ist es wichtig, dass der Polymerisationsgrad der PolySia möglichst einheitlich ist und keinen großen Schwankungen unterliegt. Neben dem Polymerisationsgrad wurden NMR-Untersuchungen und optische Prüfungen durchgeführt, um das Produkt zu beschreiben sowie dessen Wasserlöslichkeit zu überprüfen.

4.3.2.1 Kettenlängenbestimmungen

Der Polymerisationsgrad der hergestellten PolySia wurde über eine HPLC-Methode (high performance liquid chromatography) und eine native Gelelektrophorese ermittelt. Während die PolySia bei der HPLC-Methode partiell hydrolysiert wurde, erfolgte die Bestimmung des Polymerisationsgrades mittels Gelelektrophorese ohne vorherige Hydrolyse.

4.3.2.1.1 HPLC-Bestimmung mit Fluoreszenzdetektion (DMB-HPLC)

Zur Bestimmung der Kettenlänge mittels HPLC wurde die PolySia mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid (DMB) markiert [106]. Die Reaktion fand unter sauren Bedingungen statt, durch die es zu einer partiellen Hydrolyse der PolySia kam. Durch den partiellen Zerfall konnten durch die Methode Monomere bis hin zu PolySia mit dem maximal vorhandenen Polymerisationsgrad nachgewiesen werden. Entsprechend konnte über die Anzahl der einzelnen Peaks die maximale Kettenlänge der PolySia

4. Experimentelle Arbeiten

bestimmt werden. Eine quantitative Bestimmung der Konzentration einzelner Polymerisationsgrade war mit dieser Methode nicht möglich [43, 50]. Die Markierungsreaktion mit DMB ist in Abbildung 22 gezeigt.

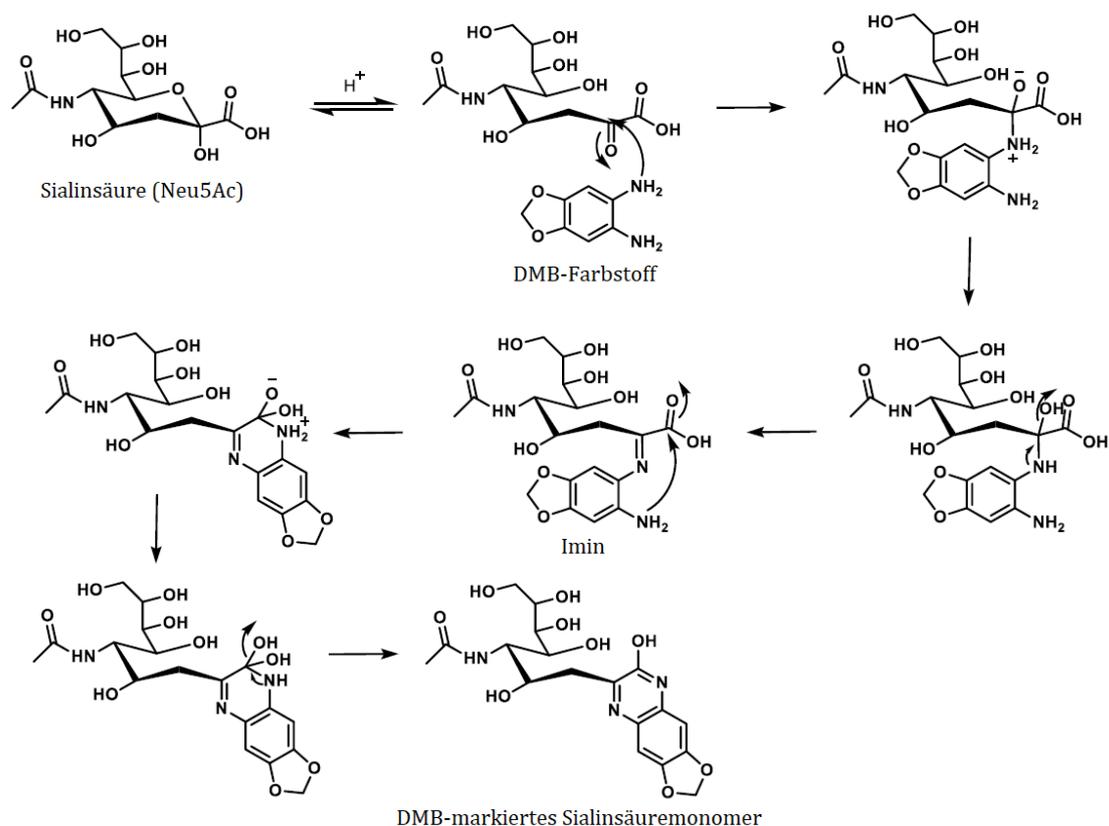


Abbildung 22: Fluoreszenzmarkierung eines Sialinsäuremonomers mit DMB nach [107].

Die maximale Kettenlänge der hergestellten PolySia betrug 90 – 100 DP. Die maximale Kettenlänge wurde nicht durch den verwendeten Bioreaktortyp oder die Kultivierungsstrategie (batch oder fed-batch) beeinflusst. Die bestimmte maximale Kettenlänge der PolySia ist mit dem Literaturwert für eine batch-Kultivierung im

4. Experimentelle Arbeiten

STR von bis zu 110 DP vergleichbar [43, 88]. Für eine fed-batch-Kultivierung wurden in vorherigen Arbeiten maximale Kettenlängen von bis zu 160 DP beschrieben, wobei der Prozess für die Herstellung möglichst langkettiger PolySia für den Einsatz im Tissue Engineering optimiert wurde [43]. Ein Vergleich der hergestellten PolySia mit kommerziell verfügbarer PolySia (Sigma-Aldrich) ist in Abbildung 23 gezeigt.

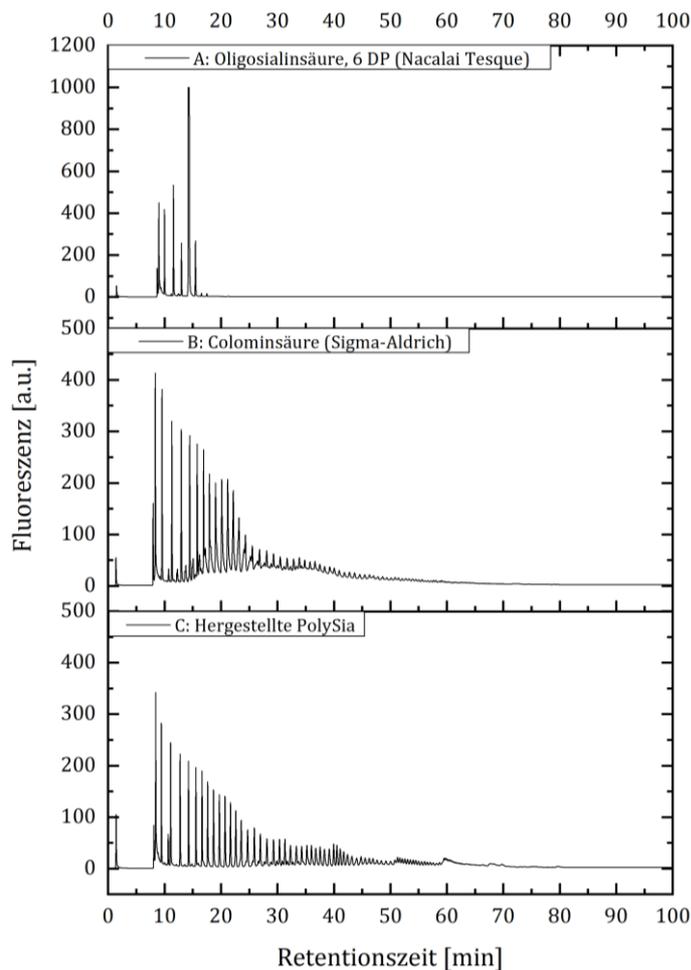


Abbildung 23: Kettenlängenbestimmung der PolySia und Vergleich. Die hergestellte PolySia (C) hatte eine maximale Kettenlänge von 90 – 100 DP, womit der Polymerisationsgrad über dem der kommerziell verfügbaren PolySia (~ 70 DP, B) lag. Oligosialinsäure (A) mit einer definierten Kettenlänge von 6 DP diente als Referenz.

4. Experimentelle Arbeiten

Im Vergleich zur kommerziellen PolySia hatte die hier hergestellte PolySia einen höheren Polymerisationsgrad. Zudem war der Anteil kurzkettiger PolySia in dem in dieser Arbeit hergestellten Produkt geringer als in der kommerziell verfügbaren PolySia, die vor allem zwischen 10 min und 25 min Retentionszeit hohe Fluoreszenzintensitäten zeigte. Die im Herstellungsprozess verwendete NaOH-Behandlung zur Endotoxinanreicherung (siehe Kapitel 4.2.5.1 Natriumhydroxidbehandlung) hatte weder einen Einfluss auf die maximale Kettenlänge der PolySia, noch auf die Intensität der einzelnen Peaks und damit auch nicht auf die Kettenlängenverteilung.

4.3.2.1.2 Native Gelelektrophorese

Alternativ zur DMB-HPLC wurde eine Größenbestimmung mit einer nativen Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Polymerisationsgrad läuft die PolySia unterschiedlich weit im elektrischen Feld und kann dadurch aufgetrennt werden. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das 18 %ige Tris-Glycin Gel mit Stains-All (Sigma-Aldrich) gefärbt.

Durch die native Gelelektrophorese konnte die Kettenlänge nicht exakt bestimmt werden, sie konnte allerdings durch die verwendeten Dextranmarker (Größe von 3 kDa und 7 kDa) eingeordnet werden. Ein Gelbild mit dem Vergleich zu kommerziell erhältlicher PolySia ist in Abbildung 24 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

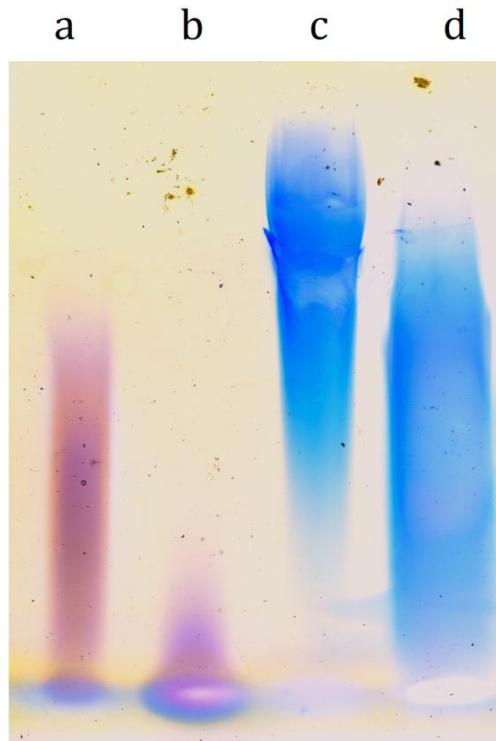


Abbildung 24: Native Gelelektrophorese von PolySia in einem 18 %igen Tris-Glycin Gel. Die hergestellte PolySia (c) zeigte im Vergleich zur kommerziell erhältlichen PolySia (Sigma-Aldrich, d) einen höheren Anteil langkettiger Polymere. Durch die Dextranmarker mit einer Größe von 7 kDa (a) und 3 kDa (b) konnte die Größe der PolySia eingeordnet werden. Während die hergestellte PolySia hauptsächlich eine Polymergröße von > 7 kDa besaß, lag die vorherrschende Polymergröße der kommerziellen PolySia bei ~ 7 kDa.

Die Auswertung der nativen Gelelektrophorese zeigt, dass die hergestellte im Vergleich zur kommerziell erhältlichen PolySia einen höheren Anteil langkettiger Polymere besaß. Die Größe der hergestellten PolySia lag dabei überwiegend bei über 7 kDa. Eine Größe von 7 kDa entspricht etwa 24 DP. Die Ergebnisse stimmen damit mit der in der DMB-HPLC ermittelten Aussage überein, dass der Hauptanteil der hergestellten PolySia langkettiger war, als der der kommerziell verfügbaren PolySia.

4. Experimentelle Arbeiten

4.3.2.2 NMR-Untersuchungen

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance) ist eine Methode zur Charakterisierung chemischer Moleküle. Die NMR-Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (Dr. Jörg Fohrer) durchgeführt.

Zur Charakterisierung wurden ^1H - und ^{13}C -Spektren von der hergestellten und kommerziellen PolySia aufgenommen. Zudem wurden Spektren mit NaOH-behandelter PolySia und unbehandelter PolySia aufgenommen und ein möglicher Effekt der Behandlung bei hohem basischen pH-Wert auf die Struktur der PolySia überprüft. Als Messsystem diente Ascend 400 MHz mit Avance III Konsole und Prody BBFO probe (Bruker Corporation). Die PolySia wurde in Deuteriumoxid (D_2O) gelöst.

4.3.2.2.1 ^1H -NMR-Untersuchung

Die Protonenspektren wurden mit einer Relaxationszeit von 2 s und einer Anzahl von 16.384 Punkten über eine spektrale Breite von 12 ppm aufgenommen. Die in Abbildung 25 gezeigten Spektren wurden ohne Wasserunterdrückung aufgezeichnet.

Die aufgenommenen Spektren waren nahezu identisch. Bei einer chemischen Verschiebung von 1 ppm trat im Spektrum der nicht mit NaOH-behandelten und kommerziellen PolySia ein Signal auf, das auf geringe Verunreinigungen (z.B. Acetrückstände) schließen lässt. In den Protonenspektren war keine strukturelle Veränderung der PolySia durch die NaOH-Behandlung zu erkennen. Die Methylgruppe der hergestellten und kommerziellen PolySia konnte bei einer chemischen Verschiebung von 2 ppm in den Proben nachgewiesen werden.

4. Experimentelle Arbeiten

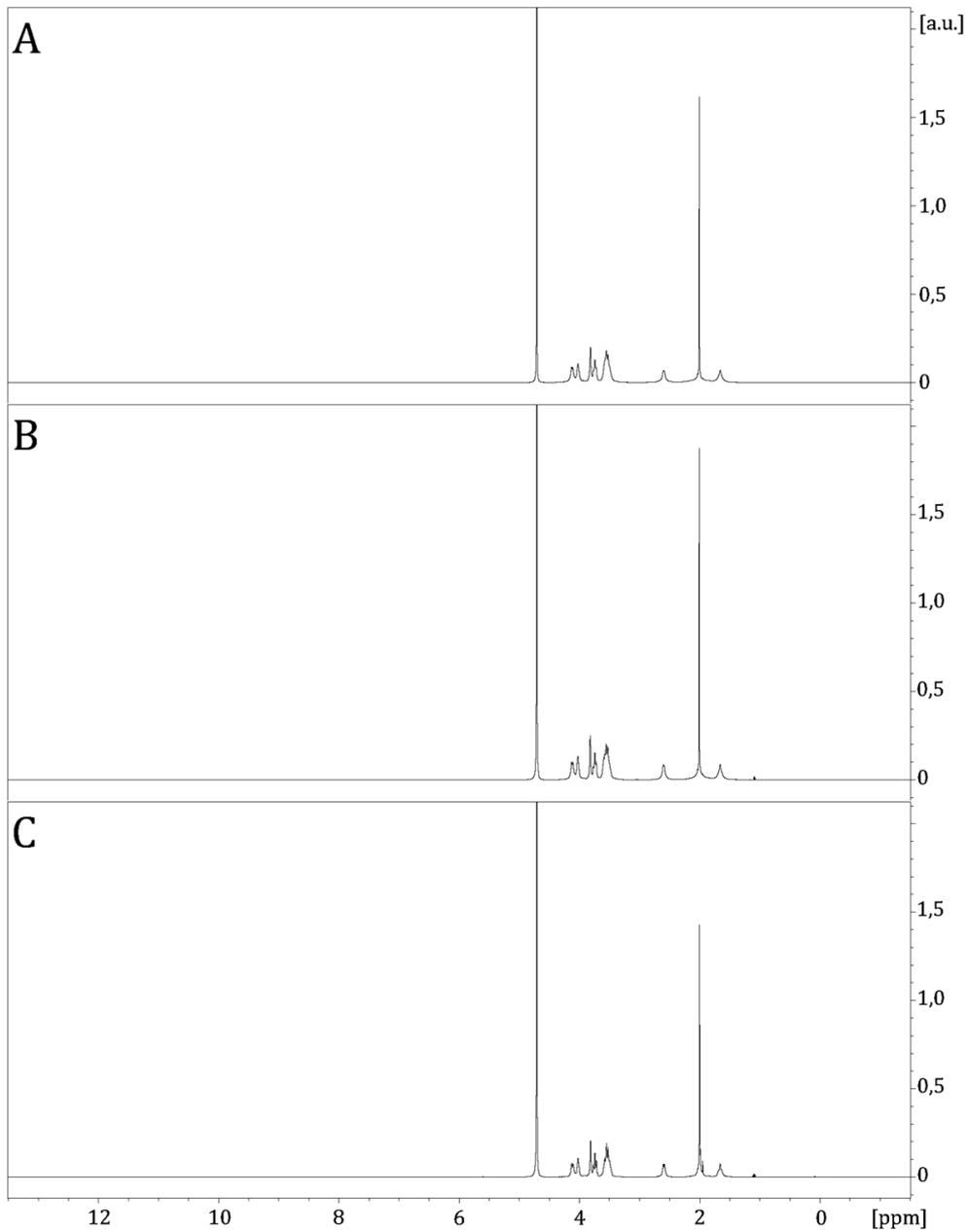


Abbildung 25: ^1H -Spektren von der hergestellten und kommerziell erhältlichen PolySia. Die Spektren der hergestellten PolySia nach Endotoxinentfernung mittels NaOH-Behandlung (A), ohne Endotoxinentfernung mit NaOH (B) und der kommerziellen PolySia von Sigma-Aldrich (C) waren nahezu identisch. Bei 1 ppm trat bei der nicht NaOH-behandelten PolySia und der kommerziellen PolySia ein Signal mit geringer Intensität auf, das auf eine Verunreinigung schließen lässt.

4.3.2.2.2 ^{13}C -NMR-Untersuchung

Die ^{13}C -Spektren wurden breitbandenkoppelt mit einer Relaxationszeit von 3 s und einer Anzahl von 65.536 Punkten über eine spektrale Breite von 251 ppm aufgenommen.

In den aufgenommenen Spektren waren die elf chemisch unterschiedlichen Kohlenstoffatome der PolySia identifizierbar. Während in der zur Endotoxinentfernung mit NaOH-behandelten PolySia und der kommerziellen PolySia elf Signale bei identischer chemischer Verschiebung auftraten, war bei der nicht mit NaOH-behandelten PolySia bei einer chemischen Verschiebung von 160 ppm ein weiteres Signal zu erkennen, was auf eine Verunreinigung hindeutet. Während die Signalintensität der hergestellten und kommerziellen PolySia aufgrund des unterschiedlichen Polymerisationsgrades nicht vergleichbar war, war die Signalintensität der einzelnen Peaks bei der mit NaOH-behandelten und unbehandelten PolySia, bis auf geringe chargenbedingte Schwankungen, identisch. Entsprechend konnte auch in den ^{13}C -Spektren kein Einfluss der zur Endotoxinabreicherung genutzten NaOH-Behandlung auf die chemische Struktur der PolySia beobachtet werden. Die beiden Carbonylgruppen der hergestellten und kommerziellen PolySia konnten bei einer chemischen Verschiebung von 173 ppm und 175 ppm nachgewiesen werden. Eine genaue Zuordnung zu der entsprechenden Carbonylgruppe war aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebung nicht möglich. Die Methylgruppe der hergestellten und kommerziellen PolySia wurde bei einer chemischen Verschiebung von 22 ppm nachgewiesen. Die aufgenommenen ^{13}C -Spektren sind in Abbildung 26 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

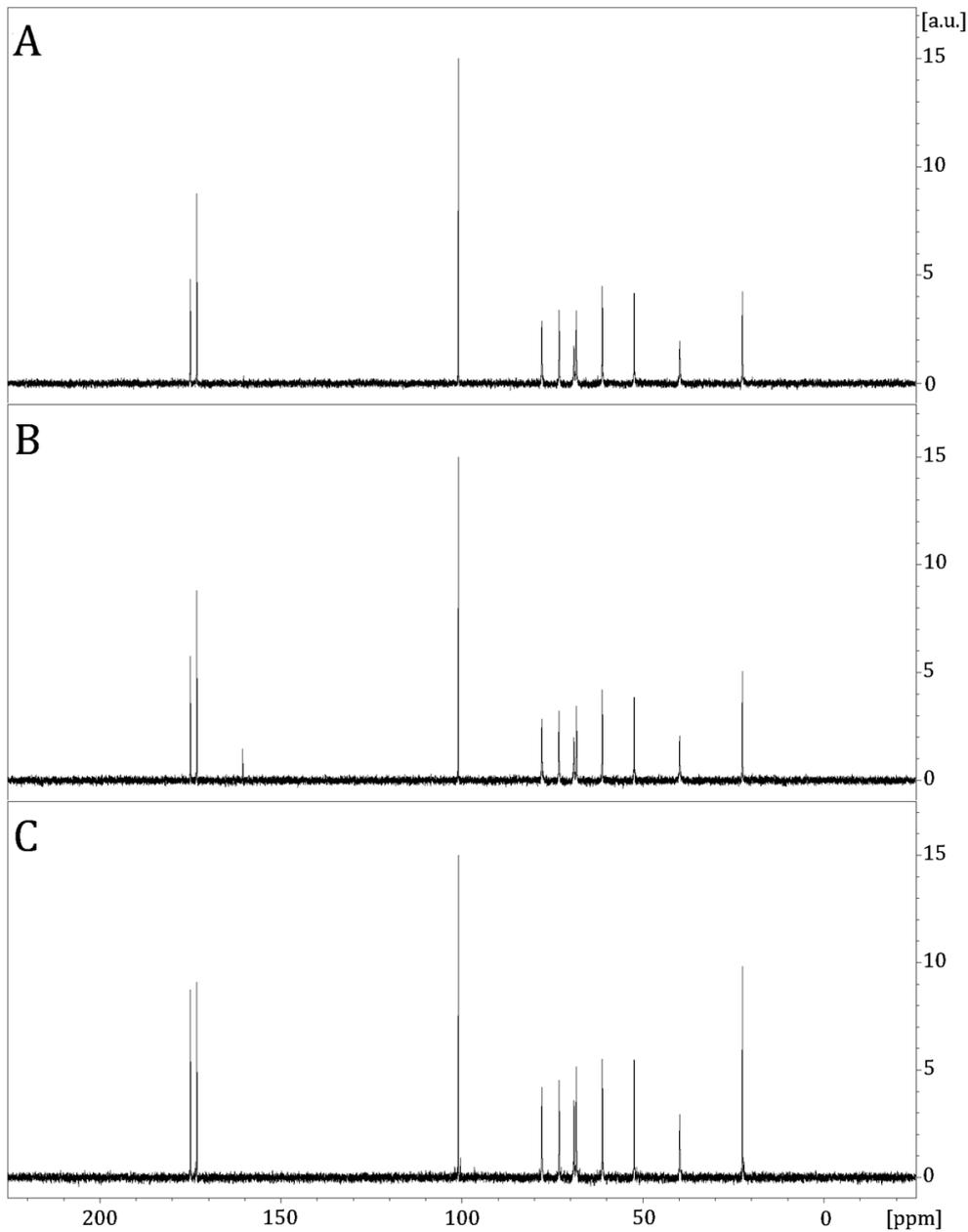


Abbildung 26: ^{13}C -Spektren von der hergestellten und kommerziell erhältlichen PolySia. In den Spektren der hergestellten PolySia nach Endotoxinentfernung mittels NaOH-Behandlung (A), ohne Endotoxinentfernung mit NaOH (B) und der kommerziellen PolySia von Sigma-Aldrich (C) waren die elf chemisch unterschiedlichen Kohlenstoffatome der PolySia identifizierbar. Bei 160 ppm trat bei der nicht NaOH-behandelten PolySia ein Signal auf, das auf eine Verunreinigung schließen lässt.

4. Experimentelle Arbeiten

4.3.2.3 Optische Prüfung und Wasserlöslichkeit

Nach der Gefriertrocknung lag ein watteartiger, weißer Feststoff vor. Die hergestellte PolySia ist in Abbildung 27 gezeigt. Die langkettige PolySia war bei Raumtemperatur bei einer Konzentration von > 50 g/L rückstandslos in Wasser löslich.

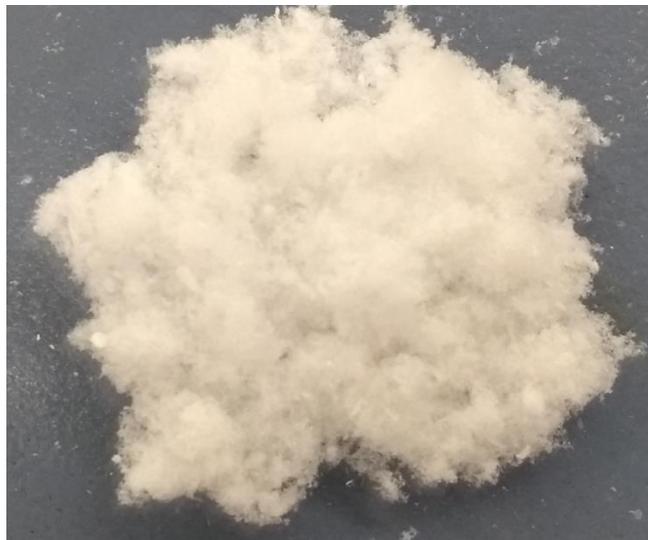


Abbildung 27: Hergestellte PolySia nach der Gefriertrocknung. Nach der Trocknung lag die PolySia als watteartiger, weißer Feststoff vor.

4.3.3 Zusammenfassung Produktanalytik

Nach dem Aufreinigungsprozess konnte ein reines Endprodukt als weißer Feststoff gewonnen werden. Die in Kapitel 4.2.5.1 Natriumhydroxidbehandlung beschriebene Behandlung zur Endotoxinentfernung bei hohem basischen pH-Wert hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf die chemische Struktur des Produktes. Verglichen mit der kommerziell erhältlichen PolySia konnte durch den

4. Experimentelle Arbeiten

entwickelten Produktionsprozess ein Produkt mit geringerem Restgehalt an DNA und Endotoxin hergestellt werden. Zudem war der maximale Polymerisationsgrad der hergestellten PolySia höher als beim kommerziellen Produkt und die Verteilung der unterschiedlichen Kettenlängen einheitlicher. Ein Überblick über die wichtigsten Merkmale der hergestellten PolySia ist in Tabelle 7 gegeben.

Tabelle 7: Übersicht der Produktmerkmale der hergestellten PolySia.

| Merkmal | Messwert | Messmethode |
|-----------------------------|-------------------|--|
| Proteingehalt | Nicht nachweisbar | Bradford-Assay |
| DNA-Gehalt | Nicht nachweisbar | Photometrische Bestimmung PCR und Gelelektrophorese |
| Endotoxingehalt | < 3 EU/mg | LAL-Test |
| Maximale Kettenlänge | 90 – 100 DP | DMB-HPLC-Methode |

4.4 Stabilitätstests und Produktmodifikationen

Die Stabilität biotechnologischer Produkte ist für den späteren Einsatz entscheidend und wird in der ICH Guideline Q5C „Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products“ geregelt [108]. Kritische Lagereinflüsse sind z.B. die Temperatur, Licht oder die Luftfeuchtigkeit.

Im Folgenden werden Untersuchungen mit der hergestellten PolySia unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und Methoden zur Herstellung kurzkettiger PolySia für den medizinischen Einsatz gezeigt. Zur Bestimmung der Stabilität wurde die in Kapitel 4.3.2.1 Kettenlängenbestimmungen beschriebene DMB-HPLC-Methode verwendet. Ein Anstieg der Intensität der Peaks im

4. Experimentelle Arbeiten

kurzkettigen Bereich (zwischen 20 und 40 min Retentionszeit) zeigte einen Zerfall der langkettigen PolySia-Moleküle.

4.4.1 Stabilität in Kulturbrühe

Die in Kapitel 4.2.1 Reifeprozess dargestellte Einführung eines Reifeprozesses erleichterte den Produktionsprozess durch Entkopplung der Kultivierung von der anschließenden Aufreinigung und setzte weitere PolySia von der Zelloberfläche in den Kulturüberstand frei. Im Folgenden wird untersucht, ob während der Lagerung ein Zerfall der PolySia stattfand. Neben kritischen Einflussfaktoren, wie dem pH-Wert oder der Temperatur, könnten auch freigesetzte Zellbestandteile wie Enzyme den Produktzerfall begünstigen.

Vor der Messung mit der DMB-HPLC-Methode wurden die Proben mit Ultrafiltrationsröhrchen mit einem MWCO von 10 kDa vorbehandelt, um Salze und weitere niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen, die die Messung beeinträchtigen. Durch Konzentrationsbestimmungen der PolySia in den behandelten Proben vor und nach der Lagerung konnte sichergestellt werden, dass kein erhöhter Anteil kurzkettiger PolySia durch die Behandlung verloren ging.

Über einen Lagerzeitraum von sechs Tagen bei 8 °C konnte kein Zerfall der PolySia beobachtet werden, wie in Abbildung 28 gezeigt ist. Der Anteil kurz- und langkettiger PolySia sowie die maximale Kettenlänge blieben über den Lagerzeitraum konstant. Entsprechend kann ein Reifeprozess nach der Kultivierung in Hinblick auf die Produktstabilität als unkritisch betrachtet werden.

4. Experimentelle Arbeiten

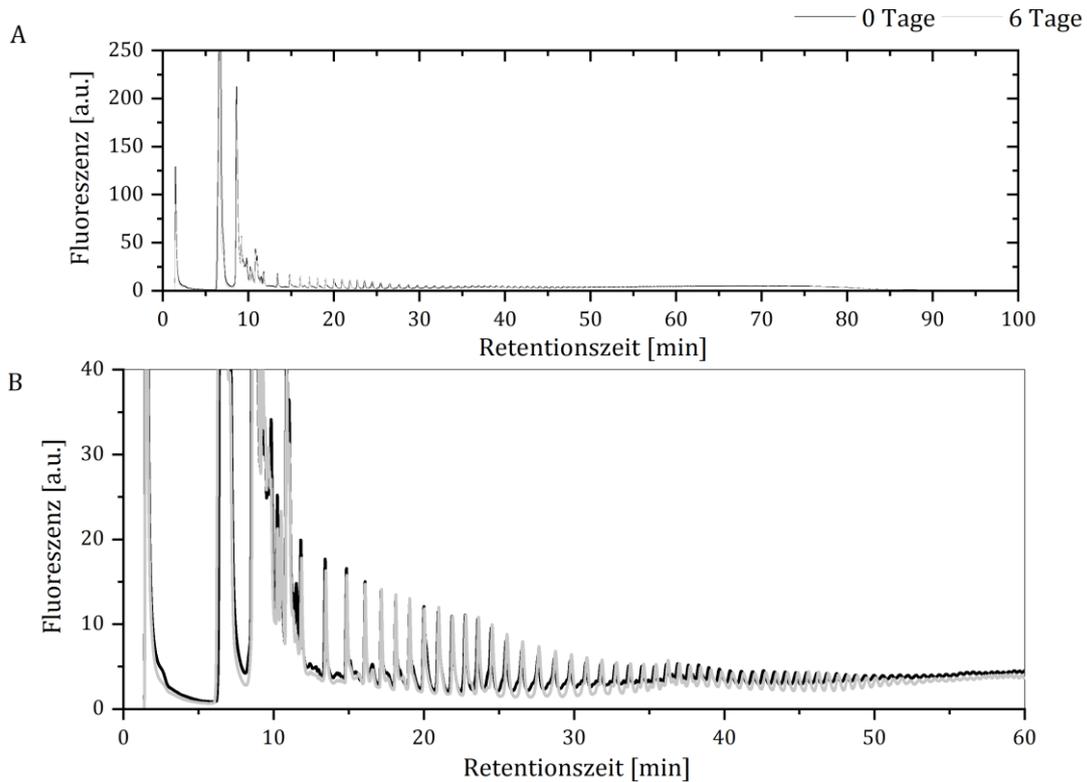


Abbildung 28: Stabilität von PolySia in Kulturbrühe. Über einen Lagerzeitraum von 6 Tagen bei 8 °C nach der Kultivierung konnte kein Zerfall der PolySia beobachtet werden. Sowohl der Anteil kurz- und langkettiger PolySia, sowie die maximale Kettenlänge blieben konstant. Neben der kompletten Ansicht (A) ist eine vergrößerte Ansicht im kurzkettenigen Bereich (B) gezeigt.

4.4.2 Stabilität aufgereinigter PolySia

Nach dem Herstellungsprozess musste die langkettige PolySia bis zur weiteren Produktmodifikation oder dem direkten Einsatz als langkettiges Produkt zwischengelagert werden. Eine langfristige Lagerung der hochmolekularen PolySia fand als Feststoff bei -20 °C statt. Im Folgenden wurden unterschiedliche Bedingungen zur kurzfristigen Lagerung über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten getestet. Während die Stabilitätstests in wässriger Lösung vor allem in Hinblick auf einen Zerfall während der Aufreinigung interessant sind, sind die

4. Experimentelle Arbeiten

Stabilitätstest des PolySia-Feststoffes unter anderem für den Transport der PolySia und eine kurzfristige Zwischenlagerung bedeutend.

In wässriger Lösung konnte bei Lagerung bei Raumtemperatur bereits nach 4 Tagen eine erhöhte Menge an kurzkettiger PolySia beobachtet werden, nach 15 Tagen war der erhöhte kurzkettige Anteil deutlich zu erkennen. Bei einer Temperatur von 8 °C war die PolySia in wässriger Lösung deutlich stabiler. Ein erhöhter Anteil kurzkettiger PolySia-Moleküle war nach 92 Tagen sichtbar, allerdings war der Zerfall nicht so weit fortgeschritten wie bei Raumtemperatur in wässriger Lösung nach 15 Tagen. Daher war es wichtig, während des Aufarbeitungsprozesses länger andauernde Arbeitsschritte, wie z.B. die Dialyse, unter gekühlten Bedingungen durchzuführen und die Lösungen zwischen den Prozessschritten kühl zu lagern, damit es nicht zu einem Stabilitätsverlust kam.

Der PolySia-Feststoff war deutlich stabiler. Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 8 °C konnte über einen Zeitraum von 92 Tagen kein PolySia-Zerfall beobachtet werden. Eine Auswahl der Stabilitätsmessungen ist in Abbildung 29 dargestellt.

4. Experimentelle Arbeiten

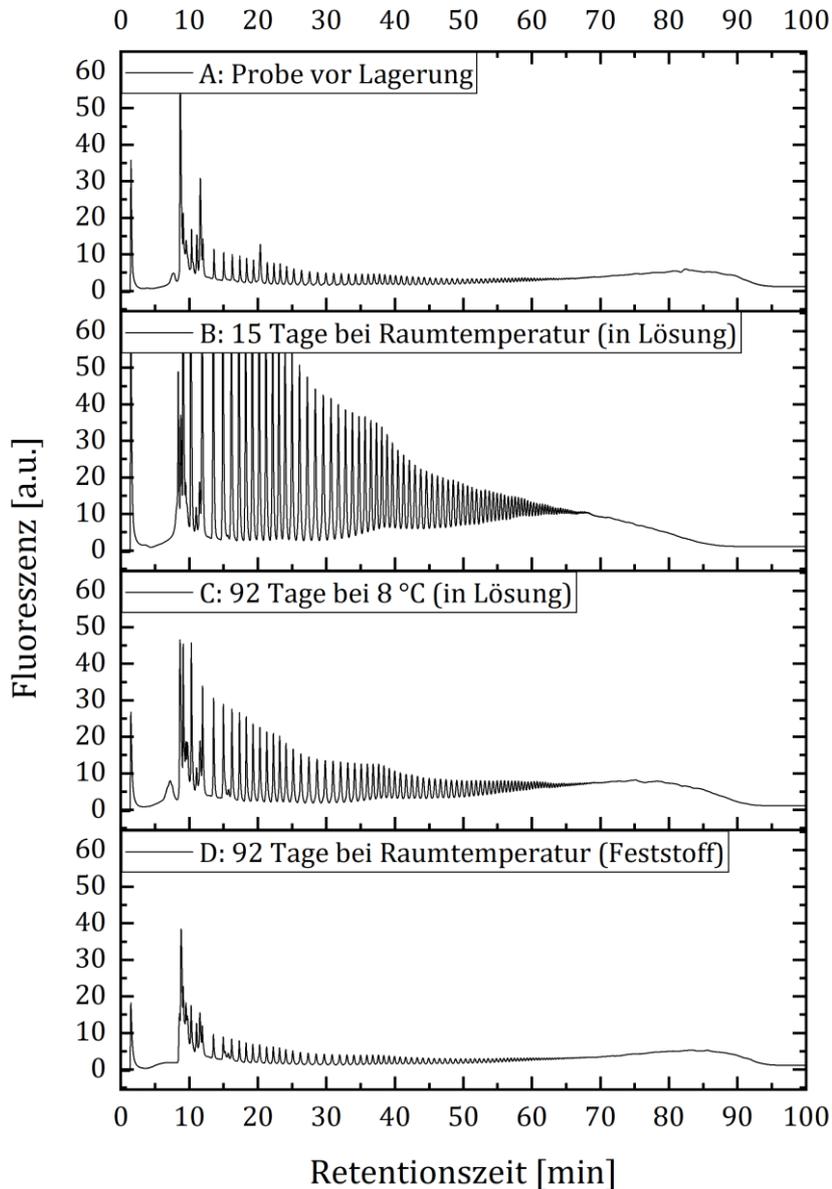


Abbildung 29: Stabilität aufgereinigter PolySia unter unterschiedlichen Bedingungen. Während die maximale Kettenlänge bei allen Proben unverändert blieb, zeigte die PolySia in wässriger Lösung bei Raumtemperatur bereits nach 15 Tagen (B) und bei der Lagerung bei 8 °C nach 92 Tagen (C) einen erhöhten Anteil kurzketziger Moleküle. Der PolySia-Feststoff war stabiler und zeigte auch nach 92 Tagen Lagerung (D) bei Raumtemperatur keine Zerfallsprodukte, verglichen mit der Probe vor der Lagerung (A).

4. Experimentelle Arbeiten

Neben der erhöhten Stabilität war es aufgrund des reduzierten Lagerungsvolumens sinnvoll, das Produkt getrocknet zu lagern. Während des Downstream Processing kam es lediglich kurzzeitig zu Prozessschritten bei Raumtemperatur, was einen PolySia-Zerfall während der Aufreinigung ausschließt.

4.4.3 Stabilität unter Stressbedingungen und thermische Hydrolyse

Neben Stabilitätsuntersuchungen bei 37 °C, die im Hinblick auf einen späteren Einsatz im Tissue Engineering oder einem medizinischen Einsatz eine große Rolle spielen, wurden bei einer erhöhten Temperatur von 65 °C Untersuchungen zur gezielten Herstellung kurzkettiger PolySia durchgeführt.

4.4.3.1 Stabilität bei 37 °C

Die Stabilitätstests bei 37 °C wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Über einen Zeitraum von 32,5 h war ein Zerfall der PolySia zu beobachten. Während die Stabilität in den ersten 8 h nur geringfügig beeinflusst wurde, war nach 24 h ein deutlich erhöhter Anteil kurzkettiger PolySia zu erkennen. Die maximale Kettenlänge der PolySia war trotz des Stabilitätsverlustes nach 32,5 h mit ~ 90 DP unverändert im Vergleich zur unbehandelten Probe. Ein Überblick ist in Abbildung 30 gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

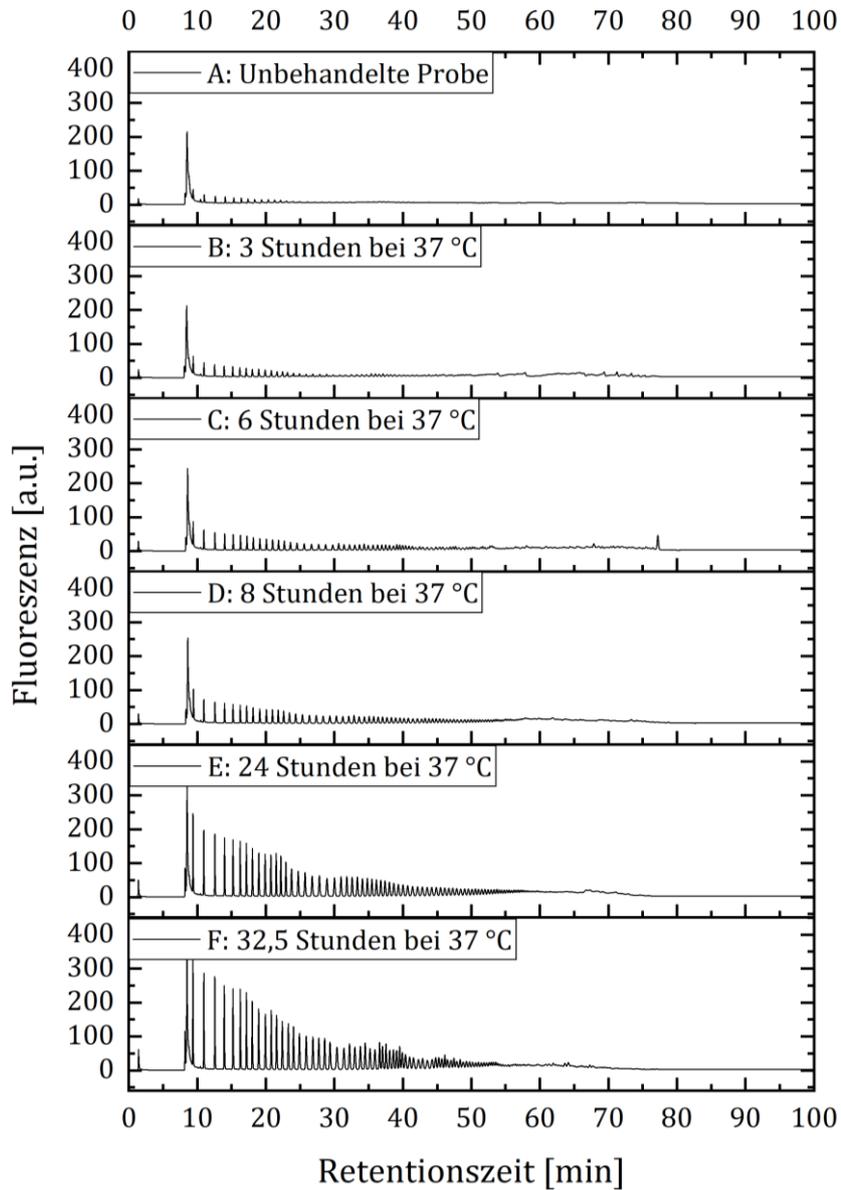


Abbildung 30: Stabilität von PolySia in wässriger Lösung bei 37 °C. PolySia war in wässriger Lösung bei 37 °C instabil. Während der Zerfall nach 8 h geringfügig ausfiel (D), war nach 24 h (E) ein deutlich erhöhter Anteil kurzkettiger PolySia zu erkennen. Die maximale Kettenlänge blieb mit ~ 90 DP auch nach 32,5 h (F) unverändert.

Der Stabilitätsverlust bei 37 °C war für den Kultivierungsprozess unbedeutend, da der Hauptanteil der PolySia gegen Ende der Kultivierung gebildet wurde und daher

4. Experimentelle Arbeiten

nur kurzzeitig einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt war. Für das Tissue Engineering und einen medizinischen Einsatz ist eine längere Inkubationsdauer bei 37 °C nötig. Während die PolySia im Tissue Engineering vor allem zur Beschichtung von Materialien verwendet wird und durch die Bindung an Oberflächen die Stabilität beeinflusst werden kann, könnte für einen medizinischen Einsatz der Probenpuffer eine entscheidende Rolle in Hinblick auf die Stabilität spielen.

4.4.3.2 Thermische Hydrolyse bei 65 °C

In dem gezeigten Produktionsprozess wurde langkettige PolySia mit einer maximalen Kettenlänge von 90 – 100 DP produziert. Kurzkettige PolySia mit einem Polymerisationsgrad von 20 Monomereinheiten ist jedoch, wie in Kapitel 3.2.3 Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin beschrieben, besonders für den Einsatz gegen neurodegenerative Erkrankungen geeignet.

Für die Produktion kurzkettiger PolySia eignen sich Methoden, bei denen die PolySia ohne Zugabe von Chemikalien oder Enzymen gespalten wird, da diese nach dem Einsatz wieder entfernt werden müssen. In Abbildung 31 wird eine thermische Hydrolyse von PolySia bei einer Temperatur von 65 °C bei unterschiedlichen Inkubationszeiten gezeigt.

4. Experimentelle Arbeiten

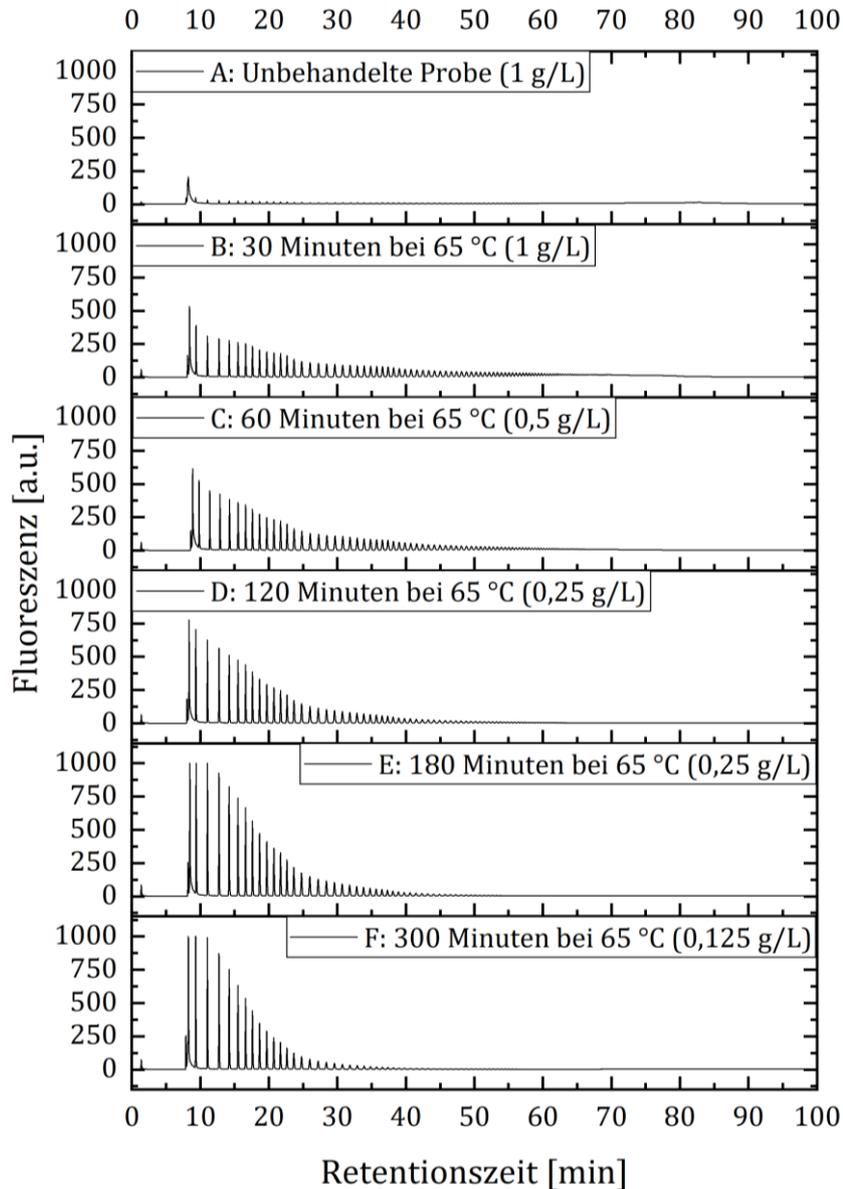


Abbildung 31: Thermische Hydrolyse von PolySia bei 65 °C. PolySia konnte bei einer Temperatur von 65 °C hydrolysiert werden. Aufgrund der erhöhten Konzentration kurzkettiger PolySia mussten die Proben nach 60 min Hydrolyse verdünnt werden. Neben dem Konzentrationsanstieg kurzkettiger PolySia-Moleküle nahm auch die maximale Kettenlänge ab. Vor der Hydrolyse (A), nach 30 min (B) und nach 60 min (C) lag die maximale Kettenlänge bei ~ 95 DP. Anschließend nahm die maximale Kettenlänge ab. Nach 120 min lag sie bei ~ 85 DP, nach 180 min bei ~ 75 DP und nach 300 min bei ~ 55 DP.

4. Experimentelle Arbeiten

Die langkettige PolySia konnte bei 65 °C effektiv gespalten werden. Bereits nach 30 min war ein deutlicher Anstieg kurzkettiger PolySia zu erkennen. In der Folge nahm nicht nur der Anteil kurzkettiger PolySia weiter zu, sondern auch die maximale Kettenlänge ab. Während die maximale Kettenlänge vor der Hydrolyse bei ~ 95 DP lag, lag sie nach 300 min Hydrolyse bei ~ 55 DP.

Die thermische Hydrolyse bei 65 °C bot daher eine effektive und einfache Möglichkeit, langkettige PolySia zu spalten. Dabei konnte auf den Zusatz von Chemikalien und Enzymen verzichtet werden. Je nach gewünschtem Hydrolysegrad konnte die Dauer der Behandlung angepasst werden.

4.4.4 Zusammenfassung Stabilitätstests

Die Stabilitätstests zeigten, dass die PolySia im trockenen Zustand deutlich stabiler war als in wässriger Lösung. Entsprechend sollte die PolySia für eine längerfristige Lagerung getrocknet werden. Im trockenen Zustand konnten auch nach 92 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur keine Zerfallserscheinungen festgestellt werden.

In wässriger Lösung konnte bei Raumtemperatur bereits nach 4 Tagen ein Zerfall beobachtet werden. Gekühlt war die PolySia in wässriger Lösung deutlich stabiler und zeigte erst nach 92 Tagen Zerfallserscheinungen. Daher sollten längere Prozessschritte wie z.B. die Dialyse gekühlt durchgeführt werden.

Die Geschwindigkeit des PolySia-Zerfalls war temperaturabhängig. Bei 37 °C kam es in wässriger Lösung nach wenigen Stunden zur Bildung kurzkettiger Zerfallsprodukte. Bei einem späteren Einsatz im Tissue Engineering oder medizinischen Bereich könnte der Zerfall jedoch durch Bindung an Oberflächen oder einem stabilisierenden Probenpuffer eingeschränkt werden.

4. Experimentelle Arbeiten

Durch eine thermische Hydrolyse bei 65 °C ließ sich in kurzer Zeit ohne die Zugabe von Hilfsstoffen kurzkettige PolySia erzeugen. Ein Überblick der durchgeführten Stabilitätstests ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Überblick der durchgeführten Stabilitätstests.

| Bedingung | Stabilität |
|-----------------------------------|-------------------|
| Kulturbrühe (8 °C) | stabil |
| Lösung (8 °C) | instabil |
| Lösung (Raumtemperatur) | instabil |
| Lösung (37 °C) | instabil |
| Feststoff (8 °C) | stabil |
| Feststoff (Raumtemperatur) | stabil |
| Hydrolyse bei 65 °C | instabil |

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit sollte ein Herstellungsprozess mit anschließender Analytik für die Produktion hochreiner PolySia für einen möglichen medizinischen Einsatz entwickelt werden. Durch die Etablierung von Einwegprozesselementen während der Kultivierung und dem Downstream Processing sollte eine spätere Übertragung des entwickelten Prozesses in eine GMP-konforme Produktionsumgebung erleichtert werden. Die niedrigen Investitionskosten und die hohe Flexibilität der Systeme im Hinblick auf die Produktion unterschiedlicher Produkte in einer Prozesseinheit machen Einwegsysteme für die Produktion von Prüfpräparaten für präklinische und klinische Studien interessant.

Für die biotechnologische PolySia-Produktion wird üblicherweise *E. coli* K1 in einem wiederverwendbaren Rührkesselreaktor eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde der etablierte batch-Kultivierungsprozess auf ein Einwegreaktorsystem übertragen. Der verwendete Einwegreaktor wird welleninduziert durchmischt. Aufgrund des niedrigeren Sauerstoffeintrags im welleninduziert durchmischten Einwegreaktor verglichen zum Rührkesselreaktor musste bei höheren Zelldichten mit Sauerstoff begast werden, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Durch die angepassten Prozesseinstellungen konnten im Einwegreaktorsystem vergleichbare Biomasse- und Produktkonzentrationen zum etablierten Prozess im Rührkesselreaktor erreicht werden. Die schonende welleninduzierte Durchmischung hatte keinen Einfluss auf die Produktablösung von der Zelloberfläche in den Kulturüberstand verglichen mit der intensiven Durchmischung im Rührkesselreaktor, jedoch wurde weniger Protein im Einwegreaktor freigesetzt. Die geringere Freisetzung von Verunreinigungen während des Kultivierungsprozesses erleichterte die anschließende Aufreinigung der PolySia. Nach der batch-Kultivierung im 10 L-Maßstab standen etwa 3 g PolySia für die weitere Aufreinigung zur Verfügung. Durch eine Aufskalierung des Kultivierungsmaßstabes von 10 L auf 25 L im Einwegreaktorsystem bzw. auf 30 L im Rührkesselreaktor konnte die

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Produktionskapazität erhöht werden. Neben einer batch-Kultivierung konnte im Einwegreaktor ein fed-batch-Prozess realisiert werden, wodurch die Produktausbeute um das bis zu 3,6-fache erhöht werden konnte. Eine verbesserte Steuerung der fed-batch-Regelung könnte die Produktausbeute in zukünftigen Arbeiten weiter erhöhen. Durch den fed-batch-Prozess konnten die Kosten reduziert werden, da pro Einwegreaktorbeutel eine erhöhte Menge Produkt gebildet wurde. Nach dem Kultivierungsprozess bot der Einwegreaktor den Vorteil einer direkten und einfachen Lagerung der Kulturbrühe im Reaktorbeutel. Der Reifeprozess erhöhte nicht nur die Produktausbeute, sondern entkoppelte auch den Kultivierungsprozess und das Downstream Processing, was die Durchführbarkeit des Herstellungsprozesses im universitären Umfeld erleichterte.

Im Anschluss musste die PolySia aus der Kulturbrühe isoliert werden. Dazu wurden zunächst die Zellen abgetrennt und das Produkt mittels Cross-flow Ultrafiltration aufkonzentriert. Bei der Aufkonzentrierung mit einem MWCO von 10 kDa ging nahezu die Hälfte des Produktes verloren. In folgenden Arbeiten könnte durch intensives Spülen der Cross-flow-Anlage das verlorene Produkt im Totvolumen minimiert werden und durch eine geringere Ausschlussgrenze der Anteil kurzkettiger PolySia, die im Permeat verloren ging, reduziert werden. Durch eine Kombination aus einer Ethanol-fällung und einer Behandlung mit Tonmineralien konnte das Protein einfach und zeitschonend entfernt werden und die PolySia nach einer Dialyse und Trocknung für nicht regulierte Anwendungsbereiche, wie z.B. das Tissue Engineering zur Verfügung gestellt werden. Für einen medizinischen Einsatz mussten die noch verbliebenen Verunreinigungen entfernt werden. Der Endotoxingehalt betrug nach der Proteinentfernung über $1.000 \text{ EU/mg}_{\text{PolySia}}$ und die DNA-Menge $5,5 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{DNA}}/\text{g}_{\text{PolySia}}$. Eine Erweiterung des Aufreinigungsprozesses durch eine NaOH-Behandlung, verbunden mit der gezielten Adsorption und Elution der PolySia an bzw. von Membranadsorbentien (Anionenaustauscher), reduzierte den Endotoxingehalt im Endprodukt auf unter $3 \text{ EU/mg}_{\text{PolySia}}$ und den DNA-Gehalt auf eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Durch die NaOH-Behandlung

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

bei einem pH-Wert von pH=13 konnte durch die durchgeführten Analysen keine Veränderung der chemischen Struktur der PolySia, weder im Hinblick auf die maximale Kettenlänge (90 – 100 DP) noch auf die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen, ausgemacht werden. Dennoch könnten in Zukunft produktschonende Methoden zur Endotoxinentfernung etabliert werden. Erste Tests zur Endotoxinentfernung mit Affinitätssäulen zeigten keine vergleichbaren Ergebnisse zur NaOH-Behandlung im Hinblick auf die Reinheit des Endproduktes oder erschwerten eine großtechnische Herstellung. Nach dem Aufarbeitungsprozess lag die PolySia hauptsächlich als Natriumsalz vor. Verglichen mit der kommerziell verfügbaren PolySia konnte mit dem entwickelten Herstellungsprozess nicht nur reinere PolySia im Hinblick auf DNA- und Endotoxinverunreinigungen, sondern auch PolySia mit einem höheren Polymerisationsgrad hergestellt werden. Die Ausbeute des Downstream Processing betrug $29 \pm 7 \%$. Entsprechend konnte aus einer 10 L batch-Kultivierung etwa 1 g aufgereinigte PolySia gewonnen werden.

Nach dem Herstellungsprozess musste die PolySia bis zur Verwendung gelagert werden. Während die PolySia üblicherweise als Feststoff bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wird, wurde die Stabilität in wässriger Lösung und als Feststoff bei Raumtemperatur und $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ getestet. Es zeigte sich, dass die PolySia in Lösung bei Raumtemperatur bereits nach 4 Tagen erste Stabilitätsverluste zeigte und bei $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nach 92 Tagen ein Zerfall zu beobachten war. Als Feststoff war die PolySia deutlich stabiler und zeigte auch nach 92 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur keinen erhöhten Anteil kurzkettiger PolySia-Moleküle. Für den Herstellungsprozess war die eingeschränkte Stabilität in wässriger Lösung unkritisch, da zeitaufwändige Prozessschritte gekühlt durchgeführt wurden. Auch während des eingeführten Reifeprozesses wurde die Kettenlänge der PolySia nicht beeinflusst. Die Zerfallsgeschwindigkeit der PolySia erwies sich als temperaturabhängig. Bei einer Temperatur von $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zerfiel die PolySia in wässriger Lösung bereits nach wenigen Stunden. Durch eine Bindung an ein Trägermaterial (z.B. im Tissue Engineering) oder einen stabilisierenden Probenpuffer könnte in weiterführenden Arbeiten die

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Stabilität der PolySia erhöht werden. Eine gezielte thermische Hydrolyse konnte genutzt werden, um aus dem hergestellten langkettigen Produkt kurzkettige PolySia zu erzeugen, die unter anderem bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen als potentiellies Arzneimittel getestet werden kann. Bei einer Temperatur von 65 °C zerfiel die PolySia bereits nach wenigen Minuten. Nach 5 h Inkubation bei 65 °C konnte der maximale Polymerisationsgrad der PolySia von ~ 95 DP auf ~ 55 DP verringert werden. Im Gegensatz zu einer sauren Hydrolyse oder einer enzymatischen Spaltung bot die thermische Hydrolyse die Möglichkeit, kurzkettige PolySia ohne die Zugabe von Hilfsstoffen zu erzeugen. Im Anschluss an die thermische Hydrolyse könnte in weiterführenden Arbeiten PolySia mit den unterschiedlichen Kettenlängen nach Adsorption an einen Anionenaustauscher, wie z.B. die in dieser Arbeit für die Endotoxinentfernung etablierten Membranadsorber, über einen Gradienten eluiert und fraktioniert gesammelt werden.

Die Einführung von Einwegelementen, wie dem Bioreaktor für die Kultivierungsarbeiten oder den Membranadsorbern im Downstream Processing, erleichterte die Durchführbarkeit des Produktionsprozesses. Neben den überflüssigen Sterilisations- und Reinigungsschritten, die zu einer Zeitersparnis führten, wird durch die Prozesselemente eine Übertragung in neue Produktionsumgebungen und eine Aufskalierung des Produktionsmaßstabes vereinfacht. Durch den optimierten Aufreinigungsprozess konnte PolySia mit hohem Reinheitsgrad hergestellt werden, welche direkt als langkettiges Produkt eingesetzt werden kann oder durch Modifikationen, wie z.B. einer Hydrolyse, an das gewünschte Anwendungsgebiet angepasst werden kann.

6. Anhang

6.1 Materialien und Methoden

6.1.1 Materialien

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte, Verbrauchsmittel und eingesetzten Chemikalien tabellarisch aufgeführt. In Tabelle 9 werden die Geräte und Verbrauchsmittel gezeigt.

Tabelle 9: Geräte und Verbrauchsmittel.

| Gerät/Verbrauchsartikel | Typ | Hersteller |
|--------------------------------|---|-------------------------------|
| Abgassensor | BlueInOne Ferm | BlueSens gas sensor GmbH |
| Affinitätssäule | EndoTrap® HD | Hyglos GmbH |
| Affinitätssäule | Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Column | Thermo Fisher Scientific |
| Autosampler | Triathlon | Spark Holland B.V. |
| Cross-flow-Kassette | Sartocon® Slice Hydrosart® Cassette (10 kDa) | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Cross-flow-Anlage | Sartoflow® Smart | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Dialysemembran | Visking® | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| DO-Messsonde | OxyFerm FDA | Hamilton Company |

6. Anhang

| | | |
|---|--------------------------------------|---|
| Einweg-Beutel-Reaktor (Rockingplattform und Steuereinheit) | Biostat® CultiBag RM 20/50 | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Einweg-Beutel-Reaktor (Reaktorbeutel) | Flexsafe® RM 20L bzw. 50L optical | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Endotoxin-Kartusche | Endosafe®-PTS™ 10 – 0,1 EU/mL | Charles River Laboratories |
| Endotoxin-Messsystem | Endosafe®-PTS™ Cartridge Reader | Charles River Laboratories |
| Fluoreszenzdetektor | RF-20A | Shimadzu |
| FPLC-Anlage | ÄKTA™ pure 25 L | GE Healthcare |
| Gefrierschrank (-80 °C) | | Thermo Fisher Scientific |
| Gefriertrocknungsanlage | Alpha 1-4 LSC | Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH |
| Gele | 18% Ready Gel® Tris- HCl Gel | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Gelelektrophoresesystem | Thermo EC Classic™ | Thermo Fisher Scientific |
| Gelelektrophoresesystem | Mini-Protean® | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Glucosemessgerät | YSI 2900 | YSI Incorporated |
| HPLC-Anlage | 1200 Series | Agilent Technologies |
| HPLC-Anlage | VWR HITACHI Chromaster | VWR International |
| HPLC-Pumpe | | Agilent Technologies |

6. Anhang

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| HPLC-Säule | DNAPac™ PA100 | Thermo Fisher Scientific |
| HPLC-Säule | Aminex® HPX-87H | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Inkubationsschrank | HAT-CH-4015 Basel | Infors AG |
| Kontinuierliche Zentrifuge | Heraeus™ Contifuge Stratos™ | Thermo Fisher Scientific |
| Kryoröhrchen | | Sarstedt AG & Co. KG |
| Küvetten (Polystyrol) | | Sarstedt AG & Co. KG |
| Membranadsorber | Sartobind® Q 75 | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Membranadsorber | Sartobind® Q 75 mL | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| pH-Messsonde | EasyFerm Plus | Hamilton Company |
| Photometer | Libra S80 | Biochrom GmbH |
| Photometer | Multiskan® Spectrum | Thermo Fisher Scientific |
| Photometer | NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific |
| Reinstwasseranlage | arium® 611 | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Brechungsindexdetektor | LaChrom RI-Detector L-7490 | Merck KGaA |
| Rührkesselreaktor (10 L) | Biostat® C | Sartorius Stedim Biotech GmbH ehemals B. Braun Biotech International GmbH |

6. Anhang

| | | |
|---------------------------------|------------------------|--|
| Rührkesselreaktor (30 L) | Biostat® Cplus | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Schüttelkolben (500 ml) | | Corning Incorporated |
| Spritzen (50 ml, 20 ml) | Omnifix® | B. Braun Melsungen AG |
| Spritzenfilter | Minisart® | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Sterilbank | Herasafe™ | Thermo Fisher Scientific |
| Sterilfilter | Sartobran® P300 | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Sterilfilter | Sartolab® | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Thermomixer | Thermomixer comfort | Eppendorf AG |
| Thermomixer | Thermomixer compact | Eppendorf AG |
| Trockenschrank | | Memmert GmbH & Co. KG |
| Ultrafiltrationsröhrchen | Vivaspin® 20 | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| Ultraschallsonde | Labsonic® M | Sartorius Stedim Biotech GmbH |
| UV-System | | Intas Science Imaging Instruments GmbH |
| Zentrifuge | Heraeus™ Biofuge™ pico | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge | Multifuge™ X3 FR | Thermo Fisher Scientific |

6. Anhang

| | | |
|------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Zentrifugationsgefäße | Centrifuge Tube (15 mL und 50 mL) | Corning Incorporated |
|------------------------------|--------------------------------------|----------------------|

Eine Liste der verwendeten Chemikalien ist in Tabelle 10 gegeben. Reinstwasser wird mit dem Reinstwassersystem (arium® 611, Sartorius Stedim Biotech GmbH) hergestellt.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.

| Chemikalie | Hersteller |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Aceton | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Agarose | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Ammoniak | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Ammoniumacetat | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumsulfat | AppliChem GmbH |
| β-Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Bovines Serumalbumin | AMRESCO, Inc. |
| Calciumcarbonat | Sigma-Aldrich |
| Calciumchlorid | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Colominsäure | Sigma-Aldrich, Carbosynth Limited |
| Coomassie-Plus Reagenz | Thermo Fisher Scientific |
| Deuteriumoxid | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | AppliChem GmbH |
| Desmophen 3900 | Bayer AG |
| Dextransulfate | TDB Consultancy AB |

6. Anhang

| | |
|--|------------------------|
| Eisensulfat | Sigma- Aldrich |
| Endotoxinfreies Wasser | GE Healthcare |
| Essigsäure | AppliChem GmbH |
| Ethanol 96 % | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Glucosemonohydrat | Fluka |
| Glycerin | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Hefeextrakt | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Isopropanol | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Kaliumdihydrogenphosphat | AppliChem GmbH |
| Kaliumsulfat | Fluka |
| Kupfersulfat | Fluka |
| Magnesiumsulfat | AppliChem GmbH |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Natriumarsenit | Sigma-Aldrich |
| Natrium-Ethylen-diamintetraessigsäure (Na-EDTA) | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Natriumchlorid | VWR International |
| Natriumhydrogencarbonat | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Natriumphosphat | Sigma-Aldrich |
| Natriumsulfat | AppliChem GmbH |
| Natriumsulfit | Fluka |
| Methanol | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| 4,5-Methylendioxy-1,2-phenylendiamin dihydrochlorid (DMB) | Sigma-Aldrich |
| Oligosialinsäure | Nacalai Tesque Inc. |
| Periodsäure | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Phosphorsäure | Sigma-Aldrich |
| Salzsäure | AppliChem GmbH |
| Sauerstoff | Linde |

6. Anhang

| | |
|--------------------------------|------------------------|
| Schwefelsäure | Sigma-Aldrich |
| Stains-All | Sigma-Aldrich |
| 2-Thiobarbutursäure | Sigma-Aldrich |
| Tonminerale (EX M 1753) | Clariant AG |
| Triethanolamin | Sigma-Aldrich |
| Trifluoressigsäure | Carl Roth GmbH & Co.KG |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich |
| Trypton | AppliChem GmbH |

Zusätzlich zu den Chemikalien werden molekularbiologische Reagenzien verwendet, die in Tabelle 11 aufgeführt sind.

Tabelle 11: Molekularbiologische Reagenzien.

| Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| dNTP-Mix | Thermo Fisher Scientific |
| 5x Green GoTaq® Reaction Buffer | Promega Corporation |
| GoTaq® G2 DNA Polymerase | Promega Corporation |
| Färbereagenz (HDGreen™) | Intas Science Imaging Instruments GmbH |
| Primer <i>E. coli</i> hin 5'-GAGCGCAACCCTTATCCT-3' | MWG-Biotech AG |
| Primer <i>E. coli</i> rev 5'-GGTTCCCCTACGGTTAC-3' | MWG-Biotech AG |

6.1.2 Methoden

Im Folgenden werden zunächst die Medien und Lösungen aufgelistet und anschließend die verwendeten Methoden beschrieben.

6.1.2.1 Medien und Lösungen

6.1.2.1.1 Medium für die Vor-Vorkultur: LB-Medium

Für die Vor-Vorkultur wird LB-Medium verwendet. Der pH-Wert wird mit 2 M Natronlauge auf pH=7,3 eingestellt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des LB-Mediums.

| Komponente | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| Hefeextrakt | 10 g/L |
| Trypton | 10 g/L |
| Natriumchlorid (NaCl) | 5 g/L |

6.1.2.1.2 Medium für die Vorkultur: definiertes Medium

Für die Vorkultur wird das in Tabelle 13 gezeigte definierte Medium verwendet. In dem Medium dienen di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) als Puffer, Glucose als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. Der pH-Wert des definierten Mediums wird mit 2 M Natronlauge auf pH=7,5 eingestellt.

6. Anhang

Tabelle 13: Zusammensetzung des definierten Mediums.

| Komponente | Konzentration |
|---|----------------------|
| Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) | 9,3 g/L |
| Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | 2,03 g/L |
| Glucosemonohydrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) | 22 g/L |
| Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) | 10 g/L |
| Natriumchlorid (NaCl) | 1,2 g/L |
| Kaliumsulfat (K_2SO_4) | 1,1 g/L |
| Calciumchlorid ($CaCl_2$) | 0,013 g/L |
| Spurensalzlösung (siehe Tabelle 14) | 1 mL/L |

Tabelle 14: Zusammensetzung der Spurensalzlösung.

| Salz | Konzentration |
|---|----------------------|
| Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) | 150 g/L |
| Eisensulfat ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$) | 1 g/L |
| Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) | 1 g/L |

6.1.2.1.3 Medium für die Reaktorkultivierungen

Für die batch-Kultivierungen im Rührkessel- und Einweg-Beutel-Reaktor wird das in Tabelle 13 beschriebene definierte Medium verwendet. Je nach Prozessmaßstab wird das entsprechende Mediovolumen vorgelegt. Im Rührkesselreaktor wird dem Medium zusätzlich 0,2 mL/L Antischaummittel (Desmophen 3900, Bayer AG) zugegeben. Die Regelung des pH-Wertes erfolgt in beiden Systemen mit 25 %iger NH_4OH - und 1 M HCl-Lösung.

6. Anhang

Für die fed-batch-Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor wird für die batch-Phase das in Tabelle 13 gezeigte definierte Medium mit einer Startkonzentration von 10 g/L Glucose und einem Medienvolumen von 8 L verwendet. Die feed-Lösung, die im Anschluss an die batch-Phase verwendet wird, ist in Tabelle 15 aufgeführt. Der pH-Wert der feed-Lösung wird auf pH=7,5 eingestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der feed-Lösung.

| Komponente | Konzentration |
|---|----------------------|
| Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) | 9,3 g/L |
| Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | 2,03 g/L |
| Glucosemonohydrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) | 220 g/L |
| Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) | 10 g/L |
| Natriumchlorid (NaCl) | 1,2 g/L |
| Kaliumsulfat (K_2SO_4) | 1,1 g/L |
| Calciumchlorid ($CaCl_2$) | 0,065 g/L |
| Spurensalzlösung (siehe Tabelle 14) | 2 mL/L |

6.1.2.1.4 Lösungen für den TBA-Assay

Die Hydrolyselösung für den TBA-(2-Thiobarbitursäure)-Assay ist 50 mM Phosphorsäure (H_3PO_4). Die weiteren Lösungen sind in Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgelistet. Die Lösungen werden vor dem Einsatz filtriert.

6. Anhang

Tabelle 16: Zusammensetzung der Oxidationslösung.

| Komponente | Menge |
|--|--------------|
| Periodsäure (H₅IO₆) | 0,46 g |
| 1 M Phosphorsäure (H₃PO₄) | 0,51 mL |
| Wasser (H₂O) | 9,49 mL |

Tabelle 17: Zusammensetzung der Reduktionslösung.

| Komponente | Menge |
|--|--------------|
| Natriumarsenit (NaAsO₂) | 1,5 g |
| Natriumsulfat (NaSO₄) | 2,13 g |
| 2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) | 3 mL |
| Wasser (H₂O) | 27 mL |

Tabelle 18: Zusammensetzung der TBA-Lösung.

| Komponente | Menge |
|--|--------------|
| 2-Thiobarbitursäure (C₄H₄N₂O₂S) | 0,9 g |
| 3 M Natronlauge (NaOH) | 3 mL |
| Wasser (H₂O) | 27 mL |

6.1.2.1.5 Lösungen für die DMB-HPLC

Zur Probenvorbereitung für die DMB-(4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid)-HPLC wird neben einer 20 mM TFA-(Trifluoressigsäure)-Lösung die in Tabelle 19 gezeigte DMB-Lösung verwendet.

Tabelle 19: Zusammensetzung der DMB-Lösung.

| Komponente | Menge |
|---|---------------|
| DMB ($C_7H_8N_2O_2 \cdot 2 HCl$) | 0,0016 g |
| Natriumsulfit ($NaSO_3$) | 0,0016 g |
| β -Mercaptoethanol (C_2H_6OS) | 56,3 μ L |
| Wasser (H_2O) | 943,7 μ L |

6.1.2.2 Kultivierungsarbeiten

6.1.2.2.1 Stammhaltung

Für die Kultivierungsarbeiten wird der Stamm *Escherichia coli* B2032/82 Serotyp K1 verwendet. Bei dem Stamm handelt es sich um ein klinisches Isolat [50]. Dauerkulturen werden in 50 % v/v Glycerin bei -80 °C gelagert. Die Dauerkulturen werden aus einer Schüttelkolbenkultur in LB-Medium bei $OD_{600}=3$ angesetzt.

6.1.2.2.2 Ansetzen der Vor-Vorkultur

Die Vor-Vorkultur wird in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen angesetzt. Das Volumen an LB-Medium (siehe Tabelle 12) beträgt 100 mL. Die Vor-Vorkultur wird mit 1 mL Dauerkultur angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 130 rpm in einem Inkubator kultiviert.

6.1.2.2.3 Ansetzen der Vorkultur

Die Vorkultur für die Reaktorkultivierungen wird in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen angesetzt. Als Medium wird 100 mL definiertes Medium (siehe Tabelle 13) verwendet. Die Vorkultur wird mit 20 μ L der Vor-Vorkultur angeimpft und anschließend bei 130 rpm und 37 °C für 10 bis 12 h inkubiert.

6.1.2.2.4 Kultivierungen im Rührkesselreaktor

Die Kultivierungen im Rührkesselreaktor werden in zwei Maßstäben durchgeführt. Die Kultivierungen im 10 L-Maßstab werden in dem Reaktorsystem Biostat® C (Sartorius Stedim Biotech GmbH ehemals B. Braun Biotech International GmbH) und die Kultivierungen im 30 L-Maßstab in dem Reaktorsystem Biostat® Cplus (Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt.

Der Aufbau beider Reaktorsysteme ist ähnlich. Die Systeme umfassen jeweils einen Reaktorbehälter und eine Steuereinheit. Über Zugänge am Reaktordeckel oder Standard 25 mm Ports können Messsonden und weitere Apparaturen angeschlossen werden. Die Durchmischung erfolgt über einen im Deckel eingebauten Rührer und die Temperierung über den Reaktormantel. Gase werden über einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 μ m zugegeben und das Abgas gekühlt. Die genauen Prozessbedingungen sind in Kapitel 4.1.2.1 Batch-Kultivierungen im Rührkesselreaktor beschrieben. Die Reaktorsysteme sind fest installiert und werden in-place gereinigt und sterilisiert. Die Abgasanalytik erfolgt mit dem Sensor BlueInOne Ferm (BlueSens gas sensor GmbH). Der pH-Wert (EasyFerm Plus, Hamilton Company) und der DO-Wert (OxyFerm FDA, Hamilton Company) werden online über Messsonden gemessen.

6.1.2.2.5 Kultivierungen im Beutel-Reaktor: batch-Betrieb

Die batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor werden im 10 L- und 25 L-Maßstab durchgeführt. Das verwendete System (Biostat® CultiBag RM 20/50, Sartorius Stedim Biotech GmbH) kann nach Anpassung der Rockingplattform an den gewünschten Prozessmaßstab für beide Maßstäbe verwendet werden. Der jeweilige Reaktorbeutel (10 L-Maßstab: Flexsafe® RM 20L optical, 25 L-Maßstab: Flexsafe® RM 50L optical, beide Sartorius Stedim Biotech GmbH) wird nach Anbringen auf der Rockingplattform über einen Sterilfilter (Sartobran® P300, Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit Medium befüllt. Die genauen Prozessbedingungen sind in Kapitel 4.1.2.2 Batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor beschrieben. Über bereits vorinstallierte und kalibrierte Sensoren werden der pH- und der DO-Wert bestimmt. Zudem sind mehrere Anschlüsse vorhanden, die es ermöglichen, den Reaktor zu befüllen, pH-Korrekturmittel anzuschließen und Proben zu nehmen. Der Abluftfilter des Einweg-Beutel-Reaktors wird beheizt, um die Bildung von Kondensat im Filter zu vermeiden.

6.1.2.2.6 Kultivierungen im Beutel-Reaktor: fed-batch-Betrieb

Die fed-batch-Kultivierungen im Einweg-Beutel-Reaktor werden im 10 L-Maßstab durchgeführt. Die genauen Prozessbedingungen sind in Kapitel 4.1.3 Fed-batch-Prozess im Einweg-Beutel-Reaktor beschrieben. Nachdem die batch-Phase beendet ist, wird die fed-batch-Phase gestartet. Die Pumprate wird durch das Programm ORK Feeder 1000 (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) berechnet. Das beschriebene Prozessmodell gilt für ideale Rührkesselreaktoren und basiert unter Berücksichtigung der Substratlimitierung auf dem Monod-Modell [97].

6. Anhang

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{max}S}{K_M+S}X(t) - \frac{\dot{V}_F(t)}{V_R(t)}X(t) \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{max}S}{K_M+S} \frac{X(t)}{Y_{X/S}} + \frac{\dot{V}_F(t)}{V_R(t)}(S_0 - S) \quad (2)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_M+S} \quad (3)$$

$$\frac{dV_R(t)}{dt} = \dot{V}_F(t) \quad (4)$$

$$\dot{V}_F(t) = \mu_{max} \frac{S}{K_M+S} \frac{X(t)}{Y_{X/S}} \frac{1}{(S_0-S)} V_R(t) \quad (5)$$

$X(t)$ Biomassenkonzentration zum Zeitpunkt t (g/L); S Substratkonzentration (Glucose) (g/L); μ_{max} maximale Wachstumsrate (/h); K_M Monod-Konstante (g/L); $\dot{V}_F(t)$ Fütterungsrate zum Zeitpunkt t (L/h); $V_R(t)$ Reaktorvolumen zum Zeitpunkt t (L); S_0 Startkonzentration der feed-Lösung (g/L); μ spezifische Wachstumsrate (/h) und $Y_{X/S}$ Ausbeutekoeffizient (g/g)

Es wird davon ausgegangen, dass die zugegebene Glucose direkt verstoffwechselt wird. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Substratkonzentration $\frac{dS}{dt} = 0$ beträgt, wodurch Gleichung (2) zu Gleichung (5) umgeformt werden kann [97]. Das verwendete Programm löst die Differentialgleichungen numerisch unter Nutzung des Runge-Kutta-Verfahrens vierter Ordnung [97]. Die berechnete Pumprate wird direkt an die Pumpe weitergeleitet. Die für die Berechnung nötigen Startparameter sind in Tabelle 3 gezeigt.

6.1.2.2.7 Offline-Analytik während der Kultivierungen

Für die offline-Analytik wird aus dem Rührkessel- bzw. Einweg-Beutel-Reaktor je Probenahme 10 mL Kulturvolumen entnommen und für die folgenden Analysen verwendet.

Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD_{600}) wird bei 600 nm photometrisch bestimmt (Libra S80, Biochrom GmbH). Als Referenz dient 0,9 %ige Salinelösung. Proben, die einen Wert von $OD_{600}=0,4$ überschreiten, werden mit 0,9 %iger Salinelösung verdünnt.

Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Biotrockenmasse (BTM) wird durch Gewichts Differenz bestimmt. Für die Bestimmung wird 1 mL Probe in ein trockenes 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge™ pico; Thermo Fisher Scientific). Anschließend wird der Überstand verworfen, das Pellet für 48 h bei 80 °C getrocknet und das Gewicht des trockenen Pellets bestimmt.

Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration wird basierend auf einer enzymatischen Nachweismethode bestimmt (YSI 2900, YSI Incorporated). Es wird der zellfreie Überstand nach Zentrifugation (5 min bei 13.000 rpm, Heraeus™ Biofuge™ pico,

Thermo Fisher Scientific) vermessen. Die Proben sollten in einem Glucosekonzentrationsbereich von 0 bis 10 g/L liegen. Eventuelle Verdünnungen werden mit Wasser durchgeführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration während der Kultivierungen wird mit dem Bradford-Assay bestimmt. Die Standardreihe wird im Bereich zwischen 0 mg/L und 2.000 mg/L mit bovinem Serumalbumin angesetzt. Zur Bestimmung werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte 10 µL der Standardlösungen bzw. der Proben mit 300 µL Coomassie-Plus Reagenz (Thermo Fisher Scientific) versetzt, für 30 s geschüttelt und anschließend unter Lichtausschluss für 10 min inkubiert. Die Proben werden nach der Inkubation bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen (Multiskan® Spectrum, Thermo Fisher Scientific).

Bestimmung der Polysialinsäure-Konzentration

Die PolySia-Konzentration wird mit dem TBA-Assay bestimmt. Die Standardreihe wird im Bereich zwischen 0 g/L und 0,75 g/L mit kommerzieller PolySia (Sigma-Aldrich) angesetzt. Zur Bestimmung werden die zellhaltigen Proben vorbehandelt und der Überstand nach Zentrifugation (5 min bei 13.000 rpm, Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Zunächst werden 50 µL der Standardlösung bzw. der Probe in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 200 µL Hydrolyselösung (50 mM Phosphorsäure (H₃PO₄)) versetzt und 18 h bei 70 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 100 µL 0,1 M Natronlauge neutralisiert und nach Zugabe von 100 µL Oxidationslösung

(siehe Tabelle 16) für 30 min bei 37 °C behandelt. Nach der Oxidation wird 500 µL Reduktionslösung (siehe Tabelle 17) zugegeben und die Probe so lange durchmischt bis sich die teilweise bräunlich gefärbte Lösung entfärbt. Anschließend wird zu der Probe 500 µL TBA-Lösung gegeben (siehe Tabelle 18) und die Probe für 13 min bei 95 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe für etwa 30 s auf Eis abgekühlt und 200 µL Probe in eine 96-well-Mikrotiterplatte übertragen und die Absorption bei 549 nm photometrisch bestimmt (Multiskan® Spectrum, Thermo Fisher Scientific).

Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Acetatkonzentration wird mittels einer HPLC-Methode bestimmt. Die Standardreihe wird im Bereich zwischen 0,6 g/L und 12 g/L mit Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$) angesetzt. Vor der Messung werden die Proben sterilfiltriert. Die verwendete Polymersäule (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, Inc.) wird im Säulenofen auf 55 °C temperiert. Die Proben werden mit 5 mM Schwefelsäure (H_2SO_4) bei einer Flussrate von 0,6 mL/min isokratisch eluiert. Die Detektion erfolgt mittels Brechungsindexdetektor (LaChrom RI-Detector L-7490, Merck KGaA).

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Gesamtmenge an PolySia wird nach Zellaufschluss mittels Ultraschall bestimmt. Der Zellaufschluss erfolgt mit 1 mL zellhaltiger Probe dreimal für je 30 s bei einer aktiven Periode von 0,6 /s und einer Amplitude von 100 % (Labsonic® M, Sartorius Stedim Biotech GmbH). Zwischen den Ultraschallbehandlungen wird die Probe für 30 s auf Eis gekühlt. Nach der Behandlung wird die Probe für 5 min bei

13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge™ pico; Thermo Fisher Scientific) und der Überstand für die weiteren Messungen verwendet.

6.1.2.3 Downstream Processing

Im Folgenden sind die Arbeitsschritte zur Herstellung reiner PolySia aus der Kulturbrühe nach der Kultivierung beschrieben.

6.1.2.3.1 Reifeprozess und Zellabtrennung

Nach der Kultivierung im Einweg-Beutel-Reaktor kann die Kulturbrühe bis zur Zellabtrennung direkt im Einwegbeutel gelagert werden. Die Lagerung erfolgt bei 8 °C für 17 h. Die Zellen werden durch kontinuierliche Zentrifugation (Heraeus™ Contifuge Stratos™, Thermo Fisher Scientific) abgetrennt. Die Zellabtrennung erfolgt bei 17.000 rpm und 4 °C bei einer Flussrate von 100 mL/min.

6.1.2.3.2 Aufkonzentrierung mittels Cross-flow Ultrafiltration

Der Überstand nach der kontinuierlichen Zentrifugation wird durch Cross-flow Ultrafiltration (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit einer Filterkassette mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Sartocon® Slice Hydrosart® Cassette, Sartorius Stedim Biotech GmbH) auf ein Volumen von 250 mL aufkonzentriert. Der Druck vor der Filterkassette wird durch automatische Anpassung der Pumprate auf maximal 2 bar reguliert.

6.1.2.3.3 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit dem Konzentrat nach der Cross-flow Ultrafiltration. Die Fällung wird jeweils bei einer Endkonzentration von 80 % v/v Ethanol in der Probelösung durchgeführt. Nach der Ethanolzugabe wird die Lösung jeweils für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Präzipitat nach dem ersten Fällungsschritt für 15 min, nach dem zweiten Fällungsschritt für 20 min und nach dem dritten Fällungsschritt für 60 min bei 4.700 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Multifuge™ X3 FR mit Ausschwingrotor Round bucket 75003608, Thermo Fisher Scientific). Zwischen den Fällungsschritten wird das Präzipitat in Wasser gelöst. Nach dem finalen Fällungsschritt wird das Präzipitat in 400 mL Wasser gelöst.

6.1.2.3.4 Tonmineralienbehandlung

Die Probe nach der Ethanolfällung wird mit Tonmineralien (EX M 1753, Clariant AG) weiterbehandelt. Ein Überblick über die durchschnittliche Zusammensetzung der Tonmineralien ist in Tabelle 5 gezeigt. Zunächst werden 40 g der Tonmineralien in 200 mL 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH=7) für 1 h unter Rühren equilibriert. Anschließend wird die Probe zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur mit den Tonmineralien behandelt. Im Anschluss werden die Tonmineralien durch Zentrifugation (Multifuge™ X3 FR mit Ausschwingrotor Round bucket 75003608, Thermo Fisher Scientific), bei 4.700 rpm und 4 °C für 15 min, entfernt.

6.1.2.3.5 Natriumhydroxidbehandlung

Nach der Tonmineralienbehandlung wird die Probelösung mit NaOH behandelt. Durch Zugabe von 2 M Natronlauge wird der pH-Wert auf pH=13 eingestellt. Anschließend wird die Probelösung bei pH=13 für 16 – 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 10 mM Triethanolamin (siehe Kapitel Evaluation der Membranadsorber) bzw. 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (siehe Kapitel Upscale der Aufreinigung mittels Membranadsorber) zugegeben und der pH-Wert mit 1 M Salzsäure auf pH=7,4 eingestellt. Abschließend wird die Probelösung bei einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (Sartolab®, Sartorius Stedim Biotech GmbH).

6.1.2.3.6 Membranadsorberbehandlung

Evaluation der Membranadsorber

Die Evaluation der Membranadsorber erfolgt nach der Natriumhydroxidbehandlung in einem FPLC-System (ÄKTA™ pure 25 L, GE Healthcare) mit Sartobind® Q 75-Modulen (Membranfläche: 75 cm², Säulenvolumen (CV): 2,1 mL, Sartorius Stedim Biotech GmbH). Die genutzte Systemsoftware ist Unicorn™ 6.4 (GE Healthcare). Die Membranadsorbermodule werden zunächst mit 5 CV Laufpuffer (100 mM Triethanolamin, pH=7,4) equilibriert. Anschließend wird die Probelösung aufgegeben und mit 5 CV Laufpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt über 20 CV mit einem linearen Gradienten mit Elutionspuffer (1 M NaCl). Vor der nächsten Probenaufgabe werden die Membranadsorbermodule erneut mit 5 CV Laufpuffer equilibriert. Die Flussrate beträgt 15 mL/min und es findet eine fraktionierte Sammlung der Proben für weitere Analysen statt.

Upscale der Aufreinigung mittels Membranadsorber

Die Anpassung der Modulgröße der Membranadsorber erfolgt mit Sartobind® Q 75 mL-Modulen (Membranfläche: 2.700 cm², CV: 75 mL, Sartorius Stedim Biotech GmbH). Im Gegensatz zum während der Evaluation der Membranadsorber verwendeten Laufpuffer wird als Laufpuffer 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH=7,4) verwendet, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Reste von Triethanolamin nach der Aufreinigung im Produkt verbleiben. Die Membranadsorber werden zunächst mit 5 CV Laufpuffer equilibriert und anschließend die Probe aufgegeben. Nach einem Waschschrift mit 5 CV Laufpuffer wird die PolySia isokratisch mit 5 CV 0,75 M NaCl eluiert. Vor einer erneuten Probenaufgabe wird erneut mit 5 CV Laufpuffer equilibriert. Die aufgetragene Probenmenge wird an die ermittelte maximale dynamische Bindungskapazität (siehe Kapitel 4.2.5.2 Membranadsorberbehandlung) der Adsorbermodule angepasst. Die Flussrate beträgt 100 mL/min.

6.1.2.3.7 Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen

Die Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen wird als produktschonendere Alternative zur Natriumhydroxid- und der anschließenden Membranadsorberbehandlung getestet. Als Material für die Tests mit den Affinitätssäulen wird langkettige PolySia nach Proteinentfernung, Entsalzung und Trocknung verwendet (siehe Kapitel 4.2.4 Einfache und effiziente Entfernung von Proteinen). Die verwendeten Affinitätssäulen sind EndoTrap® HD-Säulen (Hyglos GmbH) und Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns (Thermo Fisher Scientific). Die Affinitätssäulen werden in Kapitel 4.2.5.3 Endotoxinentfernung mittels Affinitätssäulen beschrieben. Alle Puffer und verwendeten Lösungen werden mit endotoxinfreiem Wasser (HyPure™ Cell Culture Grade Water, GE Healthcare) angesetzt.

Die EndoTrap® HD-Säulen werden zunächst zweimal mit je 3 mL Regenerationspuffer (Hyglos GmbH) gewaschen. Im Anschluss werden die Säulen zweimal mit je 3 mL Equilibrierungspuffer (Hyglos GmbH) equilibriert. Die Probe wird nach Zugabe von 0,1 mM Calciumcarbonat (CaCO_3) aufgegeben und nach dem Durchlauf aufgefangen. Die Durchlaufgeschwindigkeit wird durch die Gravitationskraft vorgegeben.

Die Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns werden zunächst über Nacht mit 0,2 M Natronlauge inkubiert und anschließend mit 2 M NaCl behandelt. Danach werden die Säulen zunächst mit endotoxinfreiem Wasser und im Anschluss dreimal mit dem Probenpuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH=7) gewaschen. Nach dem Waschschrift wird die Probelösung in Probenpuffer aufgegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen werden zwischen den Schritten durch Zentrifugation bei 500 g entfernt. Die Probelösung wird nach der Behandlung aufgefangen und für weitere Analysen verwendet.

6.1.2.3.8 Entsalzung

Die Entsalzung der Probelösung erfolgt mittels Dialyse. Die verwendete Dialysemembran (Visking®, Carl Roth GmbH & Co. KG) hat eine Ausschlussgrenze von 14 kDa. Vor der Verwendung wird die Dialysemembran zweimal für je 10 min in einer 600 mL-Lösung mit 12 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und 0,228 g Natrium-Ethylen-diamintetraessigsäure (Na-EDTA) aufgeköcht und zwischen den Schritten und im Anschluss mit VE-Wasser gewaschen. Die Dialyse der Probelösung erfolgt für 24 h gegen 5 L Reinstwasser mit 5,5 g NaCl und 20 μL 10 %iger NaOH und anschließend zweimal für je 24 h gegen 5 L Reinstwasser mit 20 μL 10 %iger NaOH. Die Dialyseschritte erfolgen jeweils bei 8 °C.

6.1.2.3.9 Trocknung

Nach der Dialyse wird die Probelösung gefriergetrocknet (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Die Lösung wird zunächst eingefroren und anschließend bei -20 °C und 0,04 mbar bis zur vollständigen Trocknung gefriergetrocknet.

6.1.2.4 Produktanalytik

6.1.2.4.1 Proteinanalytik

Neben der Bestimmung mit dem in Kapitel Bestimmung der Proteinkonzentration beschriebenen Bradford-Assay wird die Proteinmenge photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

6.1.2.4.2 DNA-Analytik

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung wird mittels PCR, gefolgt von einer Agarosegelelektrophorese, geprüft, ob geringe DNA-Restmengen im Produkt vorhanden sind. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen: 10 µL 5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega Corporation), 4 µL dNTP-Mix (jeweils 2 mM, Thermo Fisher Scientific), 2 µL Primermix (*E. coli* forward: 5'-GAGCGCAACCCTTATCCT-3', *E. coli* reverse: 5'-GGTTCCTACGGTTAC-3') (MWG-Biotech AG), 1 µL Template und 0,25 µL GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega Corporation) in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Die Amplifizierung erfolgt nach initialer Denaturierung von 5 min bei 95 °C für 40 Zyklen wie folgt: 95 °C für 30 s, 51 °C für 30 s und 72 °C für 30 s. Nach einer finalen Elongation bei 72 °C für 5 min wird die PCR gestoppt und die Proben bei 4 °C gelagert.

Für die Agarosegelelektrophorese wird ein 1,5 %iges Agarosegel mit 0,005 % v/v HDGreen™ (Intas Science Imaging Instruments GmbH) verwendet. Die Probenmenge beträgt 20 µL und der Gellauf erfolgt für 1 h bei 110 V. Als Marker wird der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

6.1.2.4.3 Bestimmung der Endotoxinkonzentration

Der Endotoxingehalt der Proben wird mit dem Endosafe®-PTS™-System (Charles River Laboratories) bestimmt. Die Proben werden in endotoxinfreiem Wasser angesetzt bzw. mit endotoxinfreiem Wasser verdünnt, wenn notwendig.

6.1.2.4.4 Metallionenanalyse

Die Metallionenanalyse wird mittels optischer Emissionsspektrometrie (ICP-OES) durchgeführt. Die Proben werden extern vermessen (SGS Institut Fresenius GmbH). Vor der Messung werden die Proben mit Salpetersäure (HNO₃) angesäuert.

6.1.2.4.5 Kettenlängenbestimmungen

HPLC-Bestimmung mit Fluoreszenzdetektion (DMB-HPLC)

Die maximale Kettenlänge der PolySia wird mit der DMB-HPLC-Methode bestimmt. Zunächst wird 50 µL zellfreie Probe mit 20 µL Reinstwasser, 80 µL 20 mM Trifluoressigsäurelösung (TFA-Lösung) und 80 µL DMB-Lösung (siehe Tabelle 19) versetzt und für 24 h bei 10 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Reaktion mit 20 µL 1 M NaOH gestoppt. Die fluoreszenzmarkierten Proben werden über eine DNAPac™ PA100-Säule (Thermo Fisher Scientific) getrennt. Das Injektionsvolumen beträgt 25 µL und die Detektion erfolgt über einen Fluoreszenzdetektor (RF-20A, Shimadzu) bei einer Extinktionswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Die Flussrate beträgt 1 mL/min. Als Laufpuffer wird Reinstwasser und als Elutionspuffer 4 M Ammoniumacetatlösung verwendet. Das Gradientenprofil ist in Tabelle 20 gezeigt.

Tabelle 20: Gradientenprofil der DMB-HPLC.

| Zeit | Reinstwasser | 4 M Ammoniumacetatlösung |
|----------------|---------------------|---------------------------------|
| 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 |

Native Gelelektrophorese

Neben der DMB-HPLC-Methode wird die Kettenlänge der PolySia durch eine native Gelelektrophorese eingeordnet. Zur Analyse werden 18 %ige Tris-Glycin Gele (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Die Färbelösung ist 50 %iges Methanol (CH₃OH) mit 4 mg Stains-All (C₃₀H₂₇BrN₂S₂). Dextransulfate mit bekannten Größen (DXS 5 HS und DXS 10 HS, TDB Consultancy AB) dienen als Marker. Die Proben werden 1:1 mit Tris-Glycine Native Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Als Laufpuffer wird Tris-Glycine Native Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Probenmenge beträgt 10 µL. Die Elektrophorese läuft 90 min bei 125 V. Nach der Elektrophorese werden die Gele in Wasser entfärbt, um die Intensität des Hintergrundes zu reduzieren.

6.1.2.4.6 NMR-Untersuchungen

Die Probenkonzentration für die NMR-Untersuchungen liegt bei 40 g/L. Die Probe wird in Deuteriumoxid (D₂O) gelöst. Eine genaue Beschreibung der NMR-Untersuchungen ist in Kapitel 4.3.2.2 NMR-Untersuchungen gegeben.

6.1.2.5 Stabilitätstests und Produktmodifikationen

6.1.2.5.1 Stabilität in Kulturbrühe

Für die Stabilitätstests in Kulturbrühe wird die PolySia nach der Kultivierung bei 8 °C gelagert. Die Stabilität wird mittels der DMB-HPLC-Methode überprüft. Zunächst werden die Zellen durch Zentrifugation (Multifuge™ X3 FR mit Ausschwingrotor Round bucket 75003608, Thermo Fisher Scientific), bei 4.700 rpm und 4 °C für 20 min, entfernt. Der zellfreie Überstand wird vor der Messung mit Ultrazentrifugationsröhrchen mit einem MWCO von 10 kDa (Vivaspin® 20, Sartorius Stedim Biotech GmbH) behandelt, um niedermolekulare Verunreinigungen, welche die DMB-HPLC-Methode stören, zu entfernen. Die Proben werden bei 4.700 rpm und 4 °C (Multifuge™ X3 FR mit Ausschwingrotor Round bucket 75003608, Thermo Fisher Scientific) bis zu einem verbleibenden Volumen von 5 mL zentrifugiert, anschließend mit Reinstwasser auf 20 mL aufgefüllt und erneut bis zu einem Endvolumen von 5 mL zentrifugiert. Neben der Kettenlängenbestimmung wird eine PolySia-Konzentrationsbestimmung bei allen Proben durchgeführt.

6.1.2.5.2 Stabilität aufgereinigter PolySia

Die Stabilität aufgereinigter PolySia wird in Lösung und als Feststoff überprüft. Die Lagerung erfolgt jeweils bei 8 °C und Raumtemperatur. Die Konzentration der gelagerten PolySia in Lösung beträgt 1 g/L. Die PolySia-Lösung wird mit Reinstwasser angesetzt. Die Stabilität wird mit der DMB-HPLC-Methode getestet.

6.1.2.5.3 Stabilität unter Stressbedingungen und thermische Hydrolyse

Die Stabilität der PolySia unter Stressbedingungen und die thermische Hydrolyse werden mit aufgereinigter PolySia in Lösung durchgeführt. Die Konzentration der PolySia beträgt 1 g/L. Die Lösungen werden mit Reinstwasser angesetzt und bei 37 °C bzw. 65 °C im Thermocycler für die unterschiedlichen Zeiträume inkubiert. Die Stabilität bzw. die Hydrolyse wird mittels DMB-HPLC-Methode überprüft.

Literaturverzeichnis

- [1] Kayser, O., Grundwissen pharmazeutische Biotechnologie. Chemie in der Praxis, 1st Ed., Teubner, Stuttgart u.a. 2002.
- [2] Walsh, G., Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nature biotechnology 2014, 32, 992–1000.
- [3] Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R., Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology 1998, 9, 497–501.
- [4] Bernardez Clark, E. de, Refolding of recombinant proteins. Current Opinion in Biotechnology 1998, 9, 157–163.
- [5] Fink, A. L., Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Folding and Design 1998, 3, R9-R23.
- [6] Rajan, R. S., Illing, M. E., Bence, N. F., Kopito, R. R., Specificity in intracellular protein aggregation and inclusion body formation. PNAS 2001, 98, 13060–13065.
- [7] Tambuyzer, E., Rare diseases, orphan drugs and their regulation: Questions and misconceptions. Nature reviews. Drug discovery 2010, 9, 921–929.
- [8] Schaeffer, D., Haslbeck, J., Bewältigung chronischer Krankheit, in: Richter, M., Hurrelmann, K. (Eds.), Soziologie von Gesundheit und Krankheit. Lehrbuch, 1st Ed., Springer VS, Wiesbaden 2016, pp. 243–256.
- [9] Buchkremer, R., Thibaut, U., Pharmaunternehmens-Management, Forschung und Entwicklung und Medizinökonomie, in: Thielscher, C. (Ed.), Medizinökonomie 2: Unternehmerische Praxis und Methodik. FOM-Edition, 2nd Ed., Springer Gabler, Wiesbaden 2017, pp. 93–130.
- [10] Nadin, A., Hattotuwagama, C., Churcher, I., Leitstruktur-orientierte Synthese: Eine Alternative für die Synthesechemie. Angew. Chem. 2012, 124, 1140–1149.

- [11] Fischer, D., Breitenbach, J., Die Pharmaindustrie: Einblick – Durchblick – Perspektiven, 4th Ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2013.
- [12] Kubinyi, H., Drug research: Myths, hype and reality. Nature reviews. Drug discovery 2003, 2, 665–668.
- [13] Kennedy, T., Managing the drug discovery/development interface. Drug Discovery Today 1997, 2, 436–444.
- [14] Bergmann, A. (Ed.), Pharma-Einkauf: Qualitätsorientierte Prozesse - Rechtliche Rahmenbedingungen - Trends, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2018.
- [15] Bortz, J., Lienert, G. A., Barskova, T., Leitner, K. et al., Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung: Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben ; mit 97 Tabellen sowie zahlreichen Formeln. Springer-Lehrbuch, 3rd Ed., Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2008.
- [16] Schumacher, M., Schulgen, G., Methodik klinischer Studien: Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung. Statistik und ihre Anwendungen, Springer, Berlin, Heidelberg 2008.
- [17] Victor, N., Schäfer, H., Nowak, H., Bethge, H. et al. (Eds.), Arzneimittelforschung nach der Zulassung: Bestandsaufnahme und Perspektiven. Medizinische Informatik und Statistik, Vol. 73, Springer, Berlin, Heidelberg 1991.
- [18] Willmann, J. K., van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., Gambhir, S. S., Molecular imaging in drug development. Nature reviews. Drug discovery 2008, 7, 591–607.
- [19] Dimasi, J. A., New drug development in the United States from 1963 to 1999. Clinical pharmacology and therapeutics 2001, 69, 286–296.
- [20] Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C. et al., How to improve R&D productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. Nature reviews. Drug discovery 2010, 9, 203–214.

- [21] Zambrowicz, B. P., Sands, A. T., Knockouts model the 100 best-selling drugs-
-will they model the next 100? *Nature reviews. Drug discovery* 2003, 2, 38–51.
- [22] DiMasi, J. A., Hansen, R. W., Grabowski, H. G., The price of innovation: New
estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* 2003, 22, 151–
185.
- [23] Adams, C. P., van Brantner, V., Estimating the cost of new drug development:
Is it really 802 million dollars? *Health affairs (Project Hope)* 2006, 25, 420–428.
- [24] Kola, I., The state of innovation in drug development. *Clinical pharmacology
and therapeutics* 2008, 83, 227–230.
- [25] Kühn, R., Qualitätssicherung in der pharmazeutischen Industrie am Beispiel
einer Tabletten-Herstellung. *Chemie Ingenieur Technik* 1993, 65, 1243–1247.
- [26] Unger, C., Skottman, H., Blomberg, P., Dilber, M. S. et al., Good manufacturing
practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Human molecular
genetics* 2008, 17, R48-53.
- [27] Werner, G., Dörmann, D., Krüger, D., GMP-gerechte Herstellung von
Gentransfer-Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung -
Gesundheitsschutz* 2001, 44, 1090–1094.
- [28] Kutz, G., Wolff, A. (Eds.), *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*, Wiley-
VCH, Weinheim 2007.
- [29] Große, J., Ruch, U., Tiedemann, G., Qualitätsmanagement bei neu
gegründeten Life-Science-Unternehmen, in: Becker, J., Villinger, T. R. (Eds.), *Life
Science Venturing: Herausforderung - Spezifika - Prozess*, Springer Gabler,
Wiesbaden 2017, pp. 97–116.
- [30] Margulies, A., Kroner, T., Gaisser, A., *Onkologische Krankenpflege*, 6th Ed.,
2017.

- [31] Walsh, G., Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology* 2010, 28, 917–924.
- [32] Eibl, R., Eibl, D., Single-use technology in biopharmaceutical manufacture, 2010.
- [33] Eibl, R., Kaiser, S., Lombriser, R., Eibl, D., Disposable bioreactors: The current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 86, 41–49.
- [34] Eibl, R., Kaiser, S., Lombriser, R., Eibl, D., Disposable bioreactors: The current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 86, 41–49.
- [35] Shukla, A. A., Gottschalk, U., Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends in biotechnology* 2013, 31, 147–154.
- [36] Hammond, M., Marghitoiu, L., Lee, H., Perez, L. et al., A cytotoxic leachable compound from single-use bioprocess equipment that causes poor cell growth performance. *Biotechnology progress* 2014, 30, 332–337.
- [37] Shah, R. R., Linville, T. W., Whynot, A. D., Brazel, C. S., Evaluating the toxicity of bDtBPP on CHO-K1 cells for testing of single-use bioprocessing systems considering media selection, cell culture volume, mixing, and exposure duration. *Biotechnology progress* 2016, 32, 1318–1323.
- [38] Jurkiewicz, E., Husemann, U., Greller, G., Barbaroux, M. et al., Verification of a new biocompatible single-use film formulation with optimized additive content for multiple bioprocess applications. *Biotechnology progress* 2014, 30, 1171–1176.
- [39] Jossen, V., Eibl, R., Pörtner, R., Kraume, M. et al., Stirred Bioreactors, in: Larroche, C., Sanroman, M. A., Du, G. (Eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls*, 2016, pp. 179–215.

- [40] Vries, I. de, Busse, C., Kopatz, J., Neumann, H. et al., Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor. Eng. Life Sci. 2017, 17, 723–731.
- [41] Larroche, C., Sanroman, M. A., Du, G. (Eds.), Current developments in biotechnology and bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls, 2016.
- [42] Traving, C., Schauer, R., Structure, function and metabolism of sialic acids. Cellular and molecular life sciences : CMLS 1998, 54, 1330–1349.
- [43] Bice, I., Optimierung der biosynthetischen Produktion von Polysialinsäure und Oligosialinsäure aus *Escherichia coli* K1, Hannover, Univ., Diss, 2012.
- [44] Rode, B., Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1, Hannover, Univ., Diss, 2008.
- [45] Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., Polysialic acid: Three-dimensional structure, biosynthesis and function. Current Opinion in Structural Biology 1998, 8, 558–564.
- [46] Lin, B.-X., Qiao, Y., Shi, B., Tao, Y., Polysialic acid biosynthesis and production in *Escherichia coli*: Current state and perspectives. Applied microbiology and biotechnology 2016, 100, 1–8.
- [47] Drake, P. M., Nathan, J. K., Stock, C. M., Chang, P. V. et al., Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 2008, 181, 6850–6858.
- [48] Inoue, S., Inoue, Y., Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. The Journal of biological chemistry 2001, 276, 31863–31870.
- [49] Nakata, D., Troy, F. A., 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. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280, 38305–38316.

[50] Rode, B., Endres, C., Ran, C., Stahl, F. et al., Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. *Journal of biotechnology* 2008, 135, 202–209.

[51] Baumann, H., Brisson, J. R., Michon, F., Pon, R. et al., Comparison of the conformation of the epitope of .alpha.(2 .fwdarw. 8) polysialic acid with its reduced and N-acyl derivatives. *Biochemistry* 2002, 32, 4007–4013.

[52] Liu, J.-L., Zhan, X.-B., Wu, J.-R., Lin, C.-C. et al., An efficient and large-scale preparation process for polysialic acid by *Escherichia coli* CCTCC M208088. *Biochemical Engineering Journal* 2010, 53, 97–103.

[53] Vimr, E., Steenbergen, S., Cieslewicz, M., Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. *Journal of industrial microbiology* 1995, 15, 352–360.

[54] Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H., Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews* 2014, 94, 461–518.

[55] Weledji, E. P., Assob, J. C., The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Annals of medicine and surgery (2012)* 2014, 3, 77–81.

[56] Acheson, A., Sunshine, J. L., Rutishauser, U., NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *The Journal of cell biology* 1991, 114, 143–153.

[57] Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M. et al., Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280, 42971–42977.

- [58] Rutishauser, U., Landmesser, L., Polysialic acid in the vertebrate nervous system: A promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends in neurosciences* 1996, 19, 422–427.
- [59] Fujimoto, I., Bruses, J. L., Rutishauser, U., Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276, 31745–31751.
- [60] Rutishauser, U., Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* 2008, 9, 26–35.
- [61] Krug, L. M., Ragupathi, G., Hood, C., George, C. et al., Immunization with N-propionyl polysialic acid-KLH conjugate in patients with small cell lung cancer is safe and induces IgM antibodies reactive with SCLC cells and bactericidal against group B meningococci. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2012, 61, 9–18.
- [62] Khatua, B., Roy, S., Mandal, C., Sialic acids siglec interaction: A unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens. *The Indian Journal of Medical Research* 2013, 138, 648–662.
- [63] Colley, K. J., Kitajima, K., Sato, C., Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2014, 49, 498–532.
- [64] Wang, X., Li, X., Zeng, Y.-N., He, F. et al., Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *International journal of molecular medicine* 2016, 37, 197–206.
- [65] Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T., Kitajima, K., Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278, 13875–13880.

- [66] Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., Roth, J., Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *The Journal of biological chemistry* 1992, 267, 9965–9971.
- [67] Haastert-Talini, K., Schaper-Rinkel, J., Schmitte, R., Bastian, R. et al., In vivo evaluation of polysialic acid as part of tissue-engineered nerve transplants. *Tissue engineering. Part A* 2010, 16, 3085–3098.
- [68] Berski, S., van Bergeijk, J., Schwarzer, D., Stark, Y. et al., Synthesis and biological evaluation of a polysialic acid-based hydrogel as enzymatically degradable scaffold material for tissue engineering. *Biomacromolecules* 2008, 9, 2353–2359.
- [69] Haile, Y., Haastert, K., Cesnulevicius, K., Stummeyer, K. et al., Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials* 2007, 28, 1163–1173.
- [70] Steinhaus, S., Stark, Y., Bruns, S., Haile, Y. et al., Polysialic acid immobilized on silanized glass surfaces: A test case for its use as a biomaterial for nerve regeneration. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2010, 21, 1371–1378.
- [71] Lindhout, T., Iqbal, U., Willis, L. M., Reid, A. N. et al., Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108, 7397–7402.
- [72] Fernandes, A. I., Gregoriadis, G., The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: Implication in its pharmacokinetics. *International journal of pharmaceutics* 2001, 217, 215–224.
- [73] Fernandes, A. I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: Preparation, activity and pharmacokinetics. *Biochimica et biophysica acta* 1997, 1341, 26–34.

- [74] Jain, S., Hreczuk-Hirst, D. H., McCormack, B., Mital, M. et al., Polysialylated insulin: Synthesis, characterization and biological activity in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 2003, 1622, 42–49.
- [75] Constantinou, A., Epenetos, A. A., Hreczuk-Hirst, D., Jain, S. et al., Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation. *Bioconjugate chemistry* 2008, 19, 643–650.
- [76] Constantinou, A., Epenetos, A. A., Hreczuk-Hirst, D., Jain, S. et al., Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment. *Bioconjugate chemistry* 2009, 20, 924–931.
- [77] Gregoriadis, G., Fernandes, A., Mital, M., McCormack, B., Polysialic acids: Potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2000, 57, 1964–1969.
- [78] Tan, L. K. K., Carlone, G. M., Borrow, R., Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *The New England journal of medicine* 2010, 362, 1511–1520.
- [79] Liu, T., Guo, Z., Yang, Q., Sad, S. et al., Biochemical engineering of surface alpha 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 2000, 275, 32832–32836.
- [80] Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M. et al., Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 2011, 29, 8802–8826.
- [81] Shahraz, A., Kopatz, J., Mathy, R., Kappler, J. et al., Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. *Scientific reports* 2015, 5, 16800.
- [82] Werneburg, S., Buettner, F. F. R., Erben, L., Mathews, M. et al., Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. *Glia* 2016, 64, 1314–1330.

- [83] Karlstetter, M., Kopatz, J., Aslanidis, A., Shahraz, A. et al., Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina. *EMBO molecular medicine* 2017, 9, 154–166.
- [84] Jager, R. D., Mieler, W. F., Miller, J. W., Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* 2008, 358, 2606–2617.
- [85] Meyer, C. H., Holz, F. G., Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: Ranibizumab and bevacizumab. *Eye (London, England)* 2011, 25, 661–672.
- [86] Rofagha, S., Bhisitkul, R. B., Boyer, D. S., Sadda, S. R. et al., Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 2013, 120, 2292–2299.
- [87] Langmann, T., Fauser, S., Polysialinsäure zur Immunmodulation im Tiermodell der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2017, 234, 657–661.
- [88] Bice, I., Celik, H., Wolff, C., Beutel, S. et al., Downstream processing of high chain length polysialic acid using membrane adsorbers and clay minerals for application in tissue engineering. *Eng. Life Sci.* 2013, 13, 140–148.
- [89] Eibl, R., Werner, S., Eibl, D., Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications, in: Eibl, R., Abreu, G. d. (Eds.), *Disposable bioreactors. Advances in biochemical engineering, biotechnology*, Vol. 115, Springer, Heidelberg 2009, pp. 55–87.
- [90] Dreher, T., Husemann, U., Zahnw, C., Wilde, D. de et al., High Cell Density *Escherichia coli* Cultivation in Different Single-Use Bioreactor Systems. *Chemie Ingenieur Technik* 2013, 85, 162–171.

- [91] Jonczyk, P., Schmidt, A., Bice, I., Gall, M. et al., Strikt anaerobe Batch-Kultivierung von *Eubacterium ramulus* in einem neuartigen Einweg-Beutelreaktorsystem. *Chemie Ingenieur Technik* 2011, 83, 2147–2152.
- [92] Jonczyk, P., Takenberg, M., Hartwig, S., Beutel, S. et al., Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. *Journal of biotechnology* 2013, 167, 370–376.
- [93] Busse, C., Biechele, P., Vries, I. de, Reardon, K. F. et al., Sensors for disposable bioreactors. *Engineering in Life Sciences* 2017, 17, 940–952.
- [94] Yamanè, T., Shimizu, S., Fed-batch techniques in microbial processes, in: Fiechter, A., Aiba, S., Atkinson, B., Bylinkina, E. et al. (Eds.), *Bioprocess Parameter Control. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Vol. 30, Springer, Berlin, Heidelberg 1984, pp. 147–194.
- [95] Raddatz, L., Vries, I. de, Austerjost, J., Lavrentieva, A. et al., Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Eng. Life Sci.* 2017, 17, 931–939.
- [96] Weuster-Botz, D., Altenbach-Rehm, J., Arnold, M., Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 7, 163–170.
- [97] Chen, R., John, J., Rode, B., Hitzmann, B. et al., Comparison of polysialic acid production in *Escherichia coli* K1 during batch cultivation and fed-batch cultivation applying two different control strategies. *Journal of biotechnology* 2011, 154, 222–229.
- [98] Anspach, F. B., Endotoxin removal by affinity sorbents. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2001, 49, 665–681.
- [99] Magalhães, P. O., Lopes, A. M., Mazzola, P. G., Rangel-Yagui, C. et al., Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for*

Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques 2007, 10, 388–404.

[100] Petsch, D., Beeskow, T.C., Anspach, F.B., Deckwer, W.-D., Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997, 693, 79–91.

[101] Lee, S. Y., Choi, J. i., Han, K., Song, J. Y., Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology* 1999, 65, 2762–2764.

[102] Jain, S., Laing, P., Gregoriadis, G., Reduction of endotoxin in polysialic acids [Internet], Google Patents, 2008. Available from: <https://www.google.ch/patents/WO2008104811A1?cl=en>.

[103] Choi, J., Lee, S. Y., Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnology and bioengineering* 1999, 62, 546–553.

[104] Nho, K., Glower, D., Bredehoeft, S., Shankar, H. et al., Peg-Bovine Hemoglobin: Safety en a Canine Dehydrated Hypovolemic-Hemorrhagic Shock Model. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* 2009, 20, 511–524.

[105] Su, W., Cho, M., Nam, J.-D., Choe, W.-S. et al., Aptamer-Assisted Gold Nanoparticles/PEDOT Platform for Ultrasensitive Detection of LPS. *Electroanalysis* 2013, 25, 380–386.

[106] Inoue, S., Lin, S.-L., Lee, Y. C., Inoue, Y., An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology* 2001, 11, 759–767.

[107] Ludger Limited, Product Guide for LudgerTag™ DMB (1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene.2HCl) Sialic Acid Release and Labeling Kit 2011.

[108] ICH Expert Working Group, Stability testing of Biotechnological/Biological products (Q5C) 1995.

Unterstützende Arbeiten

Teile der praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden studentischen Abschlussarbeiten nach Vorgabe und in Zusammenarbeit mit dem Autor der Dissertation durchgeführt.

Bachelorarbeiten

- Laura Leykam: Produktion hochreiner Polysialinsäure. 04.2016 – 06.2016.
→ Teilergebnisse in Kapitel 4.2.5.1 und Kapitel 4.2.5.2.
- Mouna Ben Amor: Ausführlicher Vergleich eigens hergestellter und kommerziell verfügbarer Polysialinsäure. 02.2017 – 04.2017.
→ Teilergebnisse in Kapitel 4.3.1 und Kapitel 4.3.2.1.2.

Masterarbeiten

- Zawadi Hellmann: Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungs- und Lagerungsbedingungen auf den Polymerisationsgrad von in *Escherichia coli* hergestellter Polysialinsäure. 10.2016 - 04.2017.
→ Teilergebnisse in Kapitel 4.1.3, Kapitel 4.3.1.2 und Kapitel 4.4.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ingo de Vries
Geburtsdatum und -ort: 11.04.1990 in Norden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

2015 - 2018 **Promotionsstudium:** Chemie an der Leibniz Universität Hannover am Institut für Technische Chemie
Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften

2013 - 2014 **Masterstudium:** Applied Life Sciences an der Hochschule Emden/Leer am Standort Emden
Abschluss: Master of Engineering

2009 - 2013 **Bachelorstudium:** Biotechnologie/Bioinformatik an der Hochschule Emden/Leer am Standort Emden
Abschluss: Bachelor of Science

Schulbildung

2002 - 2009 Besuch des Ulrichsgymnasiums Norden
Abschluss: allgemeine Hochschulreife