

Analyse und Synthese von zyklischen Herstellungsprozessen
artifizieller Diversity Covering (DiCo) Malariavakzinkandidaten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften,
Dr. rer. nat.,
genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Sanja Martens
geboren am 09. Oktober 1985 in Henstedt-Ulzburg

2014

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferentin: Prof. Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 16. April 2014

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Januar 2014 im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysetechnik der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann und Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen angefertigt.

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann für die zur Verfügung gestellten Anlagen, Geräte und Materialien sowie die mir entgegengebrachte Unterstützung und Förderung. Seine wertvollen Anregungen und kritischen Diskussionen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Für die jederzeit kompetente und freundliche Betreuung und das in mich investierte Vertrauen gilt mein großer Dank Prof. Dr. Gesine Cornelissen.

Prof. Dr. Thomas Scheper und Prof. Dr. Ursula Rinas vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover danke ich für die Übernahme der Referate.

Für seine freundliche Kooperation und unkomplizierte Kommunikation sei Dr. Bart Faber (Department of Parasitology, Biomedical Primate Research Center, Rijswijk, Niederlande) gedankt. Im BPRC wurden die hier beschriebenen Malaria Impfstoffkandidaten unter der Federführung der European Malaria Vaccine Development Association (FKZ: LSHP-CT-2007-037506) entwickelt.

Pro Exzellenzia danke ich für mein Promotionsstipendium und das Qualifizierungsprogramm. Des Weiteren wurde diese Arbeit durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ: 01FP09124A) sowie die Max Buchner Forschungstiftung (FKZ: 2890) unterstützt.

Den an meiner Arbeit beteiligten Masteranden Jan-Patrick und David danke ich für ihren Einsatz und ihre eingebrachte Ergebnisse.

Die Zusammenarbeit in dem Labor BPA war von großer Kollegialität und einem tollen Arbeitsklima geprägt. Hier gilt mein spezieller Dank Hape und Uli, sowie Kai, Sven, Christian, Jens, Jessi, Kristof und nochmals Jan-Patrick, die mich durch zahlreiche Diskussionen und Ratschlägen unterstützten und mir jederzeit hilfsbereit und freundschaftlich zur Seite standen. Ich wünsche Euch allen viel Erfolg bei der Umsetzung Eurer Projekte!

Bei Christian möchte ich mich für seinen Beistand und Motivation in dieser Zeit besonders bedanken.

Den herzlichsten Dank meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das Verständnis.

Danke!

Kurzfassung

Sanja Martens

Analyse und Synthese von Herstellungsprozessen artificialer Diversity Covering (DiCo) Malariavakzinkandidaten

Die vorliegende Arbeit enthält eine umfassende Analyse und Charakterisierung der Expression potentieller Malariavakzine in Bioreaktorkultivierungen sowie eine Synthese zyklischer Produktionsprozesse mit der methylo trophen Hefe *Pichia pastoris*.

Bei den Zielproteinen handelt es sich um Bestandteile eines Multikomponentenvakzins, das am Biomedical Primate Research Center (BPRC) in Rijswijk, Niederlande, entwickelt wurde. Zur Verbreiterung der funktionellen Immunantwort beinhaltet dies eine Fusion von drei Diversity Covering (DiCo) Proteinen, die aus dem *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (PfAMA1) entwickelt wurden, mit modifizierten Formen des C-terminalen Fragments des Merozoite Surface Protein 1 (MSP1₁₉).

Für die Forschungsarbeiten standen hochinstrumentierte Laborbioreaktoren mit ergänzenden Messverfahren von u. a. Zelldichte und Methanolkonzentration zur Verfügung, mit denen vollautomatische Produktionsprozesse entwickelt werden konnten.

Zur Atline-Detektion der Zielproteine kam eine Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) Methode in einer HPLC-Anlage zum Einsatz, die von einer umfangreichen Offline-Analyse des extrazellulären Zielproteins sowie der intrazellulären Alkoholoxidase- und Zielproduktgehalte begleitet wurde.

Bei einer intensivierten Produktion der Malaria-Impfstoffkandidaten wechseln sich eine Zellanzucht auf Glycerol und eine anschließende Induktion der Zielproteinexpression auf Methanol zyklisch ab. Ernte- und Refresh-Operationen erlauben dabei die automatische Durchführung repetitiver Kultivierungssequenzen.

Über diese sequentielle Prozessführungsstrategie wurde mittels Statistischer Versuchsplanung (Design of Experiments) der Einfluss der Flüssigphasentemperatur und des pH-Wertes auf die volumetrische Produktivität, die Produktstabilität und auf den Metabolismus des Expressionssystems bei Wachstum auf Methanol untersucht.

Umfangreiches Datenmaterial führte zu einer detaillierten Modellierung der Expressionsvorgänge in zyklischer Produktion mit kybernetischen Modellansätzen, die eine sehr gute Beschreibung sowie eine Analyse des komplexen dynamischen zell-internen und zellexternen Prozessverlaufes zulassen.

Keywords:

Malaria-Impfstoffkandidaten, *Pichia pastoris*, sequentielle Produktion, Design of Experiments, Expressionsmodellierung und Prozesssimulation

Abstract

Sanja Martens

Analysis and synthesis of production processes for artificial Diversity Covering (DiCo) Malaria vaccine candidates

This work describes the extensive analysis and characterization of the expression of potential malaria vaccines in bioreactor cultivations as well as the synthesis of cyclic production processes with the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

The target proteins are a part of a multi component vaccine which was developed by the Biomedical Primate Research Center (BPRC) in Rijswijk, The Netherlands. It promises a broader functional immunity as it comprises a fusion of designed diversity covering (DiCo) *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (*PfAMA1*) proteins and modified forms of the 19 kDa C-terminal fragment of Merozoite Surface Protein 1 (*MSP1₁₉*).

Highly instrumented bioreactors with additional measurements for e. g. cell density and methanol concentration were configured to run fully automated and global on-line observable production processes.

An immobilized metal chelate affinity chromatography (IMAC) was established to detect the target proteins at-line. These measurements were accompanied by an extensive off-line analysis of the extracellular target protein and intracellular alcohol oxidase and target product contents.

For an intensified production of these Malaria vaccine candidates, a cell breeding on glycerol and a subsequent production phase on methanol alternate cyclically. These repetitive sequences can be performed automatically by implemented harvest and refresh equipment.

Using this sequential process control strategy, Design of Experiments was applied to investigate the influence of the liquid phase temperature and the pH value on the volumetric productivity and the product stability as well as on the metabolism of the expression system growing on methanol.

Substantial experimental data led to a detailed modeling of the expression dynamics in cyclic production using cybernetic approaches, which allow a sufficient description and analysis of the dynamic cell-internal and cell-external expression processes.

Keywords:

Malaria vaccine candidates, *Pichia pastoris*, sequential production, Design of Experiments, expression modeling and process simulation

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Hintergrund und Motivation	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	3
2	Die Zielproteine: Potentielle Malariavakzine	4
2.1	Die Herausforderung Malariaimpfstoff.....	4
2.2	Konstruktion artifizierender Multikomponentenvakzine	5
2.3	Kritische Qualitätsmerkmale der Zielprodukte	8
3	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	11
3.1	Das Expressionssystem	11
3.1.1	Die methylotrophe Hefe <i>Pichia pastoris</i>	11
3.1.2	Herstellung der Expressionsstämme	12
3.2	Der dreistufige Produktionsprozess.....	13
3.3	Eingesetzte Bioreaktor- und Automatisierungstechnik	15
4	Offline-Analytik	22
4.1	Gesamtproteinbestimmung	22
4.2	Bestimmung der Produktreinheit	22
4.3	Identifikations- und Antigenitätstest.....	23
4.4	Enzymatischer Alkoholoxidasenachweis	24
4.5	Zellinternes Zielprodukt	25
4.6	Glycerolanalytik	26
5	Online-Detektion der Zielprodukte	28
5.1	Der verwendete Messaufbau.....	28
5.2	Filtrationssonde ESIP	29
5.3	Anwendung verschiedener IMAC-Methoden	31
5.3.1	Detektion von D1M1 mittels Cu(II)-IMAC	32
5.3.2	Detektion von D1M1H mittels Ni(II)-IMAC in einstufiger Elution.....	33
5.3.3	Detektion von D1M1H mittels Ni(II)-IMAC in zweistufiger Elution	36
5.3.4	Detektion von GFPH mittels Ni(II)-IMAC	38
6	Mathematische Auswertung der Produktionsprozesse.....	41
6.1	Reaktionskinetische Charakterisierung	41
6.1.1	Bilanzierung des Reaktorsystems.....	41
6.1.2	Der gewählte Reaktionsansatz	46
6.1.3	Bestimmung der Reaktionsparameter.....	47
6.2	Bewertung der Produktbildung	53

7	Charakterisierung der Produktionsstämme	55
7.1	Potentielles Vakzin D1M1.....	55
7.2	Modifizierter Impstoffkandidat D1M1H.....	57
8	Entwicklung zyklischer Produktionsprozesse	62
8.1	Repeated Fed Batch Produktion von D1M1	62
8.2	Sequentielle Herstellung von D1M1H.....	64
9	Optimierung von Produktionsprozessen mit Design of Experiments	68
9.1	Systematische Untersuchung der Produktivität und Produktreinheit	68
9.1.1	Anwendung von Design of Experiments (DoE).....	68
9.1.2	Experimentelle Durchführung.....	70
9.1.3	Evaluation der Modelle	74
9.2	Betrachtung der zellspezifischen Reaktionsraten der Methanolaufnahme ..	78
10	Modellbildung der dynamischen Abläufe in zyklischer Produktion	84
10.1	Das kybernetische Modell der Proteinexpression.....	84
10.2	Induktion und Repression der Proteinexpression	85
10.2.1	Überexpression.....	86
10.2.2	Metabolisches Verzögerungssystem der Proteinbiosynthese	87
10.2.3	Produktdegradation in der Medienphase	89
10.3	Erprobung des Ursprungsmodells	90
10.4	Modellerweiterungen	92
10.4.1	Beschreibung der AOX-Expressionsdynamik	92
10.4.2	Modellierung der Methanolaufnahme.....	98
10.4.3	Die Simulation der Zielproteinexpression.....	101
11	Zusammenfassung	105
12	Anhang.....	107
12.1	Kultivierungsmedien	107
12.2	Offline-Messungen	108
13	Literatur	113

Nomenklatur

Symbole

A_C	:= UV-Absorption bei der Chromatografie	[AU]
$A_{C.E_j}$:= UV-Absorptionsmaximum im Elutionschritt E_j bei der Chromatografie	[AU]
a_{D2}	:= Eigenwert der AOX-Überexpressionsverzögerung	[h ⁻¹]
a_l	:= inverse Integrationszeitkonstante	[h ⁻¹]
a_{im}	:= Regressionskoeffizient für Faktor i des Gütekriteriums m	[div]
A_{P2S}	:= volumenbezogene AOX-Aktivität im Aufschlussansatz	[UI ⁻¹]
a_{Pji}	:= Anpassungskoeffizient i für Produkt P_j	[div]
a_{Pjk}	:= Eigenwertanteil des Turnover im Expressionsschritt k für Produkt P_j	[h ⁻¹]
a_{S2diff}	:= Methanoldiffusionskoeffizient der Zelle	[lg ⁻¹ h ⁻¹]
B_{jK}	:= Pixelintensität der SDS-PAGE Bande j der Probe aus Teilsystem K	[-]
b_{Pjk}	:= Eingangsverstärkung im Expressionsschritt k für Produkt P_j	[h ⁻¹]
c_{IK}	:= Konzentration der Komponente I im Teilsystem K	[gl ⁻¹]
C_{IK}	:= molare Konzentration der Komponente I im Teilsystem K	[moll ⁻¹]
d	:= Schichtdicke bei einer spektroskopischen Messung	[cm]
E	:= Extinktion bei einer spektroskopischen Messung	[-]
F	:= Verdünnungsfaktor einer Probe	[-]
F_K	:= Volumenstrom in/aus Teilsystem K	[h ⁻¹]
F_{Krel}	:= relative Zufütterrata aus Teilsystem K	[%]
Fl_C	:= Fluoreszenzsignal bei der Chromatografie	[FLU]
$Fl_{C.E_j}$:= Fluoreszenzmaximum im Elutionschritt E_j bei der Chromatografie	[FLU]
$g_{P1/X}$:= zellinterner Gehalt des Zielproduktes	[gg ⁻¹]
$g_{P2/X}$:= zellmassebezogene zellinterne Alkoholoxidaseaktivität	[Ug ⁻¹]
$G_{P4/X}$:= relativer zellinterner Gehalt des Produktes P_4	[-]
IA_C	:= Peakfläche im Chromatogramm	[AUs]
K, k	:= Konstante, Anpassungsparameter, Proportionalitätsfaktor	[div]
M_l	:= Molmasse der Komponente I	[gmol ⁻¹]
m_{lK}	:= Masse der Komponente I im Teilsystem K	[g]
m_K	:= Masse des Teilsystems K	[g]
MV	:= Modellvalidität bei der DoE-Anpassung	[-]
MW	:= Molekulargewicht eines Proteins	[kDa]
n	:= Anzahl von Messungen, Experimenten	[-]
N_{St}	:= Rührerdrehzahl	[min ⁻¹]
OD	:= optische Dichte	[AU]
p_G	:= Gesamtdruck in der Gasphase	[bar]

pH	:= pH-Wert	[-]
pI	:= isoelektrischer Punkt	[-]
pO ₂	:= relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[%]
P _{PjK}	:= Reinheit des Produktes P _j im Teilsystem K	[-]
PRD	:= volumetrische Produktivität der Zielproduktherstellung	[g ^l ⁻¹ h ⁻¹]
Q ²	:= Güte der Vorhersage eines DoE-Modells	[-]
Q _I	:= volumetrische Ver- oder Entsorgungsrate der Komponente I	[g ^l ⁻¹ h ⁻¹]
q _{I/X}	:= zellspezifische Reaktionsrate der Komponente I	[h ⁻¹]
q _{iO/X}	:= zellspezifische Sauerstoffaufnahme auf Substrat S _i	[h ⁻¹]
q _{iX/X}	:= zellspezifische Wachstumsrate auf Substrat S _i	[h ⁻¹]
Q _{P4/Xk}	:= zellspezifische Bildungsrate des Produktes P ₄ im Expressionsschritt k	[h ⁻¹]
R ²	:= Güte der Anpassung	[-]
R _{IK}	:= Wiederfindung der Komponente I im Teilsystem K	[-]
RP	:= Reproduzierbarkeit von DoE-Experimenten	[-]
RQ	:= molarer Respirationsquotient	[-]
S _{turb}	:= optisches Signal der Trübungsmessung	[AU]
T	:= Zeitkonstante	[h]
t _j	:= Zeitpunkt j	[h]
V _{Pj2ind}	:= Induktionsverstärkung durch Methanol bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
V _{Pj4rep}	:= Repressionsverstärkung durch Produkt P ₄ bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
V _{Pjkrep}	:= Repressionsverstärkung durch Substrat S _k bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
V _K	:= Volumen des Teilsystems K	[l]
x _{IG}	:= Stoffmengenanteil der Komponente I im Gasstrom G	[-]
y _{I/K}	:= Ausbeutekoeffizient der Komponente I aus Komponente K	[-]
y _m	:= Gütekriterium m	[div]
α _{Z/X}	:= Verhältnis von Biofeucht- zu Biotrockenmasse	[-]
ε	:= molarer Extinktionskoeffizient	[lμmol ⁻¹ min ⁻¹]
ϑ _L	:= Temperatur der Flüssigphase	[°C]
κ _{I24}	:= Inhibierungsordnung von Produkt P ₄ bei der Methanolumsetzung	[-]
κ _{j2ind}	:= Induktionsordnung von Methanol bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
κ _{j4rep}	:= Repressionsordnung von Produkt P ₄ bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
κ _{ji rep}	:= Repressionsordnung von Substrat S _i bei der Bildung von Produkt P _j	[-]
λ	:= Wellenlänge bei einer spektroskopischen Messung	[nm]
μ	:= zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
ρ _K	:= Dichte des Teilsystems K	[g ^l ⁻¹]
ρ _Z	:= Dichte feuchter Zellen	[g ^l ⁻¹]

Indizes

0	:= Startzeitpunkt
A	:= Analyse
acc	:= Akkumulation (accumulation)
act	:= Aktivität (activity)
AF	:= Antischaum (anti foam)
AIR	:= Luft (air)
at	:= atline
B	:= Puffer (buffer)
C	:= Chromatographiesystem, Regelung (control)
C, CO ₂	:= Kohlenstoffdioxid
CDW	:= Zelltrockenmasse (cell dry weight)
con	:= Überexpression (over expression control)
d	:= Proteinzersetzung (decay)
E	:= Elution
E _j	:= Elutionsschritt j
exp1	:= Expressionsschritt 1 (transcription)
exp2	:= Expressionsschritt 2 (translation)
exp3	:= Expressionsschritt 3 (protein processing)
fbk	:= AOX-Expressionsmitkopplung k (feedback)
G	:= Gasphase
gr	:= Wachstumsanteil (growth)
H	:= Ernte (harvest)
i, j, k, m	:= Zahlenindex, Laufvariable, Schritt
in	:= Eingang (input)
ind	:= Induktion (induction)
L	:= Flüssigphase (liquid)
m	:= Erhaltungsstoffwechsel (maintenance)
M	:= Medienphase
max	:= maximal
min	:= minimal
n	:= auf Gasnormbedingungen bezogen
O, O ₂	:= Sauerstoff
obs	:= beobachtet (observed)
OD	:= Optische Dichte (bei 600 nm)
off	:= offline

opt	:= optimal
out	:= Ausgang (output)
P1	:= Produkt 1 (Zielprotein)
P2	:= Produkt 2 (Alkoholoxidase)
P3	:= Produkt 3 (Spaltprodukt des Zielproteins)
P4	:= Produkt 4 (hypothetisches Inhibierungsprodukt)
Pn	:= Nebenprodukt n
Ptot	:= Gesamtprotein
R1	:= Reservoir 1 (Glycerol)
R2	:= Reservoir 2 (Methanol)
R3	:= Reservoir 3 (Refreshmedium)
rel	:= relativ oder Ausschleusung (release)
rep	:= Repression
S	:= Ansatz, Probe (sample)
S1	:= Substrat 1 (Glycerol)
S2	:= Substrat 2 (Methanol)
sec	:= Sekretion (secretion)
syn	:= Synthese (synthesis)
T	:= Gas/Flüssig-Transfer
T1	:= Titrationsbehälter 1 (Säure)
T2	:= Titrationsbehälter 2 (Base)
turb	:= Trübung (turbidity)
V	:= Verdampfungsverlust bei Begasung (volatility)
w	:= Sollwert
W	:= Waschschritt
Z	:= Biofeuchtphase

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Motivation

In den vergangenen 25 Jahren hat sich die Biotechnologie zu einer typischen Querschnittstechnologie für viele Branchen entwickelt und gilt als eine der zentralen Zukunftstechnologien unserer Zeit. Neuartige Produkte, Dienstleistungen, Verfahren und Prozesse finden heutzutage Einsatz in Ernährung, Landwirtschaft, Umweltschutz und Medizin sowie in industriellen Produktionsverfahren. Die treibende Kraft für diese Entwicklung war die Möglichkeit zur Herstellung von Fremdproteinen mit Hilfe von rekombinanten Organismen [BMWl, 2013; BMBF, 2012; Sciconomy, 2012; Thiemann und Palladino, 2007].

Besonders die Gesundheits- und Pharmaindustrie sind durch die Entwicklung und Herstellung von Biopharmazeutika wahrhaft revolutioniert worden. Dazu zählen neben rekombinanten Proteinen, wie z.B. Antikörper, Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren, auch Nukleinsäuren für Therapie und Diagnostik [Thiemann und Palladino, 2007; BMBF, 2012]. Trotzdem gibt es heutzutage noch einen verzweifelten Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Vorsorge und/oder Behandlung für viele verbreitete und tödliche Krankheiten [BPRC, 2013].

An Malaria, eine der am verbreitetsten und seit Jahrhunderten gefürchtetsten Infektionskrankheiten des Menschen, erlagen im Jahr 2010 laut [WHO, 2012] schätzungsweise 660 000 Menschen, während nach neuesten Hochrechnungen die Sterblichkeit mit 1.2 Millionen Todesfällen sogar wesentlich höher ausfällt [Murray et al., 2012]. Als wertvolle Ergänzung zu Kontroll- und Präventionsprogrammen, wie z. B. der Vektorkontrolle und Chemoprävention, wird ein wirksamer Impfstoff dringend benötigt.

Attraktive Kandidaten für einen Malaria-Impfstoff stellen zwei Oberflächenproteine des asexuellen Malaria-Parasiten, das *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (*PfAMA1*) und die C-terminale Region des Merozoite Surface Protein 1 (*MSP1₁₉*), dar. Gegen diese Proteine gerichtete Antikörper können die Vermehrung des parasitären Erregers *Plasmodium* erfolgreich unterdrücken [Kocken et al., 2002; Arnot et al., 2008], wobei der Polymorphismus des AMA1 das Vakzinpotential jedoch erheblich beeinträchtigt [Remarque et al., 2008].

Zur Verbreiterung der Immunantwort wurde daher im Department Parasitologie des Biomedical Primate Research Centre (BPRC, Rijswijk, Niederlande) das Design dreier künstlicher Diversity Covering (D1, D2, D3) *PfAMA1* Proteine [Remarque et al., 2008] und die Kombination mit zwei Allelvariationen (M1, M2) des relativ konservierten Proteins *MSP1₁₉* [Faber et al., 2007] verfolgt, was in vielversprechenden Fusionsproteinen resultierte [Faber et al., 2013].

Die beobachtete Degradation der rekombinant hergestellten AMA1- und D1M1-Moleküle reduziert jedoch die Ausbeute an intaktem Produkt [Kennedy et al., 2002; Faber et al., 2007; Faber et al., 2013].

Besonders vor dem Hintergrund der Armutskrankheit Malaria ist das Erreichen einer hohen Produktausbeute sowie Produktreinheit bei gleichzeitiger Minimierung der Kosten die oberste Zielsetzung eines erforderlichen biotechnologischen Produktionsprozesses.

Neben der Ergiebigkeit sind die korrekte Faltung und konstante Produktqualität wichtige Kriterien bei der Wahl eines Expressionssystems, das für die Produktion von Pharmazeutika zudem hohen Sicherheitsanforderungen genügen muss [Schmidt, 2004].

Durch die Fähigkeit zur Sekretion und zu posttranslationalen Modifikationen kombiniert die Hefe *Pichia pastoris* die Vorteile von höheren eukaryontischen Systemen mit den Annehmlichkeiten bakterieller Expression. So sind durch das schnelle Wachstum auf kostengünstigen Nährmedien zu sehr hohen Zelldichten attraktive Level des Zielproteins mit relativ geringem Aufwand und niedrigen Kosten zu erreichen [Cregg et al., 1993].

Dementsprechend weit verbreitet ist der Einsatz des Hostsystems *Pichia pastoris* zur Expression rekombinanter Proteine [Cregg, 2003; Schmidt, 2004; Macauley Patrick, 2005].

Das Verhalten von Mikroorganismen ist direkt an deren physikalische und chemische Umgebung gekoppelt, sodass jede Änderung dieser Umwelt zu einem anderen Ablauf der biologischen Prozesse führen kann. Die Entwicklung eines Herstellungsprozesses verkörpert daher die konsequente Anwendung des Wissens um diese Interaktionen und Phänomene, was sowohl eine systematische Analyse, als auch eine systematische Prozesssynthese erfordert [Präve et al., 1994].

Die Verfügbarkeit geeigneter Mess- und Regelungssysteme, sowie die Verarbeitung anfallender Messdaten bei der Prozessmodellierung und der Prozessoptimierung sind daher Grundvoraussetzung für eine zielführende Entwicklung von optimalen Bioprozessen [Scheper, 1991].

Dass eine Verbesserung der Produktqualität nur durch ein signifikant höheres Verständnis des Herstellungsprozesses erreicht werden kann, ist eine tragende Erkenntnis der Process Analytical Technology (PAT) Initiative der Food and Drug Administration (FDA) [FDA, 2004; Brendelberger, 2003; Scott und Wilcock, 2006]. Durch dieses Rahmenwerk sind eine umfangreiche Kontrolle und Analyse sowie Optimierung des Herstellungsprozesses für wissenschaftlich gesicherte Qualitätsstandards auch von äußerstem Interesse der pharmazeutischen Industrie.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Herstellungsprozess der kleinsten Fusionsproteine eines Impfstoffgemisches aus DiCo PfAMA1 und MSP1₁₉ Proteinen, D1M1 bzw. D1M1H, mit *Pichia pastoris* in Bioreaktorkultivierungen umfassend charakterisiert werden.

Die Unterdrückung oder Vermeidung einer Degradation des Produktes war dabei eine Zielfunktion der Entwicklung des Herstellungsprozesses.

Dafür standen hochinstrumentierte Forschungsbioreaktoren mit umfangreichen Mess- und Analysesystemen und damit ein hoher Automatisierungsgrad zur Verfügung, der bestmögliche Bedingungen für reproduzierbare Bioprozesse darstellt. Diese MSR-Technik sollte um eine Atline-Detektion der Zielproteine über eine Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) erweitert werden.

Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der Zielproteine waren geeignete Methoden zu etablieren, um neben der Produktausbeute die Produktreinheit und Antigenität bestimmen zu können.

Die Analyse des Zellzustandes sollte zusätzlich zu einer reaktionskinetischen Charakterisierung über eine Ermittlung des zellinternen Gehalts an Zielprodukt und Alkoholoxidase erfolgen, um letztlich eine hinreichende Beschreibung der extra- und intrazellulären Expressionsvorgänge zu ermöglichen.

Durch eine sequentielle Prozessführungsstrategie war eine sinnvolle Fahrweise der Bioreaktoranlage zur verlängerten Produktion der instabilen Malaria-Impfstoffkandidaten zu erarbeiten. Eine Entwicklung eines derartigen Produktionsprozesses erforderte den Nachweis von reproduzierbaren zellinternen Zyklen und zellexternen Zustandsgrößen.

In Anlehnung an vorangegangene Optimierungsuntersuchungen am Forschungs- und Transferzentrum für Bioprocess- und Analysetechnik der HAW Hamburg sollte daran anschließend eine Optimierung mittels Statistischer Versuchsplanung (DoE – Design of Experiments) in zyklischer Einreaktorstrategie durchgeführt werden.

Über diese effektive Methode war der Einfluss der Prozessbedingungen auf die volumetrische Produktivität und die Produktstabilität sowie auf den Metabolismus des Expressionssystems bei Wachstum auf Methanol hin zu untersuchen.

Die systematische Analyse der zellulären Proteinexpression und des zellexternen Proteinabbaus sollte zu einem verbesserten Verständnis des komplexen Prozesses und schließlich zu dessen optimaler Auslegung führen.

In einem weiteren, theoretischen Teil der Arbeit waren umfangreiche experimentelle Daten einer sequentiellen Modellkultivierung, die eine hinreichende Analyse und Beschreibung der Prozessverläufe zulassen, als Grundlage für eine mathematische Modellbildung und schließlich eine Simulation des Produktionsprozesses heranzuziehen.

Dies sollte einen Beitrag zur systembiologischen Analyse der Expressionsdynamik rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris* leisten und dadurch zu einem besseren Verständnis der komplexen Proteinexpression beitragen.

2 Die Zielproteine: Potentielle Malariavakzine

2.1 Die Herausforderung Malariaimpfstoff

Trotz 50 Jahre intensiver Forschung steht bisher kein Impfstoff gegen Malaria zur Verfügung. Eine Ursache ist die Biologie des parasitären Erregers mit seinem komplexen Entwicklungszyklus, sodass auch nach Jahren ständig wiederholter Infektionen bei Betroffenen nur ein labiler Schutz aufgebaut wird. Die Herstellung eines effektiven Impfstoffes fordert folglich noch besser als die Natur zu sein – eine der größten Herausforderungen biomedizinischer Forschung.

Hervorgerufen wird die Krankheit durch den eukaryotischen Parasiten *Plasmodium*. Von den fünf humanpathogenen Arten, die sich in Klinik und Verbreitung stark unterscheiden, ist *Plasmodium falciparum* die bedeutsamste als Erreger der vorherrschenden und tödlichen *Malaria tropica* [Richards und Beeson, 2009].

Mit dem Stich der weiblichen *Anopheles* Mücke, wird der Erreger auf den Menschen übertragen, wie in Abb. 2.1 gezeigt ist. Über den Blutstrom gelangt er als *Sporozoit* in Leberzellen und vermehrt sich dort klinisch unbemerkt.

Die Symptome äußern sich erst in der erythrozytären Phase, in der die als *Merozoiten* freigesetzten Parasiten rote Blutkörperchen befallen und eine zweite, starke Vermehrung folgt. Diese zyklische Replikation ist u. a. die Ursache der rhythmischen Fieberschübe. Wenige *Merozoiten* entwickeln sich zur Geschlechtsform, den *Gametozyten*, die sich bei erneuter Aufnahme durch eine Mücke geschlechtlich vermehren und so Neuinfektionen initiieren [Cox, 2010].

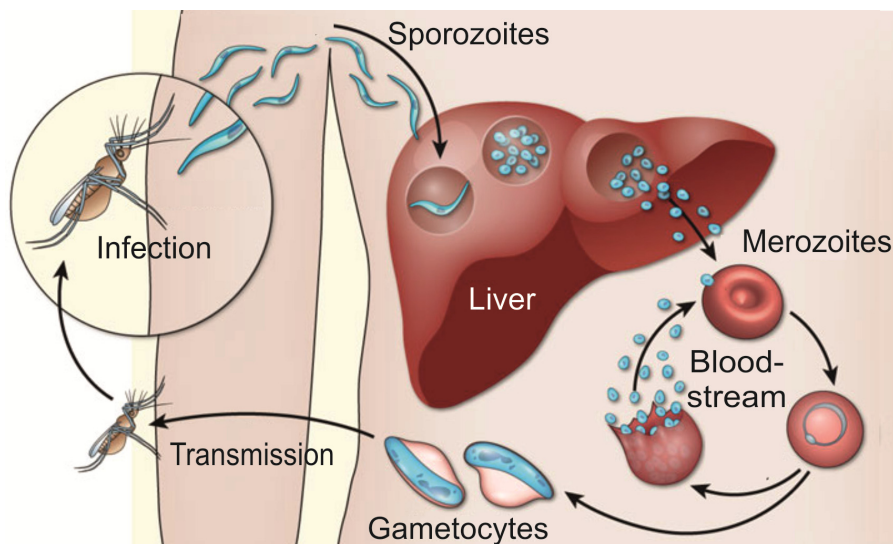


Abb. 2.1: Vereinfachter Lebenszyklus der Malaria-Erreger
[modifiziert nach Michalakis und Renaud, 2009]

Die zunehmenden Resistenzen des Überträgers gegen Insektizide sowie der Parasiten gegen Erstrang-Medikamente schränken die Behandlungsmöglichkeiten ein und können zur Ausbreitung resistenter Stämme führen [Wernsdorfer und Payne, 1991]. Ein sicherer und effektiver Impfstoff ist somit unerlässlich im Kampf gegen Malaria.

Aktuelle Immunisierungsstrategien erstreben, den Entwicklungszyklus an verschiedenen Stellen zu durchbrechen. Dazu gehören u. a. pre-erythorzytäre Impfstoff-Ansätze, die zwischen der Inokulation durch den Mosquito und der Infektion der Leber greifen. Das Ziel ist, dieser Infektion vorzubeugen und eine sogenannte sterile Immunität hervorzurufen [Good, 2005]. Dabei würde jedoch ein einziger *Sporozoit* ausreichen, um eine Blutinfektion auszulösen.

Im Fokus stehen daher besondere Vakzin-Kandidaten gegen spezifische Proteine des Blutstadiums, da dies die klinischen Symptome und die Sterblichkeit bedingt. Das Target stellen dabei die *Merozoiten* dar, die aus infizierten, geplatzen Leberzellen oder Erythrozyten auf frische Erythrozyten übergehen [Richards und Beeson, 2009].

Die Entwicklung erweist sich jedoch als problematisch, da insbesondere *Plasmodium falciparum* eine Reihe an Mechanismen nutzt, um dem menschlichen Immunsystem zu entgehen. So induziert der Parasit die Bildung von sogenannten blockierenden Antikörpern, die als Antagonisten die Invasion in Gegenwart inhibierender Antikörper ermöglichen.

Schwerwiegend ist zudem die Fähigkeit des Erregers zur Antigenvariation, wodurch z. B. der wichtige Pathogenitätsfaktor PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1), der auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten präsentiert wird, einfach ausgetauscht werden kann. Das hochvariable Protein ist mit mehreren Genen kodiert, sodass sogar innerhalb einer Parasitenpopulation unterschiedliche Variationen gebildet und damit der erworbenen Immunantwort entgangen werden kann.

Die größte Hürde ist jedoch der Polymorphismus der Antigene, da von vielen Oberflächenproteinen zwischen den Stämmen, aber auch innerhalb einer *Plasmodium* Spezies mehrere Allele auftreten [Bai et al., 2005]. Die entstehende Diversität der Antigene hat einen bedeutenden Effekt auf die erworbene Immunität, die sich lediglich auf das spezielle Allel der Vakzinierung beschränkt.

Viele Ansätze scheiterten somit an der Stamm- und Stadienspezifität der erworbenen Immunität. Daher hat sich die Auffassung durchgesetzt, dass nur eine Kombination langfristig Erfolg haben kann: ein mehrwertiger Impfstoff, der gegen mehrere Stadien des Parasiten, gegen mehrere Antigene und mehrere Allele dieser Antigene gerichtet ist [Doolan und Hoffman, 1997].

2.2 Konstruktion artifizierender Multikomponentenvakzine

Das Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) und das Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) von *Plasmodium falciparum* stellen attraktive Kandidaten für einen Malaria-Impfstoff dar. Beide Antigene sind Oberflächenproteine des Merozoiten, der invasiven Form des Parasiten im Blutstadium, und beiden wurde eine Rolle im Invasionsprozess zugewiesen [Mitchell et al., 2004; Nikodem und Davidson, 2000].

AMA1 ist ein Typ 1 integrales Membranprotein [Peterson et al., 1989], dessen Cysteinreste eine Domänenstruktur definieren, die in Abb. 2.2 gezeigt ist [Hodder et al., 1996].

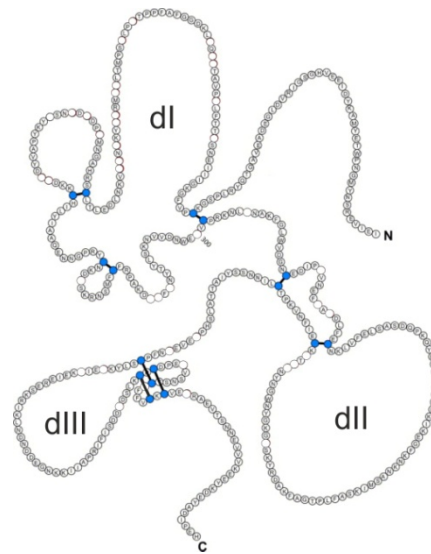


Abb. 2.2: Sequenz der *PfAMA1* Ektodomäne mit Cysteinresten (blau), die durch Disulfidbrücken Domäne 1, 2 und 3 (dI, dII, dIII) darlegen [nach Hodder et al., 1996]

Gegen AMA1 gerichtete Antikörper können die Invasion von Erythrozyten durch den Erreger erfolgreich unterdrücken [Kocken et al., 2002]. Klinische Evaluierungen des *PfAMA1* in den Niederlanden und in Mali [European Vaccine Initiative, 2013] belegen allerdings die Notwendigkeit, aufgrund des polymorphen Charakters der AMA1-Proteine, die Breite der Immunantwort zu steigern [Remarque et al., 2008]. Rund 10 % der Aminosäuren können variieren, wie in Abb. 2.3 gezeigt, ohne die Funktion des AMA1 bei der Invasion in Erythrozyten zu beeinflussen.

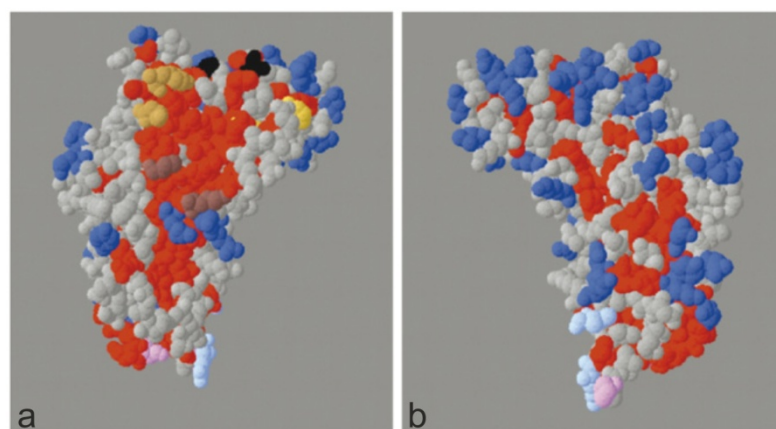


Abb. 2.3: Vorder- (a) und Rückansicht (b) der Kristallstruktur des AMA1 aus *P. vivax*. Gekennzeichnet sind Aminosäurereste, die innerhalb der *Plasmodium spp.* konserviert vorliegen (rot), zwischen den Spezies variieren (grau) und innerhalb des *P. falciparum* einem Polymorphismus unterliegen (blau) [Remarque et al., 2007]

Bis auf wenige Ausnahmen sind an einer polymorphen Stelle jedoch nur ein oder zwei andere Aminosäuren vorzufinden [Chesne-Seck et al., 2005]. Dieser begrenzte Polymorphismus (Bi- oder Trimorphismus) des *PfAMA1* ermöglichte das Design von drei künstlichen *PfAMA1* Sequenzen (Diversity Covering, D1, D2, D3). Diese weisen eine sehr hohe Abdeckung aller natürlich vorkommenden Allele auf, wenn sie in einem Impfstoff kombiniert werden. *PfAMA1* wurde zudem auch in Sporoziten nachgewiesen [Bozdech et al., 2003], womit AMA1 sowohl einen hepatozytären als auch einen erythrozytären Vakzin-Kandidaten darstellt, der an den zwei Schlüsselstadien der Malaria-Erkrankung angreift.

Antikörper gegen MSP1 hingegen wirken mit einem anderen Mechanismus – sie verhindern innerhalb der frisch infizierten Blutzelle die Weiterentwicklung und damit Vermehrung des Parasiten [Arnot et al., 2008].

Der 19 kDa schwere C-Terminus des Proteins, MSP1₁₉, stellt einen eigenen Impfstoffkandidaten dar, da diese Sequenz relativ konserviert ist und lediglich an maximal sechs polymorphen Stellen variieren kann. Diese Variationen sind in zwei MSP1₁₉ Modulen fassbar: *3D7* und *Wellcome-Type* [Faber et al., 2007]. Das Design eines modifizierten MSP1₁₉, dem Epitope der blockierenden Antikörper fehlen, führt zu einer verbesserten immunogenen Aktivität [Faber et al., 2007; Hensmann et al., 2004].

Zur Konstruktion von Breitband-Vakzinen soll nun eine Mischung der drei künstlichen AMA1-Sequenzen mit den Allelen des weniger polymorphen Proteins MSP1₁₉ kombiniert werden. Diese Kombination erfüllt damit alle Anforderungen an einen erfolgreichen Malaria-Impfstoff.

Die simultane Immunisierung mit kombinierten Antigenen bringt mehrere stichhaltige Vorteile. So ermöglicht der zeitgleiche Befall multipler Immunisierungsziele additive oder synergetische Effekte, wodurch MSP1₁₉ in einer AMA1-Fusion signifikant höhere Antikörpertiter erreicht [Faber et al., 2013]. Die Variantenvielfalt der Antigene verbreitert die Immunantwort, während die Induktion von Immunreaktionen in unterschiedlichen Phasen des Entwicklungszyklus des Erregers Schutz während des gesamten Zyklus bietet. Dadurch können in Individuen unterschiedlich stark ausfallende immunologische Reaktionen auf verschiedene Ziele ausgeglichen werden.

Malaria als Armutskrankheit verlangt die Kosten der Einzelsdosis auf ein Minimum zu reduzieren. Da die cGMP-Produktion von unterschiedlichen Produkten teurer ist als die Produktion eines Fusionsproteins, wurden die drei DiCo Proteine (Dj) mit den beiden MSP1₁₉ Units (Mk) zu verschiedenen Produkten vereint. Dadurch soll zudem die fragliche Kompatibilität zwischen Proteinen, Adjuvanzen und gegebenenfalls immunologische Interaktionen zwischen den Komponenten unterbunden werden.

Drei entwickelte Multikomponentenvakzine sind in Abb. 2.4 gezeigt. Favorisiert wurde die Verbindung der drei DiCo-Einheiten mit den zwei MSP1₁₉ Modulen zu D1M1D2M3D3.

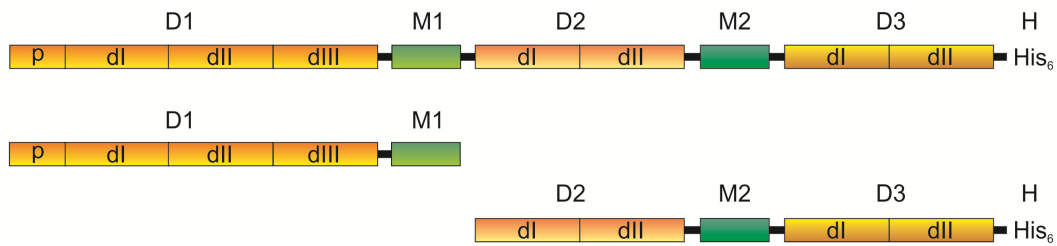


Abb. 2.4: Multikomponentenvakzine D1M1D2M2D3H, D1M1 und D2M2D3H

Zur Reduktion der Proteingröße wurden in diesem Konstrukt bei D2 und D3 auf Domäne 3 (dIII) sowie die Prodomäne (p) verzichtet, da Domäne 1 und 2 (dl, dll) den kleinsten Ausschnitt des *PfAMA1* beschreiben, der hohe Level an inhibitorischen Antikörpern induziert [Remarque et al., 2008].

Da die Ausbeute der rekombinanten Produktion mit steigender Proteingröße sinkt und zudem die Antikörperinduktion des mittig gelegenen D2 zu gering ausfiel als in kleineren Fusionen [Faber et al., 2013], wurde die Konstruktion kleiner Fusionsproteine (D1M1 und D2M2D3H) vorgenommen, die noch relativ klein und somit noch gut zu exprimieren sind. Der Nachteil liegt darin, dass nunmehr für ein geeignetes Vakziningemisch beide Fusionsproteine hergestellt werden müssten.

2.3 Kritische Qualitätsmerkmale der Zielprodukte

Der *in vitro* induzierte Schutz durch AMA1 und MSP1 basiert größtenteils auf Antikörpern gegen konformative Epitope der Proteine, die in Abb. 2.5 beispielhaft gezeigt sind. Die korrekte Faltung und Integrität der Fusionsproteine ist somit maßgebend zur Bildung inhibitorischer Antikörper.

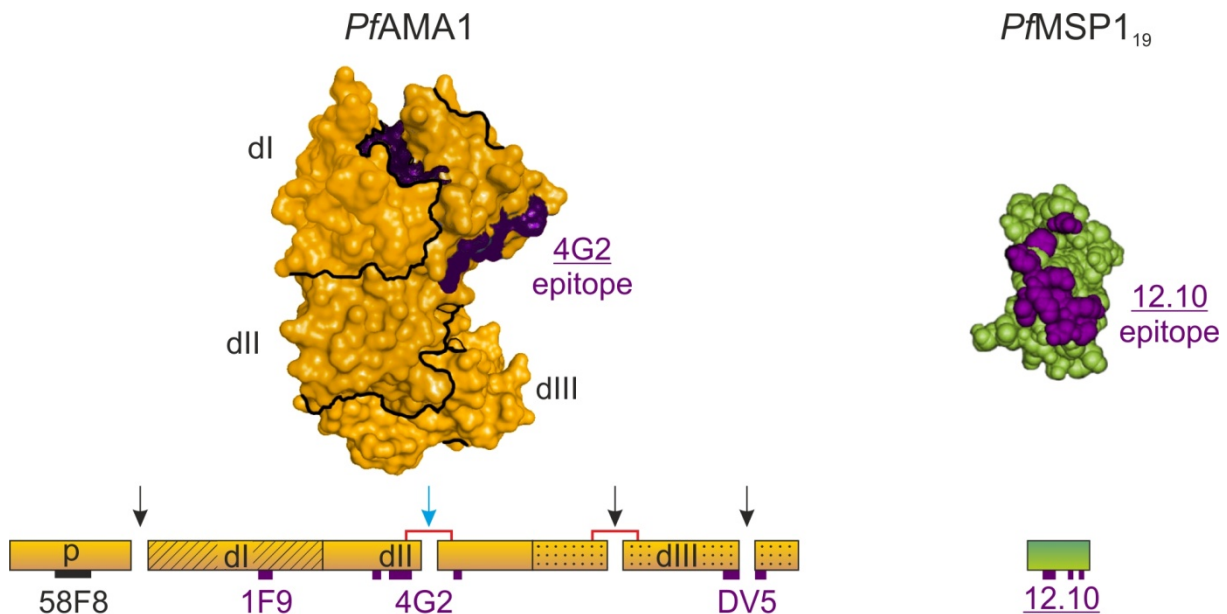








Abb. 2.5: Struktur und vereinfachte Sequenz des *PfAMA1* und *PfMSP1*₁₉ mit Epitopen inhibitorischer Antikörper (violett) und proteolytischer Spaltstellen (Pfeil), [nach Collins et al., 2009 und Pizarro et al., 2002], [Remarque et al., 2008]

Natürliche proteolytische Prozessierungen (schwarze Pfeile) und eine bevorzugte Spaltstelle (blauer Pfeil) des AMA1 können Epitope inhibierender Antikörper (violett) unterbrechen, wobei deren Funktionalität teilweise durch Disulfidbrücken (rot) erhalten bleibt, wie in Abb. 2.5 gezeigt ist. Durch gezielten Einsatz dieser Antikörper in der Analytik (unterstrichen) lässt sich die Integrität und Antigenität der hergestellten Proteine nachweisen (vgl. Kapitel 4.3).

Durch die genannten Spaltstellen können Fragmente entstehen, deren theoretische Molekulargewichte (MW) und isoelektrische Punkte (pI) in Tab. 2.1 aufgelistet sind.




Tab. 2.1: Mögliche Fragmente von D1M1

D1	M1	MW [kDa]	pI [-]
		71.5	5.24
		62.5	5.52
		57.4	5.43
		48.4	6.08
		14.1	4.77
		9.0	4.60

Die Spaltung der Prodomäne führt in Stabilitätsversuchen zu einer erhöhten Anfälligkeit für Proteasen, was in einem weiteren Produktabbau resultiert [Faber et al., 2013]. Von der Prodomäne wird jedoch angenommen, dass sie immunologisch nicht relevant ist [Howell et al., 2001].

Parallel zu dieser Arbeit erfolgte daher eine Rekonstruktion des D1M1, die durch Aussparung der Prodomäne und Anfügen eines C-terminalen Hexahistidin-Schwanzes zu einem verbesserten Stabilitätsprofil führte [Faber et al., 2013]. Dieses Fusionsprotein wird mit D1M1H gekennzeichnet und bringt eine verminderte Anzahl potentieller Spaltprodukte, wie in Tab. 2.2 gezeigt ist.

Tab. 2.2: Mögliche Fragmente des nicht reduzierten D1M1H

D1	M1 H	MW [kDa]	pI [-]
		62.7	5.71
		47.7	6.08
		15.0	5.27

Die qualitativen Unterschiede des aufgereinigten D1M1H und dem ursprünglichen D1M1 werden in Abb. 2.6 anhand einer SDS-PAGE verdeutlicht.

Mit der Prodomäne besitzt D1M1 einen natürlichen Tag zur Metallchelatchromatographie, während beim D1M1H der künstliche Hexahistidin-Schwanz der Analytik und der Aufarbeitung dient.

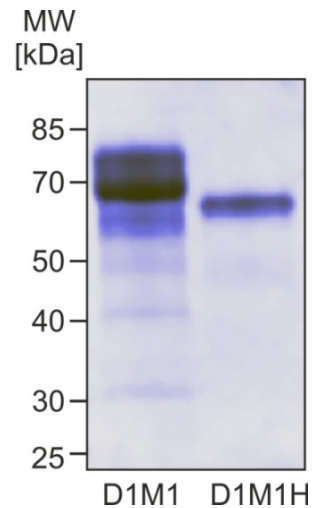


Abb. 2.6: SDS-PAGE der aufgereinigten Zielprodukte D1M1 und D1M1H

Die Unterdrückung oder Vermeidung der Degradation der Zielprodukte D1M1 und D1M1H ist eine Zielfunktion der Entwicklung und Optimierung des im Weiteren dokumentierten Herstellungsprozesses.

Die rekombinante Expression und Aufreinigung von AMA1 in einer geeigneten Form für klinische Evaluierung stellte eine Herausforderung dar – nicht nur in Bezug auf die Ausbeute, sondern auch auf die korrekte Faltung und die Tatsache, dass das native AMA1 nicht N-glykosyliert vorliegt [Remarque et al., 2008].

Während *Escherichia coli* eine Rückfaltung zur nativen Konformation erfordert, neigt die Hefe *Pichia pastoris* zu Hyperglykosilierungen des Wildtyp AMA1 [Remarque, 2008]. Durch ein synthetisches Gen mit angepasster Codon-Usage und Mutagenese-Strategien lieferte *P. pastoris* ein geeignetes, nicht N-glykosyliertes PfAMA1 in vergleichsweise hohen Ausbeuten [Kocken et al., 1999]. Die Herstellung der Impfstoffkandidaten D1M1 und D1M1H erfolgt daher analog zu AMA1 mit dem Expressionssystem *P. pastoris*, das im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

3 Kultivierung von *Pichia pastoris*

3.1 Das Expressionssystem

3.1.1 Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*

Die Hefe *Pichia pastoris* hat sich als eines der wichtigsten biotechnologischen Systeme zur Expression eines breiten Spektrums artfremder Proteine etabliert.

P. pastoris kann seit 1993 in akademischen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten lizenzfrei eingesetzt werden und stellt heute somit eines der am besten charakterisierten Expressionssysteme und einen wichtigen Modellorganismus dar.

Als Wirtsorganismen kombinieren Hefen die Vorteile von höheren eukaryontischen Systemen, wie posttranslationale Modifikationen, mit den Annehmlichkeiten bakterieller Expression.

Dabei bietet sowohl eine vereinfachte genetische Manipulation als auch Kultivierung eine sehr gute Handhabbarkeit. Hinzu kommt die Möglichkeit des schnellen Heranzüchtens auf kostengünstigen Nährmedien zu sehr hohen Zelldichten. Diese Eigenschaften befähigen die Zellen, attraktive Level des Zielproteins mit relativ geringem Aufwand und niedrigen Kosten herzustellen [Cregg et al., 1993].

Ein wesentlicher Vorteil besteht zudem in der Fähigkeit zur Sekretion, was die Aufreinigung des jeweiligen Zielproduktes erheblich vereinfacht. Da *P. pastoris* selbst nur sehr geringe Mengen an Hostproteinen ausschleust, bildet das rekombinante Protein die überwiegende Mehrheit der im Medium enthaltenen Proteine [Barr et al., 1992].

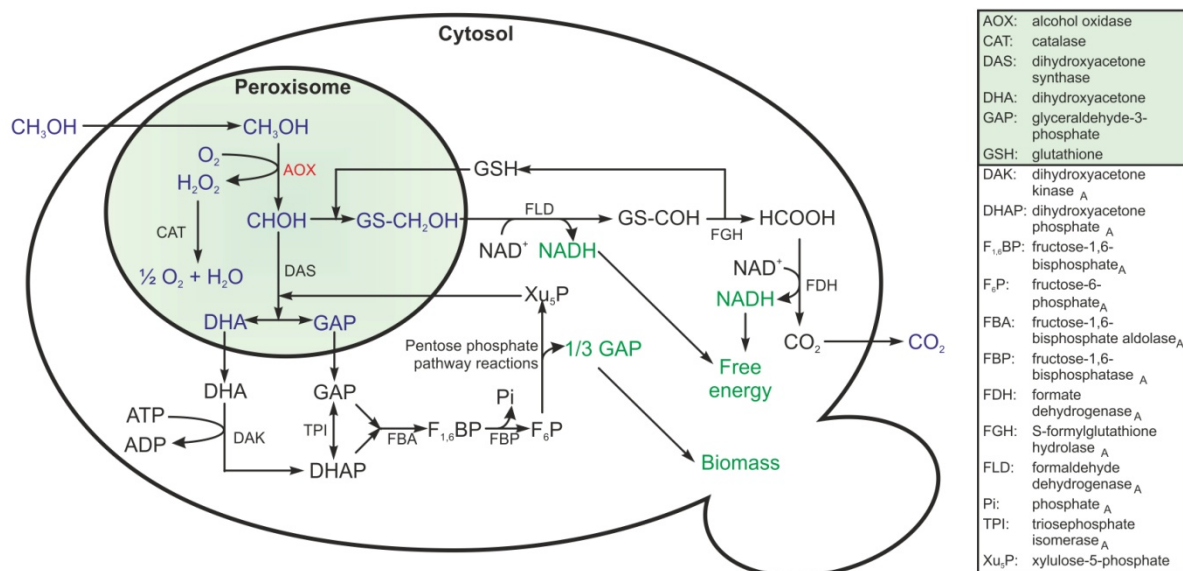


Abb. 3.1: Methanol Utilization Pathway, nach [De Schutter et al., 2009]

P. pastoris wächst aerob auf klassischen Substraten, wie z. B. Glucose und Glycerol. Als methylotrophe Hefe kann *P. pastoris* zudem Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle effizient nutzen. Abb. 3.1 zeigt die Metabolisierung des Methanols und die daran beteiligten Enzyme. Die ersten Reaktionen erfolgen dabei in abge-

schlossenen Organellen, den Peroxisomen, die drei Schlüsselenzyme enthalten: Alkoholoxidase (AOX), Katalase (CAT) und Dihydroxyacetonsynthase (DAS) [Macauley-Patrick et al., 2005]. Durch Alkoholoxidase wird Methanol zu Formaldehyd oxidiert, wobei das abgespaltene toxische Wasserstoffperoxid sofort von Katalase zersetzt wird. Ein Teil des gebildeten Formaldehyds wird von zwei zytoplasmatischen Hydrogenasen weiter zu Formiat und Kohlendioxid oxidiert. Diese Reaktionen bilden die Energiequelle des Wachstums auf Methanol. Das verbleibende Formaldehyd wird zur Generation von Biomasse in einer zyklischen Reaktion assimiliert, die ebenfalls im Zytosol erfolgt [Cereghino und Cregg, 2000].

Die geringe Affinität von AOX zu Sauerstoff kompensiert *P. pastoris* durch Erzeugung großer Mengen dieses Enzyms [Cereghino und Cregg, 2000]. Das macht üblicherweise über 30 % des löslichen Proteins in Methanol induzierten Zellen aus, sodass der regulierende Promotor ein attraktives Target zur Herstellung rekombinanter Proteine darstellt.

Alkoholoxidase ist durch zwei Gene codiert, wobei AOX1 den Hauptteil der AOX-Aktivität in der Zelle ausmacht. AOX2 entspricht zwar zu 97 % AOX1, jedoch erfolgt ein Wachstum damit wesentlich langsamer.

In Hinblick auf die Methanolaufnahme werden drei Phänotypen unterschieden: Mut⁺ (Methanol ut ilization positive) besitzt beide AOX-Gene, während dem Mut^S (Methanol ut ilization slow) lediglich das transkriptionell schwächere AOX2 zum Wachstum auf Methanol bleibt. Mut⁻ (Methanol ut ilization negative) hingegen wurden beide AOX-Gene entfernt, weshalb dieser Stamm kein Methanol umsetzen und somit nicht darauf wachsen kann [Higgins und Cregg, 1998].

Die Expression des AOX1 Gens wird auf Transkriptionsebene reguliert und kann in Repression/Derepression und einen Induktionsmechanismus unterteilt werden [Cereghino und Cregg, 2000]. Diese Mechanismen werden in Kapitel 10.2 näher erläutert. Die Anwesenheit von Methanol selbst induziert dabei die AOX-Bildung, während Primärsubstrate, wie Glycerol und Glucose, die Transkription reprimieren.

3.1.2 Herstellung der Expressionsstämme

Die molekularbiologischen Arbeiten zur Herstellung der Expressionsstämme sowie das Design der Zielproteine wurden im Department of Parasitology des BPRC, Rijswijk durchgeführt (siehe [Faber et al., 2013]).

Dazu wurden die synthetischen Malariavakzin-Gene mit der Codierung für die jeweilige Sequenz der Fusionsproteine mittels PCR konstruiert und amplifiziert. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte in pPICZαA-Vektoren der Fa. Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA. Nach Amplifikation in *E. coli* DH5α-Zellen wurden die Plasmide zur Transformation von *P. pastoris* verwendet.

Als Wirtssystem zur rekombinanten Produktion wurde der *P. pastoris* Stamm KM71H als Mut^S-Stamm gewählt. Bei diesem Stamm ist das AOX1-Gen weitgehend entfernt und durch das *S. cerevisiae* ARG4 Gen ersetzt [Higgins und Cregg, 1998]. Der Methanolstoffwechsel wird somit ausschließlich durch die Expression des schwächeren AOX2-Gens vollzogen und resultiert in geringen Wachstumsraten.

Der verwendete Plasmidvektor pPICZ α A enthält nach der Plasmidversion des AOX1-Promotors (P_{AOX1}) eine sekretorische Signalsequenz aus *S. cerevisiae* (α -F) zur Ausschleusung des rekombinanten Proteins. Der Einbau der Fremd-DNA wird durch eine Multiple Cloning Site (MCS) ermöglicht, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthält. Das Ende der Transkription bewirkt die natürliche AOX1-Terminationssequenz (TT) und ein Resistenzgen (Zeocin) erlaubt die Selektion positiver Transformanten.

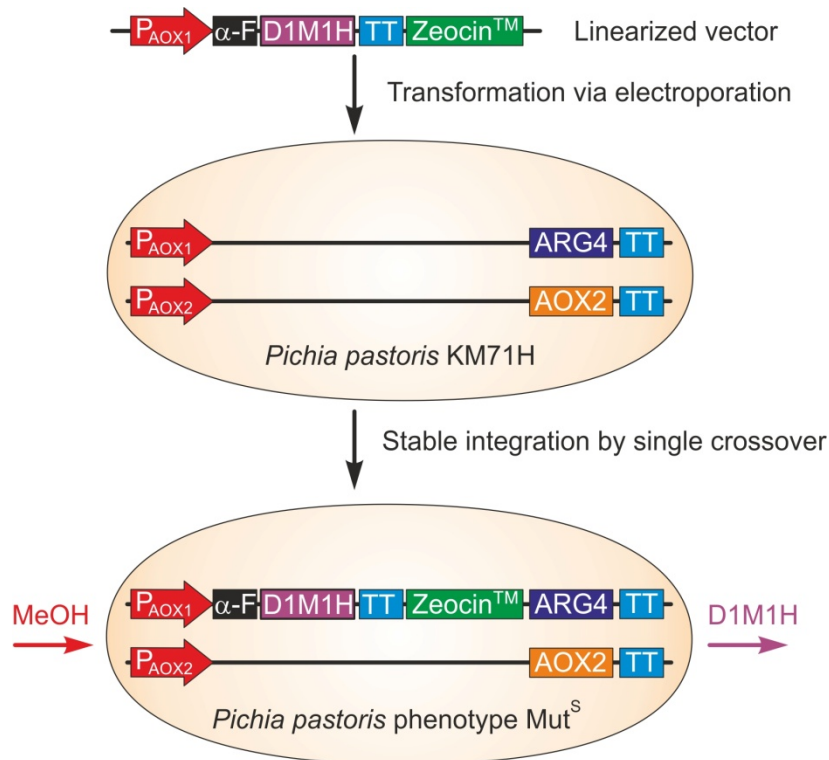


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Integration der Expressionskassette in das Genom von *Pichia pastoris*

Durch Linearisierung des Plasmids wird die Rekombination bei Transformation in *Pichia* stimuliert. Durch Insertion oder Replacement, zumeist in den homologen Bereichen der P_{AOX1} -Sequenz, wird die Expressionskassette, wie in Abb. 3.2 gezeigt ist, stabil in das Genom integriert. Durch selektive Restriktion des Plasmids entstehen so die verschiedenen Phänotypen der Hefe.

Bei der Transformation des verwendeten Mut^S KM71H kann im Gegensatz zu anderen Mut^S-Stämmen die Integration auch durch einfaches Crossover erfolgen [Invitrogen, 2010]. Die erfolgreiche Integration wird durch eine Testexpression geprüft und positive Transformanten ausgewählt [Faber et al., 2013].

3.2 Der dreistufige Produktionsprozess

Die typische Produktion rekombinanter Proteine mit *P. pastoris* erfolgt in einem dreistufigen Prozess, bestehend aus einer unlimitierten Batch und einer limitierten Fed Batch-Phase auf Glycerol sowie einer Induktionsphase auf Methanol [Higgins und Cregg, 1998]. Ein entsprechender Verlauf zur Herstellung eines Malariavakzins ist in Abb. 3.3 dargestellt.

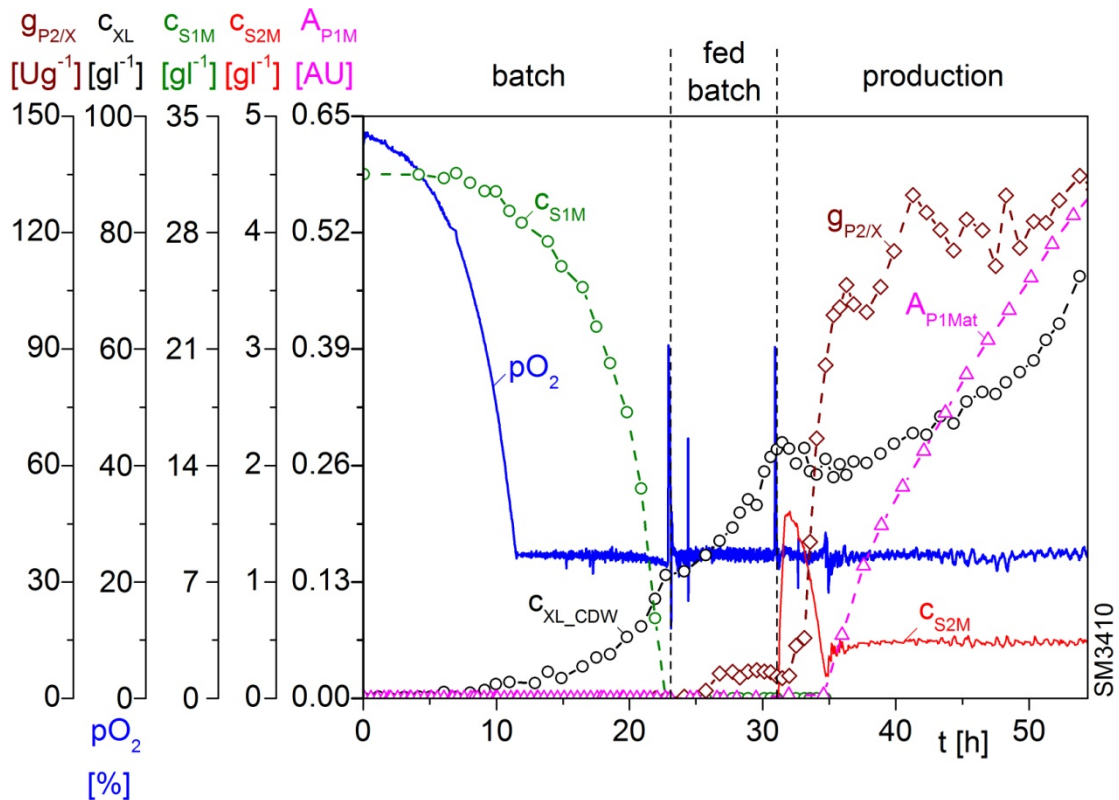


Abb. 3.3: Der dreistufige Produktionsprozess am Beispiel der Herstellung von D1M1

Die erste Prozessstufe, in der *P. pastoris* unlimitiert auf dem reprimierenden Substrat Glycerol c_{S1M} wächst, dient der Generation von Zellmasse c_{XL} .

Es folgt eine substratlimitierte Glycerol Fed Batch-Phase zur weiteren Zellanzucht und zur regulatorischen Vorbereitung (Derepression) der Zellen auf die folgende Induktion [Brierley et al., 1990; Higgins und Cregg, 1998]. Durch ein exponentielles Zufütterungsprofil wird in dieser Phase die zellspezifische Wachstumsrate μ konstant gehalten [Cornelissen, 2004; Gregory und Turner, 1993].

Die Produktionsphase zeichnet sich durch die Zufütterung des Induktors aus. Die Methanolkonzentration c_{S2M} wird dabei inline gemessen und damit PID-geregt. Mit dem Wechsel der Kohlenstoffquelle wird die Bildung des Enzyms Alkoholoxidase ($g_{P2/X}$) sowie die Expression und Sekretion des Zielproduktes (A_{P1M}) initiiert, die atline mit einer HPLC detektiert wird (siehe Kapitel 5).

In einer sequentiellen Prozessfahrweise soll dieser klassische Verlauf mehrfach hintereinander durchgeführt werden, womit Zellanzucht auf Glycerol und Produktion auf Methanol alternierend stattfinden, wie in Abb. 3.4 beispielhaft gezeigt ist. In diesem Bild ist die Konzentration des Zielproteins c_{P1M} bereits aus dem Atline-Signal A_{P1M} einer HPLC rekonstruiert. Die Entwicklung und Analyse der zyklischen Prozesse wird in Kapitel 8 beschrieben.

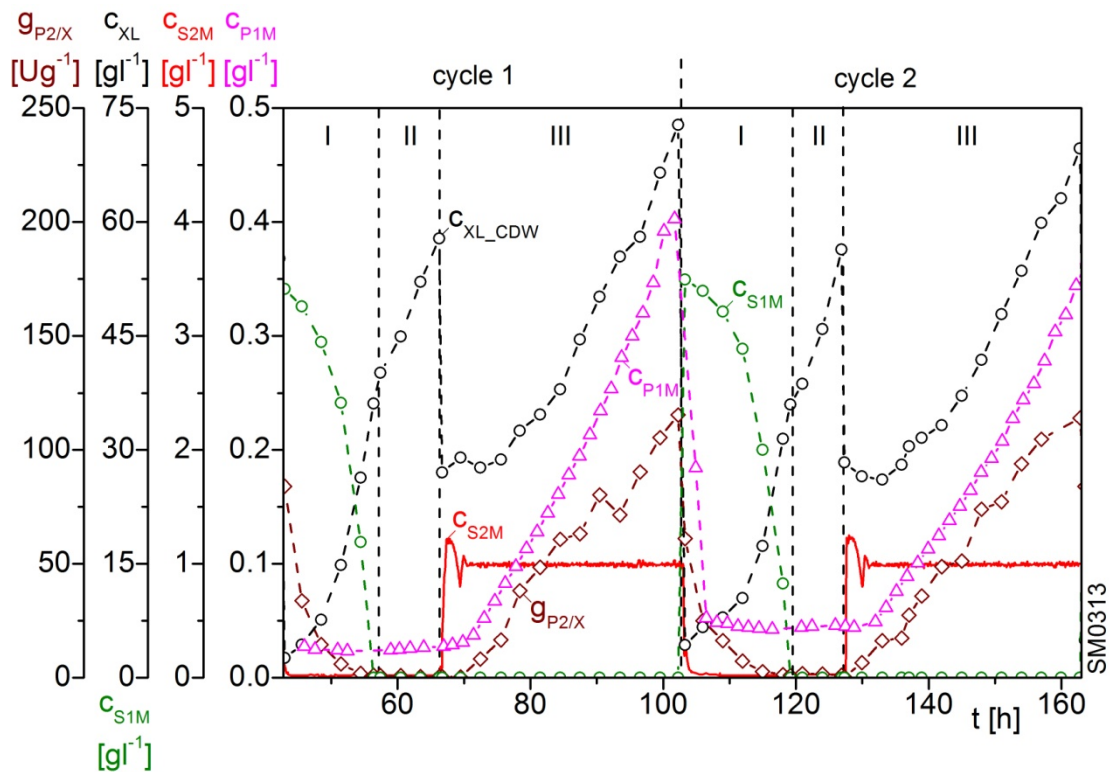


Abb. 3.4: Zyklische Produktion des D1M1H

Zur Beobachtung und Führung der Prozesse sind umfangreiche Mess- und Analysetechniken sowie unterschiedliche Steuer- und Regelungsverfahren eingebunden, die den automatischen Ablauf der genannten Prozessphasen über das Prozessführungssystem MFCS/win (Sartorius Stedim Systems, Guxhagen) ermöglichen.

3.3 Eingesetzte Bioreaktor- und Automatisierungstechnik

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit wurden hochinstrumentierte Forschungsbioreaktoren vom Typ BIOSTAT® ED5 sowie BIOSTAT® C10 der Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen, eingesetzt. Der Maßstab der Edelstahl-Rührkesselreaktoren beläuft sich auf 5 bzw. 10 Liter Arbeitsvolumen.

Die Abbn. 3.5 und 3.6 zeigen die verwendeten Reaktorsysteme mit einer jeweils erweiterten Anlagenperipherie. In Tab. 3.1 sind die jeweils eingesetzten Messsysteme gegenübergestellt.

Beide Reaktorsysteme sind mit einer Standardmesstechnik für die Prozessgrößen Drehzahl N_{St} , Temperatur ϑ_L , Füllstand und Schaum, pH-Wert, relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck pO_2 , Begasungsrate F_{nG} und Druck p_G ausgestattet, die über auch über eine Reaktorkontrolleinheit DCU (Digital Control Unit) geregelt werden können.

Für eine stabile Prozessführung sowie ein erweitertes Prozessverständnis ist bei beiden Reaktorsystemen eine umfangreiche Ausstattung und Messtechnik implementiert, die u. a. eine Gasmischstation, Abgasanalytoren sowie eine Methanol- und eine Trübungsmessung umfasst. Die erweiterte Instrumentalisierung des BIOSTAT® ED ist in Abb. 3.7. beispielhaft gezeigt und wird im Folgenden näher erläutert, bevor auf das Prozessführungssystem eingegangen wird.



Abb. 3.5: Hochinstrumentierter Forschungsbioreaktor BIOSTAT® C



Abb. 3.6: Forschungsbioreaktor BIOSTAT® ED5 mit Anlagenperipherie

Tab. 3.1: Ausstattung der verwendeten Reaktorsysteme

	Variable	BIOSTAT [®] C	BIOSTAT [®] ED5
Arbeitsvolumen		10 l	5 l
Kontrolleinheit		Mikro-DCU	DCU 2
H:D		3:1	3:1
Rührer	N _{St}	Drei Sechsstab- Scheibenrührer	Drei Sechsstab- Scheibenrührer
Motor		ABB Servomotor Obenantrieb N _{Stmax} = 1500 min ⁻¹	Sartorius Drehstrommotor Untenantrieb N _{Stmax} = 1500 min ⁻¹
Temperaturmessung	ϑ _L	Pt100	Pt100
Schaumsonde		kapazitive Sonde	kapazitive Sonde
Antischaummittel		Schill&Seilacher Struktol J 673	Schill&Seilacher Struktol J 673
pH-Messung	pH	Hamilton Easy ferm plus	Hamilton Easy ferm plus
Titration		2 M H ₃ PO ₄ , 25 % NH ₃	2 M H ₃ PO ₄ , 25 % NH ₃
pO ₂ - Messung	pO ₂	Mettler Toledo InPro [®] 6800	Mettler Toledo InPro [®] 6800
Massflowcontroller		Bronkhorst High-Tech	Bronkhorst High-Tech
Druck	p _G	Druckaufnehmer	Philips Druckaufnehmer P13
Abgasanalyse	x _{O2}	BlueSens gas sensor BPC-O2	BlueSens gas sensor BPC-O2
	x _{CO2}	BlueSens gas sensor BPC-CO2	BlueSens gas sensor BPC-CO2
Trübungsmessung	S _{turb}	Trübungssonde optek ASD-25BT-N-5	Trübungssonde optek AS16
Methanolfmessung	C _{S2M}	Biotechnologie Kempe Alcoline [®] Silicone Tubing Sonde mit Flachmembran	Biotechnologie Kempe Alcoline [®] Silicone Tubing Sonde
Zellfreie Probenahme		Trace Analytics Filtrationssonde ESIP-Process 5441	Trace Analytics Filtrationssonde ESIP-Lab 5442

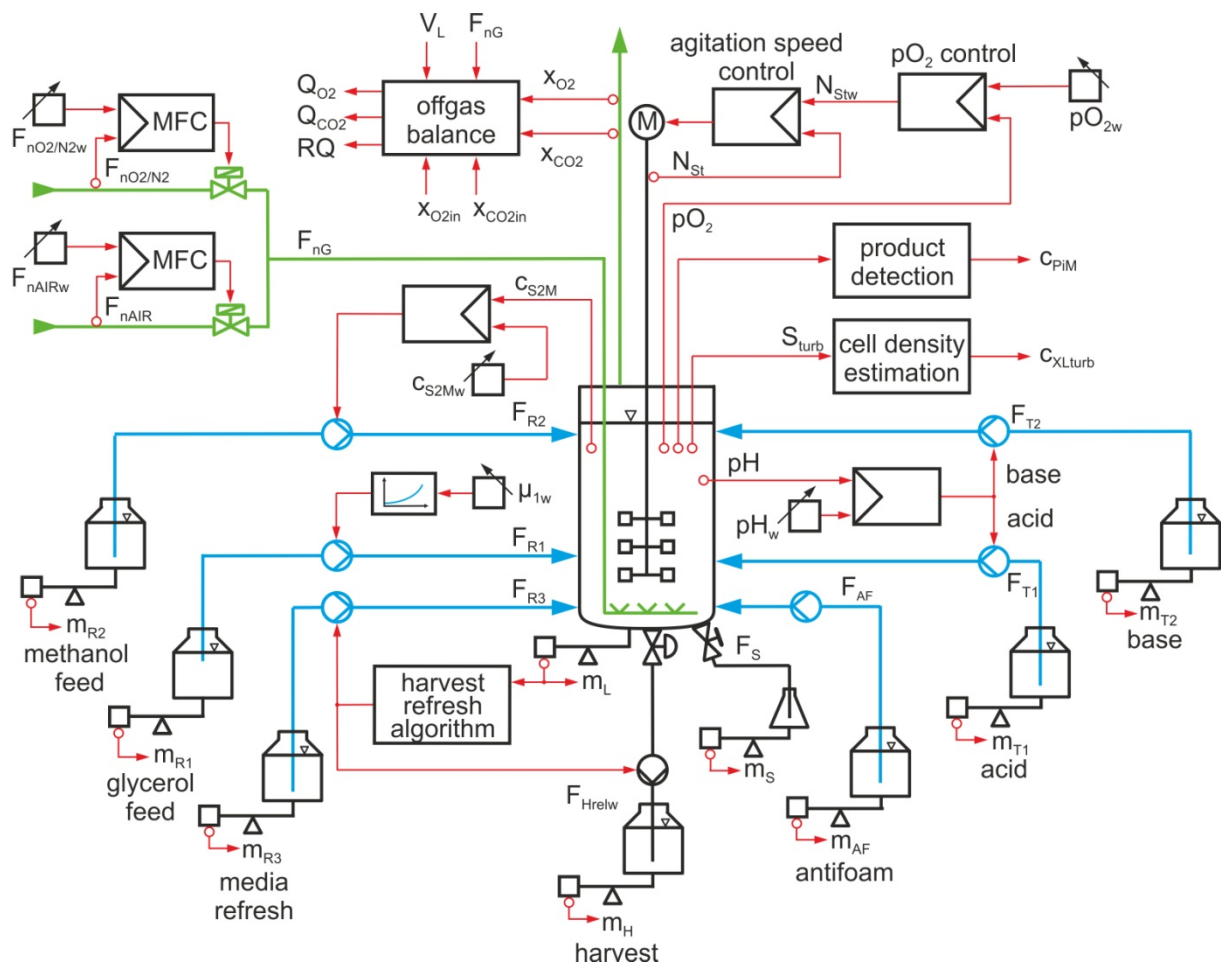


Abb. 3.7: MSR-Struktur des BIOSTAT® ED5

Für die Ausführung von Ernte- und Refreshoperationen verfügen die Bioreaktorsysteme über je einen Frischmedien- und einen Erntetank. Während die Kulturbrühe beim BIOSTAT® C10 über ein Steigrohr gepumpt wird (Watson Marlow, Rommerskirchen), dient beim BIOSTAT® ED5 ein pneumatisches Bodenablassventil (Gemü Apparatebau, Ingelfingen-Criesbach) der Ernte. Die Zufütterung frischen Mediums erfolgt bei beiden Systemen unter Verwendung entsprechender Pumpen (Watson Marlow, Rommerskirchen). Die Prozeduren werden über Harvest- und Refreshalgorithmen im Prozessleitsystem MFCS/win über S88-Rezepturen realisiert.

Um eine möglichst vollständige Volumen- und Massenbilanzierung des Bioprozesses vornehmen zu können, befinden sich zusätzlich zur Wägung des Reaktionsvolumens (m_L) auch der Erntetank (m_H), die drei Substratvorlagen, Glycerol (m_{R1}), Methanol (m_{R2}) und Refreshmedium (m_{R3}), und die beiden Titrationsmittel, Säure (m_{T1}) und Base (m_{T2}) sowie die über die Inline Filtrationssonde entnommene Analysemenge (m_A , nicht gezeigt) auf Waagen (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen).

Bei den Kultivierungen kamen Abgassensoren der Fa. BlueSens gas sensor, Herten, zum Einsatz. Der Stoffmengenanteil x_{O_2} von Sauerstoff wird dabei über ein elektrochemisches Messprinzip bestimmt, das auf einer Sauerstoffpumpzelle aus Zirkoniumdioxid basiert.

Die Ermittlung des Stoffmengenanteils x_{CO_2} von Kohlendioxid hingegen beruht auf einer Absorption von Infrarotlicht durch die CO_2 -Moleküle. Über die Bilanzierung der beteiligten Gaskomponenten bei Kultivierungen kann anhand der Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} , der Kohlendioxidaustragsrate Q_{CO_2} und des Respirationsquotienten RQ eine Beurteilung der Zellaktivität erfolgen.

Zur Beobachtung des Verlaufs der Zielproteinexpression wurde zudem ein HPLC-System atline an die Prozesse angebunden. Die benötigte zellfreie Probenahme über eine Inline-Filtrationssonde sowie der Einsatz der Immobilisierten Metallchelatchromatographie wird in Kapitel 5.3 näher erläutert.

Die Regelung der Methanolkonzentration $c_{\text{S}_2\text{M}}$ ist sowohl für das Zellwachstum als auch für die Produktbildung in der Induktionsphase von großem Interesse. In dieser Arbeit wurden Sonden und der Messverstärker im Grundgerät FMC (Fermentation Micro Computer) der Fa. Biotechnologie Kempe, Kleinmachnow, verwendet.

Die Inline-Messung der Methanolkonzentration erfolgt dabei mittels *Silikon-Tubing* Sonden [Biotechnologie Kempe, 2003]. Dabei separiert der Sondenkörper durch eine Silikonmembran flüchtige organische Komponenten aus der Flüssigphase. Diese werden anschließend über einen Trägergasstrom zu einem erhitzten Halbleiter-Gassensor transportiert, der aus einer Zinndioxidkeramikmembran besteht.

Das Messprinzip beruht auf der Widerstandsänderung des Halbleiters bei der Verdrängung von Sauerstoff durch Alkoholmoleküle. Zur Kompensation der Temperaturabhängigkeit erfordert der Messaufbau eine zusätzliche Temperatursonde, die ebenfalls im Bioreaktor positioniert wird.

Mit dieser Messung wird eine Regelung der Methanolkonzentration über das Prozessleitsystem MFCS/win ermöglicht, die eine notwendige Bedingung zur Reproduzierbarkeit der durchgeführten Kultivierungen darstellt.

Eine Trübungssonde der Fa. optek-Danulat, Essen, erfasst das Zellwachstum als eine Funktion der NIR-Absorption (840-910 nm). Dabei wird die Abschwächung der Lichtintensität durch Absorption und/oder Streuung an den Inhaltsstoffen im Trägermedium von einer Silizium-Photodiode erfasst [optek-Danulat, 2005].

Aus dem Durchlichtsignal S_{turb} wurde die Zelldichte $c_{\text{X|turb}}$,

$$c_{\text{X|turb}}(t) = k_1 \cdot (e^{k_2 \cdot S_{\text{turb}}(t)} - 1) \quad (3.1)$$

mit

$$\begin{array}{ll} k_1 & := \text{Zelldichteparameter} & [\text{gl}^{-1}] \\ k_2 & := \text{Trübungsparameter} & [\text{AU}^{-1}], \end{array}$$

unter Verwendung eines exponentiellen Ansatzes estimiert.

Die Anpassung der stammspezifischen Koeffizienten k_i erfolgt postexperimentell an die Werte der Biotrockenmassebestimmung $c_{\text{XL_CDW}}$ über das heuristische Simplexverfahren nach Nelder-Mead [Nelder und Mead, 1965]. Die Kennlinie zur Abschätzung der Zelldichte ist in Abb. 3.8 zusammen mit dem Rohsignal S_{turb} sowie der angepassten Zelldichte $c_{\text{X|turb}}$ einer Herstellung von D1M1 gezeigt.

Die separat für die Prozessphasen ermittelten Anpassungsparameter der Produkte D1M1 und D1M1H und sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Durch Implementierung von Gl. (3.1) und Hinterlegung der ermittelten Parameter im Prozessführungssystem MFCS/win erfolgte eine Online-Abschätzung der unbekannt-ten Zelldichte über die Trübungsmessung [Kaiser, 2010].

Die aus der Trübungsmessung approximierte Zelldichte ist ein wichtiger Bestandteil der Prozessautomatisierung, da diese als Startparameter für die exponentielle Glycerol-Zufütterung, als Übergangskriterium der einzelnen Prozessphasen sowie als Basis für die Ernte- bzw. Refresh-Berechnungen verwendet wird.

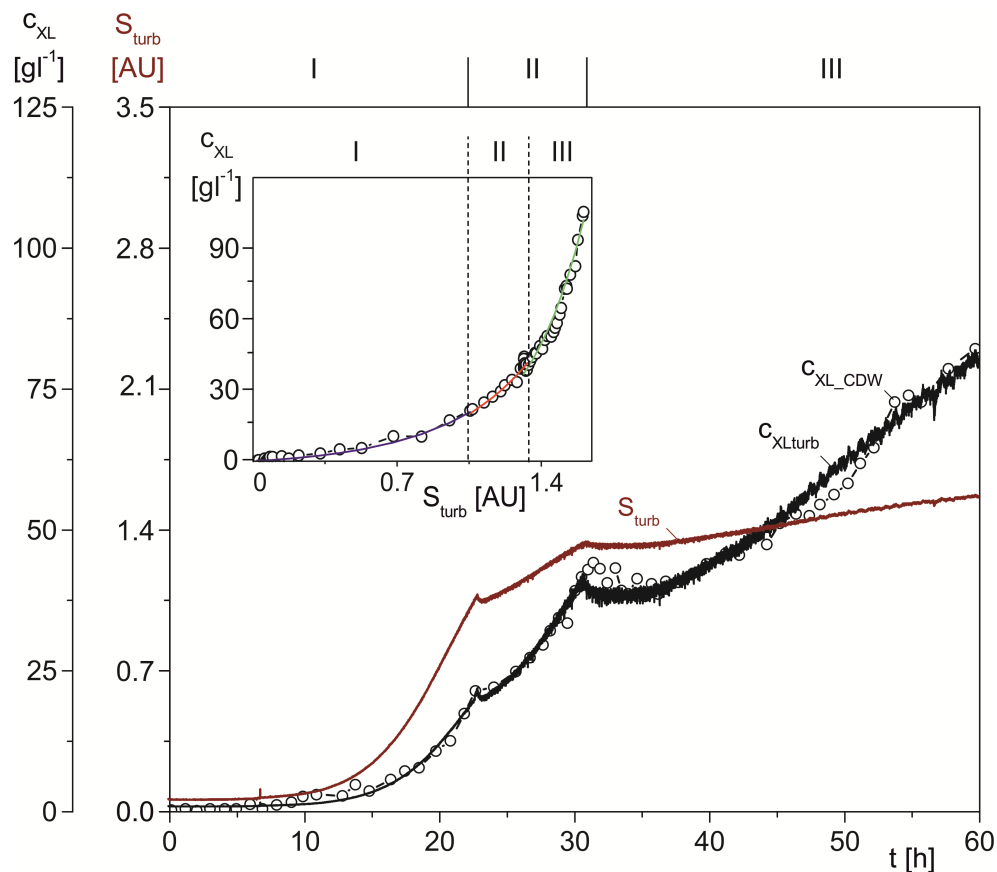


Abb. 3.8: Kennlinie und Abschätzung der Zelldichte bei der Herstellung von D1M1

Tab. 3.2: Parameter der Trübungsanpassung

Produkt	Koeffizient	batch (I)	fed batch (II)	production (III)
D1M1	k_1 [gl^{-1}]	2.259	1.693	0.441
	k_2 [AU^{-1}]	2.196	2.425	3.378
D1M1H	k_1 [gl^{-1}]	0.564	0.037	0.068
	k_2 [AU^{-1}]	1.893	3.197	2.867

Mit der Prozessleitsoftware MFCS/win (*Multi Fermenter Control System for Windows*) und dem implementierten Tool S88c der Fa. Sartorius BBI Systems werden die Prozesse über eine geeignete Programmierung automatisiert.

Zur Umsetzung der gewünschten Prozessstrategie wird zusätzlich ein externes Programmmodul *MFCS-Tool* verwendet, dessen Funktionen eine erweiterte Regelung des pO_2 , die automatische Erkennung des Batch Endes und die exponentielle Substratzugabe zur Steuerung der zellspezifischen Wachstumsrate μ_{1w} im Glycerol-Fed Batch bilden. Das in Visual Basic programmierte Modul ist in [Cornelissen, 2004] beschrieben.

Wesentlich ist dabei der Sollwert der Substratzufüterraute F_{R1w} ,

$$F_{R1w}(t) = F_{R1j} \cdot e^{\mu_{1wj} \cdot (t-t_j)}, \quad (3.2)$$

der bei Vorgabe des Startwertes F_{R1j} ,

$$F_{R1j} = \frac{(\mu_{1wj} + q_{S1/Xm} \cdot y_{X/S1gr}) \cdot V_{Lj} \cdot c_{XLj}}{y_{X/S1gr} \cdot c_{S1R1}} \quad (3.3)$$

mit

t_j	:= Start- oder Änderungszeitpunkt der μ -Steuerung	[gl ⁻¹]
μ_{1wj}	:= Sollwert der μ -Steuerung bei t_j	[h ⁻¹]
$q_{S1/Xm}$:= zellspezifische Maintenance-Glycerolaufnahmerate	[h ⁻¹]
$y_{X/S1gr}$:= Ausbeutekoeffizient des Zellzuwachses auf Glycerol	[-]
V_{Lj}	:= Volumen der Flüssigphase bei t_j	[l]
c_{XLj}	:= Zellkonzentration bei t_j	[gl ⁻¹]
c_{S1R1}	:= Konzentration im Glycerolreservoir R1	[gl ⁻¹],

online ansteuerbar ist [Schultz, 2001]. Die Bestimmung der erforderlichen Reaktionsparameter $y_{X/S1gr}$ und $q_{S1/Xm}$ wird in Kapitel 6 erläutert.

Zusätzlich wurde das *BioPAT*[®] *MFCS/win DoE* Modul eingesetzt, das eine DoE-konforme Rezeptur im Prozessleitsystem MFCS/win über eine direkte Anbindung der DoE-Software MODDE[®] (Umetrics, Malmö, Schweden) ermöglicht [Fricke et al., 2013].

Über die Automatisierung der Kultivierungen wird somit ein reproduzierbarer Ablauf mit erleichterter Handhabung sichergestellt.

4 Offline-Analytik

Es wurden während der Prozesse Proben entnommen, zentrifugiert und zur späteren Analyse als Kulturüberstand und Zellen getrennt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (Cell Dry Weight – CDW) erfolgte eine Trocknung von Aliquots der Kulturbrühe in vorgewogenen Reaktionsgefäßen.

Mehrere Offline-Methoden wurden zur Überprüfung der Qualität und Quantität der Zielproteine angewandt, da neben der Produktausbeute die Produktreinheit ein wichtiger Faktor in der Bewertung der Expressionsstrategie ist.

Die genaue Vorgehensweise der Analysemethoden und die erforderlichen Lösungen sind dem Anhang zu entnehmen.

4.1 Gesamtproteinbestimmung

Der Gehalt an Gesamtprotein c_{PtotK} wird mit der Methode nach [Bradford, 1976] kolorimetrisch bestimmt. Dabei wird das *Quick Start™ Bradford Protein Assay* der Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA, verwendet.

4.2 Bestimmung der Produktreinheit

Zur Analyse der Reinheit der Proteine erfolgt zunächst eine SDS-PAGE und dann mithilfe der Analysesoftware TotalLab® Quant eine quantitative Auswertung der Färbungsintensität der Proteinbanden, die in Abb. 4.1 gezeigt ist.

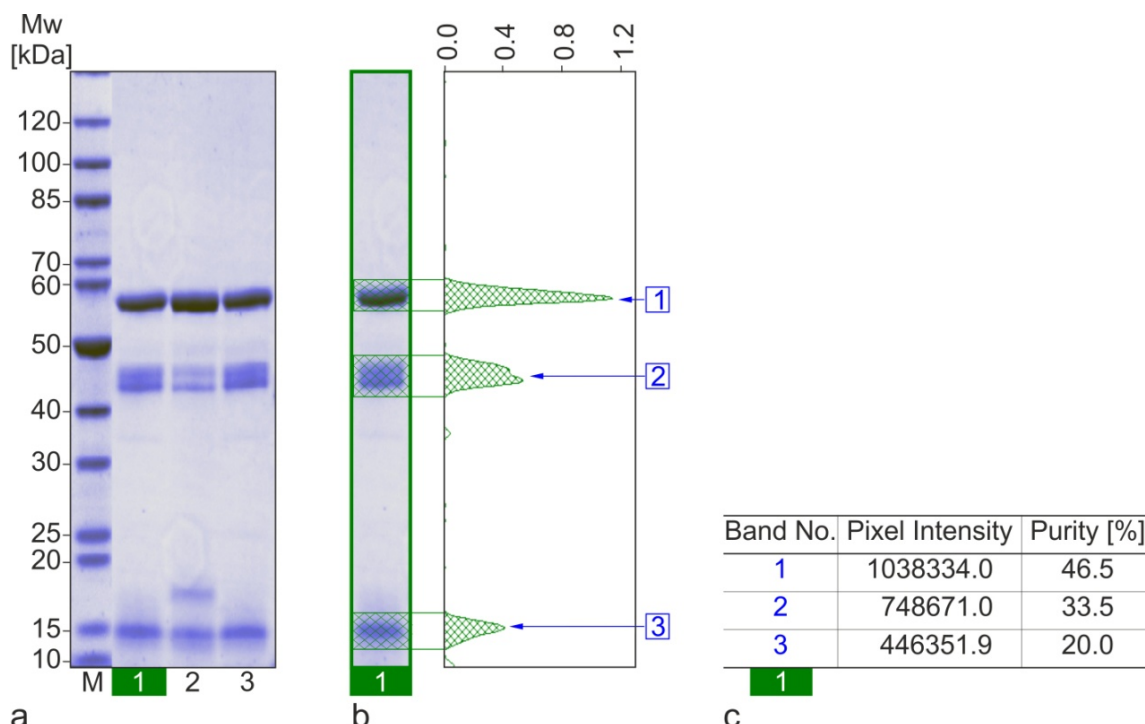


Abb. 4.1: SDS-PAGE als Produktanalytik
 a: Elektrophoretische Auftrennung des Kulturüberstandes
 b: Densitometrische Erfassung der Proteinbanden
 c: Densitometrische Auswertung der Proteinbanden

Die eindeutige Zuordnung einer Bande B_j ermöglicht die Angabe der Reinheit P_{PiK} des zu analysierenden Proteins P_i ,

$$P_{PiK} = \frac{B_{jK}}{\sum_{l=1}^n B_{lK}}, \quad K = A, M \quad (4.1)$$

mit

P_{PiK} := Reinheit des Produktes P_i im System K [-]

B_{jK} := Pixelintensität der SDS-PAGE Bande j des Produktes P_i [-]

B_{lK} := Pixelintensität einer Produktbande l [-]

n := Anzahl der Banden in der auszuwertenden Lane [-]

A := Analysestrom (Filtrat der ESIP)

M := Medienphase,

in der zu bewertenden Probe aus dem System K .

Die Konzentration c_{PiK} des Proteins i in K ,

$$c_{PiK} = P_{PiK} \cdot c_{PtotK}, \quad K = A, M \quad (4.2)$$

mit

c_{PiK} := Konzentration des Proteins i in K [$g l^{-1}$]

c_{PtotK} := Konzentration des Gesamtproteins in K [$g l^{-1}$],

lässt sich dann über die Reinheit des Proteins P_{PiK} und die nach Bradford analysierte Gesamtproteinkonzentration c_{PtotK} berechnen.

4.3 Identifikations- und Antigenitätstest

Zur Identifizierung und Überprüfung der Antigenität der produzierten Proteine wird ein Western Blot angewandt, welcher einen Transfer (Blotting) von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran mit anschließender Immuno-detektion beinhaltet, die in Abb. 4.2 schematisch dargestellt ist.

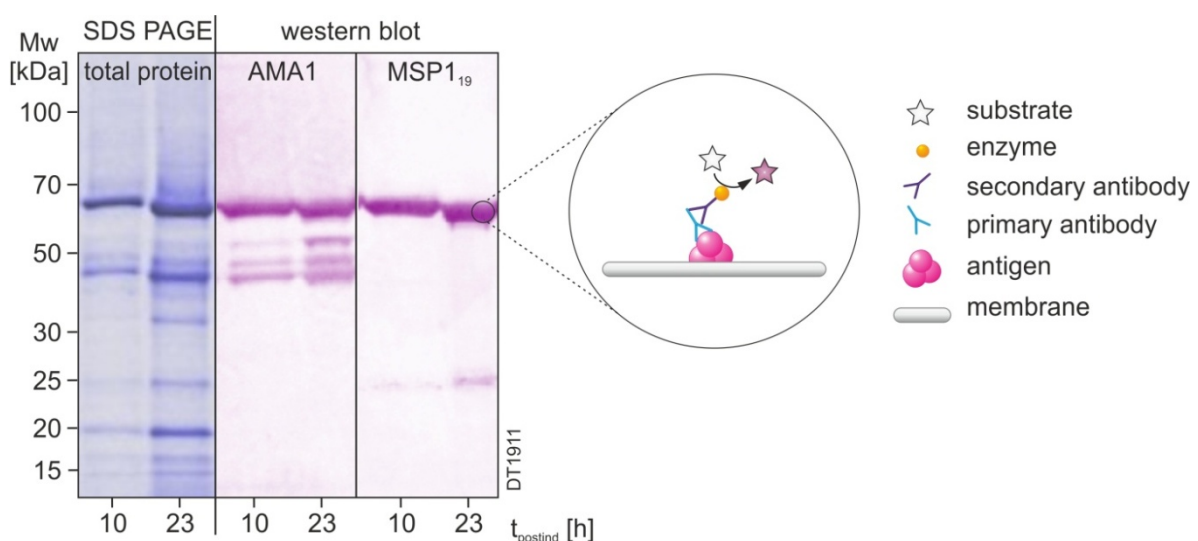


Abb. 4.2: Analyse des Kulturüberstands durch SDS-PAGE und Western Blot

Durch gezielten Einsatz von Primärantikörpern gegen AMA1 und MSP1₁₉, wie beispielhaft in Abb. 4.2 gezeigt ist, als auch gegen die Prodomäne lassen sich so neben den Impfstoffkandidaten auch Produktfragmente identifizieren. Die genannten Antikörper sind, bis auf letzteren, reduktionssensitiv. Daher ist eine korrekte Faltung des Antigens Voraussetzung für eine Bindung an das diskontinuierliche Epitop (vgl. Kapitel 2).

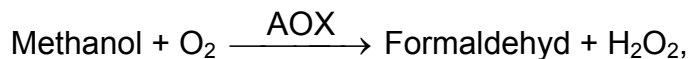
Als Sekundärantikörper wurden Enzymkonjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) eingesetzt, welche zum kolorimetrischen Nachweis die Umsetzung des Substrats BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Nitroblau Tetrazolium) katalysiert.

4.4 Enzymatischer Alkoholoxidasenachweis

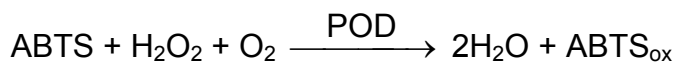
Die Untersuchung der zellinternen Alkoholoxidaseaktivität wird durch einen gekoppelten ABTS/Peroxidase Enzymassay durchgeführt, das auf der von Janssen und Ruelius (1968) beschriebenen Methode basiert.

Da das Enzym intrazellulär vorliegt, erfolgt zunächst ein mechanischer Zellaufschluss mit Glasperlen unter Verwendung von Proteaseinhibitoren.

Die folgende Analyse basiert auf der Umsetzung von Methanol durch AOX,



wobei das gebildete Wasserstoffperoxid durch Peroxidase (POD) das ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)),



oxidiert. Im oxidierten Zustand kann dessen Farbintensität über die Extinktion E bei einer Wellenlänge λ von 405 nm gemessen werden.

Eine Unit der AOX-Aktivität ist definiert zu einem μmol umgesetzten ABTS pro Minute. Die Aktivität der Alkoholoxidase A_{P2S} im Aufschlussansatz S,

$$A_{\text{P2S}}(t_j) = \frac{V_S}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P} \cdot F(t_j) \cdot \dot{E}(t_j) \quad (4.3)$$

mit

A_{P2S}	:= Aktivität der Alkoholoxidase im Aufschlussansatz S	[U l ⁻¹]
t_j	:= Probenahmezeitpunkt	[h]
\dot{E}	:= zeitliche Extinktionsänderung	[min ⁻¹]
ε	:= molarer Extinktionskoeffizient von ABTS bei 405 nm	[$\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
d	:= Schichtdicke des Reaktionsansatzes	[cm]
V_S	:= Gesamtvolumen des Aufschlussansatzes	[l]
V_P	:= Volumen der Probe	[l]
F	:= Vorverdünnungsfaktor	[-],

lässt sich somit aus der linearen Extinktionsänderung unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes und des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ nach [Keeseey, 1987] berechnen.

Die zellspezifische AOX-Aktivität $g_{P2/X}$,

$$g_{P2/X}(t_j) = \frac{A_{P2S}(t_j)}{c_{XS}(t_j)}, \quad (4.4)$$

mit

$$\begin{aligned} g_{P2/X} &:= \text{zellspezifische AOX-Aktivität} && [\text{Ug}^{-1}] \\ c_{XS} &:= \text{Zelldichte im Aufschlussansatz} && [\text{gl}^{-1}], \end{aligned}$$

ergibt sich aus der AOX-Aktivität im Aufschlussansatz A_{P2S} bezogen auf die im Aufschluss enthaltene Zelldichte c_{XS} und entspricht somit dem zellspezifischen Gehalt an AOX.

4.5 Zellinternes Zielprodukt

Zur Quantifizierung des zellinternen D1M1H wurde ein ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) unter Verwendung von Ni-NTA HisSorp Platten der Fa. Qiagen, Venlo, Niederlande, durchgeführt.

Der erforderliche Zellaufschluss geschieht ebenfalls mechanisch mit Glasperlen unter Verwendung von Proteaseinhibitoren. Die Analyse des Aufchlusses mittels Western Blot unter Verwendung eines Cocktails produktspezifischer Antikörper in Abb. 4.3 zeigt exemplarisch, dass im Gegensatz zum Kulturüberstand (M) das Zelllysate (Z) neben dem intakten D1M1H bei 63 kDa kein Produktfragment enthält.

Die Analyse zeigt zudem, dass die Quantifizierung des zellinternen Zielproteins nicht analog zum externen über die Auswertung der Färbungsintensität der Proteinbanden der SDS-PAGE geschehen kann, sondern es zur Detektion einer spezifischen Färbung bzw. einer Aufreinigung des Zielproduktes bedarf.

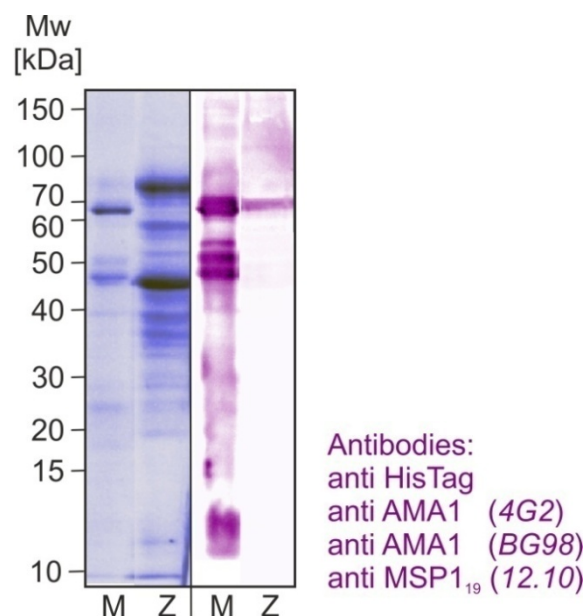


Abb. 4.3: Analyse des Zellaufchlusses mittels SDS-PAGE und Western Blot

Daher erfolgt eine Immobilisierung des Zielproteins aus dem Zelllysate mit Ni-IMAC anhand von Mikrotiterplatten, die eine Oberflächenbeschichtung aus Nitrilotriessigsäure (NTA) enthalten. Dies bildet mit Nickelionen einen Metallchelate, in den der HisTag des Zielproduktes eingelagert wird (vgl. Kapitel 5.3).

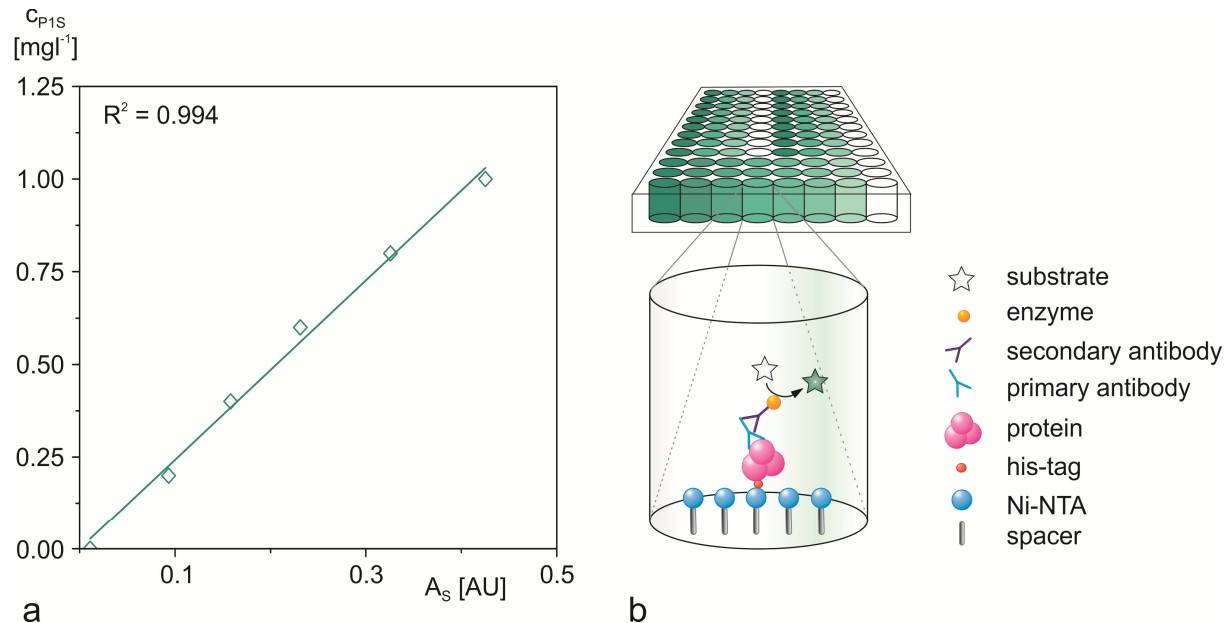


Abb. 4.4: ELISA mit Ni-NTA zur Messung des internen D1M1H

Die weitere Analyse erfolgt analog zum Western Blot immunochemisch durch den Einsatz eines Primärantikörpers gegen das Antigen und eines Sekundärantikörpers zur Detektion, was in Abb. 4.4b schematisch dargestellt ist. Dabei wird ein produktspezifischer, polyklonaler Antikörper (*BG98*) eingesetzt, der neben konformativen auch lineare Epitope erkennt und somit auch an falsch- oder ungefaltetes D1M1H bindet [Faber et al., 2013].

Zur quantitativen Bestimmung wird die Umsetzung von Paranitrophenylphosphat (pNPP) durch die konjugierte Alkalische Phosphatase genutzt, die bei 405 nm in einem Mikroplattenphotometer gemessen werden kann. Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Kalibriergeraden aus aufgereinigtem D1M1H, die in Abb. 4.4a beispielhaft gezeigt ist.

4.6 Glycerolanalytik

Die Quantifizierung des Primärsubstrats Glycerol im Kultivierungsmedium erfolgt mit Hilfe eines HPLC-Systems durch Ionenausschlusschromatographie.

Die offline eingesetzte Anlage LaChrom D-7000 der Fa. VWR International, Darmstadt, besteht aus einem Interface, dem Pumpenmodul (L-7100), einem Säulenofen (L-7360), einem Autosampler (L-7250) und verfügt über einen Dioden Array Detektor (DAD, L-7455) sowie einen Refractive Index Detektor (RI, L-7490).

Als stationäre Phase wird eine RHM-Monosaccharid-Säule der Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, verwendet. Die Hydrathülle der Sulfonsäuregruppen der stationären Phase wird durch eine partiell negativ geladene Donnan-Membran begrenzt, die für

den vollständig undissoziiert vorliegenden Analyten passierbar ist. Dieser wird am Säulenmaterial adsorbiert und retardiert.

Die Steuersoftware D-7000 HSM erlaubt eine automatische Vermessung der Proben über einen Autosampler. Zur Analyse wurden 50 μl Kulturüberstand in einen 0.6 ml min^{-1} Fluss von 10 mM Schwefelsäure injiziert und der Säulenofen auf $60 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

Für die Ermittlung der Glycerolkonzentration im Medium c_{S1M} wurde eine Zehn-Punkt-Kalibrierung durchgeführt und die Fläche unter dem Glycerolpeak im Signal des RI-Detektors herangezogen. Eine Kalibriergerade sowie die Verfahrenskenn-daten Korrelationskoeffizient (R^2), Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) sind in Abb. 4.5 gezeigt.

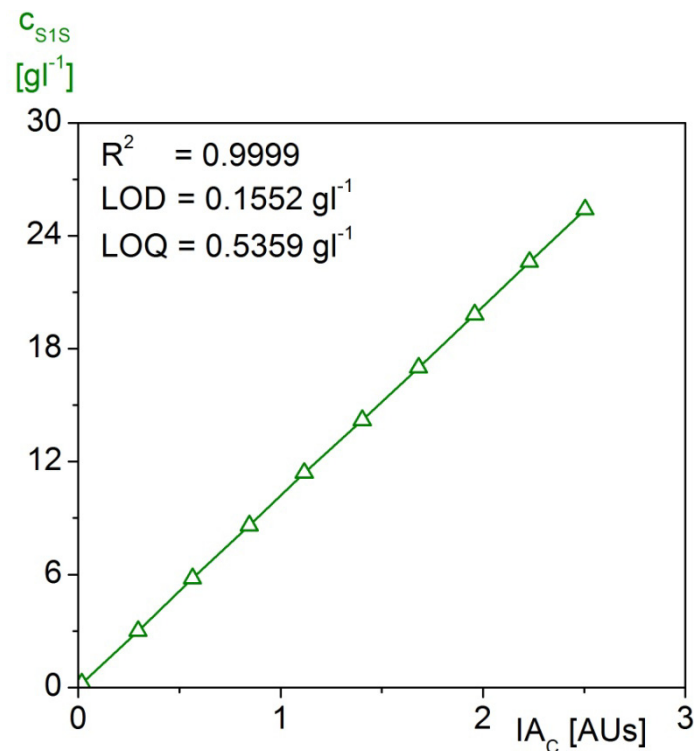


Abb. 4.5: Zehnpunktkalibrierung der Glycerolmessung

5 Atline-Detektion der Zielprodukte

5.1 Der verwendete Messaufbau

Für eine Atline-Detektion der Zielproteine wurde die Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) in einer HPLC-Anlage angewendet.

Als Chromatographiesystem wurde das Modell LaChrom Elite[®] der Fa. VWR International (Darmstadt) eingesetzt, das aus den Modulen Organizer, Pumpe (L-2130), Säulenofen (L-2300) sowie UV-Detektor (L-2400) besteht und im Verlauf dieser Arbeit um einen Fluoreszenzdetektor (L-2480) erweitert wurde.

In Abb. 5.1 ist die HPLC-Anlage in der verwendeten Konfiguration schematisch dargestellt.

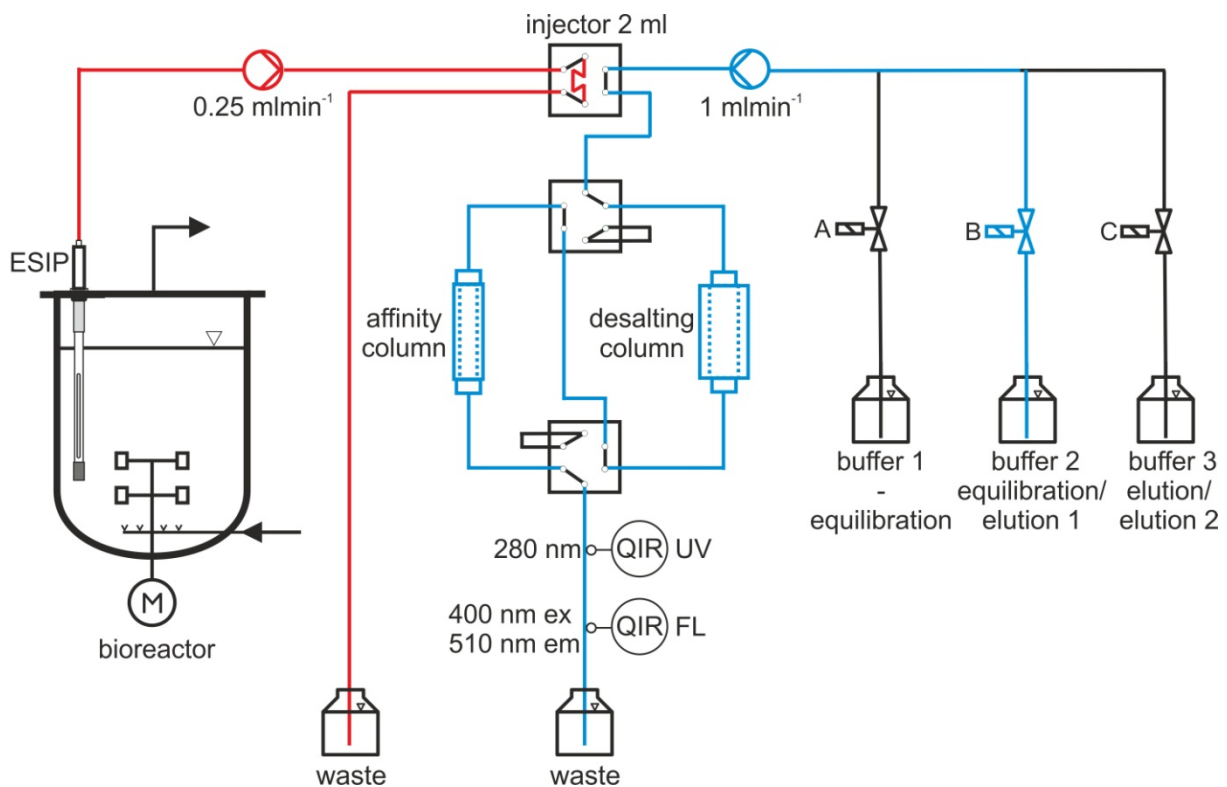


Abb. 5.1: Fließschema zur Atline-Detektion der Produkte

Zur IMAC wird neben der mit Kupfer(II) oder Nickel(II) aktivierten Affinitätssäule (HisTrap[™] Fast Flow Crude 1 ml, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden) eine Größenausschusssäule (HiTrap[™] Desalting, 5 ml, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) zur Umpufferung eingesetzt, wobei die Injektion und die Säulenschaltung über drei Six-Port-Ventile der Fa. ERC, Riemerling, umgesetzt wird. Die Automatisierung der Anlage erfolgt über die Software *EZChrom Elite*.

Zur Atline-Analytik bedarf es einer zellfreien Probenahme, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, bevor die verwendeten IMAC-Methoden erläutert werden.

5.2 Filtrationssonde ESIP

Der zur Atline-Analyse der Zielprodukte benötigte zellfreie Analysestrom F_A wird dem Bioreaktor über eine *in situ* sterilisierbare Inline-Filtrationssonde ESIP – *Eppendorf Sterilizable Inline Probe* der Fa. TRACE Analytics, Braunschweig, entnommen, die in Abb. 5.2 gezeigt ist.

Die Sonde enthält eine Rohrmembran aus Polypropylen mit einer Porengröße von $0.2 \mu\text{m}$ und erlaubt einen maximalen Analysestrom $F_{A\text{max}}$ von 2 mlmin^{-1} . Durch eine Peristaltikpumpe der Fa. Gilson, Middleton, USA, wird der Analysestrom zur Probenschleife der HPLC gefördert.



Abb. 5.2: Eppendorf Sterilizable Inline Probe (ESIP)

Die Membran wurde bei Kultivierungen gelegentlich durch Zellen oder Salze verblockt, wodurch der zur Analyse erforderliche Mindeststrom F_{Aw} von 0.25 mlmin^{-1} nicht über die gesamte Prozessphase gewährleistet werden konnte, wie beispielhaft in Abb. 5.3 gezeigt ist. Zur Reaktivierung der Filtrationsleistung wurde die Sonde in dem gezeigten Prozess daher bei $t = 94.5 \text{ h}$ und $t = 119 \text{ h}$ manuell gegengeschpült.

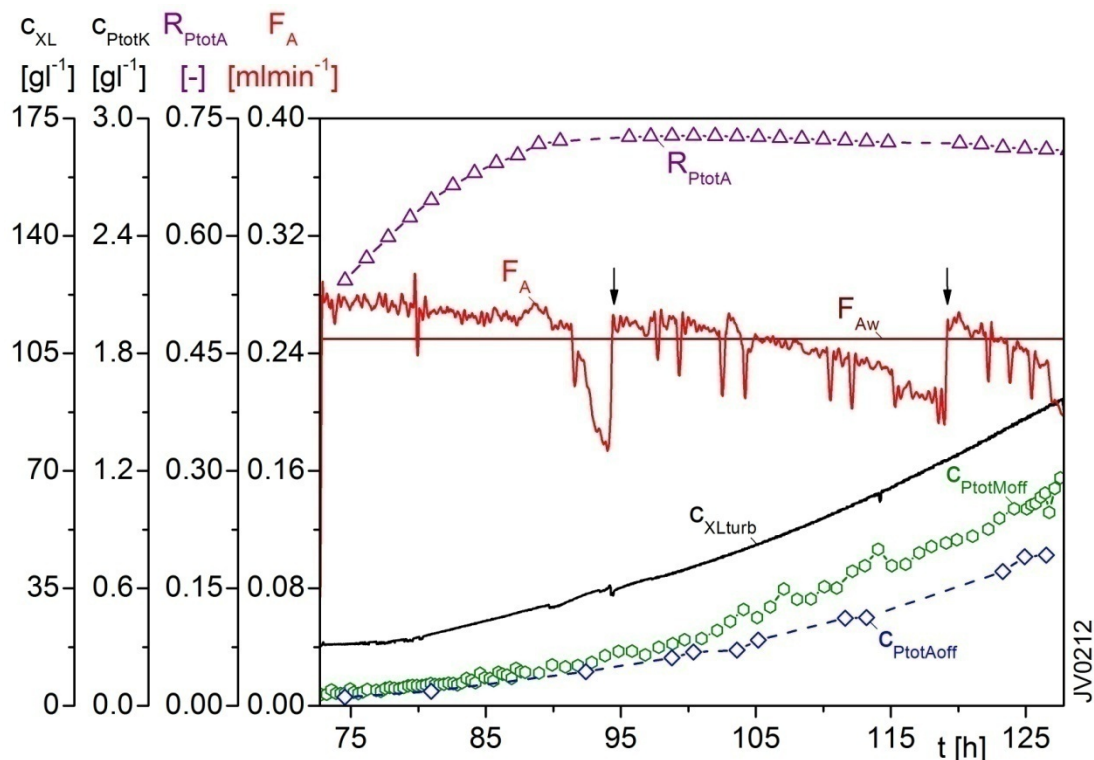


Abb. 5.3: Gesamtproteinanalyse der Medienphase und des ESIP-Analysestroms

Der erhaltene Analysestrom entspricht in Bezug auf den Proteingehalt jedoch nicht zwangsläufig der Medienphase, wie ebenfalls in Abb. 5.3 gezeigt ist.

Die Gesamtproteinwiederfindung (Recovery) im Analysestrom $R_{P_{totA}}$,

$$R_{P_{totA}}(t_j) = \frac{c_{P_{totA}}(t_j)}{c_{P_{totM}}(t_j)}, \quad (5.1)$$

lässt sich über die offline bestimmten Gesamtproteinkonzentrationen $c_{P_{totK}}$ beider Teilsysteme bestimmen.

Die Proteinzusammensetzung des Analysestroms ist in dieser Kultivierung mit der in der Medienphase vergleichbar, wie in Abb. 5.4 durch die Reinheit $P_{P_{1K}}$ des Zielproteins P_1 und die Reinheit $P_{P_{3K}}$ des Nebenproduktes P_3 in beiden Teilsystemen M (Reaktormedium) und A (Analysestrom) gezeigt ist.

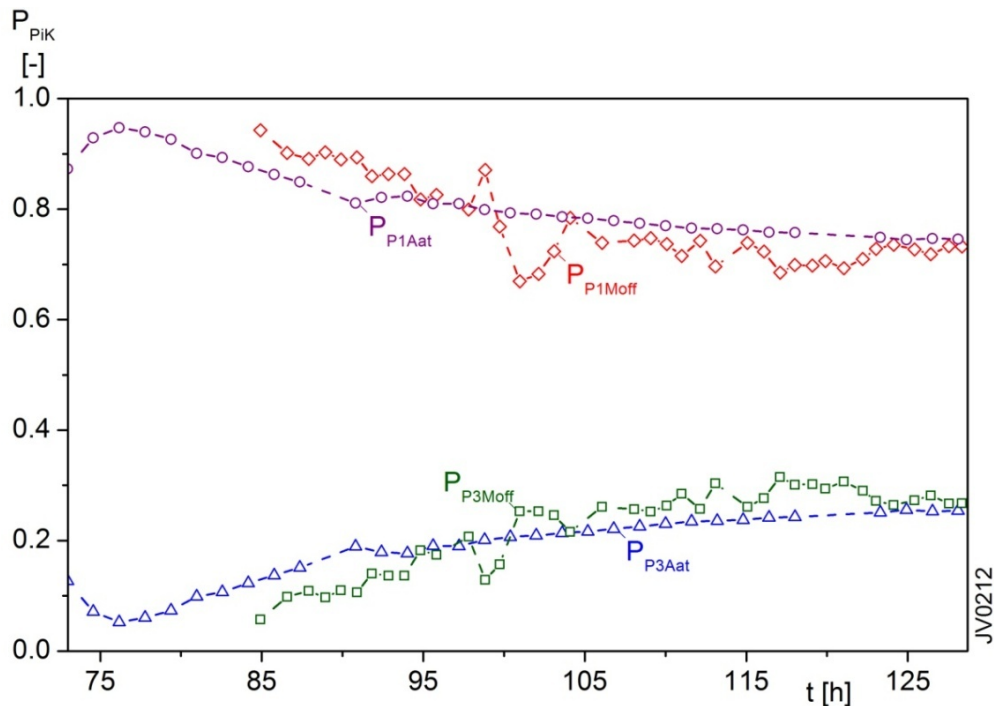


Abb. 5.4: Vergleich der Proteinreinheiten in der Medienphase und im Analysestrom

Es muss beachtet werden, dass die von der Filtrationssonde zurückgehaltenen Proteine von der Atline-Analytik nicht erfasst werden.

Daher sollte zur Korrektur der Atline-Signale durch die Wiederfindung $R_{P_{iA}}$ der Einzelprodukte im ESIP-Strom,

$$R_{P_{totA}}(t_j) = \frac{c_{P_{totA}}(t_j)}{c_{P_{totM}}(t_j)}, \quad (5.2)$$

bestimmt werden.

Bei zyklischen Prozessen ist die Produktwiederfindung $\bar{R}_{P_{iAk}}$ im Atline-Probestrom,

$$\bar{R}_{P_{iAk}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{c_{P_{iAkoff}}(t_j)}{c_{P_{iMkoff}}(t_j)}, \quad (5.3)$$

für jeden Zyklus k getrennt zu ermitteln.

In Tab. 5.1 ist eine Übersicht der Wiederfindungen in verschiedenen Kultivierungen gezeigt.

Bei zyklischen Prozessen, wie bei SM0313, ist auffällig, dass trotz Gegenspülung die Proteinwiederfindung über den Gesamtprozess abnimmt. Zudem ist die Membran bei der Produktion von D1M1H für das ca. 43 kDa schwere Nebenprodukt P_3 leichter passierbar als für das 63 kDa schwere Zielprodukt P_1 . Eine Untersuchung der Proteinrückhaltung durch die Filtrationssonde für das Modellprotein GFPH wurde ebenfalls durchgeführt.

Tab. 5.1: Wiederfindungen aus verschiedenen Kultivierungen

Zielprodukt	Kultivierung	Zyklus	\bar{R}_{P1A} [-]	\bar{R}_{P3A} [-]
D1M1H	JV0212	-	0.73	0.73
D1M1H	SM0313	1	0.49	0.80
		2	0.47	0.70
		3	0.37	0.59
		4	0.35	0.53
		5	0.33	0.41
GFPH	OT3712	-	0.59	0.59

5.3 Anwendung verschiedener IMAC-Methoden

Der Hexa-Histidin-Schwanz von D1M1H und dem Modellprotein GFPH ermöglicht die chromatographische Trennung über Ni(II)-IMAC, während über die histidinreiche Prodomäne von D1M1 als natürlicher Tag dieses mit Cu(II) aufgereinigt werden kann.

Das Prinzip basiert auf der Komplexbildung eines Metallions mit einem am Säulenmaterial immobilisierten mehrzähligen Liganden, in den Histidinreste reversibel eingelagert werden können und so eine Trennung von Proteinen mit unterschiedlicher Anzahl und Anordnung oberflächenständiger Histidine erlaubt. Um ionische Wechselwirkungen zu unterdrücken, ist eine Mindestionenstärke erforderlich. Eine unprotonierte Elektronendonorguppe zur Bindung des Proteins ist für Histidin bei einem neutralen pH-Wert gegeben.

Die erforderliche Umpufferung erfolgt sukzessiv in fünf Teilproben à 2 ml, da das Volumen der Entsalzungssäule das Probenvolumen limitiert. Das Zielprotein wird so auf der Säule akkumuliert, um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze zu erreichen.

Der Einsatz des um Bindungsstellen konkurrierenden Moleküls Imidazol bewirkt die Elution säurelabiler Proteine auch bei neutralem pH-Wert. Neben der üblichen einstufigen Elution für D1M1 wurde später eine zweistufige Elution zur Detektion von D1M1H und GFPH und deren Fragmenten eingesetzt. Die Zusammensetzung der sowohl für Ni(II)- als auch für Cu(II)-IMAC verwendeten Puffer ist in Tab. 5.2 gezeigt.

Tab. 5.2: Verwendete Puffer bei der IMAC

	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
Phosphat	20.0 mM	20.0 mM	20.0 mM
NaCl	0.5 M	0.5 M	0.5 M
Imidazol	0.0 mM	15.0 mM	100.0 mM
pH	7.4	7.4	7.4

Die Auswertung der Messungen über die Peakhöhe, die entweder als Rohsignal $A_{C,E}$ in Absorptionseinheiten AU bzw. $FL_{A,E}$ in Fluoreszenzeinheiten FLU oder als korrelierte Konzentration c_{PiA} des Produktes P_i in Konzentrationseinheiten $mg\ l^{-1}$ an das Prozessleitsystem übergeben werden.

Die Elutionsmethoden sowie die Möglichkeit der Kalibrierung der IMAC, die abhängig von der Proteinzusammensetzung der Kulturbrühe ist, wird im Folgenden für die Zielprodukte D1M1, D1M1H und GFPH getrennt betrachtet.

5.3.1 Detektion von D1M1 mittels Cu(II)-IMAC

Zur Analyse von D1M1 erfolgt die Equilibrierung und Probenaufgabe mit Puffer 2 zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen und eine einstufige Elution des Zielproteins mit Puffer 3. Ein typisches Chromatogramm mit den charakteristischen fünf Teilprobenaufgaben ist in Abb. 5.5a gezeigt.

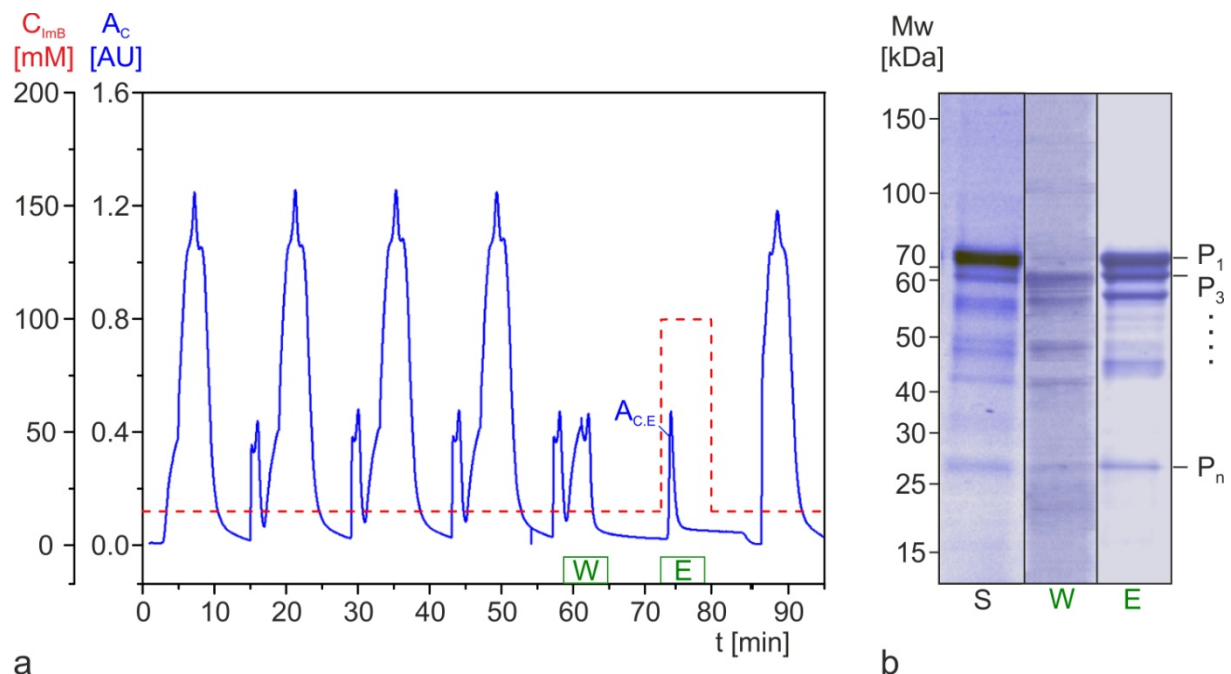


Abb. 5.5: Analyse von D1M1

a: Chromatogramm der Atline-IMAC, b: SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen S: Ausgangsprobe, W: Wash und E: Elution

Die Produktbezeichnungen in dieser Arbeit werden mit P_1 für das Zielprotein und mit P_2 für die zellinterne Alkoholoxidase festgelegt. Zielproduktfragmente und andere auftretende Proteine werden mit P_3 bis P_n bezeichnet.

Wie in Abb. 5.5b gezeigt ist, enthält die einstufige Elution E von D1M1 neben dem Zielprodukt eine Kontamination an prodomänehaltigen Produktfragmenten. Im Waschschrift W zur Verdrängung unspezifisch gebundener Proteine sind ebenfalls eine Reihe an Proteinen vorzufinden.

Da das Verhältnis von D1M1 zu den übrigen Komponenten des Eluats über die Prozesszeit nicht konstant ist (siehe Kapitel 7.1), kann keine direkte Korrelation zwischen der Zielproduktkonzentration c_{P1M} und der Höhe des Elutionspeaks $A_{C,E}$ erfolgen. Die Atline-Messung von D1M1 stellt somit ein nicht aufzulösendes Rohsignal $A_{C,E}$ in Absorptionseinheiten AU dar.

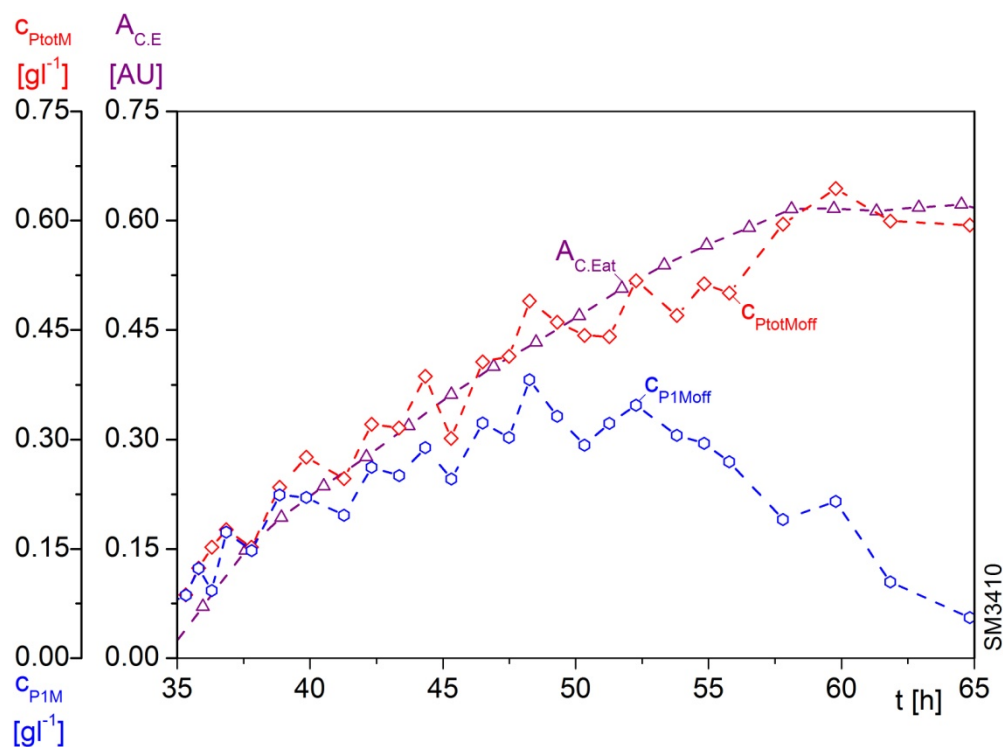


Abb. 5.6: Produktion von D1M1 mit Offline-Proteinbestimmungen $c_{P_{totM}}$ und $c_{P_{1M}}$ sowie dem Atline-Rohsignal $A_{C,E}$ der HLPC

Wie in Abb. 5.6 gezeigt ist, weist das Atline-Signal $A_{C,E}$ der Cu(II)-IMAC einen vergleichbaren Verlauf zum Gesamtproteingehalt $c_{P_{totM}}$ auf, nicht jedoch zur Zielproteinkonzentration $c_{P_{1M}}$, deren Offline-Bestimmung über die Gln. (4.1) und (4.2) somit unerlässlich ist.

5.3.2 Detektion von D1M1H mittels Ni(II)-IMAC in einstufiger Elution

Die Atline-Detektion von D1M1H erfolgt über den C-terminalen His-Tag mittels Ni(II)-IMAC. Die Puffer zur Equilibrierung und Elution entsprechen denen der Aufreinigung von D1M1 mittels Cu(II)-IMAC.

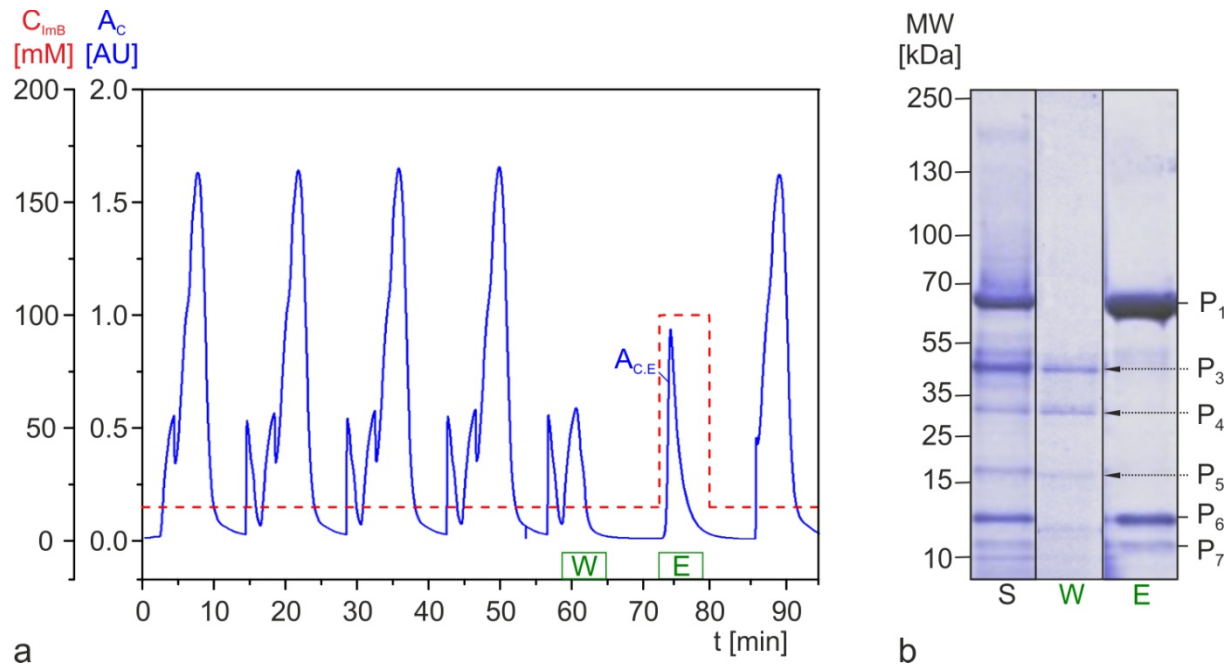


Abb. 5.7: Analyse von D1M1H mit einstufiger Elution
 a: Chromatogramm der Atline-IMAC, b: SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen S: Ausgangsprobe, W: Wash und E: Elution

Der resultierende Peak der einstufigen Elution E, die in Abb. 5.7a exemplarisch gezeigt ist, enthält unter nicht optimierten Kultivierungsbedingungen neben dem Zielprodukt P_1 noch eine begrenzte Anzahl an Produktfragmenten, z. B. P_6 und P_7 , wie in Abb. 5.7 b gezeigt ist. Im Waschschrift W befinden sich ebenfalls Nebenprodukte, P_3 bis P_5 , die im Gegensatz zu den in der Elution befindlichen Proteinen keinen His-Tag enthalten.

Sofern die Reinheit des Zielproduktes P_{P1E} im Eluat,

$$P_{P1E}(t_j) = \frac{B_{jE}}{\sum_{l=1}^n B_{lE}} = \text{const} , \quad (5.4)$$

über den Verlauf der Expression konstant bleibt, kann die Höhe des Elutionspeaks $A_{C,E}$ an die offline bestimmten Produktkonzentrationen c_{P1Moff} ,

$$A_{C,E}(t_j) = \frac{c_{P1Moff}(t_j) - k_{P10}}{k_{P11}} \quad (5.5)$$

mit

$A_{C,E}$:= Absorptionsmaximum der Elution des Analysesystems	[mAU]
c_{P1Moff}	:= offline Zielproduktkonzentration in der Medienphase	[mg l ⁻¹]
k_{P10}	:= Offset der Anpassung für Produkt 1	[mg l ⁻¹]
k_{P11}	:= Steigung der Anpassung für Produkt 1	[mg l ⁻¹ mAU ⁻¹],

über eine Geradengleichung angepasst werden.

Die Anpassung der Koeffizienten k_{P1i} erfolgt über das heuristische Simplexverfahren nach Nelder-Mead [Nelder und Mead, 1965] separat für jeden Prozesszyklus.

Die an offline-Daten angepassten Koeffizienten k_{P1i} ,

$$k_{P1i} = a_{P1i} \cdot R_{P1A}, \quad (5.6)$$

fassen dabei jeweils die beiden unbekanntenen Größen, den Koeffizienten der IMAC-Analyse a_{P1i} und die Proteinwiederfindung R_{P1A} im Analysestrom, zusammen.

Anhand der beiden Koeffizienten k_{P1i} lässt sich nun die Zielproteinkonzentration c_{P1M} im Medium,

$$c_{P1M}(t_j) = k_{P10} + k_{P11} \cdot A_{C,E}(t_j), \quad (5.7)$$

aus der Atline-Analyse $A_{C,E}$ postexperimentell rekonstruieren.

In Abb. 5.8 ist eine Produktionsphase zur Herstellung von D1M1H mit dem Rohsignal der Atline-Analytik $A_{C,E}$, der Offline-Zielproduktkonzentration c_{P1Moff} und dem rekonstruierten Verlauf von c_{P1M} gezeigt.

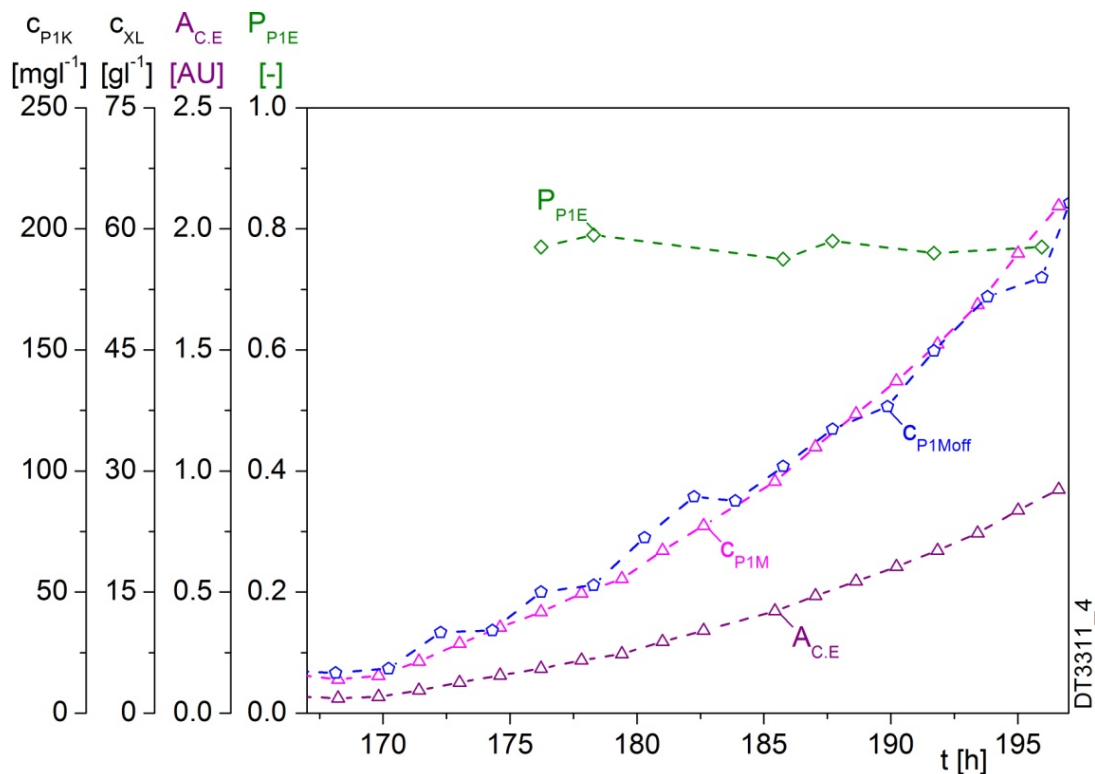


Abb. 5.8: Produktion von D1M1H mit Atline- und Offline-Analytik

Zur Bewertung des Produktionsprozesses ist neben der Zielproteinkonzentration c_{P1M} auch der Gehalt an Produktfragmenten c_{PKM} von Interesse, die über die einstufige Elution nicht erfasst werden. Daher erfolgte eine Weiterentwicklung der IMAC-Methode [Voß, 2012], die im Folgenden erläutert wird.

5.3.3 Detektion von D1M1H mittels Ni(II)-IMAC in zweistufiger Elution

Die zweistufige Elutionsmethode ermöglicht eine Trennung und Quantifizierung der Nebenprodukte, die bei der einstufigen Elution im Wash enthalten sind.

Durch den imidazolfreien Puffer 1 bei der Probenaufgabe werden nun auch unspezifische Bindungen His-Tag loser Proteine zugelassen. Diese werden im ersten Elutionsschritt E₁ durch Puffer 2 verdrängt, bevor die Hexahistidin-getagten Proteine mit Puffer 3 in E₂ eluieren, wie in Abb. 5.9b gezeigt ist.

Abb. 5.9a zeigt ein typisches Chromatogramm der zweistufigen Elution mit den resultierenden Elutionspeaks.

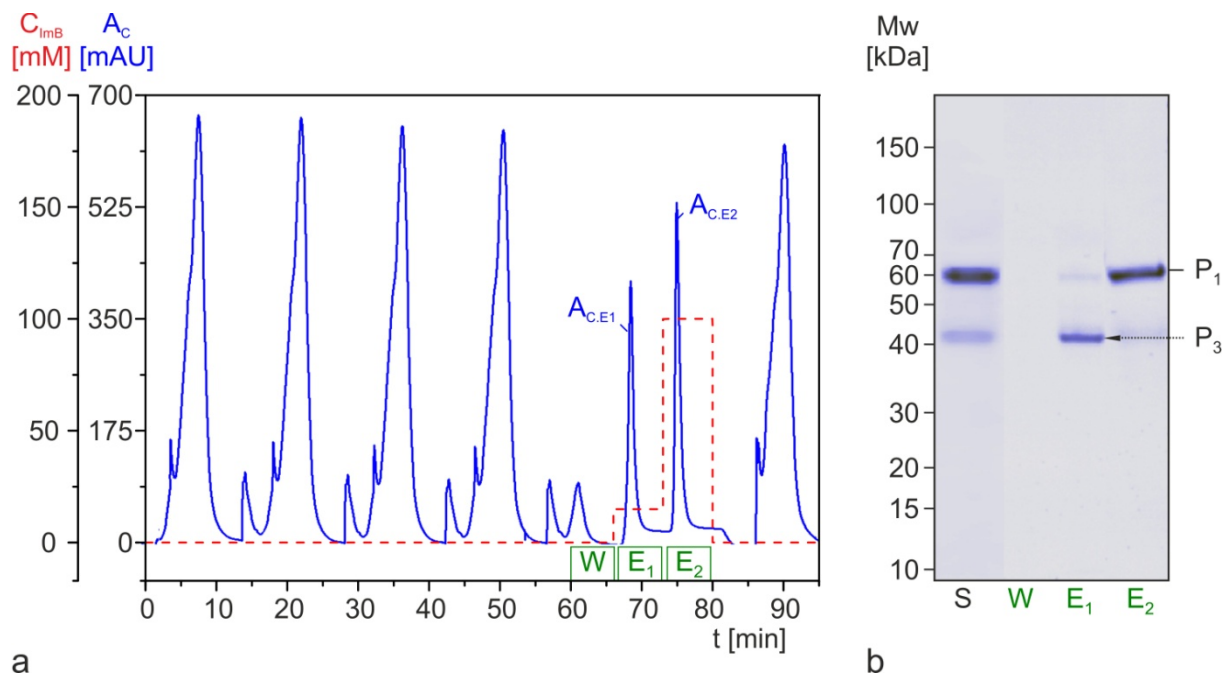


Abb. 5.9: Analyse von D1M1H mit zweistufiger Elution
 a: Chromatogramm der Atline-IMAC, b: SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen, S: Ausgangsprobe W: Wash, E₁: Elution 1 und E₂: Elution 2

Unter optimierten Kultivierungsbedingungen zur Produktion von D1M1H sind im Kulturüberstand vornehmlich das Zielprodukt P₁ und das His-Tag lose Produktfragment P₃ vorhanden, wie in Abb. 5.9b gezeigt ist. Diese können nun anhand einer zweistufigen Elutionsmethode mit unterschiedlicher Imidazolkonzentration getrennt eluiert und damit auch quantifiziert werden.

Die eindeutige Zuordnung des Zielproduktes P₁ zum Eluat E₂ und des Nebenproduktes P₃ zum Eluat E₁ erlaubt eine Kalibrierung der HPLC-Methode und damit letztendlich auch einen Einsatz als Atline-Detektionsmethode.

Dazu werden die offline gemessenen Produktkonzentrationen c_{PiAoff} an die atline gemessenen Höhen der Elutionspeaks $A_{C,Ej}$ über

$$A_{C,Ej}(t_j) = \frac{c_{PiAoff}(t_j) - a_{Pi0}}{a_{Pi1}}, \quad j = 1, 2 \text{ und } i = 3, 1 \quad (5.8)$$

mittels linearer Regression angepasst.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5.10 und in Tab. 5.3 gezeigt.

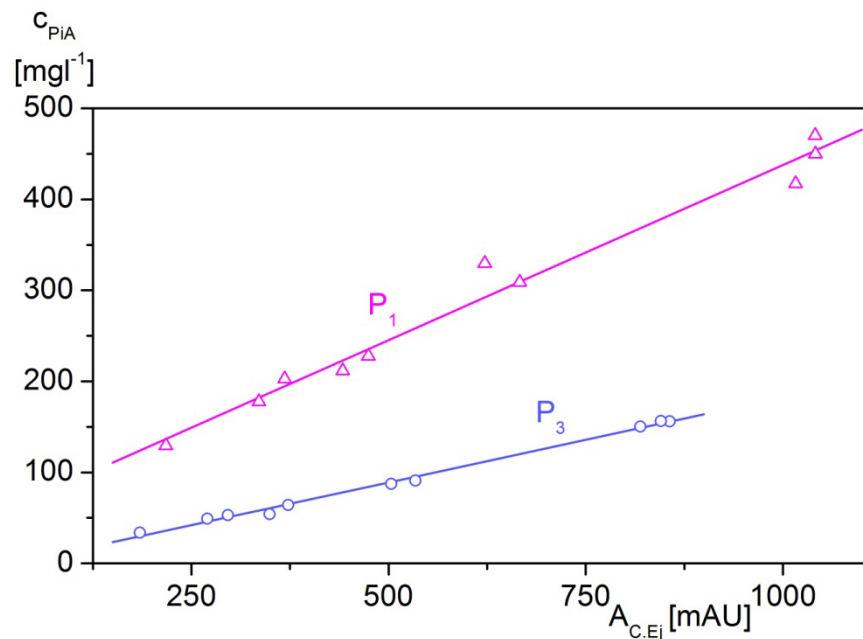


Abb. 5.10: Lineare Regression der Höhe der Elutionspeaks $A_{C,Ej}$ zu den offline ermittelten Produktkonzentrationen c_{PiA} im Analysestrom

Tab. 5.3: Kalibrierung der Atline-HPLC

i	a_{Pi0} [mg l ⁻¹]	a_{Pi1} [mg l ⁻¹ mAU ⁻¹]	R^2 [-]
1	52.87	0.385	0.979
3	- 4.81	0.188	0.995

Mit den in Tab. 5.3 gezeigten Koeffizienten lassen sich nunmehr die im Analysestrom befindlichen Konzentration c_{P1A} für das Zielprodukt P₁,

$$c_{P1A}(t_j) = a_{P10} + a_{P11} \cdot A_{C,E2}(t_j), \quad (5.9)$$

und c_{P3A} für das Nebenprodukt P₃,

$$c_{P3A}(t_j) = a_{P30} + a_{P31} \cdot A_{C,E1}(t_j), \quad (5.10)$$

direkt aus den beiden Elutionspeaks bestimmen und damit auch für ein Atline-Monitoring einsetzen.

Die Darstellung der wahren Konzentration c_{PiM} in der Medienphase unterliegt allerdings der zyklusabhängigen Proteinrückhaltung der Filtrationssonde (siehe Tab. 5.1).

Über die mit Gl. (5.2) bestimmte Produktwiederfindung R_{PiAk} im Inline-Analysestrom F_A ist die Produktkonzentration c_{PiMk} im Medium,

$$c_{PiMk}(t_j) = \frac{c_{PiAk}(t_j)}{R_{PiAk}(t_j)}, \quad (5.11)$$

unter Verwendung der atline gemessenen Produktkonzentration c_{PiAk} für den jeweiligen Zyklus k zu ermitteln.

In Abb. 5.11 sind zwei Zyklen zur Herstellung von D1M1H gezeigt. Dabei sind die atline ermittelten Produktkonzentrationen c_{PiA} und deren mittlere Wiederfindungen \bar{R}_{PiAk} im Analysestrom von Zyklus k sowie die daraus konstruierten Verläufe der Produktkonzentrationen c_{PiM} der Medienphase dargestellt.

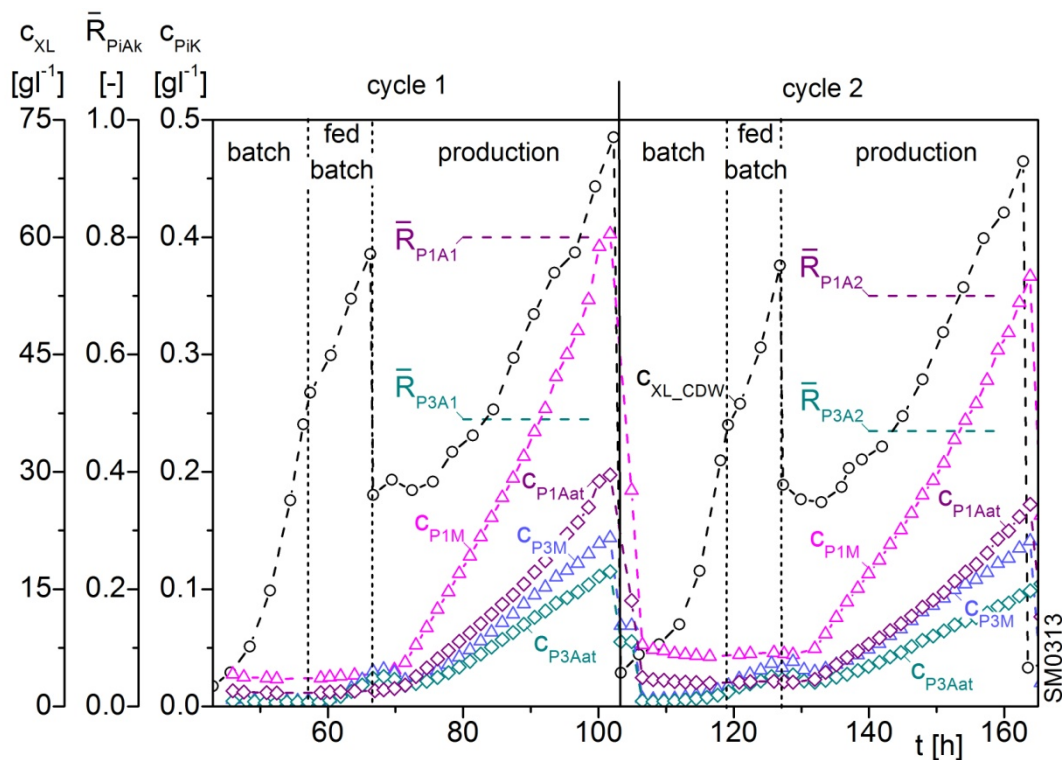


Abb. 5.11: Verlauf der Produkte P_1 und P_2 und deren Wiederfindungen im ESIP-Analysestrom in zwei Produktionszyklen

5.3.4 Detektion von GFPH mittels Ni(II)-IMAC

Das Prinzip der zweistufigen Elution wurde zudem bei der Herstellung des Fusionsproteins GFPH erprobt, das aus dem Modellprotein GFP und einem Hexahistidin-Schwanz besteht.

Auch hier liegt neben dem Zielprotein P_1 eine His-Tag lose Variation P_3 vor, die mit dieser Methode getrennt eluiert werden kann, wie in Abb. 5.12 gezeigt ist.

Neben dem UV-Signal $A_{C.Ei}$ liegt nun auch ein Fluoreszenzsignal $FL_{C.Ei}$ vor, das aufgrund der eindeutigen Zuordnung der Produkte zu den Eluatn kalibrierbar ist.

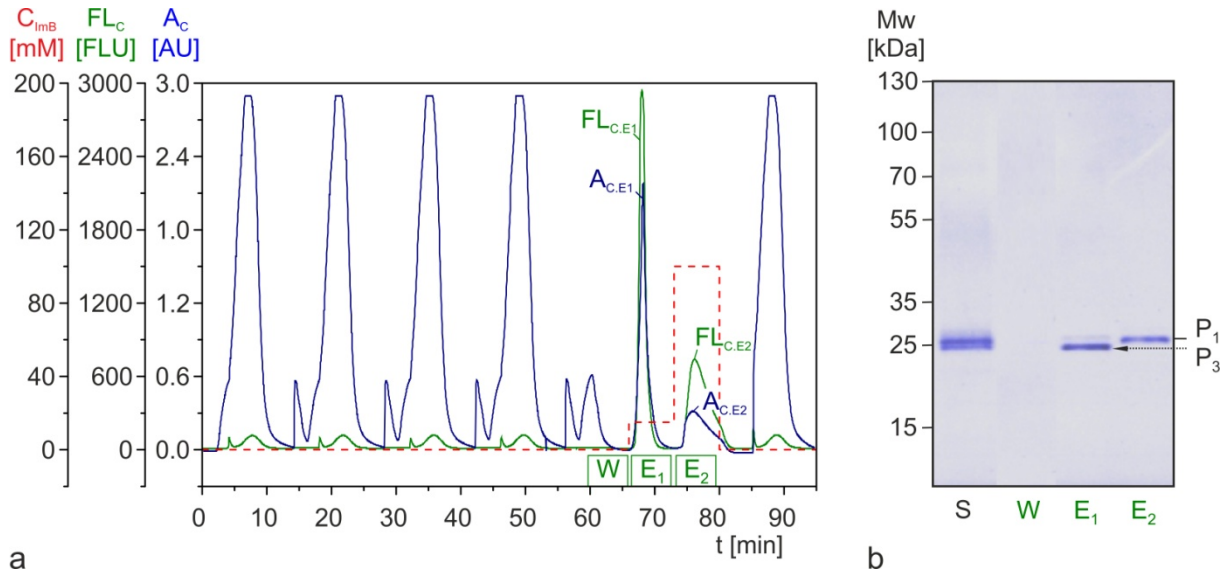


Abb. 5.12: Analyse von GFPH mit zweistufiger Elution
 a: Chromatogramm der Atline-IMAC, b: SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen S: Ausgangsprobe, W: Wash, E₁: Elution 1 und E₂: Elution 2

Dazu werden gemäß Gl.(5.8) die offline gemessenen Produktkonzentrationen c_{PiAoff} an die atline gemessenen Höhen der UV-Elutionspeaks $A_{C,Ej}$,

$$A_{C,Ej}(t_j) = \frac{c_{PiMoff}(t_j) - a_{Pi0_UV}}{a_{Pi1_UV}}, \quad (5.12)$$

und zudem an die atline gemessenen Höhen der Fluoreszenz-Elutionspeaks $FL_{C,Ej}$,

$$FL_{C,Ej}(t_j) = \frac{c_{PiMoff}(t_j) - a_{Pi0_FL}}{a_{Pi1_FL}}, \quad (5.13)$$

mittels linearer Regression angepasst.

Tab. 5.4: Kalibrierung der Atline-HPLC für UV- und Fluoreszenz-Messung von GFPH

i	a_{Pi0_UV} [mg l ⁻¹]	a_{Pi1_UV} [mg l ⁻¹ mAU ⁻¹]	R_{UV}^2 [-]	a_{Pi0_FL} [mg l ⁻¹]	a_{Pi1_FL} [mg l ⁻¹ FLU ⁻¹]	R_{FL}^2 [-]
1	4.00	0.781	0.994	11.262	0.0120	0.995
3	- 8.20	0.257	0.969	91.861	0.0066	0.974

Anhand der in Tab. 5.4 aufgeführten Koeffizienten sind nun die Zielprodukt- und die Nebenproduktkonzentrationen c_{PiA} im Analysestrom, analog zu den Gln. (5.9) und (5.10), sowohl über die UV- als auch über die Fluoreszenz-Messung atline bestimmbar.

Unter Berücksichtigung der Proteinrückhaltung \bar{R}_{P1AK} der Filtrationssonde lassen sich nun auch die Produktkonzentrationen im Medium c_{PiMk} über Gl. (5.11) errechnen.

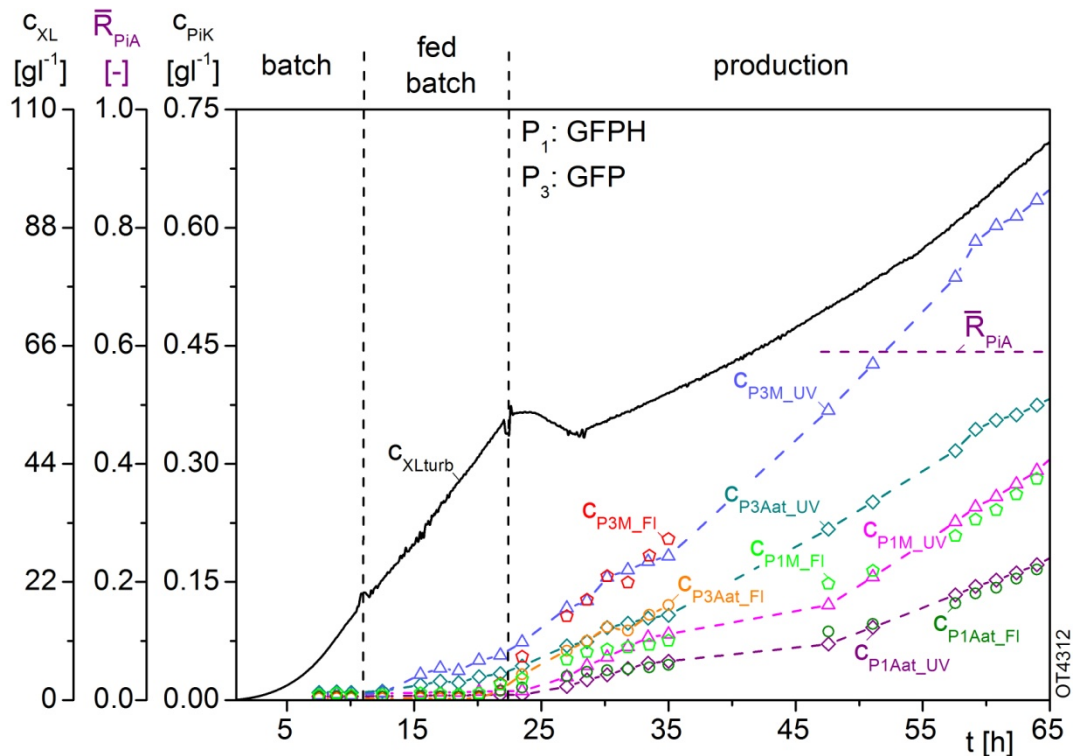


Abb. 5.13: Detektion von GFPH (P_1) und Nebenprodukt ohne HisTag (P_3) mit kalibrierten UV- und Fluoreszenzsignalen

Eine *Pichia pastoris* Kultivierung zur Herstellung von GFPH ist in Abb. 5.13 gezeigt. Die über Fluoreszenz- und UV-Messung ermittelten Produktkonzentrationen c_{PiA} im Analysestrom und damit auch die Produktkonzentrationen c_{PiM} im Medium weisen eine gute Korrelation auf. Nach $t = 35$ h ist die Detektionsgrenze des Fluoreszenzdetektors für P_3 in E_1 erreicht.

Durch die separate Fusion von GFP und einem His-tag an die entgegengesetzten Termini eines spaltungsanfälligen Proteins, wie den Malariavakzinkandidaten, ließe sich mit dieser Methode das intakte Zielprotein auch in einem von Spaltprodukten kontaminierten Eluat quantifizieren. Auftretende Produktfragmente wären über den etwaigen Terminus klassifizierbar und quantifizierbar. Zur Bewertung der Prozessstrategie und damit zur Unterdrückung oder Vermeidung der Proteolyse würde diese Methode ein nützliches Werkzeug darstellen.

6 Mathematische Auswertung der Produktionsprozesse

6.1 Reaktionskinetische Charakterisierung

6.1.1 Bilanzierung des Reaktorsystems

Die mathematische Auswertung und Charakterisierung eines Produktionsprozesses erfordert eine systemtheoretische Analyse.

Die Gleichungen zur Beschreibung der Prozesszustände werden dabei im Wesentlichen aus zwei Ansätzen entwickelt [Julien und Whitford, 2007]:

- (I) den theoretischen Gesetzen der Massen- und Energieerhaltung sowie der Reaktions- und Wachstumskinetik und
- (II) der statistischen Analyse experimenteller Daten des Bioreaktionsprozesses.

Der folgende Abschnitt beschreibt zunächst die Charakterisierung der verwendeten Produktionsstämme über eine Analyse der dynamischen Verläufe von zellspezifischen Reaktionsraten, aus denen dann kinetische Reaktionsparameter identifiziert werden (nach [Cornelissen, 2004]).

In Kapitel 10 wird darauf aufbauend ein deterministisches Modell des Bioreaktionsprozesses hergeleitet, das sowohl den zellinternen Expressionsablauf als auch das Reaktionsverhalten der Zellen beschreibt. Dieses Modell wird dann durch Simulationen und begleitenden Parameteridentifikation an experimentelle Daten angepasst.

Der in Kapitel 3 vorgestellte dreistufige Prozess soll nun exemplarisch an einer in Abb. 6.1 gezeigten Kultivierung zur Produktion von D1M1 über reaktionskinetische Parameter charakterisiert werden.

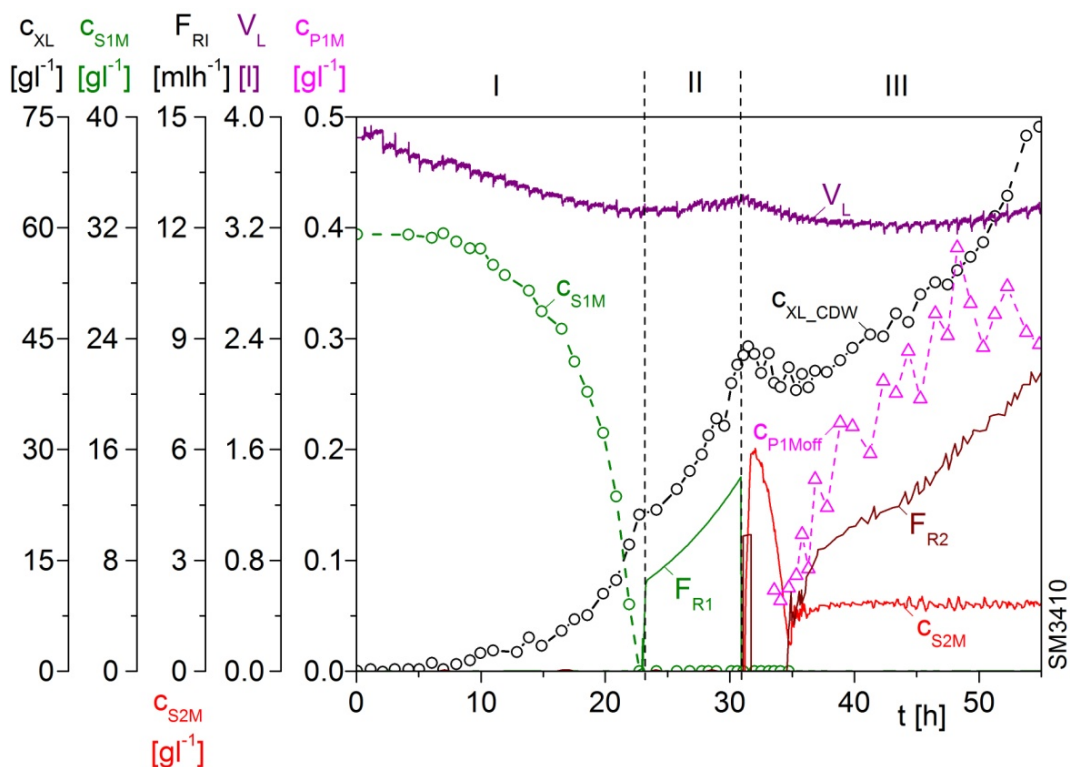


Abb. 6.1: Produktion von D1M1 zur reaktionskinetischen Charakterisierung

Gezeigt sind die essenziellen Größen Biotrockenmasse c_{XL} , die Zufütterraten F_{Ri} und Konzentrationen c_{SiM} von Glycerol (S_1) und Methanol (S_2), die Zielproduktkonzentration c_{P1M} sowie das Volumen der Flüssigphase V_L .

Die mathematische Beschreibung der drei beteiligten Reaktionsphasen basiert dabei auf Massenbilanzen. Abb. 6.2 zeigt dazu den von [Cornelissen, 2004] und [Peuker, 2006] gewählten Dreiphasenansatz. Danach besteht das Bioreaktionssystem aus der Gasphase G und der Flüssigphase L, die zur exakten Stoffbilanzierung in die zellfreie Medienphase M und die Biofeuchtphase Z unterteilt wird.

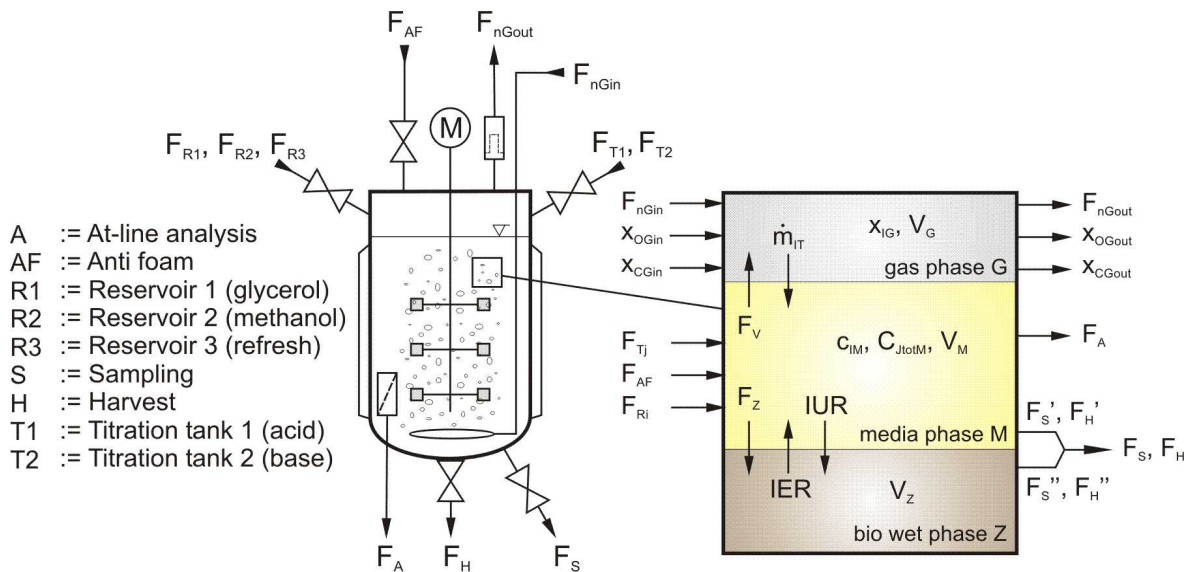


Abb. 6.2: Makroskopisches Volumenelement eines Bioreaktors zur Bilanzierung des Dreiphasenmodells [nach Peuker, 2006]

Die Volumenbilanz der Flüssigphase V_L ,

$$\dot{V}_L(t) = F_{in}(t) - F_{out}(t), \quad (6.1)$$

enthält den Eintrittsvolumenstrom F_{in} ,

$$F_{in}(t) = \sum_{j=1}^2 F_{Tj}(t) + \sum_{j=1}^3 F_{Rj}(t) + F_{AF}(t) - F_V(t), \quad (6.2)$$

bestehend aus den Zufütterraten der Titrationmittel, F_{T1} (Säure) und F_{T2} (Base), der Substratzugaben F_{R1} (Glycerol) und F_{R2} (Methanol) sowie des Refreshmediums F_{R3} und des Antischaummittels F_{AF} . Bilanztechnisch wird die Verdampfungsrate F_V negativ in der Zugabe berücksichtigt.

Der Austrittsvolumenstrom F_{out} ,

$$F_{out}(t) = F_S(t) + F_H(t) + F_A(t), \quad (6.3)$$

setzt sich aus der Probenahme F_S , dem Erntevolumenstrom F_H sowie der zellfreien Entnahme des Analysenstromes F_A zusammen.

Die verfügbaren Waagensignale der Bioreaktorsysteme, aus denen die nicht direkt messbaren Volumenströme rekonstruiert werden, sind in Abb. 6.3 aufgeführt.

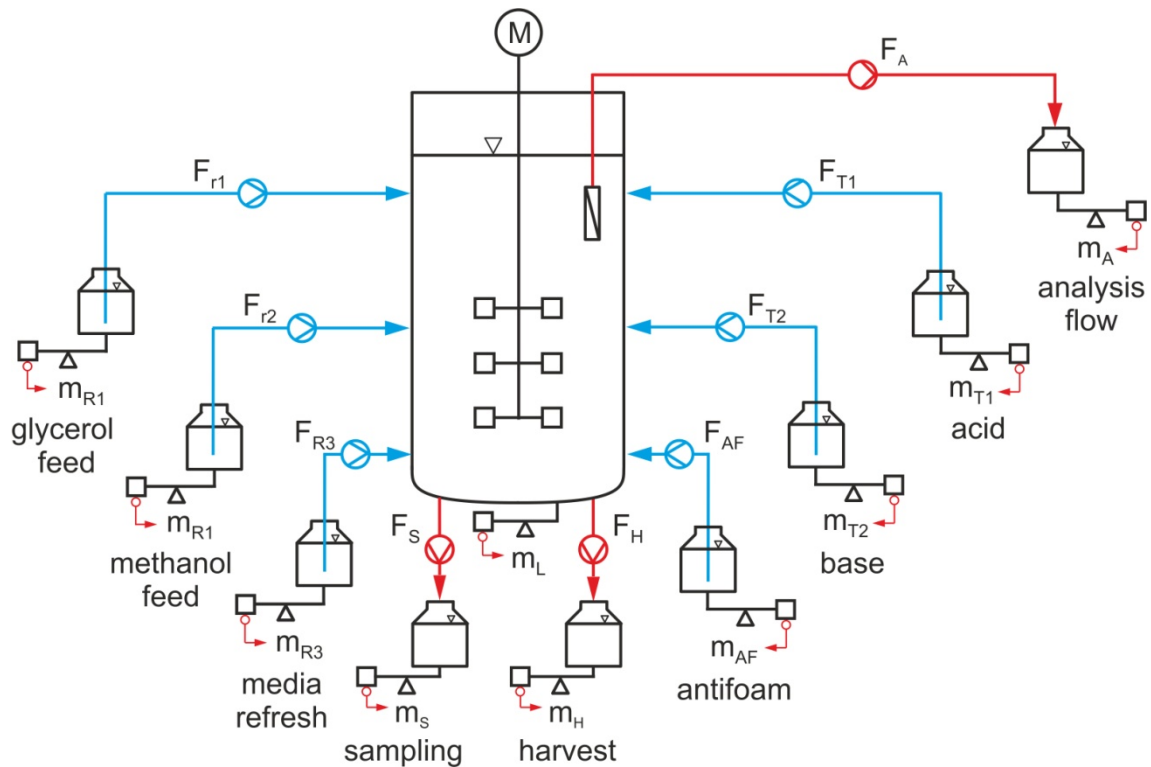


Abb. 6.3: Waagenausstattung der Bioreaktorsysteme

Das Volumen der Medienphase V_M ,

$$V_M(t) = V_L(t) - V_Z(t), \quad (6.4)$$

ist definiert als die Volumendifferenz von Flüssigphase V_L und Biofeuchtphase V_Z .

Mit Einführung des Biofeuchtvolumens V_Z ,

$$V_Z(t) = \frac{m_{ZL}(t)}{\rho_Z} = \frac{\alpha_{Z/X} \cdot m_{XL}(t)}{\rho_Z} = \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z} \cdot V_L(t) \quad (6.5)$$

mit

m_{ZL}	:= Biofeuchtmasse der Flüssigphase	[g]
m_{XL}	:= Biotrockenmasse der Flüssigphase	[g]
$\alpha_{Z/X}$:= Verhältnis von Biofeucht- zu Biotrockenmasse	[-]
ρ_Z	:= Dichte der Biofeuchtmasse	[g l ⁻¹],

lässt sich die Medienphase V_M ,

$$V_M(t) = \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z} \right] \cdot V_L(t), \quad (6.6)$$

aus der Zelldichte c_{XL} und dem Volumen der Flüssigphase V_L errechnen.

Die Sauerstoffversorgung der Zellen wird als quasistationär angesehen.

Die O₂-Massenbilanz der Gasphase,

$$\dot{m}_{\text{OG}}(t) = \dot{m}_{\text{OGin}}(t) - \dot{m}_{\text{OGout}}(t) - \dot{m}_{\text{OT}}(t) = V_L(t) \cdot [Q_{\text{O}_2}(t) - \text{OTR}(t)] \stackrel{!}{=} 0, \quad (6.7)$$

mit

$$\begin{aligned} \dot{m}_{\text{OGin}} &:= \text{O}_2\text{-Eingangsmassenstrom der Gasphase} && [\text{gh}^{-1}] \\ \dot{m}_{\text{OGout}} &:= \text{O}_2\text{-Ausgangsmassenstrom der Gasphase} && [\text{gh}^{-1}] \\ \dot{m}_{\text{OT}} &:= \text{O}_2\text{-Masseneintragsrate in die Flüssigphase} && [\text{gh}^{-1}] \\ Q_{\text{O}_2} &:= \text{volumetrische O}_2\text{-Eintragsrate} && [\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}] \\ \text{OTR} &:= \text{volumetrische O}_2\text{-Transferrate} && [\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}], \end{aligned}$$

beinhaltet die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und die O₂-Transferrate OTR, die beide als identisch angesehen werden und auf das Reaktionsvolumen V_L bezogen sind.

Dabei beinhaltet die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} ,

$$\begin{aligned} Q_{\text{O}_2}(t) &= \frac{\dot{m}_{\text{OGin}}(t) - \dot{m}_{\text{OGout}}(t)}{V_L(t)} \\ &= Q_{\text{O}_2\text{max}}(t) \cdot \frac{x_{\text{OGin}}(t) \cdot [1 - x_{\text{CG}}(t)] - x_{\text{OG}}(t) \cdot [1 - x_{\text{CGin}}(t)]}{1 - x_{\text{OG}}(t) - x_{\text{CG}}(t)} \end{aligned} \quad (6.8)$$

mit

$$\begin{aligned} Q_{\text{O}_2\text{max}} &:= \text{maximale O}_2\text{-Versorgungsrate} && [\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}] \\ x_{\text{IGin}} &:= \text{Eingangsmolenbruch der Gaskomponente I} && [-] \\ x_{\text{IG}} &:= \text{Molenbruch der Komponente I in der Gasphase} && [-], \end{aligned}$$

als weitere Begasungskenngrößen die maximale O₂-Versorgungsrate $Q_{\text{O}_2\text{max}}$,

$$Q_{\text{O}_2\text{max}}(t) = \frac{F_{\text{nG}}(t) \cdot M_{\text{O}_2}}{V_L(t) \cdot V_{\text{nM}}}, \quad (6.9)$$

mit

$$\begin{aligned} F_{\text{nG}} &:= \text{Gesamtbegasungsrate unter Normbedingungen} && [\text{lh}^{-1}] \\ M_{\text{O}_2} &:= \text{Molmasse von Sauerstoff} && [\text{gmol}^{-1}] \\ V_{\text{nM}} &:= \text{Molvolumen unter Normbedingungen} && [\text{lmol}^{-1}], \end{aligned}$$

und die Eingangsmolenbrüche von O₂ und CO₂ bei möglicher Luft- und O₂- oder N₂-Begasung,

$$x_{\text{IGin}}(t) = \frac{F_{\text{nl}}(t) + x_{\text{IAIR}} \cdot F_{\text{nAIR}}(t)}{F_{\text{nAIR}}(t) + F_{\text{nO}_2}(t) + F_{\text{nN}_2}(t)}, \quad I = \text{O, C}, \quad (6.10)$$

mit

$$\begin{aligned} F_{\text{nl}} &:= \text{Begasungsrate einer Zusatzkomponente I unter Normbedingungen} && [\text{lh}^{-1}] \\ x_{\text{IAIR}} &:= \text{Molenbruch einer Komponente I in Luft} && [-]. \end{aligned}$$

Die volumetrische O₂-Transferrate OTR,

$$\text{OTR}(t) = \frac{\dot{m}_{\text{OT}}(t)}{V_L(t)} = \text{OTR}_{\text{max}}(t) \cdot \left[x_{\text{OG}}(t) - \frac{p_{\text{Gcal}} \cdot x_{\text{OGcal}}}{p_{\text{G}}(t)} \cdot p\text{O}_2(t) \right], \quad (6.11)$$

mit

\dot{m}_{OT}	:= O ₂ -Masseneintragsrate in die Flüssigphase	[gh ⁻¹]
OTR_{max}	:= theoretische Obergrenze der O ₂ -Eintragsrate	[gl ⁻¹ h ⁻¹]
p_{Gcal}	:= Gesamtdruck der Gasphase während der pO ₂ Kalibrierung	[bar]
x_{OGcal}	:= O ₂ -Molenbruch während der pO ₂ Kalibrierung	[-]
p_{G}	:= Gesamtdruck in der Gasphase	[bar]
$p\text{O}_2$:= relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck	[-],

enthält die theoretische Obergrenze der O₂-Eintragsrate OTR_{max} ,

$$\text{OTR}_{\text{max}}(t) = k_L a(t) \cdot c_{\text{OLmax}}(t) \quad (6.12)$$

mit

$k_L a$:= volumetrischer O ₂ -Transferkoeffizient	[h ⁻¹]
c_{OLmax}	:= maximale O ₂ -Sättigungskonzentration	[gl ⁻¹],

sowie den relativen Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$,

$$p\text{O}_2(t) = \frac{p_{\text{OL}}(t)}{p_{\text{Gcal}} \cdot x_{\text{OGcal}}}, \quad (6.13)$$

als Kernprozessgrößen einer Sauerstoffversorgung.

In der O₂-Massenbilanz der Flüssigphase,

$$\dot{c}_{\text{OL}}(t) = \sum F_K(t) \cdot c_{\text{OK}}(t) + \text{OTR}(t) - \text{OUR}(t) \quad (6.14)$$

mit

OUR	:= volumetrische O ₂ -Aufnahmerate	[gl ⁻¹ h ⁻¹],
--------------	---	--------------------------------------

sind der Akkumulationsterm und die konvektiven Massenströme gegenüber der OTR vernachlässigbar.

Somit ergibt sich das quasistationäre O₂-Versorgungsgleichgewicht,

$$Q_{\text{O}_2}(t) = \text{OTR}(t) = \text{OUR}(t) = q_{\text{O}/X}(t) \cdot c_{\text{XL}}(t), \quad (6.15)$$

aus dem die volumetrische O₂-Aufnahmerate OUR und bei Kenntnis der Zelldichte c_{XL} auch die zellspezifische Aufnahmerate $q_{\text{O}/X}$ bestimmt werden können.

6.1.2 Der gewählte Reaktionsansatz

Der gewählte Reaktionsansatz des Mehrsubstratstoffwechsels ohne Bissubstratfütterung nach [Cornelissen, 2004] ist in Abb. 6.4 gezeigt.

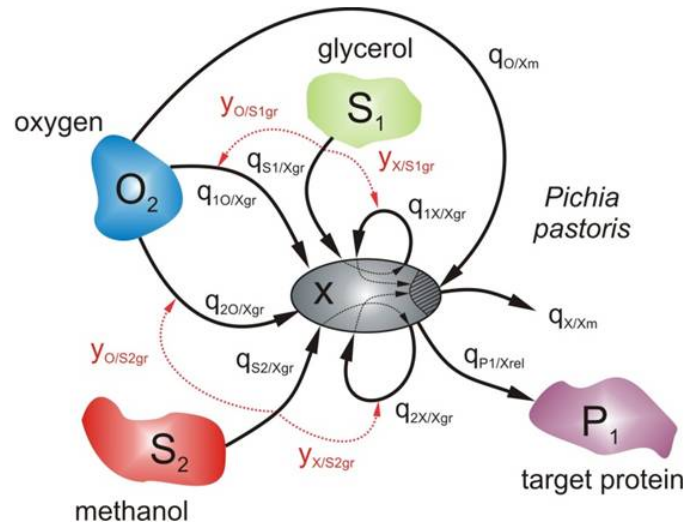


Abb. 6.4: Reaktionsschema der Substrat- und Sauerstoffaufnahme sowie Zellmasse- und Produktbildung nach [Cornelissen, 2004]

Das Reaktionsverhalten wird hierbei durch das zeitvariante Fließgleichgewicht der zellspezifischen Reaktionsraten,

$$q_{iX/X}(t) = y_{X/S_i}(t) \cdot q_{S_i/X}(t) = y_{iX/O}(t) \cdot q_{iO/X}(t), \quad (6.16)$$

sowie das zeitinvariante Verhalten des Zuwachsprozesses,

$$q_{iX/Xgr}(t) = y_{X/Sigr} \cdot q_{S_i/Xgr}(t) = y_{iX/Ogr} \cdot q_{iO/Xgr}(t) \quad (6.17)$$

beschrieben.

Die zellspezifischen Einzelraten,

$$q_{S_i/X}(t) = q_{S_i/Xgr}(t), \quad (6.18)$$

$$q_{iO/X}(t) = q_{iO/Xgr}(t) + q_{iO/Xm}, \quad (6.19)$$

$$q_{iX/X}(t) = q_{X/Xgr}(t) - q_{X/Xm} = y_{X/Sigr} \cdot (q_{S_i/X}(t) - q_{S_i/Xm}), \quad (6.20)$$

$$q_{iX/Xm}(t) = y_{X/Sigr} \cdot q_{S_i/Xm}, \quad (6.21)$$

beinhalten mit $q_{iX/Xgr}$ Anteile für den Zellzuwachs und mit $q_{iX/Xm}$ Anteile für das Zell-maintenance.

Daraus lassen sich der effektiv wirksame Ausbeutekoeffizient y_{X/S_i} für das Substrat i ,

$$y_{X/S_i}(t) = \frac{q_{iX/X}(t) \cdot y_{X/Sigr}}{q_{iX/X}(t) + q_{S_i/Xm} \cdot y_{X/Sigr}}, \quad (6.22)$$

sowie der zugehörige effektive Ausbeutekoeffizient $y_{iX/O}$ für Sauerstoff,

$$y_{iX/O}(t) = \frac{q_{iX/X}(t) \cdot y_{iX/Ogr}}{q_{iX/X}(t) + q_{Si/Xm} \cdot y_{X/Sigr} + q_{iO/Xm} \cdot y_{iX/Ogr}}, \quad (6.23)$$

formulieren.

6.1.3 Bestimmung der Reaktionsparameter

Eine Auswertung der Kultivierung in Abb. 6.1 erfolgt getrennt nach den drei Prozessphasen. Dabei sollen die maximalen Reaktionsparameter q_{iXmax} des unlimitierten Wachstums auf Glycerol (S_1) und Methanol (S_2) sowie die erzwungenen Reaktionsparameter q_{iXw} der substratlimitierten Fed Batch Phase identifiziert werden:

- I. Glycerol Batch: $\bar{q}_{1/X} = q_{1X/Xmax}$, $\bar{q}_{S1/X} = q_{S1/Xmax}$, $\bar{q}_{1O/X} = q_{1O/Xmax}$
 II. Glycerol Fed Batch: $\bar{q}_{1X/X} = q_{1X/Xw}$, $\bar{q}_{S1/X} = q_{S1/Xw}$, $\bar{q}_{1O/X} = q_{1O/Xw}$
 III. Methanol Fed Batch: $\bar{q}_{2X/X} = q_{2X/Xmax}$, $\bar{q}_{S2/X} = q_{S2/Xmax}$, $\bar{q}_{2O/X} = q_{2O/Xmax}$

Zur Bestimmung der zellspezifischen Reaktionsraten q_{iX} stellen die Bilanzierung der Zelldichte c_{XL} im Bioreaktionsvolumens V_L ,

$$\dot{c}_{XL}(t) = \left[-\frac{F_{in}(t) - F_A(t)}{V_L(t)} + q_{X/X}(t) \right] \cdot c_{XL}(t), \quad (6.24)$$

mit

$$q_{X/X} := \text{zellspezifische Wachstumsrate} \quad [h^{-1}],$$

und die Konzentrationsbilanz c_{iM} einer nichtdissoziierenden Komponente I in der Medienphase M,

$$\begin{aligned} \dot{c}_{iM}(t) = & \frac{\sum F_K(t) \cdot c_{iK}}{V_M(t)} - \frac{\rho_Z \cdot F_{in}(t) - q_{X/X}(t) \cdot \alpha_{Z/X} \cdot V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z \cdot V_M(t)} \cdot c_{iM}(t) \\ & + \frac{\dot{m}_{iT}(t)}{V_M(t)} \pm \frac{q_{i/X}(t) \cdot V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{V_M(t)}, \end{aligned} \quad (6.25)$$

mit

$$F_{iK} := \text{Zufütterraten Teilsystem K} \quad [h^{-1}]$$

$$c_{iK} := \text{Konzentration der Komponente I im Zufüttersystem K} \quad [g l^{-1}]$$

$$\dot{m}_{iT} := \text{Transfer der Komponente I aus der Gasphase} \quad [g l^{-1}],$$

die Basisgleichungen dar.

Unter Verwendung der zum Probenahmezeitpunkt t_j vorliegenden Messungen werden nunmehr die zellspezifischen Reaktionsraten bei jeweils t_j ermittelt.

Die aus Gl. (6.24) entstehende Auswertung der zellspezifischen Wachstumsrate $q_{X/X}$,

$$q_{X/X}(t_j) = \frac{F_{in}(t_j) - F_A(t_j)}{V_L(t_j)} + \frac{\dot{c}_{XL}(t_j)}{c_{XL}(t_j)}, \quad (6.26)$$

beinhaltet die zeitliche Ableitung der Zellkonzentration c_{XL} ,

$$\dot{c}_{XL}(t_j) \approx \frac{c_{XL}(t_{j+1}) - c_{XL}(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}]}, \quad (6.27)$$

die mit dem zentralen Differenzenquotienten approximiert werden kann.

Der unbekannte Eingangsvolumenstrom F_{in} ,

$$F_{in}(t_j) = \sum_{i=1}^2 F_{Ti}(t_j) + \sum_{i=1}^3 F_{Ri}(t_j) + F_{AF}(t_j) - F_V(t_j), \quad (6.28)$$

wird über die Zufütterraten F_K aus den Signalen der Vorlagenwaagen m_K ,

$$F_K(t_j) = -\frac{\dot{m}_K(t_j)}{\rho_K} \approx \frac{m_K(t_{j-1}) - m_K(t_{j+1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}] \cdot \rho_K}, \quad K = Ti, Ri, AF, \quad (6.29)$$

mit

$$\rho_K := \text{Dichte des Zufüttersystems } K \quad [g \cdot l^{-1}],$$

gleichermaßen über den zentralen Differenzenquotienten bestimmt.

Die Verdampfungsverluste im Abgas F_V werden vernachlässigt, während der Analysestrom F_A ,

$$F_A(t_j) = \frac{m_A(t_{j+1}) - m_A(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}] \cdot \rho_M}, \quad (6.30)$$

ebenfalls über sein zugeordnetes Waagensignal berechenbar ist.

Durch einsetzen von Gl (6.6) in (6.25) ist nun für die Ermittlung der zellspezifischen Glycerolaufnahmerate $q_{S1/X}$,

$$q_{S1/X}(t_j) = \frac{F_{R1}(t_j) \cdot c_{S1R1}}{V_L(t_j) \cdot c_{XL}(t_j)} - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{S1M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)} - \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{\dot{c}_{S1M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)}, \quad (6.31)$$

und der zellspezifische Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$,

$$q_{S2/X}(t_j) = \frac{F_{R2}(t_j) \cdot c_{S2R2}}{V_L(t_j) \cdot c_{XL}(t_j)} - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{S2M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)} - \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{\dot{c}_{S2M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)}, \quad (6.32)$$

die zeitliche Änderung des zugehörigen Substrates c_{SiM} ,

$$\dot{c}_{SiM}(t_j) \approx \frac{c_{SiM}(t_{j+1}) - c_{SiM}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \quad (6.33)$$

erforderlich.

Die Bestimmung der zellspezifischen Sauerstoffaufnahmerate $q_{O/X}$,

$$q_{O/X}(t_j) = \frac{Q_{O2}(t_j)}{c_{XL}(t_j)}, \quad (6.34)$$

erfolgt über die aus den Abgasdaten bilanzierte Sauerstoffeintragsrate Q_{O2} .

Die zellspezifische Produktbildungsrate $q_{P1/X}$,

$$q_{P1/X}(t_j) = \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{P1M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)} + \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{\dot{c}_{P1M}(t_j)}{c_{XL}(t_j)}, \quad (6.35)$$

beinhaltet wiederum die zeitliche Änderung der Zielproduktkonzentration c_{P1M} ,

$$\dot{c}_{P1M}(t_j) \approx \frac{c_{P1M}(t_{j+1}) - c_{P1M}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \quad (6.36)$$

die über eine Offline-Produktanalytik bestimmbar ist.

Mit den aufgestellten Bilanzgleichungen ist es nun möglich, den Verlauf der Reaktionsraten während des vorgestellten D1M1-Produktionsprozesses darzustellen, wie in Abb. 6.5 gezeigt ist.

Während bei unlimitiertem Wachstum in der Glycerol Batchphase maximale zellspezifische Reaktionsraten $q_{I/Xmax}$ und Ausbeutekoeffizienten $y_{X/I max}$ vorliegen, erfolgt im Fed Batch eine Steuerung sowohl der spezifischen Reaktionsraten $q_{I/Xw}$ als auch der zugeordneten Ausbeutekoeffizienten $y_{X/Iw}$ durch das exponentielle Zufütterungsprofil.

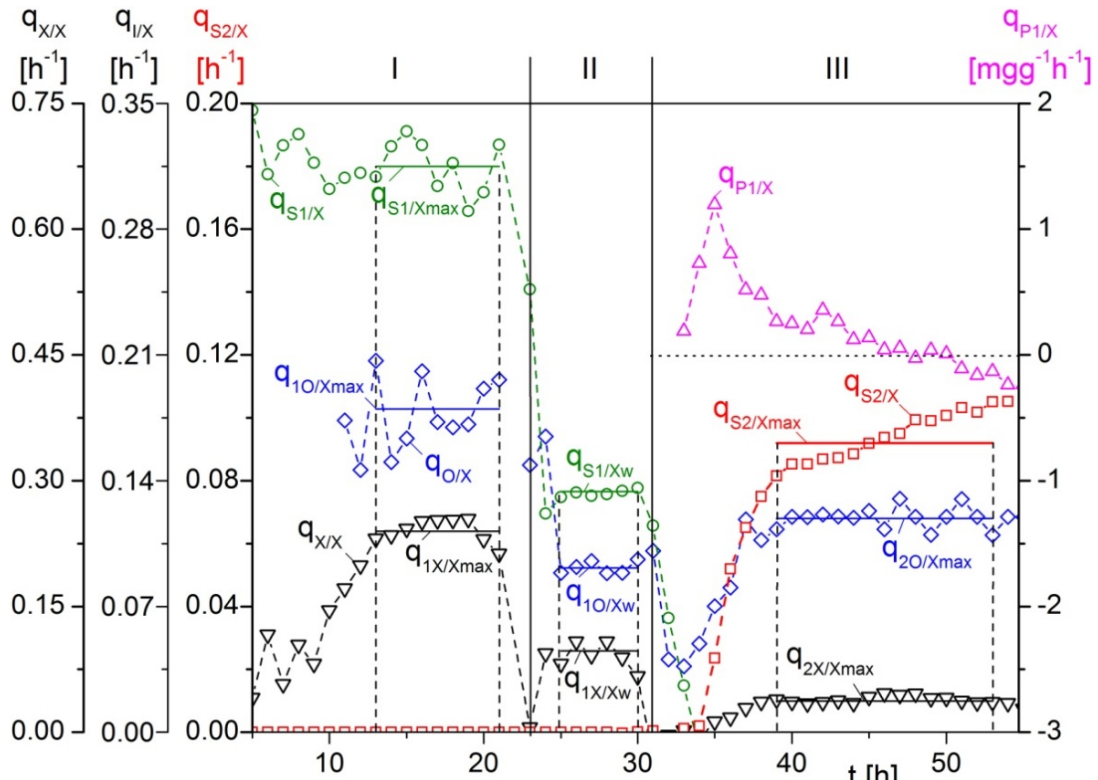


Abb. 6.5: Reaktionsraten und zugehörige Reaktionsparameter eines Herstellungsprozesses von D1M1

Im Weiteren wird die Identifizierung dieser charakteristischen Reaktionsparameter aus den Verläufen der jeweiligen Reaktionsrate mit PLS – Partial Least Square Methoden erläutert.

Unter Verwendung der Definition eines Zelldichte-Matrizelements a_{xj} ,

$$a_{xj} := c_{XL}(t_j), \quad (6.37)$$

werden aus den Gln. (6.26), (6.31), (6.32), (6.34) und (6.35) die Bestimmungsgleichungen für die mittleren zellspezifischen Reaktionsraten $\bar{q}_{l/X}$,

$$a_{xj} \cdot \bar{q}_{X/X} = b_{xj} = \frac{(F_{in}(t_j) - F_A(t_j)) \cdot c_{XL}(t_j)}{V_L(t_j)} + \frac{c_{XL}(t_{j+1}) - c_{XL}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \quad (6.38)$$

$$a_{xj} \cdot \bar{q}_{S1/X} = b_{S1j} = \frac{F_{R1}(t_j) \cdot c_{S1R1}}{V_L(t_j)} - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot c_{S1M}(t_j) - \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{S1M}(t_{j+1}) - c_{S1M}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \quad (6.39)$$

$$\begin{aligned} \mathbf{a}_{Xj} \cdot \bar{q}_{S2/X} = \mathbf{b}_{S2j} = & \frac{F_{R2}(t_j) \cdot c_{S2R2}}{V_L(t_j)} - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot c_{S2M}(t_j) \\ & - \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{S2M}(t_{j+1}) - c_{S2M}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \end{aligned} \quad (6.40)$$

$$\begin{aligned} \mathbf{a}_{Xj} \cdot \bar{q}_{P1/X} = \mathbf{b}_{P1j} = & \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot c_{P1M}(t_j) \\ & + \left[1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot \frac{c_{P1M}(t_{j+1}) - c_{P1M}(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}}, \end{aligned} \quad (6.41)$$

$$\mathbf{a}_{Xj} \cdot \bar{q}_{O/X} = \mathbf{b}_{Oj} = Q_{O2}(t_j), \quad (6.42)$$

hergeleitet.

Die Darstellung der Gln. (6.38) bis (6.42) in Matrizenform,

$$\underline{\mathbf{a}}_X \cdot \bar{\mathbf{q}}_{I/X} = \underline{\mathbf{b}}_I, \quad (6.43)$$

erlaubt die Bestimmung der Reaktionsparameter $\bar{q}_{I/X}$,

$$\bar{\mathbf{q}}_{I/X} = (\underline{\mathbf{a}}_X^T \cdot \underline{\mathbf{a}}_X)^{-1} \cdot \underline{\mathbf{a}}_X^T \cdot \underline{\mathbf{b}}_I = \underline{\mathbf{a}}_X^+ \cdot \underline{\mathbf{b}}_I = \underline{\mathbf{a}}_X \setminus \underline{\mathbf{b}}_I, \quad (6.44)$$

mit MATLAB in den drei verschiedenen Prozessphasen über die Pseudoinverse Matrix $\underline{\mathbf{a}}_X^+$. Die Ergebnisse werden dann den Reaktionsparametern $q_{I/X_{max}}$ bzw. q_{I/X_w} zugeordnet.

Die jeweils zugehörigen Substratausbeutekoeffizienten $y_{X/S_{ik}}$,

$$y_{X/S_{ik}} = \frac{q_{iX/Xk}}{q_{S_{i}/Xk}}, \quad k = \max, w, \quad (6.45)$$

und Sauerstoffausbeutekoeffizienten $y_{iO/Xk}$,

$$y_{iX/Ok} = \frac{q_{iX/Xk}}{q_{iO/Xk}}, \quad k = \max, w, \quad (6.46)$$

sind dann über die zellspezifische Wachstumsrate $q_{iX/Xk}$ und die entsprechende zellspezifischen Reaktionsrate $q_{i/Xk}$ bestimmbar.

Die errechneten reaktionskinetischen Parameter aus einer Produktion von D1M1 sind exemplarisch in Tab. 6.1 aufgelistet.

Tab. 6.1: Reaktionskinetische Parameter für den D1M1-Stamm

Batch Phase (I)		Fed Batch Phase (II)		Produktionsphase (III)	
		μ_{1w}	$[h^{-1}]$	0.100	
$q_{1X/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.240	$q_{1X/Xw}$	$[h^{-1}]$	0.097
$q_{S1/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.315	$q_{S1/Xw}$	$[h^{-1}]$	0.134
$q_{1O/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.180	$q_{1O/Xw}$	$[h^{-1}]$	0.092
$y_{X/S1max}$	[-]	0.763	$y_{X/S1w}$	[-]	0.723
$y_{1X/Omax}$	[-]	1.333	$y_{1X/Ow}$	[-]	1.054
					$q_{2X/Xmax}$
					$[h^{-1}]$
					0.037
					$q_{S2/Xmax}$
					$[h^{-1}]$
					0.092
					$q_{2O/Xmax}$
					$[h^{-1}]$
					0.119
					$y_{X/S2max}$
					[-]
					0.402
					$y_{2X/Omax}$
					[-]
					0.311

Zur Bestimmung der Parameter aus den Einzelraten auf Glycerol stehen aus Phase I und II $q_{1X/Xmax}$, $y_{X/S1max}$, $y_{1O/Xmax}$, $q_{1X/Xw}$, $y_{X/S1w}$ und $y_{1O/Xw}$ zur Verfügung (Tab. 6.1).

Aus Gl.(6.22) sind die Berechnungsvorschriften des Zellzuwachsausbeutekoeffizienten $y_{X/S1gr}$,

$$y_{X/S1gr} = \frac{(q_{1X/Xmax} - q_{1X/Xw}) \cdot y_{X/S1w} \cdot y_{X/S1max}}{q_{1X/Xmax} \cdot y_{X/S1w} - q_{1X/Xw} \cdot y_{X/S1max}}, \quad (6.47)$$

und der zellspezifischen Maintenance-Glycerolaufnahmerate $q_{S1/Xm}$,

$$q_{S1/Xm} = \frac{(y_{X/S1max} - y_{X/S1w}) \cdot q_{1X/Xmax} \cdot q_{1X/Xw}}{(q_{1X/Xmax} - q_{1X/Xw}) \cdot y_{X/S1max} \cdot y_{X/S1w}}, \quad (6.48)$$

sowie aus Gl. (6.23) die Bestimmung des Zellzuwachsausbeutekoeffizienten $y_{1X/Ogr}$,

$$y_{1X/Ogr} = \frac{(q_{1X/Xmax} - q_{1X/Xw}) \cdot y_{1X/Omax} \cdot y_{1X/Ow}}{q_{1X/Xmax} \cdot y_{1X/Ow} - q_{1X/Xw} \cdot y_{1X/Omax}}, \quad (6.49)$$

und der zellspezifischen Maintenance-Sauerstoffaufnahmerate $q_{1O/Xm}$,

$$q_{1O/Xm} = \frac{q_{1X/Xmax} \cdot q_{1X/Xw} \cdot (y_{1X/Omax} - y_{1X/Ow}) + q_{1X/Xm} \cdot (y_{1X/Omax} \cdot q_{1X/Xw} - y_{1X/Ow} \cdot q_{1X/Xmax})}{(q_{1X/Xmax} - q_{1X/Xw}) \cdot y_{1X/Omax} \cdot y_{1X/Ow}}, \quad (6.50)$$

als globale Parameter des Glycerol- und Sauerstoffhaushaltes herleitbar [Cornelissen, 2004].

Die darüber ermittelten charakteristischen Parameter des in der vorgestellten D1M1 Kultivierung verwendeten Stammes sind in Tab. 6.2 gegeben. Die Charakterisierung des gewählten Produktionsstammes für D1M1H befindet sich in Kapitel 7.2.

Tab. 6.2: Globale Parameter des D1M1-Stammes bei Wachstum auf Glycerol

$y_{X/S1gr}$	[-]	0.793
$q_{S1/Xm}$	$[h^{-1}]$	0.012
$q_{1O/Xm}$	$[h^{-1}]$	0.027
$y_{1X/Ogr}$	[-]	1.625

6.2 Bewertung der Produktbildung

Das Erreichen hoher Produktausbeuten ist die oberste Zielsetzung biotechnologischer Produktionsprozesse. Zur Bewertung zyklischer Prozesse, wie in Abb. 6.6 beispielhaft gezeigt ist, wird die Produktbildung für jeden Zyklus getrennt betrachtet. Aufgrund des verbesserten Stabilitätsprofils von D1M1H wurde dieser als Produktionsstamm gewählt (siehe Kapitel 7.2).

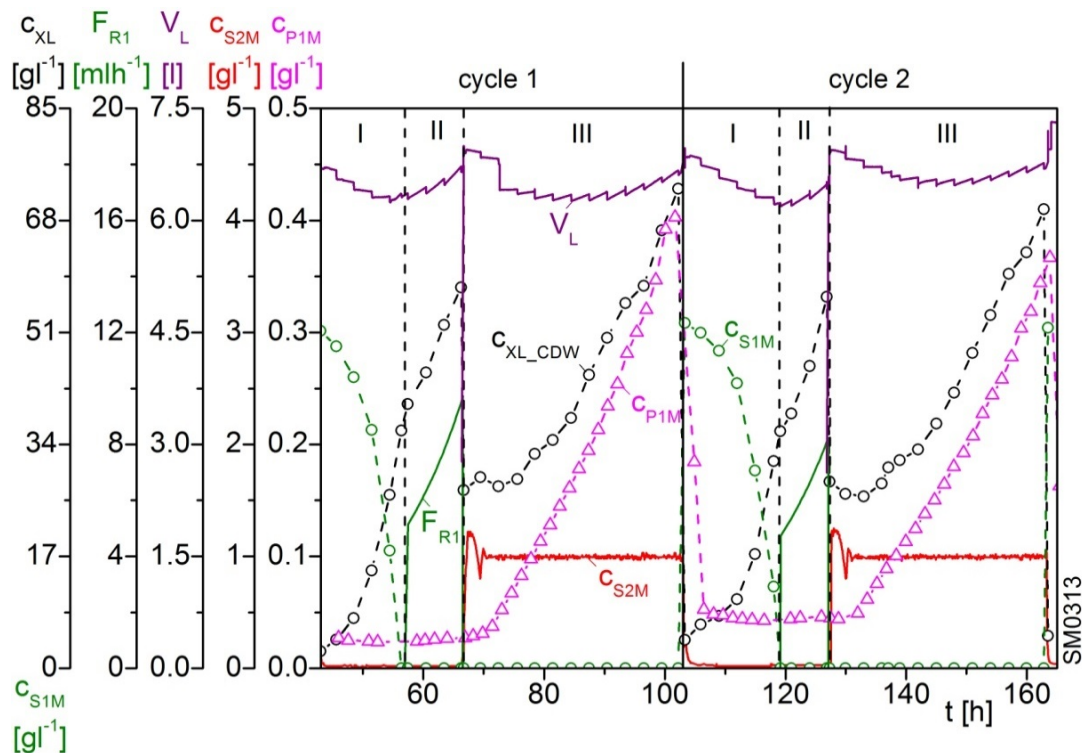


Abb. 6.6: Auszuwertende Produktion von D1M1H

Die Produktivität PRD_k des jeweiligen Zyklus k ,

$$PRD_k = \frac{m_{P1M}(t_{kn}) - m_{P1M}(t_{k0}) - \sum_{j=1}^n \Delta m_{P1M}(t_{kj})}{V_{Lkn} \cdot (t_{kn} - t_{k0})}, \quad (6.51)$$

errechnet sich dabei aus der gesamten hergestellten Produktmenge, die aus der Differenz der am Ende (t_{kn}) und zu Beginn (t_{k0}) vorliegenden zuzüglich der durch

Probenahme entnommenen Masse besteht. Diese wird dann auf das Endvolumen und den Produktionszeitraum $t_{kn} - t_{k0}$ in Phase III normiert.

Die Masse des Zielproteins m_{P1M} bei den einzelnen Probezeitpunkten t_{kj} ,

$$m_{P1M}(t_{kj}) = V_M(t_{kj}) \cdot c_{P1M}(t_{kj})$$

$$= \left(1 - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_{kj})}{\rho_Z} \right) \cdot V_L(t_{kj}) \cdot c_{P1M}(t_{kj}) \quad (6.52)$$

wird dabei über die offline ermittelte Zielproteinkonzentration c_{P1M} ermittelt.

Ein zusätzlicher Qualitätsindikator der D1M1H Produktion stellt das Spaltverhältnis $y_{P3/P1}$ dar,

$$y_{P3/P1}(t_j) = \frac{c_{P3M}(t_j)}{c_{P1M}(t_j)}, \quad (6.53)$$

der sich aus dem Verhältnis des im Medium enthaltenen Nebenproduktes c_{P3M} zum Zielprodukt c_{P1M} ergibt.

Eine zyklische Produktion von D1M1H mit der Produktivität PRD und dem Spaltverhältnis $y_{P3/P1}$ ist in Abb. 6.7 gezeigt.

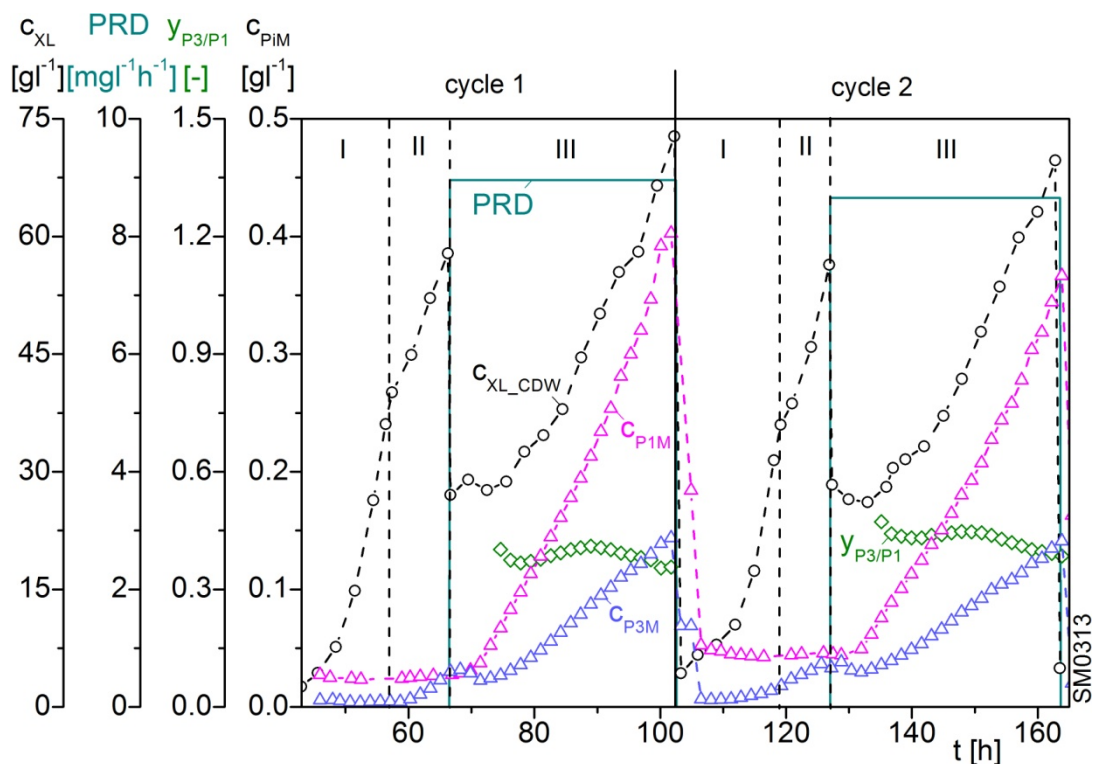


Abb. 6.7: Zyklische Produktion von D1M1H

Über die in diesem Kapitel vorgestellten Methoden zur Ermittlung von Reaktionsparametern und Qualitätsgrößen werden im Weiteren die Produktionstämme charakterisiert und die Prozessstrategie bewertet.

7 Charakterisierung der Produktionsstämme

7.1 Potentielles Vakzin D1M1

Im Folgenden werden zwei exemplarische Kultivierungen zur Produktion der Impfstoffkandidaten D1M1 und D1M1H dargestellt und unter Verwendung der in Kapitel 6 aufgeführten Methoden ausgewertet. Neben dem Wachstumsverhalten der *P. pastoris* Stämme ist auch die Eigenschaften des jeweiligen Zielproduktes in Hinblick auf dessen Expression und mögliche proteolytische Spaltung während der Herstellung von äußerstem Interesse.

Der Verlauf einer Kultivierung zur Produktion von D1M1 ist in Abb. 7.1 dargestellt und entspricht der in Kapitel 3.2 erläuterten klassischen Strategie. Die Kultivierung wurde mit dem im Kapitel 3.3 vorgestellten BIOSTAT® ED5 durchgeführt.

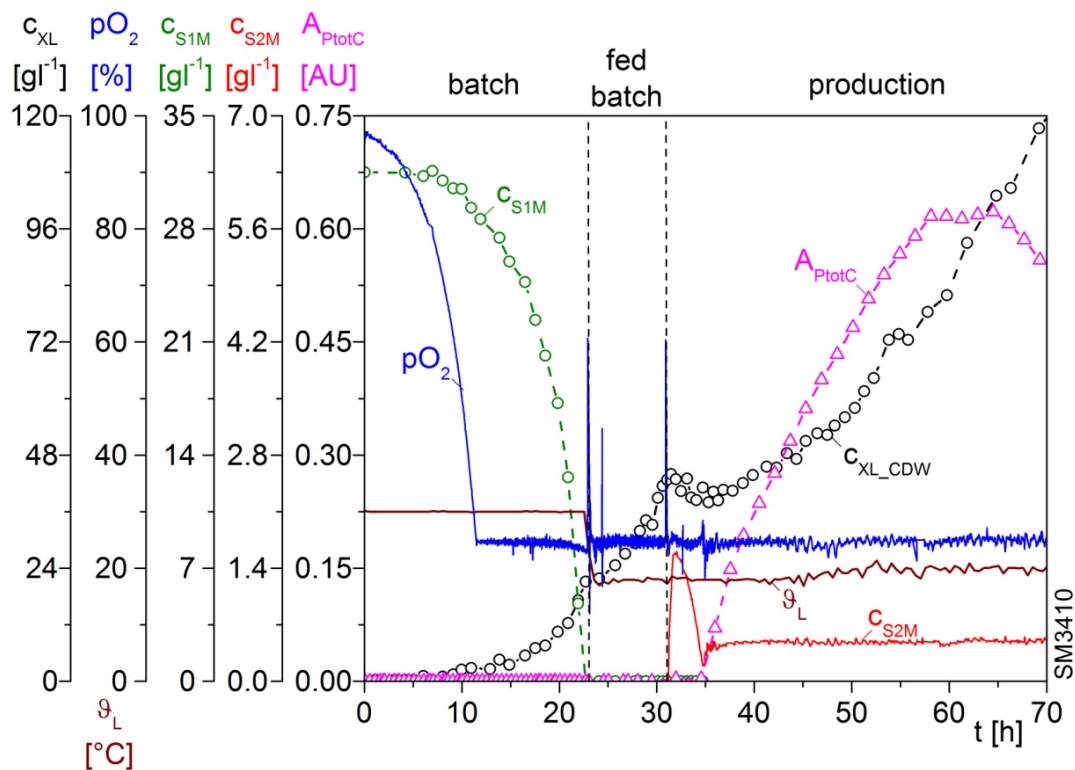


Abb. 7.1: Übersicht des Kultivierungsverlaufes SM3410

Während der beiden Wachstumsphasen auf Glycerol wurde die Temperatur der Flüssigphase ϑ_L auf 30 °C und der pH-Wert auf 5 geregelt.

Die postexperimentell ermittelten zellspezifischen Reaktionsraten für die Batch und Fed Batch Phase wurden bereits in Abb. 6.5 dargestellt sowie die daraus bestimmten Reaktionsparameter in Tab. 6.1 und Tab. 6.2 gezeigt.

Bei einer Zelldichte von 40 gl^{-1} wurde, wie in Abb. 7.1 gezeigt, automatisch die Induktion gestartet und die inline gemessene Methanolkonzentration über die Zufüterraße F_{R2} auf einen Sollwert von 0.5 gl^{-1} geregelt. Eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 17 °C dient der Verminderung proteolytischer Aktivität.

Auffällig ist das abfallende HPLC Atline-Signal $A_{P_{totC}}$ zur Produktbestimmung, das aufgrund der Kontamination mit Produktfragmenten im Eluat den Gehalt an Gesamtprotein repräsentiert (vgl. Kapitel 5.3.1) und einen Abbau der produzierten Proteine indiziert.

Die Detektion des Zielproduktes P_1 als auch der Nebenprodukte P_j erfolgte für diese Kultivierung daher offline mit einer Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE, die in Abb. 7.2b dargestellt ist.

Der daraus konstruierte Verlauf des Zielproduktes $C_{P_{1M}}$ als auch die Reinheit $P_{P_{1M}}$ des D1M1 sind in Abb. 7.2a gezeigt.

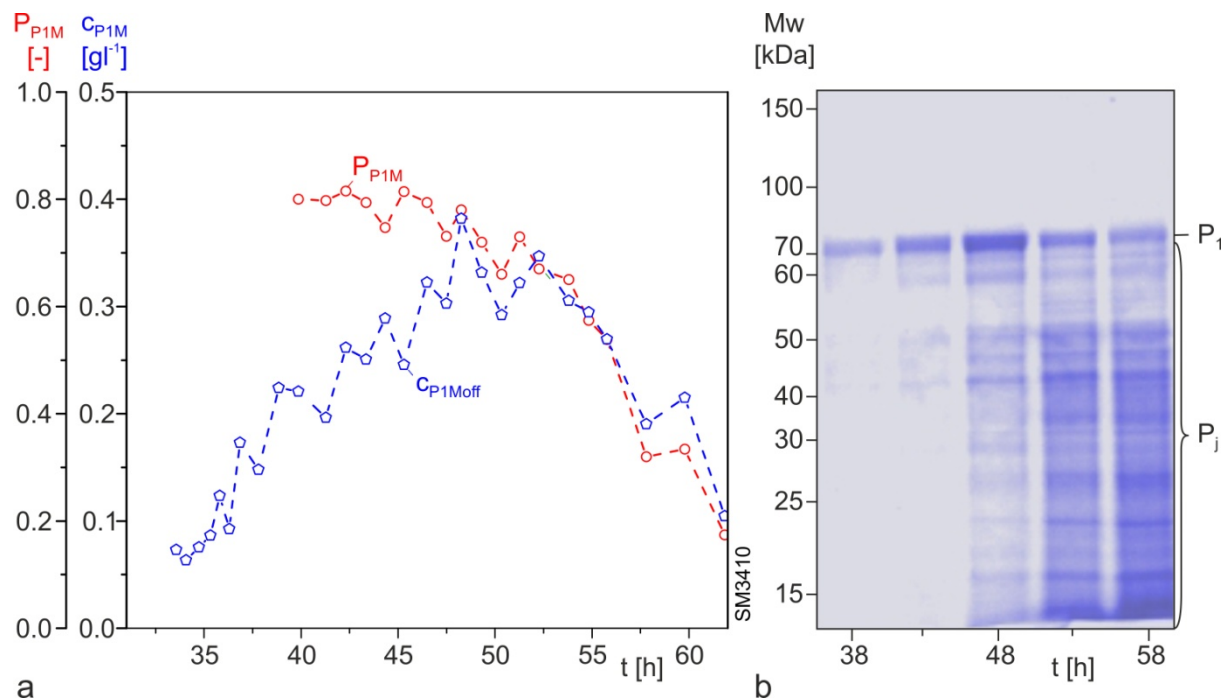


Abb. 7.2: a: Verlauf der Produktzusammensetzung in der Medienphase
b: SDS-PAGE Analyse des Überstandes

Die Bildung des D1M1 ist direkt mit dessen Abbau verbunden, was auch aus dem Verlauf der zellspezifischen Produktbildungsrate $q_{P_{1/X}}$ in Abb. 7.3 hervorgeht. Die Bildung der Nebenprodukte $q_{P_{j/X}}$ erfolgt zeitversetzt zum Zielprodukt auf einem konstanten Level.

Um die größte Ausbeute an intaktem Produkt zu erhalten, müsste bei $t = 46$ h (16 h nach Beginn der Induktion) die Ernte erfolgen.

Die ebenfalls in Abb. 7.3 dargestellte zellspezifische Wachstumsrate $q_{2/X}$, die Methanolaufnahmerate $q_{S_{2/X}}$ und die Sauerstoffaufnahmerate $q_{2O/X}$ sowie auch der zellspezifische Gehalt an Alkoholoxidase $g_{P_{2/X}}$, ausgedrückt in AOX-Aktivitätseinheiten U pro g Zellgewicht, gehen im Verlauf der Produktionsphase in einen stationären Zustand über. Dabei wird ein maximaler zellspezifischer AOX Gehalt $g_{P_{2/Xmax}}$ von 125.5 Ug^{-1} erreicht.

Eine Übersicht der weiteren maximalen Reaktionsparameter der Produktionsphase ist bereits in Tab. 6.1 gegeben.

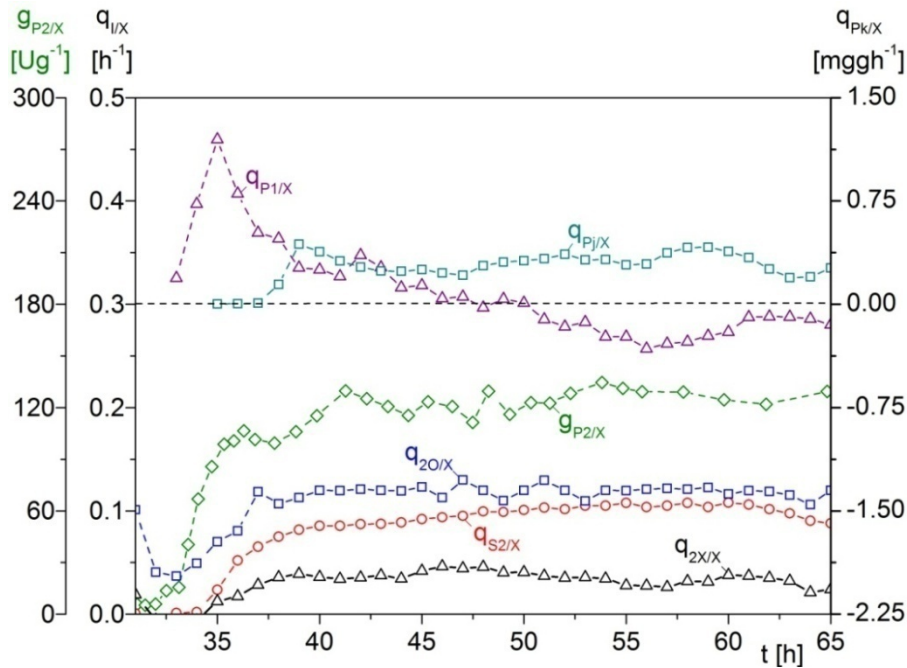


Abb. 7.3: Zellspezifische Reaktionsraten in der Produktionsphase

Die beobachtete Instabilität von D1M1 entspricht dem in [Faber et al., 2013] beschriebenen Phänomen. Die Abspaltung der immunologisch nicht relevanten Prodomäne begünstigt einen weiteren Proteinabbau und verfälscht die atline erfolgte IMAC-Messung. Dies wurde durch die Modifikation von D1M1 zu D1M1H unterbunden (siehe Kapitel 2).

7.2 Modifizierter Impstoffkandidat D1M1H

Ein Prozess zur Herstellung und Charakterisierung von D1M1H ist in Abb. 7.4 gezeigt. Das eingesetzte Bioreaktorsystem ist der BIOSTAT® C (siehe Kapitel 3.3).

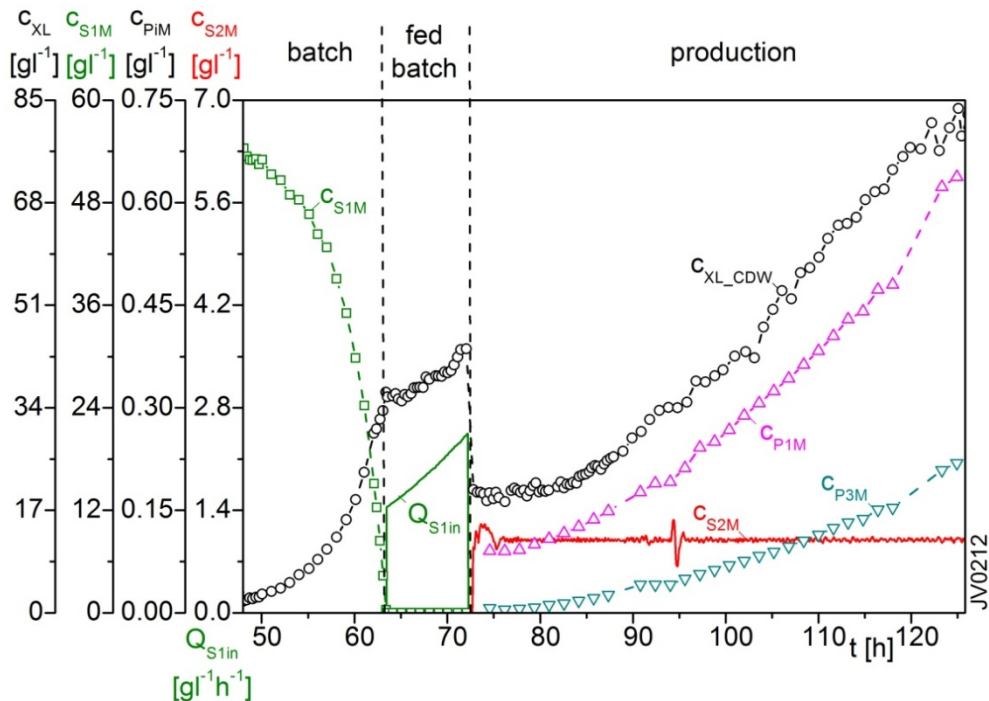


Abb. 7.4: Übersicht des Verlaufs einer Produktion von D1M1H

Nach einer Batch und Fed Batch Phase auf Glycerol mit einem pH-Wert von 5 und einer Temperatur der Flüssigphase ϑ_L von 30 °C wurde in dieser Kultivierung bei $t = 72$ h eine Teilernte und Verdünnung durchgeführt, um neben den Wirtszellen auch mögliche Nebenprodukte und Proteasen zu verdünnen.

Die Zuführung von frischem Medium (Medium 1, siehe Anhang) sollte zudem einer Limitierung der Nährstoffe bei verlängerter Produktion zur Beobachtung eines etwaigen Produktrückganges vorbeugen.

Die reaktionskinetischen Parameter des Produktionsstammes von D1M1H bei Wachstum auf Glycerol sind in Tab. 7.1 gezeigt.

Tab. 7.1: Reaktionskinetische Parameter des D1M1H-Stammes auf Glycerol

Batch Phase			Fed Batch Phase			Globale Parameter		
			μ_{1w}	[h ⁻¹]	0.040			
$q_{1X/Xmax}$	[h ⁻¹]	0.240	$q_{1X/Xw}$	[h ⁻¹]	0.030	$q_{1X/Xm}$	[h ⁻¹]	0.014
$q_{S1/Xmax}$	[h ⁻¹]	0.285	$q_{S1/Xw}$	[h ⁻¹]	0.049	$q_{S1/Xm}$	[h ⁻¹]	0.015
$q_{1O/Xmax}$	[h ⁻¹]	0.112	$q_{1O/Xw}$	[h ⁻¹]	0.027	$q_{1O/Xm}$	[h ⁻¹]	0.010
$y_{X/S1max}$	[-]	0.840	$y_{X/S1w}$	[-]	0.611	$y_{X/S1gr}$	[-]	0.887
$y_{1X/Omax}$	[-]	2.135	$y_{1X/Ow}$	[-]	1.099	$y_{1X/Ogr}$	[-]	2.465

Die Induktionsphase wurde mit einer Zelldichte von 20 gl⁻¹ gestartet. Die Methanolkonzentration wurde auf 1 gl⁻¹ und die Temperatur der Flüssigphase auf 23° C geregelt. Der Sollwert der pH-Regelung wurde aufgrund der vermuteten Säurelabilität des Zielproduktes auf 5.6 erhöht.

Der Verlauf der zellspezifischen Reaktionsraten sowie die intrazellulären Gehalte an D1M1H und AOX in der Produktionsphase sind in Abb. 7.5 gezeigt, während die ermittelten Parameter in Tab. 7.2 aufgeführt sind.

Der zellspezifische Gehalt des Zielproduktes $g_{P1/X}$ steigt mit Beginn der Methanolinduktion stark an und verläuft ab $t = 83$ h auf einem maximalen Level $g_{P1/Xmax}$ von 6 mgg⁻¹ Zelle, erfährt nach ca. 30 Stunden Induktion jedoch einen leichter Rückgang.

Gleichermaßen zum Ende der Induktion abfallend verhält sich der zellspezifische AOX Gehalt, dessen Maximum $g_{P2/Xmax}$ von 123.4 Ug⁻¹ hingegen erst bei $t = 105$ h erlangt wird. Im Laufe der Langzeitexpression nehmen die zellspezifischen Aufnahmezeiten für Sauerstoff $q_{2O/X}$ und Methanol $q_{S2/X}$ nach einer stationären Phase bis $t = 105$ h ebenfalls ab.

Die Bildungszeiten des Zielproduktes $q_{P1/X}$ und des alleinigen Nebenproduktes $q_{P3/X}$ weisen einen vergleichbaren Verlauf ohne Rückgang auf, was auf eine verbesserte Stabilität von D1M1H deutet.

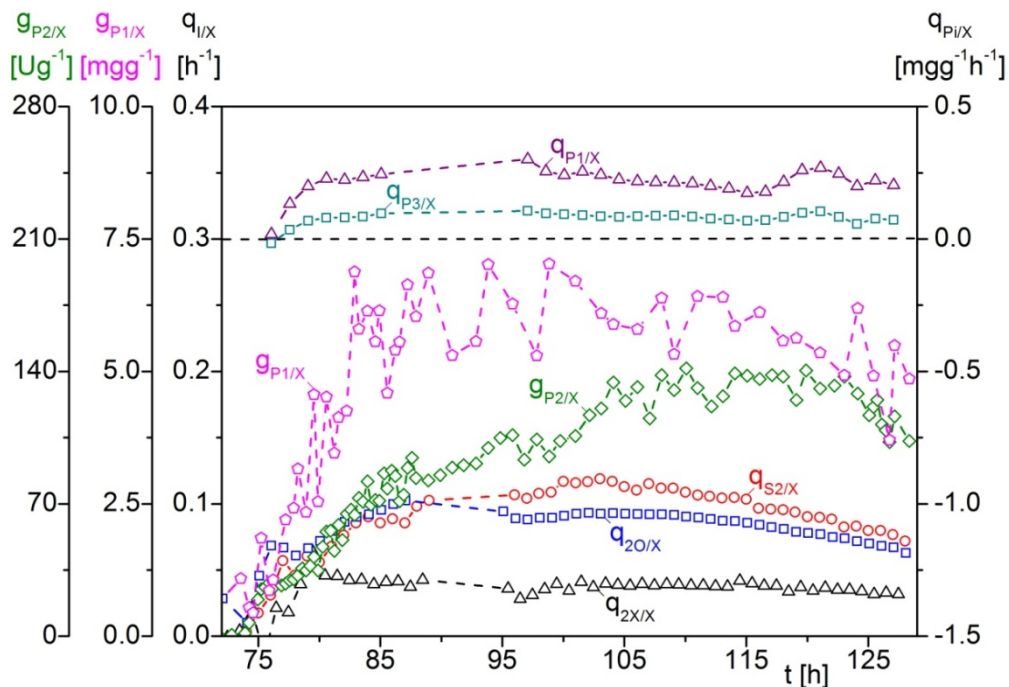


Abb. 7.5: Verlauf der zellspezifischen Reaktionsraten und intrazellulärer Produkte

Tab. 7.2: Maximale Reaktionsparameter zur Produktion von D1M1H bei unlimitiertem Methanolstoffwechsel

$q_{2X/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.041
$q_{S2/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.103
$q_{2O/Xmax}$	$[h^{-1}]$	0.332
$y_{X/S2max}$	$[-]$	0.082
$y_{2X/Omax}$	$[-]$	0.063
$g_{P2/Xmax}$	$[Ug^{-1}]$	123.4
$g_{P1/Xmax}$	$[mgg^{-1}]$	6.010

Die Detektion von D1M1H erfolgte in dieser Kultivierung atline mit der zweistufigen Elutionsmethode zur Detektion des Zielproduktes P_1 und des alleinigen Nebenproduktes P_3 , deren Offline-Analyse in Abb. 7.6b gezeigt ist.

Bei der Produktion von D1M1H konnte durch Offline-Analytik kein Produktrückgang verzeichnet werden, jedoch wurde durch das Fouling der Filtrationssonde über die Atline-Detektion ein solches suggeriert. Daher ist in Abb. 7.6a die offline ermittelte Zielproduktkonzentration c_{P1Moff} gezeigt.

Ebenfalls aufgeführt sind dessen Reinheit P_{P1M} und das Spaltverhältnis $y_{P3/P1}$, die beide ab $t = 105$ h nahezu stationär verlaufen und somit ein stabiler Prozess ohne Qualitätsverlust erreicht wurde.

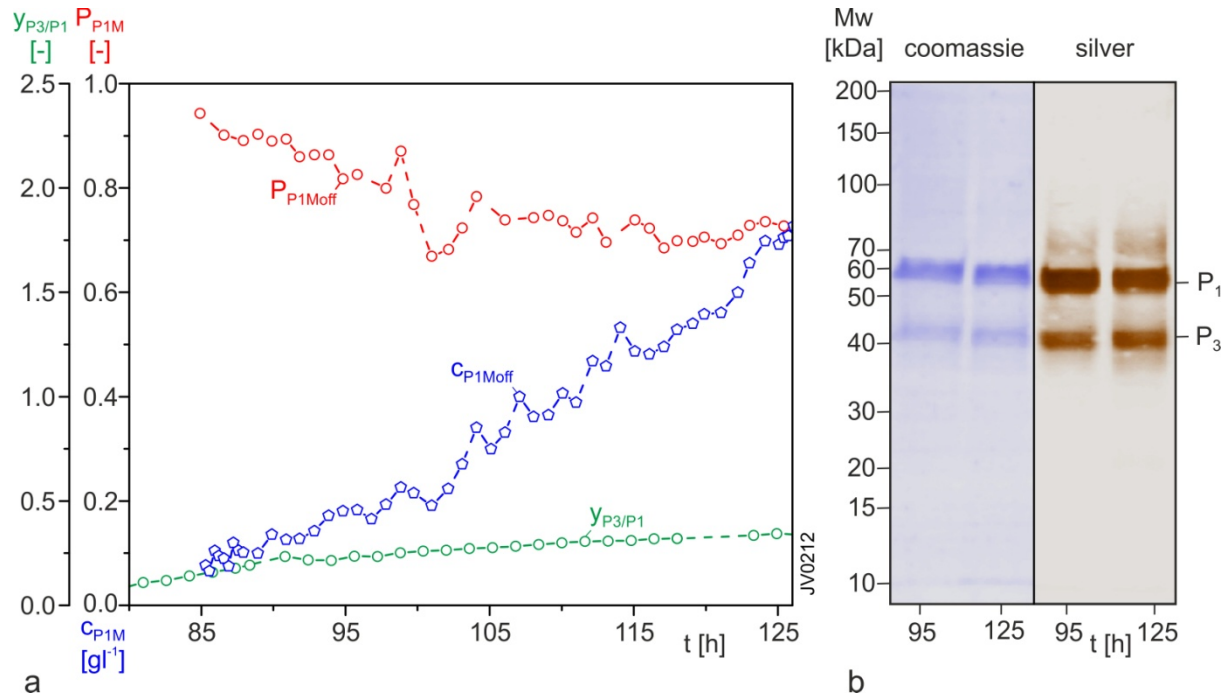


Abb. 7.6: a: Verlauf der Produktzusammensetzung der Medienphase
b: SDS-PAGE Analyse des Überstandes

Der modifizierte Impfstoffkandidat D1M1H unterliegt demnach einer Spaltung, jedoch wesentlich gemäßigter als das ursprüngliche D1M1. In Anbetracht des gleichbleibenden Produktverhältnisses und den vergleichbaren Bildungsrate der Produkte P₁ und P₃ wird die Ursache der Spaltung des D1M1H zellulär vermutet.

Da intrazellulär jedoch ausschließlich das intakte D1M1H vorliegt (siehe Kapitel 4.5) wird vermutet, dass während des Sekretionsvorganges eine definierte Spaltung von D1M1H erfolgt. In dem hier vorliegenden Sonderfall von günstigen Prozessbedingungen werden beide extrazellulär nicht weiter abgebaut.

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens erfolgten Stabilitätstest mit aufgereinigtem D1M1H.

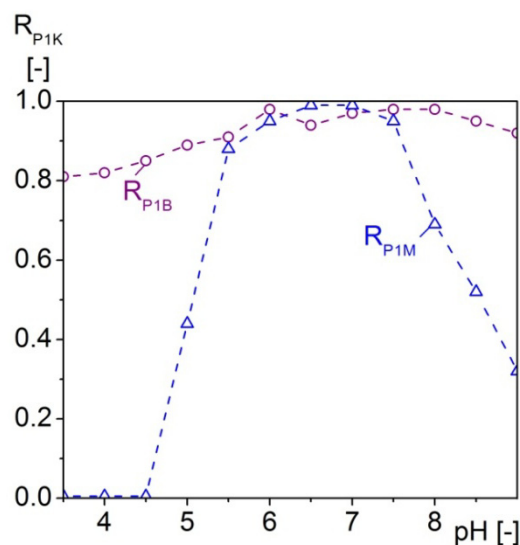


Abb. 7.7: Stabilität von D1M1H im Kulturüberstand (M) und in frischem Kulturmedium (B)

Die Wiederfindung R_{P1K} nach einer 72 stündigen Inkubation bei 30 °C in frischem Medium 1 (B) sowie in dem zugehörigen Kulturüberstand (M) einer *P. pastoris* Kultivierung ist in Abb. 7.7 gezeigt.

Der Abbau von D1M1H außerhalb des Bereichs $\text{pH} \in [5.5; 7.5]$ kann folglich auf Einflüsse des Expressionssystems zurückgeführt werden.

Diese Phänomene des Produktabbaus lassen sich auch bei Kultivierungen mit unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen während der Produktionsphasen beobachten, wie aus der SDS-PAGE in Abb. 7.8 hervorgeht.

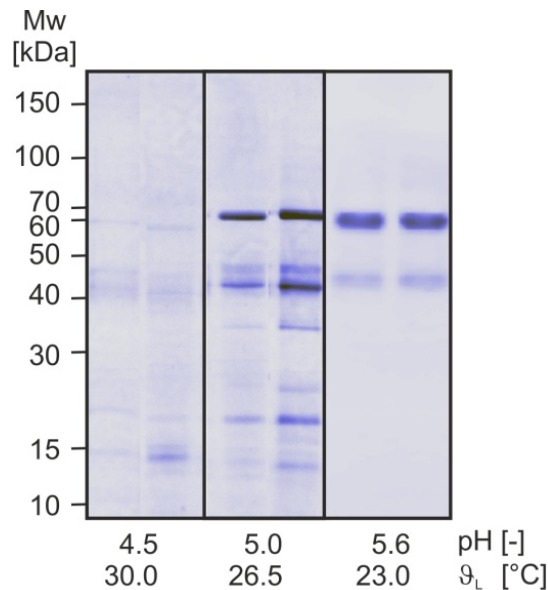


Abb. 7.8: Spaltung des D1M1H bei unterschiedlichen Produktionsbedingungen

Sekretierte rekombinante Proteine können im Kulturmedium potentiell durch extrazelluläre, zellgebundene und/oder durch intrazelluläre Proteasen lysierter Zellen abgebaut werden. Obwohl extrazelluläre Proteasen nicht ausreichend dokumentiert sind, ist bekannt, dass *Pichia pastoris* nur geringe Mengen an endogenen Proteinen sekretiert [Macauley-Patrick et al., 2005; Kang et al., 2006; Cereghino und Cregg, 2000; Johnson et al., 2003].

Die Proteolyse beeinträchtigt den Produktionsprozess durch:

- (I) die Reduktion der Proteinausbeute bei Abbau des Produktes
- (II) den etwaigen Verlust der biologischen Aktivität der verkürzten Produkte und
- (III) die Kontamination an Produktfragmenten, insbesondere bei der Aufreinigung durch deren ähnliche physikochemische und/oder Affinitätscharakteristiken [Macauley-Patrick et al., 2005]. Somit ist der Produktabbau in jeder Hinsicht zu verhindern bzw. zu minimieren.

Letztlich wird die im Kulturüberstand befindliche Konzentration an intaktem Produkt sowohl über die zelluläre Proteinexpression als auch über den zellexternen Proteinabbau beeinflusst, die beide von den Prozessbedingungen abhängig sind.

Dieser Zusammenhang soll systematisch analysiert und der Produktionsprozess optimiert werden. Dazu bedarf es einer geeigneten Prozessstrategie, um den experimentellen Aufwand zu reduzieren.

8 Entwicklung zyklischer Produktionsprozesse

8.1 Repeated Fed Batch Produktion von D1M1

Um den Gesamtproduktionsprozess zu verlängern und den experimentellen Aufwand für eine Optimierung zu reduzieren, soll eine zyklische Fahrweise etabliert werden.

Durch eine Repeated Fed Batch (RFB) Prozedur kann die erforderliche Reinigung und Sterilisierung des Equipments für einen erneuten Prozess umgangen werden. Mit einer Teilernte verbleibt Zellbrühe im Reaktor und durch Zuführung von frischem Medium wird eine Fed Batch Produktion wiederholt [Käppeli, 1994]. Anhand dieser Prozedur können zudem Reinigungskosten und die Belastung durch Chemikalien sowie bei einer effizienten Anlagennutzung die Herstellungskosten reduziert werden.

Eine schnelle Abtrennung von den Zellen und Überführung in stabile Lagerbedingungen ist bei sensitiven Produkten, wie den Malariavakzinkandidaten, essentiell. Die RFB Produktion ermöglicht eine direkte Verknüpfung mit sukzessiver Aufarbeitung wie Säulenchromatografie oder Separation.

Beim Design der zyklischen Fed-Batch Kultur ist zu beachten, dass keine Toxine oder inhibierenden Metabolite akkumulieren oder Nährstoffe limitiert vorliegen dürfen [Stanbury und Whitaker, 1984, Queener und Swartz, 1979]), um eine Beeinträchtigung des Folgezyklus zu vermeiden. Die Qualität des Herstellungsprozesses ist daher direkt von der Reproduzierbarkeit der Zyklen abhängig.

Mit einer sequentiellen Prozessführungsstrategie werden zwei unterschiedliche Ziele verfolgt:

- Optimierung von Produktionsprozessen mit DoE
- Untersuchungen der dynamischen Abläufe in zyklischer Produktion

Im Folgenden werden dazu zwei verschiedene RFB Strategien, die auf dem bereits vorgestellten klassischen Verlauf basieren, erläutert und näher untersucht.

Dabei wird zunächst eine Repeated Fed Batch Produktion von D1M1 vorgestellt, bevor auf die sequentielle Herstellung von D1M1H eingegangen wird.

Ein Langzeitprozess zur Produktion des D1M1 führt zu einer Abnahme des Zielproteingehalts, wie in Abb. 8.1 gezeigt ist. Somit ist eine kurze Produktionsphase erforderlich. Durch eine schnelle *Insitu*-Abtrennung des sensitiven Produkts und eine zyklische Produktionsweise kann der Prozess dennoch sinnvoll gefahren werden.

Zur Durchführung mehrerer Produktionsphasen innerhalb eines Prozesses wurde ein RFB-Prinzip etabliert. Hierbei folgt einer Fed Batch-Produktion von D1M1 eine Teilentleerung des Bioreaktors in einen Konditionierungstank. Ein Medienrefresh und eine Fed Batch-Phase auf Glycerol, zum schnellen Erreichen höherer Zelldichten, leiten dann eine neue Produktionsphase ein. In dieser induziert Methanol erneut die Produktexpression bis die Zellbrühe wiederum geerntet wird. Parallel zur Produktion erfolgt die Konditionierung der zuvor geernteten Zellbrühe mit anschließender Primäraufreinigung durch eine Expanded Bed Adsorptionsanlage [vgl. Martens und Borchert, 2011].

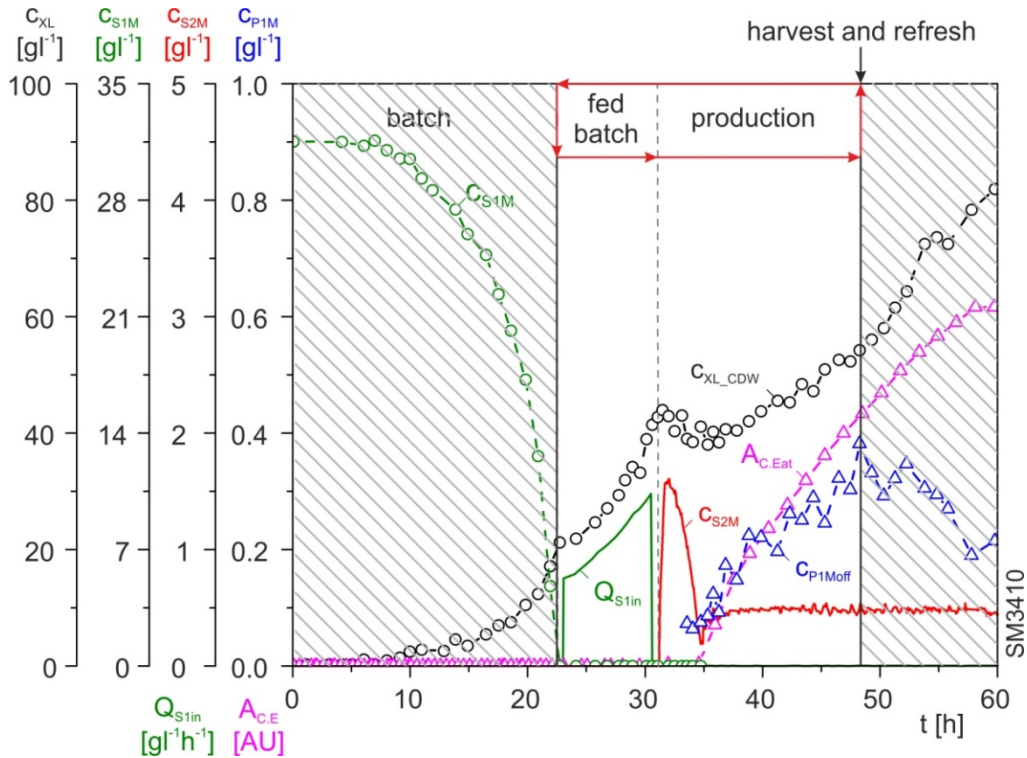


Abb. 8.1: Motivation zur zyklischen Produktion von D1M1

In Abb. 8.2 sind acht Produktionszyklen einer derartigen Strategie von 22 bis 35 h Dauer gezeigt, die jeweils mit einer Ernteprozedur und einem Refresh endeten. In diesen Experimenten konnten reproduzierbare Abläufe realisiert werden, in denen die Produktbildung vergleichbare Verläufe aufweist und insgesamt kein Produktionsabfall über den Langzeitprozess auftrat. Die ermittelten reaktionskinetischen Parameter der Produktionsphasen sind in Tab. 8.1 aufgeführt.

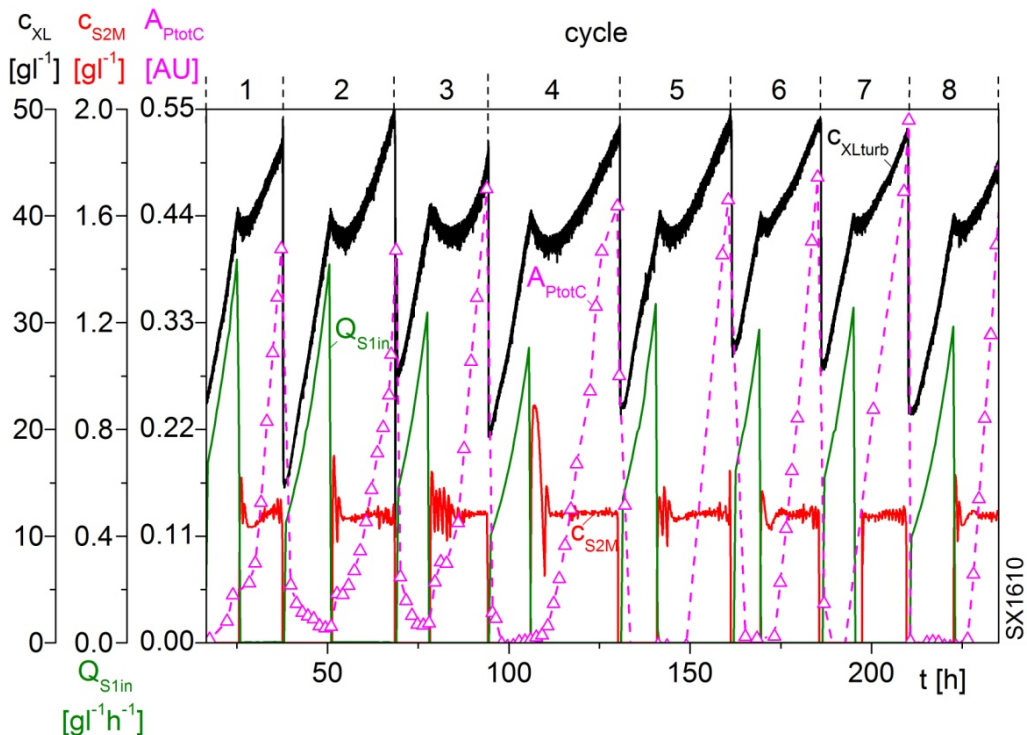


Abb. 8.2: Ablauf eines sequentiellen Produktionsprozesses

Tab. 8.1: Reaktionskinetische Parameter und Produktivität der Produktionsphasen

Zyklus	$q_{2X/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$q_{S2/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$y_{X/S2_{max}}$ [gg ⁻¹]	$q_{2O/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$y_{2X/O_{max}}$ [gg ⁻¹]	PRD [mg l ⁻¹ h ⁻¹]
1	0.019	0.074	0.258	0.081	0.236	4.287
2	0.020	0.078	0.263	0.075	0.272	4.289
3	0.021	0.076	0.277	0.081	0.260	4.704
4	0.017	0.075	0.229	0.082	0.209	4.508
5	0.021	0.074	0.281	0.080	0.260	4.531
6	0.018	0.077	0.234	0.081	0.223	4.845
7	0.019	0.078	0.239	0.076	0.247	4.982
8	0.020	0.083	0.242	0.082	0.246	4.940

Die erreichte Reproduzierbarkeit ermöglicht stabile Produktionsbedingungen und liefert daher ein hohes Potential zur Optimierung des Integrierten Prozesses. Dies wird in weiteren Promotionsvorhaben bearbeitet [Borchert, 2013].

8.2 Sequentielle Herstellung von D1M1H

Zur zyklischen Herstellung mit einer in-situ Optimierung der Produktion von D1M1H wurde eine weitere Repeated Fed Batch Strategie entwickelt, die in Abb. 8.3 gezeigt ist.

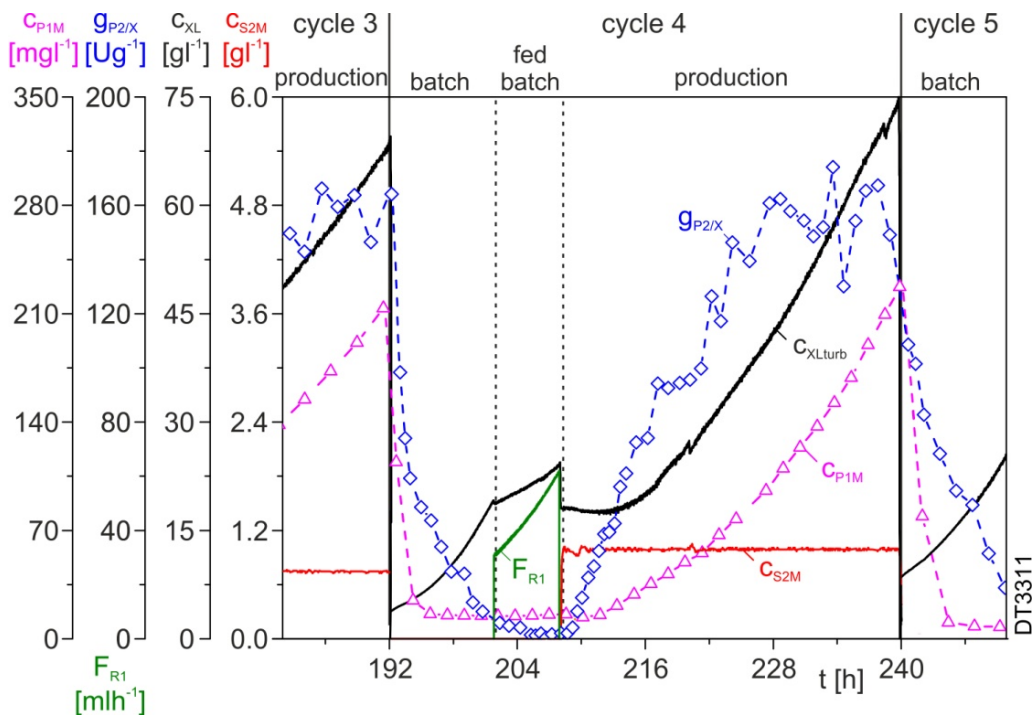


Abb. 8.3: Zyklischer Dreistufen-Produktionsprozess

Als Regenerationsphase für die Zellen zwischen den Produktionsphasen wird nunmehr eine unlimitierte Batch Phase und eine limitierte Fed Batch Phase auf Gly-

cerol vorangestellt. Diese dient zudem einer vollständigen Deletion des Methanolmetabolismus der vorangehenden Produktionsphase, um für zyklische Optimierungen in einem Reaktor gleiche zelluläre Anfangsbedingungen zu schaffen. Als Indikator dafür dient der Verlauf des Gehalts an zellinterner Alkoholoxidase $g_{P2/X}$.

Ein Verdünnungsschritt nach dem Glycerol Fed Batch ermöglicht nun die Einstellung identischer Startzellichten c_{XL0} und Volumen der Flüssigphase V_{L0} sowie die Zufuhr frischen Mediums für die Produktionsphasen. Die verbesserte Stabilität des modifizierten Impfstoffkandidaten D1M1H erlaubt dabei eine Verlängerung der Expressionsphase.

Ein Produktionszyklus setzt sich somit aus einem Glycerol Batch und Fed Batch, einer Teilernte mit Verdünnung sowie einem Methanol Fed Batch zusammen. Vor dem Hintergrund der Vergleichbarkeit für eine Optimierung der Produktion werden durch eine derartige Strategie stets gleiche Ausgangsbedingungen der Produktionsphasen gewährleistet.

Die Qualität eines Prozesses hängt direkt von dessen Reproduzierbarkeit ab. Daher wurde die beschriebene zyklische Prozessstrategie mit einer direkten Abfolge gleicher Experimente auf ihre Reproduzierbarkeit hin geprüft. In dieser Form wäre der Prozess auch als verlängerter Produktionsprozess zur Herstellung des Malaria-vakzinkandidaten einsetzbar.

Der Verlauf der sequentiellen Prozedur ist in Abb. 8.4 gezeigt. Dabei wurden während der Produktionsphase eine Methanolkonzentration c_{S2M} von 1 gl^{-1} , ein pH-Wert von 5.6 und eine Flüssigphasentemperatur ϑ_L von 23 °C , sowie die Verwendung des Mediums 1 entsprechend der in Kap. 7.2 vollgestellten Produktion von D1M1H gewählt.

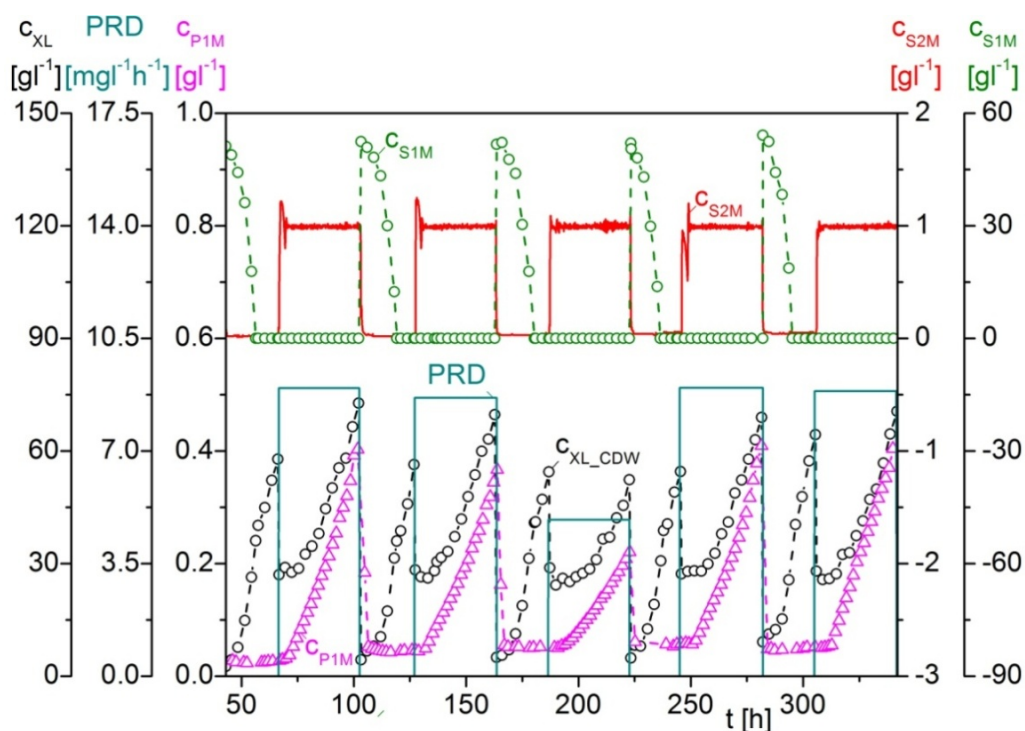


Abb. 8.4: Übersicht des Verlaufs der Kultivierung SM0313

Die reaktionskinetischen Parameter und die Produktivität der Produktionsphasen sind sowohl statistisch in Abb. 8.5 als auch tabellarisch in Tab. 8.2 aufgeführt.

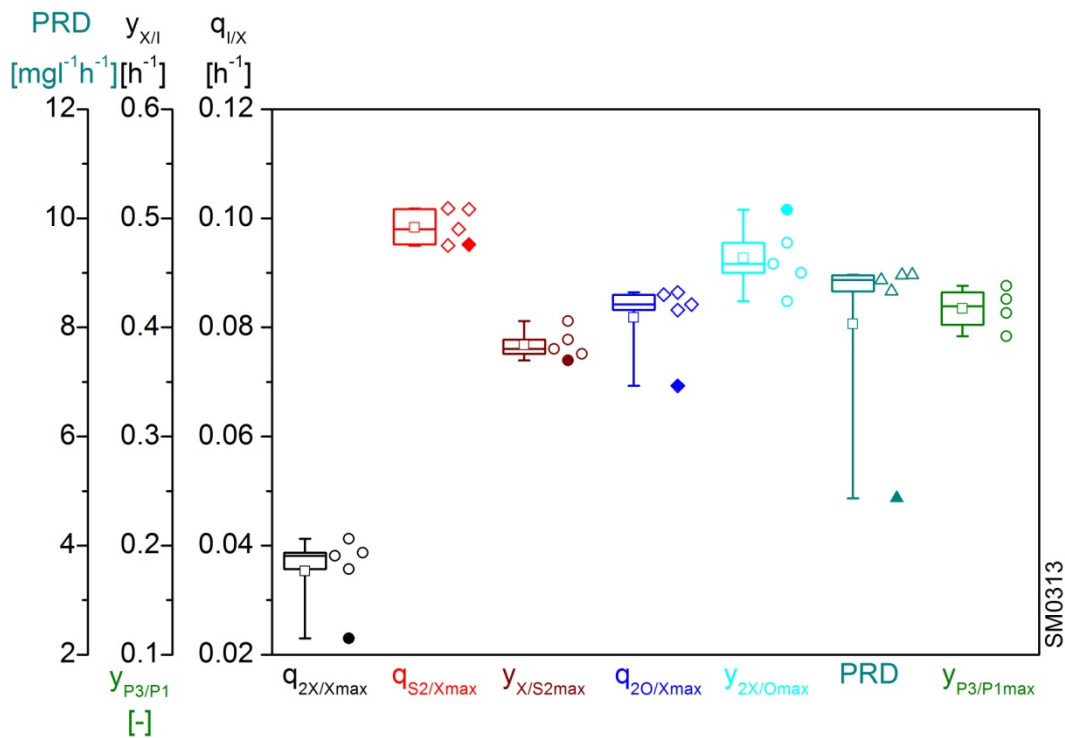


Abb. 8.5: Boxplots und Daten der zellspezifischen Reaktionsparameter und der Produktivität der fünf Zyklen; 25 und 75 Perzentile mit Median als horizontale Linie. Mittelwert (\square). Fehlerbalken bzw. Minimum und Maximum ($-$). Symbole von Zyklus 3 sind gefüllt dargestellt

Tab. 8.2: Reaktionskinetische Parameter und Produktivität der Produktionsphasen

Zyklus	$q_{2X/Xmax}$ [h ⁻¹]	$q_{S2/Xmax}$ [h ⁻¹]	$y_{X/S2max}$ [gg ⁻¹]	$q_{2O/Xmax}$ [h ⁻¹]	$y_{2X/Omax}$ [gg ⁻¹]	PRD [mg l ⁻¹ h ⁻¹]	$y_{P3/P1max}$ [-]	$g_{P1/Xmax}$ [m gg ⁻¹]
1	0.0413	0.1016	0.4059	0.0864	0.4775	8.957	0.392	5.783
2	0.0381	0.0980	0.3888	0.0832	0.4581	8.662	0.426	5.444
3	0.0230	0.0920	0.3478	0.0693	0.4618	4.866	-	5.479
4	0.0387	0.1018	0.3802	0.0860	0.4500	8.965	0.438	5.160
5	0.0357	0.0950	0.3758	0.0842	0.4240	8.869	0.413	5.593

Wie aus Abb. 8.4 und Abb. 8.5 hervorgeht, weisen sowohl der Verlauf des Zyklus 3 als auch dessen Parameter eine Abweichung von den übrigen Zyklen auf. Bei der Produktivität PRD, dem zellspezifischen Wachstum $q_{2X/Xmax}$ sowie der Sauerstoffaufnahme $q_{2O/Xmax}$ handelt es sich um Ausreißer (nach Grubbs getestet).

Es wird vermutet, dass es sich um eine Inhibierung handelt, womöglich durch vermehrte Zugabe von Antischaum oder zu hohe Temperatur des Refreshmediums.

Durch die Teilernte und Verdünnung sowie das unlimitierte Wachstum auf Glycerol entspricht der Folgezyklus ($k = 4$) wieder dem gewünschten Muster. Dies bekräftigt

das Regenerationspotential des unlimitierten Glycerol Batches und damit das gewählte Design der zyklischen sequentiellen Prozessstrategie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die sequentielle Repeated Fed Batch Prozedur sich als taugliche Strategie zur verlängerten Produktion der Malariaimpfstoffkandidaten erwiesen hat.

Störungen des Prozesses sowie Veränderungen des biologischen Systems sind nie vollständig auszuschließen, jedoch sind sie durch ein geeignetes Prozessmonitoring und systematische Auswertung fassbar.

9 Optimierung von Produktionsprozessen mit Design of Experiments

9.1 Systematische Untersuchung der Produktivität und Produktreinheit

9.1.1 Anwendung von Design of Experiments (DoE)

Ein wichtiger Schritt der Bioprozessentwicklung stellt die Optimierung der Produktion der rekombinanten Proteine dar, da durch Bereitstellung optimaler Prozessbedingungen die Produktivität gesteigert und so die Wirtschaftlichkeit maximiert werden kann.

Es hat sich gezeigt, dass die in der Produktionsphase eingestellten verfahrenstechnischen Parameter ein großes Potential zur Steigerung der Produktbildung des Prozesses haben [Macauley-Patrick et al., 2005; Lögering et al., 2010].

Allgemein hängt die erforderliche Expressionssteuerung von den Charakteristika des jeweiligen Zielproteins ab, so dass optimale Prozessbedingungen für jedes Produkt individuell zu identifizieren sind [Donovan et al., 1996; Cregg et al., 1993].

Mit der Methode der Statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) ist es möglich, den experimentellen Aufwand zur Erreichung aussagekräftiger Ergebnisse gegenüber der klassischen Versuchsdurchführung, bei der jeweils nur ein Faktor variiert wird, um ein Vielfaches zu reduzieren.

Über die genaue Charakterisierung der Einflüsse der gewählten Faktoren auf ein Qualitätsmerkmal wird die Berechnung eines Optimums in Abhängigkeit aller Faktoren ermöglicht. Dabei wird auch offengelegt, wie Interaktionen der Faktoren die Ausgangsgröße beeinflussen.

Die über das *BioPAT*[®] *MFCS/win DoE* Modul, Sartorius Stedim Biotech, Guxhagen, angebundene Software *MODDE*[®], Umetrics AB, Schweden, wurde für die Generierung der Versuchsdesigns, die statistische Auswertung der Rohdaten und zur Konstruktion und Evaluierung der Modelle angewendet.

In der vorliegenden Arbeit sollte in Anlehnung an Optimierungsuntersuchungen in einer zweistufigen sequentiell/parallelen Prozessführung mit einer Multibioreaktoranlage [Fricke et al., 2013; Vefghi, 2012] eine DoE-Anwendung auf einen Herstellungsprozess von D1M1H mit einer zyklischen Einreaktorstrategie erprobt werden.

In diesen vorausgegangenen Studien wurde neben der Flüssigphasentemperatur ϑ_L auch der pH-Wert der Kulturbrühe als kritische Prozessgrößen mit signifikantem Einfluss auf die Produktivität der Herstellung von D1, D1M1H und D2M2D3H identifiziert.

Diese Ergebnisse stellen eine gute Auslegung einer DoE-Untersuchung dar, sodass sie in dieser Arbeit als Screening vorweggesehen werden und hier nur noch der eigentliche Optimierungslauf in einer Einreaktorstrategie thematisiert wird.

Das Ziel der durchgeführten Untersuchung bestand darin, durch ein aussagekräftiges Modell den Einfluss der Faktoren Temperatur ϑ_L (x_1) und pH-Wert (x_2) auf die Systemantworten Produktivität PRD (y_1), Produktreinheit P_{P1M} (y_2) und die gewichtete

Produktivität $P_{P1M} \cdot PRD$ (y_3) zu beschreiben, wie in Abb. 9.1 schematisch dargestellt ist.

Durch die Ermittlung einer optimalen Wertepaarung der Faktoren können so optimale Expressionsbedingungen sowie eine maximale Produktreinheit gefunden werden.



Abb. 9.1: Schematische Darstellung der untersuchten Einflussfaktoren x_i und der Systemantworten y_m

Die Beurteilung der Prozessgüte erfolgte durch die in Gl. (6.51) bereits vorgestellte volumetrische Produktivität PRD_k des Zyklus k ,

$$y_{1k} = PRD_k = (\rho_Z \cdot (t_{kn} - t_{k0}) \cdot V_{Lkn})^{-1} \cdot [c_{P1Mkn} \cdot V_{Lkn} \cdot (\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XLkn}) + \sum_{j=1}^n c_{P1Mkj} \cdot \Delta V_{Skj} \cdot (\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XLkj}) - c_{P1Mk0} \cdot V_{Lk0} \cdot (\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XLk0})], \quad (9.1)$$

während die Proteinreinheit des Zielproteins P_{P1Mk} zum Ende der Induktion des Zyklus k ,

$$y_{2k} = P_{P1Mk} = \frac{B_{jMk}}{\sum_{i=1}^{n_k} B_{iMk}} \quad (9.2)$$

mit

P_{PiMk}	:= Reinheit des Produktes P_i im Medium im Zyklus k	[-]
B_{jMk}	:= Pixelintensität der SDS-PAGE Bande j des Produktes P_i im Zyklus k	[-]
B_{iMk}	:= Pixelintensität einer Produktbande i im Zyklus k	[-]
n_k	:= Anzahl der Banden in der auszuwertenden Lane im Zyklus k	[-],

über eine SDS-PAGE Analyse ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.2).

Das aus den ersten beiden Systemantworten zusammengesetzte Gütekriterium y_3 ,

$$y_{3k} = P_{P1Mk} \cdot PRD_k, \quad (9.3)$$

gewichtet die Qualität des Zyklus k durch Einbeziehung des Proteinabbaus über die Reinheit P_{P1Mk} . So wird ein Produktverlust und auch ggf. eine erschwerte Aufreinigung durch entstehende Nebenprodukte berücksichtigt.

Das gewählte CCC (Central Composite Circumscribed) Design der zwei Faktoren Flüssigphasentemperatur ϑ_L und pH-Wert ist in Abb. 9.2 gezeigt.

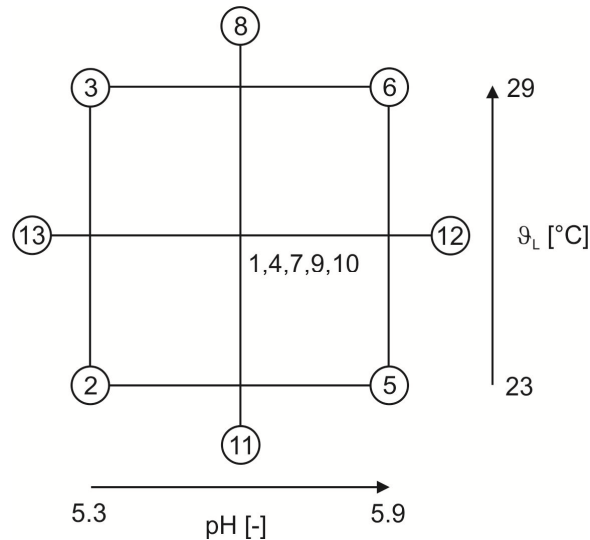


Abb. 9.2: CCC Optimierungsdesign

Um genügend Informationen über die Reproduzierbarkeit zu erhalten werden vier Center-Point-Experimente vorgesehen.

Die Experimente werden durch sukzessive Produktionszyklen in randomisierter Reihenfolge umgesetzt [Eriksson *et al.*, 2008].

9.1.2 Experimentelle Durchführung

Die Durchführung der Experimente der Optimierung erfolgte unter Verwendung des Bioreaktorsystems BIOSTAT[®] C.

Für die Optimierung wurde die in Kapitel 6.2. bereits erläuterte Strategie gewählt, wonach sich ein Produktionszyklus aus einem Glycerol Batch und einem Glycerol Fed Batch, einer Teilernte mit Verdünnung sowie einem Methanol Fed Batch zusammensetzt.

In der Produktionsphase wird die Methanolkonzentration c_{S2M} auf das Optimum der Produktion von D1 nach [Fricke *et al.*, 2013] von 1 g l^{-1} geregelt, während die Flüssigphasentemperatur ϑ_L und der pH-Wert systematisch variiert werden, wie in Abb. 9.3 unten zu erkennen ist.

Dort ist der Verlauf von fünf Prozesszyklen gezeigt, während die Darstellung von Zyklus 4 im oberen Bild von Abb. 9.3 einen genaueren Einblick in das zellinterne und das zellexterne Expressionsverhalten des Prozesses gibt.

Im Laufe der Zellanzucht auf Glycerol wird der zellinterne AOX-Gehalt $g_{P2/X}$ vollständig abgebaut, was ein Indiz für die vollständige Umstellung des Zellstoffwechsels ist. Dadurch werden gleiche Ausgangsbedingungen für alle nachfolgenden Induktionsphasen geschaffen.

Das Plateau von $g_{P2/X}$ weist auf einen stationären zellulären Zustand zum Abschluss der gegebenen Produktionsbedingungen hin.

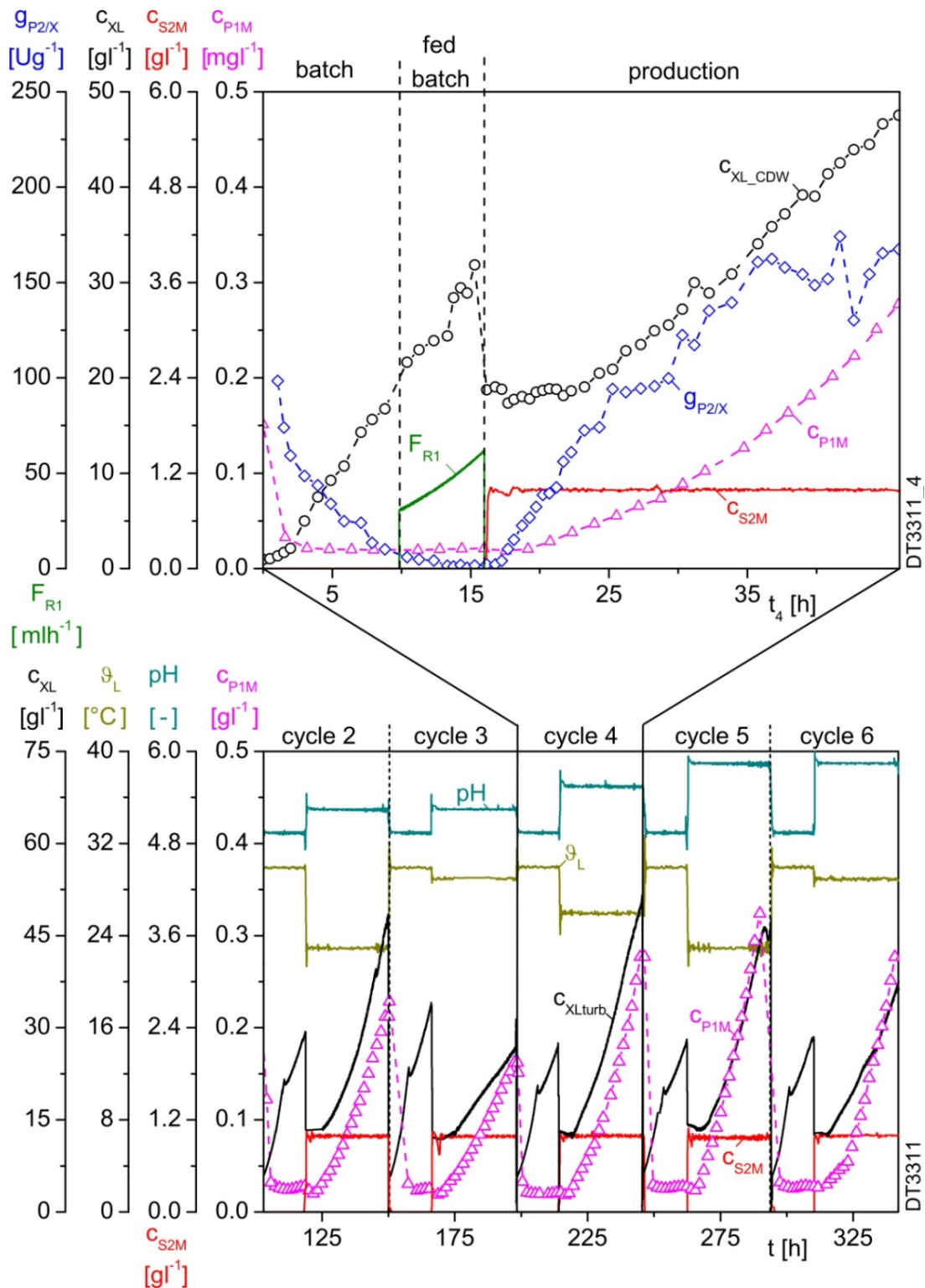


Abb. 9.3: Verlauf von fünf Optimierungszyklen und Einblick in Zyklus 4

Der Verlauf der zellspezifischen Reaktionsraten zweier Center Point Experimente ($k = 4$ und 7) ist in Abb. 9.4 gezeigt. Eine Auswertung der Experimente in Hinblick auf maximale zellspezifische Reaktionsbedingungen erfolgt in Kapitel 9.2.

Die zellulären Zustände der Produktionsphase und damit die sequentielle Kultivierung sind augenscheinlich reproduzierbar gestaltet, obwohl zwischen diesen Center Point Versuchen zwei Produktionszyklen mit veränderten Bedingungen lagen.

Während der unlimitierten Glycerol Batch Phase erreichen die Zellen unterschiedliche Wachstumsraten $\mu_{1\max}$ und damit auch ein abweichendes Andauern der Batch-Phase, wohl bedingt durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen in der vorangehenden Produktionsphase.

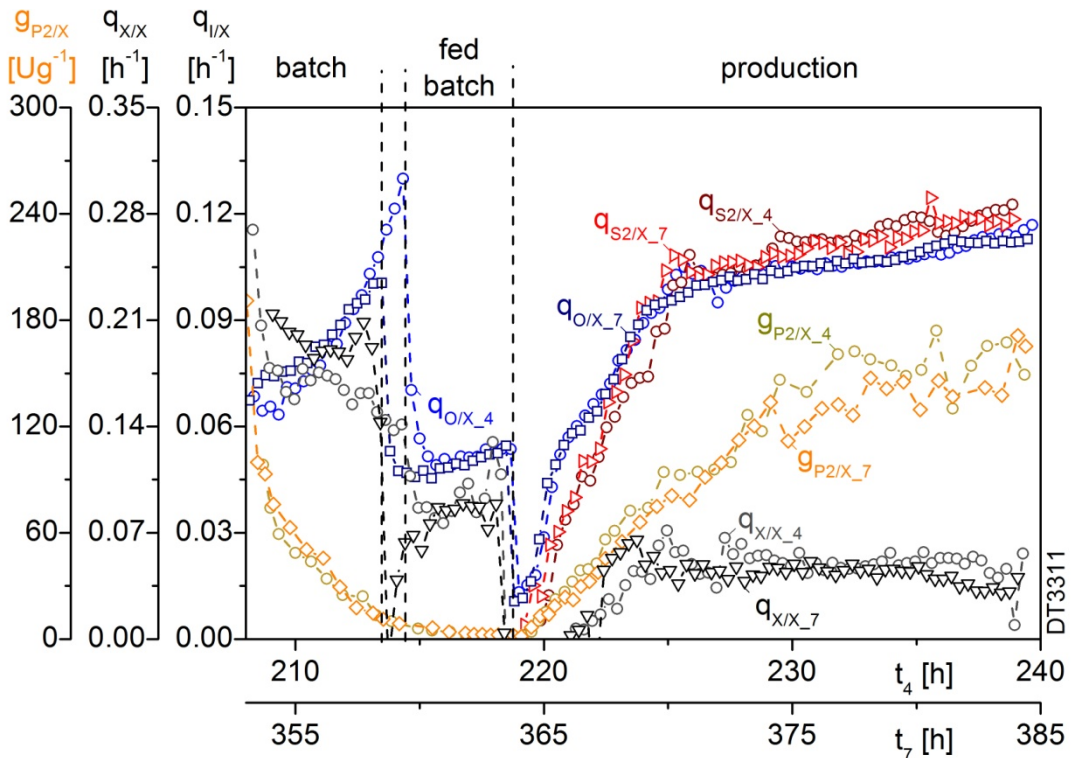


Abb. 9.4: Zellspezifische Reaktionsraten der *Center Point* Experimente 4 und 7

In einem späteren Center Point Experiment, $k = 12$, wurde jedoch ein stark abweichender Sauerstoff- und Substratbedarf in der Induktionsphase beobachtet, wie in Abb. 9.5 gezeigt ist.

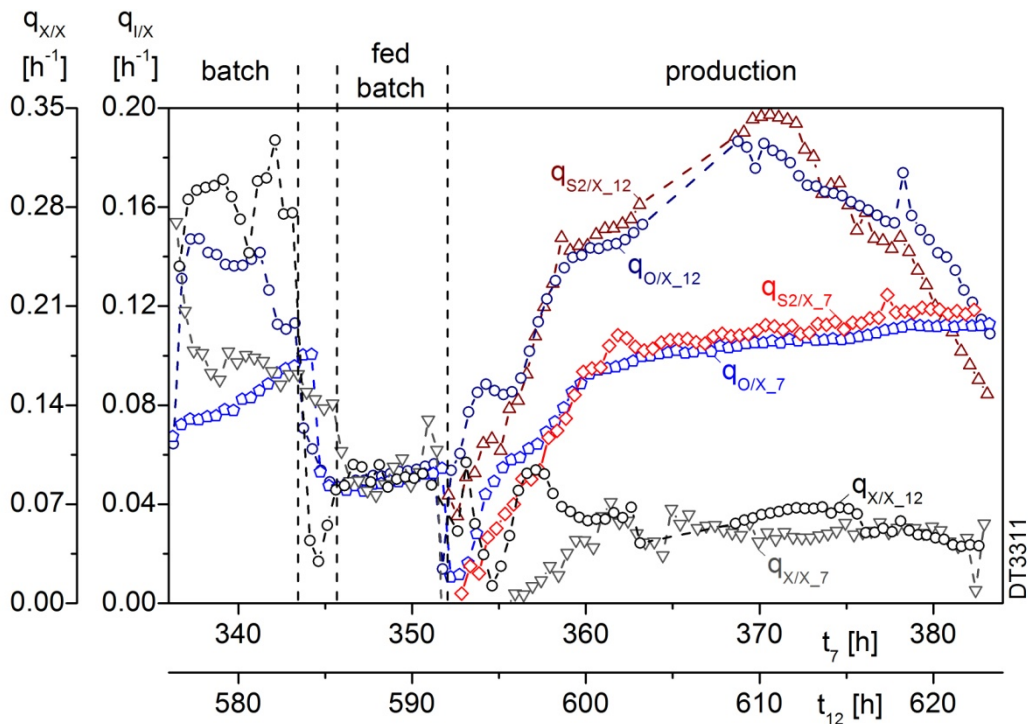


Abb. 9.5: Zellspezifische Reaktionsraten der *Center Point* Experimente 7 und 12

Auch durch die Glycerol Batch und Fed Batch Phase des Folgezyklus war der Sauerstoff- und Substratbedarf nicht zurückzuführen.

Es wird vermutet, dass es sich um eine Mutation oder eine irreversible Stressantwort auf die Bedingungen einer vorherigen Produktionsphase ($k = 8$) handelt, da diese mit einem Sollwert der Temperatur in der Flüssigphase von $> 30\text{ °C}$ mit Schwankungen nah der beschriebenen Obergrenze der Proteinexpression und sogar der Lebensfähigkeit von 32 °C liegen kann [Invitrogen, 2010].

Das Regenerationspotential der zyklischen Prozessführung ist somit auf natürliche Weise auf die physiologischen Grenzen des Expressionssystems beschränkt.

Aus diesem Grund wurden die auf den Sternpunkt ($k = 8$) folgenden Experimente in der Auswertung nicht berücksichtigt und wiederholt.

Die Optimierungsauswertung resultierte somit aus zwei Experimentalblöcken ($k = 1$ bis 8 und $k^* = 9$ bis 13) mit insgesamt 13 verwertbaren Produktionszyklen.

Die Designmatrix mit den Faktoreinstellungen und den experimentell ermittelten Werten der Systemantworten ist in Tab. 9.1 gezeigt.

Tab. 9.1: Faktoren und Ergebnisse der Produktivitäts-Optimierung

	Zyklus	pH	ϑ_L	PRD	P_{P1M}	$P_{P1M} \cdot PRD$
		[-]	[°C]	[mg l ⁻¹ h ⁻¹]	[-]	[mg l ⁻¹ h ⁻¹]
k	1	5.60	26.0	7.15	0.57	4.05
	2	5.30	23.0	4.33	0.44	1.91
	3	5.30	29.0	3.07	0.38	1.18
	4	5.60	26.0	7.72	0.58	4.51
	5	5.90	23.0	9.47	0.71	6.71
	6	5.90	29.0	7.56	0.59	4.49
	7	5.60	26.0	7.78	0.66	5.10
	8	5.60	30.2	6.20	0.62	3.83
k*	9	5.60	26.0	6.39	0.55	3.53
	10	5.60	26.0	7.75	0.57	4.42
	11	5.60	21.8	7.23	0.64	4.64
	12	6.02	26.0	8.13	0.67	5.41
	13	5.18	26.0	3.62	0.36	1.29

9.1.3 Evaluation der Modelle

Die Auswertung und Modellbildung erfolgte mit Hilfe der statistischen Werkzeuge von der Software MODDE®.

Die Anpassung der Rohdaten an ein Regressionsmodell wurde in dieser Arbeit über *Multiple Linear Regression* (MLR) vorgenommen.

Über ein Koeffizientendiagramm ist eine Beurteilung der Signifikanz der Modellterme gegeben. Dabei wird für jeden Koeffizienten das Konfidenzintervall in der Form von Fehlerbalken angezeigt, welche die Präzision beziehungsweise die Unsicherheit des jeweiligen Koeffizienten widerspiegelt.

Die *Coefficient Plots* der Gütekriterien PRD, P_{P1M} und $P_{P1M} \cdot PRD$ sind in Abb. 9.6 gezeigt, wobei die Darstellung auf den Faktorraum normiert und zentriert erfolgt. Das Vertrauensniveau beträgt 95 %.

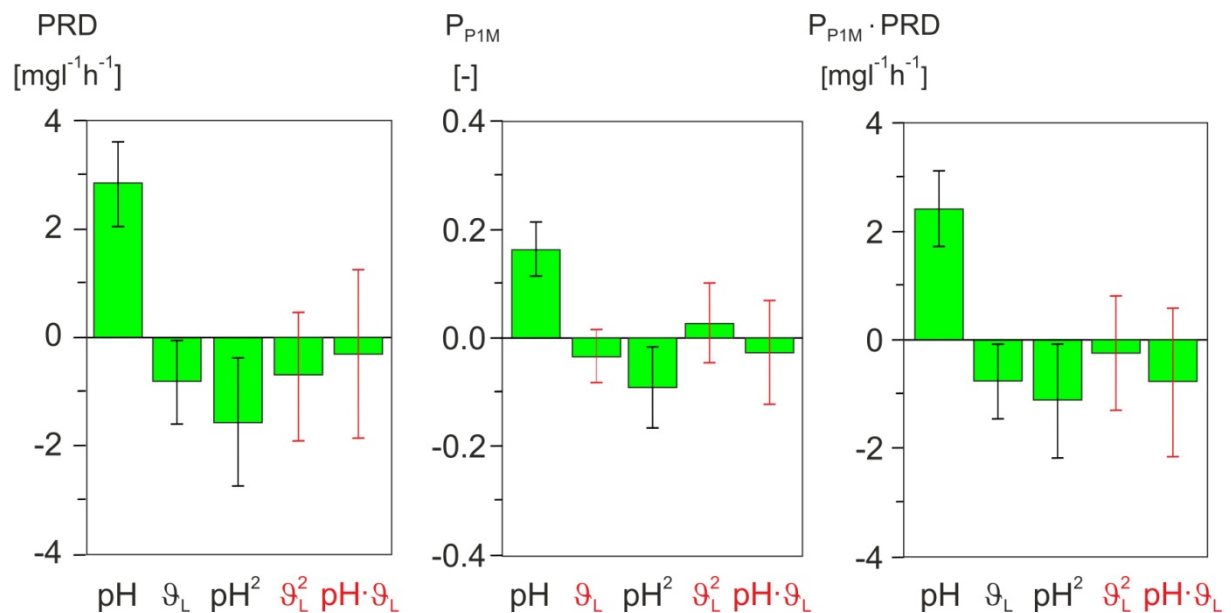
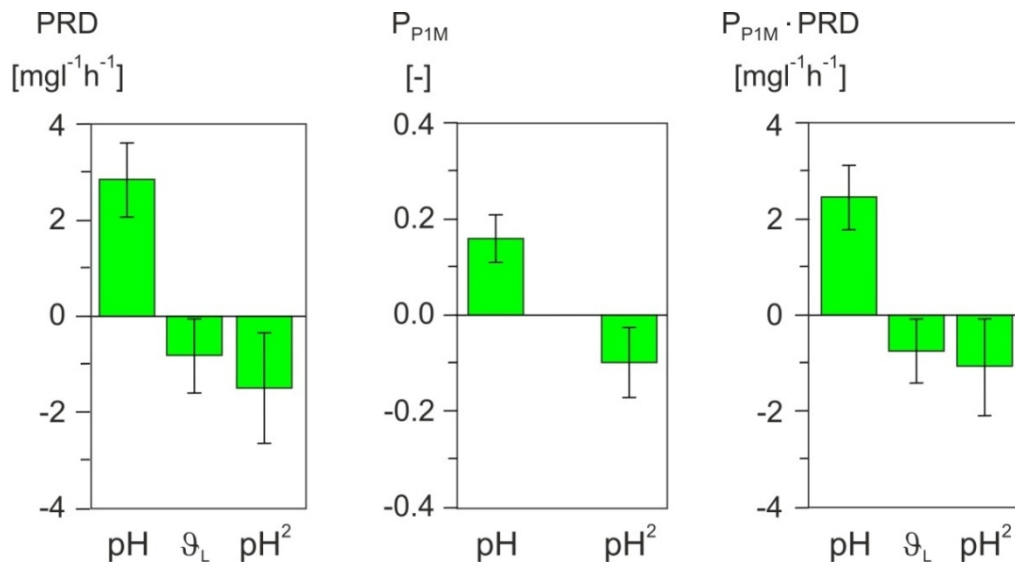


Abb. 9.6: *Coefficient Plots* der Gütekriterien PRD, P_{P1M} und $P_{P1M} \cdot PRD$

Für die drei untersuchten Systemantworten PRD, P_{P1M} und $PRD \cdot P_{P1M}$ wurden die Interaktionsterme sowie die quadratischen Regressionsterme der Flüssigphasentemperatur als nicht signifikant eingestuft, da die Konfidenzintervalle dieser Terme den Wert null einschließen. Sie wurden daher aus den Modellgleichungen ausgeschlossen.

Aus dem Modell der Produktreinheit P_{P1M} entfällt die Flüssigphasentemperatur gänzlich, da hier auch der lineare Term keinen statistisch signifikanten Einfluss ausübt.

Die finalen *Regression Coefficient Plots* der angepassten Modelle sind in Abb. 9.7 gezeigt und enthalten nun ausschließlich signifikante Modellterme.


 Abb. 9.7: *Regression Coefficient Plot* der finalen Modelle

Die zugrundeliegenden Modellgleichungen in Abhängigkeit von den beiden Faktoren pH-Wert und Temperatur ϑ_L ,

$$y_m = a_{0m} + a_{1m} \cdot \text{pH} + a_{2m} \cdot \vartheta_L + a_{11m} \cdot \text{pH}^2, \quad m = 1, 3, \quad (9.4)$$

beinhalten für die beiden volumetrischen Produktivitäten vier Koeffizienten.

Für die Proteinreinheit P_{P1M} in der Medienphase,

$$y_2 = P_{P1M} = a_{02} + a_{12} \cdot \text{pH} + a_{112} \cdot \text{pH}^2, \quad (9.5)$$

sind hingegen nur drei Koeffizienten signifikant.

Die Regressionskoeffizienten des nicht skalierten Modells sind in Tab. 9.2 gezeigt.

Tab. 9.2: Regressionskoeffizienten der Optimierungsmodelle

		PRD	P _{P1M} ·PRD	P _{P1M}	
a ₀	[mg l ⁻¹ h ⁻¹]	- 288.48	- 210.76	a ₀	[-] - 18.73
a ₁	[mg l ⁻¹ h ⁻¹]	100.66	72.54	a ₁	[-] 6.52
a ₂	[mg l ⁻¹ h ⁻¹ °C ⁻¹]	- 0.19	- 0.17		
a ₁₁	[mg l ⁻¹ h ⁻¹]	- 8.39	- 5.95	a ₁₁	[-] - 0.55

Die Verläufe der Systemantworten in Abhängigkeit von den Einflussfaktoren sind in Abb. 9.8 in Form von *Response Surface Plots* dargestellt. Die Maximalwerte der Gütekriterien und die zugehörigen optimalen Betriebsparameter sind Tab. 9.9 zu entnehmen.

Die optimalen Faktoreinstellungen sind für die Gütekriterien vergleichbar und liegen am Rande des hier betrachteten Untersuchungsraumes.

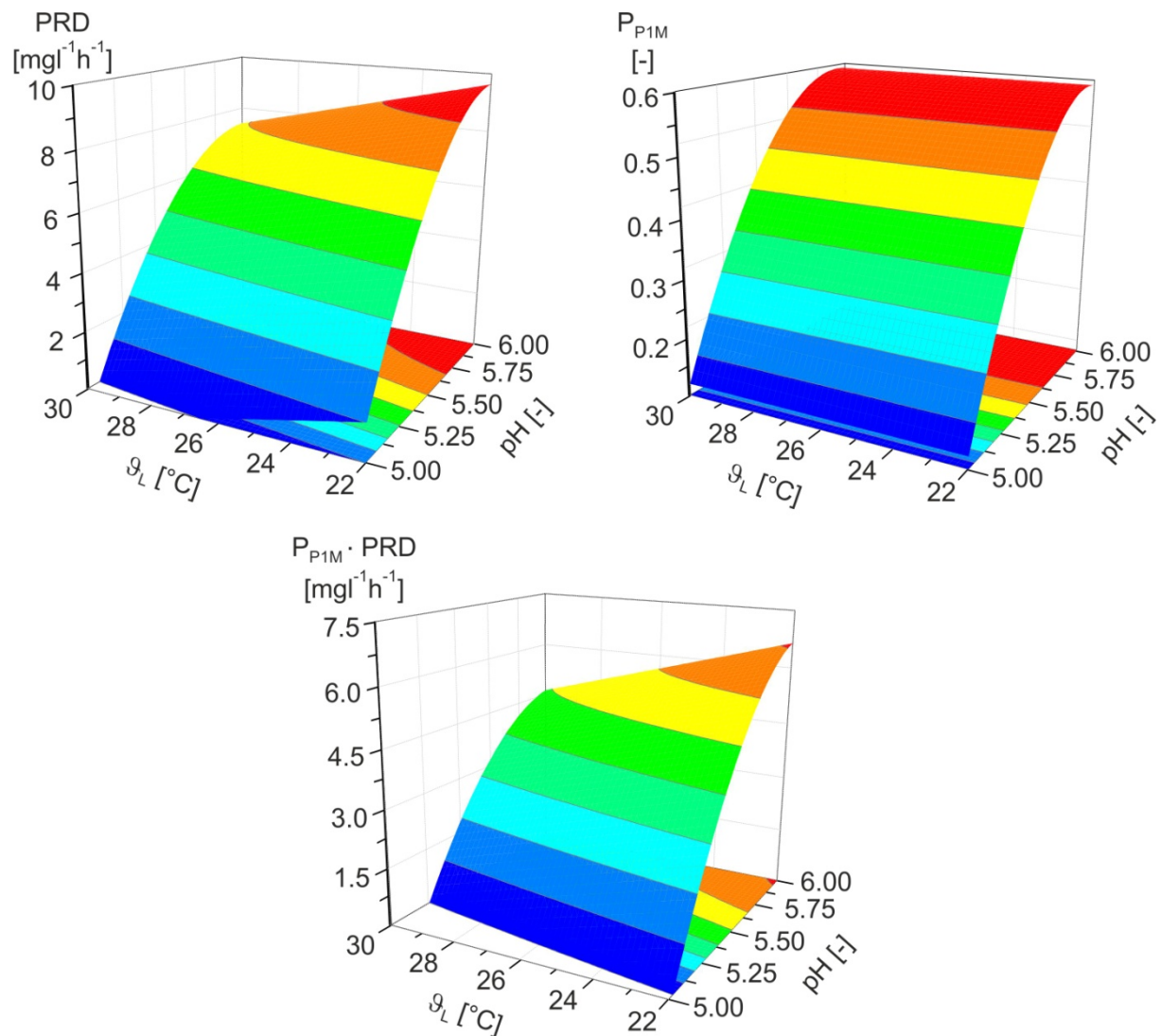


Abb. 9.8: Response-Surface Plots der volumetrischen Produktivitäten und der Produktreinheit

Tab. 9.3: Optimale Werte und Faktoreinstellungen der volumetrischen Produktivitäten und der Produktreinheit

		pH _{opt} [-]	ϑ_{Lopt} [°C]
PRD _{opt}	9.23 [mg l ⁻¹ h ⁻¹]	6.0	21.8
(P _{P1M} PRD) _{opt}	6.38 [mg l ⁻¹ h ⁻¹]	6.0	21.8
P _{P1Mopt}	0.66 [-]	5.9	-

Der beobachtete pH-Wert abhängige Abbau des Zielproduktes in Kapitel 7.2 wurde bestätigt. Die systematische Analyse der Proteinreinheit P_{P1M} ermöglichte die Charakterisierung der Stabilität des Zielproduktes in der Medienphase. Sie weist keine Temperaturabhängigkeit im gewählten Untersuchungsbereich auf.

Die Güte der aufgestellten Modelle wird in der Software MODDE[®] hauptsächlich über vier Koeffizienten, die Güte der Anpassung R^2 , die Güte der Vorhersehbarkeit Q^2 , die Modellvalidität MV sowie die Reproduzierbarkeit RP, beschrieben, die in Abb. 9.9 in einem *Summary of Fit Plot* dargestellt sowie in Tab. 9.4 aufgelistet sind.

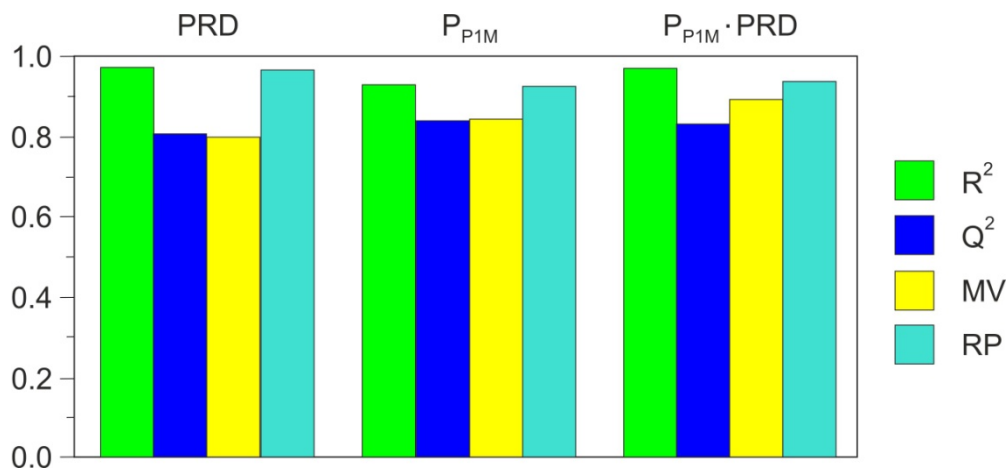


Abb. 9.9: *Summary of Fit Plot* der Gütekriterien

Tab. 9.4: Kenngrößen zur Bewertung der Modellgüte

	R ² [-]	Q ² [-]	R ² - Q ² [-]	MV [-]	RP [-]
Anforderung	> 0.5	> 0.5	< 0.2 - 0.3	> 0.25	> 0.5
PRD	0.903	0.747	0.156	0.742	0.899
P _{P1M}	0.863	0.780	0.083	0.782	0.860
P _{P1M} ·PRD	0.902	0.703	0.199	0.829	0.872

Die volumetrische Produktivität PRD, die Proteinreinheit P_{P1M} sowie die gewichteten Produktivität P_{P1M}·PRD sind nunmehr durch statistisch abgesicherte Modelle beschreibbar. Sie stellen aufgrund der Modellgüte sehr gute mathematische Abbilder der durchgeführten Versuche dar.

Zur Verifizierung der aufgestellten Modelle und der Stabilität des Systems ist jeweils die Durchführung eines Robustheitstest empfohlen. Auf diese wurde wegen des weiteren hohen experimentellen Aufwandes verzichtet.

9.2 Betrachtung der zellspezifischen Reaktionsraten der Methanolaufnahme

Mit der Methode der statistischen Versuchsplanung wurde des Weiteren auch der Einfluss der Flüssigphasentemperatur und des pH-Wertes auf die zellspezifischen Reaktionsraten innerhalb des Methanolstoffwechsels des Expressionssystems untersucht, wie in Abb. 9.10 gezeigt ist.



Abb. 9.10: Schematische Darstellung der untersuchten Einflussfaktoren x_i und der Systemantworten y_m

Dazu wurden die Experimente hinsichtlich der zellspezifischen Reaktionsraten für das Wachstum $q_{2X/X_{\max}}$ (y_1), die Sauerstoffaufnahme $q_{2O/X_{\max}}$ (y_2) und die Methanolaufnahme $q_{S2/X_{\max}}$ (y_3) gemäß der Gln. (6.26), (6.34) und (6.32) ausgewertet.

Zudem wurde die zellspezifische Produktbildungsrate $\bar{q}_{P1/Xk}$ (y_4) des Zyklus k ,

$$y_{4k} = \bar{q}_{P1/Xk} = \bar{y}_{P1/Xk} \cdot q_{2X/X_{\text{grk}}}, \quad (9.6)$$

unter Verwendung des mittleren Produktausbeutekoeffizienten $\bar{y}_{P1/Xk}$ des Zyklus k ,

$$\bar{y}_{P1/Xk} = \frac{m_{P1Lkn} - m_{P1Lk0}}{m_{XLkn} - m_{XLk0}}, \quad (9.7)$$

bestimmt [Fricke et al., 2011].

Zur Ermittlung der unbekanntenen zellspezifischen Zuwachsrates $q_{2X/X_{\text{grk}}}$ auf Methanol wurde angenommen, dass sich eine Änderung der Wachstumsrate in einem gleichbleibenden Verhältnis auf den Growth- und Maintenancestoffwechsel auswirkt.

Daraus ergibt sich ein ebenfalls konstanter Stoffwechselfaktor K_m ,

$$K_m = \frac{q_{2X/X_m}}{q_{2X/X_{\max}}} = \text{const.}, \quad (9.8)$$

als Verhältnis des zellspezifischen Maintenancerates q_{2X/X_m} zur zellspezifischen Wachstumsrate $q_{2X/X_{\max}}$.

Die zellspezifische Zuwachsrates $q_{2X/X_{\text{grk}}}$ des Zyklus k ,

$$q_{2X/X_{\text{grk}}} = q_{2X/X_m k} + q_{2X/X_{\max k}} = (1 + K_m) \cdot q_{2X/X_{\max k}}, \quad (9.9)$$

lässt sich nun aus der beobachtbaren maximalen Wachstumsrate $q_{2X/X_{\max k}}$ des Zyklus k unter Verwendung des Stoffwechselfaktors K_m beschreiben.

Durch eine Vorabsimulation des Produktionsprozesses wurden die in Tab. 9.5 aufgeführten Growth- und Maintenance-Anteile des Wachstums auf Methanol und damit der Stoffwechselfaktor K_m identifiziert [Voß, 2012].

Tab. 9.5: Globale Wachstumsparameter des Methanolstoffwechsels des D1M1H-Stammes

$q_{2X/X_{max}}$ [h ⁻¹]	q_{2X/X_m} [h ⁻¹]	K_m [-]
0.041	0.020	0.488

Unter Verwendung der Gl. (9.6) und dem in Tab. 9.5 aufgeführten Stoffwechselfaktor K_m lassen sich nun die mittleren zellspezifischen Produktbildungsraten $\bar{q}_{P1/Xk}$ der jeweiligen Zyklen berechnen.

Die Faktoreinstellungen und die experimentell ermittelten Reaktionsparameter sind in Tab. 9.6 dargestellt.

Tab. 9.6: Auswertung des Methanolstoffwechsels

Zyklus	pH [-]	ϑ_L [°C]	$q_{2X/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$q_{2O/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$q_{S2/X_{max}}$ [h ⁻¹]	$\bar{Y}_{P1/X}$ [mgg ⁻¹]	$q_{2X/X_{gr}}$ [h ⁻¹]	$\bar{q}_{P1/X}$ [mgg ⁻¹ h ⁻¹]	
k	1	5.60	26.0	0.0394	0.0998	0.1050	4.971	0.0586	0.291
	2	5.30	23.0	0.0403	0.1081	0.1053	3.067	0.0600	0.184
	3	5.30	29.0	0.0294	0.0756	0.0890	3.363	0.0437	0.147
	4	5.60	26.0	0.0399	0.1099	0.1092	5.256	0.0594	0.312
	5	5.90	23.0	0.0368	0.0992	0.1051	7.174	0.0548	0.393
	6	5.90	29.0	0.0304	0.0826	0.0781	7.663	0.0452	0.347
	7	5.60	26.0	0.0390	0.1047	0.1089	5.501	0.0580	0.319
	8	5.60	30.2	0.0233	0.0743	0.0702	8.856	0.0347	0.307
k*	9	5.60	26.0	0.0384	0.1018	0.1039	4.633	0.0571	0.265
	10	5.60	26.0	0.0379	[0.0806]	[0.0888]	5.741	0.0564	0.324
	11	5.60	21.8	0.0383	0.0983	0.1043	7.020	0.0570	0.400
	12	6.02	26.0	0.0361	0.0824	0.0966	6.885	0.0537	0.370
	13	5.18	26.0	0.0365	0.0946	0.0971	2.849	0.0543	0.155

Eine Rohdatenevaluation erfolgte anhand der in Abb. 9.11 gezeigten *Probability Plots*. Bei der Auswertung nach $q_{S2/X_{max}}$ sowie $q_{2O/X_{max}}$ wurde dabei Experiment Nr. 10 als statistisch signifikanter Ausreißer identifiziert.

Da hier die Standardabweichungen der Residuen jenseits der Grenze der vierfachen Standardabweichung liegen [Eriksson *et al.*, 2008], wurden diese Versuche von der Modellbildung dieser Systemantworten ausgeschlossen.

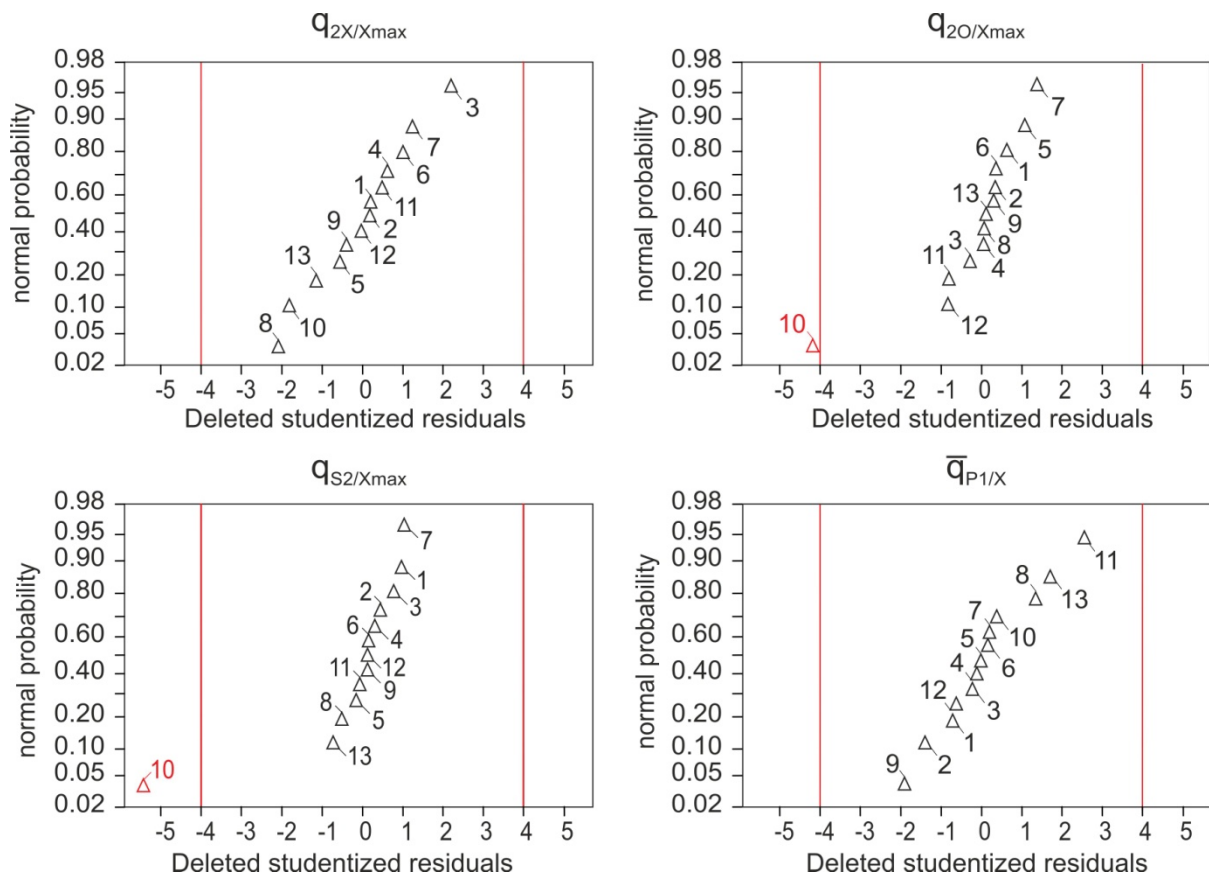
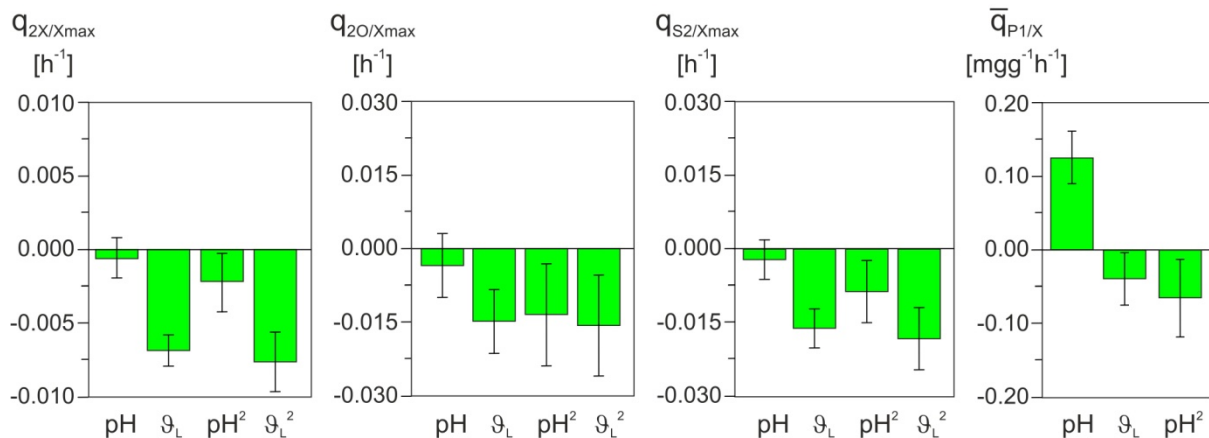
Abb. 9.11: *Probability Plots* der Residuen

Abb. 9.12 zeigt die Signifikanz der Modellterme der finalen Optimierungsmodelle anhand der jeweiligen Koeffizientenplots mit einem Vertrauensniveau von 95 %.

Abb. 9.12: *Coefficient Plot* der finalen Optimierungsmodelle der zellspezifischen Parameter

Signifikante quadratische Regressionsterme des pH-Wertes liegen bei allen Qualitätskriterien vor, wodurch die nicht signifikanten linearen Terme bestehen bleiben.

Die Interaktionsterme von pH und ϑ_L besitzen keinen signifikanten Einfluss auf die Systemantworten und wurden daher aus der Modellbildung entfernt, wie auch der quadratische Regressionsterm der Flüssigphasentemperatur bei dem Modell der mittleren zellspezifischen Produktbildung $\bar{q}_{P1/X}$.

Die zugrundeliegenden Modellgleichungen,

$$y_m = a_{0m} + a_{1m} \cdot \text{pH} + a_{2m} \cdot \vartheta_L + a_{11m} \cdot \text{pH}^2 + a_{22m} \cdot \vartheta_L^2, \quad m = 1, 2, 3, \quad (9.10)$$

enthalten für $q_{2X/X_{\max}}$, $q_{2O/X_{\max}}$ und $q_{S2/X_{\max}}$ fünf Koeffizienten.

Für die mittlere zellspezifische Produktbildung $\bar{q}_{P1/X}$,

$$y_4 = \bar{q}_{P1/X} = a_{04} + a_{14} \cdot \text{pH} + a_{24} \cdot \vartheta_L + a_{114} \cdot \text{pH}^2, \quad (9.11)$$

wurden hingegen vier Koeffizienten ermittelt, deren Werte alle in Tab. 9.7 aufgelistet sind.

Tab. 9.7: Regressionskoeffizienten der Optimierungsmodelle des Methanolstoffwechsels

	$q_{2X/X_{\max}}$	$q_{2O/X_{\max}}$	$q_{S2/X_{\max}}$		$\bar{q}_{P1/X}$
a_0 [h ⁻¹]	- 0.6029	- 2.729	- 1.988	a_0 [mgg ⁻¹ h ⁻¹]	- 12.537
a_1 [h ⁻¹]	0.1400	0.839	0.540	a_1 [mgg ⁻¹ h ⁻¹]	4.374
a_2 [°C ⁻¹ h ⁻¹]	0.0211	0.042	0.050	a_2 [mgg ⁻¹ °C ⁻¹ h ⁻¹]	- 0.009
a_{11} [h ⁻¹]	- 0.0126	- 0.076	- 0.049	a_{11} [mgg ⁻¹ h ⁻¹]	- 0.364
a_{22} [°C ⁻² h ⁻¹]	- 0.0004	- 0.001	- 0.001		

Die aufgestellten Modelle der zellspezifischen Parameter genügen alle den Ansprüchen eines guten und stabilen Modells, wie an den Kenngrößen in Tab. 9.8 zu erkennen ist.

Tab. 9.8: *Summary of Fit* des Methanolstoffwechsels

	R^2	Q^2	$R^2 - Q^2$	MV	RP
	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
Anforderung	> 0.5	> 0.5	< 0.2 – 0.3	> 0.25	> 0.5
$q_{2X/X_{\max}}$	0.964	0.889	0.075	0.495	0.975
$q_{2O/X_{\max}}$	0.874	0.579	0.295	0.692	0.876
$q_{S2/X_{\max}}$	0.953	0.849	0.104	0.691	0.954
$\bar{q}_{P1/X}$	0.897	0.862	0.035	0.637	0.917

Die *Response Surface Plots* der zellspezifischen Wachstumsrate $q_{2X/X_{\max}}$, Sauerstoffaufnahme rate $q_{2O/X_{\max}}$ und Methanolaufnahmerate $q_{S2/X_{\max}}$ sowie die zellspezifische Produktbildungsrate $\bar{q}_{P1/X}$ sind in Abb. 9.13 dargestellt.

Tab. 9.9 zeigt die optimalen Arbeitspunkte und die entsprechend zugeordneten optimalen zellspezifischen Reaktionsraten.

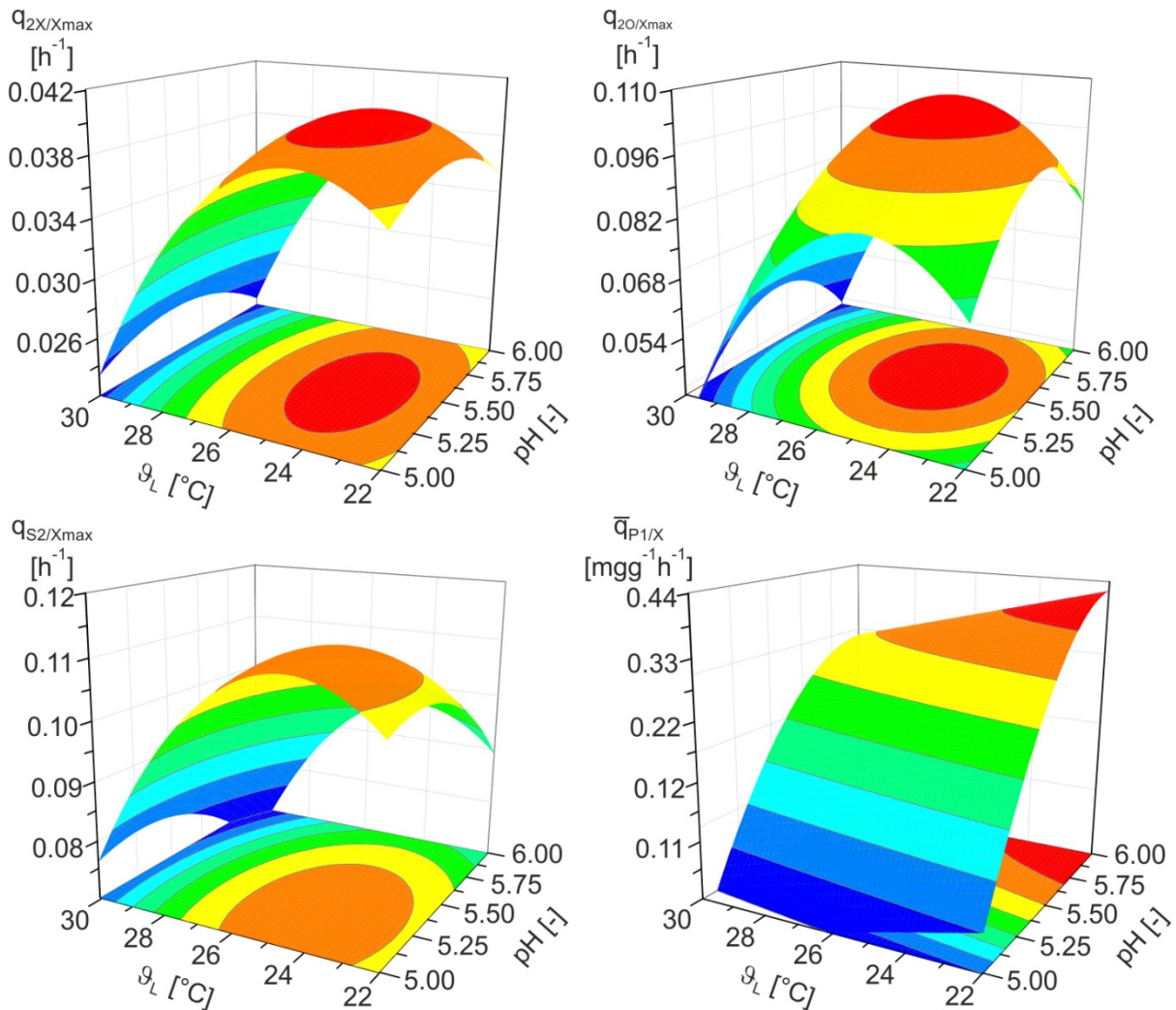


Abb. 9.13: Response-Surface Plots der zellspezifischen Reaktionsraten

Tab. 9.9: Optimale Werte und Parameter der zellspezifischen Reaktionsraten

			pH _{opt} [-]	θ _{Lopt} [°C]
q _{2X} /X _{opt}	0.040	[h ⁻¹]	5.6	24.2
q _{2O} /X _{opt}	0.108	[h ⁻¹]	5.5	24.0
q _{S2} /X _{opt}	0.110	[h ⁻¹]	5.6	24.2
q̄ _{P1} /X _{opt}	0.412	[mgg ⁻¹ h ⁻¹]	6.0	21.8

Obwohl optimales Wachstum induzierter Zellen in der Literatur bei einer Temperatur von 28 bis 30 °C beschrieben wird [Invitrogen, 2010], liegt das hier ermittelte Optimum q_{2X}/X_{opt} bei 24.2 °C. Eine Reduktion der Temperatur von 30 °C auf 23 °C führte bereits bei [Jahic et al., 2003] zu einer erhöhten AOX-Aktivität, was auf eine höhere Wachstumsrate von Mut^S Stämmen bei niedrigeren Temperaturen hinweist [Kupcsulik und Sevela, 2005].

Die wachstumsassoziierten Parameter q_{2X}/X_{max} , q_{2O}/X_{max} und q_{S2}/X_{max} weisen, wie erwartet, vergleichbare optimale Operationsparameter auf, von denen die optimalen

Einstellungen für die produktorientierten Parameter $\bar{q}_{P1/X}$ und PRD deutlich abweichen.

Dies lässt darauf schließen, dass die zellspezifische Produktbildung und die volumetrische Produktivität nicht direkt mit dem Zellwachstum und dem Methanolmetabolismus korrelieren. Es wurde bereits berichtet, dass bei *Pichia pastoris* Mut^S Stämmen im Gegensatz zu Mut⁺ die Produktbildungsrate unabhängig vom Wachstum beschrieben werden muss [Kupcsulik und Sevella, 2005; d'Anjou und Daugulis, 2001].

Hohe Temperaturen können die Produktausbeute durch eine geringere Produktstabilität, erhöhte Freisetzung von Proteasen toter Zellen sowie Problemen bei der Proteinfaltung oder Sekretion beeinträchtigen [Macauley-Patrick et al., 2005; Hong et al., 2002]. Dabei beeinflusst die Temperatur die Produktsekretionsrate nicht nur durch thermodynamische Effekte, sondern auch durch Genregulation [Gasser et al., 2007-1].

In der Literatur wird vielfach berichtet, dass die sekretorische Kapazität ein Bottleneck der rekombinanten Produktion darstellt [Pfeffer et al., 2011; Idris et al., 2010; Marx et al. 2009; Zhang et al., 2006; Gasser et al., 2007-2; Love et al., 2012]. Der induzierbare AOX Promotor kann einen Überschuss an Proteinen produzieren, der den Sekretionsweg überfüllt und dadurch hohe Level an Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie Proteinabbau und reduzierte Translation verursacht [Love et al., 2012; Gasser et al., 2006; Meusser et al., 2005; Harding et al., 1999].

Die Sekretionskapazität von *Pichia pastoris* ist dabei unabhängig von der Fähigkeit zur Proteinfaltung [Love et al., 2012].

Eine erhöhte Expression des Zielproduktes kann als Folgeerscheinung einer Faltungslimitierung zu einem ER assoziierten Proteinabbau (ERAD) führen. Durch die Retranslokation der falsch gefalteten Proteine ins Cytosol wird dann kompetitiv zur Translokation die Anzahl an Proteinen limitiert, die in den Sekretionsweg eintreten [Mattanovich et al., 2004].

Zudem beeinträchtigt eine proteolytische Spaltung des sekretierten Proteins die Ausbeute an intaktem Zielprodukt. Bei der Zellyse werden die enthaltenen Proteasen freigesetzt, wobei der Gehalt verschiedener Proteasentypen der Vakuolen der Hefezellen wiederum von unterschiedlichen Stressfaktoren abhängig ist [Sinha et al., 2005]. Eine erhöhte Temperatur führt zu einer niedrigeren Viabilität und damit erhöhter Zellyse [Macauley-Patrick et al., 2005].

Der pH-Wert abhängige, extrazelluläre Abbau des Zielproduktes durch Proteasen wird als Grund für die Verschiebung des optimalen Arbeitspunktes des zellulären Stoffwechsels zu einem höheren pH-Wert für die Produktivität angesehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren die Unverzichtbarkeit der Prozessoptimierungen, um damit nicht nur die Maximierung des Zellwachstums oder der Gesamtproteinproduktion sondern eine maximale Ausbeute an intakten, bioaktiven Zielproteinen als Resultat eines komplexen biologischen Produktionsprozesses zu erstreben.

10 Modellbildung der dynamischen Abläufe in zyklischer Produktion

10.1 Das kybernetische Modell der Proteinexpression

Auf Grundlage der erworbenen experimentellen Daten erfolgt eine mathematische Modellbildung und Simulation der komplexen zellinternen Vorgänge bei der Expression eines artifiziiellen Malariavakzins in einem sequentiell geführten Produktionsprozess mit *Pichia pastoris*.

Reaktionskinetische und kybernetische Modellansätze sollen dabei weiterentwickelt und angepasst werden, um neben der Zielproteinexpression auch die Expression der Alkoholoxidase und deren Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel zu beschreiben. Dies soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Proteinexpression leisten und Möglichkeiten der analytischen Prozessoptimierung offenbaren.

Zur Modellierung, Simulation und Parameterestimierung wurde das Software Paket MATLAB, The Math Works Inc., Natick, MA, USA, in Kombination mit der BLOSS-toolbox verwendet. Diese ist ein auf MATLAB basierendes Programmpaket, das speziell für die Modellierung, Simulation und Optimierung von auf Schätzungen beruhenden (dynamischen) biotechnologischen Prozessen entwickelt wurde [Gollmer, 1998].

Die folgenden Abschnitte beschreiben einen zunächst verwendeten kybernetischen Modellansatz nach [Luttmann et al., 2010]. Der komplexe Prozess wird dabei in die vier Schritte, Induktion, Proteinsynthese und Anreicherung oder Ausschleusung, unterteilt. Der dort gewählte Ansatz beschreibt die induzierte Bildung der zellinternen AOX sowie die Expression und Sekretion des rekombinanten Zielproteins 1-3del ITAC. Das dafür gewählte Reaktionsschema ist in Abb. 10.1 dargestellt.

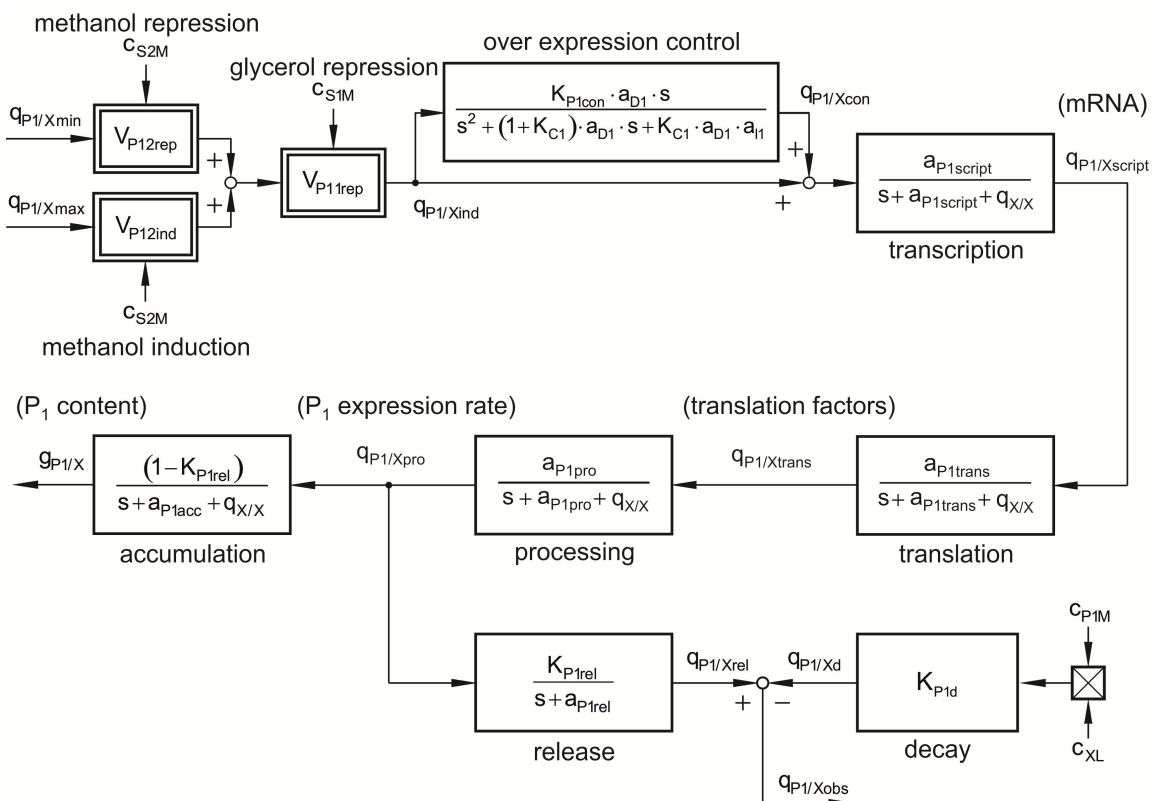


Abb. 10.1: Netzwerk der Zielproduktexpression nach [Luttmann et al., 2010]

Die Modellierung basiert auf kybernetischen Elementen der biologischen Reaktionskinetik und klassischen Reaktionsansätzen der linearen Regelungstechnik, die im Folgenden einzeln erläutert werden. Nach der Erprobung des Ursprungsmodells ist ab Kapitel 10.4 die phänomenologische Modellerweiterung zur Prozesssimulation dargestellt, die beide im Rahmen einer betreuten Masterarbeit [Voß, 2012] erfolgten. In der vorliegenden Arbeit wurde sich an dieser Darstellung orientiert.

Dabei erfolgt eine Betrachtung sowohl des Zielproteins D1M1H (P_1) als auch des intrazellulären Enzyms AOX (P_2).

10.2 Induktion und Repression der Proteinexpression

Mit Hilfe von modifizierten Ansätzen aus der biologischen Reaktionskinetik werden die Induktion und Repression der Expression als nichtlineare Schalterfunktionen modelliert. Dabei ist die Induktion der Expression sowohl des Zielproteins P_1 als auch der Alkoholoxidase P_2 proportional zu einem nichtlinearen Verstärkungsfaktor $V_{P_j2ind} \in [0,1]$,

$$V_{P_j2ind}(t) = \frac{\left(\frac{c_{S2M}(t)}{k_{S2ind}}\right)^{\kappa_{j2ind}}}{1 + \left(\frac{c_{S2M}(t)}{k_{S2ind}}\right)^{\kappa_{j2ind}}}, \quad j = 1, 2 \quad (10.1)$$

mit

k_{S2ind} := Induktionskonstante von Methanol [$g\,l^{-1}$]

κ_{j2ind} := Induktionsordnung von Methanol während der Bildung von P_j [-],

der von der Methanolkonzentration c_{S2M} im Medium gesteuert wird. Über einen Limitierungsterm der Ordnung κ_{j2ind} wird bei der Konzentration k_{S2ind} ein Schmitt-Trigger ähnliches Verhalten nachgebildet [Tietze und Schenk, 2002].

Die Reprimierung des Promotors P_{AOX_j} wird dagegen mit einem Inhibierungsterm höherer Ordnung dargestellt, der von der Glycerolkonzentration c_{S1M} oder der Methanolkonzentration c_{S2M} im Medium abhängig ist.

Die allgemeine Betrachtung einer nichtlinearen Repression der Expression des Produktes P_j durch das Substrat S_i ,

$$V_{P_jirep}(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{c_{SiM}(t)}{k_{Sirep}}\right)^{\kappa_{jirep}}}, \quad j = 1, 2; i = 1, 2 \quad (10.2)$$

mit

k_{Sirep} := Repressionskonstante des Substrates S_i [$g\,l^{-1}$]

κ_{jirep} := Repressionsordnung des Substrates S_i während der Bildung von P_j [-],

erlaubt auch die Beschreibung der Dereprimierung des Promotors P_{AOX_j} als einen von der jeweiligen Konzentration c_{SiM} abhängigen Repressionsmechanismus.

Die Proteinbildungsrate des gesamten Induktionsvorganges $q_{Pj/Xind}$,

$$q_{Pj/Xind}(t) = V_{Pj1rep}(t) \cdot (V_{Pj2ind}(t) \cdot q_{Pj/Xmax} + V_{Pj2rep}(t) \cdot q_{Pj/Xmin}), \quad j = 1, 2, \quad (10.3)$$

wird maßgeblich von dem Repressionsmechanismus V_{Pj1rep} durch das Glycerol bestimmt. Bei Anwesenheit von Glycerol ($c_{S1M} > k_{S1rep}$) wird dadurch keine neue Produktbildung induziert.

Bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glycerol ($c_{S1M} < k_{S1rep}$) und Methanol ($c_{S2M} < k_{S2rep}$) wird eine Produktbildung mit der Rate $q_{Pj/Xmin}$ induziert. Dieser Ansatz beschreibt eine gewisse Leckrate der AOX-Promotoren in Abwesenheit beider Substrate. Ist hingegen Methanol ($c_{S2M} > k_{S2ind}$) und kein Glycerol ($c_{S1M} < k_{S1rep}$) vorhanden, so werden die Promotoren P_{AOX1} mit $q_{P1/Xmax}$ und P_{AOX2} mit $q_{P2/Xmax}$ aktiviert.

10.2.1 Überexpression

Zu Beginn der Proteinexpression wird in einigen Fällen ein starker Anstieg der zellspezifischen Produktbildungsrate registriert, die nach dem Erreichen eines Maximums wieder zügig auf einen konstanten Wert abfällt, wie in Abb. 10.2 beispielhaft an der Expression des rekombinanten Chemokins 1-3del ITAC gezeigt ist [Luttmann et al., 2010].

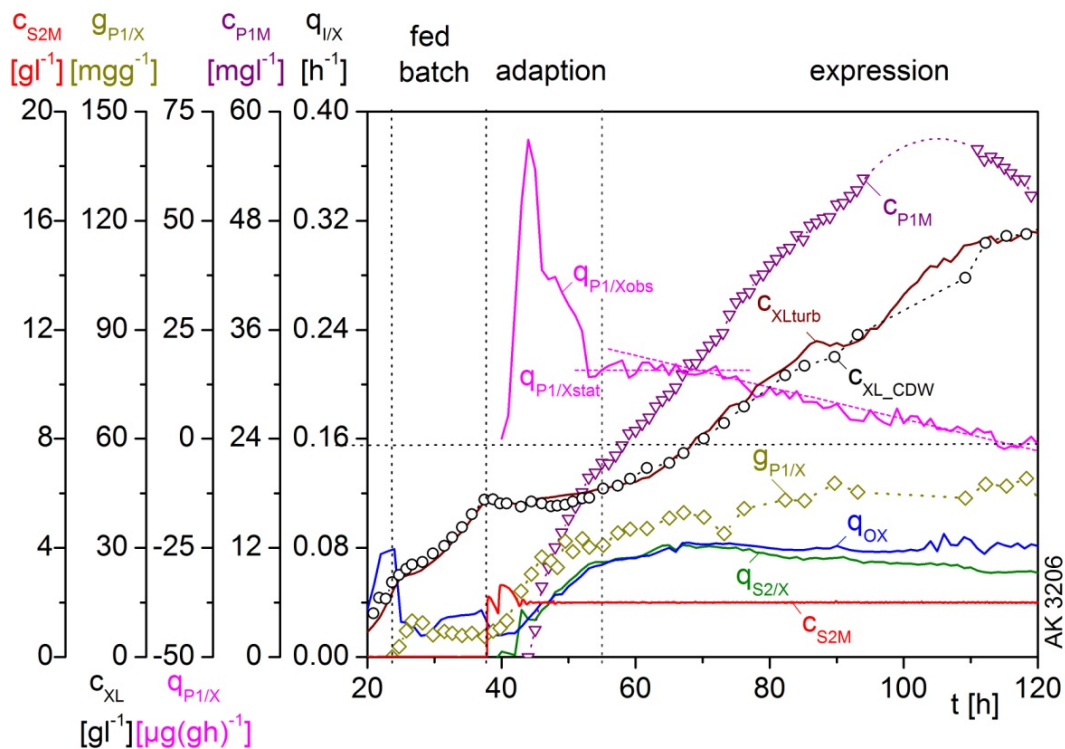


Abb. 10.2: Expressionsdynamik des 1-3del ITAC nach [Luttmann et al., 2010]

Um diese Überexpression zu beschreiben, wurde ein Regelkreis mit einer transienten Sprungantwort gewählt, der aus einem PI-Regler und einem Verzögerungssystem 1. Ordnung besteht und in Abb. 10.3 gezeigt ist.

Die Eingangsgröße der Überexpression, die Ausgangsgröße $q_{Pj/Xind}$ der Induktion, geht mit der Verstärkung K_{Pjcon} als Störgröße in den Regelkreis ein.

Der Sollwert der Überexpression $q_{Pj/Xconw}$ ist mit 0 h^{-1} vorgegeben, da die Überexpression keinen eigenen, bleibenden Beitrag zu der Gesamtproduktbildungsrate leistet.

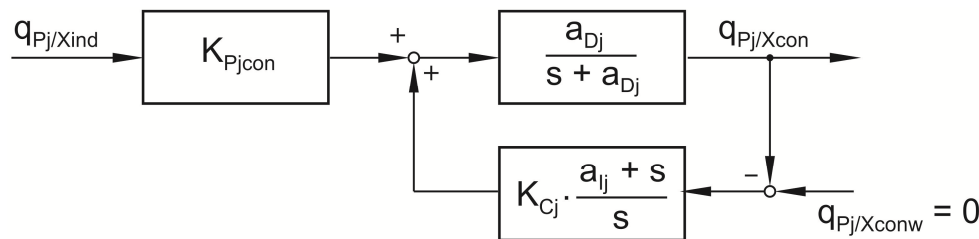


Abb. 10.3: Regelungstechnisches Ersatzschaltbild des Modells der Überexpression

Die komplexe Störübertragungsfunktion des geschlossenen Regelkreises G_{Pjcon} ,

$$G_{Pjcon}(s) = \frac{K_{Pjcon} \cdot a_{Dj} \cdot s}{s^2 + (1 + K_{Cj}) \cdot a_{Dj} \cdot s + K_{Cj} \cdot a_{Dj} \cdot a_{lj}}, \quad j = 1, 2 \quad (10.4)$$

mit

K_{Pjcon}	:= Verstärkung der Überexpression	[-]
a_{Dj}	:= Eigenwert der Überexpressionsverzögerung	[h ⁻¹]
K_{Cj}	:= Reglerverstärkung	[-]
a_{lj}	:= Inverse Integrationszeitkonstante	[h ⁻¹],

beschreibt ein differenzierendes System mit einer Verzögerung 2. Ordnung (D-T₂ System). Das dynamische Verhalten wird durch das Verhältnis von dem Eigenwert der Überexpressionsverzögerung a_{Dj} , der inversen Integrationszeitkonstanten a_{lj} sowie der Reglerverstärkung K_{Cj} bestimmt und kann in schwingender oder nicht-schwingender Form eingestellt werden [Reuter und Zacher, 2008].

10.2.2 Metabolisches Verzögerungssystem der Proteinbiosynthese

Die Proteinsynthese kann in eine Reihe von Expressionsschritten unterteilt werden:

1. Produktion von mRNA (transcription)
2. Übersetzung der mRNA in eine Aminosäuresequenz (translation)
3. Posttranslationale Modifikationen und Proteinfaltung (protein processing)
4. Anreicherung des Proteins in der Zelle (accumulation) beziehungsweise dessen Ausschleusung (secretion)

Jeder dieser Expressionsschritte wird durch die Ausgangsgröße des vorhergehenden Schrittes induziert und bildet dabei ein Verzögerungssystem erster Ordnung.

Die Transkription als Expressionsschritt 1 folgt der induzierten Eingangsgröße $q_{Pj/Xexp0}$,

$$q_{Pj/Xexp0}(t) = q_{Pj/Xind}(t) + q_{Pj/Xcon}(t), \quad (10.5)$$

die sich aus der Summe der substratgesteuerten Induktion $q_{Pj/Xind}$ und der transienten Überexpression $q_{Pj/Xcon}$ ergibt.

Die zeitliche Änderung einer an der Produktbildung beteiligten zellspezifischen Reaktionsrate $q_{Pj/Xexpk}$ im Expressionsschritt k ,

$$\dot{q}_{Pj/Xexpk}(t) = -(q_{X/X}(t) + a_{Pjexpk}) \cdot q_{Pj/Xexpk}(t) + b_{Pjexpk} \cdot q_{Pj/Xexpk-1}(t),$$

$$j = 1, 2; k = 1, 2 \quad (10.6)$$

mit

$q_{Pj/Xexpk-1} :=$ Ausgang des Expressionsschrittes $k-1$ $[h^{-1}]$

$a_{Pjexpk} :=$ Eigenwert des Turnover im Expressionsschritt k $[h^{-1}]$

$b_{Pjexpk} :=$ Eingangsverstärkung im Expressionsschritt k $[h^{-1}]$,

ist über die Eingangsverstärkung b_{Pjexpk} von der Ausgangsgröße $q_{Pjexpk-1}$ des vorherigen Expressionsschrittes und von der Gegenkopplung über den aktuellen Expressionsschritt abhängig. Dieser beschreibt über den zeitvarianten Eigenanteil $q_{X/X}$ (Zellteilung) und den zeitinvarianten Eigenwertanteil a_{Pjexpk} (component turnover) den Wiederabbau der an diesem Schritt beteiligten Expressionskomponente.

Dieser Systemansatz beschreibt daher mit zeitvarianten Verzögerungssystemen 1. Ordnung die gesamte Expressionskette.

Abb. 10.4 zeigt das entsprechende regelungstechnische Ersatzschaltbild und verdeutlicht den Einfluss der Verlustmechanismen sowie der Eingangsgröße, die mit der Verstärkung b_{Pjexpk} die Neubildung induziert.

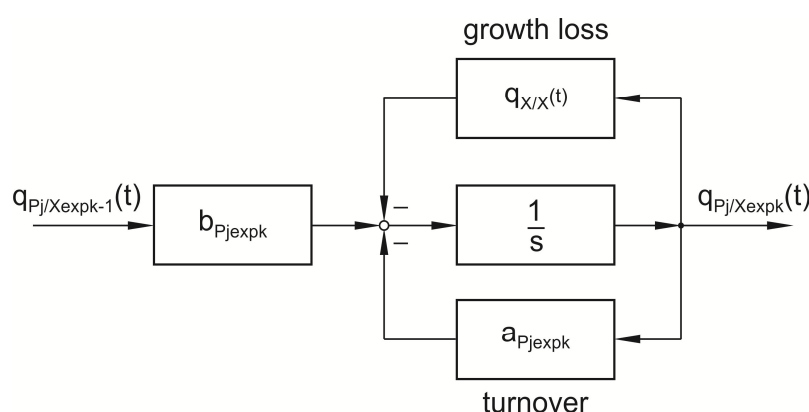


Abb. 10.4: Regelungstechnisches Ersatzschaltbild eines Expressionsschrittes $expk$

Zur Vereinfachung der Beschreibung der Expressionsdynamik ist durch die Vorgabe

$$b_{Pjexpk} = a_{Pjexpk} \quad (10.7)$$

nur ein Parameter pro Expressionsschritt vorgesehen und damit zu identifizieren.

Die auf die Prozessierung folgende Proteinsekretion und die Proteinakkumulation werden als zwei unterschiedliche und parallel ablaufende Prozesse betrachtet, wobei lediglich das Zielprodukt P_1 in den Sekretionsweg eintritt.

Daher geht die Produktbildungsrate $q_{P_1/X_{pro}}$ (protein processing) anteilig über K_{P_1rel} als Eingangsgröße in die Sekretion und über $(1-K_{P_1rel})$ in die Akkumulation ein. Bei der Sekretion findet kein Verlust der Ausgangsgröße durch Zellteilung statt.

Die zeitliche Änderung der spezifischen Produktausgangsrate $q_{P_1/X_{rel}}$ (release),

$$\dot{q}_{P_1/X_{rel}}(t) = -a_{P_1rel} \cdot q_{P_1/X_{rel}}(t) + K_{P_1rel} \cdot b_{P_1rel} \cdot q_{P_1/X_{pro}}(t) \quad (10.8)$$

mit

a_{P_1rel} := Eigenwert der Verzögerung im Ausschleusungsschritt *release* $[h^{-1}]$

b_{P_1rel} := Eingangungsverstärkung des Ausschleusungsschrittes *release* $[h^{-1}]$

K_{P_1rel} := Ausschleusungsverhältnis $[-]$,

ergibt sich in Analogie zu einem Expressionsschritt k .

Die Ausgangsgröße der Akkumulation muss als zellspezifischer Proteingehalt vorliegen, woraus sich die zeitliche Änderung des internen Produktgehaltes $g_{P_1/X}$,

$$\dot{g}_{P_1/X}(t) = -[q_{X/X}(t) + a_{P_1acc}] \cdot g_{P_1/X}(t) + (1 - K_{P_1rel}) \cdot q_{P_1/X_{pro}}(t) \quad (10.9)$$

mit

a_{P_1acc} := Eigenwertanteil des Protein Turnover im Akkumulationsschritt $[h^{-1}]$,

ergibt.

10.2.3 Produktdegradation in der Medienphase

Die im Medium beobachtbare Produktbildungsrate $q_{P_1/X_{obs}}$ des sekretierten Zielproteins,

$$q_{P_1/X_{obs}}(t) = q_{P_1/X_{rel}}(t) - q_{P_1/X_d}(t), \quad (10.10)$$

ist ungleich der Produktausgangsrate $q_{P_1/X_{rel}}$, da es zu einer Proteindegradation in der Medienphase kommen kann.

Dabei wird angenommen, dass die Produktzersetzungsrate q_{P_1/X_d} ,

$$q_{P_1/X_d}(t) = K_{P_1d} \cdot c_{XL}(t) \cdot c_{P_1M}(t) \quad (10.11)$$

mit

K_{P_1d} := Proteinzersetzungsfaktor $[l^2 g^{-2} h^{-1}]$,

sowohl von der vorherrschenden Zelldichte c_{XL} und damit von vorwiegend durch Zellyse freigesetzten Proteasen als auch von der Zielproteinkonzentration c_{P_1M} selbst als Substrat enzymatischer Reaktionen abhängig ist.

Die Beschreibung der Produktdegradation wäre für instabile Produkte wie D1M1 von äußerstem Interesse, da hier eine starke Fragmentierung auftritt (vgl. Kapitel 7.1).

Bei stabilen Zielprodukten ohne messbaren extrazellulären Abbau, wie bei der folgenden Betrachtung von D1M1H, wird durch Wahl des Proteinzersetzungsfaktors K_{P1d} zu 0 die modellierte Degradation hingegen vernachlässigt.

10.3 Erprobung des Ursprungsmodells

Das beschriebene Ursprungsmodell wurde anhand der in Kapitel 7.2 vorgestellten Kultivierung erprobt.

Zunächst erfolgte eine Simulation der Batch- und der Fed Batch-Phase auf Glycerol, in denen weder die Bildung von Zielprodukt noch von Alkoholoxidase beobachtet werden konnte.

Mit der Wahl der Induktions- und Repressionsordnung,

$$\kappa_{j2ind} = \kappa_{jirep} = 5, \quad j = 1, 2; i = 1, 2, \quad (10.12)$$

sowie der Induktions- und Repressionskonstanten,

$$k_{S2ind} = k_{Sirep} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ gl}^{-1}, \quad i = 1, 2, \quad (10.13)$$

werden steile Ein- und Ausschaltfunktionen bei geringen Substratkonzentrationen gewährleistet und die Anzahl der zu identifizierenden Parameter reduziert.

Abbildung 10.5 zeigt den Verlauf einiger Größen in den Wachstumsphasen auf Glycerol. Neben der Zelldichte c_{XL} , der Glycerolkonzentration c_{S1M} sowie der zellspezifischen Zellteilungsrate $q_{1X/X}$ und der zellspezifischen Glycerolaufnahmerate $q_{S1/X}$ ist auch der zellinterne Gehalt $g_{P2/X}$ an Alkoholoxidase dargestellt.

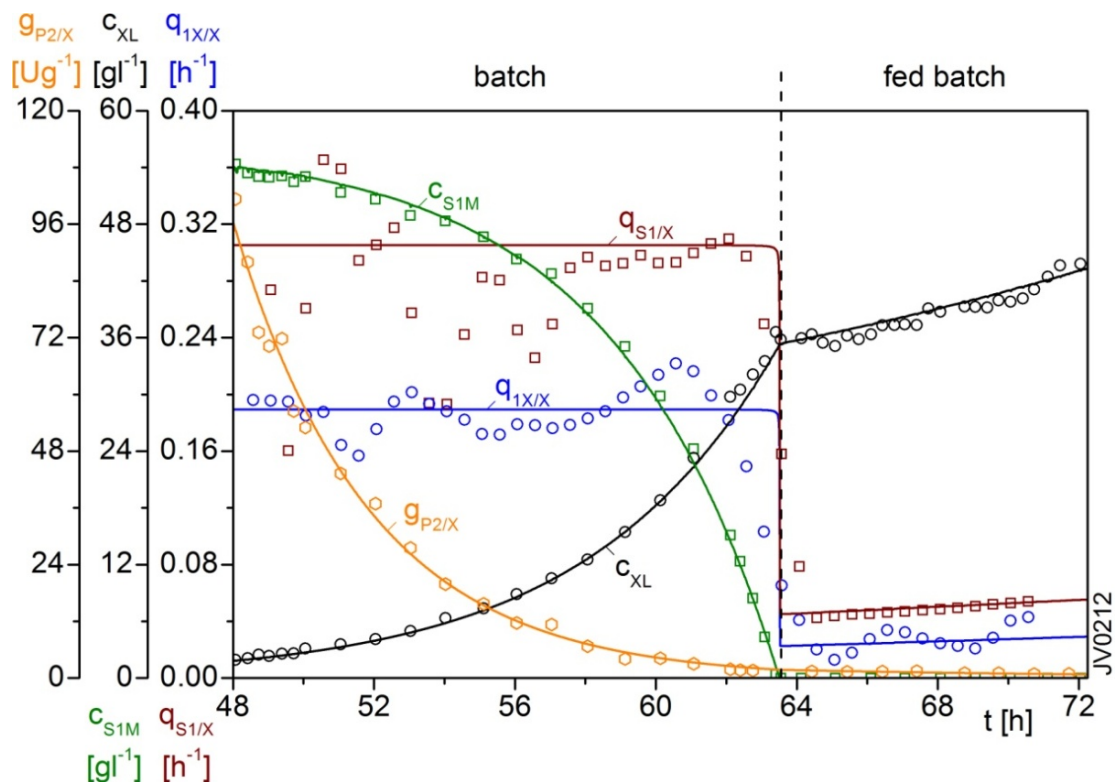


Abb. 10.5: Simulation der Glycerol-Wachstumsphasen

Für alle Größen kann eine gute Anpassung des Modells an die Originaldaten beobachtet werden.

Aufgrund des durch Glycerolrepression inaktivierten Induktionsmechanismus wird die in der vorherigen Produktionsphase gebildete Alkoholoxidase in den gezeigten Glycerol-Wachstumsphasen ausschließlich abgebaut.

Dadurch eignet sich diese Phase sehr gut zur Identifizierung des Akkumulations-Eigenwertanteils a_{P2acc} des AOX-Abbaus, der mit 0.069 h^{-1} ermittelt wurde.

Die Simulation der nachfolgenden Produktionsphase ist in Abb. 10.6 anhand der Zelldichte c_{XL} , der zellspezifischen Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$ und des zellinternen AOX-Gehaltes $g_{P2/X}$ gezeigt.

Dabei wurden die Werte der Parameter des Induktionsmechanismus aus Gln. (10.12) und (10.13) beibehalten und durch die Festlegung der Überexpressionsverstärkung K_{P2con} auf 0 zunächst vereinfachend von keiner AOX-Überexpression ausgegangen.

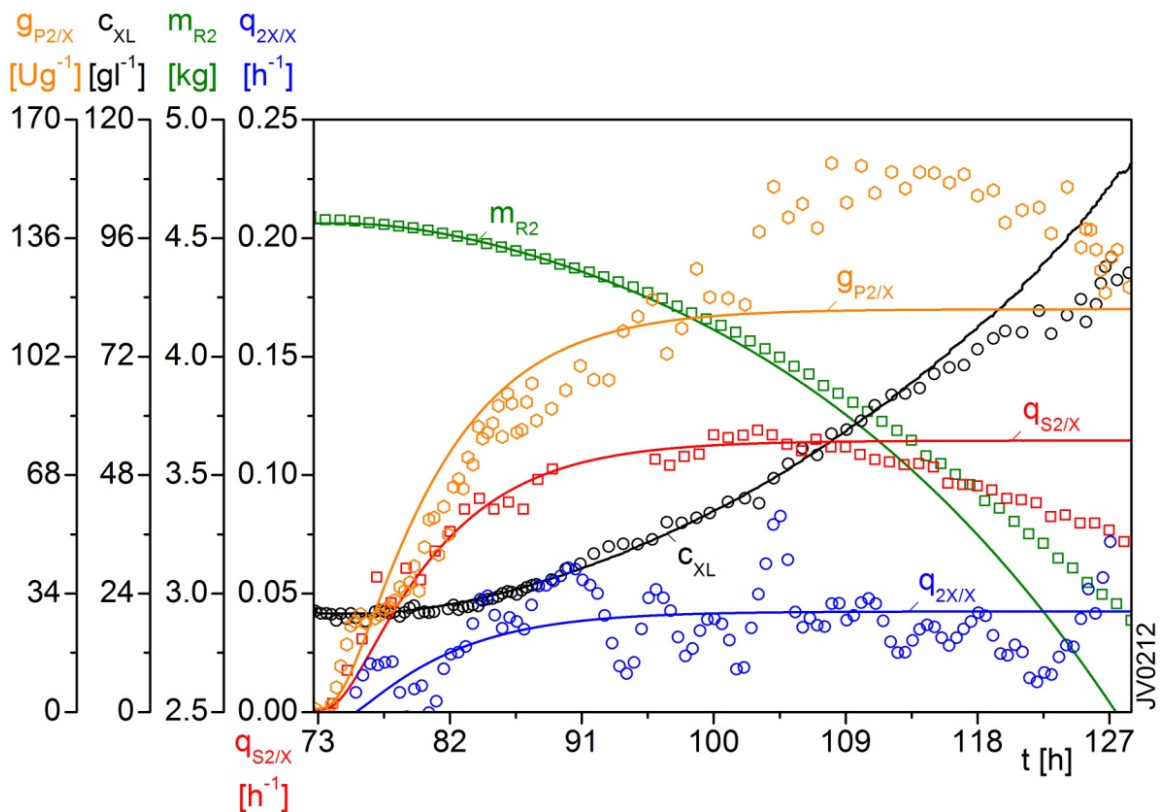


Abb. 10.6: Simulation der Produktionsphase auf Methanol

Für die zellspezifische Wachstumsrate $q_{2X/X}$ und die Masse m_{R2} des Methanolreservoirs konnte lediglich in einem begrenzten Zeitintervall bis etwa $t = 105\text{ h}$ eine Übereinstimmung mit den Originaldaten erzielt werden.

Besonders auffällig ist die große Modellabweichung aller Größen im späteren Simulationsverlauf.

Das Modell ist somit nicht geeignet, die beobachtete stufenweise Zunahme des zellinternen AOX-Gehaltes $q_{P2/X}$ und die spätere Abnahme der Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$ mit konstanter Induktion zu beschreiben.

Aus diesem Grund wurde das vorgestellte Modell zunächst derart erweitert, dass der Verlauf der AOX-Expressionsdynamik korrekt abgebildet werden konnte.

In einem zweiten Schritt wurde dann auch der Einfluss von Alkoholoxidase auf die Methanolaufnahme näher untersucht. Nach einer hinreichend genauen Darstellung des Zellstoffwechsels wurde letztendlich auch die Zielproteinexpression besser beschreibbar.

10.4 Modellerweiterungen

10.4.1 Beschreibung der AOX-Expressionsdynamik

In diesem Abschnitt wird der stufenweise Anstieg des zellinternen AOX-Gehaltes einerseits und dessen Abbau andererseits modelliert und das vorhandene Modell entsprechend erweitert.

In der Literatur wird die Genexpressionsregulation der Alkoholoxidase als sehr komplex beschrieben und es wird vermutet, dass dabei mindestens zwölf regulatorische Elemente beteiligt sind [Hartner, 2008].

Durch eine hohe AOX-Aktivität sind ebenfalls ausreichend hohe Gehalte der anderen Enzyme vonnöten, um die anfallenden zytotoxischen Stoffwechselprodukte wie Wasserstoffperoxid und Formaldehyd energetisch zu verwerten und zu entgiften (vgl. Kapitel 3.1).

Diese Enzyme unterliegen ähnlichen Regulationsmechanismen wie AOX selbst [Hartner und Glieder, 2006]. Es ist also denkbar, dass die AOX-Expression von dem Expressionsgrad dieser Stoffwechsellzyme abhängt, sodass die Zelle sich nicht selbst vergiftet.

Die Beschreibung des beobachteten Verhaltens wurde empirisch mit einer Kombination aus bereits vorhandenen und einfachen, hypothetischen Modellansätzen erprobt. Über systembiologische Modellelemente wurden bereits Mechanismen wie Feedbacksysteme oder Feedforward-Schleifen beschrieben [Kremling, 2012; Tyson, 2003].

Die erste steile Stufe im Verlauf des zellinternen AOX-Gehaltes wird über das bereits beschriebene kybernetische Modellelement der Überexpression modelliert.

Für die beiden weiteren Stufen wird eine vom AOX-Gehalt abhängige, zweistufige Mitkopplung in das Expressionsnetzwerk eingefügt.

Die Beschreibung der Abnahme des zellspezifischen AOX-Gehalts zum Ende der Produktionsphase erfolgt über das Postulat einer unbekannt Substanz P_4 , die zellintern akkumuliert wird und eine Repression der Expression von Alkoholoxidase zur Folge hat.

Das resultierende Expressionsnetzwerk ist in Abb. 10.7 dargestellt.

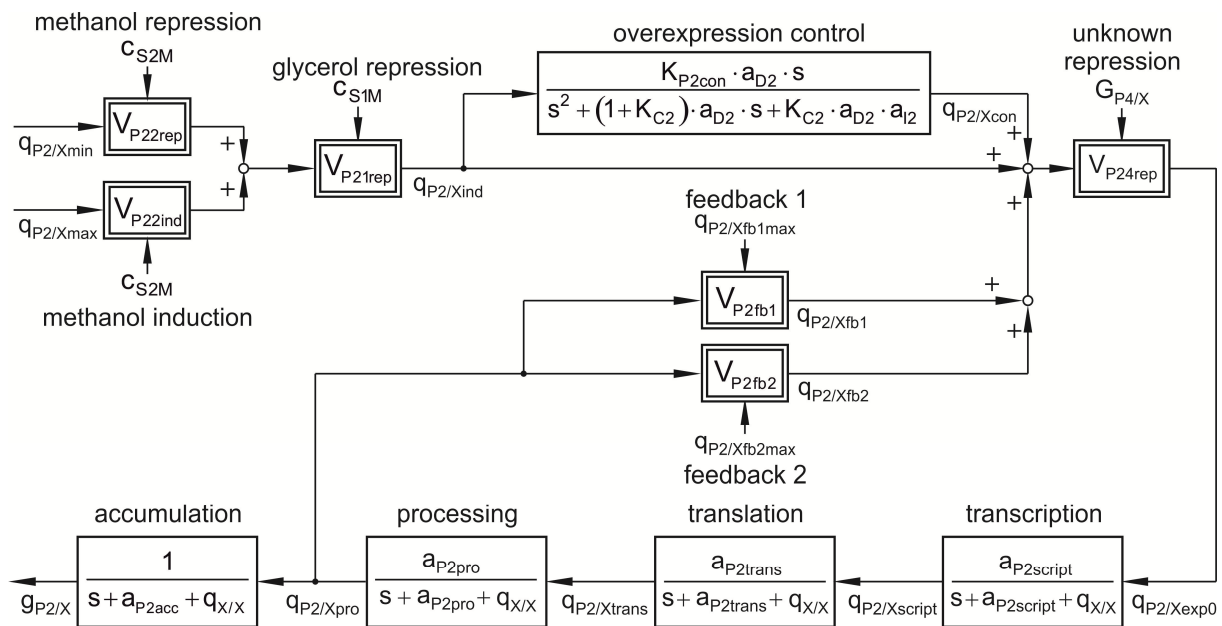


Abb. 10.7: Angepasstes Expressionsnetzwerk der Alkoholoxidase

Eine Repression der AOX-Bildung durch den Gehalt $G_{P4/X}$ von Produkt 4 geht als Verstärkungsfaktor $V_{P24rep} \in [0, 1]$,

$$V_{P24rep}(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{G_{P4/X}(t)}{K_{P4rep}} \right)^{\kappa_{24rep}}} \quad (10.14)$$

mit

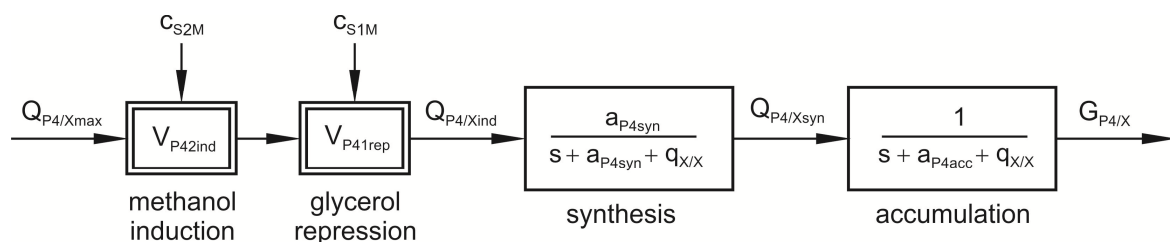
- $G_{P4/X}$:= relativer zellspezifischer Gehalt an P_4 [-]
- K_{P4rep} := Repressionskonstante von P_4 [-]
- κ_{24rep} := Repressionsordnung von P_4 während der AOX-Bildung [-],

in die Expressionskette ein. Dies wird auf der Ebene der Transkription angenommen. Da es sich bei P_4 um eine hypothetische Größe handelt, wird diese als relativer zellspezifischer Gehalt $G_{P4/X} \in [0, 1]$,

$$G_{P4/X}(t) = \frac{g_{P4/X}(t)}{g_{P4/Xmax}}, \quad (10.15)$$

definiert.

Das Expressionsnetzwerk von P_4 ist in Abb. 10.8 gezeigt.


 Abb. 10.8: Expressionsnetzwerk des hypothetischen Produktes P_4

Die zellspezifische Induktionsrate $Q_{P4/Xind}$ des Produktes P_4 ,

$$Q_{P4/Xind}(t) = V_{P42ind}(t) \cdot V_{P41rep}(t) \cdot Q_{P4/Xmax} \quad (10.16)$$

mit

$$Q_{P4/Xmax} := \text{maximale Induktionsrate von } P_4 \quad [h^{-1}],$$

wird über die Induktion V_{P42ind} durch Methanol,

$$V_{P42ind}(t) = \frac{\left(\frac{c_{S2M}(t)}{k_{S2ind}}\right)^{K_{42ind}}}{1 + \left(\frac{c_{S2M}(t)}{k_{S2ind}}\right)^{K_{42ind}}} \quad (10.17)$$

mit

$$k_{S2ind} := \text{Induktionskonstante von Methanol} \quad [gl^{-1}]$$

$$K_{42ind} := \text{Induktionsordnung von Methanol während der Bildung von } P_4 \quad [-],$$

und die Repression V_{P41rep} durch Glycerol,

$$V_{P41rep}(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{c_{S1M}(t)}{k_{S1rep}}\right)^{K_{41rep}}} \quad (10.18)$$

mit

$$k_{S1rep} := \text{Repressionskonstante von Glycerol} \quad [gl^{-1}]$$

$$K_{41rep} := \text{Repressionsordnung von Glycerol während der Bildung von } P_4 \quad [-],$$

gesteuert und hat den Maximalwert $Q_{P4/Xmax}$.

Diese nichtlinearen Terme wurden analog zu den in Kapitel 10.2 vorgestellten Mechanismen der Proteinexpression angenommen. Eine mögliche Dereprimierung des zugrundeliegenden Promotors durch einen von der Methanolkonzentration c_{S2M} abhängigen Repressionsterm wurde jedoch nicht berücksichtigt.

Die zeitliche Änderung der zellspezifischen Syntheserate $Q_{P4/Xsyn}$,

$$\dot{Q}_{P4/Xsyn}(t) = - (q_{X/X}(t) + a_{P4syn}) \cdot Q_{P4/Xsyn}(t) + a_{P4syn} \cdot Q_{P4/Xind}(t) \quad (10.19)$$

mit

$$a_{P4syn} := \text{Verstärkungsfaktor und Turnover Eigenwertanteil bei der } P_4\text{-Synthese } [h^{-1}],$$

und die Bilanz des zellinternen relativen Gehaltes $G_{P4/X}$,

$$\dot{G}_{P4/X}(t) = - (q_{X/X}(t) + a_{P4acc}) \cdot G_{P4/X}(t) + Q_{P4/Xsyn}(t) \quad (10.20)$$

mit

$$a_{P4acc} := \text{Turnover Eigenwertanteil bei der Akkumulation von } P_4 \quad [h^{-1}],$$

erfolgen in Analogie zur Expression und Akkumulation der Alkoholoxidase, wobei die Proteinbiosynthese vereinfachend zu einem Schritt zusammengefasst wird.

Im Folgenden wird eine Simulation des hinsichtlich der AOX-Expression angepassten Modells gezeigt. Dabei liegt kein Glycerol ($c_{S1M} = 0$) vor, sondern lediglich der Induktor Methanol ($c_{S2M} > k_{S2ind}$) ist anwesend.

Der Beginn der Induktionsphase ist in Abb. 10.9 gezeigt. Er ist durch die Überexpression gekennzeichnet. Neben der konstanten AOX-Induktionsrate $q_{P2/Xind}$ ist die transiente Überexpression $q_{P2/Xcon}$ und die aus beiden nach 3 Verzögerungsschritten resultierende Produktbildungsrate $q_{P2/Xpro}$ (protein processing) dargestellt. Durch deren Akkumulation entsteht der zellspezifische Gehalt an Alkoholoxidase $g_{P2/X}$, der mit experimentellen Daten hinterlegt ist.

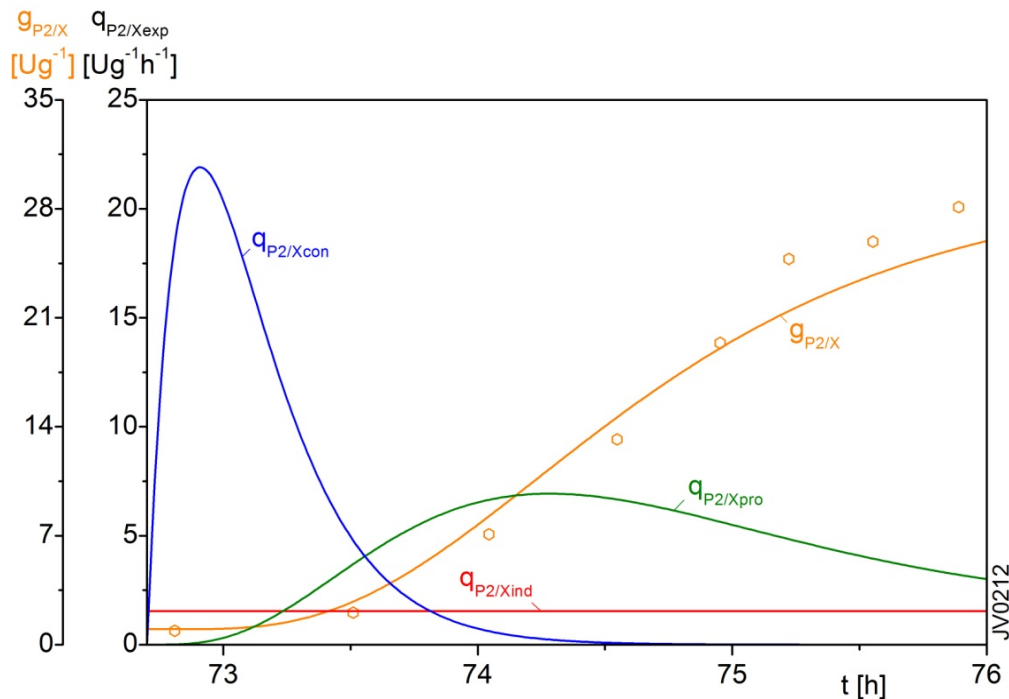


Abb. 10.9: Simulation der AOX-Überexpression

Zur Beschreibung der folgenden zwei Stufen des AOX-Gehalts wird eine doppelte Rückkopplung als eine Verschaltung zweier parallel wirkenden sehr starker Schalter eingeführt. Diese sind erneut der biologischen Reaktionskinetik entlehnt und stellen vom AOX-Gehalt abhängige Limitierungsmechanismen höherer Ordnung dar.

Sie resultieren in den durch die Mitkopplung zusätzlich auftretende Proteininduktionsraten $q_{P2/Xfbk}$,

$$q_{P2/Xfbk}(t) = \frac{\left(\frac{g_{P2/X}(t)}{k_{P2fbk}}\right)^{K_{22fbk}}}{1 + \left(\frac{g_{P2/X}(t)}{k_{P2fbk}}\right)^{K_{22fbk}}} \cdot q_{P2/Xfbkmax}, \quad k = 1, 2 \quad (10.21)$$

mit

- $q_{P2/Xfbkmax}$:= maximale AOX-Induktionsrate über Mitkopplung der Stufe k $[Ug^{-1}h^{-1}]$
- k_{P2fbk} := Induktionskonstante von P_2 in der Feedbackstufe k $[Ug^{-1}]$
- K_{22fbk} := Induktionsordnung von P_2 in der Feedbackstufe k $[-]$.

Die eigentliche Biosynthese von P_2 beginnt mit der Anregung der Expression $q_{P2/Xexp0}$,

$$q_{P2/Xexp0}(t) = V_{P24rep} \cdot (q_{P2/Xind}(t) + q_{P2/Xcon}(t) + q_{P2/Xfb1}(t) + q_{P2/Xfb2}(t)), \quad (10.22)$$

als Summe der theoretischen AOX-Bildungsraten aus der Induktion $q_{P2/Xind}$, der Überexpression $q_{P2/Xcon}$ sowie der doppelten Mitkopplung $q_{P2/Xfbk}$, die dann, wie in Abb. 10.7 gezeigt, einer Repression von P_4 unterliegt.

Über die bereits berücksichtigten Mechanismen des Turnover und des Wachstums erfolgt weiterhin der eigentliche Abbau des Enzyms AOX.

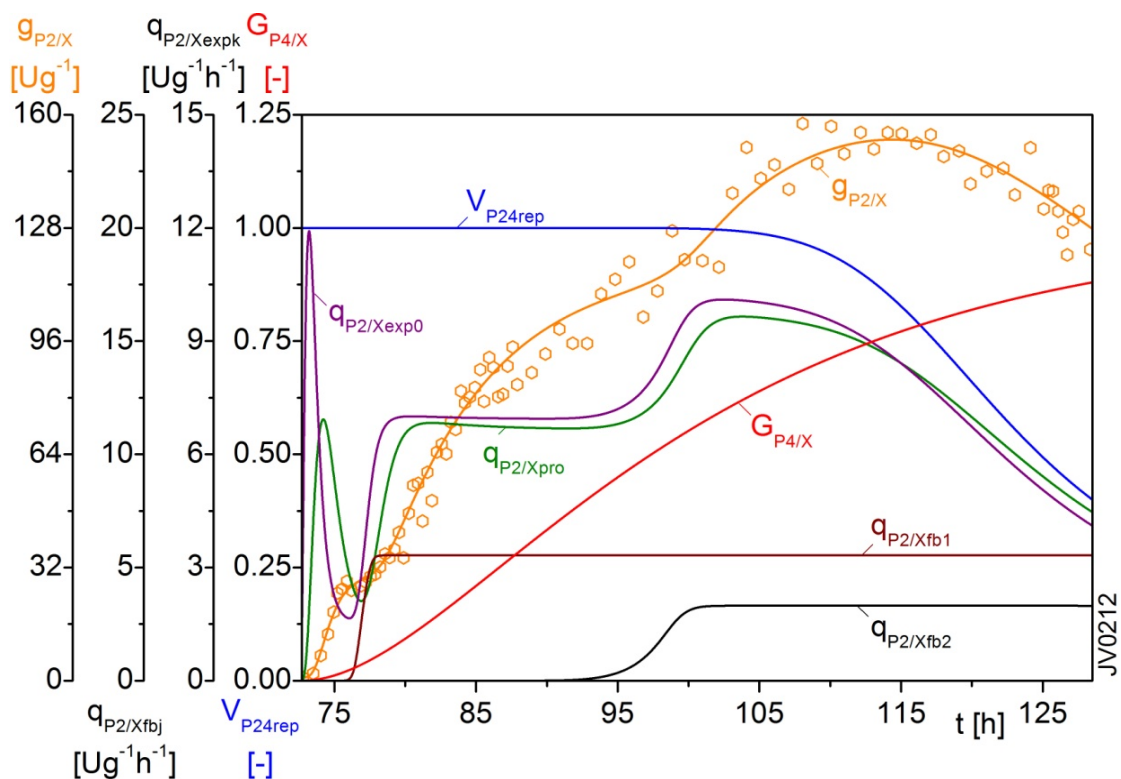


Abb. 10.10: Simulation der AOX-Expression mit dem angepassten Modell

Der gesamte Verlauf der Induktionsphase ist in Abb. 10.10 gezeigt. Aufgeführt sind die durch eine positive Rückkopplung entstehenden Induktionsanteile $q_{P2/Xfb1}$ und $q_{P2/Xfb2}$, die vom AOX-Gehalt gesteuert jeweils eine sprunghafte Veränderung aufweisen. Ebenfalls gezeigt ist der von dem relativen Gehalt $G_{P4/X}$ des hypothetischen Produktes P_4 abhängige Repressionsfaktor der AOX-Bildung V_{P24rep} .

Das Zusammenspiel der beschriebenen Mechanismen wird durch die Eingangsgröße $q_{P2/Xexp0}$ der Proteinbiosynthese verdeutlicht. Der gesamte Verlauf der AOX-Bildungsrate $q_{P2/Xpro}$ führt nach deren Akkumulation zu einer hinreichend genauen Beschreibung des zellinternen AOX-Gehaltes $g_{P2/X}$, der durch eine sehr gute Anpassung an die experimentelle Daten bestätigt wird.

Der anfängliche stufenweise Anstieg sowie der Abfall des zellinternen Gehalts an Alkoholoxidase konnte somit durch das kybernetische Modellelement der Überexpression, die doppelte Mitkopplung über $g_{P2/X}$ sowie durch die Repression der AOX-Bildung durch das hypothetische Produkt P_4 hinreichend nachgebildet werden.

In Tab. 10.1 sind die Parameter für die Simulation der P₂-Expression über das erweiterte Modell gegeben, die entweder aus experimentellen Daten ermittelt (calculated, C), über Simulation identifiziert (estimated, E) oder abgeschätzt (defined, D) wurden.

Tab. 10.1: Parameter des AOX-Metabolismus

Parameter	Wert	Parameter	Wert
a _{D2} [h ⁻¹]	2.922 (E)	k _{S1rep} [gl ⁻¹]	0.001 (D)
a _{I2} [h ⁻¹]	5.844 (E)	k _{S2ind} [gl ⁻¹]	0.001 (D)
a _{P2acc} [h ⁻¹]	0.069 (E)	k _{S2rep} [gl ⁻¹]	0.001 (D)
a _{P2script} [h ⁻¹]	149.0 (E)	q _{P2/Xfb1max} [Ug ⁻¹ h ⁻¹]	12.92 (E)
a _{P2trans} [h ⁻¹]	8.100 (E)	q _{P2/Xfb2max} [Ug ⁻¹ h ⁻¹]	6.018 (E)
a _{P2pro} [h ⁻¹]	0.853 (E)	q _{P2/Xmax} [Ug ⁻¹ h ⁻¹]	0.548 (E)
a _{P4acc} [h ⁻¹]	0.069 (D)	q _{P2/Xmin} [Ug ⁻¹ h ⁻¹]	0.000 (D)
a _{P4syn} [h ⁻¹]	0.030 (D)	Q _{P4/Xmax} [h ⁻¹]	0.247 (E)
K _{C2} [-]	0.172 (E)	κ _{22fbk} , k = 1, 2 [-]	50.00 (D)
K _{P24rep} [-]	0.269 (E)	κ _{24rep} [-]	20.00 (D)
K _{P2con} [-]	61.53 (E)	κ _{22ind} [-]	5.000 (D)
k _{P2fb1} [Ug ⁻¹]	28.93 (E)	κ _{2krep} , k = 1, 2 [-]	5.000 (D)
k _{P2fb2} [Ug ⁻¹]	110.6 (E)		

mit

a _{D2}	:= Eigenwert der AOX-Überexpressionsverzögerung	[h ⁻¹]
a _{I2}	:= Inverse Integrationszeitkonstante der AOX-Überexpression	[h ⁻¹]
a _{P2exp}	:= Eigenwert der Verzögerung im AOX-Expressionsschritt exp	[h ⁻¹]
a _{P4acc}	:= Turnover Eigenwertanteil bei der Akkumulation von P ₄	[h ⁻¹]
a _{P4syn}	:= Turnover Eigenwertanteil bei der Synthese von P ₄	[h ⁻¹]
K _{C2}	:= Reglerverstärkung der AOX-Überexpression	[-]
K _{P24rep}	:= Repressionskonstante durch P ₄ während der AOX-Bildung	[-]
K _{P2con}	:= Verstärkung der AOX-Überexpression	[-]
k _{P2fbk}	:= Induktionskonstante der Feedbackstufe k, k = 1, 2	[Ug ⁻¹]
k _{Sirep}	:= Repressionskonstante von S _i	[gl ⁻¹]
k _{S2ind}	:= Methanolinduktionskonstante	[gl ⁻¹]
q _{P2/Xfbkmax}	:= maximaler AOX-Induktionsanteil über Mitkopplung in Stufe k	[Ug ⁻¹ h ⁻¹]
q _{P2/Xmax}	:= maximale stationäre AOX-Induktionsrate	[Ug ⁻¹ h ⁻¹]
q _{P2/Xmin}	:= minimale stationäre AOX-Induktionsrate	[Ug ⁻¹ h ⁻¹]
Q _{P4/Xmax}	:= maximale stationäre Induktionsrate von P ₄	[h ⁻¹]
κ _{22fbk}	:= Induktionsordnung der Feedbackstufe k, k = 1, 2	[-]
κ _{24rep}	:= Repressionsordnung von Produkt P ₄ während der AOX-Bildung	[-]
κ _{22ind}	:= Induktionsordnung von Methanol während der AOX-Bildung	[-]
κ _{2irep}	:= Repressionsordnung von S _i während der AOX-Bildung, i = 1, 2	[-]

10.4.2 Modellierung der Methanolaufnahme

Bei dem Ausgangsmodell wurde davon ausgegangen, dass die beobachtbare zellspezifische Methanolaufnahmerate direkt proportional zum zellinternen Gehalt an AOX ist und damit einen entsprechenden Verlauf aufweisen würde.

Dies wurde mit den vorliegenden experimentellen Daten nicht bestätigt. Es scheint, dass die durch den zellinternen AOX-Gehalt gesteuerte Methanolaufnahmerate durch bisher unberücksichtigte Mechanismen inhibiert wird.

Daher wurde das Ausgangsmodell dahingehend erweitert, dass die Diffusion des Methanols in die Zelle Berücksichtigung fand. Dies ist für eine Betrachtung der zellinternen Umsetzung des Methanols notwendig und erfordert somit eine Bilanzierung des zellinternen Methanolgehaltes.

Das sich ergebene Netzwerk der Methanolaufnahme und der Methanolumsetzung ist in Abb. 10.11 gezeigt.

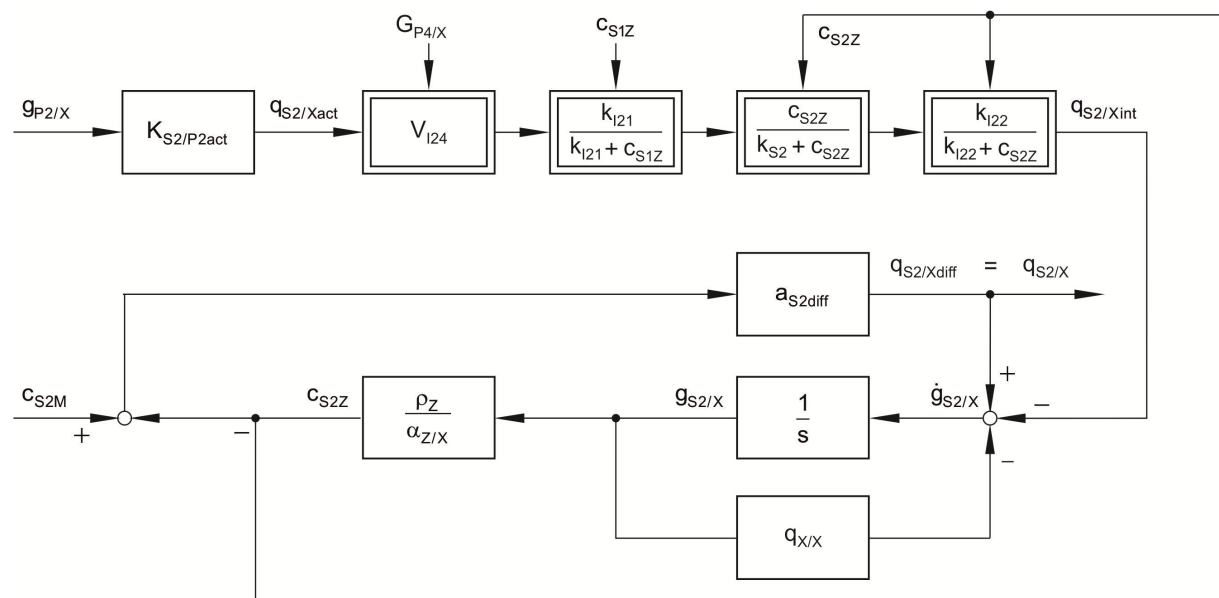


Abb. 10.11: Regelungstechnisches Blockschaltbild der Methanolaufnahme

Die potentielle zellspezifische Methanolumsetzungsrate $q_{S2/Xact}$,

$$q_{S2/Xact}(t) = K_{S2/P2act} \cdot g_{P2/X}(t) \quad (10.23)$$

mit

$$K_{S2/P2act} := \text{Verhältnis von Methanolumsetzung und AOX-Gehalt} \quad [gU^{-1}h^{-1}]$$

$$g_{P2/X} := \text{zellspezifischer AOX-Gehalt} \quad [Ug^{-1}],$$

wird als proportional zum zellinternen AOX-Gehalt $g_{P2/X}$ postuliert.

Aufgrund der Stöchiometrie der zugrundeliegenden, gekoppelten Nachweisreaktion (siehe Kapitel 4.4) entspricht dieser wiederum der zellspezifischen Methanolumsetzungsrate. Mit dem Proportionalitätsfaktor $K_{S2/P2act}$, der zu $1.923 \cdot 10^{-3} gU^{-1}h^{-1}$ berechnet wurde, erfolgt die Umrechnung der stoffmengenbezogenen AOX-Aktivität in die massenbezogene Methanolumsetzungsrate.

Die tatsächlich wirkende, zellspezifische Methanolaufnahmerate $q_{S2/Xint}$,

$$q_{S2/Xint}(t) = V_{IS24}(t) \cdot \frac{c_{S2Z}(t)}{k_{S2} + c_{S2Z}(t)} \cdot \frac{k_{I22}(t)}{k_{I22} + c_{S2Z}(t)} \cdot \frac{k_{I21}(t)}{k_{I21} + c_{S1Z}(t)} \cdot q_{S2/Xact}(t) \quad (10.24)$$

mit

c_{S2Z}	:= Methanolkonzentration in der Biofeuchtphase	$[g\ l^{-1}]$
c_{S1Z}	:= Glycerolkonzentration in der Biofeuchtphase	$[g\ l^{-1}]$
k_{S2}	:= Methanol-Limitierungskonstante	$[g\ l^{-1}]$
k_{I21}	:= Methanol-Inhibierungskonstante durch Glycerol	$[g\ l^{-1}]$
k_{I22}	:= Methanol-Inhibierungskonstante durch Methanol	$[g\ l^{-1}]$,

wird zunächst in einer Inhibierung durch das hypothetische zellinterne Produkt P_4 ,

$$V_{I24}(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{G_{P4/X}(t)}{K_{I24}} \right)^{K_{I24}}} \quad (10.25)$$

mit

K_{I24}	:= Inhibierungskonstante von P_4 bei der Methanolumsetzung	$[-]$
K_{I24}	:= Inhibierungsordnung von P_4 bei der Methanolumsetzung	$[-]$,

analog zu der in Kapitel 10.4.1 vorgestellten Repression der AOX-Bildung mit einem Inhibierungsfaktor $V_{I24} \in [0, 1]$ beaufschlagt.

Weiterhin wird sie über Limitierungs- und Inhibierungsterme durch beide Substratkonzentrationen c_{SiZ} in der Biofeuchtphase,

$$c_{SiZ}(t) = \frac{\rho_Z}{\alpha_{Z/X}} \cdot g_{Si/X}(t), \quad i = 1,2, \quad (10.26)$$

die wiederum in Abhängigkeit zu den zellspezifischen Substratgehalten $g_{Si/X}$ stehen, gesteuert. Methanol wirkt dabei sowohl limitierend als auch inhibierend, während Glycerol die Methanolumsetzung nur inhibiert. Die Modellierung der Substratdiffusion wird im Weiteren auf Methanol beschränkt, da in der betrachteten Produktionsphase kein Glycerol zugefüttert wird.

Die Änderung des zellinternen Methanolgehaltes $g_{S2/X}$,

$$\dot{g}_{S2/X}(t) = q_{S2/Xdiff}(t) - q_{S2/Xint}(t) - q_{X/X}(t) \cdot g_{S2/X}(t), \quad (10.27)$$

wird durch die in die Zellen eindiffundierende Rate $q_{S2/Xdiff}$, die zellintern umgesetzte Rate $q_{S2/Xint}$ und die möglichen Verluste durch eine Zellteilung bestimmt.

Die treibende Kraft der zellspezifischen Methanoldiffusionsrate $q_{S2/Xdiff}$,

$$q_{S2/Xdiff}(t) = a_{S2/Xdiff} \cdot (c_{S2M}(t) - c_{S2Z}(t)), \quad (10.28)$$

mit

a_{S2diff}	:= Methanoldiffusionskoeffizient der Zelle	$[l\ g^{-1}\ h^{-1}]$,
--------------	--	-------------------------

ist die Differenz zwischen der Methanolkonzentration c_{S2M} im Medium und der Methanolkonzentration c_{S2Z} in der Biofeuchtphase.

Die Triebkraft und der Methanoldiffusionskoeffizient a_{S2diff} bestimmen somit die zellextern beobachtbare zellspezifische Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$,

$$q_{S2/X}(t) = a_{S2/Xdiff}(t), \quad (10.29)$$

die der möglichen Diffusionsrate $q_{S2/Xdiff}$ entspricht.

Die Parameter der Simulation der Methanolaufnahme sind in Tab. 10.2 gegeben.

Tab. 10.2: Parameter der Methanolaufnahme

Parameter	Wert	Parameter	Wert
a_{S2diff} [$l \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$]	0.123 (E)	$K_{S2/P2act}$ [$gU^{-1} \cdot h^{-1}$]	$1.923 \cdot 10^{-3}$ (E)
k_{I22} [$g \cdot l^{-1}$]	75.12 (E)	$\alpha_{Z/X}$ [-]	3.700 (C)
K_{I24} [-]	0.262 (E)	κ_{I24} [-]	5.000 (D)
k_{S2} [$g \cdot l^{-1}$]	0.148 (E)	ρ_Z [$g \cdot l^{-1}$]	1149 (C)

Die Simulation der Methanolaufnahme mit dem erweiterten Modell zeigt Abb. 10.12. Die sinkende Methanolkonzentration c_{S2Z} der Biofeuchtphase limitiert dabei die Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$, die im späteren Verlauf des Prozesses auch noch durch das hypothetische Produkt 4 inhibiert wird.

Dies wird durch die Verstärkung V_{I24} in Abhängigkeit vom relativen Gehalt $G_{P4/X}$ beschrieben. Die potentielle Methanolumsatzrate $q_{S2/Xact}$ ist proportional zum zellinternen AOX-Gehalt $g_{P2/X}$.

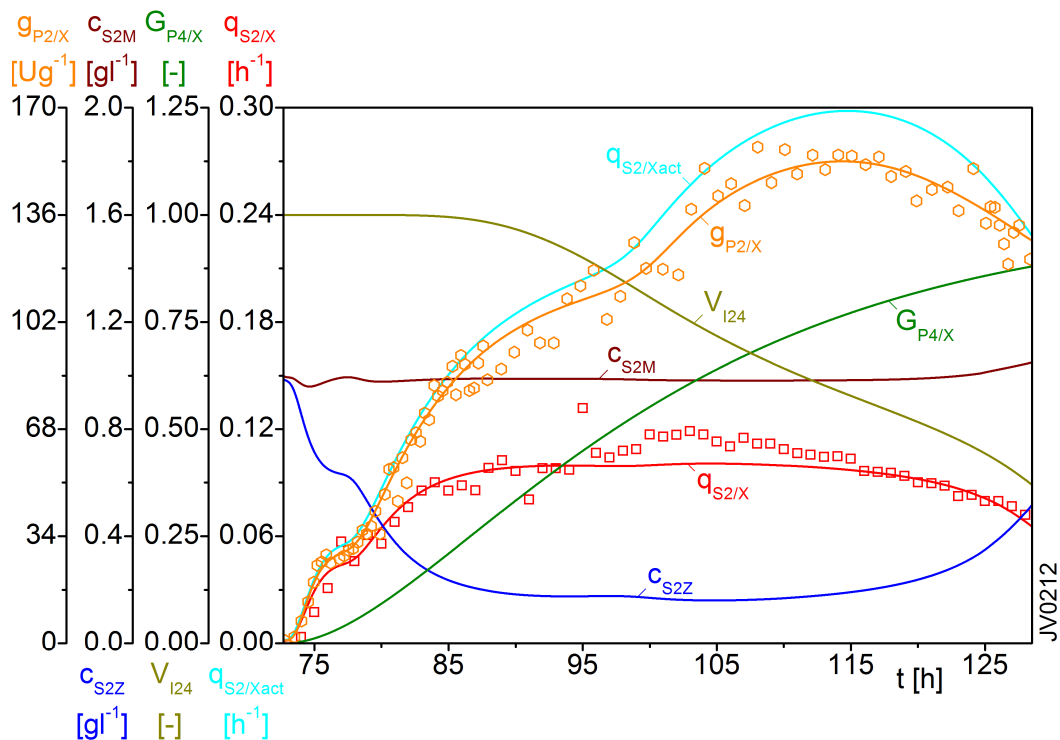


Abb. 10.12: Simulation der Methanolaufnahme mit dem angepassten Modell

Das angepasste AOX-Modell weist hinsichtlich des Zellstoffwechsels eine gute Anpassung an die experimentellen Daten der zellspezifischen Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$ auf und wird daher auch als Grundlage für die Beschreibung der Expression des Zielproteins verwendet.

10.4.3 Die Simulation der Zielproteinexpression

Zur Simulation der Zielproduktexpression wird das Netzwerk der Zielproteinbildung auf das beobachtbare Sekretionsverhalten des D1M1H-Stammes hin modifiziert. Das finale Expressionsnetzwerk ist in Abb. 10.13 gezeigt.

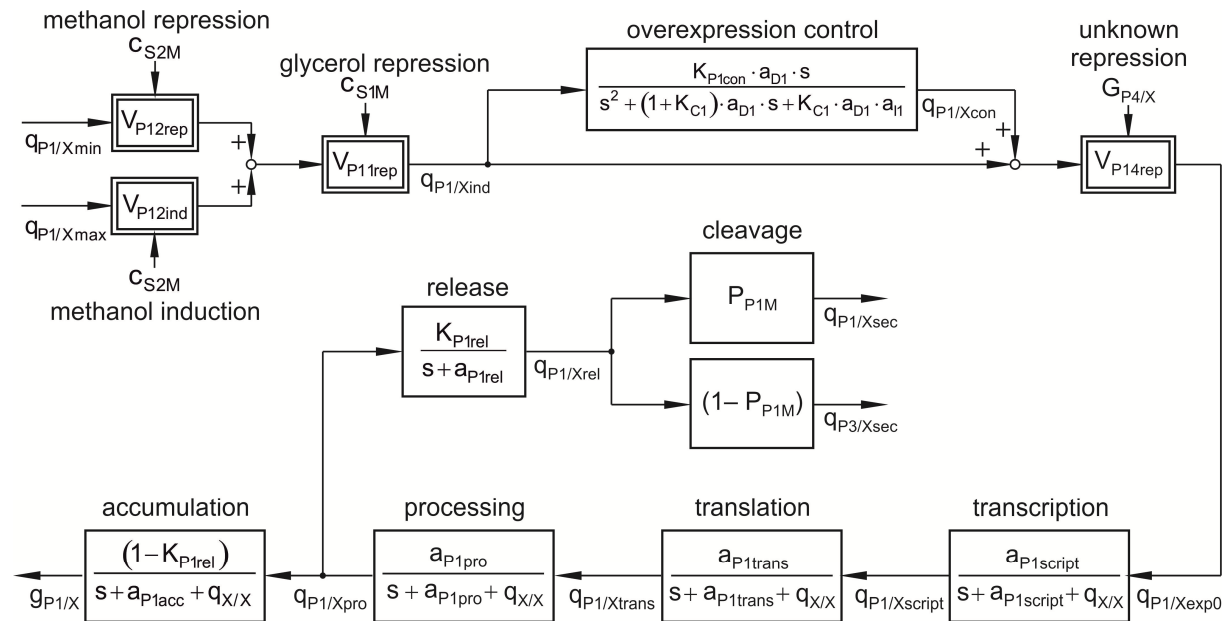


Abb. 10.13: Erweitertes Expressionsnetzwerk der Zielproteinbildung

Bei der Ausschleusung des Zielproteins wird die Entstehung der beiden Produkte P_1 und P_3 berücksichtigt. Da ihr Verhältnis im Verlauf der Produktionsphase nahezu konstant bleibt, wird in der Modellierung von einem konstanten Ausschleusungsverhältnis $y_{P3/P1}$ der beiden Zielproteinfraktionen ausgegangen (vgl. Kapitel 7.2).

Das D1M1H-Expressionsnetzwerk berücksichtigt analog zur AOX-Bildung ebenfalls eine Repression der Produktbildung durch das hypothetische Produkt 4, wodurch die Eingangsgröße $q_{P1/Xexp0}$ der Transkription,

$$q_{Pj/Xexp0}(t) = V_{P14rep} \cdot (q_{Pj/Xind}(t) + q_{Pj/Xcon}(t)), \quad (10.30)$$

über den Repressionsfaktor V_{P14} der unbekanntenen Repression durch P_4 unterliegt.

Dieser verursacht die Abnahme der Produktbildung im späteren Prozessverlauf.

Da vornehmlich nur zwei Produkte ausgeschleust werden, bestimmt ihr Verhältnis $y_{P3/P1}$ die Reinheit P_{P1M} ,

$$P_{P1M} = \frac{1}{1 + y_{P3/P1}}, \quad (10.31)$$

und darüber auch die Sekretionsrate $q_{P1/Xsec}$,

$$q_{P1/Xsec} = P_{P1M} \cdot q_{P1/Xrel}(t), \quad (10.32)$$

des Zielproduktes P_1 .

Die Sekretionsrate $q_{P3/Xsec}$ des Nebenproduktes P_3 ,

$$q_{P3/Xsec}(t) = q_{P1/Xrel}(t) - q_{P1/Xsec}(t) = (1 - P_{P1M}) \cdot q_{P1/Xrel}(t), \quad (10.33)$$

wird aufgrund der hohen Proteinreinheit als die Differenz der Ausschleusungsrate $q_{P1/Xrel}$ des gesamten Zielproteins und der Sekretionsrate $q_{P1/Xsec}$ von P_1 angenommen.

Da keine Überexpression beobachtet werden konnte, wurde die Eingangsverstärkung K_{P1con} der Überexpressionsregelung mit 0 festgelegt.

Die Simulation der Zielproteinexpression ist in Abb. 10.14 gezeigt.

Der Faktor der unbekanntenen Repression V_{P14rep} der Zielproteinbildung ist von dem relativen Gehalt $G_{P4/X}$ der hypothetischen Substanz 4 abhängig.

Dessen Einfluss auf den Eingang der Proteinbiosynthese $q_{P1/Xexp0}$ wirkt sich mehrfach verzögert auf die Proteinausschleusung $q_{P1/Xrel}$ und die Akkumulation $q_{P1/Xacc}$ aus.

Dabei wird ab $t = 105$ h mit einer negativen Akkumulationsrate $q_{P1/Xacc}$ sogar mehr intrazelluläres Zielprotein abgebaut als angehäuft.

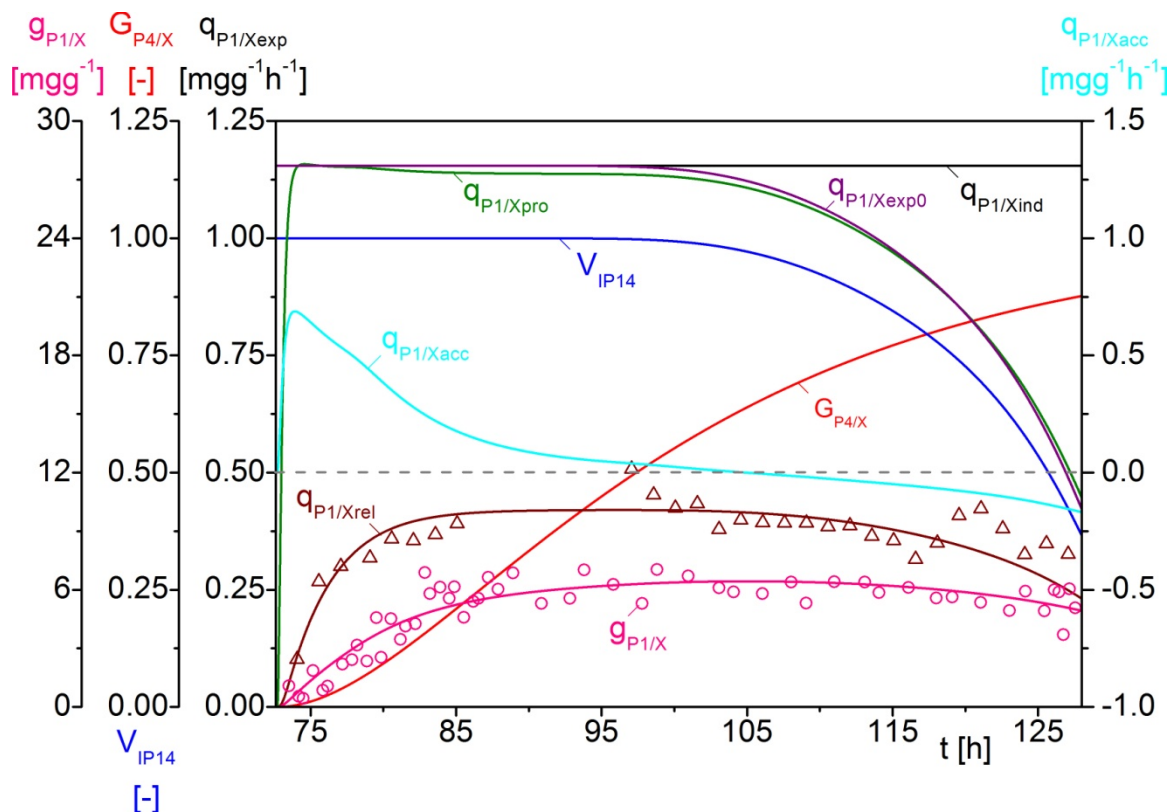


Abb. 10.14: Simulation der erweiterten Zielproteinexpression

Ebenfalls aufgeführt ist der zellspezifische Zielproteingehalt $g_{P1/X}$, dessen Verlauf mit einem anfänglichem steilen Anstieg, einem Plateau und schließlich einem leichten Rückgang durch das erweiterte Modell gut beschrieben wird.

Maßgeblich für den intrazellulären Produktgehalt ist der identifizierte Ausschleusungsanteil K_{P1rel} von 37 %, dessen Differenz zu 1 das restliche gebildete Zielprodukt akkumulieren lässt.

Einen erstaunlich vergleichbaren Ausschleusungsanteil von 35 % (q_{sec}) und entsprechende Verluste durch zellinterne Wiederverwertung und Wachstum von 65 % ($q_{Deg} + q_{Dil}$) beschreiben [Pfeffer et al., 2011] bei einer substratlimitierten Chemostatproduktion mit *Pichia pastoris* X-33.

Die Produktion des Malariavakzinkandidaten D1M1H ist somit entschieden durch die Kapazität der intrazellulären Proteinfaltung und/oder der Sekretion begrenzt, wie bereits in Kapitel 9.2 diskutiert wurde.

Die Simulation der Aufteilung des Zielproduktes ist in Abb. 10.15 anhand der beiden Sekretionsraten $q_{P1/Xsec}$ und $q_{P3/Xsec}$ sowie der Konzentrationen c_{P1M} und c_{P3M} der entsprechenden Proteine im Medium gezeigt.

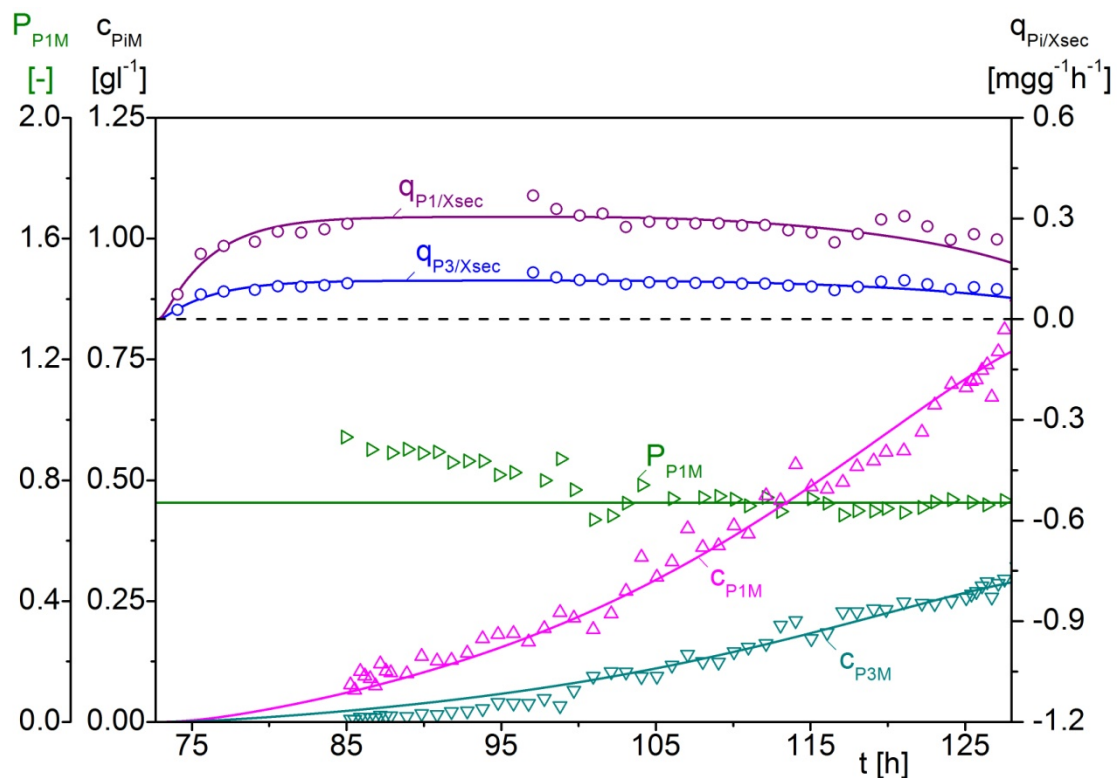


Abb. 10.15: Simulation der Aufspaltung des Zielproteins und dessen Akkumulation

Die Annahme eines konstanten Ausschleusungsverhältnisses bzw. einer konstanten Reinheit P_{P1M} des Zielproteins wird durch die gute Modellanpassung bestätigt.

Die Parameter der Zielproteinexpression sind in Tab. 10.3 gegeben.

Tab. 10.3: Parameter der Zielproteinexpression

Parameter		Wert		Parameter		Wert	
a_{D1}	$[h^{-1}]$	-		k_{S1rep}	$[gl^{-1}]$	0.001	(D)
a_{I1}	$[h^{-1}]$	-		k_{S2ind}	$[gl^{-1}]$	0.001	(D)
a_{P1acc}	$[h^{-1}]$	0.069	(D)	k_{S2rep}	$[gl^{-1}]$	0.001	(D)
$a_{P1script}$	$[h^{-1}]$	149.0	(D)	K_{P1rel}	[-]	0.370	(E)
$a_{P1trans}$	$[h^{-1}]$	6.448	(E)	P_{P1M}	[-]	0.726	(E)
a_{P1pro}	$[h^{-1}]$	4.371	(E)	$q_{P1/Xmax}$	$[h^{-1}]$	$1.155 \cdot 10^{-3}$	(E)
a_{P1rel}	$[h^{-1}]$	0.301	(E)	$q_{P1/Xmin}$	$[h^{-1}]$	0.000	(D)
K_{C1}	[-]	-		K_{14rep}	[-]	15.00	(D)
K_{P1con}	[-]	0.000	(D)	K_{12ind}	[-]	5.000	(D)
K_{P14rep}	[-]	0.274	(E)	$K_{1irep}, i = 1, 2$	[-]	5.000	(D)

mit

a_{D1}	:= Eigenwert der P_1 -Überexpressionsverzögerung	$[h^{-1}]$
a_{I1}	:= Inverse Integrationszeitkonstante der P_1 -Überexpression	$[h^{-1}]$
a_{P1k}	:= Eigenwert der Verzögerung im P_1 -Expressionsschritt k	$[h^{-1}]$
K_{C1}	:= Reglerverstärkung der P_1 -Überexpression	[-]
K_{P1con}	:= Verstärkung der P_1 -Überexpression	[-]
K_{P14rep}	:= Repressionskonstante von P_4 während der Bildung von P_1	[-]
k_{S1rep}	:= Glycerolrepressionskonstante	$[gl^{-1}]$
k_{S2ind}	:= Methanolinduktionskonstante	$[gl^{-1}]$
k_{S2rep}	:= Methanolrepressionskonstante	$[gl^{-1}]$
K_{P1rel}	:= Ausschleusungsanteil von P_1	[-]
P_{P1M}	:= Reinheit von P_1 im Medium	[-]
$q_{P1/Xmax}$:= maximale stationäre P_1 -Induktionsrate	$[h^{-1}]$
$q_{P1/Xmin}$:= minimale stationäre P_1 -Induktionsrate	$[h^{-1}]$
K_{14rep}	:= Repressionsordnung von P_4 während der Bildung von P_1	[-]
K_{12ind}	:= Induktionsordnung von Methanol während der Bildung von P_1	[-]
K_{1irep}	:= Repressionsordnung von S_i während der Bildung von P_1 , $i = 1, 2$	[-]

Die verwendeten kybernetischen Modelle lassen eine sehr gute Beschreibung und Analyse des dynamischen zellinternen und zellexternen Prozessverlaufes zu.

Durch die hypothetischen Modellansätze konnten Hinweise zum Verständnis der komplexen Proteinexpression gewonnen werden. Die vorliegende Arbeit liefert damit einen wertvollen Beitrag zur systembiologischen Analyse der Expressionsdynamik rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*.

11 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression potentieller Malariavakzine in Bioreaktorkultivierungen mit der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* analysiert und charakterisiert. Zielführend wurde eine zyklische Prozessführungsstrategie entwickelt, die zur Optimierung der Herstellung von D1M1H eingesetzt sowie auf dynamische zellinterne Expressionsvorgänge der sequentiellen Produktion hin untersucht wurde.

Die Zielproteine D1M1 und D1M1H sind Bestandteile eines vielversprechenden Multikomponentenvakzins gegen Malaria, die eine Fusion von *Diversity Covering* Proteinen (D1, D2, D3) des *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (PfAMA1) und modifizierten Varianten (M1, M2) der C-terminalen Region des Merozoite Surface Protein 1 (MSP1₁₉) beinhalten [Faber et al., 2013].

Für die Forschungsarbeiten standen hochinstrumentierte Laborbioreaktoren zur Verfügung, die vollautomatische Abläufe mehrstufiger Produktionsprozesse erlaubten. Neben einer umfangreichen Offline-Analyse des extrazellulären Zielproteins sowie der intrazellulären Alkoholoxidase- und Produktgehalte wurde für eine Online-Detektion der Zielproteine eine Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) in einer HPLC-Anlage angewendet. Dabei wurden verschiedene Elutionsmethoden sowie Möglichkeiten der Kalibrierung der IMAC betrachtet, die abhängig von Produkt- und Proteinzusammensetzung der Kulturbrühe sind.

Es wurden zunächst zwei exemplarische Kultivierungen zur Produktion der Impfstoffkandidaten reaktionskinetisch charakterisiert und in Hinblick auf die proteolytische Spaltung der Zielprodukte als kritische Qualitätsmerkmale untersucht. Der rekonstruierte Impfstoffkandidat D1M1H zeichnet sich dabei durch eine höhere Stabilität und Reinheit gegenüber D1M1 aus.

Für das sensitive D1M1 ist daher eine kurze Produktionsphase und eine schnelle *In situ*-Abtrennung zweckmäßig. Zur Verlängerung des Gesamtproduktionsprozesses wurde ein Repeated Fed Batch (RFB) Prinzip etabliert, das aus einer alternierenden Fed Batch Zellanzucht auf Glycerol und Produktion auf Methanol besteht. Der Übergang der Zyklen erfolgte dabei automatisiert über eine Teilernte und einen Medienrefresh. Die erreichte Reproduzierbarkeit indiziert stabile Produktionskonditionen und eröffnet somit ein hohes Potential zur Entwicklung und Optimierung von Integrierten Bioprozessen.

Zur zyklischen Herstellung und vorgesehenen Optimierung der Produktion von D1M1H wurde eine weitere RFB-Strategie entwickelt. Für eine Regeneration sowie vollständigen Deletion des Methanolmetabolismus der vorangehenden Produktionsphase wurde eine unlimitierte Glycerol Batch Phase dem Fed Batch vorangestellt. Mit einer folgenden Teilernte und Verdünnung konnten so stets gleiche Anfangsbedingungen der sich anschließenden Methanol Fed Batch Produktionsphase gewährleistet werden.

Die Methode des Design of Experiments (DoE) wurde zum einen zur Maximierung der Produktivität PRD und der Produktreinheit P_{P1M} innerhalb der zyklischen Produktion von D1M1H und zum anderen zur Charakterisierung des Methanolmetabolismus über zellspezifische Reaktionsparameter auf den Einfluss der Flüssigphasentemperatur ϑ_L und des pH-Wertes untersucht. Dabei wurde eine Optimierung über DoE durch sukzessive Produktionszyklen in einem Reaktor durchgeführt.

Die volumetrische Produktivität PRD sowie die durch die Produktreinheit gewichtete Produktivität stehen unter einem signifikanten Einfluss der untersuchten Faktoren und die resultierenden quadratischen Regressionsmodelle gleichen sich in Hinblick auf ihre Verläufe sowie die optimalen Arbeitspunkte pH_{opt} von 6.05 ± 0.05 und ϑ_{Lopt} von $21.8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die systematische Analyse der Produktreinheit P_{P1M} ermöglichte eine Charakterisierung der Stabilität des Zielproduktes in der Medienphase, wobei die Flüssigphasentemperatur ϑ_L im untersuchten Bereich keinen signifikanten Einfluss aufwies. Eine maximale Reinheit wird bei einem pH-Wert von 5.9 erhalten.

Für die zellspezifischen Stoffwechselfparameter auf Methanol, für das Wachstum $q_{2X/Xmax}$, die Sauerstoffaufnahme $q_{2O/Xmax}$ und die Methanolaufnahme $q_{S2/Xmax}$ konnten statistisch abgesicherte quadratische Modelle erstellt werden, die einen ähnlichen Verlauf und übereinstimmende Optima mit pH_{opt} von 5.55 ± 0.05 und ϑ_{Lopt} von $24.1 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ aufwiesen. Das Maximum der mittleren zellspezifischen Produktbildung $\bar{q}_{P1/X}$ liegt bei einer Flüssigphasentemperatur ϑ_L von $21.8 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von 6.00 und stimmt somit mit den optimalen Faktoreinstellungen der volumetrischen Produktivität PRD überein.

Die erhobene intensive experimentelle Analyse eines sequentiell geführten Produktionsprozess mit *Pichia pastoris* diente als Grundlage für eine mathematische Modellbildung und Simulation der komplexen zellinternen Vorgänge bei der Expression des rekombinanten D1M1H sowie der Alkoholoxidase.

Als Ausgangspunkt für diese theoretischen Arbeiten diente ein der Literatur entnommenes Modell [Luttmann et al., 2010]. Die dort enthaltenen reaktionskinetischen und kybernetischen Elemente wurden um hypothetische Modellansätze aus der Systembiologie erweitert, wodurch die Anpassung an die phänomenologischen Beobachtungen hinsichtlich der Proteinexpression verbessert wurde.

Durch die Entwicklung der hypothetischen Modellansätze konnten Hinweise zum Verständnis der komplexen Proteinexpression gewonnen werden. Die vorliegende Arbeit liefert damit einen weiteren Beitrag zur systemtheoretischen Analyse der Expressionsdynamik rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*.

12 Anhang

12.1 Kultivierungsmedien

Als Vorkultur-, Fermenter- oder Refreshmedium wurde ein Grundsatzmedium (Tab. 12.1) gemäß Tab. 12.2 mit dem Primärsubstrat Glycerol versetzt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen werden 8 ml⁻¹ der Biotinvorlage und 4 ml⁻¹ der PTM4-Spurenelementlösung zugefügt. Diese Stocklösungen wurden zuvor nach Tab. 12.4 angesetzt, mit 0.2 µm Porendurchmesser sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tab. 12.1: Grundsatzmedien

Komponente	Konzentration [gl ⁻¹]	
	Medium 1	Medium 2
KH ₂ PO ₄	25.7	7.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	5.0
K ₂ SO ₄	8.6	2.0
CaSO ₄ · 2H ₂ O	1.4	0.8
MgSO ₄	16.4	8.0
Na ₂ -citrate · 2H ₂ O	5.9	5.0

Bei dem Grundsatzmedium 1 handelte es sich um ein modifiziertes FM22 Medium nach [Stratton et al., 1998]. Um das Ausfallen der Salze bei leicht sauren pH-Werten zu reduzieren, wurde als *Low Salt* Variante Medium 2 konzipiert, wobei sich an [Ghosalkar et al., 2008] und [Zhao et al., 2008] orientiert wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurde Medium 2 verwendet.

Tab. 12.2: Glycerolvorlagen

Komponente	Konzentration [gl ⁻¹]		
	Vorkultur	Batch	Refresh
Glycerol	30	30 bzw. 55	0

Die Konzentrationen der verwendeten Zufüttervorlagen ist in Tab. 12.3 gegeben.

Tab. 12.3: Feedlösungen

Feedlösung	Konzentration [gl ⁻¹]	Bemerkung
Glycerol	500	für $\mu_w = 0.10 \text{ h}^{-1}$
	400	für $\mu_w = 0.04 \text{ h}^{-1}$
Methanol	792	

Tab. 12.4: Stocklösungen

PTM4			Biotinvorlage		
Komponente	Konzentration		Komponente	Konzentration	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2.00	gl^{-1}	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0.20	gl^{-1}
NaI	0.08	gl^{-1}			
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.00	gl^{-1}			
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.20	gl^{-1}			
H_3BO_3	0.02	gl^{-1}			
CaSO_4	0.50	gl^{-1}			
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.50	gl^{-1}			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7.00	gl^{-1}			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22.00	gl^{-1}			
H_2SO_4	1.00	ml^{-1}			

12.2 Offline-Messungen

Bestimmung der optischen Dichte, der Biofeucht- und Biotrockenmasse

Die photometrische Bestimmung der optischen Dichte erfolgte in Einmalküvetten mit 1 cm Schichtdicke in einem Absorptionsmessbereich von 0.2 bis 0.6 bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer.

Zur Ermittlung der Biotrockenmasse wurden 1 ml der zu bestimmenden Probe in vorgewogenen Mikroreaktionsgefäße zentrifugiert (5000 rpm, 3 min), der Überstand entnommen und das Pellet bei 80 °C für mindestens 3 Tage getrocknet. Die erneute Aufnahme des Gewichts ergab abzüglich des Leergewichts die Biotrockenmasse.

Bestimmung des Gesamtproteingehalts (Bradford-Test)

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde ein Bradford-Test in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Lösungen:

- A Standards: Quick Start™ Bovine γ -Globulin Standard Set (Bio-Rad Laboratories)
- B Reaktionslösung: Quick Start™ Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories)

Unter Verwendung von A wurde im Bereich von 12.5 bis 200 μgml^{-1} BGG in PBS eine Kalibriergerade erstellt. Es wurden 20 μl Leerprobe (PBS), Standard oder Probe (ggf. verdünnt in PBS) mit 300 μl B gemischt, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Bei der Bindung des in der Reaktionslösung enthaltenen Farbstoffs *Coomassie brilliant blue G-250* an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum [Bradford, 1976]. In einem Mikroplattenphotometer (Sunrise, Tecan) wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm gegen PBS gemessen, die somit ein Maß für die Gesamtproteinkonzentration $C_{P_{tot}}$ in der Lösung war, die mit Hilfe der Kalibriergeraden bestimmt werden konnte.

SDS-PAGE zur Reinheitsbestimmung

Zur Elektrophorese wurden 4-12 % Polyacrylamid-Gele (Criterion XT Bis-Tris, Bio-Rad Laboratories) verwendet.

Lösungen:

- | | | |
|---|--------------------------|--|
| A | Probenpuffer: | XT Sample Buffer, 4x (Bio-Rad Laboratories) |
| B | Marker für SDS-PAGE: | PageRuler Unstained Protein Ladder
(Thermo Scientific) |
| | Marker für Western Blot: | PageRuler Prestained Protein Ladder
(Thermo Scientific) |
| C | Laufpuffer Stock: | 10x Tris/Glycin/SDS Buffer (Bio-Rad Laboratories) |
| D | Laufpuffer: | 10 % C |
| E | Coomassielösung: | Coomassie R350 (PhastGel™ Blue R, GE Health-care) in 170 ml H ₂ O |
| F | Färbelösung | 200 ml Methanol, 30 ml Essigsäure (Eisessig) in 0.2 μ m filtriertem E |
| G | Entfärbelösung: | 10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure |

Zur Bestimmung der Reinheit $P_{P_{1K}}$ des Zielproteins im jeweiligen Teilsystem K wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration nach Bradford ermittelt und die Proben mit PBS auf eine Konzentration von 250 mg l⁻¹ verdünnt.

Die Probe wurde mit A versetzt und bei 70 °C für 10 min inkubiert. Nach Auftragen von 30 μ l Probe bzw. 5 μ l B erfolgte die Trennung bei 150 V für ca. 75 Minuten unter Verwendung von D. Das Gel wurde ca. 60 min in E gefärbt und mehrfache in G inkubiert bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

Die Digitalisierung erfolgte mit einem Fluor-S Multimager (Bio-Rad Laboratories) über die Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Die Auswertung der Proteinbanden wurde anhand der Software TotalLab Quant (TotalLab) durchgeführt.

Zielproteinidentifizierung mittels Western-Blot

Zum spezifischen immunochemischen Nachweis werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung die Proteine auf eine bindende Membran übertragen.

Die verfügbaren primären Antikörper sind in Tab. 12.5 gelistet. Als sekundäre Antikörper (sAK) wurden Konjugate mit Alkalischer Phosphatase (AP) gegen IgG des jeweiligen Produzenten des primären Antikörpers verwendet (Sigma-Aldrich).

Tab. 12.5: Primäre Antikörper (pAK)

pAK	Antigen	Klonalität	produziert in	bezogen von
12.10	MSP1 ₁₉	monoklonal	Maus	BPRC
4G2	AMA1	monoklonal	Ratte	BPRC
BG98	AMA1	polyklonal	Kaninchen	BPRC
58F8	AMA1-Prodomäne	monoklonal	Ratte	BPRC
Anti-HisTag	HisTag	polyklonal	Kaninchen	Antibodies-online
Anti- <i>Pichia</i>	Wirtszellproteine	polyklonal	Kaninchen	Acris Antibodies

Lösungen:

- A Blotting-Puffer: 7.2 gl⁻¹ Glycin, 1.55 gl⁻¹ Tris-HCl
- B 20x TBS: 121.1 gl⁻¹ Tris base; 175.32 gl⁻¹ NaCl; pH 7.2
- C Blockingpuffer: 5 % B, 0.3 % Tween 20, 0.3 % BSA
- D Waschpuffer: 0.2 % Tween-20 in 5 % B
- E Antikörperpuffer: 5 % B, 0.05 % Tween 20, 0.05 % BSA, 0.02 % NaN₃
- F Primärer Antikörper: 5 µgml⁻¹ in E, kurz vor Gebrauch ansetzen
- G Sekundärer Antikörper: 1/30000 in E, kurz vor Gebrauch ansetzen
- H AP-Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- I Reaktionslösung: 2 % NBT-BCIP in H, kurz vor Gebrauch ansetzen

Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Elektrolot (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories) auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN[®], Whatman) in A bei 100 V, 400 mA und 50 W für 1.5 h.

Daraufhin wurde der immunochemische Nachweis gemäß Tab. 12.6 unter Verwendung der Lösungen C bis I durchgeführt [Faber et al., 2013; Kocken et al., 1999].

Tab. 12.6: Durchführung der Immunodetektion zur Proteinidentifizierung

Schritt	Reagenz	Volumen [ml]	Inkubation
Blocken	C	50	RT, 30 min oder 4 °C, über Nacht
Waschen	D	100	RT, 5 min
Inkubation mit pAK	F	3	RT, 1 h
5 mal Waschen	D	100	RT, je 5 min
Inkubation mit sAK	G	3	RT, 1 h
5 mal Waschen	D	100	RT, je 5 min
Substratreaktion	I	3	RT, bis gewünschtes Signal erreicht ist
Stoppreaktion	H ₂ O	100	-

Zellaufschluss

Zur Bestimmung des intrazellulären Gehalts an Zielprodukt $g_{P1/X}$ und Alkoholoxidase $g_{P2/X}$ wurde zuvor ein mechanischer Zellaufschluss unter Verwendung von Glas-Beads® (Carl Roth) mit 0.5 mm Durchmesser durchgeführt.

Lösungen:

- A Aufschlusspuffer für $g_{P1/X}$: PBS
Aufschlusspuffer für $g_{P2/X}$: 1 mM EDTA in PBS
- B Zellsuspension: 100 $g\ l^{-1}$ Zellen in A
- C Aufschlussesatz: 1 g Glasbeads, 100 $\mu\ l$ B in 900 $\mu\ l$ A
- D Proteaseinhibitor: 1 mM PMSF in C, kurz Gebrauch ansetzen

Nach Ansetzen der jeweiligen Lösung A wurden die Zellpellets darin für 10 min bei 2000 rpm auf einem Vibrax resuspendiert (Lösung B). Aus der Zellsuspension erfolgte eine BTM-Bestimmung sowie die Herstellung von Lösung C in Mikroreaktionsgefäßen.

Unter Verwendung von Proteaseinhibitoren (D) wurden die Zellen für 20 min bei 2000 rpm auf einem Vibrax aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 14000 min^{-1} und 4°C konnte der Überstand für die jeweilige Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

AOX-Bestimmung

Nach einem mechanischen Zellaufschluss erfolgt die Bestimmung der Aktivität von Alkoholoxidase in einem enzymatischen Assay nach [Sigma-Aldrich, 2013; Keesey, 1983; Janssen und Ruelius, 1968].

Lösungen:

- A Kaliumphosphatpuffer: 100 mM KP_i
- B Wasserstoffperoxid: 0.003 % H_2O_2 , kurz vor Gebrauch ansetzen
- C Peroxidase: 2500 $U\ ml^{-1}$, aliquotiert bei -20 °C lagern
- D Reaktionslösung: 2.2 mM ABTS, 5 % B, 0.05 % C in A, kurz vor Gebrauch ansetzen
- E Substratlösung: 1 % Methanol in A

Es wurden jeweils 50 $\mu\ l$ Probe (in geeigneter Verdünnung in A) in einer Mikrotiterplatte mit 200 $\mu\ l$ D gemischt und 0.5 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 50 $\mu\ l$ B gestartet und die Absorption bei 405 nm in einem Mikroplattenphotometer (Sunrise, Tecan) über 4.5 min alle 30 s gemessen.

Quantifizierung des zellinternen Zielproduktes mittels ELISA

Das Zelllysate wurde mithilfe eines Sandwich ELISAs auf den Zielproteingehalt untersucht. Dabei wurden vorbeschichtete Mikrotiterplatten (Ni-NTA HisSorp plates, Qiagen) verwendet, sodass die Bindung des Zielproduktes analog zur IMAC über den His-Tag erfolgte.

Als primärer Antikörper wurde BG98 aus Kaninchen gegen AMA1 eingesetzt, gegen den ein Alkalische-Phosphatase konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Sigma-Aldrich) gerichtet war.

Lösungen:

- | | | |
|---|------------------------|---|
| A | Verdünnungspuffer: | 0.05 % Tween 20, 0.5 % BSA in PBS |
| B | Waschpuffer: | 0.05 % Tween 20 in PBS |
| C | Primärer Antikörper: | 1/50000 in A |
| D | Sekundärer Antikörper: | 1/30000 in A |
| E | DEA Puffer: | 0.15 % MgCl ₂ , 0.1 % Diethanolamin pH 9.8 |
| F | Substratlösung: | 1 mgml ⁻¹ Para-Nitrophenylphosphat in E |

Aufgereinigtes D1M1H wurde im Bereich von 0.1 bis 1 µgml⁻¹ in A zur Erstellung einer Kalibriergerade angesetzt und von jeder Probe in A drei Verdünnungsstufen hergestellt. Je 200 µl Standard, Probe oder Blank (A) wurden als Dreifachbestimmung auf die Ni-NTA Mikrotiterplatte gegeben und die Immunodetektion nach Tab. 12.7 durchgeführt [Qiagen, 2011; Faber et al., 2013; Harlow und Lane, 1988].

Tab. 12.7: Durchführung des ELISA zur Produktquantifizierung

Schritt	Reagenz	Volumen [µl]	Inkubation
Bindung der Probe/Standard		200	RT, 600 rpm, 2 h oder 4 °C über Nacht
5 mal Waschen und Abklopfen	B	200	RT, je 1 min
Inkubation mit pAK	C	200	RT, 600 rpm, 1 h
5 mal Waschen und Abklopfen	B	200	RT, je 1 min
Inkubation mit sAK	D	200	RT, 600 rpm, 1 h
5 mal Waschen und Abklopfen	B	200	RT, je 5 min
Reaktion	F	200	RT, 600 rpm, bis gewünschtes Signal erreicht ist

Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm in einem Mikroplattenphotometer (Sunrise, Tecan).

13 Literatur

Arnot, D.E.; Cavanagh, D.R.; Remarque, E.J.; Creasey, A.M.; Sowa, M.P.; Morgan, W.D.; Holder, A.A.; Longacre, S.M.; Thomas, A.W. (2008): Comparative testing of six antigen-based malaria vaccine candidates directed toward merozoite-stage *Plasmodium falciparum*, *Clin Vaccine Immunol* 15(9): 1345-1355.

Bai, T.; Becker, M.; Gupta, A.; Strike, P.; Murphy, V.J.; Anders, R.F.; Batchelor, A.H. (2005): Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket, *Proc Natl Acad Sci USA* 102(36): 12736-12741.

Balbás, P.; Lorence, A. (Eds.) (2004): *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* (Vol. 267), Springer.

Barr, K.A.; Hopkins, S.A.; Sreekrishna, K. (1992): Protocol for Efficient Secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*, *Pharm Eng* 12: 48-51.

Biotechnologie Kempe (2003): Firmenhomepage,
URL <http://www.btkempe.de/html/alcoline-engl.HTM>, Abruf 09. Mai 2013.

BMBF (2012): Biotechnologie: Hightech-Strategie gibt neue Impulse, URL
<http://www.hightech-strategie.de/de/112.php>, Abruf 26. November 2013.

BMWi (2013): Biotechnologie, URL <http://www.bmwi.de/DE/Themen/Technologie/Schlüsseltechnologien/biotechnologie.html>, Abruf 26. November 2013.

Borchert, S.-O. (2013): Development of an Integrated Bioprocess for Production of Potential Malaria Vaccines with *Pichia pastoris*, 12th IFAC Symp. On Computer Appl. Biotechnol., eingereichtes Manuskript.

Bozdech, Z.; Llinas, M.; Pulliam, B.L.; Wong, E.D.; Zhu, J.; DeRisi, J.L. (2003): The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*, *PloS biology* 1(1): E5.

BPRC (2013): Homepage, URL <http://www.bprc.nl/>, Abruf 05. Februar 2013.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72: 248-54.

Brendelberger, G. (2003): Die FDA-Initiative "Process Analytical Technology (PAT)", URL http://www.gmp-navigator.com/nav_news_323.html, Abruf 26. November 2013.

Brierley, R.A.; Bussineau, C.; Kosson, R.; Melton, A.; Siegel, R.S. (1990): Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme *Biochemical Engineering VI*, *Ann NY Acad Sci* 589: 350-363.

Cereghino, G.P.L.; Cereghino, J.L.; Ilgen, C.; Cregg, J. (2002): Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13(4): 329-332.

Cereghino, J.L.; Cregg, J. (2000): Heterologous protein expression in the methyl-trophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol Rev* 24(1): 45-66.

- Chesne-Seck, M.L.; Pizarro, J.C.; Vulliez-Le Normand, B.; Collins, C.R.; Blackman, M.J.; Faber, B.W.; Remarque, E.J.; Kocken, C.H.; Thomas, A.W.; Bentley G.A. (2005): Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites, *Mol Biochem Parasit* 144(1): 55-67.
- Coley, A.M.; Gupta, A.; Murphy, V.J.; Bai, T.; Kim, H.; Foley, M.; Anders, R.F.; Batchelor, A.H. (2007): Structure of the Malaria Antigen AMA1 in Complex with a Growth-Inhibitory Antibody. *PLoS Pathog* 3(9): e138.
- Collins, C.R.; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Blackman, M.J. (2009): An Inhibitory Antibody Blocks Interactions between Components of the Malarial Invasion Machinery, *PLoS Pathog* 5(1): e1000273.
- Cornelissen, G. (2004): Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*, Dissertation, Universität Hannover, VDI Verlag Reihe 17, Nr. 249.
- Cox, F.E.G. (2010): History of the discovery of the malaria parasite and their vectors, *Parasit Vectors* 3(1): 5.
- Cregg, J.M. (2003): Heterologous Proteins Expressed in *Pichia pastoris*, URL <http://www.kgi.edu/faculty-and-research/profiles/james-m-cregg.html>, Abruf 27. November 2013
- Cregg, J.M.; Lin Cereghino, J.; Shi, J.; Higgins, D.R. (2000): Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Mol Biotechnol* 16(1): 23-52.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. (1993): Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *Biotechnol* 11(8): 905-910.
- D'Anjou, M.C.; Daugulis, A.J. (2001): A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation, *Biotechnol Bioeng*, 72(1): 1-11.
- De Schutter K.; Lin Y.-C.; Tiels, P.; Van Hecke, A.; Glinka, S.; Weber-Lehmann, J.; Rouzé, P.; Van de Peer, Y.; Callewaert, N. (2009): Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*, *Nat Biotechnol* 27 (6): 561–566.
- Donovan, R.S.; Robinson, C.W.; Glick, B.R. (1996): Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter, *J Ind Microbiol*, 16(3): 145-154.
- Doolan, D.L.; Hoffman, S.L. (1997): Multi-gene vaccination against malaria: A multi-stage, multi-immune response approach, *Parasit Today* 13(5): 171-178.
- Ellis, S.B.; Brust, P.F.; Koutz, P.J.; Waters, A.F.; Harpold, M.M.; Gingeras, T.R. (1985): Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Mol Cell Biol* 5(5): 1111-1121.
- European Vaccine Initiative (2013): Homepage, URL <http://www.euvaccine.eu/-portfolio/projects-no-longer-active/ama1>, Abruf 13. Mai 2013.

- Faber, B.W.; Remarque, E.J.; Morgan, W.D.; Kocken, C.H.; Holder, A.A.; Thomas, A.W. (2007): Malaria vaccine-related benefits of a single protein comprising *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 domains I and II fused to a modified form of the 19-kilodalton C-terminal fragment of merozoite surface protein 1, *Infect Immun* 75(12): 5947-5955.
- Faber, B.W.; Younis, S.; Remarque, E.J.; Rodriguez Garcia, R.; Riasat, V.; Walraven, V.; van der Werff, N.; van der Eijk, M.; Cavanagh, D.R.; Holder, A.A.; Thomas, A.W.; Kocken, C.H. (2013): Diversity Covering AMA1-MSP119 fusion proteins as malaria vaccines, *Infect Immun* 81(5): 1479-1490.
- Faber, B.W.; Remarque, E.J.; Kocken, C.H.; Cheront, P.; Cingolani, D.; Xhonneux, F.; Jurado, M.; Haumont, M.; Jepsen, S.; Leroy, O.; Thomas, A.W. (2008): Production, quality control, stability and pharmacotoxicity of cGMP-produced *Plasmodium falciparum* AMA1 FVO strain ectodomain expressed in *Pichia pastoris*, *Vaccine* 26(48): 6143-6150.
- FDA (2004): Guidance for Industry: PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, URL <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>, Abruf 12. Oktober 2013.
- Fricke, J.; Pohlmann, K.; Jonescheit, N.A.; Ellert, A.; Joks, B.; Luttmann, R. (2013): Designing a fully automated multi-bioreactor plant for fast DoE optimization of pharmaceutical protein production, *Biotechnol J*, 8(6): 738-747.
- Fricke, J.; Pohlmann, K.; Tatge, F.; Lang, R.; Faber, B.; Luttmann, R. (2011): A multi-bioreactor system for optimal production of malaria vaccines with *Pichia pastoris*, *Biotechnol J*, 6(4): 437-451.
- Gasser, B.; Maurer, M.; Gach, J.; Kunert, R.; Mattanovich, D. (2006): Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments, *Biotechnol Bioeng* 94(2): 353-361.
- Gasser, B.; Maurer, M.; Rautio, J.; Sauer, M.; Bhattacharyya, A.; Saloheimo, M.; Penttilä, M.; Mattanovich, D. (2007-1): Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions, *BMC Genomics* 8: 179.
- Gasser, B.; Sauer, M.; Maurer, M.; Stadlmayr, G.; Mattanovich, D. (2007-2): Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts, *Appl Environ Microbiol*, 73(20): 6499-6507.
- Ghosalkar, A.; Sahai, V.; Srivastava, A. (2008): Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production, *Bioresour Technol*. 99(16): 7906-7910.
- Gollmer, K.U. (1998): BIOS – A biotechnological Simulations System, User Guide, unveröffentlicht.
- Good, M.F. (2005): Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies, *Trends Parasitol*, 21(1): 29-34.

- Gregory, M.E.; Turner, C. (1993): Open-loop control of specific growth rate in fed-batch cultures of recombinant *E. coli*, *Biotechnol Tech* 7(12): 889-894.
- Harding, H.P.; Zhang, Y.H.; Ron, D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature* 397(6716): 271- 274.
- Harlow, E.; Lane, D. (1988): *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Hartner, F.S.; Glieder, A. (2006): Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts, *Microb Cell Fact* 5:39.
- Hartner, F.S.; Ruth, C.; Langenegger, D.; Johnson, S.N.; Hyka, P.; Lin-Cereghino, G.P.; Lin-Cereghino, J.; Kovar, K.; Cregg, J.M.; Glieder, A. (2008): Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Res* 36 (12): e76.
- Hensmann, M.; Li, C.; Moss, C.; Lindo, V.; Greer, F.; Watts, C.; Ogun, S.; Holder, A.A.; Langhorne J. (2004): Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen processing and affect the in vivo antibody response, *Eur J Immunol* 34(3): 639-648.
- Higgins, D.R.; Cregg, J.M. (Eds.) (1998): *Pichia Protocols*, Vol. 103, Humana press, New York City.
- Hodder, A.N.; Crewther, P.E.; Matthew, M.L.; Reid, G.E.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Anders, R.F. (1996): The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1, *J Biol Chem*, 271(46): 29446-29452.
- Hong, F.; Meinander, N.Q.; Jonsson, L.J. (2002): Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*, *Biotechnol Bioeng* 79(4): 438-449.
- Howell, S.A.; Withers-Martinez, C.; Kocken, C.H.; Thomas, A.W.; Blackman, M.J. (2001): Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1, *J Biol Chem* 276(33): 31311-31320.
- Idiris, A.; Tohda, H.; Kumagai, H.; Takegawa, K. (2010): Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production, *Appl Microbiol Biotechnol* 86(2): 403-417.
- Invitrogen (2010): Manual, EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, URL http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf, Abruf 25. Februar, 2013.
- Jahic, M.; Wallberg, F.; Bollok, M.; Garcia, P.; Enfors, S.O. (2003): Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures, *Microb Cell Fact*, 2(1): 6.
- Janssen, F.W.; Ruelius, H.W. (1968): Alcohol oxidase, a flavoprotein from several Basidiomycetes species: Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol, *Biochimica et biophysica acta*, 151(2): 330-342.

- Johnson, S.K.; Zhang, W.; Smith, L.A.; Hywood-Potter, K.J.; Swanson, S.T.; Schlegel, V.L.; Meagher, M.M. (2003): Scale-up of the fermentation and purification of the recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*, *Prot Exp Pur* 32(1): 1-9.
- Julien, C.; Whitford, W. (2007): Bioreactor Monitoring, Modeling, and Simulation, *BioProcess Int* 5(1): S10-S17.
- Kaiser, C. (2010): Methoden zur Prozessüberwachung und Modellierung von Herstellungsprozessen rekombinanter Proteine mit *Escherichia coli*, Dissertation Universität Hannover.
- Kang, H.A.; Choi, E.S.; Hong, W.K.; Kim, J.Y.; Ko, S.M.; Sohn, J.H.; Rhee, S.K. (2000): Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotechnol* 53(5): 575-582.
- Käppeli, O. (1994): Bio- und Gentechnologie. 1. Technikbeurteilung geschlossener Systeme, vdf Hochschulverlag AG, Zürich.
- Keesey, J. (1987): Biochemica Information, 1st ed., Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis.
- Kennedy, M.C.; Wang, J.; Zhang, Y.; Miles, A.P.; Chitsaz, F.; Saul, A.; Long, C.A.; Miller, L.H.; Stowers, A.W. (2002): In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response, *Infect Immun* 70(12): 6948-6960.
- Kocken, C.H.; Withers-Martinez, C.; Dubbeld M.A.; van der Wel, A.; Blackman, M.J.; Thomas, A.W. (2002): High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion, *Infect Immun* 70(8): 4471-4476.
- Kocken, C.H.; Dubbeld M.A.; van der Wel, A.; Pronk, J.T.; Waters, A.P.; Thomas, A. W. (1999): High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2, *Infect Immun* 67(1): 43-49.
- Kremling, A. (2011): Kompendium Systembiologie: Mathematische Modellierung und Modellanalyse, Springer DE.
- Kupcsulik, B.; Sevelle, B. (2005): Optimization of Specific product formation rate by statistical and formal kinetic model descriptions of an HAS producing *Pichia pastoris* Mut^S Strain, *Chem Biochem Eng Q*, 19(1): 99-108.
- Kyes, S.A.; Kraemer, S.M.; Smith, J.D. (2007): Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family, *Eukaryot Cell* 6(9): 1511-1520.
- Loegering, K.; Mueller, C.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R. (2010): Optimization of recombinant enzyme production with *Pichia pastoris* in an integrated industrial scale-down production plant, 11th Intern Symp on Computer Appl Biotechnol, 293-298.

- Love, K.R.; Politano, T.J.; Panagiotou, V.; Jiang, B.; Stadheim, T.A.; Love, J.C. (2012): Systematic Single-Cell Analysis of *Pichia pastoris* Reveals Secretory Capacity Limits Productivity, *PloS One* 7(6): e37915.
- Luttmann, R.; Hukelmann, E.; Ellert, A.; Kazemi, A.; Cornelissen, G. (2010): A Cybernetic Approach for Modelling of Complex Dynamic Expression in Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris*, *Computer Applications in Biotechnology*, 11(1): 383-388.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. (2005): Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast* 22(4): 249-270.
- Martens, S.; Borchert, S.-O.; Faber, B.W.; Cornelissen, G.; Luttmann, R. (2011): Fully automated production of potential Malaria vaccines with *Pichia pastoris* in integrated processing, *Eng Life Sci*, 11(4): 429-435.
- Mattanovich, D.; Gasser, B.; Hohenblum, H; Sauer, M. (2004): Stress in recombinant protein producing yeasts, *J Biotechnol*, 113(1-3): 121-135.
- Meusser, B.; Hirsch, C.; Jarosch, E.; Sommer, T. (2005): ERAD: the long road to destruction, *Nat Cell Biol* 7(8): 766-772.
- Michalakis, Y.; Renaud, F. (2009): Malaria: Evolution in vector control, *Nature* 462(7271): 298-300.
- Mitchell, G.H.; Thomas, A.W.; Margos, G.; Dluzewski, A.R.; Bannister, L.H. (2004): Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells, *Infect Immun* 72(1): 154-158.
- Murray, C.J.L.; Rosenfeld, L.C.; Lim, S.S.; Andrews, K.G.; Foreman, K.J.; Haring, D.; Fullmann, N.; Naghavi, M.; Lozano, R.; Lopez, A.D. (2012): Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis, *Lancet* 379 (9814): 385
- Nelder, J.A.; Mead, R. (1965): A simplex method for function minimization, *Comput J*, 7(4): 308-313.
- Nikodem, D.; Davidson, E. (2000): Identification of a novel antigenic domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro, *Mol Biochem Parasitol*, 108(1): 79-91.
- Optek-Danulat (2005), Homepage, URL <http://www.optek.com>, Abruf: 03. Juni 2013.
- Peterson, M.G.; Marshall, V.M.; Smythe, J.A.; Crewther, P.E.; Lew, A.; Silva A.; Anders, R.F.; Kemp, D.J. (1989): Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*, *Mol Cell Biol*, 9(7): 3151-3154.
- Peuker, T. (2006): Modellgestützte Verfahren zur Beobachtung und Steuerung bioverfahrenstechnischer Prozesse, Dissertation, Universität Hannover, VDI Verlag Reihe 17, Nr. 261.

- Pfeffer, M.; Maurer, M.; Kollensperger, G.; Hann, S.; Graf, A.B.; Mattanovich, D. (2011): Modeling and measuring intracellular fluxes of secreted recombinant protein in *Pichia pastoris* with a novel 34S labeling procedure, *Microb Cell Fact*, 10: 47.
- Pizarro, J.C.; Chitarra, V.; Calvet, C.; Verger, D.; Bentley, G.A. (2002): Crystallization and preliminary structural analysis of an antibody complex formed with PfMSP1-19, a malaria vaccine candidate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt7): 1246-1248.
- Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.A. (1994): *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage, R. Oldenbourg Verlag München Wien.
- Qiagen (2011): Quick start protocol: ELISA with Ni-NTA HisSorb Strips or Plates, URL <http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/protein-and-cell-assays/ni-nta-hissorb-plates#resources>, Abruf 14. Januar 2013.
- Queener, S.; Swartz, R. (1979): Penicillins: Biosynthetic and semisynthetic, *Economic Microbiology*, 3: 35-123.
- Remarque, E.J.; Faber, B.W.; Kocken, C.H.; Thomas, A.W. (2008): A Diversity-Covering Approach to Immunization with *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 Induces Broader Allelic Recognition and Growth Inhibition Responses in Rabbits, *Infect Immun*, 76(6): 2660-2670.
- Remarque, E.J.; Faber, B.W.; Kocken, C.H.; Thomas, A.W. (2007): Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review, *Trends Parasitol*, 24(2): 74-84.
- Reuter, M.; Zacher, S. (2008): *Regelungstechnik für Ingenieure: Analyse, Simulation und Entwurf von Regelkreisen*, 12. Auflage, Vieweg+Teubner, Wiesbaden.
- Scheper, T. (1991): *Bioanalytik: Messung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren*, Vieweg+Teubner, Braunschweig.
- Schmidt, F.R. (2004): Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(4): 363-372.
- Schultz, M. (2001): *Automatisierung eines neuartigen Bioreaktors zur Integrierten Prozessführung*, Diplomarbeit an der HAW Hamburg, unveröffentlicht.
- Sciconomy (2012): *Zukunftstag Biotechnologie*, URL <http://www.sciconomy.de/index.php?id=167>, Abruf 27. November 2013.
- Scott, B.; Wilcock, A. (2006): Process Analytical Technology in the Pharmaceutical Industry: A Toolkit for Continuous Improvement, *PDA J Pharm Sci Technol*, 60(1): 17-53.
- Sigma-Aldrich (2013): *Enzymatic Assay of Alcohol Oxidase (EC 1.1.3.13)*, URL <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-alcohol-oxidase.html>, Abruf 15. Juli 2013.

- Sinha, J.; Plantz, B.A.; Inan, M.; Meagher, M.M. (2005): Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau, *Biotechnol Bioeng* 89(1): 102-112.
- Stanbury, P.F.; Whitaker, A. (1984): *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Oxford.
- Stratton, J.; Chiruvolu, V.; Meagher, M.M. (1998): High cell-density fermentation, *Methods Mol Biol*, 103: 107-120.
- Thiemann, W.J.; Palladino, M.A. (2007): *Biotechnologie*, Pearson Deutschland GmbH, Hallbergmoos.
- Thiesing, D. (2011) Umsetzung eines Design of Experiments zur optimierten Herstellung rekombinanter Proteine in Sequentieller Prozessführung mit *Pichia pastoris*, Masterarbeit an der HAW Hamburg, unveröffentlicht.
- Tietze, U.; Schenk, C. (2002): *Halbleiter-Schaltungstechnik*, 12. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Tschopp, J.F.; Brust, P.F.; Cregg, J.M.; Stillman, C.A.; Gingeras, T.R. (1987): Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Research*, 15(9): 3859-3876.
- Tyson, J.J.; Chen, K.C.; Novak, B. (2003): Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell, *Curr Opin Cell Biol* 15(2): 221-231.
- Vefghi, E. (2012): Entwicklung und Erprobung von Kultivierungsstrategien zur Optimierung von Herstellungsprozessen rekombinanter Malariavakzine mit *Pichia pastoris* mittels DoE in einer Multi-Bioreaktoranlage, Masterarbeit an der HAW Hamburg, unveröffentlicht.
- Voß, J.-P. (2012): Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Expressionsdynamik rekombinanter Malariavakzine in *Pichia pastoris*, Masterarbeit an der HAW Hamburg, unveröffentlicht.
- Voß, T. (2012): Optimization of an IMAC method for analytical and preparative purification of a Malaria vaccine candidate in an integrated production process, Masterarbeit an der HAW Hamburg, unveröffentlicht.
- Wernsdorfer, W.H.; Payne, D. (1991): The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*, *Pharmacol Ther*, 50(1): 95-121.
- Zhang, W.; Zhao, H.L.; Xue, C.; Xiong, X.H.; Yao, X.Q.; Li, X.Y.; Chen, H.P.; Liu, Z.M. (2006): Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins, *Biotechnol Prog*, 22(4): 1090-1095.
- Zhao, H.L.; Xue, C.; Wang, Y.; Liu, Z M. (2008): Increasing the cell viability and heterologous protein expression of *Pichia pastoris* mutant deficient in PMR1 gene by culture condition optimization, *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(2): 235-241.

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Angaben

Name	Sanja Martens
Geburtsdatum	09. Oktober 1985
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Studium

seit 01.2011	Promotion Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysentechnik (BPAT) in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover Mündliche Prüfung zum Dr. rer. nat. am 16. April 2014
09.2009 - 11.2010	Masterstudiengang Biotechnology HAW Hamburg M.Sc. in Biotechnology am 30. November 2010
09.2005 - 10.2009	Diplomstudiengang Biotechnologie HAW Hamburg Dipl.-Ing. (FH) am 1. Oktober 2009

Berufliche Tätigkeiten

11.2009 - 06.2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin HAW Hamburg, BPAT
-------------------	--

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

- (1) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Hartwich, P.; Cornelissen, G.; Anspach, B.; Faber, B.W.; Luttmann, R. (2009): Production and Purification of Complex Malaria Vaccines from High Cell Density Cultivations with *Pichia pastoris*. Poster auf der Pichia 2009 - protein expression conference, 18.-21.10., Tucson, Arizona, USA.
- (2) Fricke, J.; Martens, S.; Lang, R.; Tatge, F.; Faber, B.W.; Luttmann, R. (2009): Conception of a Parallel/ Sequential DoE-Design of Experiments in a Multifemter System BIOSTAT® Qplus6 for Optimal Recombinant Malaria Vaccine Production, Poster auf der Pichia 2009 - protein expression conference, 18.-21.10., Tucson, Arizona, USA.
- (3) Martens, S.; Luttmann, R.; Cornelissen G. (2010): Herstellung von Malaria-vakzin-Kandidaten – Überwachung der Produktion, Vortrag auf dem Chrom Forum 2010, 02.03., Hamburg.
- (4) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Hartwich, P.; Faber, B.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2010): Entwicklung einer vollautomatisierten Produktion potenzieller Malariavakzine mit *Pichia pastoris* in Integrierter Prozessführung. Vortrag auf der GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Bioprozessorientiertes Anlagendesign, 10.-12.05, Nürnberg.
- (5) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Hartwich, P.; Faber, B.W.; Thomas, A.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2010): Entwicklung einer vollautomatisierten Produktion potenzieller Malariavakzine mit *Pichia pastoris* in Integrierter Prozessführung. Chem. Ing. Tech., 82(9): 1547-1548.
- (6) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Hartwich, P.; Faber, B.W.; Thomas, A.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2010): Entwicklung einer vollautomatisierten Produktion potenzieller Malariavakzine mit *Pichia pastoris* in Integrierter Prozessführung. Poster auf der 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, 21.-23.09., Aachen.
- (7) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Cornelissen, G. (2010): Herstellung rekombinanter Malariavakzine mit Integrierter Expanded Bed Adsorption. Vortrag auf dem Bioengineering Workshop Biokatalyse2021, 3.12., Hamburg.
- (8) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Faber, B.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2011): Experimentelle Untersuchungen bei der Expression von Diversity-Covering Malariavakzinen. Poster auf der 8. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie, 04.05., Hamburg.
- (9) Borchert, S.-O.; Martens, S.; Paul, J.; Voß, T.; Faber, B.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2011): Optimierung einer Zellabtrennung und Reinigung von Malariavakzinen in einer Expanded Bed Adsorptions Chromatographie mit Design of Experiments. Poster auf der 8. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie, 04.05., Hamburg.

- (10) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Faber, B.W.; Cornelissen, G.; Luttmann, R. (2011): Fully automated production of potential Malaria vaccines with *Pichia pastoris* with integrated processing. Eng. Life Sci., 11(4): 429-435.
- (11) Fricke, J.; Borchert, S.-O.; Pohlmann, K.; Martens, S.; Lögering, K.; Müller, C.; Joks, B.; Faber, B.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2011): How to Optimize Pharmaceutical Production Processes. Poster auf der ECAB - 1st European Congress of Applied Biotechnology, 25.-29.09., Berlin.
- (12) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Faber, B. W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2011): Automated long term production of Malaria vaccine candidates in Integrated Processing using *Pichia pastoris*. Vortrag auf der ECAB - 1st European Congress of Applied Biotechnology, 25.-29.09., Berlin.
- (13) Martens, S.; Luttmann, R.; Cornelissen G. (2012): Einsatz einer Atline-HPLC Methode an Bioreaktoren zum Nachweis artifizieller Malariavakzin-Kandidaten. Vortrag auf dem Chrom Forum 2012, 29.02., Hamburg.
- (14) Borchert, S.-O.; Paul, J.; Martens, S.; Faber, B.W.; Luttmann, R.; Cornelissen, G. (2012): Optimization of an Integrated Bioprocess for production of potential Malaria vaccines with *Pichia pastoris* via Design of Experiments. Poster auf der Biotechnología Habana, 05.-08.03., Havanna, Cuba.
- (15) Martens, S.; Borchert, S.-O.; Paul, J.; Voss, J.-P.; Faber, B.W.; Cornelissen, G. (2012): Analysis and optimization of a sequential malaria vaccine production process with in-situ product removal (ISPR). Poster auf der Vaccine Technology IV, 20.-25.05., Albufeira, Portugal.
- (16) Martens, S. (2012): Synthese und Analyse von Herstellungsprozessen artifizieller *Diversity Covering* (DiCo) Malariavakzinkandidaten. Poster auf dem HAW-Forschungstag, 15.06., Hamburg.
- (17) Martens, S.; Voss, J.-P.; Thiesing, D.; Faber, B.W.; Cornelissen, G. (2012): Investigation in Expression Dynamics during Sequential Recombinant Production with *Pichia pastoris*. Vortrag auf der ESBES/ISPPP, 23.-26.09., Istanbul, Türkei.