
1 Einleitung und Zielsetzung

Biopharmazeutika machen heute bereits 20 % der kommerziell erhältlichen Pharmazeutika aus und Marktprognosen sagen einen weiteren Wandel von traditionellen Medikamenten zu Biopharmazeutika mit einem Umsatz von bis zu 306 Mrd. \$ im Jahr 2020 voraus. Grund sind die oftmals höhere Effizienz von Biopharmazeutika sowie der höhere Bedarf durch eine alternde Bevölkerung und zunehmende Häufigkeit von Krebs- und Autoimmunerkrankungen (Global Industry Analytics Inc. 2015). Nordamerika stellt mit 63,3 Mrd. \$ Umsatz im Jahr 2012 den größten Biopharmazeutika-Markt dar, wobei monoklonale Antikörper (24,6 Mrd. \$) gefolgt von Hormonen (16,1 Mrd. \$) und Wachstumsfaktoren (8,1 Mrd. \$) die größte Produktgruppen bilden (Global Industry Analytics Inc. 2015). Die Entwicklung rekombinanter DNA-Technologien in den 1970er Jahren ermöglichte die kontrollierte und skalierbare Produktion dieser pharmazeutisch relevanten Polypeptide mit einfachen und kostengünstigen Wirtsorganismen. 2008 waren bereits 151 Peptide für die pharmazeutische Anwendung zugelassen, wobei ihre industrielle Produktion vor allem in Säugetierzellen (39 %), Hybridomzellen (11,2 %), der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (18,5 %) und dem Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (29,8 %) erfolgte (Ferrer-Miralles et al. 2009).

Ein Hauptanliegen bei der industriellen Etablierung neuer Wirtssysteme ist es, die Einfachheit und Flexibilität prokaryotischer Produktionssysteme zu nutzen und gleichzeitig die korrekte Faltung und post-translationale Modifikation sicherzustellen (Sanchez-Garcia et al. 2016). Hierfür sind Gram-positive Bakterien des Genus *Bacillus* vielversprechende Kandidaten, die bereits seit vielen Jahrzehnten als Produktionssysteme für homologe und rekombinante Proteine etabliert sind (Westers et al. 2004; Vary et al. 2007). Stämme der Gattung *Bacillus* sind einfach und kostengünstig in Handhabung und Kultivierung, weisen hohe Wachstumsraten auf, sind apathogen und frei von Endotoxinen und genetisch gut zugänglich. Außerdem sekretieren sie Proteine im $g L^{-1}$ -Bereich in korrekt gefalteter Form direkt in den Kulturüberstand, wodurch das Downstream-Processing vereinfacht und kostengünstiger wird (Doi et al. 1986; Harwood 1992; Schallmey et al. 2004).

Einige der interessantesten und gleichzeitig anspruchsvollsten pharmazeutischen Proteine stellen Antikörper und ihre Fragmente sowie große multimere Enzyme wie die Penicillin-G-Acylase dar. Antikörper und ihre Fragmente werden aufgrund der hohen Bindungsspezifität zu ihrem Antigen vielfach in der Analytik (z.B. für Assays), in der Diagnostik (u. a. zum Nachweis von Pathogenen und Toxinen) und in der Therapie (z.B. von Krebs- und Autoimmunerkrankungen) eingesetzt. Ihr jährlicher Umsatz beträgt fast 100 Mrd. \$ (Siddiqui 2010; Sean 2012; bcc Research 2015; Biocompare 2015; Ecker et al. 2015; Global Industry Analytics Inc. 2015; Grand View Research 2016). Die Penicillin-G-Acylase (Pac) ist für die pharmazeutische Industrie ebenfalls von großem Interesse, auch wenn sie nicht direkt als Bio-



pharmazeutikum eingesetzt wird. Das Enzym spaltet Penicillin G bzw. Cephalosporin G in 6-Aminopenicillansäure bzw. 7-Amino-desacetoxy-cephalosporansäure (Sakaguchi und Murao 1950), die wiederum als Plattformchemikalien für die Herstellung semisynthetischer β -Lactam-Antibiotika wie Ampicillin und Cephalexin dienen, für deren Synthese ebenfalls die Pac verwendet werden kann (Srirangan et al. 2013). Die Pac von *E. coli* und *B. megaterium* wird in der Industrie zunehmend als Alternative zur umständlichen und teuren chemischen Synthese von β -Lactam-Antibiotika eingesetzt. β -Lactam-Antibiotika machten im Jahr 2009 mit 11,9 Mrd. \$ Umsatz für Cephalosporine und 7,9 Mrd. \$ für Penicilline über die Hälfte des Antibiotika-Marktes aus und sind eine der größten biotechnologischen Produktgruppen (Hamad 2010).

Um die Etablierung von *Bacillus* als rekombinantes Produktionssystem für diese pharmazeutisch relevanten Proteine voranzutreiben, wurden in dieser Arbeit Stämme von *B. megaterium*, *B. licheniformis* und *B. subtilis* zur Herstellung des Antikörperfragments D1.3 scFv und der Pac untersucht. Hierbei wurde skalenübergreifend neben klassischen Schüttelkolben-Experimenten auch die Kultivierung in Mikrotiterplatten als High-Throughput-Screening-Plattform sowie die kontrollierbare und industriell meist eingesetzte Kultivierungsform im Rührkesselreaktor betrachtet. Zielsetzungen in dieser Arbeit sind daher:

- die Konstruktion von Plasmiden für die Xylose-induzierbare rekombinante Produktion und -sekretion der pharmazeutisch relevanten Proteine D1.3 scFv und Penicillin-G-Acylase in *B. megaterium*, *B. licheniformis* und drei sich in ihrer Protease-Aktivität unterscheidenden *B. subtilis*-Stämmen,
- die Anpassung eines für die D1.3 scFv-Produktion geeigneten Minimalmediums,
- die Assay-Anpassung zur Quantifizierung der rekombinanten Proteine,
- der skalenübergreifende Vergleich von Wachstum und Produktbildung in Mikrotiterplatte (1,25 mL Kulturvolumen), Schüttelkolben (150 mL Kulturvolumen) und Rührkesselreaktor (2.000 mL Kulturvolumen), insbesondere in Bezug auf Sauerstoffverfügbarkeit,
- die Quantifizierung der Produktbildungskinetik für alle betrachteten *Bacillus*-Stämme und Kultivierungssysteme sowie,
- der abschließende Vergleich der Produktion und Sekretion von D1.3 scFv und Pac mit der Produktion von intrazellulärem GFP.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Antikörper und Antikörperfragmente

2.1.1 Anwendung von Antikörpern in Therapie, Diagnostik und Analytik

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind Proteine, die in B-Lymphozyten von Wirbeltieren als Immunreaktion auf körperfremde Strukturen (Antigene) von Viren, Bakterien oder anderen krankheitserregenden Organismen gebildet werden. Hierbei bindet das Paratop des Antikörpers hochspezifisch an eine passende Struktur (Epitop) des Antigens und markiert dieses für die Entsorgung durch das Immunsystem (Dübel 2004; Murphy et al. 2012). Auf B-Lymphozyten exponierte, membranständige Antikörper (B-Zell-Rezeptoren) vermitteln, nach Aktivierung durch das passende Antigen, die Differenzierung dieser Zellen zu Antikörpersekretierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Sekretierte Antikörper wirken hauptsächlich, indem sie Antigene direkt neutralisieren (z.B. bei Viren), für die Makrophagenvermittelte Phagozytose markieren (z.B. bei Bakterien) oder das Komplementärsystem aktivieren (Dübel 2004; Murphy et al. 2012). Aufgrund der hochspezifischen Bindung von Antikörpern zu ihrem Antigen werden sie vielfach therapeutisch, diagnostisch und analytisch eingesetzt.

Für den therapeutischen Bereich wurde der erste kommerzielle monoklonale Antikörper (mAK) Orthoclone OKT3 im Jahr 1986 zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen zugelassen. Im Jahr 2014 waren bereits 47 mAK auf dem Markt und der weltweite Umsatz betrug 85,4 Mrd. \$. Für 2024 wird eine weitere Steigerung auf 138,6 Mrd. \$ erwartet. Mit etwa einem Drittel des Marktanteils sind mAKs das dominierende biopharmazeutische Produkt und stellen den am schnellsten wachsenden Sektor der pharmazeutischen Industrie dar. Über 50 % der monoklonalen Antikörper werden zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt, wo sie aufgrund geringerer Nebenwirkungen die beste Alternative zur Chemotherapie und anderen Medikationen darstellen. Weitere Anwendungsgebiete sind die Behandlung von Autoimmun-, Infektions- und Entzündungserkrankungen sowie mikrobiellen Infektionen (Ecker et al. 2015; Global Industry Analytics Inc. 2015; Grand View Research 2016).

Neben dem therapeutischen Einsatz werden mAKs auch *in vitro* in der Diagnostik eingesetzt. Der globale Markt hat einen Umsatz von etwa 8 Mrd. \$. Diagnostische Assays dienen beispielsweise dem Nachweis von Infektionskrankheiten, Pathogenen, Toxinen, Krebs und Allergien sowie der Erfassung biologischer Marker und Hormone in Blutproben (Siddiqui 2010; Sean 2012).

Für Forschungszwecke werden Antikörper vor allem analytisch angewandt und wiesen 2014 einen weltweiten Umsatz von fast 2,2 Mrd. \$ auf, wobei für 2019 bis zu 3 Mrd. \$ vorausge-



sagt werden. Die Anzahl kommerziell verfügbarer Antikörper im Forschungssektor wird auf bis zu 2,2 Mio. von mehr als 300 globalen Vertreibern geschätzt. Einsatzgebiete sind beispielsweise *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays* (ELISA), Radio-Immuno-Assays (RIA), Western Blots, Durchflusszytometrie, Konfokalmikroskopie, Immunohistochemie, Immunofluoreszenz-Färbung und Proteinreinigung (Sean 2012; bcc Research 2015; Biocompare 2015).

2.1.2 Gewinnung von Antikörpern

Zur Herstellung von Antikörpern wurde früher das Immunsystem von Versuchstieren genutzt. Nach Injektion des Antigens produzierten diese verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Epitope dieses Antigens (Immunisierung). Durch Extraktion des Blutserums wurden diese polyklonalen Antikörper dann isoliert (Clark et al. 2009).

Im Jahre 1975 gelang erstmalig die Fusion von immortalen Myelomzellen (Krebszellen) mit Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten, die immortalisierte, Antikörper-produzierende Hybridom-Zelllinien ergab. Somit war es nach Immunisierung eines Versuchstiers mit dem gewünschten Antigen und Isolierung von dessen B-Zellen möglich, Zelllinien zu erzeugen, welche, zurückgehend auf eine einzelne durch Fusion erzeugte Hybridomzelle, identische Antikörper herstellen, die alle an dasselbe Epitop eines Antigens binden (monoklonale Antikörper, mAK) (Köhler und Milstein 1975).

Um bei der therapeutischen Anwendung Immunreaktionen des Patienten auf die körperfremden Proteine zu minimieren, wurden in der Folgezeit zuerst chimäre Antikörper mit humanen konstanten Domänen entwickelt und in rekombinanten Hybridom-Zellen produziert (Better et al. 1988; Weiner 2006). Später folgten dann auch vollständig humanisierte Antikörper, welche bis auf die tatsächliche Antigen-Bindestelle CDR (engl. *complementary determining regions*) ausschließlich aus humanen Antikörperstrukturen bestehen (Weiner 2006; Clark et al. 2009). Anfang der 1990er Jahre konnte schließlich die Entwicklung neuer Antikörper gegen gewünschte Antigene unabhängig von der Immunisierung von Versuchstieren durch *in-vitro*-Selektionsmethoden wie dem Phagen-Display etabliert werden (McCafferty et al. 1990). Hierbei werden aus großen Antikörpergenbibliotheken Fragmente von Antikörpern funktionell auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert und nach spezifischer Bindung an das Antigen isoliert und identifiziert (Dübel 2004). Die Produktion der so konstruierten Antikörper kann dann mittels rekombinanter DNA-Technologien in unterschiedlichen eu- und prokaryotischen Wirtsorganismen erfolgen (Frenzel et al. 2013)



2.1.3 Struktur von Antikörpern

Die Struktur eines Antikörpers erinnert an den Buchstaben Y (**Abb. 2.1**). Das Protein ist ein Hetero-Tetramer bestehend aus zwei leichten (engl. *light chain* oder *L chain*) und zwei schweren Ketten (engl. *heavy chain* oder *H chain*). Jede der Ketten ist wiederum unterteilt in eine konstante (engl. *constant*) Domäne (C_L bzw. C_H), welche die gleichbleibende Funktion des Effektor-Mechanismus sicherstellt, und eine variablen (engl. *variable*) Domäne (V_L bzw. V_H), die die Vielfalt der Bindungsspezifität gewährleistet (Edelman 1973). Alle Domänen weisen eine ähnliche Struktur bestehend aus zwei β -Faltblättern auf (Ramsland und Farrugia 2002; Murphy et al. 2012). Innerhalb der variablen Domänen V_L bzw. V_H existieren Sequenzen besonders hoher Variabilität, die als hypervariable Regionen oder *complementary-determining regions* (CDR) bezeichnet werden. Sie formen drei Loops, die im gefalteten Antikörper räumlich zusammen liegen und die komplementär zum Epitop geformte eigentliche Antigen-Bindestelle darstellen (Wu und Kabat 1970; Murphy et al. 2012). Die Bindung zwischen Epitop und bestimmten Aminosäureresten der CDR erfolgt nicht-kovalent über elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen (Davies und Cohen 1996; Murphy et al. 2012).

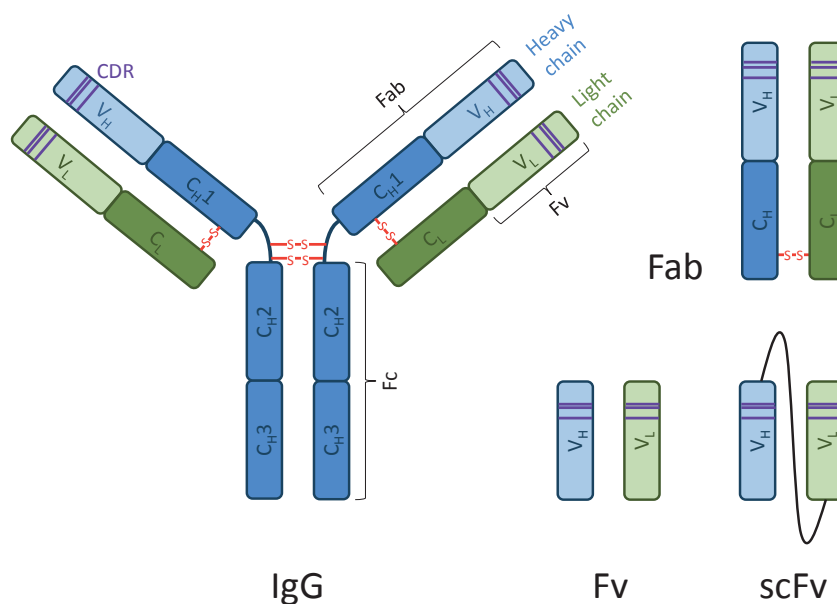


Abbildung 2.1: Struktur eines Immunglobulin G (IgG) sowie des *fragment antigen binding* (Fab), *fragment variable* (Fv) und *single chain Fv* (scFv). Die schwere Kette (engl. *heavy chain* oder *H chain*) in blau ist in die konstanten (engl. *constant*) Domänen C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} und die variable (engl. *variable*) Domäne V_H , die leichte Kette (engl. *light chain* oder *L chain*) in grün in die konstante Domäne C_L und die variable Domäne V_L unterteilt. Innerhalb der variablen Domänen liegen die drei Sequenzen besonders hoher Variabilität (engl. *complementary-determining regions*, CDR) zur Bindung des Antigens (hier in lila). Disulfidbrücken zwischen den Domänen sind in rot und der Peptidlinker des scFv in schwarz dargestellt (modifiziert nach Dübel 2004; Clark et al. 2009; Murphy et al. 2012).

Die fünf Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgG, IgM unterscheiden sich bezüglich ihrer schweren Ketten und somit in ihrer Effektor-Funktion. Etwa 75 % der im Blutplasma vorkommenden Antikörper gehören der häufigsten und typischsten Klasse IgG an. Hier ergibt