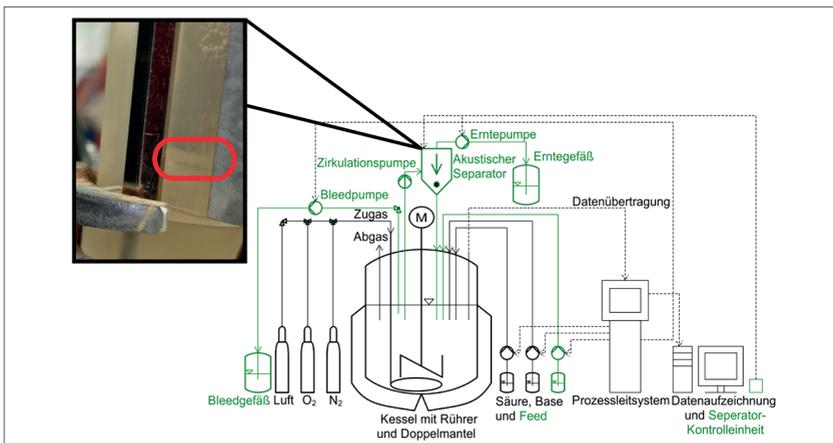


Lukas Paul Käßer

Entwicklung und Intensivierung eines Bioprozesses für die Produktion eines antimikrobiellen Peptids in einer stabilen *Sf - 9* Zelllinie



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 22

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

**Entwicklung und Intensivierung eines  
Bioprozesses für die Produktion eines  
antimikrobiellen Peptids in einer stabilen  
Sf - 9 Zelllinie**

Dem Fachbereich Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium - Dr. rer. nat.**

Dissertation vorgelegt von

**Lukas Paul Käßer**

geboren in Baden-Baden

Gießen, Juli 2021

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der Justus - Liebig - Universität Gießen, Deutschland.

**Dekan:**

Prof. Dr. Thomas Wilke

**Erstgutachter:**

Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

**Zweitgutachter:**

Prof. Dr. Andreas Vilcinskas

**Prüfer:**

Prof. Dr. Gerd Hamscher

**Prüfer:**

Prof. Dr. Kai Thormann

**Disputation:** 18.11.2021

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und  
Pharmazeutische Technologie

Band 22

**Lukas Paul Käßer**

**Entwicklung und Intensivierung eines Bioprozesses  
für die Produktion eines antimikrobiellen Peptids  
in einer stabilen *Sf* - 9 Zelllinie**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag  
Düren 2022

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2021

Copyright Shaker Verlag 2022

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8384-2

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus - Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, Juli 2021

---

Lukas Paul Käßer



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. - Ing. Peter Czermak für die gute Betreuung, den konstruktiven Rat, das Vertrauen und die ausgezeichnete Forschungsumgebung danken, ohne die die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (IBPT) an der Technischen Hochschule Mittelhessen (THM) nicht möglich gewesen wäre. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Vilcinskas für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Finanzierung meiner Promotionsstelle danke ich dem Land Hessen, der Landes - Offensive zur Entwicklung wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) sowie der Technischen Hochschule Mittelhessen.

Der Arbeitsgruppenleiterin der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik Frau Dr. - Ing. Denise Salzig und dem Arbeitsgruppenleiter der Untergruppe Insektenzellkultur Herrn Dr. Jan Zitzmann danke ich besonders für die intensive, kompetente und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Insbesondere für die fachlich exzellente, spannende und auch lustige Zusammenarbeit beim Aufbau der Versuchsanlage, die in einen kompletten Laborumbau mündete, danke ich Herrn Dr. Jan Zitzmann sehr.

Explizit möchte ich mich bei Frau Julie Harnischfeger bedanken, die immer mit Rat und Tat zur Stelle war, ohne die ich mir die Arbeit im Nachhinein nicht vorstellen kann und in der ich eine echte Freundin gefunden habe.

Ich danke Herrn Dr. Joel Eichmann für die Hilfe bei der Klonierung sowie Herrn Keven Lothert und Herrn Hauke Dieken für ihre Hilfestellung bei der Konzeptionierung der Aufreinigungsstrategie. Catharine Meckel - Oschmann danke ich für die Prüfung englischer Texte. Meinen Kollegen am Institut danke ich für die fachliche und auch praktische Unterstützung sowie für die moralische Unterstützung und Motivation.

Besonderer Dank gilt auch den Herren Maximilian Rotter und Luca Coletta, die mich im Rahmen ihrer studentischen Tätigkeiten und Abschlussarbeiten experimentell

unterstützt und auch an der Publikation *Process intensification of a perfusion process with a stable Sf-9 insect cell-line* mitgewirkt haben.

Meiner Großmutter Elfriede, die immer an mich glaubt, meinen Eltern Birgit und Uli, die mich immer unterstützen und meinen Brüdern Nils und Martin, die immer für mich da, sind danke ich von ganzem Herzen. Außerdem danke ich meiner Freundin Vanessa für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihr offenes Ohr während dieser Zeit. Mit einer solchen Familie im Rücken kann man nicht scheitern.

Für gute Ratschläge während meiner gesamten bisherigen Ausbildung und aufbauende Motivation während der Arbeit danke ich Herrn Dr. - Ing. Joachim Heck. Meinen Freunden Max, Sven und Daniel sowie Werner, Arthur, Burkhard, Udo, Konrad, Jochen und Pascal danke ich für die Ablenkung und die Hilfe dabei, den Kopf hin und wieder auch mal richtig freizubekommen.

## Kurzfassung

In Anbetracht der aktuellen Antibiotikakrise ist es wichtig, potentielle alternative Wirkstoffkandidaten in für die Forschung relevanten Mengen herzustellen und auch Prozesse für eine mögliche Produktion zu entwickeln. Antimikrobielle Peptide bieten vor diesem Hintergrund aufgrund ihrer Eigenschaften, der hohen Zahl bisher entdeckter neuer Stoffe sowie dem breiten Vorkommen in der Natur eine Chance im pharmazeutischen und medizinischen Bereich. Für die Produktion dieser antimikrobiellen Peptide wurde in dieser Arbeit eine stabile *Sf* - 9 Insektenzelllinie generiert, welche ein Fusionsprotein mit dem antimikrobiellen Peptid BR033 aus *Lucilia sericata* exprimiert. BR033 wurde in synthetisierter Form in der Vergangenheit als Wirkstoffkandidat erfolgreich gegen mehrere pathogene Erreger getestet. In dieser Arbeit wurde ein biotechnologischer Prozess zur Produktion von BR033 im 2 - L Maßstab im Satzbetrieb entwickelt. Bei der Prozessentwicklung lag das Augenmerk auf der Auswahl der Oxygenierungsstrategie sowie der Einbindung von *Process Analytical Technology*-Messtechnik, die eine tiefere Prozesskontrolle für eine anschließende Prozessintensivierung nach *Quality by Design* ermöglicht.

Mit Hilfe dieser Daten konnte der Prozess über akustische Separation in einem externen Kreislauf und Trübungsregelung hin zu einem Perfusionsprozess intensiviert werden. Dabei konnten auch bei einer Zellkonzentration von  $11 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter 98,5 - 100 % der Zellen im Kultivierungsgefäß zurückgehalten werden, die Prozessauslegung ermöglichte dabei eine durchgängig hohe Vitalität von > 90,5 %. Durch den kontinuierlichen Prozessmodus konnte die Produktivität und Raum - Zeit - Ausbeute um 180 % beziehungsweise 170% verbessert werden. Um zu zeigen, dass das rekombinant exprimierte antimikrobielle Peptid auch in aktiver Form produziert wird, wurde das Fusionsprotein aufgereinigt. Dabei wurde im ersten Aufreinigungsschritt eine 90 - fache Aufkonzentrierung erzielt, die Wiederfindung des gesamten *Downstreams* lag bei ~ 75 %. Nach der enzymatischen Abspaltung des antimikrobiellen Peptids von den Fusionsgruppen konnte eine inhibitorische Aktivität von ~ 20 % gegen *E. coli* demonstriert werden.

Schlagworte: antimikrobielles Peptid, *Sf* - 9, Prozessintensivierung, Perfusion, PAT, akustische Separation, rekombinante Proteinproduktion, Messen und Regeln

## Abstract

In view of the current antibiotic crisis, it is of importance to produce potential alternative drug candidates in relevant amounts for research and development and to develop processes for their production. Due to their properties, their vast number of discovered compounds, and their widespread occurrence in nature, antimicrobial peptides are good candidates for a use in the pharmaceutical and medicinal sector.

In this work, we generated a stably transformed *Sf*-9 cell line producing a fusion protein containing the antimicrobial peptide BR033 from *Lucilia sericata*, as in the past, synthesized BR033 was successfully tested as a drug candidate against multiple pathogens. Furthermore, we developed a biotechnological batch process for the production of recombinant BR033 on a 2 – L scale. For the process development, we concentrated on the selection of the oxygenation strategy and the integration of process analytical technology measurement techniques, in order to enable a more profound process control for a subsequent process intensification in accordance with the *Quality by Design* initiative.

By means of the obtained data, the process was intensified for perfusion via acoustic separation in an external loop, and a turbidimetry control. In this context, 98.5 – 100 % of the cells could be retained at a viable cell concentration of  $11 \times 10^6$  cells per milliliter, and the process set - up enabled a continuous high vitality of > 90.5 %. Due to the continuous process mode, productivity as well as the space-time-yield improved by 180 % and 170 %, respectively. As a proof for the production of an active recombinantly expressed antimicrobial peptide, the fusion protein was purified. The first purification step led to a 90 - fold concentration, and the recovery of the entire downstream process was at ~ 75 %. After an enzymatic separation of the antimicrobial peptide from the fusion groups, an inhibitory activity of ~ 20 % against *E. coli* could be shown.

Key Words: antimicrobial peptide, *Sf* - 9, process intensification, perfusion, PAT, acoustic separation, recombinant protein production, measurement and control

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>Formelzeichen .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation .....	1
1.2 Ziel der Arbeit .....	2
<b>2 Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
2.1 Antimikrobielle Peptide als potentielle pharmazeutische Wirkstoffe .....	4
2.1.1 Wirkmechanismen .....	4
2.1.2 Cecropine und BR033 .....	5
2.2 Insektenzellen als biotechnologische Fabriken .....	8
2.2.1 Sf - 9 Zelllinie .....	9
2.3 Expressionssysteme .....	10
2.3.1 Baculovirus Expressionssystem .....	10
2.3.2 Stabile Zelllinien .....	11
2.4 Expressionsplasmid .....	12
2.4.1 Backbone .....	12
2.4.2 Expressionskassette .....	15
2.5 Bioreaktor .....	16
2.6 Kultivierungsparameter für Insektenzellen .....	18
2.6.1 Durchmischung im Rührkesselreaktor .....	19
2.6.2 Temperatur und pH - Wert im Rührkesselreaktor .....	23
2.6.3 Gasaustausch in der Kulturbrühe .....	24
2.6.4 Nährstoffversorgung .....	31
2.6.5 Sterilität .....	32
2.7 Prozessmodi Satzbetrieb und kontinuierlicher Betrieb mit Zellrückhalt .....	33
2.8 Akustische Zellseparation .....	35
2.9 Monitoring - Tools nach der <i>Quality by Design</i> Initiative .....	37
2.10 Statistische Versuchsplanung .....	44
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.1 Molekularbiologie .....	46
3.1.1 Transformation .....	46
3.1.2 Plasmidisolierung .....	46
3.1.3 Enzymatischer Plasmidverdau .....	47

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.4	Agarose - Gelelektrophorese.....	48
3.1.5	Golden - Gate - Klonierung.....	49
3.1.6	DNA - Konzentrationsbestimmung.....	50
3.1.7	Sequenzierung.....	50
3.1.8	Dynamic Light Scattering zur Bestimmung der Größe von Lipopolyplexen.....	51
3.2	Biochemie.....	51
3.2.1	SDS - PAGE.....	51
3.2.2	Western Blot.....	52
3.2.3	Fluorometrie.....	53
3.2.4	Glukose und Laktatbestimmung.....	53
3.3	Zellkulturtechnik.....	54
3.3.1	Auftauen von Sf - 9 Zellen.....	54
3.3.2	Zellzählung mit Trypanblaufärbung.....	54
3.3.3	Zellzählung via Durchflusszytometrie.....	55
3.3.4	Stammhaltung und Passagieren von Sf - 9 Zellen.....	55
3.3.5	Einfrieren von Sf - 9 Zellen.....	55
3.3.6	Transfektion.....	56
3.3.7	Selektion.....	56
3.4	Charakterisierung des Bioreaktors.....	57
3.4.1	Mischzeit.....	57
3.4.2	Verweilzeit im Rezirkulationskreislauf.....	57
3.4.3	Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.....	58
3.4.4	Bestimmung des $k_{La}$ - Werts nach dynamischer Stickstoffdesorption.....	58
3.4.5	Setup für die Reaktorkultivierung im 1 - L Maßstab.....	58
3.4.6	Setup für die Reaktorkultivierung im 2 - L Maßstab.....	59
3.4.7	Erweiterung des Setups für den Perfusionsbetrieb.....	60
3.4.8	Berechnungen zur Produktbildung im Prozess.....	60
3.4.9	Vorkultur für das Animpfen einer Reaktorkultur.....	61
3.5	Aufreinigung.....	61
3.5.1	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie.....	61
3.5.2	Gelfiltration / Größenausschlusschromatographie.....	62
3.5.3	Thrombinverdau.....	62
3.6	Aktivitätsassay.....	63
3.7	Statistische Versuchsplanung zur Transfektionsoptimierung.....	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>65</b>
4.1	Klonierung.....	65
4.2	Transfektion.....	66
4.2.1	Vorversuche zur Lipopolyplexgröße.....	66
4.2.2	Screening zur Expressionseffizienz.....	69
4.3	Zelllinienentwicklung.....	73

4.3.1	Dosis - Wirkungs - Kurve von Zeocin™ .....	73
4.3.2	Selektion transifizierter <i>Sf - 9</i> Zellen .....	76
4.4	Medienadaption und Wachstumskinetik.....	77
4.5	Kultivierung im Bioreaktor .....	80
4.5.1	Versuche im 1 - L Maßstab im Satzbetrieb .....	81
4.5.2	Verfahrenstechnische Charakterisierung des Reaktorsystems im 2 - L Maßstab ...	87
4.5.3	Überlegungen zur Auslegung der Oxygenierungsstrategie im 2 - L Maßstab .....	91
4.5.4	Kultivierung von <i>Sf - 9 His<sub>td</sub>Tom_BR033p</i> in <i>Sf - 900™ II</i> im 2 - L Maßstab .....	94
4.5.5	Stabilitätstest der Regelung in Perfusionsbetrieb .....	102
4.5.6	Korrelation der <i>Online</i> - Messsignale mit der Zellkonzentration .....	103
4.5.7	Kontinuierliche Kultivierung im Prozessmodus Perfusion .....	105
4.6	Peptidaufreinigung.....	112
4.6.1	Fest - Flüssig - Trennung .....	112
4.6.2	Affinitätschromatographie.....	113
4.6.3	Pufferwechsel via Gelfiltration .....	115
4.6.4	Thrombinverdau und zweite IMAC .....	116
4.7	Aktivitätstest .....	120
4.7.1	Wachstum von <i>E. coli</i> K12 unter Einfluss des rekombinanten Peptids.....	121
4.7.2	Rekombinantes und synthetisiertes BR033 im Vergleich .....	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>124</b>
	<b>Erklärung zur Verwendung von Literatur .....</b>	<b>151</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>152</b>
	<b>Publikationen und Konferenzen .....</b>	<b>164</b>
	Veröffentlichungen in Büchern und Fachzeitschriften.....	164
	Konferenzbeiträge .....	164
	Sonstige Beiträge .....	164