

Weißer Biotechnologie bei Bayer HealthCare Product Supply: Mehr als 30 Jahre Erfahrung

Michael Schedel

Wichtige Projekte der Weißen Biotechnologie, die derzeit bei Bayer HealthCare Product Supply bearbeitet werden, reichen von der Fermentation von Sekundärstoffen über die Herstellung und den Einsatz von Ganzzell-Biokatalysatoren im Technikums- und Produktionsmaßstab bis zur Entwicklung und technischen Nutzung leistungsfähiger rekombinanter Expressionssysteme zur Gewinnung von Proteinwirkstoffen.

1 Einleitung

Die Abteilung Biotechnologie bei Bayer HealthCare Product Supply Pharma in Wuppertal blickt auf mehr als dreißig Jahre Erfahrung in nahezu allen Bereichen der biotechnischen Entwicklung und Produktion zurück [1, 2]. Die Abteilung beschäftigt etwa 100 hoch qualifizierte Mitarbeiter in 11 Laboratorien und in zwei Technika, in denen räumlich voneinander getrennt Zellkulturen und mikrobielle Produktionsstämme fermentiert werden.

Das zellbiologische Technikum konzentriert sich auf die GMP-Produktion monoklonaler Antikörper und komplexer rekombinanter Proteine in Fermentern bis zum 200-L-Maßstab und ist neben Batch- und Fed-Batch-Techniken auf die Kultivierung tierischer Zellen in Perfusionskulturen mit Zellrückhaltung spezialisiert; dadurch gelingt es, in einem vergleichsweise kleinen Arbeitsvolumen hohe Produkterträge zu erzielen.

Das für mikrobielle Verfahren ausgelegte Biotechnikum verfügt über die Maßstabebenen 30 L, 300 L, 3000 L und 40 000 L; in dieser Mehrzweck-Entwicklungs- und GMP-Produktionsanlage werden Fermentationen mit Bakterien, Hefen und Pilzen durchgeführt und die erzeugten Produkte aus den Fermentationsbrühen gereinigt. Beide Technika besitzen eine exzellente technische Ausstattung, die es erlaubt, regelungs- und steriltechnisch anspruchsvolle Verfahren auf allen Maßstabsebenen durchzuführen (s. Abb. 1).

Das Biotechnikum ist eine der größten Gentechnikanlagen in Nordrhein-Westfalen und angemeldet gemäß GenTG für Arbeiten mit rekombinanten Organismen der Sicherheitsstufe 1. Zur Vermeidung von Emissionen wird die gesamte Apparateabluft aus dieser Anlage der werkseigenen Verbrennungsanlage zugeführt. Das Prozessabwasser kann quaran-

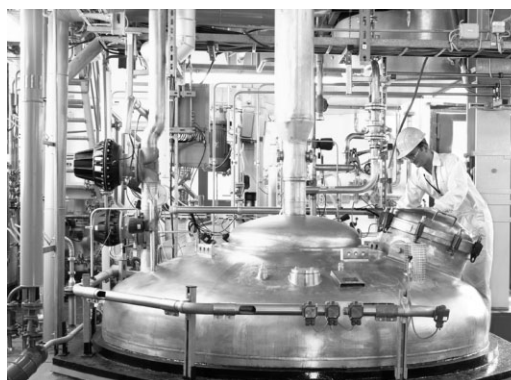


Abbildung 1. Technische Ausstattung im Biotechnikum bei Bayer HealthCare Product Supply Biotechnologie.

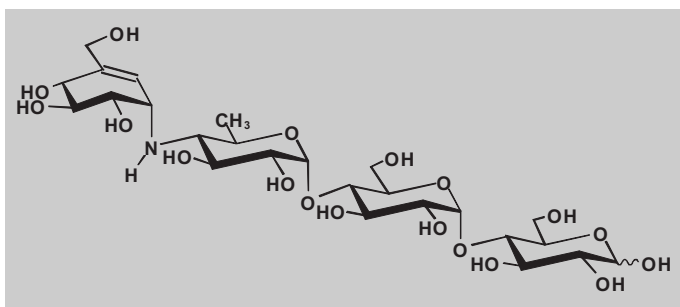


Abbildung 2. Acarbose.

tänisiert und – wenn benötigt – inaktiviert werden; es wird anschließend in die Werkskläranlage entsorgt.

Der Bereich zur Aufarbeitung der verschiedenen Bioproducte – vom niedermolekularen Sekundärstoff über mikrobielle Biomasse bis zum parenteral anzuwendenden Proteinwirkstoff – verfügt über alle hierzu notwendigen Apparaturen und die benötigten Räumlichkeiten und Reinräume. Er ist darüber hinaus explosionsgeschützt ausgelegt und erlaubt den Einsatz brennbarer Lösungsmittel im großen Maßstab. Die räumliche Nähe von Fermentation und Ex-Schutzbereich ermöglicht es, brennbare Flüssigkeiten als Substrate für die Kultivierung von Mikroorganismen oder für Biotransformationsverfahren einzusetzen.

Neben der Bearbeitung der verschiedenen Projekte aus der Bayer HealthCare-eigenen Pipeline bietet die Abteilung Biotechnologie ihr umfangreiches Know-how und die Entwicklungs- und Produktionsanlagen seit einigen Jahren erfolgreich auch externen Partnern für Lohnaufträge an.

Im Folgenden sollen an einigen aktuellen Beispielen speziell aus dem Bereich der Wei-

ßen Biotechnologie die Vielfalt und die sehr unterschiedlichen Anforderungen der in Wuppertal bearbeiteten Projekte dargestellt werden.

2 Acarbose

Acarbose ist der Wirkstoff des 1990 ausgebotenen oralen Antidiabetikums Glucobay® zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II (s. Abb. 2). Es handelt sich um ein Pseudo-Tetra-saccharid mit hoher Wirksamkeit als kompetitiver Inhibitor intestinaler Glucosidasen [3]. Die Gewinnung erfolgt durch Fermentation des fädigen Bakteriums *Actinoplanes spec.* Dieser Organismus wurde in den 1960er Jahren an der Universität Marburg isoliert und stammt aus einer Bodenprobe aus einer Kaffeeplantage in Kenia. Die mehrjährige Optimierung des Wildstammes durch klassische Mutation mit verschiedenen mutagenen Agenzien und Auswahl höher produzierender Selektanten ermöglichte es, Elitemutanten zu erzeugen mit einer im Vergleich zum Ausgangsstamm rund 500-fach höheren Produktausbeute.

Die Acarbose-Stammoptimierung gehört inzwischen zu den erfolgreichsten Beispielen für den Einsatz dieser klassischen Methode. Die großtechnische Fermentation von Acarbose ist als Fed-Batch-Prozess etabliert, die Isolierung des Wirkstoffs aus der Fermentationslösung erfolgt mit sehr spezifischen Chromatographieverfahren und liefert ein hochreines Wirkstoffprodukt. Die Produktion von Acarbose findet in Wuppertal in einem eigenen großen Monobetrieb statt.

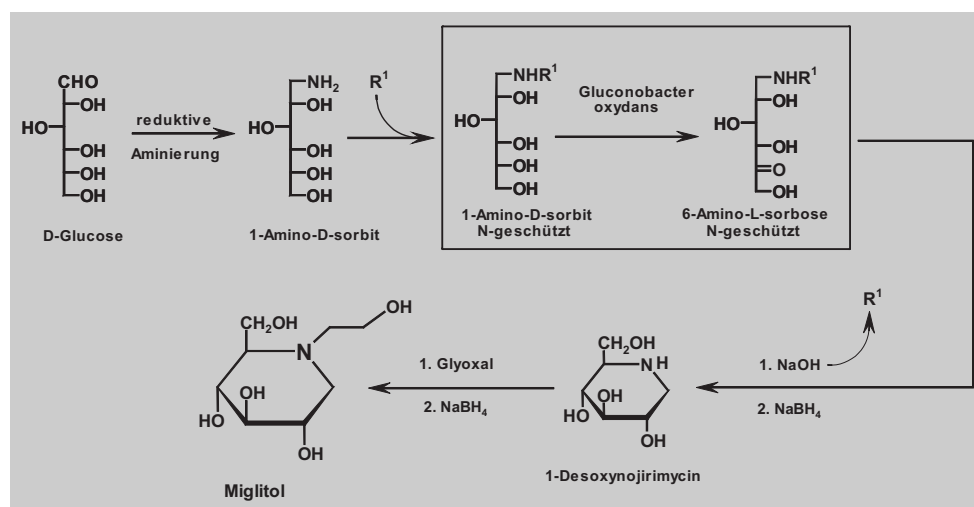


Abbildung 3. Biotransformation von D-Aminosorbit mit *Gluconobacter oxydans*, zentraler Schritt der Synthese des anti-diabetischen Wirkstoffs Miglitol.

3 Miglitol

Miglitol ist ein weiterer anti-diabetischer Wirkstoff, der in Wuppertal produziert wird. Seine Herstellung erfolgt durch eine elegante kombiniert biotechnologisch-chemische Synthese, deren zentraler Schritt die regio- und stereoselektive Oxidation von D-Aminosorbit zu L-Aminosorbose mit ganzen Zellen von *Gluconobacter oxydans* ist (s. Abb. 3) [4]. Dieses Verfahren hat Ähnlichkeiten mit der klassischen Vitamin C-Synthese, bei der die unvollständige Oxidation von D-Sorbit zu L-Sorbose durch *G. oxydans* angewandt wird.

Die Ganzzell-Biotransformation von D-Aminosorbit zu L-Aminosorbose erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird der benötigte Biokatalysator durch Fermentation in einer Sorbit-haltigen Nährlösung erzeugt, auf einem Tellerseparator aus der Kulturbrühe abgetrennt und als konzentrierter Biomassenschlamm zwischengelagert. Die eigentliche Biotransformation erfolgt pH-statiiert mit einer Lösung von D-Aminosorbit in Wasser. Um die Weiterreaktion der gebildeten L-Aminosorbose zu 3-Hydroxy-2-hydroxymethylpyridin und anderen Produkten zu verhindern, wird das Substrat D-Aminosorbit durch eine Schutzgruppe am Stickstoff blockiert. Die Einführung einer geeigneten Schutzgruppe am Stickstoff an C1 beeinträchtigt nicht die Fähigkeit von *G. oxydans*, Polyole an C5 gemäß der Bertrand-Hudson-Regel zu oxidieren.

Die D-Aminosorbit-Oxidation erlaubt ungewöhnlich hohe Raum-Zeit-Ausbeuten: Bis zu 500 kg/m^3 können in etwa 24 h zu mehr als 99 % umgesetzt werden. Die großtechnische Durchführung dieses Verfahrens hat einige für die Weiße Biotechnologie nicht untypische Aspekte: So gilt es, eine große Abwasserfracht mit einem hohen biologischen Sauerstoffbedarf aus der *Gluconobacter*-Fermentation zu entsorgen. Soll ferner die maximal mögliche Raum-Zeit-Ausbeute im Biotransformationsschritt erreicht werden, ist eine technisch sehr gut ausgelegte Fermentationsanlage notwendig, die einen hohen Sauerstoffeintrag (etwa $6 \text{ kg O}_2/\text{m}^3 \text{ h}$) und eine ausreichende Kühlkapazität (etwa 10 KW/m^3) gewährleistet. Die Biotransformationsreaktion in Wasser läuft vollständig entkoppelt ab und führt nahezu ausschließlich zur Bildung von Wärme. Hinzu kommt die Notwendigkeit für eine effektive und schnelle Handhabung der großen Menge an Feststoffsubstrat: Mit einem einzigen 40-m^3 -Ansatz können mehr als 10 t D-Aminosorbit umgesetzt werden, die in kurzer Zeit durch die Befüllöffnung im Kessel vorgelegt werden müssen. Schließlich muss die Stabilität des Ganzzellbiokatalysators während der Zwi-

schlenlagerung nach der *Gluconobacter*-Fermentation und auch bei der anschließenden Biotransformation sichergestellt werden.

4 *Escherichia coli*-Biokatalysatoren

In den zurückliegenden Jahren wurden im 3-m^3 - und im 40-m^3 -Fermenter mehrere rekombinante *E. coli*-Stämme für den großtechnischen Einsatz als Ganzzellbiokatalysatoren für enantioselektive Synthesen in der chemischen Produktion hergestellt. Es handelte sich durchweg um K12-Stämme, die ohne Antibiotikumzusatz, also ohne Selektionsdruck im großen Maßstab fermentiert und in der Regel unter Verwendung des lac-Promotors und Zusatz von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert wurden. In Hochzelldichte-Fermentationen wurden Zellausbeuten von rund 70 g Biotrockengewicht/L erreicht (s. Abb. 4), die spezifische Biokatalysatoraktivität lag dabei in den aus den Labor-Vorversuchen festgelegten Bereichen.

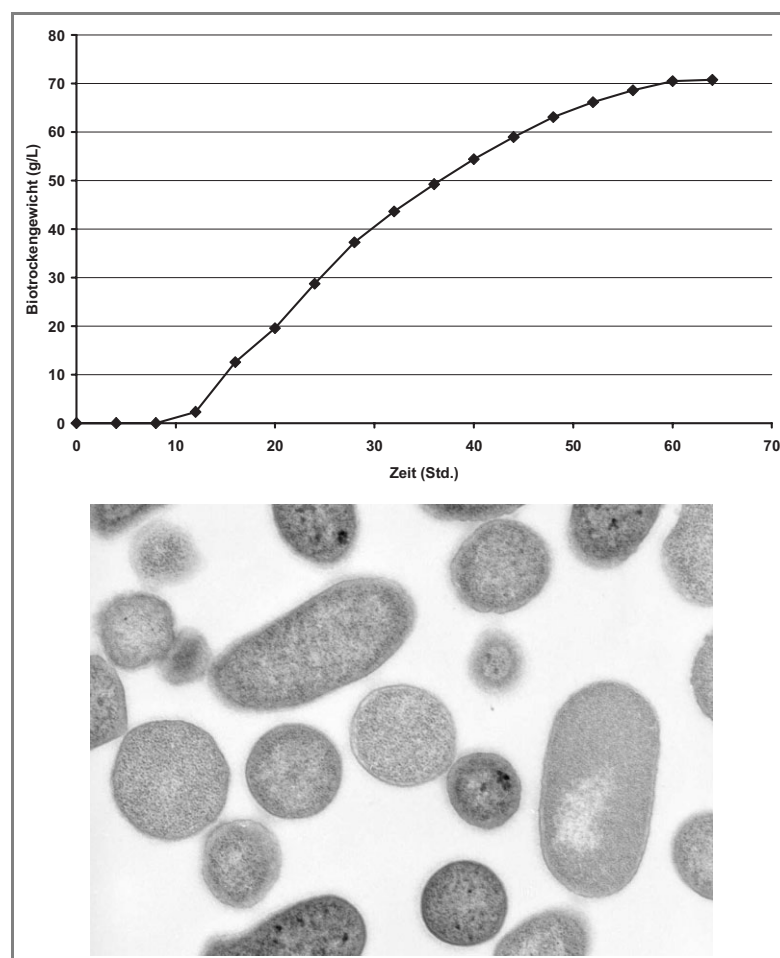


Abbildung 4. Hochzelldichte Fermentation eines rekombinanten *Escherichia coli*-Biokatalysators.

Die Herstellung natürlicher Aromen erfordert gemäß den gesetzlichen Regularien den Einsatz natürlicher Verfahren und die Verwendung natürlicher Einsatzstoffe.

Eine Fermentation im 40-m³-Kessel mit einem Arbeitsvolumen von 30 m³ liefert bei einer Trockengewichtsausbeute von 70 g/L mehr als 2 t Trockenbiomasse oder – nach Konzentrierung der Biomasse auf einem Separator – rund 12 m³ eines eben noch fließfähigen Zellschlammes. Da diese Ganzzellbiokatalysatoren portionsweise über Wochen und Monate in der enantioselektiven Synthese eingesetzt werden sollen, bestand die Aufgabe, die großen Schlammengen in einer technisch geeigneten Weise und möglichst ohne Aktivitätsverlust lange Zeit zu lagern. Sehr gute Ergebnisse wurden erzielt durch portionierte Abfüllung des Zellschlammes in verschlossenen, mit einem PE-Inliner ausgekleideten Metallfässern und Lagerung unter Kühlung bei ca. + 4 °C. In Langzeitversuchen ließ sich zeigen, dass auch nach einer Lagerdauer von mehr als 6 Monaten kein Aktivitätsverlust beim großtechnischen Einsatz aliquoter Portionen zu verzeichnen war.

5 Natürliche Aromastoffe

Ein weiteres Beispiel großtechnischer Verfahren bei BayerHealthcare Product Supply mittels der Weißen Biotechnologie ist die Gewinnung natürlicher Aromastoffe durch Biotransformationsprozesse [5]. Tab. 1 gibt eine Übersicht der in den letzten Jahren durchgeführten Verfahren. Die Gewinnung organischer Säuren, als solche oder als Ester wichtige Komponenten verschiedener Fruchtaromen, macht es erforderlich, die entsprechenden Alkoholsubstrate – allesamt brennbare Flüssigkeiten – im vielfachen Kubikmetermaßstab in einem Ex-geschützten Bereich bereitzustellen

	<p>Methylketone Produziert aus Milchfett mit Sporen von <i>Penicillium roqueforti</i>; Freisetzung der Fettsäuren, Oxidation zu β-keto-Säuren, Decarboxylierung</p>
	<p>gamma-Decalacton Produziert aus Rizinolsäure mit <i>Candida lipolytica</i> Freisetzung der Fettsäuren, β-Oxidation zu 4-Hydroxydecanolacton, Lactonbildung</p>
	<p>Vanillin Produziert aus Ferulasäure mit <i>Amycolatopsis spec.</i> Addition von Wasser, Abspaltung von Essigsäure</p>
	<p>Organische Säuren Oxidation des jeweiligen Alkohols mit <i>Gluconobacter spec.</i></p>

Table 1. Biokatalytische Produktion natürlicher Aromastoffe im industriellen Maßstab.

und über eine geschlossene Leitung submerser wachsenden *Gluconobacter*-Kultur zuzuführen. Wie oben erläutert verfügt das Biotechnikum über die hierfür notwendige technische Ausrüstung.

Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Herstellung von natürlichem Vanillin aus Ferulasäure durch Biotransformation mit *Amycolatopsis spec.*, chemisch gesehen die Addition eines Wassermoleküls und die Abspaltung von Essigsäure. Die Herstellung natürlicher Aromen erfordert gemäß den gesetzlichen Regularien den Einsatz natürlicher Verfahren und die Verwendung natürlicher Einsatzstoffe. Die hier eingesetzte Ferulasäure wird beispielsweise aus der aus Reiskleie gewonnenen Ölfraction hergestellt. Ferulasäure ist eine Vorstufe des Lignins und in Pflanzen weit verbreitet. Die Produktion natürlicher Aromen muss – da in der Regel der US-Markt von besonderer Bedeutung ist – unter Koscher-Bedingungen durchgeführt werden. Die sorgfältige Einhaltung dieser Qualitätsanforderungen im Biotechnikum wird in routinemäßigen, etwa halbjährlich erfolgenden Inspektionen durch einen Rabbi überprüft.

6 Mikrobielle Expressionssysteme

Bayer HealthCare verfügt über besondere Erfahrungen in der Entwicklung leistungsfähiger Expressionsverfahren zur Herstellung von Proteinwirkstoffen aus rekombinanten Mikroorganismen (z. B. *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*). Aktuelles Beispiel hierfür ist die Entwicklung eines technischen Verfahrens zur Produktion von Aprotinin, einem seit vielen Jahren aus Rinderlunge extrahierten und gereinigten Wirkstoff für den Einsatz im Krankenhaus bei Operationen am offenen Herzen [6].

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die genannten Beispiele zeigen die große Breite der Weißen Biotechnologie bei Bayer HealthCare Product Supply. Die erfolgreiche Bearbeitung solcher unterschiedlicher Prozesse setzt neben einer umfassenden Projekterfahrung weitere Gegebenheiten voraus: gut ausgebildete und motivierte Mitarbeiter, eine exzellent funktionierende interdisziplinäre Zusammenarbeit, eine dem Stand der Technik entsprechende und gut gepflegte technische Ausrüstung im Fermentations- und Aufarbeitungsbereich, geeignete Organisationsstrukturen für das notwendige Nebeneinander von Forschung und Verfahrensentwicklung auf der einen Seite und großtechnischer Routinepro-

duktionen mit ihrer hohen Anforderung an Konsistenz und Reproduzierbarkeit auf der anderen Seite. Mehr als 30 Jahre Erfahrung in der Biotechnologie bei Bayer HealthCare haben diese Voraussetzungen geschaffen und die Basis aufgebaut für die effektive Bearbeitung neuer Projekte und anspruchsvoller Verfahren.

Eingegangen am 26. Januar 2006

Dr. M. Schedel

(michael.schedel@bayerhealthcare.com),
Bayer HealthCare AG, Product Supply Pharma,
Biotechnologie, Geb. 226, Friedrich-Ebert-Straße
217, D-42096 Wuppertal, Germany.

Literatur

- [1] M. Schedel, *PharmaChem* **2004**, July/August, 4.
- [2] B. Boedeker, *PharmaChem* **2005**, July/August, 10.
- [3] D. Schmidt et al., *Naturwissenschaften* **1977**, 64, 535.
- [4] M. Schedel, in *Biotechnology Second, Completely Revised Edition* (Eds: H.-J. Rehm, G. Reed), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, 8b, 295.
- [5] I. L. Gatfield, in *Jahrbuch Biotechnologie, Band 2* (Eds: P. Präve, M. Schlingmann, W. Crüger, K. Esser, R. Thauer, F. Wagner), Carl Hanser Verlag, München, **1988**, 2, 319.
- [6] D. Royston, *Blood Coagulation Fibrinolysis* **1990**, 1, 55.