



Doctoral Thesis

## Development of a novel two-stage process for the production of the lantibiotic gallidermin

**Author(s):**

Medaglia, Giovanni

**Publication Date:**

2009

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005925427> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 18310

**Development of a novel two-stage process for the production  
of the lantibiotic gallidermin**

A dissertation submitted to the  
ETH Zürich

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
Giovanni Medaglia  
Dipl. Natw. ETH Zürich

born on January 28<sup>th</sup>, 1978  
citizen of Camorino (TI), Switzerland

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Sven Panke (ETH Zürich, Switzerland), examiner  
Prof. Dr. Martin Fussenegger (ETH Zürich, Switzerland), co-examiner  
PD Dr. Wolfgang Minas (Biotech Concepts GmbH, Switzerland), co-examiner

2009

## Abstract

The increasing number of multidrug resistant pathogens has reached a crisis point in many hospitals around the world and the number of available antibiotics to combat them is steeply declining. Therefore, the development of new antimicrobial agents is absolutely necessary.

Lantibiotics are an emerging class of natural compounds with great clinical potential for the treatment of multidrug resistant infections. They are ribosomally synthesized peptide bacteriocins produced by a variety of Gram-positive bacteria, which undergo characteristic posttranslational modifications. They are particularly active against Gram-positive bacteria such as *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* and multiresistant Staphylococci. Nevertheless, none of the characterized lantibiotics has been developed into a pharmaceutical product. The major obstacle to this is the difficulty of obtaining them in sufficient amounts to perform the necessary clinical tests. This problem is mainly due to the low titers that are obtained in lantibiotic fermentations, which are presumably generally hampered by self-toxicity. Attempts to address this problem with classical process engineering approaches such as *in situ* product removal were successful in increasing the volumetric productivity, but generally failed to provide increases of the final titer, which is crucial in the design of an economic process.

In earlier work, we had laid the foundations for a novel two-step approach for the production of the type A-lantibiotic gallidermin, a 22 amino acids long peptide produced by the non-pathogenic *Staphylococcus gallinarum* Tü3928. Rather than the toxic gallidermin, we aimed at producing the non-toxic precursor pregallidermin by the mutant strain *S. gallinarum*  $\Delta P$  that lacks the final enzyme in the gallidermin production pathway, the protease GdmP. In a second step, the precursor is proteolytically activated *in vitro* after the production.

As tested in liquid cultures, the mutant strain was no longer subject to product toxicity at least up to a pregallidermin level of 4 g L<sup>-1</sup>. Therefore, pregallidermin production could be treated as a peptide overproduction problem in a non-standard host. First, we developed a high cell density cultivation protocol based on a complex medium that permitted the accumulation of pregallidermin to 1.23 g L<sup>-1</sup>, corresponding to 0.780 g L<sup>-1</sup> gallidermin, a 2.5-fold improvement over previous processes. In a subsequent step, a further improvement was obtained through the development and optimization of a defined medium, which allowed accumulation of pregallidermin to an equivalent

gallidermin concentration of 1.49 g L<sup>-1</sup>. Particularly important was the identification of the essential nutrients for growth and pregallidermin production, which was followed by balancing of their concentrations with respect of the biomass composition in a series of chemostats. The defined medium allowed to implement a feed protocol based on carbon limitation and thus to avoid acetate formation, which was problematic in complex medium fermentations.

Since this production strategy needs an additional step to obtain the mature gallidermin from the non-toxic precursor, another important process requirement was the development of an efficient enzymatic activation step. This could be performed with the commercially available serine protease trypsin, which could efficiently substitute GdmP. We investigated various strategies to integrate this hydrolysis in an existing efficient purification strategy for gallidermin and found that the production of pregallidermin requires adaptation of some steps such as the conditions for its capturing and partial purification. Moreover, some additional chromatographic materials were necessary for the separation of gallidermin from the leader peptide and from trypsin after tryptic digest. In conclusion, we have demonstrated that the final gallidermin titer could be significantly increased by eliminating the problem of product inhibition. Further effort is now required to transfer this process to industrial scale. This work contributed substantially to the development of a novel pharmaceutical grade antibiotic with potential for the treatment multidrug-resistant infections. Due to the highly homologous production pathways of many lantibiotics, the same strategy can probably be applied to other lantibiotics.

## Riassunto

Il numero crescente di patogeni multiresistenti ha raggiunto un punto di crisi in molti ospedali nel mondo, mentre il numero di antibiotici a disposizione per combatterli è in rapida diminuzione. Per questo motivo è necessario sviluppare nuovi agenti antimicrobici. I lantibiotici, un'emergente classe di composti naturali con grande potenziale per il trattamento di infezioni multiresistenti, sono prodotti della sintesi ribosomale in numerosi batteri Gram-positivi e sono sottoposti a modificazioni post-traslazionali, che si manifestano nella formazione di amminoacidi inusuali, quali la lantionina e la metillantionina. I lantibiotici sono biologicamente attivi contro altri batteri Gram-positivi quali *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* e Staphylococchi multiresistenti.

Tuttavia finora nessun lantibiotico è stato sviluppato in un prodotto clinico a causa della generale difficoltà a ottenerne quantità sufficienti per condurre test clinici. Il maggior ostacolo è il basso titer di produzione dovuto alla loro tossicità verso gli stessi ceppi produttori. In passato sono stati fatti vari tentativi per migliorarne la produttività volumetrica, senza tuttavia mai sfociare in un aumento rilevante della loro concentrazione finale, che costituisce un importante parametro per l'economia dell'intero processo di produzione.

In precedenza, nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato le basi per una nuova strategia di produzione per la gallidermina, un lantibiotico di tipo A formato da 21 amminoacidi e prodotto dal batterio apatogeno *Staphylococcus gallinarum* Tü3928. La nostra strategia si basa su una produzione a due stadi. Nella prima fase l'effetto tossico della gallidermina è evitato grazie alla produzione di un suo precursore inattivo, la pregallidermina, prodotta dal ceppo mutante *S. gallinarum*  $\Delta P$  che non esprime la proteasi GdmP, responsabile per la conversione della pregallidermina in gallidermina attiva. Nella seconda fase la pregallidermina è attivata separatamente *in vitro*.

In base a test condotti in culture liquide, è emerso che la pregallidermina non presentava effetti tossici contro il suo produttore fino a una concentrazione di  $4 \text{ g L}^{-1}$ , pertanto la sua espressione in abbondanza può essere considerata come un normale problema di sovrapproduzione di peptidi in un ospite inusuale. Abbiamo dapprima sviluppato un protocollo di produzione ad alta densità cellulare in un mezzo di coltura a base di estratto di lievito, dove è stato possibile raggiungere una concentrazione di pregallidermina pari a  $1.23 \text{ g L}^{-1}$ . Questo valore equivale a  $0.780 \text{ g L}^{-1}$  del composto

attivo gallidermina, che corrisponde a un aumento di 2.5 volte (in termini molari) rispetto ai massimi valori raggiunti in processi precedenti. In seguito, abbiamo ottenuto un ulteriore aumento del titer grazie allo sviluppo di un processo basato su un mezzo di coltura definito, dove per il composto attivo il massimo valore raggiunto è stato di 1.49 g L<sup>-1</sup>. Fondamentale è stata in questo caso l'identificazione delle sostanze essenziali per la crescita del batterio e per la produzione del peptide, seguita da un bilanciamento delle loro concentrazioni rispetto alla biomassa in una serie di chemostati. In particolare è stato possibile implementare un protocollo di alimentazione con una limitazione di carbonio, permettendo di evitare l'eccessiva formazione di acetato che caratterizzava le fermentazioni condotte in mezzi di coltura complessi.

Siccome la nuova strategia di produzione richiede un passaggio supplementare per ottenere la gallidermina partendo dal suo precursore, è stato necessario sviluppare un processo enzimatico di attivazione, il quale è stato condotto con la tripsina, una serin proteasi commerciale che può sostituire efficacemente la GdmP nell'idrolisi della pregallidemina. Abbiamo esaminato diverse strategie per l'integrazione di questa reazione in un processo di purificazione efficacemente sviluppato in precedenza e abbiamo scoperto che per la produzione di pregallidermina è indispensabile modificare alcuni passaggi, come le condizioni per una sua purificazione parziale. Inoltre alcuni materiali cromatografici supplementari sono stati necessari per la separazione della gallidermina dal leader peptide e dalla tripsina dopo la reazione enzimatica.

In conclusione, abbiamo dimostrato la possibilità di aumentare ampiamente il titer di produzione grazie all'eliminazione della tossicità della gallidermina. Ulteriori sforzi sono tuttora necessari per trasferire questo processo su scala industriale. Questo lavoro ha contribuito notevolmente allo sviluppo di un nuovo antibiotico con grande potenziale per il trattamento di infezioni multiresistenti. Giacché la biosintesi dei lantibiotici è altamente conservata, la stessa strategia potrebbe essere applicata ad altre molecole appartenenti alla stessa classe di batteriocini.