Zellfreie Proteinsynthese

Neue Systeme zur Antikörperherstellung

MARLITT STECH¹, OLGA NIKOLAEVA^{1, 2}, STEFAN KUBICK¹

¹ ABTEILUNG ZELLFREIE UND ZELLBASIERTE BIOPRODUKTION, FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR ZELLTHERAPIE UND IMMUNOLOGIE (IZI), INSTITUTSTEIL BIOANALYTIK UND BIOPROZESSE (IZI-BB), POTSDAM

² INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE, MEDIZINISCHE BIOTECHNOLOGIE, TU BERLIN

Antibodies are indispensable tools for therapy and diagnostics. Here, we present a novel technique that allows for an accelerated synthesis of functionally active antibodies. This is achieved by using a cell-free translation system based on mammalian cells.

DOI: 10.1007/s12268-017-0851-z
© Springer-Verlag 2017

■ Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems, da sie in der Lage sind, molekulare Zielstrukturen hochspezifisch zu erkennen und zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich für verschiedene medizinische Anwendungen zunutze, z. B. bei der Behandlung von Krebs. Durch ihre Fähigkeit, Tumorzellen von gesunden Zellen zu unterscheiden, haben sich Antikörper bereits seit vielen Jahren in der Klinik etabliert und sind

im letzten Jahrzehnt zu einer tragenden Säule der zielgerichteten Krebstherapie geworden.

Die Suche nach dem „richtigen“ Antikörper für die Erkennung eines bestimmten Antigens, z. B. eines tumorspezifischen Zelloberflächenproteins, gleicht der Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Trotz der technologischen Fortschritte der letzten Jahre sind die Entwicklungszeiten von Antikörpern immer

noch sehr lang, durchschnittlich sechs Jahre, und die damit verbundenen Kosten entsprechend hoch [1, 2]. Doch woher rühren die langen Entwicklungszeiten? Die Pipeline zur Entwicklung eines einzigen Antikörperkandidaten umfasst eine komplexe Abfolge ineinandergreifender Technologien. Alles beginnt mit dem Target und seiner Validierung, gefolgt von der Selektion geeigneter Antikörpersequenzen, bis hin zu deren Optimierung und Charakterisierung [3]. Die beiden letztgenannten Schritte erfordern die Expression des Antikörpers und seine Aufreinigung. Es müssen Zelllinien entwickelt und Scale-up-Verfahren der Produktion etabliert werden. Herkömmliche Verfahren zur Expression von Antikörpern basieren auf der Verwendung lebender Zellen als Proteinproduzenten. Hierbei wird die Antikörper-codierende Gensequenz in eine geeignete Zelllinie eingebracht. Trotz der weiten Verbreitung dieser Methode sehen sich die Forscher in der Praxis jedoch mit verschiedenen Schwierigkeiten konfrontiert, denn die meisten Methoden, die auf der Handhabung lebender Zel-

◀ **Abb. 1:** Zellfreie Antikörper-synthese im eukaryotischen *in vitro*-Translationssystem. Die zur Proteinsynthese benötigten Komponenten (Zelllysate, Aminosäuren, Energieregulationssystem sowie die Antikörper-codierende DNA bzw. mRNA) werden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und für wenige Stunden inkubiert. Verschiedene Antikörperformate, hier IgG, scFv-Fc und scFv werden ko-translational in ER-basierte Mikrosomen transloziert, in denen die Faltung und Assemblierung der Antikörper unter optimalen Bedingungen stattfindet.

len beruhen, sind mit einem äußerst hohen personellen und apparativen Aufwand verbunden. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass die besten Antikörperkandidaten für eine Weiterentwicklung noch vor ihrer Testung wieder verworfen werden. Dementsprechend hoch ist der Bedarf an alternativen Verfahren, die den Durchsatz erhöhen und Zeit einsparen können. Eine Alternative zur zellbasierten Antikörperexpression bietet die zellfreie Proteinsynthese, ein Verfahren, bei dem Antikörper nicht wie herkömmlich in lebenden Zellen, sondern künstlich in einer definierten und artifiziellen Umgebung hergestellt werden. Der große Vorteil dieser Vorgehensweise liegt zum einen in der enormen Zeitersparnis und zum anderen in der Möglichkeit, die Synthesen hochparallelisiert und automatisiert durchzuführen. Somit können in kurzer Zeit viele Antikörpervarianten getestet werden, um die optimale zu finden. Diese kann dann sowohl „klassisch“ (*in vivo*) als auch zellfrei (*in vitro*) als Therapeutikum produziert werden.

Zellfreie Proteinsynthese: Antikörperproduktion *just in time*

Zellfreie Proteinsynthesesysteme basieren auf der Verwendung der zellinneren molekularen Maschinerie zur Herstellung von Proteinen, wie z. B. Ribosomen, Translationsfaktoren und Enzyme. Durch spezielle Zellaufschlussverfahren können Zelllysate gewonnen werden, die diese Bestandteile in ihrer funktionell aktiven Form enthalten, auch wenn die Zelle als solche nicht mehr existiert [4]. Die Synthese des Zielproteins, hier des Antikörpers, wird durch die Zugabe der Antikörper-codierenden Sequenz gestartet, und man erhält das „fertige“ Protein innerhalb weniger Stunden (**Abb. 1**). Anstatt die zur Expression verwendeten Zellen kontinuierlich kultivieren zu müssen, werden Zelllysate im großen Maßstab chargenweise hergestellt, in gefrorenem Zustand gelagert und bei Bedarf und ohne weitere Vorbehandlung zur Antikörpersynthese eingesetzt, wobei die Proteinsynthese innerhalb von drei bis 24 Stunden abläuft. Da zellfreie Synthesen als „offene“ Reaktionen ablaufen, kann die Antikörper-codierende DNA oder mRNA direkt in die in Lösung stattfindende Reaktion eingebracht werden. Ebenso kann auf die Generierung zirku-

lärer DNA-Templates verzichtet werden, da zellfreie Synthesen klonierungsfrei und sehr effizient bei Verwendung linearer Templates, wie z. B. PCR-Fragmente, ablaufen.

Säugerzelllysate für die zellfreie Antikörpersynthese

Die Verwendung zellfreier Systeme zur Herstellung von Antikörpern hat eine lange Historie [5]. Heutzutage ist es sogar möglich, komplexe Antikörperformate bis in den Liter-Maßstab hinein zu synthetisieren [6]. Bisher waren bakterielle Zelllysate im Fokus der Forschung, da diese kostengünstig zu generieren und hochproduktiv sind. Bakterielle Zelllysate haben jedoch den Nachteil, dass sie gerade bei komplexen Proteinen an ihre Grenzen stoßen, da einige Proteine aggregieren, sich nicht richtig falten und wichtige posttranslationale Modifikationen nicht dargestellt werden können. Antikörper sind komplexe, eukaryotische Proteine, die sich *in vivo* im endoplasmatischen Retikulum (ER) von B-Zellen assemblieren und vielfältige posttranslationale Modifikationen erhalten. Aus diesem Grund hat sich unsere Arbeitsgruppe auf die Entwicklung zellfreier Translationssysteme spezialisiert, die aus eukaryotischen Zellen gewonnen werden und eben jene zellulären Kompartimente enthalten, die auch *in vivo* zur Antikörperentstehung notwendig sind. Das von uns entwickelte System basiert auf der Verwendung von Zellextrakten, die aus einer hochproduktiven Säugerzelllinie gewonnen werden [7, 8]. Hierbei fiel die Wahl auf CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary cells*), da diese die am weitesten verbreitete Zelllinie zur Produktion von Antikörpern sind. Durch besonders milde Zellaufschlussverfahren ist es möglich, CHO-Zelllysate zu generieren und dabei gleichzeitig Strukturen des ER in Form von Vesikeln (Mikrosomen) zu erhalten. Wird der herzustellende Antikörper mit einer geeigneten Signalsequenz fusioniert, wird er während seiner Synthese direkt in das Innere der Mikrosomen transloziert, wo seine Faltung und Assemblierung unter optimalen Bedingungen stattfinden kann (**Abb. 1**). Da Antikörper aus vier separaten Polypeptidketten bestehen, ist der Schritt der richtigen Assemblierung besonders kritisch. Neben der

Abb. 2: Zellfreie Synthese verschiedener Antikörperformate im eukaryotischen *in vitro*-Translationssystem. **A**, Signalpeptid-induzierte Translokation *de novo* synthetisierter Antikörperfragmente (scFv-Format) in das Lumen ER-basierter Mikrosomen. Die mikroskopische Aufnahme zeigt die mit einem fluoreszierenden Reporter (enhanced yellow fluorescent protein, eYFP) fusionierten Antikörperfragmente im Lumen der Mikrosomen. **B**, Autoradiogramm zum Nachweis der zellfrei synthetisierten Antikörperkonstrukte, hier IgG und scFv-Fc (red.: reduzierende SDS-PAGE; nicht-red.: nicht-reduzierende SDS-PAGE; HC: heavy chain). **C**, Nachweis der Funktionalität zellfrei hergestellter Antikörper mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). **D**, Charakterisierung zellfrei hergestellter Antikörper mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Schema rechts). Das Sensorgramm (links) zeigt die spezifische Bindung der getesteten Antikörper an das Antigen.

Assemblierung der Ketten und ihrer kovalenten Verknüpfung über Disulfidbrücken ist auch die Faltung der einzelnen Immunglobulinodomänen entscheidend für die Funktionalität des Proteins. Die Strategie, Antikörper schon während ihrer Synthese in Mikrosomen zu translokieren, hat den Vorteil, dass die benötigten Enzyme und Faltungshelfer in den Mikrosomen bereits von Hause aus enthalten sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass die in den Mikrosomen eingeschlossenen Antikörper nach der Synthese über einen einfachen Zentrifugationsschritt vom löslichen Teil des Lysats abgetrennt werden können. Die Antikörper-enthaltenden Mikrosomen werden hierfür unter Verwendung nicht-ionischer Detergenzien und milder Pufferlösungen resuspendiert, und die freigesetzten Antikörper können danach direkt im Hinblick auf ihre Antigen-bindenden Eigenschaften untersucht werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Antikörper-

formate, darunter auch kleinere Binder wie Einzelketten-Antikörperfragmente (scFvs), im zellfreien CHO-System in ihrer funktionell aktiven Form herstellbar sind (Abb. 2, [9]). Im gleichen Zuge bietet das verwendete zellfreie System hervorragende Möglichkeiten zur Modifizierung der Antikörper mit nicht-kanonischen Aminosäuren, die ko-translational und ortsspezifisch in die Proteinsequenz eingebaut werden können (Abb. 3, [10]). Damit ergeben sich vielseitige Möglichkeiten, Antikörper z. B. mit Fluoreszenzfarbstoffen zur Visualisierung oder mit Wirkstoffen zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika zu entwickeln (antibody-drug conjugates). Darüber hinaus kann das System, ähnlich wie eine lebende Zelle, Zuckerstrukturen an Proteine anfügen. Diese in zellfreien eukaryotischen Systemen durchführbaren Glykosylierungsreaktionen beeinflussen die Wirkung des Antikörpers als Therapeutikum, da Glykosylierungen in dem

Bereich des Antikörpers zu finden sind, der später im Patienten mit Zellen des Immunsystems wechselwirkt.

Ausblick

Das hier vorgestellte neue Verfahren zur Antikörperherstellung vereint die Vorteile der zellfreien Technologie mit den positiven Eigenschaften einer Säugerzelllinie. Darüber hinaus bietet das entwickelte System die Möglichkeit, Antikörper durch den Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren an definierten Positionen zu markieren, was sowohl das Monitoring im Hinblick auf die Biodistribution als auch die Generierung von Antikörper-Wirkstoff-Kandidaten entscheidend verbessert.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt unseren Kolleginnen und Kollegen am Fraunhofer IZI-BB, Dana Wenzel, Lena Thoring, Doreen A. Wüs-

▲ Abb. 3: Aminosäure- und ortsspezifischer Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren in *de novo* synthetisierte Antikörper. Mithilfe von vorbeladenen tRNAs, die direkt zur zellfreien Proteinsynthesereaktion hinzugegeben werden, können Antikörper ko-translational an multiplen Positionen oder an einer definierten Position mit einer nicht-kanonischen Aminosäure markiert werden. Die Abbildung zeigt zwei In-Gel-Fluoreszenz-Aufnahmen von Antikörpern, die mit Bodipy-TMR-Lysin fluoreszenzmarkiert wurden.

Literatur

- [1] Pohl-Apel G (2011) Monoklonale Antikörper: Vielseitige Moleküle in Therapie und Forschung. *BIOspektrum* 1:116–117
- [2] Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM (2010) Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9:767–774
- [3] Shih HH (2012) Discovery Process for Antibody-Based Therapeutics. In: Tabrizi MA, Bornstein GG, Klakamp SL (Hrsg) *Development of Antibody-Based Therapeutics: Translational Considerations*. Springer, New York, S 9–32
- [4] Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C et al. (2015) Cell-free protein synthesis: pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *Chembiochem* 16:2420–2431
- [5] Stech M, Kubick S (2015) Cell-free synthesis meets antibody production: a review. *Antibodies* 4:12–33
- [6] Yin G, Garces ED, Yang J et al. (2012) Aglycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable *in vitro* transcription-translation system. *MAbs* 4:217–225
- [7] Thoring L, Wüstenhagen DA, Borowiak M et al. (2016) Cell-free systems based on CHO cell lysates: optimization strategies, synthesis of „difficult-to-express“ proteins and future perspectives. *PLoS One* 11:e0163670
- [8] Brödel AK, Sonnabend A, Kubick S (2013) Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 111:25–36
- [9] Stech M, Nikolaeva O, Thoring L et al. (2017) Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled *in vitro* transcription-translation system based on CHO cell lysates. *Sci Rep* 7:12030
- [10] Quast RB, Mrusek D, Hoffmeister C et al. (2015) Cotranslational incorporation of non-standard amino acids using cell-free protein synthesis. *FEBS Lett* 589:1703–1712

Korrespondenzadresse:

Dr. Stefan Kubick
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI)
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB)
Am Mühlenberg 13
D-14476 Potsdam
Tel.: 0331-58187306
Fax: 0331-58187199
stefan.kubick@izi-bb.fraunhofer.de

tenhagen und Dr. Walter Stöcklein. Ebenso bedanken wir uns bei unseren Kooperationspartnern, Prof. Dr. Stefan Dübel und Prof. Dr. Michael Hust von der Technischen Universität Braunschweig und Jörg Schenk von der

UP Transfer GmbH/Hybrotec GmbH (Potsdam-Golm). Die finanzielle Unterstützung des Projektes erfolgte durch Mittel des BMBF (Nr. 031B0078A) und des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE).

AUTOREN

Marli Stech

2005–2010 Biotechnologiestudium (Bachelor und Master) an der Beuth Hochschule für Technik Berlin. 2011–2014 Promotion an der Universität Potsdam im Fachbereich Biochemie, in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Institutsteil für Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB) in Potsdam-Golm. Seit 2015 Postdoktorandin am Fraunhofer IZI-BB in Potsdam-Golm in der Abteilung „Zellfreie und Zellbasierte Bioproduktion“. Seit Oktober 2017 Teilnahme am Fraunhofer TALENTA Programm.

Olga Nikolaeva

2007–2017 Studium der Medizinischen Biotechnologie an der TU Berlin. Seit 2017 Diplomarbeit am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Institutsteil für Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB) in Potsdam-Golm in der Abteilung „Zellfreie und Zellbasierte Bioproduktion“.

Stefan Kubick

1987–1993 Biologie- und Chemiestudium an der Universität Stuttgart-Hohenheim, dort 1997 Promotion am Institut für Physiologie. 1998–2000 Postdoc in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Schultz am Institut für Pharmakologie der FU Berlin. 2000–2009 Senior Scientist bei der RiNA GmbH, Berlin. 2010–2014 Leiter der Nachwuchsforschungsgruppe „Zellfreie Proteinsynthese“ am Fraunhofer-Institut in Potsdam-Golm. 2014–2015 Leiter der Arbeitsgruppe „In vitro Proteinmarkierung“, seit 2015 Leiter der Arbeitsgruppe „Zellfreie Proteinsynthese“ und seit 2016 Abteilungsleiter der Abteilung „Zellfreie und zellbasierte Bioproduktion“ am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse Potsdam-Golm (IZI-BB). Seit 2016 Vorstandsvorsitzender des Glyconet Berlin-Brandenburg. Dozent an der Beuth Hochschule für Technik Berlin (University of Applied Sciences), der FU und der TU Berlin und der Universität Potsdam.