

Peptidsynthese

Eine rekombinante Produktionsplattform für Peptide

BACH-NGAN NGUYEN¹, LUTZ SCHMITT², CHRISTIAN SCHWARZ¹

¹NUMAFERM GMBH, DÜSSELDORF

²LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE I, FACHBEREICH CHEMIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

The production of peptides as active pharmaceutical ingredients (APIs) by recombinant technologies is of emerging interest. A reliable production platform, however, is still missing due to inherent peptide characteristics such as proteolytic sensitivity, aggregation, and cytotoxicity. We developed a new approach – Numaswitch™. It solves present limitations and provides a cost-efficient production platform for diverse peptides and hard-to-be-expressed proteins.

DOI: 10.1007/s12268-021-1650-0

© Die Autorinnen und Autoren 2021

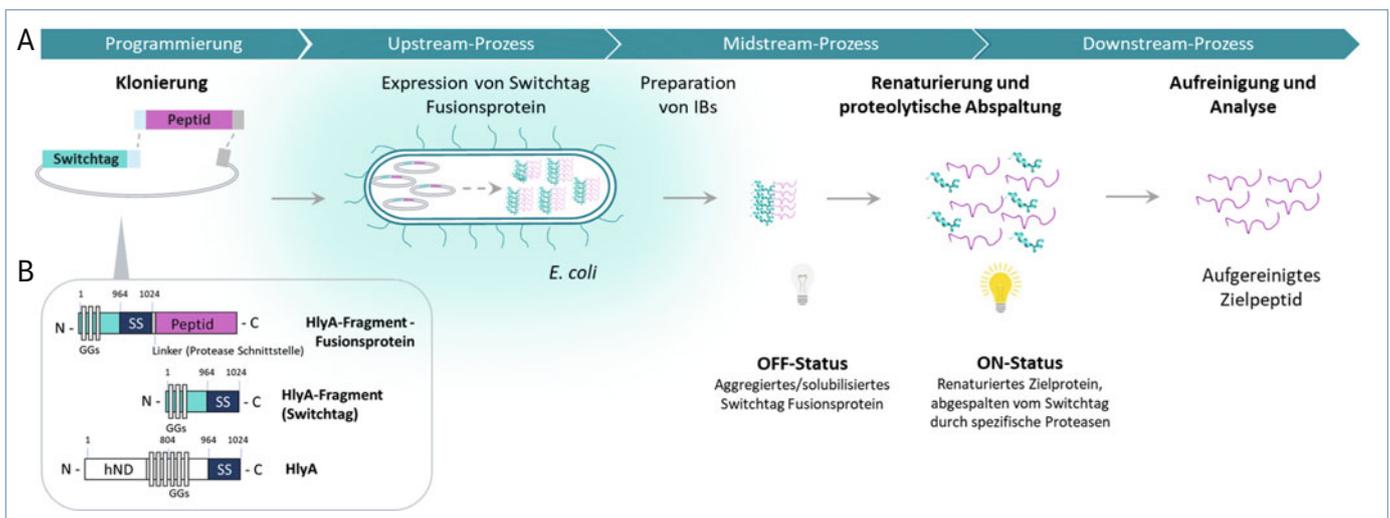
Die Bedeutung von Peptiden als Wirkstoffe nimmt stetig zu. Rund fünf Prozent aller *active pharmaceutical ingredients* (APIs) sind Peptide und das Marktvolumen betrug im Jahr 2018 rund 25 Milliarden US-Dollar, Tendenz steigend [1].

Gegenwärtig werden ca. 85 Prozent aller Peptide über chemische Synthesen hergestellt. Der Materialaufwand, darunter als bedenklich eingestufte Chemikalien und organische Lösungsmittel, schlechte Prozess-

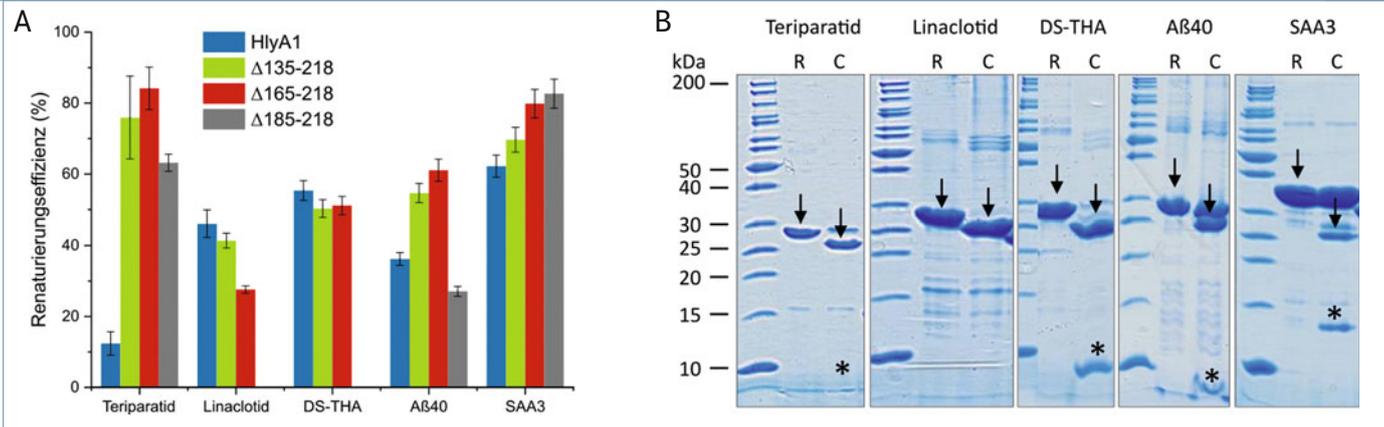
skalierbarkeit sowie hohe Produktionskosten schränken einen breiten kommerziellen Einsatz ein. Im Gegensatz zu vielen Proteinen sind Peptide rekombinant schwierig zugänglich. Aufgrund ihrer proteolytischen Sensitivität und Aggregationsneigung können oftmals nur geringe Produkttiter (100 mg/l Bereich) erzielt werden [2, 3].

Mit der Numaswitch-Technologie (Abb. 1A) werden die genannte Limitierungen chemischer Synthesen und verfügbarer rekombi-

nanter Expressionssysteme auflöst. Dazu werden Fragmente des *repeat-in-toxin* (RTX)-Proteins Hämolyisin (HlyA) genutzt. Diese beinhalten eine unterschiedliche Anzahl an *GG repeats*, Ca²⁺-Ionen-bindende Domänen mit K_D-Werten im µM-Bereich. Werden HlyA-Fragmente cytoplasmatisch in *Escherichia coli* exprimiert (c[Ca²⁺]: ca. 100 nM), findet keine Ca²⁺-Bindung statt und die HlyA und HlyA-Fragmente bilden aufgrund ihres instabilen Zustands *inclusion bodies* (Ibs) [4]. Unsere Studien haben gezeigt, dass extrahierte und solubilisierte Ibs in Ca²⁺-haltigen Puffern quantitativ renaturieren, also in wasserlösliche, funktionale Formen überführt werden konnten. Offensichtlich dienen die *GG repeats* als eine Art molekularer Schalter, der sich durch die Ab- bzw. Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen abschalten (Aggregation) bzw. anschalten (Löslichkeit) lässt. Hinsichtlich der natürlichen Funktion von HlyA erscheint die Schaltbarkeit sinnvoll. HlyA ist ein membranpermeabilisierendes Protein, das mittels eines Typ-1-Sekretionssystems aus dem Cytoplasma von *E. coli* ohne periplasmatisches Intermediat in den Kulturüberstand sezerniert wird. Ein C-terminales Sekretionssignal bindet dabei an einen Membranproteinkomplex bestehend aus dem *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter Hämolyisin B (HlyB) und dem Membransfusionsprotein Hämolyisin D (HlyD), woraufhin das *outer membrane protein* (OMP) TolC rekrutiert wird. Energetisiert wird der Transport durch ATP-Hydrolyse. Erst außerhalb der Zellen, wo die



▲ Abb. 1: Schematische Darstellung der Numaswitch-Technologie sowie Hämolyisin (HlyA) und HlyA-(Peptid)-Fragmenten, die als rekombinantes Expressionssystem genutzt werden und *inclusion bodies* (Ibs) bilden. **A,** Numaswitch-Technologie. Switchtag-Peptide werden genetisch in einen Expressionsplasmid eingebracht und anschließend in *Escherichia coli* als Ibs exprimiert. Die präparierten Ibs werden nun in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen quantitativ renaturiert. Nun werden Peptide mithilfe von Proteasen abgespalten. **B,** HlyA und HlyA-Fragmente. HlyA besteht aus drei funktionalen Domänen: Eine hydrophobe N-terminale Domäne (hND), der RTX-Domäne mit GG repeats und einem C-terminalen Sekretionssignal (SS, ~ 60 AA).



▲ Abb. 2: Repräsentative Renaturierungs- und proteolytische Abspaltungsdaten. **A,** Renaturierungseffizienzen von HlyA-Fragment-Peptid-Fusionsproteinen. **B,** SDS-PAGE-Analyse vor und nach proteolytischer Abspaltung. Pfeile markieren die Fusionsproteine nach Renaturierung (R) und HlyA-Fragmente nach der Abspaltung (C). Die Positionen der Peptidbanden (außer die von Linaclotid) sind markiert (*).

Tab. 1: Freigabeanalytik von Teriparatid

Eigenschaften	Spezifikation	Gemessen
Identität (4117,7 Da)	103 0,4 [M+4H] ⁴⁺	1030,4 [M+4H] ⁴⁺
Peptid Mapping (aa)	23-30, 23-34, 5-22, 5-19	Bestätigt
Reinheit (%)	(≥ 95)	99,6
Brutto-/Nettogewicht (%)	> 80	88,7
AA/TFA/CI (mol%)	> 95% AA	96/3/1
Endotoxine	< 5 EU/mg	< 0,4 EU/mg
rHCP	<500 ng/mg	< 100 ng/mg
rHCD	<200 pg/mg	< 10 pg/mg
Funktionalität	Bestätigt nach WHO standard	

Ca²⁺-Konzentration hoch ist (mM), faltet HlyA und nimmt seine permeabilisierende Funktionalität an. Da HlyA in gefalteter Form zu groß ist (> 100 kDa), um durch die äußere Membran zur Cytoplasmamembran zu gelangen, wird *E. coli* durch diesen Mechanismus geschützt [4].

Etablierung der Numaswitch-Technologie

In unseren Studien wurde untersucht, ob HlyA-Fragmente als bifunktionaler Protein-Tag für die Produktion von Peptiden und kleinen Proteinen genutzt werden können. Dazu wurden HlyA-Fragmente generiert, die sich in der Größe und Anzahl an *GG repeats* unterscheiden, und die mit Peptiden und kleinen Proteinen verschiedener Größen (1,5–12,3 kDa) und physikochemischen Eigenschaften fusioniert wurden (**Abb. 1B**). Bei der Expression in *E. coli* BL21 (DE3) bildeten sich erwartungsgemäß Ibs. Nach der Extraktion und Überführung in gelöste Ibs durch chaotrope Reagenzien, wurde die Renaturierung in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen überprüft. Wie erhofft, konnten wir

unser Konzept belegen und tatsächlich fand eine quantitative Renaturierung der HlyA-Fragmente statt (**Abb. 2A**). So können die Vorteile von Ibs, hohe Expressionstiter, hohe initiale Reinheiten und Produktschutz, nutzbar und die größte Limitierung, die ineffiziente Renaturierung, umgangen werden. Wir nennen die entwickelte Technologie Numaswitch (von „Schalter“) und die HlyA-Fragmente mit den bifunktionalen Eigenschaften Switchtag-Proteine. Die Zielpeptide konnten nach der Renaturierung durch spezifische Proteasen effizient vom Tag abgespalten werden (**Abb. 2B**).

Produktion von Teriparatid im Gramm-Maßstab

Die Anwendbarkeit und Alleinstellung von Numaswitch im Pilotmaßstab wurde anhand des Peptids Teriparatid getestet. Hierzu wurden Protokolle für die Hochzelldichte-Fermentation, die Extraktion und Renaturierung der Ibs, ein Aufreinigungsprotokoll und entsprechende Freigabeanalytik etabliert. So gelang es, das Fusionsprotein Switchtag-Teriparatid quantitativ zu renaturieren, Teri-

paratid quantitativ vom Tag abzuspalten und mehr als 2 g lyophilisiertes Teriparatid in API-Qualität pro Fermentationsliter herzustellen (**Tab. 1**). Verglichen zu gegenwärtigen Herstellmethoden entspricht dies einer ca. 20fachen Ausbeutesteigerung, und dies ohne den Einsatz von Affinitäts- oder HPL-Chromatographien.

Fazit

Es wurde gezeigt, dass Numaswitch eine hocheffiziente Expressionsplattform für die Produktion von Peptiden und kleinen Proteinen mit unterschiedlicher Länge und physikochemischen Eigenschaften darstellt. Sie überwindet Limitierungen gegenwärtiger Strategien und ermöglicht hohe Ausbeuten hochreiner Peptidprodukte mit einfachen, standardisierbaren, robusten Prozesse. ■

Literatur

- [1] Henninot A, Collins JC, Nuss JM (2018) The current state of peptide drug discovery: back to the future? *J Med Chem* 61: 1382–1414
- [2] Isidro-Llobet A, Kenworthy MN, Mukherjee S et al. (2019) Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: from R&D to production. *J Org Chem* 84: 4615–4628
- [3] Wegmuller S (2014) Recombinant peptide production in microbial cells. *Curr Org Chem* 18: 1005–1019
- [4] Lecher J, Schwarz CKW, Stoldt M et al. (2012) An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure* 20: 1778–1787

Funding note: Open Access funding enabled by Numafarm GmbH.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Christian Schwarz
 NUMAFERM GmbH
 Merowingerplatz 1A
 D-40225 Düsseldorf
 Christian.Schwarz@numafarm.com
<https://numafarm.com>