

Biopharma-Zelllinienentwicklung

Plasmazellen als Blaupause für die moderne Biopharmakaherstellung

NIKOLAS ZEH^{1,2}, NADJA RAAB^{1,3}, KERSTIN OTTE¹

¹ INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE (IAB), HOCHSCHULE BIBERACH

² BOEHRINGER INGELHEIM, BIBERACH

³ NOVARTIS PHARMA GMBH, KUNDL, ÖSTERREICH

Chinese hamster ovary (CHO) cells are the workhorse for industrial production of biotherapeutics, like monoclonal antibodies (mAbs). They are derived from ovarian tissue and therefore not specialized for the production of therapeutic mAbs. Contrastingly, plasma cells of the immune system are evolutionary specialized for high-end mAb synthesis. Taking nature as blueprint, we compared naturally specialized plasma cells to CHO cells, by big-data omic analyses, to improve industrial CHO cells.

DOI: 10.1007/s12268-022-1827-1

© Die Autorinnen und Autoren 2022

Zu den modernen Biopharmaka zählen neben RNA- und Zelltherapeutika auch rekombinante Proteine, wie beispielsweise therapeutische Antikörper für die Behandlung verschiedener Tumor- und Autoimmunerkrankungen. Diese rekombinanten Proteine werden mithilfe von Produktionszelllinien hergestellt. Am häufigsten werden CHO-Zellen (CHO: *chinese hamster ovary*) verwendet, da diese zum einen sehr robust sind, die komplexen Proteine aber gleichzeitig auch effizient und in guter Qualität herstellen können [1]. Mithilfe rekombinanter DNA-Technologie wird die genetische Information für das jeweilige Protein in die CHO-Zellen eingebracht (transfiziert), welche

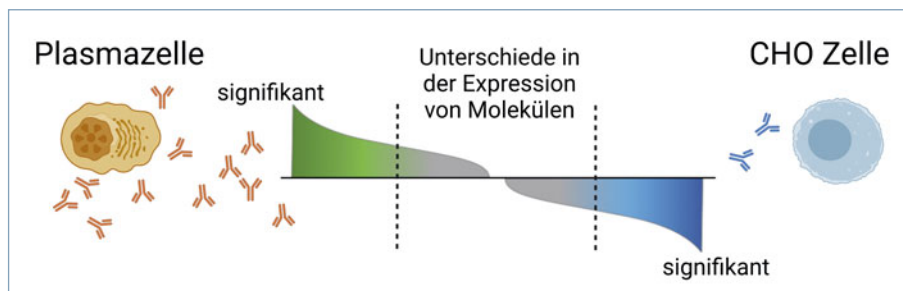
dann in der industriellen Produktion in mehreren zehntausend Litern umfassenden Fermentationsanlagen kultiviert, überwacht und mit Nährstoffen versorgt werden. Die produzierten Proteintherapeutika werden nachfolgend gereinigt und konfektioniert. Obwohl gerade zu Beginn der industriellen Herstellung therapeutischer Antikörper die Produktion mithilfe von CHO-Zellen eher ineffizient war, konnte sie im Lauf der vergangenen Jahrzehnte massiv verbessert werden, um der steigenden Nachfrage gerecht zu werden [2]. Derzeit entwickelt die Forschung kontinuierlich neue Proteinformate, u. a. auch künstliche Antikörperderivate oder virusbasierte Gentherapien, die potenter gegen bis-

her unheilbare Krankheiten wirken. Gerade diese artifiziiellen Proteine sind häufig von CHO-Zellen nur schwer herstellbar, falt- oder sekretierbar, was zu einer stark verminderten Ausbeute während der Fermentation führt. Um diese Probleme zu lösen, bedarf es gezielter Optimierungen der Produktionszelllinien.

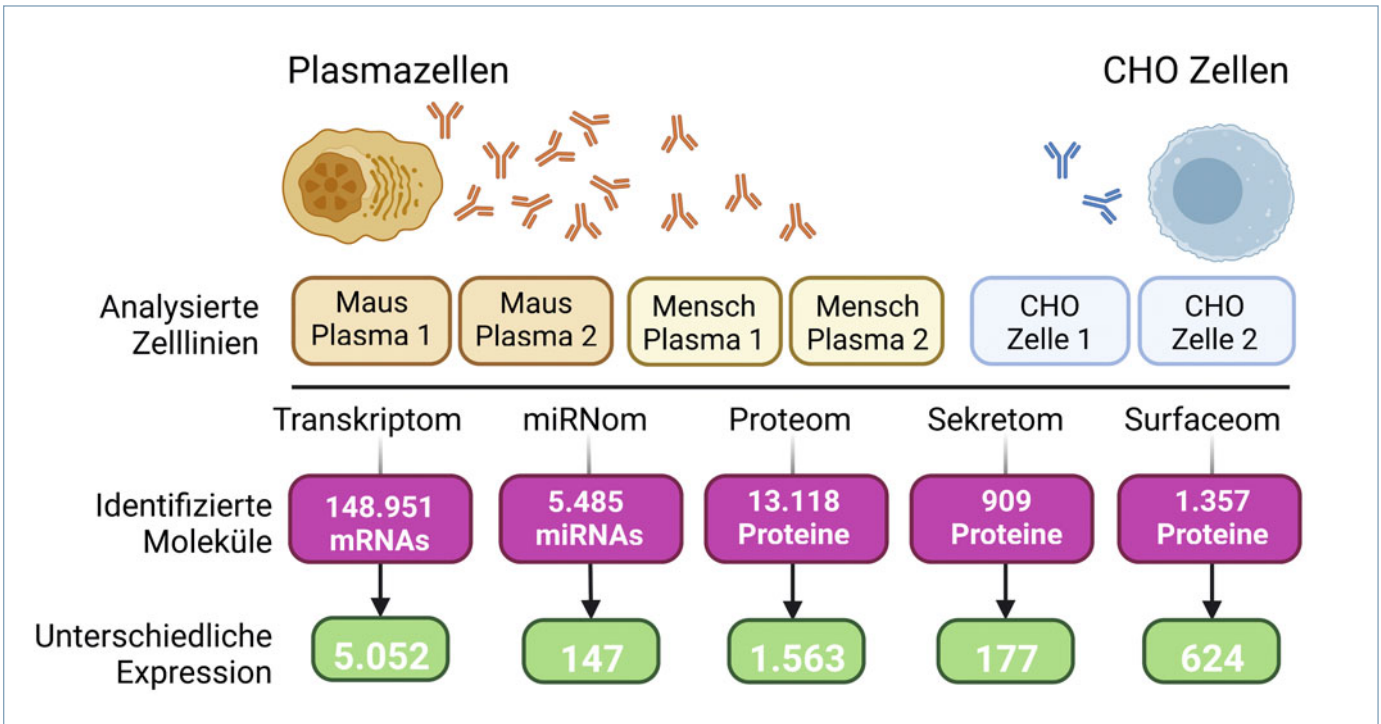
Grundsätzlich sind CHO-Zellen sehr gute Expressionswirte, welche während der Fermentation zu hohen Zelldichten wachsen, auf große Volumina skaliert werden können und einfach genetisch modifiziert werden können [3]. Allerdings sind CHO-Zellen von Natur aus Ovarienzellen und daher nicht auf die Herstellung großer Proteinmengen spezialisiert. Um CHO-Zellen für die Produktion therapeutischer Proteine zu optimieren, können diese gezielt genetisch verändert werden. Das Einbringen neuer Gene kann die Zellen beispielsweise befähigen, Proteine effizienter zu exprimieren, zu falten, oder auch zu sekretieren. Alternativ können nachteilige Gene in der Produktionszelle durch molekulare Genschere wie CRISPR-Cas9 ausgeschaltet oder mittels RNA-Interferenz herunterreguliert werden. Ziel ist hierbei immer die verbesserte CHO-Zelle zu Herstellung hoch komplexer, auch artifiziieller Proteine.

Plasmazellen als Blaupause für die Antikörperproduktion

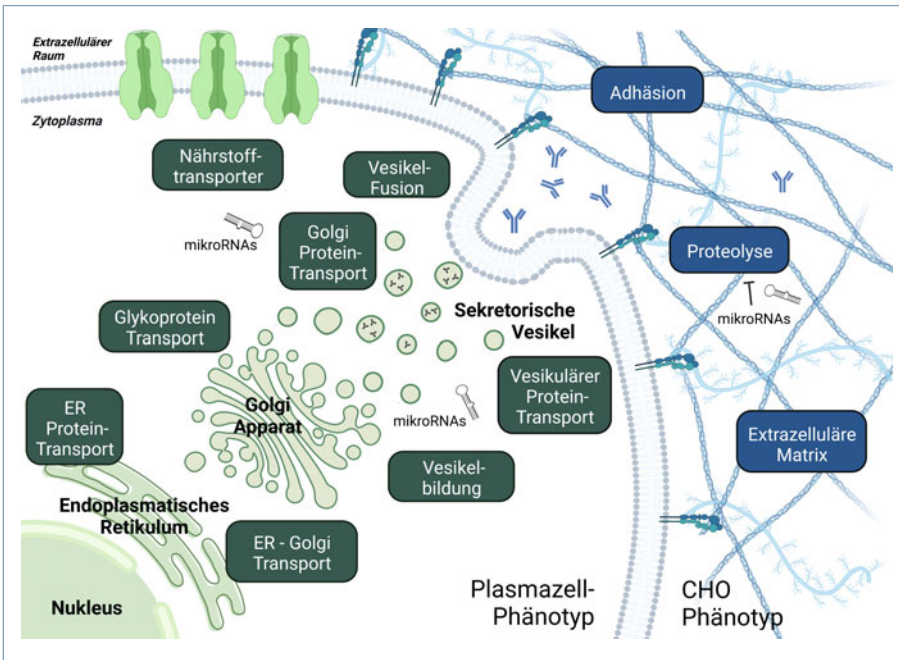
Plasmazellen wurden im Lauf der Evolution über Millionen Jahre darauf spezialisiert, enorme Mengen Antikörper von hoher Qualität für unsere Immunabwehr zu produzieren. Welche genetischen und molekularen Voraussetzungen dieser Fähigkeit zugrunde liegen, ist heute bereits gut erforscht. Kernpunkte sind eine stark vergrößerte zelluläre Produktions- und Sekretionsmaschinerie für Antikörper, welche durch ein genetisches Plasmazellprogramm generiert wird [4]. Nahezu unerforscht sind hingegen die molekularen Unterschiede zwischen diesen natürlichen Antikörperproduzenten und CHO-Produktionszellen (Abb. 1). Um die unspezialisierten CHO-Zellen produktiver und damit ressourcen- und kosteneffizienter zu machen,



▲ Abb. 1: Identifizierung molekularer Unterschiede zwischen Plasma- und CHO-Zellen. Hierzu wurde die unterschiedliche Expression von verschiedensten biologischen Molekülen durch Omics-Analysen untersucht und bioinformatisch ausgewertet.



▲ **Abb. 2:** Differenziell vorkommende biologische Moleküle zwischen Plasma- und CHO-Zellen. Initial identifizierte Moleküle wurden mittels bioinformatischer und statistischer Methoden auf den signifikant differenziell exprimierten Anteil zwischen CHO- und Plasmazellen heruntergebrochen.



▲ **Abb. 3:** Plasma- und CHO-Zell-spezifische Signalwege. In Plasmazellen sind beispielsweise Moleküle der Sekretionsmaschinerie überrepräsentiert (grün) während CHO-Zellen sich durch eine stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix und enorme Mengen sekretierter Proteine auszeichnen (blau).

sind diese molekularen Unterschiede von enormem Interesse.

Die modernen Omics-Analysemethoden eignen sich für diese Fragestellung beson-

ders. Der Begriff „omic“ ist vom Griechischen abgeleitet und beschreibt die Betrachtung einer Gesamtheit [5]. Mithilfe dieser Analysen können die gesamten RNAs (Transkrip-

tom und miRNom) und Proteine (Proteom, Sekretom, Surfaceom) einer Zelle analysiert werden (**Abb. 1**).

Während das Transkriptom alle gencodierenden mRNA-Moleküle zusammenfasst, stellt das miRNom eine Untergruppe des Transkriptoms dar. MikroRNAs sind, wie der Name bereits vermuten lässt, sehr kleine Moleküle bestehend aus ca. 21 Nukleotiden. Trotz ihrer bescheidenen Größe haben sie einen enormen Einfluss auf die globale Genexpression einer Zelle. So kann eine einzige mikroRNA die Expression mehrerer hundert Gene verhindern [6]. Genau diese Eigenschaft der Regulation gesamter Genetzwerke macht mikroRNAs auch für die Veränderung und Optimierung von industriellen Produktionszelllinien äußerst interessant. Ähnliches gilt für die Gesamtheit der Proteine: Während das Proteom alle Proteine einer Zelle umfasst, sind das Sekretom und Surfaceom zelluläre Protein-Untergruppen, die für die Entwicklung besserer Produktionszelllinien sehr wertvoll sein können.

Für die Omics-Analysen in unserem Projekt wurden die gesamten molekularen Unterschiede in der Expression aller oben genannten Gruppen zwischen Plasma- und CHO-Zellen untersucht. Dafür wurden die Moleküle aus CHO- und Plasmazellen isoliert, experimentell analysiert und resultie-

rende Daten bioinformatisch ausgewertet und quantitativ verglichen (**Abb. 2**).

Aus den ursprünglich insgesamt 148.951 detektierten mRNA-Transkripten, 5.485 mikroRNAs, 13.118 intrazellulären Proteinen, 909 sekretierten und 1.357 Oberflächenproteinen wurde eine Vielzahl an unterschiedlich (differenziell) vorhandenen Molekülen herausgefiltert. Daraus ergeben sich 5.052 mRNA-Moleküle, 147 mikroRNAs und insgesamt 2.364 Proteine, welche signifikant differenziell zwischen CHO- und Plasmazellen vorkommen.

Entschlüsselung der unterschiedlichen Signalwege in Plasma- und CHO-Zellen

Was aber sagen uns diese zahlreichen Unterschiede und wie können wir sie zur Verbesserung von CHO-Zellen nutzen? Eine einfache Betrachtung der Liste differenzieller Moleküle kann – mit fachlichem Hintergrundwissen – bereits Ansatzpunkte für bisher ungenutzte Optimierungsmöglichkeiten von CHO-Produktionszelllinien liefern.

Um ein generelles Verständnis auf zellulärer Ebene zu generieren, müssen die beteiligten Plasma- oder CHO-Zell-spezifischen Moleküle in ihrem Kontext und ihrer Rolle in übergreifenden zellulären Signalwegen betrachtet werden. Dies ist mithilfe von *pathway enrichment*-Analysen möglich. Bei diesen werden Signalwege, in denen die Beteiligung der zellspezifischen Moleküle möglichst hoch ist, über bioinformatische Datenevaluierung identifiziert. Aus solchen Analysen ging deutlich hervor, dass in Plasmazellen viele Moleküle der Transkription, Proteinexpression und -faltung, des Vesikel- und Nährstofftransports und der Sekretion häufiger vorkommen als in industriellen CHO-Zellen (**Abb. 3**, grün). CHO-Zellen hingegen zeichnen sich vor allem durch eine stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix, sowie große Mengen an sekretierten Proteinen und Proteasen aus (**Abb. 3**, blau).

Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse zur Verbesserung von CHO-Produktionszellen

Um die resultierenden plasmazellspezifischen Mechanismen auch experimentell für die Optimierung von industriellen CHO-Produktionszelllinien zu nutzen, wurde eine Auswahl an plasmazellspezifischen Molekülen in CHO-Zellen eingebracht. Im Falle der plasmazellspezifischen mikroRNAs wurden 66 Moleküle getestet und für 14 mikroRNAs eine Verbesserung der spezifischen Produktivität für Antikörper von 20–50 Prozent erreicht. Diese Verbesserung der Produktionskapazität ist besonders bemerkenswert, da der Effekt nur auf die Genregulation einer einzigen mikroRNA zurückzuführen ist. Dies zeigt das enorme Potenzial dieser winzigen RNA-Moleküle.

Des Weiteren wurden mehr als 20 plasmazellspezifische, proteincodierende Gene zur Optimierung in CHO-Zellen eingebracht. Darunter befanden sich Transkriptionsfaktoren für eine verbesserte Proteinprozessierung sowie Gene, die die Nährstoffversorgung oder Proteinsekretion steigern. Hiermit wurden Produktsteigerungen von bis zu 50 Prozent erreicht. Im Hinblick auf die vielfältigen vorherigen CHO-Zelllinienentwicklungsstudien ist es bemerkenswert, wie effizient die Gene des molekularen CHO-Plasma-Vergleichs zu verbesserten Phänotypen führten [7]. Dies unterstreicht eindrucksvoll, wie die Natur als Vorbild verwendet werden kann, um die zelluläre Herstellung therapeutischer Antikörper in CHO-Zellen zu verbessern.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Prof. Dr. Dieter Stoll und Robin Kretz der HAS und bei Boehringer Ingelheim für die gute Zusammenarbeit. Das Projekt wurde finanziert durch das BMBF, Förderkennzeichen 13FH162PA6/13FH162PB6 und Boehringer Ingelheim.

Literatur

- [1] Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36: 1136–1145
- [2] Kunert R, Reinhart D (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 3451–3461
- [3] Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM (2009) 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here? *Biotechnol Adv* 27: 1023–1027
- [4] Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM et al. (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15: 160–171
- [5] Kildegaard HF, Baycin-Hizal D, Lewis NE et al. (2013) The emerging CHO systems biology era: Harnessing the 'omics revolution for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 24: 1102–1107
- [6] He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522–531
- [7] Fischer S, Handrick R, Otte K (2015) The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol Adv* 33: 1878–1896

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
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>.



Nikolas Zeh (links) und Nadja Raab



Kerstin Otte

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Kerstin Otte
Institut für angewandte Biotechnologie (IAB)
Hochschule Biberach
Hubertus-Liebrecht-Straße 35
D-88400 Biberach
otte@hochschule-bc.de