

Hitze stabilisiert Malariaimpfstoffkandidaten in komplexen Proteinextrakten

JOHANNES F. BUYEL

INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE, RWTH AACHEN UNIVERSITY;
FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND ANGEWANDTE OEKOLOGIE -
IME, AACHEN

Plants can be an alternative to mammalian cell cultures in terms of vaccine production due to low upstream production costs and a good safety profile. However, product purification can be challenging because of abundant host cell proteins (HCPs) in raw plant extracts. Here we report the optimization of blanching, a heat-based method, that allowed to remove over 90 percent of HCPs and to stabilize a malaria vaccine candidate by carefully adjusting the temperature in the step and combined it with solid-liquid separation and chromatographic purification.

DOI: 10.1007/s12268-019-1026-x
© Springer-Verlag 2019

■ Impfungen können eine kosteneffiziente und wirkungsvolle Methode zur Vorbeugung und Zurückdrängung von Krankheiten darstellen. Eindrucksvollstes Beispiel ist vielleicht die Ausrottung der Pocken durch eine weltweite Impfkampagne [1]. Leider sind immer noch für einige relevante Erkrankungen keine geeigneten Impfstoffe verfügbar. Im Falle von AIDS und Malaria liegt dies unter anderem an der Variabilität der Antigene der entsprechenden Krankheitserreger. Speziell bei Malaria kommt jedoch auch hinzu, dass kostengünstige Produktionsmöglichkeiten fehlen, die erforderlich sind, damit auch die über 100 Millionen betroffenen Menschen in wirtschaftlich schwachen Regionen (vor allem in Afrika südlich der Sahara) Zugang zu einer Impfung bekommen können bzw. diese durch Hilfsorganisationen ermöglicht werden kann.

Seit den 1980er-Jahren werden Pflanzen als Alternative zu mikrobiellen und tierischen Expressionssystemen verwendet, um rekombinante, biopharmazeutische Proteine herzustellen [2]. Das große Potenzial der Pflanzen besteht dabei vor allem in einer einfachen und günstigen Kultivierung im Vergleich zu Bioreaktorsystemen und einer hohen Skalierbarkeit, die durchaus die Herstellung mehrerer Tonnen Wirkstoff pro Jahr ermöglicht [3].

Dennoch werden Pflanzen aktuell noch nicht in industriell relevanten Pharmaprozessen eingesetzt. Dies liegt zum einen sicherlich daran, dass die Produktion in Pflanzen eine gänzlich andere Infrastruktur und damit initiale Investitionen im Vergleich zu etablierten Systemen erfordert. Zum anderen stellt die Reinigung der Produkte aus einer Pflanzenmatrix (*downstream processing*, DSP) oft eine große Herausforderung dar, speziell wenn Affinitätsschritte, wie Protein A im Falle von Antikörpern, nicht verfügbar sind [4]. Dies geschieht bei Impfstoffkandidaten. Die Ursachen für das herausfordernde DSP sind vor allem die bei der Extraktion der Produkte freigesetzten pflanzlichen Wirtsproteine (*host cell proteins*, HCPs). Letztere machen meist mehr als 90 Prozent des gesamten löslichen Proteins (*total soluble protein*, TSP) aus [5] und können unter anderem verschiedene Proteasen enthalten. Diese Enzyme können wiederum das Produkt angreifen, das heißt an verschiedenen Stellen spalten und so inaktivieren oder in seiner Funktion verändern. In konventionellen Prozessen erfolgt die Trennung von Produkt und HCPs meist über eine Chromatographie, welche erst nach einer adäquaten Klärung des Pflanzenextrakts durchgeführt werden kann [6]. Entsprechend viel

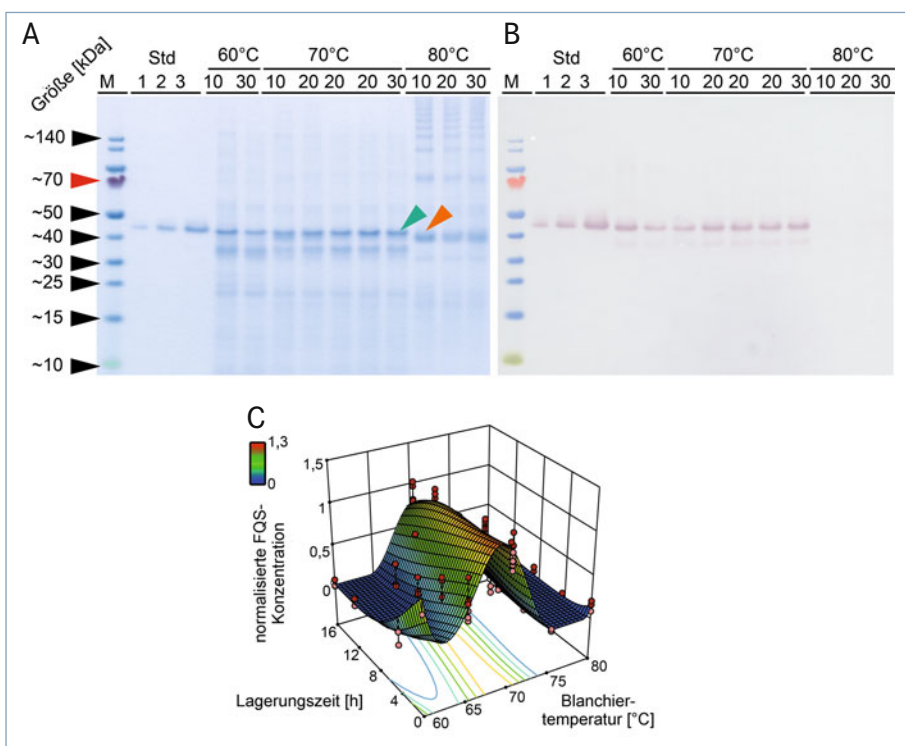
Zeit haben Proteasen, auf ein Produkt einzuwirken.

Um eine frühzeitige Trennung von Produkt und potenziell schädlichen HCPs zu erreichen, wurden Methoden wie die Extraktion in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen [7] oder die selektive Fällung pflanzlicher HCPs bei niedrigem pH-Wert [5] entwickelt. Da diese Strategien nicht mit allen Produkten kompatibel sind (z. B. aufgrund der pH-Stabilität), haben wir eine weitere, auf Hitzedenaturierung beruhende Methode zur Abreicherung von HCPs entwickelt, für einen thermisch nur eingeschränkt stabilen und pH-sensitiven Malariaimpfstoffkandidaten optimiert und mit einer chromatographischen Reinigung kombiniert [8, 9]. Bei dem Impfstoffkandidaten FQS handelte es sich um ein artifizielles Protein, das aus Domänen verschiedener Proteine von *Plasmodium falciparum*, einem dominanten Malariaerreger, zusammengesetzt ist [9].

Hitze fällung

Für die Umsetzung einer Hitze fällung haben wir in der Vergangenheit verschiedene Verfahren verglichen: (1) das Eintauchen intakter Pflanzen oder Blätter in eine temperierte Flüssigkeit (Blanchieren), (2) die Extraktion mit heißem Puffer und (3) das Erhitzen des Rohextrakts [8, 10], wobei Letzteres sowohl mittels Rührkessel als auch Wärmetauscher realisiert werden kann. Im praktischen Vergleich der Methoden zeigte sich, dass alle zu einer substanziellen Verringerung des TSP führten, das Blanchieren erwies sich jedoch als in besonderem Maße kompatibel mit der typischen Prozessführung von pflanzenbasierten Bioprozessen [8, 10]. Außerdem kann es bereits vor der Extraktion durchgeführt werden und so potenziell die Interaktion von Produkt und einigen Proteasen verhindern.

Ab Temperaturen von 60 °C denaturierten mehr als 80 Prozent der HCPs, und bei 80 °C waren mehr als 95 Prozent der HCPs ausgefallen [11]. Für den Malariaimpfstoffkandidaten FQS stellte unsere Arbeitsgruppe jedoch fest, dass sich bei einer Behandlung mit 80 °C



▲ **Abb. 1:** Stabilität des Malariaimpfstoffkandidaten FQS. **A,** LDS-Polyacrylamid-Gel, gefärbt mit SimplyBlue SafeStain zur Detektion von Proteinen in Proben, die aus Pflanzenmaterial gewonnen wurden, das bei unterschiedlichen Temperaturen blanchiert wurde. Die Zahlen unterhalb der Temperaturangabe geben die Dauer des Blanchiervorgangs an. Beim Übergang von 70 auf 80 °C wurde eine Änderung der scheinbaren Produktgröße um 2,3 Kilodalton beobachtet (grüner und oranger Pfeil). **B,** gleiche Proben wie in A, jedoch erfolgte der spezifische Nachweis von FQS über Immunoblotting. **C,** *response-surface*-Darstellung des mittels statistischer Versuchsplanung gewonnenen Modells für die FQS-Konzentration im Pflanzenextrakt in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und der Blanchiertemperatur. Die Werte sind normalisiert auf die Bedingung 70 °C und 20 Minuten Lagerung.

ein scheinbarer Größenverlust des Produktes von ca. 2,3 Kilodalton ergab (LDS-PAGE-Analyse; **Abb. 1A**) und trotz des Vorhandenseins des Proteins ein Epitop im zentralen Bereich von FQS nicht mehr durch einen spezifischen Antikörper erkannt wurde (**Abb. 1B**). Wir schlossen auf eine thermisch bedingte, permanente Veränderung des Produktes und untersuchten mittels statistischer Versuchsplanung, wie sich eine Verringerung der Temperatur auf die Detektierbarkeit des Produktes durch den spezifischen Antikörper auswirkt. Darüber hinaus analysierten wir zudem die Stabilität (Lagerung für bis zu 16 Stunden) des Produktes, welches in Vorversuchen nach wenigen Stunden nicht mehr im Rohextrakt nachweisbar war. Eine Stabilität von mindestens vier Stunden war jedoch erforderlich, da dies in etwa der Zeit zwischen Extraktion und chromatographischer Reinigung entspricht.

Interessanterweise zeigte sich, dass nur ein schmales Temperaturfenster von ca. 67 bis 73 °C bestand, in dem das Produkt sowohl

nach dem Blanchieren durch den spezifischen Antikörper erkannt wurde als auch für vier oder mehr Stunden stabil im Extrakt vorlag (**Abb. 1C**). Trotz dieser Temperaturreduktion wurden durch die Hitzebehandlung noch 90 Prozent der HCPs entfernt und die Reinheit zum Zeitpunkt der Extraktion von fünf auf 25 Prozent erhöht.

Produktspezifische Filterauswahl und Konditionierung

Die anschließende Fest-Flüssig-Trennung zur Vorbereitung einer weiteren chromatographischen Reinigung führten wir zunächst mit einer etablierten Kombination aus Beutel- und Tiefenfilter durch [6]. Hier zeigte sich jedoch, dass das Produkt vollständig im Tiefenfilter zurückgehalten wurde. Da die Porengröße der Filter mehrere Größenordnungen über dem Proteindurchmesser lag, führten wir die minimale Ausbeute auf physikochemische Interaktionen zwischen FQS und Tiefenfilter zurück. Wir vermuteten, dass besonders die im Filter eingesetzte Diatomeenerde aufgrund

ihrer Ladung für eine Wechselwirkung mit dem Produkt verantwortlich gewesen sein könnte. Diese Vermutung wurde bestätigt, da bei der Verwendung von Diatomeenerdefreien Filtern keine Produktverluste mehr beobachtet wurden. Gleichzeitig verdoppelte sich die Filterkapazität, was wir auf die größeren Poren der verwendeten Filter zurückführten. Entsprechend höher war auch die Trübung des geklärten Pflanzenextrakts mit 55 NTU (*nephelometric turbidity units*). Bei Verwendung der feineren Filter lag die Trübung bei unter 5 NTU, was mit mehreren früheren Versuchen übereinstimmte [12].

Beim anschließenden Pufferaustausch mittels einer Membran aus regenerierter Cellulose zur Vorbereitung einer nachfolgenden Ionenaustauschchromatographie fanden wir lediglich ca. 65 Prozent des im geklärten Extrakt vorhandenen FQS wieder. Ähnlich wie bei der Tiefenfiltration deutete dies auf eine Interaktion des Produktes mit dem Filtermaterial hin. Da die Wiederfindung mit steigender Leitfähigkeit abnahm, lagen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Produkt und Membran als Ursache nahe. Hydrophobe Bereiche könnten auf der Oberfläche des Produktes entweder als Folge der Hitzebehandlung oder aufgrund des artifiziellen Charakters des Produktes (bei den meisten natürlichen Proteinen finden sich hydrophobe Aminosäuren vor allem im Inneren der dreidimensionalen Struktur) [13] exponiert gewesen sein. Eine genauere Untersuchung dieser Zusammenhänge wird in zukünftigen Studien erfolgen.

Chromatographische Reinigung

Die Reinheit von FQS konnte zwar durch Blanchieren von fünf auf 25 Prozent erhöht werden, doch dies war unzureichend für eine pharmazeutische Anwendung, welche normalerweise mehr als 95 Prozent erfordert. Aufgrund der irreversiblen Denaturierung von FQS bei pH-Werten kleiner als 6,0 schlossen wir eine Reinigung über Kationenaustauschchromatographie aus, welche typischerweise genau diesen pH-Bereich erfordert. Auch der Einsatz einer Anionenaustauschchromatographie erwies sich als nicht zielführend, da in einem Screeningversuch maximal 50 Prozent Reinheit erzielt werden konnte. Im Gegensatz dazu erzielten wir bei einem Screening hydrophober Liganden deutlich höhere Reinheiten und Octyl 4 FF (Octyl Sepharose 4 Fast Flow) stellte sich als am vielversprechendsten heraus. Ebenfalls mittels statistischer Versuchsplanung optimierten

Hier steht eine Anzeige.



wir die Binde- und Elutionsbedingungen für dieses Harz, sodass wir final eine Reinheit von 70 Prozent bei 65 Prozent Wiederfindung erzielen konnten. Die nächsten Schritte in der Prozessentwicklung werden die finale Reinigung des Proteins sowie eine detaillierte Kostenkalkulation umfassen.

Danksagung

Unsere Arbeiten wurden durch das Attract-Programm (Fördernummer: 125-600164) der Fraunhofer-Gesellschaft sowie die Fraunhofer-Zukunftsstiftung unterstützt. ■

Literatur

- [1] Henderson DA, Klepac P (2013) Lessons from the eradication of smallpox: an interview with D. A. Henderson. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20130113
- [2] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76–78
- [3] Buyel JF, Twyman RM, Fischer R (2017) Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing. *Biotechnol Adv* 35:458–465
- [4] Buyel JF, Twyman RM, Fischer R (2015) Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol Adv* 33:902–913
- [5] Hassan S, van Dolleweerd CJ, Ioakeimidis F et al. (2008) Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 6:733–748
- [6] Buyel JF, Fischer R (2014) Scale-down models to optimize a filter train for the downstream purification of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco leaves. *Biotechnol J* 9:415–425
- [7] Platis D, Drossard J, Fischer R et al. (2008) New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *J Chromatogr A* 1211:80–89
- [8] Menzel S, Holland T, Boes A et al. (2016) Optimized blanching reduces the host cell protein content and substantially enhances the recovery and stability of two plant-derived malaria vaccine candidates. *Front Plant Sci* 7:159
- [9] Menzel S, Holland T, Boes A et al. (2018) Downstream processing of a plant-derived malaria transmission-blocking vaccine candidate. *Protein Express Purif* 152:122–130
- [10] Buyel JF, Hubbuch J, Fischer R (2016) Comparison of tobacco host cell protein removal methods by blanching intact plants or by heat treatment of extracts. *J Vis Exp*, doi: 10.3791/54343
- [11] Buyel JF, Gruchow HM, Boes A et al. (2014) Rational design of a host cell protein heat precipitation step simplifies the subsequent purification of recombinant proteins from tobacco. *Biochem Eng J* 88:162–170
- [12] Buyel JF, Fischer R (2014) Flocculation increases the efficacy of depth filtration during the downstream processing of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco. *Plant Biotechnol J* 12:240–252
- [13] Isom DG, Castaneda CA, Cannon BR et al. (2010) Charges in the hydrophobic interior of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:16096–16100

Korrespondenzadresse:

Dr. Dr.-Ing. Johannes Buyel
 Institut für Molekulare Biotechnologie
 RWTH Aachen University
 Worringerweg 1
 D-52074 Aachen
 Tel.: 0241-6085-13162
 johannes.buyel@rwth-aachen.de

AUTOR



Johannes Buyel

Jahrgang 1983. 2003–2009 Biotechnologiestudium in Aachen, Lund (Schweden) und Newark (Delaware, USA). 2013 Promotion zum Dr. rer. nat. 2013–2014 Postdoc am Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen University. 2014–2015 Gruppenleiter am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME) in Aachen; dort seit 2015 Abteilungsleiter. 2017 Promotion zum Dr.-Ing. am Karlsruher Institut für Technologie.