

## Transiente Genexpression für Proteintherapeutika



Prof. Dr. Christiane Zaborosch, Fachstellenleiterin  
Biochemie, [christiane.zaborosch@zhaw.ch](mailto:christiane.zaborosch@zhaw.ch)

Patrizia Sebgondi, wissenschaftliche Mitarbeiterin,  
[patrizia.sebgondi@zhaw.ch](mailto:patrizia.sebgondi@zhaw.ch)

**Rekombinante Proteine werden heutzutage für eine Vielzahl von Erkrankungen als Standard-of-Care eingesetzt und generieren einen globalen jährlichen Umsatz von mehr als 80 Milliarden Dollar. Im Rahmen des Projekts soll in Zusammenarbeit mit der Firma ExcellGene SA und einem Labor der EPFL eine neuartige Methode für die Herstellung von Proteinen für klinische Studien in GMP-Qualität etabliert werden, in der die Proteine anstatt mit stabilen Zelllinien durch transiente Genexpression (TGE) hergestellt werden.**

### Stand der Technik: stabile Zelllinien

Rekombinante Proteintherapeutika werden überwiegend mittels Säugerzellen hergestellt, da nur solche Zellen die vielfach erforderlichen posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, ermöglichen. Dazu werden «unsterbliche» Zelllinien wie z.B. die Chinese-Hamster-Ovary-Zelllinie verwendet, in welchen die genetische Information des Zielproteins durch Gen-Transfer stabil in das Genom der Zellen integriert ist. Die Herstellung stabiler Zelllinien ist jedoch sehr zeitaufwendig.

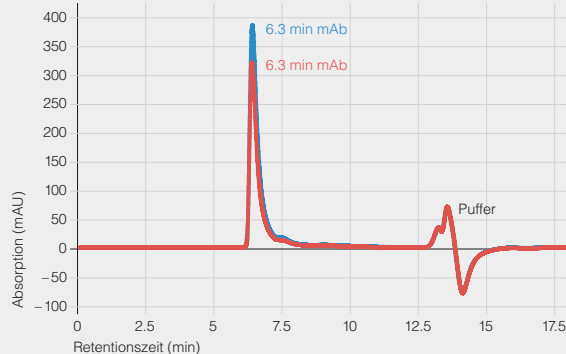
### Transiente Genexpression als alternative Methode

Eine Alternative zur Proteinproduktion mit stabilen Zelllinien ist die transiente Genexpression. Dabei werden Expressionsvektoren in grosser Zahl in Zellen eingeschleust, die in Bioreaktoren kultiviert werden. Die Vektor-DNA wird dann in der Zelle in die entsprechende mRNA umgeschrieben, anhand derer das Protein hergestellt wird. Die Proteinexpression erfolgt solange, bis die Expressionsvektoren abgebaut, inaktiviert oder durch Zellteilung ausgedünnt wurden (ca. zwei Wochen). Die Methode erfordert im Gegensatz zur Produktion mit stabilen Zelllinien keine Selektion von Einzelklonen und keine nachfolgende Vermehrung der Zellen (die zeitaufwendig ist). Dies erlaubt daher eine wesentlich schnellere und kostengünstigere Herstellung von Zielproteinen durch die transiente Genexpression, insbesondere wenn diese in grösseren Bioreaktoren durchgeführt werden kann.

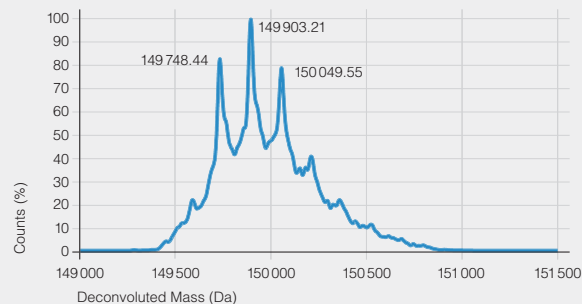
### Proteinexpression, Downstream Processing und Analytik

Ziel des Projektes ist es, eine Plattform für TGE von rekombinanten Proteinen für präklinische und frühe klinische Studien zu etablieren. Für den direkten Vergleich beider Methoden wird ein Modellprotein mittels einer stabilen Zelllinie und mittels TGE von den Projektpartnern produziert. Beim verwendeten Modellprotein handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper (mAb) gegen den Rhesusfaktor D. Anti-Rhesus-D-Antikörper werden zur Prophylaxe während der Schwangerschaft von Rhesus-D-negativen Frauen eingesetzt.

Die Proteine aus beiden Prozessen werden an der ZHAW mit chromatographischen Methoden aufgereinigt. Die Aufreinigungsprozesse werden bezüglich der Abreicherung von Verunreinigungen wie DNA, Host-Cell-Proteinen und Endotoxinen charakterisiert. Das Targetmolekül aus beiden Prozessen wird auf seine physikochemischen Eigenschaften detailliert untersucht. Dabei kommen Methoden wie isoelektrische Fokussierung, Size Exclusion HPLC, Reversed Phase HPLC und Massenbestimmung mittels MS zum Einsatz.



SEC-HPLC-Chromatogramm der gereinigten anti-Rhesus D mAb nach stabiler (rot) und transienter (blau) Expression. Die Retentionszeiten und die Profile beider mAb unterscheiden sich nicht.



Massenspektrum (ESI-Q-TOF) des gereinigten anti-Rhesus D mAb nach stabiler (rot) und transienter (blau) Expression. Die drei Hauptpeaks kommen durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen zustande.

### Forschungsprojekt

#### Establishment of a robust GMP-ready technology platform for large-scale transient gene expression for the manufacture of clinical grade protein pharmaceuticals

Leitung ZHAW:	Prof. Dr. Christiane Zaborosch
Projektdauer:	2 Jahre
Partner:	ExcellGene S.A., Monthey; Laboratory of Cellular Biotechnology, EPFL, Prof. Dr. F. Wurm
Förderung:	Kommission für Technologie und Innovation KTI, Bern
Projektvolumen:	CHF 1 115 000