



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Production and characterization of recombinant human lactoferrin

Veen, H.A. van

Citation

Veen, H. A. van. (2008, April 23). *Production and characterization of recombinant human lactoferrin*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13570>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13570>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

1. Inleiding

Humaan lactoferrine (hLF) is een geglycosyleerd, ijzerbindend eiwit dat behoort tot de familie van de transferrines. Het eiwit komt voor in melk, traanvocht, speeksel en in bronchiale en intestinale afscheidingen. Tevens is het aanwezig in de specifieke granula van neutrofiële granulocyten. Humaan LF bestaat uit één keten van 692 aminozuren die in twee homologe lobben gevouwen is (zie figuur 1 van hoofdstuk 1). Elke lob kan één ijzerion binden tezamen met één carbonaation. Voorts bevat het N-terminale deel van het molecuul positief geladen domeinen die negatief geladen liganden zoals heparine en lipopolysacharide (LPS) kunnen binden.

Uitgebreid in vitro en in vivo onderzoek heeft aangetoond dat hLF antimicrobiële en ontstekingsremmende eigenschappen heeft. Daarnaast is gevonden dat lactoferrine het immuunsysteem kan moduleren. Op basis van deze activiteiten wordt hLF beschouwd als een onderdeel van het aangeboren afweersysteem.

De antimicrobiële activiteiten van hLF berusten op remming van bacteriële groei door het wegvangen van ijzer en het verstoren van de celwandintegriteit. Lactoferrine kan ook virusinfecties remmen. De ontstekingsremmende activiteiten van hLF berusten op de remming van hydroxylradicaalvorming, cytokineproductie en tryptase-activiteit als ook het neutraliseren van LPS. Naast deze ontstekingsremmende eigenschappen kan hLF de afweerreactie van het lichaam bevorderen door het activeren van verscheidene typen witte bloedcellen, zoals monocyt/macrofagen en NK-cellen. De activering van deze immuuncellen door hLF is waarschijnlijk receptor-gemedieerd want receptoren voor hLF zijn gevonden op diverse soorten cellen zoals monocyt, lymfocyt, lever- en intestinale cellen.

2. Toepassingen van humaan lactoferrine in de gezondheidszorg

Door de verscheidenheid aan biologische activiteiten van hLF zijn diverse toepassingen denkbaar in de gezondheidszorg, zowel in de voedingsector als in de farmaceutische sector.

Een interessante toepassing van hLF voor onderzoek is de preventie of de behandeling van aandoeningen aan het maag-darmkanaal, zoals bij patiënten die lijden aan chronische darmontstekingen of patiënten die een chemotherapie ondergaan. Deze patiënten kunnen baat hebben bij de antimicrobiële, de ontstekingsremmende en de immunomodulatoire activiteiten van hLF. Verder is aangetoond dat hLF de groei van darmepitheelcellen stimuleert, probiotische effecten heeft, bijvoorbeeld stimulatie van de groei van *Bifidobacteria*, en mogelijk ook een rol speelt bij de opname van ijzer in de darm. Deze activiteiten van hLF kunnen ook als basis dienen voor de toepassing van het eiwit in klinische voedingen en babyvoedingen.

Een andere, mogelijke toepassing van hLF is het verminderen van symptomen bij patiënten die lijden aan allergische aandoeningen. Dit idee is gebaseerd op studies in diermodellen voor astma waaruit bleek dat hLF de zogenaamde late-fase ontstekingsreacties elimineerde (door remming van tryptase-activiteit) en de vorming van hydroxylradicalen reduceerde.

De sterke antibiotische effecten van hLF tegen *Klebsiella pneumoniae* en *Staphylococcus aureus* in muismodellen (hoofdstuk 5) vormen de basis voor studies naar de potentie van hLF voor behandeling van patiënten die geïnfecteerd zijn met antibiotica-resistente bacteriën waaronder de beruchte methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) waarvan de bestrijding in ziekenhuizen momenteel erg moeilijk is.

Zowel hLF als runderlactoferrine (bLF) verkregen uit koemelk kan gebruikt worden voor toepassingen van LF in de gezondheidszorg. Echter, het gebruik van bLF is beperkt tot orale toepassingen omdat afweerreacties door het menselijk lichaam te verwachten zijn bij parenterale toepassingen. Daarnaast is bLF mogelijk inferieur aan hLF in toepassingen waarin interacties met specifieke receptoren in het menselijk lichaam van belang zijn. Bovendien is bLF veel gevoeliger voor het eiwitafbrekende enzym trypsine (hoofdstuk 7). Deze hogere gevoeligheid van bLF voor proteolyse door trypsine in vergelijking met hLF is relevant voor orale toepassingen, omdat trypsine deel uitmaakt van het arsenaal eiwitafbrekende enzymen die aanwezig zijn in het maag-darmkanaal. Voor sommige orale toepassingen van hLF kan het nodig zijn het eiwit te beschermen zodat het intact de maag en de (dunne) darm kan passeren.

De beperkte beschikbaarheid van humane melk heeft de productie van grote hoeveelheden hLF voor (klinische) studies naar potentiële nutraceutische en farmaceutische toepassingen gehinderd. Vanwege deze beperking is de haalbaarheid van productie van recombinant hLF (rhLF) onderzocht in diverse expressiesystemen, zoals zoogdiercellen, schimmels, gisten en planten. Het gebruik van transgene koeien die rhLF tot expressie brengen in de melk, is een aantrekkelijk alternatief voor de genoemde expressiesystemen, omdat één koe meer dan 10.000 liter melk per jaar kan geven en de melkklier een hoge eiwitproductiecapaciteit heeft (circa 300 kg per jaar). In dit proefschrift worden de resultaten beschreven van het onderzoek naar de expressie en karakterisatie van rhLF, geproduceerd in de melk van transgene koeien.

3. Expressie van rhLF in de melk van transgene koeien

In hoofdstuk 5 worden de expressieniveaus van rhLF in de melk van een aantal transgene koeien beschreven. Deze koeien zijn genetisch gemodificeerd en daarmee drager geworden van een gen dat gebaseerd is op de regulerende elementen van het melk-specifieke runder- α S1-caseïnegeen en een genomische DNA-sequentie, coderend voor een natuurlijke hLF-variant. De expressie van rhLF in de melk van transgene koeien van lijn 8785 was ongeveer 2,5 gram per liter. Verder bleek de expressie van rhLF in de melk van de eerste generatie koeien vergelijkbaar te zijn met die van hun nakomelingen. De wijze van melkinductie (kunstmatige inductie met hormonen versus natuurlijke inductie door de geboorte van een kalf) had geen effect op de expressie van rhLF. Daarnaast bleek het expressieniveau stabiel over de gehele lactatieperiode (280 dagen). De expressie van rhLF had geen invloed op de hoeveelheid geproduceerde melk noch op het celgetal en de gehalten aan eiwit, vet en lactose. Evenmin zijn er veranderingen in gezondheid en gedrag van deze dieren waargenomen. Op grond van deze waarnemingen kan geconcludeerd worden dat productie van rhLF door lacterende transgene koeien een realistische manier is om duizenden kilo's rhLF per jaar te produceren ten bate van de gezondheidszorg, met gewoon veevoer als grondstof.

4. Karakterisatie van rhLF

Recombinant hLF dat gezuiverd was uit de melk van transgene koeien, bleek voor 8% verzadigd te zijn met ijzer (hoofdstuk 5 en 9). Dit percentage ijzerverzadiging is vergelijkbaar met dat van natuurlijk hLF en bLF. Het voordeel van een relatief laag percentage ijzerverzadiging is dat rhLF uit transgene koemelk niet gedesatureerd hoeft te worden om preparaten te verkrijgen die ijzer kunnen binden, in tegenstelling tot rhLF uit veel andere expressiesystemen.

In de hoofdstukken van dit proefschrift wordt het onderzoek beschreven dat gedaan is aan de karakterisering van rhLF uit transgene koemelk met natuurlijk hLF uit moedermelk als referentie. De resultaten van de verschillende studies alsmede de gebruikte technieken en referenties naar de hoofdstukken zijn samengevat in tabel 1 van hoofdstuk 10. De resultaten laten zien dat rhLF en natuurlijk hLF hetzelfde zijn met betrekking tot aminozuursequentie, bezetting van N-glycosyleringsplaatsen, ijzersaturatie en -desaturatie, kristalstructuur, gevoeligheid voor proteolyse door

trypsine en antibacteriële activiteit in enkele muismodellen. Het enig gevonden verschil tussen beide moleculen betreft de glycosylering. In vergelijking met het natuurlijke eiwit bevatten de suikerstructuren van rhLF minder fucose, minder siaalzuur en naast galactose ook N-acetylgalactosamine. Verder hebben experimenten aangetoond dat rhLF naast een zogenaamde complex-type glycosylering, die alleen op natuurlijk hLF voorkomt, ook suikerstructuren heeft van het oligomannose- en/of van het hybride-type (hoofdstuk 5). Deze bevindingen zijn niet verrassend omdat de glycosylering niet alleen door het eiwit wordt bepaald maar ook door het diersoort, het weefsel en het type cel dat het eiwit produceert.

Het glycosyleringspatroon van rhLF werd bevestigd door verder onderzoek dat de aanwezigheid van tenminste zeventien verschillende suikerstructuren liet zien (resultaten niet gepubliceerd). Niet één van de zeventien suikerstructuren had immunogene epitopen, dat wil zeggen structuren die een afweerreactie kunnen bewerkstelligen, zoals de α -galactosylepitoop waartegen antistoffen circuleren in het menselijk lichaam. De afwezigheid van immunogene epitopen in het overgrote deel van de suikerstructuren is belangrijk bij parenterale toepassingen van rhLF.

Humaan LF wordt snel uit de circulatie geklaard door binding aan negatief geladen chondroïtinesulfaat-proteoglycanen die aanwezig zijn op parenchymale levercellen. De aanwezigheid van oligomannose-type glycosylering en de lage graad van sialylering zouden zelfs de klaring van rhLF door de lever nog kunnen versnellen door binding van het eiwit aan de mannose- en de asialoglycoproteïne-receptor. Echter, farmacologische studies in muismodellen met radioactief gelabeld rhLF en natuurlijk hLF toonden vergelijkbare halfwaardetijden en weefsel distributie aan (hoofdstuk 5) wat suggereert dat beide lactoferrines dezelfde farmacokinetiek hebben en dat lading-gerelateerde klaring de belangrijkste, en snelste, route van klaring van hLF uit de circulatie is. Belangrijker is echter dat, ondanks de verschillen in N-glycosylering, intraveneus toegediend rhLF en natuurlijk hLF even effectief waren in verschillende muismodellen die geïnfecteerd waren met *Klebsiella pneumoniae* en *Staphylococcus aureus* (hoofdstuk 5).

5. Productie van rhLF uit transgene melk op grote schaal

5.1 Ontwikkeling van zuiveringsmethoden voor rhLF

De methoden die ontwikkeld zijn voor het zuiveren van rhLF, zijn ook toepasbaar voor de productie van het eiwit op industriële schaal. De stappen die ontwikkeld zijn om van transgene melk tot gezuiverd rhLF te komen, zijn voor zowel het farmaceutische als het nutraceutische product samengevat in tabel 2 van hoofdstuk 10. Voor beide producten werd de melk eerst ontvet, gevolgd door extractie van de lactoferrinefractie (rhLF en bLF) met behulp van kationenwisselingschromatografie op SP Sepharose. De zuiverheid van rhLF na deze extractie is al voldoende, dat wil zeggen voor ongeveer 95%, voor toepassingen van rhLF in functionele voedingen. Verder opwerken van het lactoferrineproduct door de resterende melkeiwitten zoals bLF te verwijderen, heeft geresulteerd in een rhLF-preparaat dat geschikt is voor farmaceutische toepassingen. De scheiding van rhLF en bLF is ook uitgevoerd met behulp van kationenwisselingschromatografie, echter nu op MacroPrep High S Support (MHPS). De chromatografie op MHPS resulteerde in rhLF-preparaten met minder dan 0,1% bLF. Indien nodig is verdere verwijdering van bLF mogelijk met bijvoorbeeld hydrofobe-interactiechromatografie.

5.2 Ontwikkeling van analysemethoden voor rhLF

Verscheidene methoden zijn ontwikkeld voor de karakterisatie van gezuiverd rhLF (tabel 1 van hoofdstuk 10). Deze methoden zijn ook geschikt voor kwaliteitscontrole van geproduceerde rhLF-preparaten.

De identiteit en concentratie van rhLF in de melk van transgene koeien, in tankmelk en in gezuiverde rhLF-preparaten kunnen bepaald worden met specifieke antistoffen tegen hLF. In hoofdstuk 3 is de generatie van tien verschillende monoclonale antistoffen tegen hLF beschreven. Experimenten met proteolytische hLF-fragmenten en de recombinant hLF-lobben (hun karakterisering is beschreven in

hoofdstuk 4) gaven aan dat vijf monoclonale antistoffen gericht waren tegen conformationele epitopen in de N-lob en de andere vijf tegen conformationele epitopen in de C-lob. De monoclonale antistoffen tegen hLF zijn gebruikt voor de ontwikkeling van specifieke immunochemische detectiemethoden (hoofdstuk 3) en in structuur-functieonderzoek van hLF.

Andere methoden, ontwikkeld en/of gebruikt voor karakterisatie van rhLF, zijn N-terminale sequentieanalyse, monosacharide-compositieanalyse, ijzersaturatie en –desaturatie, kristalstructuur-analyse en gevoeligheid voor proteolyse door trypsine. Met trypsine werd een subtiel verschil gevonden in gevoeligheid voor proteolyse tussen natuurlijk hLF en rhLF afkomstig van een cDNA sequentie, die een cysteïne op aminozuurpositie 404 heeft in plaats van de natuurlijk voorkomende glycine. Uit eerder onderzoek was gebleken dat de glycine⁴⁰⁴→cysteïne-mutatie in hLF geen invloed had op de ijzersaturatie en –desaturatie noch op de binding aan verschillende liganden en de in vitro en in vivo antigeniciteit.

De karakterisatie van eiwitpreparaten voor toepassingen in de gezondheidszorg vereist ook de kwalificatie en kwantificatie van onzuiverheden. Voor rhLF uit transgene koemelk kunnen deze onzuiverheden komen uit de melk (bijvoorbeeld eiwitten), uit het zuiveringsproces (bijvoorbeeld gebruikte chemicaliën) of gerelateerd zijn aan rhLF (bijvoorbeeld afgebroken moleculen). Hoofdstuk 2 beschrijft een robuuste methode voor het bepalen van koemelk- en rhLF-gerelateerde onzuiverheden in rhLF-preparaten. De methode, die bestaat uit kationenwisselingschromatografie op een Mono-S kolom, maakt onderscheid tussen N-terminaal intact hLF en hLF-moleculen die twee of drie N-terminale aminozuren missen. Verder maakt de methode onderscheid tussen hLF en lactoferrines van andere diersoorten (bijvoorbeeld bLF), transferrines en melkeiwitten. De Mono-S methode kan ook onderscheid maken tussen twee glycosyleringsvarianten van bLF, bLF-A en bLF-B, die respectievelijk wel en niet geglycosyleerd zijn op Asn²⁸¹ (hoofdstuk 7). Naast de Mono-S methode voor kwalificatie en kwantificatie van bLF is er een specifieke ELISA ontwikkeld voor dit molecuul (hoofdstuk 5) die speciaal geschikt is voor het bepalen van sporen bLF in farmaceutische rhLF-preparaten. Een specifieke ELISA is ook ontwikkeld voor een niet eerder beschreven koemelkeiwit dat op Mono-S eenzelfde binding en elutie had als hLF (hoofdstuk 8). Met N-terminale sequentieanalyse is aangetoond dat dit eiwit behoort tot de familie van de lipocalines. De lipocalines zijn een functioneel diverse familie van kleine extracellulaire eiwitten die hydrofobe moleculen transporteren. Het nieuw gevonden eiwit werd vernoemd naar de humane homoloog die in eerste instantie, in complex met gelatinase, gevonden werd in neutrofiele granulocyten. Vandaar de naam ‘neutrophil gelatinase-associated lipocalin’ ofwel NGAL.

5.3 Preklinische en klinische ontwikkeling

Nu de productie van grote hoeveelheden van rhLF uit transgene koemelk mogelijk is, kan er gestart worden met onderzoek naar potentiële toepassingen van het eiwit in de gezondheidszorg. Voordat klinische studies naar potentiële toepassingen van start kunnen gaan, moet eerst de veiligheid van het rhLF-product getest worden. Diverse preklinische studies en vervolgens een Fase I klinische studie met gezonde vrijwilligers hebben aangetoond dat een intraveneuze toediening van farmaceutisch rhLF van 60 mg per kg lichaamsgewicht veilig is en goed verdragen wordt. Vergelijkbaar aan het farmaceutische product is de veiligheid van het nutraceutische rhLF-product onderzocht in preklinische studies. In hoofdstuk 9 wordt een preklinische studie met het nutraceutische product beschreven. Drie doseringen van rhLF (200, 600 en 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag) en fysiologische zout als controle werden dagelijks oraal toegediend aan ratten, voor een periode van 90 dagen, en een groot aantal gezondheidsparameters werden gemeten. Het onderzoek resulteerde in de conclusie dat het nutraceutische rhLF-product, in de drie geteste doseringen, veilig was en goed verdragen werd. Op basis van deze conclusie kon de NOAEL (no observed-adverse-effect level) bepaald worden op 2000 mg rhLF per kg lichaamsgewicht per dag.

6. Conclusies

Het toepassen van recombinante eiwitten in de gezondheidszorg vraagt om een gevalideerde productiemethode, een gedetailleerde vergelijking tussen het recombinante eiwit en de natuurlijke vorm en om uitgebreide studies naar de veiligheid en effectiviteit van de voorgestelde toepassing. Het gebruik van transgene koeien als eiwitproductietechnologie voor rhLF en de karakterisatie en veiligheid van het gezuiverde molecuul worden beschreven in dit proefschrift. De transgene koe is een aantrekkelijke en goedkope manier voor productie van grote hoeveelheden rhLF omdat constante expressieniveaus, in de gram per liter hoeveelheden, zijn verkregen in de melk zonder invloed op diverse gezondheidsparameters en normale melkparameters. Karakterisatie van het gezuiverde rhLF toont aan dat het molecuul vrijwel identiek is, in structuur en functie, aan natuurlijk hLF uit moedermelk. Verder blijkt uit de preklinische studies en uit onderzoek bij gezonde vrijwilligers (Fase I klinische studie) dat rhLF veilig is en goed verdragen wordt. Concluderend kan worden gesteld dat de transgene koe een waardevol platform is voor productie van rhLF voor toepassing in de gezondheidszorg. De resultaten met rhLF illustreren tevens het potentieel van transgene koeien voor productie van andere recombinante humane eiwitten voor therapeutische doeleinden.

