

Schlussbericht

Yumab GmbH – Business & Finances; Inhoffenstr. 7, Gebäude Y, 38124 Braunschweig

Zuwendungsempfänger:
Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR)
DLR-Projektträger
Gesundheitsforschung
Heinrich-Konen-Straße 1
53227 Bonn

Förderkennzeichen:
01EA2107E

Vorhabenbezeichnung:
Verbund ErdHase – Identifizierung des allergenen Potentials von Erdnuss und Haselnuss in
Lebensmittelverarbeitungsketten bei Allergiepationen – Entwicklung von Lebensmitteltestmethoden

Laufzeit des Vorhabens:
01.05.2021 – 30.04.2024

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung und Ziele

Das Projekt ErdHase zielt darauf ab analytische Werkzeuge für das Management von Lebensmittelallergenen entlang der Wertschöpfungskette der Lebensmittelproduktion bereitzustellen. Denn aktuell wird bei Lebensmittelallergenen gänzlich die Individualität des Patienten außen vorgelassen, sodass dessen einzige Möglichkeit die Vermeidung dieser Lebensmittel ist. Würden die Allergene in Lebensmitteln bestimmt und gewisse Schwellenwerte eingehalten werden, könnte der Patient individuell entscheiden.

Als *proof of principle* werden Immunoassays für die Lebensmittelanalyse von Erdnuss- und Haselnussallergenen erstellt, welche als Analysemethoden für die Industrie bereitgestellt werden, um sichere Produkte für die Patienten zu liefern.

YUMAB stellt in diesem Zusammenhang die Antikörper mittels rekombinanter Antikörpertechnologie zur Verfügung, basierend auf Patientenmaterial von Erdnuss und Haselnussallergikern.

Es werden außerdem Patienten, Ernährungsfachkräfte und Lebensmittelhersteller im Bezug auf deren Wünsche zum Management von Erdnuss- und Schalenfruchtallergien befragt und die Ergebnisse geteilt.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Gegenwärtig erhalten alle Patienten, die allergisch auf Erdnüsse und / oder Schalenfrüchte reagieren, den gleichen Ratschlag zur strikten Allergenvermeidung. Verschiedene Arten der Lebensmittelverarbeitung können zu einer Erhöhung oder Reduktion der Allergenität führen, wodurch Patienten bestimmte Lebensmittel meiden sollten oder ohne Gefährdung verzehren könnten. Da dies jedoch nicht ausreichend in der Lebensmittelherstellung getestet wird und keine einheitlichen Schwellenwerte festgelegt sind, müssen Patienten auf alle entsprechend gekennzeichneten Lebensmittel aus potenziellen gesundheitlichen Gefahren verzichten. Das Projekt knüpft daran an, entsprechende Tests der Lebensmittelindustrie zur Verfügung zu stellen und eine einheitliche Deklaration und Toleranzwerte umzusetzen.

Zur Generierung dieser Immunoassays werden mittels rekombinanter Antikörpertechnologie, Antikörpersequenzen aus Allergiepationen gewonnen und auf den Allergenen der Erdnuss und

Haselnuss angereichert und anschließend getestet. Diese Antikörper werden rekombinant produziert und charakterisiert, um deren potenzielle Nutzbarkeit für die Immunoassays zu prüfen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens sowie die wesentlichen Ergebnisse

Zu Beginn des Projekts wurden YUMAB Blutproben von fünf Patienten zur Verfügung gestellt, dieses Material hat YUMAB genutzt, um die B-Zellen zu isolieren und daraus die Antikörpersequenzen des IgG und IgE Repertoires in Antikörper-Phagen Bibliotheken zu klonieren (MS4 – Arbeitspaket 1). Von vier der fünf Patienten konnten erfolgreich Antikörper-Phagen Bibliotheken, innerhalb des ersten Berichtszeitraums (05.2021-04-2022) generiert werden. Nachdem die Allergene der Erdnuss und Haselnuss zur Verfügung gestellt wurden, hat YUMAB mit der Selektion von allergenspezifischen Antikörpern mittels Antikörperphagendisplay begonnen. Nach der in-vitro Antikörperselektion und Charakterisierung im scFv-Format wurden diese Antikörper in humane IgG1 Antikörper konvertiert und in Säugerzellen produziert (MS4 – Arbeitspaket 3). Die rekombinant produzierten Antikörper wurden mittels SDS-PAGE und SEC-HPLC auf Reinheit und Integrität geprüft. Im Anschluss fand die Testung der Bindung zu verschiedenen Erdnuss oder Haselnussallergenen statt, sowie die Testung auf Kreuzreaktivität zu anderen pflanzlichen Proteinen. Die potenziell interessantesten Antikörper wurden dem Projektpartner zur Assay Entwicklung zur Verfügung gestellt (MS4.3 – Arbeitspaket 4).

Aufgrund von Schwierigkeiten während der Gewinnung der Erdnuss und Haselnussallergene, kamen die notwendigen Proteine leider zeitverzögert bei der YUMAB an, sodass nicht alle Arbeiten im vorgesehenen Zeitraum abgeschlossen werden konnten. Die Arbeiten wurden aufgeteilt, sodass es nur zu Teilverzögerungen kam.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die für die Arbeiten notwendigen Patientenproben wurden von der Charité zur Verfügung gestellt, diese wurden bei YUMAB unmittelbar weiterverarbeitet und Antikörper-Phagen Bibliotheken generiert. Die generierten Bibliotheken wurden genutzt um Antikörper, auf den von der Hochschule Fresenius zur Verfügung gestellten Allergene der Erdnuss und Haselnuss, zu selektieren. Die selektierten Antikörper wurden R-Biopharm zur Entwicklung der Immunoassays zur Verfügung gestellt.

Schlussbericht

Yumab GmbH – Business & Finances; Inhoffenstr. 7, Gebäude Y, 38124 Braunschweig

Zuwendungsempfänger:
Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR)
DLR-Projektträger
Gesundheitsforschung
Heinrich-Konen-Straße 1
53227 Bonn

Förderkennzeichen:
01EA2107E

Vorhabenbezeichnung:
Verbund ErdHase – Identifizierung des allergenen Potentials von Erdnuss und Haselnuss in
Lebensmittelverarbeitungsketten bei Allergiepationen – Entwicklung von Lebensmitteltestmethoden

Laufzeit des Vorhabens:
01.05.2021 – 30.04.2024

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Im Rahmen des Verbundprojekts ErdHase, war YUMAB für die Identifizierung, Charakterisierung und Bereitstellung von allergenspezifischen rekombinanten Antikörpern zuständig (Teilprojekt 2). Hierzu stellte der Projektpartner Charité, Blutproben von Patienten mit einer Erdnuss- und/oder Schalenfruchtallergie zur Verfügung. Aus diesen Proben wurden die B-Zellen isoliert und die RNA aufgereinigt. Anschließend wurde die gereinigte RNA in cDNA transkribiert und zur Amplifikation der variablen Antikörpersequenzen des IgG- und IgE-Repertoires genutzt. Die amplifizierten variablen Antikörpersequenzen wurden in Vektoren für die Generierung von Antikörper-Phagen-Bibliotheken kloniert. Da die Amplifikation der schweren und leichten Ketten getrennt erfolgt, kann die natürliche Paarung der Antikörper nicht beibehalten werden, sodass eine Vielzahl neuer Antikörperkombinationen während der Bibliothekserstellung generiert werden. Nach erfolgreicher Klonierung der schweren und leichten variablen Antikörpersequenzen wurden diese Vektoren in *E. Coli* mittels Elektroporation eingebracht. Dabei wurden die leichten variablen Antikörpersequenzen aufgeteilt in lambda und kappa Antikörperbibliotheken. Pro Patient wurden somit zwei Antikörperbibliotheken erstellt. Nach erfolgreicher Transformation wurden die Bibliotheken auf Funktionalität mittels Sanger Sequenzierung und Western Blot geprüft. Die Bibliotheken wurden anschließend in Phagen verpackt, um diese für die Antikörperselektion nutzen zu können (MS4 – Arbeitspaket 1).

Zusätzlich wurde an einer Technologie gearbeitet, um gepaarte Antikörperbibliotheken zu erstellen, bei diesen Antikörperbibliotheken soll die natürliche Paarung der Antikörper des Patienten erhalten bleiben, dies ermöglicht die Nutzung der hochspezifischen Antikörper des jeweiligen Immunsystems. Hierzu hat YUMAB im Rahmen des Verbundprojekts eine Mikrofluidik-Station (Onyx von Atrandi Biosciences) gekauft, welches für die Etablierung einer solchen Technologie notwendig ist. Hierbei werden die Antikörperbibliotheken mittels Flüssigtröpfchentechnologie generiert. Dabei werden einzelne B-Zellen zu Tröpfchen verkapselt, welche als Reaktionsraum für die Amplifikation der natürlich gepaarten Antikörperketten dienen und die anschließende Klonierung dieser natürlichen Paarung in die Phagen-Display-Vektoren ermöglichen (MS4.1 – Arbeitspaket 2). Die Anschaffung sowie Technologieentwicklung

und zusätzlichen Materialkosten wäre ohne die Zuwendung nicht möglich gewesen, sind aber von großem Nutzen für zukünftige Projekte, um zum Beispiel Assays gegen weitere Allergene zu entwickeln. Durch wiederkehrende und neu auftretende Hindernisse in der Technologieentwicklung hat diese anstatt angestrebter 15 Monate, bis zum Laufzeitende angedauert.

Während der Technologieentwicklung, wurde parallel die Entdeckung von Antikörpern mittels gemischter Antikörper-Genbibliotheken vorangetrieben. Die vom Projektpartner Hochschule Fresenius zur Verfügung gestellten Allergene wurden einer Biotinylierung unterzogen. Nach anschließender Qualitätskontrolle wurden die biotinylierten und nativen Allergene zur in-vitro Antikörperphagenselektion (Biopanning) verwendet. In einem ersten Durchlauf wurden die Erdnussallergene Ara h1, h2, h3 und h6 zur Verfügung gestellt und verwendet. Die Bereitstellung der Haselnussallergene Cor a 9 und Cor a 11 erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, sodass YUMAB die Arbeiten nicht parallel durchführen konnte, was die Material- und Personalkosten zusätzlich belastet hat und ohne die Zuwendung nicht möglich gewesen wäre.

Nachdem die Antikörperselektion für vier Runden durchgeführt wurde, wurden lösliche Antikörperfragmente (scFvs) in Bakterien exprimiert und mittels ELISA auf spezifische Bindung untersucht. Die vielversprechendsten Binder wurden anschließend sequenziert und in einem zweiten ELISA weiter charakterisiert. Die Diversität der identifizierten Antikörper war verhältnismäßig gering, was basierend auf einer Patientenbibliothek zu erwarten war. Eine Auswahl an Antikörpern wurde anschließend in Vektoren zur IgG Expression kloniert. Anschließend wurden diese Antikörper in Säugetierzellen exprimiert und mittels Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigt (MS4 – Arbeitspaket 3). Die aufgereinigten Antikörper wurden mittels reduzierender SDS-PAGE und analytischer SEC-HPLC auf Reinheit und Integrität überprüft. Alle Antikörper zeigten in der reduzierenden SDS-PAGE das erwartete leichte Kette, schwere Kette Laufverhalten. Außerdem zeigten nahezu alle Antikörper über 90% Hauptpeak in der analytischen SEC-HPLC Analyse, was die Reinheit und Integrität der Moleküle bestätigte. Bei der anschließenden Charakterisierung mittels ELISA zeigten die meisten der getesteten Antikörper, nicht nur Bindung auf dem identifizierten Allergen, sondern Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Allergenen wie zum Beispiel auf Ara h1, h2, h3 und h6. Trotz dieser identifizierten, unerwarteten Kreuzreaktivität zeigten die meisten Antikörper keine Bindung zu weiteren pflanzlichen Proteinen wie zum Beispiel Mandeln, Linsen, Quinoa, oder Walnuss (MS4 – Arbeitspaket 4). Die ausgewählten Antikörper wurden R-Biopharm zur Verfügung gestellt, um immunologische Methoden für die Lebensmittelanalyse zu entwickeln. YUMAB hat mit der Bereitstellung von allergenspezifischen Antikörpern die Projektmeilensteine erreicht. Leider konnten während des Projekts keine gepaarten Antikörperbibliotheken generiert werden und daher diese nicht getestet werden, da die Diversität nach der Selektion bereits bei den nicht gepaarten Antikörperbibliotheken verhältnismäßig gering war, wären auf Grundlage der gepaarten Antikörperbibliotheken kaum andere Ergebnisse zu erwarten.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten – 307000 Euro

Mikrofluidik-Station (Onyx) – 37600 Euro

Materialkosten – 71200 Euro

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die Arbeiten von YUMAB waren in diesem Projekt unabdingbar, da ansonsten die Grundlage zur Entwicklung immunologischer Assays in der Lebensmittelanalyse gefehlt hätten. Die Grundlage hierfür stellen in dem Projekt die identifizierten Antikörper dar. Da die Projektteile auf den verschiedenen

Allergenen nicht alle simultan erfolgen konnten, hatte YUMAB hohe Personal und Materialkosten, welche ohne die Zuwendung nicht tragbar gewesen wären.

Außerdem hat die Zuwendung die Technologieentwicklung von gepaarten Antikörperbibliotheken für die YUMAB ermöglicht. Diese Technologie konnte zwar nicht in diesem Projekt angewandt werden, stellt aber die Grundlage für die Antikörperentwicklung gegen weitere Allergene dar und erweitert das Portfolio eines deutschen Biotechnologieunternehmens auf dem Weltmarkt. Die Entwicklung von gepaarten Antikörperbibliotheken stellt zum aktuellen Zeitpunkt einen Technologiefortschritt gegenüber vielen anderen Konkurrenten dar und kann Anwendungen bei sowohl Patienten als auch Immunbibliotheken finden, um Antikörper zu entwickeln.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Die Technologie der gepaarten Antikörperbibliotheken erweitert das Portfolio von YUMAB und kann zur Auftragsgewinnung und bestmöglichen Bearbeitung genutzt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit auf Grundlage dieser Technologie weitere Antikörper für immunologische Assays in der Lebensmittelanalyse zu entwickeln.

YUMAB hat bereits ein Poster mit dem Titel „Next generation natural antibody libraries – „Pairing what belongs together““ auf dem Festival of Biologics (FOB) in Basel, zu den gepaarten Antikörperbibliotheken vorgestellt, als auch in Alpbach auf dem 10th Affinity Preteomics Workshop.

Auf www.yumab.com/antibody-libraries/ wird bereits für gepaarte Bibliotheken mit dem Spruch:

“Paired libraries – Bring together what belongs together: Antibody libraries with paired VH and VL combinations as generated in-vivo” geworben.

Die entwickelten Antikörper konnten zur Entwicklung von immunologischen Assays genutzt werden, ob die Antikörper final nutzbar für diese Assays sind, ist abhängig von weiteren Faktoren. Möglicherweise müssten weitere Antikörper charakterisiert oder die bestehenden Antikörper verbessert werden.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Während der Entwicklung sind hilfreiche Ergebnisse und Protokolle zur Verwendung von Mikrofluidiksystemen publiziert worden, welche der internen Technologieentwicklung teilweise halfen.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 NABF.

YUMAB hat bereits ein Poster mit dem Titel „Next generation natural antibody libraries – „Pairing what belongs together““ auf dem Festival of Biologics (FOB) in Basel, zu den gepaarten Antikörperbibliotheken vorgestellt, als auch in Alpbach auf dem 10th Affinity Preteomics Workshop. YUMAB arbeitet an weiteren Daten zur Veröffentlichung der Nutzung gepaarter Antikörperbibliotheken zur Generierung und Entwicklung bestmöglicher Antikörper.