

Onderzoek naar rol complementsysteem in post-COVID en andere aandoeningen stuwt vraag naar antilichamen en assays

Focus op aangeboren immuniteit legt Hycult Biotech geen windeieren



Research analyst Liz Verstegen werkt samen met Westburg Life Sciences in een project voor de ontwikkeling van een optimaal serumvrij medium.

Hycult Biotech in Uden legt zich al meer dan dertig jaar toe op aangeboren immuniteit, met name het complementsysteem. Deze eerste verdedigingslinie tegen lichaamsvreemde stoffen komt steeds vaker naar voren als belangrijke factor bij tal van ziektes en syndromen. Onderzoekers kunnen bij Hycult terecht voor antilichamen en immuno-assays waarmee ze de vele verschillende eiwitten en factoren kunnen meten die een rol spelen in de onderliggende pathways. Voor de productie van de antilichamen wordt nauw samengewerkt met leveranciers van kweekmedia, waaronder Westburg Life Sciences. Iedere cellijn heeft zo zijn eigen voorkeuren, ondervindt R&D-analist Liz Verstegen, die voor te produceren antilichamen de optimale productiecondities uitzoekt.

Bij de term immuunsysteem zal menigene het adaptieve immuunsysteem voor ogen hebben: het slimme, lerende systeem dat zich met een leger van B- en T-cellen door koppeling van receptoren op een antigen van een virus of bacterie met grote precisie op die specifieke indringer weet te richten en die uiterst doeltreffend kan uitschakelen. Tot de verbeelding spreekt ook het immunologisch geheugen van na zo'n actie getransformeerde B- en T-lymfocyten, waardoor een soortgelijke indringer jarenlang na de eerste poging direct wordt herkend (en weer onschadelijk gemaakt). De associatie met het complementsysteem zal door veel minder mensen worden gelegd. Ze kennen het niet, of ze vinden het minder relevant. Want, in tegenstelling tot het fijnbesnaarde adaptieve immuunsysteem zijn de taken van het complementsysteem meer rudimentair. Van het hangen van een vlaggetje aan een bacterie of virus, zodat witte bloedcellen ze kunnen opruimen tot direct vernietigen van de indringer door het boren van een gaatje in de celwand en het chemisch aantrekken van afweercellen door stukjes van bepaalde eiwitten af te splitsen. Dit alles, zo op het eerste oog, zonder aanzien des indringers.

Eerste verdedigingslinie uit de schaduw

Dat, zeker ten opzichte van de B- en T-cellen, wat onbehouden gedrag is essentieel voor de functie als eerste verdedigingslinie: zo veel als mogelijk tegenhouden. Een functie, die zeker in de eerste uren van het leven van een mens essentieel is. Het gaat hierbij immers om 'innate immunity', aangeboren immuniteit, die vanaf de geboorte functioneert. Het adaptief immuunsysteem daarentegen heeft tijd nodig om te leren en op te schalen. Adaptieve immuniteit heeft zich lang mogen verheugen in meer wetenschappelijke aandacht. Als basis voor vaccins heeft het ook baat gehad bij de ontwikkeling van de hybridomatechnologie, die geleid heeft tot een gigantische stroom aan publicaties. En de mechanistische complexiteit is natuurlijk ook uitdagend voor wetenschappers. Daar stond tegenover de relatief primitieve barrière van de aangeboren immuniteit waar veel minder wetenschappelijke eer aan te behalen was. Daar kwam begin deze eeuw verandering in. Uit onderzoek bleek namelijk dat het aangeboren immuunsysteem wel degelijk in staat is om specifiek pathogenen te herkennen en bepaalde cellen ook een vorm van geheugen

hebben. Dat leidde er toe dat er meer inzicht kwam in de -bij nader inzien- toch best wel complexe mechanismen, waar tal van eiwitten bij betrokken zijn. Een inzicht dat tot op de dag van vandaag nog verder wordt verdiept. De definitieve stap uit de schaduw van adaptieve immuniteit hing samen met COVID. Er zijn namelijk sterke aanwijzingen dat overactiviteit van het aangeboren immuunsysteem, met name het complementsysteem, te maken heeft met post-COVID, een syndroom waaraan de laatste jaren enorm veel onderzoek wordt gedaan. Die overactiviteit wordt ook in verband gebracht met andere aandoeningen, zoals kanker (tumorgroei), nierziektes, neurodegeneratie en auto-immunziektes.



Productie van de antilichamen vindt plaats in tweeliter roller bottles.

EEN FACTOR VAN VERSCHIL

Een voorbeeld van de verdieping van het onderzoek aan het complementsysteem is te zien bij de kit voor factor H (FH), die Hycult Biotech al zo'n vijftien jaar in het assortiment had. FH is een in het plasma voorkomend glyco-eiwit dat een belangrijke rol speelt bij het beschermen van gezonde cellen tegen onbedoelde aanvallen door het complement-systeem. In de loop der tijd zijn er zeven factor H-related eiwitten ontdekt, die structureel net iets verschillen van FH en ook andere eigenschappen hebben. In de oorspronkelijke kit werd dus niet alleen FH herkend, maar ook FHR-1A, -1B, -2, -3, -4A, -4B en -5. Dat wil niet zeggen dat die kit in het begin niet goed was; die andere eiwitten waren immers nog niet bekend. Ondertussen heeft Hycult Biotech voor alle factor H-related eiwitten een specifieke kit in het assortiment, en ook eentje specifiek voor factor H.

Vooruitziende blik

De basis voor Hycult Biotech is gelegd in 1994 met de overname door Sanbio van Holland Biotechnology, dat actief was in de toen nog prille markt van antilichamen. Sanbio-directeur Wim de Niet en oprichter van Hycult Biotech constateerde dat er bij Holland Biotechnology weliswaar veel kennis was, maar dat er aan de commerciële kant nog veel te winnen was. Met de naamswijziging naar Hycult Biotech, waarbij Hycult een acroniem is voor 'hybridoma culture', werd meer nadruk gelegd op de kernactiviteit van het bedrijf: de toentertijd nog zeer innovatieve techniek voor de productie van antilichamen. Ook lifte het bedrijf mee op het wereldwijde distributienetwerk van Sanbio. Vandaag de dag staat Hycult Biotech los van Sanbio, dat wel nog steeds de Benelux-distributeur is. Ook in

Een boost aan onderzoek aan het complementsysteem hangt samen met nieuwe inzichten in post-COVID.

circa dertig andere landen bedient het bedrijf de markt via distributeurs; in de Verenigde Staten en Duitsland zijn eigen vestigingen.

"Vanaf het begin lag de focus op de niche van aangeboren immuniteit, en dat blijkt achteraf gezien een hele goede zet geweest", stelt 'order & logistic manager' Linda Keizer, die al een kleine twintig jaar aan het bedrijf verbonden is. "We waren hierdoor als relatief klein bedrijf –er werken in Uden nu 38 mensen– in staat om uit te groeien tot specialist met veel kennis over het complementsysteem. Iets wat onmogelijk is als je een veel breder portfolio aan antilichamen zou willen coveren die te maken hebben met

het adaptieve immuunsysteem. En dan heb ik niet eens over de concurrentie, die daar veel groter is."

Dicht bij het vuur

"Als kennisleider –zo durf ik ons wel te betitelen– hebben we nauwe contacten met onderzoekers die zich bezighouden met het complementsysteem. We wisselen kennis uit en participeren in onderzoeksprojecten. Een recent gestart project is COMPASS waarin we optrekken met onderzoekers van UMC Utrecht en Radboudumc in de ontwikkeling van betrouwbare bloedtesten voor de diagnose van nierziekten, die samenhangen met een niet correct functionerend complementsysteem. Aan de hand van specifieke immuno-assays kan worden vastgesteld wat de effecten zijn van nieuw ontwikkelde medicijnen: welke patiënten er het meeste baat bij hebben en hoe effectief de behandeling is", vertelt Linda.

De sterke verwevenheid met het de laatste jaren sterk uitdijende onderzoek op het gebied van het complementsysteem is een belangrijke aanjager voor uitbreiding van het assortiment aan antilichamen en ELISA-kits. Momenteel zijn dat zo'n 800 verschillende antilichamen en 90 kits. "We houden vanuit R&D nauwgezet in de gaten waar onderzoekers mee bezig zijn. Zijn er ergens nieuwe antilichamen gevonden en kunnen we die commercialiseren om ze breder beschikbaar te maken voor de onderzoekswereld? Daarbij werken we nauw samen met onderzoekers en onderzoeksgroepen wereldwijd. Door kennis en expertise uit te wisselen en elkaar waar mogelijk te ondersteunen, bouwen we aan langdurige samenwerkingen waar beide partijen voordeel van hebben", aldus Linda.

Post-COVID

Een boost aan onderzoek aan het complementsysteem, waarvan het einde nog lang niet in zicht is, hangt samen met nieuwe inzichten in post-COVID. Waar het complementsysteem bij een infectie normaliter na verloop van tijd weer tot rust komt, zijn er aanwijzingen dat deze activatie bij een deel van de post-COVID-patiënten langer aanhoudt. Daardoor kunnen ontstekingsignalen aanwezig blijven en worden immuuncellen voortdurend geac-



tiveerd. Onderzoekers denken dat dit kan bijdragen aan aanhoudende micro-ontstekingsprocessen in verschillende weefsels, wat mogelijk samenhangt met klachten zoals vermoeidheid en spierpijn. Ook lijken complementactivatie en verstoringen in de bloedstolling met elkaar verbonden te zijn. Zo kunnen er microscopisch kleine bloedstolsels (microclots) ontstaan. Deze verstoppingen de kleinste bloedvaten, waardoor weefsels en hersenen te weinig zuurstof krijgen. Dit draagt bij aan post-COVID-symptomen zoals 'brain fog' en kortademigheid. En zo zijn er nog wel meer symptomen die in verband kunnen worden gebracht met een op hol geslagen complementsysteem.

Voor de oorzaken achter die overactivering zijn ook weer allerlei triggers, variërend van achtergebleven restanten van het SARS-CoV-2-virus, auto-antistoffen

en reactivatie van andere virussen. Om deze processen beter te begrijpen, is gedetailleerd onderzoek naar de verschillende pathways binnen het complementsysteem noodzakelijk. "Bij al dat onderzoek wil je gedetailleerd in de verschillende pathways in kaart brengen wat er gebeurt. Daarvoor zijn onze antistoffen en immuno-assays de researchtools bij uitstek."

Productie

Productie van de antilichamen gebeurt aan de hand van hybridomacellen, waarbij voor ieder antilichaam een specifieke cellijn wordt gekweekt. De meeste van die hybridoma cellen worden verkregen vanuit onderzoek. Met de productie inclusief de benodigde kwaliteitscontrole is in de regel tussen de twaalf en veertien weken gemoeid, waarbij voor de celkweek acht tot tien weken staat. Dat

Linda Keizer, 'order & logistic manager' bij Hycult Biotech koopt jaarlijks ruim tweeduizend liter kweekmedium in. Het aandeel van deels synthetisch medium daarin groeit gestaag, onder meer met door Westburg Life Sciences geleverde producten van Capricorn Scientific.



Naast zo'n 800 verschillende antilichamen heeft Hycult Biotech 90 kits in het assortiment.

BIOCULT

Met de overname in 2019 van Biocult heeft Hycult Biotech een bedrijf in huis gehaald voor contract research en contract manufacturing. Dus naast research en productie voor de eigen productlijnen van antilichamen en immuno-assays is dat ook mogelijk voor derden. De CRO- en CMO-projecten zijn niet alleen op het gebied van het complementsysteem. Grote gemeen deler vormt wel immuniteit, wat ook naar voren komt in de gedeelde research- en productiefaciliteiten. Ook de inzet van het personeel is fluïde. Onlangs zijn vijf nieuwe medewerkers aangenomen voor Biocult, die waar nodig kunnen bijspringen in projecten van Hycult Biotech. En dat geldt ook andersom.

→ levert batches op in de grootte-orde van milligrammen. De eerste selectie van geschikte kweekomstandigheden voor nieuwe cellijnen vindt plaats binnen R&D. Nadat een cellijn is beoordeeld en geselecteerd, wordt deze overgedragen aan productie. In het productieproces worden de cellen eerst opgekweekt in een serumhoudend medium. Serum bevat belangrijke groeifactoren die de groei en conditie van de cellen ondersteunen, vooral tijdens de opstartfase. Zodra de cellen de gewenste conditie hebben bereikt, worden ze overgezet naar een serumvrij medium voor de productie van antilichamen. Dit is noodzakelijk omdat serum tijdens het downstream proces verstoringen kan veroorzaken en de zuivering van antilichamen kan bemoeilijken.

Optimale groeiomstandigheden

Om de prestaties van onze cellijnen verder te verbeteren, is Hycult Biotech met Westburg een project gestart dat is gericht op de ontwikkeling van een optimaal serumvrij medium. “Het vervangen van serum is een uitdaging, omdat serum verschillende positieve effecten heeft op de groei van cellen. Daarom onderzoeken we welke supplementen en mediumcomponenten de conditie van de cellen ondersteunen en tegelijkertijd zorgen voor een zo hoog mogelijke antilichaamproductie”, vertelt Liz. “Omdat wij een groot assortiment aan antilichamen produceren, is het niet praktisch om voor iedere afzonderlijke cellijn een uniek medium te ontwikkelen. Daarom streven we naar één serumvrij medium dat geschikt is voor het merendeel van onze cellijnen, met waar nodig enkele uitzonderingen. Binnen dit project testen we welke supplementen de hoogste productie opleveren, zodat we tot een medium komen dat breed inzetbaar is binnen onze productieprocessen.”

Deels synthetisch alternatief

Westburg Life Sciences werkt al meerdere jaren samen met Hycult Biotech, aanvankelijk in de hoedanigheid van distributeur van de producten van Lonza. “Op een zeker moment boden zij ook kweekmedia en kweeksupplementen van Capricorn Scientific aan. Niet veel later bleek Lonza te stoppen met de productie van kweekmedia. We moesten dus op zoek naar een alternatief voor bestaande producties. Sindsdien zijn we in goed overleg gestart met het uitzoeken hoe en wat we allemaal kunnen overzetten van Lonza naar Capricorn, met inmiddels goede resultaten”, vertelt Linda.

Van Capricorn komt ook FBS Xtra, dat een kleine hoeveelheid natuurlijk foetaal kalfsserum (FBS) bevat; de rest bestaat uit een uitgekiende mix van sporenelementen, aminozuren, vitaminen en cofactoren. “Doordat een groot deel van de samenstelling synthetisch is, heb je minder variatie tussen batches. Dat maakt processen beter reproduceerbaar en resultaten voorspelbaarder. Daarnaast speelt ook de afnemende beschikbaarheid van FBS een rol. Een deels synthetisch alternatief kan

Ontdooide cellen hebben echt een opkikker nodig om weer goed op gang te komen.

helpen om minder afhankelijk te worden van natuurlijke grondstoffen. Wanneer zulke producten vergelijkbare prestaties leveren, bieden ze niet alleen voordelen op het gebied van consistentie en duurzaamheid, maar kunnen ze op termijn ook bijdragen aan stabielere en mogelijk lagere kosten”, stelt Liz

Opkikker

Helemaal zonder FBS is voorlopig nog niet aan de orde volgens Liz. “In de opstartfase

kunnen de cellen eigenlijk niet zonder FBS. Ze komen dan uit de opslag bij -150 °C. In de invries-ontdooicyclus gaan veel cellen dood, en de overlevers hebben daar een flinke klap aan overgehouden. Ze hebben dan echt een opkikker nodig om weer goed op gang te komen!” ||

De hybridomacellen

zijn cruciale tools voor Hycult Biotech. Ze worden in Uden bewaard in deze onlangs aangeschafte -150 °C vriezer van Haier Biomedical, in een speciale ruimte met een aparte brandmuur en vluchtdeur. Om niets aan het toeval over te laten wordt een backup van de hybridoma's bewaard onder stikstof bij een externe vriesfaciliteit.



INFORMATIE

Westburg Life Sciences
www.westburg.eu

Hycult Biotech
www.hycultbiotech.com

Biocult
www.biocult.com