

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA

Lehet:

- Prokariótákkal (baktériumokkal)
 - Könnyen, gyorsan szaporíthatók, olcsó táptalaj, de:
 - a termék sokszor intracelluláris (zárványtest), és nincs posztranszlációs modifikáció (glikozilálás, metilezés)
- Élesztőkkel
 - Gyors szaporodás, jó hozam, olcsó táptalaj, de:
 - eltérő glikozilációs mintázat, nem mindig aktív a termék
- állati sejtenyésztéssel
 - Lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
 - termék biztosan biológiailag aktív.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

A jelenleg jóváhagyott technológiák 95%-a ezt a három gazdaszervezetet használja:

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Chinese Hamster Ovary (CHO)
		



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

Funkció szerint:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Enzimek (általában orvosi célra; VIII faktor, tPA, aszparagináz)
- Antitestek (terápia - analitika; Herceptin, ProstaScint)
- Vakcinák (aktív és passzív immunizálás)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Therapeutic Protein Classes

Combined global prescription sales for the top 50 pharmaceutical companies (excluding generic-drug companies) by molecule type (2009–2014).

Molecule type	Sales (\$ billion)						Difference in sales between 2009 and 2014
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
Small molecule	411	414	415	405	394	394	-4%
Therapeutic protein	65	68	70	72	74	76	17%
Monoclonal antibody	38	43	48	53	58	62	63%
Vaccine	21	22	24	25	27	28	33%

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 4

Inzulin

Az inzulin emlőshormon; ez volt első rekombináns módszerrel előállított fehérje. A gyógyászati célra történő humán inzulin éves termelése eléri a 20 tonnát. Az inzulint a hasnyálmirigy (pancreas) Langerhans-szigetei termelik. Antagonista párja a glukagon, a két hormon együtt biztosítja a vércukorszint megfelelő szabályozását. Az inzulint először 1922-ben izolálták kutya pancreasból. Az aminosavszekvencia meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.

Nélkülözhetetlen a cukorbetegek számára.
Diabetes: cukor anyagcsere zavar, megegyezik a vércukorszint.
Inzulin: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás



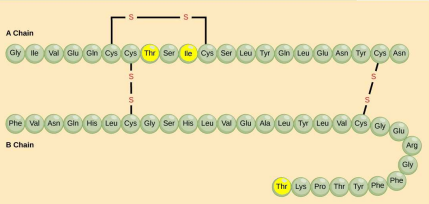
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 5

Inzulin szerkezete

Amino acid comparison of insulin between selected species

Species	Peptide chain and amino acid number			
	A8	A10	A18	B30
Feline	Ala	Val	His	Ala
Bovine	Ala	Val	Asn	Ala
Porcine/Canine	Thr	Ile	Asn	Ala
Human	Thr	Ile	Asn	Thr

Két aminosavláncból áll (21 + 30 aminosav), amelyeket két diszulfid híd köt össze és egy stabilizál.
 A humán és az állati inzulinek között csak néhány aminosav a különbség:



tudomány Tanszék 6

Az inzulin érése

Az inzulin egy gén terméke. Két intron kivágása után egy fehérjeláncként keletkezik (pre-proinzulin, 110 AS), ebből két szakasz (pre: 23 AS, C: 34 AS) eltávolításával alakul ki az aktív szerkezet.

Az inzulin érése

Az endoplazmás retikulumban megy végbe szignálpeptid levágása, a diszulfid hidak és a folding kialakítása. A proinzulin transzport vezikulákban megy át a Golgi komplexbe, és ott történik a C lánc kivágása (PC-I és PC-II), valamint a két Arg levágása (karboxipeptidáz E).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az inzulin előállítása

1. Kémiai szintézis aminosavakból
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná
3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
 - Az A és B lánc termelése külön-külön *E. coli*-val, majd összekapcsolás
 - pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, majd átalakítása
 - Pre-pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, hasítások
 - Pro-inzulin fermentáció *S. cerevisiae*-vel, átalakítás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
10

Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből extrahálják az inzulint.

- Nincs elég belőle
- Az egy aminosav különbség immun-problémákat okozhat

Ezért inkább átalakítják, lecserélik a láncvégi alanint.

A tripszin szintén a hasnyálmirigyből nyerhető peptidáz, ami a bázikus aminosavak (Arg, Lys) melletti peptidkötést bontja → lecsipi a láncvégi alanint.

Egyensúlyi folyamat, visszafelé is megy, a lizinre ráköthet egy aminosavat.

Ha nagy főléslegben treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
11

Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

Mellékreakció: az enzim a 22 Arg mellett is hasítana.

Lefékezése: 6-12 °C !
oldószeres közeg (etanol, DMF, DMSO) + <50% acetát puffer.

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a hu-

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
12

Inzulin fermentációs előállítás

Prokariótákkal is megoldható, mert:

Viszonylag rövid láncok, nincs glikozilezés, metilezés, de:

Két lánc, három diszulfid híd – nehezebb jól összepárosítani

Megoldották a két lánc külön-külön bevitelét és fermentációját, majd összekapcsolását is – és az egészet egyben is.

Az *E. coli* törzsbe a pBR322 plazmiddal viszik be a géndarabot. A Trp-operonból származó szakaszt (121 aminosav) egy Met-nal választják el az inzulint kódoló szakasztól. Ennek az a szerepe, hogy brómián hatására (70%-os HCOOH-ban) a Met elbomlik, és a fehérje lánc elszakad.

Az –SH csoportokat szulfitolízissel ($\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, pH>9)

–S–S–O₃ csoporttá alakítják → diszulfid hidak felbontása.

Összekapcsolás –SH vegyületekkel: (merkaptó-etanol, ditiotretitol)

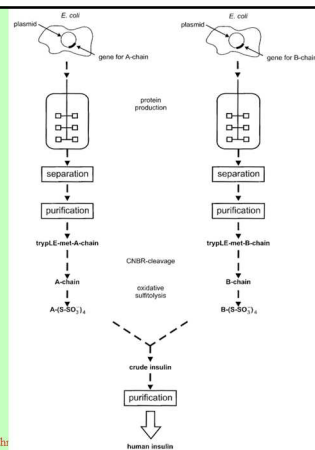


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Kettős fermentáció

A két láncot két külön plazmidba vitték be. Két *E. coli* törzs, két külön fermentáció, aztán összekapcsolás.



BME Alkalmazott Biotech

Inzulin fermentációs előállítás

Az egész lánc előállítás genmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba. Nem-patogén coli törzs.

1. Szakaszos fermentáció (15 m³)
2. Sejteltárás (lízis), centrifugálás, szűrés
3. Refolding: a terciér szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
4. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
5. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)
6. Tisztítás →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

The diagram illustrates the structure of pre-pro-insulin, a single polypeptide chain consisting of three regions: the C-chain (C-peptide), the A-chain, and the B-chain. The C-chain is located at the N-terminus (NH₂) and the B-chain at the C-terminus (COOH). The A and B chains are connected to each other and to the C-chain by inter-chain disulfide bonds (S-S). The C-chain contains two cleavage sites marked with red dashed lines, indicating where the signal peptide is removed during processing. The B-chain also has a cleavage site. The diagram shows the specific amino acid residues at each position along the chain.

16

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin fermentációs előállítása

Az inzulin rekombináns előállítása *Saccharomyces cerevisiae*-vel egyszerűbb, mert:

1. Az ER-ben megtörténik a szignálpeptid levágása és a folding
2. A Golgiban pedig a hasítások (PC-I,II helyett a Kex2-proteázok)
3. → a kész inzulin molekulát kell kinyerni és tisztítani.

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin feldolgozás

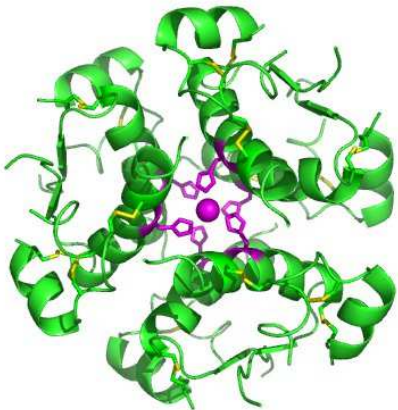
1. Gélszűrés (hasítási termékek és egyéb, kis peptidok kiszűrése)
2. Ioncsere kromatográfia,
3. Lehet: amorf csapadék vagy kristályos: Zn ionnal. A kristályforma függ a Zn koncentrációtól és a pH-tól (ld. távály). Így lassabban szívódik fel.
→ +5 °C, IEP = 5,4
(inzulin)₆Zn₍₁₋₂₋₄₎

18

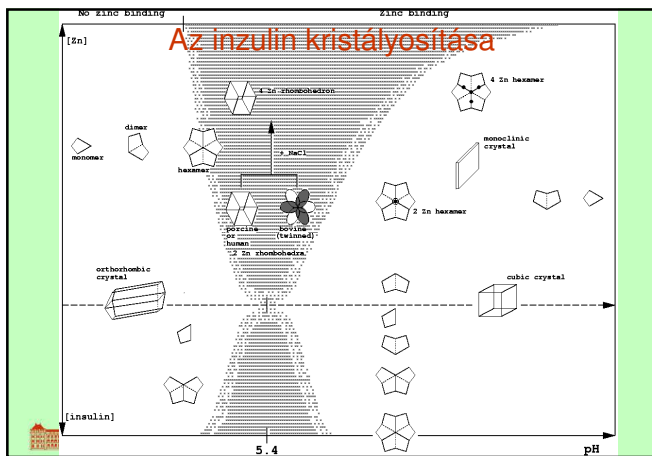
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin Zn-komplex

A B-10 His kapcsolódik a központi Zn^{2+} ionhoz, hexamer formában a legstabilabb.



BME



Inzulin analitika

A rec inzulin azonosítása (azonos-e mindenben a humánnal):

Kémiai analízis: HPLC

- egészben
- enzimesen (V8 proteáz) ötfelé hasítva (fingerprinting)
- aminosav-analízis (teljes hidrolízis után)

Biológiai hatás: - vércukorszint csökkenés nyúlban (lassú, drága)

Immunanalízis: - reakció specifikus ellenanyagokkal

BME 21

Módosított inzulín molekulák

Gyors hatású inzulínok:

Lispro inzulín: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. Gyorsabban felszívódó anyag, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Eli Lilly, Humalog néven.

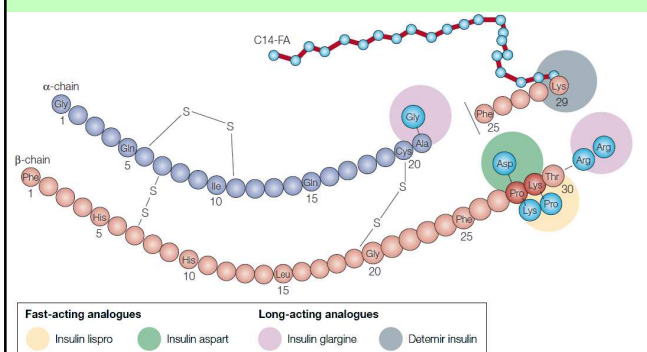
Aspart inzulín: a B28 helyen lévő Pro-t kicserélték Asp-ra. Emiatt nem alkot hexamert → jobban oldódik, gyorsabban felszívódik. *Saccharomyces cerevisiae*-vel termelik. NovoNordisk, NovoLog néven



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Módosított inzulín molekulák



Módosított inzulín molekulák

Elnyújtott hatású inzulínok:

Glargin inzulín: (Gly + Arg) mindkét lánc C terminálisát átalakították: az A21 Asp helyére glicint kapcsolnak, a B lánc végére pedig két arginint. Ez megváltoztatja az izoelektromos pontot (5,4 → 6,7) emiatt a szöveti pH-n aggregálódik → lassabban szívódik fel (>24 óra). Sanofi-Aventis, Lantus néven.

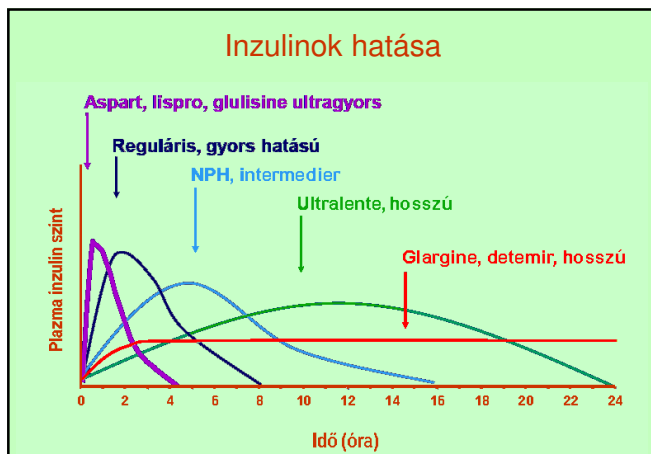
Detemir inzulín: a B30 Thr-t elhagyták, és a B29 Lys aminoszcsoportját C14 zsírsavval (mirisztinsav) acilezték. A gyártásnál rövidebb láncot termelnek (Insulin B1-29-Ala-Ala-Lys-Insulin A1-21), ezt enzimesen bontják, majd acilezik. NovoNordisk, Levemir néven



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Módosított inzulin molekulák						
Amino Acid Substitutions						
	A- chain Position	B- chain Position				
Source/ Type	A21	B3	B28	B29	B30	B31 And B32
Human	Asn	Asn	Pro	Lys	Thr	
Aspart	Asn		Aspartic acid	Lys	Thr	
Lispro	Asn		Lys	Pro	Thr	
Gulisine	Asn	Lys	Pro	Glu	Thr	
Glargine	Gly		Pro	Lys	Thr	Arg
Detemir				Lys	Myristic acid	



Eritropoietin, EPO

Hormon, glikoprotein, a citokinek közé tartozik.
 Emberi szervezetben: 85-90%-a a vesében képződik, 10-15%-a a májban.

A hormon funkciója: stimulálja a vörösvértestek (erytrociták) képződését a csontvelőben.
 Képződését a vér alacsony oxigénkoncentrációja (hipoxia) indukálja (érzékelő: a vese kéregállományában)

A hormon normális koncentrációja a szérumban 10-20 mU/ml.
 Erős hipoxia esetén ez 5-10 000-re is emelkedhet.

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 27

Az EPO gyógyászati felhasználása

- vesekéreg-károsodás
 - anaemia tumor illetve kemoterápia következtében (csontvelő)
 - anaemia (veseelégtelenség, művese kezelés következtében)
A dialízissel 10-20 év után anaemia alakul ki, ekkor transzfúzió szükséges. Panaszok: gyengeség, hideg intolerancia, alvászavar, agyelégtelenség, stb. Az EPO javítja a beteg életminőségét.
 - akut vérzések
 - akut véréjt-pusztulás (HIV betegek, fertőzések, malária)
- Doppingszerként is használják az állóképességi sportokban (hosszútávfutás, sífutás, kerékpározás, néha labdarúgók is)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Az EPO szerkezete

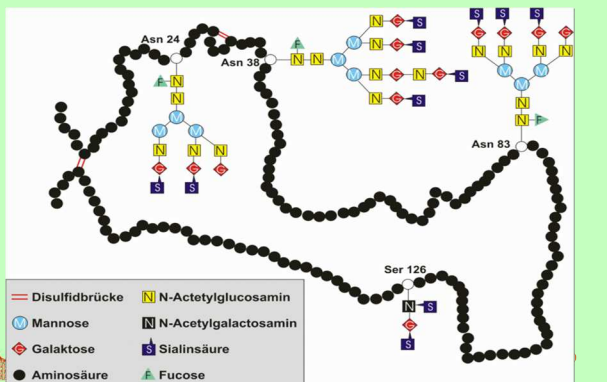
Glikoprotein: 34 kDa, 165 aminosav, 55 szénhidrát egység
A szénhidrát rész a molekulatömeg közel 40 %-át teszi ki.
1 O-glikozid rész (Ser 126).
3 N-glikozid rész (Asn 24, 38, 83).
A cukorrész variábilis, a szílsavak mennyiségével arányos a biológiai aktivitás és a felezési idő.
A cukorrész felelős a molekula stabilitásáért is: hőmérséklet, pH, „carbohydrate engineering”
Bioszintézise: mRNS: 5 exon, 4 intron, eredetileg 193 aminosav
Posztranszlációs módosulások: az N-terminálisról 28 AS (szignálpeptid), a C-terminálisról Asp hasad le.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

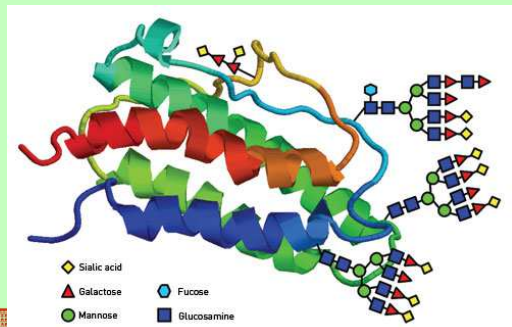
29

Az EPO szerkezete



Az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:



31

Az EPO előállítása

Ki lehetne vonni vérből és vizeletből, de nagyon kicsi a koncentráció és korlátozott az alapanyag. Ezért:

rekombináns fehérjeként célszerű termeltetni.

De ez nem megy prokariótákkal, mert:

- nem működik az intronok kivágása (ez még megoldható a kész mRNS reverz transzkripciójával)
- nem képesek a glikozilálásra

Ezért állati sejtekben, sejtenyészetben kell megoldani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

Állati sejtenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

A szövetekből elkülönített, diszpergált sejtek szaporítása in vitro. A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, a tenyészet elöregszik (szenescencia).

Csak a tumorsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kevésbé.

A sejtvonalak nagy része csak felülethez kötve növekszik (monolayer, kontakt gátlás) → speciális tenyésztő edények

Van néhány, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), mint a mikrobák → fermentorszerű készülékek.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet: vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)
 Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), + glutaminsav
 15 - 20 féle aminosav, vitaminok, koenzimek, lipidek, ionok (pontos összetétel, ozmózis nyomás)

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is → ezt újszülött állatok (borjú) vérézérumával biztosítják (5-15%). Ez szörnyű drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekednek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.



Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium				
Component	D5546 [1x] g/L	D5648 g/L	D5546 [1x] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS				
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS	
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004
AMINO ACIDS				
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	p-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER	
L-Leucine	0.105	0.105	p-Glucose	1.0
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11
L-Serine	0.042	0.042	ADD	
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584
			Sodium Bicarbonate	—

A szérum aktív komponensei

Important Components of Serum and Their Probable Role in Cell Culture	
Component	Probable function
Proteins	
Albumin	Osmotikum and buffer Lipid, hormone, mineral carrier
Fetuin	Cell attachment
Fibronectin	Cell attachment
α ₂ -Macroglobulin	Trypsin inhibitor
Transferrin	Binds iron
Polypeptides	
Endothelial growth factor (ECGF)	Mitogen
Epidermal growth factor (EGF)	Mitogen
Fibroblast growth factor (FGF)	Mitogen
Insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2)	Mitogen
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Mitogen and major growth factor
Hormones	
Hydrocortisone	Promotes attachment and proliferation
Insulin	Promotes uptake of glucose and amino acids
Growth hormones	Mitogen—present in fetal sera
Metabolites and nutrients	
Amino acids	Cell proliferation
Glucose	Cell proliferation
Keto-acids (e.g., pyruvate)	Cell proliferation
Lipids (e.g., cholesterol)	Membrane synthesis
Minerals	
Iron, copper, zinc, and selenium	Enzymes and other constituents
Inhibitors	
γ-globulin	
Bacterial toxins from prior contaminants	
Chalones (tissue-specific inhibitors)	



Az állati sejtenyésztés tápadatai

Törekednek a szérumentes, kémiai komponensekből össze-mért tápoldatok használatára, mert ezek olcsóbbak, állandó az összetételük, és reprodukálhatóbbak az eredmények, kisebb a fertőzés kockázata, könnyebb a fehérje termékek izolálása.

Pl. próbálkoznak a szérum részbeni vagy teljes pótlására hidrofí polimerekkel pl. dextránnal.

A sejtek érzékenyek a szerves ionok pontos koncentrációjára, pl az üveg edényekből kioldódó anyagokra, ezért vagy műanyag edényeket, vagy víztöltéssel többször autoklavozott üveget használnak tenyésztésükhöz.

A víznek is különlegesen tisztának kell lennie (ionmentes, szerves anyag-mentes, endotoxin-mentes, pirogén-mentes) és ezt is műanyag edényben tárolják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

- nagyon kíméletes keverés,
- sok sejtvonal érzékeny a buborékokra

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtérfogatot át-öblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

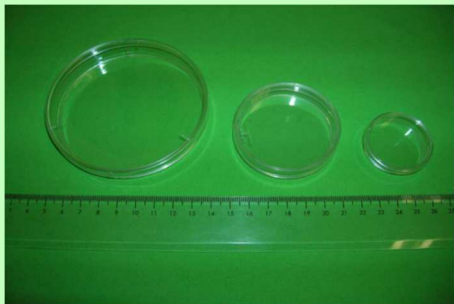
Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

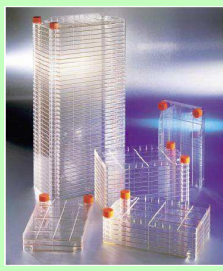


Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Felület növelése

Multitray



roller bottles



Forgó palackok/roller bottles



A person in a white lab coat and hairnet is working with roller bottles in a laboratory setting. The bottles are arranged on shelves, and the person is handling one of them.

Mikrokarrires tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis kialakult monolayer



Two images showing microcarrier cells. The left image shows a spherical microcarrier with cells attached, labeled 'Inokulálási/tapadási fázis'. The right image shows a cluster of cells on a microcarrier, labeled 'kialakult monolayer'.

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú fordulat
Mikrokarrires és szuszpenziós tenyésztés



Two images of spinner flasks. The left image shows a spinner flask with a magnetic stirrer and a blue cap. The right image shows a spinner flask with a blue cap and a small vial.

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierekkel felületi tenyészetekhez is használható.

Max. 10.000 liter (pl: interferon, tPA)

Energiabevitel kisebb, kevesebb O₂ kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket

Diffúziós levegőztetés: szilikon csövek falán át, nincs károsodás

Keverő: propeller, hajócsavar, lekerekített formák, 25-250rpm

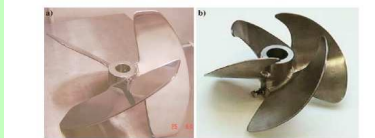


Fig. 13 (a) An ABC 'shear cut' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Sterilitás

A baktériumok gyors szaporodási képességük miatt igen hamar túlnövik a tenyészetet (a savasodást az indikátor kimutatja). Gyakran tesznek a tápoldatba antibiotikumot (prokarióták ellen).

A vírusok elpusztítják a sejteket (forrása: a szövet izolátum vagy a savó). (HEPA szűrők)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

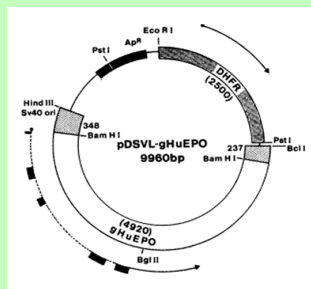
47

Az EPO génbevitel vektora

Az alap egy *E. coli* plazmid, ami tartalmazza a humán EPO gént. Ahhoz, hogy ez emlős sejtekben szaporodni tudjon, kell egy replikációs origó (SV40, majom-vírusból).

A szelekcióhoz DHFR = dihidrofolát-reduktáz markergén (metotrexát rezisztencia)

Ez Ca-foszfáttal bevihető a CHO (= chinese hamster ovary) sejtbe



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

Eritropoietin

Upstream:

A BHK/CHO sejtvonali felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10 % szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.

4 nap után tápoldat csere: termelő közeg 1,5% szérumot tartalmaz.

3 naponként lefejtés.



EPO fermentációs üzem



Az eritropoietin feldolgozása

1. 100 l koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel
2. Immunoszorbens EPO megkötés (MAB-affinitás krom.)
3. Elúció: Na-acetáttal (2800x tisztítás). Az aktivitás 84 %-a megmarad. A MAB oszlop ~30x használható.
4. Gélszűrés Sephadex G-100 oszlopon (3200x tisztítás). Az aktivitás 66 %-a megmarad.
5. Adsorpció hidroxipatiton, (3260x tisztítás) Az aktivitás 52 %-a megmarad.
6. A gyógyszert ampullázzák pufferben és stabilizálják humán szérum albuminnal.
7. A termék tisztaságát SDS-PAGE-sel, HPLC-vel, és MAB-ELISA-val ellenőrzik.



Eritropoietin készítmények

Az alábbi rekombináns EPO-k ugyanazon szénhidrát-izofomák eltérő összetételű keverékei:

EPO α : CHO sejtvonallal termeli az Amgen.

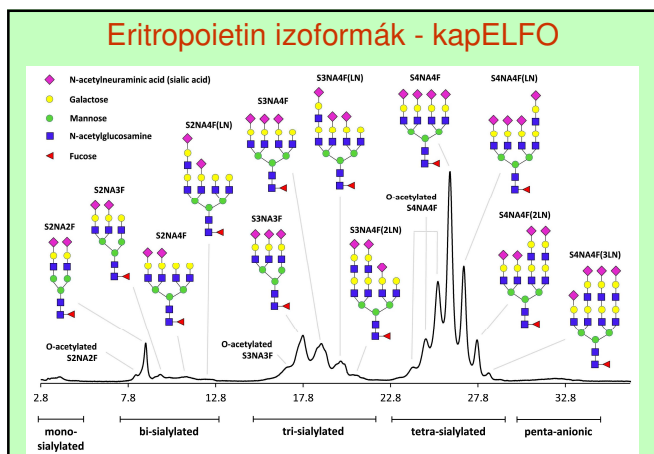
EPO β : CHO sejtvonallal termeli a Roche

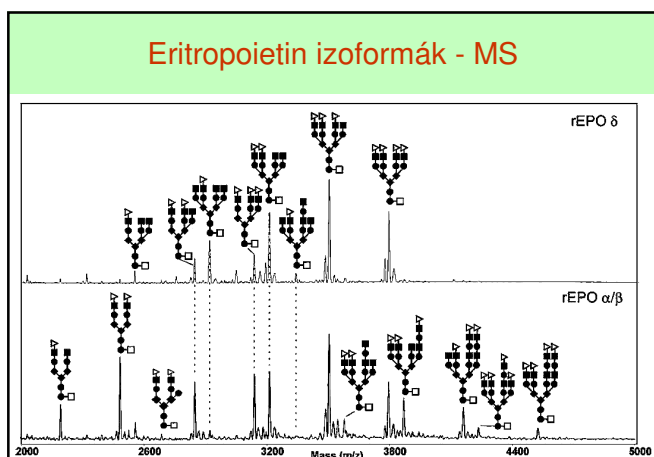
EPO δ : humán fibroszarkóma sejtvonallal termelik, a benne lévő saját EPO gént kapcsolják be CMV promotérral.

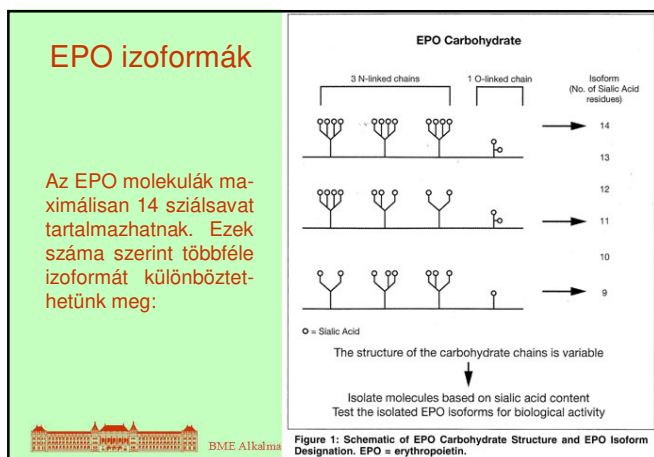
EPO ω : BHK sejtvonallal termeli az Elamex/Baxter

A különböző variánsok között kis különbségek vannak az izoforma arányban, ezek kapEifo-val, IEF-sal, MS-sel szétválaszthatók és azonosíthatók. Az eltérés a cukormonomerekben, illetve a cukorláncok elágazásaiban van, a szíalsavak elhelyezkedése is eltérő. Emiatt a biológiai hatás, illetve ennek időbeli lefutása is különbözik.









EPO izoformák

A különböző EPO izoformák hatékonysága (a hematokrit növekedése) arányos a szialsavak számával.

Isoform	Increase in Hematocrit - Day 30
8	~6
9	~10
10	~14
11	~18
12	~20
13	~23
14	~26

Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/55)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett EPO készítmények

Darbepoetin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-30, Thr-37, Val-87, Asn-88 és Thr-90, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki, → +két cukorláncot tartalmaz, ettől a szialsav-tartalma nagyobb → 3-szorosára nőtt a molekula felezési ideje.

CERA (Continuous erythropoietin receptor activator): az EPO-ra PEG láncot kötöttek → a felezési idő a húszszorosára nőtt (Roche)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett EPO készítmények

Epoetin (–α-, –β-, etc.)
same amino acid as human EPO

Darbepoetin
altered amino acid sequence

CERA
posttranslational pharmaceutical modification

Methoxy-PEG polymer
Ala 1, Lys 45 or Lys 52

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett EPO készítmények								
	Epoetin alpha	Epoetin beta	epoetin omega	Epoetin delta (Discont.)	Epoetin theta (stand-alone product)	Epoetin zeta	Darbepoetin	Methoxy-PEG-Epoetin beta
Clinical use (Brand names)	Epogen (Amgen), Procrit (Janssen-US), Eprex (Janssen-non-US), Erypo, ESPO (Kirin)	Recormon- (Roche-US), Neo-Recormon (Roche-non-US), Epogin (Chugai-non-US)	Repotin (Bioclones), EPOMAX (Baxter)	Dynepo (Shire)-unfavorable market conditions	Biopoin (CT Arzneimittel), Eporatio and Ratioepo (Ratiopharm)	Silapo (Stada)	Aranesp (Amgen)	Mircera (Roche)
Cell substrate of origin	Chinese hamster ovary Cell	Chinese hamster ovary Cell	baby hamster kidney cells	Human cell line	Chinese hamster ovary Cell	Chinese hamster ovary Cell	Chinese hamster ovary Cell	Chinese hamster ovary Cell
Terminal half life	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	25hr	130-140 hr
Mass (Dalton)	30.4	30.4	<30	<30	30.6	~30.4	37.10	60.4
