

## Rekombináns termékek és technológiák

Az orvosi célú rekombináns fehérjék funkció szerint lehetnek:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Hemosztázis fehérjék (VIII faktor, IX faktor, tPA)
- Antitestek (terápia - analitika; Herceptin - ProstaScint)
- Vakcinák (alegység vakcinák)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

---

---

---

---

---


---

---

---

## Therapeutic Protein Classes

| Product Class                 | Market (M USD, 2003) | Annual Growth Rate % |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| EPO-s                         | 7 763                | 6.1                  |
| Monoclonal Antibodies         | 6 721                | 31.4                 |
| Insulin and Insulin Analogues | 5 487                | 17.9                 |
| Interferons                   | 3 935                | 5.8                  |
| Hormones (inc. GH)            | 3 317                | 8.3                  |
| Blood Factors                 | 2 354                | 5.5                  |
| Enzyme Replacement Therapies  | 1 057                | 14.6                 |
| Interleukins                  | 219                  | 3.2                  |
| Others                        | 121                  | N/A                  |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

---


---

## Inzulin

Az inzulín emlőshormon; ez volt első rekombináns módszerrel előállított fehérje. A gyógyászati célra történő humán inzulín 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 cukorbetegség számára.**  
**Diabetes:** cukor anyagcsere zavar, tünete: megemelkedik a vércukorszint.  
 Inzulín: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

---

---

---

---

---

---

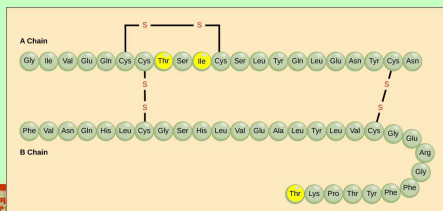
---

---

### Inzulin szerkezete

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

|        | Aminosav |      |        |
|--------|----------|------|--------|
|        | 8.       | 10.  | 30.    |
| Marha  | Ala      | Val  | Ala    |
| Sertés | Thr      | ILeu | Ala    |
| Ember  | Thr      | ILeu | Thr    |
|        | A lánc   |      | B lánc |



4

---

---

---

---

---

---

---

---

---

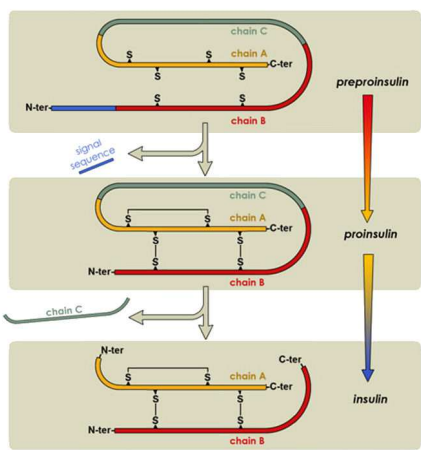
---

---

---

### 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) + 2 Arg eltávolításával alakul ki az aktív szerkezet.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

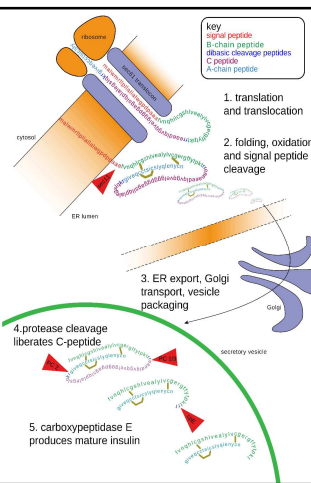
---

---

---

### 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).




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Az inzulin előállítása

1. Kémiai szintézis aminosavakból
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulin-ná
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

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből extrahálják az sertés 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 → lecsípi a láncvégi alanint.

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

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

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.

9

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

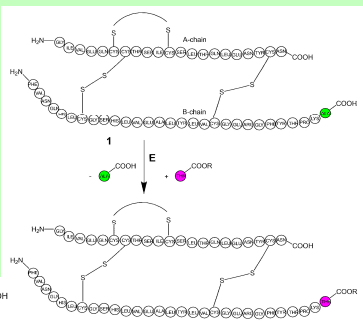
---

---

### 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 humán inzulin:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Inzulin fermentációs előállítása

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehéz, a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba. Nem-patogén, szabadban életképtelen *coli* törzs.

1. Szakaszos fermentáció (15 m<sup>3</sup>)
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 végén maradó két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)
6. Tisztítás →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

---

---

---

---

---

---

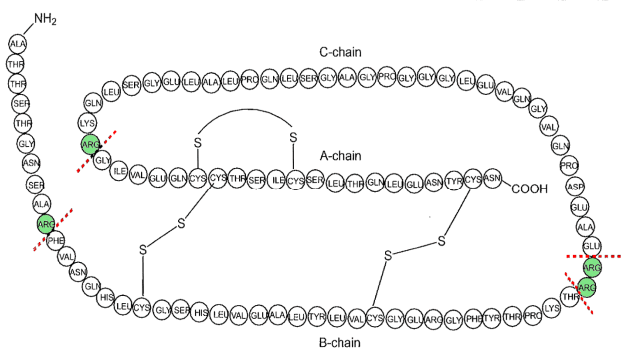
---

---

---

---

### A pre-pro-inzulin enzimes hasításai




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Inzulin fermentációs előállítása

Az inzulin rekombináns előállítása *Saccharomyces cerevisiae*-val 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

---

---

---

---

---

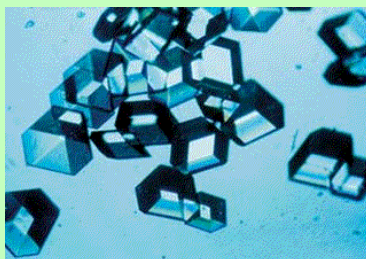
---

---

---

### 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. Így lassabban szívódik fel.  
→ +5 °C, IEP = 5,4  
(inzulin)<sub>6</sub>Zn<sub>(1-2-4)</sub>



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

---

---

---

---

---

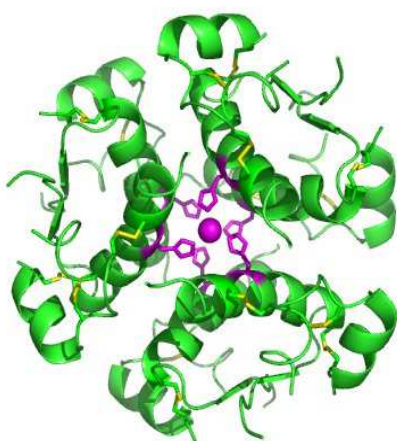
---

---

---

### Inzulin Zn-komplex

A B-10 His-ek kapcsolódnak a központi Zn<sup>2+</sup> ionhoz. Hexamer formában a legstabilabb.



BME

---

---

---

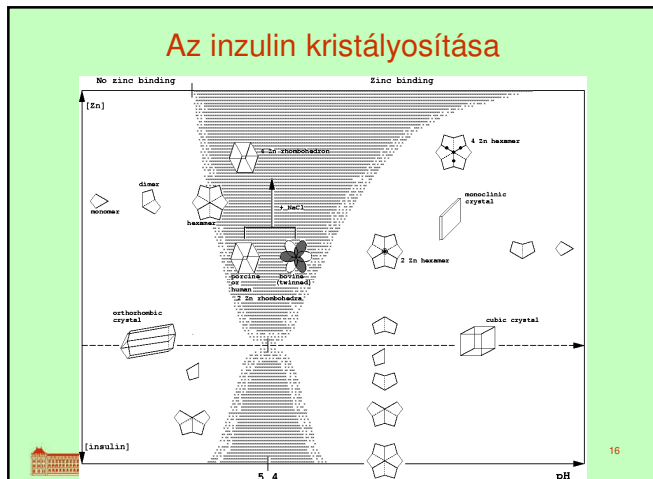
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Inzulin analitika

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

Kémiai analízis: HPLC

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

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

Immunanalízis: - reakció specifikus ellenanyagokkal

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

---

---

---

---

---

---

---

---

### Módosított inzulin molekulák

Gyors hatású inzulinok:

Lispro inzulin: 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 inzulin: 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

18

---

---

---

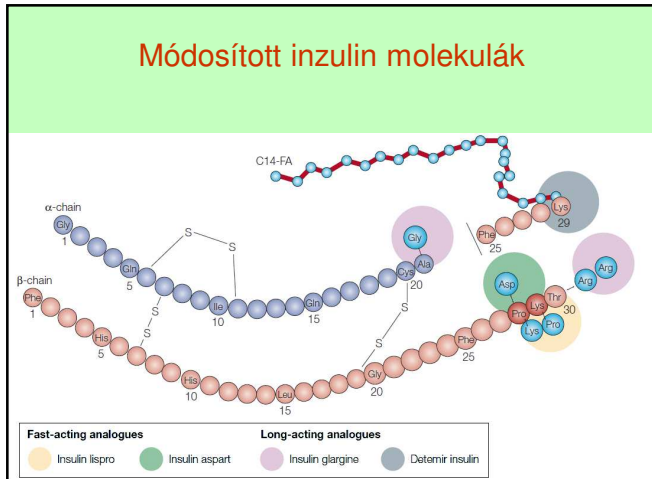
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Módosított inzulin molekulák

Elnyújtott hatású inzulinok:

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

**Detemir** inzulin: a B30 Thr-t elhagyták, és a B29 Lys amino csoportját C14 zsírsavval (mirisztilsav) acilezték. A gyártásnál rövidebb láncot termeltek (Insulin B1-29-Ala-Ala-Lys-Insulin A1-21), ezt enzimesen bontják, majd acilezik. Novo-Nordisk, Levemir néven

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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           |             |
| Glulisine                | Asn               | Lys               | Pro           | Glu | Thr           |             |
| Glargine                 | Gly               |                   | Pro           | Lys | Thr           | Arg         |
| Detemir                  |                   |                   |               | Lys | Myristic acid |             |

---

---

---

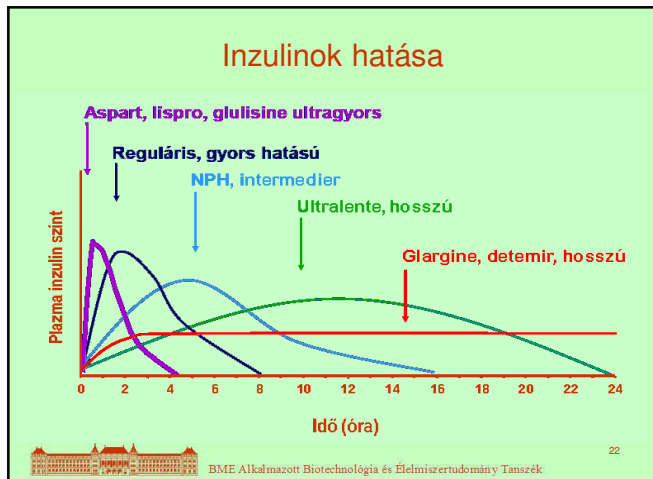
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 (erythrocyták) 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 23

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 vérséjt-pusztulás (HIV betegek, fertőzések, malária)

Doppingszerként is használják az állóképességi sportokban (hosszútávfutás, sífutás, kerékpározás, néha labdarúgók is)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 24

---

---

---

---

---

---

---

---



### 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 sztiálsavak 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

25

---

---

---

---

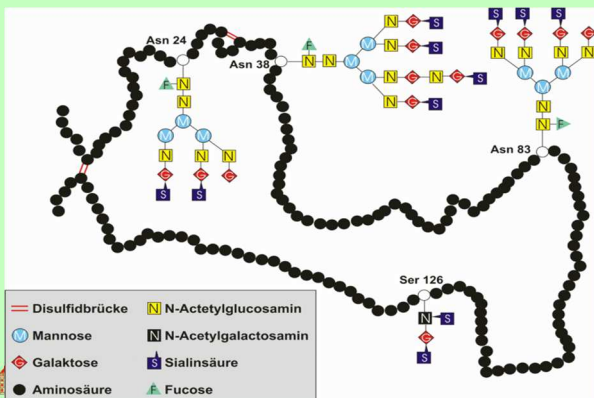
---

---

---

---

### Az EPO szerkezete




---

---

---

---

---

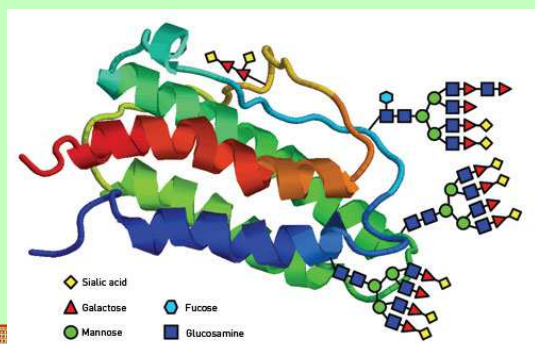
---

---

---

### Az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású  $\alpha$ -hélixből áll:



27

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

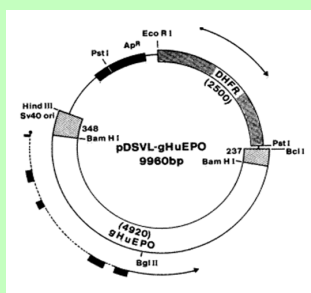
## Az EPO génbevitel vektora

Ingázó vektor, az alapja egy *E. coli* plazmid, ami tartalmazza a humán EPO gént.

Ahhoz, hogy ez emlős sejtekben szaporodni tudjon, kell egy replikációs origó (SV40, majomvírusból).

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

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




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Eritropoietin termelés

Upstream:

A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10 % szérumból + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.

4 nap után tápoldatot cserél: termelő közeg 1,5% szérumból tartalmaz.

3 naponként lefejtés, rátöltés.



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 (2800× tisztítás). Az aktivitás 84 %-a megmarad.
4. Géliszűrés Sephadex G-100 oszlopon (3200× tisztítás). Az aktivitás 66 %-a megmarad.
5. Adszorpció hidroxi-apatiton, (3260× 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-izoforrák eltérő összetételű keverékei:

EPO $\alpha$ : CHO sejtvonallal termeli az Amgen.

EPO $\beta$ : CHO sejtvonallal termeli a Roche

EPO $\omega$ : BHK sejtvonallal termeli az Elamex/Baxter

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




---

---

---

---

---

---

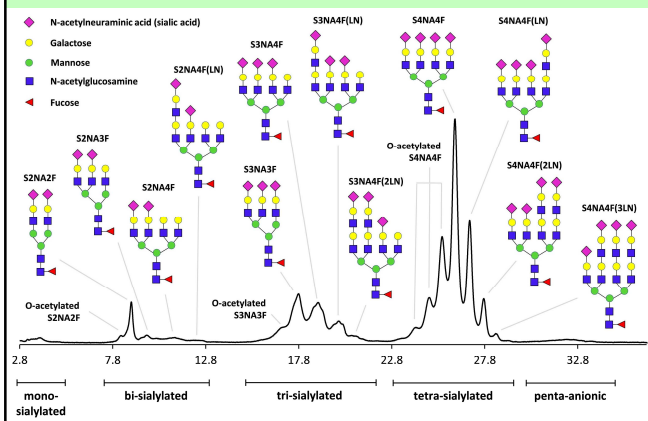
---

---

---

---

### Eritropoietin izoformák - kapELFO




---

---

---

---

---

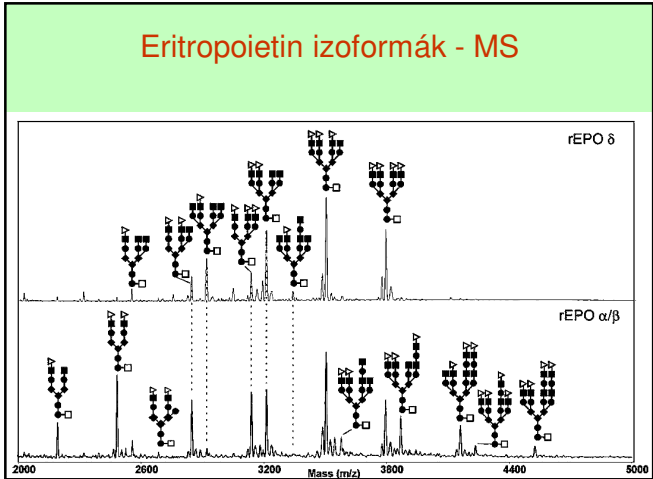
---

---

---

---

---




---

---

---

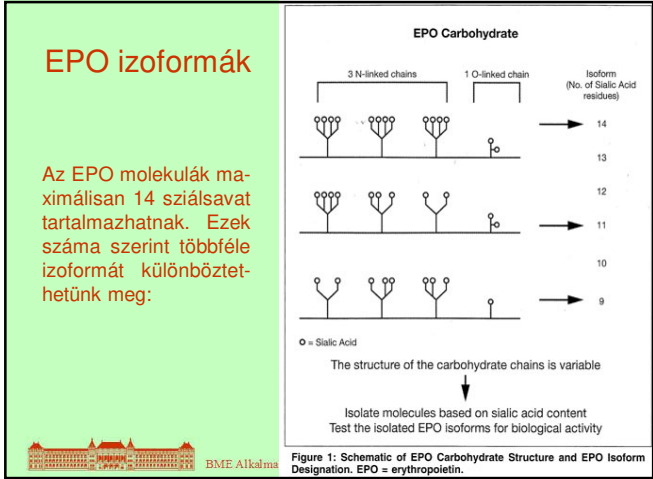
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Továbbfejlesztett EPO készítmények

Darbepoetin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-57, Thr-59, Val-114, Asn-115 és Thr-117, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki, → +két cukorláncot tartalmaz, a szíálsav-tartalma nagyobb → 3-szorosára nőtt a molekula felezési ideje.

A 24 Asn lecserélése Gln-ra → +29% hatás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

---

---

---

---

---

---

---

---

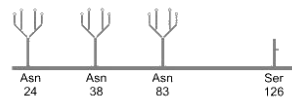
---

---

### Továbbfejlesztett EPO készítmények

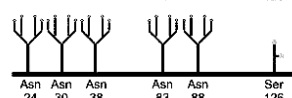
Epoetin (–α, –β, etc.)

same amino acid as human EPO



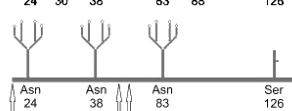
Darbepoetin

altered amino acid sequence



CERA

posttranslational pharmaceutical modification



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



38

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 Ratiopo (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                       |

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---