

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

Inzulin szerkezete

Két aminosavláncból áll (21 + 30 aminosav), amelyeket két diszulfid híd köt össze és egy harmadik stabilizál. A humán, marha és sertés inzulín 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

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

Az inzulín érése

Az inzulín 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.

3

Inzulín

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 glükagon, 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

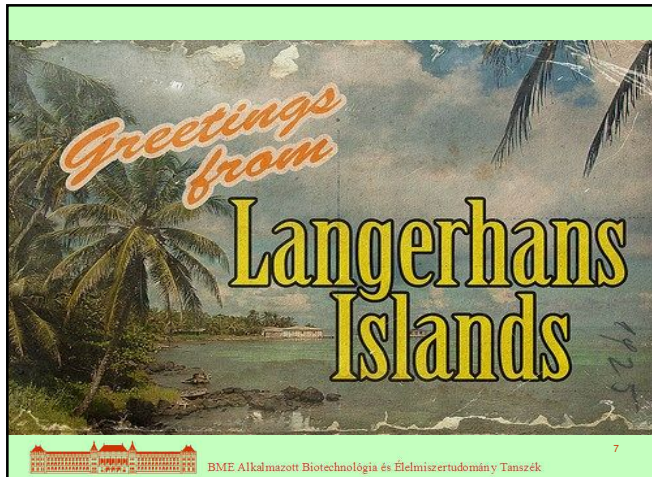
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Az inzulín 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 Biotech



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

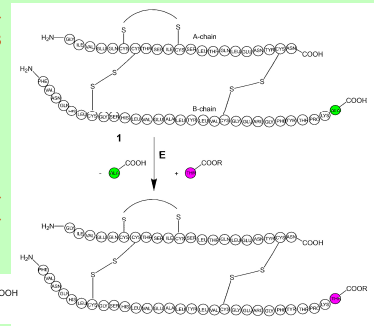
7

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

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

8

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 m³)
2. Sejteltérés (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

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 főlöslégen treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

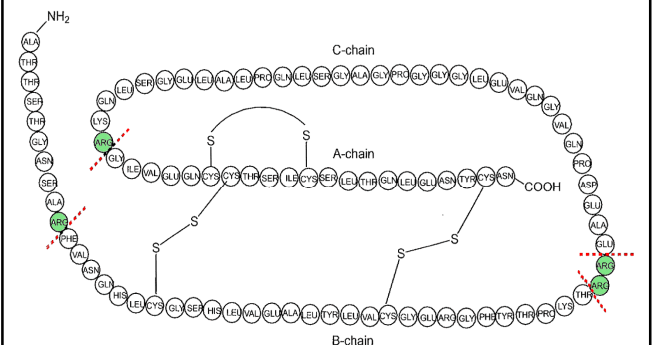
A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A pre-pro-inzulin enzimes hasításai



Inzulin fermentációs előállítása

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

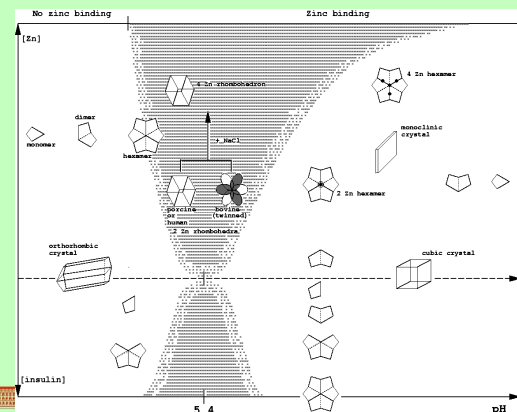
1. Az ER-ben megtörténik a szignálpeptid levágása és a folding
2. A Golgiban pedig a hasítások (PC-I,II helyett a Kex2-proteázok)
3. → a kész inzulin molekulát kell kinyerni és tisztítani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Az inzulin kristályosítása

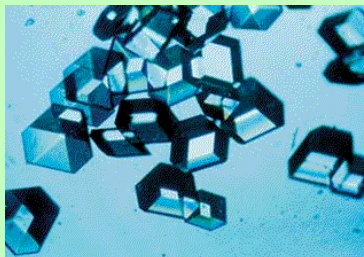


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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)₆Zn₍₁₋₂₋₄₎



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

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

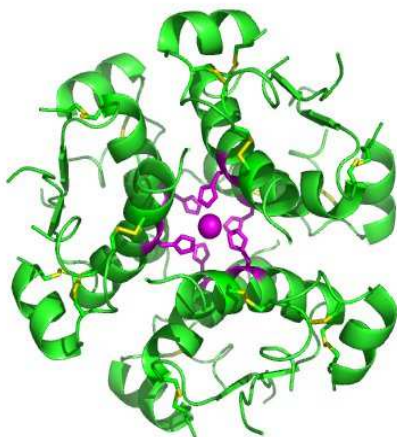


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Inzulin Zn-komplex

A B-10 His-ek kapcsolódnak a központi Zn²⁺ ionhoz. Hexamer formában a legstabilabb.



BME

Módosított inzulin molekulák

Gyors hatású inzulinok:

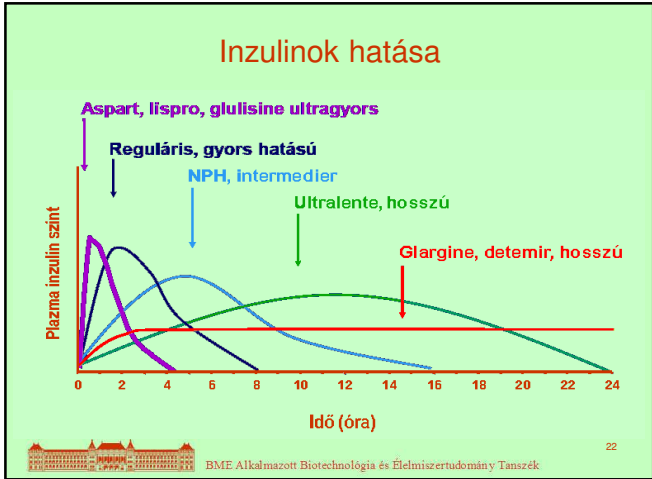
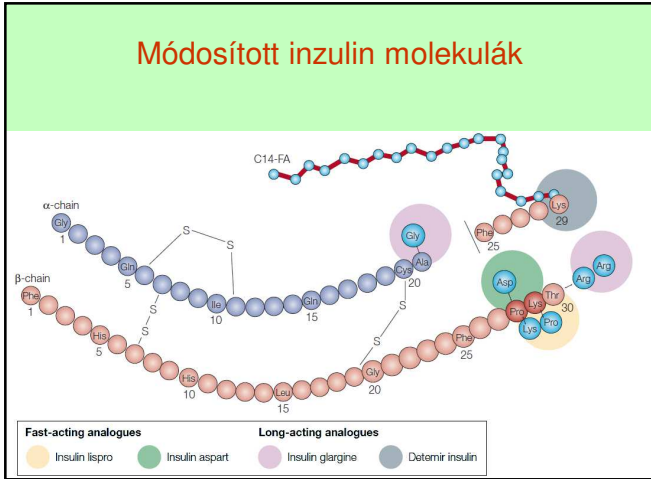
Lispro inzulin: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. Gyorsabban felszívódó anyag, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Eli Lilly, Humalog néven.

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 argint. 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 (mirisztílsav) acilezték. A gyártásnál rövidebb láncot termeltek (Insulin B1-29-Ala-Ala-Lys-Insulin A1-21), ezt enzimesen bontják, majd acilezik. Novo-Nordisk, Levemir néven

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 (érzékkelő: 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

Módosított inzulin molekulák

Source/ Type	Amino Acid Substitutions					
	A- chain Position	B- chain Position				
	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	

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

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 sziazsavak 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 (szignálopeptid), a C-terminálisról Asp hasad le.



Az EPO előállítása

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

→ rekombináns fehérjeként célszerű termeltetni.

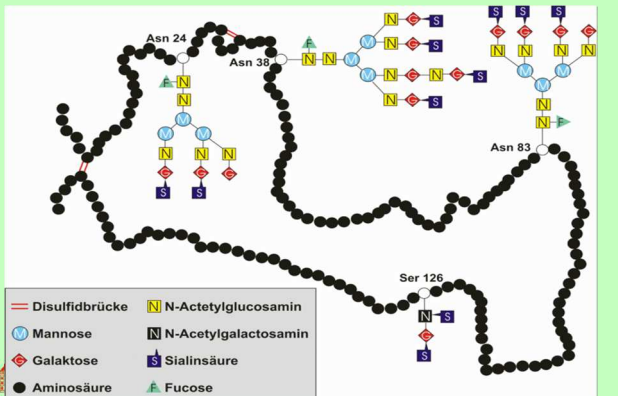
De ez nem megy prokariótákkal, mert:

- 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 szerkezete



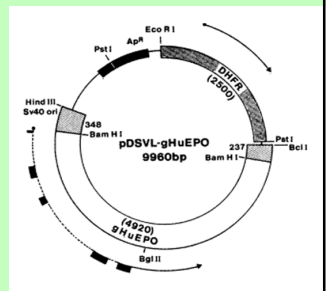
Az EPO génbevitel vektora

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).

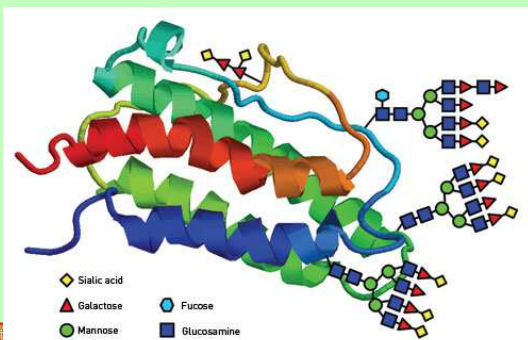
A szelekcióhoz DHFR = dihidrofolát-reduktáz markergén (metotrexát rezisztencia)

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



Az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α-héliből áll:



Eritropoietin termelés

Upstream:

A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10 % szérumból + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.
 4 nap után tápoldat cseré: termelő közeg 1,5% szérumból tartalmaz.
 3 naponként lefejtés, rátöltés.



EPO fermentációs üzem



Az eritropoietin feldolgoása

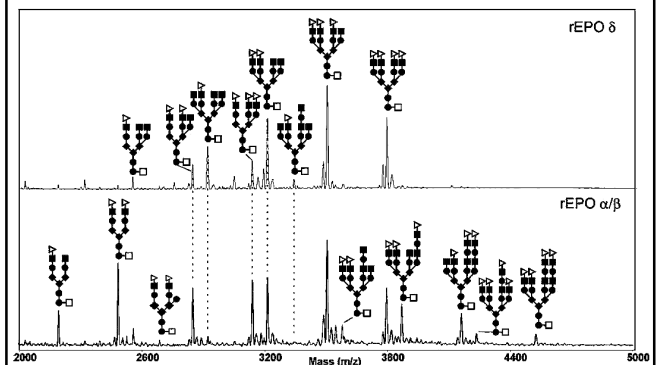
- 100 l koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel
- Immunszorbens EPO megkötés (MAB-affinitás krom.)
- Elúció: Na-acetáttal (2800x tisztítás). Az aktivitás 84 %-a megmarad.
- Gélszűrés Sephadex G-100 oszlopon (3200x tisztítás). Az aktivitás 66 %-a megmarad.
- Adszorpció hidroxí-apatiton, (3260x tisztítás) Az aktivitás 52 %-a megmarad.
- A gyógyszert ampullázzák pufferben és stabilizálják humán szérum albuminnal.
- A termék tisztaságát SDS-PAGE-sel, HPLC-vel, és MAB-ELISA-val ellenőrzik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Eritropoietin izoformák - MS



Eritropoietin készítmények

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

EPO α : CHO sejtvonallal termeli az Amgen.

EPO β : CHO sejtvonallal termeli a Roche

EPO ω : BHK sejtvonallal termeli az Elamex/Baxter

A különböző variánsok között kis különbségek vannak az izoforma arányban, ezek KapElo-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 eltérő.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

EPO izoformák

Az EPO molekulák maximálisan 14 szialsavat tartalmazhatnak. Ezek száma szerint többféle izoformát különböztethetünk meg:

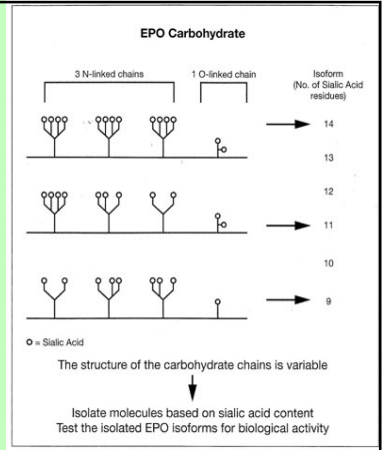
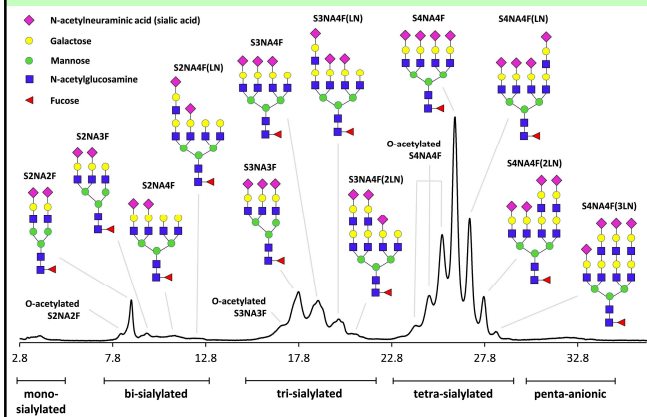


Figure 1: Schematic of EPO Carbohydrate Structure and EPO Isoform Designation. EPO = erythropoietin.

Eritropoietin izoformák - kapELFO



EPO izoformák

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

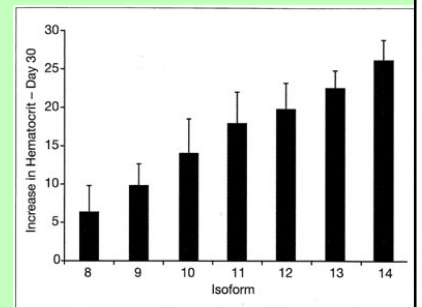


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

Továbbfejlesztett EPO készítmények

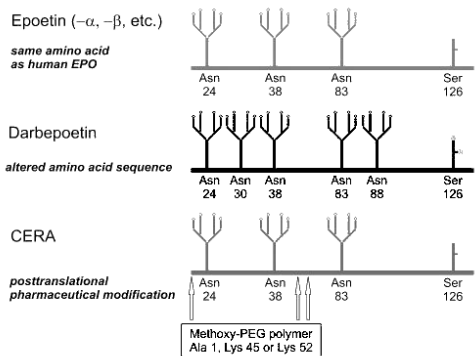
Darbepoetin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-57, Thr-59, Val-114, Asn-115 és Thr-117, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki, → +két cukorláncot tartalmaz, a szíálsav-tartalma nagyobb → 3-szorosára nőtt a molekula felezési ideje.

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)



Továbbfejlesztett EPO készítmények



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