

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:

E. coli

S. cerevisiae

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 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, megegyezik a vércukorszint.

Inzulín: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
5

Inzulín szerkezete

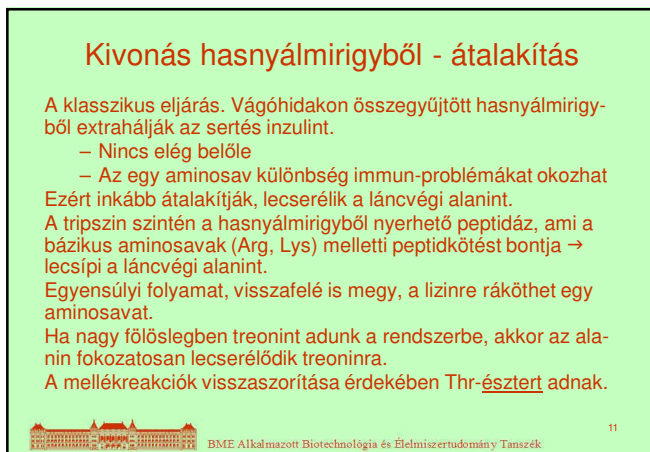
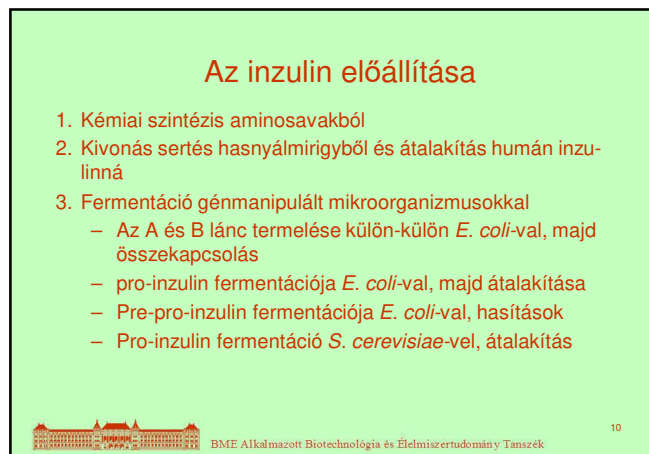
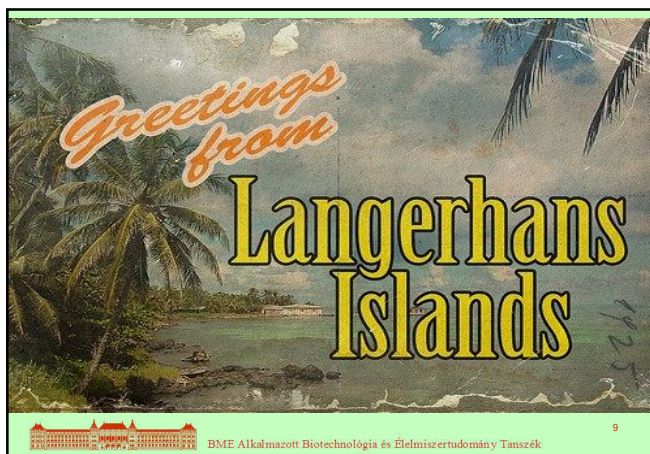
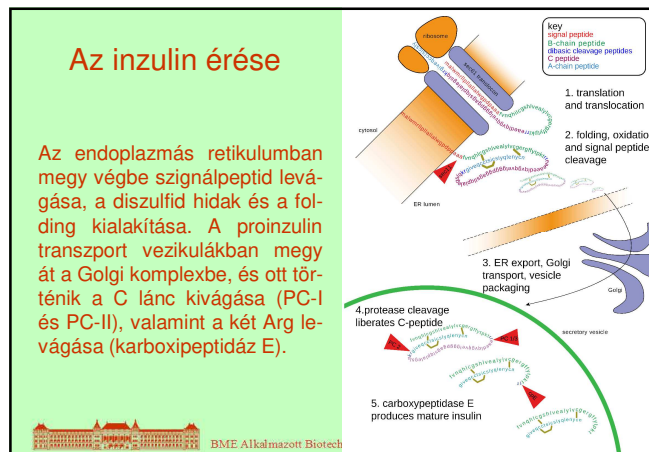
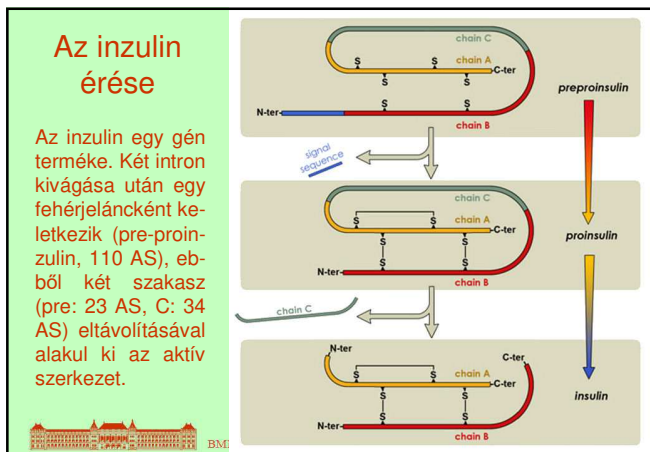
Amino acid comparison of insulin between selected species

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 inzulínok között csak néhány aminosav a különbség:

tudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
6



Inzulin fermentációs előállítása

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 brómcian 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–SO₃ csoporttá alakítják → diszulfid hidak felbontása.

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

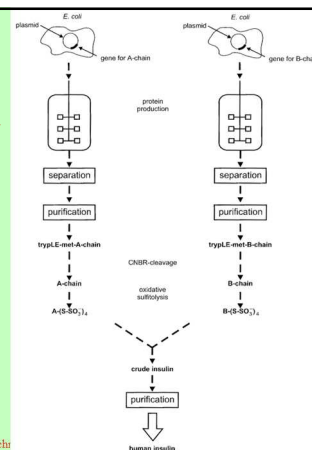


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Kettős fermentáció

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



BME Alkalmazott Biotech

Inzulin fermentációs előállítása

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

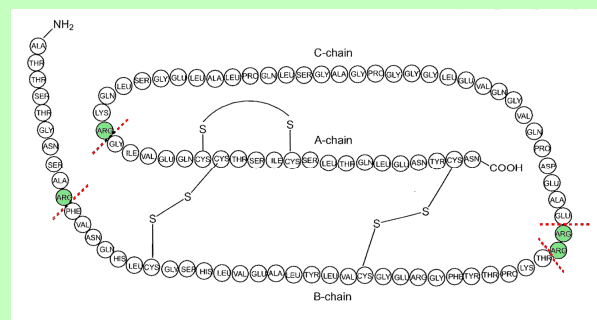
1. Szakaszos fermentáció (15 m³)
2. Sejteltérés (lízis), centrifugálás, szűrés
3. Refolding: a tercier szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
4. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
5. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

A pre-pro-inzulin enzimes hasításai



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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.

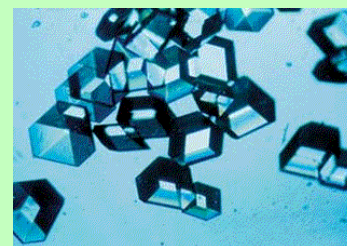


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Inzulin feldolgozás

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

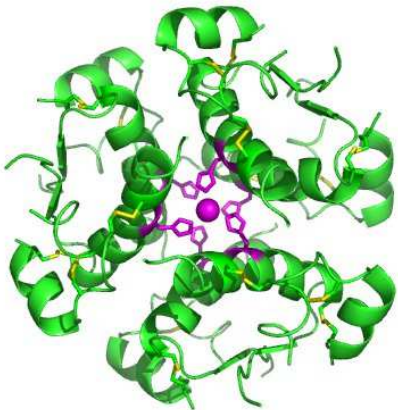



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



18

Inzulin Zn-komplex

A B-10 His kapcsolódik a központi Zn²⁺ ionhoz, hexamer formában a legstabilabb.

Az inzulin kristályosítása

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 Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 21

Módosított inzulin molekulák

Gyors hatású inzulinok:

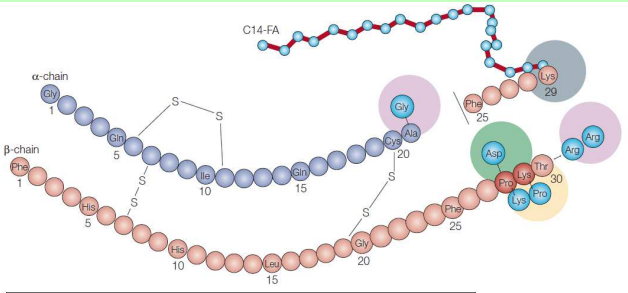
Lispro inzulin: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. Gyorsabban felszívódó anyag, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Eli Lilly, Humalog néven.

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 22

Módosított inzulin molekulák




Fast-acting analogues

- Insulin lispro
- Insulin aspart

Long-acting analogues

- Insulin glargine
- Detemir insulin




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 23

Módosított inzulin molekulák

Elnyújtott hatású inzulinok:

Glargin inzulin: (Gly + Arg) mindkét lánc C terminálisát átalakították: az A21 Asp helyére glicint kapcsolnak, a B lánc végére pedig két argint. 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 inzulin: a B30 Thr-t elhagyták, és a B29 Lys aminos csoportját C14 zsírsavval (mirisztátsav) acilezték. A gyártásnál rövidebb láncot termelnek (Insulin B1-29-Ala-Ala-Lys-Insulin A1-21), ezt enzimesen bontják, majd acilezik. NovoNordisk, Levemir néven

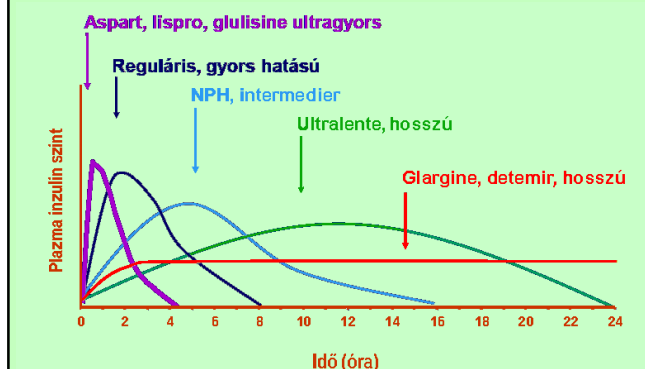


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 24

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	

Inzulinok hatása



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 (erythrociták) 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 véresejt-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 variabilis, a szialsavak mennyiségével arányos a biológiai aktivitás és a felezési idő.

A cukorrész felelős a molekula stabilitásáért is: hőmérséklet, pH, „carbohydrate engineering”

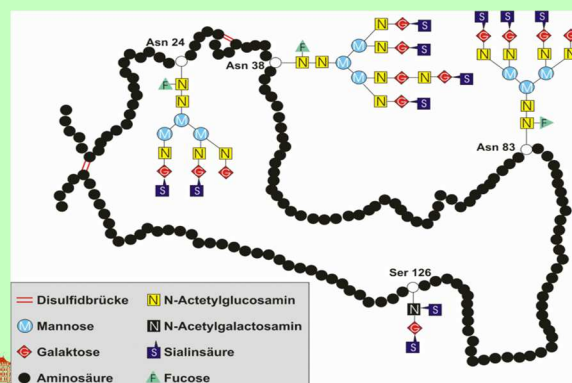
Bioszintézise: mRNS: 5 exon, 4 intron, eredetileg 193 aminosav

Posztranzlációs módosulások: az N-terminálisról 28 AS (szignálpeptid), a C-terminálisról Asp hasad le.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

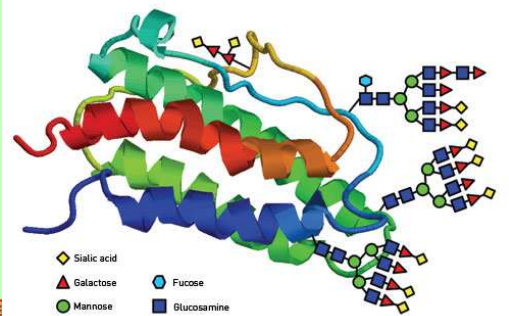
29

Az EPO szerkezete



Az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:



31

Az EPO előállítás

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, sejtenyésztésben 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 (szeneszcencia). 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) vérszérumával biztosítják (5-15%). Ez szörnyű drága (és nehezen reprodukálható), ezért töreksenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	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	0.10379
Ferrous Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	—	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	D-Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	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	—	3.7

A szérum aktív komponensei

Important Components of Serum and Their Probable Role in Cell Culture	
Component	Probable function
Proteins	
Albumin	Osmoticum and buffer
Fetuin	Lipid, hormone, mineral carrier
Fibronectin	Cell attachment
α_2 -Macroglobulin	Cell attachment
Transferrin	Trypsin inhibitor
	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)	

B3

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

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 hidrofíl polimerekkel pl. dextránnal.

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

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



Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

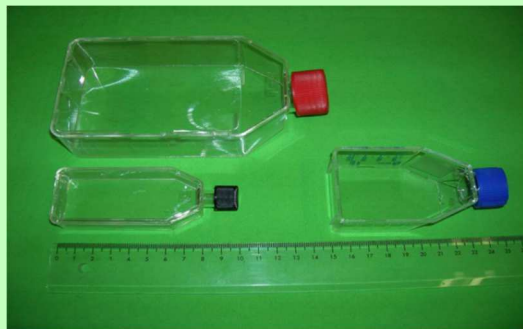
- nagyon kíméletes keverés,
- sok sejtvonal érzékeny a buborékokra

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



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

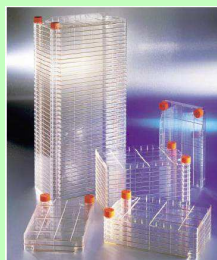


Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Felület növelése

Multitray



roller bottles



Forgó palackok/roller bottles

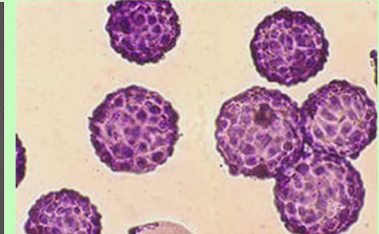
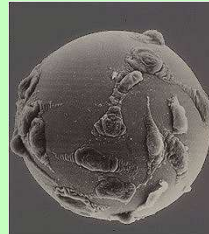


33

Mikrokarrires tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis

kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú fordulat
Mikrokarrires és szuszpenziós tenyésztés



45

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierrel 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

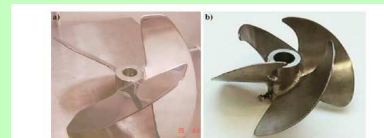


Fig. 11 (a) An ABC 'stephant car' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil

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)

47

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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, majomvírusból).

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

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



48

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

EPO izoformák

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

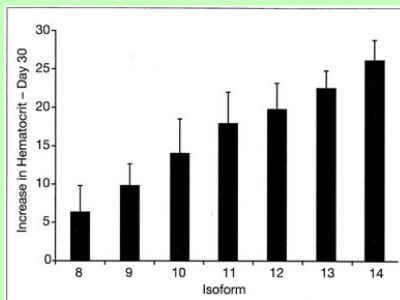


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/55)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett EPO készítmények

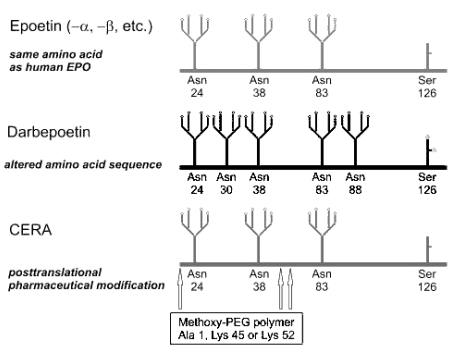
Darbepoetin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-30, Thr-37, Val-87, Asn-88 és Thr-90, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki, → +két cukorláncot tartalmaz, ettől a szialsav-tartalma nagyobb → 3-szorosára nőtt a molekula felezési ideje.

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



57

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