

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – I

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejlesztése:

I. A törzs kialakítása

- 1) A molekula megismerése (aminosavsorrend, szénhidrátok)
Glikozilálás
- 2) Megfelelő analitika kidolgozása
- 3) Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
- 4) Kodonoptimalás
- 5) A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
- 6) Klónozás, expresszió, szelekció – RCB létrehozása

II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalás (fermentációs körülmények)
- 2) Downstream optimalás (végtermék izolálása)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1. A fehérje molekula megismerése

- Az aminosav sorrend elemzés (MS – MS)
- A glikozilációs mintázat elemzése (MS – MS)
- A másodlagos/harmadlagos szerkezet felderítése (legalább a diszulfid hidak), (Röntgen-kristallográfia)
- Domén-szerkezet, természetes érési/aktiválási útvonal
- Aktiváló/inaktiváló hatások, bomlékonyság



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

2. Analitikai módszerek kidolgozása

- Az analitika a „szemünk”, amivel követhetjük a fejlesztés minden lépését
- Ha nincs jó analitika az elején, akkor később derülnek ki a hibák – buktuk az egész addigi munkát.

Lehet:

- Szerkezeti: - enzimmel célzottan feldaraboljuk a fehérjét és a kis peptideket HPLC-vel vizsgáljuk
- MS-MS
- Aktivációs: immunanalitikák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Példa: inzulin analitika

A rekombináns inzulin azonosítása (azonos-e mindenben a humánal):

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




4

3. A gazdaszervezet kiválasztása

Lehet:

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



5

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

	Alacsony	→			Magas
Előállítás sebessége	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA	
Techn. költsége	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN	
Tipikus hozam	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 BACTERIA	 YEAST	
Post transl. módosítás	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN	
Hatóság által már jóváhagyott technológiák	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA	 MAMMALIAN	



BEVS - Baculovirus Expression Vector System

6

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

Minél komplexebb a célfehérje, annál fejlettebb gazdasejtet kell választani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

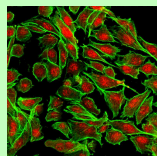
3. A gazdaszervezet kiválasztása

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

E. coli

S. cerevisiae

Chinese Hamster Ovary (CHO)



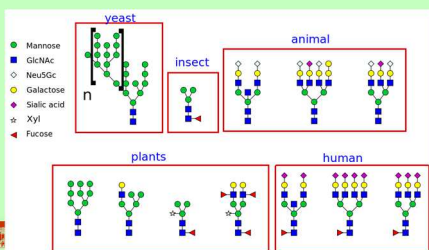
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

3/1 Glikozilálás

Az eukarióta szervezetek különböző szénhidrát-mintázatokat hoznak létre:

Baktériumok: nincs Élesztők: sok mannóz egység
 Rovarok: rövid, fukozilált Emlős sejtek: komplex „kétágú”
 Növényi sejtek: fukozilált és xilozilált



9

A glikozilálás típusai

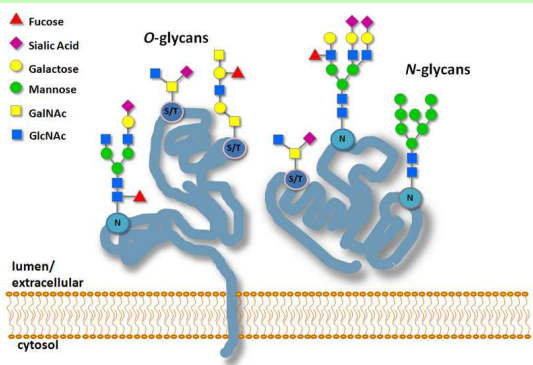
A cukorrészek az aminosav lánc elkészülte után kerülnek rá a molekulára. Ez csak bizonyos funkció csoporttal rendelkező aminosavakon lehetséges:

- > N-glikozilálás → az Asn-X-Ser/Thr/Cys aminosav-hármas nitrogénjén, ahol X bármely aminosav lehet.
- > O-glikozilálás → Ser vagy Thr-on.

A két glikozilálás más biokémiai mechanizmussal történik, más helyen a sejten belül.



N- és O-glikoziláció



N-glikozilálás

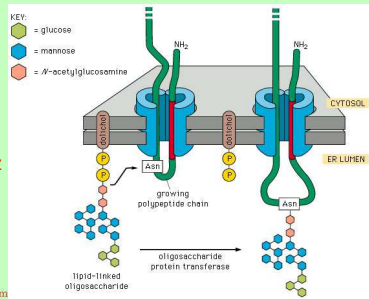
A fehérjékben előforduló Asn-X-Ser/Thr egységeknek mintegy kétharmad részéhez kapcsolódik cukorrész. A többiek szterikus okok vagy az X aminosav savas jellege miatt fedetlenek maradnak.

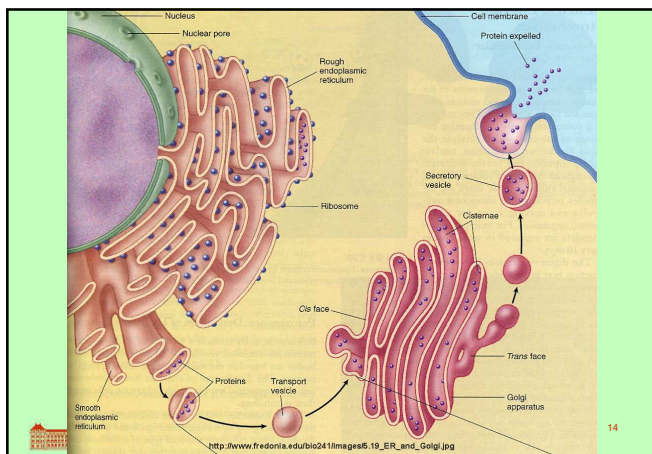
A fehérjék szénhidrát részeik kialakulása során hosszú utat tesznek meg a sejten belül. A riboszómáról az ER lumenjébe kerülnek, onnan transzport vezikulákban végig haladnak a Golgi komplex cisz-, médium- és tranz rétegein és csak ezután kerülnek a felhasználási helyükre. Az útvonal minden állomásán lokalizált enzimek végeznek egy-egy átalakítást az oligoszacharidokon.



Az N-glikozilálási lépés

Maga a glikozilálás az endoplazmás retikulum membránjának belső oldalán történik, ott, ahol a membrán felületén kötött riboszóma egy transzlokonon keresztül „betolja” a fehérjeláncot a lumen térbe. A megfelelő aminosavhármass felbukkanása esetén egy OST = oligoszacharil-transzferáz enzim helyezi át a 14-oligoszaharidot a dolicholról a fehérjére.



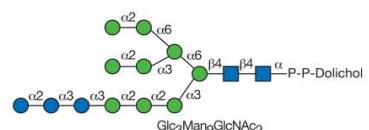


14

N-glikozilálás

Az N-glikozilálás során először egy 14 cukoregységből álló szerkezet alakul ki, az ER membránjába horgonyozott dolichol (19 tagú poli-izoprénil pirofoszfát) templáton. Ez tevődik át a fehérjére és soklépéses érési folyamat eredményeként jön létre a végső, komplex forma.

- Galactose (Gal)
- N-Acetylgalactosamine (GalNAc)
- Galactosamine (GalN)
- Glucose (Glc)
- N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
- ▲ Fucose (Fuc)
- Mannose (Man)
- N-Acetylmannosamine (ManNAc)
- ◆ N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)

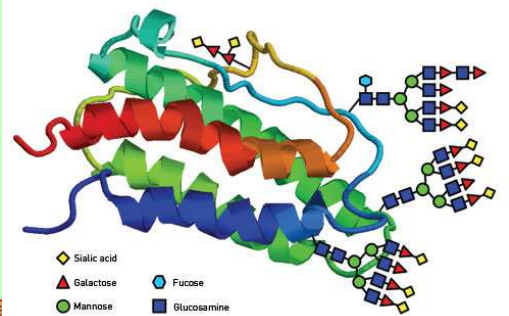


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Példa: az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:

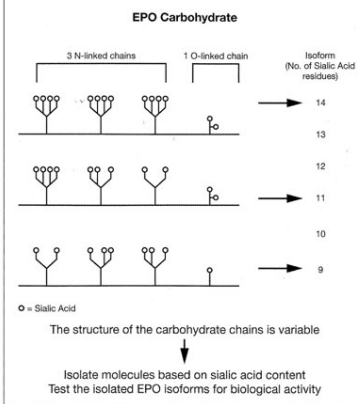


◆ Sialic acid ● Fucose
▲ Galactose ■ Glucosamine
● Mannose

19

EPO izoformák

Az EPO molekulák maximuman 14 szílsavat tartalmazhatnak. Ezek száma szerint többféle izoformát különböztethetünk meg:



EPO Carbohydrate
 3 N-linked chains 1 O-linked chain Isoform (No. of Sialic Acid residues)

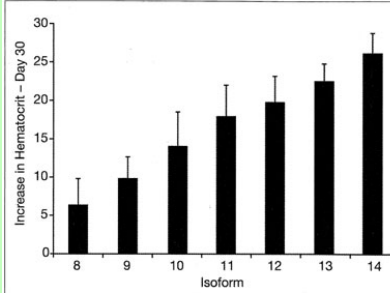
14
13
12
11
10
9

○ = Sialic Acid
 The structure of the carbohydrate chains is variable
 ↓
 Isolate molecules based on sialic acid content
 Test the isolated EPO isoforms for biological activity

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

EPO izoformák

A különböző EPO izoformák hatékonysága (a hematokrit növekedése) arányos a szílsavak 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 = 20/21)

4. Kodon optimálás

A genetikai kód redundáns, egy aminosavat több (2,4,6) triplett is kódol. Nem mindegy, melyiket használjuk, a szintézis sebességét befolyásolja:

- A tRNS-ek kópiaszáma és illeszkedése
- A mRNS legyen stabil és ne képezzen hurkokat
- A DNS szálak könnyű szétválasztása (G+C arány)

Ez minden gazdára más és más. Erre specializálódott cégek szoftvereikkel optimálnak.



5. A konstrukció megtervezése

A célgén köré megtervezett vágási helyekkel „expressziós kazettát” építenek:

promóter-operátor-célgén-terminátor



Példa: az NdeI enzim vágáshelye (CA|ATG) megegyezik a metionin kódjával (ATG), a bacifehérjék első aminosavával



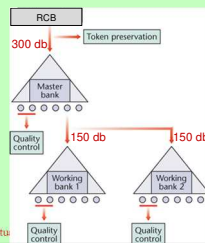
6. Génmanipuláció

1. Az optimált bázissorrendű DNS-t erre specializált cégekkel szintetizáltatják.
2. Kétszálúvá alakítják
3. Felszaporítják PCR-rel
4. Beépítik a kiválasztott vektorba (eukarióta host esetén ingázó vektor)
5. Génbevitel
6. Expresszió, szelekció



7. Sejtbankok

A fejlesztések, a termelések, a klinikai kezelések stabil ismételtetésének alapja az azonos és változatlan képességű sejtek biztosítása. Ezt a sejtbankok létrehozásával oldják meg. Egyetlen sejtől indulnak ki, minimális osztódás (néhány generáció) után kis tételekbe szétosztják a tenyészetet, majd -180 °C-on tárolják. A cél: a tulajdonságok megőrzése (ne legyen mutáció, vírus- vagy plazmidfertőzés, előregedés). Története és a vizsgálatok jól dokumentáltak legyenek. Évente néhány ampullát újra megvizsgálják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7. Sejtbankok

Research Cell Bank (RCB):
A szelekció után a legjobb vonalat (+ egy tartalék) tárolják. Célja, hogy a következő fejlesztések mindig azonos tenyészetből indulhassanak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

7. Sejtbankok

Master Cell Bank (MCB)
Az RCB-ből indul ki, a cél azonos mint RCB-nél, de GMP-ben készített, nagyon alaposan karakterizált (GLP módszerek, több mint 50 féle vizsgálat), jól dokumentált és tárolt (GMP) tenyészet. Az engedélyekhez a dokumentációt mellékelni kell. Olyan érték, hogy több távoli helyen tárolják.

Working Cell Bank (WCB)
Az MCB-ből indul ki, célja, hogy az üzemi termeléshez mindig azonos oltóanyagot biztosítson. Ezt is ellenőrizni kell.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27
