

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – II/2

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejtése:

I. A törzs kialakítása

- 1) A molekula megismerése (aminosav sorrend, glikozilálás)
- 2) Megfelelő analitika kidolgozása
- 3) Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
- 4) Kodonoptimalizálás
- 5) A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
- 6) Klónozás, expresszió, szelekció
- 7) Sejtbankok létrehozása

II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalizálás (fermentációs körülmények)

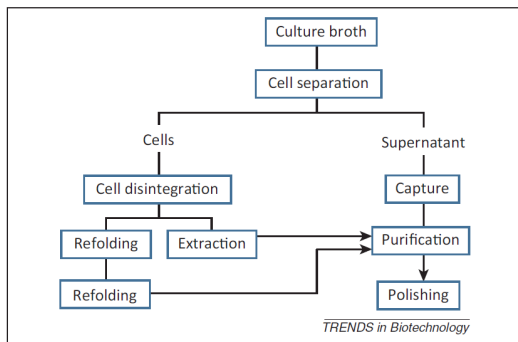
2) Downstream optimalizálás (a végtermék izolálása)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

A fehérjeizolálás általános sémája



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

II/2. Downstream optimalizálás

A feldolgozási technológia a különböző gazdaszervezetek (mikroorganizmusok és állati sejtek) esetében az első lépésekben különbözik, a későbbiekben, a fehérjék tisztításánál már nagyon hasonló műveleteket alkalmaznak.

II/2/a termékizolálás prokariótákból

A baktériumok, így az *E. coli* rendszerint intracellulárisan termeli a rekombináns fehérjéket, sőt gyakran zárványtesteket (inclusion body) képez.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Fehérje zárványtestek

A rekombináns fehérjéknél gyakran előfordul, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem szilárd szemcséket, zárványokat alkot a sejteken belül. Csak prokariótáknál fordul elő, eukariótáknál nem. (humán: genetikai betegségek)

E. coli →

Legömbölyített, erősen fénytörő, nagy sűrűségű zárványok.



4

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fehérje zárványtestek

A zárványképződésnek vannak előnyei is:

- > A zárvány tiszta fehérje (>90%), alig kell tisztítani
- > Védett a proteázoktól
- > Nem károsítja a gazdasejtet.

Nem lehet előre megmondani, hogy melyik fehérjéből lesz zárvány. Nem számít:

- > Genetika (host, vektor, génkörnyezet)
- > Méret, oldhatóság, szerkezet

5

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fehérje zárványtestek

Fehérje bioszintézis

- folding → natív fehérje
- zárvány képződés → IB

Ha a folding sebessége kicsi a termeléshez képest, akkor sok fehérje megy a zárványokba.

A prokariótákban a folding azért lassabb, mert:

- > nincsenek chaperonok
- > a citoplazma redukív közeg, nem kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Csak a perioplazmikus tér oxidatív.

6

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fehérje zárványtestek

A zárványtestek feldolgozásának lépései:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. Sejtfeltárás | sejttörmelék |
| 2. Centrifugálás, mosás | IB paszta |
| 3. Oldás, szolubilizálás | oldott, unfolded fehérje |
| 4. Folding/refolding | oldott, aktív fehérje |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

1. Sejtfeltárás

Baktériumsejtek feltárása: lizozim + erős mechanikai behatások (ultrahang, nagynyomású homogenizátor)

2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek kompakt, nagy sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A felületen visznek magukkal szennyezéseket → mosással tisztítják (pH=8, 0,2 M NaCl, Triton X100, EDTA, DTT, NaN₃)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Oldás, szolubilizálás

Tömör szerkezet, vizes közegben oldhatatlan.

Kaotróp, denaturáló oldószerek: 6 M guanidin HCl, 8 M karbamid.

~5 g/l fehérje, 1-4 óra.

Puffer: enyhén lúgos közeg, pH ~8 (tiolát anionok).

Fémionok: EDTA

Erősen redukív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotritol, dithioeritrol, redukált glutation, merkaptó-etanol, ciszteín, cisz-tamin.

Tisztítás: ha az IB pasztát jól kimosták, alig szükséges. A foldingnál ügyis felhígul.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Folding

A folding („hajtogatás”) a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását jelenti. A szerkezetet rögzítik az intramolekuláris

- diszulfid hidak
- másodlagos kölcsönhatások (ionpár, H-hidak, van der Waals)

Az intermolekuláris kapcsolatok hibás szerkezetet eredményeznek.

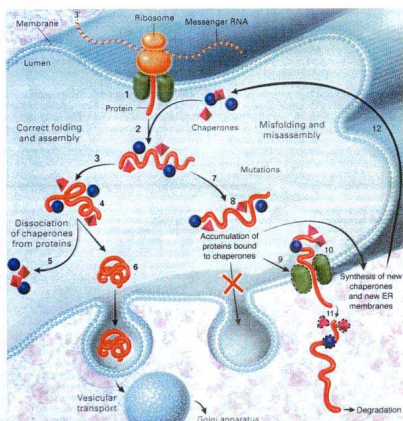


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Folding

Eukariótákban a folding az ER belsőjében történik. A folding normális menetét chaperonok (dajkafehérjék) katalizálják. A hibás fehérjéket a sejt proteozómái lebontják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

In vitro folding

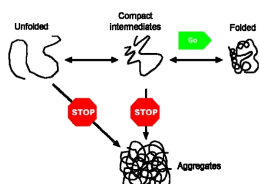
Prokariótáknál a foldingot ER és chaperonok nélkül kell végrehajtani.

Az aggregáció (másodrendű reakció) megakadályozása érdekében a molekulákat távol kell tartani egymástól → hígítás

$$\frac{dc}{dt} = k_f c$$

$$\frac{dc}{dt} = k_A c^2$$

A lehetséges mellékreakciók megakadályozása:



BME Alkalmazott

In vitro folding

A fehérje koncentráció: 10-50 mg/l (100 – 500x hígítás)

Trükkök:

- lassan engedik be a fehérjeoldatot a folding pufferbe
- több ponton táplálják be
- Több adagban adják hozzá a pufferhez, megvárják, amíg az előző adag jórészt átalakul

A hígítás hátránya: nagy térfogat, nagy tartály, nagyon sok folding puffer kell → drága



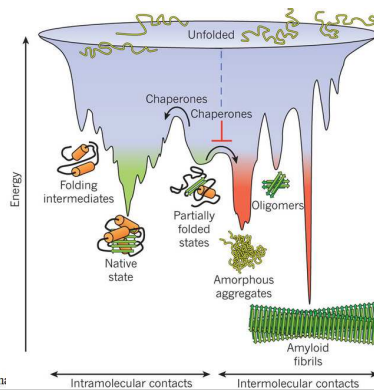
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

In vitro folding

A fehérje nagyon sokféle alakot vehet fel. Ezek közül csak egy a natív → feltételezik, hogy ez az energiaminimum. Ha elég sokáig „rázzuk”, odatalál a natív formához.

Kritikus: a diszulfid hidak helyes kialakítása.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

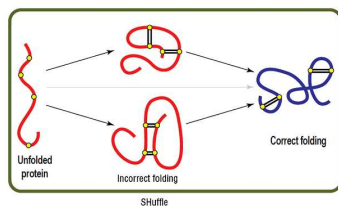
Intramolecular contacts Intermolecular contacts

In vitro folding

A lehetséges diszulfid hidak száma: $n \times (n-1) / 2$

Elsőre nagy valószínűséggel nem a natív keletkezik → felbontás-újrakötés dinamikus egyensúlyát kell megteremteni → „redox-puffer”:

- 1-10 mM –SH és –S–S– vegyület, egymás mellett, oxidáló túlsúly, pl.: Glutation (oxidált > redukált)
- Cisztein < cisztin
- β-merkaptó-etanol < diszulfidja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

In vitro folding

A pufferben még:

pH puffer (pl. 0,1-0,2 M Tris), enyhén lúgos (pH=7,5-8,5),
→ az -SH-k részben tiolát anionná alakulnak

Kaotrópok kis koncentrációban

Arginin (0,4 – 1 M)

Detergensek (ionos vagy nemionos, pl. Triton-X)

EDTA (2 – 10 mM) kelátképző

PMSF (~0,1 mM) proteáz-gátló

Esetleg chaperon-hatású molekulák: alkil-karbamid, PEG,
lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek

4–20 °C, 24-48 óra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

TRX fehérje/domén

A TRX lehet önálló fehérje, de lehet egy más aktivitású fehérjén belül egy domén.

Két Cys-t tartalmaz, ezek oxidált állapotban diszulfid hidat alkotnak, redukálva két -SH csoportot.

A red forma képes arra, hogy más fehérjék diszulfid hídjait felbontsa. Visszaredukálásához NADPH szükséges.

Feladata a korrekt cisztein párosodás kialakítása és a hibás párosodás korrekciója a fehérje hajtogatás során.

Ezt beadagolva elő lehet segíteni az in vitro foldingot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Egyéb folding technikák

Dialízis: nem hígítanak, hanem dialízissel fokozatosan csökkentik a kaotróp és a redukáló S-vegyületek koncentrációját → néha jó, de néha kicsapódik.

Micellákban és liposzómákban: ha a fehérje molekulák elkülönülten állnak, nincs aggregáció.

Hidrofób kromatográfia: során a fehérje sokszorosan adszorbeálódik-deszorbeálódik az apoláris felületen, ennek során "gyűrődik" és "megtalálja" a jó foldingot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

II/2/b termékizolálás állati sejt tenyészetből

A jellemző műveleti sorrend (de nincs köbe vésvé):

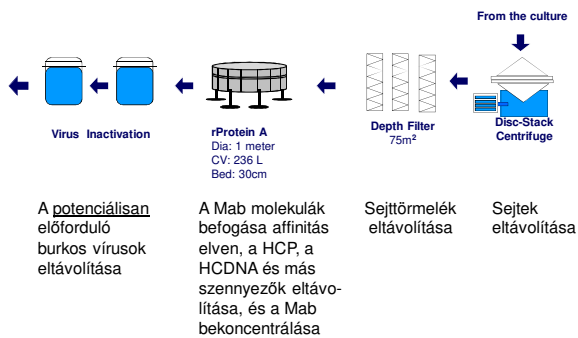
- A. Sejtek elválasztása → szilárd-folyadék elválasztás
műveletek: szűrés, centrifugálás
- B. Koncentráció lépés (capturing) → a víztől választjuk el
műveletek: adszorpció, membránszűrés, kromatográfia,
(csapadékképzés)
- C. Tisztítás → a termék és a szennyezések elválasztása.
műveletek: mint az előbb, de főleg kromatográfia
- D. Vég tisztítás (polishing) → a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják.
+ műveletek: vírusmentesítés, sterilizálás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Mab termelés emlős sejttel – Downstream A, B



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

A. A sejtek elválasztása

A sejtenyészeteknél az első lépések jóval egyszerűbbek. Az állati sejtek sokkal nagyobbak, mint a baktériumok, könnyebben elválaszthatók – kisebb g értékű centrifugák

Perfúziós tenyészeteknél a kapott lé egész sejteket nem is, csak sejttörmelék tartalmaz. Mélységi szűrés, egyszer használható, emiatt drága.

Sejtfeltárással sincs szükség, a termék a lében található.



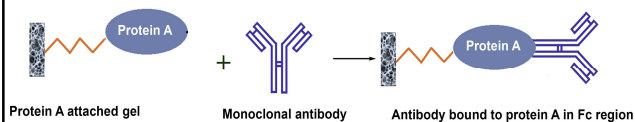
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

B. Koncentrálás (capturing)

A termék elválasztása a víztől és a nagyon eltérő jellegű szennyezésektől. Alkalmos művelet az affin-kromatográfia (valójában adszorpció).

Példa: volt: Faktor IX - heparin
itt: Mab – Protein A kötés

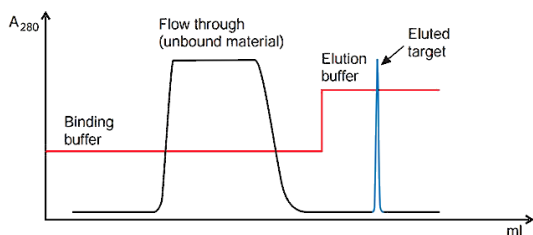


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Protein A kromatográfia

A terméket kötjük, a szennyezéseket kimossuk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Protein A kromatográfia

A töltet élettartama: (fontos, mert nagyon drága)

Table 4.12 Protein A Resin Lifetime Study

Reuse Cycle Number	Yield (%)	HCP (ng/mg)	Acidic Variants	Aggregate %
6	97	8,100	9	2.2
20	97	7,900	10	2.4
70	97	6,500	11	2.0
130	94	9,500	11	1.9
170	94	8,800	8	2.5
204	91	8,300	9	2.1
250	90	7,900	9	2.2

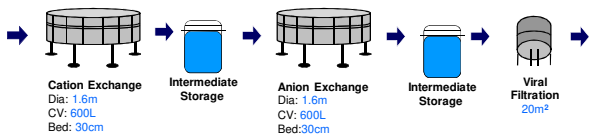
Kismértékű kitermelés csökkenés, de a minőségi paraméterek nem változtak.

Élettartam: legalább 250 ciklus



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mab termelés emlős sejttel – Downstream C



Savas töltésű variánsok és HCP eltávolítása

Aggregátumok, vírusok, HCP és HCDNA eltávolítása

További (gyakorlatilag az összes) potenciális vírus eltávolítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

C. Tisztítás

A szennyezők elválasztása – lehetőleg a termék maximális megtartásával.

A szennyezéseket kötjük meg, a terméket átengedjük (flow through).

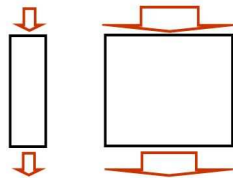


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

Léptéknövelésnél azonos anyagú és szemcseméretű töltetek esetén hogyan növeljük az oszlop méretét?



Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:

$v = \text{térfogatáram} / \text{keresztmetszet}$
→ a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

Mab termelés emlős sejttel – Downstream C, D

I.B.I. CryoPreservation System

Hosszú idejű tárolás

Bulk Filtration (BDS) 3m²

A potenciálisan előforduló mikrobiális szennyezők eltávolítása, 0,2 µm szűrő

UF/DF Step 80m²

Puffercsere a végleges tároló pufferre és a Mab koncentráció beállítása

Intermediate Storage

Hydrophobic Interaction
Dia: 1.6m
CV: 600L
Bed: 30cm

További aggregátumok és HCP eltávolítása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

D. Végtisztítás (polishing)

A fehérje felhasználáshoz szükséges közeg, állapot beállítása. A gyógyszerkönyvekben előírt tulajdonságok, tisztaság elérése.

Például néhány követelmény:

Tests	Acceptance criteria	Methods	Results
Tests for purity			
G0	27-52 corrected area%	CE-LIF/ In-house	55.8%*
G1	30-38 corrected area%		28.5%
G1'	9-12 corrected area%		9.7%
G2	5-12 corrected area%		5.0%
Impurities with molecular masses differing from that of the product Mab			
Main peak:	at least 99%	SEC-HPLC/ In-house	99.6%
	Heavy chain + light chain altogether at least 97%	Chip electrophoresis (reducing)/ In-house	99.7%
Mab charge variants and impurities			
Main peak:	at least 45%	Ion-exchange HPLC/ In-house	56.1%
Sum of (acidic) impurities before the main peak:	n.m.l. 15%		8.2%
Peak pertaining to the first lysine variant:	n.m.l. 40%		31.0%
Sum of other (basic) impurities:	n.m.l. 8%		4.7%
Bacterial endotoxins	≤ 3.0 EU/ml	Kinetic turbidimetry (harmonized Ph. Eur./USP)	<0.04 EU/ml

Vírusinaktiválás / eltávolítás

Fizikai módszerek

Inaktiválás hőkezeléssel

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gözölés

Eltávolítás

- Szűrés
- Kromatográfias módszerek
- Kicsapás

Kémiai módszerek

- Solvens – Detergens eljárás
- β-Propiolakton
- Jód

Fotokémiai módszerek

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin



Vírusinaktiválás / eltávolítás

PASZTÖRIZÁLÁS

Fehérje oldat

Stabilizálószer adagolás

Hőkezelés 10 óra 60°C (vízfürdő v.duplikátor)

Stabilizálószer eltávolítás


További tisztítás



Vírusinaktiválás / eltávolítás

SD (SOLVENT-DETERGENT) KEZELÉS

S: 1 % TNBP tri-n-butyl-foszfát
 D: 1 % detergens (Triton X-100, Tween)
 4 óra 30° C-on (burok leoldása)
 Extrakció növényi olajjal (pl. steril szójaolaj)
 Adszorpciós tisztítás (C18 tölteten)
 Ultraszűrés




37
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Vírusinaktiválás / eltávolítás

A vírusmentesítési műveletek hatékonyságát különböző ismert vírustenyészetek hozzáadásával minősítik.

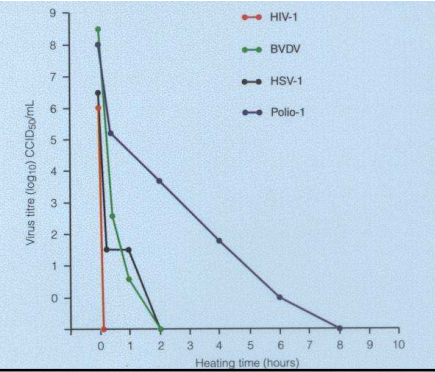
A vírustiter csökkenését logaritmus skálán adják meg. Egy log-nyi csökkenés 10%-os túlélésnek felel meg. Ennek az az előnye, hogy az egymást követő műveletek log értéke összeadható.

Általában az az elvárás, hogy a technológia során összesen 15-20 log-nyi csökkenés legyen.




38
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Beriplex P/N® pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



Heating time (hours)	HIV-1 (log ₁₀ CCID ₅₀ /mL)	BVDV (log ₁₀ CCID ₅₀ /mL)	HSV-1 (log ₁₀ CCID ₅₀ /mL)	Polio-1 (log ₁₀ CCID ₅₀ /mL)
0	8.5	8.5	8.5	8.5
1	0	2.5	5.5	5.5
2	0	0	3.5	3.5
4	0	0	0	1.5
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0



39

Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

<u>Modellvírusok</u>	HIV env.,RNA	Herp. vir. env.,DNA	BVDV Mod.f.Hep.C	Polio n.env.,RNA
Pasteurization (log 10)	> 6,6	> 6,0	> 8,5	> 7,9
Nanofiltration (log 10)	>7,1	> 7,2	4,0	(0,3)
Total reduction (log 10)	> 21,1	19,9	15,5	15,5

HBV: Nanofiltration reduction of 4 log
 Remaining steps > 6,5 log (chimpanzees)
 Total reduction: > 10 log



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

Sterilszűrés

A vírusmentesítés után nincs sok értelme, de a hatóságok előírják.

Az átlagos baktériumszűréshez 0,45 µm-es szűrőt használnak, itt a mikoplazmák (kicsi, plasztikus sejtfa-lú sejtek) garantált eltávolítása miatt 0,2 mikronos szűrőket írnak elő.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

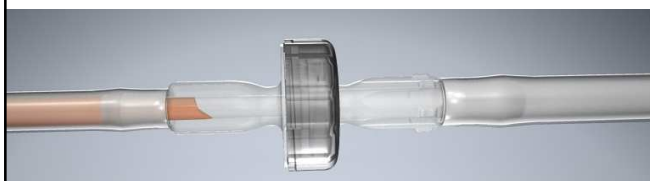
41

Egyszer használatos eszközök

A feldolgozási műveletek során is terjednek az egyszer használatos eszközök. Tartályok helyett műanyag zsákok, eldobható szűrők, oszlopok, csövek. Az előny itt is a tisztítás, sterilizálás és ezek validálásának elhagyása.

Például: steril konnektorok

Összekattintás és a zárófólia kihúzása után zárt rendszerben, sterilén történhet az áttöltés.



Egyszer használatos tároló

Flexel® 3D Bag Modular Palletank® System



Specifications	
Material:	Stainless Steel 304L
Surface Finish:	Bad Blasted
Volumes:	100 200 L, 500 L, 1,000 L
Dimensions	
100 200 L	792 × 592 × 720 mm (31.2" × 23.3" × 28.3")
500 L	1192 × 792 × 856 mm (46.9" × 31.2" × 33.7")
1,000 L	1192 × 992 × 1235.5 mm (46.9" × 39.1" × 48.6")
Stack ability	
100 200 L	3×
500 L	2×
1,000 L	not to be stacked

Description
The Modular Palletank® Systems are stainless steel containers designed for the safe and

Flexibility
Each Palletank® includes an integrated pallet base that allows easy carriage by pallet-jack