

### 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)



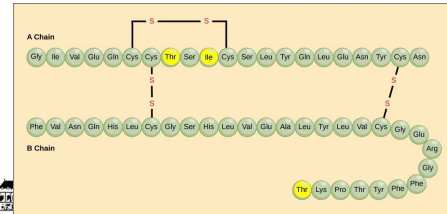
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

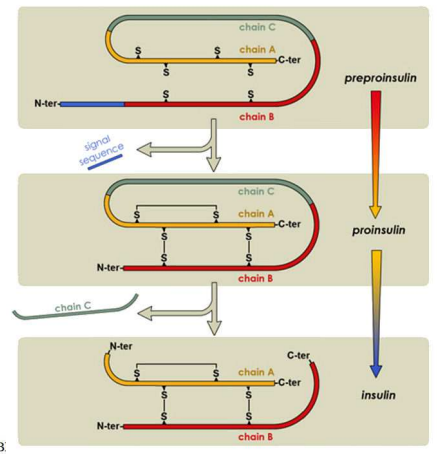


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

### Inzulin

Az inzulín emlíshormon; 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 aminosavszekvenca meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.

Nélkülözhetetlen a cukorbetegség számára. Diabetez: cukor anyagcsere zavar, tünete: megemelkedik a vércukorszint. Inzulín: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás

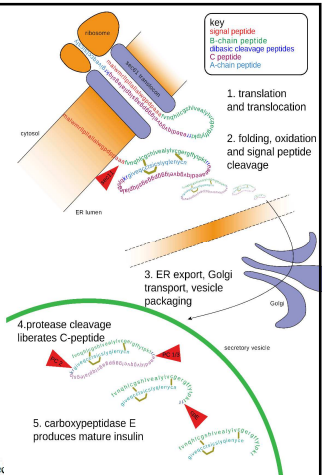


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

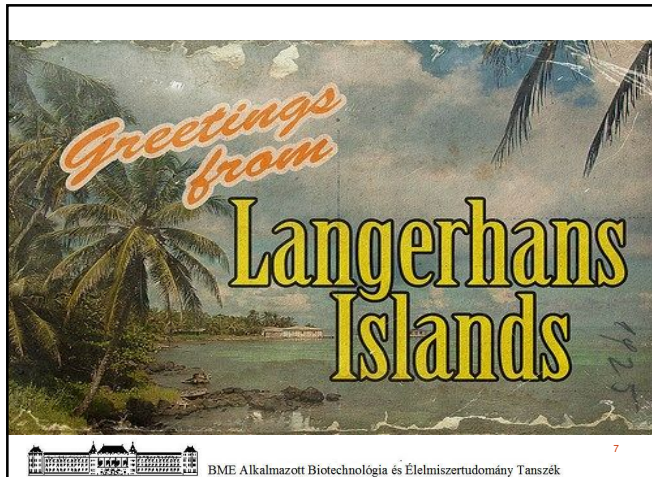
### Az inzulín érése

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 Biotec

3

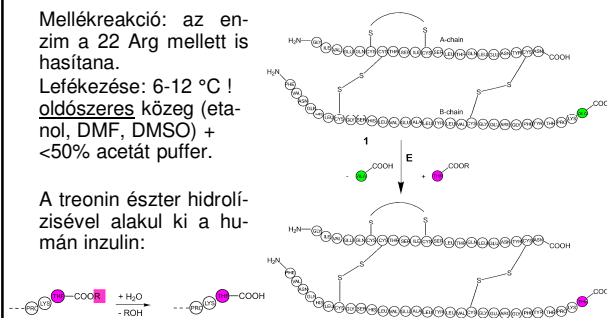


## Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

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

## Az inzulin előállítása

- Kémiai szintézis aminosavakból
- Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná
- 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

## 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.

- Szakaszos fermentáció (15 m<sup>3</sup>)
- Sejtfeltárás (lízis), centrifugálás, szűrés
- Refolding: a terciér szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
- Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
- A B végén maradó két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)
- Tisztítás →



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.

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

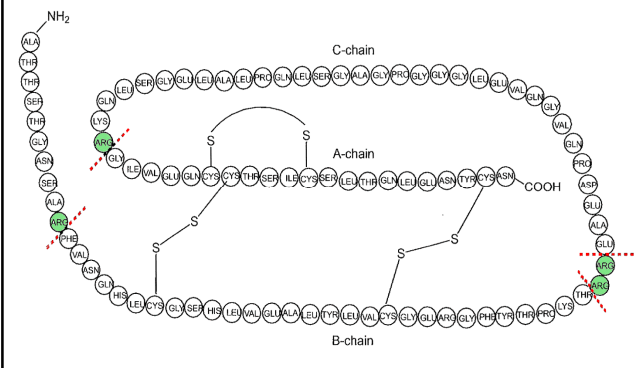
Ha nagy főlöslében treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## A pre-pro-inzulin enzimes hasításai



## Inzulin fermentációs előállítása

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

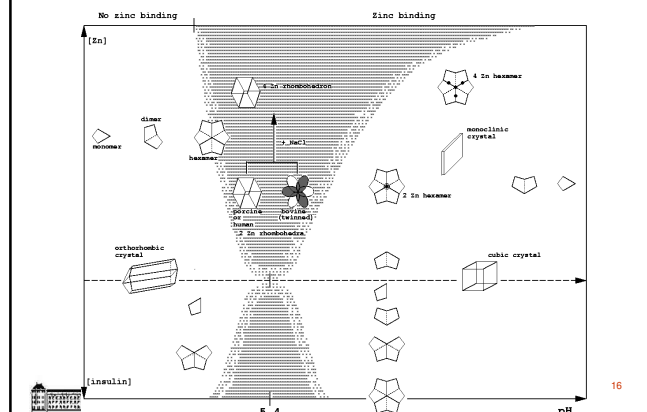
1. Az ER-ben megtörténik a szignálpeptid levágása és a folding
2. A Golgiban pedig a hasítások (PC-I,II helyett a Kex2-proteázok)
3. → a kész inzulin molekulát kell kinyerni és tisztítani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

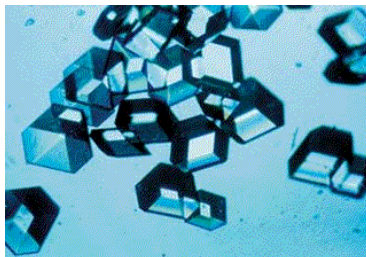
## Az inzulin kristályosítása



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)<sub>6</sub>Zn<sub>1(1-2-4)</sub>



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) ötféle hasítva (fingerprint)
- aminosav-analízis (teljes hidrolízis után)

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

Immunanalízis: - reakció specifikus ellenanyagokkal

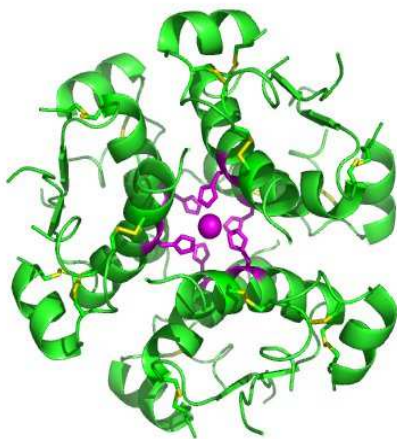


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## Inzulin Zn-komplex

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



BM

## Módosított inzulin molekulák

Gyors hatású inzulinok:

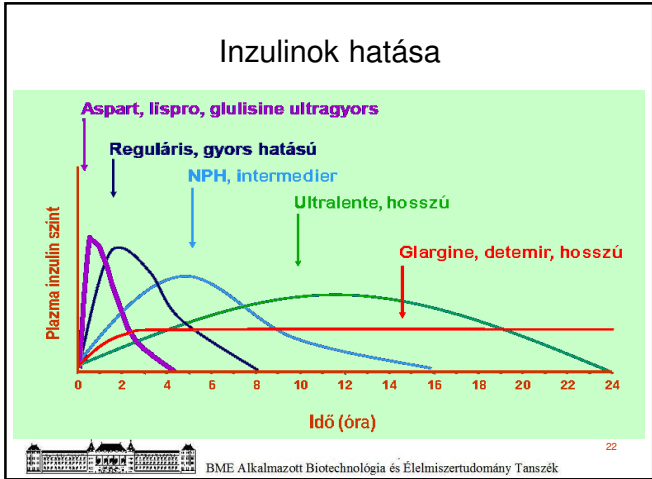
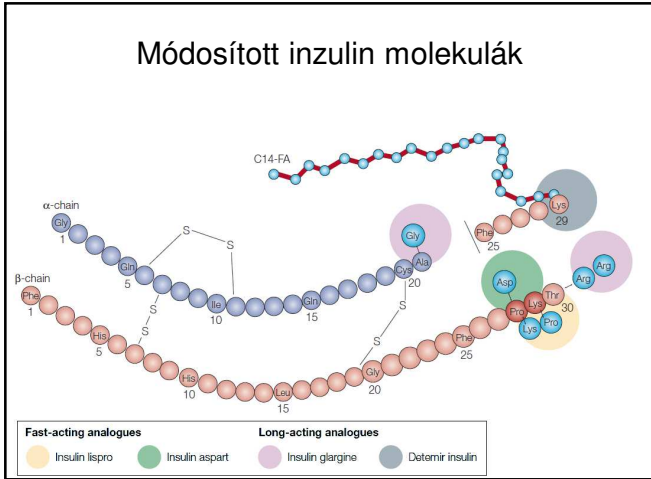
Lispro inzulin: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. Gyorsabban felszívódó anyag, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Eli Lilly, Humalog néven.

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 inzulín molekulák

Elnyújtott hatású inzulínok:

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

### 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 (erytrociták) 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.

### Módosított inzulín 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	

### 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)



## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

## 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

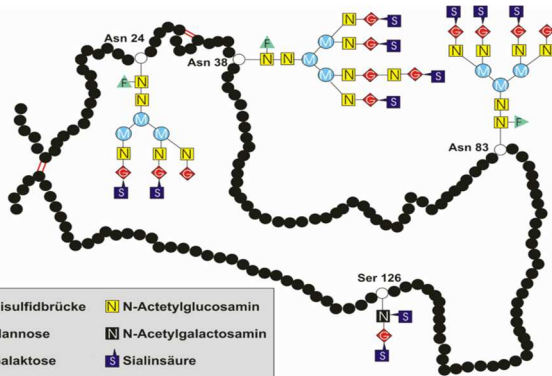
Ezért állati sejtekben, sejtenyészetben kell megoldani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

## Az EPO szerkezete



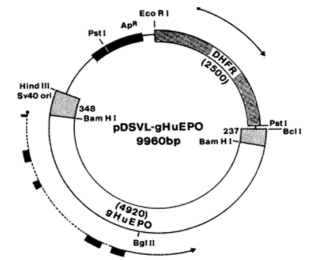
## Az EPO génbevitel vektora

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) sejtkben

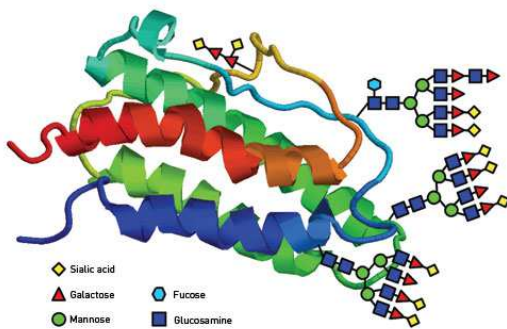


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

## Az EPO harmadlagos szerkezete

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## Eritropoietin termelés

Upstream:

A BHK/CHO sejtvonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10 % szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.  
4 nap után tápoldat csere: termelő közeg 1,5% szérumot tartalmaz.  
3 naponként lefejtés, rátöltés.



EPO fermentációs üzem



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

### Az eritropoietin feldolgoása

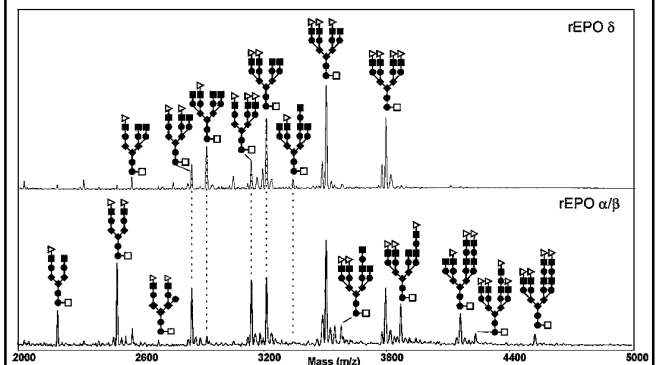
- 100 l koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel
- Immunoszorbens EPO megkötés (MAB-affinitás krom.)
- Elúció: Na-acetáttal (2800× tisztítás). Az aktivitás 84 %-a megmarad.
- Gélszűrés Sephadex G-100 oszlopon (3200× tisztítás). Az aktivitás 66 %-a megmarad.
- Adszorpció hidroxipapatiton, (3260× 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 $\alpha$ : 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 KapElo-val, IEF-sal szétválaszthatók és azonosíthatók. Az eltérés a cukormonomerekben, illetve a cukorláncok elágazásaiban van, a szialsavak elhelyezkedése is eltérő. Emiatt a biológiai hatás, illetve ennek időbeli lefutása is különbözik.

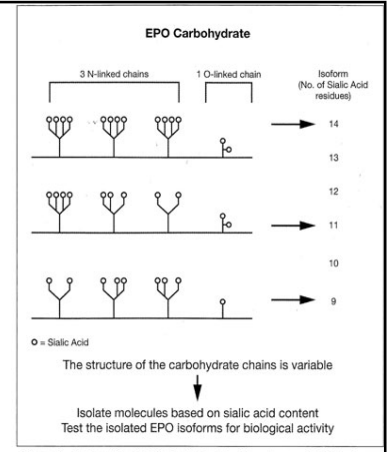


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

### EPO izoformák

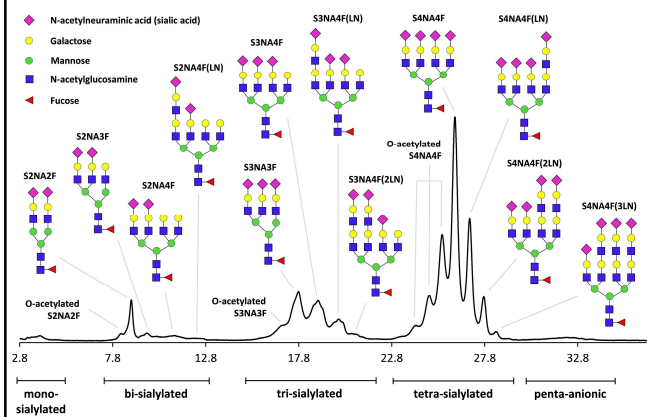
Az EPO molekulák maximálisan 14 szialsavat tartalmazhatnak. Ezek száma szerint többféle izoformát különböztethetünk meg:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

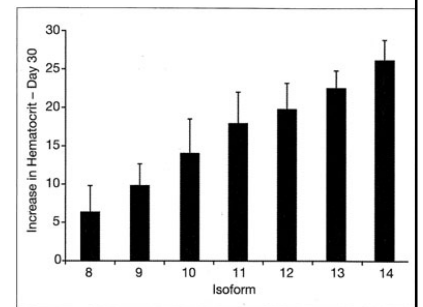


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/isoform)



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

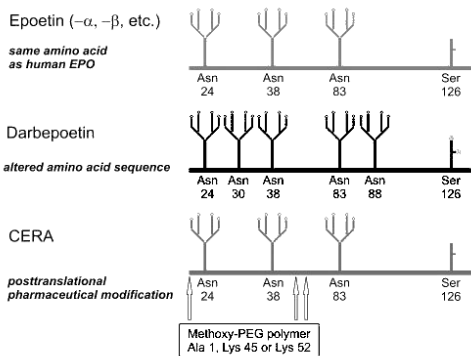
**CERA** (Continuous erythropoietin receptor activator): az EPO-ra PEG láncot kötöttek → a felezési idő a húszszorosára nőtt (Roche)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

### Továbbfejlesztett EPO készítmények



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
<b>Clinical use (Brand names)</b>	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)
<b>Cell substrate of origin</b>	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
<b>Terminal half life</b>	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	6-9 hr	25hr	130-140 hr
<b>Mass (Dalton)</b>	30.4	30.4	<30	<30	30.6	~30.4	37.10	60.4