

# Biotermék technológia 2

## Msc. Biomérnök hallgatók részére

# Rekombináns fehérjetermékek előállítása

## 1. Rész



**Ballagi András, PhD.**  
**BME Címzetes Egyetemi Tanár**



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**A fehérjetermelés szabályozása**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**



# Tartalom folyt.

**Monoklonális antitestek**

**Monoklonális antitestek gyártási technológiája**

**Biosimiláris gyógyszerek**

**A véralvadás diagnosztika rekombináns fehérjéi és mérési módszerei**



# A biotechnológia ágazati felosztása

## **Piros** (Humán- és állategészségügyi) Biotechnológia:

Humán és állati gyógyszerek, terápiák előállítása a biotechnológia eszközeivel. (Össejt terápia, gén terápia, fehérje terápia, antitest terápia, diagnosztika...)

## **Fehér** (Ipari) Biotechnológia:

Biotechnológiai módszerek felhasználása a hagyományos műanyag, textil stb. ipar termékeivel azonos értékű, de alternatív, környezetkímélőbb vagy teljesen környezetbarát, olcsóbb technológiák által.

(bioüzemanyag, mosóporok, aminosavak, vegyszerek, biopolimerek...)

## **Zöld** (Növényi) Biotechnológia:

Idegen növényfajok közti géntranszfer, mely által új, előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező kultúrnövényeket állít élő az iparág. (rovar, hőmérséklet és szárazság rezisztens, nagy terméshozamú fajok)

Transzgenikus növények (terápiás vagy ipari célú fehérjék)



# Fehér biotechnológia

**Sajt enzim: chymosin (borjú negyedik gyomor)**

**rekombináns chymosin enzim 60.000 kg/év,  
14 millió t / év sajthoz**

*Kluyveromyces lactis*

**Gist-brokades  
Maxiren**

**Establ. on chrom.**

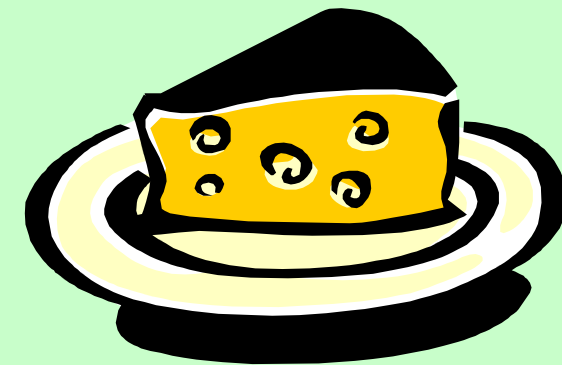
*Escherichia.coli*

**Pfizer  
Chy-Max**

**Fermentation  
Intracell., incl.  
bod.**

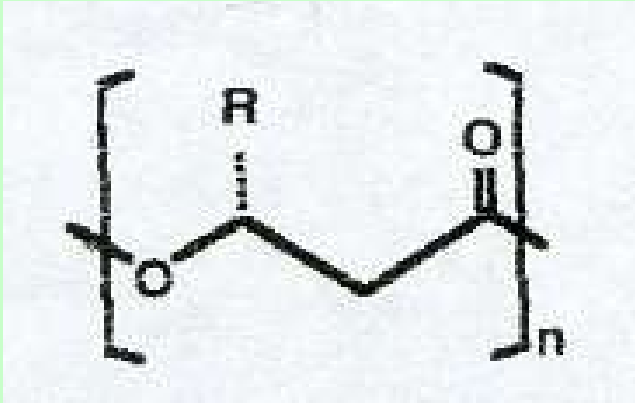
*Aspergillus niger var.  
awamori*

**Genencor  
Chymogen**



# Fehér biotechnológia:

## Műanyag gyártás...



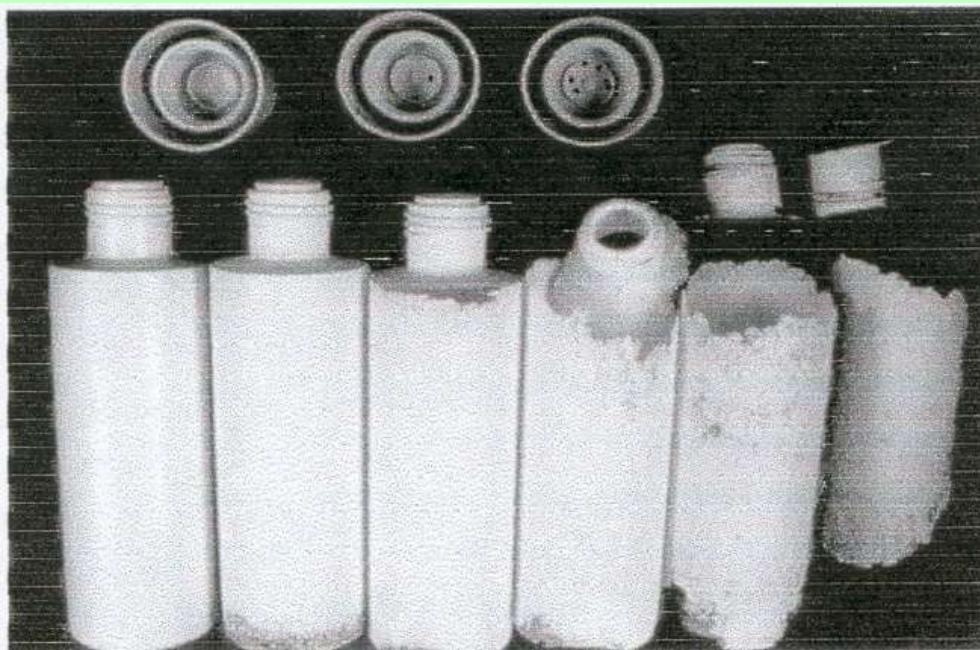
*Ralstonia eutropha*

lassan növekedő, nehezen feltárható

Rekombináns *E.coli*

gyors növekedés

a sejt szárazanyag 85% P(3HB)



...Műanyag degradáció

# Zöld biotechnológia



# Tartalom

## A rekombináns biotechnológia területei

### A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai

## Gazdaszervezetek

### Műveletek baktériumokkal

Klónozás

Sejtbankok

Fehérjemolekulák előállítása

Refolding

Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia

### Műveletek emlős sejtekkel

Klónozás

Sejtbankok

Tenyésztések

Tenyésztési módszerek

Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)





# Piros biotechnológia

**Önálló bioaktív  
egységekből álló  
gyógyszerek**

**Sejtek,  
Őssejtek,  
Vakcinák**

**Lehet természetes  
eredetű,  
vagy rekombináns  
élő szervezet**

**Makromolekulás  
biogógyszerek  
élő szervezetekből,  
vagy élő  
szervezetekkel  
előállítva**

**Peptidek  
(pl. peptid hormonok)  
Fehérjék  
(pl. inzulin, antitestek)  
Vérkészítmények (pl.  
véralvadás faktor)**

**Lehet természetes  
eredetű,  
vagy rekombináns  
termék**

**Kismolekulás  
gyógyszerek  
élő  
szervezetekkel  
előállítva**

**Szteroidok,  
Toxinok,  
Antibiotikumok**

**Lehet  
természetes  
eredetű,  
vagy  
rekombináns  
élő szervezettel  
előállítva**

**Diagnosztikai  
termékek**

**Immunológiai  
tesztek  
Pl. Allergia tesztek**

**Lehet  
természetes  
eredetű,  
vagy  
rekombináns  
élő szervezetből,  
vagy  
rekombináns élő  
szervezettel  
előállított  
termék.**



# Élő szervezetek használata a gyógyszergyártásban

- **Növények és állatok részeinek használata, pl. gyógynövények, májkivonat, régebben inzulin sertés hasnyálmirigyből,**
- **Sok esetben konkrét hatóanyag volt azonosítható később, és további növényi és állati hatóanyag felfedezése várható, amelyek később biotechnológiai úton lesznek termelhetőek**
- **Nehéz a termék állandó minőségét biztosítani, korlátozott hozzáférés**
- **Korlátozott a változatosság – különösen terápiás fehérjék esetében**
- **Egészségügyi kockázatok – vírus v. CJD átvitele állattól, v. emberi szövetekből.**



# Rekombináns fehérjék használatának előnyei

- Fajlagosabb (egy meghatározott típusú fehérje állítható elő)
- Olcsóbb (baktériumokat és élesztőgombákat könnyebb tenyészteni, mint természetes anyagokból kivonni fehérjét)
- Magas termelékenység (nagy lépték és magas koncentráció érhető el )
- Magas reprodukálhatóság (meghatározott és hosszú ideig tárolt sejtvonalak)
- Mikroorganizmusok alkalmazása bioreaktorokban biztosítja a folyamatos termelést (nem évszakfüggő) és állandó minőséget
- A tenyésztés bioreaktorokban biztosítja a kontrollált körülményeket, és megakadályozza a termelő szervezetek természetbe való kijutását
- Kevésbé veszélyes (pl. a vírusnak csak egy részlete készül el)
- Nem szükségesek kísérleti állatok, vagy emberi szervek
- Mesterséges (teljesen új, vagy módosított természetbeni) fehérjék alkalmazása



# Piros biotechnológia által használt rekombináns termékek

<b>Peptidek</b>	<b>Petid hormonok</b>
<b>Proteinek</b>	<b>Kiegészítő proteinek (inzulin, interferon, monoklonális antitestek)</b> <b>Modellanyagok a fehérjék működésbeli és szerkezeti vizsgálatához,</b> <b>Enzimek</b> <b>Diagnosztikai tesztek</b>
<b>Nukleinsavak</b>	<b>DNS, RNS</b>
<b>Egész sejt</b>	<b>vakcinák</b>
<b>Vírus részecskék</b>	<b>vakcinák</b>



# A modern biotechnológiai ipar kialakulása

1940 → 1950 → 1960 → **1970** → → → **1980** → → → → → → → → **1990** → → → → → **2000** → → → → **2010**

**1953**  
DNA Double-helix

**1973**  
Recombinant DNA  
Technology

**1975**  
Hybridoma  
Technology

**1983**  
PCR  
Technology

**Herbert Boyer & Stanley Cohen**  
Originators of Genetic Engineering

**Robert Swanson & Herbert Boyer**  
The father of the Biotechnology Industry

**1976**  
Genentech  
founded → **1980**  
Genentech  
went public

**1980**  
Amgen  
founded → **1983**  
Amgen  
went public → **1992**  
Listed in  
Fortune 500

**1982**  
Insulin  
launched      **1986**  
Interferon  
launched      **1989**  
EPO  
launched

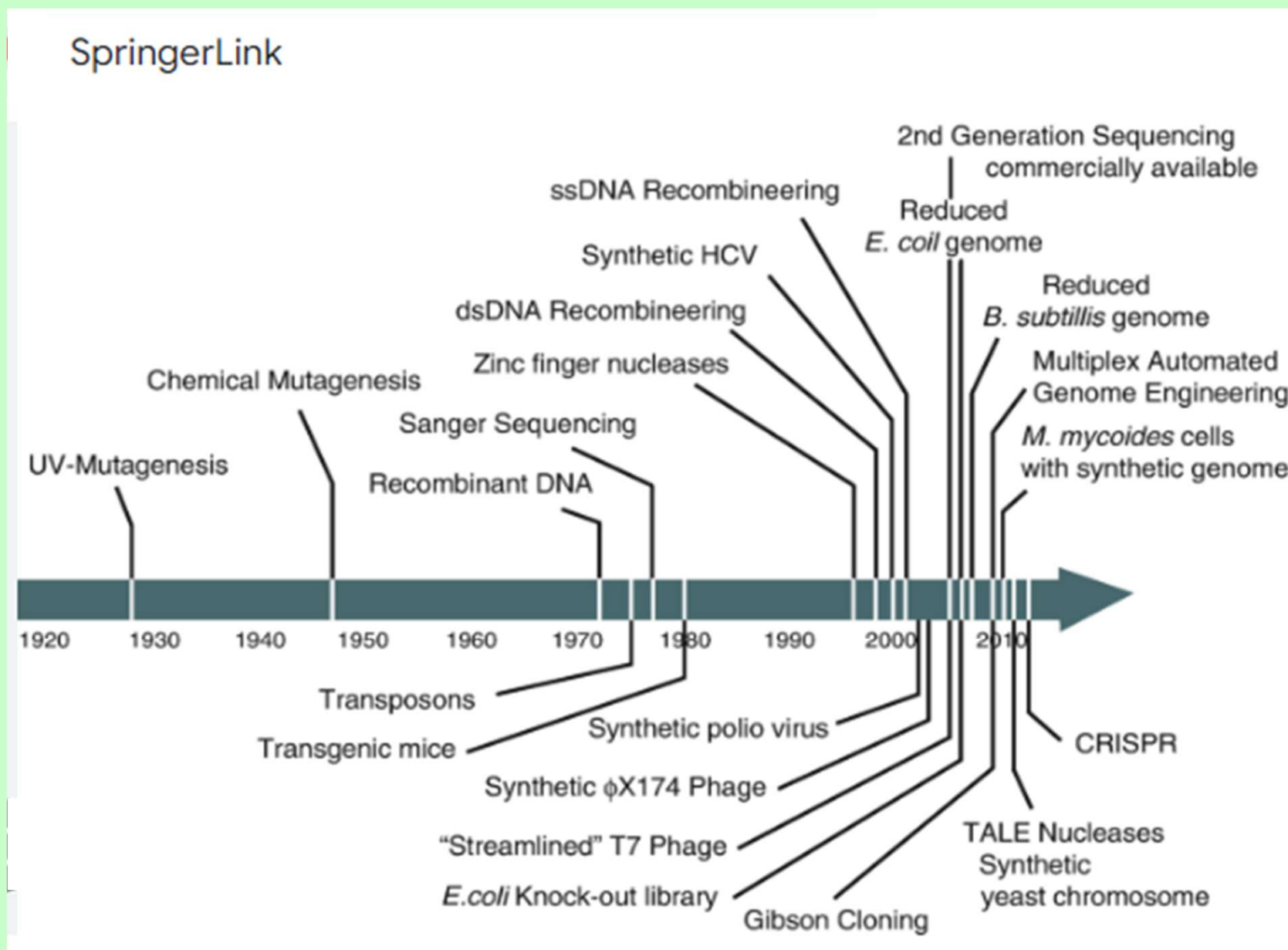
**2008**  
Revenues of Publicly  
Traded Biotech's Grew  
12% to US\$89.7  
Billion

**Genentech**  
Acquired by Roche  
for US\$46.8 Billion

**Amgen**  
Revenue US\$ 15 Billion  
Ranked 11th  
Among Pharmas

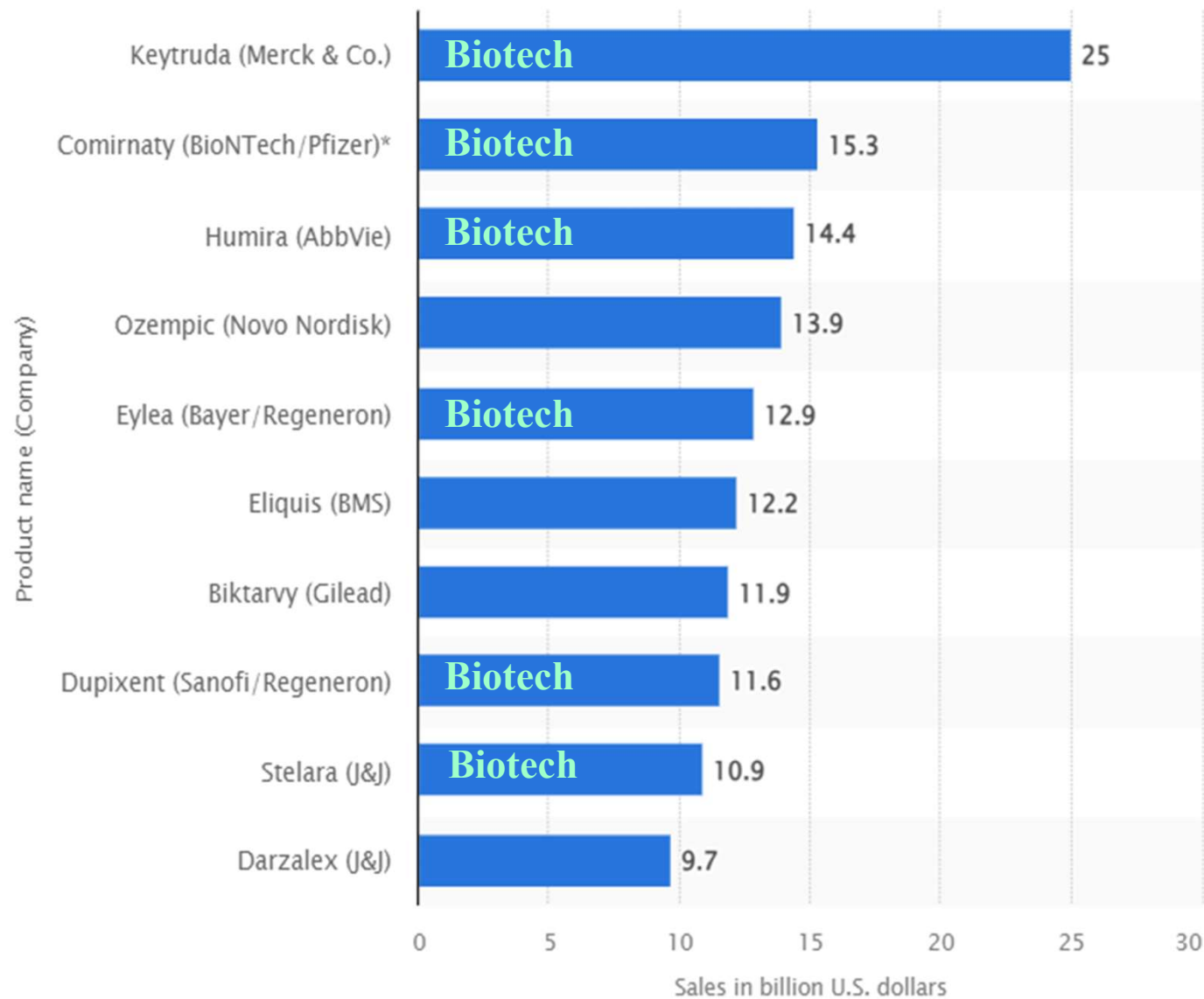


# A biotechnológia fejlődését támogató módszerek megjelenése



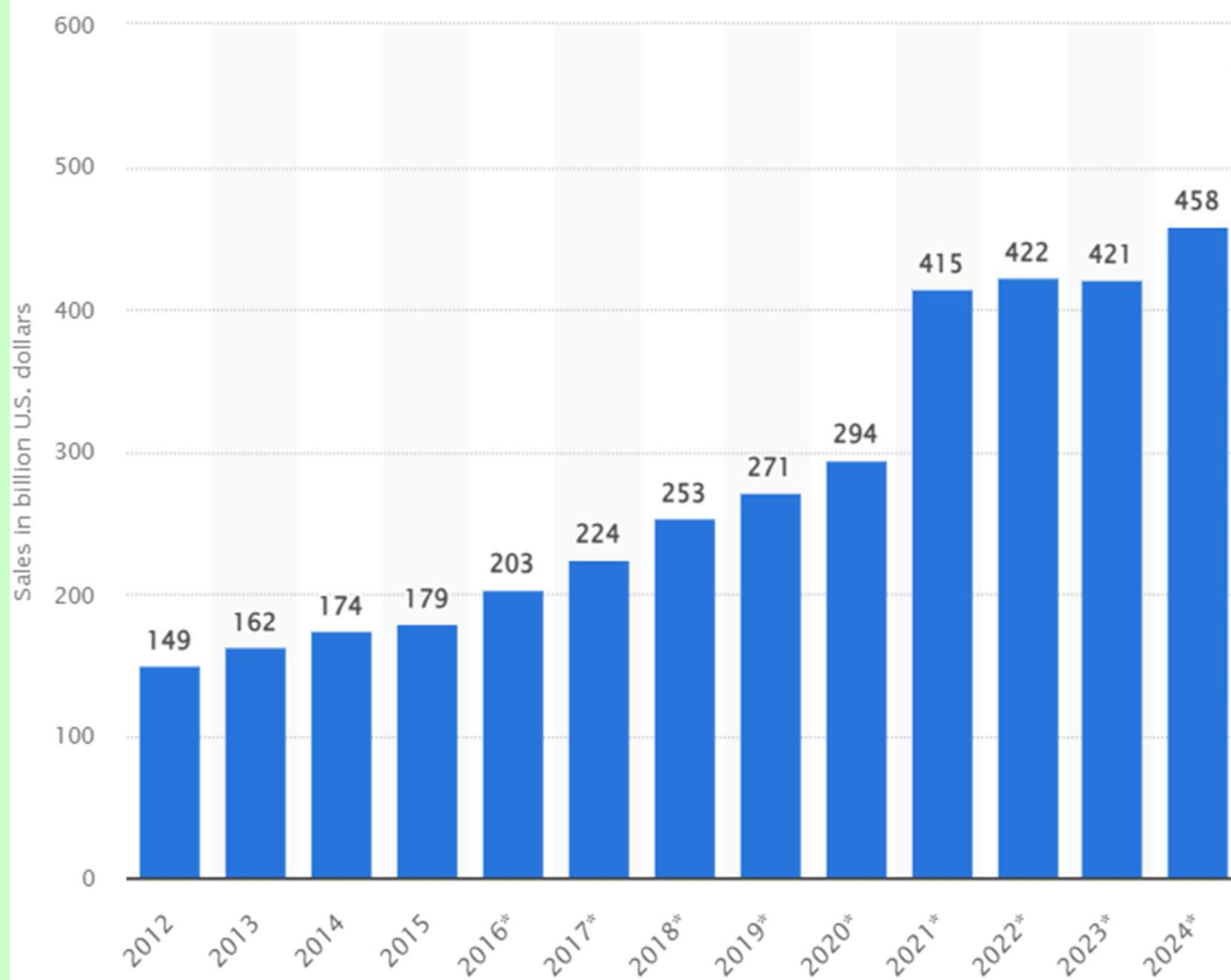
# Leading pharmaceutical products by sales worldwide in 2023

(in billion U.S. dollars)



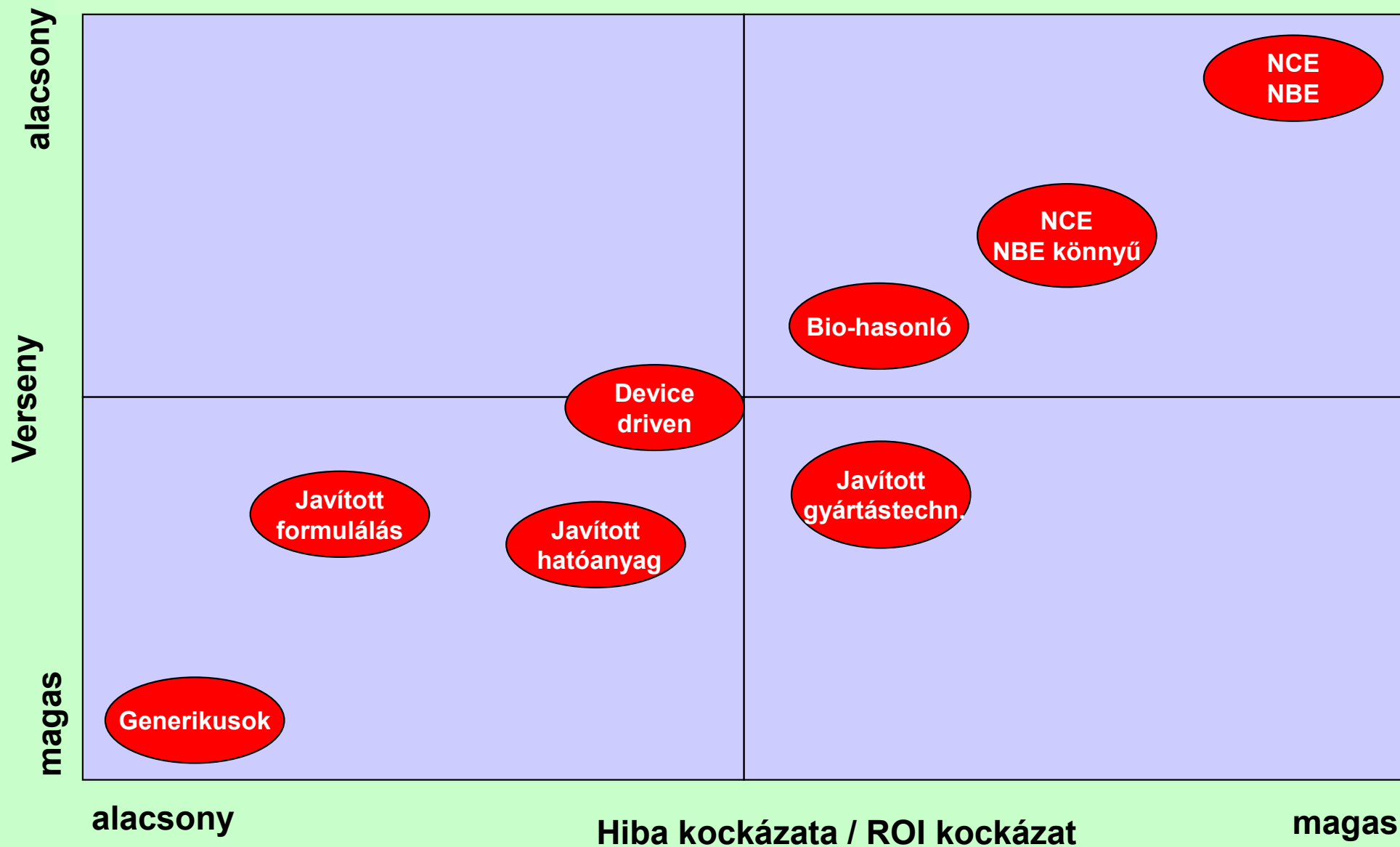
# Estimated total global biotech drugs sales from 2012 to 2024

(in billion U.S. dollars)





# Kockázat és haszon a termékek tekintetében



# Érvek egy gyógyszergyár számára

## Mellette:

- **jelentős árbevétel**
- **magas nyereségtartalom**
- **kevesebb versenytárs**
- **szelektív hatás, kevesebb mellékhatás**
- **ismert ADME paraméterek (pl. terápiás fehérjék)** ADME: absorption, distribution, metabolism, and excretion,

## Ellene:

- **speciális szaktudás minden szinten**
- **magas beruházási és fejlesztési költségek**
- **speciális klinikai vizsgálatok**
- **kaotikus törzskönyvezési helyzet (USA)**
- **ismeretlen piaci viszonyok (biohasonló gyógyszerek)**

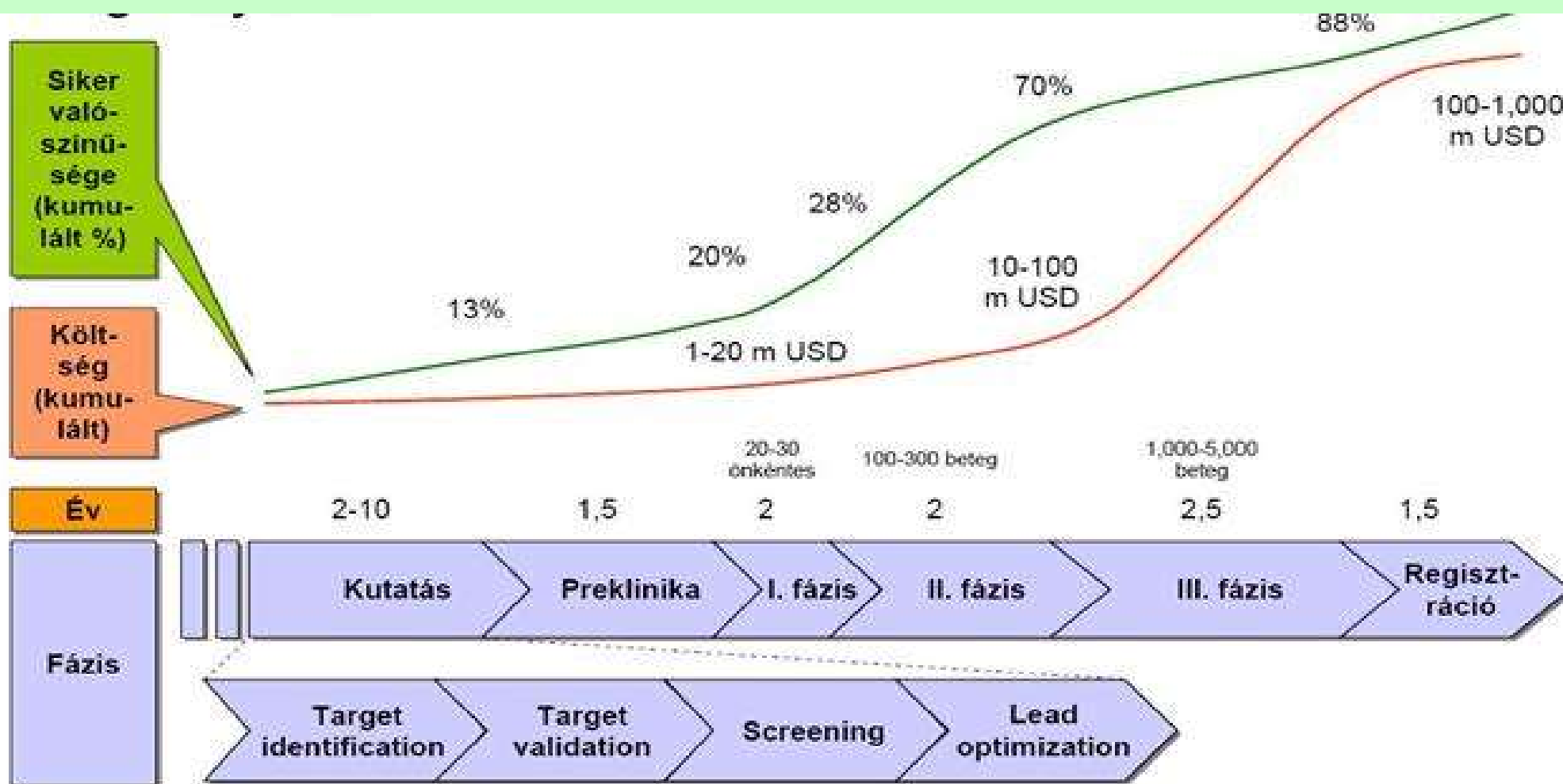


# Szükséges tudás

- Biomérnök** • molekuláris biológia,
- Biomérnök** • fermentációs tudás (bakteriális, emlőssejtes),
- Biomérnök** • tisztítási (down-stream) ismeretek,
- Biomérnök** • analitikai tudás,
- Biomérnök** • méretnövelés, gyártás (bakteriális, emlőssejtes),
- készítményfejlesztés,
- készítmény gyártás, csomagolás
- Biomérnök** • minőségbiztosítás
- klinikai vizsgálatok,
- Biomérnök** • törzskönyvezés



# Biotechnológiai gyógyszerek fejlesztése



Forrás: Convincible elemzés



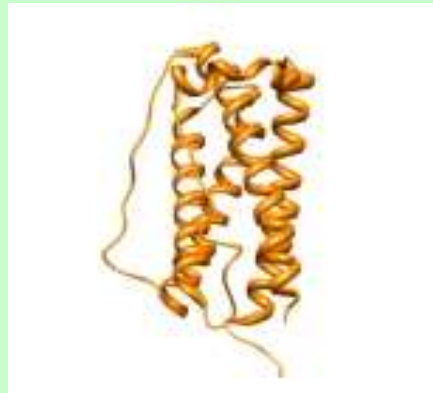
# A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai

Size does matter: analitikai eszközeink  
nem alkalmasak a  
**PONTOS**  
szerkezet meghatározására



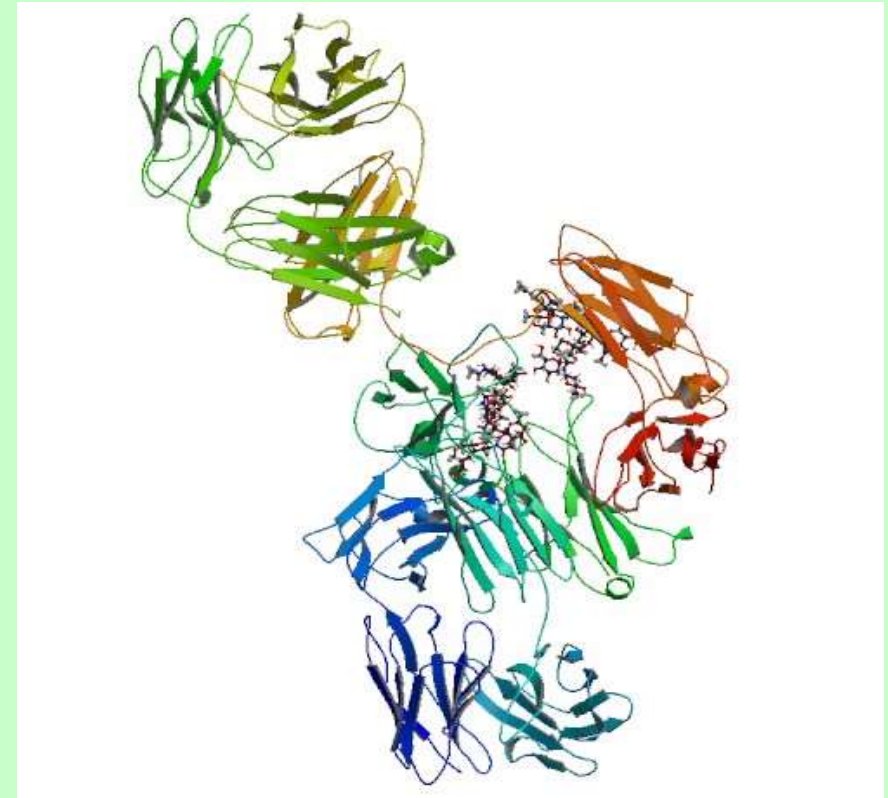
**Vinpocetin**  
(Cavinton)

$C_{22}H_{26}N_2O_2$   
MW: 180 Da



**Filgastrim**

$C_{845}H_{1343}N_{223}O_{243}S_9$   
MW: 18.8 kDa



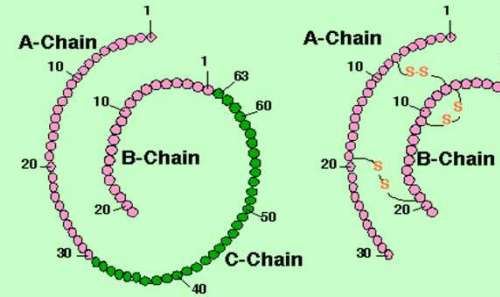
**Rituximab**

$C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$   
MW: 143.9 kDa

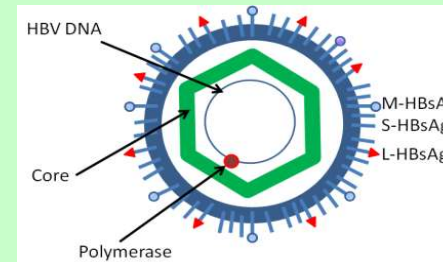


# Példák rekombináns szervezetekkel előállított termékekre

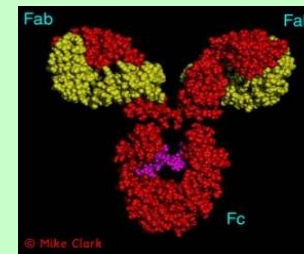
Inzulin rekombináns E.colival



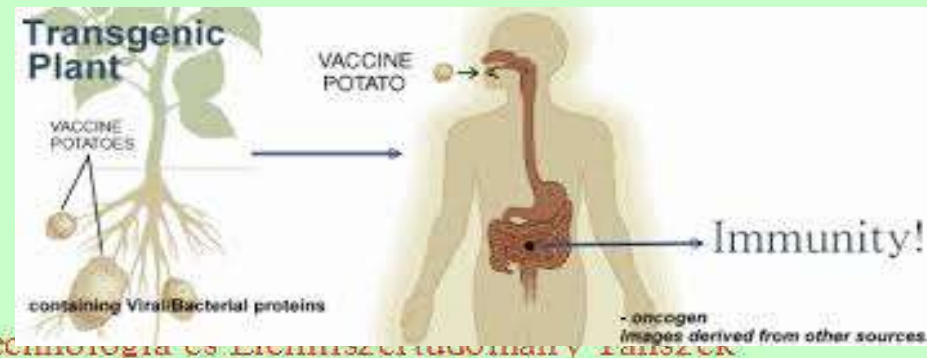
Hepatitis B vakcina élesztővel,



Monoklonális antitest termelés CHO sejttel  
(trastuzumab – HER2 – mellrák)



Ehető vakcina Norwalk vírus ellen  
burgonyában



# Két konkrét példa a rekombináns biotechnológiai gyógyszerekre

## 1. Anti-Her2 (a Her2 egy receptor fehérje):

**Trastuzumab (INN\* név) – Herceptin (keresk. név)**

## 2. Anti-TNF ( a TNF gyulladást stimuláló fehérje)

**Adalimumab – Humira**

**Infliximab – Remicade**

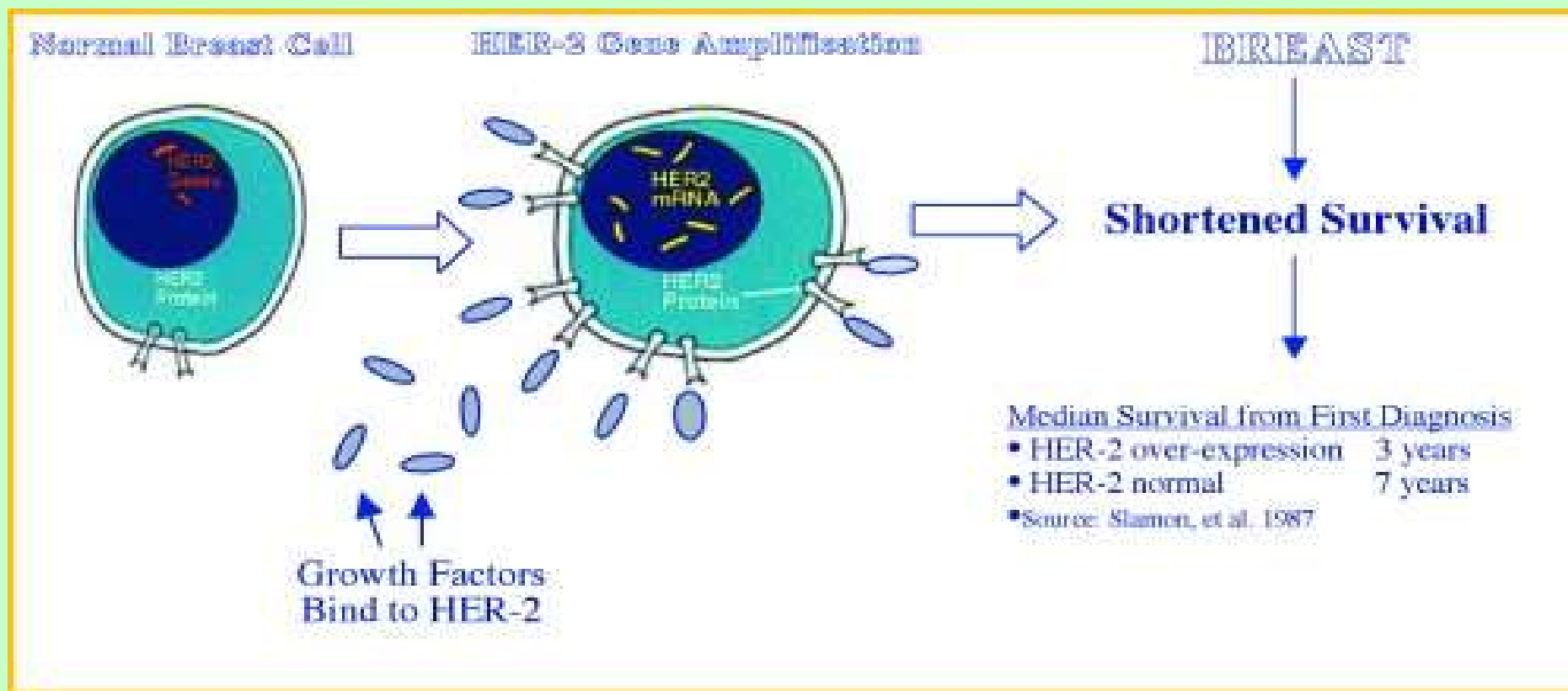
**Etanercept – Enbrel**

\* INN-International  
Nonproprietary  
Name



# 1. példa: A mellrák egy fajtájának mechanizmusa

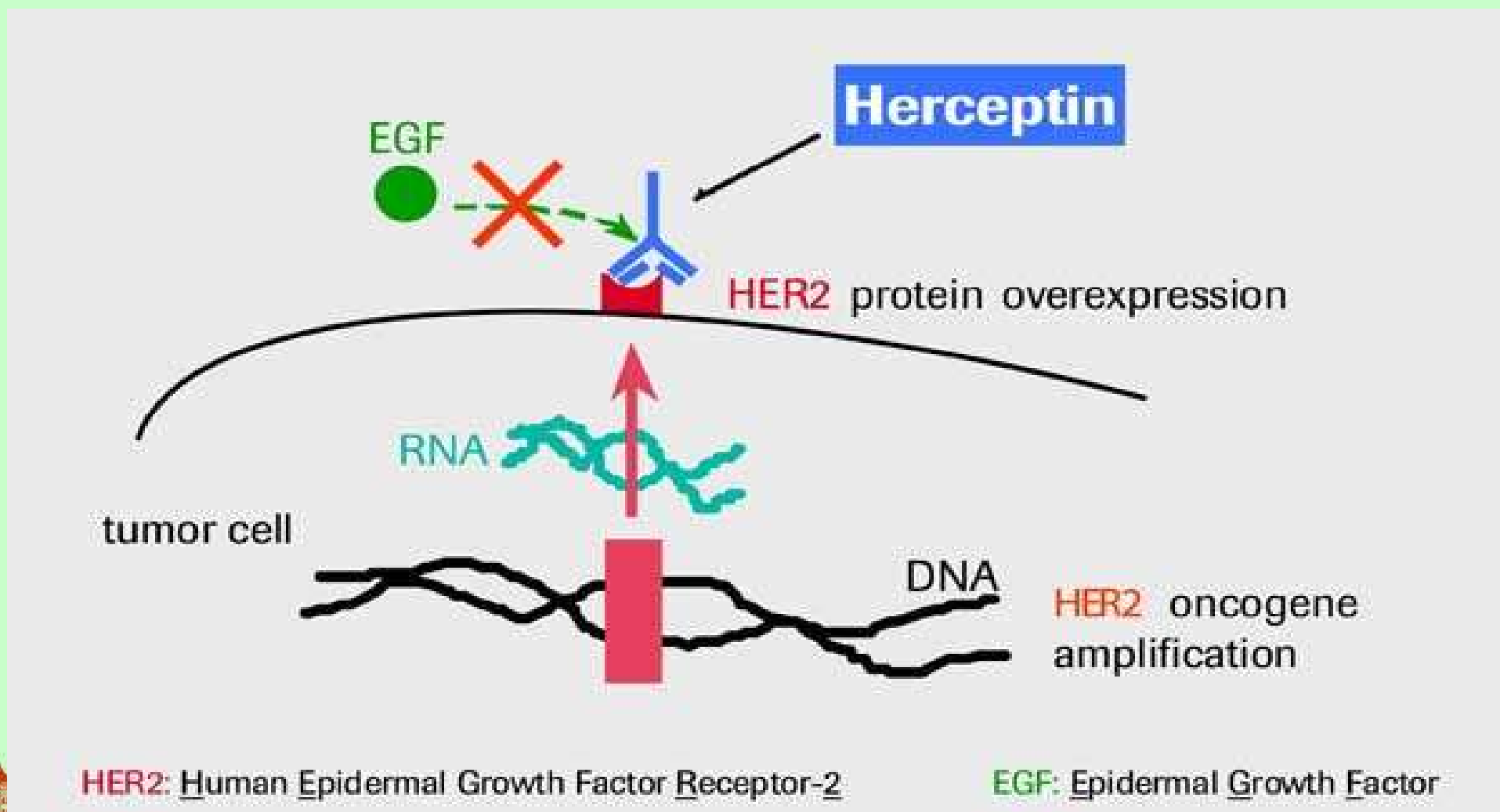
- A mellrák egy fajtájának rákos sejtjei túltermelik a Her2 receptort (human epidermal growth factor receptor 2).
- Növekedési faktorok (growth factors) stimulálják a sejt szaporodást. Több növekedési faktor → nagyobb sejt szaporodás



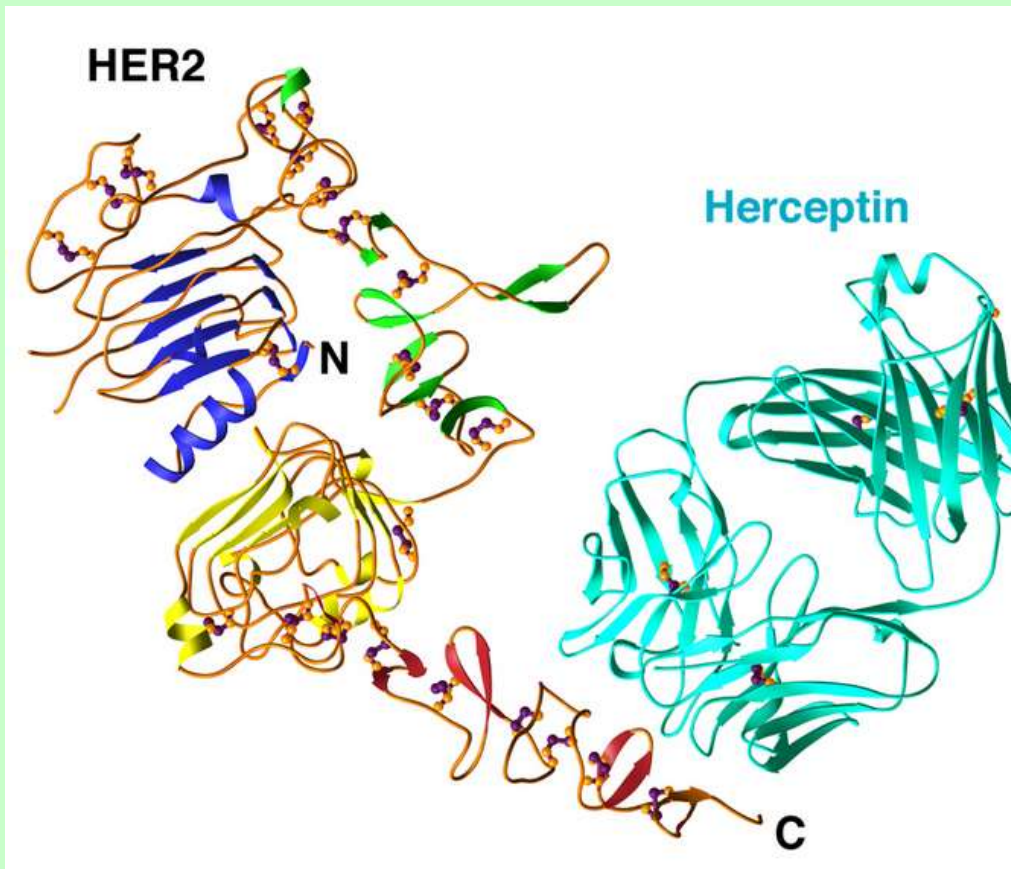


# 1. Példa folyt.: Trastuzumab (Herceptin) – egy Mab a Her2 blokkolására

Megakadályozza a növekedési faktor bekötődését



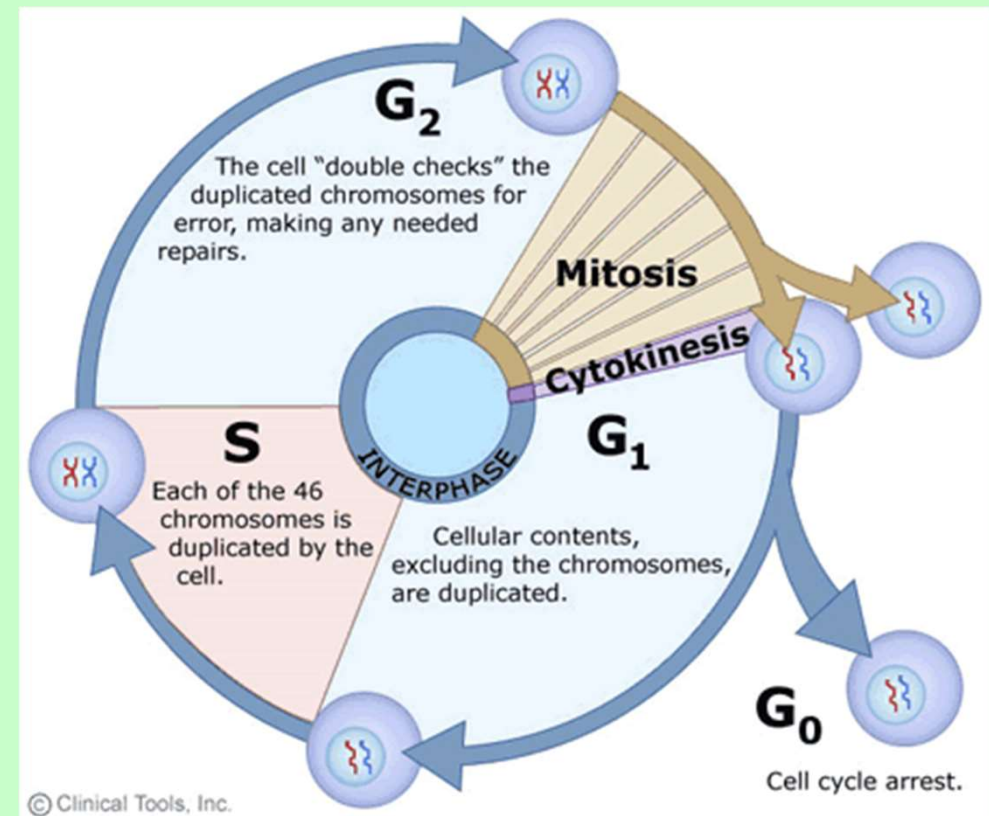
# 1. Példa folyt.: Trastuzumab/Herceptin (Genentech, Roche)



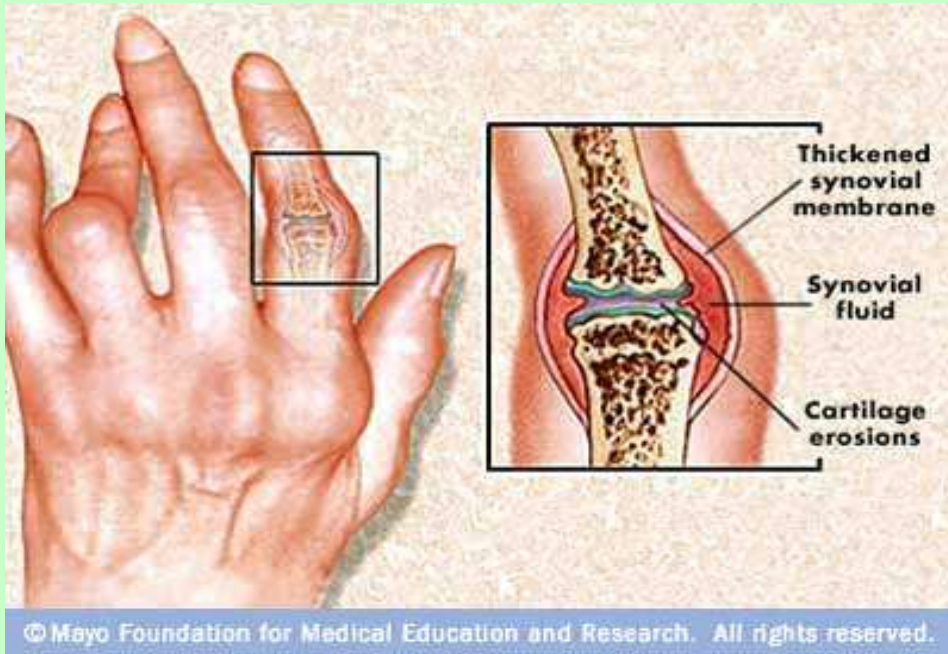
- Humanizált MAb CHO-ban termelve
- Hatással van a HER2/neu (erbB2) receptorra mellrákos páciensekben
- Megállítja a sejt növekedést a G1 fázisban

• 25-30% -a a mellrákos betegeknek ezzel gyógyítható.

• rizikó: szívre toxikus lehet



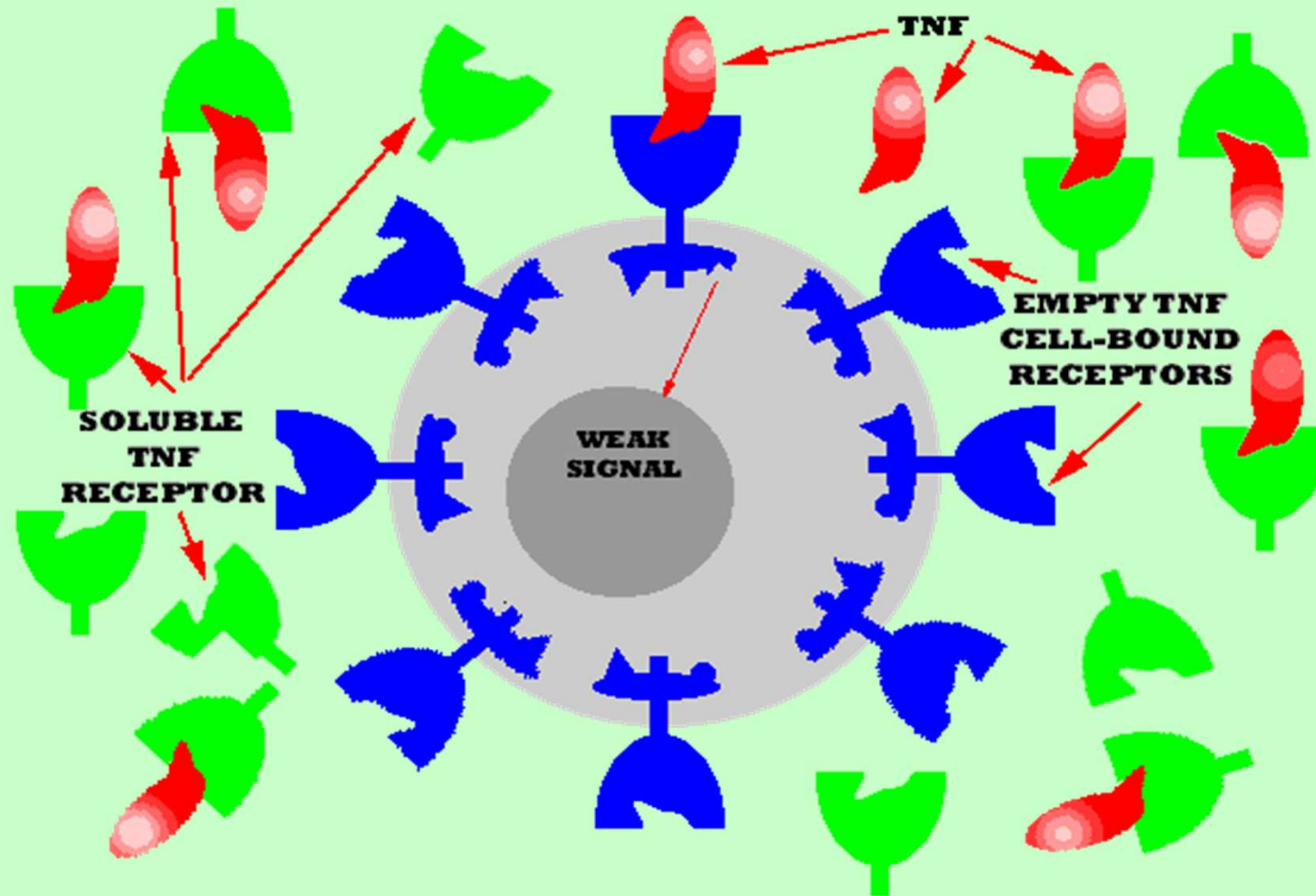
## 2. példa: Anti-TNF (a TNF gyulladást stimuláló fehérje)



- **Az arthritis egy autoimmun betegség – az immunrendszer a saját test ellen fordul**
- **Citokinek, konkrétan a Tumor Nekrózis Faktor (TNF) stimulálják az immunreakciót, ami a gyulladást okozza**
- **Az egyik megoldás a TNF blokkolása, hogy ne tudjon bekötődni és stimulálni.**



## 2. Példa folyt.: Az anti-TNF fehérjék (Soluble TNF receptor) megakadályozzák a gyulladás stimulálását.



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

## **Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**




















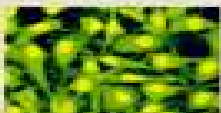
**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**Ipari feldolgozási sor**

**1. Rész**



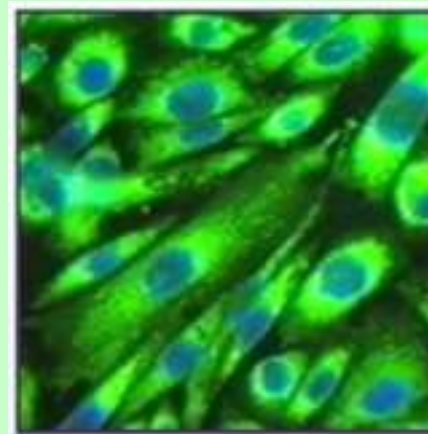
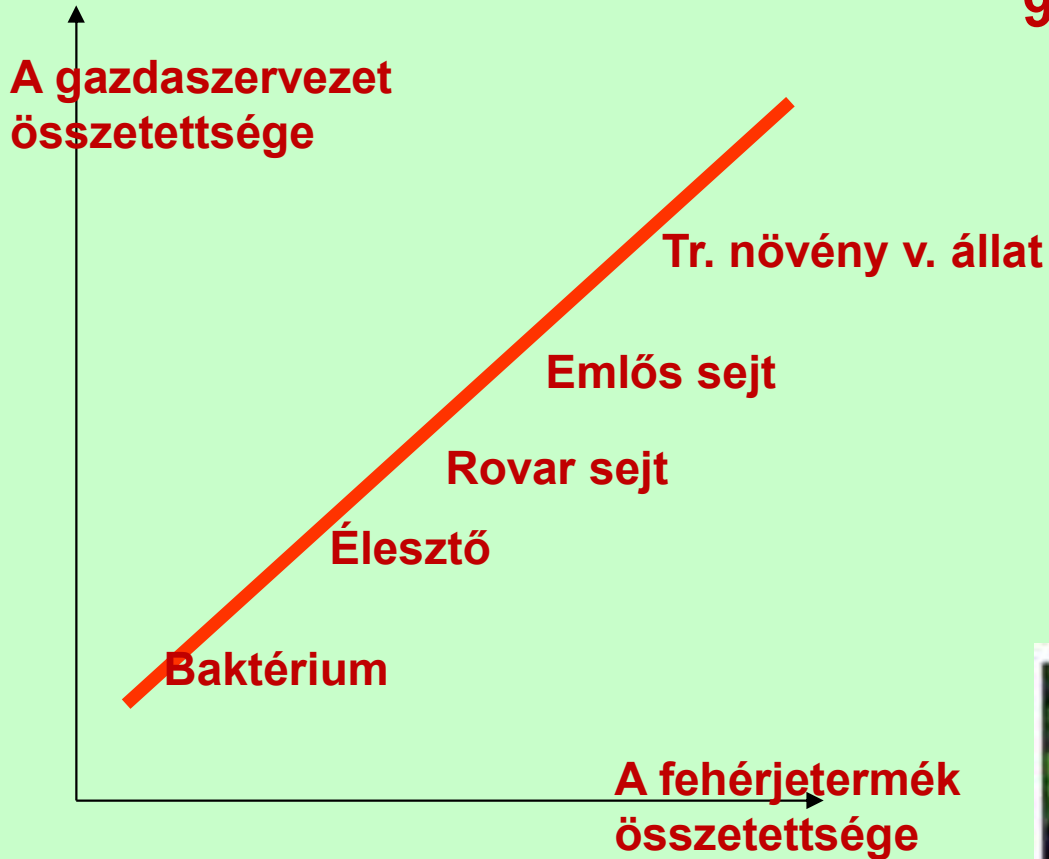
# Gazdaszervezetek összehasonlítása

	Alacsony		Magas	
<b>Előállítás sebessége</b>	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA
<b>Techn. költsége</b>	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN
<b>Tipikus hozam</b>	 MAMMALIAN	 BEVS/INSECT CELL	 BACTERIA	 YEAST
<b>Post transzl. módosítás</b>	 BACTERIA	 YEAST	 BEVS/INSECT CELL	 MAMMALIAN
<b>Hatóság által már jóváhagyott technológiák</b>	 BEVS/INSECT CELL	 YEAST	 BACTERIA	 MAMMALIAN



# Fontos a gazdaszervezet megválasztása

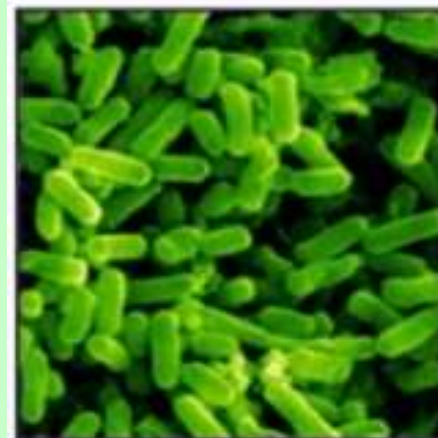
A jelenleg jóváhagyott technológiák 95%-a ezt a 3 gazdaszervezetet használja.



Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells



Yeast



E. coli

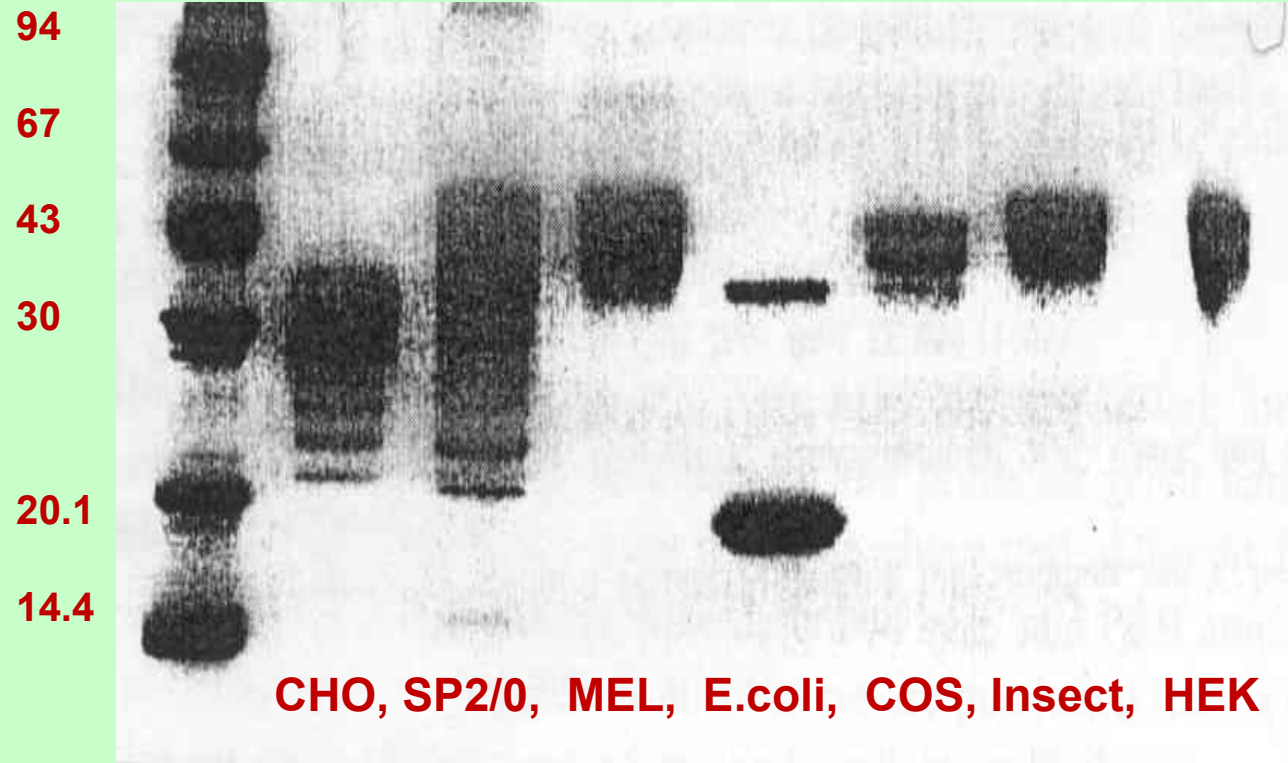


# Alternatív Expressziós Rendszerek

Több mint 340 új expressziós rendszer áll fejlesztés alatt  
Az új gazdaszervezetek nagyobb technikai és törzskönyvezési problémát okozhatnak.

A bioszimilárisok esetében különösen veszélyes gazdaszervezetet váltani.

További fejlesztések lehetségesek a jelenlegi gazdaszervezetekkel is.



Native hu-Leukemia Inhibitory Factor:

7 db N glikozilációs hely (20-67kDA), 3 diszulfid kötés

Geisse and Kocher, Prot.Exp.Pur. (1996)





# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

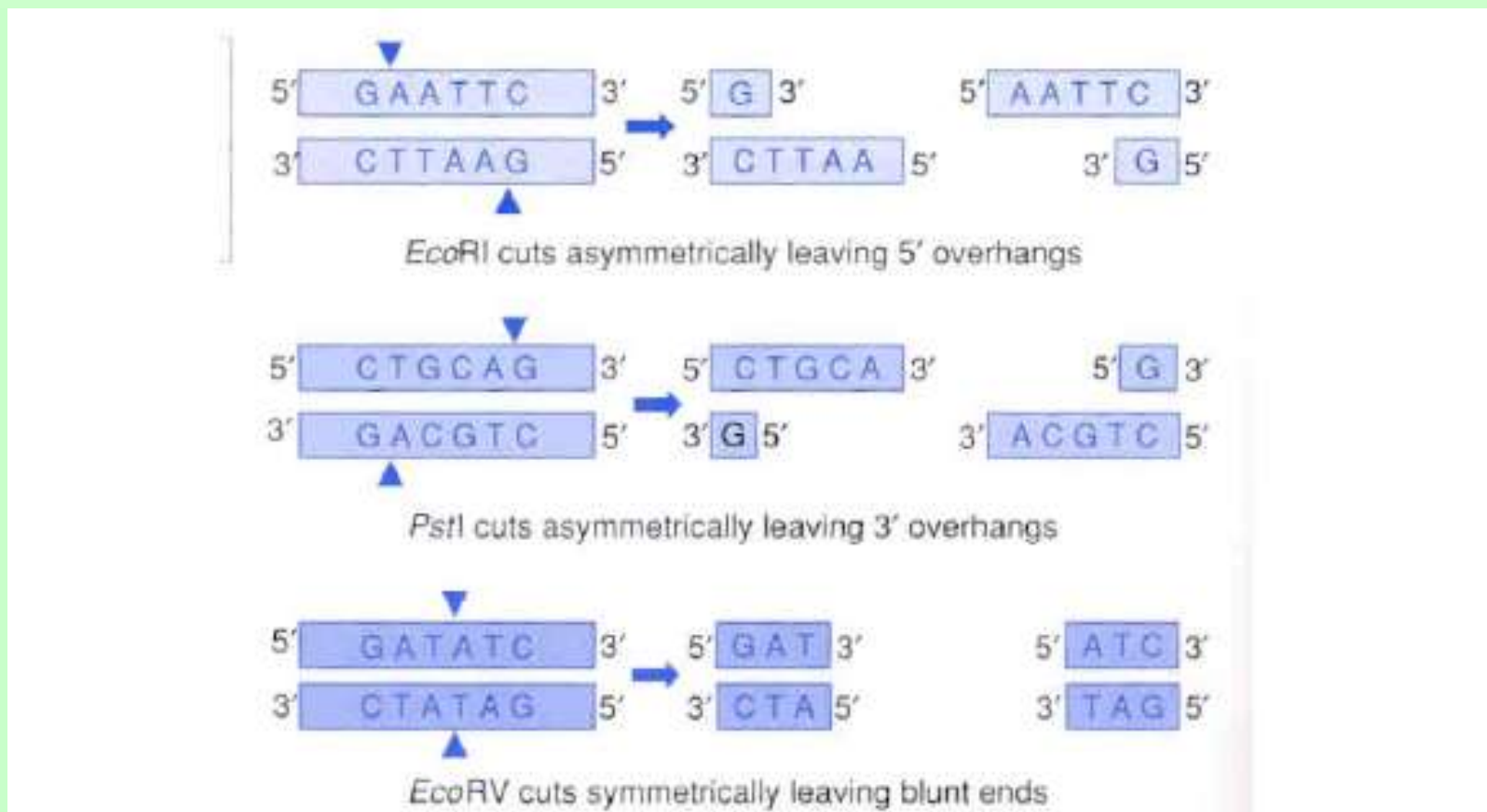
**1. Rész**



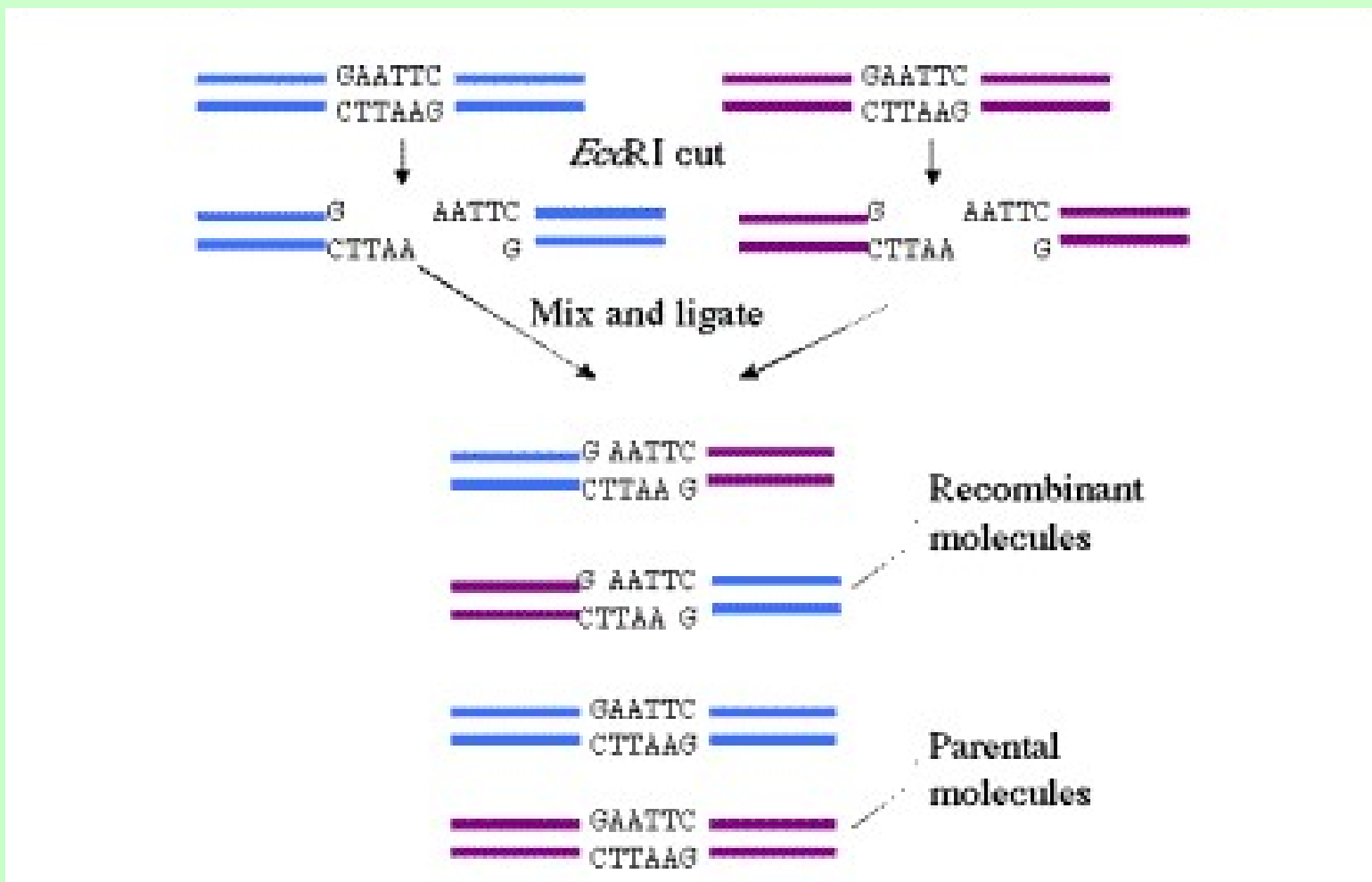
# A klónozás „szerszáma”: restriktációs enzimek

DNS emésztő enzimek, amelyek csak bizonyos szekvenciák mentén vágnak.

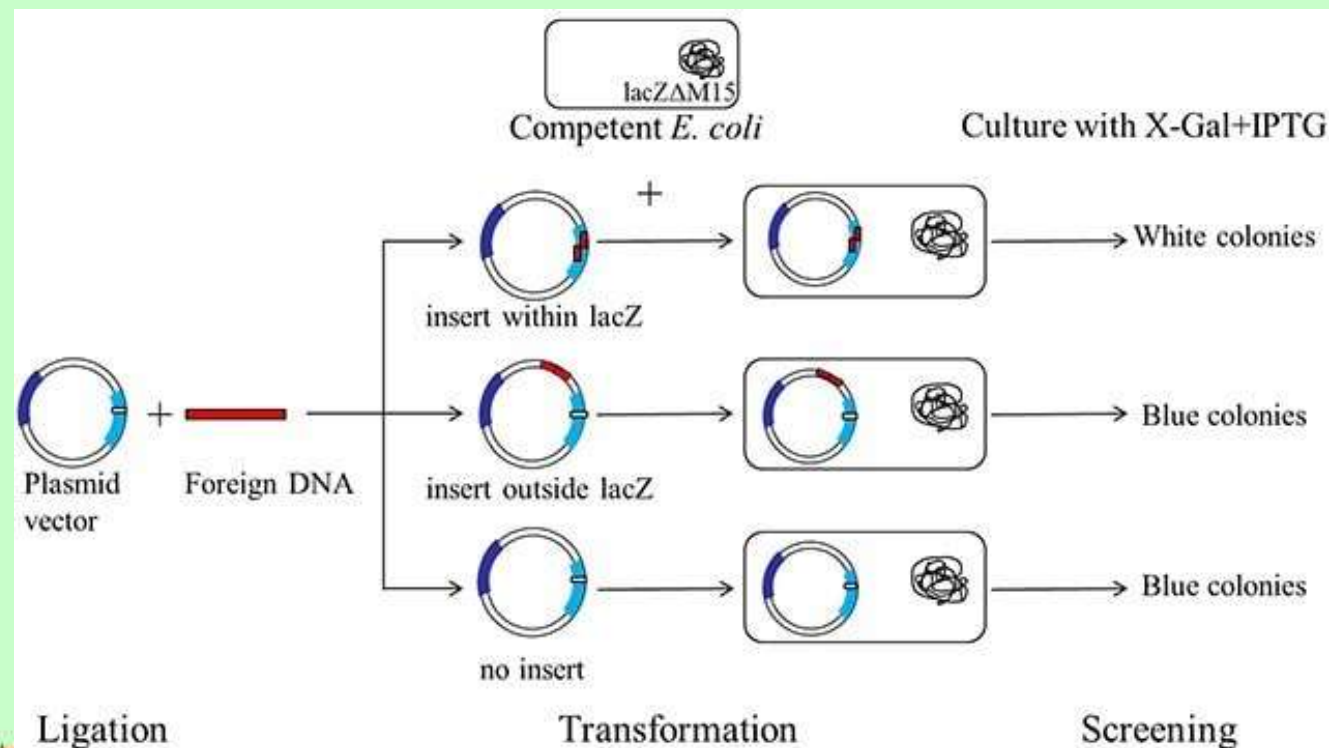
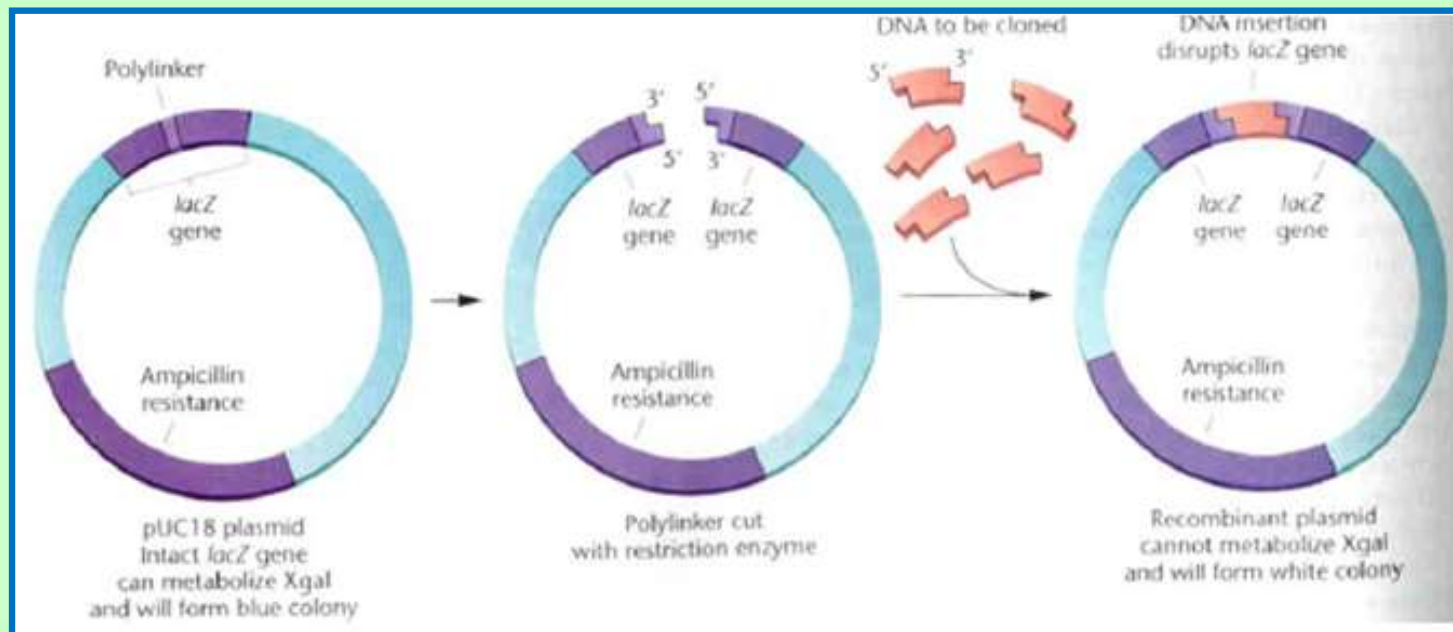
Szabad 5' véget, szabad 3' véget, vagy tompa véget (blunt end) tudnak képezni.



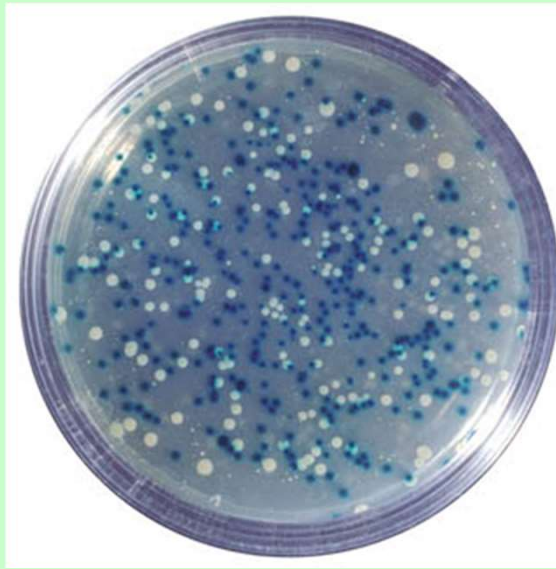
# Rekombináció



# A pUC 18 plazmid használata, a sikeres génbevitel láthatóvá tétele



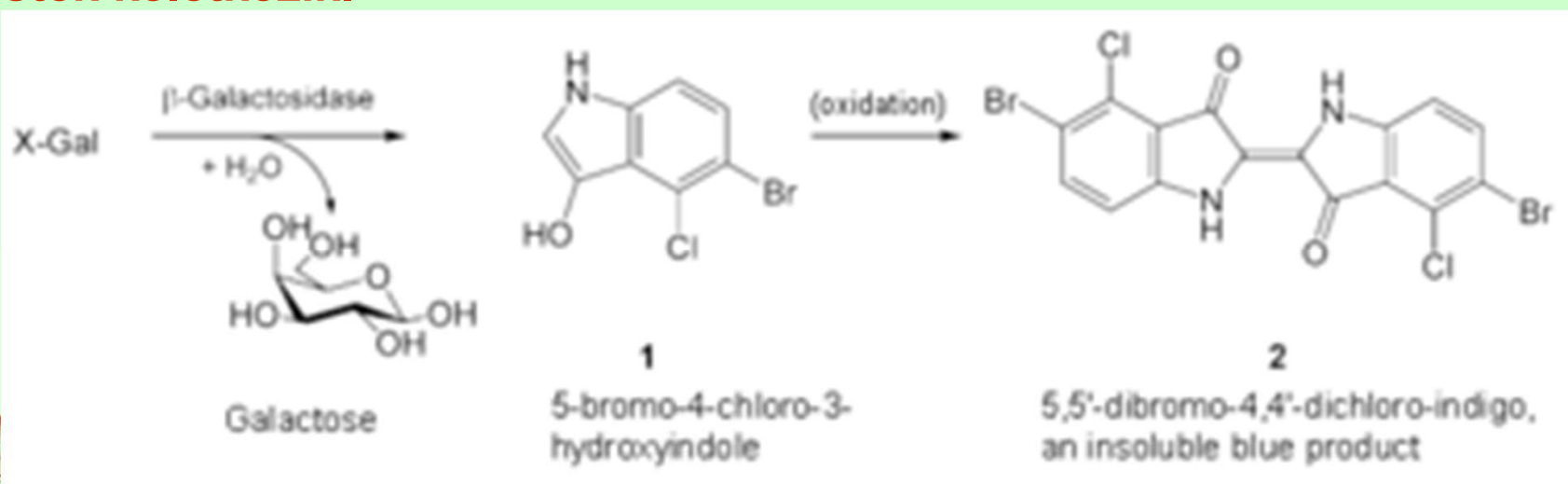
# A pUC 18 plazmid használata

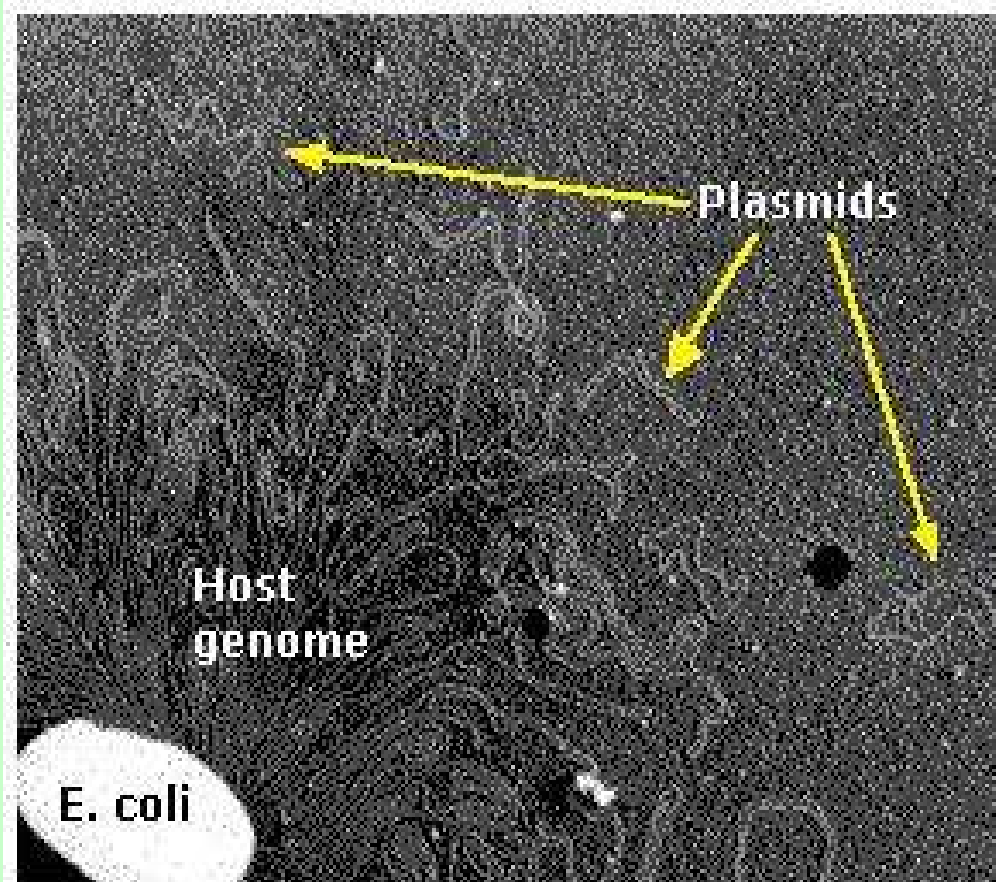


A plazmidot nem tartalmazó baktérium egyedek nem képesek kinőni a penicillin miatt.

A klónozott gént tartalmazó plazmiddal rendelkező baktérium egyedek fehér kolóniákat képeznek, mert az X-gal épen marad.

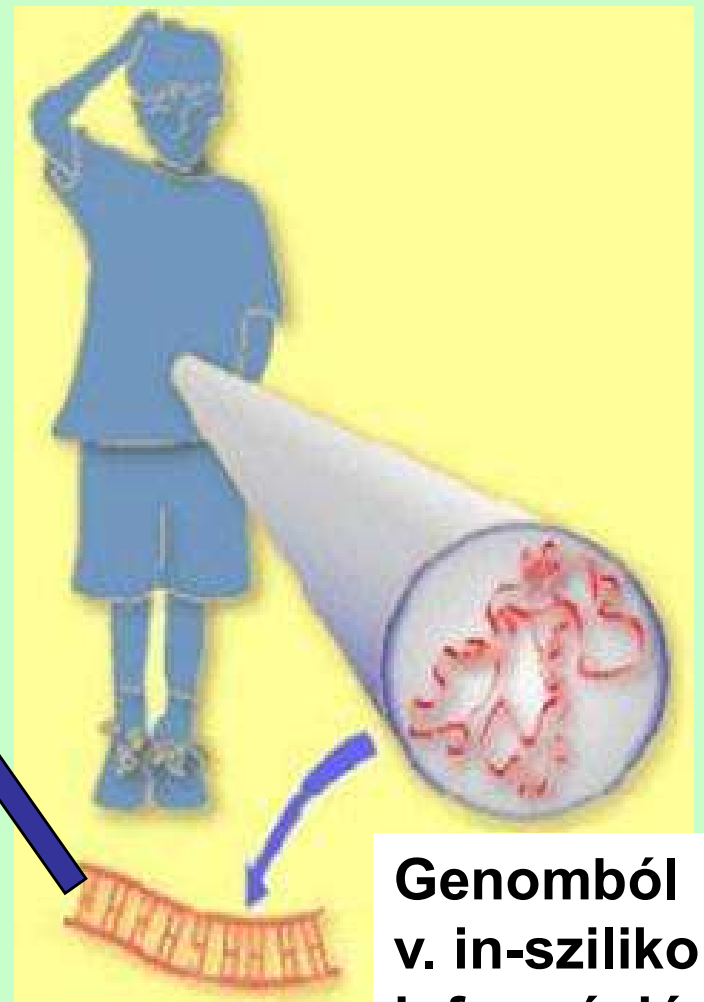
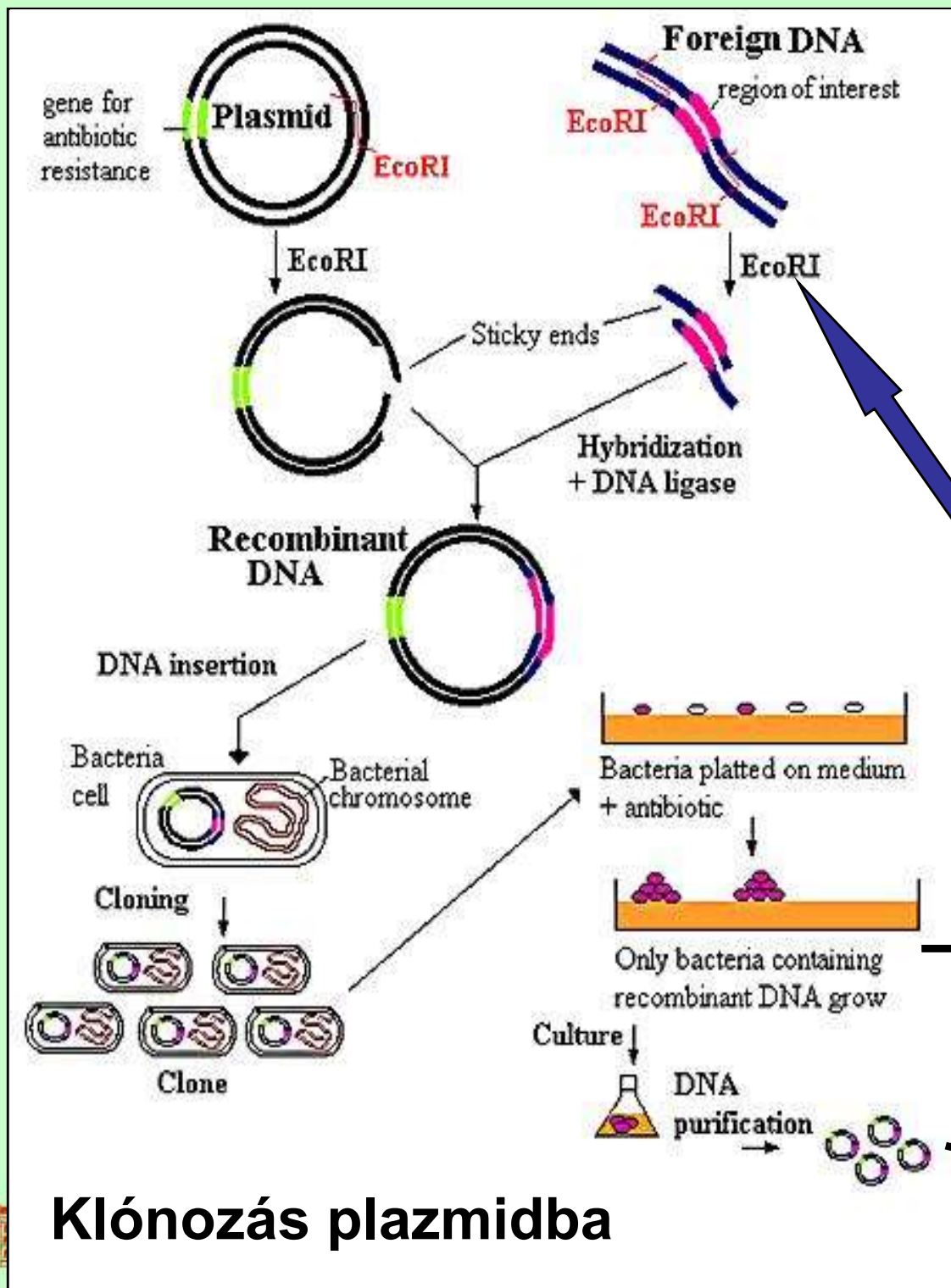
A klónozott géntől mentes plazmidot tartalmazó egyedek kék kolóniát képeznek, mert az enzim hatására X-gal riportermolekula elbomlik, és kék festék keletkezik.





Electron micrograph of an E. coli cell ruptured to release its DNA. The tangle is a portion of a single DNA molecule containing over 4.6 million base pairs encoding approximately 4,300 genes. The small circlets are plasmids. (Courtesy of Huntington Potter and David Dressler, Harvard Medical School.)





**Genomból  
v. in-sziliko  
információ**

**Termelés bioreaktorban  
E.colival**

**vagy**

**A plazmid transzfeckciója  
pl. CHO sejtekbe**

**Klónozás plazmidba**



# Indukálható promoterek

A rekombináns fehérjék alapjában véve primer metabolitok (a szaporodáshoz kötött a termelésük a sejtfehérjékhez hasonlóan.)

Az idegen fehérje termelése megterhelő a gazdaszervezet metabolizmusa számára.

Célszerű a szaporodás alatt szüneteltetni a rek. fehérje termelést, majd bekapcsolni azt. Így kisebb a megterhelés és a gén „elvesztésének” valószínűsége.

Some inducible promoters used for separation of the production of recombinant proteins into a cell growth phase and a production phase.

<i>Host</i>	<i>Promoter</i>	<i>Induction method</i>
<i>E. coli</i>	P <sub>R</sub> and P <sub>L</sub>	Temp. shift 30 to 40°C
	<u>lac</u>	<u>IPTG addition</u>
	pho	Phosphate starvation
	trp	trp starvation or addition of IAA
	tac	IPTG addition
<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	Galactose addition
	PHO5	Phosphate starvation

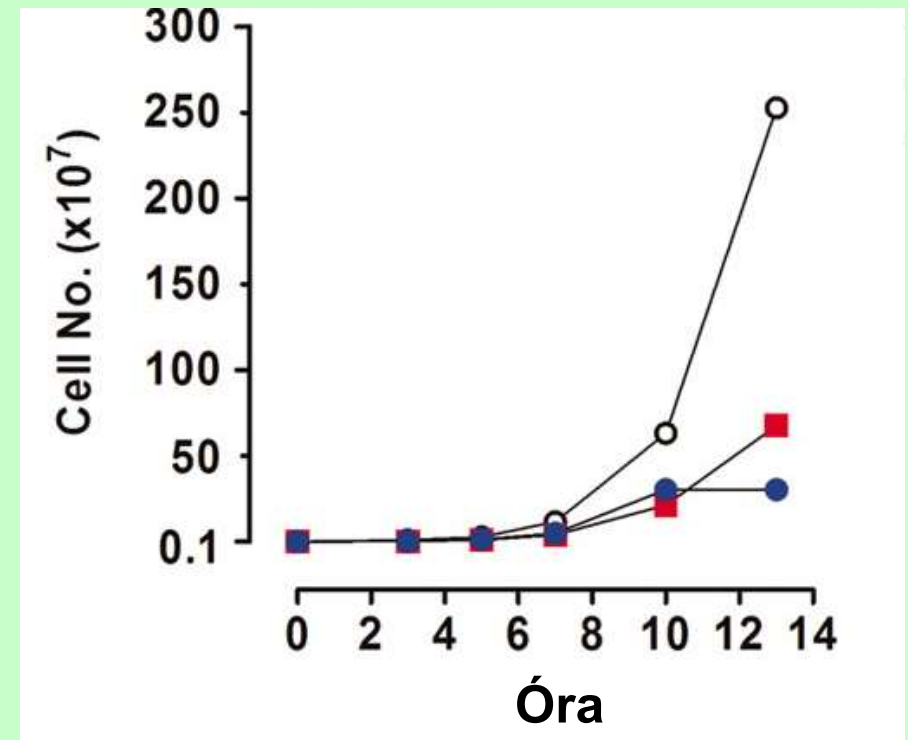
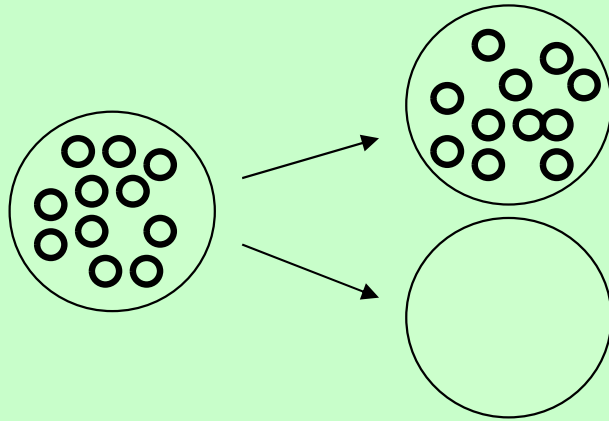
IPTG: isopropyl β-thio-D galactoside IAA: β-idolyl acrylic acid





# Plazmid instabilitás

- **Struktúrális (plazmid pusztulás)**
- **Szegregációs (plazmidmentes lánysejtek megjelenése az osztódás során)**



- **A plazmidmentes sejtek túlnövik (outnumber) a plazmidtartalmú sejteket, mert gyorsabban nőnek**



# Rekombináns és plazmid-mentes sejtek ATP igénye

## Comparison of ATP demand of plasmid-free and recombinant cells

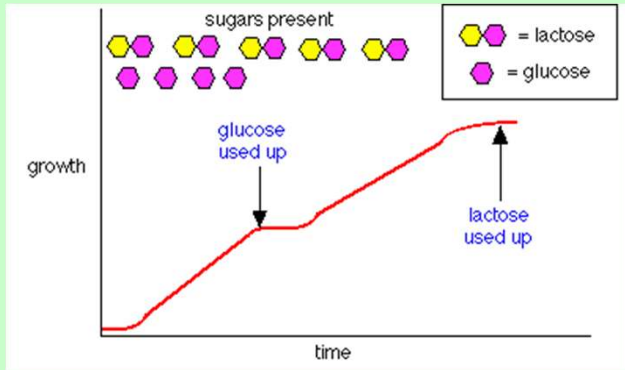
Host: E.coli; Carbon source: glucose; 100 plasmid/cell;

Plasmid Mw.  $2.9 \times 10^6$ ; Recombinant protein: 50% of total cell prot.

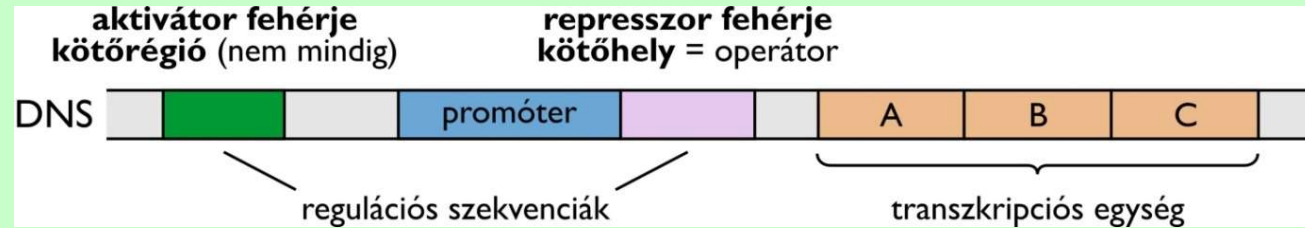
	<i>Plasmid-free cell</i>	<i>Recombinant cell</i>
	10 e(-16) mol/cell	10 e(-16) mol/cell
Function		
biosynthesis of		
polysaccharide	5.75	5.73
cell protein	57.39	57.22
<b>product protein</b>	<b>0.00</b>	<b>57.22</b>
RNA	12.24	12.20
chrom. DNA	2.96	2.95
<b>plasmid DNA</b>	<b>0.00</b>	<b>0.27</b>



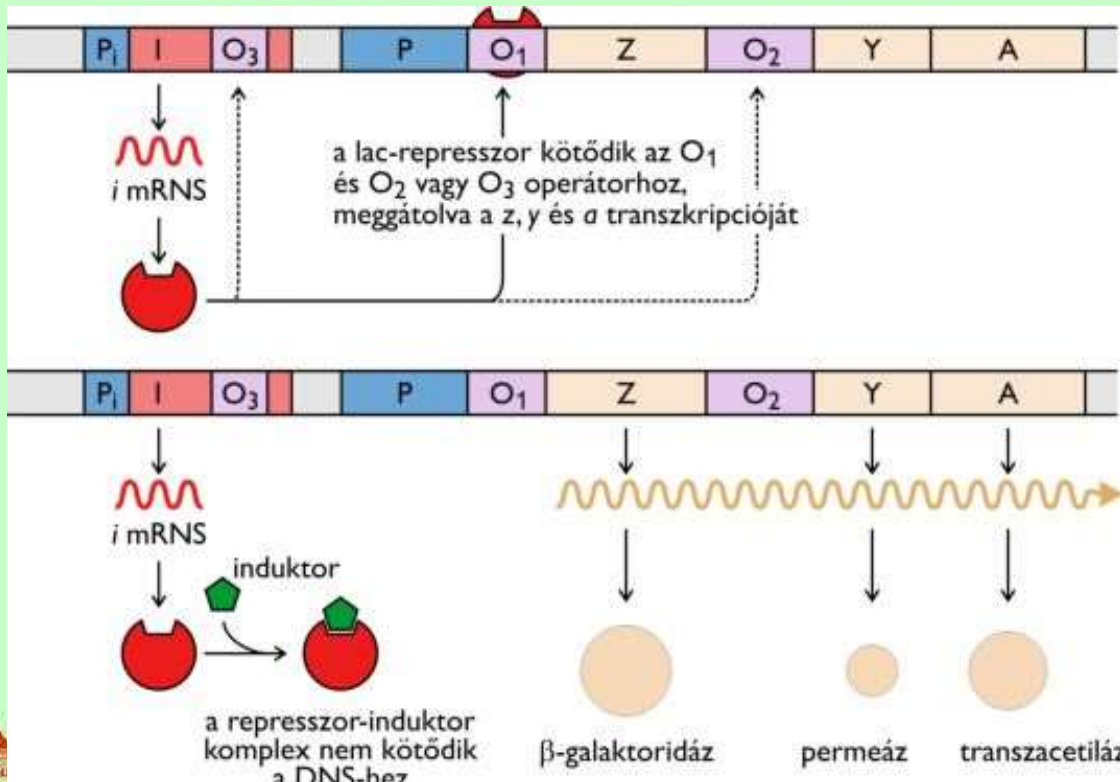
# Hogy működik az IPTG indukció?



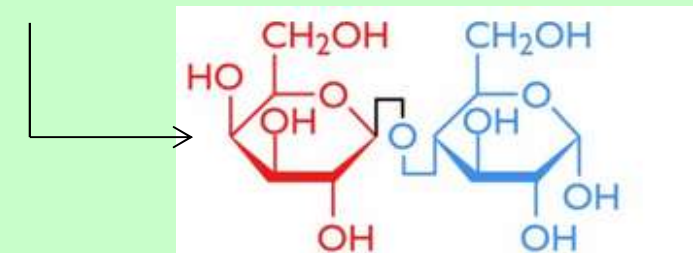
## Mi szabályozza a laktózbontó enzim megjelenését?



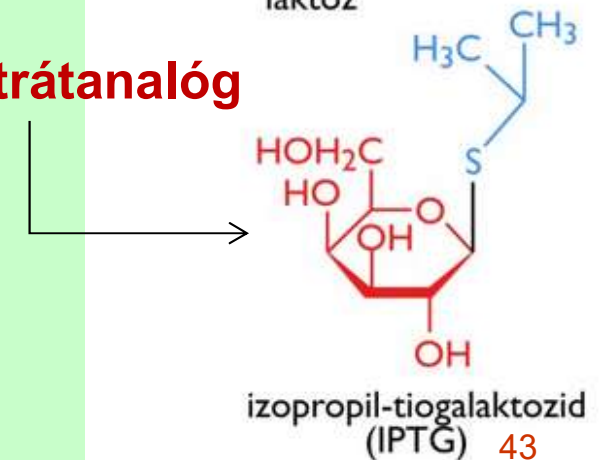
## Hogyan történik a szabályozás?



## Természetes szubsztrát



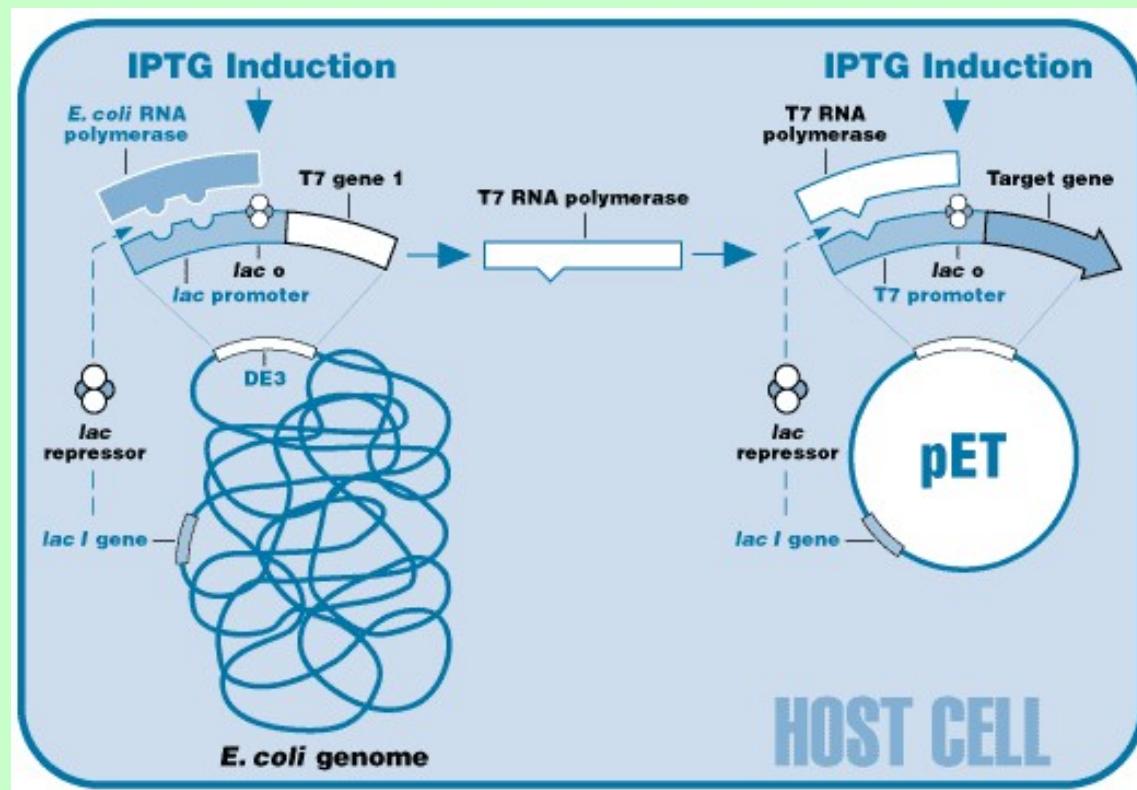
## Szubsztrátanalóg



## Indukciós rendszer a GCSF termelésére

Az újonnan létrehozott *E. Coli* T7 pol egy módosított *E. coli* törzs (eredetileg egy BL21 származék), amely T7 DNS függő RNS polimeráz gént tartalmaz a kromoszómán, ráadásul egy szorosan szabályozó promoter mögött, amely IPTG-vel indukálható.

Vagyis amíg nem adunk be IPTG-t addig meg sem képződik a terméket kódoló m-RNS keletkezéséhez szükséges T7 RNS polimeráz.



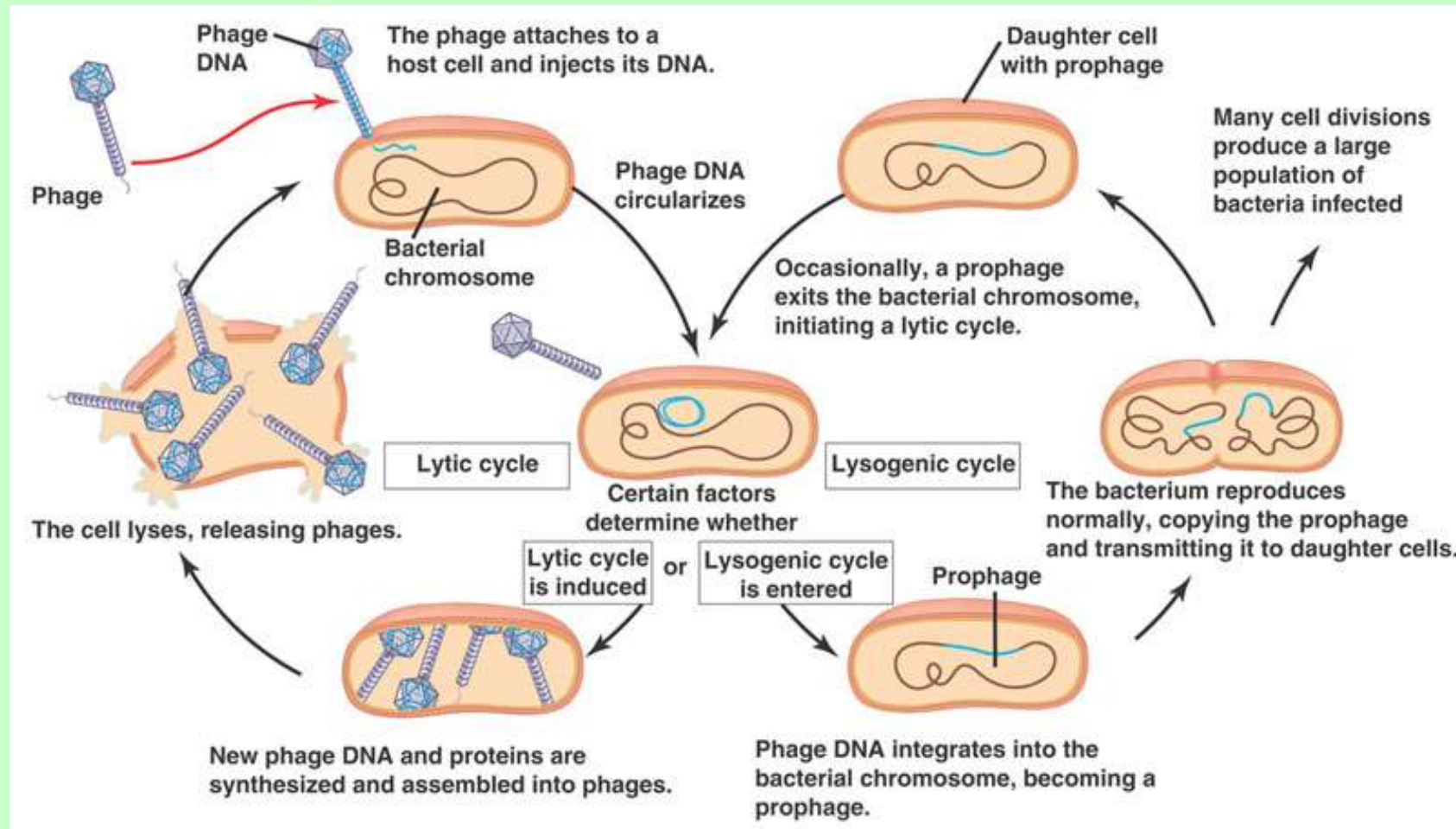
IPTG adagolásra azonban a kromoszómán keletkező T7 RNS polimeráz megképződik, és bekötődik a plazmidon lévő T7 polimeráz promoterbe, és megkezdí a cél gén átírását m-RNS-be.

A még szorosabb szabályzás érdekében a cél gén előtt is van egy IPTG indukálható promoter, amely az IPTG adagolásra szintén felszabadul.



# Hogyan lehet bevinni a T7 polimeráz gént a kromoszómára?

A  $\lambda$ DE3 fág beépül a kromoszómába és viszi magával a kapszidba rakott bármely DNS szekvenciát. A lítikus ciklus után lizogén lesz és úgy is marad. Újra aktiválásához egy segéd fágra van szükség.



## A $\lambda$ DE3 lizogén fágot tartalmazó *E.coli* alkalmazása a gyógyszergyártásban.

A hatóság nem nézi jó szemmel fág szekvenciák jelenlétét a termelő törzsekben. Nem tartja biztosnak a fág lizogén állapotát.

Ezért célszerű a T7 polimeráz gént más módon betenni a kromoszómába. Az újonnan létrehozott *E. coli* T7 pol nem tartalmaz  $\lambda$ DE3 lizogén szekvenciát, hanem a T7 polimeráz közvetlenül a kromoszómára lett beklónozva, fág közvetítése nélkül, homológ rekombinációval.



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**



# Sejtbankok előállítása

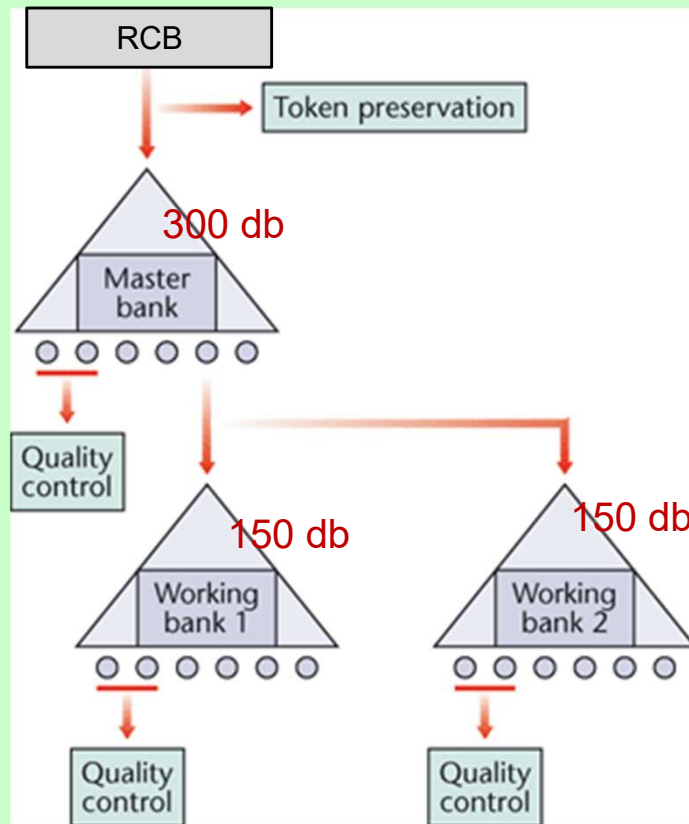
A fejlesztések, a termelések, a klinikai kezelések stabil ismételhőségének alapja az azonos és változatlan képességű sejtek biztosítása.

Ez a:

Research Cell Bank (RCB),  
Master Cell Bank (MCB),  
Working Cell Bank (WCB)

létrehozásával történik.

Tárolás: több, földrajzilag független helyen





## **Research Cell Bank (RCB)**

**Egyetlen sejtől indul ki**

**Sejtek tárolását foglalja magában,**

**Sejtek, amelyek „időben”, vagyis minimális osztódás után kerültek fagyasztásra**

**Megőrzik a tulajdonságaikat,**

**Megakadályozza a fertőződést és a pusztulást**

**Története jól dokumentált**

## **Master Cell Bank (RCB)**

**RCB –ből indul ki**

**a cél u.a., mint RCB-nél, de GMP-ben készített, nagyon alaposan karakterizált (GLP módszerek), jól dokumentált és tárolt (GMP)**

## **Working Cell Bank (WCB)**

**MCB –ből indul ki**

**a cél u.a., mint RCB-nél, de GMP-ben készített, nagyon alaposan karakterizált (GLP módszerek), jól dokumentált és tárolt (GMP)**

# Szabályzó dokumentumok

**FDA's 21 CFR Part 610.18**

**FDA's 1993 *Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals***

**ICH Q7A**

**ICH Q5D**

**European Pharmacopeia (EP)**

**US Pharmacopeia (USP)**

**Japanese Pharmacopeia (JP)**



# A termelő törzs jellemzése

## Tesztelési területek:

**Azonosság igazolása (expressziós szerkezet)**

**Tisztaság igazolása (esetleges fertőzések)**

**Genetikai stabilitás (a terméket kódoló régióban)**

**A sejtek minőségét garantáló minőségbiztosítási folyamat első lépése, amely a tenyésztés végéig tart:**

**end-of-production/post production cells (EPC/PPC)**



# Sejtbankok tisztaságának igazolása

**Kizárja/minimalizálja idegen mikroorganizmusok bekerülését a folyamatba:**

**Idegen baktérium, Mikoplazma, Gomba, bakteriofág**

**Fertőzési források:**

**Sejtekben már meglévő fágok**

**Külső fertőzések**

**Segédanyagok fertőzései**

**Víz**

**Levegő**

**Személyzet**



# Master cell bank (MCB), Working Cell Bank (WCB) és End Product Cells (EPC) vizsgálata



Tests	Acceptance criteria	Tests	Acceptance criteria
Viable cell count	$\geq 1 \cdot 10^7$ cfu/ml $\geq 1 \cdot 10^9$ cfu/ml (EPC)	Microbiological purity	
<i>E. coli</i> identity	The result of the strain must be identical to the parental strain.	a) bacterial impurities	Contamination excluded
Plasmid stability test by examination of antibiotics resistance	>90%	b) fungal impurities	Contamination excluded
		c) phage impurities	Contamination excluded
		Plasmid-DNA : genomic DNA ratio	>5



## Tests

## Acceptance criteria

## Tests

## Acceptance criteria

Size of linearized plasmid  
(Restriction digest by PstI enzyme)

**RSD < 6 %;**  
**6311 base pair ± 10%**

Plasmid sequence analysis

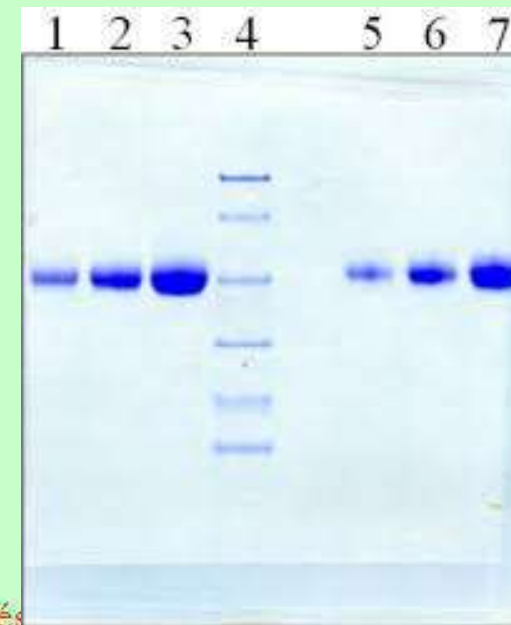
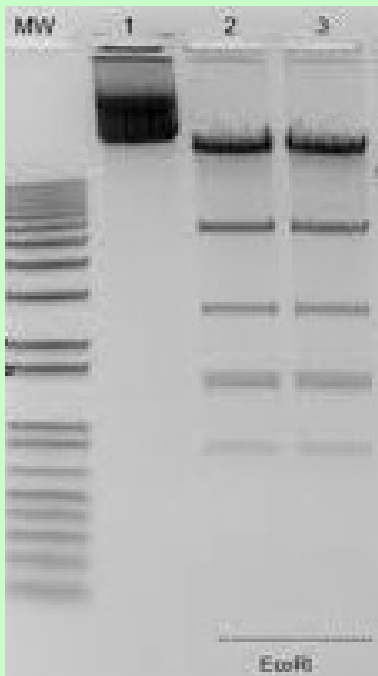
**100 % identical to the theoretical sequence**

Restriction mapping of the plasmid  
(Restriction digest by EcoRI enzyme)

**4 fragments;**  
**RSD < 6 %;**  
**3325 base pair ± 10 %**  
**1413 base pair ± 10 %**  
**1023 base pair ± 10 %**  
**550 base pair ± 10 %**

Protein molecular weight

**18 800 Dalton ± 10%**  
**(Appropriate streak obtained with the test and reference solution should be at the same position)**



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

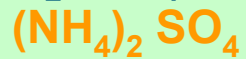
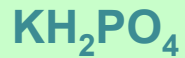
**1. Rész**



# Tápanyagösszetételek

## Oltóanyag (inokulum) tápanyag

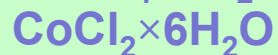
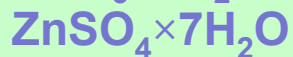
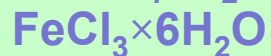
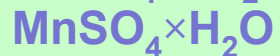
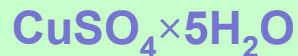
**Glycerol 99,5%**



**Kanamycin sulfate**

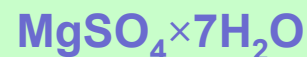
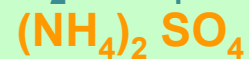
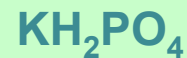
**Thiamine HCl**

**Boric acid**



## Termelő tápanyag

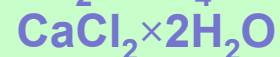
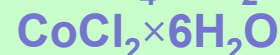
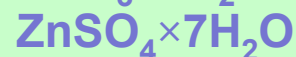
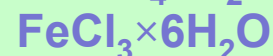
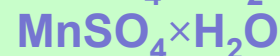
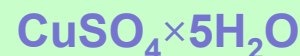
**Glycerol 99,5%**



**Kanamycin sulfate**

**Thiamine HCl**

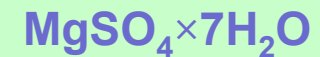
**Boric acid**



**PPG2000**

## Rátápláló (fed batch) tápanyag

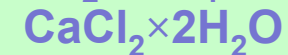
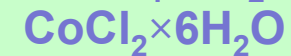
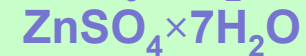
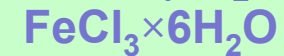
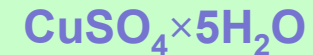
**Glycerol 99,5%**



**EDTA**

**Kanamycin sulfate**

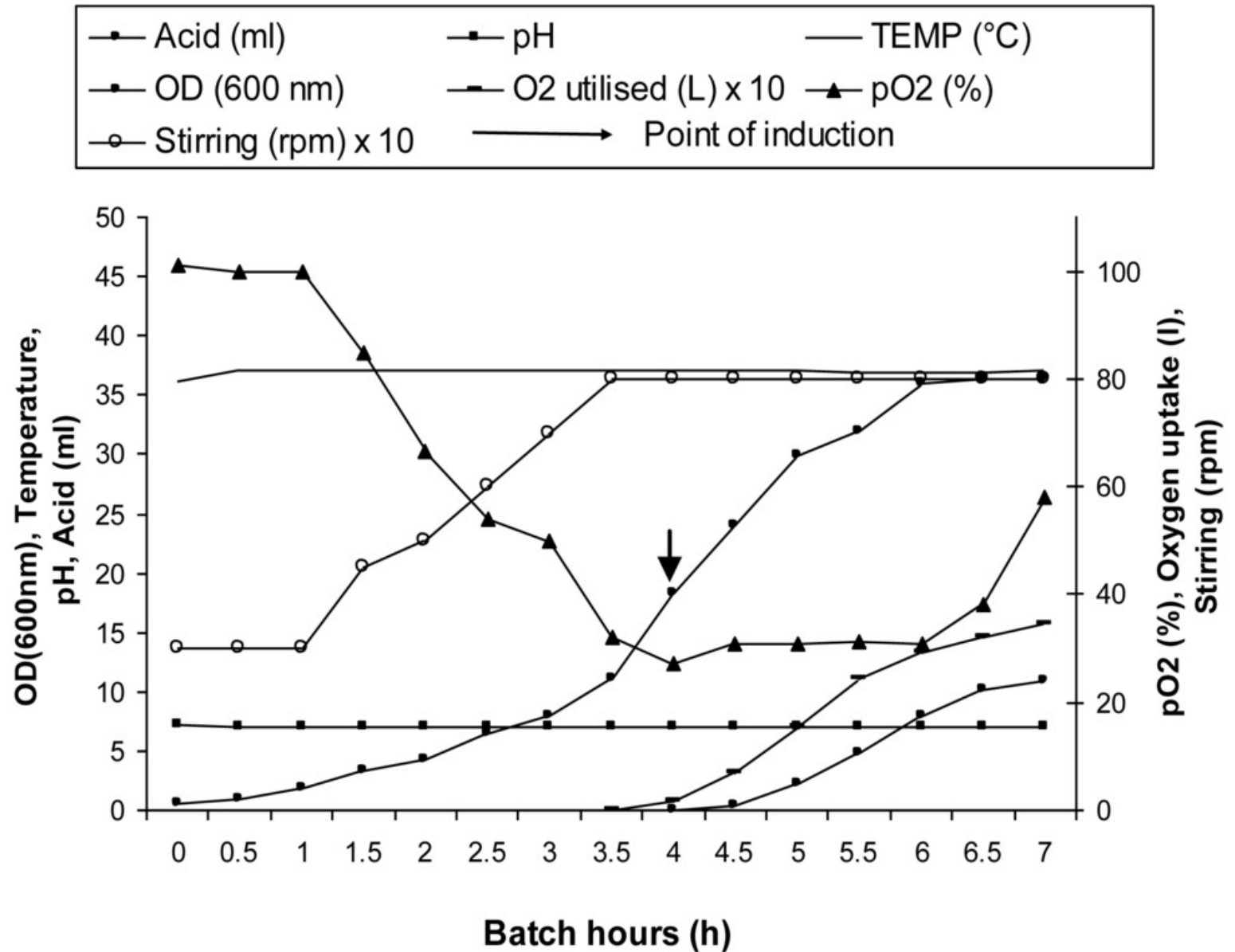
**Boric acid**



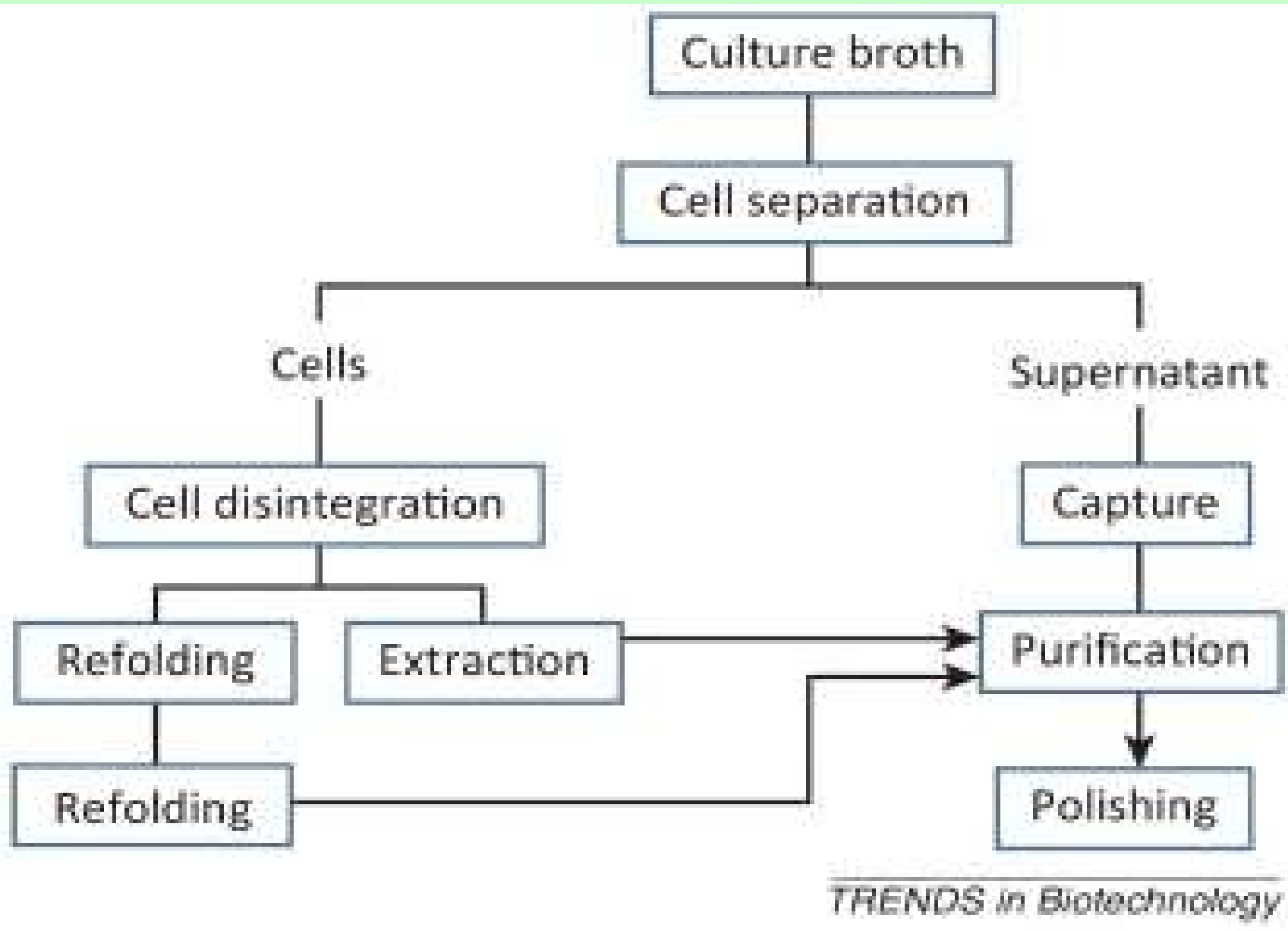


**A fermentáció  
lefolyása egy  
IPTG  
indukálható  
rekombináns  
fehérje termelő  
tenyésztésben**

**Fermentation process parameters**



# Egy általános fehérjetermelő technológia



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

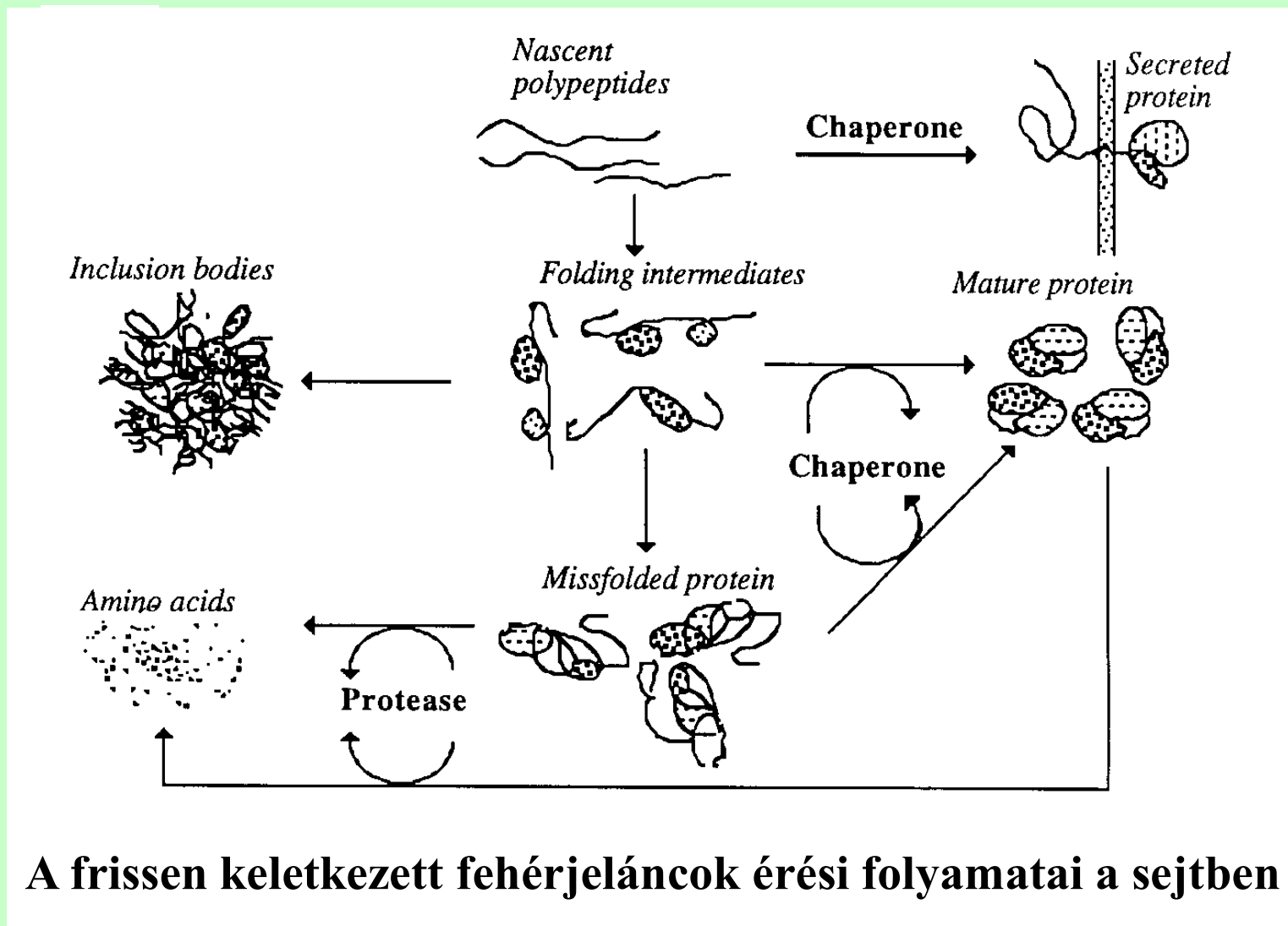
**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**

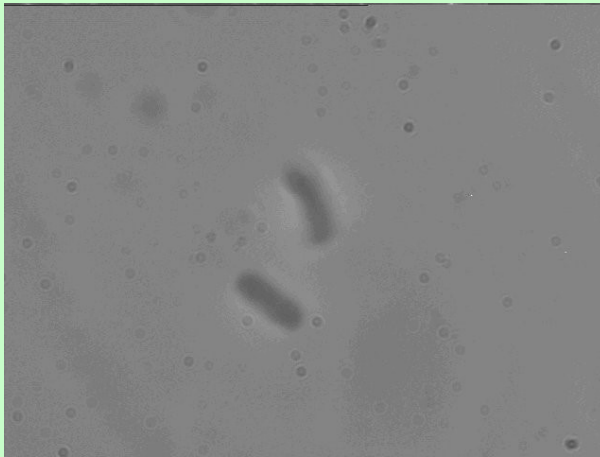


# Baktériumokban (*E.coliban*) keletkező oldható fehérjék és zárvány testek (inclusion bodies)

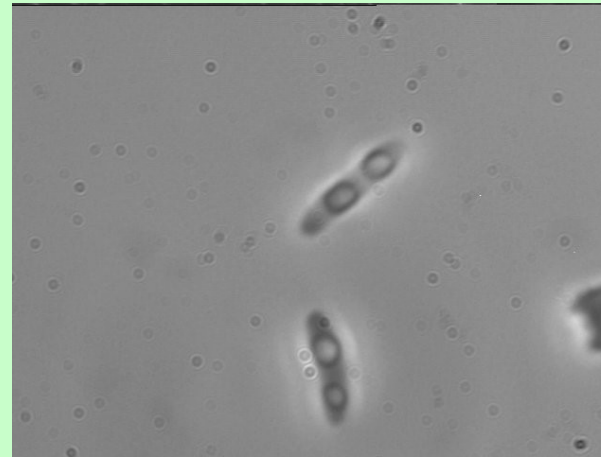


# *E. coli*ban keletkező inklúziós testek és méretük

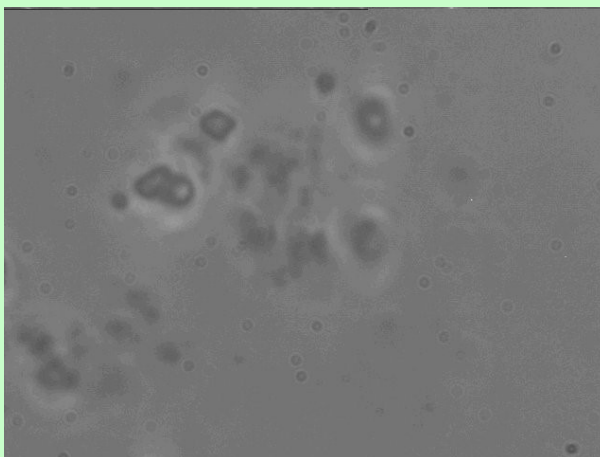
## Inklúziós testek



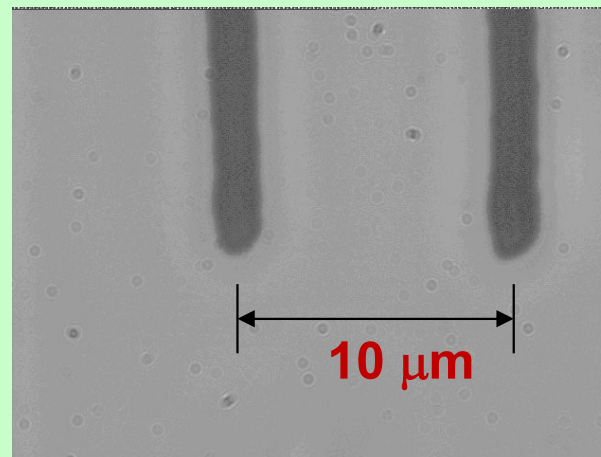
Normál *E. coli* sejtek



*E. coli* sejtek inklúziós testekkel



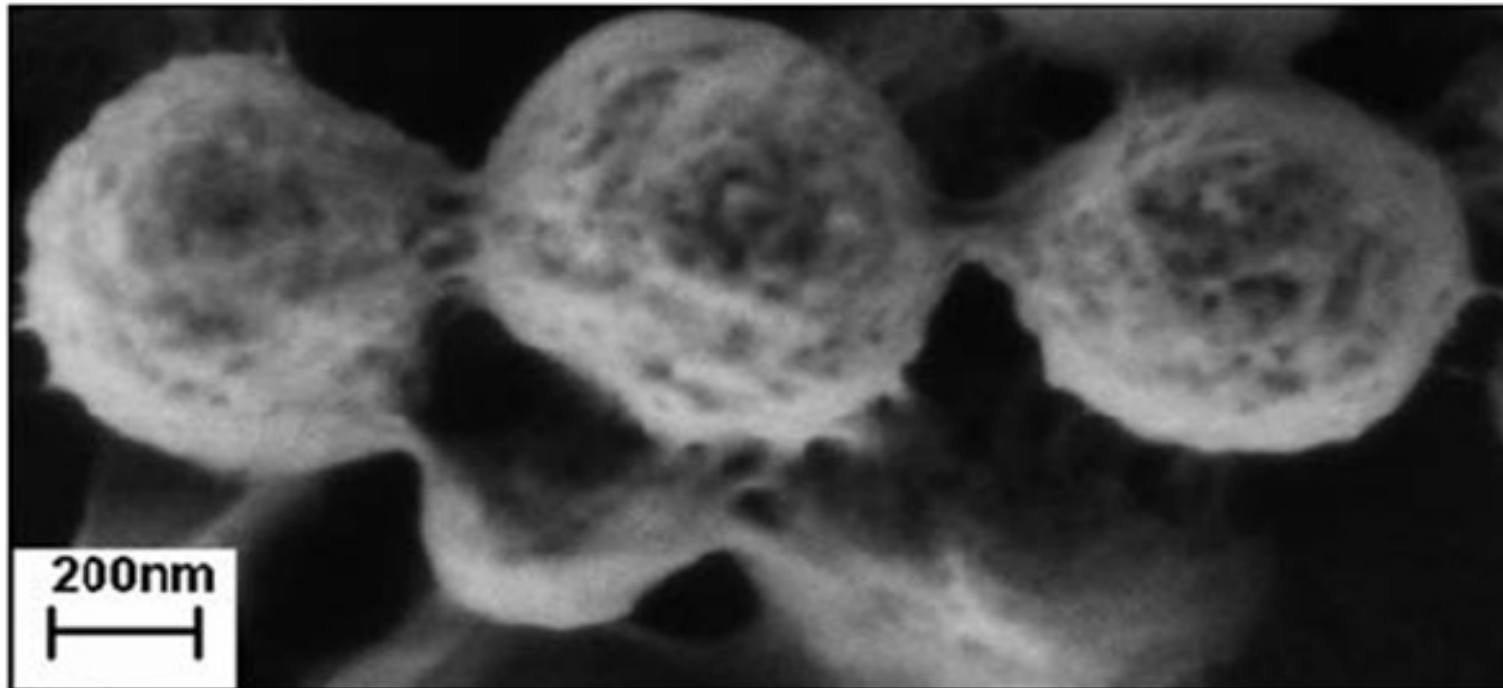
Inklúziós testek sejteltárás után



Objective micrometer - 0.01 mm (10  $\mu\text{m}$ )  
M= 3700 x



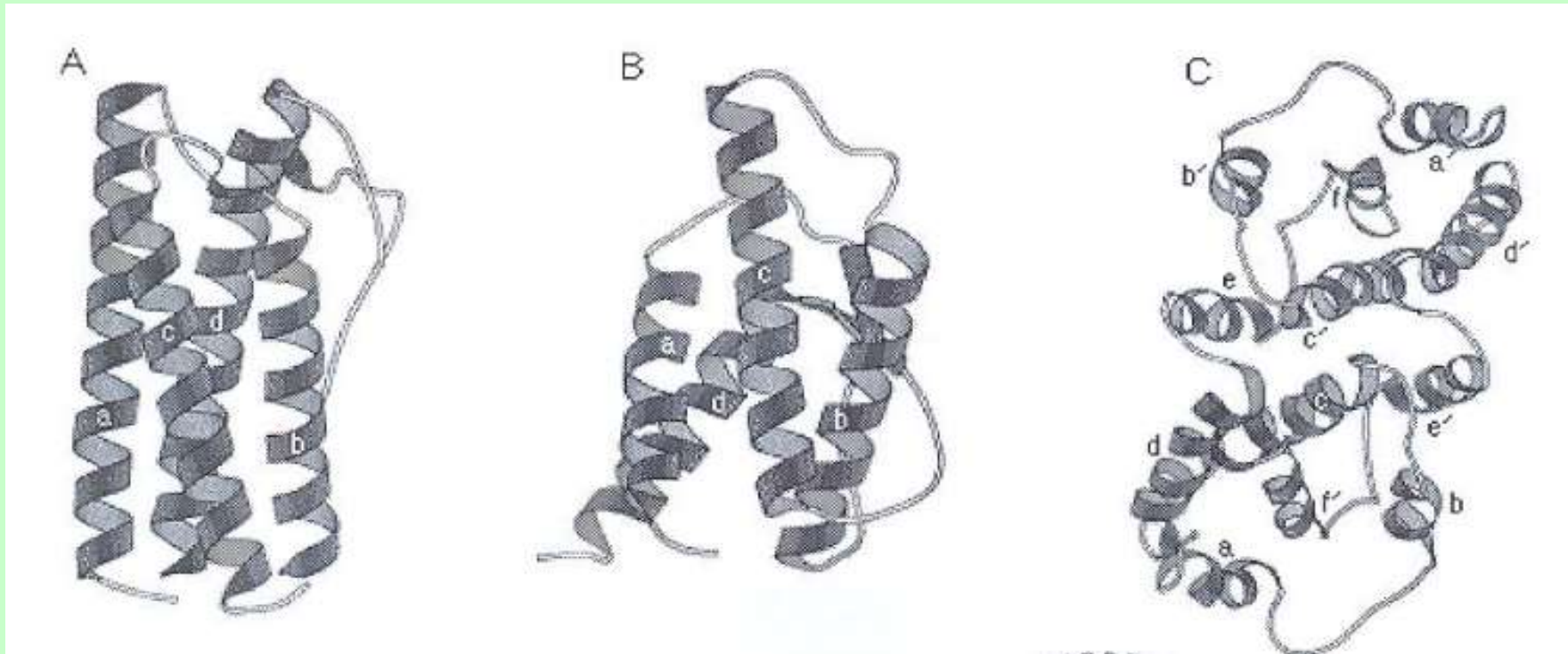
# IB



IBs from *E. coli* cultivated at 25 °C, prepared by cell disruption in a homogenizer, and then thoroughly washed in pure water.



## A keletkezett GCSF formái



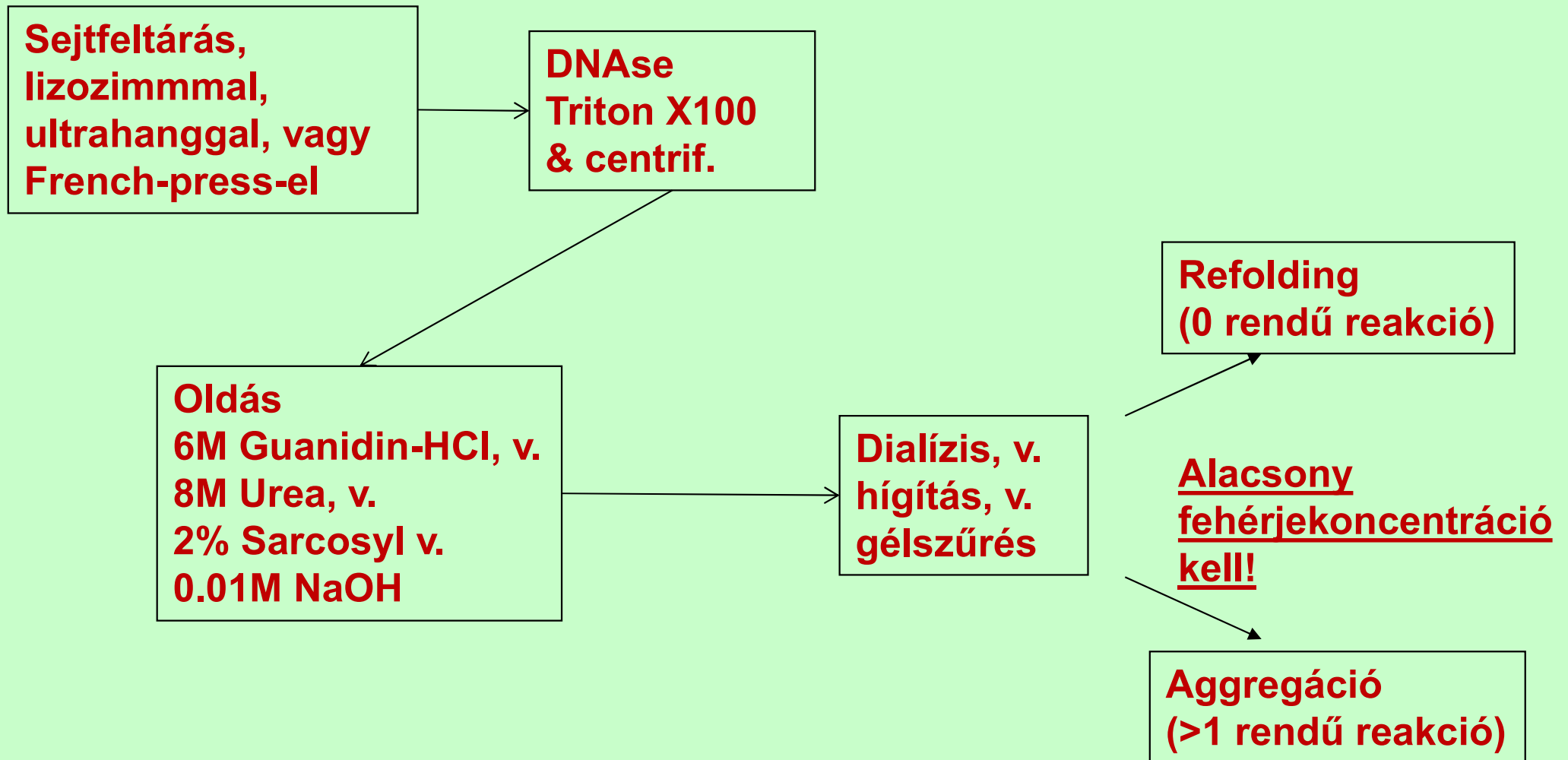
**Jól hajtogatott  
GCSF**

**Rosszul hajtogatott  
GCSF**

**Nem hajtogatott  
GCSF**

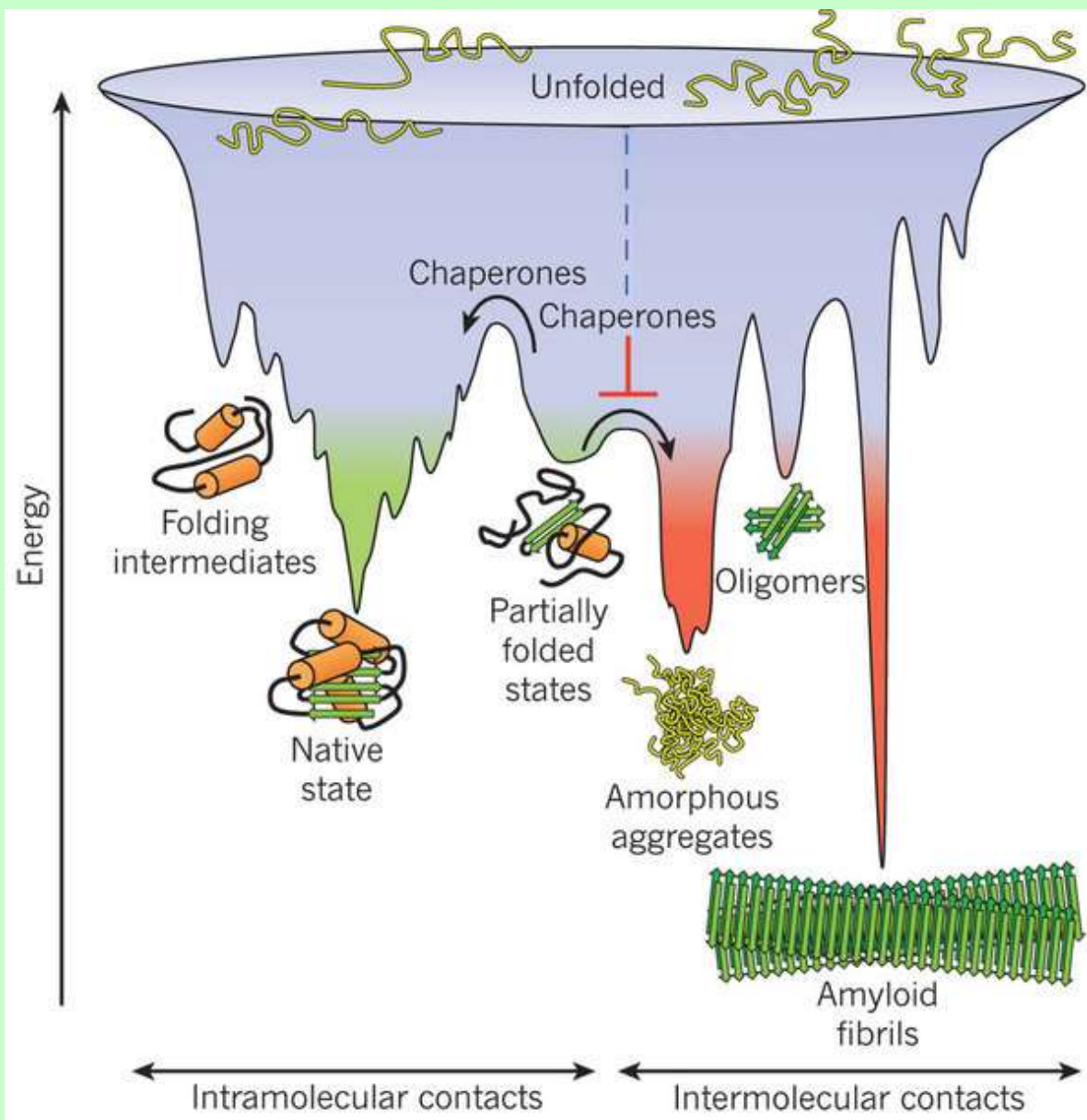


# Rekombináns fehérjék újrarahajtogatása inklúziós testből





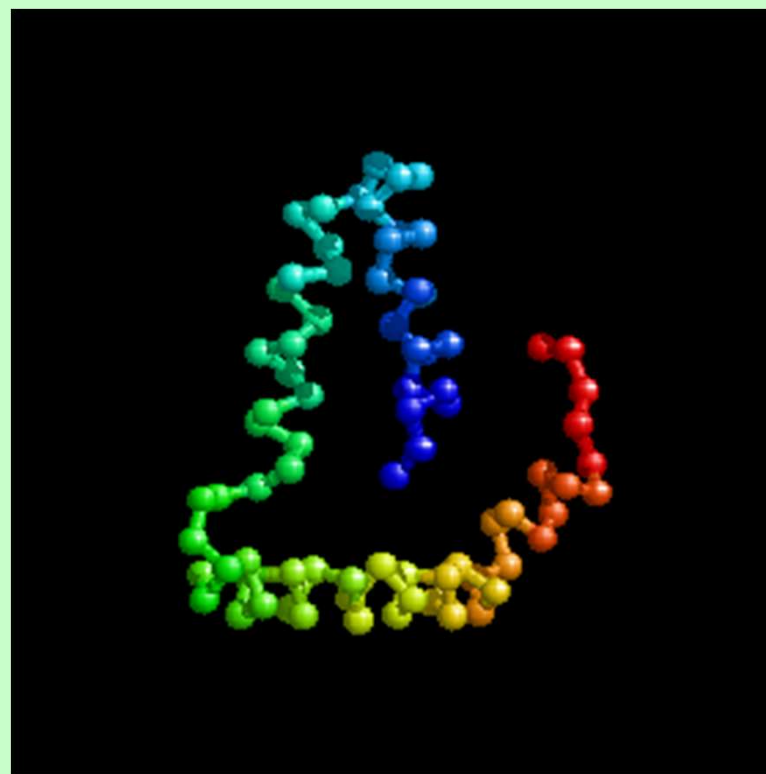
# Fehérjék újra hajtogatásának (refolding) lehetséges kimenetelei



Unfolded – nem hajtogatott fehérjék

in-vivo : keletkezéskor

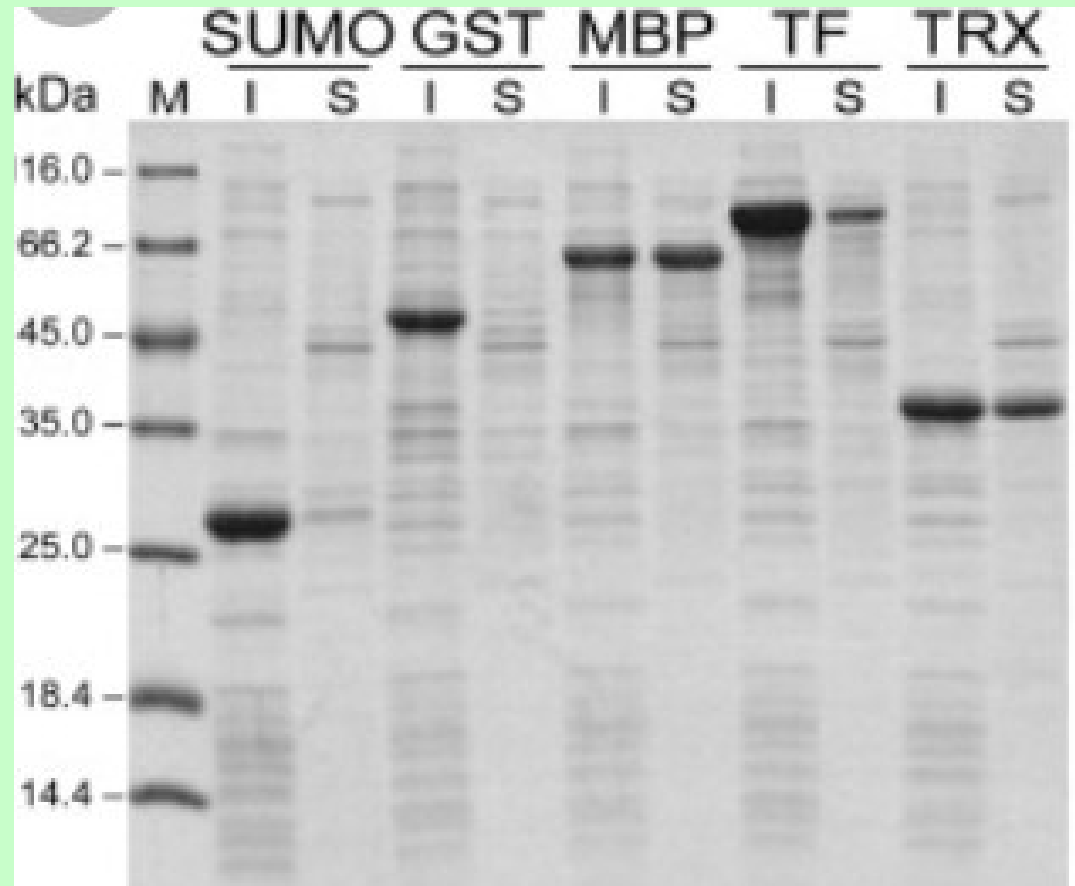
in-vitro: kaotróp ágensekkel



# A fermentlé vizsgálata GCSF oldhatóságot elősegítő fúzió (TRX) nélkül, és TRX-el



A természetben általánosan előforduló fehérje, amely redukáló hatású és a diszulfidkötések képzésében vesz részt. Feladata a korrekt cisztein párosodás kialakítása és a hibás párosodás korrekciója a fehérje hajtogatás során.



**M:**  
size marker

**I:**  
Insoluble

**S:**  
soluble

**SUMO:** small ubiquitin-like modifier

**GST:** glutathione S-transferase

**MBP:** maltose binding protein

**TF:** trigger faktor

**TRX:** thioredoxine



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**



# Egy konkrét példa a GCSF (Filgrasztim)

## Hatásmechanizmus:

**A humán granulocytá-kolónia stimuláló faktor (G-CSF) olyan glikoprotein, mely a neutrophil granulocyták osztódását és a csontvelőből való kilépését szabályozza.**

**A pegfilgrasztim a filgrasztim csökkent vese clearance-en alapuló elhúzódó tartamú formája. Sokkal nagyobb a féléletideje a páciens vérében, ezért ritkábban kell adagolni. (Napi helyett havi egy dózis.)**

**Kimutatták, hogy a pegfilgrasztim és a filgrasztim hatásmechanizmusa azonos: a perifériás vérben 24 órán belül a neutrophil szám jelentős emelkedését, valamint a monocyták és/vagy lymphocyták számának emelkedését okozzák.**

**A termelt neutrophil granulocyták, normál vagy megnövekedett funkcióval rendelkeznek.**



# GCSF - Filgrasztim

N-L-Methionyl-granulocytá-colony-stimulating-factor;  
glikozilálatlan lineáris polypeptid lánc 175 aminosavból áll.

Molekulasúlya 18.799 Da

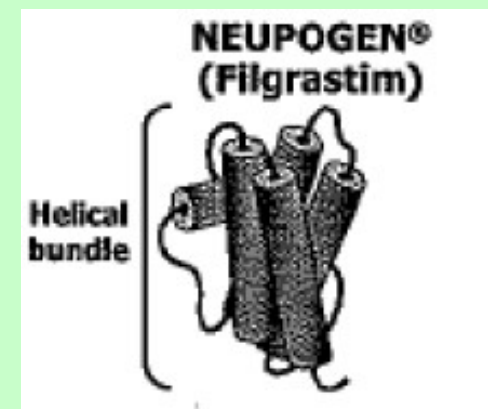
Kémiai formula:  $C_{845} H_{1343} N_{223} O_{243} S_9$

Megjelenése: Átlátszó színtelen oldat

## Elsődleges szerkezet:

Met-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-Gln-Gly-Asp-Gly-Ala-Ala-Leu-Gln-Glu-Lys-Leu-Cys-Ala-Thr-Tyr-Lys-Leu-Cys-His-Pro-Glu-Glu-Leu-Val-Leu-Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile-Pro-Trp-Ala-Pro-Leu-Ser-Ser-Cys-Pro-Ser-Gln-Ala-Leu-Gln-Leu-Ala-Glu-Cys-Leu-Ser-Gln-Leu-His-Ser-Gly-Leu-Phe-Leu-Tyr-Gln-Gly-Leu-Leu-Gln-Ala-Leu-Glu-Gly-Ile-Ser-Pro-Glu-Leu-Gly-Pro-Thr-Leu-Asp-Thr-Leu-Gln-Leu-Asp-Val-Ala-Asp-Phe-Ala-Thr-Thr-Ile-Trp-Gln-Gln-Met-Glu-Glu-Leu-Gly-Met-Ala-Pro-Ala-Leu-Gln-Pro-Thr-Gln-Gly-Ala-Met-Pro-Ala-Phe-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Arg-Arg-Ala-Gly-Gly-Val-Leu-Val-Ala-Ser-His-Leu-Gln-Ser-Phe-Leu-Glu-Val-Ser-Tyr-Arg-Val-Leu-Arg-His-Leu-Ala-Gln-Pro

Diszulfid hidak a 37. és 43. aminosavak között, és a 65. és 75. aminosavak között



# PEG-GCSF – PEG-Filgrasztim

Molekulatömege: ~38.800 Da (~39kDa)

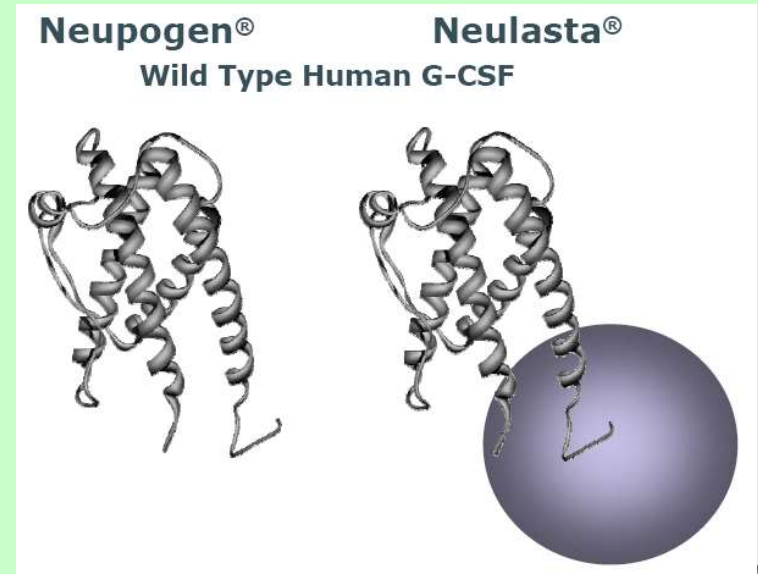
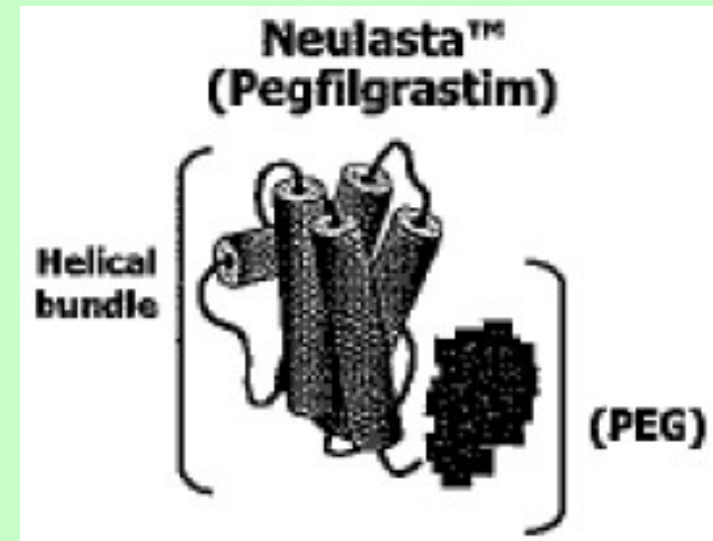
Két molekulából áll: Filgrasztim + PEG

PEG:  $(C_2H_4O)_n C_4H_8O_2$ ,  $n=440-470$ ,

Átlagos relatív molekulatömeg: ~20.000 Da

PEG molekula kapcsolódása az N terminálshoz

PEG (polyethylene-glycol):  $\alpha$ -methyl-polyoxyethylene-glycol



## **A GCSF technológia fejlesztés szakaszai:**

- 1. A primer szerkezet meghatározása**
- 2. A primer szerkezet lefordítása DNS-re, kódon-optimalizálás**
- 3. DNS szintézise**
- 4. Plazmidba való klónozás**
- 5. Sejtek kialakítása, kiválasztása (klónszelekció), sejtbank kialakítása**
- 6. Upstream fejlesztés**
- 7. Midstream fejlesztés**
- 8. Downstream fejlesztés**
- 9. Pegilálás fejlesztés**

**Folyamatos optimalizálás és bioanalitikai fejlesztés**



# A termék minőségének biztosítása a technológia kritikus paramétereinek korrekt szabályozásán keresztül

- A fejlesztési program keretében kockázatelemzést célszerű végezni. (A kockázatelemzés listája némileg módosulhat a későbbiekben gyűjtött tapasztalatok alapján.)

Failure Mode Effects Analysis (FEMA):  $RPN = S \times O \times D$   
Risk Priority Number, S-severity, O-occurrence, D-detectibility

- Ennek alapján a technológiai paraméterek hatásának megállapítása a termék kritikus minőségi paramétereire.
- Ennek eredményeként a lehetővé válik a közttermékek és a végtermék mennyiségi és minőségi paramétereinek biztosítása a kritikus technológiai paraméterek, beavatkozási határok és az elfogadási határok betartásán keresztül.
- A technológia fejlesztéséhez jó analitikai módszerekre van szükség, hogy ne vakon menjen a fejlesztés.





# A megfelelő szintetikus gén előállítás

A természetes Hu-GCSF AA szekvenciájának meghatározásával kezdődik. Endoproteázokkal emésztett fragmenseken LC-MS/MS technikával való elemzést lehet használni.

Az ellenőrzött AA szekvencia alapján kódon optimalizációt (számítógépes statisztikai kiértékelést) kell végrehajtani.

A kapott DNS szekvencia alapján történhet a kémiai szintézis (528 bp hosszú DNS).

		Second Letter					
		U	C	A	G		
1st letter	U	UUU   Phe UUC   UUA   Leu UUG	UCU   Ser UCC   UCA   UCG	UAU   Tyr UAC   UAA   Stop UAG   Stop	UGU   Cys UGC   UGA   Stop UGG   Trp	3rd letter	U C A G
	C	CUU   Leu CUC   CUA   CUG	CCU   Pro CCC   CCA   CCG	CAU   His CAC   Gln CAA   CAG	CGU   Arg CGC   CGA   CGG		U C A G
	A	AUU   AUC   Ile AUA   AUG   Met	ACU   Thr ACC   ACA   ACG	AAU   Asn AAC   AAA   Lys AAG	AGU   Ser AGC   AGA   Arg AGG		U C A G
	G	GUU   Val GUC   GUA   GUG	GCU   Ala GCC   GCA   GCG	GAU   Asp GAC   GAA   Glu GAG	GGU   GGC   Gly GGA   GGG		U C A G



# A GCSF gén beillesztése a plazmidba

A GCSF DNS beillesztésre került egy pET39b plazmidba a NdeI-XhoI vágáshelyek között. Így előállt a *pRG/GCSFa* plazmid.

Az NdeI enzim vágáshelye (CA|TATG) megegyezik a metionin kódjával (ATG), így utána bármilyen kód következhet.

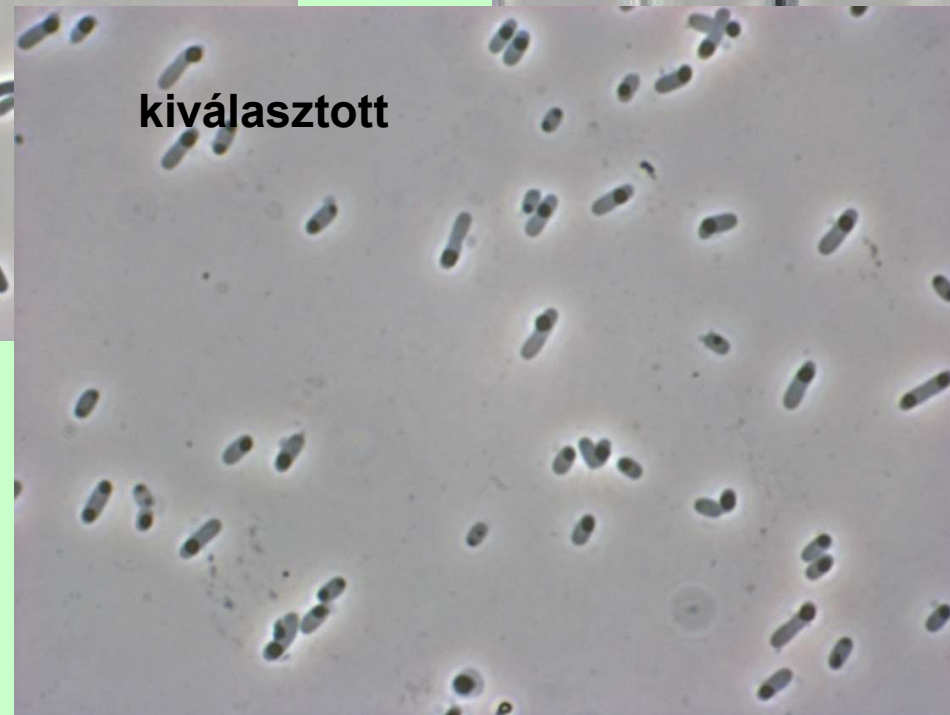
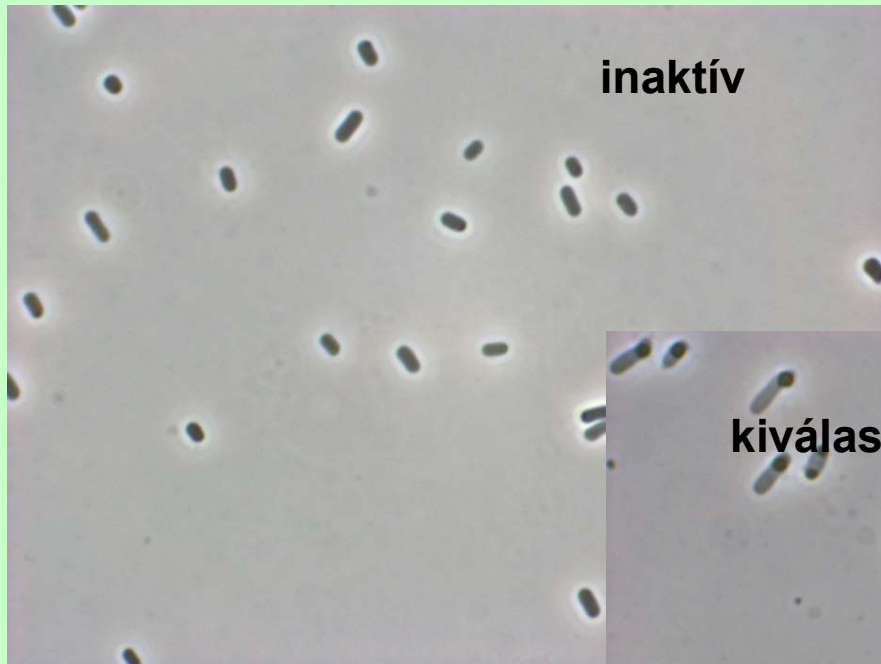


A plazmidon T7 promóter helyezkedik el, ami a génexpresszió szabályozására szolgál.

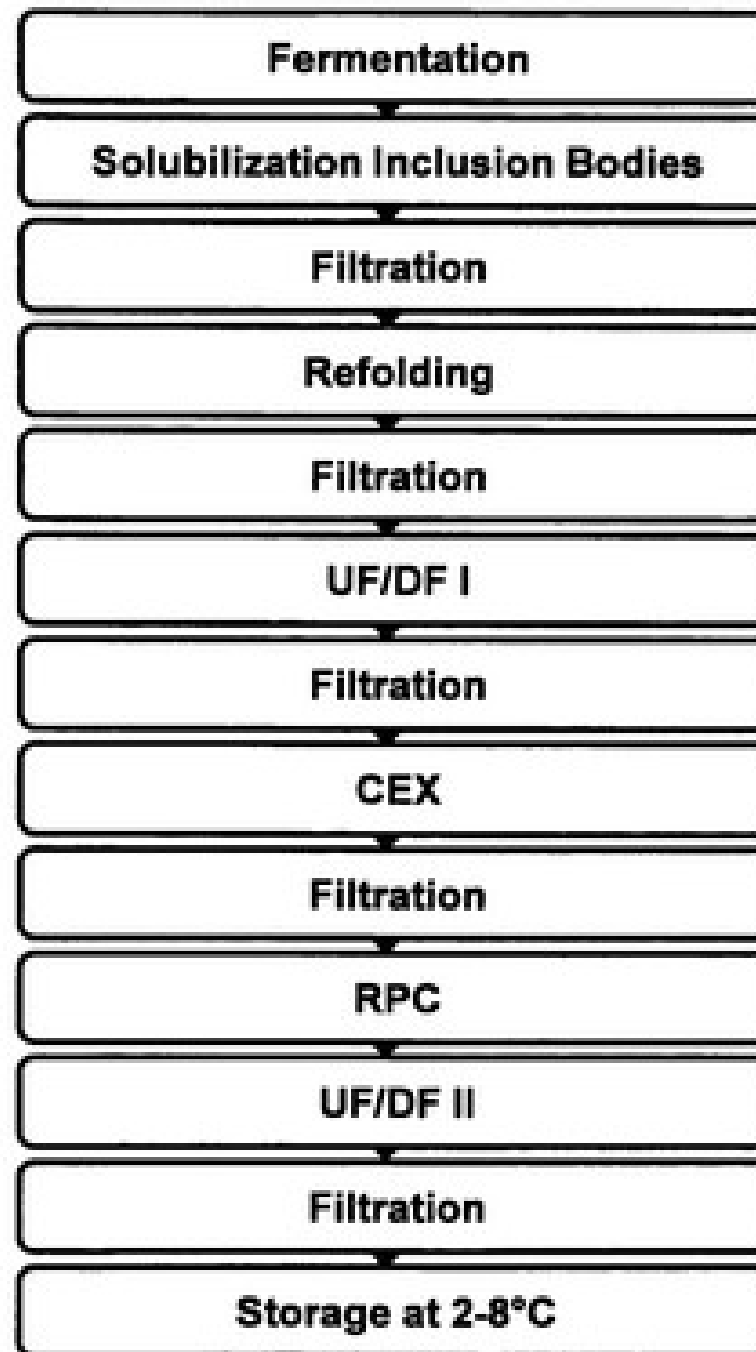
A T7 fágból származó DNS függő RNS polimeráz (T7 DNA dependent RNA polymerase) tud ide kötődni, és elvégezni az átírást m-RNS-be, de csak akkor, ha IPTG van jelen.



# A legjobb termelő törzs kiválasztása. A termelés mikroszkópos vizsgálata

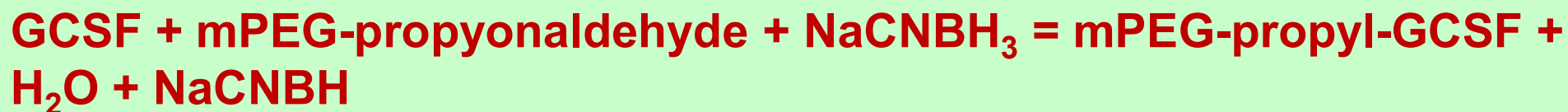


**GCSF termelése  
inklúziós testből  
újra hajtogatással  
(refolding)**

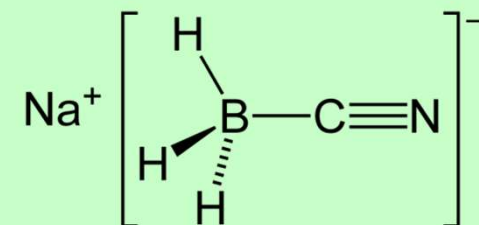
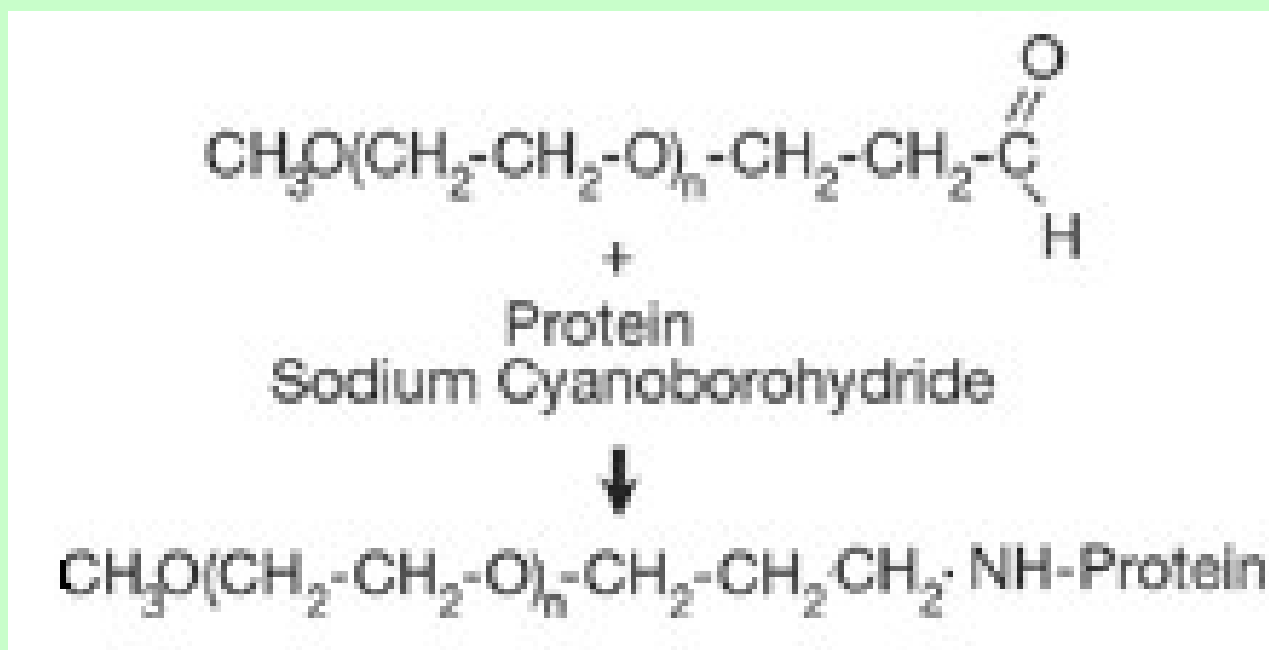


## A GCSF pegilálása

Az mPEG propyonaldehid { $\alpha$ -methyl- $\omega$ -(3-propoxy), polyoxyethylene} és a fehérje N terminálisának kémiai reakciója



A reakció mechanizmusa:



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**



# Laboratóriumban tenyészthető sejt típusok

- Elsődleges (Primer) kultúrák
  - Másodlagos (Szekunder) kultúrák
  - Sejttörzs
  - Sejtvonalak
- Kitapadó sejtek
- Nem kitapadó sejtek

## Immortalizáció módja

- Spontán transzformáció
- Transzfekció
- Szomatikus sejtfúzió  
(Hibridómák, Hibridek)



# A sejtenyésztés jelentősége

**Kutatás: az állati sejtekre jellemző biokémiai utak, különböző sejtszintű szabályozások**

**Rekombináns fehérjék előállítására (pl. interferonok, növekedési hormonok, stb.)**

**Monoklonális ellenanyag termeltetésére hibridoma sejtekkel**

**Állati vírusok szaporítására vakcina gyártás céljából**

**Sérült szövetek rekonstrukciója, nem funkcionáló szövetek helyettesítése a saját szövetek tenyésztésével, melyre nincs immunológiai válasz; embrionális eredetű és szöveti őssejt alkalmazás állatkísérletek kiegészítése, részleges helyettesítése**





# A fenntartás korlátja

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, azaz a tenyészet elöregszik (szeneszencia)

Okai:

- a kromoszómavégek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
- aktiválódnak a sejtciklust ellenőrző (és azt leállító) mechanizmusok

Eredetileg csak a tumor- és a rovarsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).



# Primer sejt kultúra

**Definíció: Az eredeti szervből/szövetből frissen eltávolított sejtekből készült kultúra**

**Szövet izolálás: (vér, intraperitoneális folyadék) fiatal állatból (kevésbé differenciáltak a sejtek, a DNS még nem károsodott)**

**Sejtek diszaggregálása:**

- **Késes homogenizátor (Turax)**
- **Enzimatis emésztés (kollagenáz, papain, tripszin) / DNáz: sejtől kiszabadult DNS eliminálása)**
- **Sejtek egymástól való elkülönítése (pl. gradiens centrifugával)**



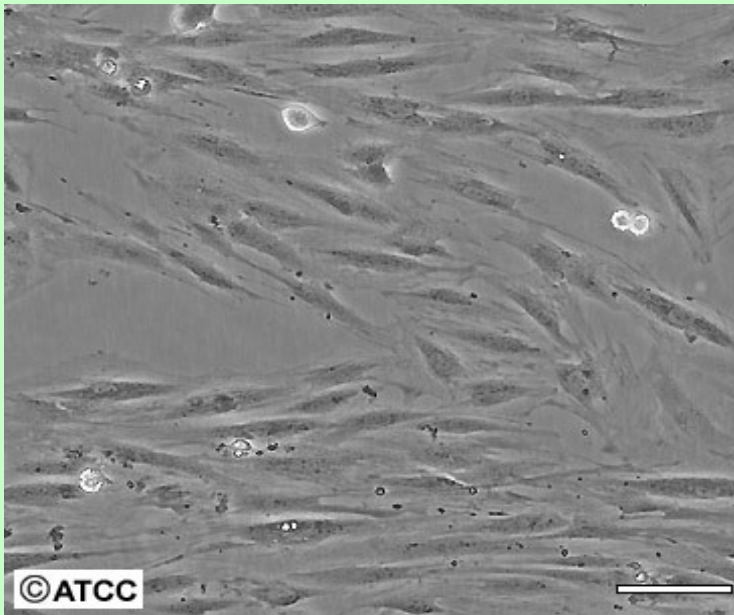
# Szekunder sejt kultúra és Sejt törzs

- **Szekunder kultúra: A primer kultúra sejtjeinek egyszeri passzálása (átoltása) révén jön létre**
- **Sejttörzs: A primer kultúrából néhány passzálás után kialakult véges élettartamú, korlátolt növekedésű (40-60 generáció) sejt kultúra**  
pl. fibroblaszt tenyészet



# Sejtvonal

**Definíció: Genetikailag homogén,  
korlátlan ideig fenntartható kultúra**



**H9C2**

## Normál sejtvonalak

- Spontán immortalizálódhatnak (pl. patkány kardio-myocyta- H9C2)

## Mesterséges immortalizáció

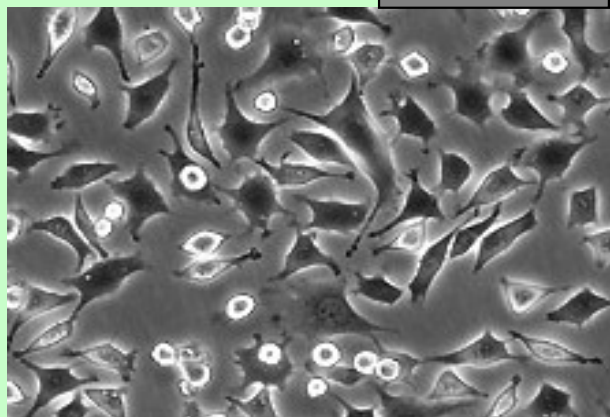
- Transzfektálás virális onkogénekkal; SV40 (Simian vírus)
- Tumor sejtek (pl. Human cervix carcinoma: HeLa)
- Hybridomák



# Sejtvonal

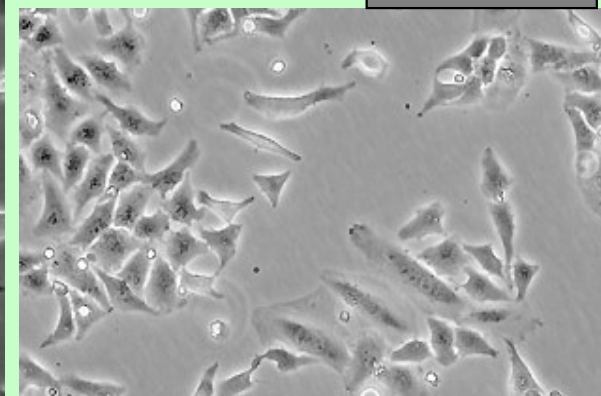
**Kitapadó – felülethez kötött  
(WRL-68, HeLa,  
HepG2 - humán hepatocelluláris  
karcinóma, etc.)**

WRL-68



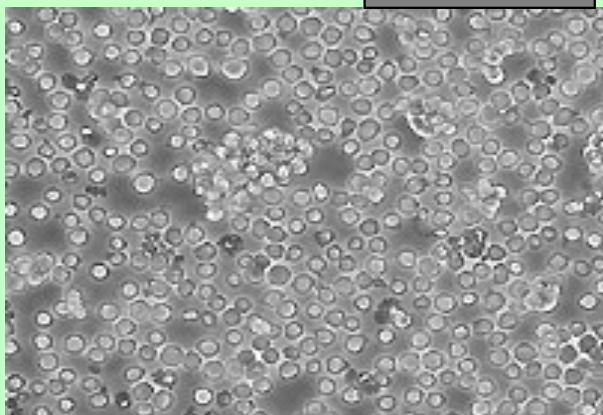
máj fibroblaszt

HeLa



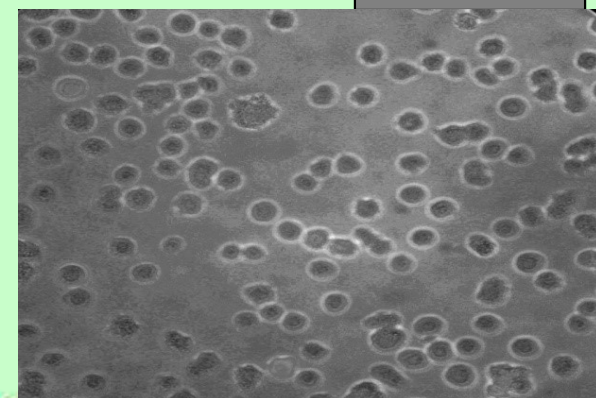
humán cervix karcinóma

Jurkat



**Nem kitapadó –  
szuszpenzióban lévő  
(Jurkat - humán T-sejt  
leukémiás sejtvonal)**

CHO



**Kitapadva és szuszpenzióban  
is fenntartható  
(CHO, chinese hamster ovary,  
BHK, Baby Hamster Kidney)**



# Törzsgyűjtemények

**European Human Cell Bank (Salisbury, UK)**

**European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK)**

**Tumor Bank, Deutsche Krebs Forschungszentrum (Heidelberg, FRD)**

**Collection of Cancer Cell Lines (Japan)**

**American Type Culture Collection (USA):**

**~3600 sejtvonala; több, mint 80 különböző fajból, több, mint 950 tumoros és 1000 hybridóma sejtvonala**



# A CHO története

1919-től Kínai hörcsögök kutatásban való alkalmazása – pneumococcus tipizálás.

1920-30 Domesztifikálás és beltenyésztés miatt sok új betegséget kaptak, használatuk lecsökkent.

1948-tól a belőlük nyerhető sejtvonalak használata. Előny: alacsony kromoszóma szám  $2n=22$  db.

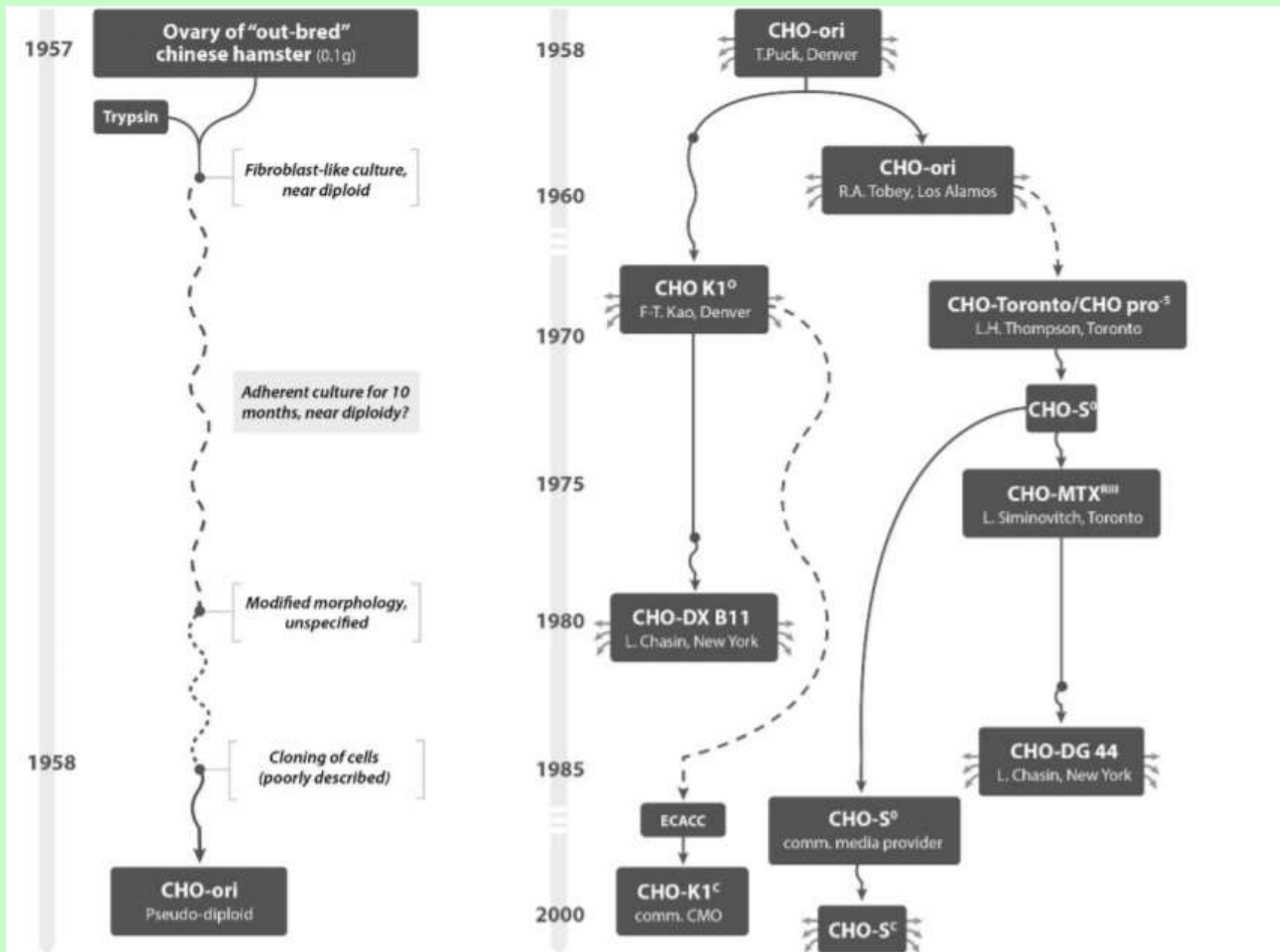


1957-ben Theodore T. Puck (University of Colorado's Department of Medicine) kapott egy nőstény Kínai hörcsögöt a Bostoni Rákkutató Intézetből. Ennek petefészkéből nyerte ki és alakította ki a CHO sejtvonalat.

Előny: gyors növekedés, nagy fehérje termelés. Emlős sejt vonalon az E.coli méltó párja, ha hosszú távú, stabil génexpresszió kell, és magas hozam.



# Az eredeti CHO sejt vonal leszármazottai



Origin, names, and constructed history of industrially relevant CHO cell lines





# CHO sejtek jelen használata

A rekombináns termékek ipari előállításának 70%-a CHO val történik.

1987 – első jóváhagyott gyógyszer CHO-val:

Genentec – Activase (stroke, embólia, infarktus)

Korai termelések jellemzői: szakaszos tenyészet, kis térfogatok, állati vérszérum a tápoldatban, 6-7 nap, 100 mg/lit hozam.

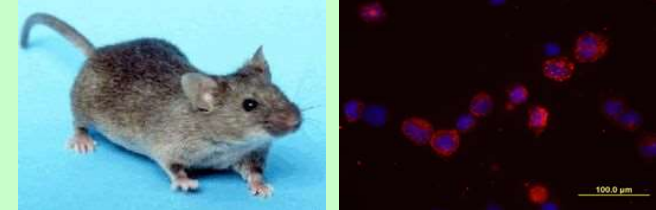
2000-es évektől:

- fed-batch v. perfúziós tenyészetek,
- nagy térfogatok (1 000 – 25 000 lit.),
- CD (chemicaly defined),
- folyamatos monitorozás (DO, CO<sub>2</sub>, cukor, egyéb tápanyagok, anyagcsere termékek),
- 1-6 g/lit hozamok.

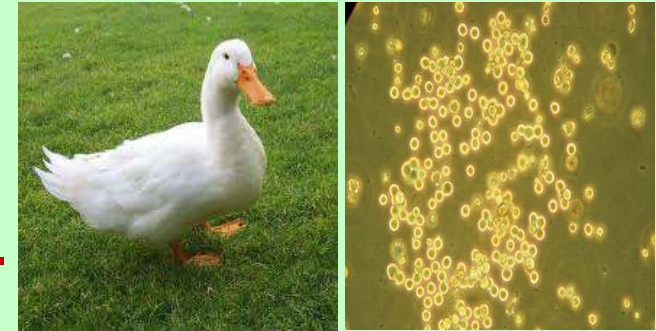


# CHO sejtek reális ipari alternatívái

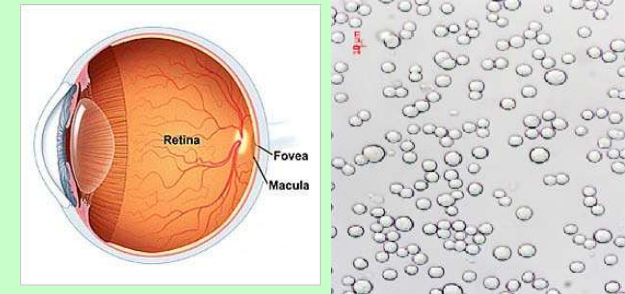
**NS0 sejtvonala: egér myeloma sejtek. Nagy hozam (kb. mint CHO). Azonban CHO-nál kevésbé humán glikoziláció. Médiába extra lipidek és koleszterol kell, ami nehezíti a downstream műveleteket.**



**EB66, kacsabombó őssejtéből származtatva (Vivalis). Sejtvonala előállítása génmanipuláció, kémiai kezelés és vírus módosítás nélkül készült, ezért stabilabb és nem tartalmaz potenciális tumorgén DNS szakaszt. Még inkább humánszerű az így készült fehérje glikozilációja. Hátránya az érte kért licenszdíj, ami általában magas.**



**PER.C6 (DSM, Crucell), humán retina eredetű. Perfúziós tenyésztésre alkalmas, a termelt fehérje akár 30 g/lit is lehet. Jelentős know-how segítség a licenszadótól, humán közeli glikoziláció, de magas licenszdíjak, egyetlen és kizárólagos tápoldat forrás a licenszadótól, emiatt kiszolgáltatott helyzet.**



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

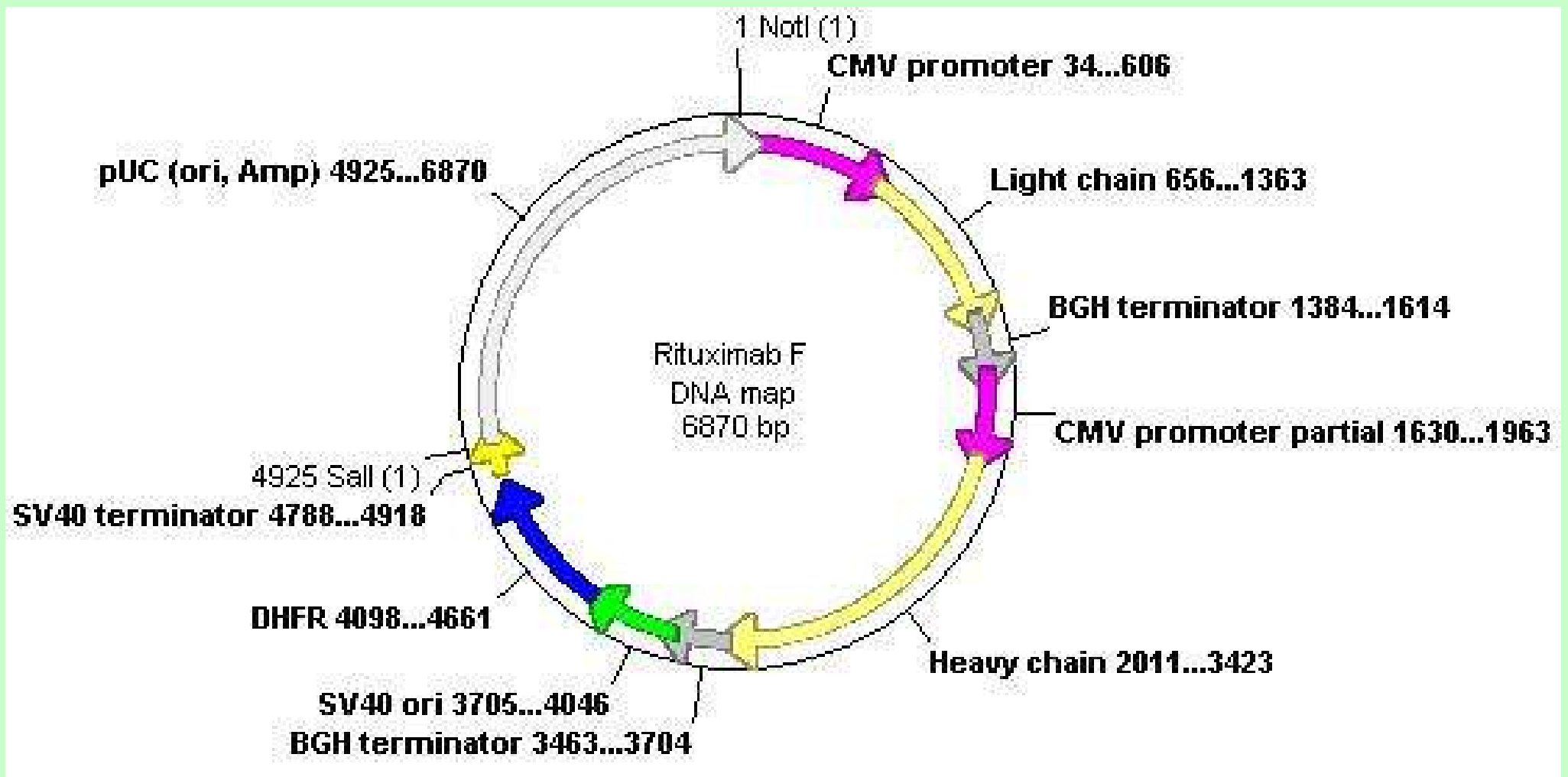
**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**Ipari feldolgozási sor**

**1. Rész**



# Egy antitest génjeit tartalmazó plazmid, emlős kromoszómába ültethető szerkezettel



**SV: Simian vacuolating Virus; CMV: Cytomegalo Virus; BGH: bovine growth hormon  
DHFR: dihydroxy-folate-reductase;**



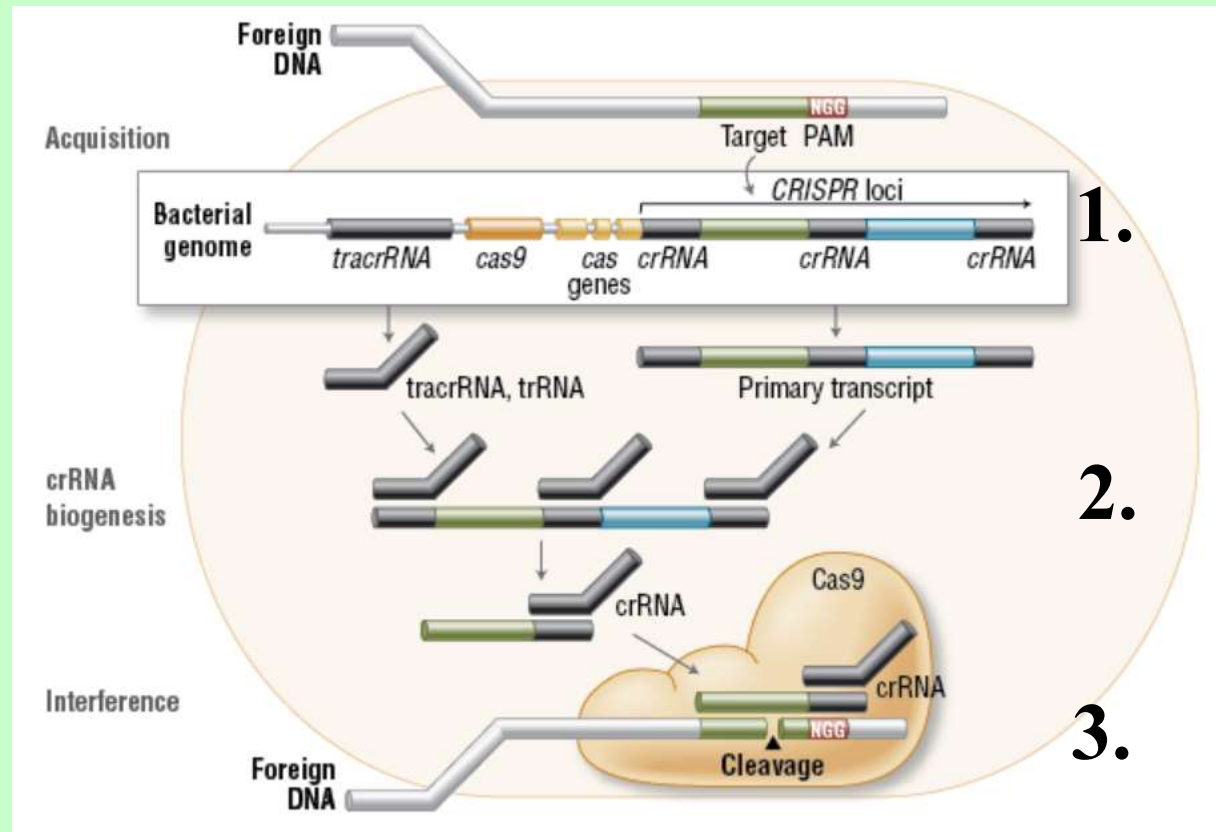
# CRISPR ejtsd „kriszper”

*clustered regularly interspaced short palindromic repeats, azaz „halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések”*

A baktériumok genomjában található rövid, ismétlődő DNS-szakaszok neve.

E szakaszok között idegen DNS darabok helyezkednek el, amelyek olyan vírusokból vagy plazmidokból származnak, amelyekkel a baktérium korábban már találkozott.

A CRISPR/Cas rendszer a prokarióták védekezési módszere a vírusok és káros plazmidok ellen; valójában egyfajta immunrendszer.



1. Idegen DNS darab megszerzése

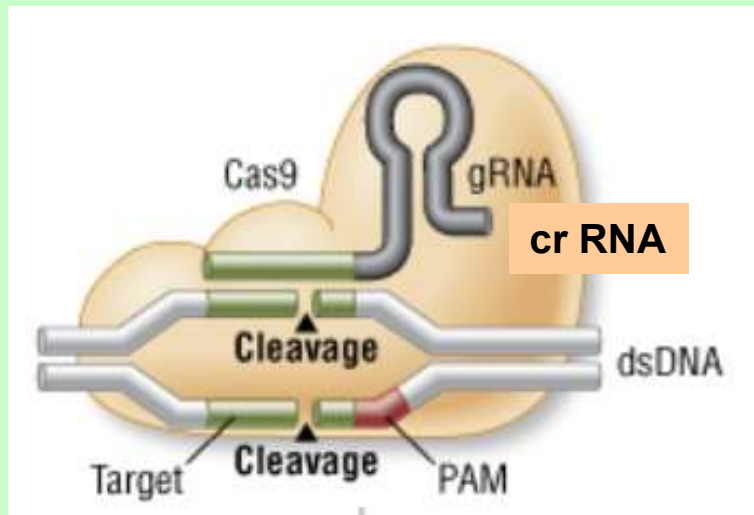
*A következő támadásnál*

2. A felismerő RNS-ek keletkezése

3. Az idegen nukleinsav lebontása



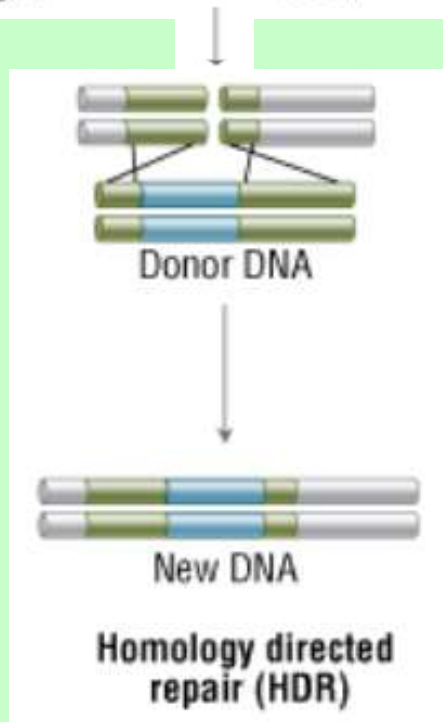
# Génszerkeztés (klónozás) a CRISPR/CAS9 rendszerrel



crRNS ez az RNS-szakasz tartalmazza a célszekvenciát (amelyet az enzim elvág majd a sejt kromoszómáján)

Cas9 a DNS-vágó enzim, amely elvágja a DNS-t a felismert szakaszon, pontos helyen.

Javítótemplát olyan DNS-szakasz, amely mintát mutat a sejt javítóenzimeinek és amelyik szekvenciája beépül az enzim által elvágott helyre



## Alkalmazások:

- Klónozás tetszőleges bázispárnál kezdődően, nem csak ott, ahol restriktív vágáshely van.
- Növényekbe, állatokban végzett génmérnöki műveletek
- Emberi génhibák javítása petesejtben



# Emlősajt klónozó módszerek – határhígítási kiválasztás

**Spontán beépülés kromoszómába vagy a MAR (Matrix Attachment Regions) adta lehetőségek kihasználása.**

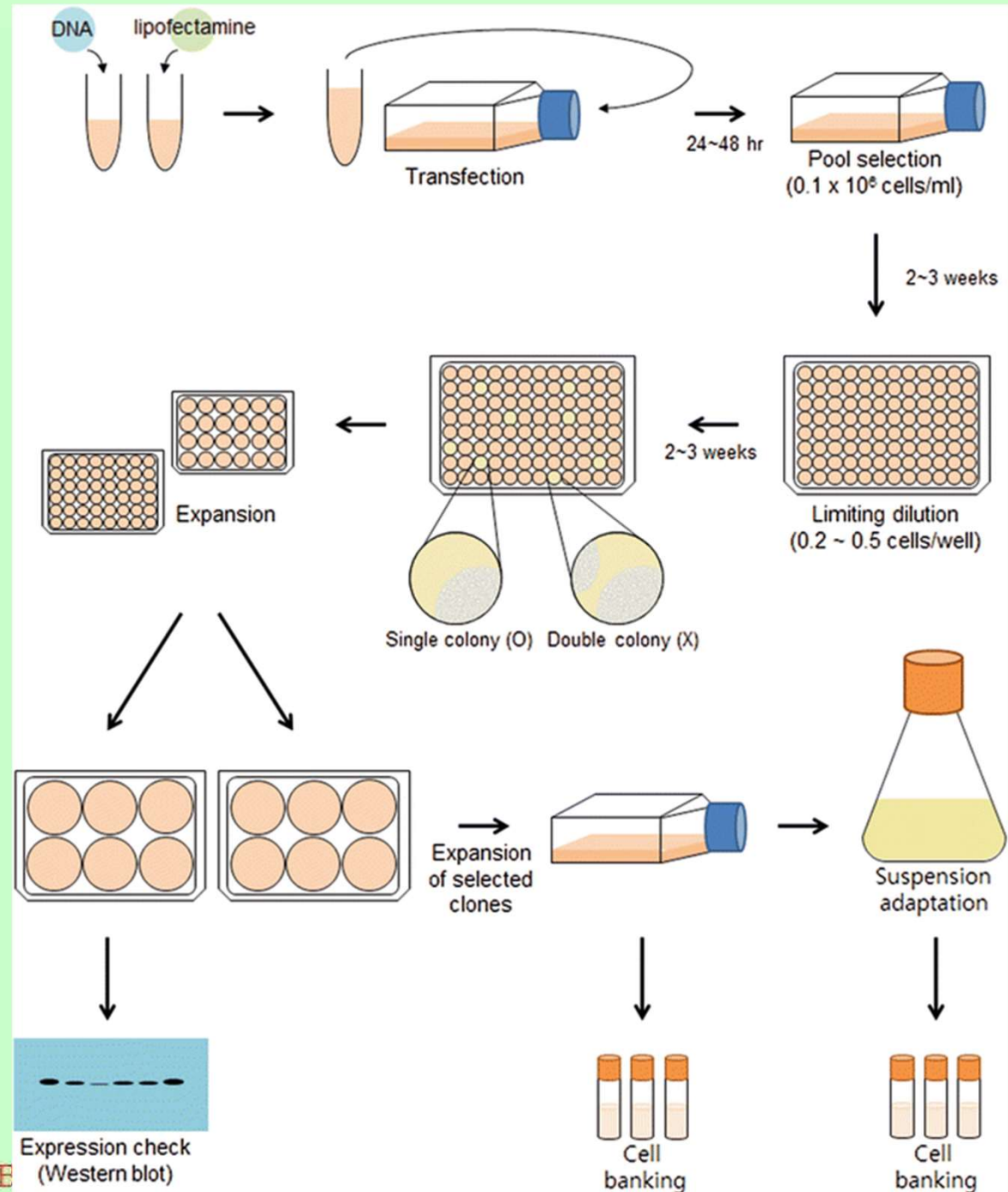
**Olcsó médium,**

**Magas genetikai stabilitás**

**Hosszadalmas klónozás (0,5-1 év)**

**Alacsony vagy közepes hozam,**

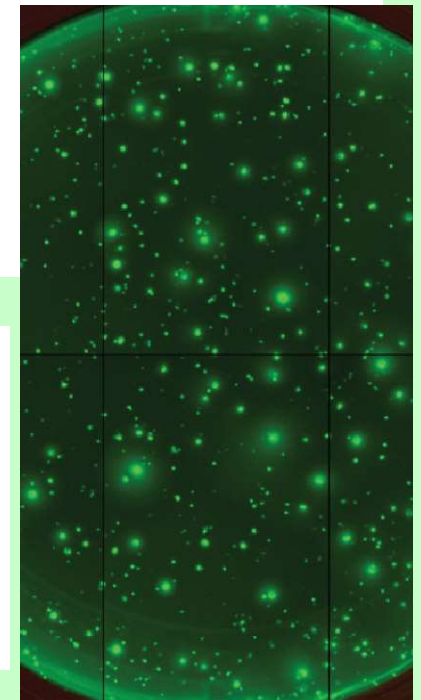
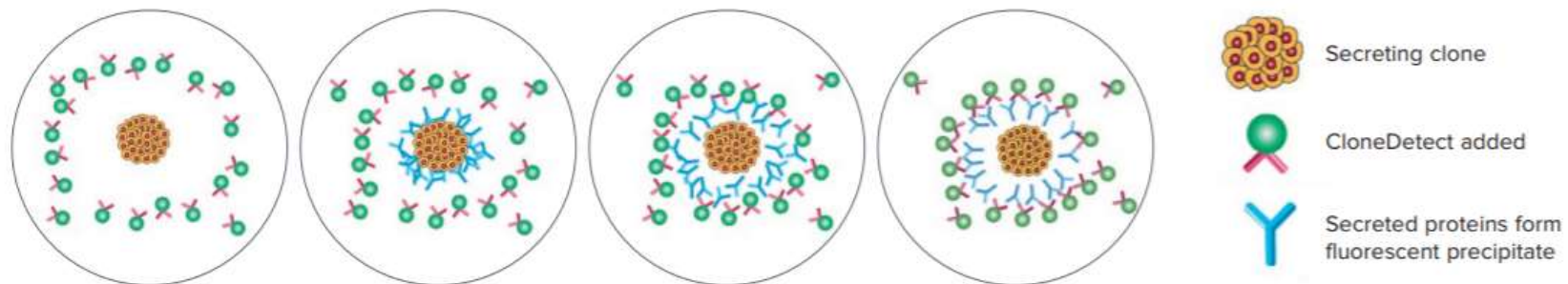
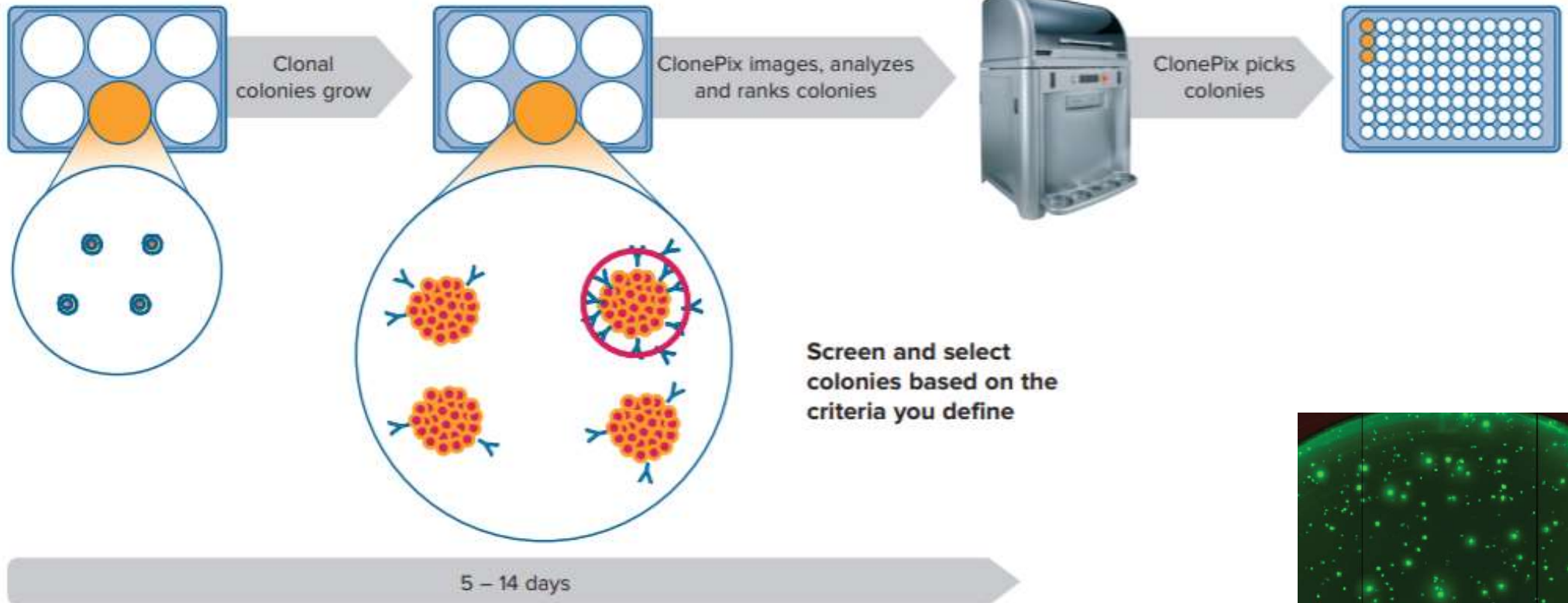
**Sok klónt kell átvizsgálni.**



# Emlőssejt klónozó módszerek - ClonePix

Cells plated into semi-solid medium

Select your colonies based on the system's automatic analysis and ranking



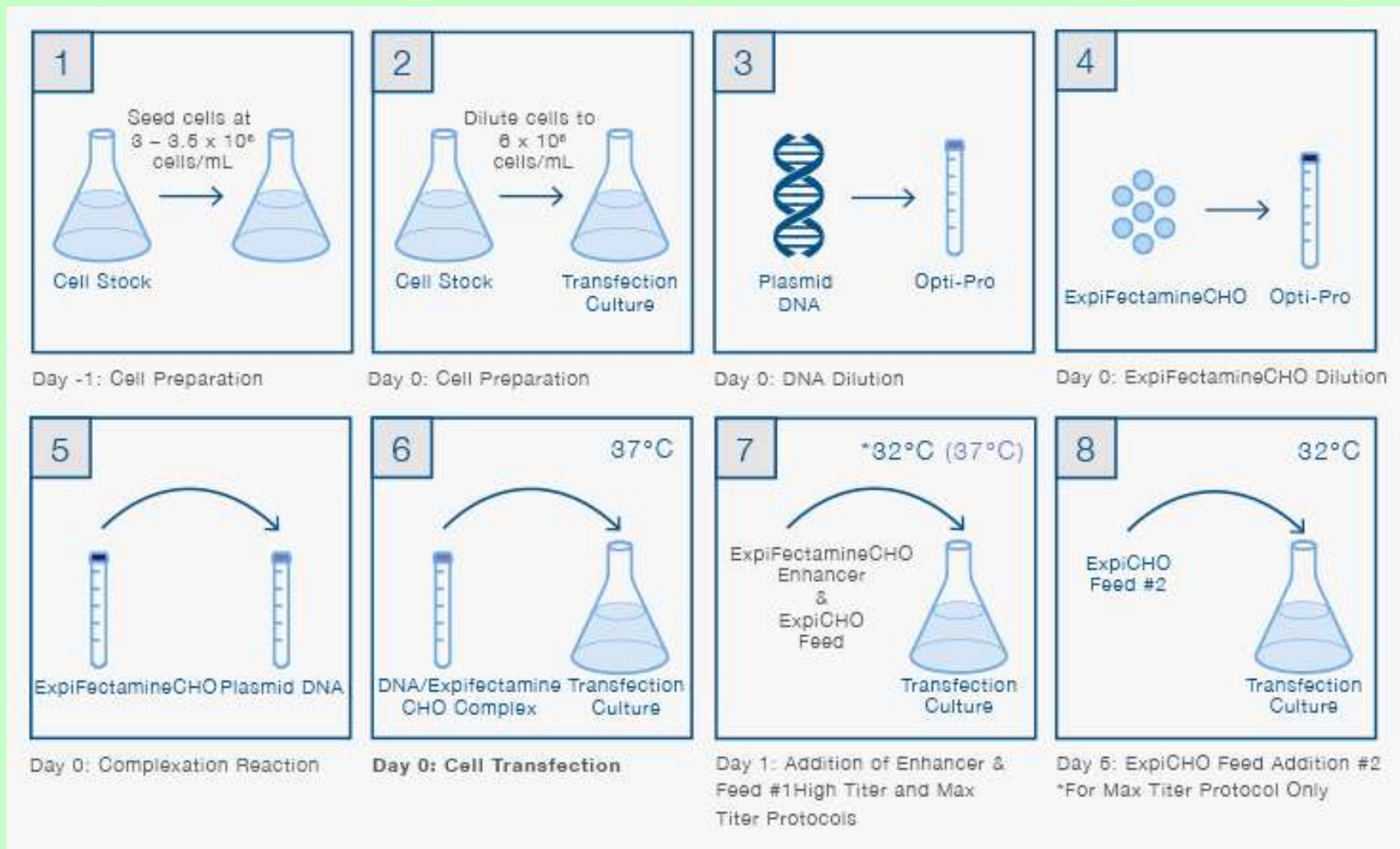


# Emlősejt klónozó módszerek

## ExpiCHO rendszer:

**Gyors megoldás,  
Optimált sejtvonala, tápoldat és rátáplálás,  
Magas hozam,**

**Drága médium,  
Egy beszállító.**



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

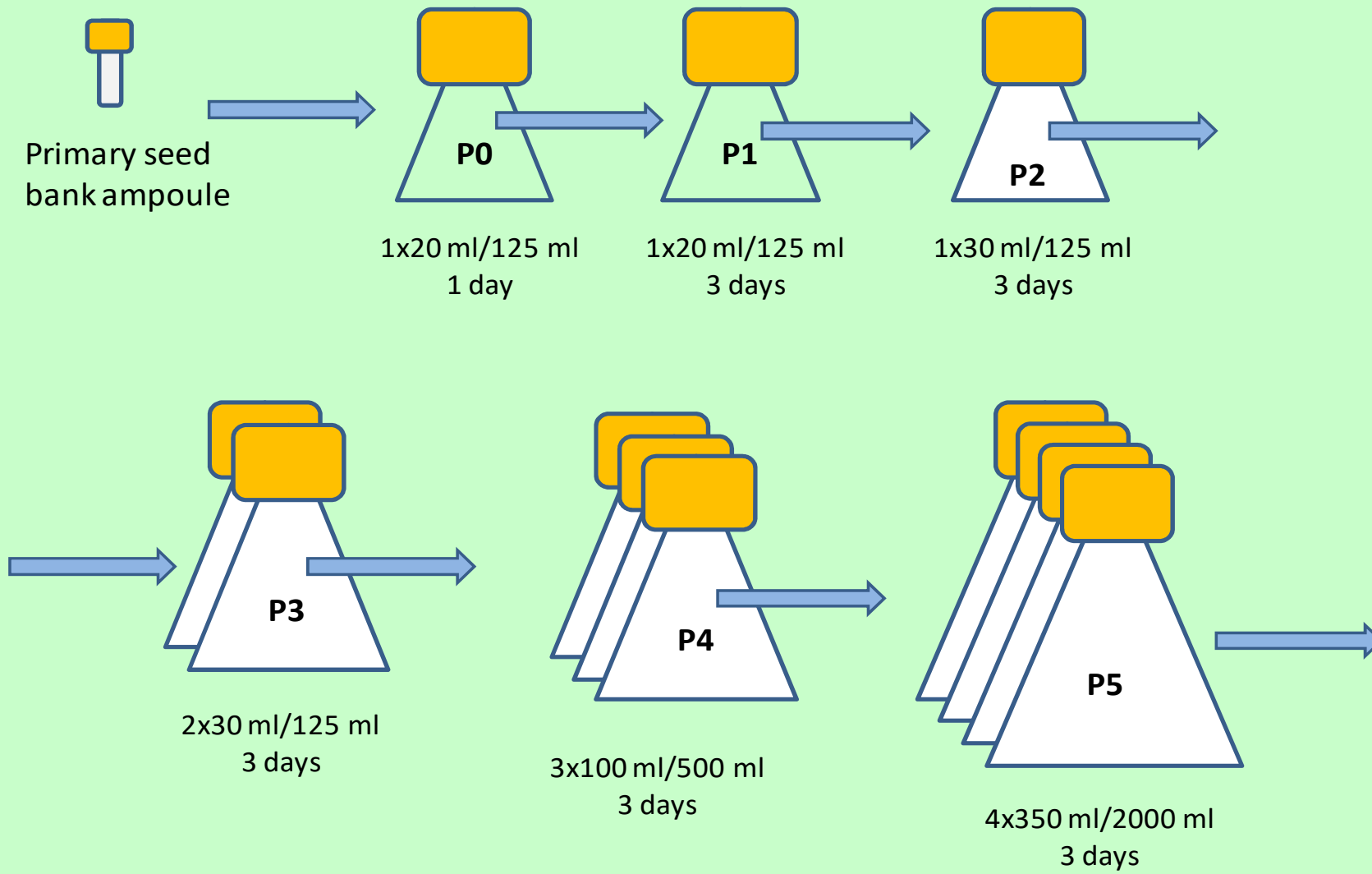
**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**Ipari feldolgozási sor**

**1. Rész**



# MCB készítése



# Lefagyasztás

1. A sejteket egy éjszakára  $-80^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóba helyezük. A hűtés optimális sebessége  $1-3^{\circ}\text{C}$  /perc.
2. A következő napon a sejteket tartalmazó fagyasztó edényt a folyékony nitrogént tartalmazó tárolóba helyezük.
3. Mind a folyadék fázisú ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), mind a gáz halmazállapotú nitrogén ( $-156^{\circ}\text{C}$ ) megfelelő hűtést biztosít.



# Felolvasztás (gyors)

1. **A sejteket tartalmazó tárolóedényt gyorsan olvasszuk ki 37 °C-os vízfürdőben, kíméletes rázatás közben.**
2. **Amint a jégkristályok kiolvadnak, a sejteket óvatosan pipettázzuk át egy előmelegített, komplett tenyésztőoldatot tartalmazó centrifugacsőbe.**
3. **A sejteket alacsony fordulatszámú centrifugálással ülepitjük, majd öntsük el a krioprezervatív anyagot tartalmazó felülúszót (ezek jelenlétében a sejtek ugyanis törékenyek).**
4. **A sejteket óvatosan reszuszpendáljuk a tenyésztő médiumban, meghatározzuk a sejtszámot és az életképességet (viabilitást).**
5. **Mérjük ki a sejteket a kívánt számban a megfelelő tenyésztőedénybe. Az inokulumban legalább  $3 \times 10^5$  élő sejt/ml legyen.**



# Sejtbank jellemzése

## Tesztelési területek:

Azonosság igazolása (expressziós szerkezet)

Tisztaság igazolása (esetleges fertőzések)

Genetikai stabilitás (a terméket kódoló régióban)

**A sejtek minőségét garantáló minőségbiztosítási folyamat a tenyésztés végéig tart, u.i. a tenyésztés végén az end-of-production/post production cells (EPC/PPC) is tesztelni kell.**

**Meg kell adni továbbá a hosszú idejű eltarthatóságot is.**



# Sejtbankok tisztaságának igazolása

## Általános sterilitás

Baktérium és gomba jelenléte

## Mycoplasma:

Két módszer paralell használata: folyékony táptalajba és agarba.

## Külső vírusfertőzés

Invitro assay indikátor sejtvonallal

Invivo assay csirkeembrióval tojásban

## Retrovírus (rágcsáló sejtvonalaknál):

XC plaque assay

S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> focus assay

Transmissziós elektromikroszkópia (TEM)

Reverztranszkriptáz enzim jelenlétének mérése

Product enhanced RT (PERT), Különleges enzimek  
retrovírusokban, cDNA teszt PCR-al



# Sejtbankok előállítása





# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

**1. Rész**



# A sejtkultúrák fenntartása

- **Médium:**  
só, glükóz, esszenciális aminosavak, vitaminok, puffer, (fenolvörös indikátor, szérum, antibiotikum)
- **Környezet:**
  - **Hőmérséklet: 37°C**
  - **Magas páratartalom**
  - **5% CO<sub>2</sub>**



# Az emlős sejt tenyésztés tápoldatai

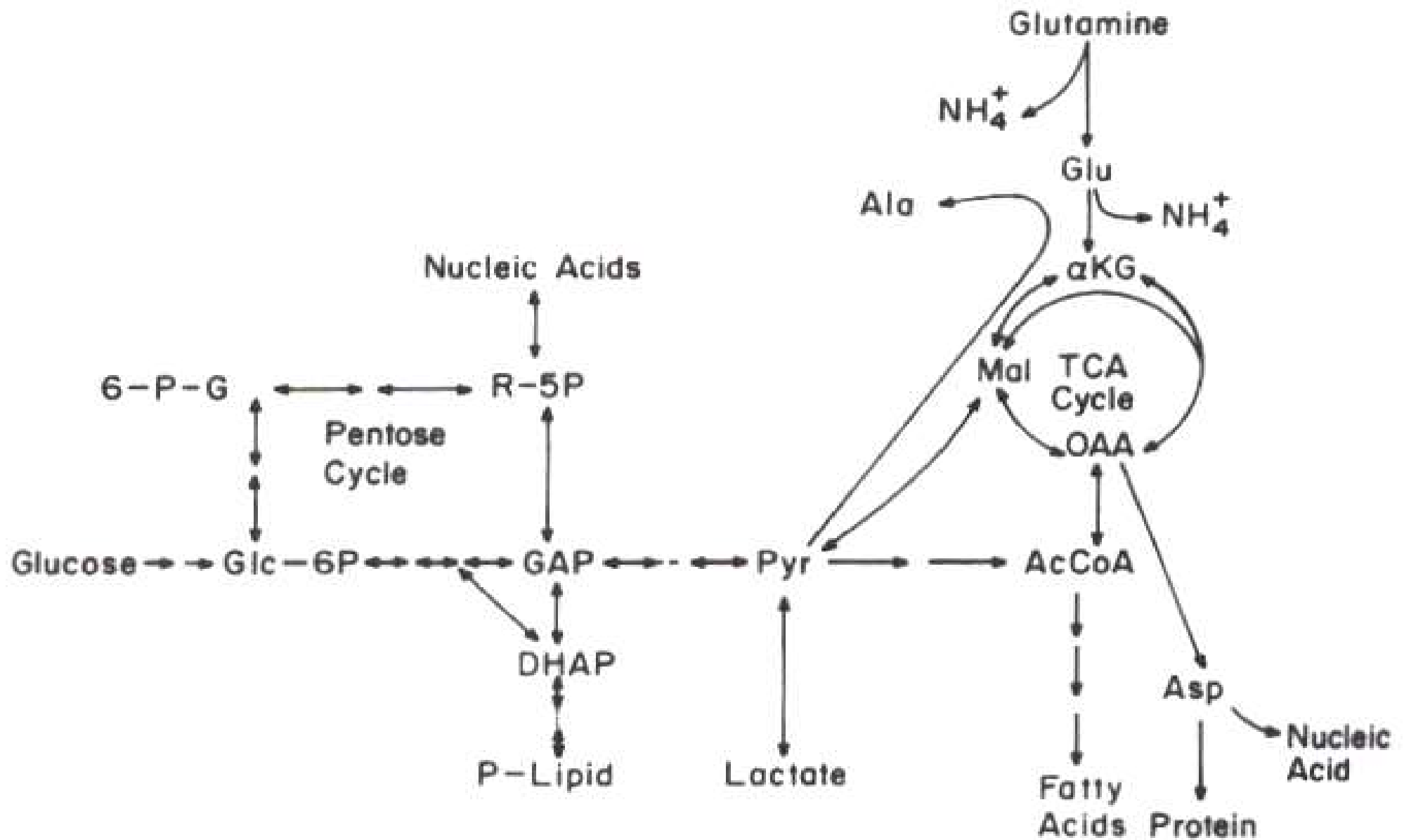
Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet: vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)

Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), glutamin! → energia és N-forrás. A glutaminból a glutaminolízis folyamata során szabadul fel az energia. Ez az energia termelés az oxigén ellátottság függvénye. A hibridóma és tumor sejtekben nagyon intenzíven folyik a glikolízis és a glutaminolízis folyamata is.

15 - 20 féle aminosav, vitaminok, koenzimek, lipidek, ásványi ionok (ozmózis nyomás)



# C – források hasznosulása



# Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium					
Component	D5546 [1×] g/L	D5648 g/L		D5546 [1×] g/L	D5648 g/L
<b>INORGANIC SALTS</b>					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H <sub>2</sub> O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	<b>VITAMINS</b>		
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	<i>myo</i> -Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
<b>AMINO ACIDS</b>					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	<i>D</i> -Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	<b>OTHER</b>		
L-Leucine	0.105	0.105	<i>D</i> -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	<b>ADD</b>		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7



# Szérummentes tápoldatok

**SZÉRUM:** a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is, e nélkül a legtöbb sejtvonal elpusztul. Újszülött állatok (borjú, csikó) vérszérumával biztosítják (5-15%). Komplex rendszer, az albumin mellett sok szabályozó, serkentő és gátló faktort tartalmaz.

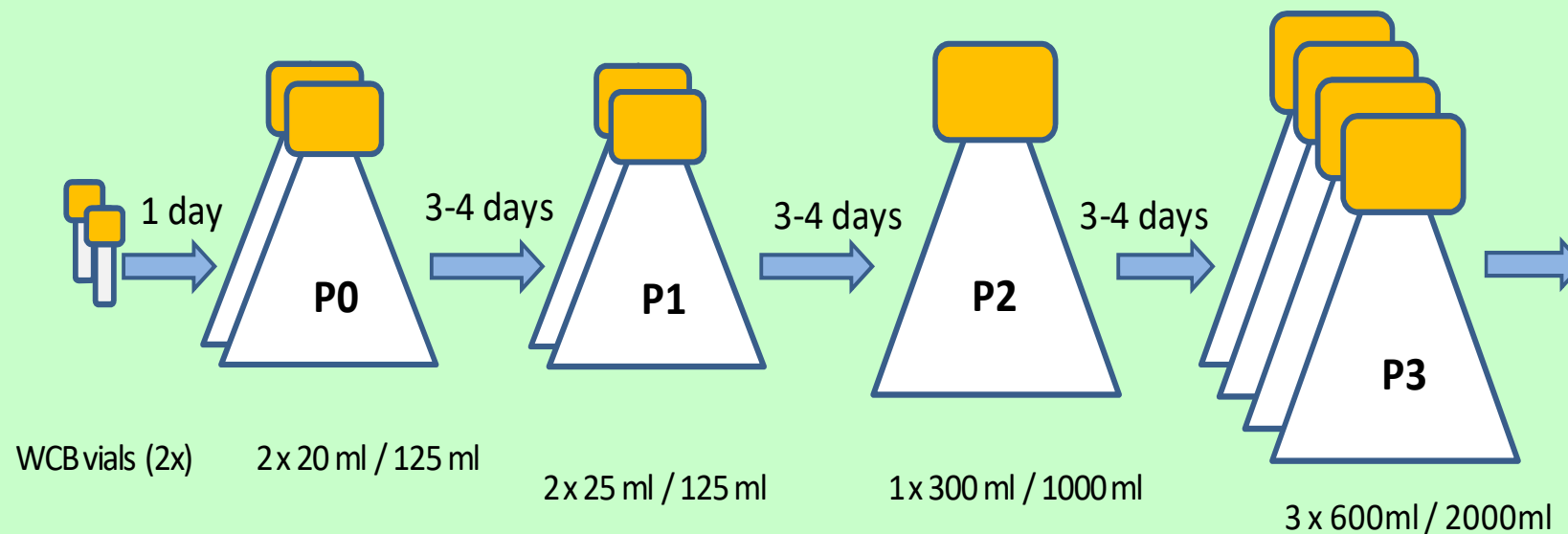
## A szérum hátrányai:

- drága
- nehezen reprodukálható, változó összetételű
- fertőzésveszély (baktériumok, vírusok, prionok)
- ellenanyagok (immunfehérjék) lehetnek benne
- a fehérjék bonyolultabbá teszik a céltermék kinyerését

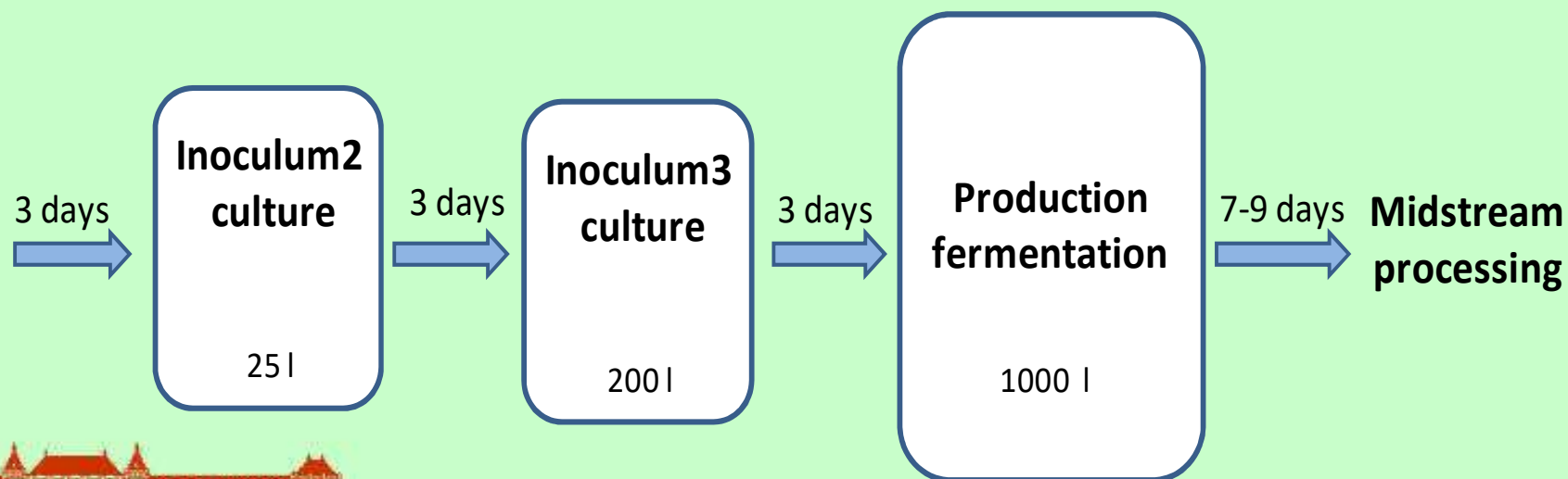
Ezért törekednek a szérummentes, kémiai komponensekből összemért tápoldatok használatára. CD – chemicaly defined. A szérum részleges vagy teljes pótlására hidrofil polimerekkel pl. dextránnal próbálkoznak. Néhány sejt típusra sikerült szintetikus médiumot kidolgozni.



# Az upstream eljárás



## Inoculum1 culture: cultivation and adaption in shake flasks



# Tenyésztési módszerek összehasonlítása

Szakaszos (Batch): rossz produktivitás,  
a sejtkoncentráció  $1-2 \times 10^6$  sejt/ml, tenyésztés 3-5 nap

Fed-batch: glükóz + aminosavak, 1-3 hét, nagyobb a produktivitás, mint szakaszosban, de toxikus metabolitok felhalmozódása hat a termelésre és a termékminőségre.

Folytonos (perfúziós): sejtkoncentráció  $3-5 \times 10^7$  sejt/ml, 6-8 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a. Jó szubsztrát ellátottság, és jó a toxikus metabolitok eltávolításának lehetősége.

A reaktor és módszer kiválasztása az alapján történik, hogy mennyi a szükséges termék mennyiség:

rEPO:  $100 \mu\text{g}/\text{dózis}$  → forgó palack, kisebb reaktor (microcarrier)

rtPA:  $100 \text{mg}/\text{dózis}$  → fermentor

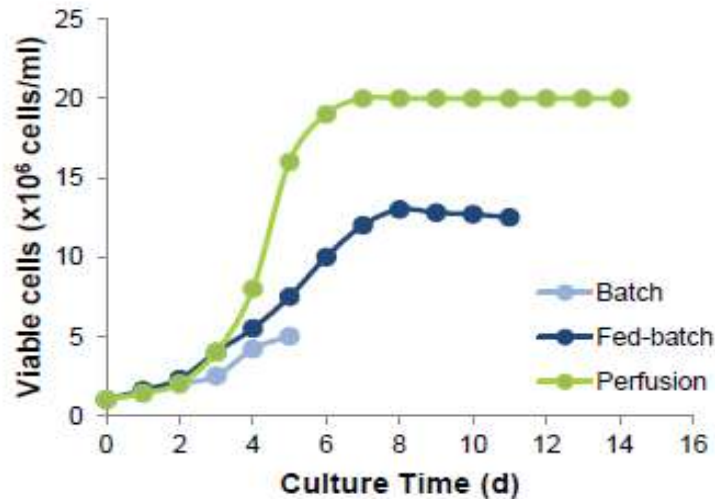
Mab:  $100 - 500 \text{mg}/\text{dózis}$  → fermentor



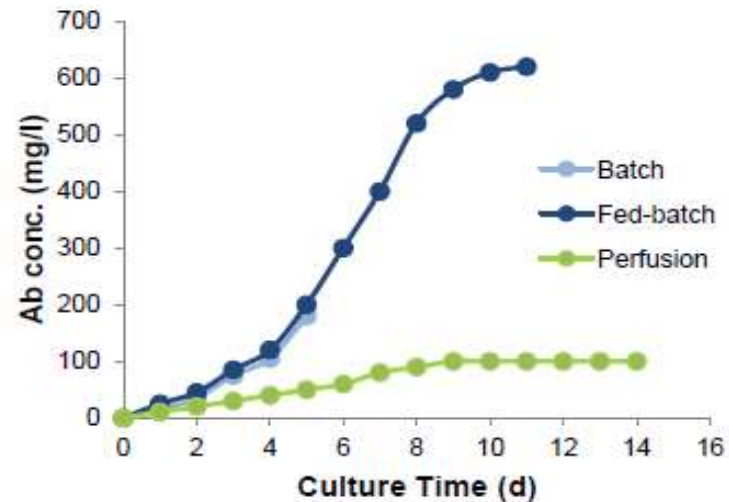


# MAb termelési technológiák

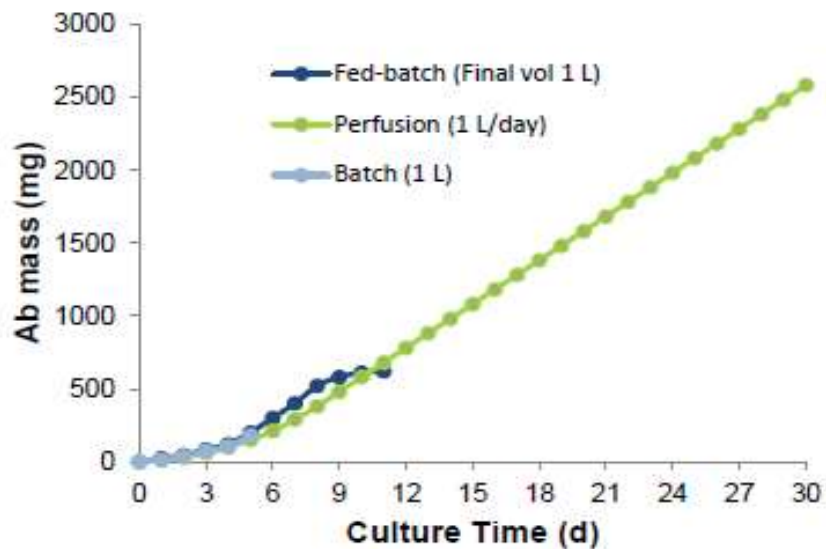
## Number of Viable Cells



## Antibody Titre



## Product Mass



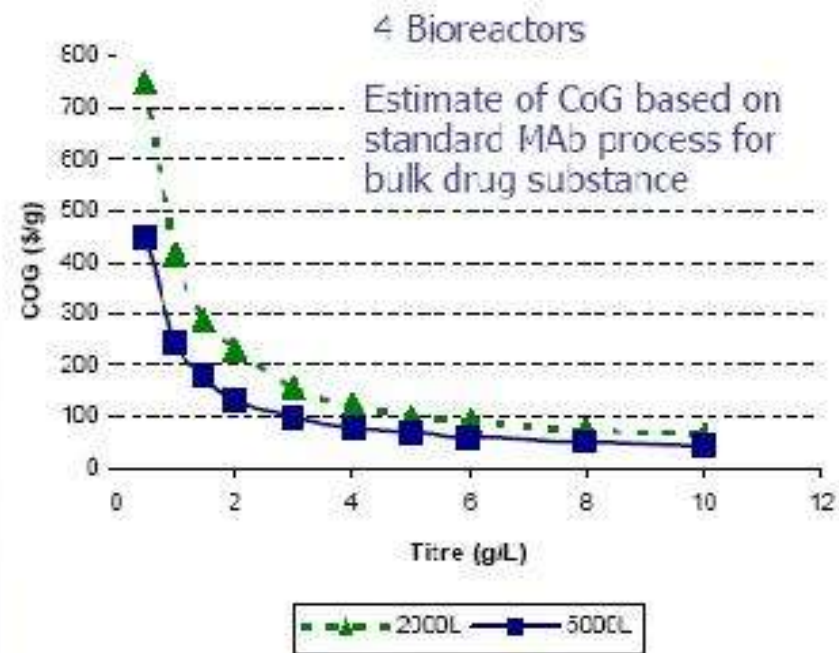
Perfusion : 2600 mg  
Fed-Batch : 620 mg  
Batch : 180 mg



# Növekvő titerek, csökkenő COG

## Improving Titres – MAbs (Bulk API)

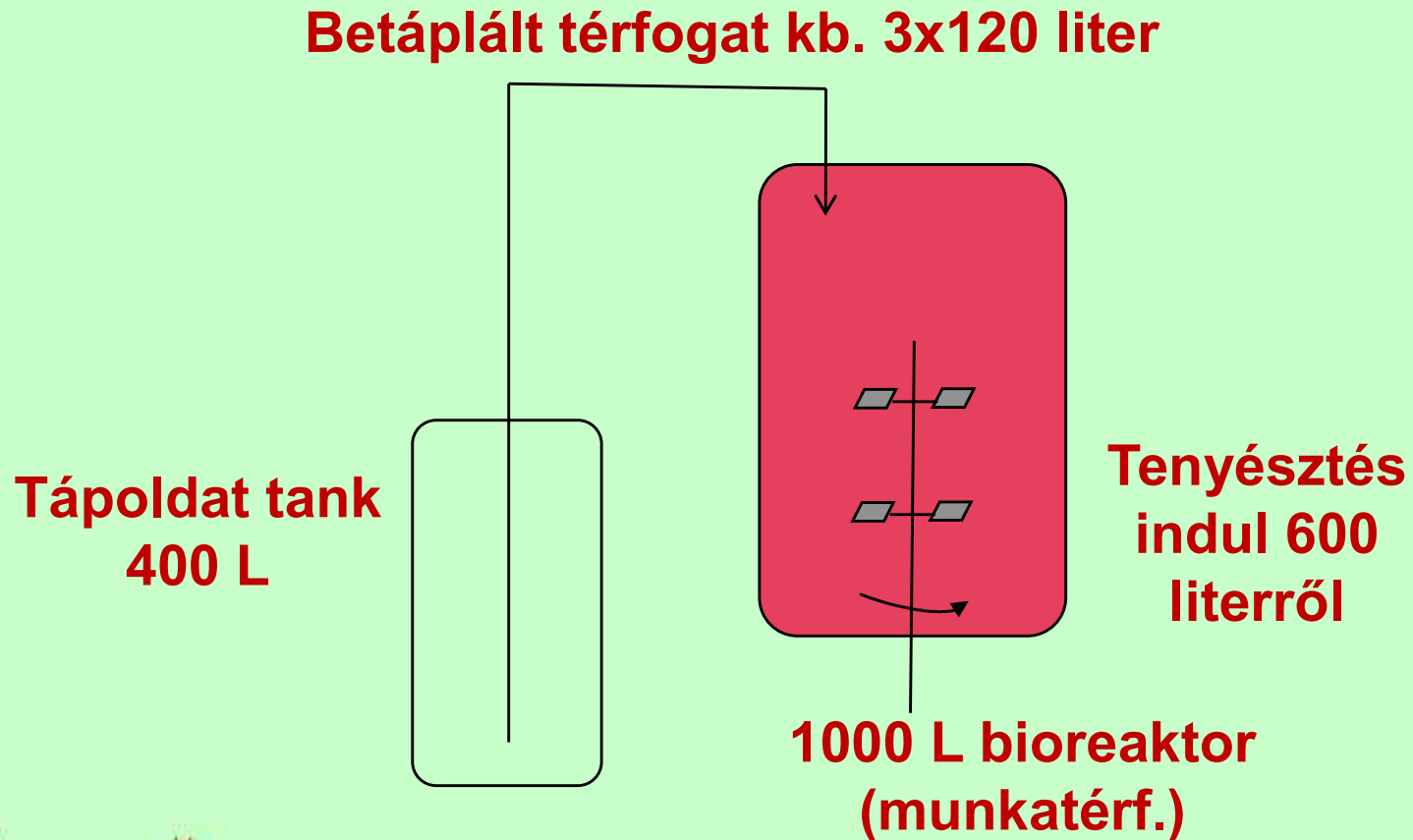
- Titre Improvements
  - Important cost benefits as titres go beyond 1g/L
  - These diminish as we go beyond 5g/L
- Beyond 5g/L
  - Downstream cost dominates
  - In this example the plateau is just under \$100/g
- Challenge in DSP
  - Bioreactors decrease in size?
  - Cope with increased titres
  - Need to drive out costs
  - Implications for facility design



Results from Biopharm Services Generic MAb cost model  
Bulk API Direct manufacturing costs

# Tenyésztési módszerek: Folyamatos tenyésztés

**Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés**  
**Rátáplálással kb. 3 naponta 3 x 110 liter,**  
**Elvétel nélkül**



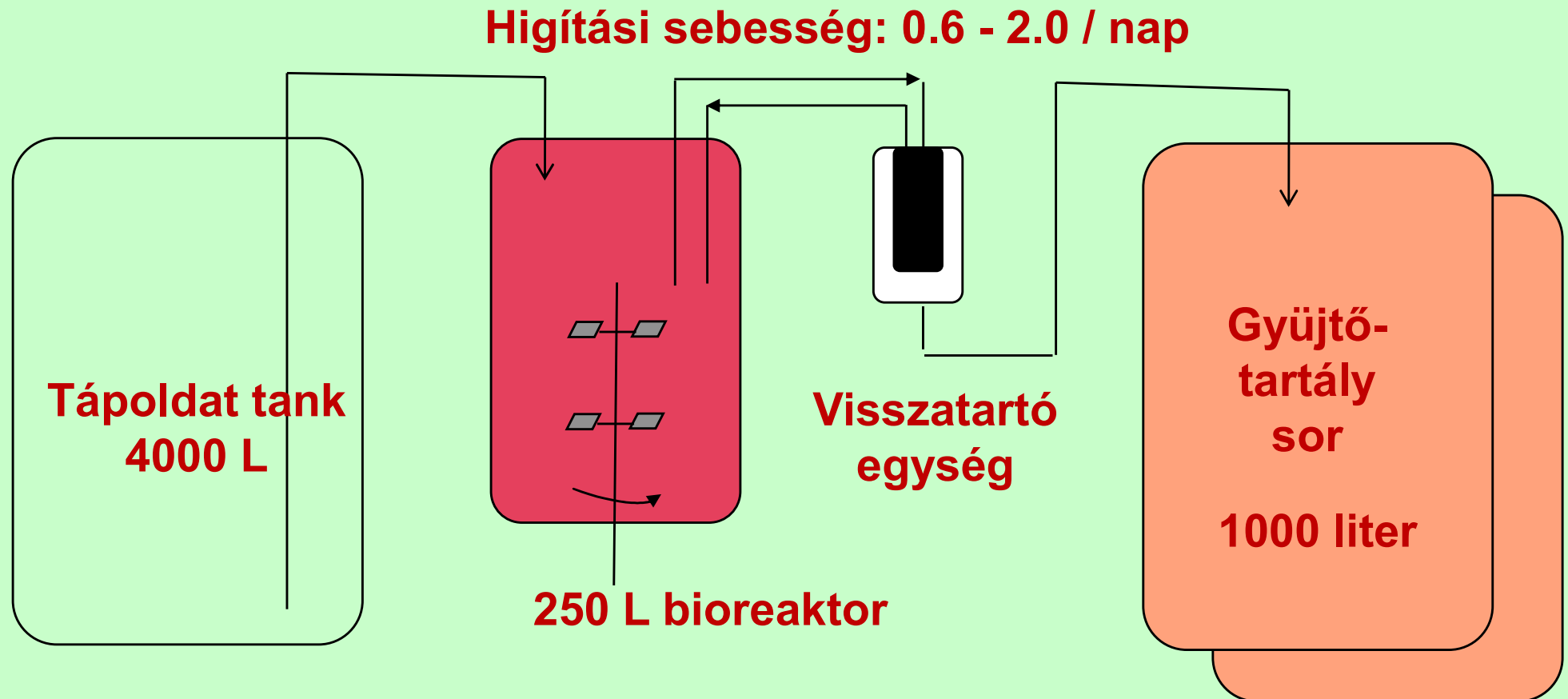
# Egy 1000 literes Fed-batch technológia tipikus adatai

<b>Working volume:</b>	<b>600-950 litres</b>
<b>Reactor type:</b>	<b>S.U.B. 1000L</b>
<b>Inoculum volume:</b>	<b>~ 60-80 l (initial volume/10) The inoculum3 culture is transferred into the production bioreactor to reach a seeding density of</b>
<b>Media volume:</b>	<b>0.4-0.6×10<sup>6</sup> cells/ml.</b>
<b>Media volume:</b>	<b>600 l basal medium</b>
<b>Feed:</b>	<b>addition on 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, and 7<sup>th</sup> day ready made feed media</b>
<b>Feed volume:</b>	<b>15% (~90 l) <math>(V_{\text{basal medium}} + V_{\text{inoculum}}) \times 0.15</math></b>
<b>Glucose addition:</b>	<b>Frequent at-line measurement, manual addition according the calculated consumption rate</b>
<b>Physical parameters:</b>	<b>Temperature set point: 37 °C, pH set point: 7.15, Stirring speed: 40-60 rpm, DO<sub>2</sub> set point: 40%, head space pressure: 0-50 mbar</b>
<b>Osmolality:</b>	<b>targeted range: &lt;400 mOsm/kg</b>
<b>pH control:</b>	<b>10-16% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution, 0.5-0.6 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution</b>
<b>Duration:</b>	<b>7-9 days</b>

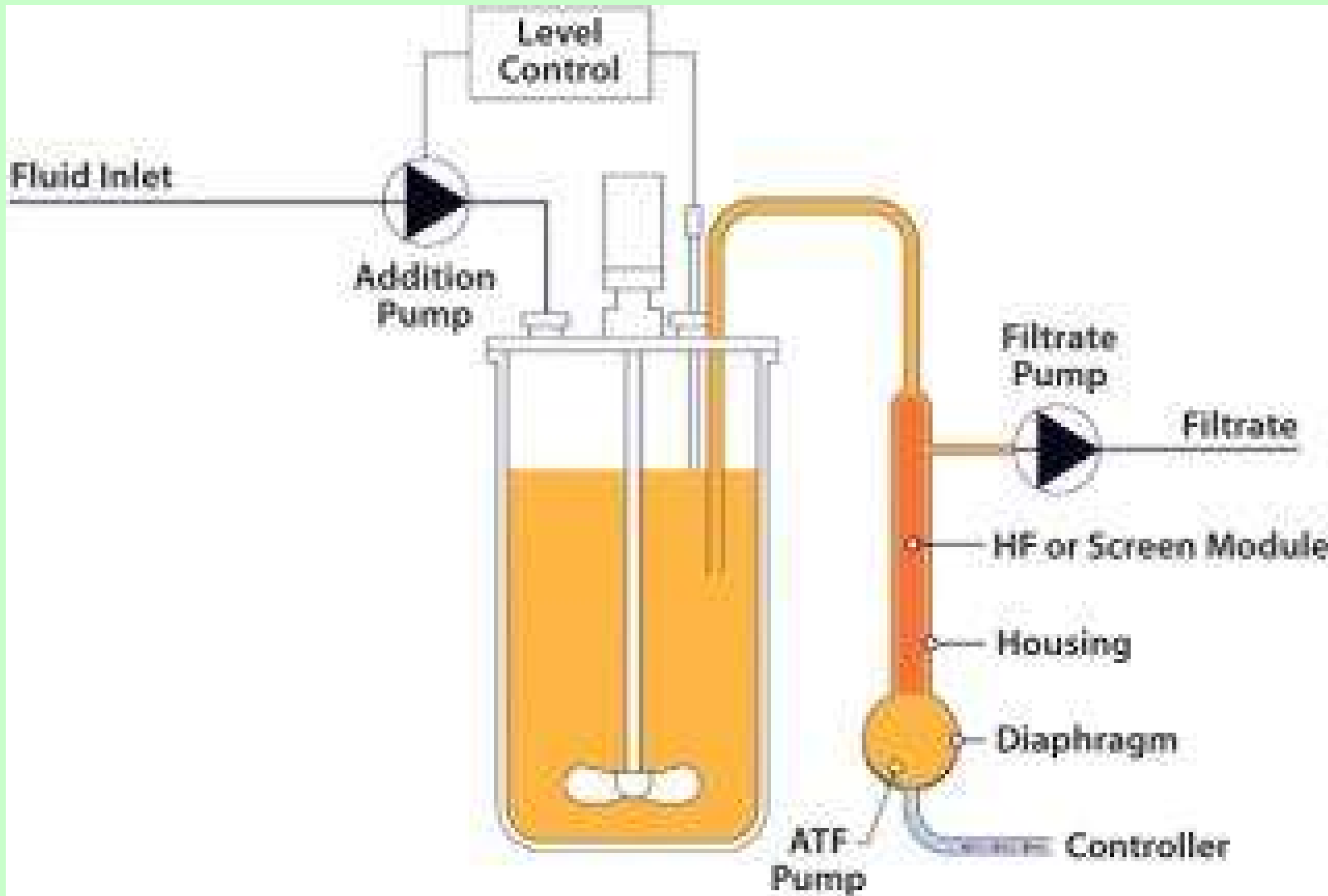


# Tenyésztési módszerek: Folyamatos tenyésztés

Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés folyamatos átfolyással, sejtviisszatartással, vagy sejt és termék viisszatartással.



# Sejtvisszatartásos és sejt + termék visszatartásos perfúziós technológiák



**ATF: Alternating tangential filtration**



# Tartalom

**A rekombináns biotechnológia területei**

**A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai**

**Gazdaszervezetek**

**Műveletek baktériumokkal**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Fehérjemolekulák előállítása**

**Refolding**

**Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia**

**Műveletek emlős sejtekkel**

**Klónozás**

**Sejtbankok**

**Tenyésztések**

**Tenyésztési módszerek**

**Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)**

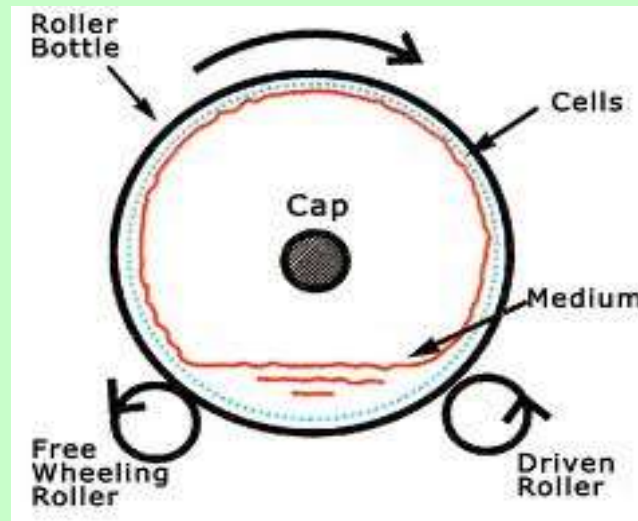
**1. Rész**



# Tenyésztőedények kitapadó emlős sejtekhez (2D)



- Petri-csészék
- Többlyukú lemezek (plate)
- T-flaskák (tissue)
- Multitray



**Roller bottle – forgó palack**





# Roller bottle – forgó palackok

Műanyag (eldobható) és üveg is,  
üveg: 1-10 l, hasznos térfogat:  
0,1-1,5 l, 1-4 rpm, inkubátor  
szekrényben vagy szobában,  
szuszpenziós és tapadós  
tenyésztésre is jó.



Tenyésztés ~7 napig, utána lefejtés  
→ proteázos kezeléssel a sejt  
szuszpenzióba vihető.

Olcsó, de munkaigényes, ha több  
száz palackot kell kezelni.



# Microcarrierek

Kis, gömbölyű részecskék

100-200 mikrométeres átmérő,

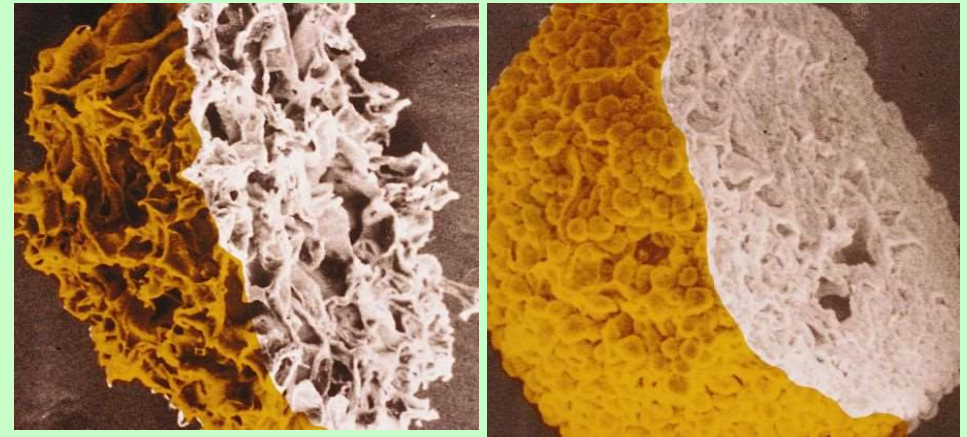
1,04 g/ml sűrűség

- elektrosztatikus vagy van der Waals erők kapcsolják a sejteket

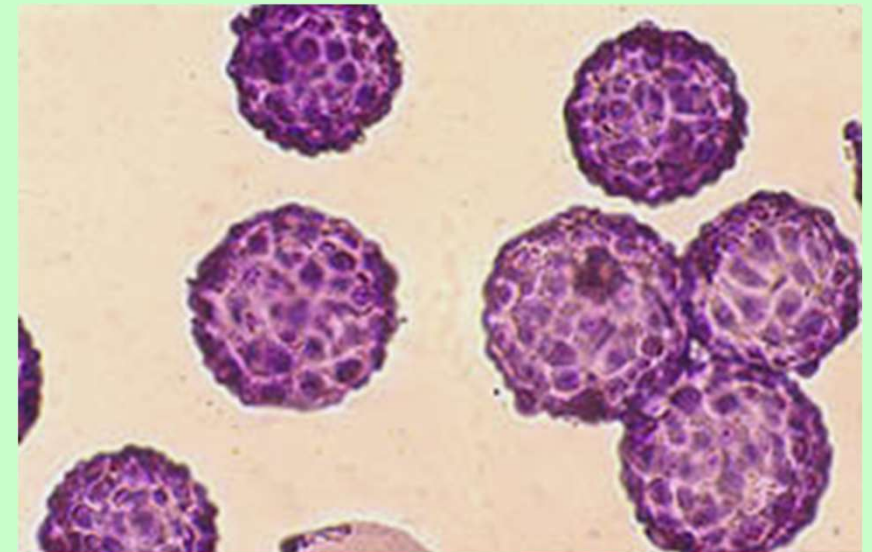
- Dextranrészecskék befedve DEAE (diethylaminoethyl)

molekulákkal

- 2-3 g/lit. carrier koncentráció => 2-3 x 10<sup>6</sup> cell/ml



**Inokulálási  
/tapadási fázis**



**kialakult monolayer**

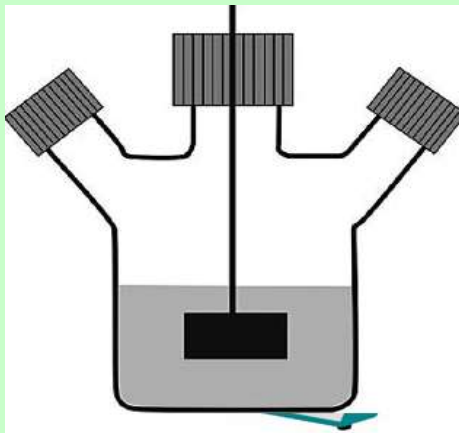


# Tenyésztőedények nem-kitapadó emlős sejtekhez (3D)



**Shake flask - Rázott lombik**

**Spinner flask**



# Minibioreaktorok mikrobiális és emlős sejtekhez



**12 ml**

**Egyedi hőmérséklet, pH, DO, pCO<sub>2</sub>, keverés szabályozással,  
automatikus mintavételezés**



**200 ml**



# Tenyésztőedények emlős sejtekhez



**2 literes emlős sejthez**



# Léptéknövelés 1000 literre



# Léptéknövelés 10 000 literre



# Egyszer használatos bioreaktorok

## Advantages:

- No CIP/SIP required
- Quick turnaround time
- Lower fixed costs
- Increased flexibility
- Reduced cleaning validation
- Faster procurement & implementation

## Disadvantages:

- Scaling issues
- Heavy reliance on suppliers for consumables
- **Most systems still require the use of traditional (non-disposable) probes**

Wave Bioreactor



Courtesy of Wave Biotech, LLC

HyClone S.U.B.



Courtesy of HyClone

Xcellerex XDR



Courtesy of Xcellerex, Inc.



Process Development  
Engineering





# Egyszer használatos bioreaktorok



## CultiBag STR 200L Bag Holder: Easy and Efficient



### Holder Design:

- Disconnectable from control tower to allow connection spare bagholder skid
- ⇒ no time loss due to bag preparation, harvesting, further process steps
- ⇒ very low operational downtime of equipment
- Opening for harvesting port at lowest point
- Double door for easy installation bag



# Egyszer használatos bioreaktorok

**Permanent  
stainless steel  
support Vessel  
(up to 1000 lit.)**



B Animation Thermo Fisher\_NEW.wmv

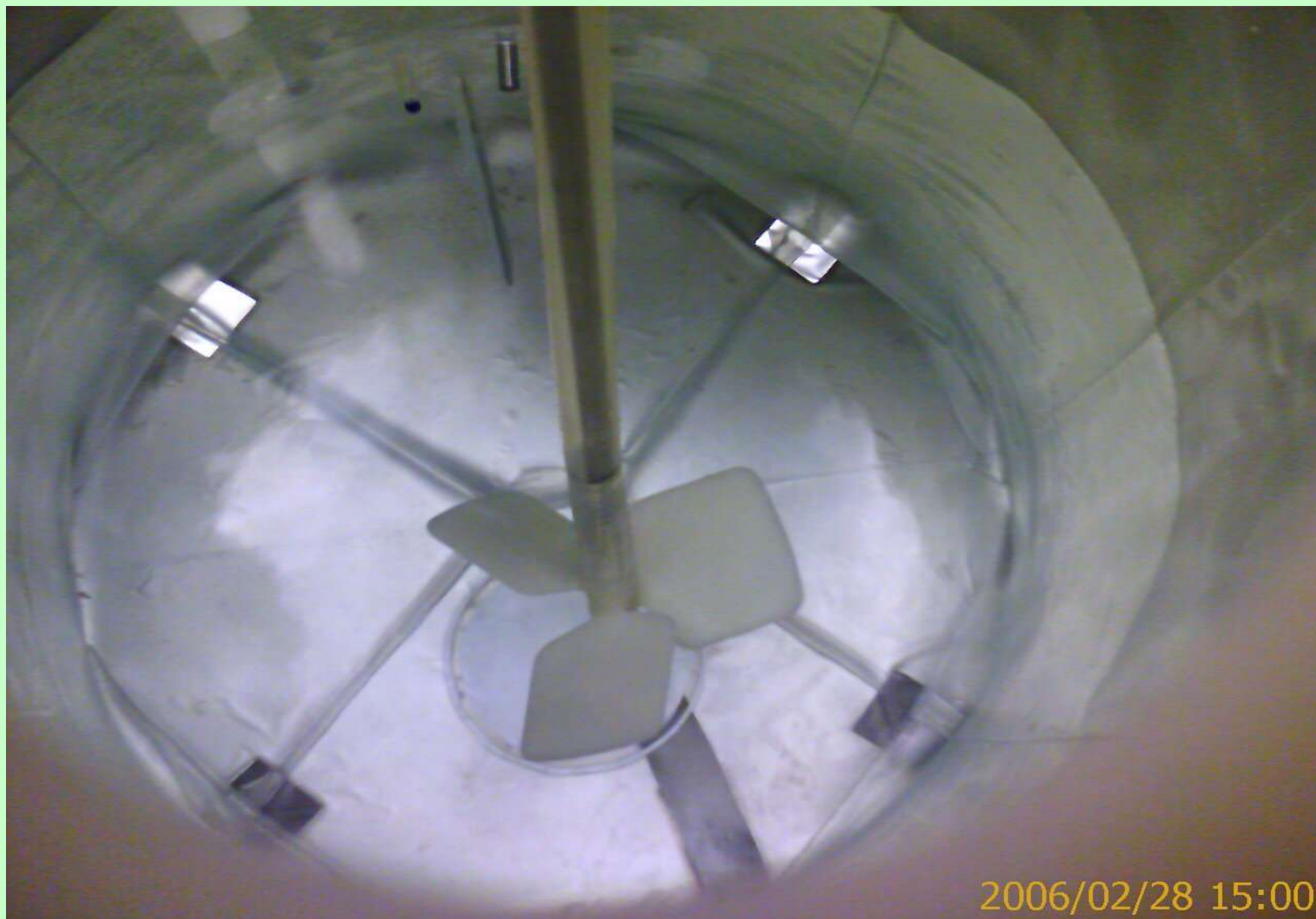


**Single-Use  
Bioreactor  
bag**

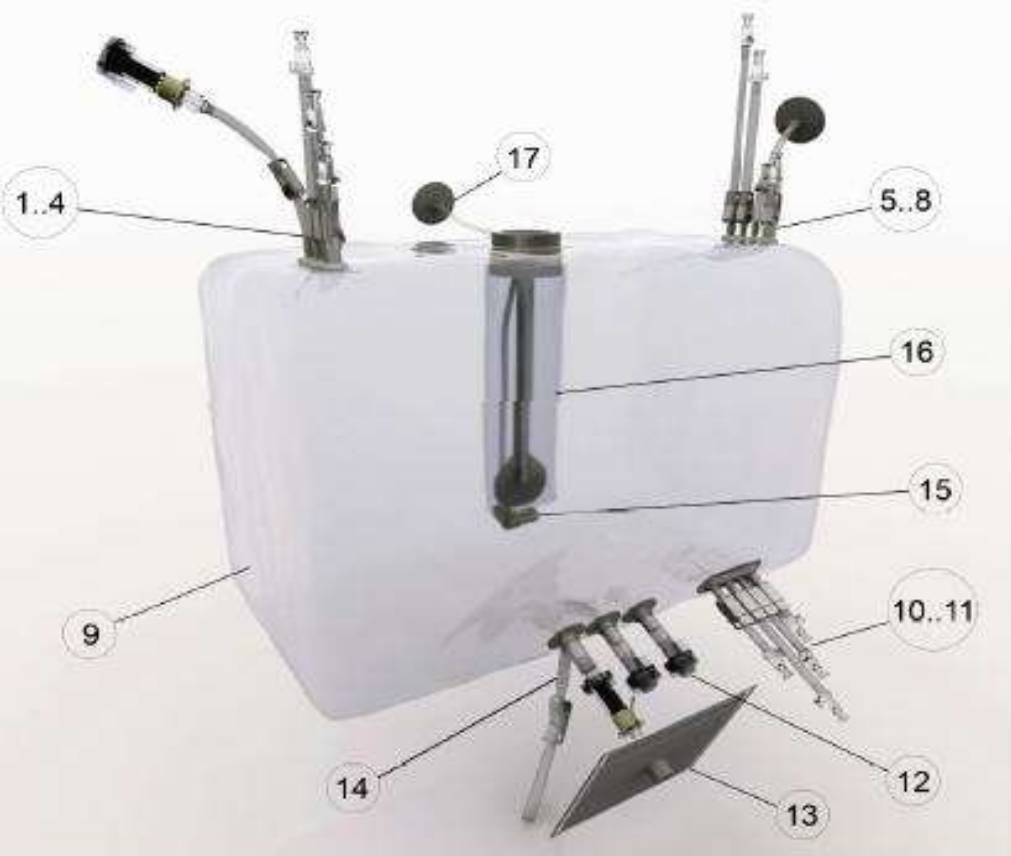


## A keverőszár behelyezése





# Egyszer használatos bioreaktorok



Line	Description
1..4	Multi port fitment - Can be used for: Supplement addition, Gas exhaust/Foam trap assembly inlet, pH regulation inlet, Cell culture Media or Cell addition, ...
5..8	Multi port fitment - Can be used for: Component addition inlet, Cell culture Media or Cell addition, Gas inlet, ...
9	Disposable bioreactor bag (ADCF barrier film)
10	Sampling exit
11	Perfusion connection/Extra sampling connection
12	Connection for pH,T or DO probe with sterile Kleenpak connector
13	Sensing probe assembly to be connected to (12) by Kleenpak counterpart
14	Easy drain connector
15	Micro or macro-sparging unit
16	Paddle mixing stick surrounded by sleeve
17	Gas inlet through sparging unit



# Eldobható down-stream eszközök



# 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 L   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 robust management of biopharmaceutical

## Flexibility

Each Palletank® includes an integrated pallet base that allows easy carriage by pallet-jack or forklift. The rectangular shape allows

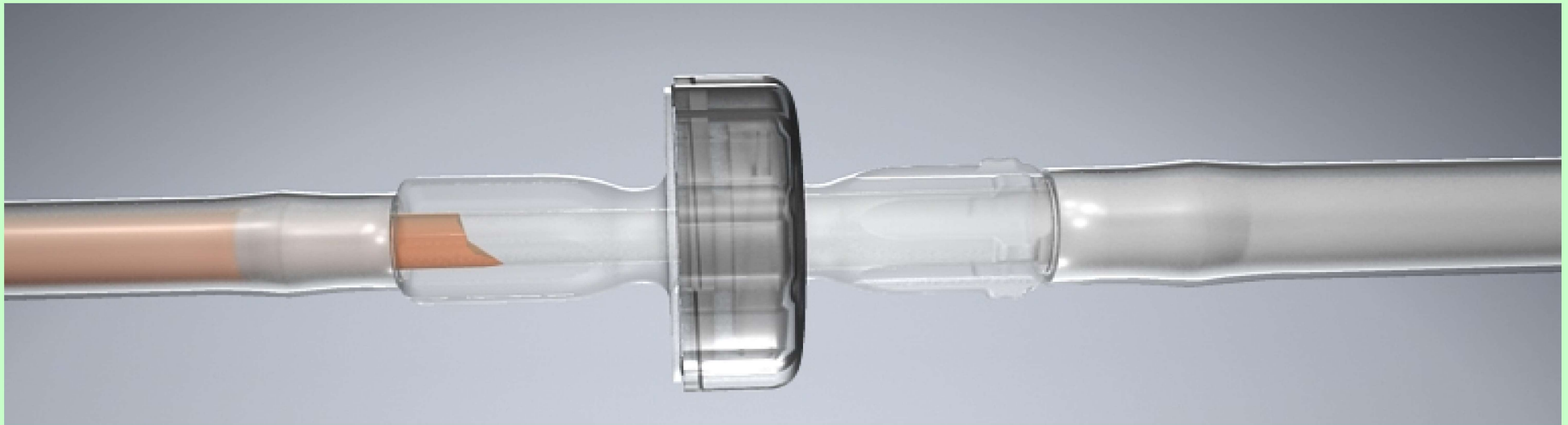






# Egyszerhasználatos steril csatlakozók

Steril konnektorok gyors és biztos kapcsolatot teremtenek két edény között, és az áttöltés az edények között megtörténhet.



[wapdoze.com]Kleenpak-Sterile-Connectors (1).mp4



**Vége az első résznek**

**Köszönöm a figyelmet!**

