

## REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA

... olyan fehérjét állítunk elő biotechnológiai úton, amelyeknek kódoló DNS-ét mesterségesen, célzott génmanipulációval vittük be a termelő organizmusba. A gyártás megtervezésénél legelső lépés, még a génmanipuláció előtt a megfelelő gazdaszervezet kiválasztása. Nem is a genetikai átalakítás módját és nehézségét kell figyelembe venni, hanem a termelődő fehérje hatékonyságát, mennyiségét és gazdaságosságát. A sokféle lehetőséget három fő csoportba sorolhatjuk be:

- Prokariótákkal (baktériumokkal)
  - Könnyen, gyorsan szaporíthatók, olcsó táptalaj, de:
  - a termék sokszor intracelluláris (zárványtest), gyakran nem alakul ki a megfelelő harmadlagos szerkezet (folding) és ezek a sejtek nem képesek a fehérjék poszttranszlációs módosítására (glikozilálás, metilezés)
- élesztőkkel
  - Könnyen, gyorsan szaporíthatók, nagy hozam, olcsó táptalaj, de:
  - Eltérő glikozilációs mintázat miatt nem mindig aktív a termék
- állati sejtenyészetben
  - Lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
  - biológiailag aktív termék.

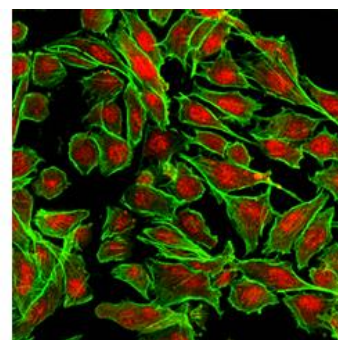
A jelenleg jóváhagyott technológiák 95%-a ezt a három gazdaszervezetet használja:



*E. coli*



*S. cerevisiae*



Chinese Hamster Ovary, CHO

A rekombináns fehérjéket funkciójuk szerint is csoportosíthatjuk:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin, szomatotropin, IGF-1)
- Enzimek (élelmiszeripari: rennin (sajtgyártás), orvosi célra: VIII faktor (véralkotás fehérje), tPA (=tissue plasminogen activator, szöveti plazminogén aktivátor – vérrög-oldás), aszparagináz – tumor terápiában)
- Antitestek (terápia – diagnosztika: Herceptin, ProstaScint)
- Vakcinák (aktív és passzív immunizálás)

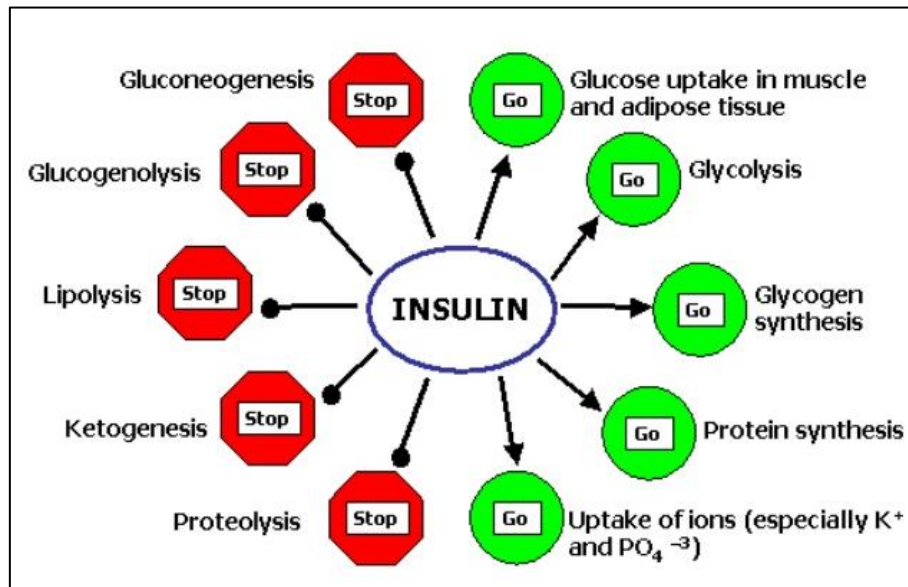
### Combined global prescription sales for the top 50 pharmaceutical companies (excluding generic-drug companies) by molecule type (2009–2014).

Sales (\$ billion)							
Molecule type	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Difference in sales between 2009 and 2014
Small molecule	411	414	415	405	394	394	–4%
Therapeutic protein	65	68	70	72	74	76	17%
Monoclonal antibody	38	43	48	53	58	62	63%
Vaccine	21	22	24	25	27	28	33%

Sources: Datamonitor, PharmaVitae Explorer, January 2010, and company-reported information.

## 2. ESETTANULMÁNY Inzulin

Az inzulin polipeptid hormon, amely a szénhidrátok, fehérjék és zsírok anyagcseréjének szabályozásában vesz részt. A szervezet sejtjei csak inzulin jelenlétében képesek felvenni a vérből a glükózt. Az inzulin serkenti a máj glikogénraktározását és a sejtek glükóz felvételét, ily módon csökkenti a vércukorszintet.



Az inzulint hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található béta-sejtek termelik.



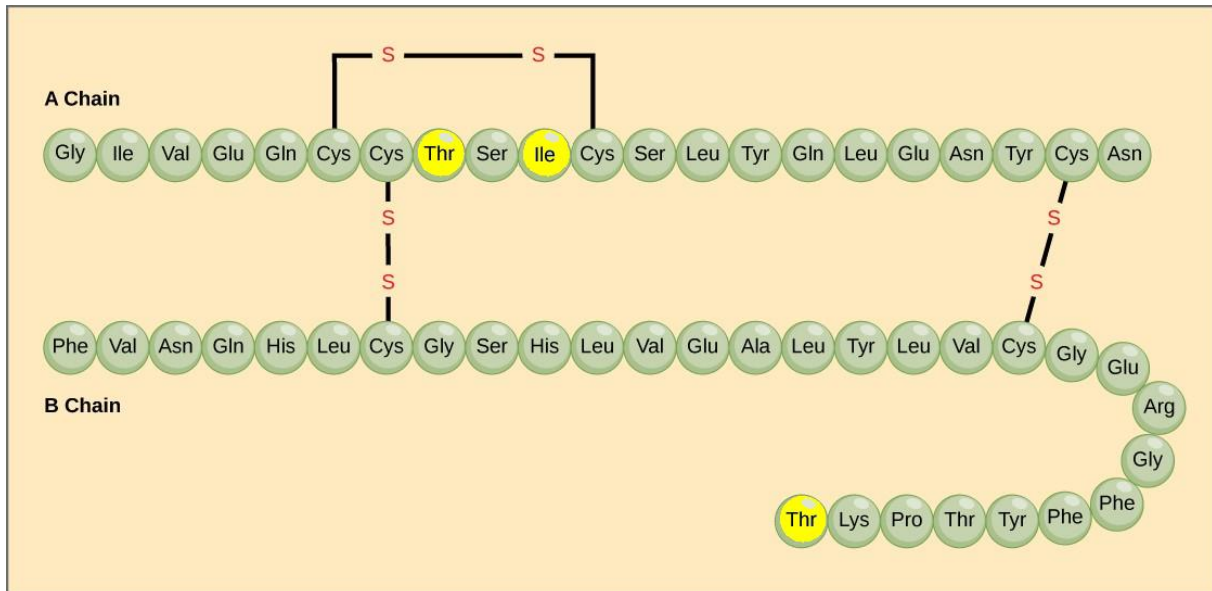
Az inzulint gyógyszerként adják a cukorbetegség(ek) kezelésére. A diabetes lényege, hogy a sejtek nem tudják megfelelően felvenni a vérből az glükózt, emiatt a vércukorszint megemelkedik. (I-típusú vagy fiatalkori diabetes: a hasnyálmirigy nem termel elegendő inzulint, mert pl. autoimmun folyamatok elpusztítják az béta sejteket. II-típusú vagy időskori cukorbetegség: van inzulin termelés, de a sejtek inzulin érzékenysége lecsökken, emiatt nem hat eléggé.)

A kívülről bevitt inzulin pótolja a hiányzó vagy elégtelen inzulintermelést. Az inzulint nem lehet szájon át bevinni a szervezetbe, mert egyrészt az emésztőenzimek lebontják, mint a többi fehérjét,

másrészt a fehérjemolekulák méretüknél fogva gyakorlatilag nem szívódnak fel. Emiatt injekcióban adják, illetve fejlesztések folynak az nyálkahártyákon keresztüli bevitelre.

### 2.1 Az inzulin szerkezete

Két aminosavláncból áll (21 + 30 aminosav), amelyeket két diszulfid híd köt össze és egy stabilizál. Móltömege: 5734. Izoelektromos pontja: 5,4.



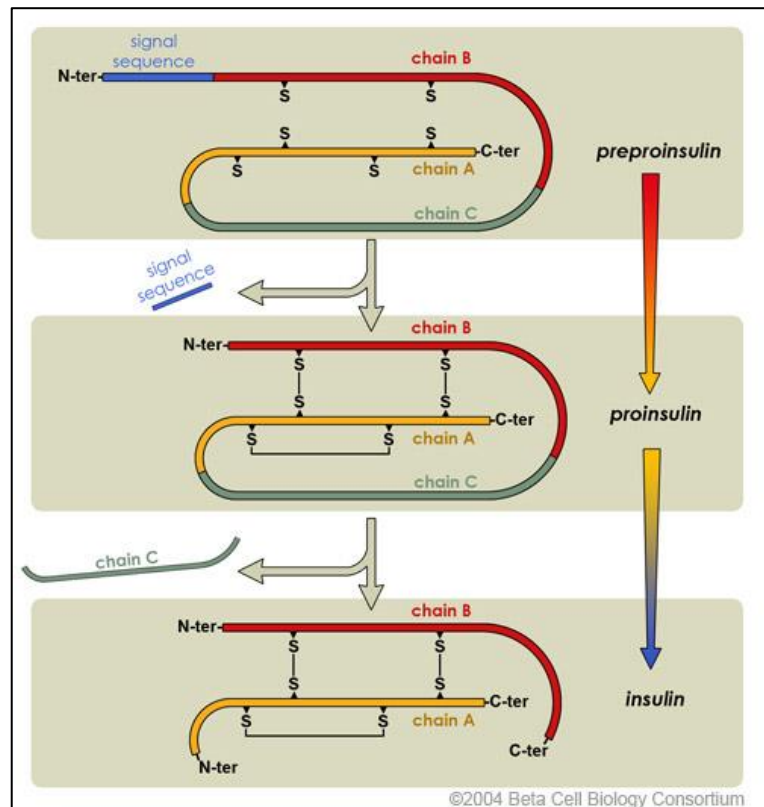
A humán, marha és sertés inzulin között csak néhány aminosav a különbség:

	Aminosav		
	8.	10.	30.
Marha	Ala	Val	Ala
Sertés	Thr	ILeu	Ala
Ember	Thr	ILeu	Thr
	A lánc		B lánc

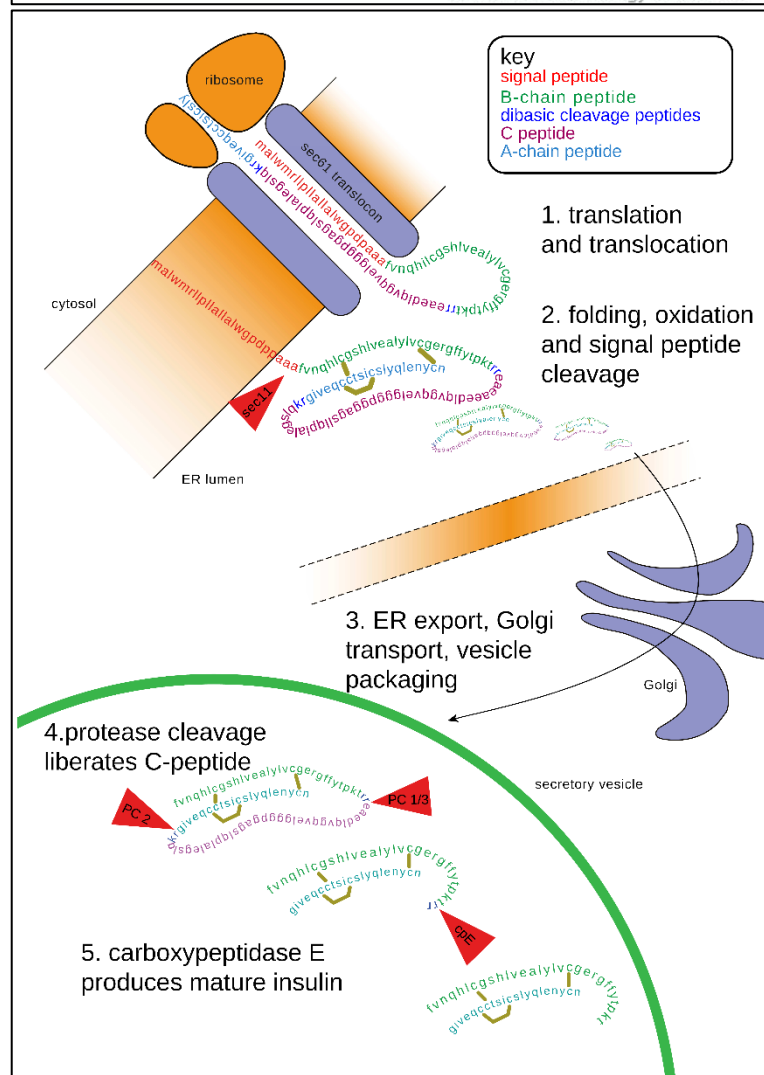


### 2.2 Az inzulin érése

Az inzulin egy gén terméke, ez azonban két intront tartalmaz. Az intronok kivágása után egy fehérjéláncként keletkezik a pre-proinzulin (110 AS), ebből két szakasz (pre: 23 AS, C: 34 AS) eltávolításával alakul ki az aktív szerkezet.



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 enzimekkel), valamint a két Arg levágása (karboxipeptidáz E enzim = CPE).



### 2.3 Az inzulin előállítása

1. Kémiai szintézis aminosavakból (megoldott, de nem gazdaságos)
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná (a rekombináns inzulin megjelenése előtt ez volt az egyedüli humán inzulin készítmény)
3. 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

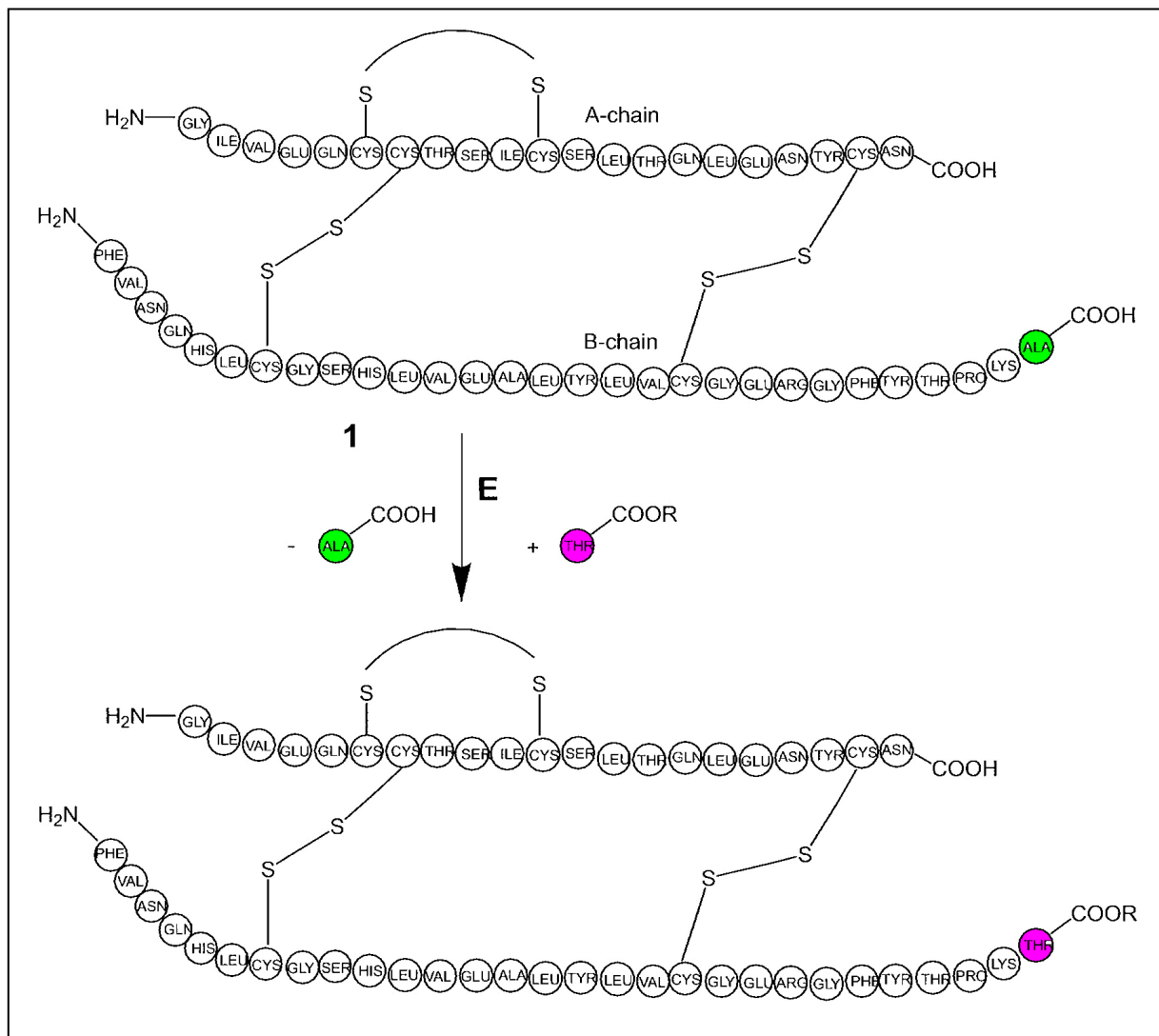
#### 2.3.1 Kivonás hasnyálmirigyből – átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből extrahálják az sertés inzulint.

De:

- nincs elég belőle
- az egy aminosav különbség hosszú távon immun-problémákat okozhat

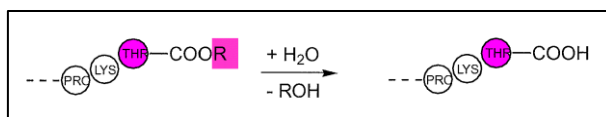
Ezért inkább átalakítják, a láncvégi alanint treoninra cserélik. Ehhez nem exopeptidázt használnak, ahogy az logikus lenne, hanem egy szelektív endopeptidázt, a tripszint. Ez az emésztő enzim szintén a sertés hasnyálmirigyből nyerhető ki, de nem a Langerhans sejtekből, hanem a hasnyálat, az emésztő



enzimeket termelő szövetből. A tripszin a bázikus aminosavakra (Arg, Lys) szelektív, ezek karboxi oldalán lévő peptidkötést bontja. Az inzulin molekulában két ilyen aminosav van, a B22Arg és a B30Lys. Ez utóbbi mellett hasítva az enzim lecsípi a láncvégi alanint. Mellékreakcióként az Arg melletti hasítás is felléphet, a B23-30 oktapeptid szabadul fel. Ennek visszaszorítására speciális reakciókörülményeket kell beállítani, alacsony hőfok (6-12 fok), apoláris oldószerkelet (etanol, DMSO, DMF + <50% acetát puffer).

A bontási reakcióval párhuzamosan az ellentétes folyamat is végbemegy. A tripszin nagy szabad aminosav koncentráció mellett peptidkötés létrehozására is képes. A hidrolízis és az acilezés dinamikus egyensúlyban vannak. Ha nagy fölöslegben szabad aminosavat, treonint adunk a rendszerbe, akkor a folyamat a szintézis irányába tolódik el. Mivel a rendelkezésre álló szabad aminosavak között a treonin nagyságrenddel nagyobb koncentrációban van jelen, mint az alanin, ez nagyobb valószínűséggel kapcsolódik a lánc végére. Az egyensúlyi elegyben a B30Thr akár 92%-ban is megjelenhet az összes inzulinszármazékhoz viszonyítva.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében nem treonint, hanem Thr-észtert (pl.: terc-butilésztert) adnak a reakcióelegybe. A termék elválasztása után a treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:



### 2.3.2 Az inzulin fermentációs előállítás

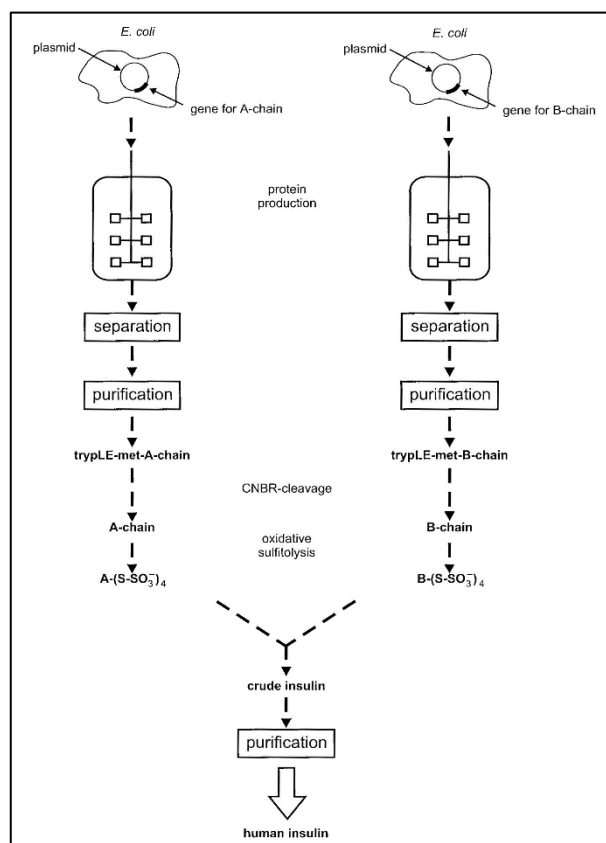
Prokariótákkal is megoldható, mert:

- Viszonylag rövid láncok, nincs glikozilezés, metilezés, de:
- Két lánc, három diszulfid híd – nehezebb jól összepárosítani

Megoldották a két lánc külön-külön bevitelét és fermentációját, majd összekapcsolását is – és az egészet egyben is.

Adalék: Kettős fermentáció *E. coli*-val

Ennek a technikának már csak történelmi érdekessége van. Az egyik első rekombináns technológiában az inzulin A és B láncát két külön pBR322 plazmid vektorba építették be. Az inzulint kódoló szakasz elé egy *Trp*-operonból származó szakaszt (121 aminosav) illesztettek, amelyeket egy metioninnal választottak el. Ennek az a szerepe, hogy brómián hatására (70%-os HCOOH-ban) a Met elbomlik, és a fehérjelánc ezen a helyen elszakad. A kiválasztott *E. coli* törzset (nem-patogén *coli* törzs, csak laboratóriumban életképes, a természetben elpusztul) külön fertőzték meg a két plazmiddal, két külön manipulált törzset hoztak létre. A két törzssel külön fermentációval állították elő a két inzulin láncot. A leader szekvenciák lehasítása után a két láncot izolálták. Az –SH csoportokat oxidatív szulfitolízissel ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ ,  $\text{pH} > 9$ ) –S–SO<sub>3</sub> csoporttá alakították, azaz felbontották az esetleg létrejött (hibás kötésű) diszulfid hidakat. A két szabad lánc elegyítése után a diszulfid hidakat redukzív közegben (–SH vegyületekkel: merkaptó-etanol, ditio-treitol) hozták létre.



<http://www.dnalc.org/view/15928-How-insulin-is-made-using-bacteria.html>

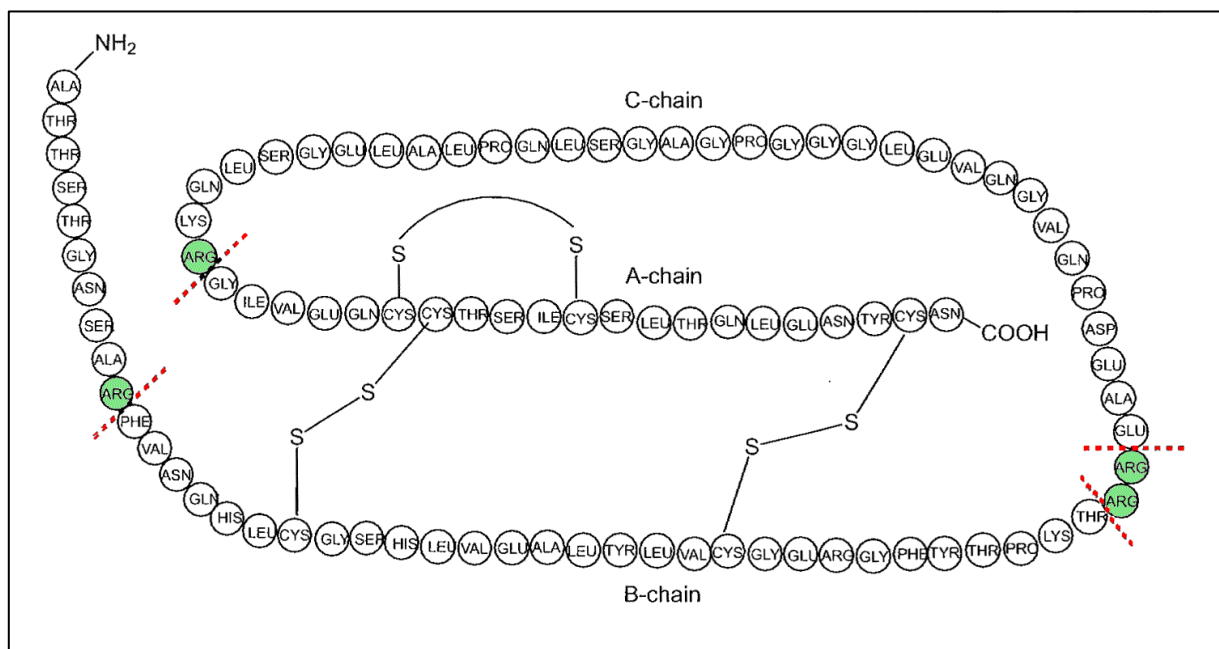
Előállítás egy fehérjeláncként (pre-pro-inzulin) *E. coli*-val

Ezzel voltaképpen a természetes inzulin képződését és érését másoljuk le a technológiában.

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes kódoló génszakasz (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba. Bonyolultabb feladat viszont a DNS szakasz kialakítása. Mivel az inzulin gén két intront is tartalmaz, nem használhatjuk direktben az izolált DNS-t hiszen ebből sokkal hosszabb, használhatatlan fehérje képződne. Célszerűen mRNS-t, méghozzá érett, a kivágáson átesett mRNS-t kell keresni, és erről megszerkeszteni a kívánt génszakaszt. Ehhez az RNS-ről reverz transzkriptázzal DNS-t kell másolni, a hibrid nukleinsavakat szétválasztani, kétszálú DNS-t szintetizálni, majd ragadós végekkel ellátni, ez kerülhet azután a vektorba. A bevitt plazmid a „szokásos” elemeket tartalmazza, szelekciós markerei ampicillin és tetraciklin rezisztencia, promotere triptofánnal szabályozható erős Trp promóter. A *coli* az egész (pre)-proinzulin láncot elkészíti, de a szerkezet kialakítását további lépésekben kell megvalósítani. A technológia műveleti sorrendje:

1. Szakaszos fermentáció (15 m<sup>3</sup>)
2. Sejtfeltárás (lízis), centrifugálás, szűrés
3. Folding: a terciér szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
4. Hasítás három helyen Arg mellett
5. A B lánc végéről két Arg „lecsípése”
6. Tisztítás

Az elsődleges szerkezetet, az aminosav sorrendet felépíti a *coli* sejt, de a következő lépéseket, amelyeket a természetes hormon szintézisben a hasnyálmirigy sejtek enzimeit hajtanak végre, további technológiai lépésekben kell megvalósítani. A diszulfid hidak és a harmadlagos szerkezet kialakítása az izolálás után, a folding pufferben megy végbe. Ezután kerül sor a „felesleges” molekularészek eltávolítására.



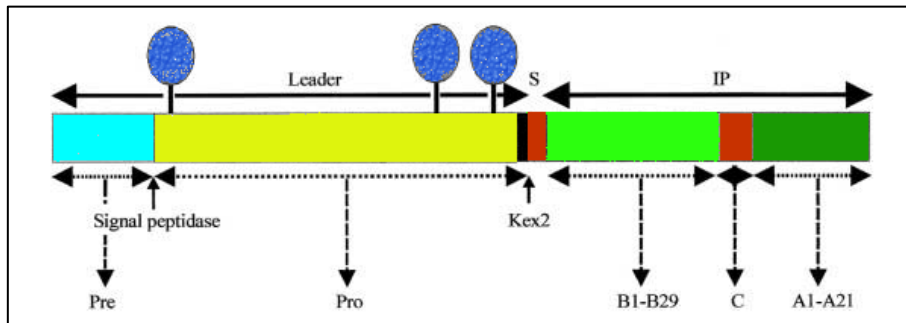
A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

Célszerűen a természetes reakcióutat kellene követni, azt, ahogyan a hasnyálmirigy sejtekben alakul ki az aktív inzulin. Mivel ezek a humán enzimek nem állnak rendelkezésünkre, helyettük más eredetű, de hasonló aktivitású enzimeket kell keresni. A lánc szétvágása három helyen a bázikus jellegű

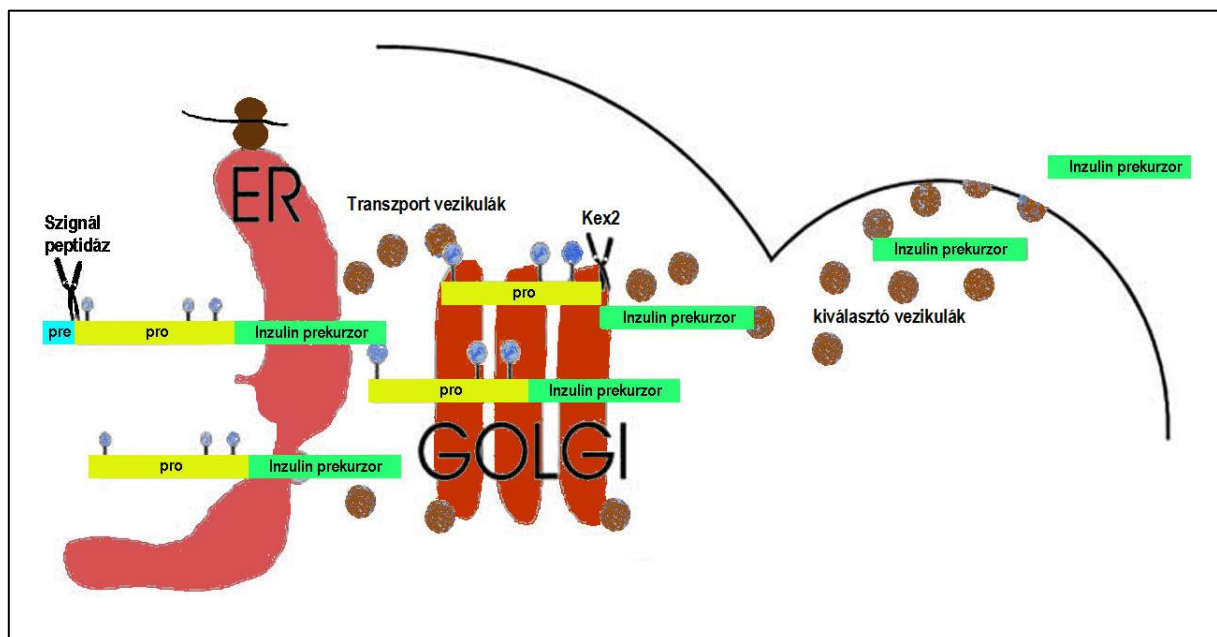
arginin mellett szükséges, erre a már említett tripszin alkalmazható. A hasítási termék már csak két argininben tér el a végterméktől (B30ArgArg inzulin). Ezek eltávolítását a sertés hasnyálmirigyéből kivonható karboxipeptidáz-B-vel valósítják meg, amely a CP-E-hez hasonlóan a C-terminális bázikus aminosavak eltávolítására specializálódott. Az enzimés átalakítás után a tisztítás első lépése a gél-kromatográfia, amellyel a levágott fehérjeláncokat lehet elválasztani a célterméktől.

Előállítás élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*)

A prokarióta *coli* mellett eukariótákkal, élesztőkkel is termeltetik a rekombináns inzultint. Előnyös például, hogy a termelés extracelluláris, nincs szükség sejtfeltárára. A fermentációt félfolytonosan is lehet vezetni, ami gazdaságosabb. Emellett az élesztő enzimei még a sejtben elvégeznek néhány átalakítást, így a technológia kevesebb lépésből áll.



Az élesztőben termeltetett rekombináns fehérje az előzőektől eltérő konstrukció. Ahhoz, hogy a fehérje végig tudjon haladni az endoplazmás retikulum – Golgi – extracelluláris tér útvonalon, egy leader szakaszt kell elé kapcsolni. Ez a leggyakrabban az élesztőben működő  $\alpha$ -faktor leader, néha Yap3, de kifejlesztettek szintetikus leader szekvenciákat is. Ez egy szignál peptiddel kezdődik, ez vezeti be a riboszómán képződő fehérje láncot a transzlokonon keresztül az endoplazmás retikulum belső terébe. Ezt a szakaszt még ott helyben levágja a szignál peptidáz. A „Pro-” szakasz 43–47 aminosav hosszúságú, az  $\alpha$ -faktor leader estében három szénhidrát „legyező” kapcsolódik hozzá. A leader és az inzulin A lánc közé néhány aminosavból álló összekötő S-peptidet (=spacer) illesztnek. Ez minden esetben két bázikus aminosavval (Lys/Arg) kezdődik, mert az élesztőben található Kex2 proteáz ennél a pontnál hasít. Így ez az enzim még a sejtben eltávolítja a „Pro-” láncot. A további aminosavakra sztérikus okokból van szükség, ezek nélkül a Kex2 enzim „nem fér hozzá” a vágási helyhez. Így viszont felesleges aminosavak maradnak a B lánc N-terminálisán. Ettől úgy lehet megszabadulni, hogy az utolsó helyre lizint építenek be és a későbbi tripszines kezelés leválasztja a feleslegessé vált szakaszt.





A termelt fehérjét inzulin prekuzornak (IP) nevezik, mert nem azonos a humán proinzulinnal. A C láncot jelentősen megrövidítették (3-6 aminosav), sőt el is hagyták. A B30 treonint is kihagyták, ezt csak folyamat végén, enzimesen kapcsolják rá.

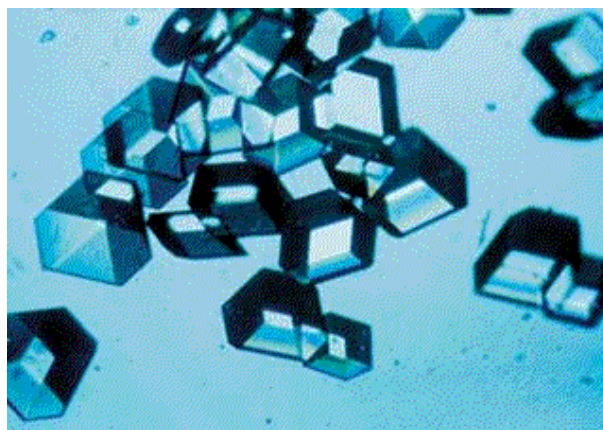
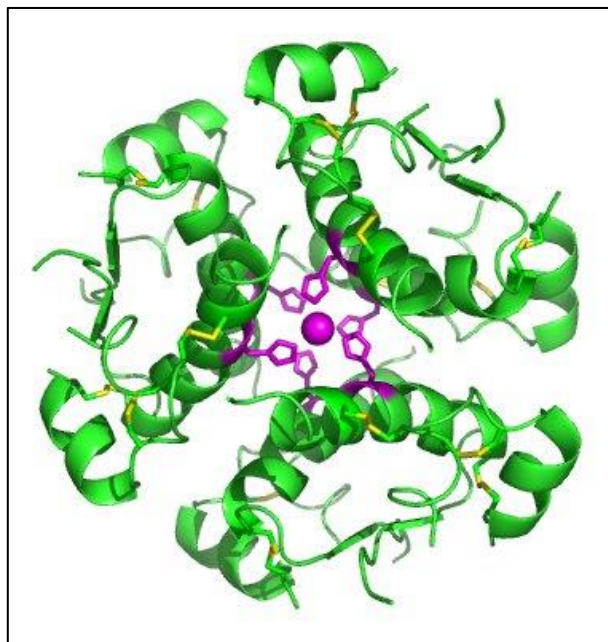
### 2.3.3 Az inzulin feldolgozása

Első lépésként a különböző méretű molekulák, hasítási termékek és egyéb, kis peptidok elválasztására gélkromatográfiát alkalmaznak. Ezt követheti egy ioncsere kromatográfiás lépés, és az így megtisztított oldatból választják le az inzulint. A különböző inzulin formák eltérő sebességgel szívódnak fel az emberi szervezetben. Így ezek megválasztásával, illetve kombinálásával beállíthatjuk az inzulin készítmény hatástartamát. A tiszta inzulin önmagában hajlamos amorf csapadékként kiválni. Szépen kristályosítható viszont cink komplex formájában. A komplexképzés a B-10 His aminosav gyűrűjében lévő nitrogénatomon keresztül történik. Ez többértékű fémionokkal komplex kötést képes kialakítani. (Ugyanezt használja ki a fém-kelát kromatográfia, amelynél az állófázishoz rögzített fémionok – Ni, Cu, stb. – létesítenek kötést a fehérjék hisztidinjeivel vagy a hozzákapcsolt His-tag-gel.) Az inzulin esetében is további 15 féle fémionnal alkotott komplexet írtak le, de a gyógyszeres szempontok alapján a cink ionnal alkotott hexamer az optimális.

A kristályosításnál a híg savas oldatban (ecetsav, esetleg sósav) lévő 7%-os inzulin oldat pH-ját ammónium-acetát hozzáadásával 5,4-6,1 közé állítják. A sztöchiometrikus Zn ion mennyiség csak 2 ezreléke lenne az inzulin tömegének, de ezt negyvenszeresen túladagolják. Ez 1.1% cink-klorid hozzáadását jelenti. Az oldhatóság csökkentésére még 10% acetont is kevernek az elegyhez, és a hőmérsékletet 25 °C-ról +5 °C-ra csökkentik. A kristályosodás elsőrendű kinetika szerint megy végbe, az anyag nagy része az első négy órában kiválik, de az egyensúlyi állapotot csak ~24 óra után éri el.

Ilyen körülmények között a komplex romboéderes formában kristályosodik.

A gyorsabban felszívódó amorf és a lassabban felszívódó kristályos inzulin mellett használatos még a protamin-inzulin is (NPH = neutral protamin Hagedorn). A protamin, mint bázikus fehérje a savas karakterű inzulinnal együttesen kicsapva egy rosszul oldódó formulát ad, ami lassan szívódik fel, így elnyújtott hatást alakít ki.



### 2.4 Inzulin analitika

Egy rekombináns fehérje minősítésénél mindig az az alapkérdés, hogy tulajdonságaiban mennyire egyezik meg az eredeti fehérjével. Ez legtökéletesebben a biológiai hatás összehasonlításán keresztül lenne lemérhető.

Ami az inzulinnál azt jelentené, hogy mérni kellene a beadás hatására bekövetkező vércukorszint csökkenést az emberi szervezetben. Alanyként embereket nem, de nyulakat használhatunk, de ez természetesen drága, lassú, kis kapacitású és állatvédelmi szempontból is kifogásolható.

A fehérjék harmadlagos szerkezetére is kiterjedő azonosítására alkalmasak az immunanalitikai módszerek, reakciók specifikus ellenanyagokkal. Ezek viszont sokszor nem adnak pontos kvantitatív eredményt.

A minősítés első lépése rendszerint egy HPLC vizsgálat, ami gyors, kvantitatív és az esetleges szennyezésekre is információt ad. Az egész, 51 aminosavból álló inzulín molekula vizsgálatánál a kis eltérések nehezen vehetők észre. Ennél részletesebb eredményt kaphatunk, ha az inzulín molekulát egy specifikus endoproteázzal (V8 proteáz) feldaraboljuk. Ez négy jól definiált helyen hasítja el az inzulint, és a kapott öt peptid kromatogramjából már a kis eltérések kiolvashatók (fingerprint technika).

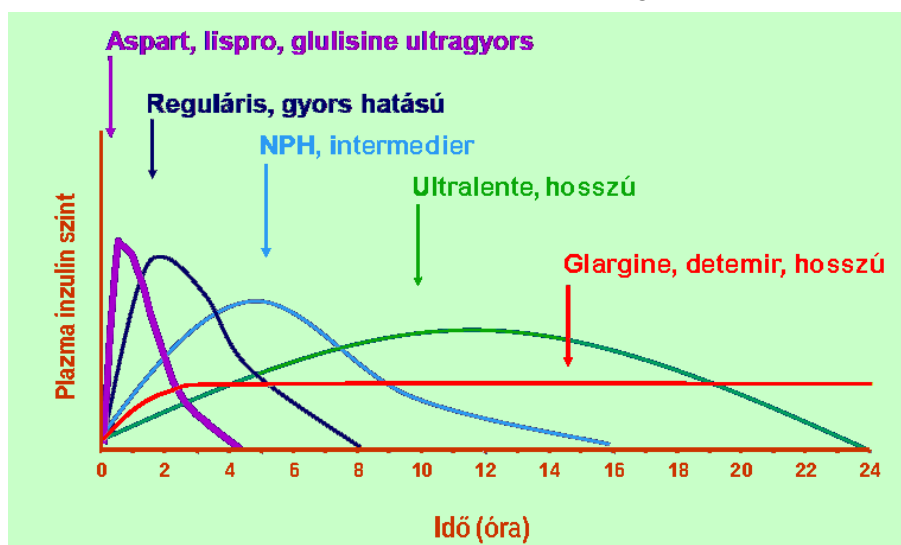
Vizsgálhatjuk az inzulín preparátumot aminosav analízissel is. Teljes hidrolízis után az aminosavak kromatográfiás szétválasztásával az aminosav összetételt kapjuk meg, de ez csak a fehérje elsődleges szerkezetére ad információt.

## 2.5 Módosított inzulín molekulák

Gyors hatású inzulínok:

**Lispro** inzulín: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. A változtatás alapja az IGF-1 (insulin like growth factor) molekula szerkezete volt, amelyben ugyanez az aminosavak sorrendje. Nem alkot hexamert, gyorsabban felszívódik, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Az Eli Lilly (USA) gyártja, Humalog néven.

**Aspart** inzulín: a B28 helyen lévő Pro-t kicserélték Asp-ra. Egyrészt nem alkot hexamert, másrészt a bevitt savas csoport miatt eltolódik az izoelektromos pont → jobban oldódik, gyorsabban felszívódik. *S. cerevisiae*-vel termeli a NovoNordisk (DK), Novo-Log néven.



Elnyújtott hatású inzulínok:

**Glargin** inzulín: (Gly + Arg) mindkét lánc C terminálisát átalakították: az A21 Asp helyére glicint kapcsolnak, a B lánc végére pedig két arginint. Ez megváltoztatja az izoelektromos pontot (5,4 → 6,7). Az injekcióban (pH=4,0) oldatban van, beadva a szövetekben (pH=7,4) mikroprecipitátumok keletkeznek. Ezek lassan oldódnak fel, emiatt elnyújtott a hatás (>24 óra). A Sanofi-Aventis gyártja, Lantus néven.

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

### 3. ESETTANULMÁNY: Eritropoietin (EPO) gyártása

Az eritropoietin egy hormonfehérje, a citokinek közé tartozik. Funkciója szerint stimulálja a vörösvértestek (eritrociták) képződését a csontvelőben. A szervezet egésze számára a megfelelő oxigén-szállító kapacitást biztosítja. Képződését a vér hosszabb ideig tartó alacsony oxigénkoncentrációja (hipoxia) indukálja. A hormont a vesetubulusok mellett található intersticiális sejtek termelik. Az EPO 85-90%-a a vesében képződik, 10-15% pedig a májban. A vese képes a hematokrit szintet (a vörösvérsejtek arányát a vérben) a normál, 45%-os értékre beállítani úgy, hogy a vörösvérsejtek mennyiségét az EPO termelésén és a víz, illetve só ürítésén keresztül (a plazmatérfogat beállításával) szabályozza. A vérbe kerülő EPO eljut a csontvelő sejtjeihez és a sejt felszíni receptorokhoz kötődik, így stimulálja a vörösvérsejtek termelését. Az EPO receptorhoz való kötődése elősegíti az eritrociták proliferációját és differenciálódását.

<http://www.pnas.org/content/100/3/1028/F1.expansion.html>

Külső EPO bevitelre többféle kórkép esetén is szükség lehet:

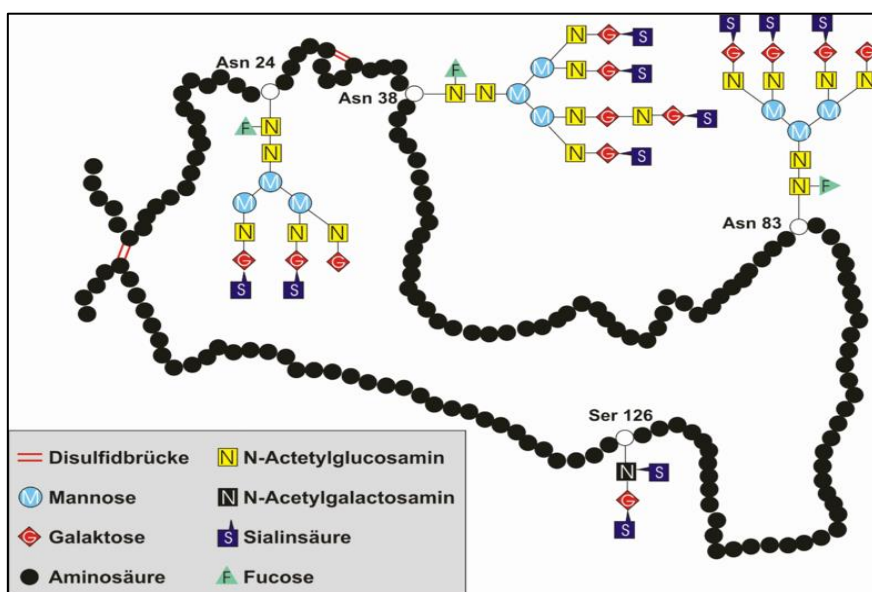
1. Nem termelődik elegendő hormon - ez a vesekéreg károsodása esetén fordulhat elő.
2. Anaemia (vérszegénység) tartós dialízis (művese) kezelés esetén.
3. A csontvelő túl kevés vörös vértestet képez (pl. anaemia tumor illetve kemoterápia következtében), ekkor az ép állományt lehet gyorsabb működésre készíteni.
4. A vörös vértestek elvesztése vagy pusztulása (vérvesztés, HIV, malária)

Az EPO-t engedélyezték krónikus veseelégtelenségben szenvedő anémiások és kemoterápiás kezelés alatt álló rákos betegek számára, valamint műtéti vérvesztés esetén. Az EPO adása a HIV kezelésére használt Zidovudine mellett adagolva is jótékony hatású.

A gyógyászati felhasználáson túl az EPO-t használgják doppingszerként is, mivel a keringési rendszer oxigén-szállítási kapacitása kulcskérdés az állóképességi sportágakban (kerékpározás, hosszútáv-futás, sífutás, de néha labdarúgók is használják). Ugyanez a mechanizmus működik a sportolók magashegyi edzőtáborozásánál is. A ritka levegőben az alacsony oxigén tenzióhoz úgy alkalmazkodik a szervezet, hogy növeli az EPO termelést, ezáltal néhány hét alatt megnöveli a vörösvérsejtszámot, amittől megnő az oxigén-szállítási kapacitás.

#### 3.1 Az EPO szerkezete

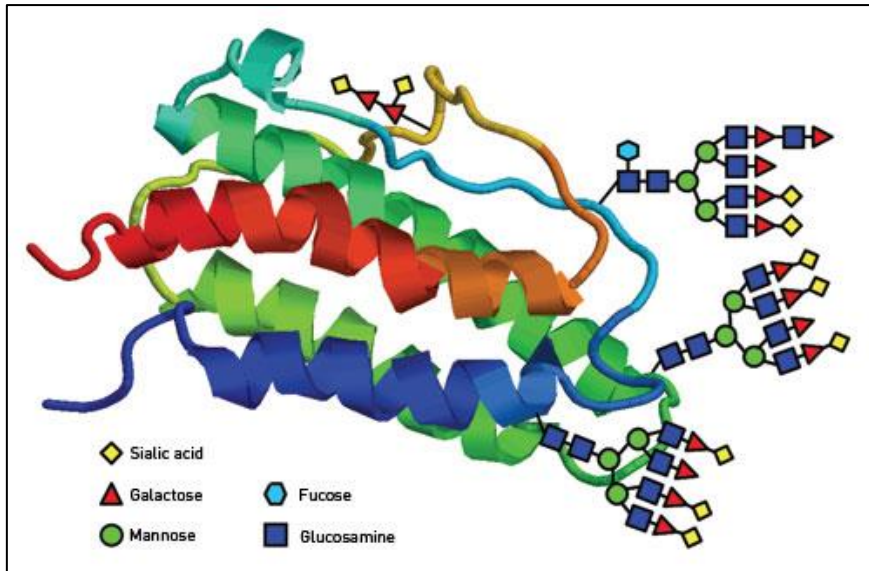
Az EPO szerkezetét tekintve egy glikoproteid, mely 165 aminosav-, és 55 cukoregységből áll. A szénhidrát rész, mely a molekula tömegének közel 40%-át teszi ki, három N-glikozilációs (Asn 24, 38, 83) és egy O-glikozilációs (Ser 126), egységből áll. Egyetlen fehérjeláncból áll és két diszulfid hid



rögzíti a szerkezetét. Az egyik majdnem a lánc végeit kapcsolja össze, egy óriási hurkot képezve („nyak-lánc és csat”), a másik egy kicsi, öt aminosavból álló gyűrűt formál.

Molekulatömege kb. 30 kDa, a különböző izoformák miatt nem adható meg pontosan, ebből a fehérjelánc tömege 18396 Da.

A harmadlagos szerkezet 4 antiparalel lefutású  $\alpha$ -hélixből áll, az N-glikozilációs oligoszacharid „legyezők” a molekula egyik pólusán helyezkednek el.



A szénhidrát láncok végén legtöbbször sziálsav (hét szénatomos cukorsav) található, de a lánc belsejében is előfordulhat. A savas csoportok száma megváltoztatja a molekula töltését, izoelektromos pontját (savas, pH=4,4 körüli). A sziálsavazottság mértéke arányos a hormon receptorkötő képességével és a szérumbeli felezési idejével (ez utóbbi fontosabb az EPO hatásának szempontjából). A láncvégi sziálsavak hiányában a szabadon maradó galaktóz végek erősen kötődnek a májsejtek galaktóz receptoraihoz. A molekula szénhidrát részei variábilisak, a glikoziláló enzimek statisztikus működése miatt egyidejűleg különböző mértékben szializált („félkész”) izoformák vannak jelen. A cukorrészek befolyásolják a molekula hő- és pH-érzékenységét is.

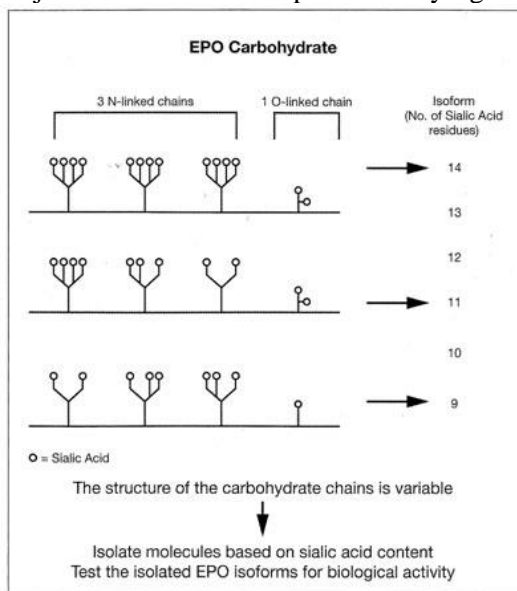


Figure 1: Schematic of EPO Carbohydrate Structure and EPO Isoform Designation. EPO = erythropoietin.

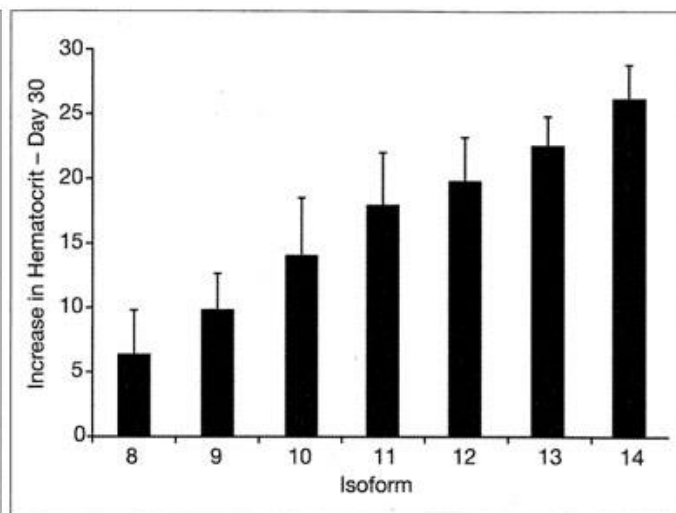


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/



### 3.2 Az EPO előállítás

Kis mennyiségű hormont ki lehet vonni vérből, illetve vizeletből, de ezekben nagyon kicsi a koncentrációban fordul elő és az alapanyag is korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A hormont először vérszegénységben szenvedő betegek vizeletéből (2500 liter) tisztították, 1977-ben.

Kereskedelmi mennyiségben rekombináns fehérjeként állítják elő.

Az EPO génje 4 intront tartalmaz, ezek a mRNS érése során kivágódnak. A fehérjelánc eredetileg 193 aminosavból áll. Érése során az N-terminálisról a 27 AS-ból álló pre szakasz, a C-terminálisról egy Asp hasad le. A cDNS-ét a szignálfehérjével együtt 1985-ben sikerült klónozni.

Gazdasejtként erre a célra nem használhatunk prokariótákat, mert:

- ezekben nem működik az intronok kivágása (ez még megoldható az érett mRNS reverz transzkripciójával)
- nem képesek a glikozilálásra
- a harmadlagos szerkezet kialakítása (folding) bizonytalan
- nagy az esély, hogy a fehérje intracelluláris marad
- zárványtest (inclusion body) kialakulása is lehetséges

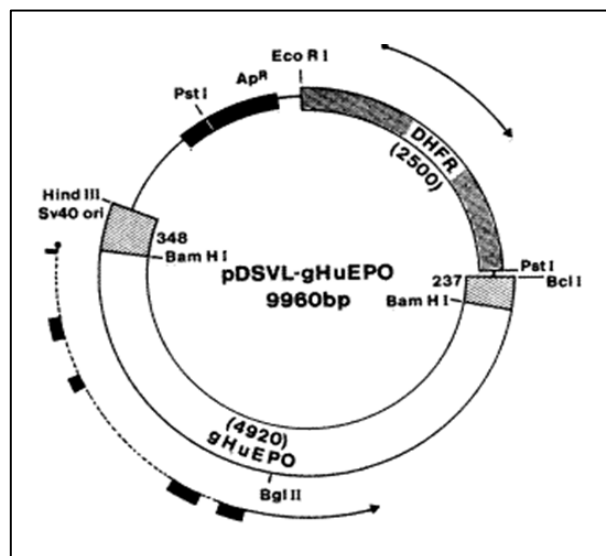
Összetettebb fehérjék termeléséhez ezért eukarióta gazdasejteket választanak. Megismételve a fejezet elején felsorolt szempontokat, termelhetünk:

- élesztőkkel
  - könnyen, gyorsan szaporíthatók, nagy hozam, olcsó táptalaj, de:
  - az eltérő (hiper)glikozilációs mintázat miatt a termék nem mindig aktív vagy immunreakciót vált ki.
- állati sejtenyészetben
  - lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
  - biológiailag aktív termék.

Az EPO esetében az állati sejtenyészetek alkalmasak a termelésre. A különböző vállalatok CHO (Chinese Hamster Ovary = kínai hörcsög petefészek), és BHK (Baby Hamster Kidney = veseszövet) sejtvonalak manipulálásával is megoldották a gyártást.

#### 3.2.1 Az EPO génbevitel vektora

Ahhoz, hogy az EPO génszakaszt klónozni lehessen, olyan vektort kellett választani, ami az emlős sejtvonalban is működni, szaporodni tud. Replikációs origóként SV40-et (majomvírus része) építettek be. A plazmid markere a DHFR (dihidrofóliát redukáz) enzim génje. Ennek megfelelően a CHO gazdasejtben ez az enzim hiányzik. Többlépcsős metotrexátos szelekcióval jó és stabil (több mint 50 osztódás) termelőképes sejtvonalakat izoláltak.



#### 3.2.2 EPO fermentáció (upstream)

Az első eljárások felületi növekedésű CHO sejtekkel működtek. Munkaigényessége ellenére ipari mennyiségben is forgó palackokban állították elő (5000 palack!). A sejtvonal szaporításához Eagle alap közeget, +10 % szérumot és 10% Bacto tryptose foszfát oldatot használtak. Négy nap után a tápoldatot lecserélték a termelő közegre, ami csak 1,5% szérumot tartalmazott. Ezt félfolytonos üzemen 3

naponként lefejtették és friss tápoldattal pótolták. Így egyrészt olcsóbb a közeg, másrészt a feldolgozás során kevesebb idegen fehérjét kell elválasztani.

A fejlesztések során elérték, hogy a sejtvonal fehérjementes tápoldaton is növekedjen. A sejteket makropórusos mikrokarrieren – felületén és pórusaiban – szaporították, fluidizációs reaktorban. Ez folytonos technológia, glükózt és Na-butirátot tartalmazó tápoldaton. A szabad ammónia koncentrációját 2mM alatt tartották. Egy termelési ciklust 40 napig tartottak fenn.

Kialakítottak perfúziós üreges szál (hollow fiber) reaktort is, a membrán tartotta vissza a sejteket, a másik térben zajlott az anyagforgalom, a termék elvétele, a tápanyagok és az oxigén bevitel.

### 3.2.3 Az eritropoietin izolálása (*downstream processing*)

A fehérje mindegyik technológiában extracellulárisan képződik, és a felületi növekedésű sejtek miatt külön sejtelválasztási lépést nem kell beiktatni. A lé feldolgozására sokféle technológiát írtak le, mindegyik kromatográfiás/adszorpciós lépések variálásán alapul. Egy jellegzetes lépéssort tekintünk át a következőkben:

1. 100 l lefejtett fermentlé koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel. (Az 50-es koncentrációs faktort valószínűleg csak több lépésben lehet elérni.)
2. MAb-affinkromatográfia: a töltetre az EPO-ra szelektív monoklonális antitesteket rögzítettek, ezen csak az eritropoietin molekulák kötődtek meg, a többi oldott komponens kimosható az oszlopból. Az adszorbeálódott molekulákat nátrium-acetát oldattal eluálják. (Az affinkromatográfia név téves, ez voltaképpen oszlopban végrehajtott adszorpció.) Ennek során a termék 2800-szoros tisztítását érték el, miközben az aktivitás 84 %-a megmarad. A művelet nagyon hatékony, de a MAb oszloptöltet nagyon drága, és az élettartama is rövid (a fehérje ligandumok elbomolhatnak, leválhatnak), gyógyszergyári technológiákban csak 30-50 alkalommal használhatók.
3. Gélkromatográfia Sephadex G-100 oszlopon, molekulaméret szerinti elválasztás. Az eredeti aktivitás 66 %-a megmarad.
4. Adszorpció hidroxipatit tölteten, az elúció után az aktivitás 52 %-a megmarad.
5. Puffercsere és stabilizálás humán szérum albuminnal.
6. A termék tisztaságát SDS-PAGE-sel, HPLC-vel, és MAB-ELISA-val ellenőrzik.

### 3.3 Eritropoietin készítmények

Mindegyik rekombináns EPO elsődleges szerkezete (aminosav sorrendje) azonos, de a cukorrészek összetételében (glikozilációs mintázat) különbözik a natív molekulától.

EPO $\alpha$ : CHO sejtvonallal termeli az Amgen. A szabadalmi oltalom 2013-ban lejárt, a gyártás leállítására készülnek.

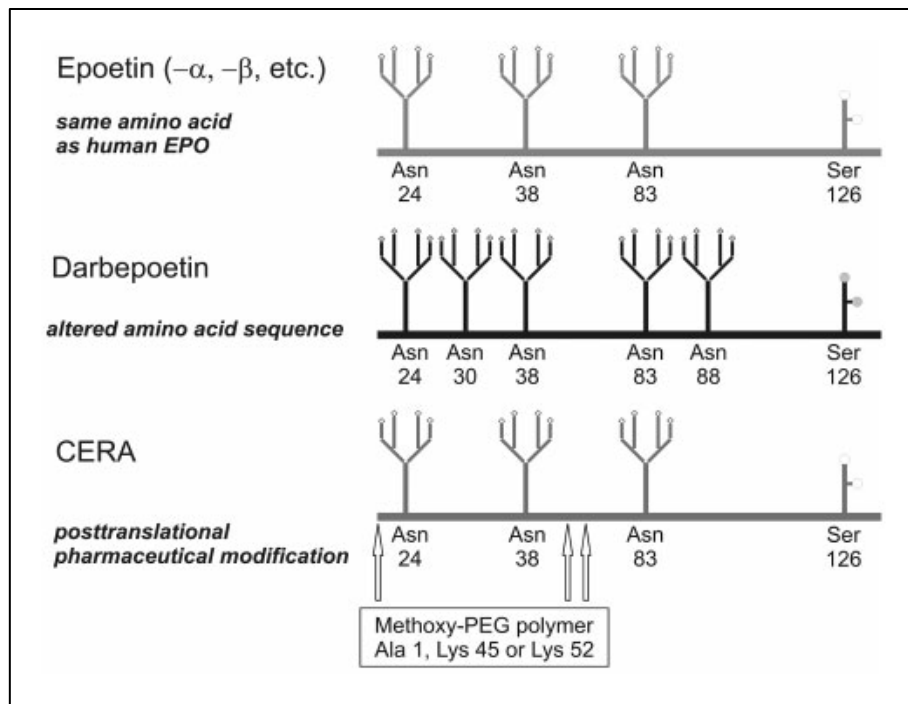
EPO $\beta$ : CHO sejtvonallal termeli a Roche.

Mindkettő oligoszacharid izoformák keveréke. Klinikailag egyenértékűek. E kettőn túl még sok bioszimiláris utángyártott termék van.

EPO $\omega$ : BHK sejtvonallal termeli az Elamex. A fehérjelánc itt is azonos, de az egyik N-glikán foszforilezett oligomannánt tartalmaz, és a molekulák egy részében hiányzik az O-glikán.

EPO $\delta$ : humán fibroszarkóma sejtvonallal termelik, a genetikai manipuláció különbözik az előzőektől. Nem az EPO gént vitték be a sejtbe, hanem a humán genomban jelen lévő, de kikapcsolt gént aktiválták egy erős vírus promóter (CMV) beépítésével.

A különböző variánsok között kis különbségek vannak: mindegyik izoformák keveréke, ezek izoelektromos fókuszálással vagy kapilláris zónaelektroforézissel szétválaszthatók és azonosíthatók. Mindegyik engedélyezett, használatban lévő termék, bár a biológiai hatásuk, illetve ennek időbeli változása kis mértékben különbözik.



#### Második generációs EPO készítmények

A módosítások célja a biológiai aktivitás növelése, a felezési idő növelése, a felhasználás könnyítése. Ennek érdekében a kiindulási molekulának mind a fehérjerészét (protein engineering), mind a szénhidrát részeit (carbohydrate engineering) módosították.

**Darbepoietin** 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. Három helyett öt N-cukorláncot tartalmaz, ennél fogva szíálsav-tartalma is nagyobb. A molekula felezési ideje a háromszorosára nőtt.

Más fejlesztésben a 24 Asp-at Glu-ra cserélték le, a molekula hatékonysága 29%-kal növekedett.

#### Harmadik generációs EPO készítmények

**CERA** (Continuous erythropoietin receptor activator): az EPO-ra PEG láncokat kötöttek, ettől a molekulatömeg 60 kDa-ra növekedett. A felezési idő a húszszorosára nőtt (Roche gyártmány).