

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – I

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejlesztése:

I. A törzs kialakítása

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

II. Technológia kialakítása

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Példa: inzulin analitika

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

Kémiai analízis: HPLC

- egészben
- enzimesen (V8 proteáz) ötfelé hasítva (fingerprinting)
- aminosav-analízis (teljes hidrolízis után)

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

Immunanalízis: - reakció specifikus ellenanyagokkal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

1. A fehérje molekula megismerése

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

3. A gazdaszervezet kiválasztása

Lehet:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

2. Analitikai módszerek kidolgozása

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

Lehet:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

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

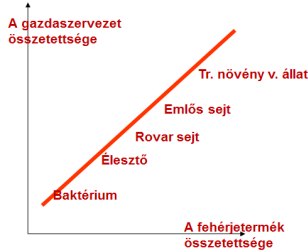


BEVS - Baculovirus Expression Vector System
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

Minél komplexebb a célfehérje, annál fejlettebb gazdaséjtet kell választani.



A glikozilálás típusai

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

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

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

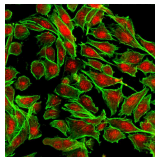
3. A gazdaszervezet kiválasztása

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

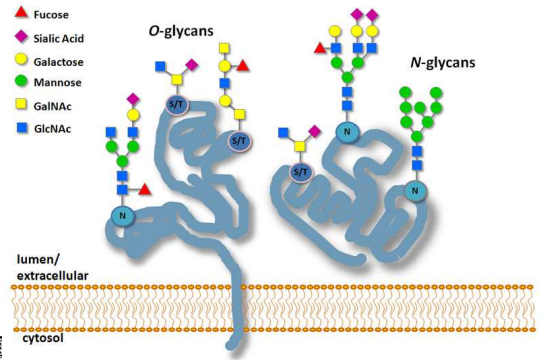
E. coli

S. cerevisiae

Chinese Hamster Ovary (CHO)



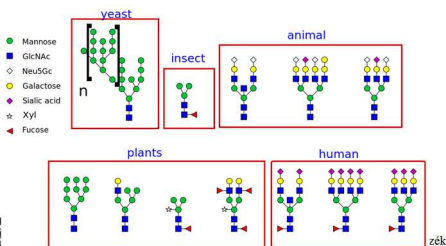
N- és O-glikoziláció



3/1 Glikozilálás

Az eukarióta szervezetek különböző szénhidrát-mintázatokat hoznak létre:

- Baktériumok: nincs
- Élesztők: sok mannóz egység
- Rovarak: rövid, fukoizilált
- Emlős sejtek: komplex „kétágú”
- Növényi sejtek: fukoizilált és xiloizilált



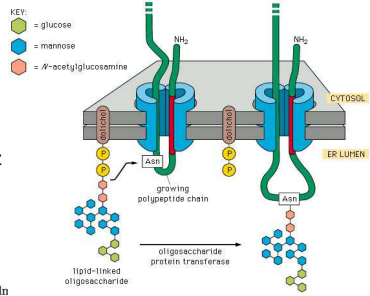
N-glikozilálás

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

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

Az N-glikozilálási lépés

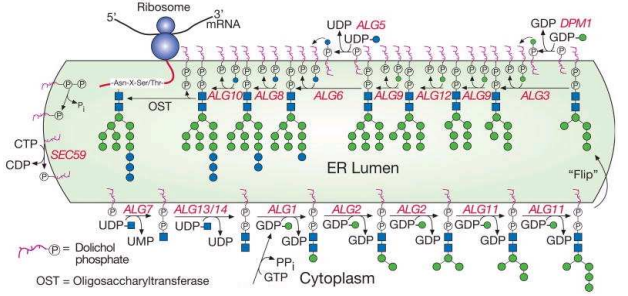
Maga a glikozilálás az endoplazmás retikulum membránjának belső oldalán történik, ott, ahol a membrán felületén kötött riboszóma egy transzlokonon keresztül „betolja” a fehérjeláncot a lumen térbe. A megfelelő aminosavháromas felbukkanása esetén egy OST = oligoszacharil-transzferáz enzim helyezi át a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



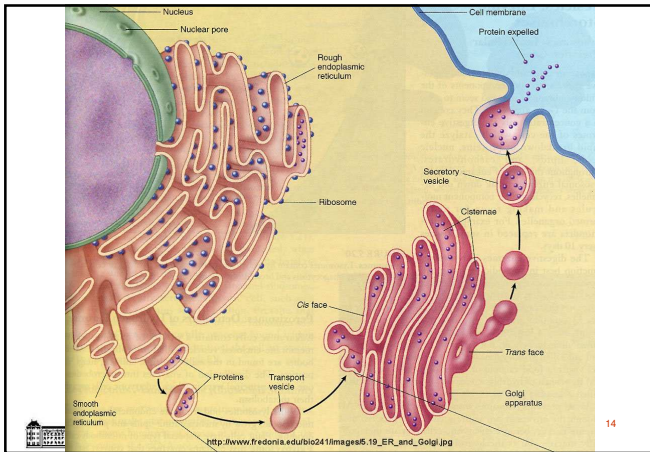
BME Alkalm

A 14-oligoszaharid bioszintézise

Az első hét egység beépülése az ER külső felületén történik, aztán „befordul” a lumenbe és ott folytatódik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

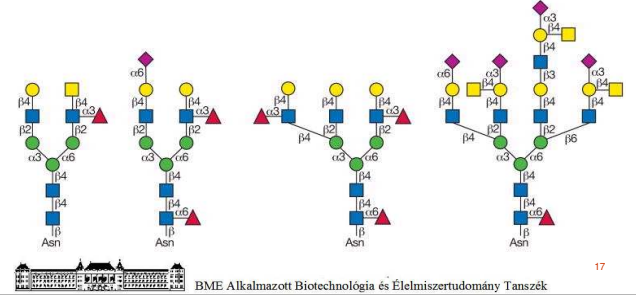


http://www.fredonia.edu/bio241/images5_19_ER_and_Golgi.jpg

14

Reakciók a Golgi komplexben

A bemutatott fő szintézisút végén a galaktóz láncvégű oligoszacharidok sokféleképpen „dekorálhatók” tovább:

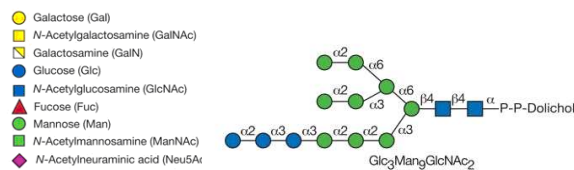


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

N-glikozilálás

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

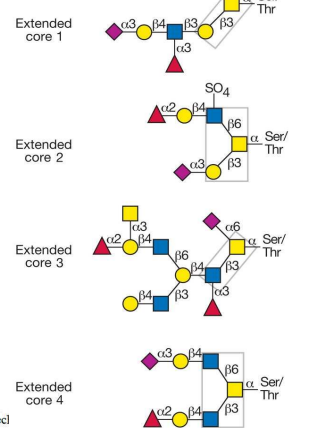


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

O-glikozilálás

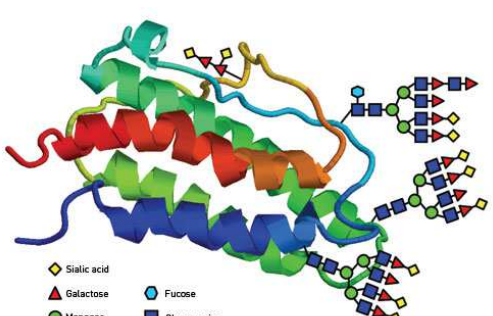
Az O-glikozilálások egész más mechanizmussal mennek végbe. A kész fehérjelánc megfelelő OH csoportjára egyenként kapcsolódnak a cukrok UDP-aktivált formában. Az alap ez esetben az N-acetil-galaktózamin kötése és ehhez kapcsolódik egy galaktóz és/vagy egy N-acetil-glükózamin. Erre az elágazó triszacharidra épülhet még sokféle, változatos felépítésű cukor.



BME Alkalmazott Biotech

Példa: az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:



19

4. Kodon optimalizálás

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

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

Ez minden gazdára más és más. Erre specializálódtak cégek szoftvereivel optimalizálnak.

22

EPO izoformák

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

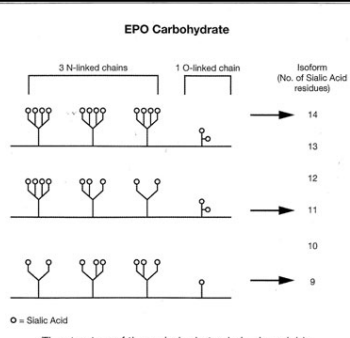


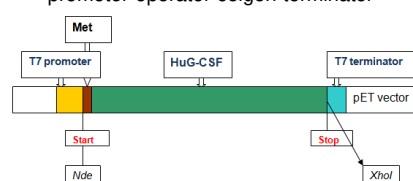
Figure 1: Schematic of EPO Carbohydrate Structure and EPO Isoform Designation. EPO = erythropoietin.

21

5. A konstrukció megtervezése

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

promóter-operátor-célgén-terminátor



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

23

EPO izoformák

A különböző EPO izoformák hatékonysága (a hematokrit növekedése) arányos a szílsavak számával.

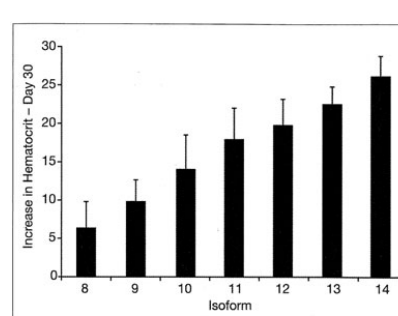


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/)

21

6. Génmanipuláció

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

24

7. Sejtbankok

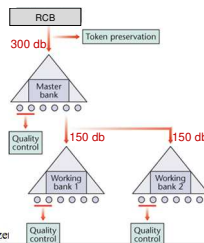
A fejlesztések, a termelések, a klinikai kezelések stabil ismételtetésének alapja az azonos és változatlan képességű sejtek biztosítása. Ezt a sejtbankok létrehozásával oldják meg.

Egyetlen sejtől indulnak ki, minimális osztódás (néhány generáció) után kis tételekbe szétosztják a tenyészetet, majd -180 °C-on tárolják.

A cél: a tulajdonságok megőrzése (ne legyen mutáció, vírus- vagy plazmidfertőzés, előregedés).

Története és a vizsgálatok jól dokumentáltak legyenek.

Évente néhány ampullát újra megvizsgálják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer

7. Sejtbankok

Research Cell Bank (RCB):

A szelekció után a legjobb vonalat (+ egy tartalék) tárolják.

Célja, hogy a következő fejlesztések mindig azonos tenyészetből indulhassanak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

7. Sejtbankok

Master Cell Bank (MCB)

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

Working Cell Bank (WCB)

Az MCB-ből indul ki, célja, hogy az üzemi termeléshez mindig azonos oltóanyagot biztosítson. Ezt is ellenőrizni kell.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27