

## REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – II/2

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejtése:

### I. A törzs kialakítása

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

### II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalizálás (fermentációs körülmények)
- 2) Downstream optimalizálás (a végtermék izolálása)

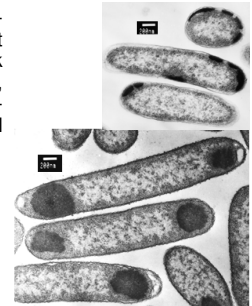


## Fehérje zárványtestek

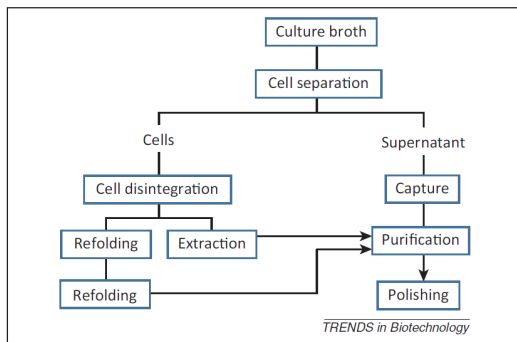
A rekombináns fehérjéknél gyakran előfordul, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem szilárd szemcséket, zárványokat alkot a sejteken belül. Csak prokariótáknál fordul elő, eukariótáknál nem. (humán: genetikai betegségek)

*E. coli* →

Legömbölyített, erősen fénytörő, nagy sűrűségű zárványok.



## A fehérjeizolálás általános sémája



## Fehérje zárványtestek

A zárványképződésnek vannak előnyei is:

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

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

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



## II/2. Downstream optimalizálás

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

### II/2/a termékizolálás prokariótákból

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



## Fehérje zárványtestek

Fehérje bioszintézis ↗ folding → natív fehérje  
↘ zárvány képződés → IB

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

A prokariótákban a folding azért lassabb, mert:

- nincsenek chaperonok
- a citoplazma redukzív közeg, nem kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Csak a periplazmikus tér oxidatív.



## Fehérje zárványtestek

A zárványtestek feldolgozásának lépései:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Folding

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

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

Az intermolekuláris kapcsolatok hibás szerkezetet eredményeznek.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

## 1. Sejtfeltárás

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

## 2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek kompakt, nagy sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A felületen visznek magukkal szennyezőseket → mosással tisztítják (pH=8, 0,2 M NaCl, Triton X100, EDTA, DTT, NaN<sub>3</sub>)

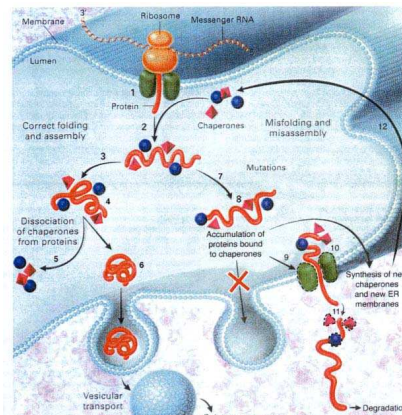


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## Folding

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Oldás, szolubilizálás

Tömör szerkezet, vizes közegben oldhatatlan.  
Kaotróp, denaturáló oldószerek: 6 M guanidin HCl, 8 M karbamid.  
~5 g/l fehérje, 1-4 óra.  
Puffer: enyhén lúgos közeg, pH ~8 (tiolát anionok).  
Fémionok: EDTA  
Erősen redukzív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotritol, dithioeritrol, redukált glutation, merkapto-etanol, cisztein, cisztamin.  
Tisztítás: ha az IB pasztát jól kimosták, alig szükséges. A foldingnál úgyis felhívul.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

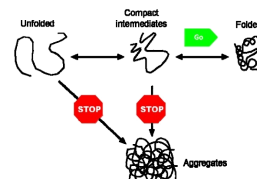
9

## In vitro folding

Prokariótáknál a foldingot ER és chaperonok nélkül kell végrehajtani.  
Az aggregáció (másodrendű reakció) megakadályozása érdekében a molekulákat távol kell tartani egymástól → hígítás

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

A lehetséges melléreakciók megakadályozása:



BME Alkalmazott

## In vitro folding

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

Trükkök:

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## In vitro folding

A pufferben még:

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

Kaotrópok kis koncentrációban

Arginin (0,4 – 1 M)

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

EDTA (2 – 10 mM) kelátképző

PMSF (~0,1 mM) proteáz-gátló

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

4–20 °C, 24-48 óra



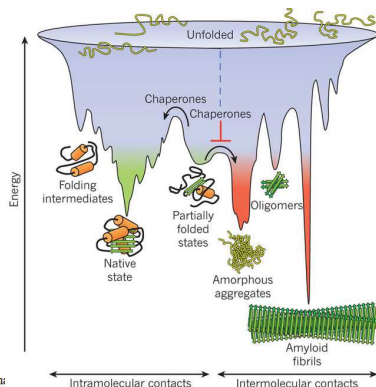
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

## In vitro folding

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

Kritikus: a diszulfid hidak helyes kialakítása.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## TRX fehérje/domén

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

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

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

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

Ezt beadagolva elő lehet segíteni az in vitro foldingot.



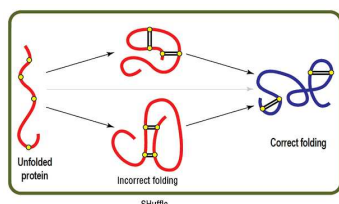
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## In vitro folding

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## Egyéb folding technikák

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

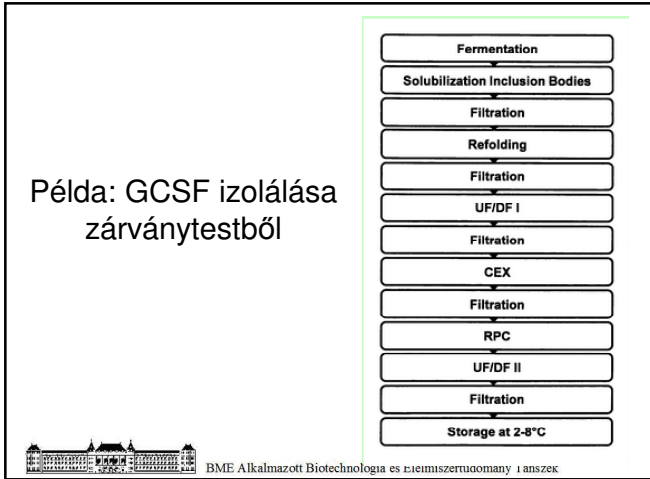
**Micellákban és liposzómákban:** ha a fehérje molekulák elkülönülten állnak, nincs aggregáció.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

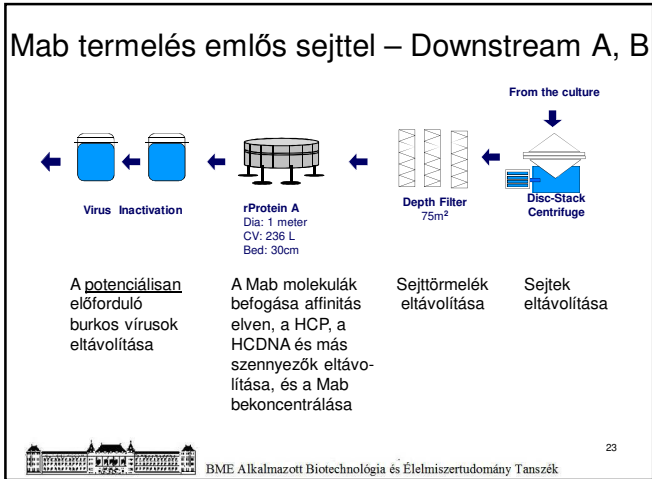
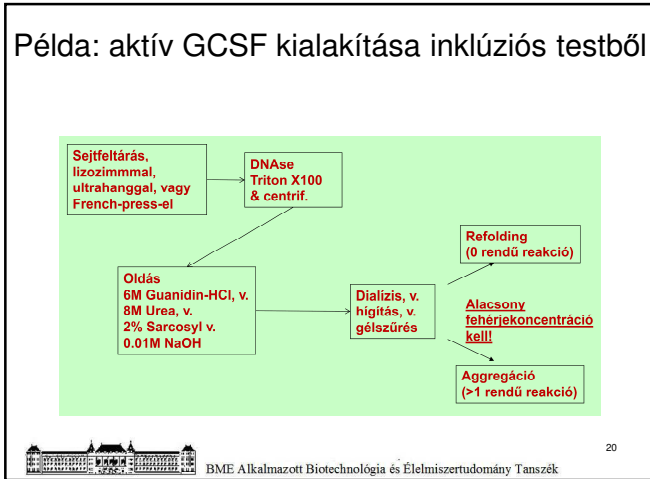


### II/2/b termékizolálás állati sejt tenyészetből

A jellemző műveleti sorrend (de nincs köbe vésvé):

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



### A folding ellenőrzése

Nehéz ügy, de lehet

- Enzimaktivitás mérés
- ELISA
- Más bioassay
- Ligand-kötés
- HPLC
- Spektroszkópia

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A. A sejtek elválasztása

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

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

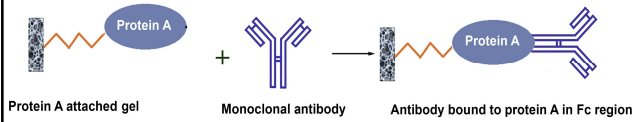
Sejtfeltárássra sincs szükség, a termék a lében található.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

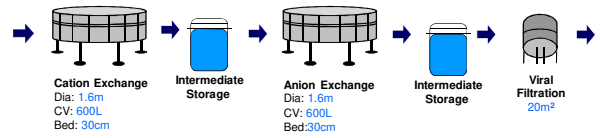
### B. Koncentrálás (capturing)

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

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



### Mab termelés emlős sejttel – Downstream C



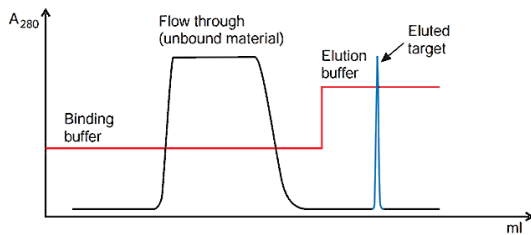
Savas töltésű variánsok és HCP eltávolítása

Aggregátumok, vírusok, HCP és HCDNA eltávolítása

További (gyakorlatilag az összes) potenciális vírus eltávolítása

### Protein A kromatográfia

A terméket kötjük, a szennyezéseket kimossuk.



### C. Tisztítás

A szennyezők elválasztása – lehetőleg a termék maximális megtartásával.

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

### Protein A kromatográfia

A töltet élettartama: (fontos, mert nagyon drága)

Table 4.12 Protein A Resin Lifetime Study

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

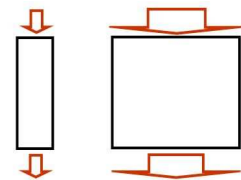
Kismértékű kitermelés csökkenés, de a minőségi paraméterek nem változtak.

Élettartam: legalább 250 ciklus

### A kromatográfiai oszlopok léptéknövelése

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

Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:



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



### A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### D. Végtisztítás (polishing)

A fehérje felhasználáshoz szükséges közeg, állapot beállítása. A gyógyszerkönyvekben előírt tulajdonságok, tisztaság elérése. Például néhány követelmény:

Tests	Acceptance criteria	Methods	Results	
<b>Tests for purity</b>				
G0	≥7-52 corrected area%	CE-LIF/ In-house	55.8%	
G1	≥30-38 corrected area%		28.5%	
G1'	9-12 corrected area%		9.7%	
G2	5-12 corrected area%		5.0%	
Impurities with molecular masses differing from that of the product Mab	Main peak:	at least 99%	SEC-HPLC/ In-house	99.6%
	Heavy chain + light chain altogether	at least 97%	Chip electrophoresis (reducing)/ In-house	99.7%
Mab charge variants and impurities	Main peak:	at least 45%	Ion-exchange HPLC/ In-house	56.1%
	Sum of (acidic) impurities before the main peak:	n.m.l. 15%		8.2%
	Peak pertaining to the first lysine variant:	n.m.l. 40%		31.0%
	Sum of other (basic) impurities:	n.m.l. 8%		4.7%
Bacterial endotoxins	≤ 3.0 EU/ml	Kinetic turbidimetry (harmonized Ph. Eur./USP)		<0.04 EU/ml

### A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Vírusinaktiválás / eltávolítás

**Fizikai módszerek**

**Inaktiválás hőkezeléssel**

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gőzölés

**Eltávolítás**

- Szűrés
- Kromatográfiai módszerek
- Kicsapás

**Kémiai módszerek**

- Solvens – Detergens eljárás
- β-Propiolakton
- Jód

**Fotokémiai módszerek**

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Mab termelés emlős sejttel – Downstream C, D

Hosszú idejű tárolás

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

Puffercserre a végleges tároló pufferre és a Mab koncentráció beállítása

További aggregátumok és HCP eltávolítása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Vírusinaktiválás / eltávolítás

**PASZTÖRIZÁLÁS**

Fehérje oldat

Stabilizálószer adagolás

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

Stabilizálószer eltávolítás

További tisztítás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## Vírusinaktiválás / eltávolítás

## SD (SOLVENT-DETERGENT) KEZELÉS

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

## Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

## Vírusinaktiválás / eltávolítás

A vírusmentesítési műveletek hatékonyságát különböző ismert vírustenyészetek hozzáadásával minősítik.

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

## Sterilszűrés

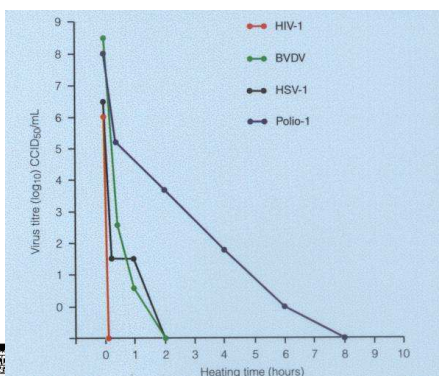
A vírusmentesítés után nincs sok értelme, de a hatóságok előírják.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

Beriplex P/N<sup>®</sup> pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája

39

## Egyszer használatos eszközök

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

Például: steril konnektorok

Összekattintás és a zárófolia kihúzása után zárt rendszerben, sterilen történhet az áttöltés.



## Egyszer használatos tároló

### Flexel® 3D Bag Modular Palletank® System



#### Specifications

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

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

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

