

Rekombináns termékek és technológiák

Az orvosi célú rekombináns fehérjék funkció szerint lehetnek:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- **HEMOSZTÁZIS FEHÉRJÉK (VIII FAKTOR, IX FAKTOR, tPA)**
- Antitestek (terápia - analitika; Herceptin - ProstaScint)
- Vakcinák (alegység vakcinák)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

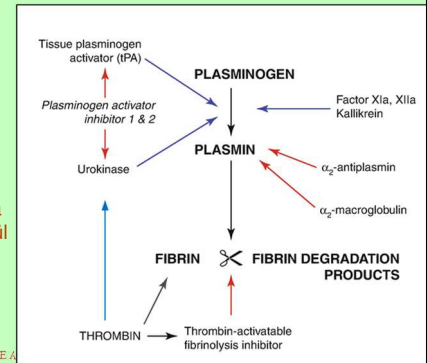
1

Vérrögoldás (fibrinolízis, trombolízis)

Fibrinolízis: a plazmin (lassan) lebontja a térhálós fibrint.

A véralvadás beindulásával egyidejűleg megindul a plazmin aktiválása is →

A kész tPA hatását a fibrin fokozza, enélkül kicsi az aktivitása.



BME A

Véralvadási fehérjék előállítása

Gyógyszerként előállított fehérjék:

Alvadási oldal: Faktor VIII, Faktor IX

Gátló oldal: szöveti plazminogén aktivátor (tPA), antitrombin, hirudin, urokináz (uPA), (heparin, sztreptokináz)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)

Nagyon specifikus Ser proteáz, a plazminogénezen az Arg-Val köztét hidrolizálja. 70 kDa, 527 AS, a szekvencia ismert, 3 glikozilálási hely (118, 186, 448 AS).

17 diszulfid híd tartja össze – a foldingnál nagy a „mellékötés” veszélye.

Öt jellegzetes doménből áll. Az aktivitást a Ser-proteáz domén hordozza, az aktív centrum - His, Asp, Ser - homológ más proteázokkal (tripszin, plazmin, trombin)

Két kettős hurkot tartalmaznak a Kringle domének (82 AS), a fibrin ehhez kapcsolódva fokozza az enzimaktivitást.

Az EGF-like (epidermisz növekedési faktor-szerű) domén és a finger (ujj) domén (43 AS) különféle membrán receptorokhoz való kötődésre alkalmas.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Vérrögoldás (fibrinolízis, trombolízis)

A vérrögök az erek elzárásával életveszélyes állapotokat hozhatnak létre: szívinfarktus, agyi katasztrófa (stroke), végtag trombolízis (dobogós halálkok).

A kialakult térhálós fibrin szöveteket (var a seben, vagy vérrög az erekben belül) természetes úton a plazmin bontja le.

A plazmin előanyag (plazminogén) formájában kering a vérben. Aktiválása:

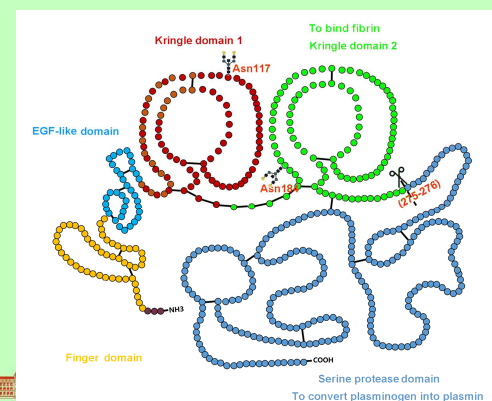
- **szöveti plazminogén aktivátor (tPA, 70 kDa-os fehérje)**
- urokináz (uPA, a vese termeli, a vizeletben is megtalálható, 54 kDa)
- sztreptokináz (*Streptococcus*-ok termelik, 45 kDa-os fehérje, aszpirin stimulálja, mellékhatások léphetnek fel)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)



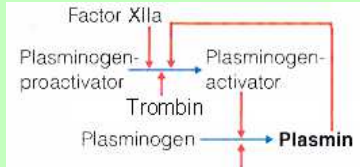
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

A tPA aktiválása

A tPA inaktív előanyag (proaktivátor), formában kering a vérben, az aktiválás során a 275-Arg és 276-Ile közötti peptidkötést kell elbontani, de a képződő két láncot egy diszulfidhid összetartja. A könnyű lánc a proteáz régió, a nehéz lánc a további négy domént tartalmazza.

A trombin mellett a F XIIa és az aktív plazmin is itt hasít – auto-katalízis.



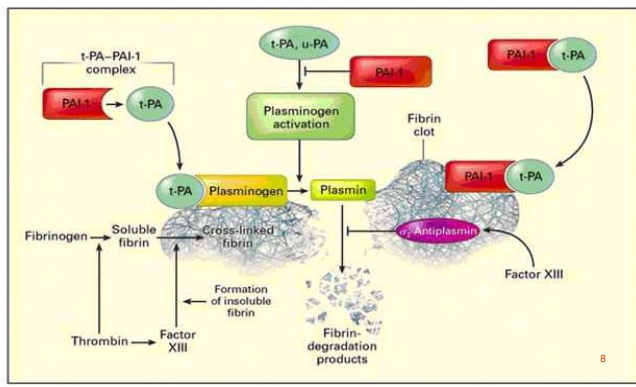
A rekombináns tPA előállítása

Tápközegek:

- *Tenyésztés* 10 %-os szérumon, tápoldatsere: 0,5 % szérum + inzulin, progeszteron, kortizon... : a tPA izolálás egyszerű, mivel alig van jelen szérumfehérje, klasszikus kromatográfias módszerekkel lehetséges.

- *Tenyésztés és termelés* 10%-os szérumon: izolálás adszorpcióval MAB kolonnán. Proteáz inhibitor (Aprotinin) és Tween-80 (0,01%) jelenlétében, egy lépcsőben végzik a specifikus megkötést.

Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)



Továbbfejlesztett rekombináns tPA-k

A nagy és összetett fehérje módosításával és egyszerűsítésével több cég is foglalkozott. Az eredeti molekulát (*Alteplase*) átalakítva:

Tenecteplase: két ponton változtatták meg a szerkezetét: a második Kringle doménen az N-glikozilációs helyet 14 aminosavval „odébb tették”, illetve a proteáz doménben négy bázikus aminosavat (296-299) semleges alaninra cseréltek ki.

Mivel a reakcióban csak a proteáz domén vesz részt, logikusnak tűnt, hogy a további domének eltávolításával próbálkozzanak. A **Lanoteplase**-nál a két N-terminális domént, a

Retepulse-nál háromat hagytak el a szerkezetből. A másik Kringle domént viszont nem lehet kihagyni, mert a tPA ezen keresztül kötődik a fibrinhez, ami nagymértékben megnöveli az aktivitást.

A rekombináns tPA előállítása

Ez volt az első rekombináns fehérje termék, a Genentech kezdte el gyártani 1989-ben.

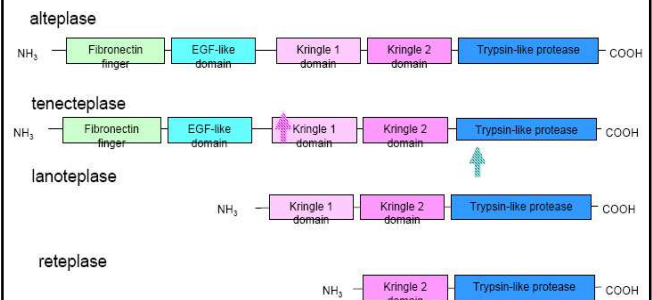
A gént melanoma (bőr rák) sejtekből izolálták.

Klónozás: pBR322 plazmidba, transzformáció *E.coli*-ba. Ez gyenge aktivitást mutatott, mert nem volt glikozilálva, és a diszulfidhidak sem alakultak ki megfelelően →

→ emlős sejtenyészetben kell gyártani

Klónozás: SV40-be, transzfecció: CHO DHFR-deficiens sejtekbe
Sok kópia épült be (Ca-foszfátos módszer)

Továbbfejlesztett rekombináns tPA-k



Továbbfejlesztett rekombináns tPA-k

Alteplase (tPA) Molecular Weight 70 kDa
 Reteplase (rPA) Molecular Weight 39 kDa
 Lanoteplase (lPA) Molecular Weight 53.6 kDa
 Tenecteplase (TNK-tPA) Molecular Weight 75 kDa

BMÉ

A Faktor-VIII aktiválása

Ha megindul a vérárvadás, a F-VIII aktiválását a trombin (vagy más, Arg mellett hasító Ser proteáz) végzi, amely kiszabadítja az A doméneket (hasítás az Arg372, Arg740 Arg1689 helyen).

A B domén kilép, nincs további szerepe. A másik három fragmentből komplex jön létre, amit továbbra is Mg²⁺ ion tart össze. Ez az aktív FVIIIa, ami részt vesz a vérárvadásban.

Mivel a koagulációnál csak percekig van szükség az aktív faktorokra, a bomlás gyorsan megindul. Az aktív Protein C (APC) az A₁ és A₂ domént bontja, ezzel inaktíválja a faktort.

BMÉ Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Antihemofíliás faktor = Faktor VIII

Vérárvadási faktor, hiánya vérzékenységet okoz. Génje az X kromoszómán helyezkedik el → a nemhez kötött recesszív örökletes iskolapéldája (→ Habsburgok).

A veleszületett vérzékenységet 80%-ban a F-VIII hiánya okozza. Pótlásával (hetente 1-2x) a vérárvadás normalizálható.

Önmagában nincs enzimaktivitása. A F-IX-el, trombinnal, foszfolipiddel (PL) és Ca²⁺-nal együtt (= tenáz komplex) van proteolitikus hatása, a F-X-et aktiválja.

A F-VIII-at is proteázok aktiválják, de a vérben az egyéb proteolitikus enzimek gyorsan (~1 óra) el is bontják. Védelem: von Willebrand faktorhoz kötődik.

BMÉ Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Faktor-VIII ligandumok

A F-VIII molekulán sok posztranzlációs módosítás található: 8 diszulfid híd, sok N-glikozilezés (különösen a B doménen), és szulfonált tirozinok.

Figure 1 Protein structures and post-translational modifications reported for factor VIII and turoctocog alfa, respectively.

Notes: Both are characterized by the same heavy chain and light chain and differ in the B-domain. Domains are indicated with capital letters and subdomains with lower case letters. Glycosylation sites are denoted by triangles, disulfide bonds are denoted by arches, reduced cysteine residues are denoted by orange vertical lines, and "SP" inside a circle indicates sulfated tyrosine residues. Brackets mark the areas of interaction with corresponding clotting factors: phospholipids (P), von Willebrand factor (VWF), calcium (Ca²⁺), and copper (Cu²⁺) ions.

Abbreviation: SP, signal peptide.

BMÉ Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Faktor-VIII érése

Eredetileg egyetlen hatalmas glikoprotein láncként szintetizálódik (300 kDa, 2332 aminosav), amely háromféle típusú doménből (A, B, C) áll.

Érése során két proteolitikus hasítás révén a B domén jelentős része leválik, és két lánc keletkezik: az A₁-A₂-B nehéz lánc (92 kDa) és az A₃-C₁-C₂ könnyű lánc (73 kDa). Ezeket egy kétértékű fémoon (pl. Mg²⁺) tartja össze. A vérben ez az inaktív forma kering, von Willebrandt faktorhoz kötött állapotban.

Synthesis: Single chain protein MW 330 kDa
 Secretion: Heterodimer MW 280 kDa
 Activation: Heterotrimer MW 166 kDa
 Inactivation of FVIIIa by APC generates fragments of both A1 and A2. Inactivation is also caused by dissociation of A2 from A1.

BMÉ Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Faktor-VIII ligandumok

A rákapcsolt csoportok az aktív F-VIII-nál is nélkülözhetetlenek az aktiváshoz:

Tyrosine residues	Significance and activity for FVIII
346 and 1664	Increase of affinity for thrombin interaction and thereby the rate of FVIII activation by thrombin
718, 719, and 723	Increase of specific procoagulant activity of FVIIIa in the complex with FIXa and FX bound to the phospholipid membrane
1680	Prerequisite for complex formation with VWF, influencing half-life of FVIII in the circulation

BMÉ Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A Faktor-VIII gyártása

Az első tisztított készítmények donorvérből készültek (1966), ezek máig a piacon vannak (Mo.: Humafactor 8, Humán Bioplazma/Kedrion).

1. generációs rekombináns F8: CHO/BHK sejtekkel a teljes láncot állították elő, bovin és humán albumint használtak (1992).
2. generáció: csak humán szérum albumint használtak (2000)
3. generáció: teljesen fehérjementes gyártás (2003). Ez kiküszöböli a vírus-, vagy prionátvitel veszélyét.
4. generáció: teljesen fehérjementes gyártás és humán sejteket alkalmaztak (HEK293), amelyek humán glikozilációt hoztak létre (2014).



A Faktor-VIII gyártása

Fermentáció:

Tucatnyi technológiát dolgoztak ki, CHO, BHK és HEK sejtvonallal. Folytonos és perfúziós technikák, m³-es nagyságban.

Feldolgozás:

változatos módszerek, de mindegyikben van:

- Sejt(törmelék) eltávolítása
- Nukleinsav eltávolítás anioncserélőn
- Affinkromatográfia (vW faktoral, monoklonális antitesttel.)
- Vírus inaktiválás (szolvens-detergens módszerrel)



A rekombináns Faktor-VIII fejlesztése

Blood-based factor VIII	First generation	Second generation	Third generation: ADVATE
Nonrekombináns, származik az emberi vérből	Rekombináns, plazma-vezetett fehérjék a kultúrmediumban és a végső formulációban	Rekombináns, plazma-vezetett fehérjék a kultúrmediumban, de nem a végső formulációban	Rekombináns, plazma-vezetett fehérjék a kultúrmediumban és a végső formulációban
In the 1980s, all clotting factor came directly from human blood.	By 1992, RECOMBINATE [Antihemophilic Factor (Recombinant)] became available, but blood components such as plasma proteins are still added at several steps of the processing. ¹⁻³	A few years later, the amount of blood components used in processing was reduced, although some still remains. Specifically, plasma proteins are still used in the cell growth phase, and trace amounts may remain in the final formulation. ¹	In 2003, ADVATE was introduced as the first recombinant factor VIII therapy to be free of blood-based additives. No plasma proteins are added at any stage of processing. ^{1,4,5}
By the mid-1980s, safeguards were developed to monitor pathogen transmission risk from blood-based additives. ²			

ADVATE eliminates the potential risk of viruses that may be carried in blood-based additives^{1,4,5}*

*There have been no confirmed reports of serious viral transmissions with recombinant factor VIII therapies.

Purification Process

Harvest	Cell removal	Cells are removed through centrifugation/filtration
Capture	Multi modal cation chromatography column	FVIII binds to the multi modal resin, whereas medium components, DNA and host cell proteins are removed from the column through washing steps
Purification	Cation exchange chromatography column	FVIII is further purified using a negatively charged chromatography resin
DNA removal	Charged filtration	A positively charged filter removes DNA (negatively charged)
Virus inactivation	Chemical inactivation (solvent/detergent)	In the theoretical case of enveloped viruses being present, these would be inactivated through chemical disruption of their surrounding lipid membrane
Affinity purification	VIIISelect™ chromatography column	Main purification step removing essentially all host cell proteins, using a non-animal derived FVIII affinity ligand chromatography resin
Virus removal	Nanofiltration (Planova 20™)	Pores with a size of approximately 20 nm have the capability to capture all pathogens based on size, including any theoretically present small non-enveloped viruses (e.g. parvoviruses), disrupted enveloped viruses, prions etc.

A Faktor-VIII módosításai

1. Az A2 és A3 fragmens közti laza kapcsolatot egy diszulfid híd beépítésével (Cys664 - Cys1826) erősítették meg. Az aktív molekula élettartama jelentősen növekedett.
2. Az emlős sejtekben kifejezett F-VIII lassan termelődik (túl nagy mRNS – instabil, chaperon igény, ER – Golgi transzport). Méret csökkentés: a B-domén kihagyása. Aktív maradt, de a hiányzó glikozilek miatt még lassabban érlelődött. Megoldás: a hosszú B lánc helyett egy rövid összekötő szakaszt építettek be, rajta egy N-glikozilálási hellyel (Asn). → 15-25-szörös növekedés.

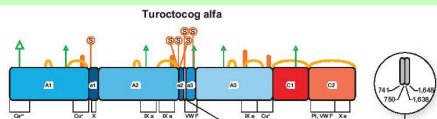


Figure 1 Protein structures and post-translational modifications reported for factor VIII and turoctocog alfa, respectively. Notes: Both are characterized by the same heavy chain and light chain and differ in the B-domain. Domains are indicated with capital letters and subdomains with lower case letters. Glycosylation sites are denoted by triangles, disulfide bonds are denoted by orange vertical lines, and "S" inside a circle indicates sulfated tyrosine residues. Brackets mark the areas of interaction with corresponding clotting factors, phospholipids (PL), von Willebrand factor (VWF), calcium (Ca²⁺), and copper (Cu²⁺) ions.

Rekombináns faktor VIII-at termelő fermentorok

