

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA

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 sejtenyésztéssel
 - Lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
 - termék biztosan biológiailag aktív.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

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

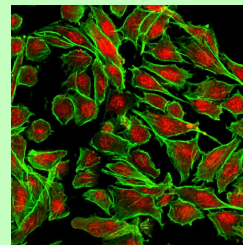
E. coli



S. cerevisiae



Chinese Hamster
Ovary (CHO)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

Funkció szerint:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Enzimek (általában orvosi célra; VIII faktor, tPA, aszparagináz)
- Antitestek (terápia - analitika; Herceptin, ProstaScint)
- Vakcinák (aktív és passzív immunizálás)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Therapeutic Protein Classes

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% |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Inzulin

Az inzulin emlőshormon; ez volt első rekombináns módszerrel előállított fehérje. A gyógyászati célra történő humán inzulin éves termelése eléri a 20 tonnát. Az inzulint a hasnyálmirigy (pancreas) Langerhans-szigetei termelik. Antagonista párja a glükagon, a két hormon együtt biztosítja a vércukorszint megfelelő szabályozását. Az inzulint először 1922-ben izolálták kutya pancreasból. Az aminosavszekvencia meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.

Nélkülözhetetlen a cukorbetegek számára.
 Diabetes: cukor anyagcsere zavar, mege-
 melkedik a vércukorszint.
 Inzulin: kettős peptidlánc, per os nem ad-
 ható, mert lebomlana → injekció, vagy in-
 halálás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

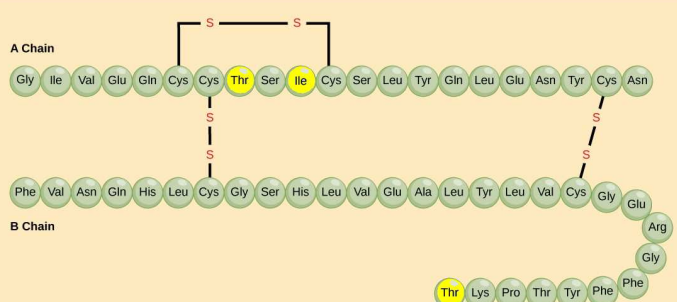
5

Inzulin szerkezete

Két aminosavláncból áll (21 + 30 ami-
 nosav), amelyeket két diszulfid híd köt
 össze és egy stabilizál.
 A humán és az állati inzulinok között
 csak néhány aminosav a különbség:

Amino acid comparison of insulin between selected species

| Species | Peptide chain and amino acid number | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|
| | A8 | A10 | A18 | B30 |
| Feline | Ala | Val | His | Ala |
| Bovine | Ala | Val | Asn | Ala |
| Porcine/Canine | Thr | Ile | Asn | Ala |
| Human | Thr | Ile | Asn | Thr |



tudomány Tanszék

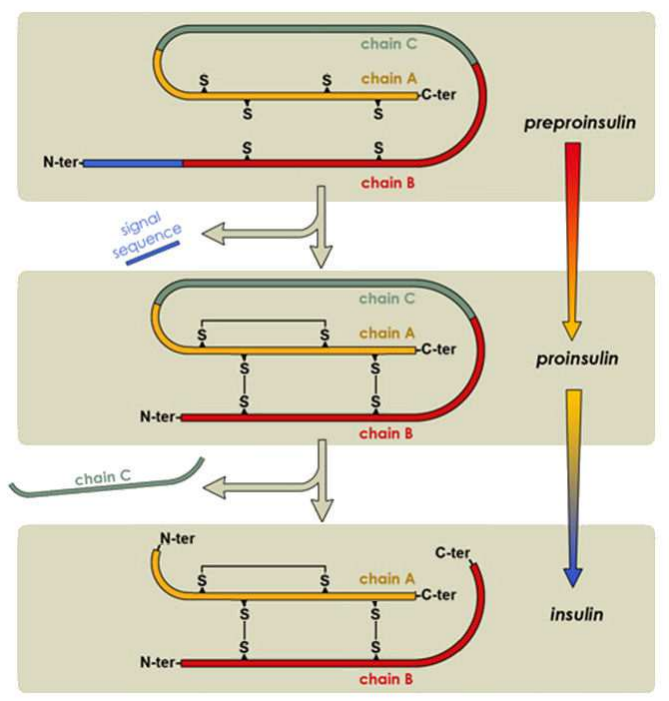
6

Az inzulin érése

Az inzulin egy gén terméke. Két intron kivágása után egy fehérjeláncként keletkezik (pre-proinzulin, 110 AS), ebből két szakasz (pre: 23 AS, C: 34 AS) eltávolításával alakul ki az aktív szerkezet.



BME

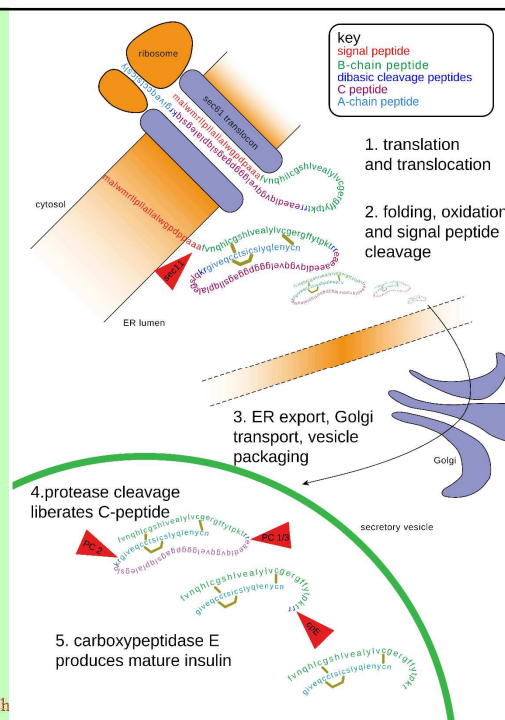


Az inzulin érése

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), valamint a két Arg levágása (karboxipeptidáz E).



BME Alkalmazott Biotech





Az inzulin előállítása

1. Kémiai szintézis aminosavakból
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná
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



Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

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

- Nincs elég belőle
- Az egy aminosav különbség immun-problémákat okozhat

Ezért inkább átalakítják, lecserélik a láncvégi alanint.

A tripszin szintén a hasnyálmirigyből nyerhető peptidáz, ami a bázikus aminosavak (Arg, Lys) melletti peptidkötést bontja → lecsípi a láncvégi alanint.

Egyensúlyi folyamat, visszafelé is megy, a lizinre ráköthet egy aminosavat.

Ha nagy fölöslegben treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.

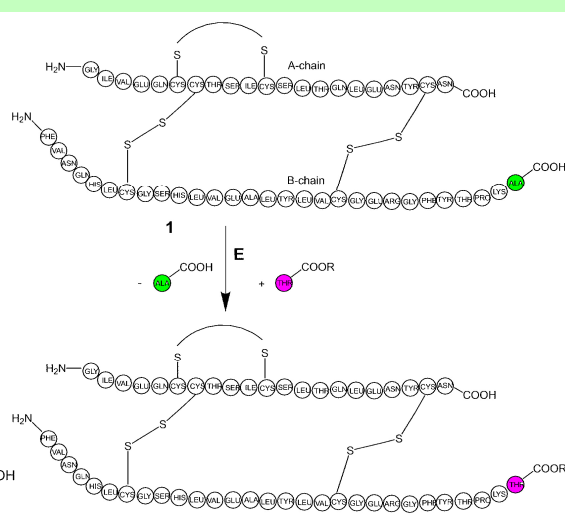
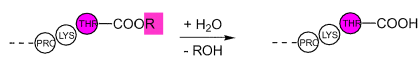


Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

Mellékreakció: az enzim a 22 Arg mellett is hasítana.

Lefékezése: 6-12 °C !
oldószeres közeg (etanol, DMF, DMSO) + <50% acetát puffer.

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a hu-



Inzulin fermentációs előállítása

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.

Az *E. coli* törzsbe a pBR322 plazmiddal viszik be a géndarabot. A Trp-operonból származó szakaszt (121 aminosav) egy Met-nal választják el az inzulint kódoló szakasztól. Ennek az a szerepe, hogy brómcján hatására (70%-os HCOOH-ban) a Met elbomlik, és a fehérje lánc elszakad.

Az –SH csoportokat szulfitolízissel ($\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, $\text{pH}>9$)

–S–SO₃ csoporttá alakítják → diszulfid hidak felbontása.

Összekapcsolás –SH vegyületekkel: (merkpto-etanol, ditiotreitolt)

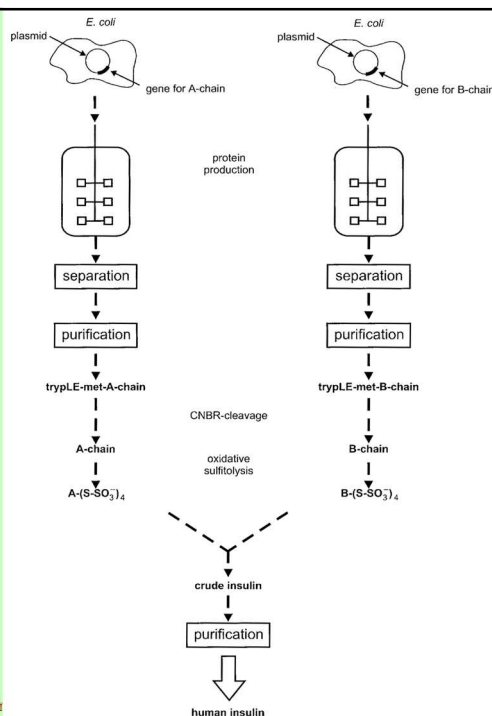


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Kettős fermentáció

A két láncot két külön plazmidba vitték be. Két *E. coli* törzs, két külön fermentáció, aztán összekapcsolás.



BME Alkalmazott Biotech

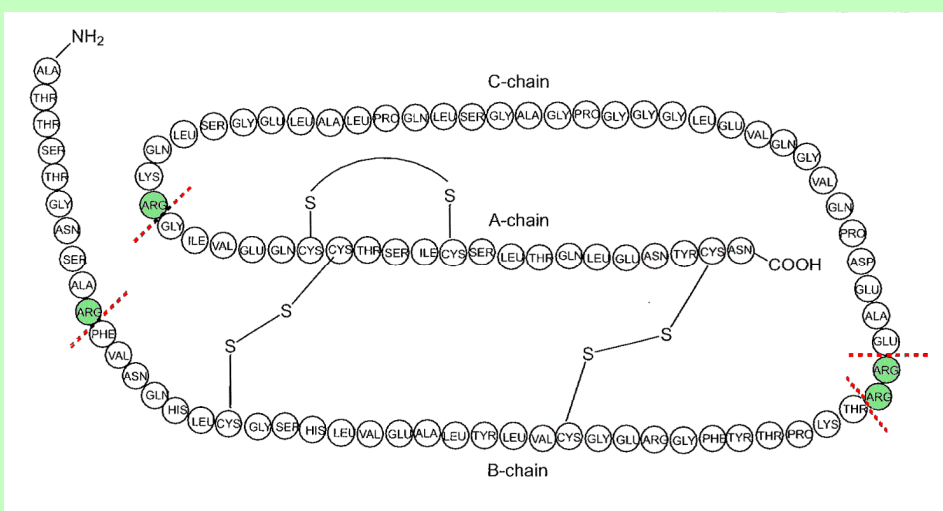
Inzulin fermentációs előállítása

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba. Nem-patogén coli törzs.

1. Szakaszos fermentáció (15 m³)
2. Sejteltárás (lízis), centrifugálás, szűrés
3. Refolding: a terciér szerkezet kialakítása megfelelő pufferben.
4. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
5. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)
6. Tisztítás →



A pre-pro-inzulin enzimes hasításai



Inzulin fermentációs előállítása

Az inzulin rekombináns előállítása *Saccharomyces cerevisiae*-val egyszerűbb, mert:

1. Az ER-ben megtörténik a szignálpeptid levágása és a folding
2. A Golgiban pedig a hasítások (PC-I,II helyett a Kex2-proteázok)
3. → a kész inzulin molekulát kell kinyerni és tisztítani.

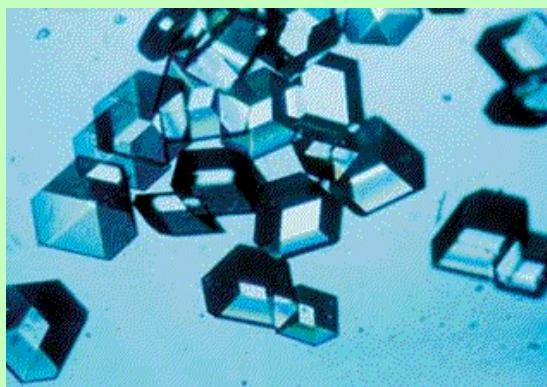


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

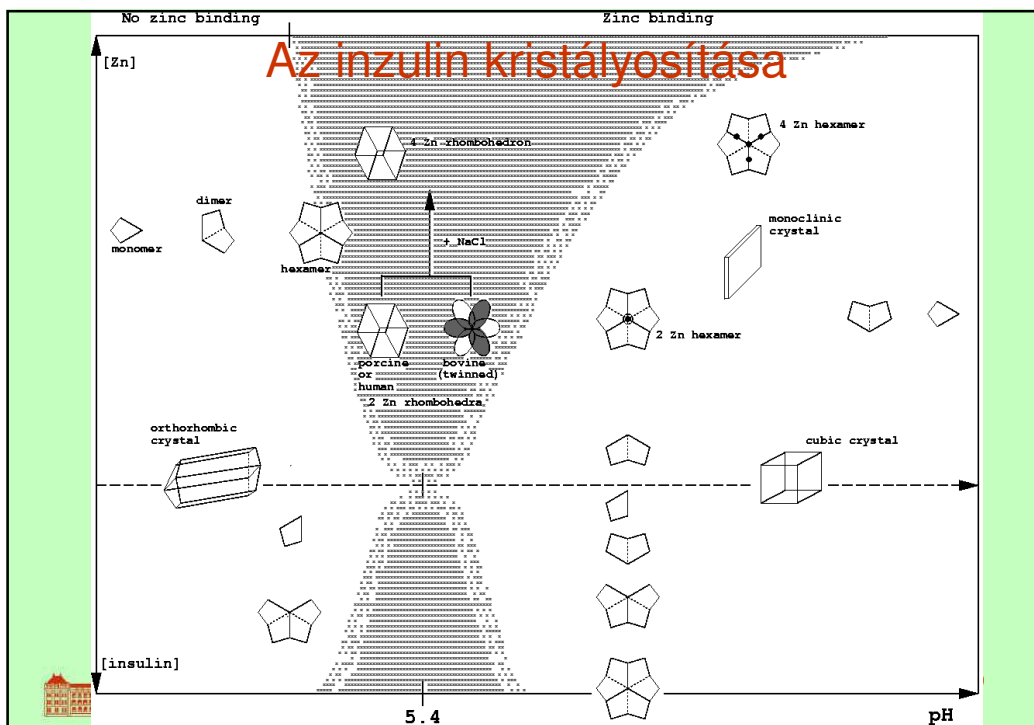
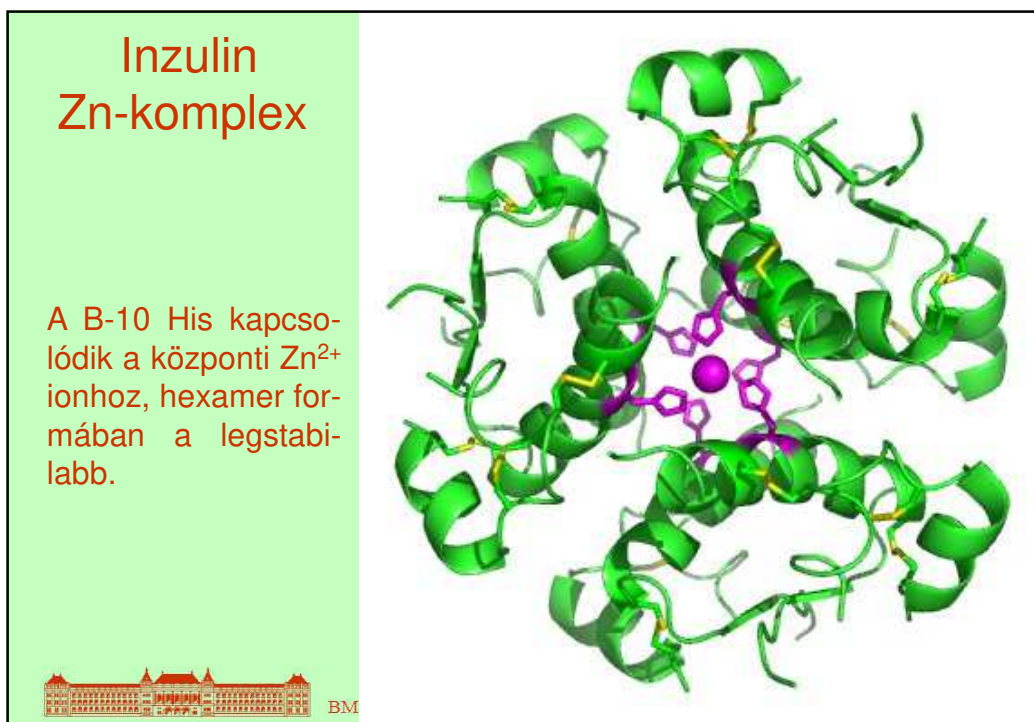
Inzulin feldolgozás

1. Gélszűrés (hasítási termékek és egyéb, kis peptidok kiszűrése)
2. Ioncsere kromatográfia,
3. Lehet: amorf csapadék vagy kristályos: Zn ionnal. A kristályforma függ a Zn koncentrációtól és a pH-tól (ld. táblázat). Így lassabban szívódik fel.
→ +5 °C, IEP = 5,4
(inzulin)₆Zn₍₁₋₂₋₄₎



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18



Inzulin analitika

A rec inzulin azonosítása (azonos-e mindenben a humánnal):

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



Módosított inzulin molekulák

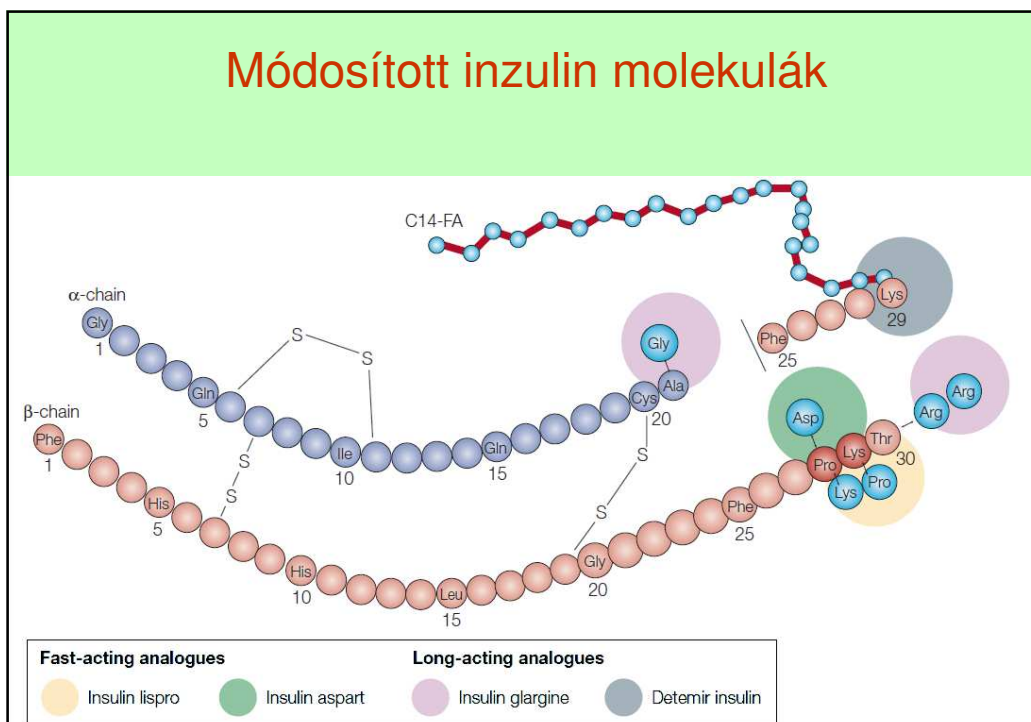
Gyors hatású inzulinok:

Lispro inzulin: a B28 Pro és 29 Lys sorrendjét megcserélték. Gyorsabban felszívódó anyag, ~15 perc alatt hat a szokásos 45-60 perc helyett. Eli Lilly, Humalog néven.

Aspart inzulin: a B28 helyen lévő Pro-t kicserélték Asp-ra. Emiatt nem alkot hexamert → jobban oldódik, gyorsabban felszívódik. *Saccharomyces cerevisiae*-vel termelik. NovoNordisk, NovoLog néven



Módosított inzulin molekulák



Módosított inzulin molekulák

Elnyújtott hatású inzulinok:

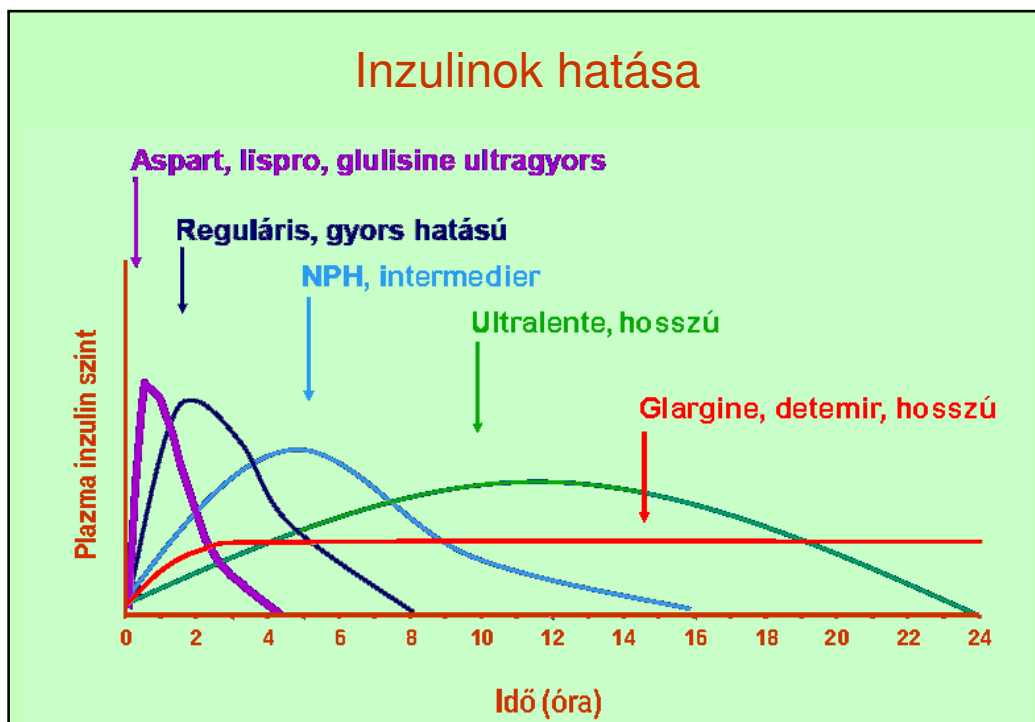
Glargin inzulin: (Gly + Arg) mindkét lánc C terminálisát átalakították: az A21 Asp helyére glicint kapcsoltak, a B lánc végére pedig két arginint. Ez megváltoztatja az izoelektromos pontot (5,4 \rightarrow 6,7) emiatt a szöveti pH-n aggregálódik \rightarrow lassabban szívódik fel (>24 óra). Sanofi-Aventis, Lantus néven.

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



Módosított inzulin molekulák

| Amino Acid Substitutions | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-----|---------------|-------------|
| | A- chain Position | B- chain Position | | | | |
| Source/ Type | A21 | B3 | B28 | B29 | B30 | B31 And B32 |
| Human | Asn | Asn | Pro | Lys | Thr | |
| Aspart | Asn | | Aspartic acid | Lys | Thr | |
| Lispro | Asn | | Lys | Pro | Thr | |
| Glulisine | Asn | Lys | Pro | Glu | Thr | |
| Glargine | Gly | | Pro | Lys | Thr | Arg |
| Detemir | | | | Lys | Myristic acid | |



Eritropoietin, EPO

Hormon, glikoprotein, a citokinek közé tartozik.

Emberi szervezetben: 85-90%-a a vesében képződik, 10-15%-a a májban.

A hormon funkciója: stimulálja a vörösvértestek (erythrociták) képződését a csontvelőben.

Képződését a vér alacsony oxigénkoncentrációja (hipoxia) indukálja (érzékelő: a vese kéregállományában)

A hormon normális koncentrációja a szérumban 10-20 mU/ml. Erős hipoxia esetén ez 5-10 000-re is emelkedhet.



Az EPO gyógyászati felhasználása

- vesekéreg-károsodás
 - anaemia tumor illetve kemoterápia következtében (csontvelő)
 - anaemia (veseelégtelenség, művese kezelés következtében)
A dialízissel 10-20 év után anaemia alakul ki, ekkor transzfúzió szükséges. Panaszok: gyengeség, hideg intolerancia, alvászavar, agyelégtelenség, stb. Az EPO javítja a beteg életminőségét.
 - akut vérzések
 - akut véresejt-pusztulás (HIV betegek, fertőzések, malária)
- Doppingszerként is használják az állóképességi sportokban (hosszútávfutás, sífutás, kerékpározás, néha labdarúgók is)



Az EPO szerkezete

Glikoprotein: 34 kDa, 165 aminosav, 55 szénhidrát egység

A szénhidrát rész a molekulatömeg közel 40 %-át teszi ki.

1 O-glikozid rész (Ser 126).

3 N-glikozid rész (Asn 24, 38, 83).

A cukorrész variábilis, a szialsavak mennyiségével arányos a biológiai aktivitás és a felezési idő.

A cukorrész felelős a molekula stabilitásáért is: hőmérséklet, pH, „carbohydrate engineering”

Bioszintézise: mRNS: 5 exon, 4 intron, eredetileg 193 aminosav

Posztranszlációs módosulások: az N-terminálisról 28 AS (szignálpeptid), a C-terminálisról Asp hasad le.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

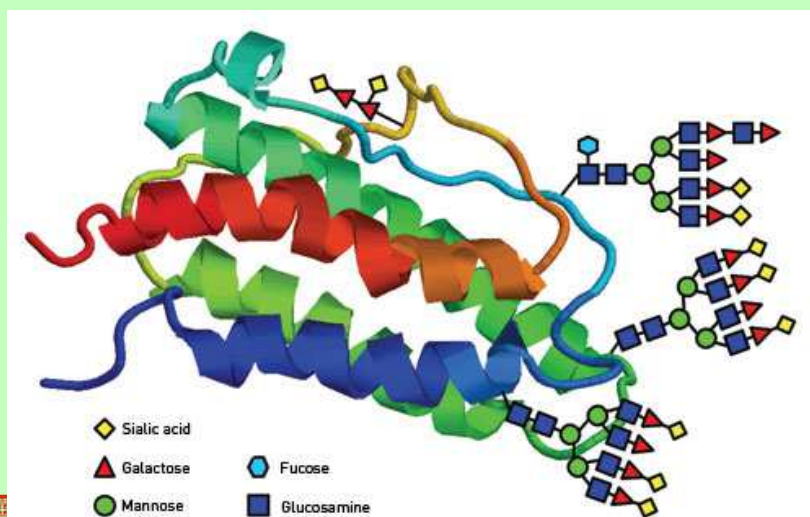
29

Az EPO szerkezete



Az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:



31

Az EPO előállítása

Ki lehetne vonni vérből és vizeletből, de nagyon kicsi a koncentráció és korlátozott az alapanyag. Ezért:

rekombináns fehérjeként célszerű termeltetni.

De ez nem megy prokariótákkal, mert:

- nem működik az intronok kivágása (ez még megoldható a kész mRNS reverz transzkripciójával)
- nem képesek a glikozilálásra

Ezért állati sejtekben, sejtenyésztésben kell megoldani.



32

Állati sejtenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

A szövetekből elkülönített, diszpergált sejtek szaporítása in vitro.

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, a tenyészet előregszik (szenescencia).

Csak a tumorsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kevésbé.

A sejtvonalak nagy része csak felülethez kötve növekszik (monolayer, kontakt gátlás) → speciális tenyésztő edények

Van néhány, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), mint a mikrobák → fermentorszerű készülékek.



Az állati sejtenyésztés tápoldatai

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

Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), + glutaminsav

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

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is → ezt újszülött állatok (borjú) vérszérumával biztosítják (5-15%). Ez szörnyű drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekszenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.



Módosított Eagle médium (MEM)

| Dulbecco's Modified Eagle's Medium | | | | | |
|--|-------------------|--------------|--------------------------------------|-------------------|--------------|
| Component | D5546 [1x] g/L | D5648 g/L | | D5546 [1x] g/L | D5648 g/L |
| INORGANIC SALTS | | | | | |
| Calcium Chloride | 0.2 | 0.2 | L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O | 0.10379 | 0.10379 |
| Ferric Nitrate • 9H ₂ O | 0.0001 | 0.0001 | L-Valine | 0.094 | 0.094 |
| Magnesium Sulfate (anhydrous) | 0.09767 | 0.09767 | VITAMINS | | |
| 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 | myo-Inositol | 0.0072 | 0.0072 |
| Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous) | 0.109 | 0.109 | Niacinamide | 0.004 | 0.004 |
| AMINO ACIDS | | | | | |
| L-Arginine • HCl | 0.084 | 0.084 | o-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 ₂ O | 0.042 | 0.042 | Thiamine • HCl | 0.004 | 0.004 |
| L-Isoleucine | 0.105 | 0.105 | OTHER | | |
| L-Leucine | 0.105 | 0.105 | D-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 | ADD | | |
| L-Threonine | 0.095 | 0.095 | Glucose | — | — |
| L-Tryptophan | 0.016 | 0.016 | L-Glutamine | 0.584 | — |
| | | | Sodium Bicarbonate | — | 3.7 |

A szérum aktív komponensei



Important Components of Serum and Their Probable Role in Cell Culture

| Component | Probable function |
|---|--|
| Proteins | |
| Albumin | Osmoticum and buffer |
| Fetuin | Lipid, hormone, mineral carrier |
| Fibronectin | Cell attachment |
| α ₂ -Macroglobulin | Cell attachment |
| Transferrin | Trypsin inhibitor |
| | Binds iron |
| Polypeptides | |
| Endothelial growth factor (ECGF) | Mitogen ^a |
| Epidermal growth factor (EGF) | Mitogen |
| Fibroblast growth factor (FGF) | Mitogen |
| Insulin-like growth factors (IGFI and IGFI) | Mitogen |
| Platelet-derived growth factor (PDGF) | Mitogen and major growth factor |
| Hormones | |
| Hydrocortisone | Promotes attachment and proliferation |
| Insulin | Promotes uptake of glucose and amino acids |
| Growth hormones | Mitogen—present in fetal sera |
| Metabolites and nutrients | |
| Amino acids | Cell proliferation |
| Glucose | Cell proliferation |
| Keto-acids (e.g., pyruvate) | Cell proliferation |
| Lipids (e.g., cholesterol) | Membrane synthesis |
| Minerals | |
| Iron, copper, zinc, and selenium | Enzymes and other constituents |
| Inhibitors | |
| γ-globulin | |
| Bacterial toxins from prior contaminants | |
| Chalones (tissue-specific inhibitors) | |

Az állati sejtenyésztés tápadatai

Törekednek a szérummentes, kémiai komponensekből össze-mért tápoldatok használatára, mert ezek olcsóbbak, állandó az összetételük, és reprodukálhatóbbak az eredmények, kisebb a fertőzés kockázata, könnyebb a fehérje termékek izolálása.

Pl. próbálkoznak a szérum részbeni vagy teljes pótlására hidrofil polimerekkel pl. dextránnal.

A sejtek érzékenyek a szerves ionok pontos koncentrációjára, pl az üveg edényekből kioldódó anyagokra, ezért vagy műanyag edényeket, vagy víztöltéssel többször autoklávozott üveget használnak tenyésztésükhöz.

A víznek is különlegesen tisztának kell lennie (ionmentes, szerves anyag-mentes, endotoxin-mentes, pirogén-mentes) és ezt is műanyag edényben tárolják.



Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

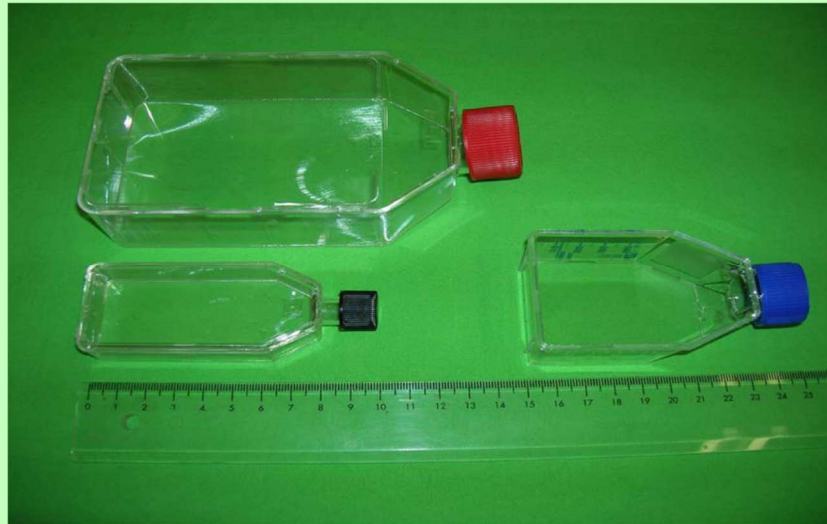
- nagyon kíméletes keverés,
- sok sejtvonal érzékeny a buborékokra

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtérfogatot át-öblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

Felület növelése

Multitray



roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

Forgó palackok/roller bottles



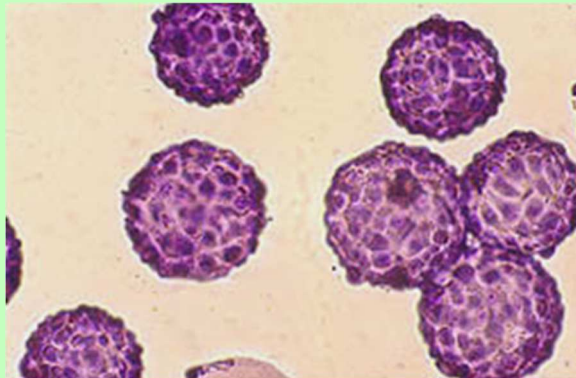
13

Mikrokarrires tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú fordulat
Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrieres felületi tenyészetekhez is használható.

Max. 10.000 liter (pl: interferon, tPA)

Energiabevitel kisebb, kevesebb O_2 kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket
Diffúziós levegőztetés: szilikon csövek falán át, nincs károsodás
Keverő: propeller, hajócsavar, lekerekített formák, 25-250rpm

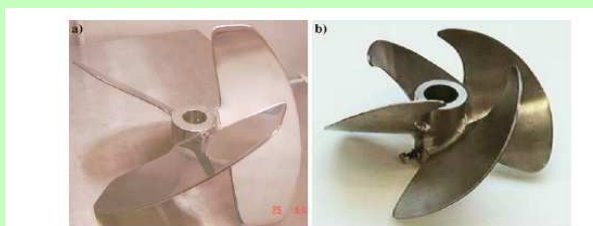


Fig. 13 (a) An ABEC 'elephant ear' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

Sterilitás

A baktériumok gyors szaporodási képességük miatt igen hamar túlnövik a tenyészetet (a savasodást az indikátor kimutatja). Gyakran tesznek a tápoldatba antibiotikumot (prokarióták ellen).

A vírusok elpusztítják a sejteket (forrása: a szövet izolátum vagy a savó). (HEPA szűrők)

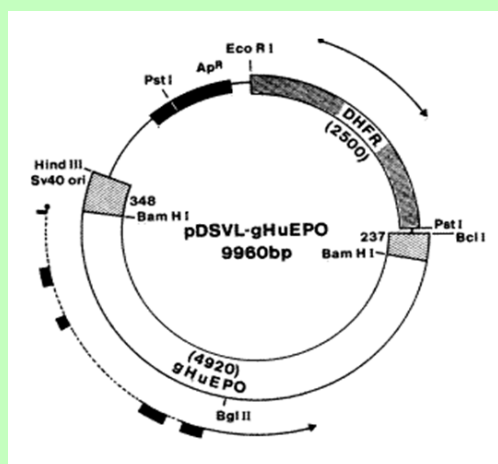


Az EPO génbevitel vektora

Az alap egy *E. coli* plazmid, ami tartalmazza a humán EPO gént. Ahhoz, hogy ez emlős sejtekben szaporodni tudjon, kell egy replikációs origó (SV40, majomvírusból).

A szelekcióhoz DHFR = dihidrofolát-reduktáz markergén (metotrexát rezisztencia)

Ez Ca-foszfáttal bevihető a CHO (= chinese hamster ovary) sejtbe



Eritropoietin

Upstream:

A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10 % szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.

4 nap után tápoldat csere: termelő közeg 1,5% szérumot tartalmaz.

3 naponként lefejtés.



EPO fermentációs üzem



Az eritropoietin feldolgozása

1. 100 l koncentrációja 2 l-re hollow-fiber ultraszűrővel
2. Immunoszorbens EPO megkötés (MAB-affinitás krom.)
3. Elúció: Na-acetáttal (2800× tisztítás). Az aktivitás 84 %-a megmarad. A MAB oszlop ~30× használható.
4. Gélszűrés Sephadex G-100 oszlopon (3200× tisztítás). Az aktivitás 66 %-a megmarad.
5. Adszorpció hidroxipatiton, (3260× tisztítás) Az aktivitás 52 %-a megmarad.
6. A gyógyszert ampullázzák pufferben és stabilizálják humán szérum albuminnal.
7. A termék tisztaságát SDS-PAGE-sel, HPLC-vel, és MAB-ELISA-val ellenőrzik.



Eritropoietin készítmények

Az alábbi rekombináns EPO-k ugyanazon szénhidrát-izoformák eltérő összetételű keverékei:

EPO α : CHO sejtvonallal termeli az Amgen.

EPO β : CHO sejtvonallal termeli a Roche

EPO δ : humán fibroszarkóma sejtvonallal termelik, a benne lévő saját EPO gént kapcsolták be CMV promóterrel.

EPO ω : BHK sejtvonallal termeli az Elamex/Baxter

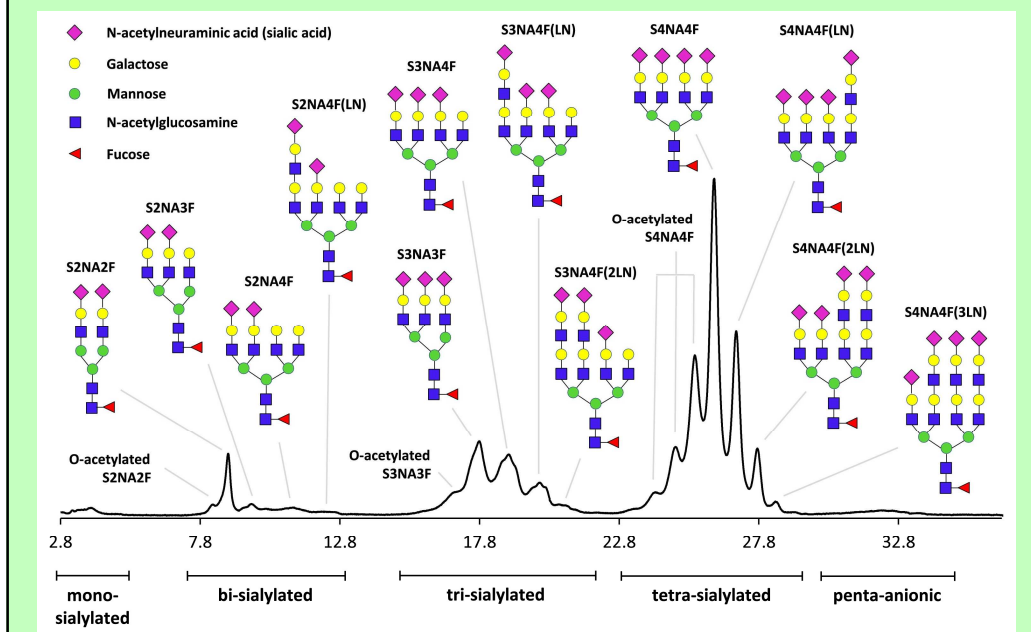
A különböző variánsok között kis különbségek vannak az izoforma arányban, ezek kapELFO-val, IEF-sal, MS-sel szétválaszthatók és azonosíthatók. Az eltérés a cukromonomerekben, illetve a cukorláncok elágazásaiban van, a szialsavak elhelyezkedése is eltérő. Emiatt a biológiai hatás, illetve ennek időbeli lefutása is különbözik.



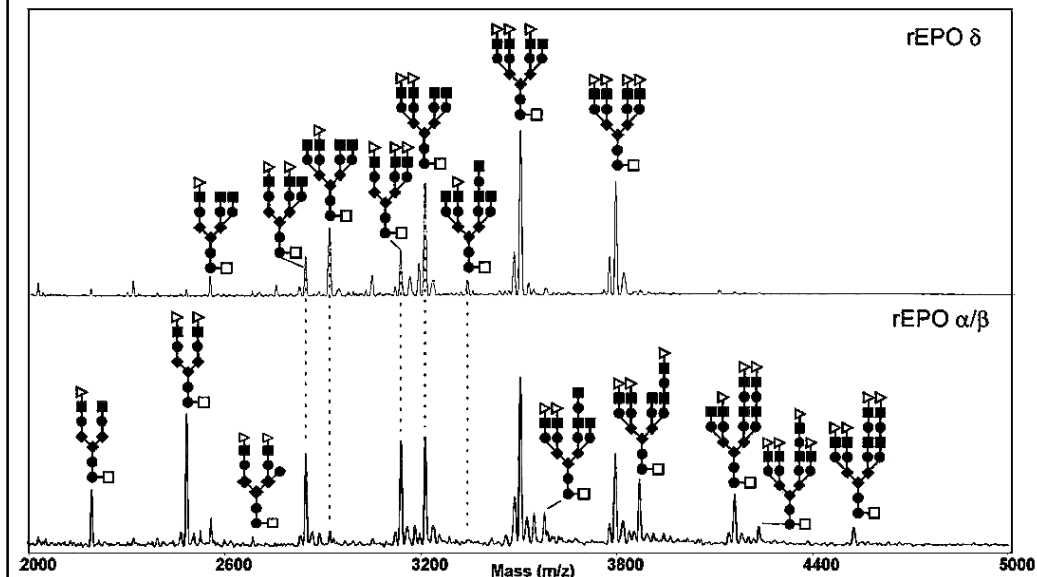
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

51

Eritropoietin izoformák - kapELFO

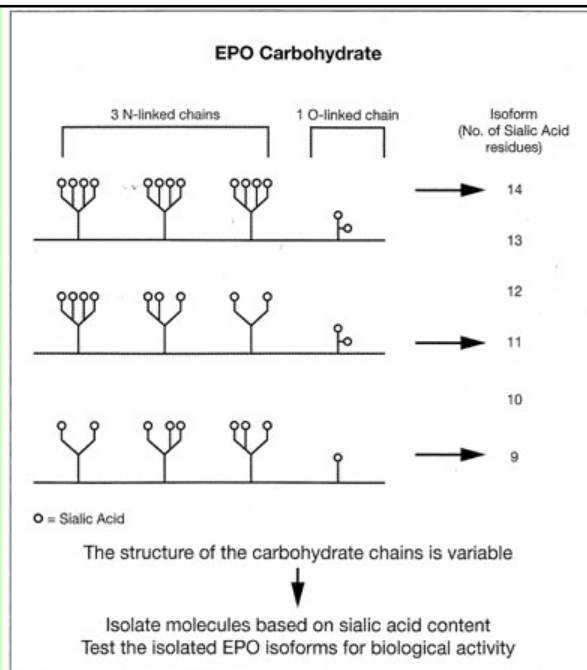


Eritropoietin izoformák - MS



EPO izoformák

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



BME Alkalma:

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

EPO izoformák

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

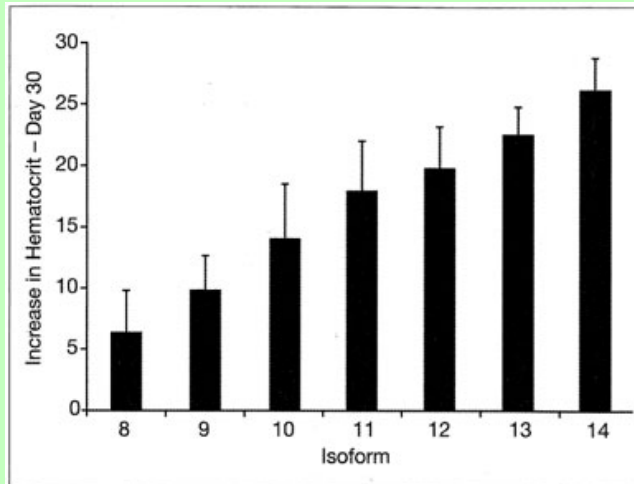


Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/55)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Továbbfejlesztett EPO készítmények

Darbepoetin alfa/Aranesp (Amgen): módosított EPO, amelyben öt aminosavat cseréltek ki: Asn-30, Thr-37, Val-87, Asn-88 és Thr-90, ezzel újabb két N-glikozilációs helyet alakítottak ki, → +két cukorláncot tartalmaz, ettől a szialsav-tartalma nagyobb → 3-szorosára nőtt a molekula felezési ideje.

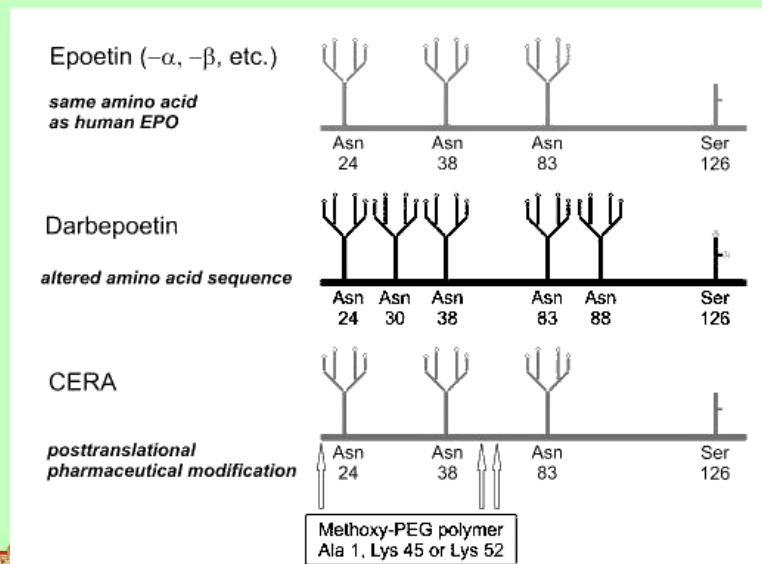
CERA (Continuous erythropoietin receptor activator): az EPO-ra PEG láncot kötöttek → a felezési idő a húszszorosára nőtt (Roche)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

56

Továbbfejlesztett EPO készítmények



57

Továbbfejlesztett EPO készítmények

| | Epoetin alpha | Epoetin beta | epoetin omega | Epoetin delta (Discont.) | Epoetin theta (stand-alone product) | Epoetin zeta | Darbepoetin | Methoxy-PEG-Epoetin beta |
|-----------------------------------|---|--|--------------------------------------|--|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Clinical use (Brand names) | Epogen (Amgen), Procrit (Janssen-US), Eprex (Janssen-non-US), Erypo, ESPO (Kirin) | Recormon (Roche-US), Neo-Recormon (Roche-non-US), Epogin (Chugai-non-US) | Repotin (Bioclones), EPOMAX (Baxter) | Dynepo (Shire)-unfavorable market conditions | Biopoin (CT Arzneimittel), Eporatio and Ratioepo (Ratiopharm) | Silapo (Stada) | Aranesp (Amgen) | Mircera (Roche) |
| Cell substrate of origin | Chinese hamster ovary Cell | Chinese hamster ovary Cell | baby hamster kidney cells | Human cell line | Chinese hamster ovary Cell | Chinese hamster ovary Cell | Chinese hamster ovary Cell | Chinese hamster ovary Cell |
| Terminal half life | 6-9 hr | 6-9 hr | 6-9 hr | 6-9 hr | 6-9 hr | 6-9 hr | 25hr | 130-140 hr |
| Mass (Dalton) | 30.4 | 30.4 | <30 | <30 | 30.6 | ~30.4 | 37.10 | 60.4 |