

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)



Véralvadási fehérjék előállítása

Gyógyszerként előállított fehérjék:

Alvadási oldal: Faktor VIII, Faktor IX

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



Vérrögoldás (fibrinolízis, trombolízis)

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

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, aspirin stimulálja, mellékhatások léphetnek fel)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

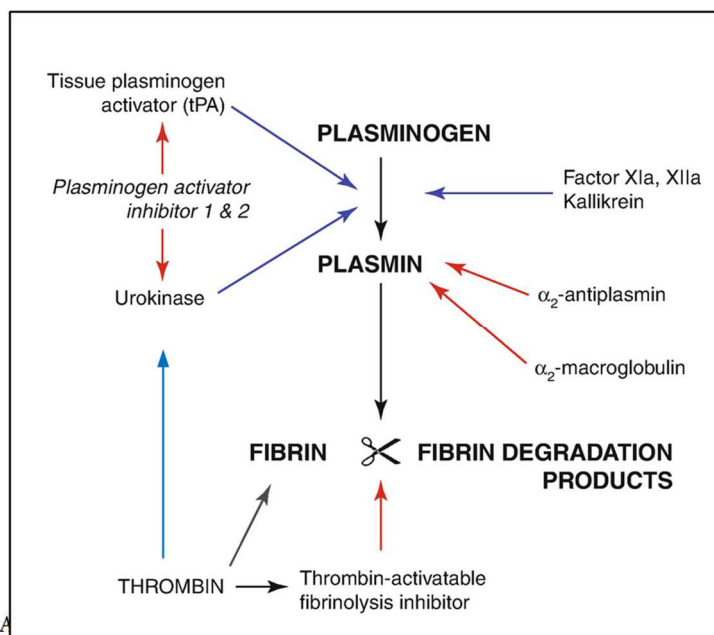
3

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

Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)

Nagyon specifikus Ser proteáz, a plazminogénen az Arg-Val kötést 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.

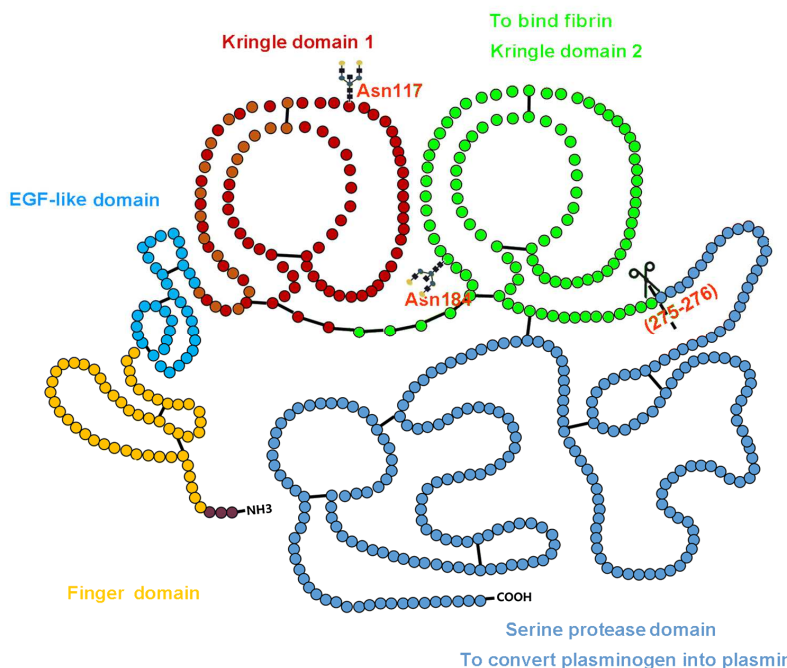
Az EGF-like (epidermisz növekedési faktor-szerű) domén és a finger (ujj) domén (43 AS) különféle membrán receptorokhoz való kötődésre alkalmas.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)



6

A rekombináns tPA előállítása

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

A gént melanoma (bőrrák) 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,

transzfekeció: CHO DHFR-deficiens sejtekbe

Sok kópia épült be (Ca-foszfátos módszer)



A rekombináns tPA előállítása

Tápközegek:

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

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



Továbbfejlesztett rekombináns tPA-k

A nagy és összetett fehérje módosításával és egyszerűsítésével több cég is foglalkozott. Az eredeti molekulát (Alteplase) átala-
kítva:

Tenecteplase: két ponton változtatták meg a szerkezetét: a má-
sodik Kringle doménon az N-glikozilációs helyet 14 aminosavval
„odébb tették”, illetve a proteáz doménben négy bázikus amino-
savat (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

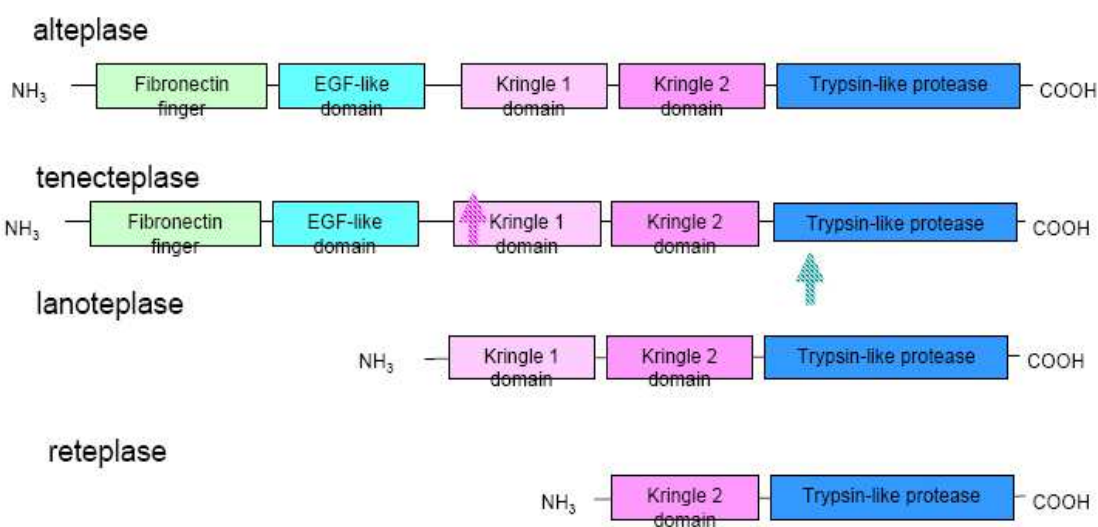
Retepulse-nál hármat hagytak el a szerkezetből. A másik Kringle
domént viszont nem lehet kihagyni, mert a tPA ezen keresztül
kötődik a fibrinhez, ami nagymértékben megnöveli az aktivitást.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

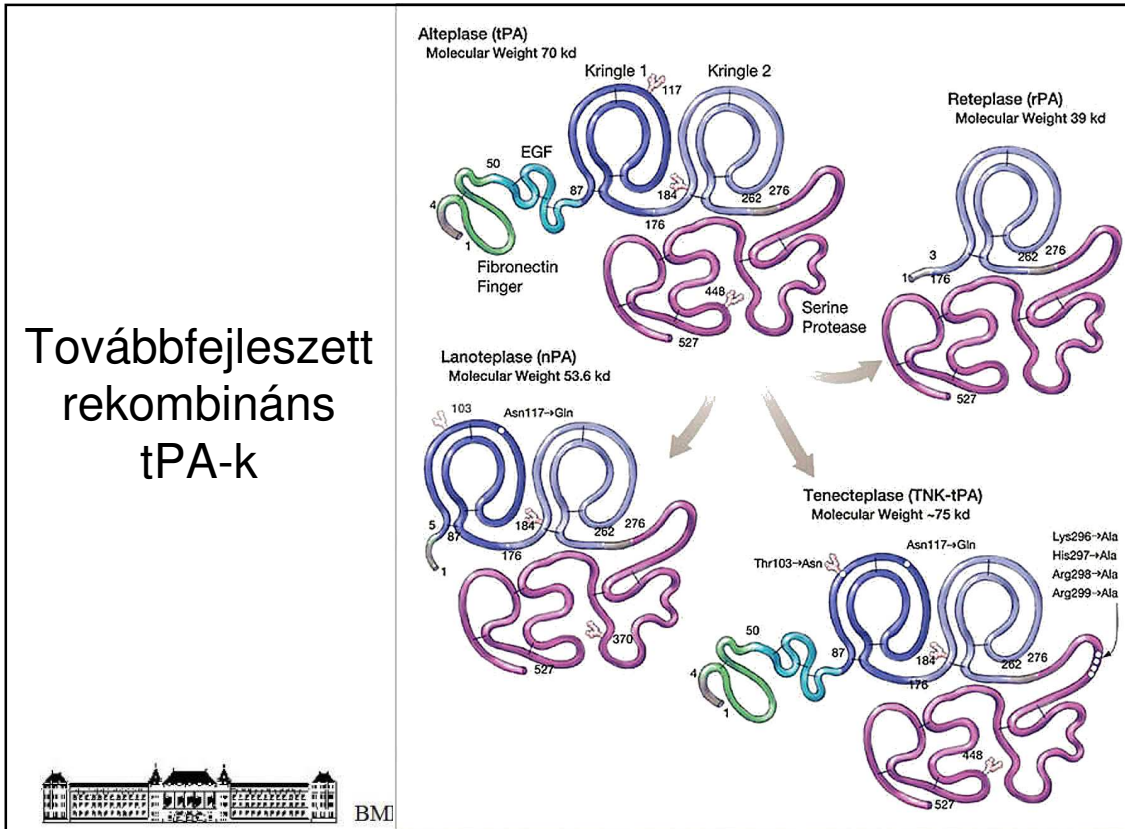
11

Továbbfejlesztett rekombináns tPA-k



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12



Antihemofíliás faktor = Faktor VIII

Véralvadási faktor, hiánya vérzékenységet okoz. Génje az X kromoszómán helyezkedik el → a nemhez kötött recesszív öröklődés 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 Ca^{2+} -nal együtt (= tenáz komplex) van proteolítikus hatása, a F-X-et aktiválják.

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



A Faktor-VIII érése

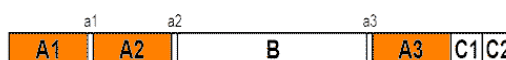
Eredetileg egyetlen hatalmas glikoprotein láncként szintetizálódik (300 kDa, 2332 aminosav), amely háromféle típusú doménből (A, B, C) áll.

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 fémion (pl. Mg²⁺) tartja össze. A vérben ez az inaktív forma kering, von Willebrandt faktorhoz kötött állapotban.



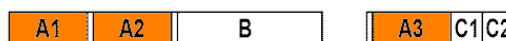
BME Alkalmazott Biotec

Synthesis: Single chain protein MW 330 kDa



Cellular Protease: ↑ ↑

Secretion: Heterodimer MW 280kDa



Thrombin: ↑ 372 ↑ 740 ↑ 1689

Activation: Heterotrimer MW 166kDa



APC: ↑ 336 ↑ 562

Inactivation of FVIIIa by APC generates fragments of both A1 and A2. Inactivation is also caused by dissociation of A2 from A1.

A Faktor-VIII aktiválása

Ha megindul a véralvadás, 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 véralvadásban.

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 inaktiválja a faktort.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

A Faktor-VIII ligandumok

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

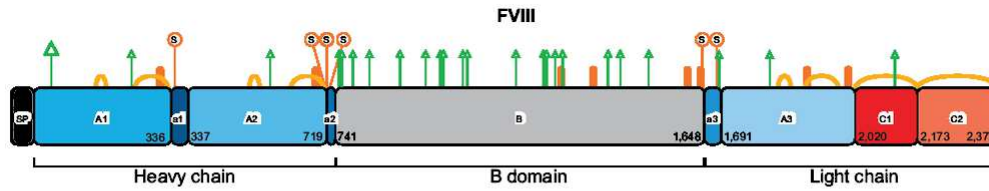
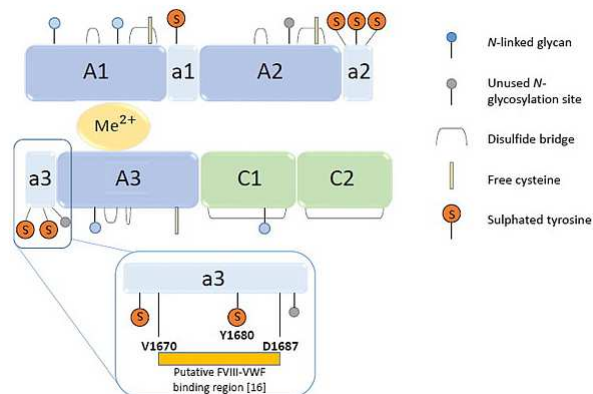


Figure 1 Protein structures and post-translational modifications reported for factor VIII and turoctocog alfa, respectively.
Notes: Both are characterized by the same heavy chain and light chain and differ in the B-domain. Domains are indicated with capital letters and subdomains with lower case letters.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



A Faktor-VIII ligandumok

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



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

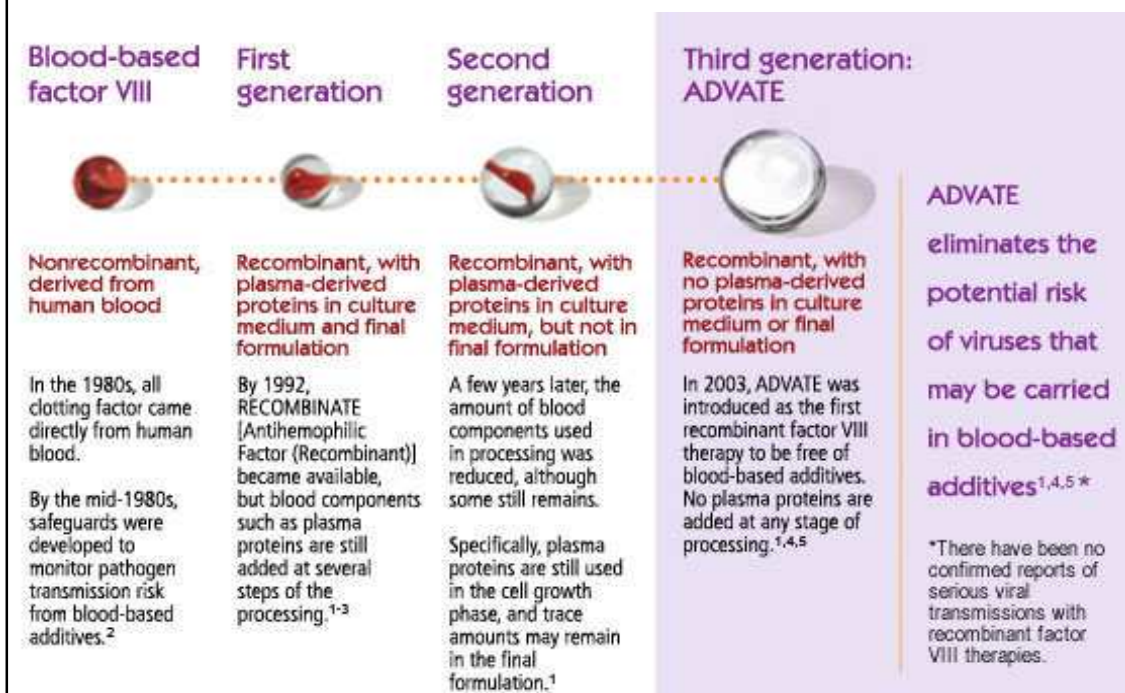
A Faktor-VIII gyártása

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 rekombináns Faktor-VIII fejlesztése



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.

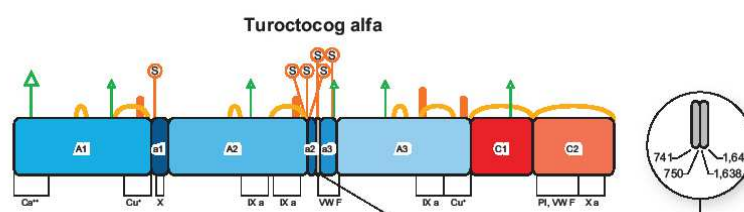


Figure 1 Protein structures and post-translational modifications reported for factor VIII and turoctocog alfa, respectively.

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 arches, reduced cysteine residues 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 (PI), von Willebrand factor (VWF), calcium (Ca^{2+}), and copper (Cu^+) ions.

A Faktor-VIII gyártása

Fermentáció:

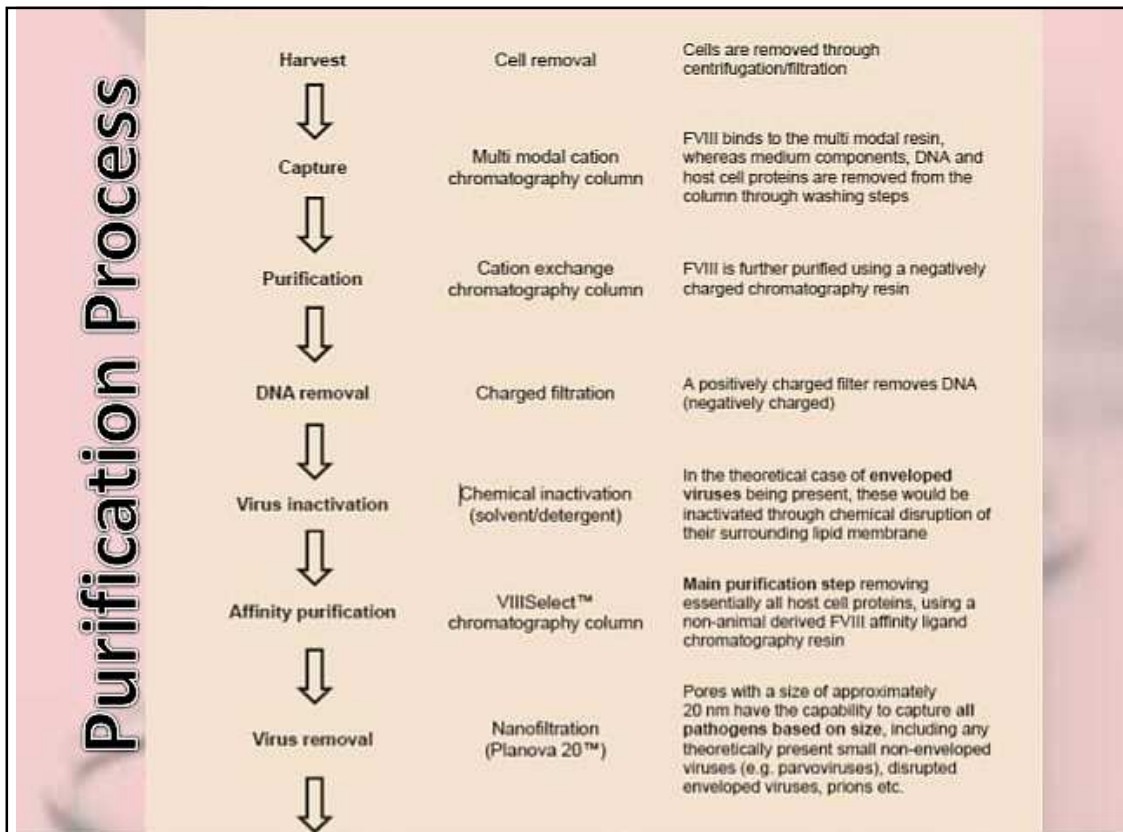
Tucatnyi technológiát dolgoztak ki, CHO, BHK és HEK sejtvonallakkal. Folytonos és perfúziós technikák, m^3 -es nagyságban.

Feldolgozás:

változatos módszerek, de mindegyikben van:

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





Rekombináns faktor VIII-at termelő fermentorok

