

## 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)

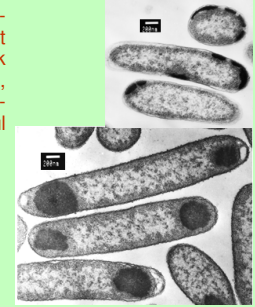


## Fehérje zárványtestek

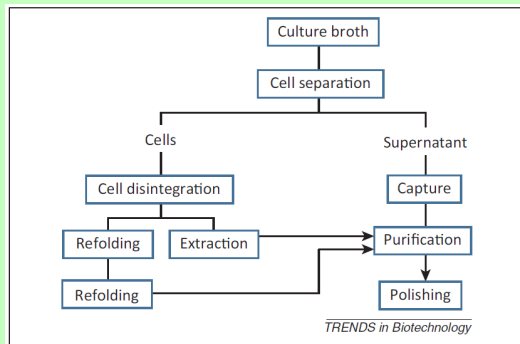
A rekombináns fehérjéknél gyakran előfordul, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem szilárd szemcséket, zárványokat alkot a sejteken belül. Csak prokariótáknál fordul elő, eukariótáknál nem. (humán: genetikai betegségek)

*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



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>)

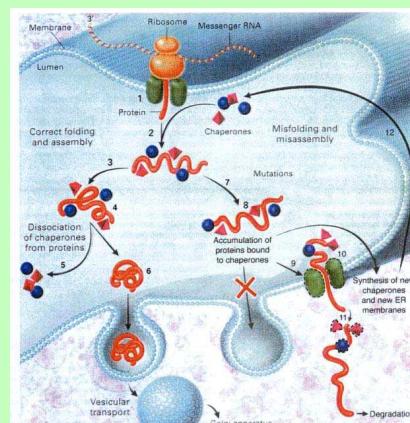


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## Folding

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



BME

## 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 redukív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotreitrol, dithioeritrol, redukált glutation, merkapto-etanol, ciszteín, cisz-tamin.  
Tisztítás: ha az IB pasztát jól kimosták, alig szükséges. A foldingnál úgyis felhígul.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

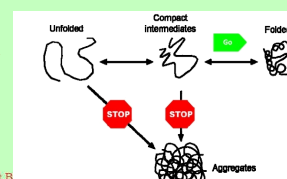
## In vitro folding

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

$$\frac{dc}{dt} = k_f c$$

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

A lehetséges mellékreakciók megakadályozása:



BME Alkalmazott B

## 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



## In vitro folding

A pufferben még:

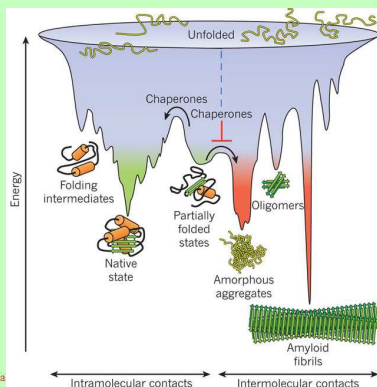
- pH puffer (pl. 0,1-0,2 M Tris), enyhén lúgos (pH=7,5-8,5), → az -SH-k részben tiolát anionná alakulnak
- Kaotrópok kis koncentrációban
- Arginin (0,4 – 1 M)
- Detergensek (ionos vagy nemionos, pl. Triton-X)
- EDTA (2 – 10 mM) kelátképző
- PMSF (~0,1 mM) proteáz-gátló
- Esetleg chaperon-hatású molekulák: alkil-karbamid, PEG, lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek
- 4–20 °C, 24-48 óra



## 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.



## 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.

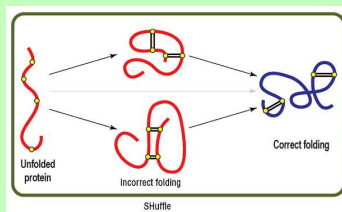


## In vitro folding

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



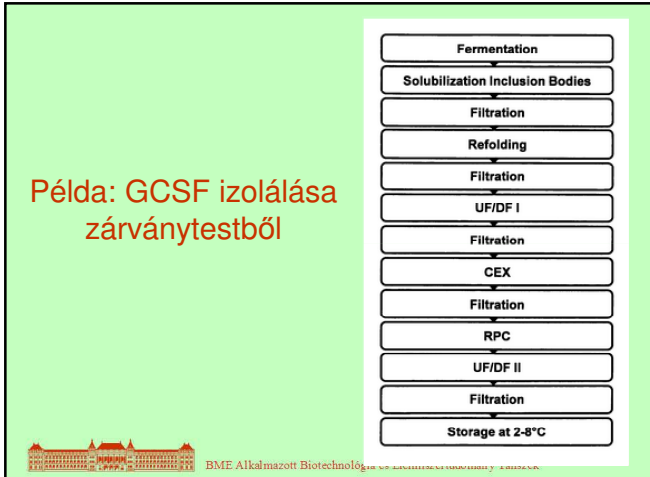
## Egyéb folding technikák

**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.



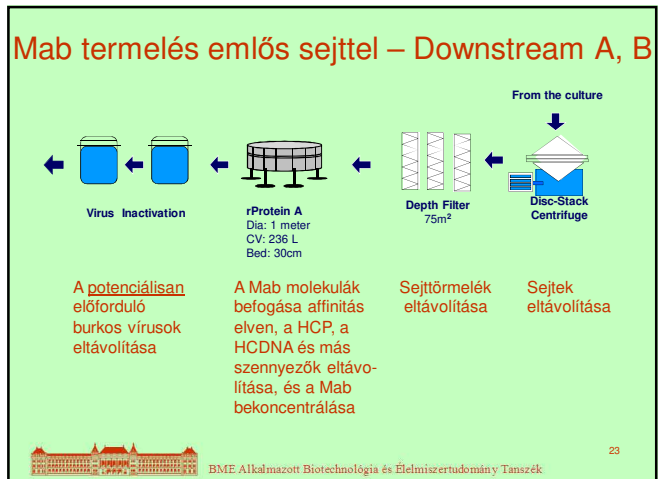


**II/2/b termékizolálás állati sejt tenyészetből**

A jellemző műveleti sorrend (de nincs köbe véseve):

- 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.

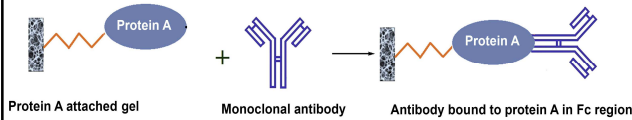
Sejteltérésre sincs szükség, a termék a lében található.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

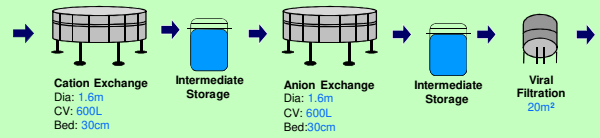
### B. Koncentrálás (capturing)

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



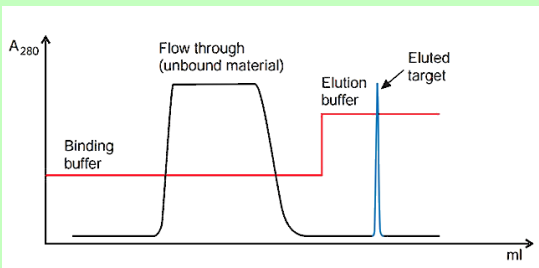
Savas töltésű variánsok és HCP eltávolítása

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         |

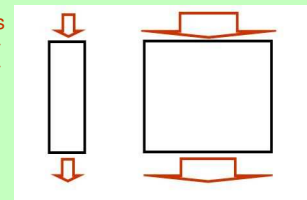
Kismértékű kitermelés csökkenés, de a minőségi paraméterek nem változtak.

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>   |  |  |  |
| Glycan pattern  | G0   | 27-52 corrected area%                          | 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<br>99.6%                        |
|   | Heavy chain + light chain altogether             | at least 97%                                   | Chip electrophoresis (reducing)/ In-house<br>99.7% |
| Mab charge variants and impurities                                      | Main peak:                                       | at least 45%                                   | 56.1%  |
|   | Sum of (acidic) impurities before the main peak: | n.m.l. 15%                                     | Ion-exchange HPLC/ In-house<br>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**

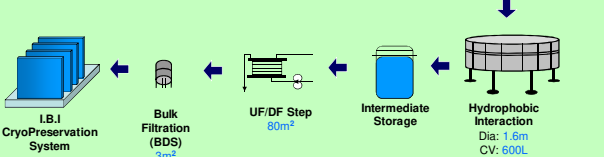
- Solvens – Detergens eljárás
- β-Propiolakton
- Jód

**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° C-on (burok leoldása)  
 Extrakció növényi olajjal (pl. steril szójaolaj)  
 Adszorpció tisztítás (C18 tölteten)  
 Ultraszűrés




37 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

| <u>Modellvírusok</u>     | <b>HIV</b><br>env.,RNA | <b>Herp. vir.</b><br>env.,DNA | <b>BVDV</b><br>Mod.f.Hep.C | <b>Polio</b><br>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) | > 21,1                 | <b>19,9</b>                   | <b>15,5</b>                | <b>15,5</b>                |

**HBV:** Nanofiltration reduction of 4 log  
Remaining steps > 6,5 log (chimpanzees)  
 Total reduction: > 10 log




40 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### 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.




38 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Sterilszűrés

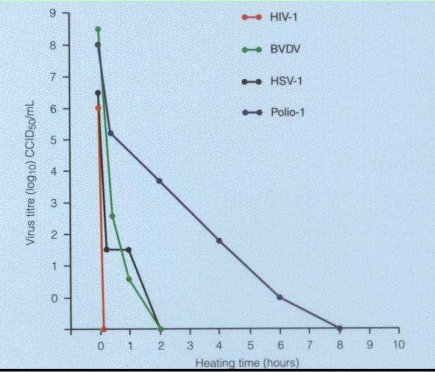
A vírusmentesítés után nincs sok értelme, de a hatóságok előírják.

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.




41 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Beriplex P/N® pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



| Heating time (hours) | HIV-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL) | BVDV (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL) | HSV-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL) | Polio-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL) |
|----------------------|--|---|--|--|
| 0                    | 8.5  | 8.5   | 8.5  | 8.5  |
| 0.5                  | 0  | 0   | 6.5  | 6.5  |
| 1                    | 0  | 0   | 1.5  | 5.5  |
| 2                    | 0  | 0   | 0  | 4.5  |
| 4                    | 0  | 0   | 0  | 2.5  |
| 6                    | 0  | 0   | 0  | 1.5  |
| 8                    | 0  | 0   | 0  | 0  |



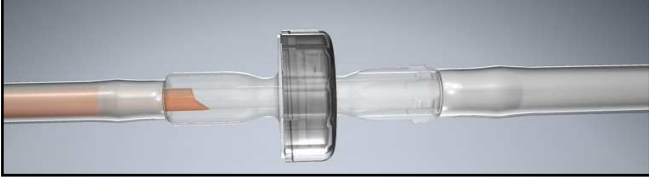
39

### 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<br>304L                           |
| Surface Finish: | Bad Blasted                                       |
| Volumes:        | 100   200 L, 500 L,<br>1,000 L                    |
| Dimensions      |   |
| 100   200 L     | 792 × 592 × 720 mm<br>(31.2" × 23.3" × 28.3")     |
| 500 L           | 1192 × 792 × 856 mm<br>(46.9" × 31.2" × 33.7")    |
| 1,000 L         | 1192 × 992 × 1235.5 mm<br>(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

