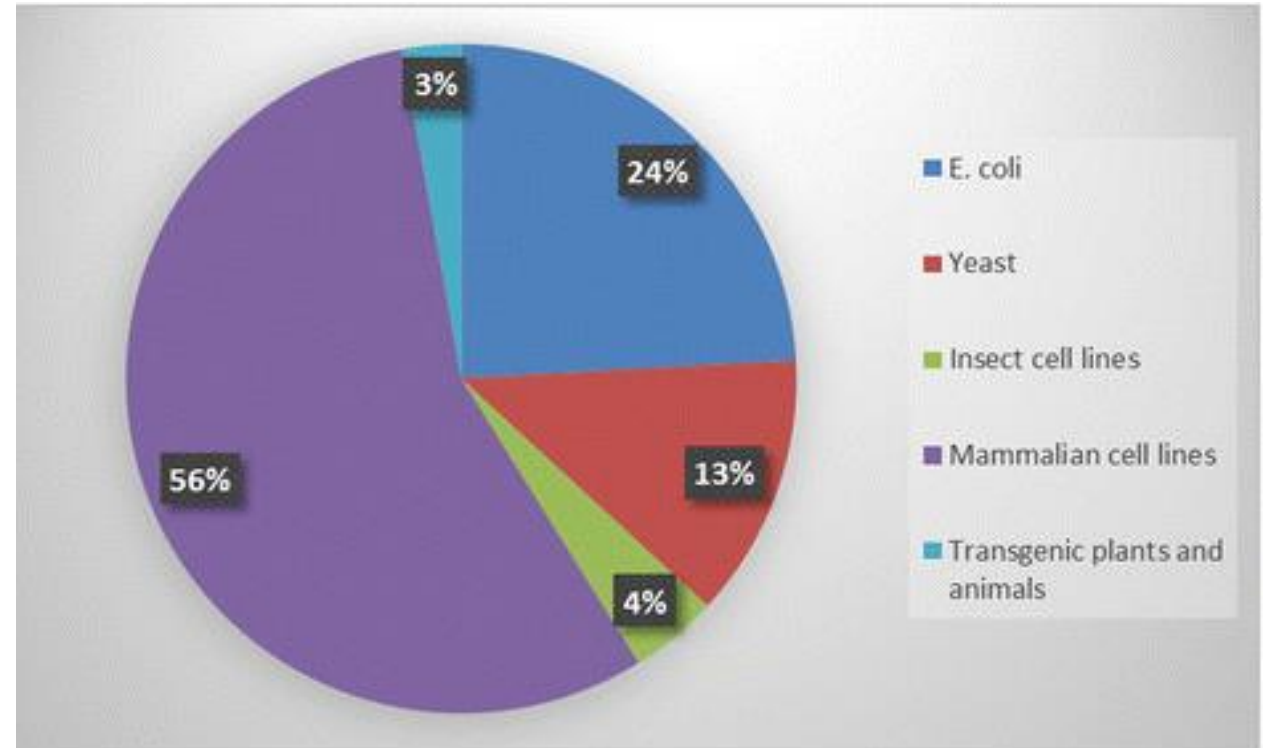


Produkce bioléciv

Ing. Eva Benešová, Ph. D.
Eva.Benesova@vscht.cz

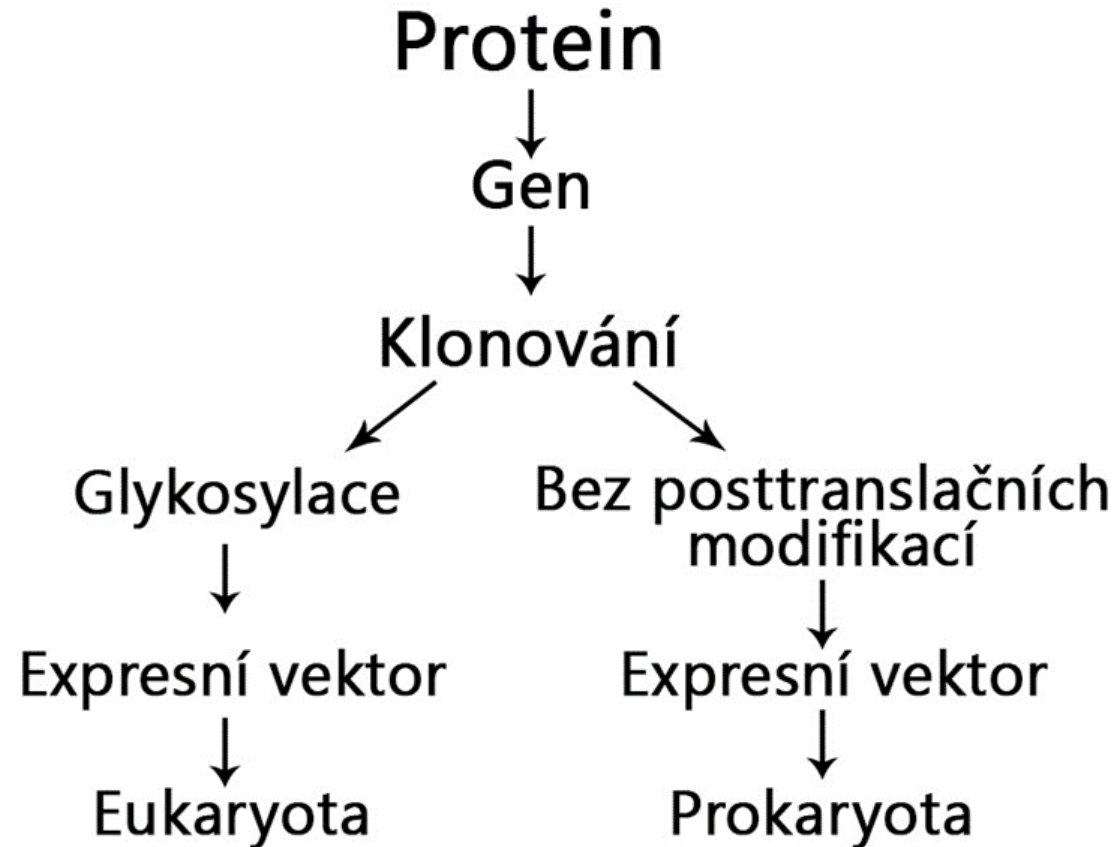
Expresní systémy využívané k produkci bioléciv

- Bakterie
- Kvasinky
- Rostlinné buňky
- Živočišné buňky



Výběr expresního systému záleží na:

Základní strategie



E. coli

VÝHODY

Modelový organismus
Velmi dobře prostudována
Jednoduchá, rychlá a levná kultivace
Méně citlivá na různé vlivy než eukaryotní systém
Vysoké výtěžky

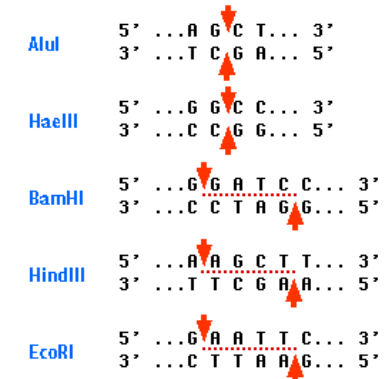
NEVÝHODY

Neschopnost posttranslačních modifikací
Expese do intracelulárního prostoru
Přítomnost lipopolysacharidu v membráně
Odlišná kodon usage
Inkluzní tělíška (mají i své výhody)

- Různě upravené kmeny *E. coli*
- Vhodná pro proteiny bez posttranslačních modifikací

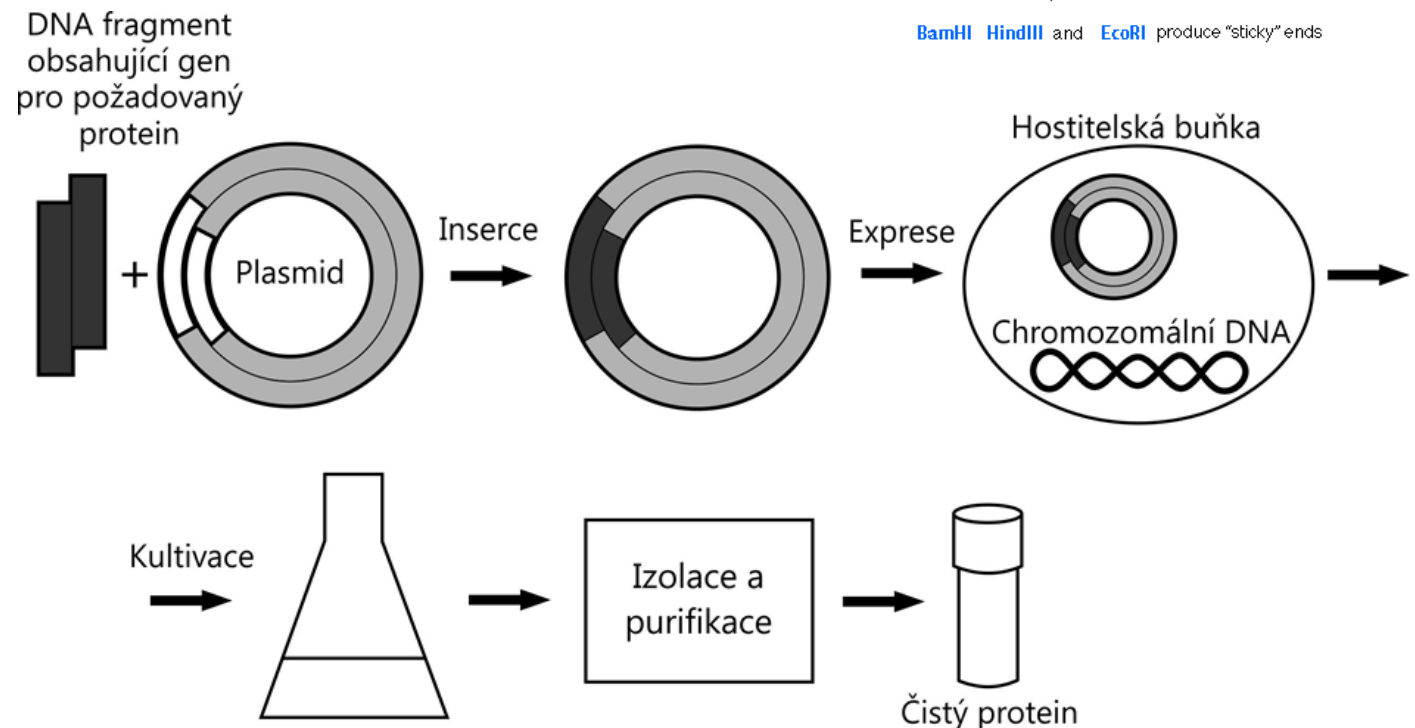
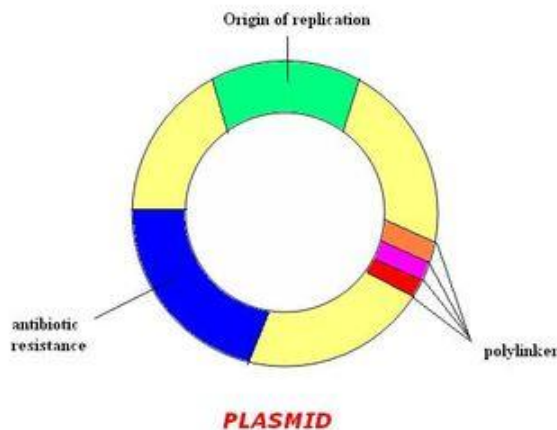
Expese rekombinantních proteinů v *E. coli*

- **Příprava DNA fragmentu obsahujícího gen požadovaného proteinu**
- nedochází k sestřihu mRNA !!!
- **Vložení insertu do expresního vektoru**
- obvykle se jedná o plasmid
- plasmidy jsou schopné autonomní replikace a zpravidla obsahují geny, které kódují enzymy zvýhodňující hostitelskou buňku
- promotor, počátek replikace, selekční marker, klonovací místo (restriční endonukleasy)
- **Připravený expresní plasmid je následně vnesen do hostitelské buňky**
- Transformace (pozor na pojem transfekce)
- Elektroporace, využití CaCl_2 a teplotního šoku (kompetentní buňky)
- **Kultivace**
- Médium se selekčním markerem (ampicilin)



AluI and **HaeIII** produce blunt ends

BamHI **HindIII** and **EcoRI** produce "sticky" ends



Eukaryotní expresní systémy

- Kvasinky
- Tkáňové kultury
- Rostliny
- zvířata

Výhody x Nevýhody

- Méně účinné než bakteriální
- Citlivost na kultivační podmínky
- Pomalý růst
- Cena

- Sestřih mRNA
- Posttranslační modifikace
- Možnost extracelulární exprese

Produkce na pomezí - v kvasinkách

Saccharomyces cerevisiae a *Pichia pastoris*

VÝHODY

Z eukaryotního systému ekonomicky nejvýhodnější

Možnost produkce posttranslačně modifikovaných proteinů

Generační doba cca 2h

Dobrá znalost produkčních kmenů (zvláště *S. cerevisiae* – povolení v potravinářských výrobcích)

Možnost exprese do média

NEVÝHODY

Rozdíly v glykosylacích (hyperglykosylace)

Oproti *E. coli* nižší výtěžky



P. pastoris

- Vyšší genetická stabilita
- Glykosylace podobnější lidským

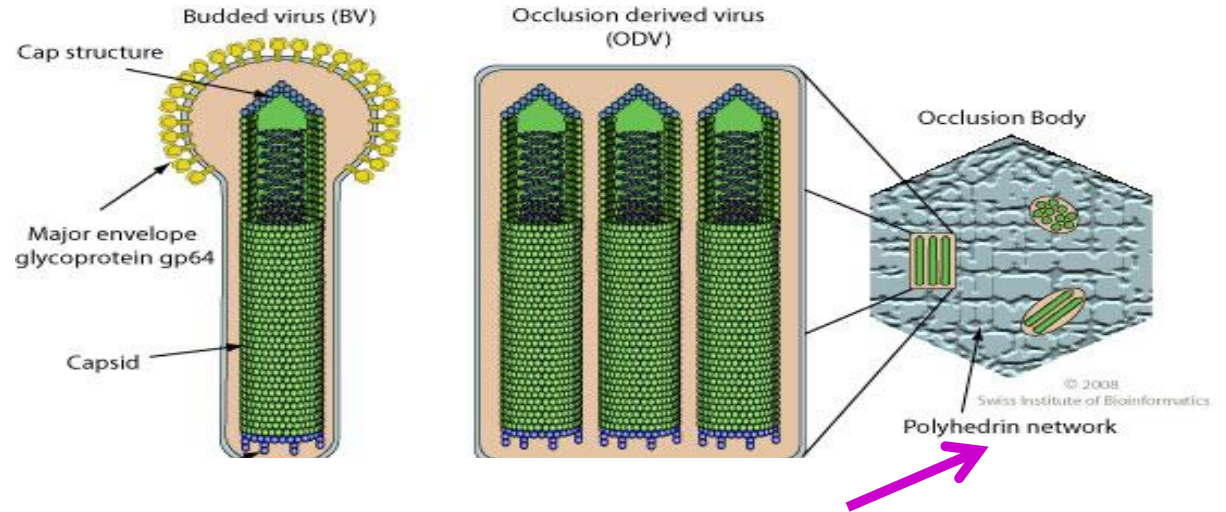
Bakuloviry

Obalené viry – cirkulární ds DNA

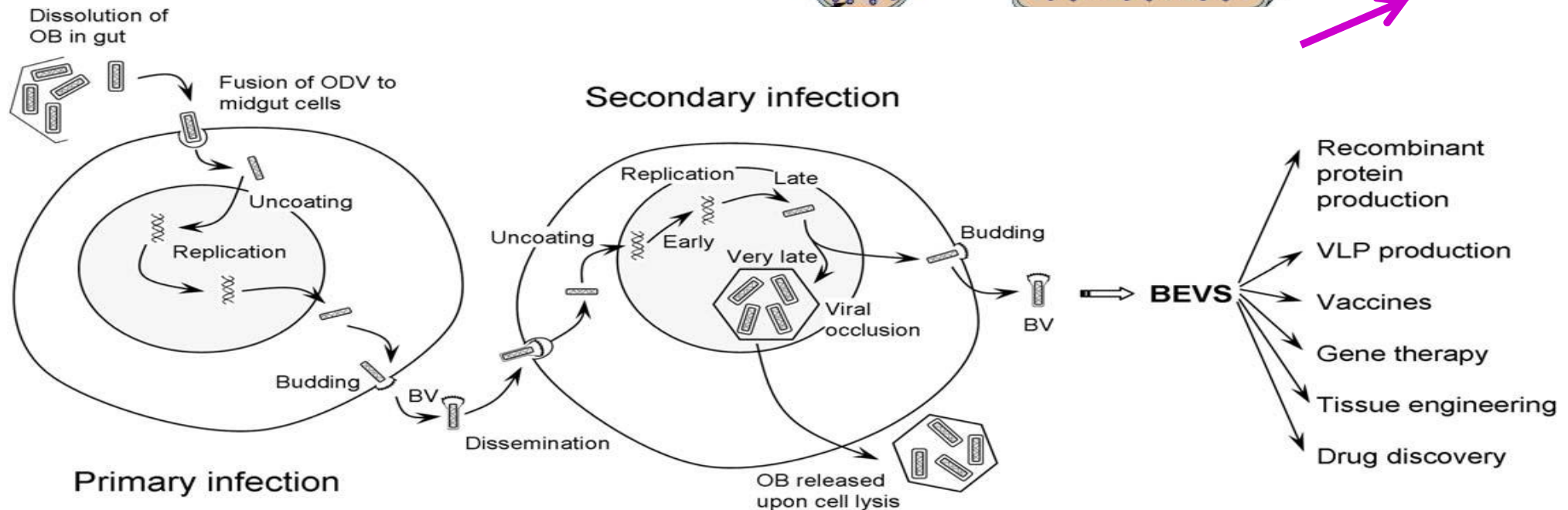
Replikují se v jádře hmyzí buňky

Lytické viry – smrt hostitele

Polyhedrin – protein oklusních tělísek



Životní cyklus



Produkce proteinů

- Nejčastěji používaný: lytický virus *Autographa californica* (*Baculoviridae*)
- Náhrada genu pro **polyhedrin** nebo P10 za gen pro žádaný protein
 - homologní rekombinace (přenosový vektor a bakulovirová DNA)
- nejpoužívanější buněčné linie:
 - A) Sf21 a Sf9 (odvozeno od *Spodoptera frugiperda*)
 - B) High-Five™ (odvozeno od *Trichoplusia ni*)

- Výhody**
- eukaryotní buňky: svinování, oligomerizace, **posttranslační modifikace**
 - **vysoké výtěžky**, relativně jednoduché růstové podmínky
 - neinfekčnost pro obratlovce, nepřítomnost lidských patogenů

- Produkty na trhu:**
- 1) Cervarix (GlaxoSmithKline) – rakovina děložního čípku
 - 2) Provenge (Dendreon Corp.) – rakovina prostaty
 - 3) FluBlok (Protein Sciences Corp.) - chřipka
- dále pak ještě 4 veterinární vakcíny

Produkce v živočišných buňkách pěstovaných ve tkáňových kulturách

VÝHODY

- Eliminace etických problémů (např. při izolaci z lidských či zvířecích zdrojů)
- Eliminace rizika přenosu chorob
- Posttranslační modifikace odpovídající lidským

NEVÝHODY

- Extrémní ekonomické nároky (vybavení, média, kultivační podmínky)
- Nebezpečí kontaminace (složitá média, pomalý růst – v řádu dnů, složitá optimalizace procesu)
- Nízké výtěžky

Produkce v živočišných buňkách pěstovaných ve tkáňových kulturách

Buňky vaječníků křečka čínského (CHO – chinese hamster ovary)

- glykosylují proteiny podobným způsobem jako lidské buňky
- Bezpečné použití vzhledem k lidským patogenům
- Adaptace pro suspenzní růst – scale-up

Myší buněčné linie NS0 a Sp2

- Vhodné pro sekreci protilátek

BHK (baby hamster kidney) a Vero buňky (endotelové buňky z opičích ledvin)

- Produkce vakcín (veterinární i medicínské účely)



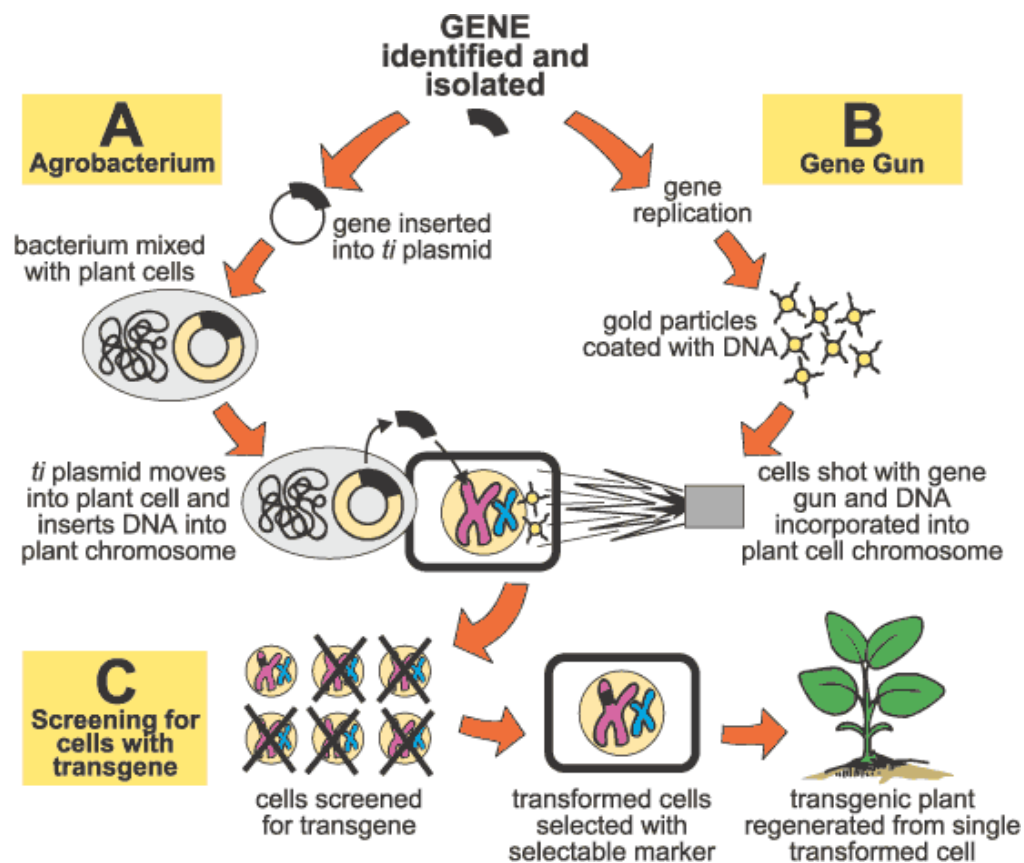
<http://www.biopharma-reporter.com/Upstream-Processing/CHO-cell-lines-unsustainable-for-biopharma-s-future-says-Dyadic> (27-9-2017)

Transgenní rostliny



Transgenní rostliny

Různé metody transformace (např: pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* nebo přímým vpravením DNA do buněk (elektroporace, mikroinjekce, vstřelováním na wolframových či zlatých částicích)



VÝHODY:

- Levné
- Snadná sklizeň
- Eliminace lidských patogenů

NEVÝHODY:

- Malé výtěžky
- Rozdílnost glykosylací
- Závislost na počasí

Budoucnost: Převedení intenzivního výzkumu možnosti produkce mAb v rostlinách do praxe

Transgenní rostliny – Elelyso



- Léčba Gaucherovy choroby
- Elelyso (Protalix/Pfizer) – FDA 2012
- Enzym glukocerebrosidasa
- Produkce v transgenní mrkvi



<http://protomag.com/articles/download-on-the-pharm> (27-9-2017)

<http://protalix.com/technology/procellex-platform/> (30-9-2017)

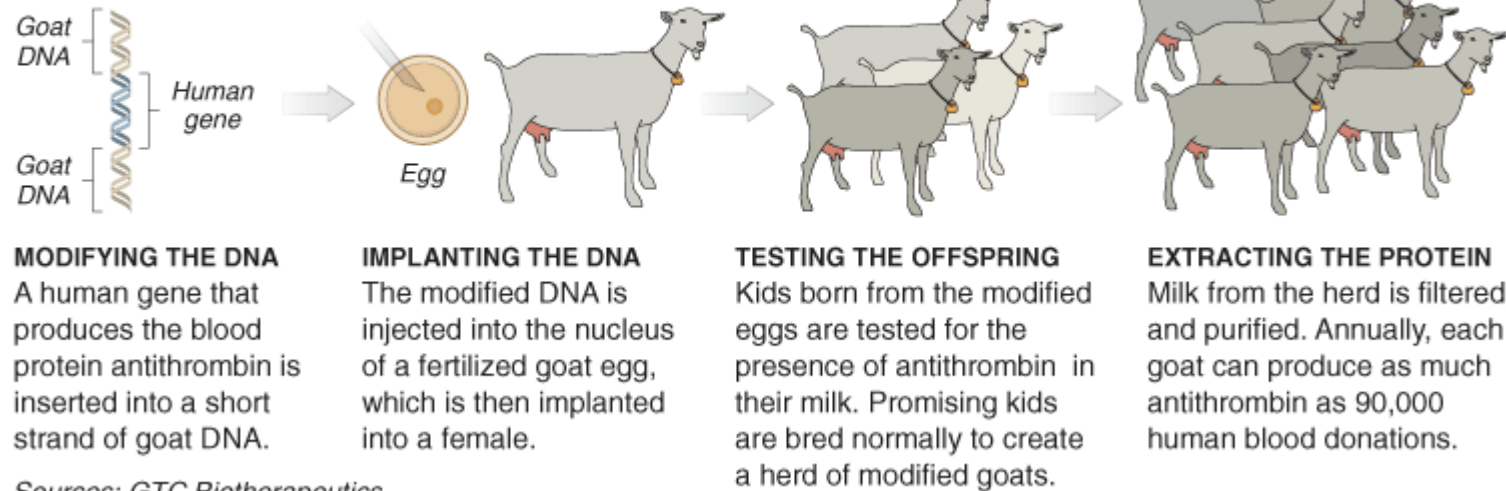
Transgenní kozy – ATryn

Schválila EMA 2006 i FDA 2009

- Izolace antitrombinu
- Léčba dědičné antitrombinové deficience

Bioengineering on the Farm

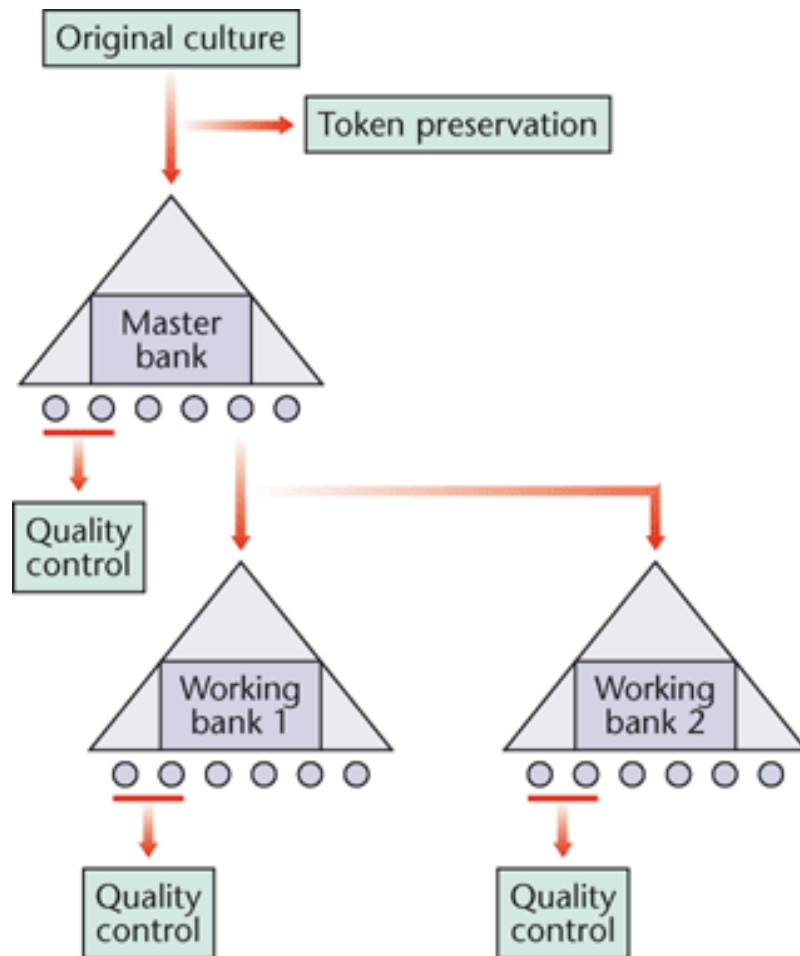
The Food and Drug Administration has approved the first drug produced in the milk of genetically engineered animals.



**Metoda
mikroinjekce**

<https://pilejordinieto.wordpress.com/genetic-engineering/> (27-9-2017)

Začátek ve velkém



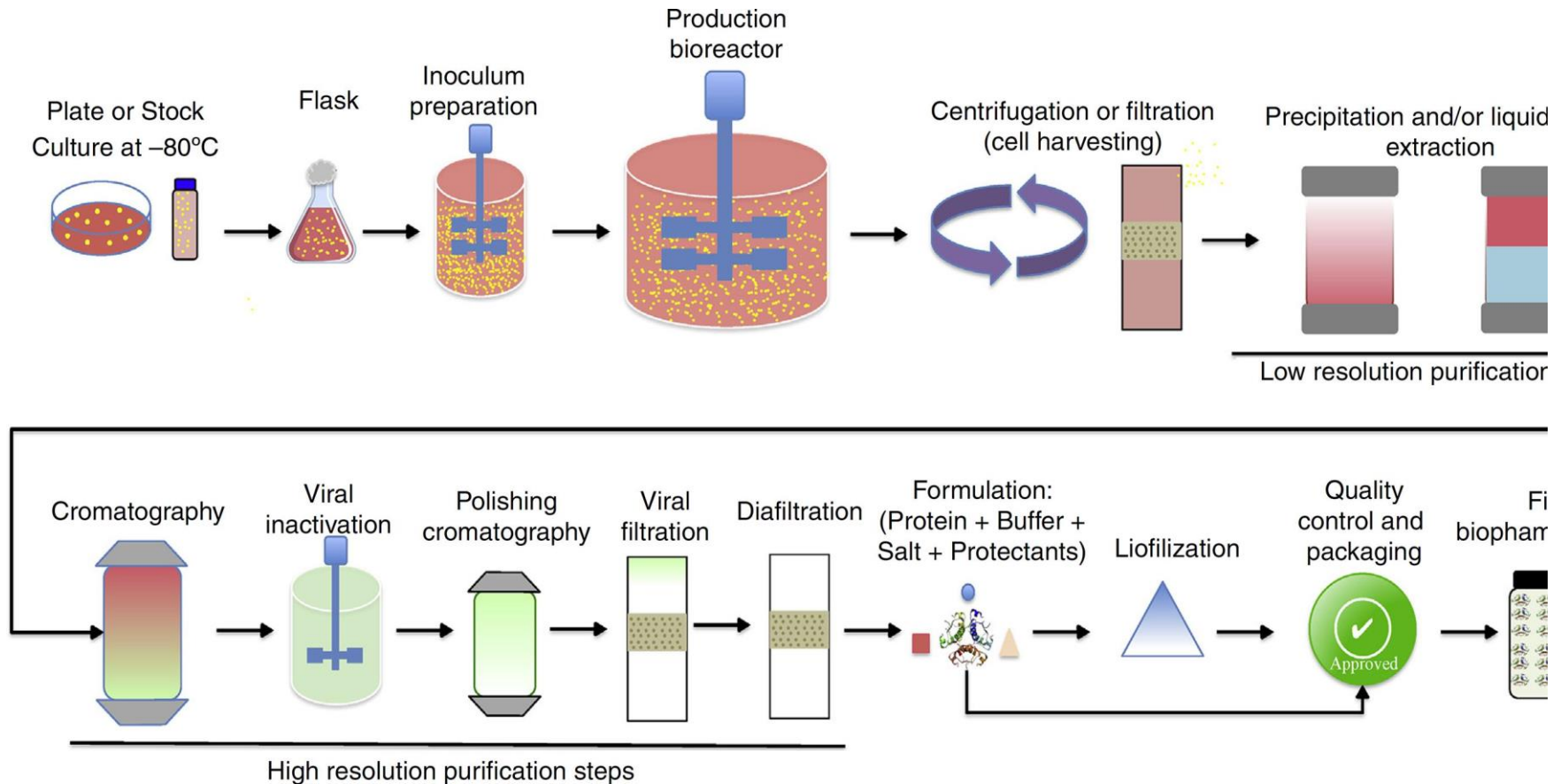
<http://engineering.unl.edu/bpdf/bpdf-cell-banking/> (30-9-2017)

<https://www.quora.com/What-is-a-brief-description-of-the-mass-production-process-for-pharmaceutical-drugs> (27-9-2017)

Upstream a downstream processing

Zjednodušeně lze říci, že

- a) Upstream – kultivace
- b) Downstream – purifikace a navazující kroky



https://www.manufacturingchemist.com/news/article_page/SGD_launches_the_EasyLyo_vial_for_biodrugs/41950 (1-10-2017)

Chromatografické metody

separační metody založené na rozdílných vlastnostech dělených látek (velikost, náboj, vazebné schopnosti) resp. nestejném rozdělování složek mezi stacionární a mobilní fázi



Princip

- Gelová
- Ionexová
- Afinitní
- Hydrofóbní
- Velikost
- náboj
- Specifické interakce
- Hydrofóbní interakce



<http://www.biosciencetechnology.com/Products/2008/11/Gel-Filtration-Column/>

Možnost převodu do HPLC uspořádání (analýza)

Čistota produktu – 98 – 99 %

<http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&ModuleId=9391>

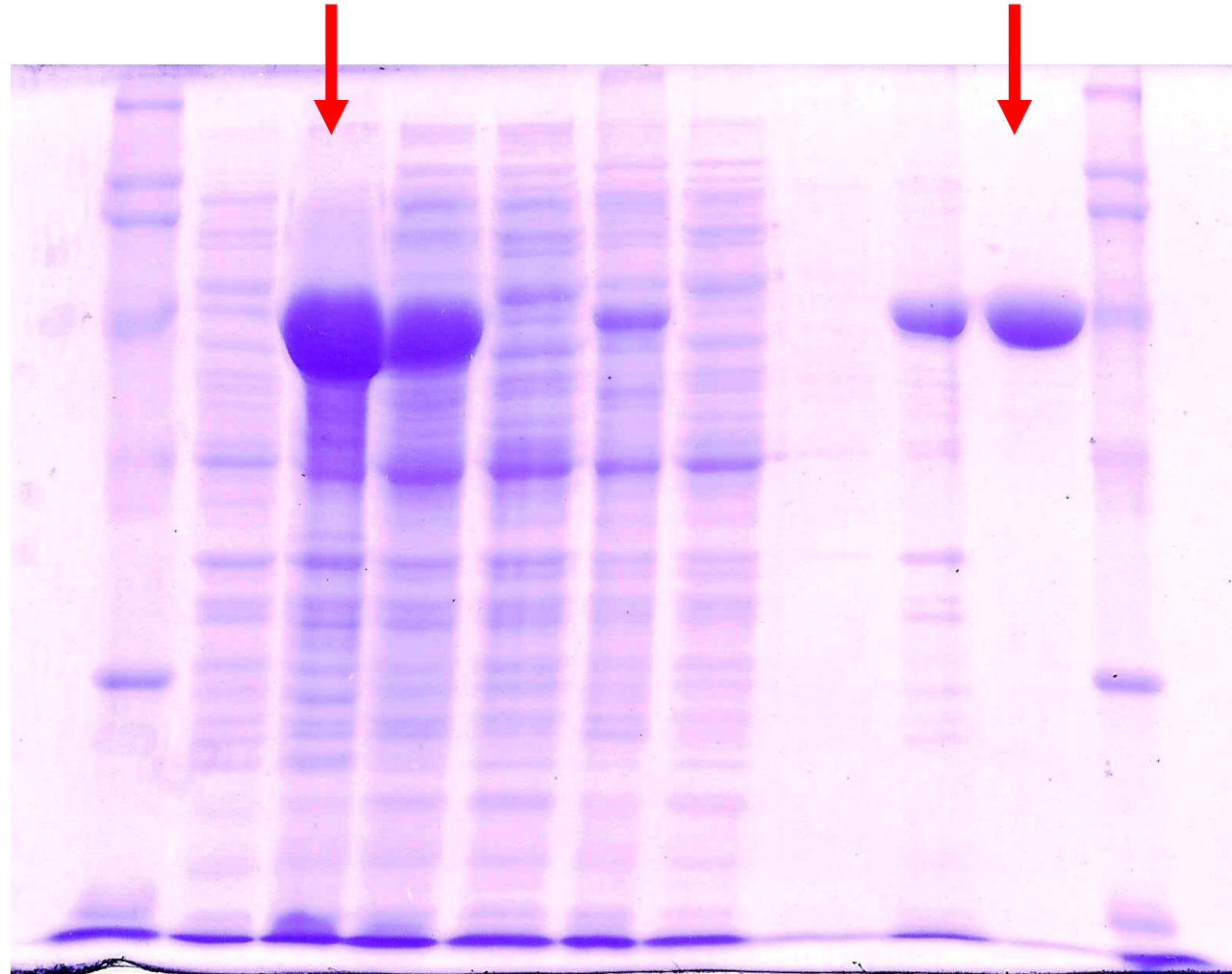
<http://www.bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/hydrophobic-interaction-membrane-chromatography-for-large-scale-purification-of-biopharmaceuticals-184195/> (14-9-2017)



Ze života

výchozí vzorek

izolovaný protein



Čistota produktu

- Kontaminanty:

- Mikroorganismy
- Virové částice
- Pyrogenní látky
- DNA
- Kontaminující proteiny - jiné než produkt

- **chybně syntetizovaný produkt**

Nečistoty související s procesem

Problémy s dokonalou charakterizací.

Nečistoty související s produktem

Analýza produktu

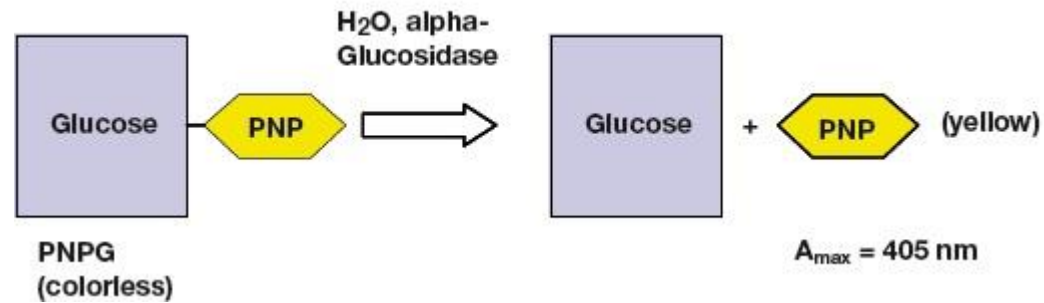
- biologické/funkční testy (aktivita enzymů, aktivita hormonů apod.)
- Elektroforetické metody (nativní, nedenaturující, denaturující, dvoudimenzionální, kapilární), izoelektrická fokusace
- peptidové mapování,
- HPLC na reverzní fázi,
- hmotnostní spektrometrie
- aminokyselinová analýza
- N-koncové sekvenování,
- cirkulární dichroismus
- imunologické metody – ELISA, western blotting
- a další.



<https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html> (30-9-2017)

Biologické testy/funkčnost preparátu

Jednoduché



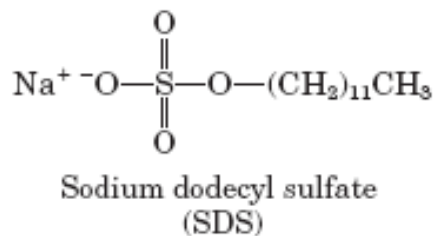
<https://www.news-medical.net/whitepaper/20160218/Standard-Curve-Generation-for-Colorimetric-Assay-in-the-Kinetic-or-Basic-Eppendorf-BioSpectrometerc2ae.aspx> (1-10-2017)

I složité – například využití zvířecích modelů

Př: testování erythropetina na myším modelu
- nevýhody: nepřesnost, nákladnost, časová náročnost

Elektroforetické metody - SDS PAGE

Užití dodecylsíranu sodného (SDS) - váže se k většině proteinů (cca v množství 1,4 g SDS/1g bílkoviny - vazba 1 molekuly SDS na 2 AMK) a molekula proteinu tím získává velký záporný náboj, který překrývá vlastní náboj molekuly. Všechny proteiny získávají podobný poměr náboje a molekulové hmotnosti a zároveň i podobný tvar.



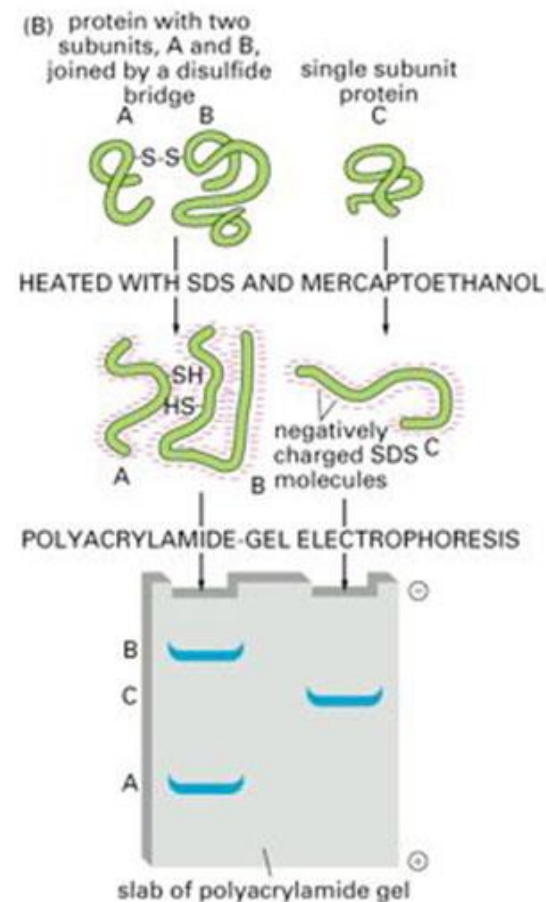
z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, W.H.Freeman&Co., New York, 2005

Užití 2 - merkaptoethanolu či dithiotreitolu - redukce disulfidových můstků (v rámci jednoho řetězce i mezi jednotlivými řetězci) – tzv. **redukující SDS PAGE**

Separace podle molekulové hmotnosti.

SDS zároveň ruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami proteinu

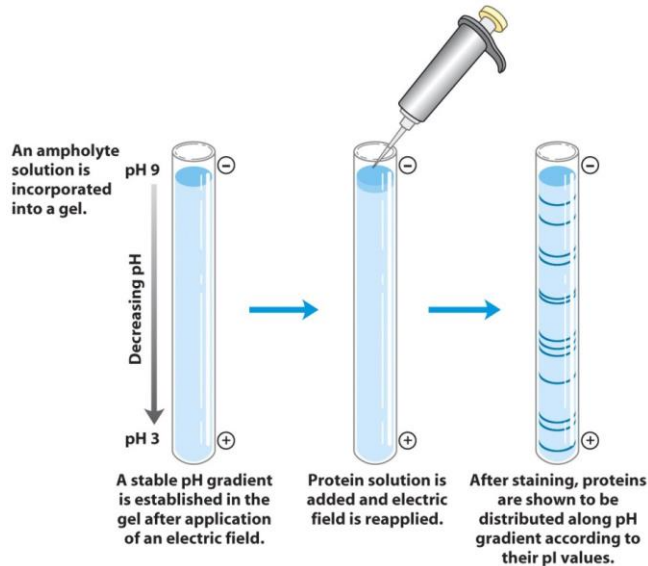
– ty se pak na gelu zobrazí jako jednotlivé proužky.



Isoelektrická fokusace

Dělení dle isoelektrického bodu proteinu.
Polyakrylamidový gel s velkými póry.

pH gradient – pH se snižuje od katody k anodě.



Proteiny z aplikované směsi migrují dokud nedosáhnou pH, které se rovná jejich pI.

Zaostřovací efekt.

(Pokud se protein vychýlí z oblasti pH = pI, získá kladný/záporný náboj a je navrácen zpět.)

Mimořádná rozlišovací schopnost!!!!

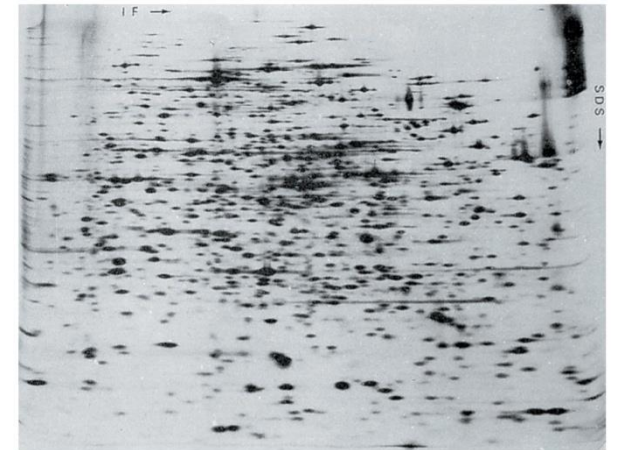
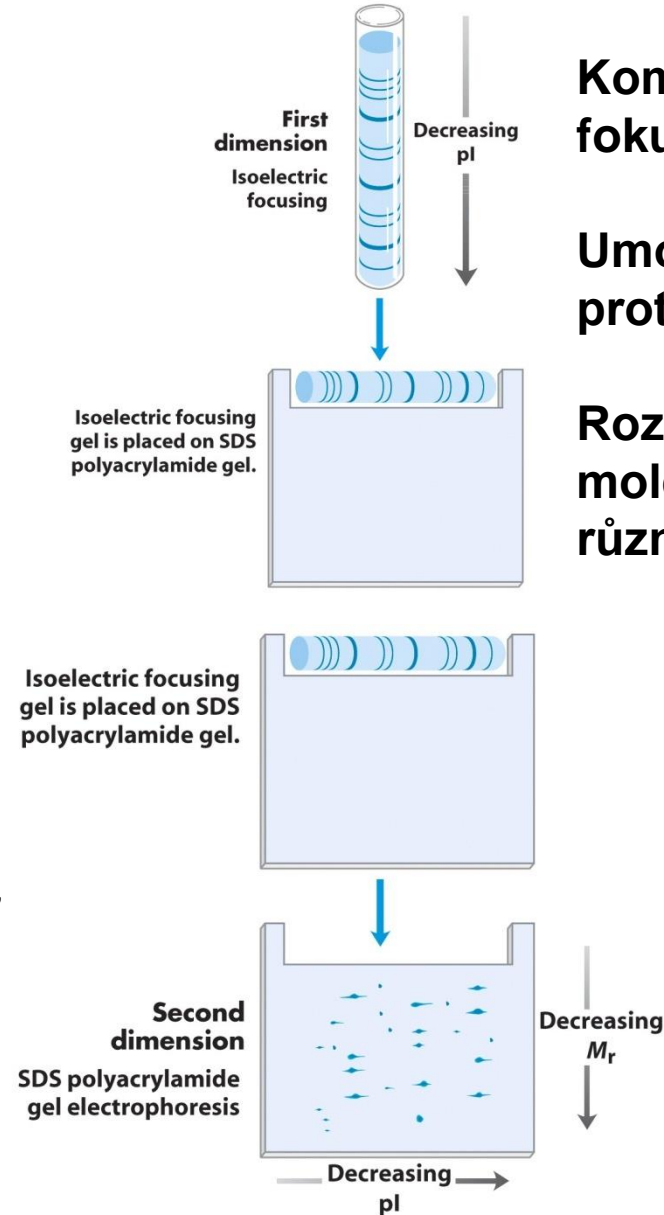
z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, W.H.Freeman&Co., New York, 2005

Dvourozměrná elektroforesa

Kombinace isoelektrické fokusace a SDS elektroforesy.

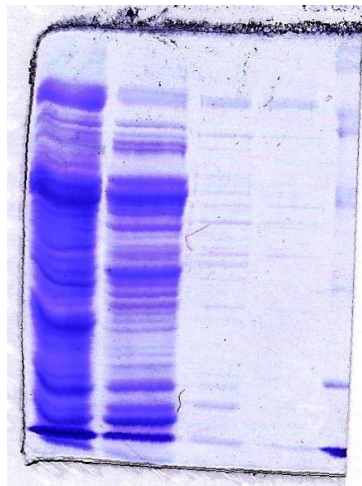
Umožňuje rozlišit složité směsi proteinů.

Rozdělí proteiny o stejné molekulové hmotnosti a různém pI či naopak.



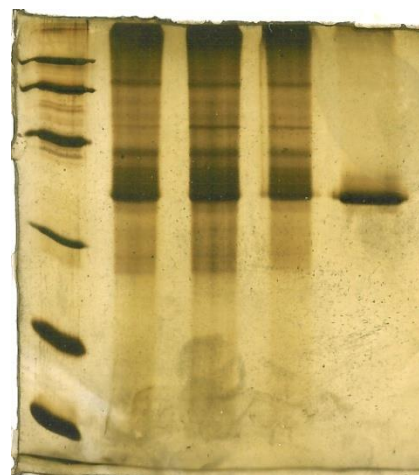
Vizualizace proteinů po separaci

Určování koncentrace proteinů



stříbro (až 0,1
nanogramu)

Coomassie
Brilliant blue
R250
(mikrogramy)

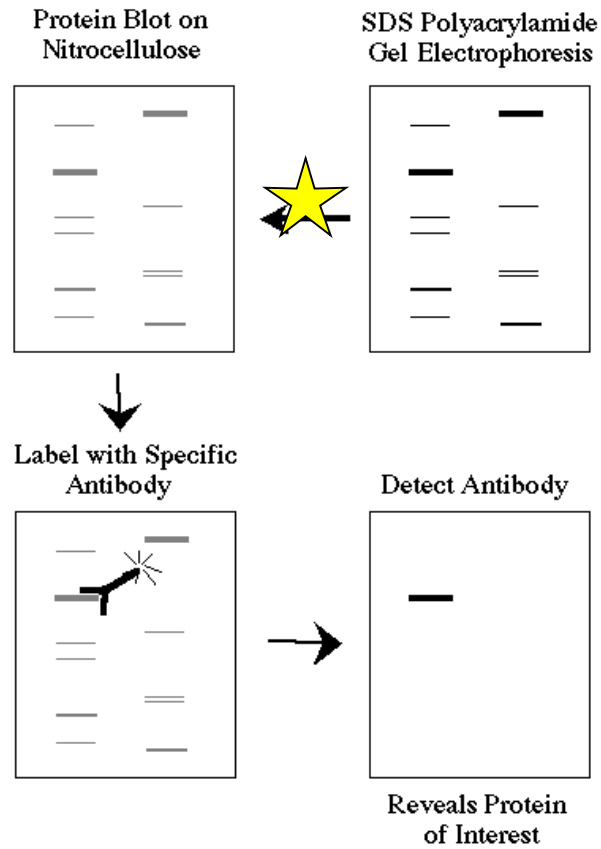


Určování koncentrace proteinů

měření absorbance při 280 nm (určování Tyr, Trp, Phe)
měření absorbance při 205 nm (peptidová vazba),
Biuretová reakce,
Lowryho metoda,
metoda Bradfordové,
metoda za použití kyseliny bicinchoninové,
Petersonova metoda

Problémy se zvolením správného standardu (BSA).

Vizualizace proteinů po separaci – Western blot



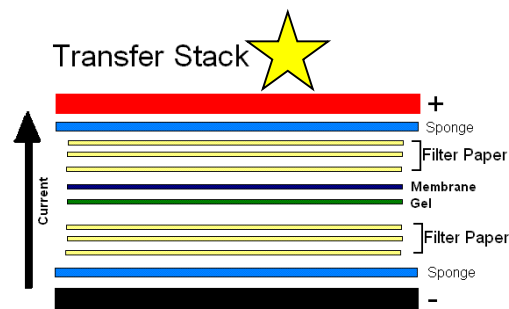
1) Separace pomocí SDS-PAGE.

★ 2) Přenos (opět působením elektrického proudu) například na nitrocelulosoovou membránu.

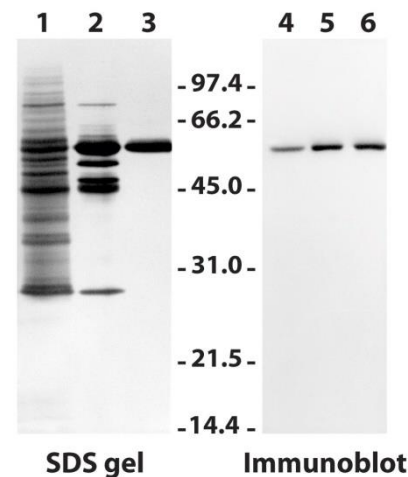
3) Vysycení membrány (mléčné proteiny, BSA) – proti nespecifickým interakcím protilátky s membránou.

4) Přidání specifické protilátky (značena – např: alkalickou fosfatase, peroxidase apod.).

5) Průběh enzymové reakce a stanovení pozice protilátky a tím hledaného proteinu.



<http://en.wikipedia.org/wiki/Electroblotting> (17-10-10)



Coomassie blue
X
Western blot
pro protein
kinasu

z knihy: D.L.Nelson, M.M.Cox:
Lehninger Principles of
Biochemistry, W.H.Freeman&Co.,
New York, 2005

ELISA

Heterogenní enzymová imunoanalýza
(Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)

koncentrace analytu se zjišťuje z kalibrační křivky (standardy)
(vhodné pro velké množství vzorků, pro jednotlivé vzorky ne tak vhodné)

umožňuje stanovit analyt v množství 10^{-9} až 10^{-12} gramu

časté využití mikrotitračních destiček
- velké množství vzorků
- vhodná miniaturizace a automatizace

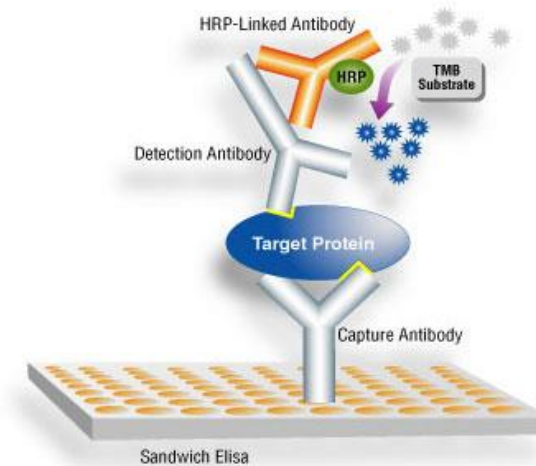
provedení:

kompetitivní
 přímé
 nepřímé
nekompetitivní



Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza

1. interakce zakotvené PI s Ag ze vzorku
2. ustanovení rovnováhy
3. promytí systému
4. interakce značené PI s Ag zachyceným na kotvené PI
5. promytí systému
6. stanovení enzymové aktivity „zachycené“ na pevné fázi



možno jen pro polyvalentní antigeny
(vazba 2 a více PI)

http://www.newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=20 (30. října 2010)

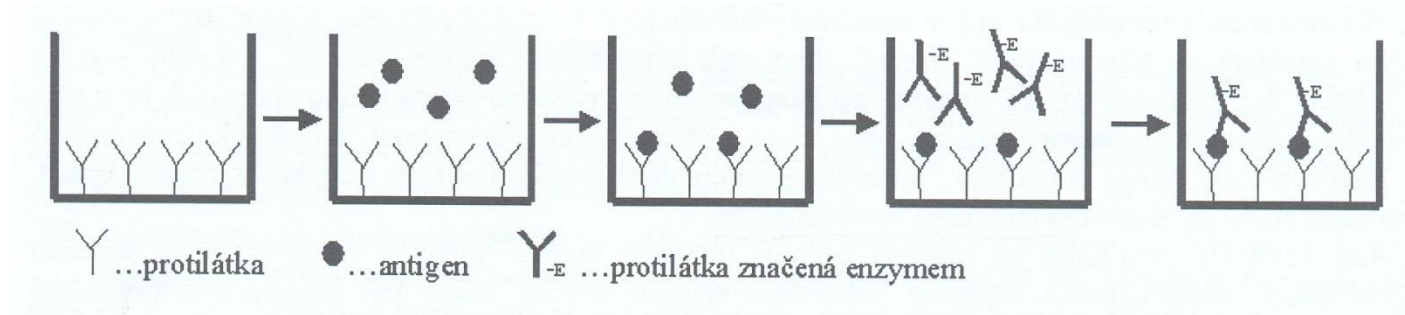
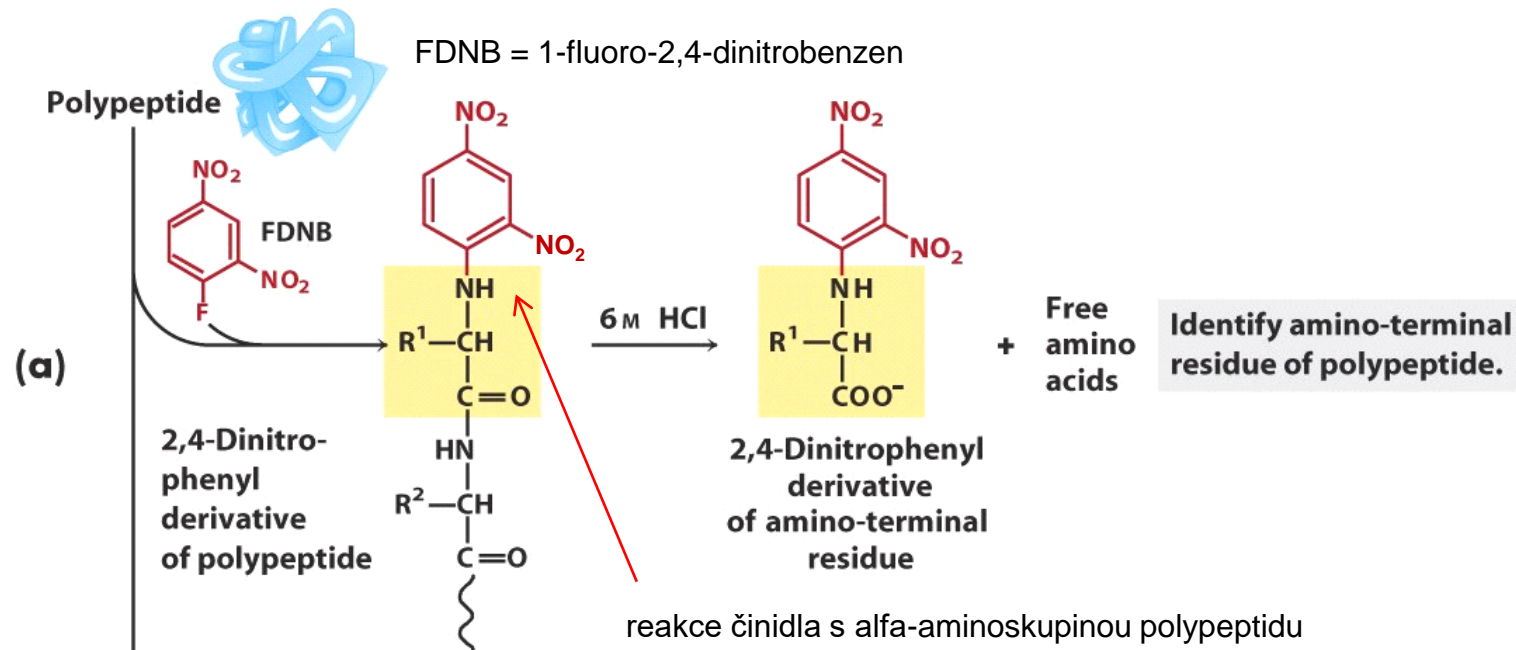


Schéma postupu při stanovování N-koncové AMK užitím Sangerova činidla



Identifikace N-koncových aminokyselin

Edmanovo odbourávání

- reakce N-koncové aminokyseliny s fenylisothiocyanátem za alkalických podmínek
- kyselina trifluoroctová – uvolnění derivátu N-koncové AMK
- postup možno opakovat – získání delší (celé) sekvence
- snadná automatizace – užití v sekvenátorech (cca 99% účinnost – možno stanovit cca 50-100 AMK)

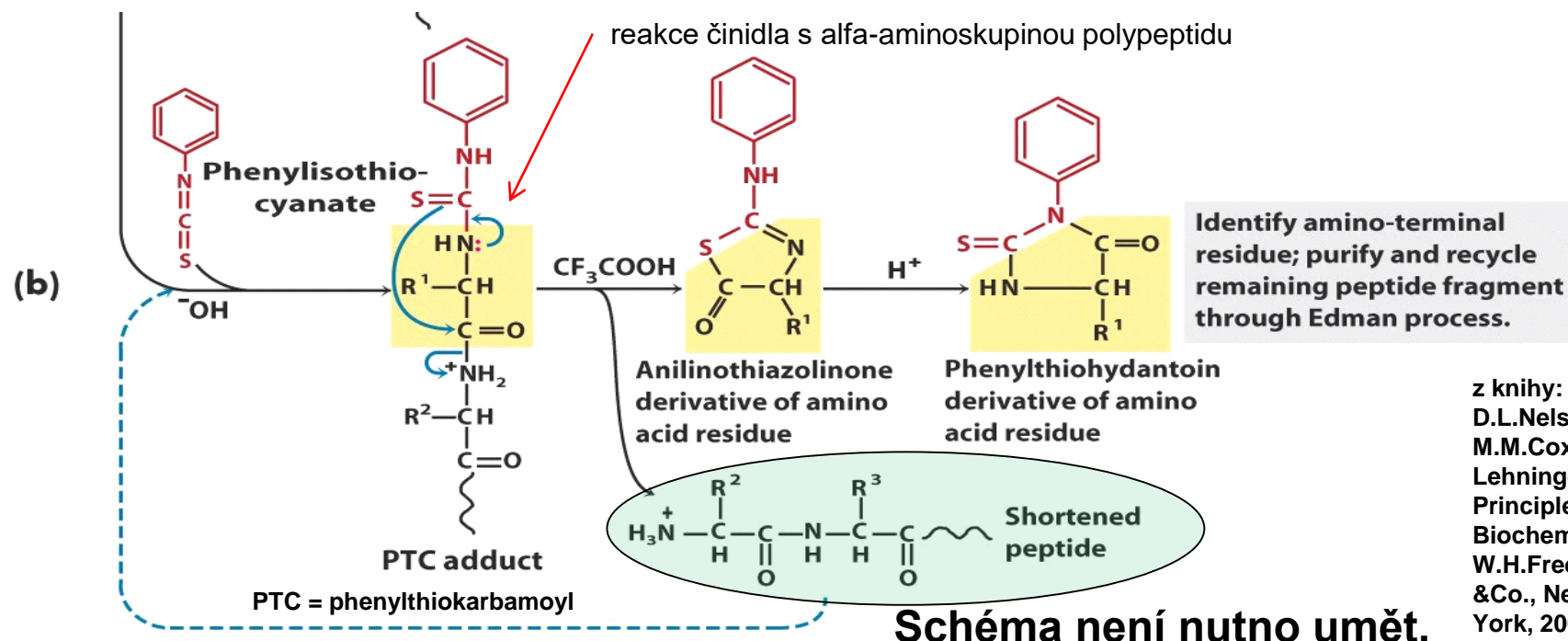
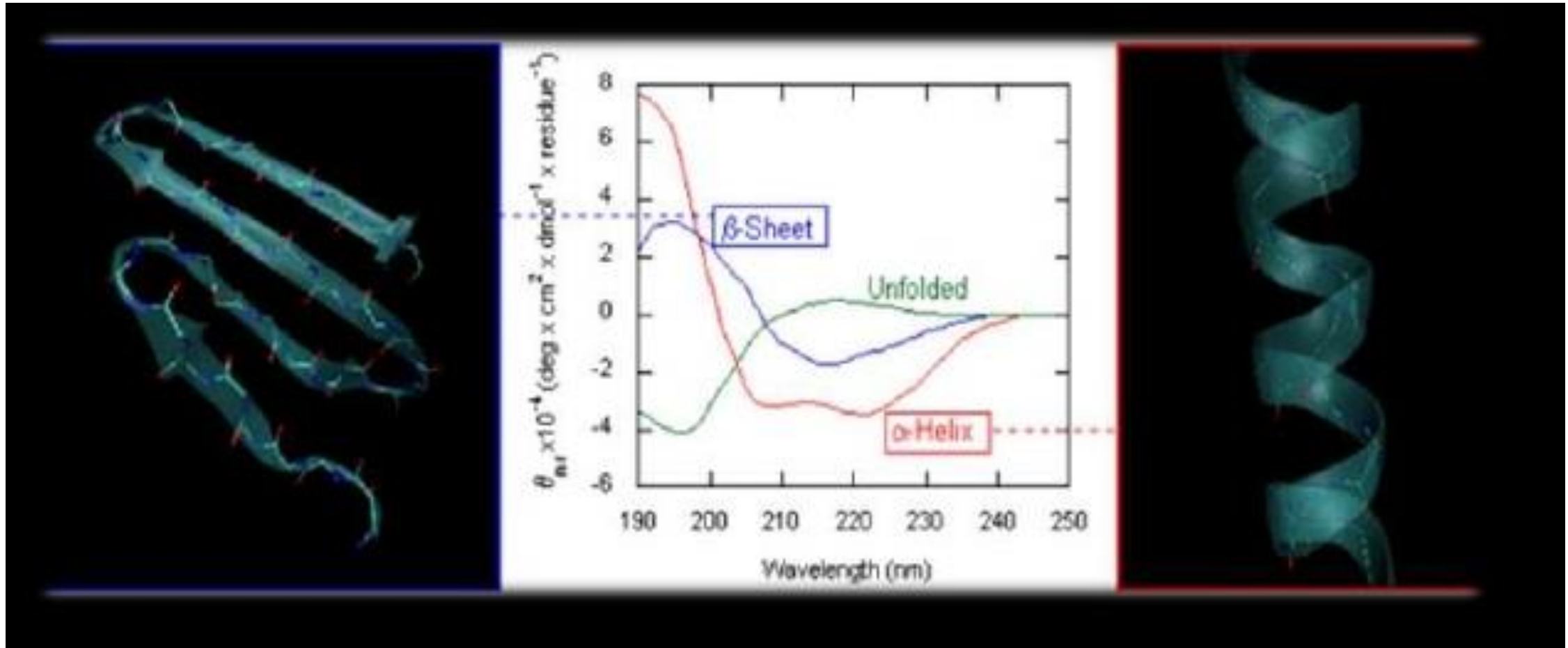


Schéma není nutno umět.

z knihy:
D.L.Nelson,
M.M.Cox:
Lehninger
Principles of
Biochemistry,
W.H.Freeman
&Co., New
York, 2005

Využití cirkulárního dichroismu



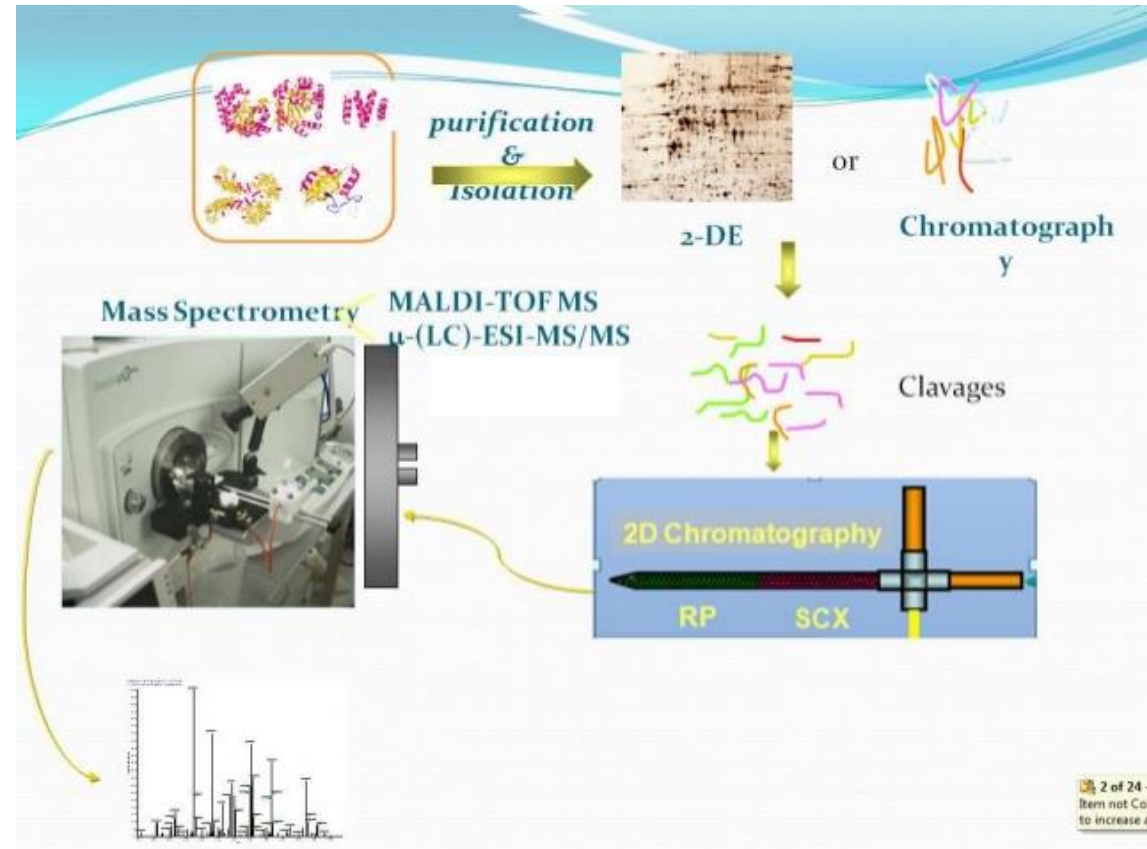
Propojení peptidového mapování, hmotnostní spektrometrie a HPLC

4 kroky (různé možnosti provedení každého kroku)

- 1) Isolace proteinu
- 2) Selektivní naštěpení proteinu
- 3) Separace fragmentů (HPLC)
- 4) Identifikace fragmentů (MS)

Srovnávací metoda

- Identifikace proteinu
- Kontrola bodových mutací
- Kontrola posttranslačních modifikací
- Kontrola biosimilars
-



<https://www.slideshare.net/SaklechaPrachi/peptide-mapping-61196475> (1-10-2017)

Nechtěné modifikace proteinů. Jak tomu předcházet?

U biologických léčiv je nutné použít pro zvýšení stability a pro jejich (bio)dostupnost řadu dalších přídatných látek.

- inhibice adsorpce účinné látky na buněčných membránách,
- konformační stabilizace,
- kryoprotekce,
- ochrana při lyofilizaci,
- chelatace kovů,
- inhibice agregace,
- termoprotekce,
- inhibice izomerizace,
- ochrana proti oxidaci,
- posílení hydrofobních vazeb,
- zlepšení rozpustnosti,
- kontrola osmolarity,
- kontrola pH.

Nutno zvolit správné kombinace!!!!

druh pomocné látky	hlavní funkce	příklady
podporující rozpustnost	zvýšení rozpustnosti bioléciv	aminokyseliny, tenzidy (Tween)
pufrovací látky	úprava pH roztoku bioléciva	soli kyseliny octové, askorbové, citronové, uhličité, fosforečné
látky upravující osmolaritu	úprava osmolarity	sacharidy a soli
konzervační látky	inhibice růstu mikroorganismů při opětovném otevírání vialek	fenol, benzylalkohol, organické sloučeniny rtuti
antioxidanty	prevence oxidace	kyselina askorbová, sulfity, cystein
kryoprotektiva a látky chránící při lyofilizaci	ochrana stability během mrazení a lyofilizace	cukry: sacharóza, trehalóza, laktóza, maltóza polyoly: mannitol, inulin aminokyseliny: glycin, glutamin, histidin, threonin, arginin, lyzin polymery: polyvinylpyrrolidon

Čisté prostory a jejich údržba

- Definice : prostory s kontrolovaným prostředím.
- Kontrole podléhá vstup a výstup jak zaměstnanců, tak surovin a produktů.



- Postupy čistění, dekontaminace a sanitace - zkratka CDS (clearing, decontamination, sanitation).
- **Čistění** - odstraňování jak organických, tak i anorganických nečistot
- **Dekontaminace** - odstranění látek, které mohou mít nějakou biologickou aktivitu a mohly by ohrozit pacienta
- **Sanitace** je potom odstranění jakýchkoliv živých mikroorganismů.

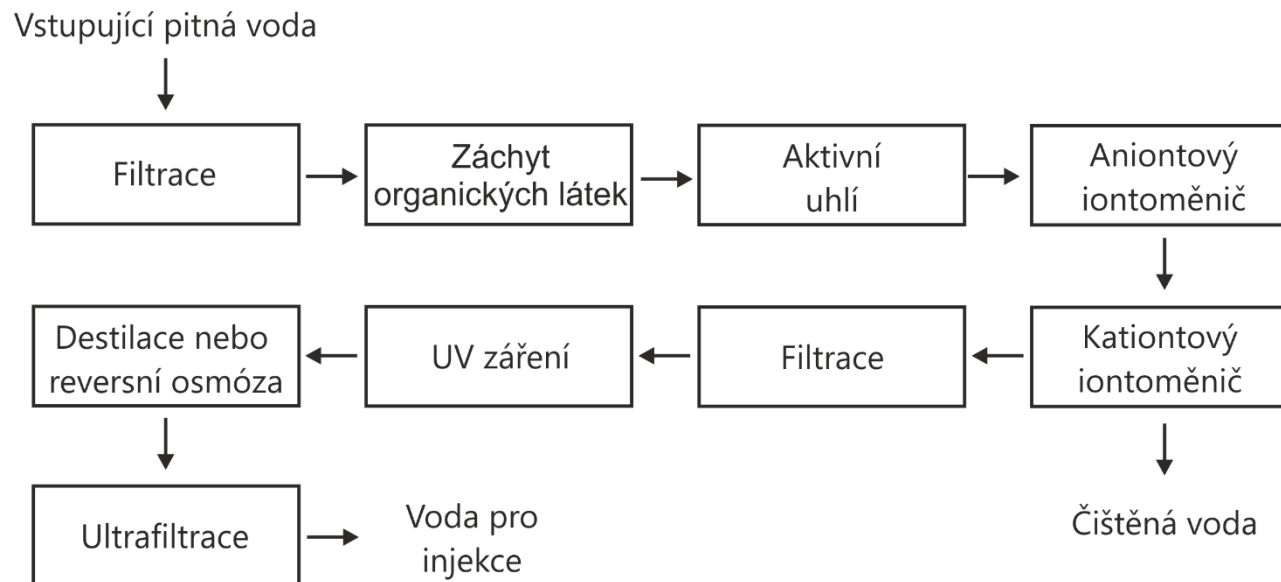
Speciální přístupy – chromatografické kolony, potrubí, fermentační tanky

Voda

- využívána jak při kultivaci, tak izolaci, čištění, ohřev, chlazení apod.
- 30 000 litrů vody na 1 kg bioléčiva

Typy:

- Běžná voda z vodovodního řadu (velmi omezené použití)
- Čištěná voda (příprava páry, médií apod.)
- Voda pro injekce (izolace, plnění, finální oplach zařízení apod.)



Správná výrobní praxe - SVP

Good Manufacturing Practice - GMP

Standardní mechanismy výroby

Dokumentace

Snaha o: eliminaci chyb a mylné interpretace
zpětnou dohledatelnost
reprodukovatelnost

Mezi dokumenty patří

1. **Standardní operační postupy** - správná manipulace s výrobním zařízením
 - údržba a validace přístrojů
 - činnost zaměstnanců
 - analýza a testování
2. **Specifikace** – definice vstupních surovin (včetně obalového materiálu) a produktů (farmakopea)
3. **Výrobní postupy od vstupu výchozích látek po balení produktů**
 - konkrétní návody včetně dávkování, podmínek, dalších úprav produktu apod.
4. **Záznamy všech parametrů výroby** – pro každou šarži
 - záznamy o analýzách (vstupních látek i produktů)
 - záznamy o výrobě, izolaci, adjustaci



<https://cz.pinterest.com/limalibrary/>

[dogs-read-too/](#) (29-9-2017)

Farmakopea = lékopis

- Katalog standardů
- Má normativní charakter
- Specifikace jednotlivých látek
- Požadavky na jakost, postup při přípravě, zkoušení, uchovávání, dávkování apod.



<https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-9th-edition> (26-9-2017)

6.0	2.5.23	Kyselina sialová v polysacharidových vakcínách		6.6	Oxygenum (0417)
7.0	2.5.24	Oxid uhlíčitý v plynech		7.1	Oxygenum 93% (2455) obr. 1x
7.0	2.5.25	Oxid uhelnatý v plynech obr. 1x		7.6	Oxymetazolin hydrochloridum (0943)
6.0	2.5.26	Oxid dusnatý a oxid dusičitý v plynech obr. 1x		9.0	Oxytetracyclini hydrochloridum (0198)
6.3	2.5.27	Kyslík v plynech		9.0	Oxytetracyclinum dihydricum (0199)
9.0	2.5.28	Voda v plynech		6.0	Oxytocini solutio concentrata (0779)
7.6	2.5.29	Oxid siřičitý obr. 1x		6.0	Oxytocinum (0780)
6.0	2.5.30	Oxidanty		9.0	Paclitaxelum (1794)
6.0	2.5.31	Ribosa v polysacharidových vakcínách		8.6	Pancreatis pulvis (0350)
8.6	2.5.32	Mikrostanovení vody		6.0	Pancuronii bromidum (0681)
6.0	2.5.33	Celkové bílkoviny		9.0	Pantoprazolum natriicum sesquihydricum (2296)
6.0	2.5.34	Kyselina octová v syntetických peptidech		7.5	Papaverini hydrochloridum (0102)
7.0	2.5.35	Oxid dusný v plynech		9.0	Paracetamolium (0049)
6.0	2.5.36	Číslo anisidinové		6.0	Paraffinum liquidum (0239)
7.1	2.5.37	Stanovení methyl-, ethyl- a isopropyl-methansulfonátu v kyselině methansulfonové		6.0	Paraffinum perliquidum (0240)
8.7	2.5.38	Stanovení methyl-, ethyl- a isopropyl-methansulfonátu v léčivých látkách		6.0	Paraffinum solidum (1034)
7.7	2.5.39	Stanovení methansulfonylchloridu v kyselině methansulfonové		6.0	Paraldehydum (0351)
8.4	2.5.40	Stanovení methyl-, ethyl- a isopropyl-toluenulfonátu v léčivých látkách		7.0	Parnaparinum natriicum (1252)
8.7	2.5.41	Stanovení methyl-, ethyl- a isopropyl-benzensulfonátu v léčivých látkách		9.0	Paroxetini hydrochloridum anhydricum (2283)
	2.6	Biologické zkoušky		9.0	Paroxetini hydrochloridum hemihydricum (2018)
7.7	2.6.1	Zkouška na sterilitu		9.0	Pefloxacinii mesilas dihydricus (1460)
6.0	2.6.2	Mykobakterie		9.0	Pemetrexedum dinatriicum heptahydricum (2637)
6.1	2.6.7	Mykoplazmata		9.0	Penbutololi sulfas (1461)
8.8	2.6.8	Zkouška na pyrogenní látky		9.0	Penicillaminum (0566)
6.0	2.6.9	Zkouška na neškodnost		6.5	Pentaerithryly tetranitras tritratatus (1355)
6.0	2.6.10	Zkouška na přítomnost histaminu		9.0	Pentamidini diisetionas (1137)
6.0	2.6.11	Zkouška na hypotenzivní látky		6.0	Pentazocini hydrochloridum (1463)
6.8	2.6.12	Mikrobiologické zkoušení nesterilních produktů: stanovení počtu mikroorganismů		6.0	Pentazocini lactas (2000)
6.7	2.6.13	Mikrobiologické zkoušení nesterilních produktů: zkoušky na specifikované mikroorganismy		6.0	Pentazocinum (1462)

<http://www.sukl.cz/farmaceuticky-prumysl/obsah-ceskeho-lekopisu-2017> (30-9-2017)