



Biotechnologie léčiv – Exprese rekombinantních proteinů v eukaryotických buňkách

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.
hosek@mail.muni.cz

Ústav molekulární farmacie
FaF MU

Table 1.3. Characteristics of various recombinant protein expression systems.

Expression system	Most common application	Advantages	Challenges
Mammalian 	<ul style="list-style-type: none"> • Functional assays • Structural analysis • Antibody production • Expression of complex proteins • Protein interactions • Virus production 	<ul style="list-style-type: none"> • Highest-level protein processing • Can produce proteins either transiently, or by stable expression • Robust optimized transient systems for rapid, ultrahigh-yield protein production 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram-per-liter yields only possible in suspension cultures • More demanding culture conditions
Insect 	<ul style="list-style-type: none"> • Functional assays • Structural analysis • Expression of intracellular proteins • Expression of protein complexes • Virus production 	<ul style="list-style-type: none"> • Similar to mammalian protein processing • Can be used in static or suspension culture 	<ul style="list-style-type: none"> • More demanding culture conditions than prokaryotic systems • Production of recombinant baculovirus vectors is time consuming
Yeast 	<ul style="list-style-type: none"> • Structural analysis • Antibody generation • Functional analysis • Protein interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Eukaryotic protein processing • Scalable up to fermentation (grams per liter) • Simple media requirements 	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentation required for very high yields • Growth conditions may require optimization
Bacterial 	<ul style="list-style-type: none"> • Structural analysis • Antibody generation • Functional assays • Protein interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Scalable • Low cost • Simple culture conditions 	<ul style="list-style-type: none"> • Protein solubility • May require protein-specific optimization • May be difficult to express some mammalian proteins
Algal 	<ul style="list-style-type: none"> • Studying photosynthesis, plant biology, lipid metabolism • Genetic engineering • Biofuel production 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetic modification and expression systems for photosynthetic microalgae • Superb experimental control for biofuel, nutraceuticals, and specialty chemical production • Optimized system for robust selection and expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Nascent technology • Less developed compared to other host platforms
Cell-free 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxic proteins • Incorporation of unnatural label or amino acids • Functional assays • Protein interactions • Translational inhibitor screening 	<ul style="list-style-type: none"> • Open system; able to add unnatural components • Fast expression • Simple format 	<ul style="list-style-type: none"> • Scaling above multimilligram quantities may not be costly

Cíle transfekce živočišných buněk

1. Přenos genů do živočišných buněk

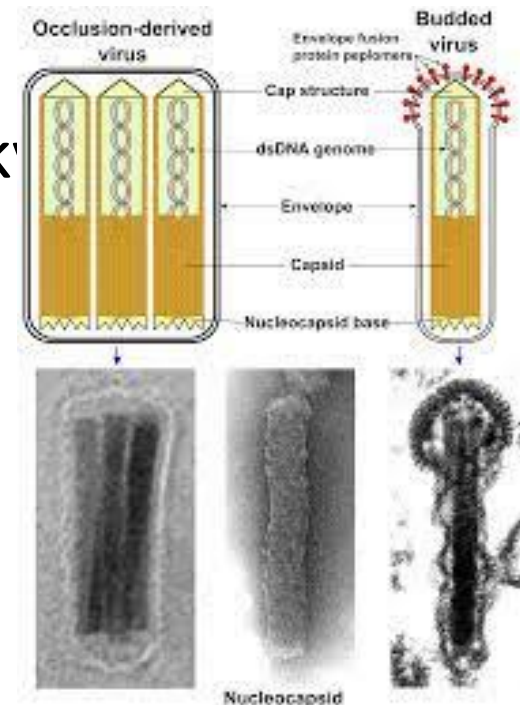
- vyhledávání genů, poznání jejich funkce a regulace a studium fenotypu (př. procesů diferenciací a jejich poruch)
- studium proteinových interakcí
- **tvorba a purifikace cizorodých proteinů**

2. Příprava transgenních živočichů

- studium fungování genů v rámci celého organismu
- modely pro studium genetických chorob
- příprava zvířat s lepšími užitkovými vlastnostmi
- hledání možností pro genovou terapii
- **vytváření cizorodých proteinů (animal farming)**

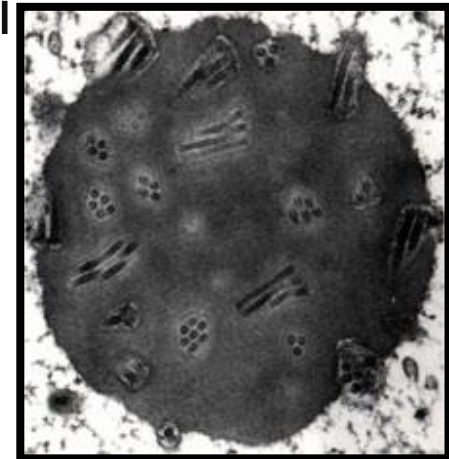
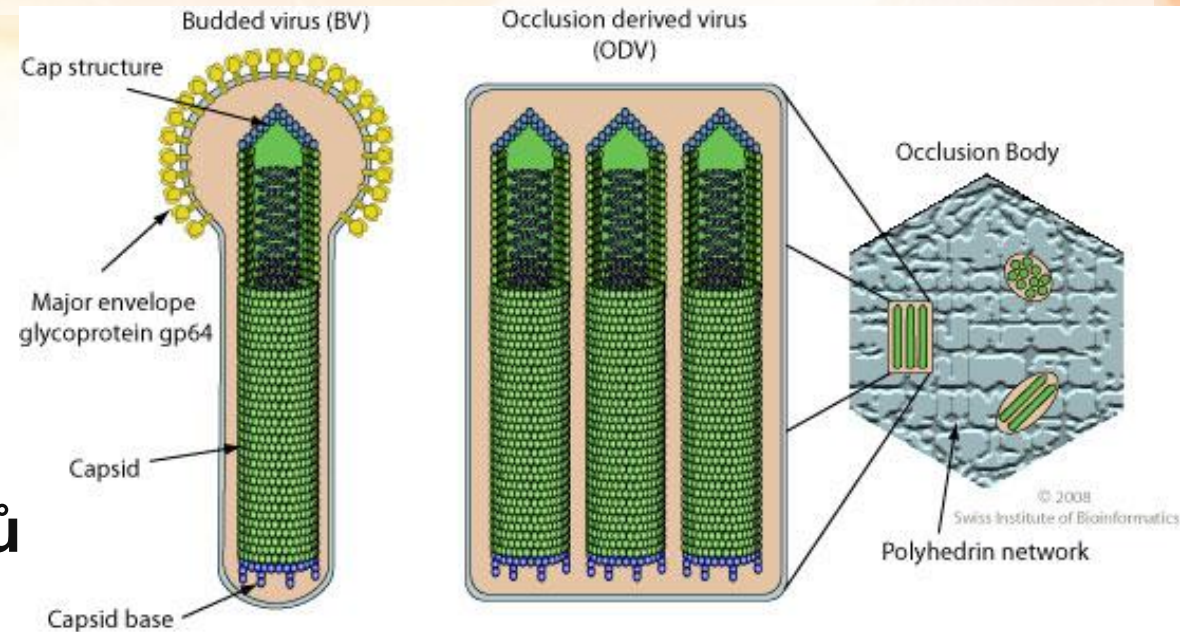
Expresní systémy hmyzích buněk

- Hostitelské buňky odvozené z
 - *Spodoptera frugiperda* → Sf9 buňky – **transientní exprese**
 - *Trichoplusia ni* → High Five™ buňky – **transientní exprese**
 - *Drosophila melanogaster* → S2 buňky – **stabilní exprese**
 - Mohou růst adherentně nebo v suspenzi
- Baculovirový vektor



Baculoviry

- Velké tyčkovité **dsDNA** viry infikující hmyz
- Nejběžnějším zástupcem je *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (**AcMNPV**) parazitující na zástupcích řádu lepidoptera (*Spodoptera frugiperda* a *Trichoplusia*) → **široké spektrum hostitelů**
- Virové částice jsou obaleny ochrannou matrix sestávající z proteinu **polyhedrinu** – umožňuje přežití ve vnějším prostředí a efektivní šíření mezi buňkami, v podmínkách *in vitro* není zapotřebí
- **Promotor pPolh** umožňuje expresi polyhedrinu nebo **rekombinantního proteinu** - až 50% celkového proteinu na konci cyklu bakuloviru



Baculovirové expresní vektory I.

- Gen zájmu pod pPolh promotorem
- GOI na plasmidu → homologní rekombinace na AcMNPV DNA
- Nízká úspěšnost rekombinace (cca 0,1 %)
- Náročné vyhledávání rekombinantních (polyhedrin-negativních) virových plaků
- Využití linearizovaných (nereplikujících se) AcMNPV DNA → úspěšnost rekombinace 10-20%, BakPAC systém až 95%

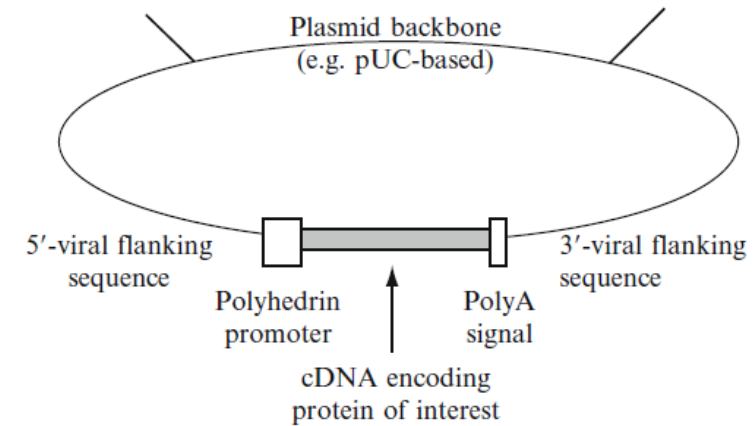


Figure 14.1 A simple baculovirus transfer plasmid.

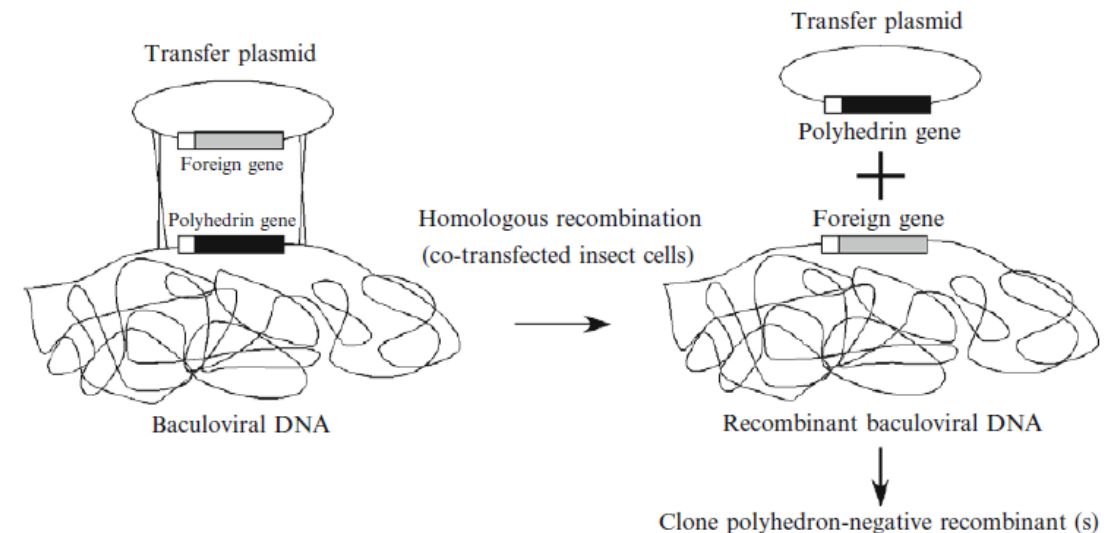


Figure 14.2 Producing a baculovirus expression vector by homologous recombination.

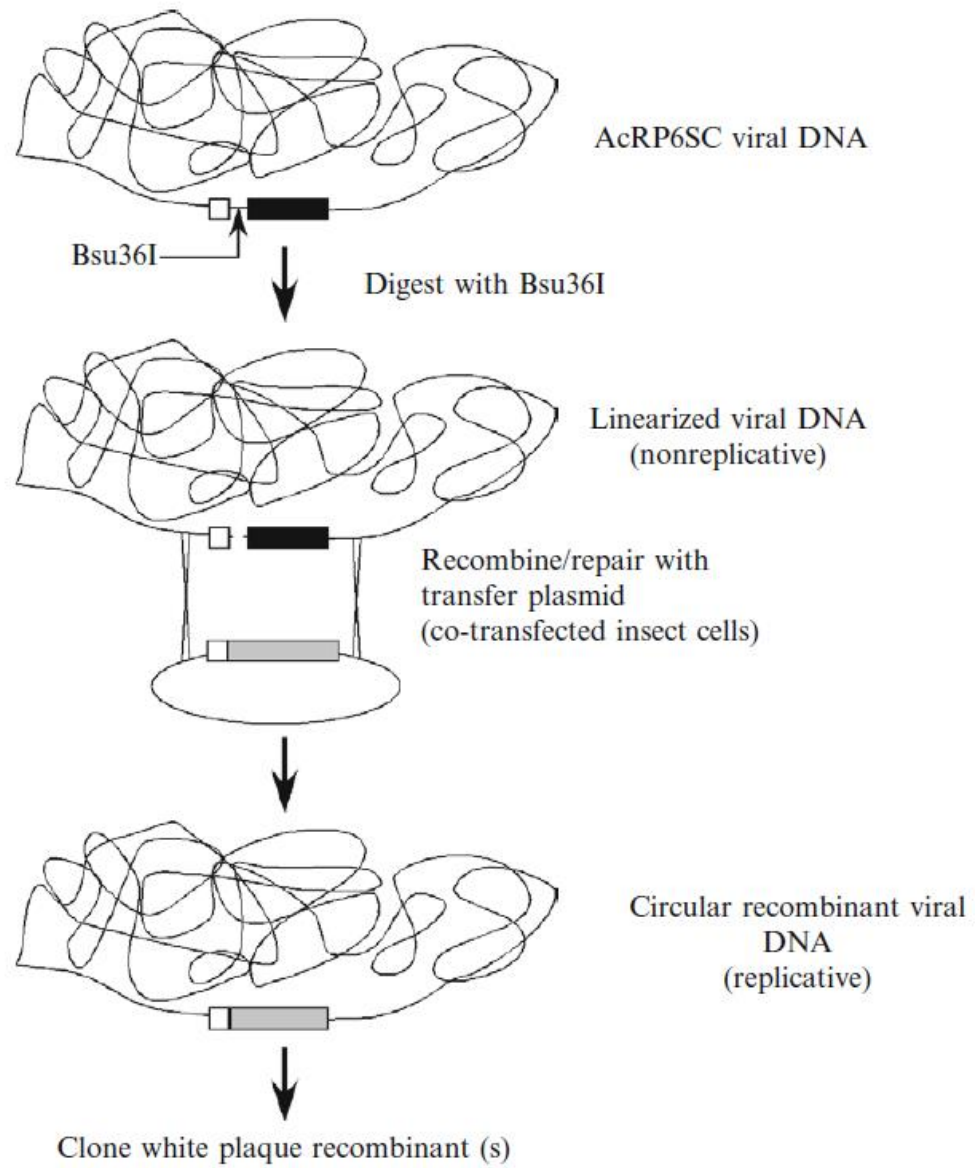


Figure 14.3 Producing a baculovirus expression vector by homologous recombination with a linearized parental viral genome.

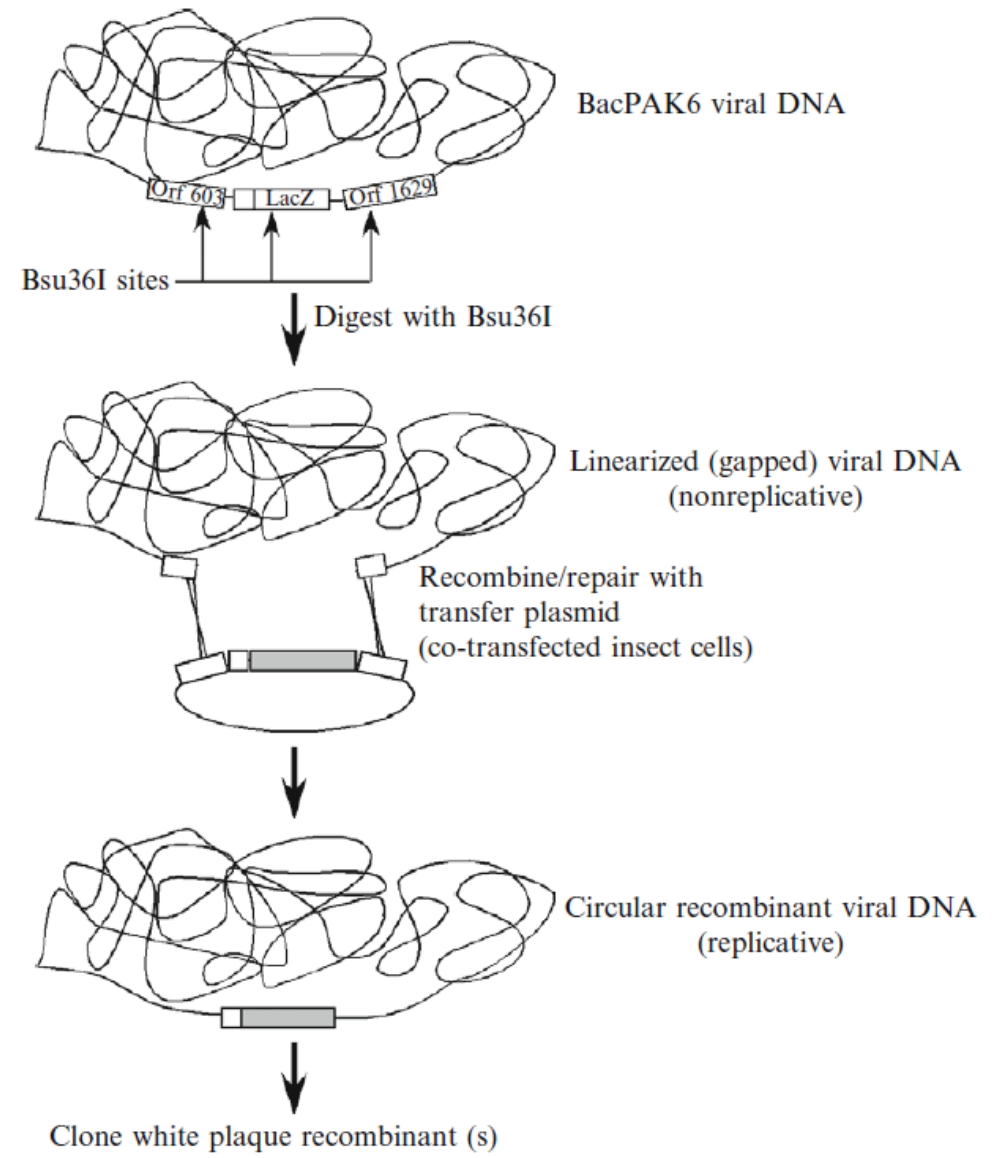


Figure 14.4 Producing a baculovirus expression vector by homologous recombination with a linearized/gapped parental viral genome.

Baculovirové expresní vektory II.

- Využití **transpozice** místo homologní rekombinace
- Transpozice probíhá v *E. coli*, která nese „helper“ plasmid kódující transponázu
- Úspěšnost rekombinace 100 %

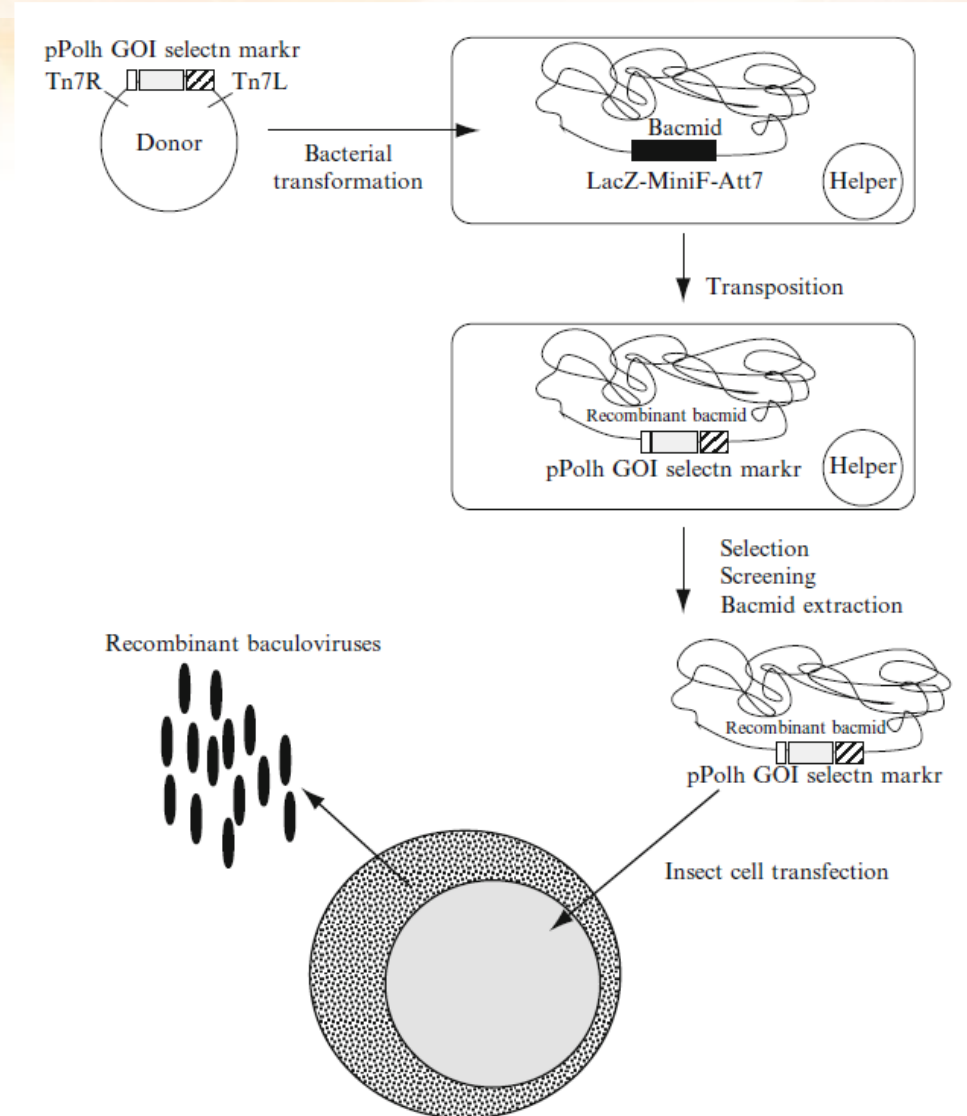
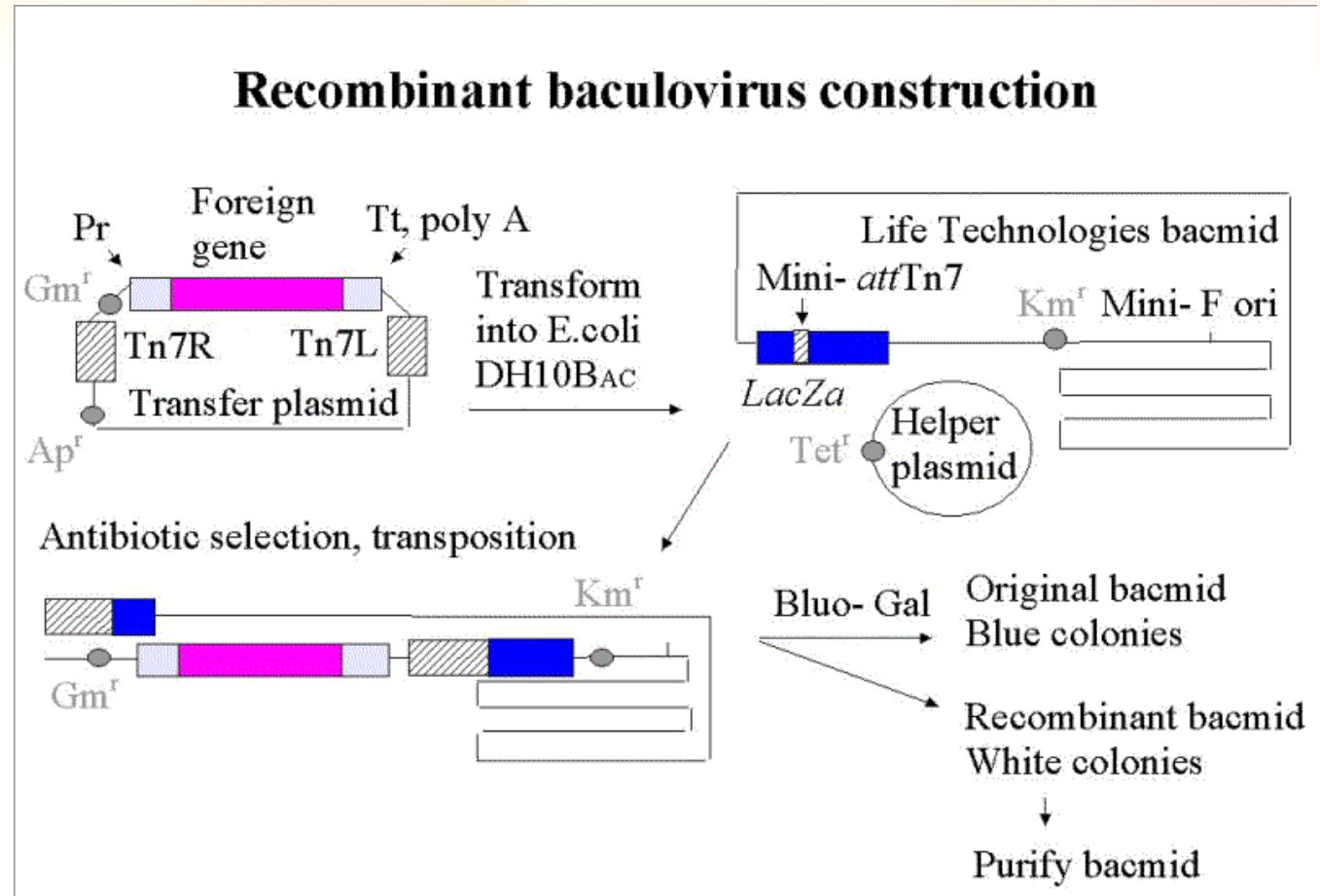


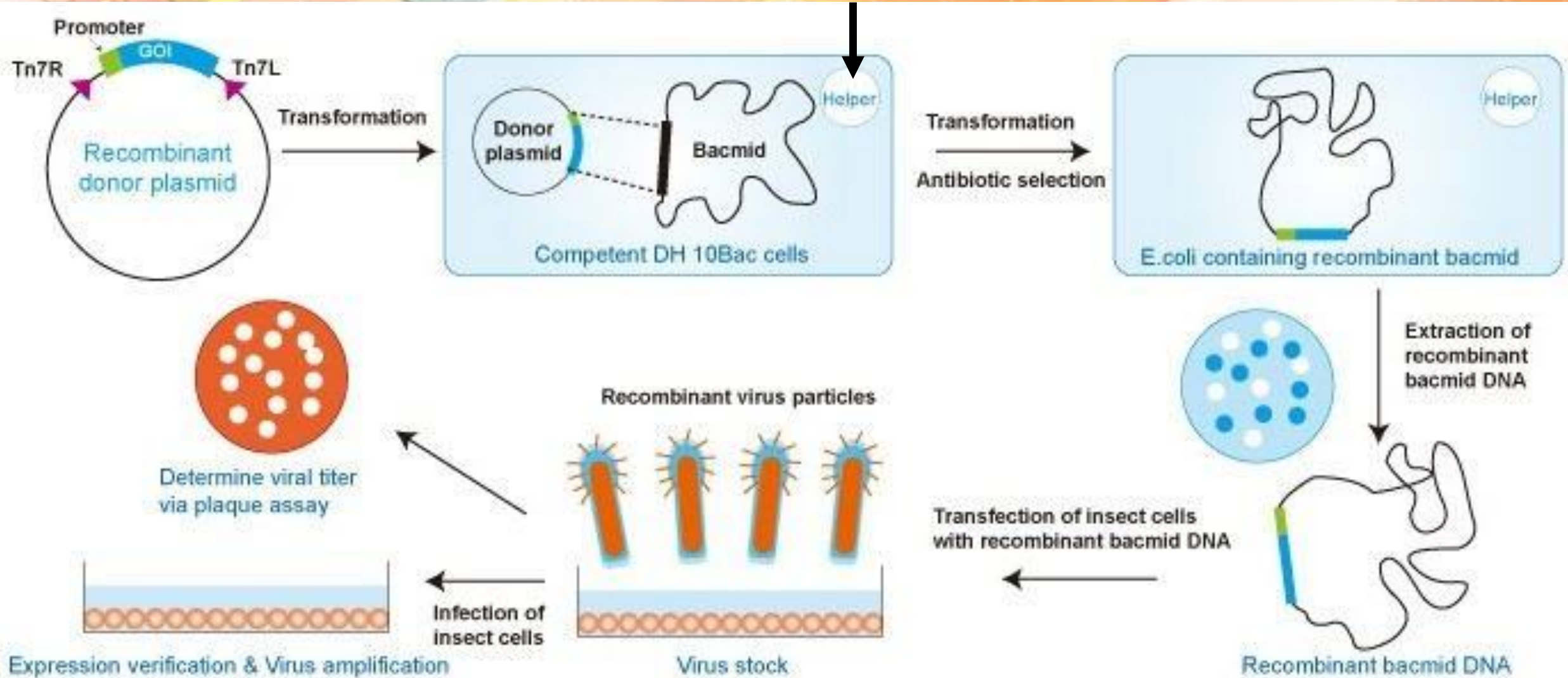
Figure 14.5 Producing a baculovirus expression vector by transposition between a bacmid and a transfer plasmid.

Bacmid

- **binární vektor, který se může replikovat v *Escherichia coli* a hmyzích buňkách** (obsahuje úplný genom baculoviru (bez PH), nízkokopiový počátek replikace z F plazmidu a att místa pro transpozon T7)
- **nese rezistenci ke kanamycinu**
- **nese gen lacZ, jím transformované kolonie tedy rostou modře, v přítomnosti IPTG**
- **rekombinantní gen je do něj vnášen transpozicí z jiného vektoru, transpozice směřuje do lacZ, výsledné kolonie rostou bíle**



transponáza

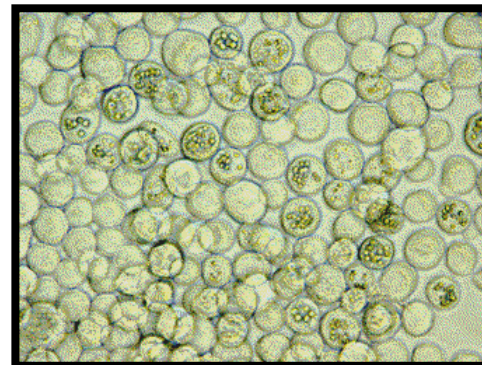


Základní vlastnosti hmyzího systému I.

- vhodný k produkci **vysokých hladin** rekombinantních proteinů (až 1 000 mg/mL)
- **správně posttranslačně modifikované** (sbalení, tvorba S-S můstků, oligomerizace, glykosylace, acylace, proteolytické štěpení)
- rekombinantní proteiny **biologicky aktivní a funkční**
- rekombinantní gen je vnesen do oblastí virového genomu, které **nejsou nutné pro replikaci viru**

Základní vlastnosti hmyzího systému II.

- rekombinantní bakulovirus **ztrácí jeden z postradatelných genů** (polh, v-cath, chiA ...), který je nahrazen genem rekombinantním
- rekombinantní protein je **exprimován v kulturách hmyzích buněk** nebo hmyzích **larvách** (není tak běžné)



Výhody hmyzího expresního systému

- **Vysoké** hladiny genové exprese, zvláště u intracelulárních proteinů
- Rekombinantní proteiny jsou většinou **rozpustné**, posttranslačně modifikované a snadno se izolují, obsah rodičovských proteinů je nízký, exprese probíhá v pozdních fázích infekce
- Hmyzí buňky se dobře kultivují v **suspenzních** kulturách – snadný převod do biorektorů
- Heterooligomerní proteiny lze exprimovat využitím **simultánní infekce** dvěma nebo více virovými vektory nebo vektorem **s více expresními kazetami**
- Bakuloviry mají **omezené spektrum hostitelů** z řad bezobratlých – bezpečná technologie

Glykosylace proteinů v hmyzích buňkách

- Hmyzí buňky mají rozdílnou glykosylaci ve srovnání se savčími
 - Snížená biologická aktivita
 - Imunogenita / alergická reakce
- Používání hmyzích buněk s transfekovanými savčími glykosyltransferázami

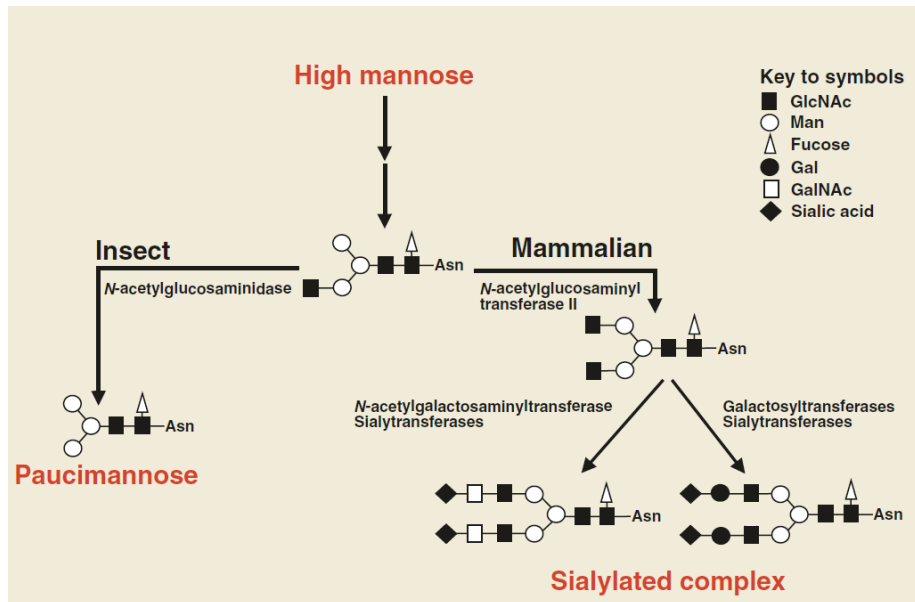


Figure 2 Overview of processing pathways and major *N*-glycans produced by insect and mammalian cell systems. The processing pathways in both systems yield a common intermediate. The major insect-cell end product (paucimannose) is produced by further trimming of this intermediate (left-hand branch), whereas the major mammalian-cell end products (including sialylated complex) are produced by elongation of this intermediate (right-hand branch).

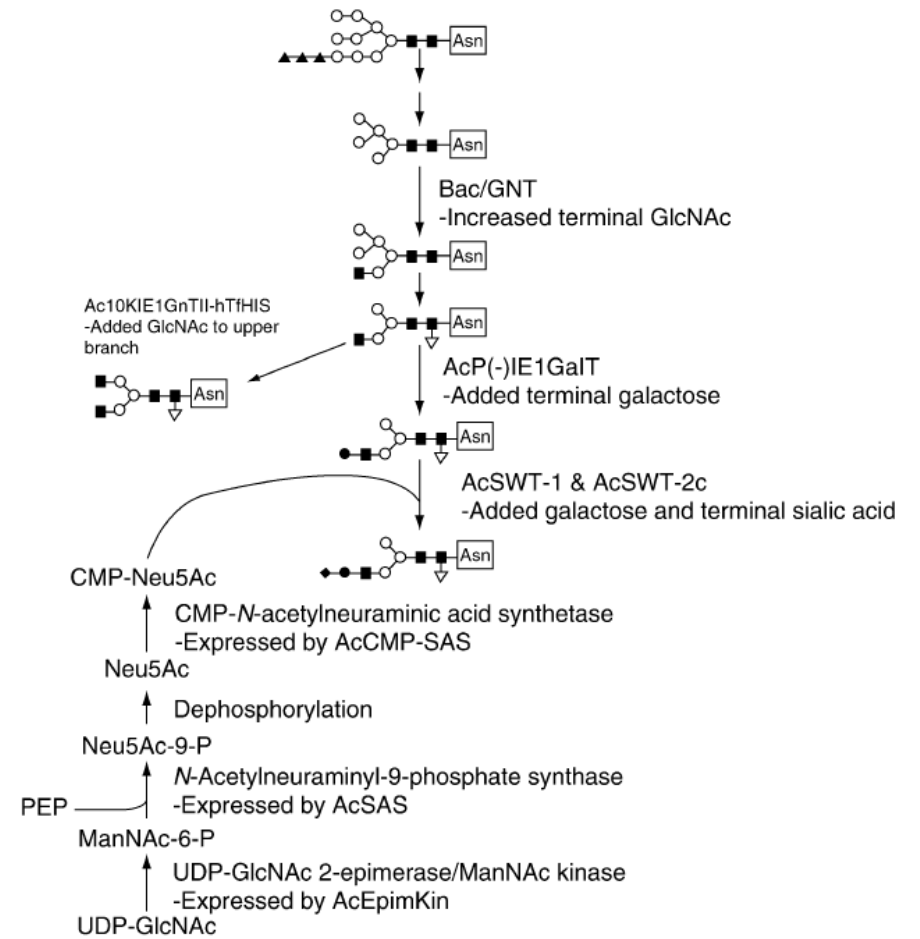
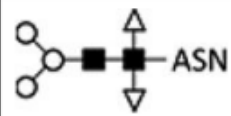



Fig 2. Structures of the *N*-glycans produced in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing mammalian glycosyltransferases. The pathway for synthesis of the sialylation donor substrate CMP-sialic acid (CMP-Neu5Ac) is also shown, and the names of the recombinant baculoviruses encoding mammalian enzymes that participate in this pathway are indicated. The standard monosaccharide symbols used in this figure are defined in the key shown in Fig. 1.

	Line #	Cell line	Glycotransferases					Sialic Acid Biosynthesis				Glycosylation Complexity	
			GalT	ST6Gal	ST3GalII	GlcNAc-TI	GlcNAc-TII	Synthase	Synthetase	Transporter	Epimerase	<small>Key to Symbols</small> ● Galactose ■ GlcNAc ▲ α-1,6-core fucose ◆ Sialic Acid ○ Mannose ▽ α-1,3-core fucose	
Mammalian cell lines	1	Wild type											Biantennary sialylation
Sf9 cell line	2	Wild type											Paucimannose glycosylation ⁶¹
	3	Wild type				B							Increased GlcNAc addition ⁷⁷
	4	Wild type	B										Improved galactosylation ¹¹⁵
	5	Sfp4GalT ¹¹⁶	I										First glycoengineered cell line
	6	Sfp4GalT/ST6 ¹¹⁷	I	I									Partial sialylation
	7	SfSWT-1 ⁴²	I	I	I	I	I						First biantennary complexity
	8	SfSWT-3 ¹¹⁸	I	I	I	I	I	I	I				Improved sialylation
	9	SfSWT-6 ¹¹⁹	I	I	I		I	I	I	I			1% terminal sialylation
	10	SfSWT-21 ¹²⁰	I	I			I	I	I	I	I		Terminal sialylation without Ac ₄ ManAc precursor
	11	SfEISWT ⁶⁴	I	I	I	I	I	I	I	I	I		13% terminal sialylation
	12	S09KSWT ⁶⁴	I	I	I	I	I	I	I	I	I		40% terminal sialylation
S2 cell line	13	S2/GalT-ST ^{121,122}	I	I									Partial sialylation



	Line #	Cell line	Glycotransferases					Sialic Acid Biosynthesis				Glycosylation Complexity	
			GalT	ST6Gal	ST3Gal	GlcNAc-TI	GlcNAc-TII	Synthase	Synthetase	Transporter	Epimerase	Key to Symbols ● Galactose ■ GlcNAc ▲ α-1,6-core fucose ◆ Sialic Acid ○ Mannose ▼ α-1,3-core fucose	
High-Five	14	Wild type with α-1,3-core fucose											Allergenic glycan ⁷⁶
	15	Wild type	B				B						MultiBac single-infection ⁸²

^aGalT, β-1;4-galactosyltransferase; ST6Gal, α-2,6-sialyltransferase; ST3Gal, α-2,3-sialyltransferase; GlcNAc-TI, N-acetylglucosaminyltransferase I; GlcNAc-TII, N-acetylglucosaminyltransferase II; ASN, Asparagine; B, expression from BEVS; I, expression from integrated genes in stable cell lines.

doi:10.1021/acs.iecr.8b0098

Transientní exprese v hmyzích buňkách

- Využívají se hlavně Sf9 buňky

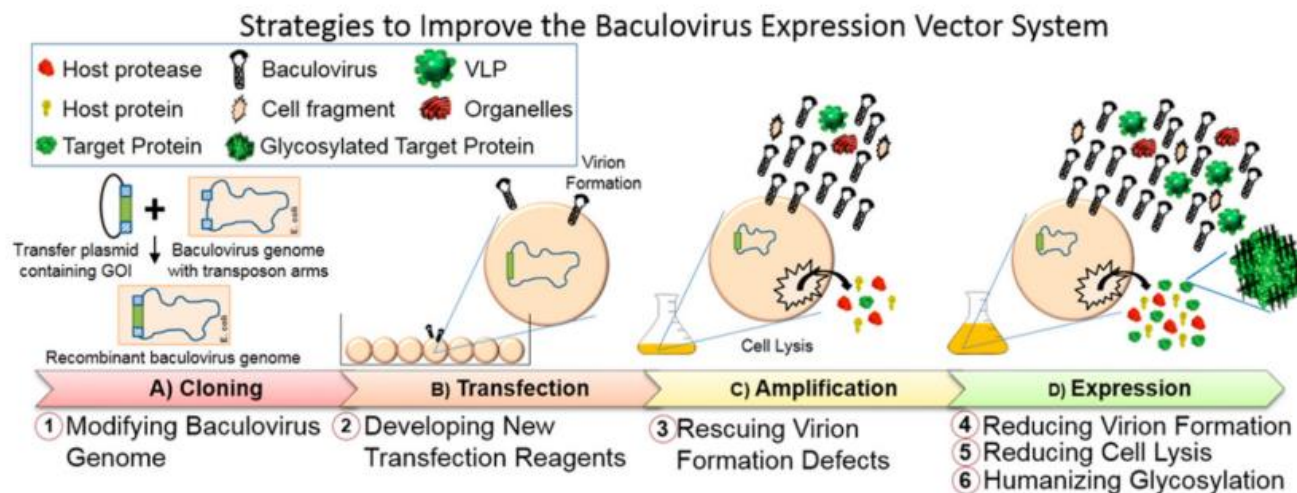
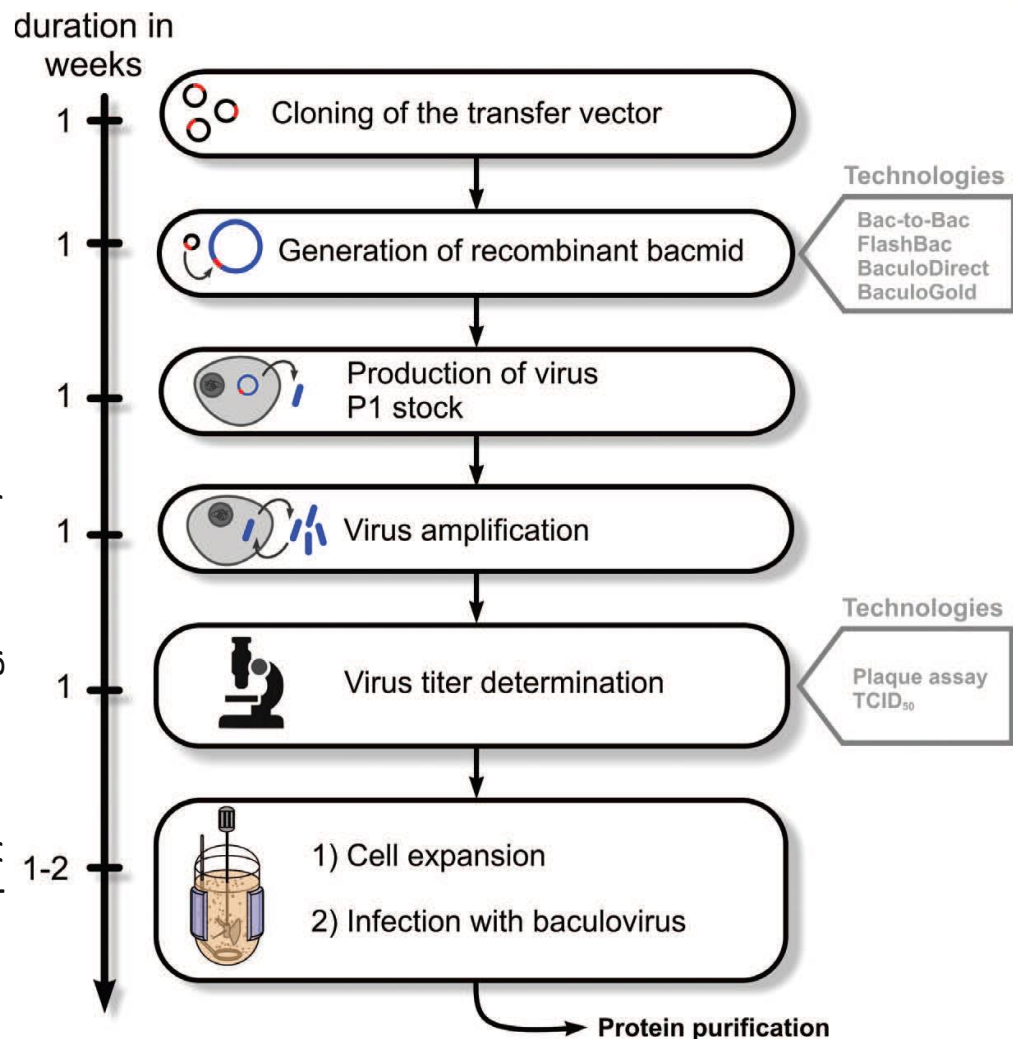


Figure 2. Overview of the BEVS and strategies to address issues associated with product contamination and glycosylation. BEVS includes four major steps: (A) Cloning the gene of interest (GOI) into a transfer plasmid and transposing into the baculovirus genome in a specialized *E. coli* strain (DH10Bac). (B) Transfection of the purified recombinant baculovirus genome in insect cells to form recombinant baculovirus progeny (Note: direct homologous recombination in insect cells could also be used but is not shown for simplicity). (C) Amplification to generate high-titer viral stocks. (D) Expression of the target protein. The six strategies listed have been applied at one of the four steps.

Využití transientní exprese

Application	Product name	Company	Stage	References
For human use				
Cervical cancer	CERVARIX [®]	GSK	Approved	[27]
Prostate cancer	PROVENGE [®]	Dendreon	Approved	[28]
Influenza	FluBlok [®]	Protein Sciences	Approved	[29, 30]
Influenza	A/H5N1 Virus-like particle	Novavax	Phase I (NCT01596725)	[31]
For veterinary use				
Procrine circovirus 2 (PCV2)	Porcilis [®] PCV	Merck	Approved	[32]
PCV2	CircoFLEX [®]	Boehringer Ingelheim	Approved	[33]
Swine fever	Porcilis Pesti [®]	Merck	Approved	[34]

Table 1. Selected human and veterinary vaccines produced using BEVS.

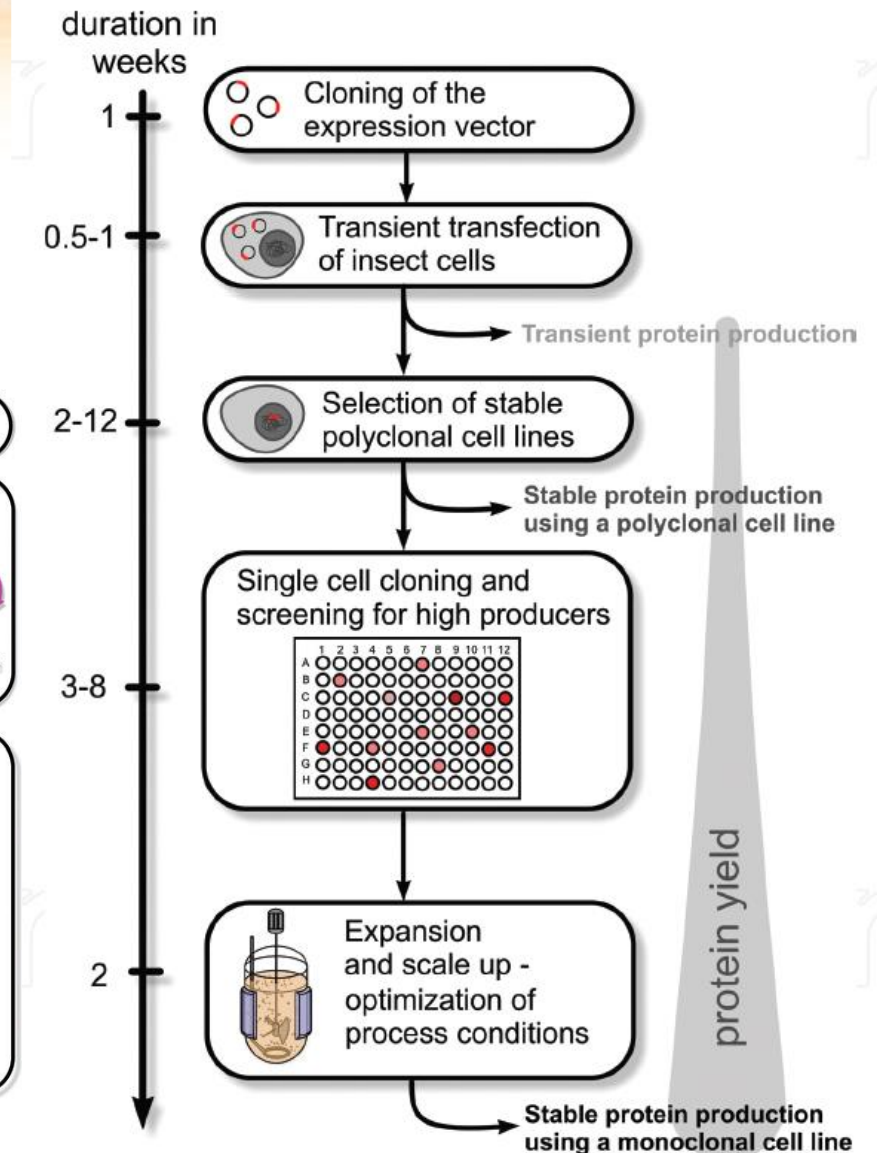
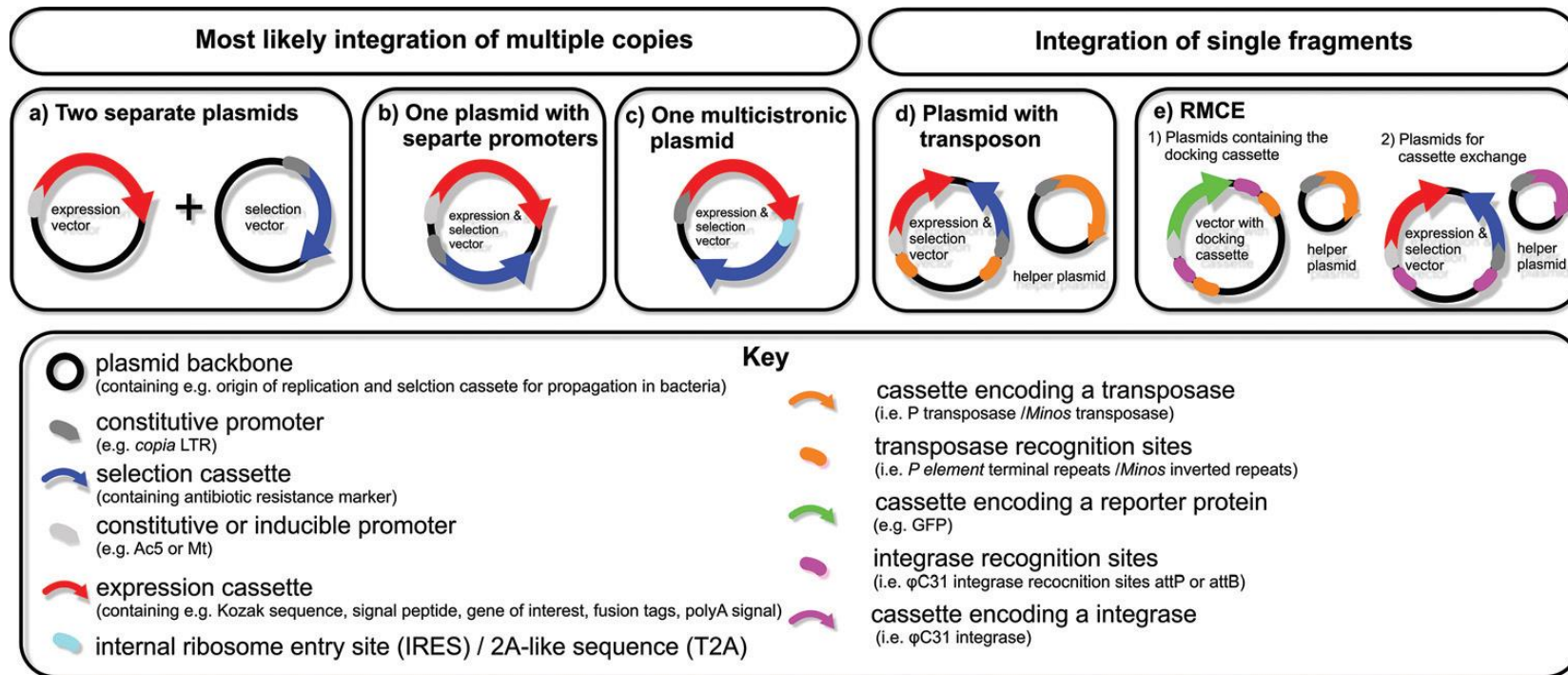
<http://dx.doi.org/10.5772/67849>

BEVS-derived products licensed for commercial use

Product/Indication	Manufacturer	Product Type
<u>Veterinary Vaccines (pigs)</u>		
<u>Classical swine fever</u>		
– Porcilis [®] Pesti	MSD Animal Health	subunit
– BAYOVAC CSF E2 [®] /Advasure ^{a)}	Bayer AG/Pfizer Animal Health	subunit
<u>Porcine circovirus type 2</u>		
– Circuvent [®] PCV	Merck Animal Health	VLP
– Ingelvac CircoFLEX [®]	Boehringer Ingelheim Vetmedica	VLP
– Porcilis [®] PCV	MSD Animal Health	VLP
<u>Human Vaccines</u>		
<u>Human papillomavirus</u>		
– Cervarix [®]	GlaxoSmithKline	VLP
<u>Influenza</u>		
– Flublok [®]	Protein Sciences Corporation	subunit
<u>Human Therapeutics</u>		
<u>Prostate cancer</u>		
– Provenge [®]	Dendreon	immunotherapy
<u>Lipoprotein lipase deficiency</u>		
– Glybera [®]	uniQure	rAAV-based gene therapy

Stabilní exprese v hmyzích buňkách

- Hlavně S2 buňky → rekombinantní rS2 buňky
- Gen je integrovaný do jaderné DNA
- Stabilní exprese, vysoká homogenita šarží
- Možnost využití perfuzních kultivačních systémů



Využití stabilní exprese

Proteins in clinical development

Recombinant placental malaria vaccine	Phase I	[76, 89, 90]
West Nile virus vaccine	Phase I	[76, 91]
HER-2 protein AutoVac™ (breast cancer)	Phase II	[76]

Proteins for research and process development

HIV-1 VLP and soluble HIV gp120	VLP	[92]
<i>Arabidopsis thaliana</i> sterol glycosyltransferase	Enzyme	[93]
Psalmotoxin 1	Small peptide toxin	[83]
M2 muscarinic and glucagon receptor	G-protein-coupled receptor	[94]
Atlantic salmon serum C-type lectin	Lectin	[95]
Monoclonal antibody against H5N1 influenza hemagglutinin	Antibody	[81]
Enhanced green fluorescent protein (eGFP)	Fluorescent marker protein	[96]

Vektory pro přenos do savčích buněk

1. Plazmidové vektory - plazmid se nereplikuje, vzácně se začleňuje do genomu buňky
 - prokaryotický plazmid + eukaryotická transkripční jednotka + selekční marker
 - využívají se k selekci transfekovaných buněk při kotransfekci a sledování transientní exprese genů
2. Virové vektory - kyvadlové vektory, replikující se v hostitelských buňkách
 - část bakteriálního vektoru + sekvence eukaryotických virů + selekční marker
 - vektory odvozené z SV40, bovinního papilomaviru, EBV, retrovirů, bakulovirů, viru vakcinie, adenovirů aj.
 - využívají se ke sledování stabilní nebo transientní exprese genů a k získávání rekombinantních proteinů ve velkém množství

Obecná struktura savčího expresního vektoru

- Promotor
- Zesilovače transkripce (enhancery)
- polyA sekvence
- Seleční marker
- Počátek replikace

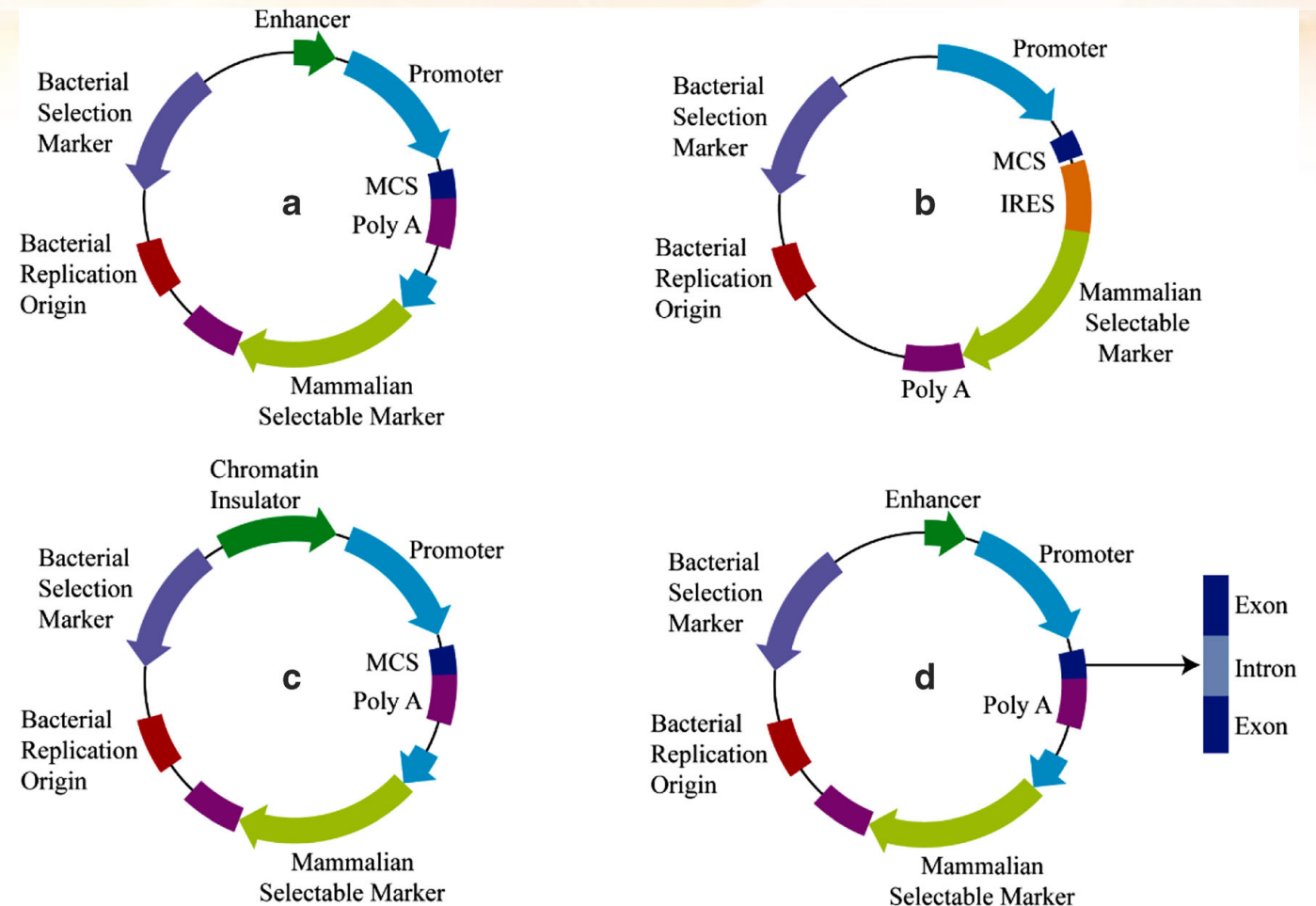


Fig. 1 Schematic of mammalian expression vector components (revised from). **a** Expression vector which contains promoter (with or without an enhancer element) and a 3' polyadenylation sequence, and GOI sequences are inserted into a multiple cloning site (MCS). The mammalian and bacterial selectable marker is regulated by a separate set of regulatory elements. **b** Bistronic vectors contain a single cassette for expression of a GOI and the MCS and a mammalian selectable

marker, separated by the IRES and under control of an upstream promoter and 3' polyA. **c** Expression vectors containing DNA opening elements (e.g., MARs or UCOEs), the element is typically placed upstream—and possibly also downstream—of the polyA. **d** Expression vectors containing one or more introns are frequently inserted into the coding sequence for a gene of interest

Promotory savčích vektorů

- Nejběžnější promotory pro expresi v savčích buňkách:
 - lidský cytomegalovirus enhancer/promotor (hCMV)
 - Simian virus 40 brzký promotor (SV40E)
 - CMV enhancer/kuřecí β -aktin promotor (CAG)
 - lidský prodlužovací faktor-1 α (hEF-1 α)
 - Elongační faktor-1 α čínské křečka (CHEF-1 α)
- Uměle vytvořený SCP1 (super core promoter 1) promotor \rightarrow 3 \times rychlejší než CMV promotor

Elements		Size (bps)	Source	Vector example
Promoter	hCMV	589	<i>Homo sapiens</i> cytomegalvirus	pRc, pCI, pAdCMV5, pcDNA3.1, pBudCE4.1
	mCMV	522	Murine cytomegalovirus	GS vector
	SV40	351	Simian virus	pGL2, PSF-SV40
	RSV	229	Rous sarcoma virus	pRSV, pRC-RSV
	PGK	555	Mouse phosphoglycerate kinase 1	pDRIVE5-SEAP-mPGK
	hEF1 α	1335	<i>Homo sapiens</i> elongation factor 1 α	pDRIVE5-GFP-1
	CHEF1 α	1660	CHO elongation factor 1a gene	pSF-CHEF1-Fluc
	CAG	1662	CMV enhancer/ β -actin promoter	pCAGG

Virové konstitutivní promotory

- Vysoká míra exprese GOI
- Virové promotory jsou často aktivní pouze během konkrétní fáze buněčného cyklu (např. CMV je aktivní během S fáze)
- Vysoká produkce cílového proteinu inhibuje růst buněk a může způsobit i apoptózu
- Virové promotory jsou náchylné k epigenetickému umlčování

Inducibilní promotory

- Nejsou závislé na buněčném cyklu
- Indukce proteinové exprese na vrcholu exponenciální fáze růstu zajistí maximální výtěžky
- IPTG-inducibilní *lac* operon
- Operony represoru tetracyklinové rezistence Tn10 (tetracycline resistance repressor operons) – Tet-Off/Tet-On

Další regulační oblasti

- PolyA sekvence
 - v 3'-UTR terminátoru
 - polyA sekvence z viru SV40 – zvýšená odolnost k nukleázám
- Introny
 - vložení intronu nebo nepřekládaného exonu před start kodon zvyšují efektivitu transportu mRNA z jádra do cytoplasmy a prodlužuje její poločas
- IRES
 - internal ribosome entry site
 - vkládá se mezi čtecí rámce bi/poly-cistronních mRNA
 - zajišťuje expresi více genů z jednoho promotoru
 - translace genu za IRES je nižší než před IRES
- Furin-2A sekvence
 - malé samoštěpící peptidy
 - vkládají se mezi dva ORF místo IRES
 - zajistí stejnou expresi obou genů

Selekční markery

Selective agent	Action of selective agent	Marker gene	Action of marker gene protein
Xyl-A	Damages DNA	Adenine deaminase (<i>ada</i>)	Deaminates Xyl-A
Blasticidin S	Inhibits protein synthesis	Blasticidin S deaminases (<i>Bsr</i> , <i>BSD</i>)	Deaminates blasticidin S
Bleomycin	Breaks DNA strands	Bleomycin-binding protein (<i>Ble</i>)	Binds to bleomycin
G-418 (Geneticin)	Inhibits protein synthesis	Neomycin phosphotransferase (<i>Neo</i>)	Phosphorylates G-418
Histidinol	Produces cytotoxic effects	Histidinol dehydrogenase (<i>hisD</i>)	Oxidizes histidinol to histidine
Hygromycin B	Inhibits protein synthesis	Hygromycin B phosphotransferase (<i>Hph</i>)	Phosphorylates hygromycin B
MSX	Inhibits glutamine synthesis	Glutamine synthetase (<i>GS</i>)	Cells that produce excess glutamine synthetase survive
MTX	Inhibits DNA synthesis	Dihydrofolate reductase (<i>dhfr</i>)	Cells that produce excess dihydrofolate reductase survive
PALA	Inhibits purine synthesis	Cytosine deaminase (<i>codA</i>)	Lowers cytosine levels in the medium by converting cytosine to uracil
Puromycin	Inhibits protein synthesis	Puromycin <i>N</i> -acetyltransferase (<i>Pac</i>)	Acetylates puromycin

MSX, methionine sulfoximine; MTX, methotrexate; PALA, N-(phosphoacetyl)-L-aspartate; Xyl-A, 9-β-D-xylofuranosyl adenine

Table 1 Common used elements of expression vector in mammalian cells

Elements	Size (bps)	Source	Vector example	Reference(s)	
Promoter	hCMV	589	<i>Homo sapiens</i> cytomegalovirus	pRc, pCI, pAdCMV5, pcDNA3.1, pBudCE4.1	Ho and Yang (2014)
	mCMV	522	Murinecytomegalovirus	GS vector	Xia et al. (2006)
	SV40	351	Simian virus	pGL2, PSF-SV40	Wang et al. (2016)
	RSV	229	Rous sarcoma virus	pRSV, pRC-RSV	Wang et al. (2016)
	PGK	555	Mouse phosphoglycerate kinase 1	pDRIVE5-SEAP-mPGK	Wang et al. (2016)
	hEF1 α	1335	<i>Homo sapiens</i> elongation factor 1 α	pDRIVE5-GFP-1	Wang et al. (2017); Veith et al. (2016)
	CHEF1 α	1660	CHO elongation factor 1a gene	pSF-CHEF1-Fluc	Wang et al. (2016)
	CAG	1662	CMV enhancer/ β -actin promoter	pCAGG	Wang et al. (2016)
PolyA	HGH	624	<i>Homo sapiens</i> growth hormone	pCMV5	Ostedgaard et al. (2005)
	SV40 late	222	Simian virus 40	pCHO1.0, pYL1	Liu et al. (2017)
	Synthetic polyA (SPA)	49	Rabbit β -globin	pAAV-CW3SA-EGFP	Choi et al. (2014)
	bGH	250	Bovine growth hormone	pcDNA3.1, pTS1012	Berman et al. (2018); Naddafi et al. (2018)
	Mutation BGH	164	Bovine growth hormone mutation	pVAX1GFP-BGH-M1	Azzoni et al. (2007)
	HSV TK	19	Herpes simplex virus	pTLD39	Leidy-Davis et al. (2018)
	Intron	hCMV intron	814	<i>Homo sapiens</i> cytomegalovirus major immediate-early protein gene	pGA1
Intron hEF1 promoter		942	<i>Homo sapiens</i> elongation factor EF-1-alpha gene	pTT5, pCK25	Kemmer et al. (2010)
Chimeric intron		133	Synthetic intron	pPAL	Alcolea et al. (2018)
Modified SV40 intron		99	Synthetic intron	pCMH148, AF286077	Wang et al. (1995)
β -Globin intron		572	Rabbit beta-globin intron II	pSG5, pMVAX1(c)	Du et al. (2014)
IRES	EMCV WT	505	Encephalomyocarditis virus	Tricistronic vectors	Ho et al. (2012)
	EMCV ATT	505	Mutated EMCV IRES with attenuated translation efficiency	Tricistronic vectors	Ho et al. (2012)
	FMDV	458	Foot and mouth disease virus	CHEF-F2A	Ebadat et al. (2017)
	HCV	368	Hepatitis C virus		Lafuente et al. (2002)
	HRV	622	<i>Homo sapiens</i> rhino virus		Stoneley et al. (1998)
	PV	635	Poliovirus		Johansen et al. (2000)
	AQP-4	292	Aquaporin 4		Baird et al. (2007)
	Apaf-1	581	Apoptotic protease-activating factor1		Holcik et al. (2003)
	BIP	222	Immunoglobulin heavy chain binding protein		Nevins et al. (2003)

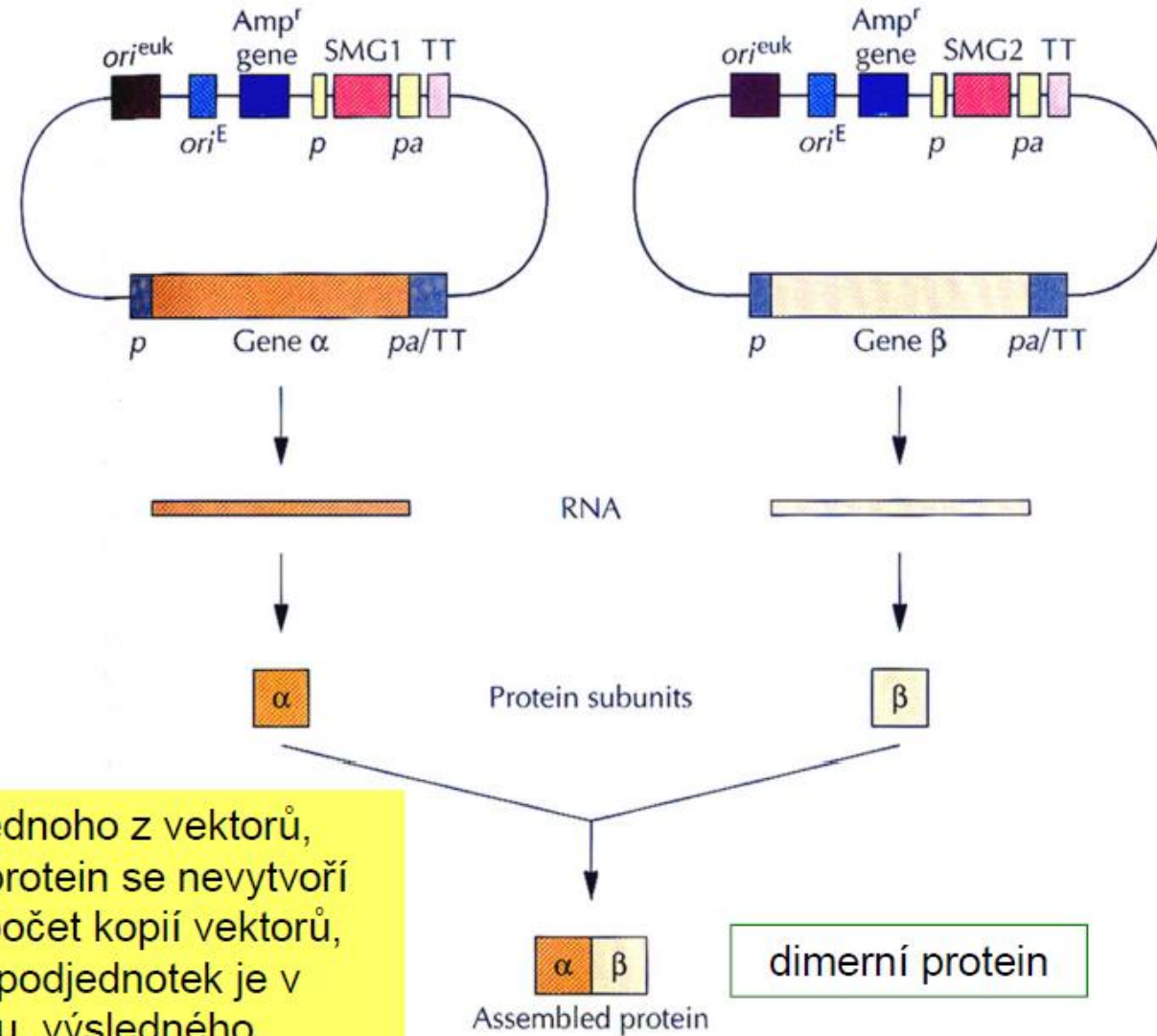
Table 1 (continued)

Elements	Size (bps)	Source	Vector example	Reference(s)	
	CAT-1	274	Cationic amino acid (arginine/lysine) transporter 1	Fernandez et al. (2001)	
	c-myc	352	c-myc proto-oncogene	Fernandez et al. (2001)	
	NRF	653	NF-kappaB repressing factor	Oumard et al. (2000)	
	Rbm3	721	Cold stress-induced mRNA	Chappell et al. (2001)	
	VCIP	571	Vascular endothelial growth factor (VEGF) and type 1 collagen inducible protein	Blais et al. (2006)	
Furin-2A	FMDV 2A(P2A)	22	Porcine teschovirus-1 2A	pLeo695	Scheller et al. (2018)
	T2A	21	Thosea asigna virus 2A	pCS4+	Kim et al. (2011)
	E2A	23	Equine rhinitis A virus	pCS4+	Kim et al. (2011)
	F2A	25	Foot-and-mouth disease virus	pCS4+	Kim et al. (2011)
Selection marker	DHFR	564	CHO cell	pCHO1.0	Invitrogen
	GS	1119	CHO cell	pEE12.4	Lonza biologics
	NeoR(G418)	804	Neomycin resistance gene from <i>E. coli</i>	pLeo695	Scheller et al. (2018)
	BSR	399	Blasticidin resistance gene from <i>Bacillus cereus</i>	pSG601	Goldfless et al. (2014)
	HygR	1026	Aminoglycoside phosphotransferase from <i>E. coli</i>	pNDC_SUB4	GenBank: LN866853.1
	Zeocin	375	<i>Streptomyces</i> CL990	pBudCE4.1	Thermo Fisher Scientific

Tvorba multimerních proteinů

- Možnosti přípravy:
 1. klonování genů pro podjednotky samostatně a pak jejich spojení *in vitro* – nízká účinnost
 2. klonování genů ve dvou vektorech v jedné buňce – sestavení proteinu *in vivo* – vysoká účinnost
- Možné komplikace:
 - Ztráta jednoho z vektorů, aktivní protein se nevytvoří
 - Různý počet kopií vektorů, jedna z podjednotek je v nadbytku, výsledného produktu je málo
- Řešení: **Klonování genů v bicistronickém expresním vektoru**

Dvouvektorový expresní systém v jedné buňce



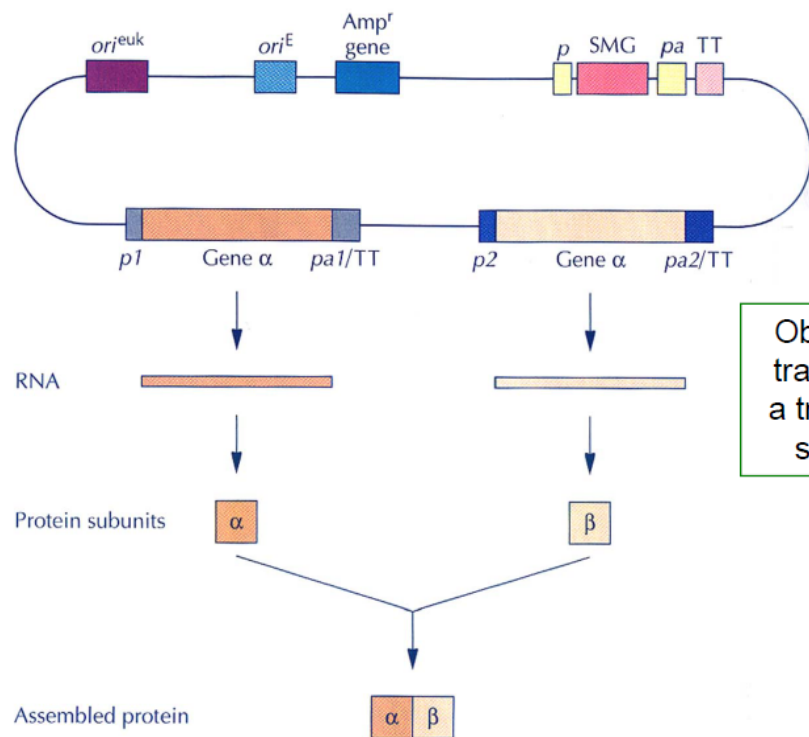
Ztráta jednoho z vektorů,
aktivní protein se nevytvoří
Různý počet kopií vektorů,
jedna z podjednotek je v
nadbytku, výsledného
produktu je málo

dimerní protein

Assembled protein

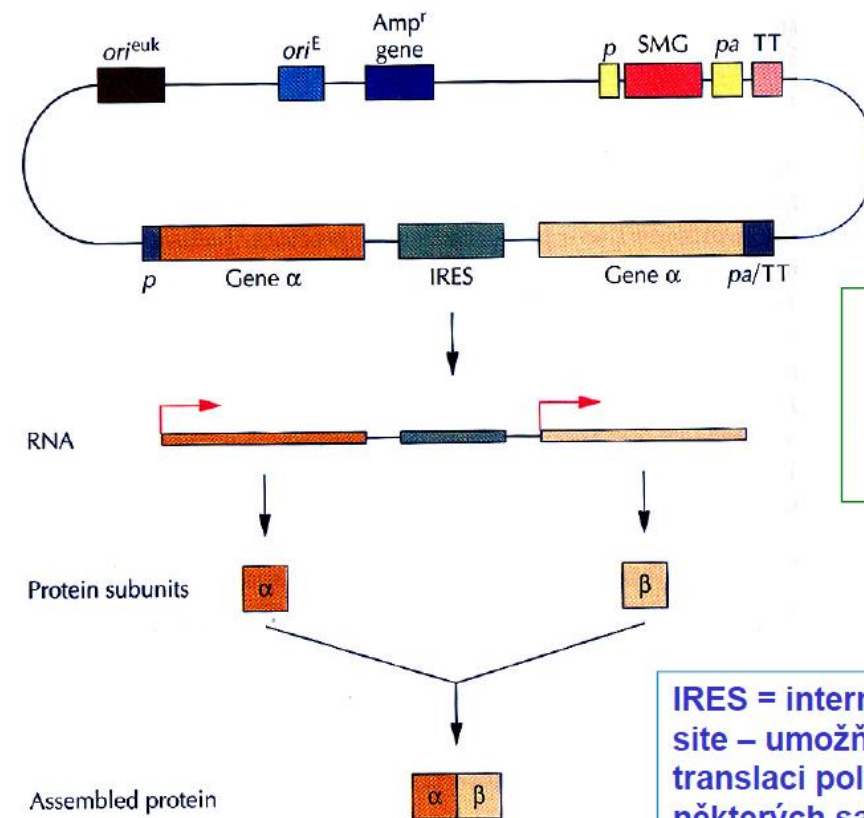
Dva geny na jednom vektoru

Expresní vektor se dvěma klonovanými geny kódujícími podjednotky heterodimeru



Oba geny jsou transkribovány a translatovány samostatně

Bicistronický expresní vektor pro klonování genů kódujících podjednotky heterodimeru



Jeden transkript (bicistronický), translatovaný do dvou proteinových podjednotek

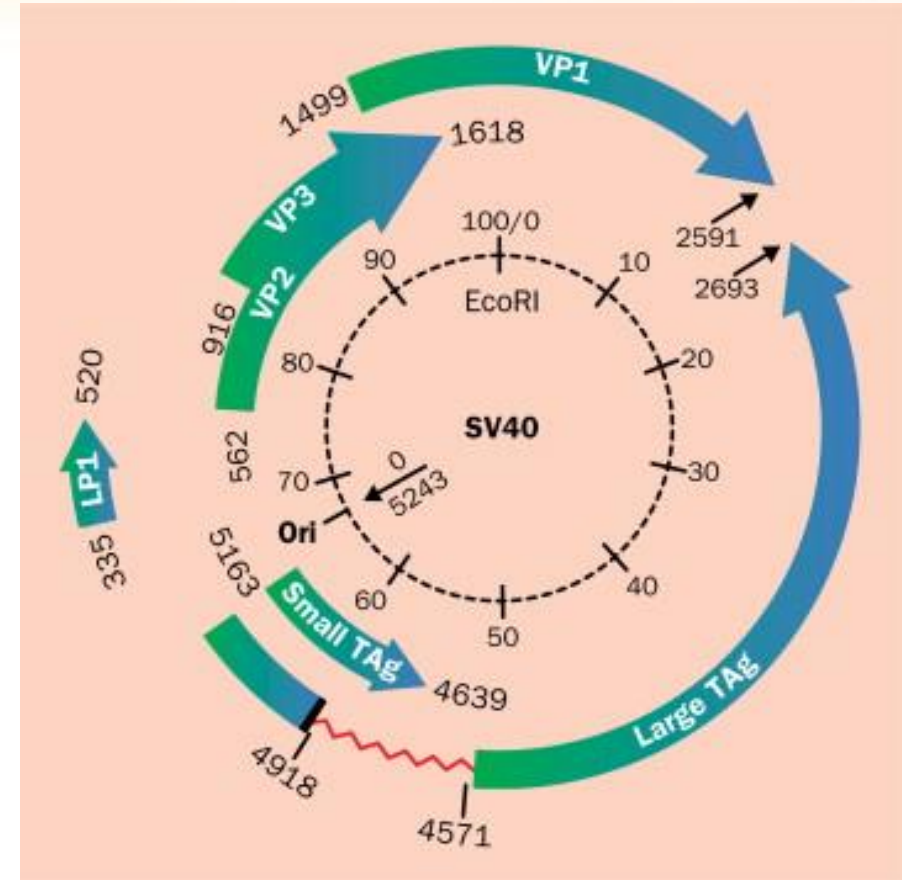
IRES = internal ribosomal entry site – umožňuje simultánní translaci polycistronické mRNA některých savčích virů

Retrovirové vektory

- Infikují široké spektrum buněk živočišných druhů a různé typy lidských buněk
- Infekce vede k integraci virového genomu do genomu hostitelské buňky – místo integrace je libovolné (přednostně v transkripčně aktivním chromatinu)
- Infekce retrovirem nemá za následek smrt buňky, často vede ke stálé produkci nových virionů
- Nevýhodou je schopnost retrovirových vektorů aktivovat transkripci genů sousedících s místy jejich začlenění

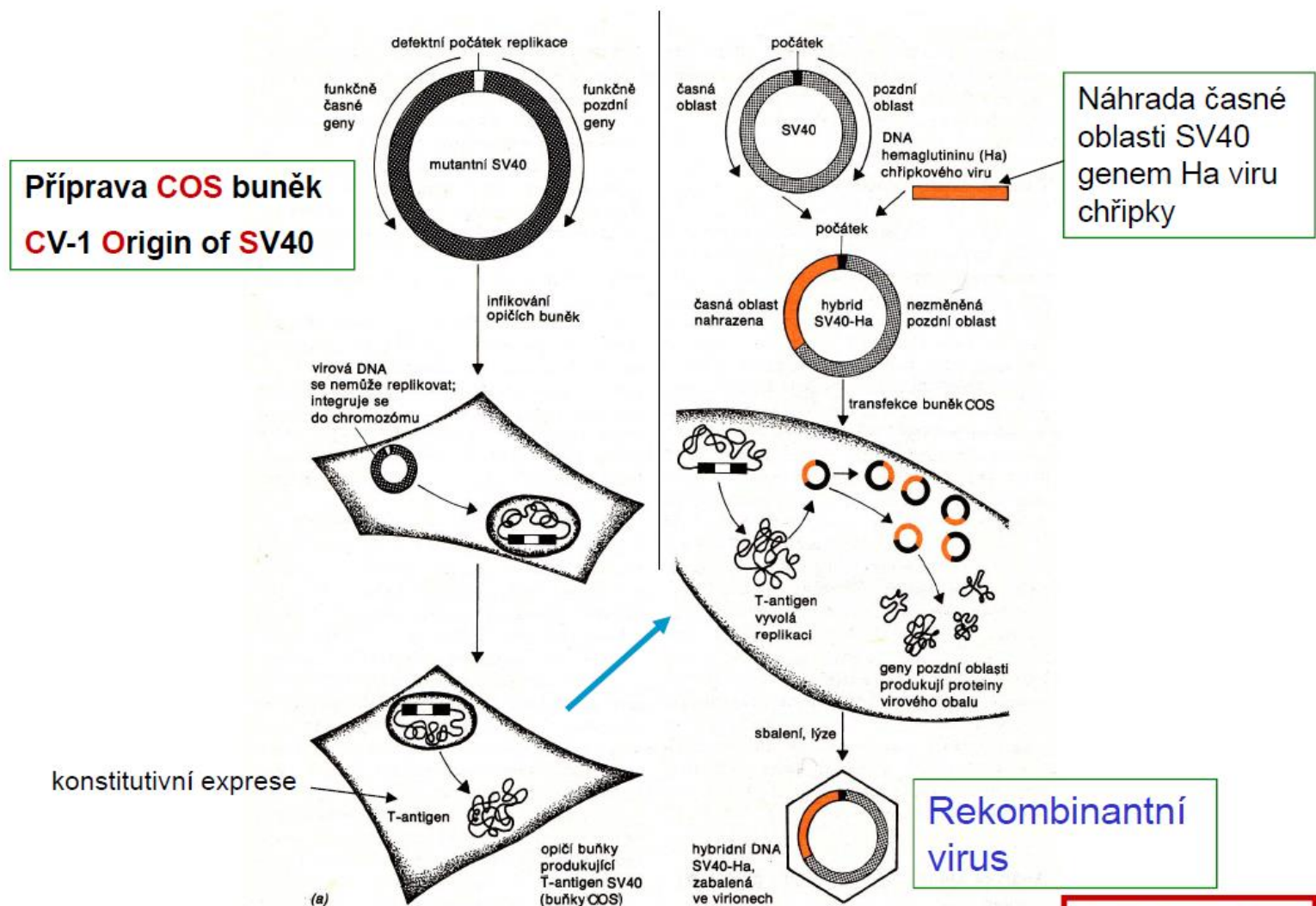
Vektory odvozené od SV40 viru

- Simian virus 40 – polyomavirus napadající opice a člověka
- genom = 5,2 kb kružnicová dsDNA
- životní cyklus:
 - v permissivních buňkách (opice) – lytický cyklus
 - v nepermissivních buňkách (myš, křeček) – integrace do genomu, transformace buněk
- Konstrukce vektorů:
 - náhrada časně nebo pozdní oblasti cizími geny, komplementace chybějících funkcí pomocným virem nebo pomocnými buňkami (**COS**)



COS buňky

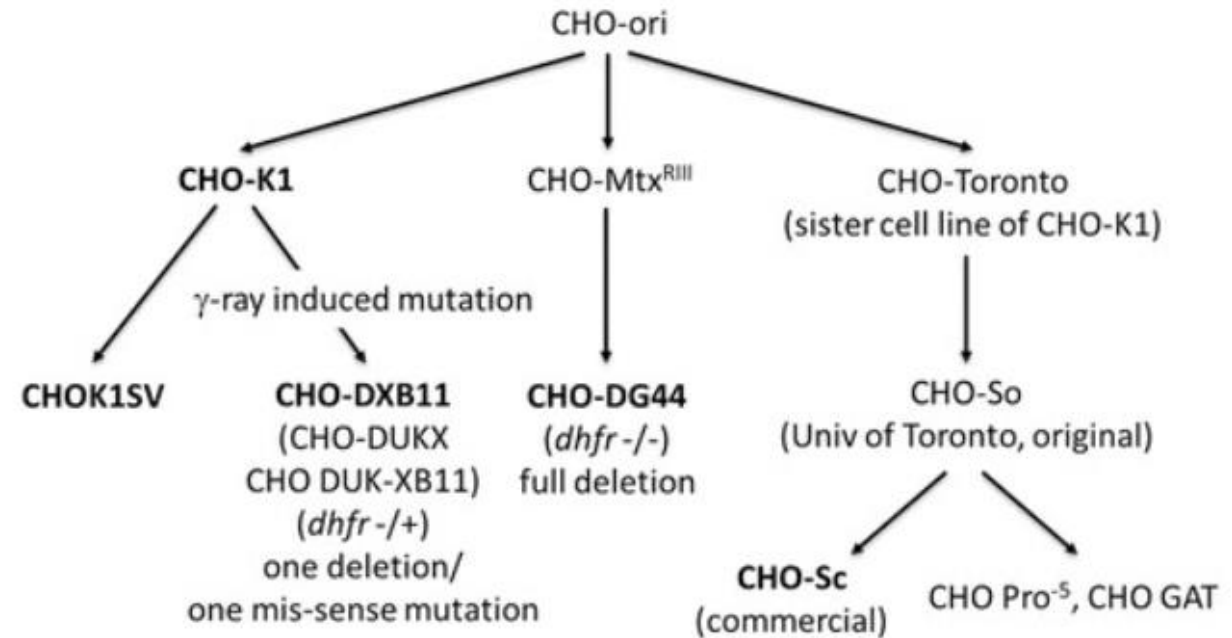
- Fibroblastům-podobné buňky odvozené z opičí ledvinové tkáně
- COS = **CV-1** (simian) in **O**ri_gin, and carrying the **SV40** genetic material
- Defektní SV40 virus integrovaný do genomu – nemůže se samostatně replikovat, ale tvoří všechny proteiny
- Replikace rekombinantních SV40 virů nebo plasmidů s **oriSV40**
- hlavně transientní exprese



Obr. 15-2: Záměna časné oblasti SV40. (a) Opičí buňky jsou infikovány mutovaným SV40, bez funkčního počátku replikace, ale s funkčními časnými i pozdními geny. Protože se takové molekuly nemohou replikovat, integrují se do chromozómu opičích buněk, kde pokračují v tvorbě funkčního T-antigenu. Tyto buňky se nazývají COS. (b) Časná oblast SV40 je nahrazena klonovaným genem pro hemaglutinin (Ha) chřipkového viru. Při transfekci COS buněk takto vytvořeným hybridem se v buňkách tvoří T-antigen, který vyvolává replikaci Ha-SV40 DNA. Funkční pozdní oblast tvoří proteiny virového obalu. Molekuly Ha-SV40 jsou sbaleny do virionů.

Používané savčí buňky

- Nejčastěji používané CHO buňky (60-70% rekombinantních biofarmaceutik na trhu)
 - hlavně stabilní exprese
 - rostou v suspenzi
 - produkce proteinu až 10 g/L
- Sp2/0 a NS0 myší myelom, YB2/0 potkaní myelom a baby hamster kidney (BHK) buňky
- Lidské linie PER C6 a CAP
 - ideální posttranslační modifikace → nízká imunogenita terapeutických proteinů



doi: 10.1007/978-3-319-52287-6_29

Table 1 Biotherapeutics ranking in the top 50 pharmaceuticals of 2014 based on global sales

Rank	Trade name	Proper name	Manufacturer	Age	Sales (\$USB)	Technology	Application	Expression host
1	Humira	adalimumab	AbbVie & Eisai	12	12,890	Antibody, human IgG1/k	TNF α Inhibitor	CHO
3	Enbrel	etanercept	Amgen & Pfizer & Takeda	16	8915	Recombinant Protein	TNF α Inhibitor	CHO
4	Remicade	infliximab	JNJ & Merck & Mitsubishi	16	8807	Antibody, chimeric IgG1/k	TNF α Inhibitor	Sp2/0
5	Lantus	insulin glargine	Sanofi	15	8428	Recombinant Protein	Insulin analogue	<i>E. coli</i>
6	Rituxan	rituximab	Roche	17	7547	Antibody, chimeric IgG1/k	Anti-CD20	CHO
8	Avastin	bevacizumab	Roche	10	7018	Antibody, humanized IgG1/k	Anti-VEGF	CHO
9	Herceptin	trastuzumab	Roche	16	6863	Antibody, humanized IgG1/k	Anti-HER2	CHO
16	Neulasta	pegfilgrastim	Amgen & Kyowa Hakko	16	4599	Recombinant Protein	G-CSF	<i>E. coli</i>
18	Lucentis	ranibizumab	Novartis & Roche	8	4301	Antibody, humanized IgG1/k Fab	Anti-VEGF	<i>E. coli</i>
20	Prevnar 13	pneumococcal vaccine	Pfizer & Daewoong	4	4297	Bacterial Vaccine	Pneumococcal vaccine	Pneumococcal strains
26	Epogen	epoetin alfa	Amgen & JNJ & Kyowa	25	3292	Recombinant Protein	Erythropoietin	CHO
27	NovoRapid	Insulin aspart	Novo Nordisk	16	3109	Recombinant protein	Insulin analogue	<i>S. cerevisiae</i>
29	Avonex	Interferon beta-1a	Biogen	18	3013	Recombinant Protein	Interferon beta	CHO
30	Eylea	aflibercept	Regeneron & Bayer & Santen	3	2972	Recombinant Protein	VEGFR kinase inhibitor	CHO
34	Humalog	Insulin lispro	Eli Lilly	19	2785	Recombinant Protein	Insulin analogue	<i>E. coli</i>
38	Levemir	Insulin detemir	Nov Nordisk	11	2533	Recombinant Protein	Insulin analogue	<i>S. cerevisiae</i>
40	Botox	onabotulinumtoxinA	Allergan & GlaxoSmithKline	12	2496	Bacterial Protein	Botulinum toxin	<i>C. botulinum</i>
42	Aranesp	darbepoetin alfa	Amgen & Kyowa Hakko	13	2454	Recombinant Protein	Erythropoietin	CHO
43	Rebif	Interferon beta-1a	Merck KGaA	17	2444	Recombinant Protein	Interferon beta	CHO
44	Prolia	denosumab	Amgen & Daiichi Sankyo	4	2411	Antibody, human IgG2/k	Anti-RANKL	CHO
45	Victoza	liraglutide	Novo Nordisk	6	2393	Recombinant Protein	Glucagon-like peptide 1 agonist	<i>S. cerevisiae</i>