

His-tags - et elegant værktøj til farmaceutisk produktion

Her beskrives en afprøvet teknologi, der både er opskalerbar og kan anvendes kommercielt uden licensbetaling

Af José Arnau og John Pedersen, Unizyme Laboratories A/S

Fremstilling af rekombinante proteiner er en central proces i farmaceutisk produktion. Derfor er det vigtigt at designe en fremstillingsproces, der integrerer de mest fordelagtige teknologier betragtet fra både økonomiske, kvalitetsmæssige og regulatoriske synsvinkler. En af de mest attraktive teknologier til produktion og oprensning af rekombinante proteiner er »Histidine tags« (His-tags). Her præsenteres en oversigt over His-tag-teknologien samt muligheder for anvendelse i farmaceutisk produktion heriblandt TAGZyme-systemet udviklet af Unizyme Laboratories A/S.

Fremstilling af rekombinante proteiner til terapeutisk anvendelse: Et kort teknologisk indblik

Insulin er et kendt eksempel på et af de mange terapeutiske proteiner, der i dag produceres vha. rekombinant DNA. Med den stærke udvikling inden for genomisk forskning - herunder det humane genom - er antallet af tilgængelige sekvenser med potentiel anvendelse som terapeutiske proteiner eksploderet i de senere år.

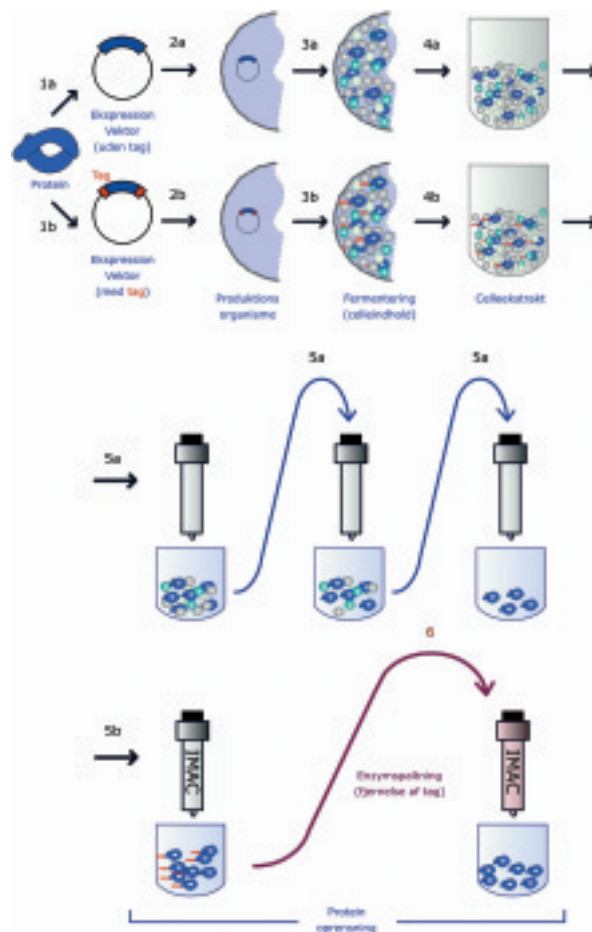
I figur 1 er der vist en oversigt over en fremstillingsproces for et terapeutisk protein. Når man har identificeret et protein med terapeutisk potentiale, bruger man typisk molekylærbiologiske teknikker til at klonе den pågældende gensekvens i en ekspressionsvektor (figur 1, trin 1a). Derefter fremstilles en produktionsorganisme ved at introducere DNA'et i værtsorganismen (figur 1, trin 2a), typisk i en bakterie (*E. coli*), i gær, m.fl.

Produktionsorganismen dyrkes i et passende medie under kontrollerede forhold (fermentering; figur 1, trin 3a), hvor opformering af celler typisk er forbundet med produktion af proteinet.

Fermenteringsudbyttet (celleekstraktet) består bl.a. af en kompleks blanding af mange proteiner (figur 1, trin 4a). Det er udgangsmaterialet for oprensning af det ønskede protein i den del af fremstillingsprocessen, der er kendetegnet som DSP (downstream proces). I DSP bruges kromatografiske metoder til at fjerne urenheder og fremstille et rent protein. Som regel er en kombination af tre eller flere oprensningstrin nødvendige ved fremstilling af et terapeutisk protein (figur 1, trin 5a).

Der udvikles typisk en specifik DSP til hvert protein. Oprensning er baseret på binding af det pågældende protein til søjlematerialet, mens uønskede komponenter såsom andre proteiner, mediekomponenter m.m. fjernes. En standard-DSP for et givent protein uden affinitets-tag resulterer dog i et tab på 50-70% af det ønskede protein under oprensning.

Farmaceutiske produkter til mennesker skal fremstilles under cGMP (current Good Manufacturing Practice). Det er derfor vigtigt at designe en fremstillingsproces, der opfylder alle krav



Figur 1. Oversigt over fremstillingsproces for et terapeutisk protein. Via molekylærbiologiske teknikker klones den pågældende gensekvens i en ekspressionsvektor (trin 1a). Derefter fremstilles en produktionsorganisme ved at introducere DNA'et i en værtsorganisme (trin 2a). Produktionsorganismen er dyrket under kontrollerede forhold (trin 3a), hvor opformering af celler er forbundet med produktion af proteinet. Udbyttet (celleekstrakt) består bl.a. af en kompleks blanding af mange proteiner (trin 4a). Det er udgangsmaterialet til oprensning af det ønskede protein, hvor der anvendes kromatografiske metoder til at fjerne urenheder. En kombination af tre eller flere oprensningstrin er nødvendig for at fremstille et terapeutisk protein (trin 5a). Ved at designe den genetiske konstruktion til at indeholde en affinitets-tag (trin 1b, ekspressionsvektor med tag) kan man øge produktudbyttet under oprensning og forenkle hele DSP (trin 5b). For at fjerne affinitets-tag kan man bruge forskellige enzymatiske metoder, der involverer spaltning eller nedbrydning af tag (trin 6). Til oprensning af His-taggede proteiner anvendes IMAC-søjler (figur 2).

til sikkerhed, kvalitet og skalerbarhed, samtidig med at processen er økonomisk holdbar. En af de mest oplagte muligheder for en mere profitabel DSP er at fremstille proteinet med en »affinitets-tag«.

Hvorfor skal man bruge affinitets-tags?

Affinitets-tags kan være korte aminosyresekvenser (typisk 5-15 aminosyrer) eller længere proteinkæder, der specifikt binder til et givent søjlemateriale. Ved at designe den genetiske konstruktion til at indeholde en passende affinitets-tag (ekspressionsvektor, figur 1) kan tabet af produkt under oprensning (udbytte for affinitets-taggede proteiner ligger på 80-90%) og antallet af oprensningstrin (figur 1, trin 5b) reduceres. Affinitets-tags er specielt nyttige i en fremstillingsproces, hvor udgangsmaterialet til DSP består af et meget komplekst celleekstrakt, hvor det ønskede protein udgør en meget lille andel [1].

Affinitets-tag kan passende placeres i den ønskede proteinsekvens (f.eks. N-terminal eller C-terminal, figur 1, trin 1b). Et protein, der indeholder en affinitets-tag, kan dermed binde specifikt og effektivt til et bestemt søjlemateriale, mens resten af indholdet i et celleekstrakt kan fjernes (figur 1, trin 5b).

Når man udvikler en proces til produktion af et nyt protein, er det også krævende at karakterisere de biokemiske egenskaber. Man kan f.eks. anvende antistoffer imod proteinet for at kunne følge produktionen under fermentering og oprensning. Fremstillingen af proteinspecifikke antistoffer er tidskrævende og kun mulig, hvis man i forvejen har oprenset proteinet. Hvis man derimod tilføjer en affinitets-tag med specifik binding til et søjlemateriale, som fusion til det protein man vil producere, kan ovennævnte begrænsninger undgås. Antistof-

fer til tags og fusionspartnere er kommercielt tilgængelige og kan bruges til f.eks. monitorering af produktion og oprensning. Affinitets-tags kan derfor betragtes som universelle tags i lighed med sekundære antistoffer til immunologisk proteindetektion (Western blot, ELISA, m.fl.).

Krav om renhed for farmaceutiske produkter, der er beregnet til behandling af sygdom hos mennesker, er selvfølgelig meget højt. Traditionelle proteinoprensningsprocedurer for terapeutiske proteiner består derfor af tre eller flere oprensningstrin, såsom ionbytning, hydrofob interaktion, gelfiltrering, m.fl. (figur 1, trin 5a). Med en affinitets-tag kan man reducere antallet af oprensningstrin i DSP samt øge udbyttet.

Hvordan vælger man en affinitets-tag?

Der findes forskellige affinitets tags til produktion af rekombinante proteiner. Nogle af de tilgængelige systemer er mest anvendelige til laboratorieskala, mens andre er skalerbare og dermed egnede til kommerciel produktion.

Der findes en type affinitets-tags kaldet epitope-tags, der bl.a. inkluderer FLAG (mere info: <http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/FLAG-tag.html>). Epitope-tags er korte aminosyresekvenser, der genkendes af specifikke antistoffer. Disse antistoffer kan immobiliseres og anvendes til kromatografisk oprensning.

På trods af fordelene ved høj affinitet skal man overveje de ekstra omkostninger, der er forbundet med brug af antistoffer for epitope-taggede proteiner ift. f.eks. »immobilised metal affinity chromatography«, IMAC (til His-tags), der kan genbruges. Det er især væsentligt, hvis man vil opskalere processen til at producere materiale til kliniske afprøvninger samt til videreudvikling af terapeutiske proteiner (gramskala).

"Life itself is the most wonderful fairy tale"

Hans Christian Andersen

Bringing Genomes to Life

Programme

Genomics and Systems Biology
Proteomics and Protein Engineering
Biochemical Engineering
Pharma Biotechnology
Industrial Biotechnology
Food Biotechnology
Environmental Biotechnology

Workshops

Focus on Biotechnology and Society

Venue

The Technical University of Denmark, Copenhagen

Deadlines

Poster Abstracts: April 1, 2005
Registration: July 20, 2005

Conference fee

Industry 600 Euros
University 400 Euros
M.Sc. and Ph.D. Students 200 Euros

Information and Registration: www.ecb12.dk



12th European Congress on Biotechnology
August, 21 – 24, 2005
Copenhagen, Denmark

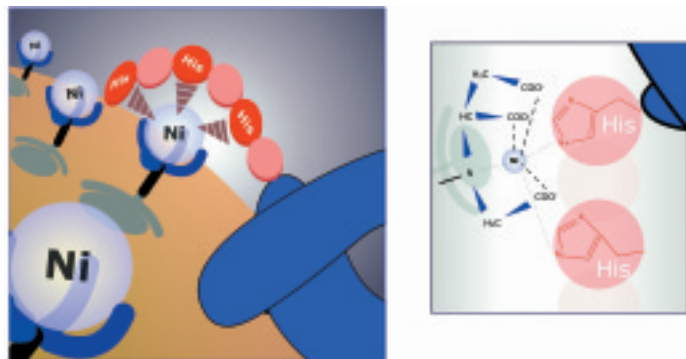


ECB12 is organised by The Danish Biotechnology Forum and The Danish Society of Biochemistry and Molecular Biology on behalf of the European Federation of Biotechnology

His-tags

I de sidste år har brug af »histidine tags« (His-tags) opnået en stor udbredelse, og i dag er His-tags den mest foretrukne affinitets-tag. I mere end 60% af alle studier om proteinstruktur anvendes His-tags til produktion og oprensning af proteinet [2].

Korte histidin-strækninger på 3-6 aminosyrer (His-tags) kan binde til f.eks. nikkel-, kobber- eller zink-søjler via IMAC under neutral eller svagt alkalisk pH (figur 2). Metallerne er vha. chelation immobiliseret på et kromatografisk materiale.



Figur 2. Binding af His-tags til IMAC. Korte histidin-strækninger (3-6 aminosyrer) binder med høj affinitet til nikkel (Ni)-søjler via »immobiliseret metal affinitet kromatografi« (IMAC) under neutral eller alkalisk pH. Ni er immobiliseret på et kromatografisk materiale via chelation. Histidiner danner komplekser med »chelerede« metaller. Metalbinding af histidin sker via imidazol-sidekæden (detaljeret i højre panel). Efter binding af His-tag-proteiner til IMAC og fjernelse af urenheder er proteinet elueret ved lav pH eller ved tilsætning af imidazol.

Histidiner, og i mindre omfang cysteiner, danner komplekser med »chelerede« metaller. Metalbinding af histidin sker via dens imidazol-sidekæde (figur 2). Det er netop histidinindholdet, der har indflydelse på binding af et protein til en IMAC-søjle. Efter binding af His-tag-proteiner til IMAC og fjernelse af urenheder elueres proteinet ved lav pH eller ved tilsætning af imidazol.

IMAC-søjler har været bredt anvendt i downstream processer, der er etableret og valideret procedurer for sanitering (Cleaning in Place, CIP) [3]. Pga. søjlernes robusthed og den høje effektivitet (typisk udbytteprocent 90%) er metoden et oplagt alternativ til mere traditionelle DSP-strategier.

His-tags og IMAC er dog ikke egnede til alle proteiner. F.eks. anbefales det ikke at bruge IMAC til oprensning af proteiner, der har en metalion i det aktive site eller andre metalloproteiner [4]. Ydermere kan der i nogle tilfælde være andre proteiner og komponenter i celleekstrakter, der også binder IMAC med høj affinitet.

Fjernelse af His-tags vha. endo- eller exopeptidaser

Proteiner med en intakt His-tag kan bruges til forskellige applikationsforsøg, men sundhedsmyndighederne forventer, at affinitets-tags fjernes inden terapeutiske proteinkandidater afprøves klinisk. På den måde sikrer man, at det er det »native protein«, der anvendes til test på dyremodeller og mennesker. Ligeledes er det anbefalet, at man fjerner affinitets-tags, inden man forsøger at klarlægge proteinets tredimensionelle struktur, f.eks. til strukturbaserede drug design.

Der findes adskillige enzymbaserede metoder til at fjerne affinitets-tags. De fleste metoder anvender en specifik endoprotease og en tilhørende genkendelsessekvens (GS) for den givne protease i selve tag'en. For at en endoprotease kan spalte en affinitets-tag, skal GS være tilgængelig (eksponeret). Det er ikke altid tilfældet i f.eks. meget kompakte protei-

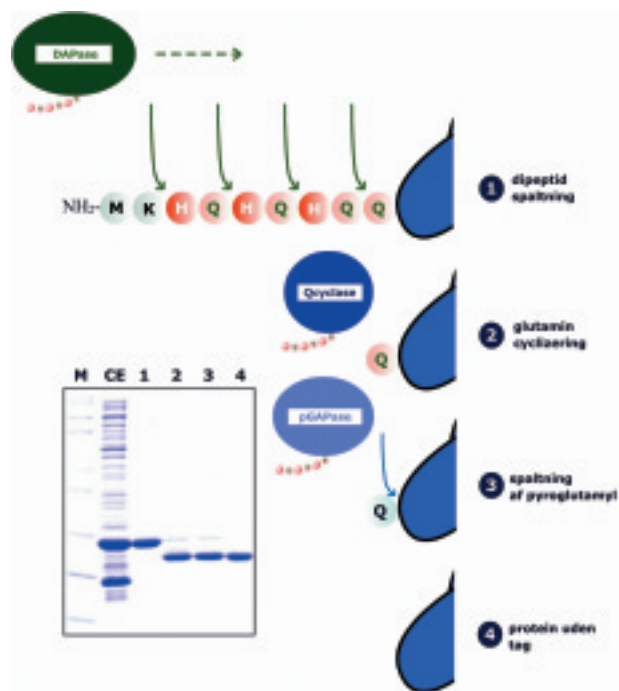
ner. For at fremme spaltningseffektiviteten placeres der typisk en »linker region« mellem GS i affinitets-tag'en og proteinet. Oftest indeholder det processerede protein stadig rester af tag'en, dvs. de aminosyrer, der er placeret i den C-terminale del af GS. Ved høj koncentration, langtidsbehandling eller hvis der er GS-lignende sekvenser i proteinet kan nogle af endoproteaserne forårsage uønsket (uspecifik) spaltning i andre af proteinets regioner.

Et alternativ til endoproteaser er at anvende exopeptidaser til at fjerne tags. Dermed undgår man uspecifik (endoproteolytisk) nedbrydning af proteinet.

DAPase, en rekombinant exopeptidase til at fjerne N-terminale tags

DAPase er en rekombinant dipeptidyl aminopeptidase I. Den fjerner sekventielt dipeptider fra proteinets N-terminale ende (figur 3; [5]). Nogle studier havde tidligere antydnet, at det naturlige enzym – udvundet fra væv, såsom lever – kan vise endoproteaseaktivitet. Det skyldes sandsynligvis, at præparationer fra væv kan indeholde flere forurenende enzymer, der oprenses sammen med dipeptidyl aminopeptidase I. Unizyme har udført detaljerede studier med forskellige substrater og demonstreret, at DAPase ikke har endoproteolytisk aktivitet.

DAPase kan bruges alene eller i kombination med to andre enzymer (Qcyclase og pGAPase) og præcist og effektivt fjerne



Figur 3. Oversigt over TAGZyme-systemet til at fjerne His-tags. Første trin efter den første IMAC-søjle er at spalte His-tag (trin 1 »dipeptid spaltning«) vha. DAPase. For proteiner, der er fremstillet med Unizymes His-tag (f.eks. MKHQHQHQ, M: methionin; K: lysin; H: histidin; Q: glutamin) udføres reaktionen under tilstedeværelse af Qcyclase i overskud. Når der findes en aminoterminal glutamin, omdanner Qcyclase aminosyren til pyroglutamyl (trin 2 »glutamin cyclisering«), hvorefter DAPase ikke længere kan spalte. Man kan efterfølgende fjerne proceskomponenter og spalte pyroglutamyl ved at anvende pGAPase (trin 3 »spaltning af pyroglutamyl«) enten i opløsning eller bundet til IMAC via C-terminal His-tag (gælder også de andre TAGZyme-komponenter). Et eksempel er vist i panelet til venstre. M: molekylvægtstandard; CE: celleekstrakt; 1: Efter den første IMAC (His-tag-protein); 2-3: Enzymatisk fjernelse af His-tag med DAPase og Qcyclase, 4: Det færdige protein efter pGAPase-behandling og efterfølgende fjernelse af procesenzymer via subtraktiv IMAC.

aminoterminal His-tags samt andre N-terminale affinitets-tags (figur 3). Det eneste krav er, at den anvendte tag-sekvens ikke indeholder lysin eller arginin i ulige positioner og er fri for prolin (naturlige stoppositioner for DAPase's exoproteolytiske aktivitet).

For at illustrere TAGZyme er der i figur 3 vist et eksempel på et terapeutisk rekombinant protein. Det er produceret med et His-tag uden naturlig stopposition for DAPase, og ved at anvende Qcyclase og pGAPase fjernes den sidste aminosyre (i tag'en):

Fra celleekstraktet (CE) elueres der efter IMAC et rent His-tag-protein (1).

Efter DAPase-behandling skifter proteinstørrelsen (pga. spaltning af dipeptider) (2).

Ved tilstedeværelse af Qcyclase i høj koncentration er den sidste glutamin omdannet til pyroglutamyl, hvorefter DAPase ikke længere kan spalte (3).

Efter behandling med pGAPase og subtraktiv IMAC er det kun det processerede oprensede produkt uden tag, der elueres, mens TAGZyme-enzymene tilbageholdes (4).

I dag findes der terapeutiske proteiner produceret i storskala med affinitets-tags, hvor man anvender dipeptidyl aminopeptidase I eller relaterede aminopeptidaser til at fjerne N-terminale affinitets-tags.

Downstream proces, patenter og licensering

De ovennævnte teknologier til affinitetsoprensning af proteiner kan frit anvendes til forskningsformål, blot man betaler for det pågældende kit/produkt. Derimod er licensering nødvendig, hvis man vil anvende teknologierne til et kommercielt formål, f.eks. til produktion af farmaceutiske proteiner. En aggressiv patentering af His-tag-teknologien fra store virksomheder har medvirket til, at den brede anvendelse af teknologien til farmaceutisk produktion endnu ikke er blevet en realitet. Unizyme har dog udviklet TAGZyme-systemet, der netop muliggør anvendelse af His-tags til kommerciel produktion – uden krav om licensbetaling.

Anvendelse af Unizymes His-tag og TAGZyme-enzymene er ikke underlagt andre patenter.

TAGZyme

TAGZyme er et skalerbart system designet til forsknings- og farmaceutiske formål.

DAPase er hovedkomponent i TAGZyme og kan bruges til at fjerne mange N-terminale tags. Bruges TAGZyme kombineret med et specielt designet His-tag, kan man præcist kontrollere fjernelse af tags fra ethvert (terapeutisk) protein vha. to andre aminopeptidaser (figur 3).

Andre proteiner og uønskede stoffer i celleekstrakter kan også binde til IMAC. TAGZyme-enzymene er udstyret med et C-terminal His-tag, der kan adskille dem fra det ønskede protein. Vha. et »subtraktivt« IMAC-trin kan man fjerne både de uønskede stoffer med affinitet for IMAC og TAGZyme-enzymene og dermed få oprenset det ønskede protein (figur 1, trin 6).

TAGZyme har allerede været brugt til produktion af over 200 forskellige proteiner. Systemet egner sig også til »high throughput screening«, hvor man f.eks. undersøger rollen for mange ukendte proteiner med terapeutisk potentiale eller forbedrede aktivitetsprofiler af kollektioner af proteinvarianter.

For at kunne imødekomme fremtidige krav om dokumentation for farmaceutiske produkter bliver DAPase fremstillet under cGMP fra 2005. TAGZyme markedsføres og distribueres globalt af Qiagen (undtagen Danmark) til farmaceutisk anvendelse.

Om Unizyme

Unizyme er - via en kontinuerlig forskningsindsats gennem de sidste 15 år - førende inden for dipeptidyl aminopeptidase I og har bidraget til adskillige fundamentale aspekter af enzymet såsom udvikling af produktionsteknologi, opklaring af aktiveringsmekanismer, kortlægning af proteinets struktur, m.v.

Firmaet markedsfører TAGZyme i Danmark og assisterer desuden i forbindelse med udvikling og optimering af DSP, hvor TAGZyme-systemet bruges. Flere produkter fremstillet vha. TAGZyme er på vej ind i kliniske fase I studier.

Unizyme arbejder fortsat på at udvikle nye applikationer og produkter til den farmaceutiske industri.

E-mail-adresser

José Arnau: ja@unizyme.dk

John Pedersen: jp@unizyme.dk

Nyttige weblinks

<http://www.bioprocessguide.com/lk/demo.nsf/Overview?OpenPage>. En komplet guide til fremstillingsproces for farmaceutiske proteiner.
http://www.ls.huji.ac.il/~purification/Purification_Protocols.html#strategy. Oversigt over de mange muligheder for design af DSP.
http://www.the-scientist.com/yr2002/feb/profile1_020218.html. Oversigt over affinitets-tags fra den videnskabelige tidsskrift »The Scientist« (gratis men kræver login).
<http://www.unizyme.com>. Unizyme's hjemmeside med detaljeret information om TAGZyme.
<http://www1.qiagen.com/products/protein/purification/tagzymesystem/default.aspx>. Informationssider om TAGZyme fra Qiagen.

Referencer

1. Abdullah N, Chase HA (2002) Recent developments in the use of IMAC in expanded bed purifications of recombinant proteins tagged with polyhistidine sequences. *Downstream EBA*: 45-50
2. Derewenda ZS (2004) The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* 34:354-363
3. Gagnon P (1999) Controlling metal ion contamination in protein purification process development. *Validated Biosystems Quarterly Resource Guide to Downstream Processing*, <http://www.validated.com>.
4. Zhou CZ, Chen YX (2004) Developments in structural genomics: protein purification and function interpretation. *Curr Genom* 5:37-48
5. Pedersen J, Lauritzen C, Madsen MT, Dahl SW (1999) Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidasen. *Prot Expr Purif* 15:389-400

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Nu er vi her !
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

Thermo
ELECTRON CORPORATION