

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE



Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov

ITMS: 26240220034

**Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ**





- **Druh projektu:**

partnerský projekt v rámci „Podpora aplikovaného výskumu, vývoja a transferu technológií“

- **Žiadateľ projektu:**

hameln rds, Modra



- **Zodpovedný riešiteľ projektu za partnera a názov príslušnej fakulty:**

doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.
Prírodovedecká fakulta UK

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Hlavný zámer/ciele projektu:

- Založenie a manažment spoločného výskumného pracoviska a maximalizácia spoločenskej pridanej hodnoty projektu.
- Zavedenie produkčných a analytických metód pre výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Stručná anotácia projektu:

- Realizácia špičkového priemyselného výskumu na koordinovanom projektovom princípe, pričom implementácia predkladaného projektu predpokladá, že nová infraštruktúra obstaraná v rámci projektu umožní zvýšiť participáciu na nových projektových aktivitách financovaných z iných finančných zdrojov a celkovo tieto aktivity zvýšia hospodársku efektívnosť a úspešnosť žiadateľa v jeho komerčných aktivitách založených na výsledkoch priemyselného výskumu.
- Realizácia tohto projektu umožní žiadateľovi v úzkom prepojení na pracovisko partnera realizovať vývoj nových liečiv, čím sa zvýši ponuka služieb a vzrastie jeho schopnosť konkurencie. Tiež budú vyvíjané nové inovatívne topické aplikačné formy na báze ľudských rekombinantných proteínov (ako napr. trombín).

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Spôsob riešenia projektu:

- konštrukcia rekombinantného kmeňa a definovanie podmienok jeho dlhodobého uchovávania, návrh postupov pre kultiváciu produkčného kmeňa a produkciu rekombinantných proteínov
- optimalizácia expresie a postup izolácie rekombinantného proteínu
- vývoj purifikačných a analytických metód (1D a 2D SDS PAGE Elektroforéza, elektroforetické čipy, FPLC, HPLC – reverzná fáza, Western blot, Izoelektrická fokusácia)
- optimalizácia vlastností a stabilizácia rekombinantných proteínov

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Dosiahnuté výsledky v projekte:

- V rámci aktivity 1.1 prebehlo vypracovanie a podpis zmluvy a štatútu spoločného pracoviska a vypracovanie podkladov pre definovanie dlhodobého strategického plánu spoločného pracoviska. Vykonalo sa verejné obstarávanie prístrojov a spotrebného materiálu.
- V rámci aktivity 1.2 prebehla študentská vedecká konferencia s posterovou prezentáciou dosiahnutých výsledkov, ktorej výsledkom je príspevok v zborníku. Vo väzbe na interné tematické priority spoločného pracoviska bol vypracovaný zoznam relevantných študijných programov a v rámci diplomových a dizertačných prác boli identifikované základné témy pre výskum mladých vedeckých pracovníkov. V rámci riešenia úloh spoločného pracoviska prebieha práca so študentami. Zatiaľ boli vypracované tri diplomové práce súvisiace s projektovou problematikou. Informácie o projekte boli odvysielané televíznou stanicou STV 2 v relácii Spektrum vedy – Molekulárna biológia. Projekt bol prezentovaný aj na podujatiach pre verejnosť Týždeň vedy a techniky na Slovensku 2012 a 2013 a Noc výskumníkov 2013. V júly 2014 bola zorganizovaná spoločná konferencia partnerov projektu v priestoroch spoločného pracoviska projektu hameln rds a.s. v Modre pod názvom „Industrial research of new drugs based on recombinant proteins and perspective cooperation of hameln rds Modra and Faculty of Natural Sciences of Comenius University“ s medzinárodnou účasťou.
- V rámci aktivity 2.1 sa vzhľadom na možnosti využitia spotrebného materiálu zakúpeného z projektových zdrojov zintenzívnili činnosti súvisiace s prípravou „konštrukcie rekombinantného kmeňa producenta proteínu“.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Dosiahnuté výsledky v projekte:

Produkcia ľudského rekombinantného trombínu v expresnom systéme *E. coli*

Trombín - multifunkčná serínová proteáza, štiepenie fibrinogénu na fibrín

Využitie vo farmaceutickom priemysle – vďaka svojim vlastnostiam a dôležitej úlohe pri tvorbe krvnej zrazeniny ako lokálne hemostatikum

Najideálnejšiou prípravou trombínu, ktorý by spĺňal vysoké kritéria na to, aby mohol byť využitý ako súčasť farmaceutických prípravkov, je príprava rekombinantného trombínu využitím **techník rekombinantných DNA**

Návrh a dizajn expresného systému na produkciu ľudského rekombinantného trombínu v baktérii *E. coli* a optimalizáciu podmienok heterologickej expresie najkratšieho prekursora trombínu, pretrombínu-2 (PT-2), v expresnom systéme *E. coli*.



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Produkcia ľudského rekombinantného trombínu v expresnom systéme *E. coli*

TROMBÍN – v krvi ako neaktívna forma protrombín (nedochádza k tvorbe krvných zrazenín vo vnútri ciev), koncentrácia 100-150 $\mu\text{g/ml}$, polčas rozpadu – 72 hodín, tvorba v pečeni

Aktívna forma – štiepenie protrombínu pomocou protrombokínázového komplexu

Trombín z ľudskej plazmy: potenciálna kontaminácia inými krvnými faktormi a patogénmi (HIV, hepatitída)

Alternatíva: Trombín produkovaný rekombinantnými organizmami – rekombinantný ľudský trombín

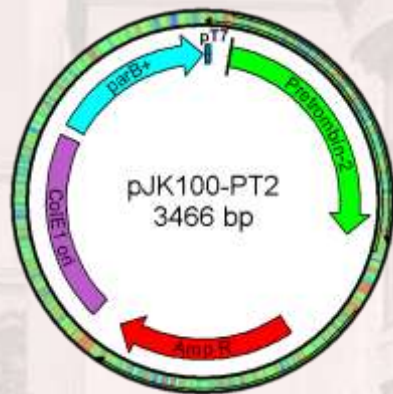
Rekombinantný trombín: minimalizovanie rizika cross-reaktivity a sekvenčných koagulopatií (sekvenčne identický s prirodzene vytvoreným ľudským trombínom); minimalizovanie rizika prenosu patogénov

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

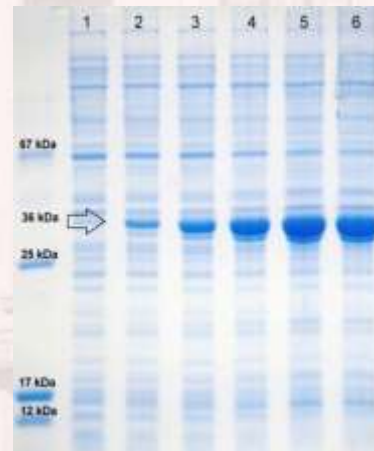


Dosiahnuté výsledky v projekte:

Produkcia ľudského rekombinantného trombínu v expresnom systéme *E. coli*



SDS-PAGE profil exprese proteínov
v *E. coli* K12 RV308ai pJK100-PT2
po indukcii exprese PT-2 (36kDa)
s 0,0005 % arabinózou pri OD₆₀₀



úroveň exprese
po 5h bola 45%

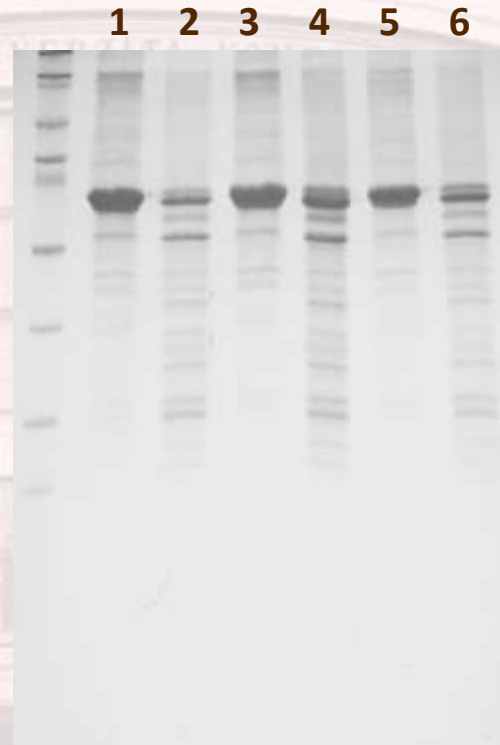
Rekombinantný PT-2 sa v bunkách *E. coli* produkuje vo forme inklúzných teliesok, preto je nevyhnutná izolácia inklúzných teliesok a následný refolding PT-2 a následná aktivácia rekombinantného pretrombínu-2 na aktívny trombín.

Dráhy 1-6: 0-5h po indukcii;

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

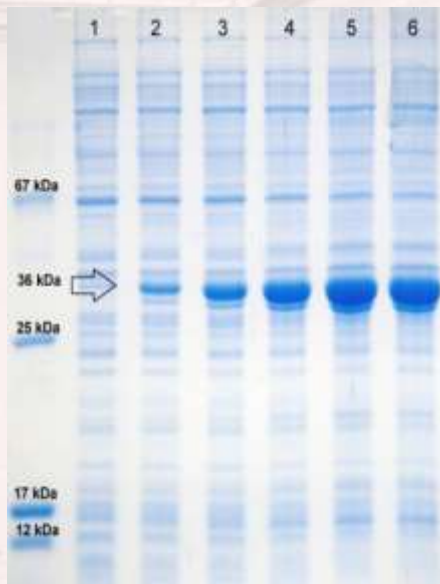
- **pI 6,05**
- **Optimalizácia expresie, izolácie IT, revitalizácia**
- **Štiepenie enterokinázou (EKMax, Invitrogen)**
- **Activity test (Chromogénny substrát pre trombín (N-(pTosyl)-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide)**
- **Optimalizácia štiepenia (pH, aditíva - CaCl₂, SDS, Triton, Tween20, močovina)**



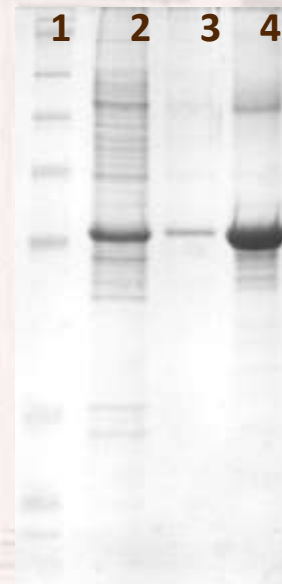
1. EKPT2 v 10mM TrisHCl pH8
2. EKPT2 v 10mM TrisHCl pH8
1ul EKMax
3. EKPT2 v 25mM TrisHCl pH8,
10%glycerol
4. EKPT2 v 25mM TrisHCl pH8,
10%glycerol
1ul EKMax
5. EKPT2 v 50mM TrisHCl pH8
6. EKPT2 v 50mM TrisHCl pH8
1ul EKMax

Dosiahnuté výsledky v projekte:

SDS-PAGE expresie hPT-2 v *E. coli* K12 RV308ai
a FPLC IMAC purifikácia hPT-2 (36kDa)



1. 0h
2. 1h
3. 2h
4. 3h
5. 4h
6. 5h



1. ladder
2. FT
3. Elúcia (prvá frakcia)
4. Elúcia (peak)

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Štúdium promótorovej sekvencie

α -glukozidázového génu kvasinky *Candida utilis*

Candida utilis vzhľadom na nízke nároky na kultiváciu a zaradenie do kategórie GRAS (Generally Recognize As Safe) predstavuje potenciálne významný expresný systém pre nadprodukcii rekombinantných proteínov vhodných aj pre medicínske/farmaceutické aplikácie.

Heterologická expresia proteínov v kvasinkových expresných systémoch je založená na presnej charakterizácii silných promótorov.

Mapovanie promótorovej sekvencie α -glukozidázového génu *C. utilis* pomocou integračného vektora.

Dizajn a konštrukcia integračného plazmidu pPICZ α -glc, transformácia divého kmeňa *C. utilis* a detekcia inzercie vektora.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

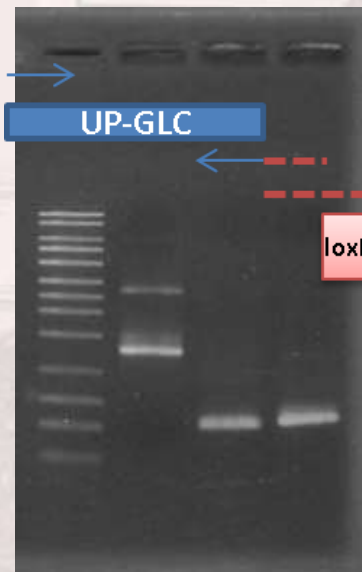


Dosiahnuté výsledky v projekte:

Štúdium promótorovej sekvencie

α -glukozidázového génu kvasinky *Candida utilis*

Konštrukcia mutačnej kazety na deléciu promótoru α -glukozidázového génu *C. utilis*

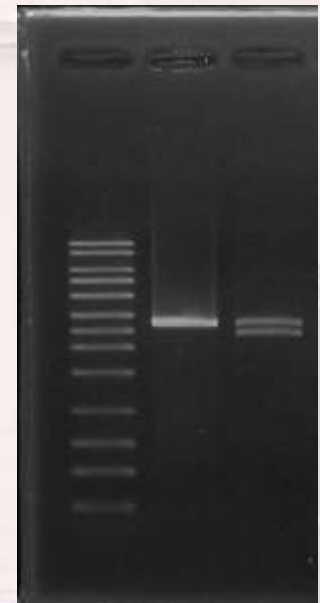


Klonovanie mutačnej kazety do vektora pUC19 cez HindIII

1. HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen Biotek)
2. pUC19/HindIII (2,7 kb)
3. pUC19+mutačná kazeta/HindIII (2,7+2,4 kb)

loxP P TEF1 ZEO CYC1 TT loxP

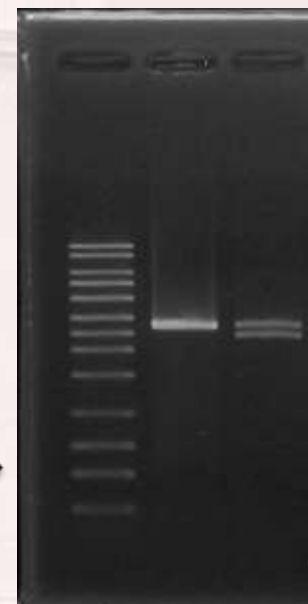
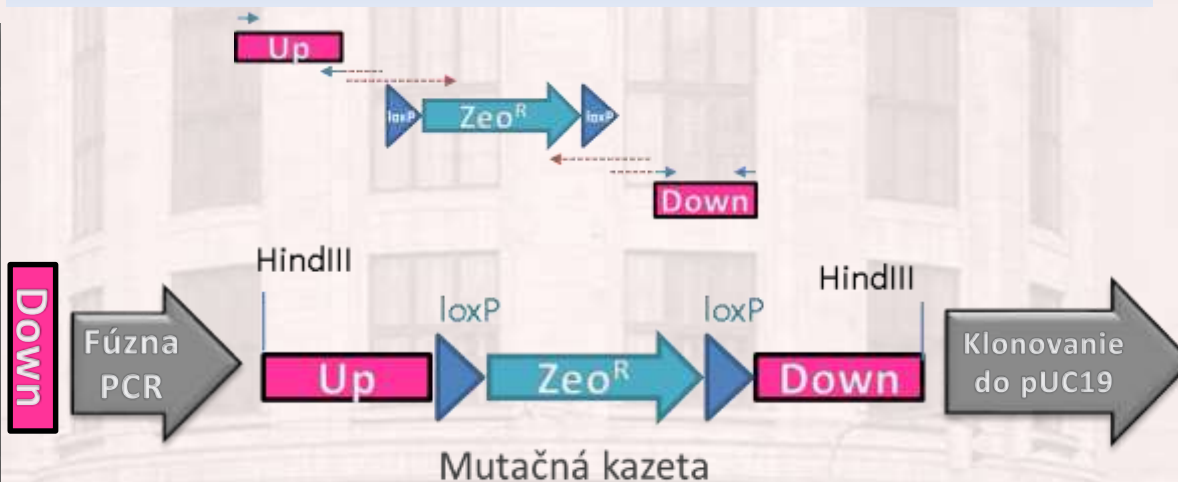
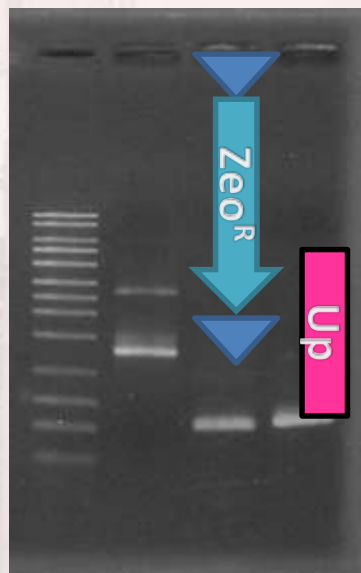
DOWN - GLC





Dosiahnuté výsledky v projekte:

Dizajn a konštrukcia mutačnej kazety na deléciu promótoru a začiatku génu α -glukozidázy (maltázy) *Candida utilis*



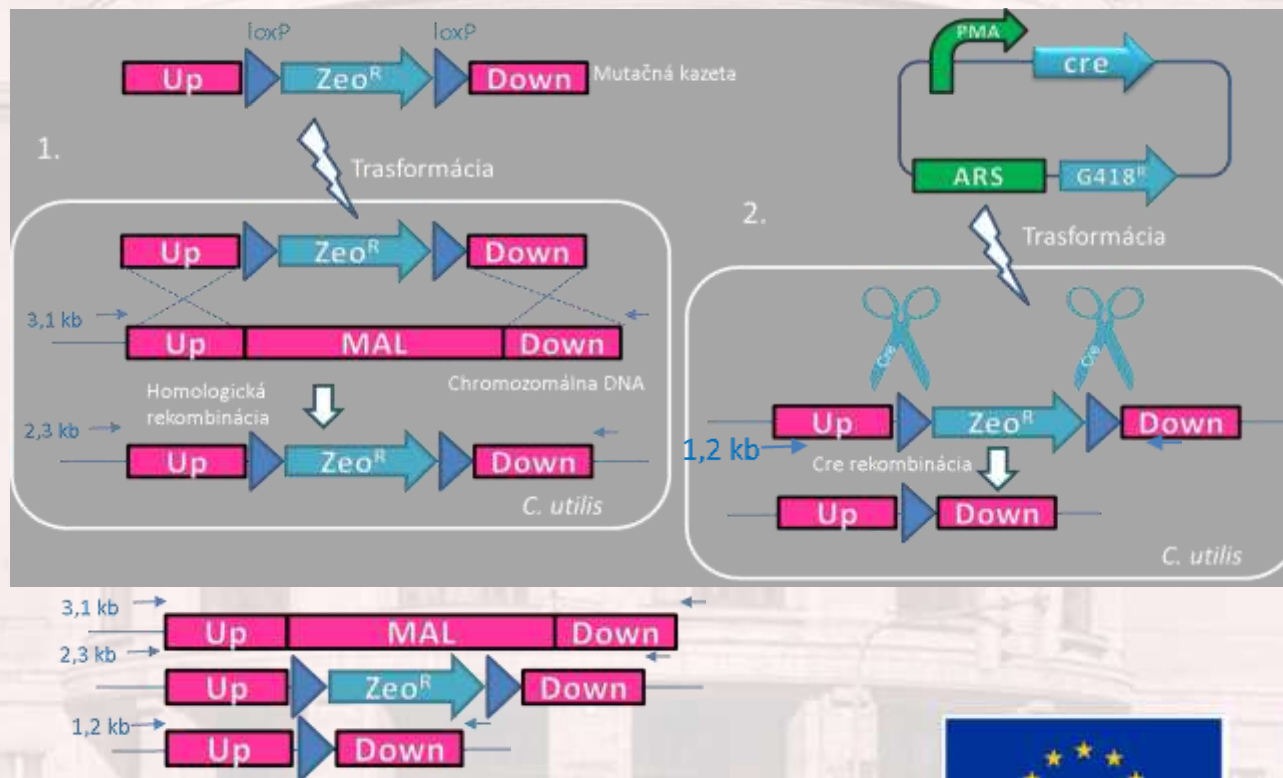
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava mutantného kmeňa *Candida utilis* deléciou všetkých kópií génu a promótoru pre α -glukozidázu (maltázu)

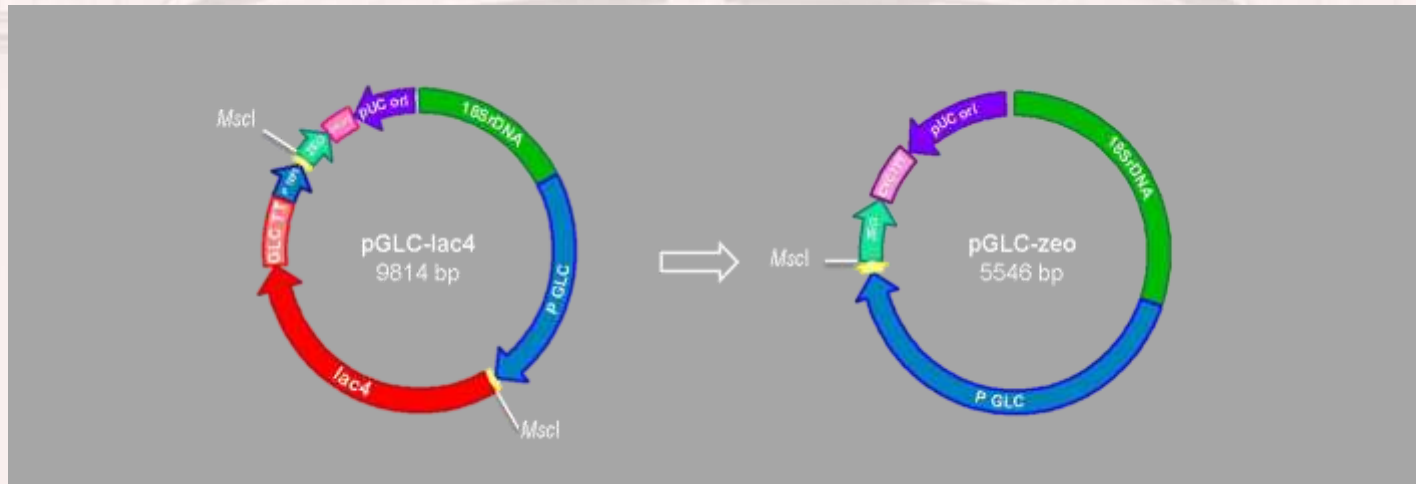


Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava konštruktov s reportérovým génom pre sledovanie sily maltázového promótoru



β -galaktozidáza

Rezistencia na zeocín

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Štúdium a návrh RP-HPLC metódy s DAD detekciou na robustnú separáciu proteínov prítomných v komplikovaných zmesiach

Výber reprezentatívnej modelovej zmesi proteínov v proteínovom výživovom doplnku Wobenzym

Názov enzýmu	Množstvo (mg)	Substrátová špecifickosť	pH optimum katalytickej aktivity	Izoelektrický bod	Relatívna molová hmotnosť
amyláza	10	polysacharidy	7 ¹⁷	6,34 ¹⁸	55 905 ¹⁹
bromelain	45	proteíny, peptide amidy	4,5-7,5 ²⁰	9,55 ²⁰	28 500 ²¹
chymotrypsín	1	peptidy amidesy estery	8 ²²	8,8 ²³	25 000 ²²
lipáza	10	triglycerides, fats and oils	7,7 ²⁴	5,8 ²⁵	45 000 ²⁶
papaín	60	proteins, peptides	4-7 ²⁷	9,5 ²⁸	23 453 ²⁹
trypsín	24	peptides	7,5-8,5 ³⁰	10,5 ³⁰	23 500 ³¹
pankreatín	100	-	-	-	-

Enzýmové zloženie produktu Wobenzym a niektoré fyzikálnochemické vlastnosti prítomných enzýmov:

^a Množstvo enzýmu v 1 tabletke uvádzané výrobcom.

^B Pankreatín je zmes pankreatických enzýmov v cicavcoch. Zahŕňa proteázy (trypsín a chymotrypsín) a exokrinné pankreatické enzýmy (α -amyláza a lipáza). Pankreatín tiež obsahuje ďalšie enzýmy a iné látky bez enzýmovej aktivity.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Separation of various human insulin analogues and insulin solution using RP-HPLC method

Structural differences between insulin analogues and regular human insulin produced by recombinant techniques:

Regular human insulin: two polypeptide chains

- A (21 amino acids)
- B (30 amino acids)

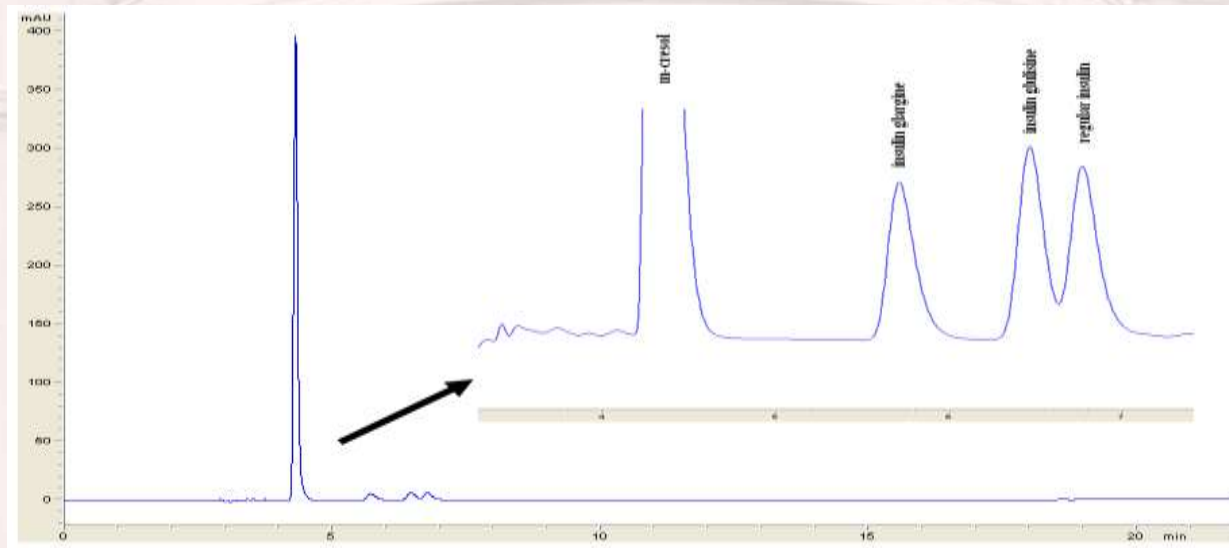
Insulin glulisine: two polypeptide chains

- A (21 amino acids)
- B (30 amino acids) differences at position B3 **asparagine** is replaced by **lysine** and B29 **lysine** is replaced by **glutamic acid**

Insulin glargine: two polypeptide chains

- A (21 amino acids) differences at position A21 **asparagine** is replaced by **glycine**
- B (**32** amino acids) differences at position B31, B32 two additional **arginine molecules**

Separation of various human insulin analogues and insulin solution using RP-HPLC method

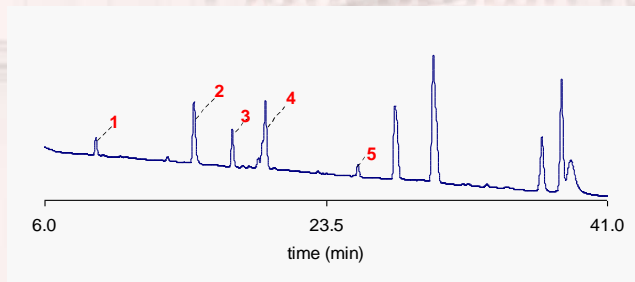


Chromatographic results from separation of the mixture insulin analogues and regular insulin
Chromatographic column C18, the injected volume of sample solutions 50 μ l, mobile phase A: buffer from formic acid and ammonium formate, mobile phase B: MeOH/H₂O (90/10, V/V), appropriate gradient at a flow rate 0.5 ml min⁻¹, UV detection at 280 nm.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte: ITP-CZE separácie produktov enzymatickej hydrolýzy Cytochrómu C po ich HPLC frakcionácii



HPLC frakcionácia produktov enzymatickej hydrolýzy Cytochrómu C

Off-, resp. on-line spájanie vysokoúčinných separačných ortogonálnych metód

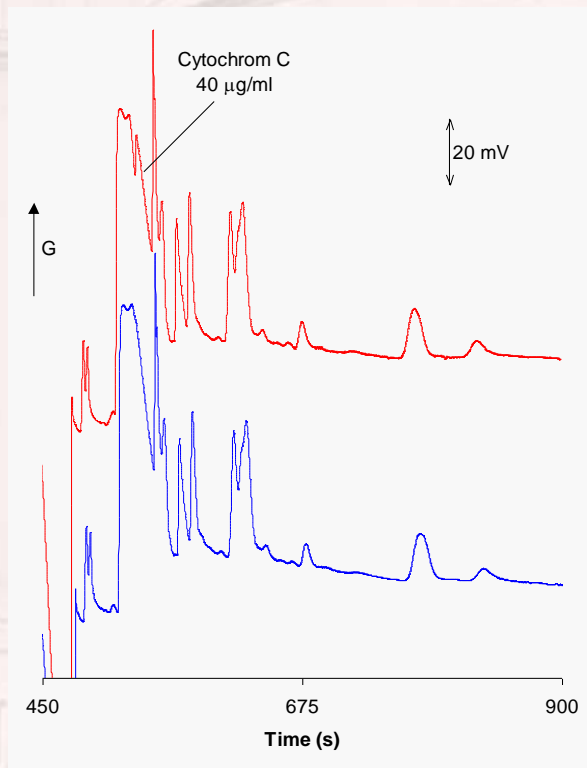
- rozlíšenie väčšieho počtu produktov enzymatickej hydrolýzy Cytochrómu C
- získanie komplexnejších informácií o produktoch



ITP-CZE separácia produktov enzymatickej hydrolýzy Cytochrómu C a jednotlivých HPLC frakcií

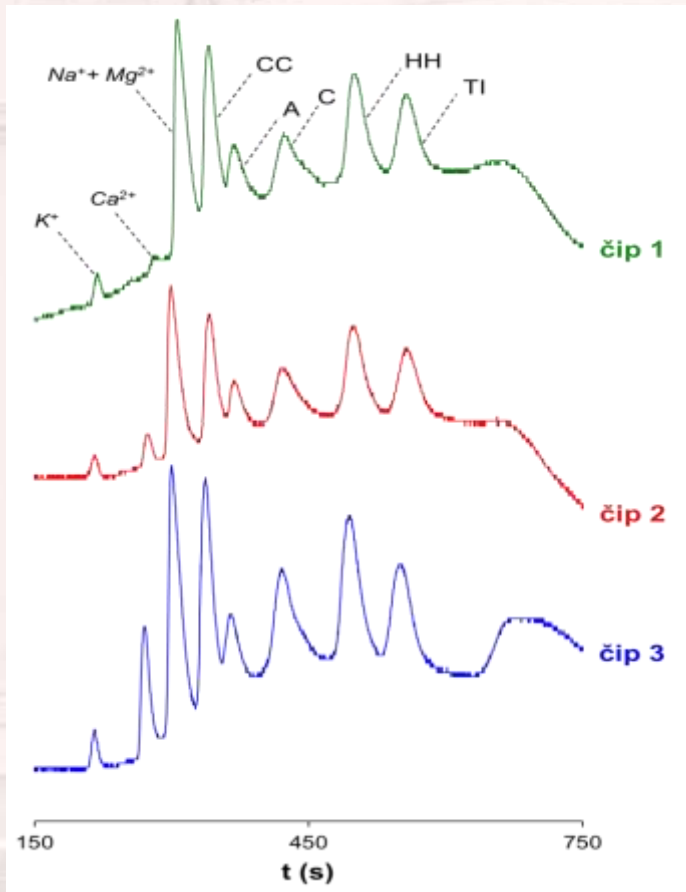
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte: ITP-CZE separácie produktov enzymatickej hydrolýzy Cytochrómu C na elektroforetickom čipe



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte: Separácie proteínov na elektroforetickom čipe



CyC = Cytochrome C
A = Avidin
C = Conalbumin
HH = Human hemoglobin
TI = Trypsin inhibitor

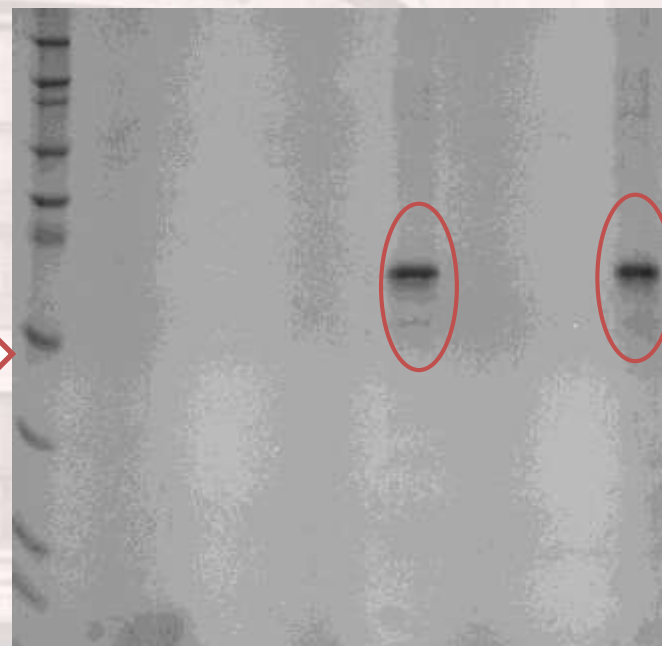
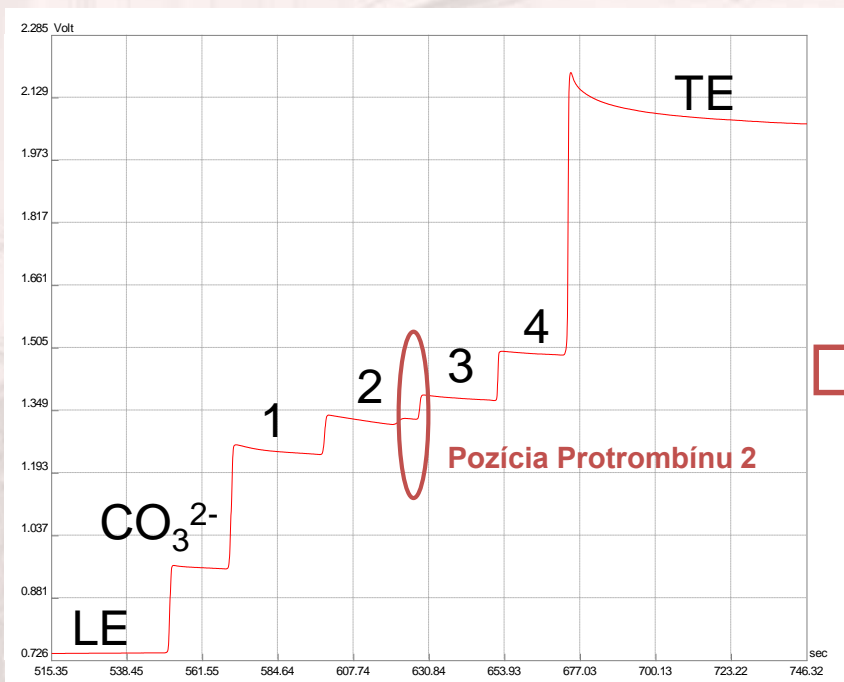
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte

Izotachoforetická francionácia
a výber frakcie s 2-protrombínom

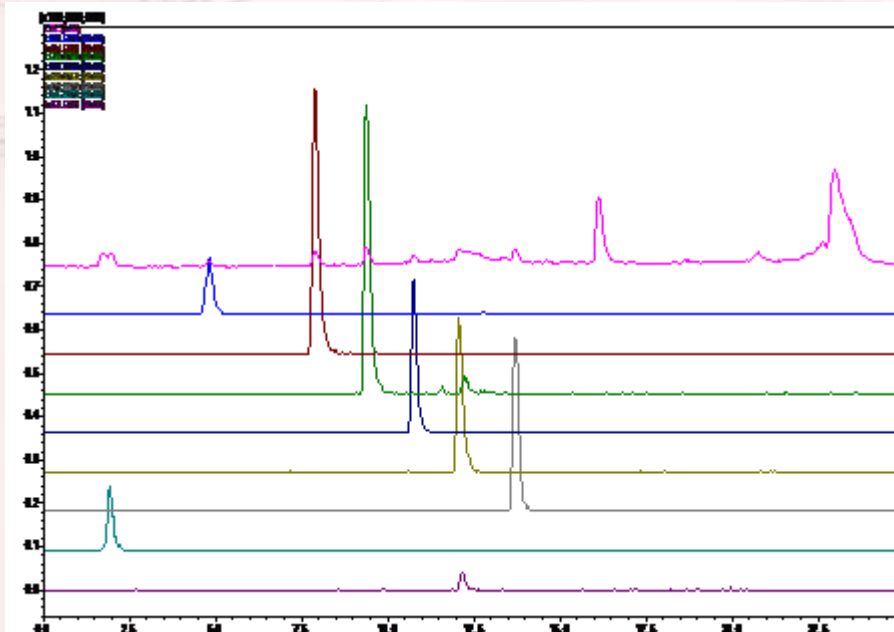
SDS/PAGE kontrola čistoty
preparátu po izotachoforetickej
purifikácii



- 1 – kyselina L-glutámová
- 2 – kyselina L-2-aminoadipová
- 3 – MOPSO
- 4 – taurín

Dosiahnuté výsledky v projekte:

HPLC-MS analýza - tryptic digest modelového proteínu (myoglobin)



T119-133 - HPGDFGADAQGAMTK
T32-42 – LFTGHPETLEK
T17-31 – VEADIAGHGQEVLR
T134-139 – ALELFR
T64-77 – HGTVVLTALGGILK
T103-118 – YLEFISDAIIHVLHSK
T97-102 – HKIPIK
T1-16 – GLSDGEWQQVLNVWGK

HPLC-MS záznam separácie zmesi peptidov získaných enzymatickým štiepením myoglobínu trypsínom. HPLC kolóna – Reprosil Gold C18 (100x2,0 mm; 5 µm); injektovaný objem 5 µl; prietok mobilnej fázy 0,2 mL/min.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

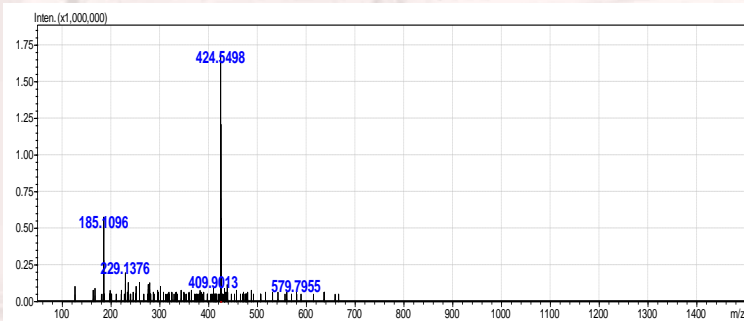


Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Dosiahnuté výsledky v projekte:

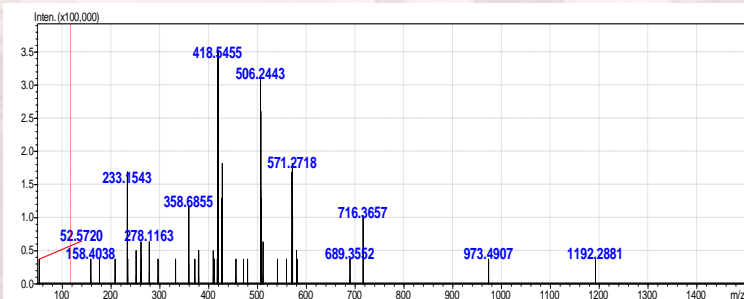
HPLC-MS analýza - tryptic digest modelového proteínu (myoglobin)



MS spektrum peptidu T32-42 (m/z 424,54)



LCMS-IT-TOF analyzátor použitý na analýzu peptidov získaných enzymatickým štiepením trypsínom

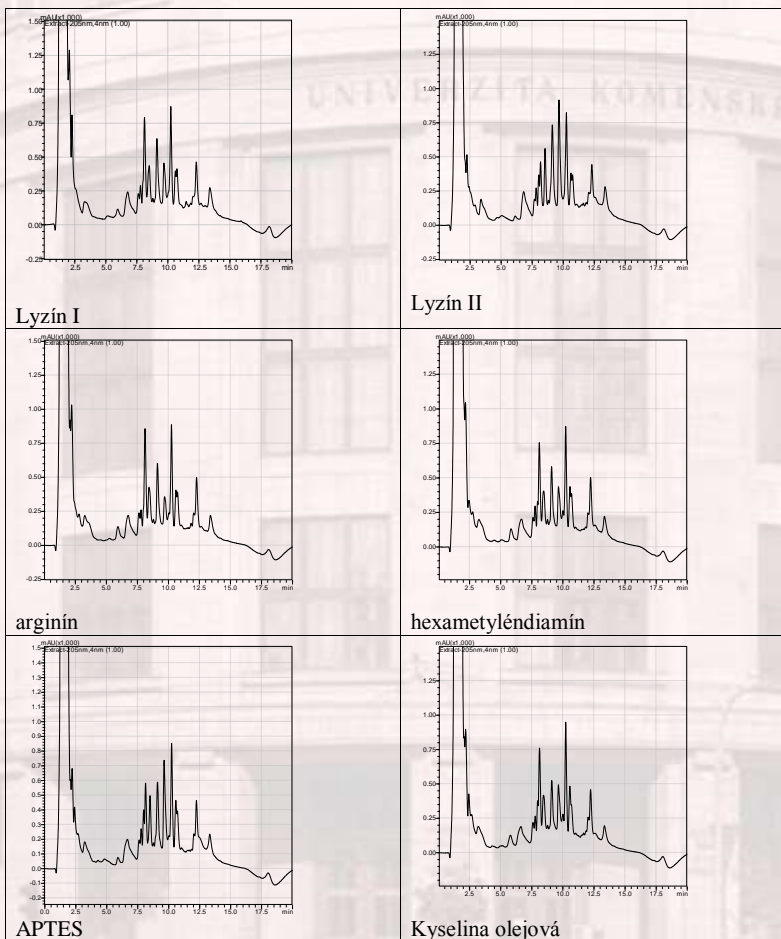


MSMS spektrum peptidu T32-42 (m/z 424,54)

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Kinetika nového spôsobu tryptic digestu testovaná na Apomyoglobíne

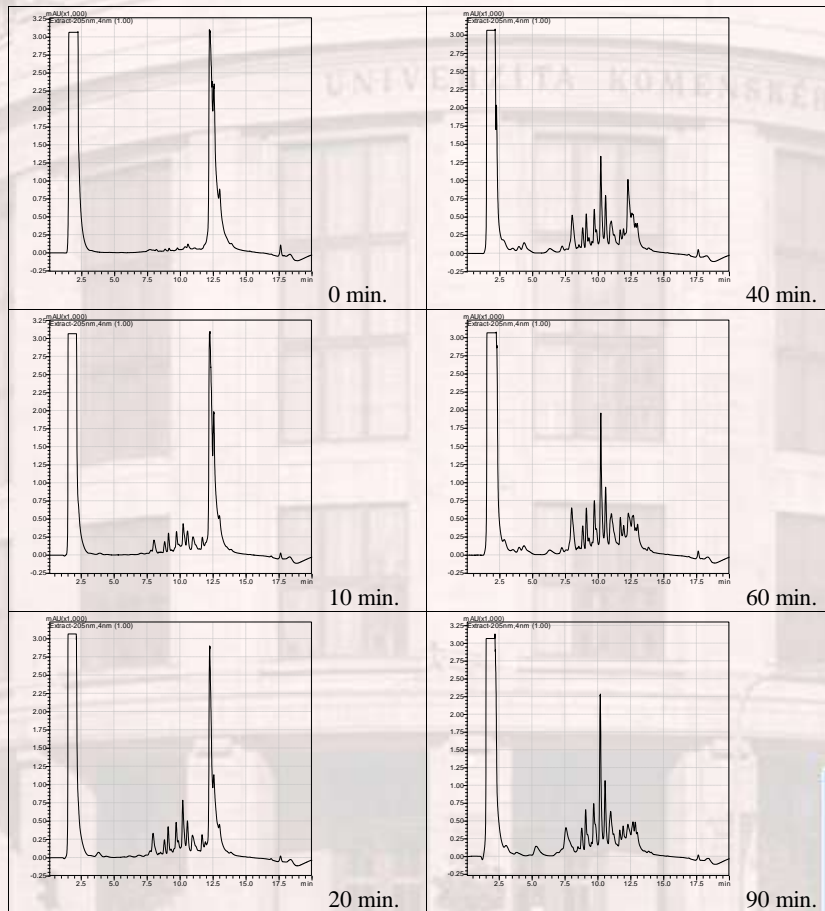


Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Kinetika nového spôsobu tryptic digestu testovaná na Apomyoglobíne

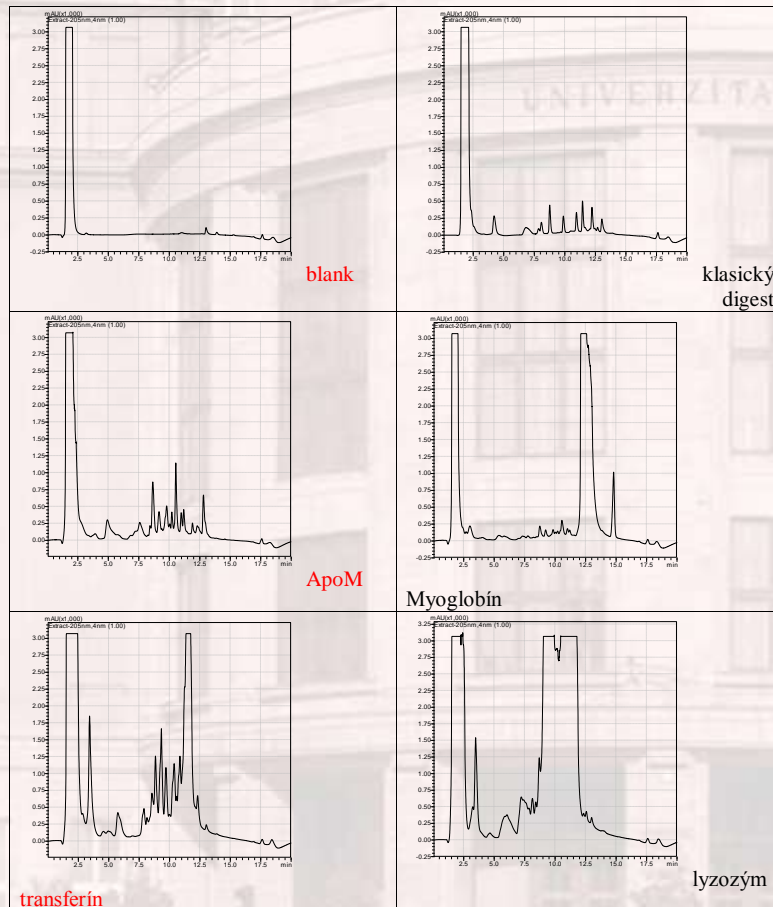


Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

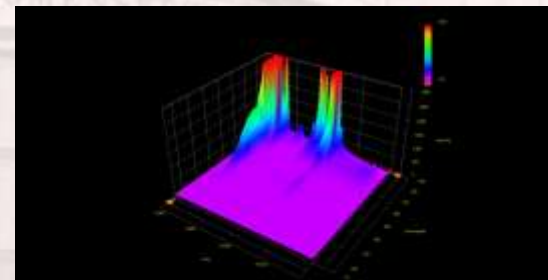


Dosiahnuté výsledky v projekte:

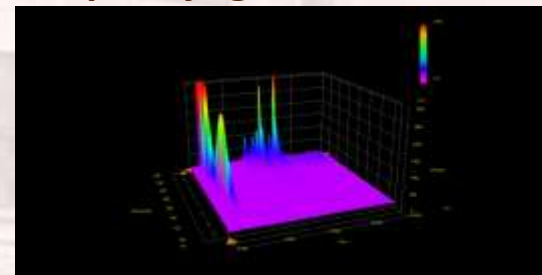
Nový spôsob tryptic digestu testovaný na rôznych proteínoch za identických podmienok



Transferín



ApoMyoglobín 30 min.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Zámer/výhľad ďalšieho postupu riešenia projektu v nasledujúcom období:

- Príprava výstupov (publikácií ako aj riešení z výsledkov získaných z produkcie rekombinantných proteínov a analytických metód)
- Naďalej bude prebiehať každodenný manažment spoločného pracoviska a jeho vedeckých aktivít, iniciovanie a schvaľovanie zapájania pracoviska do medzinárodných vedecko-výskumných štruktúr a sledovanie vzdelávania a výchovy mladých vedeckých pracovníkov v oblasti biomedicínskeho, molekulárno biologického, analytického výskumu a súvisiacich oblastí.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Publikácie a ďalšie výstupy z výsledkov získaných z produkcie rekombinantných proteínov a analytických metód – rok 2014

1. Biofarmaceutiká a lieky na báze rekombinantných proteínov / Stuchlík Stanislav, Murányi Andrej, Hutta Milan, Múčková Marta, Masár Marián, Turňa Ján, 2014. In: *Lekárnik*. - ISSN 1335-924X. - Roč. 19, č. 3 (2014), s. 18-20
2. Štúdium separácie klinicky významných ľudských hemoglobínov / Komorowska Veronika, Hutta Milan, Fábryová Viera, Božek Peter, Labuda Ján (Recenzent), Hroboňová Katarína (Recenzent), 2014. In: *Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi. Zborník abstraktov*. - Bratislava : STU, 2014. - ISBN 978-80-227-4169-9. - S. 134-135.
3. Sequential Determination of Inorganic Cations and Anions in Cerebrospinal Fluid by Microchip Electrophoresis. Jasna Hradski, Róbert Bodor & Marián Masár. In: *Chromatographia*. DOI 10.1007/s10337-014-2711-z
4. PREPARATÍVNA A KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA AKO VYSOKOROZLIŠOVACÍ NÁSTROJ PRE FOTOMETRICKÚ DETEKCIU PROTEÍNOV. Róbert Bodor, Barbara Rybárová a Marián Masár. In: *Spravodaj SSS, Ročník 21, Číslo 1, 2014*
5. Modern analytical approaches to analysis of recombinant proteins. Milan Hutta, Marián Masár, Peter Troška, Veronika Komorowska. In: *ChemZi 10/1 (2014)*
6. Optimization of expression of untagged and histidine-tagged human recombinant thrombin precursors in *Escherichia coli*. M. Osadská, H. Boňková, J. Krahulec, S. Stuchlík, J. Turňa. *Applied microbiology and biotechnology* 05/2014; DOI:10.1007/s00253-014-5840-2
7. Application Possibilities of Capillary Electrophoresis on a Chip in Separations of Selected Amino Acids and Their Enantiomers in Body Fluids. Uhlárová K., Masár M., Bodor R. Book of Abstracts, 13th international symposium and summer school on bioanalysis, Debrecen, June 27th – July 7th 2013. s.8
8. Upstream regulatory regions controlling the expression of the *Candida utilis* maltase gene. Krahulec J., Halászová H., Osadská M., Lišková V., Stuchlík, S., Turňa, J. *Journal of Biotechnology* 09/2014; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.006

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Kolektív riešiteľov z Katedry molekulárnej biológie a Katedry analytickej chémie PriFUK

Výskumní pracovníci:

Ján Turňa

Stanislav Stuchlík

Ján Krahulec

Hana Drahovská

Viera Cimová

Zdenko Levarski

Lucia Bocánová

Milan Hutta

Jozef Marák

Marián Masár

Pavol Kruk

Janka Ráczová

Peter Troška

Andrea Vojs Staňová

Radoslav Halko

Róbert Góra

Doktorandi a diplomanti:

Michaela Kandričáková-
Osadská

Hana Halászová

Veronika Komorowska

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja

