

Prokariotyczny system ekspresyjny do produkcji białek rekombinowanych oparty na *Escherichia coli*

OPIS TECHNOLOGII

Przedmiotem technologii jest wydajny system produkcyjny *E. coli* gospodarz/wektor, który tworzy narzędzie do ekspresji różnorodnych białek rekombinowanych na skalę przemysłową. Plazmidem skonstruowanym w IBA, który umożliwia ekspresję genów np. analogów insuliny jest plazmid pIBA, niesie on oporność na tetracyklinę, a geny kodujące białka znajdują się pod kontrolą promotora *deoP1P2*. Regulacja ekspresji białek rekombinowanych z promotora *deoP1P2* jest zależna od czynników zewnętrznych, jak również od doboru odpowiedniego szczepu *E. coli*, nie posiadającego aktywnego represora CytR. Ekspresja genów rekombinowanych z wykorzystaniem wektora pIBA wymaga szczepu *E. coli* z uszkodzonym genem kodującym białko represorowe CytR na chromosomie bakterii.

PODSTAWOWE DANE

- ✓ BRANŻA: biotechnologia przemysłowa
- ✓ WŁASNOŚĆ: Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej (Łukasiewicz – IChP) 100%

ZASTOSOWANIE

Do nadprodukcji rekombinowanych białek wykorzystywane są zarówno eukariotyczne, jak i prokariotyczne systemy ekspresyjne. Wybór odpowiedniego systemu zależy m.in. od tempa wzrostu komórek gospodarza i sposobu ich hodowli, poziomu ekspresji genu docelowego oraz obróbki potranslacyjnej syntetyzowanego białka. Niezależnie od rodzaju systemu ekspresyjnego, jego podstawowymi elementami są wektor i gospodarz ekspresyjny. Najczęściej stosowanym układem do nadprodukcji białek, zarówno na skalę laboratoryjną jak i przemysłową, jest system prokariotyczny. System ten oparty jest przede wszystkim na bakteriiach *E. coli*. System ten pozwala na uzyskanie w krótkim czasie dużych ilości rekombinowanych białek mających zastosowanie w biotechnologii przemysłowej. Podstawową zaletą *E. coli* jest dobrze scharakteryzowany genom, poznany układ transkrypcyjny i translacyjny oraz łatwość manipulacji genetycznych. Bakterie *E. coli* są zdolne do szybkiego wzrostu do dużych gęstości na niedrogich podłożach. Wszystkie szczepy ekspresyjne *E. coli* są całkowicie pozbawione czynników patogennych. Wytwarzanie białek rekombinowanych w systemach bakteryjnych znajduje obecnie szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, diagnostyce, przemyśle spożywczym czy kosmetycznym. Biofarmaceutyki stanowią ogromny rynek jako leki nowej generacji zarówno dla ludzi, np. insulina, jak i dla zwierząt.

Prokariotyczny system ekspresyjny do produkcji białek rekombinowanych oparty na *Escherichia coli*

PRZEBIEG PROCESU

W celu stworzenia wydajnego, prokariotycznego systemu produkcyjnego gospodarz/wektor opartego na szczepie bakteryjnym *E. coli* skonstruowano wektor ekspresyjny, w oparciu o plazmid pBR322 oraz zdefiniowany dla niego gospodarz bakteryjny *E. coli* IBA. Wektor pIBA posiada gen oporności na tetracyklinę oraz promotor *deoP1P2*. Do wydajnej produkcji rekombinowanych białek wektor pIBA wymaga gospodarza z uszkodzonym genem kodującym represorowe białko CytR na chromosomie. W celu wprowadzenia ukierunkowanej delecji w genomie *E. coli* wykorzystano metodę rekombinacji homologicznej z użyciem plazmidu rekombinacyjnego. Potwierdzono przynależność otrzymanego szczepu *E. coli* IBA do gatunku *Escherichia*. Zsekwencjonowano cały genom otrzymanego szczepu *E. coli* IBA i potwierdzono obecność delecji w obrębie genu *cytR*. Wydajna nadprodukcja rekombinowanych białek w systemie gospodarz/wektor *E. coli* IBA/pIBA została potwierdzona np. w przypadku rekombinowanej insuliny ludzkiej oraz jej analogów o zmodyfikowanym działaniu hipoglikemizującym, ludzkiego hormonu wzrostu, ludzkiego czynnika VIII czy przeciwciała monoklonalnego.

KONKURENCYJNOŚĆ

Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej jest twórcą systemu produkcyjnego gospodarz/wektor, zarówno do szczepu *E. coli* IBA, jak i do plazmidu ekspresyjnego pIBA, co pozwala na wykorzystanie go w produkcji w skali przemysłowej i przy komercjalizacji produktów leczniczych czy biofarmaceutyków. System *E. coli* IBA/pIBA może zostać wykorzystany do produkcji różnych białek rekombinowanych o właściwościach terapeutycznych wykorzystywanych w medycynie (np.: insuliny, analogów insuliny, hormonu wzrostu), enzymów przemysłowych, ale również surowców o zastosowaniu przemysłowym, np. biopolimerów, biopaliw itp. Cechy systemu: szybki wzrost, możliwość hodowli do wysokich gęstości, bardzo dobry wzrost na pożywkach mineralnych, w fazie wzrostu bakterii wymagane wysokie stężenie glukozy, w fazie produkcji możliwe wykorzystanie innych źródeł węgla np. glicerol czy fruktoza, wymagana prolina i tiamina do wzrostu, wysoka stabilność plazmidu, możliwa hodowla przemysłowa bez antybiotyków.

RYNEK/REFERENCJE

Białka rekombinowane są to białka uzyskiwane z rekombinowanych genów, czyli cząsteczek DNA, uzyskiwane w różnych systemach ekspresyjnych. Obecnie do produkcji rekombinowanych białek na skalę przemysłową wykorzystywane są systemy bakteryjne, systemy eukariotyczne, systemy roślinne, owadzie czy zwierzęta transgeniczne. Najtańszymi i najbardziej wydajnymi systemami produkcyjnymi gospodarz/wektor pozostają wciąż systemy bakteryjne.

Rynek produktów biopochodnych od początku XXI wieku systematycznie się rozwija i zyskuje coraz istotniejsze miejsce w ogólnym rynku biotechnologii przemysłowej, degradowalnych biopolimerów czy biopaliw.

Co roku rejestrowanych jest na rynku globalnym około 15-20 preparatów biologicznych, co stanowi już ponad 50% wszystkich nowo rejestrowanych leków. Preparaty te odpowiadają na potrzeby nowoczesnej medycyny i stanowią cenne, nowe opcje terapeutyczne w leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych, zwiększaniu komfortu życia pacjentów i ograniczaniu ubocznych efektów wielu chorób. Biofarmaceutyki stanowią ogromny rynek jako leki nowej generacji zarówno dla ludzi, np. insulina, jak i dla zwierząt oraz znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, diagnostyce, przemyśle spożywczym czy kosmetycznym.