

## 4. Ipari termelés génmanipulált mikroorganizmusokkal

A biotechnológiai iparban nagyon sokféle terméket gyártanak. Ezeknek az anyagoknak a bioszintézise és a gyártástechnológiája is különbözik. Egy célszerű csoportosítási elv a termékekre az anyagcsere jellege szerinti megkülönböztetés. A biokémiai anyagcsereutak bonyolult reakcióhálózatokat alkotnak. Egy olyan hálót képzeljünk el, amely tartalmaz kb. 1000féle enzimet, azaz 1000 reakciót és mindegyiket reprezentálhatjuk egy nyíllal. A lineáris reakciósoroknál minden reakció terméke egy következő lépés szubsztrátja. Ezek az utak lehetnek elágazók is (ld. korábban az allosztérikus szabályozást és a triptofán bioszintézist), és alkothatnak hurkokat is (körfolyamatok, mint például a citrátkör). Ezek együttesen alkotják az anyagcsere-utakat, ezek leképezése, „térképe” minimum A1-es méretű, bonyolult gráf.

Az anyagcserében elfoglalt hely szerint megkülönböztethetünk elsődleges anyagcsere termékeket, másodlagos anyagcsere-termékeket, és rekombináns fehérjéket. Az elsődleges és másodlagos anyagcsere termékeket a mikroorganizmus az magától is előállítja valamilyen mértékben, a szakemberek ezt fokozzák iparilag gazdaságos mértékig.

A rekombináns fehérjéknél az a helyzet, hogy azoknak a génjei, azaz termelése eredetileg nem szerepelnek a sejtben, ezeket génmanipulációval viszik bele és így veszik rá a mikroorganizmust, hogy ezt a számára ismeretlen, idegen fehérjét termelje.

### **Összefoglalva a biotechnológiai ipar termékei:**

**Elsődleges anyagcsere-termékek:** Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez és/vagy növekedéséhez. Ezek kellene ahhoz, hogy az energiatermelés ne akadályozza, a sejt növekedhessen, szaporodhasson, saját anyagait előállíthassa. Ami ezekkel a folyamatokkal kapcsolatos köztermék vagy végtermék, azt mind elsődleges anyagcsere-terméknek nevezzük. Az elsődleges anyagcsere termékek a fermentáció kezdetétől fogva folyamatosan termelődnek.

### **Másodlagos anyagcsere-termékek:**

Ezek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvezőtlen körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására indul be. Amíg a tenyésztés jó tápanyagellátás mellett szaporodik, addig szekunder metabolizmus (= másodlagos anyagcsere) nincs. A tápanyagok egy részének elfogyása után áll át az anyagcsere, és képződnek a szekunder metabolitok. A termék molekuláknak nincs közvetlen haszna a termelő sejt számára. Ezeknek a reakcióknak nem a terméke lényeges a sejt számára, hanem a reakciók lezajlásával tud más anyagot átalakítani, vagy valamit eliminálni, és így tud a sejt életben maradni. Hasonló a folyamat, mint a *Bacillus*-ok spórásodása (ld. korábban a Mikrobiológiai

alapok fejezetben). Az endospóra képzésre is akkor kerül sor, amikor a sejt számára kedvezőtlenné válnak az életkörülmények (tápanyaghiány, kiszáradás).

Fehérjék, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan, génmanipulációval bevitt gének kiírt termékei.

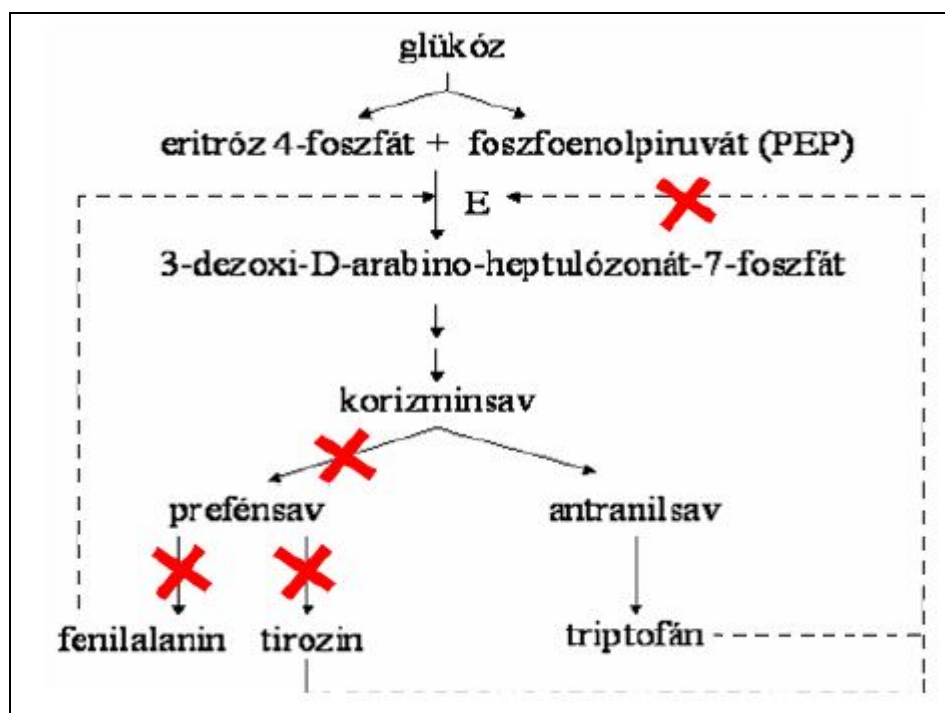
#### **4.1. Az elsődleges anyagcseretermékek előállításának biotechnológiája**

Az elsődleges anyagcseretermékek gyártását az anyagcsere mérnökség már tárgyalt módszereivel oldják meg. Emlékeztetül:

1. Az anyagcsere mellékútjainak lezárása, a melléktermékek képzésének megakadályozása → auxotróf, azaz hiánymutánsok létrehozása és szelekciója.
2. A bomlás, továbbalakulás meggátolása → szintén hiánymutánsokkal
3. Az allosztérikus szabályozás megszüntetése, antimetabolit-rezisztens mutánsok izolálásával.

A korábban már tárgyalt triptofán gyártás jó példa egy elsődleges anyagcsere termék előállítására. A triptofán fehérje alkotó aminosav, a sejtet alkotó minden fehérje bioszintéziséhez szükség van rá. Triptofán nélkül a mikroorganizmus nem életképes, a  $Trp^-$  hiánymutáns csak akkor marad életben, ha a táptalajban kapja meg a szükséges triptofánt.

→ A triptofán elsődleges anyagcsere termék.



1. ábra: A triptofán bioszintézis anyagcsere-mérnöki átalakítása

A triptofán bioszintézisét a *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzseknél ismerjük, a szénhidrátokból sok lépésben képződik.

Az anyagcsere-mérnöki beavatkozással kialakított mutációk:

Auxotrófiák: Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>

Rezisztencia: 5-Me-Trp<sup>r</sup>

Látható, az elsődleges anyagcseretermékek termeléséhez szükséges genetikai beavatkozások a bioszintézis ismeretét követelik meg, és egyszerre, de munkaigényes lépések ismétlésével valósíthatók meg.

#### **4.2. Az másodlagos anyagcseretermékek előállításának biotechnológiája**

A másodlagos anyagcseretermékeknek a termelő sejt szempontjából sokszor nincs különösebb haszna, pl. színyanyagok vagy esetében. De van a szekunder metabolitokon belül egy vegyületcsoport, az antibiotikumok csoportja, amelyek bizonyos fókig hasznosak a mikroorganizmusok számára. Kifelé a sejtbe kerülve elterjednek, és az egyéb „konkurens” mikrobák szaporodását meggátolhatják. Ezáltal az antibiotikumok életteret, tápanyagforrásokat biztosíthatnak a mikroorganizmusok számára.

Az antibiotikumokat úgy határozhatjuk meg, hogy ezek olyan mikroorganizmusok által termelt anyagok, amelyek más mikrobákat elpusztítanak, vagy életfolyamataikban gátolnak. Az antibiotikumok az emberiség számára is hasznos termékek, felhasználásuk több célú.

Humán (emberi) gyógyászati antibiotikumok - fertőzőes betegségek gyógyítására.

Rákellenes antibiotikumok - daganatos megbetegedések kezelésére

Állatorvosi antibiotikumok - beteg állatok kezelésére

Takarmányadalékok - a takarmánnyal együtt az állatok emésztőcsatornáján végighaladva egyrészt megakadályozzák a hasmenéses jellegű megbetegedéseket, másrészt átállítják a bélmikroflórát, amit a takarmány jobban gyarapodik. (Ez napjainkban már egy nagyon szigorúan szabályozott terület, az Európai Unióban az állattenyésztésben olyan szigorú szabályozás van az antibiotikumok alkalmazására, hogy itt már elő sem lehet adni antibiotikummal kezelt állatok termékeit - de a trópusokon alkalmazzák)

#### **Az antibiotikumok története:**

Az antibiózis fogalmát a **XIX. század végén** találták ki, méghozzá a szimbiózissal együtt. Amikor a szimbiózist, tehát a kölcsönösen hasznos együttélést leírták biológiai szempontból, akkor definiálták az antibiózist is. Tehát vannak olyan együtt élő különböző fajtájú organizmusok, amelyek közül az egyik negatív hatással van a másikra, tehát fékezi a működését. Ekkor ehhez még nem kapcsoltak molekulákat, csak magát a jelenséget próbálták meg leírni. Például a silózásnál foglalkoztak ezzel a kérdéssel, ahol a növényi anyagon tejsavat termelő mikrobák szaporodnak el, és a keletkező tejsav elpusztítja a mikroorganizmusokat és

ennek köszönhetően a takarmány nem rothad meg. A tejsav nem antibiotikum, de az antibiózis fogalma erre is érvényes.

(Kitekintés: az antibiotikumok elődei: szintetikus mikrobaellenes gyógyszerek:

**1912 Salvarsan**, ez a szerves arzénszármazék a vérbaj ellenszere. Ehrlich orvostudós, Hata szerves kémikus számos szerves arzénvegyületet terveztek meg, szintetizáltak, és próbálták ki egereken. Az első hatékony molekuláknak káros hatásuk volt a központi idegrendszerre, a későbbiekben ezt próbálták meg csökkenteni.



2. ábra: A Salvarsan

**1936** Szintén nagy áttörés volt a fertőzések gyógyításában a szulfonamidok felfedezése (Gerhard Domagk (1895-1964)). Ezek ma is forgalomban vannak, a házi orvosok gyakran írják fel pl. Sumetrolim-ot, ez kétkomponensű szulfonamid.



3. ábra: Sumetrolim gyógyszer

Az **1930-as évek végén** történt bevezetésük eredményeként számottevően csökkent a fertőző betegségek okozta halálozás. Az első, gyógyászati célú szulfonamidot Prontosil márkanéven 1938-ban hozták forgalomba.)

Az első ténylegesen biotechnológiai úton gyártott antibiotikum a penicillin volt. Alexander Fleming skóti orvos fedezte fel **1929-ben**. A penicillin kutatásánál több nevet is megemlíthetnénk (Chain, Florey – együtt kaptak Nobel díjat), de Fleming nevét annak kapcsán említjük, hogy a felfedezéshez egy véletlen vezetett el – baktérium telepeken egy véletlenül odakerült penész telep kioltási győrt hozott létre.

Iparilag sokáig nem történt semmi. **1944-ben** oldották meg a penicillin ipari gyártását. Hadi anyagnak min sítették

**1944 után** indult meg az ún. antibiotikum korszak.

**1944 és 1960 között** volt az új antibiotikumok felfedezésének korszaka.

**1950-t l** megjelentek a félszintetikus (fermentáció után kémiai reakció) származékok.

A fél szintetikus származékok kora még ma is tart.

**1990-t l** az antibiotikum korszak lezárult. Ez nem azt jelenti, hogy ma nem termelnek antibiotikumokat, de alig vannak új vegyületek, a régiékek szabadalmi lejártak és generikussá (bárki által gyárthatóvá) váltak. Már nincs extraprofit ezeken a termékeken. A piacon kemény árverseny van, a innováció az új molekulák helyett a meglév technológiák 1-2 %-os tökéletesítésére irányul. A nagy felfedezések kora ezen a téren már lejárt.

**1940 és 60 között:**

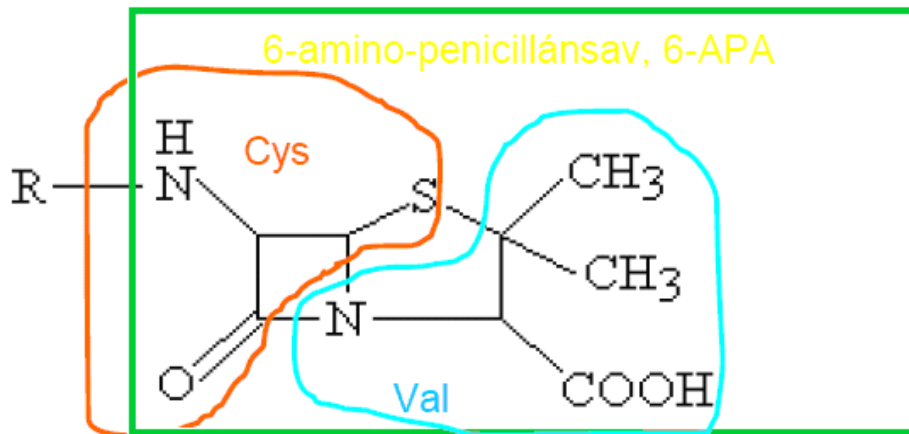
Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer különböz antibiotikus hatású vegyületet írtak le. (Az els publikáció általában nem tartalmazta a pontos szerkezetet, csak azt, hogy az adott vegyület gátol egyes mikroorganizmusokat.) Ennek a következménye az lett, hogy a felfedezett antibiotikumok száma nem csak n ni, hanem csökkenni is tud, mivel sokszor ugyanazt az antibiotikumot találták meg különböz kutató csoportok, és ez csak kés bb, a szerves kémiai szerkezet vizsgálatánál derült ki.

Ebb l a sok ezerb l a humán gyógyszerpiacon csak kb. 2-300 molekula van forgalomban. Ennek kb. 10%-át gyártják fermentációs úton, 80%-át fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikus). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

**Miért ilyen kevés?**

- Toxicitás (nem csak a mikroorganizmusra káros, hanem az emberi szervezetre is)
- Nem elég hatásos vagy van nála jobb (Ha egy új gyógyszer száz betegb l az eddigi 80 helyett 82-t gyógyít meg, az nem elég, csak akkor éri meg törzskönyvezeni és gyártani, ha jelent s a javulás.)
- Mellékhatások (Pl. valaki narancssárgát izzad – rifamicin csoport)
- Rezisztencia: Beszélhetünk állandó rezisztenciáról, tehát egy törzsnek állandó tulajdonsága, hogy bizonyos típusú antibiotikum nem hat rá. Szerzett rezisztencia, amikor a törzs a kezelés közben mutálódik, megváltozik. Tehát egy olyan antibiotikumot használni, amely ellen könnyen és gyorsan kialakul a rezisztencia nem érdemes. Olyant kell használni, amely ellen ritkán, lassan alakul ki a rezisztencia. Vannak polirezisztens törzsek, melyek több féle kezelésre is rezisztensé váltak. Ezért van az, hogy a sok antibiotikumból csak néhány száz lett gyógyszer.

Az antibiotikumok közül csak egyetlen vegyületcsoporttal, a penicillinekkal foglalkozunk, ezen mutatjuk be a szekunder metabolitok biotechnológiáját.



## A penicillin csoport

5. ábra: A penicillin molekula felépítése

### Hogy épül fel egy ilyen molekula?

Ez a molekula tulajdonképpen két aminosavból (cisztein és valin, pirossal és kékkel körberajzolva) tevődik össze, bár ez első pillantásra nem nyilvánvaló. Az alapváz a 6-amino-penicillánsav, angol rövidítése 6-APA (a zöld téglalapban). Ehhez kapcsolódik egy R molekularész, ami minden egyes penicillin molekulában más és más. Ezt variábilis oldalláncnak is nevezik.

A peptidekben a két aminosav csak egyetlen (peptid-)kötéssel kapcsolódik össze. A penicillin molekulának egy különlegessége, hogy a két aminosav még két helyen összekapcsolódik, így alakul ki a kettős gyűrűs szerkezet. A kémiában a hattagú gyűrű általában stabilak, a szétbontó gyűrűk (5, 4, 3 atomból állók) azok feszítettek, feszültség van bennük, instabilak, és könnyen felnyílnak. Ez igaz a penicillin molekulára is, a négy és öttagú gyűrűk instabilak, azaz a penicillin molekula nagyon bomlékony.

Emiatt történt az, hogy amikor Fleming felfedezte a penicillint és odaadta a szerves vegyészeknek, hogy vizsgálják meg a szerkezetét, akkor a vegyészek kezdetben mindig csak bomlástermékeket kaptak. A penicillin savra, lúgra és enzimekre egyből bomlik, így ezek a tulajdonságai nehezítették a kezelést. Ez azt is jelenti, hogy a gyomorsav is elbontja a bevett penicillint. Emiatt a negyvenes években még csak injekció formájában használták a penicillint. A későbbiekben az oldallánc lecserélésével olyan származékokat hoztak létre, amelyek savtűrők, illetve a penicillint bélben oldódó kapszulába csomagolták, ami megvédi a savtól.

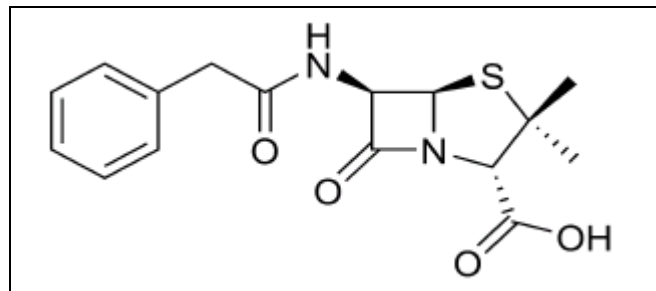
A különböző penicillin molekulák miatt a mennyiséget nem súlyra mérik, hanem az antibiotikus hatását vizsgálják. A szabványos hatásmérést egy bizonyos *Staphylococcus aureus* törzsszel (ez egy patogén baktérium, de mégis ott van mindenkinek a bőrén) végzik, szabványosított tápoldatban, szabványosított körülmények között. A definíció szerint egy egységnyi penicillin egy 50 ml-es lombikban az éppen megakadályozza a mikroba szaporodását. A penicillin nagy hatására az is jellemző, hogy ez a bizonyos egység,  $1 \text{ IU} = 0,6$

$\mu\text{g}$  G-penicillin Na sónak felel meg (mikrogramnyi mennyiségről van szó, ez a grammnak a milliommód része.) Tehát a penicillin parányi mennyiségben is hatékony, emiatt még mindig helye van a piacon.

### G-penicillin/benzil-penicillin

A molekula szerkezetében szerepelt a változtatható R oldallánc. Alapesetben az R oldallánc a fenilecetsav. Ez a fermentált alamp molekula, ebből gyártják az összes többi. Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhet és csak injekcióban adták. Ennek neve benzilpenicillin, más néven G penicillin. (A G jelölés onnan ered, hogy amikor még nem ismerték az egyes penicillinek szerkezetét akkor még az abc betűvel kódolták őket.)

Általában parenterálisan (injekció vagy infúzió útján) adagolják, mivel a gyomorban található sósav és a bélbaktériumok által termelt penicillináz hamar elbontja. A második világháború alatt is csak injekcióban adagolták a benzil-penicillint a betegeknek.



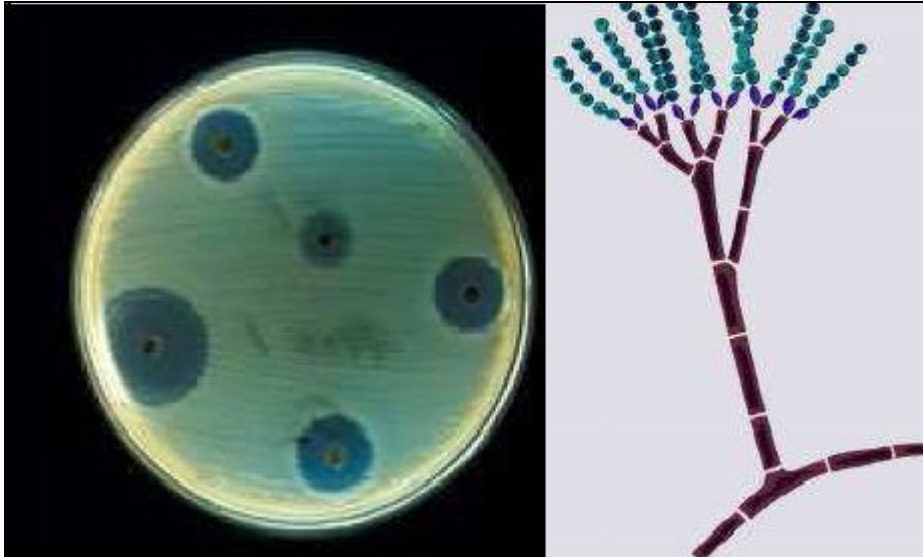
6. ábra: G-penicillin/benzil-penicillin

### A penicillin története

#### 1929

Alexander Fleming 1928-ban a londoni St. Mary kórházban vette észre, hogy a *Staphylococcus* tenyészetébe került kékes-zöldes penészszenyvedés körül a baktériumok nem növekednek. A Petri csészék utólagos sterilizálása előtt az egyik Petri csészére ráesett és kintt egy penész és a penész telep körül egy üres zóna, kioltási gyűrű keletkezett.

Fleming arra a következtetésre jutott, hogy a penész olyan anyagot bocsát ki, mely gátolja a baktériumok növekedését, elpusztítja a baktériumokat. Ötlete az volt, hogy ezt az anyagot ki kellene nyerni, és gyógyszerként lehetne használni. A penészt tiszta kultúrában is kitenyésztette, és felfedezte, hogy a *Penicillium* családba tartozó fajról van szó, melyet *Penicillium notatum* fajként azonosítottak.



7. ábra: Kioltási zónák és *Penicillium* (ecsetpenész) spóratartó.

Látszik, hogy ahol kékes-fehéres a táptalaj felülete, ott s r n ben tte egy baktérium. A sötét háttér el tt feketének látszanak az átlátszó kör alakú területek, ahol nem n tt a baktérium. A képen látható esetben nem egy penész telep termelte az antibiotikumot, hanem a szilárd táptalajba vágott lyukakba cseppentettek különböző mennyiség , antibiotikumot tartalmazó oldatot.

Fleming gondolkodhatott volna úgy is, ahogy az átlagember teszi, hogyha beleesett egy penész, az hiba, azt minél el bb el kell tüntetni. Fleming azonban arra gondolt, hogy a penész valami anyagot bocsát ki magából, amit l elpusztulnak a baktériumok. Így meg kell vizsgálni ezt az anyagot és gyógyszerként lehetne alkalmazni, ha elpusztítja a baktériumokat. Ez volt Fleming zseniális gondolata.

Fleming kezdetben nagyon optimista volt a penicillinfert zésekkel szembeni hatékonyságát illet leg, ráadásul a szernek minimális toxikus hatása volt az akkori szerekhez képest. További kísérletei után azonban Fleming úgy vélte, hogy a penicillin nem tud elegend en hosszú ideig az emberi szervezetben maradni ahhoz, hogy a patogén baktériumokat elpusztítsa.

**1940:** Sikert t tisztított formában el állítani a szert, valamint ebben az évben hadianyaggá vált a penicillin.

**1943: Klinikai kipróbálás:**

A II. világháború alatt a szövetséges er k hadseregeiben a penicillin jelent sen csökkentette az elfert z dött sebek okozta halálozások és amputációk számát. A szer azonban nehezen volt hozzáférhet , melyet egyrészt az ipari méret el állítás nehézségei, másrészt a penicillin szervezetb l történ gyors kiürülése miatti szükségessé vált gyakori adagolás okoztak. A penicillineket a vese eltávolítja a szervezetb l, a szer 80%-a a beadástól számított 3 órán belül kiürült. Ebben az id ben gyakori eljárás volt a kezelt betegek vizeletének összegy jtése, melyb l izolálták penicillint és újra felhasználták.



(A *Penicillium chrysogenum* felhasználása is ebben az évben történt. Ez egy amerikai házi-asszony dinnyéjéről származik. Lényegesen jobb penicillin-termelő törzs volt ez, mint a *Penicillium notatum*.)

#### **1944:**

Ez az év a normandiai partraszállás éve. Erre az évre már minden szövetséges hadikórházban volt penicillin.

Az ausztrál Howard Walter Florey vezetésével valamint Ernst Boris Chain és Norman Heatley részvételével egy oxfordi kutatócsoport fedezte fel, hogyan lehet a penicillint ipari méretekben előállítani.

Így 1944-re már 2,5 tonnát állítottak elő egy év alatt.

#### **1946**

Már 32 tonnát állítottak elő évente.

A II. világháború után segély formájában európai országoknak átadták a technológiát, a törzset. (Állítólag Magyarország is kaphatott volna egy ilyen, de visszautasította.)

#### **1952:**

Magyarországon is elkezdődik a gyártás. A GYOKI (Gyógyszeripari Kutató Intézet, mely jelenleg a TEVA Gyógyszergyár kutatóintézete) kutatói kapcsolataik révén szereztek egy törzset és a cseh kollégákkal közreműködésben megkezdték a penicillin gyártását. A penicillin gyártását az újonnan épülő Biogal Gyógyszergyárra (Debrecen) bízták. A kezdeti nehézségek után a termelés elérte az évi néhány száz tonnát.

#### **1980:**

A világ penicillin termelési volumene évi 30000 tonnára növekedett.

**2000:** ~100000 tonna az éves gyártás, és azóta is nagyjából ennyi, stagnál. Nehéz összesíteni, mert több, hasonló vegyületet gyártanak, és ezeket egymásba átalakítják.

### **A penicillingyártás**

Fermentációs úton, a kémiai szintézis nem gazdaságos.

A gyártást a biotechnológusok végzik. Egyik oldalról a törzset kell fejleszteni. A másik oldalról a technológiát. A törzsfelnevelés az inkább biológiai feladat, a technológiai fejlesztés az inkább mérnöki.

#### **Törzsmunka (biológia):**

- törzsizolálás
- indukált mutáció: Szándékosan mutációt idézünk elő.
- szelekció: Sok mutáció közül kiválasztjuk a legjobban termelőket.
- törzsfenntartás: Nem elég, hogy meg van a törzs, azt meg is kell nevelni.

#### **Technológia (mérnöki):**

(ld. Vegyipari és biomérnöki műveletek c. tárgy)

- Felületi/szubmerz
- Prekurzorok (4-8x)

- Tápoldatoptimalálás
- Metabolic engineering (cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Levegőztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)

### **Törzsnemesítés**

#### **Célok:**

- Hozamnövelés
- Fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- A pigment termelés megszüntetése

#### **Eszközök:**

A génmanipuláció a nagyon sok szekunder biokémiai lépés miatt majdnem lehetetlen, így maradt a régi (kb. 65 év és több ezer lépés) mutációs-szelekciós törzsjavítás. A koncentráció a fermentáléban ez idő alatt ~2-3 ppb-ről 50.000 ppb-re növekedett. A ppb (= part per billion)  $10^{-9}$ -nel helyettesíthető. Az 50.000 ppb, tehát 5%-nyi penicillin koncentrációt jelent. Ezzel már megközelítették a genetikai határt, ennél sokkal többet már nagyon nehéz lenne kizsarolni a tenyésztéssel, de dolgoznak rajta.

A 8. ábra már szerepelt korábban is, a mutációs módszereknél. Azt mutatja be, hogy 3 cég és egy egyetem (tehát 4 különböző kutatóhely) hogyan vezette végig a saját mutációs törzsfáját. Minden sor az ábrán egy-egy mutációs-szelekciós lépés, mellette az indukált mutáció módszere szerepel.

#### **A gyártás lépései:**

**1. Törzsfenntartás:** Egy laboratóriumban fenntartják a törzset rendszeres átoltással és szelekcióval egy jó termelési képességű törzset tartanak fenn.

**2. Inokulum lépcsők:** A jó termelési törzset inokulálnak egy oltóanyag tenyésztetét és lépcsőzetesen elszaporítják. Általában tízszeres, néha százszoros térfogatú tápoldatot oltanak be a tenyésztettel.

#### **3. Fermentáció**

- „Fed batch” = rátáplálásos szakaszos fermentáció, nem csak a folyamat elején, hanem menet közben is adunk tápanyagot. Glükóz limitben tartjuk a tenyésztet = kis glükóz adagokkal közel állandó, alacsony cukorszintet tartunk fenn, nehogy az elsődleges anyagcsere újra induljon.

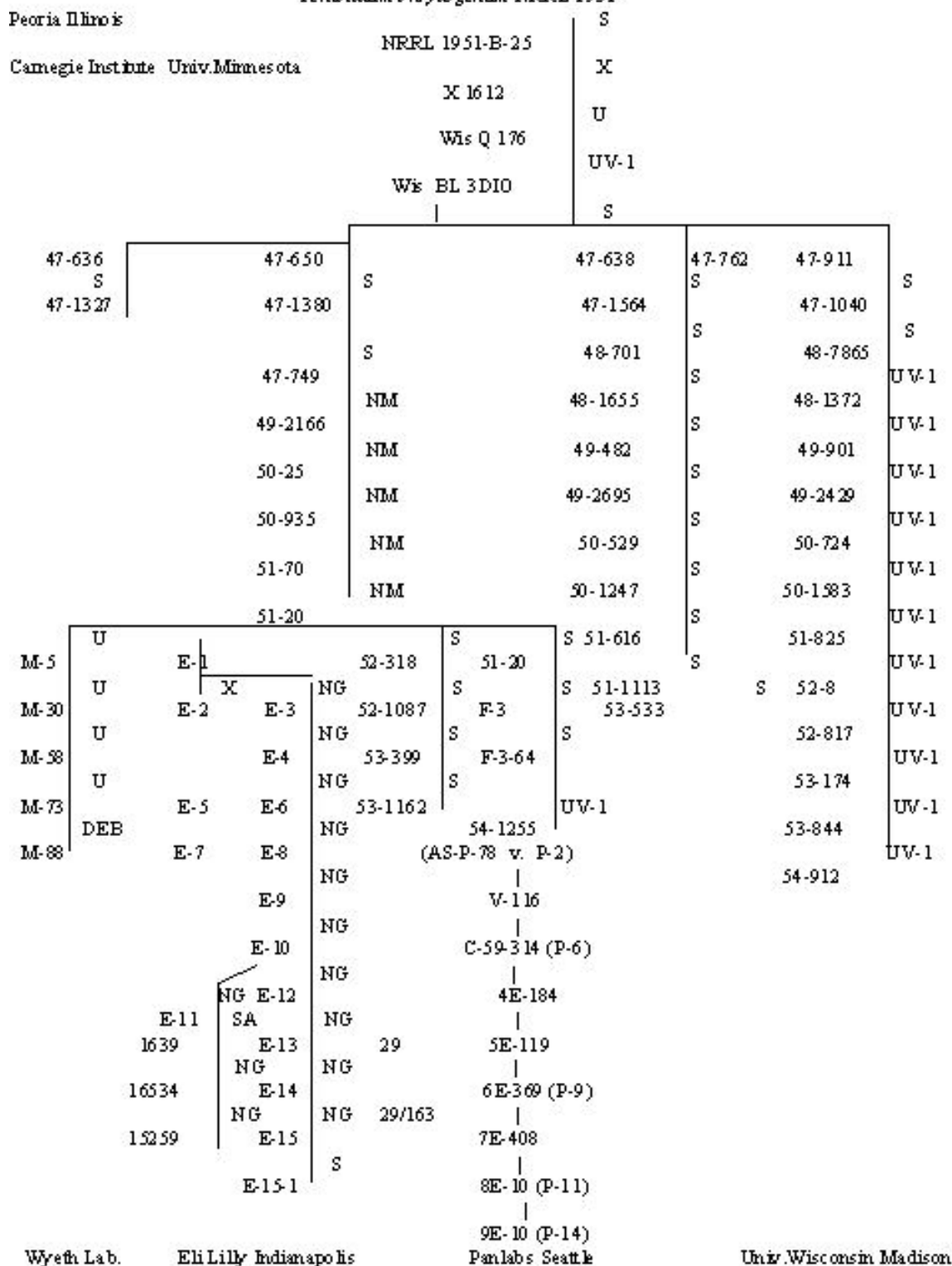
- Vágás = a fermentáció vége. kb. 80000 IU/ml ~5%-os oldat (5%-nyi penicillin a folyadékban)

#### **4. Feldolgozás:** kulcslépése:

Extrakció: Ez egy olyan vegyipari művelet, ahol vízzel nem elegyedő szerves oldószerekkel kioldják a penicillint a fermentáléból.

**Négy fejlesztő laboratórium törzsmemesítő tevékenysége a törzsjelzés feltüntetésével.**

*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951



Wyeth Lab. Eli Lilly Indianapolis Parlabs Seattle Univ. Wisconsin Madison  
 West Chester  
 Alkalmazott módszerek: S = szelekción, X = röntgenbesugárzás, UV = ultrabolya kezelés,  
 M = metil-bis(β-kloretil)amin, NG = nitrozo-guadin, NM = nitro génmutár

8. ábra: Mutációs törzsfa

## Fermentáció

Jellegzetes a szekunder metabolit fermentáció („kínjában termeli”), ami két szakaszos. Első szakasz: (kb. 40 h) a sejtek elszaporítása, intenzív levegőztetés, keverés, jó tápanyagellátás mellett, annak érdekében, hogy sok sejt keletkezzen.

Második, termelési szakasz: a sejtömeget másodlagos anyagcserére, azaz penicillin szintézisre kényszerítjük, a harmadik naptól apránként, kevés tápanyagot adagolunk.

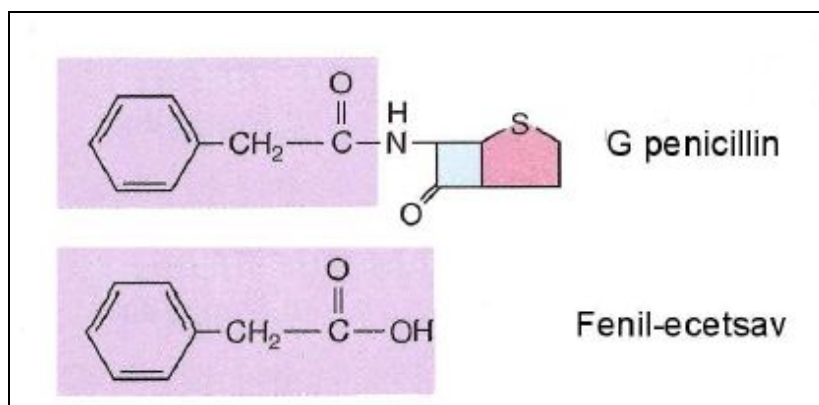
### **Mik lehetnek tápanyagforrások?**

- szénforrások (régén: laktóz, keményít, ma glükóz adagolás apránként az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: fehérje tartalmú szerves anyagok, pl. szójadara, apránként adagolva
- foszfor: foszfátként a lelegején a tápoldatba, a szaporodáshoz a sejtek felhasználják, miután elfogy – beindul a termékképzés. Többet nem szabad adni, mert leáll a szekunder metabolizmus
- prekursorok: Mérések alapján adagolják, pl. fenil-ecetsav 2-4 g/l koncentráció tartományban.

### Prekursorok

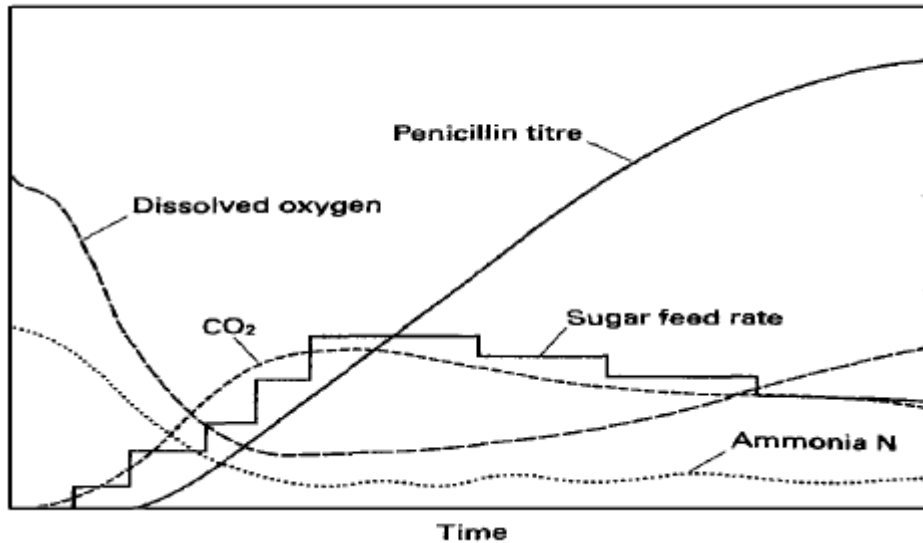
Olyan kémiai szintézissel előállított vegyület, amit „készen” adunk a mikroorganizmusnak, és az beépíti a termék molekulába. Így a tenyészetnek nem kell molekulárszint felépítenie. Anyagot és energiát takarítunk meg a mikrobának, mivel a végtermék egy részét készen megkapják.

A penicillinnél a prekursor a fenil-ecetsav. Alapesetben a penicillin molekulának ezt az oldalláncát magának a mikrobának kell megcsinálni. Ha készen megkapja a fenil-ecetsavat, akkor ezt felhasználja, beépíti a penicillinbe. Amikor felismerték a prekursor alkalmazásának lehetőségét (1946-47), a penicillin termelés 4-8-szorosára ugrott.



9. ábra: A fenil-ecetsav mint prekursor

Túl sok fenil-ecet savat sem szabad adni, mert károsítja a tenyészetet. Ha túl keveset adunk, akkor meg lassan megy a termékképzés, így alakul ki a 2-4 g/l-es tartomány.



10. ábra: A penicillin fermentáció lefutása

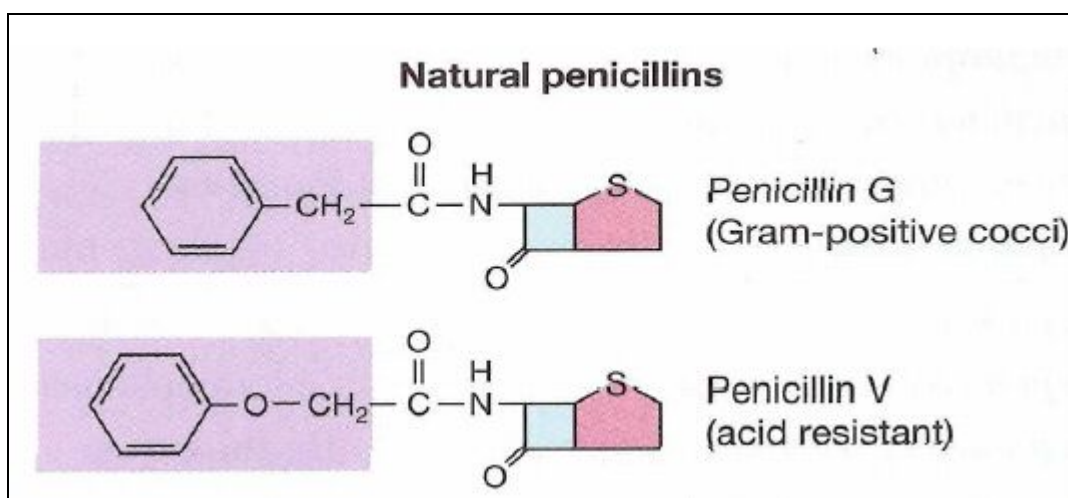
A 10. ábra szemlélteti egy tipikus penicillin fermentáció időbeli lefutását. A folyamat teljes ideje 120-160 óra. Az elején folyik a sejt szaporodás, ezen a szakaszon nagy mennyiségben fogyasztja a nitrogént, és meredeken csökken az oldott oxigén szintje is. A penicillin termelés a sejt szaporodás végénél kezd elindulni. A lépcsős görbe (sugar feed rate) a cukor betáplálás sebessége, ezzel állandósítani a glükóz-hiányos állapotot. A cukor betáplálás és a széndioxid termelés szinte teljesen együtt fut. A cukoradagolás sebessége a penicillin-termelés sebességével (a penicillin görbe meredeksége) is arányos. Mindkettő a folyamat közepén a legnagyobb, a vége felé a tenyészet előregedésével lelassul. A végén az oxigén szintje is elkezd több maradni, mert kevesebbet fogyaszt el belőle.

### Félszintetikus penicilinek

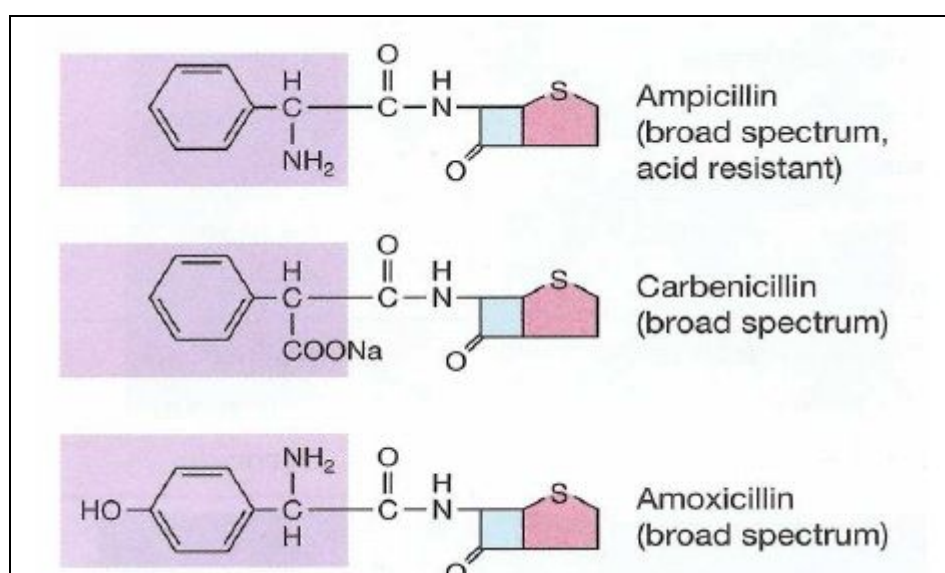
A természetes penicilineknél a gyógyászati alkalmazásoknál a következő problémák merültek fel:

- Szűk antibiotikum spektrum, csak a Gram-pozitív kórokozókra hatékony.
- A G penicillin alkáli sók sav érzékenyek, szájon át nem szedhetők
- Allergén hatások
- A kórokozók penicillinnel szemben kialakult rezisztenciája

A félszintetikus penicilinek, azon antibiotikumok, melyek hatóanyagának előállításánál, az alapmolekulát mikroorganizmus állítja elő, azonban ehhez szintetikus úton olyan oldalláncot kapcsolnak, amelyre fermentációs úton nincs lehetőség.

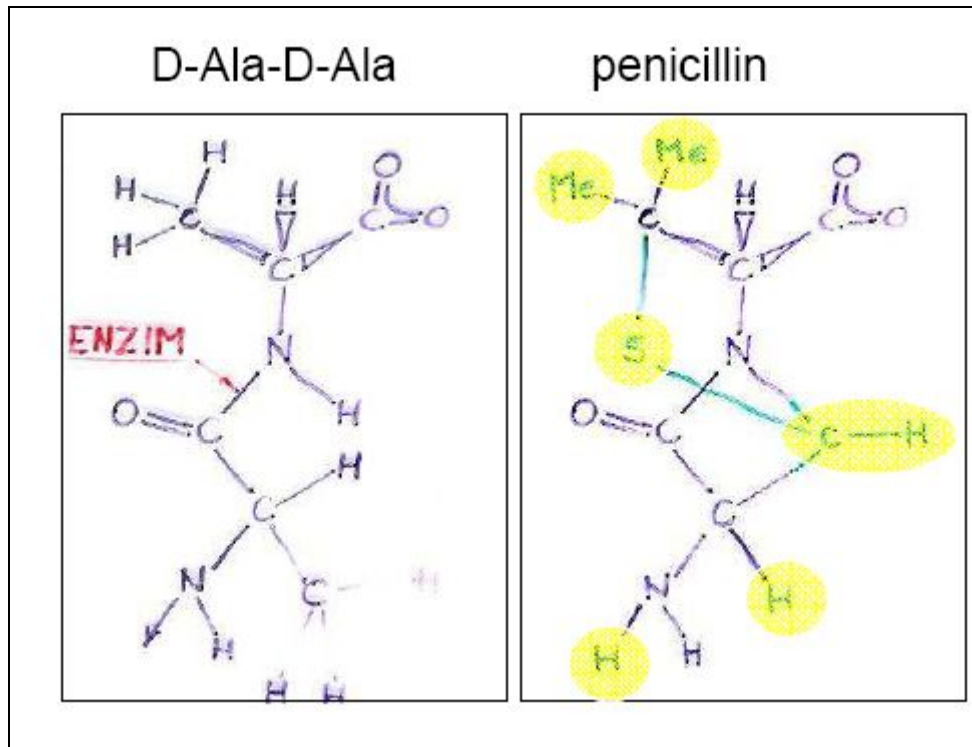


11. ábra: Fermentált alapvegyületek



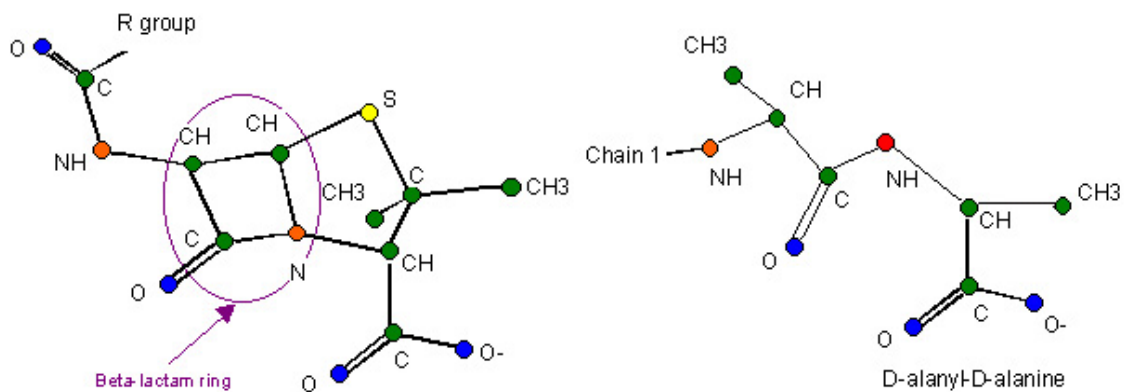
12. ábra: Fél-szintetikus penicillinek

A penicillin hatásmechanizmusa szerkezet analógián alapul.



13. ábra: A penicillin hatásmechanizmusa

Amikor a sejttel épül, akkor egy peptidlánc végén lévő D-alanin - D-alanin láncvéget egy enzim odakapcsolja egy másik peptid végéhez, és ezáltal térhálósodik a sejttel. Ennek a D-Ala-D-Ala láncvégnak a szerkezetanalógja (= hasonló kémiai szerkezet molekula) a penicillin. Az ábra ezt a hasonlóságot szemlélteti, a különbségeket sárga szín jelöli.



**Penicillin**

The four member beta lactam ring is attached to a five member ring. The R group will determine the spectrum of activity. The structure of D-alanyl-D-alanine is given for comparison.

14. ábra: A penicillin szerkezeti hasonlósága

Ha a sejtfa építő enzim a D-Ala-D-Ala láncvég helyett egy penicillin molekulát köt meg az aktív centrumában, akkor az irreverzibilisen kötődik be oda, az enzim soha többé nem tudja a sejtfa-építést katalizálni. Ettől a baktérium sejtfa meggyengül, és nem tud osztódni, mert ahhoz új sejtfa részek szintézise lenne szükséges.

### **A szekunder metabolit gyártás összefoglalása:**

Törzsfejlesztés: A génmanipuláció majdnem lehetetlen, mert a bioszintézis nagyon sok lépésből áll, és sokféle szabályozás érvényesül. A klasszikus mutációs-szelekciós módszert ismételt évtizedeken keresztül, ez hatékony, de ma már lassan eléri a határait.

Technológia: Kétszakaszos fermentáció, előbb sejtszaporítás, azután termékképzés.

Piaci helyzet: A szabadalmak lejártak, generikus készítmények, éles versenyhelyzet, nyomott árak. Ennek egyik következménye az outsourcing, a gyártás kihelyezése a fejlődő országokba (pl. Indiába), ahol alacsonyabbak a termelési költségek.



### **4.3. Rekombináns fehérjék el állítása génmanipulált mikroorganizmusokkal**

Az els dleges és másodlagos anyagcseretermékek el állítása után a rekombináns **fehérjék** gyártásáról lesz szó. Ezek olyan fehérjék, melyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, hanem a fehérjék génjét a biotechnológusok vitték be különböző vektorokkal a sejtbe.

#### **Inzulin**

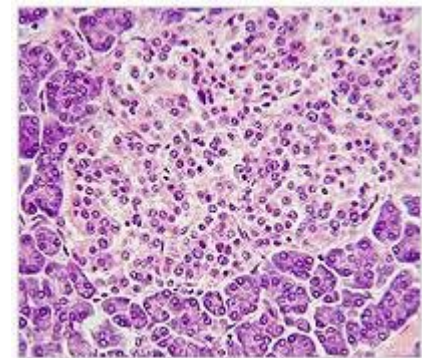
Els ként az inzulin el állításával foglalkozunk, mert ez egy viszonylag egyszer bb fehérje, másrészt id rendben, tudománytörténetileg is ez volt az els rekombináns termék.

#### **Mi is az inzulin?**

Az inzulin maga egy fehérje típusú hormon, tehát szabályozó jelleg anyag, ami nem a mennyiségével, hanem a **szabályozáson keresztül** hat. Parányi mennyiségben is hatékony, mert a sejtek felületén lévő receptorokhoz köt és a receptorokhoz való köt és anyagcsere változásokat okoz. Már egy-két inzulin molekula a sejt felületén receptorhoz köt dve meg tudja változtatni a sejtek cukorfelvételét.

#### **Hol termel dik az inzulin a szervezetünkben?**

A hasnyálmirigyben, de ennek is csak bizonyos sejtjeiben ún. Langerhans-szigeteken. Az inzulin antagonistá hormonpárja, a glükagon szintén itt termel dik. Ez a két hormon együttesen biztosítja a vércukorszint szabályozását. Az inzulin csökkenti a vércukor szintet, a glükagon emeli, a két ellentétes hatású hormon aránya alakítja ki a közel állandó vércukorszintet.



15. ábra: A hasnyálmirigy Langerhans-szigete

Az inzulinnal kapcsolatos betegség a **diabetes**, köznapi néven cukorbetegség, ami a vércukor szint szabályozásának zavarát jelenti. Többféle típusa van:

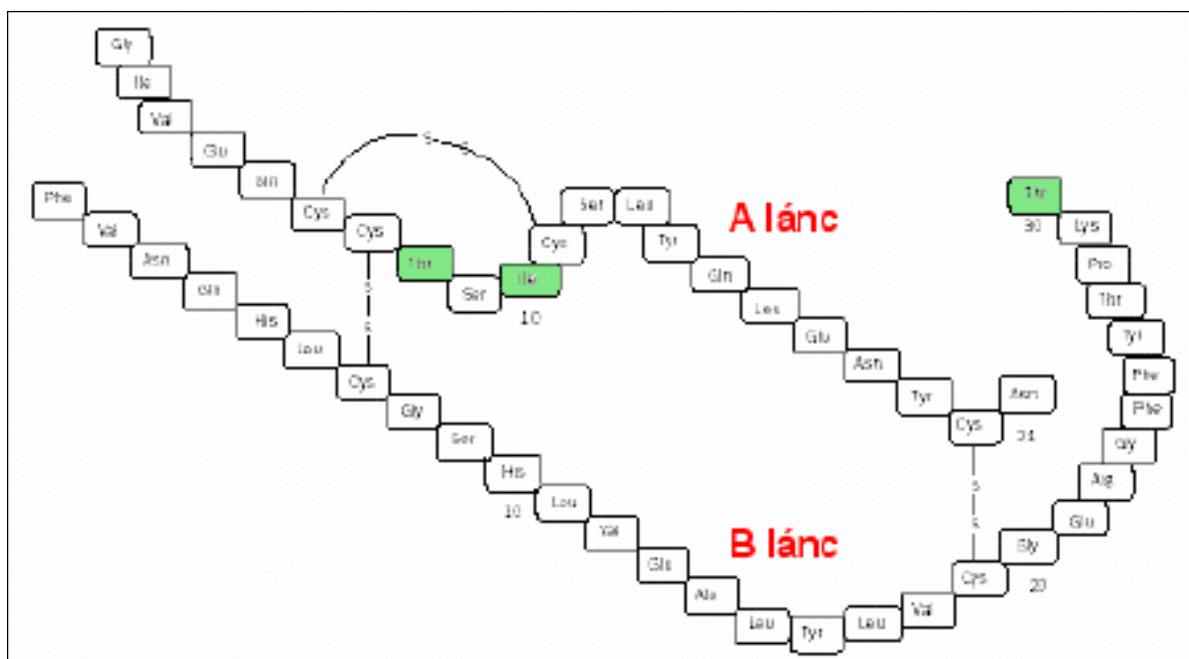
**Fiatalkori cukorbetegség:** Ez ténylegesen az inzulin hiányán alapszik. A sejtek nem képesek elegend inzulint termelni, és emiatt a vércukor szint állandóan magas a szervezetben. A fiatalkori cukorbetegség egy autoimmun betegség, melyet abszolút inzulinhiány okoz. Hátterében az áll, hogy a szervezet immunrendszere idegenként ismeri fel a saját sejtek egy részét, és autoimmun gyulladás következtében elpusztulnak a hasnyálmirigy

inzulint termel béta-sejtjei. A fiatal kori cukorbetegség inzulinos kezelés nélkül súlyos károsodással, és egy-két éven belül halállal jár.

**Id skori cukorbetegség:** A betegek túlnyomó többsége ebben szenved. Itt nem az inzulintermelés hiánya a probléma, hanem a sejtek felületén lévő inzulin receptorok károsodása. Az id skori cukorbetegség egyfajta civilizációs ártalom, amit a magas glikémiás index szénhidrátok fogyasztása (cukor, fehér liszt stb.) idéz elő. A glikémiás index azt fejezi ki, hogy egy szénhidrát milyen gyorsan szívódik fel, és jut a vérbe. Minél nagyobb ez az érték, az ételmiszer annál nagyobb inzulintermelésre serkenti a szervezetet. Az éveken át tartóan magas inzulinszint, pontosabban az étkezéseknél fellép hatalmas inzulinhullám miatt a sejtek védekezni kezdenek a beléjük pumpált túl sok cukor ellen, és kialakul az inzulinrezisztencia, vagyis a sejtek ellenállnak az inzulin hatásának - a receptorok érzéketlenné válnak az inzulinra. Ám mivel az agy érzékeli, hogy a vérben ott a sok cukor, utasítja a hasnyálmirigyet, hogy még több inzulint termeljen, a sejtek viszont egyre jobban ellenállnak. Egy ponton azonban a hasnyálmirigy feladja a küzdelmet, és a kialakuló tartóan magas vércukorszint károsítja a szervezetet. Rontja a keringést a hajszálerekben, és ennek sokféle következménye lehet (pl. vakság, lábszárfekély, infarktus).

Mind két típusnál inzulin bevitellel lehet a betegten segíteni. Ez a bevitel szájon át (tablettában, kapszulában) nem oldható meg, mert az inzulin az egy fehérje molekula, ami az emésztő csatornában lebomlik. Ezért az inzulint legtöbbször injekció formájában adják, bár sok próbálkozás történt ennek elkerülésére, pl. a nyálkahártyán keresztül felszívódó preparátumok kifejlesztésére.

### Az inzulin molekula szerkezete:



16. ábra: Az inzulin szerkezete

Két peptid láncból ( A és B lánc) épül fel. Az egyik 21 a másik 30 aminosavból áll. A két láncot diszulfid hidak (két kénatomból álló, -S-S- felépítésű keresztkötések) tartják össze. A diszulfid hidak a fehérjében lévő cisztein aminosavak között jöhetnek létre. Ezekben az oldallánc végén egy SH csoport található, két ilyen SH csoport képes összekapcsolódni.



(a hidrogéneket valamilyen molekula, pl. NAD veszi fel). Három ilyen kötés található az inzulin molekulában, kettő az A és B lánc között, a harmadik az A láncon belül hoz létre egy hurkot, ezáltal stabilizálja a szerkezetét.

A sertés és a marha szervezete szintén termel inzulint. Ezek az emberi inzulintól csak néhány aminosavban különböznek. E különbségekben az evolúciós elágazások története is kiolvasható.

	Aminosav		
	5.	10.	30.
Marha	Ala	Val	Ala
Sertés	Thr	ILeu	Ala
Ember	Thr	ILeu	Thr
	A lánc		B lánc

17. ábra: Eltérések a humán, marha és sertés inzulin között

Ha nagyobbak a különbségek, mert több mutáció lépett fel, akkor a fajok korábban váltak el egymástól. A sertés inzulin csak egyetlen aminosavban tér el az emberétől, a marha pedig háromban (a képen zölddel, a táblázatban pirossal jelölve). Ebből látszik, hogy a sertés közelebbi rokona az embernek, mint a szarvasmarha.

A cukorbetegség kezelésére évtizedekig a sertés inzulint alkalmazták. A vágóhidakon összegyűjtötték a hasnyálmirigyeket, és ebből vonták ki a sertés inzulint.

### Az inzulin bioszintézise:

Az inzulin két fehérjeláncból áll, de csak egy inzulin gén van. Ennek átírásával - az intronok kivágása után - egy fehérjelánc keletkezik (pre-pro Arg inzulin), és ebből három hasítással és két Arg eltávolításával alakul ki a végső, aktív szerkezet.



lönböz enzimekkel próbálták meg pótolni a hasnyálmirigy emészt enzimeit. Véletlenül figyelték meg, hogy a kutyák vizeletére odagy ltek a legyek. Az okot keresve állapították meg, hogy a kutyák vizeletében sokkal több cukor volt, mint az el tt. Ebb l következtek a hasnyálmirigy szerepére a vércukorszint alakulásában, és ez vezetett el végül az inzulin felfedezéséhez.) A kutyák vizsgálata után átálltak a sertések alkalmazására. A nagyobb mennyiség inzulin el állításához a tudósok ekkor a vágóhidakról szerzett állati hasnyálmirigyet kezdték használni. A kísérletek sikeresek voltak; folyamatos adagolással hosszú id n át életben tudták tartani a beteg állatokat. Cukorbeteg ember el ször 1922. január 11-én kapott a kivonatból; a már haldokló 14 éves fiatalember néhány nap múlva elhagyhatta a kórházat, bár továbbra is rászorult az injekciókra. Az inzulingyártás 60 évig a torontói felfedez k (Banting, Best és Collip) elvei alapján történt. Az inzulint sertés, illetve szarvasmarha hasnyálmirigyéb l vonták ki savas-alkoholos módszerrel. Az állatok levágását követ en a hasnyálmirigyet azonnal lefagyasztották. Darabolás, rlés után savanyú közegben alkoholos kivonatot készítettek. Ezt semlegesítették, és eltávolították a kicsapódó fehérjéket, az alkoholt és a zsírnem anyagokat. Végül semleges közegben konyhasó (NaCl) hozzáadásával az inzulin kicsapódott. Az így nyert készítmény 80-90 százalék kristályos inzulint tartalmazott, ez a klasszikus "gyors" hatású inzulin. A mindennapi gyógyításban jól alkalmazható kristályos inzulint el ször Abel állított el 1926-ban.

A felfedezésért a kutatók 1923-ban Nobel díjat kaptak.

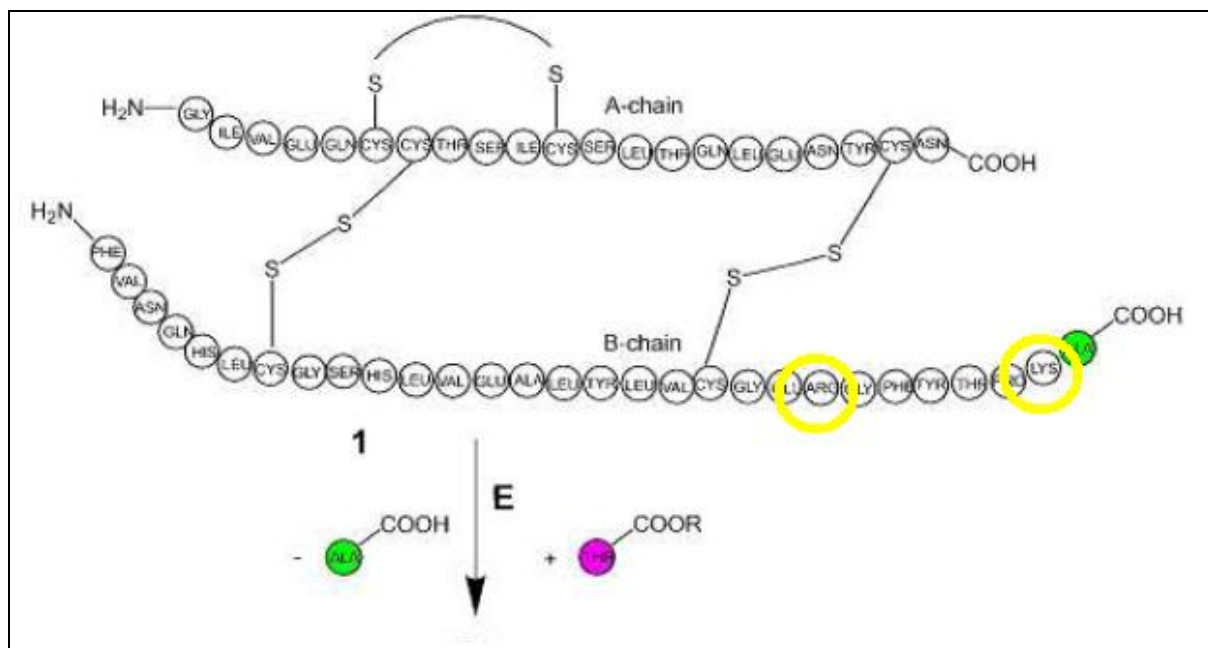
A nyolcvanas évek közepéig a sertés hasnyálmirigyb l való inzulin kinyerés volt az egyedüli technológia, de korlátozó tényez t jelentett, hogy az alapanyag mennyisége véges (nem vágnak le annyi sertést, mint amennyi hasnyálmirigyre szükség lenne). Másrészt l kiderült, hogy a sertés inzulinban lév egy aminosav különbség a kezelt paciensek egy részénél allergiát okoz. A szervezetük idegen fehérjének tekintette az inzulint és allergiás reakció alakult ki. Az allergia ráadásul ismételt bevitelnél fokozódik, tehát a folyamatos inzulin adásnál egyre er sebb lesz.

A különbség a sertés és az emberi inzulin között egyetlen aminosav. Ezt kellene lecserélni, és az allergia probléma megoldódna.

### **Hogyan lehetne ezt az aminosavat lecserélni?**

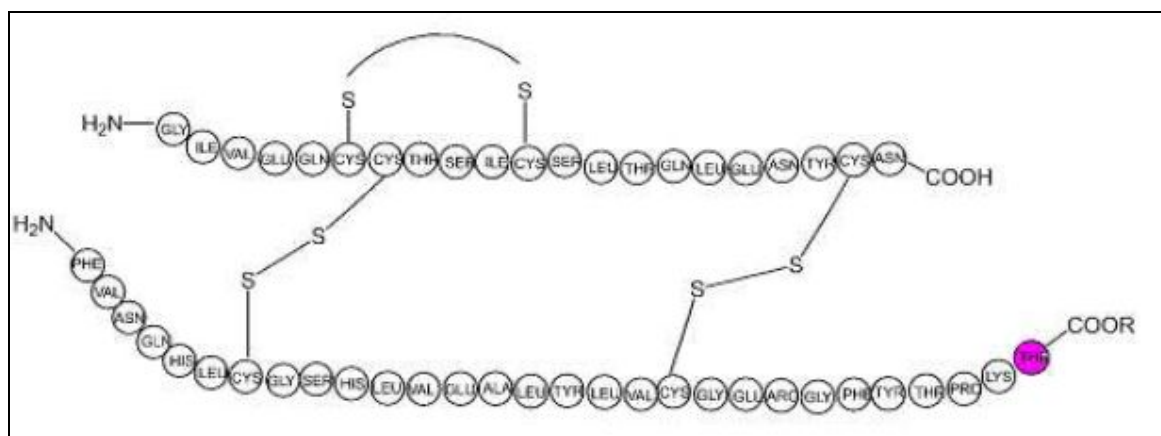
Ismét egy biotechnológiai lépés következik: egy enzimet használunk az átalakításra. Ez az enzim a tripszin, a hasnyálmirigy által termelt emészt enzim. (Kitekintés: A hasnyálmirigy hormonok mellett nagyon sokféle emészt enzimet is termel. Ezt a sokféleséget fejezi ki a hasnyálmirigy latin neve is: pancreas, lefordítva: pan = minden, teljes; creas = terem, létrehoz, pancreas = minden(félé)t termel ).

Ez egy nagyon specifikus peptidáz, mivel nem akárhol hasítja el a fehérje molekulákat, hanem a bázikus aminosavak mellett. Két féle bázikus aminosav van az arginin (Arg) és a lizin (Lys). Az oldalláncuk végén egy aminocsoport van, ezt ismeri fel a tripszin. Ahol a fehérje láncban egy ilyen aminosavat talál, odaköt dik, és mellette elvágja a peptidkötést.



19. ábra: Az alanin levágása

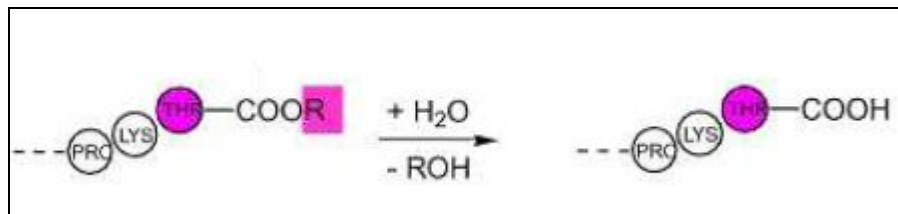
Látható a B láncon, hogy az utolsó eltti aminosav az egy lizin, tehát bázikus aminosav. A lizin mellett a tripszin éppen egyetlen aminosavat, az eltávolítandó alanint hasítja le. Sajnos az inzulinban van még egy bázikus aminosav is, az ábrán sárgával jelölt arginin. Ahhoz, hogy csak a lizin mellett menjen végbe a reakció, pontosan be kell állítani körülményeket (+6 fok, szerves oldószert adni a vizes oldathoz).



20. ábra: A threonin beépülése az alanin helyére

Az alanint treoninra (lilával jelölve) kell cserélni. A cserénél azt használják ki, hogy ezek a reakciók megfordítható, egyensúlyi reakciók. A kémiai reakciók megfordíthatók akkor, ha valamelyik reakciópartnerből nagyon sokat adunk hozzá. Ez esetben treoninból kell nagyon sokat hozzáadni az alaninhoz képest. Így az eredetileg bontási reakció visszafordul, és szintézis, azaz aminosav rákötés is végbemegy. Ha pedig nagyságrenddel több treonin van jelen, mint alanin, akkor a létrejövő inzulin molekulák között is nagyságrenddel több lesz az treoninos, mint az alaninos.

De van még egy probléma, a treonin karbonsav csoportja. Ez a csoport mellékreakciókba léphet, és szennyez melléktermékeket hozhat létre. Ennek kivédésére a savcsoportra egy véd csoportot tesznek, treonin észtert visznek be a rendszerbe. Az R bet azt jelenti, hogy valamilyen, pontosan meg nem határozott alkohollal észterezik a treonint. Így el lehet kerülni a mellékreakciókat, nem képződnek melléktermékek. De ez egyúttal azt is jelenti, hogy legvégül ezt az észterez alkoholt is el kell távolítani az inzulinról.



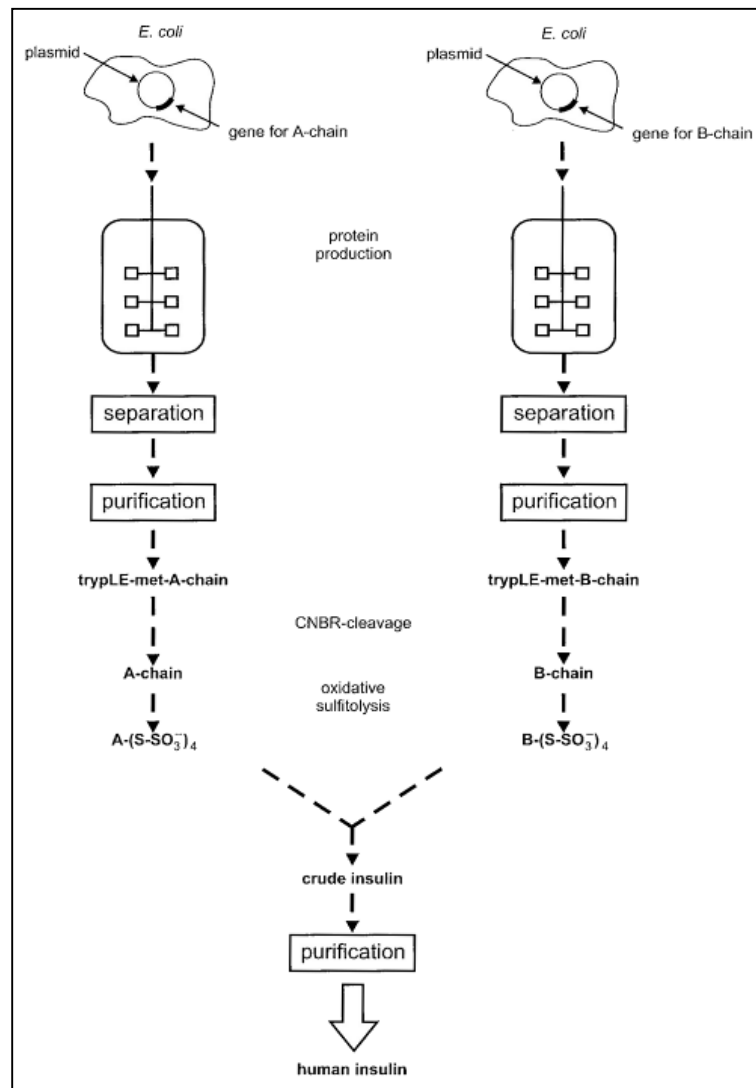
21. ábra: Az észter csoport elbontása

### Az inzulin fermentációs el állítása rekombináns fehérjeként

A rekombináns fehérjék el állítását prokariótákkal és eukariótákkal is meg lehet oldani. A kétféle fehérjeszintézis között azonban különbség van. Az eukarióták képesek szénhidrátreszekkel kiegészített fehérjéket létrehozni, míg a prokarióták csak az „alap” fehérjemolekulát tudják el állítani. Ha tehát olyan fehérjét akarunk termeltetni, amire nem kell cukrokat rákötni (szakkifejezéssel: glikozilálni), akkor ezt a feladatot prokariótákkal is meg lehet oldani a folyamatot. Ha viszont a termeltetni kívánt fehérje csak glikozilált formában aktív, akkor eukariótákkal kell dolgoznunk. Az inzulin nem tartalmaz szénhidrátokat, tehát rekombináns fehérjeként baktériumokkal is el állítható.

### Kettős fermentáció

Az inzulin A és B láncának megfelelő génszakaszt megfelelő vektorokkal két külön E. coli törzsbe viszik be. Két külön fermentációval el állítják a két fehérjeláncot. Ezek a fehérjék intracelluláris (sejten belül maradó) termékek, így a további feldolgozáshoz egy külön művelettel fel kell tárnai a sejteket. A feltárás és több lépéses tisztítás után kapják meg az inzulin komponenseit. A két lánc között a diszulfid hidakat kémiai reakcióval hozzák létre, majd további tisztítás után hozzák forgalomba.



22. ábra: Két külön fermentáció, aztán összekapcsolás

### A pre-pro-inzulin el állítása rekombináns fehérjeként

Az egész fehérjelánc el állítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *Escherichia coli* plazmidba. A génbevitel és a fermentáció *E. coli*-val az el bbiekkel analóg módon történik, de utána a lánc hasítása bonyolultabb, két enzimes lépés.

Els lépés: a bioszintézissel analóg módon, három helyen kell felhasítani a fehérjét. Szerencsére mindegyik vágási helynél, illetve közelében található egy-egy arginin a fehérjében (az ábrán zölddel jelölve). Láthatjuk, hogy a pre inzulin egy argininnel végződik, majd a B láncnál is a threonin után két arginin jön. A tripszin már tudjuk, hogy képes a bázikus aminosavak melletti bontásra, tehát ezzel majdnem pontosan meg tudjuk csinálni a hasításokat. A vágások az arginin „jobb” (karbonsav) oldalán történnek. Két helyen pontosan a megfelelő helyen szakad meg a fehérje lánc, a harmadikon viszont, a B lánc végén két arginin ott marad.





## Vakcinák

A vakcina fogalmával mindenki találkozott már, hiszen a kötelező védőoltásokkal mindenki megkapta. A vakcina gyártás az oltóanyagok előállítását jelenti.

Mi a funkciója a vakcináknak?

Ezek immunfehérjék, immunreakcióban valamilyen módon részt vevő fehérjék. Már ezen a ponton két alapvető kategóriát kell megkülönböztetnünk, az aktív és a passzív immunizálást. Ennek elkülönítéséhez nézzük meg, hogyan működik az immunreakció.

Ha a szervezetbe bekerül valamiféle fertőző ágens, vírus vagy baktérium stb. ennek a felületi fehérjéje (ez az antigén) védekező reakciót, immunreakciót vált ki. Ennek egyik fajtája az ún. molekuláris immunválasz. A fehér vérszövetek antitesteket (fehérjéket) termelnek, és az, amelyek éppen pont ráilleszkedik a támadóra, az rákötődik, és hatástalanítja. A hatástalanításnak egyik módja az, hogy beborítja a felületét és ezzel akadályozza a működését. A másik védekezési mód az, hogy a rákötődött antitest az egy „címke”, ami a sejt immunválasz sejtjei számára azt az információt hordozza, hogy ezt a megjelölt objektumot (sejt, stb.) kell bekebelezni (fagocitózis), elpusztítani. Az immunreakciónak tehát két fehérje szereplése van, az antigének és az antitestek. E kétféle fehérje alkalmazása szerint különíthetjük el az aktív és passzív immunizálást.

Passzív immunizálás	Aktív immunizálás
antitest (antitoxin) bevitel	antigén bevitel
más sejtek termelik az antitesteket	a szervezet maga termeli az antitesteket
terápia/gyógykezelés – fennálló betegség esetén	profilaxis/megelőzés – jövőbeli betegség ellen

25. ábra: Az aktív és a passzív immunizálás

Passzív immunizálás esetén az antitesteket adjuk be a szervezetbe. Akkor alkalmazzuk, ha a fertőzés már megtörtént, illetve valószínűsíthető, hogy megtörtént. Ilyenkor nincs idő arra, hogy kiváltsuk a szervezet saját immunreakcióját, ekkor olyan ellenanyagokat kell bevinni, amelyeket a szervezet maga is termelne, ha lenne ideje rá. A kívülről bevitt ellenanyagok védik meg a szervezetet. Ez nem megelőzés (profilaxis), hanem kezelés (terápia). Alkalmanként, egyénekenként adják, ezt nem kapja meg mindenki.

Az aktív immunizálásnál nem az antitestet visszük be a szervezetbe, hanem az antitest termelését kiváltó antigént. Ennek hatására a szervezet maga termeli az antitesteket, még a fertőzés

fellépése előtt. Ezzel felkészítjük a szervezetet, és nem betegszik meg a fertőző ágens megjelenésekor. Ez megelőzés (profilaxis), és nem kezelés (terápia).

Fejlett egészségüggyel rendelkező társadalmakban a különböző védőoltások rendszerét vezetik be, egy mindenkire kötelező oltási programot, ami megvédi a társadalmat a járványos fertőző betegségektől. Ezt dokumentálja az oltási könyvecske, ami végig kíséri mindenki gyerekorát.

Mindkét fehérjét (antigén és antitest) előállíthatjuk rekombináns fehérjeként, de itt az előadásban az aktív immunizálásra használatos antigén fehérjék gyártásáról lesz szó.

### **Az immunválaszt kiváltó vakcina jellege szerint lehet:**

1. Élő, attenuált (legyengített, már nem virulens) kórokozó baktérium bevitele a szervezetbe.

Edward Jenner is ugyanezt csinálta, aki a védőoltások atyjának tekinthető. Fogalma sem volt az immunreakciókról, de az védőoltások atyja volt, mert azt ismerte fel, hogy a tehenhimlő az sokkal enyhébb lefolyású, mint az emberi himlő, viszont védettséget ad a fekete himlő ellen. Onnan jött rá, hogy a tehenhimlő a tehen tőgyén található himlős sebekről ismerhető fel és azok a fejőnők, akik ezekkel a tehenekkel foglalkoztak, azok védettek lettek a himlő ellen. Az eljárása az volt, hogy a tehen tőgyén lévő himlős varokat lekaparta és ezt dörzsölte bele az emberen mesterségesen létrehozott sebbe. Így az ember megfertőződött a tehenhimlővel. Ettől keletkezett egy-két himlős folt ott az emberen, de ezek az emberek védettek lettek a himlővel szemben. Ez az 1800 körüli években történt. Edward Jenner is egy gyengébb kórokozót használt. A különbség csak az, hogy nem egy szándékosan legyengített kórokozóról beszélhetünk, hanem egy természetben előforduló kórokozóról. Manapság is használnak ilyent. Ilyen pl.: BCG oltás (a *Bacillus Calmette-Guérin* elnevezés rövidítése) A két francia kutató évekig laborban tenyésztette TBC (tuberkulózis) kórokozóját, és az már nem fertőzőképes, csak védettséget hoz létre a vele való fertőzés, betegséget nem. A törzs a *Mycobacterium tuberculosis avirulens*, immunogén változata.

2. Elölt, inaktivált kórokozó használata. A betegséget okozó törzset használják, de elpusztítják, inaktiválják. Szaporodni, így fertőzni nem tud, de a fehérjéi alkalmasak az immunválasz kiváltására. Baktériumoknál és vírusoknál is alkalmazott technika. Célszerű szelektíven a DNS-t elreagáltatni valamilyen szelektív reagenssel, úgy, hogy a fehérjék épen maradjanak.

3. Alegység- (subunit) vakcina: Az egész kórokozó helyett csak egy-két jellegzetes immunogén fehérjét visznek be. Ezeket rekombináns fehérjeként más, biztonságos törzsszel termeltetik meg. Biztonságosabb eljárás, mivel maga a mikroba sem előlt, sem élő formában nincs jelen, így garantáltan nem okozhat fertőzést.

**A vakcina gyártás technológiai lehet ségei:**

1. Eml sállatokban (lovak, kutyák, disznók, lovak). Nem csak történelem, még ma is el fordul, hogy bizonyos állatokat megfert znek kórokozókka, és a vérükben pedig termel dik az ellenanyag.
2. Csirkeembrióban (tojásban). Az influenza vakcinák el állításának gyakori módja ez. Különlegesen steril tojásokban szaporítják a vírusokat, majd leszívják a megfelelő folyadékokat és inaktiválják.
3. Attenuált baktérium fermentációval. Az attenuált szó azt jelenti, hogy legyengített baktériumok fermentációja.
4. Rekombináns fehérjék el állítása baktérium fermentációval. Azonos a korábban említett alegység vakcina gyártással.
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével. Ez az eddigiekhez képest teljesen új forma. Eddig nem volt szó arról, hogy állati sejteket is lehet szaporítani. Ez egy külön területe a biotechnológiának, eltér a normál fermentációtól. A következő el adáson részletesen tárgyaljuk
6. Rekombináns fehérjék el állítása állati sejtek tenyésztésével.

Ezek az általános el állítási lehet ségek voltak, ezek közül részletesen a rekombináns fehérje vakcinákat tárgyaljuk.

**A rekombináns fehérje vakcinák**

Alegység fehérje vakcinát hoznak létre. Ennek a lépései a következők:

1. A kórokozóból ki kell szedni azt a gént, amelyik azt a felületi fehérjét kódolja. Tehát, ha kórokozóról van szó, akkor az általában mikroorganizmus, melynek a DNS-e sokkal kisebb, mint egy emberi sejté.
2. Génmanipulációval bevinni (vektorok) egy jól kezelhet gazdaszervezetbe, expresszálni (ki is fejez djön a gén, bemegy a gén és m ködik is)
3. Fermentációval el állítani a fehérjét.
4. Feldolgozás: El ször el kell dönteni, hogy a fehérje az extra celluláris vagy intracelluláris.
  - sejtek elválasztása
  - Intracelluláris esetben sejtfeltárás
  - Fehérje tisztítási lépések

**Esettanulmány-1: Hepatitis B vírusbetegség vakcinája**

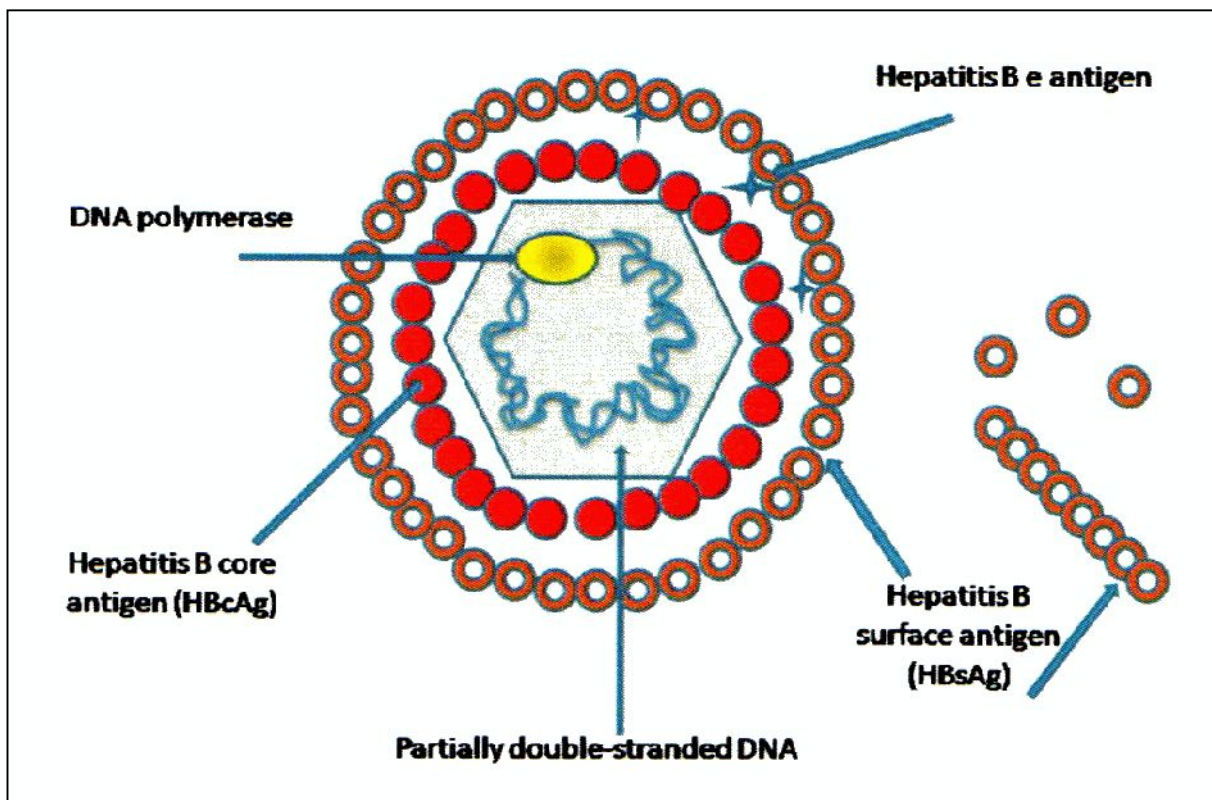
A hepatitis azt jelenti, hogy májgyulladás. Vírusos májgyulladás, melynek különböz típusai vannak (A, B,C, E, F, G), de az A B C azok, melyek a leggyakoribbak. Mindegyik májgyulladást okoz, de mások. A hepatitis A az széklettel terjed. A hepatitis A egy gyors

lefolyású betegség, hamar gyógyítható, nagyon legyengült szervezeteknél okoz problémát. Az egészséges ember 1 hónap alatt különösebb következmények nélkül meggyógyul belőle.

A hepatitis B ennél keményebb, ezen is túl lehet lenni, de ez hónapokig tart. Krónikus is lehet, évekig is elhúzódhat és az esetek bizonyos százalékában tartós májkárosodást okoz. Kis százalékban májrákot is okozhat.

Ez a betegség ez testnedvekkel terjed, vérrel, és egyéb váladékokkal. Személyes érintkezéssel. A vírus lappangási ideje több hónapig tart. A májat pusztítja el. A májsejteket támadja meg. A megtámadás után a májsejtekből kiszabadult vírusok a vérbe kerülnek és így vérrel terjed a betegség.

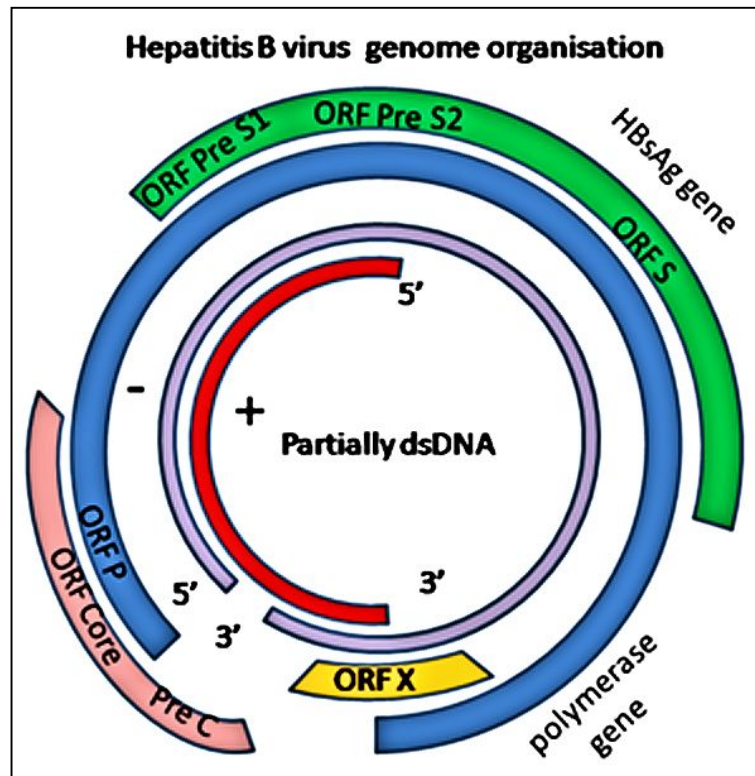
Amikor a víruszaporodásról volt szó, elhangzott, hogy a vírusok összeépülésénél sok a selejt, a tokfehérjék egy része „kimarad”. Amikor szétesik a májsejt akkor nagyon sok tokfehérje, burokkfehérje is kiszabadul és kering a vérben. Ezek a mérete lényegesen kisebb, mint a teljes vírusé, tehát megfelelő szűrővel ezeket ki lehet válogatni a vérből. A fehérjék a betegek véréből kimutathatók és izolálhatóak, így készültek a legelső hepatitis B vakcinák is.



26. ábra: A Hepatitis B vírus felépítése

Ismét azt a felépítést láthatjuk, hogy középen van a nukleinsav és körülötte valamilyen burokk, tok, borítás alakul ki. Tulajdonképpen összesen 3féle fehérjéről van szó. Ami a felületén van pirossal jelölve az a HBs (s=surface). A következő, ami már kristályos szerkezetet mutat a HBc (c=core). A HBe (e=endo). Tehát 3féle antigénje van a vírusnak: a felületi, a belső és az endo.

A Hepatitis B vírusban a DNS csak részben kettős szálú, van ahol szimpla szálú. A „-” szál (kodogén) 3200 nukleotid a „+” szál ennek csak 55-75%-a.



27. ábra: A Hepatitis DNS-e

A képen késsel láthatjuk a core antigént, pirossal a surface antigént. A HBV DNS két szála nem egyforma hosszú. Itt is láthatjuk a két Pre, azaz bevezető szakasz, ami a későbbiekben lehasad róla. A HBsAg fehérje az 226 aminosav, lipoprotein, ez a kívánt termék.

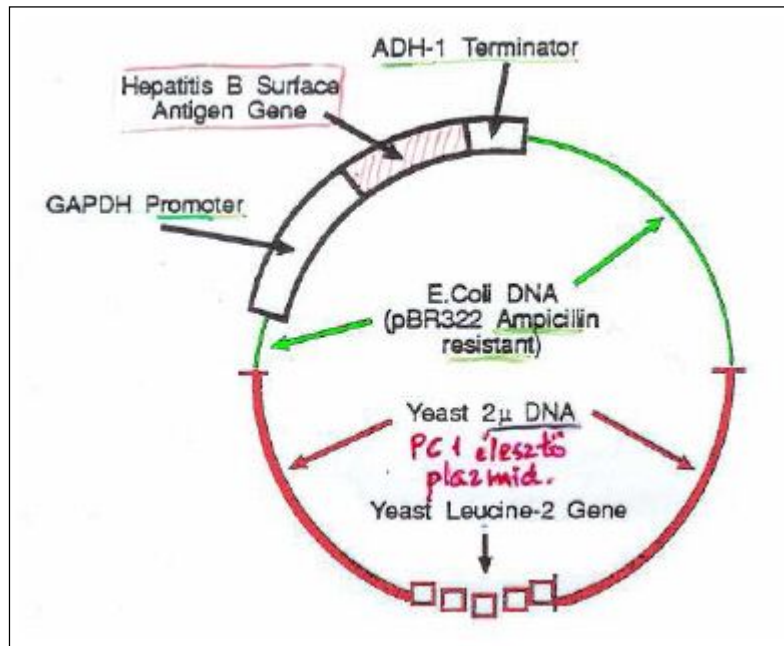
A felületi antigén génjét először *E. coli*-ba plazmiddal klónozták, termelte is, de nem-glikolizált formában (a *coli* nem tudta rárakni a cukrokat), nem alakult ki az aktív folding, ez azt jelenti, hogy nem alakult ki a molekula aktív harmadlagos szerkezete.

További megoldásokat, eukarióta gazdászervezeteket kellett keresni. Sikeresen klónozták a gént először élesztőbe, majd emlős sejtekbe. Az élesztő glikozilálta, de a sejten belül tartotta a fehérjét (intracelluláris termék), míg az emlős sejtek kiválasztották a lében a megfelelően glikozilált fehérjét (extracelluláris termék).

Mindkét fehérje engedélyezett, aktív vakcina, piaci termék. Az élesztő technológia olcsóbb és biztonságosabb (onkogének, vírusok előfordulása kizárt). Az emlős sejtenyészetekben minden ellenkezés után is előfordulhatnak olyan lappangó vírusok, melyek az emberekre is veszélyesek lehetnek.

Maga a gén az *E. coli* pBR322-es antibiotikum rezisztens plazmidjába volt beépítve (az ábrán a zölddel jelölt felső rész). A célgén promóter és terminátor szakasz (együttesen: expressziós kazetta) fogja közre. Ez így nem működik az élesztőben, ezért egy ingázó vektort kellett kialakítani, ami a *coli*-ban és élesztőben is tud szaporodni. Egyesíteni kell egy élesztő plazmiddal (PC1, az ábrán pirossal jelölve). Ebben van az élesztőben működő replikációs origó, ami lehetővé teszi, hogy ott is szaporodjon. Markergénként a leucin (aminosav) bioszinté-

zis egy lépésének enzimét kódoló gén szerepel, ami akkor biztosít szelektív növekedést, ha az élesztő gazdasejt leucinra hiánymutáns.



28. ábra: Az ingázó vektor szerkezete

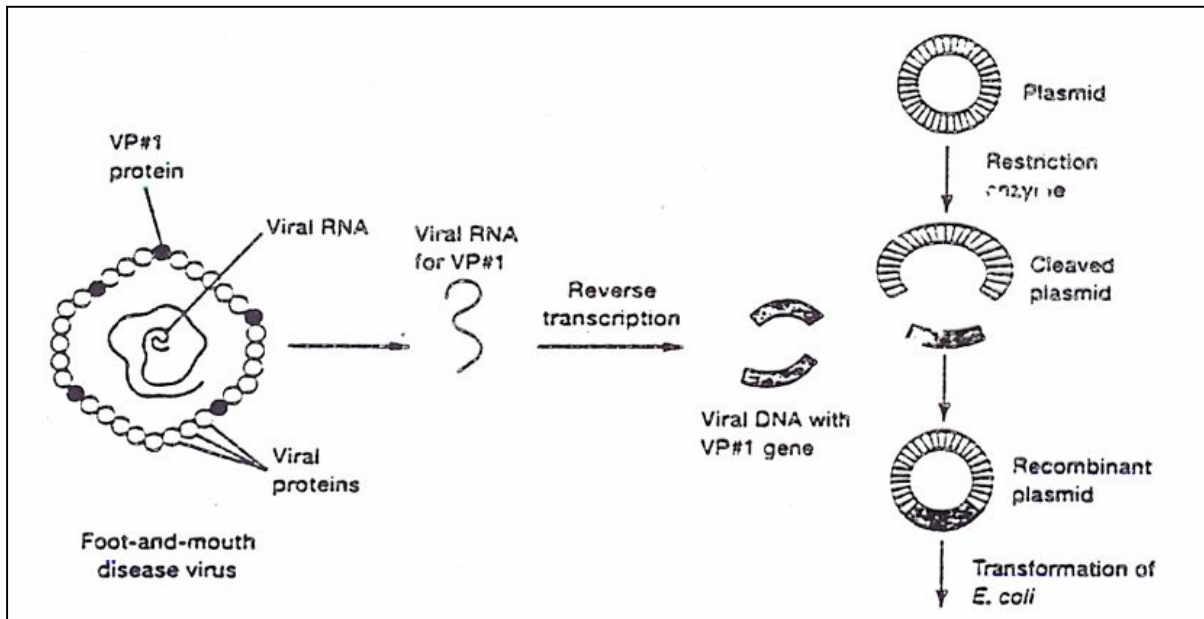
**Technológia:** szakaszos élesztő fermentáció. Az első, szaporítási fázisban Leu-mentes tápoldatban nevelik a tenyészetet – ekkor azok a sejtek szaporodnak gyorsabban, amelyekben sok plazmid van, ezek tudnak sok leucint termelni a fehérje szintézishez. A második fázisban komplex, fehérje hidrolizátumot tartalmazó tápoldatot adnak, az ebben lévő sok aminosav el segíti a termék fehérje bioszintézisét.

**Feldolgozás:** a fermentáció végén a sejteket centrifugálással elválasztják a leucintól, az antigén fehérje a sejtekben maradt. A sejtek feltárása (roncsolása) következik. A kapott kvaccsból több tisztítási lépéssel nyerik ki a célfehérjét.

A **termék ellenőrzése:** sokféle analitikai vizsgálatot végeznek, a fő célok a hatásosság és a tisztaság ellenőrzése. A hatásosságot tökéletesen csak élő állatokon lehet bizonyítani, de ezt érthető állatvédelmi okokból nagyon korlátozottan alkalmazzák. Ehelyett inkább a termelt antigént laboratóriumi körülmények között antitestekkel hozzák össze, és immunreakciójuk erősségét vizsgálják. A tisztaság vizsgálata kiterjed a mikrobamentességre, más fehérjék jelenlétére, így a baktériumok által termelt toxinokra is. Speciális esete a toxinoknak a pirogének csoportja, ezek lázat okoznak. Különösen szigorúak az előírások a plazmid és más DNS jelenlétére. A határ pikogram/liter nagyságrendben van! (1 pikogram =  $10^{-12}$  g, a gramm milliomod részének milliomod része.) Ehhez nagyon-nagyon érzékeny analitikai módszereket kellett kifejleszteni.

## Esettanulmány-2: Száj- és körömfájás (alegység)vakcina

Az SZKF a kér dz állatok er sen fert z megbetegedése, az állatok leromlásával, kis százalékban elhullásával jár. Gazdaságilag is veszélyes, mert ha egy eset is el fordul, akkor



zárlatot rendelnek el, és a fél országból nem lehet sem szállítani, sem eladni egyetlen vágóálatot sem legalább egy fél évig. Fontossága miatt ez volt az első rekombináns fehérje vakcina az állategészségügyben. Tudományos érdekessége, hogy ez egy RNS vírus. A génmanipuláció első lépése tehát, hogy a vírus RNS-ből kell állítani a megfelelő DNS-t, és csak ezután kezdetjük meg a vektorba építést.

Az alegység vakcina kifejeződik *E. coli*-ban, de egyrészt intracelluláris, azaz a sejten belül marad, másrészt kicsapódik a citoplazmában, ún. zárványtestet képez. Emiatt a fehérje kinyerése bonyolultabb, több lépésből áll. A sejtek feltárása után a zárványokat el kell különíteni, és különleges oldószerben fel kell oldani. A feloldott fehérje még nem „érett”, nem vette fel megfelelő háromdimenziós formáját, ez a „hajtogatás” újabb technológiai lépés. Mindemellett a szokásos fehérje tisztítási mveleteket is végrehajtják.

