

4.3. FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA GÉNMANIPULÁLT MIKROORGANIZMUSOKKAL

A biotechnológiai ipar termékei:

- 4.1. Elsődleges anyagcseretermékek
- 4.2. Másodlagos anyagcseretermékek
- 4.3. FEHÉRJÉK, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén terméke.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1. Inzulin

Az inzulin emlőshormon; ez volt első rekombináns módszerrel előállított fehérje. A gyógyászati célra történő humán inzulin éves termelése eléri a 2 tonnát. Az inzulint a hasnyálmirigy (pancreas) Langerhans-szigetei termelik. Antagonista párja a glukagon, a két hormon együtt biztosítja a vércukorszint megfelelő szabályozását. Az inzulint először 1922-ben izolálták kutya pancreasból. Az aminosavszekvencia meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.

Nélkülözhetetlen a cukorbetegség számára.

Diabetes: cukor anyagcsere zavar, megemelkedik a vércukorszint.

Inzulin: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás



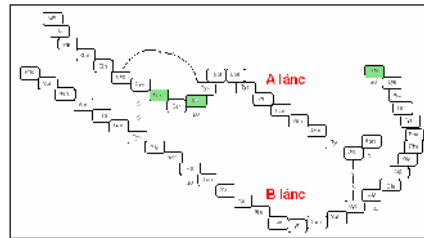
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Inzulin szerkezete

Két aminosavláncból áll (21 + 30 aminosav), ezeket két diszulfid híd köti össze és egy stabilizálja.

A humán, marha és sertés inzulin között csak néhány aminosav a különbség:



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

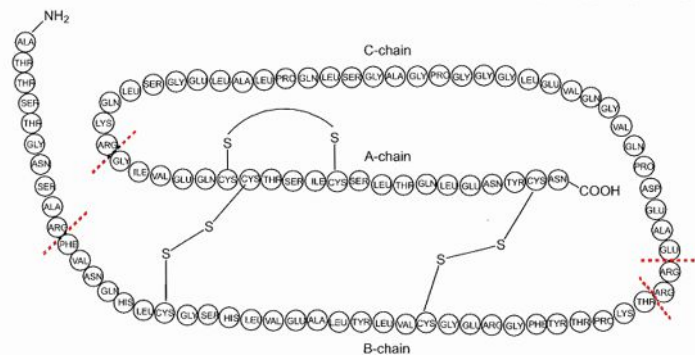


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Az inzulin bioszintézise

Az inzulin egy fehérjeláncként keletkezik (pre-pro-Arg inzulin), ebből három hasítással és két Arg eltávolításával alakul ki a szerkezete.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

AZ INZULIN EL ÁLLÍTÁSA

1. Kémiai szintézis aminosavakból – nem gazdaságos
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyb I és átalakítás humán inzulinná
3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
 - Az A és B lánc termelése külön-külön *E. coli*-val, majd összekapcsolás
 - pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, majd átalakítása
 - Pre-pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, hasítások
 - Pro-inzulin fermentáció *S. cerevisiae*-vel, átalakítás



Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyjtött hasnyálmirigyb I extrahálják az sertés inzulint.

- nincs elég bel le
- az egy aminosav különbség hosszú távon allergiát okozhat

Ezért inkább átalakítják, lecserélik a láncvégi alanint.

A tripszin szintén a hasnyálmirigyb I nyerhet peptidáz, ami a bázikus aminosavak (Arg, Lys) melletti peptidkötést bontja → lecsípi a láncvégi alanint.

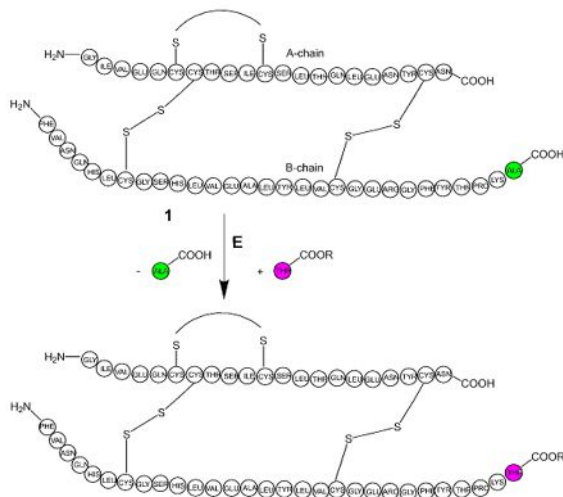
Egyensúlyi folyamat, visszafelé is megy, a lizinre ráköthet egy aminosavat.

Ha nagy fölöslegben treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserél dik treoninra.

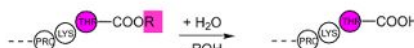
A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.



Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás



A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Inzulin fermentációs el állítása

Prokariótákkal is megoldható, mert:

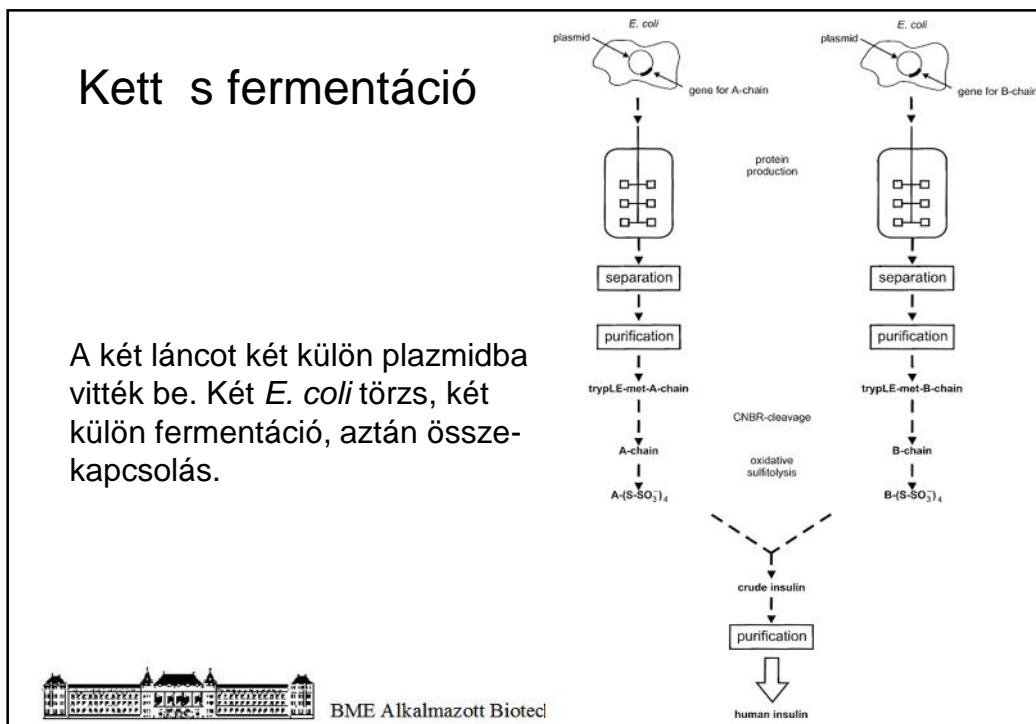
Viszonylag rövid láncok, nincs glikozilezés, metilezés, de:
két lánc, három diszulfid híd – nehéz jól összepárosítani

- megoldották a két lánc külön-külön bevitelét és fermentációját, majd összekapcsolását is
- és az egészet egyben is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8



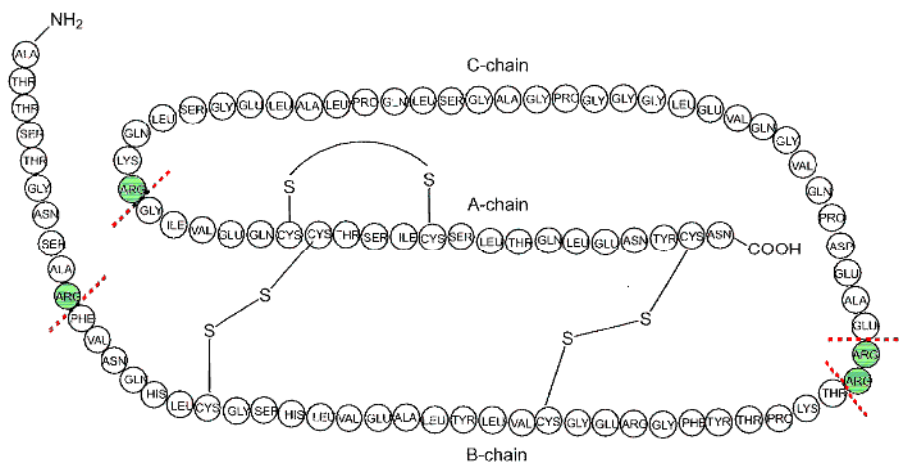
Inzulin fermentációs előállítása

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba, de a utána a lánc hasítása bonyolultabb (két enzim lépés):

1. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
2. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)



A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

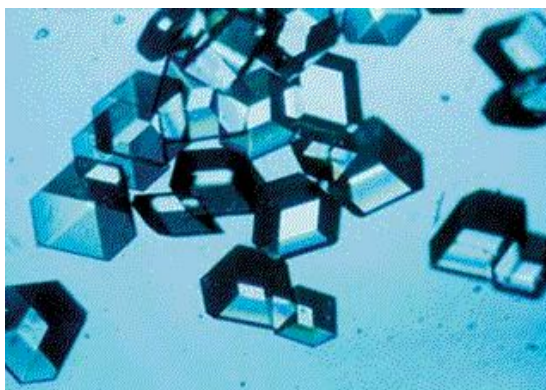


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Inzulin feldolgozás

1. Gélkromatográfia (kis molekulák elválasztása)
2. Ioncsere kromatográfia,
3. Kristályosítás: Zn ionnal.
Így stabil, tárolható.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

VAKCINAGYÁRTÁS

A fertőző betegségek (bakteriális vagy vírusos) elleni immunvédekezésben részt vevő fehérjék el állítása.

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



VAKCINAGYÁRTÁS

Az immunválaszt kiváltó anyag jellege szerint a vakcina lehet:

1. Élő, attenuált (legyengített, már nem virulens) kórokozó baktérium: pl. BCG = bacille Calmette Guérin, a *Mycobacterium tuberculosis* avirulens, immunogén törzse
vírusok: mumpsz, kanyaró
2. Elölt, inaktivált kórokozó. Nem szaporodó, nem fertőzőképes, de fehérjéi immunogének maradtak.
3. Alegység- (subunit) vakcina: az egész kórokozó helyett csak egy-két jellegzetes immunogén fehérjét viszünk be. Biztonságosabb, mert nincs benne DNS.



VAKCINAGYÁRTÁS

Technológiai szempontból több eltér gyártási mód létezik:

1. Emlős állatokban (nyulak, kutyák, disznók, lovak)
2. Csirkeembrióban (tojásban)
3. Attenuált baktérium fermentációval (szubmerz, aerob tenyésztés)
4. Rekombináns fehérjék el állítása baktérium fermentációval
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével
6. Rekombináns fehérjék el állítása állati sejtek tenyésztésével



REKOMBINÁNS FEHÉRJE VAKCINÁK

1. Izolálni, esetleg szintetizálni az antigén fehérjét kódoló gént.
2. Génmanipulációval bevinni egy jól kezelhető gazdaszervezetbe, expresszálni.
3. Fermentációval el állítani a fehérjét.
4. Feldolgozás: extracelluláris ↔ intracelluláris esetben
 - kíméletes sejtleválasztás
 - tisztítási lépések



HEPATITIS B VAKCINA

HBV – hepatitis B vírus – hatására a májsejtek pusztulnak, májgyulladás, elégtelenség, sárgaság, akut vagy krónikus májzsugor, esetleg carcinoma.

Világszinten a lakosság 5%-a fertőzött ~350 millió ember

Fertőzés átvitel: vérrel, szexuális úton

Lappangási idő: 1,5 – 3 hónap, ezalatt is vírusgazda

A vírus egységek a májsejtekben szintetizálódnak, a májsejtek szétesésével a vérbe kerülnek. A fehérjék a betegek véréből izolálhatók, szintetizálhatók – ez volt az első vakcina. → korlátozott mennyiség és veszélyes (vírusátvitel: HBV, HIV is!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

HEPATITIS B VAKCINA

HBV – hepatitis B vírus – 42 nm-es, háromféle antigénje van:

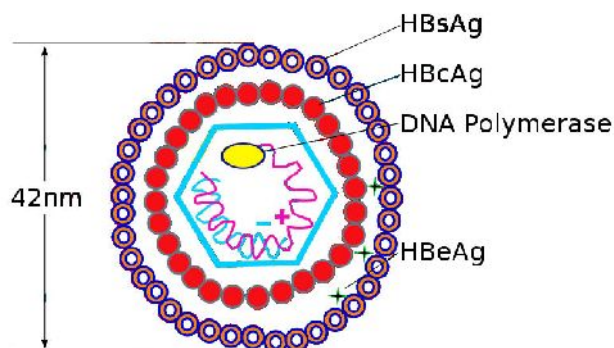
s – surface (felületi),

e – endo (belső),

c – core („mag”)

+ a DNS és a

DNS-polimeráz



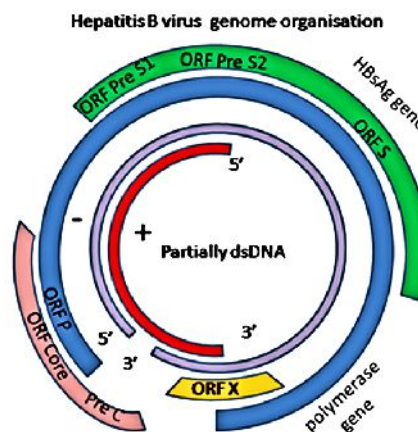
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

HEPATITIS B VAKCINA

A HBV DNS két szála nem egyforma hosszú: a - szál (kodogén) ~3200 nukleotid, a + szál ennek csak 55-75%-a.

A HBsAg fehérje 226 aminosav, lipoprotein, ezt klónozták.



HEPATITIS B VAKCINA

A felületi antigén génjét elször *E. coli* plazmidba klónozták, termelte is, de:

- nem glikozilált forma
- nem alakult ki az aktív folding

Bevitték

- éleszt be (intracelluláris, glikozilált)
- eml s sejtbe (extracelluláris, glikozilált)

Mindkett aktív vakcina, az éleszt s technológia olcsóbb és biztonságosabb (nincsenek onkogének, vírusok)



HEPATITIS B VAKCINA

Az élesztő be bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete:

Kétféle marker gén:

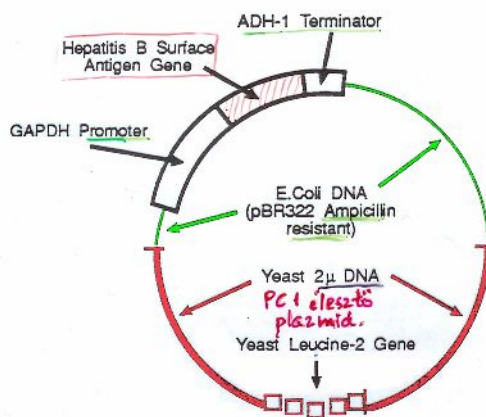
- ampicillin rezisztencia
- leucin-2 gén (az élesztő Leu⁻ mutáns)

Expressziós kazetta:

- konstitutív promóter
- az S fehérje génje
- terminátor

Két replikációs origó:

- egyik a coliban, a másik az élesztőben működik



HEPATITIS B VAKCINA

Technológia: szakaszos fermentáció

Plazmidtartalom növelése Leu-mentes tápoldattal

Azután termeltetés komplex tápoldaton

Feldolgozás:

Sejtek lecentrifugálása

Sejtfeltárás

...

Tisztítási lépések

...

Diszulfid hidak kialakítása kémiai reakcióval

...

Kiszerezési lépések



HEPATITIS B VAKCINA

A termék vizsgálata:

- Azonosítás: immunanalitika
- DNS tartalom: max 10 pikogram/l !!!
- Hatékonyság: állatokban
- Pirogének: nyúlfül (max. 0,5 fok 4 óra múlva, LAL teszt)
- Mikrobiális tisztaság
- Stabilitás: 2-3 év +4 fokon



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

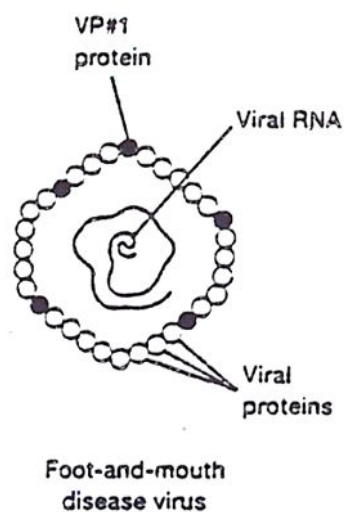
SZKF VAKCINA

SZKF = száj- és körömfájás vírus,
kérdés kre patogén

RNS vírus (reverz transzkriptáz)

Alegység (subunit) vakcina

Az első rec vakcina az állategészségügyben.

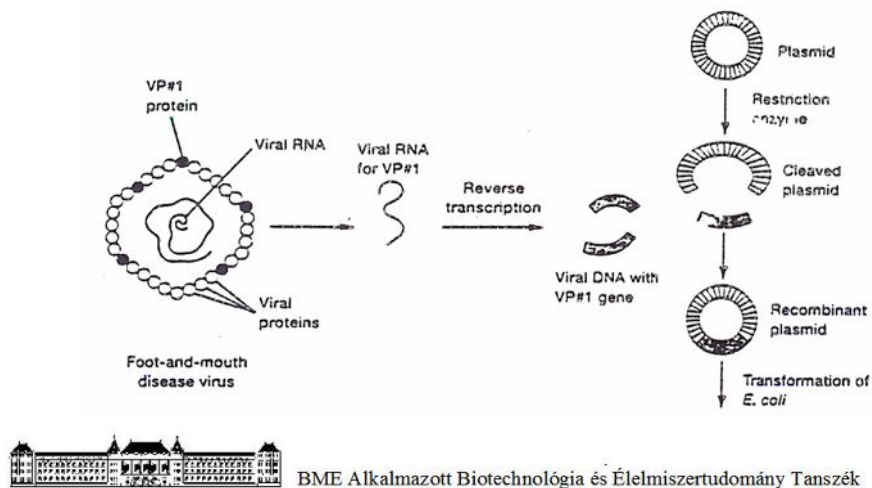


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

SZKF VAKCINA

Az SZKF burokfehérje gén klónozása *E. coli* plazmidba:



25

SZKF VAKCINA

Az SZKF burokfehérje gén klónozása *E. coli*-ba:

Kifejezik, de intracelluláris, és zárványtestet képez →

- Sejteltárás
- Szolubilizálás (feloldás)
- Folding („hajtogatás”)

után jöhet csak a szokásos tisztítás, feldolgozás

