

4.3. FEHÉRJÉK EL ÁLLÍTÁSA GÉNMANIPULÁLT MIKROORGANIZMUSOKKAL

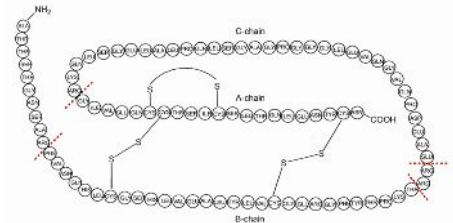
A biotechnológiai ipar termékei:

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



Az inzulín bioszintézise

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



1. Inzulín

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

Nélkülözhetetlen a cukorbetegség számára. Diabetes: cukor anyagcsere zavar, megemelkedik a vércukorszint. Inzulín: kettős peptidlánc, per os nem adható, mert lebomlana → injekció, vagy inhalálás



AZ INZULIN EL ÁLLÍTÁSA

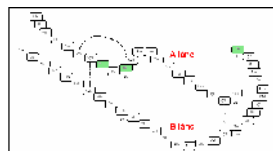
1. Kémiai szintézis aminosavakból – nem gazdaságos
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná
3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
 - Az A és B lánc termelése külön-külön *E. coli*-val, majd összekapcsolás
 - pro-inzulín fermentációja *E. coli*-val, majd átalakítása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



Inzulín szerkezete

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

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



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



Kivonás hasnyálmirigyből I - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből I extrahálják az sertés inzulint.

- nincs elég belőle
- az egy aminosav különbség hosszú távon allergiát okozhat

Ezért inkább átalakítják, lecserélik a láncvégi alanint.

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

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

Ha nagy fölőslégen treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.



Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:

7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin fermentációs el állítása

Az egész lánc el állítása 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 enzimes 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)

10

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kett s fermentáció

A két láncot két külön plazmidba vitték be. Két *E. coli* törzs, két külön fermentáció, aztán összekapcsolás.

9

BME Alkalmazott Biotech

Inzulin feldolgozás

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

12

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

VAKCINAGYÁRTÁS

A fert z betegségek (bakteriális vagy vírusos) elleni immunvédekezésben részt vev fehérjék el állítása.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

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 sejtelválasztás
 - tisztítási lépések



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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. Előlt, inaktivált kórokozó. Nem szaporodik, 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

HEPATITIS B VAKCINA

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

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

Fertőzés átvitele: vérrel, tővel, 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 kimutathatók, szintetizálhatók – ez volt az első vakcina. → korlátozott mennyiség és veszélyes (vírusátvitel: HBV, HIV is!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

VAKCINAGYÁRTÁS

Technológiai szempontból több eltérő 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

HEPATITIS B VAKCINA

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

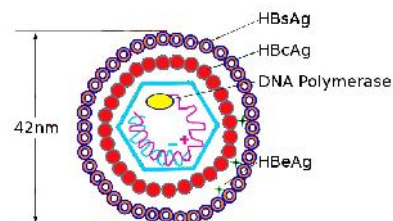
s – surface (felületi),

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 virus genome organisation

19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

Technológia: szakaszos fermentáció
Plazmidtartalom növelése Leu-mentes táppalattal
Azután termeltetés komplex táppalattal

Feldolgozás:
Sejtek lecentrifugálása
Sejtfeltárás
...
Tisztítási lépések
...
Diszulfid hidak kialakítása kémiai reakcióval
...
Kiszereleési lépések

22

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

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

- nem glikozilált forma
- nem alakult ki az aktív folding

Bevitték

- élesztőbe (intracelluláris, glikozilált)
- emlősejtbe (extracelluláris, glikozilált)

Mindkettő aktív vakcina, az élesztős technológia olcsóbb és biztonságosabb (nincsenek onkogének, vírusok)

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

A termék vizsgálata:

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

23

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

Az élesztőbe 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

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

SZKF VAKCINA

SZKF = száj- és körömfájás vírus, kérdőjeles krepatogén

RNS vírus (reverz transzkriptáz)

Alegység (subunit) vakcina

Az első rekombináns vakcina az állategészségügyben.

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

