

5'... GGATCC ... 3' **BamHI**  
 3'... CCTAGG ... 5' **hasítóhely**

5'... CATATG ... 3' **NdeI**  
 3'... GTATAC ... 5' **hasítóhely**

PCR

- A primerek végére restriktációs enzim hasító helyeket tervezünk.
- Ezek „fogantyúként” fognak szolgálni a vektorba való beillesztéshez.
- A felnyitott vektoron a primerek végeivel komplementer „fogantyú” lesznek megtalálhatóak, ha ugyanazzal a két restriktációs enzimmel hasítottunk ki belőle egy DNS darabot.

**BamHI**

**NdeI**



DNA Purification

Digestion with Flexi® Enzyme Blend

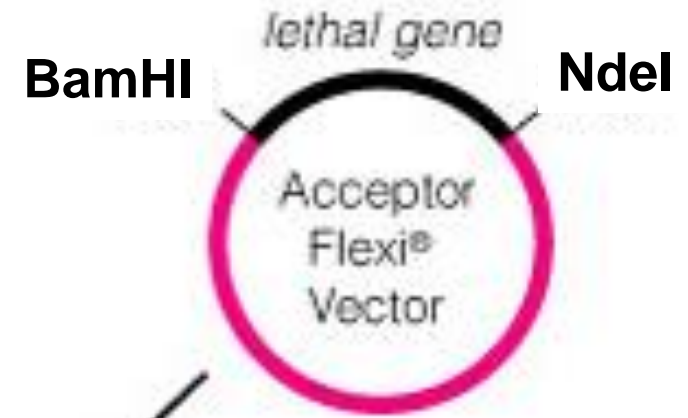
DNA Purification

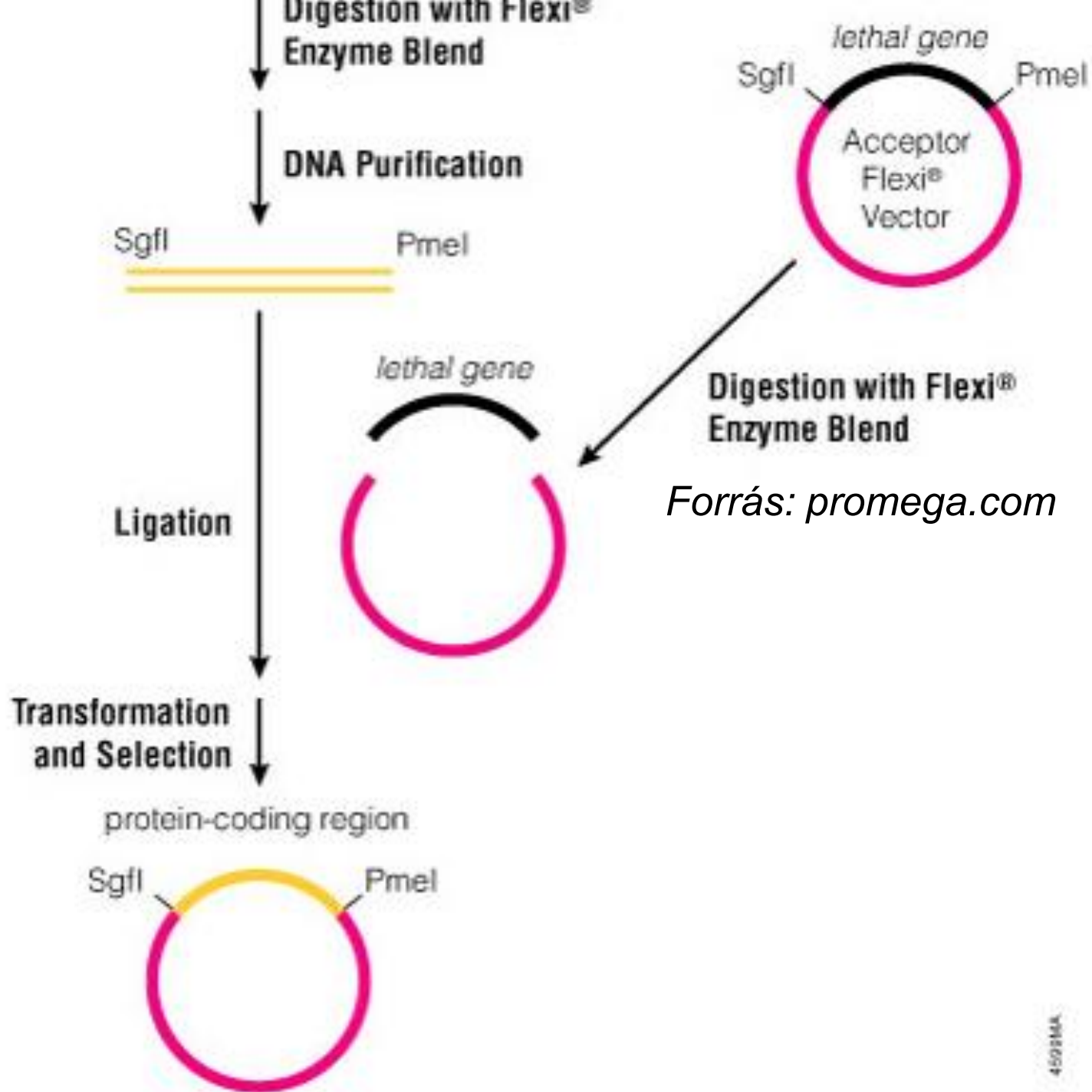
**BamHI**

**NdeI**

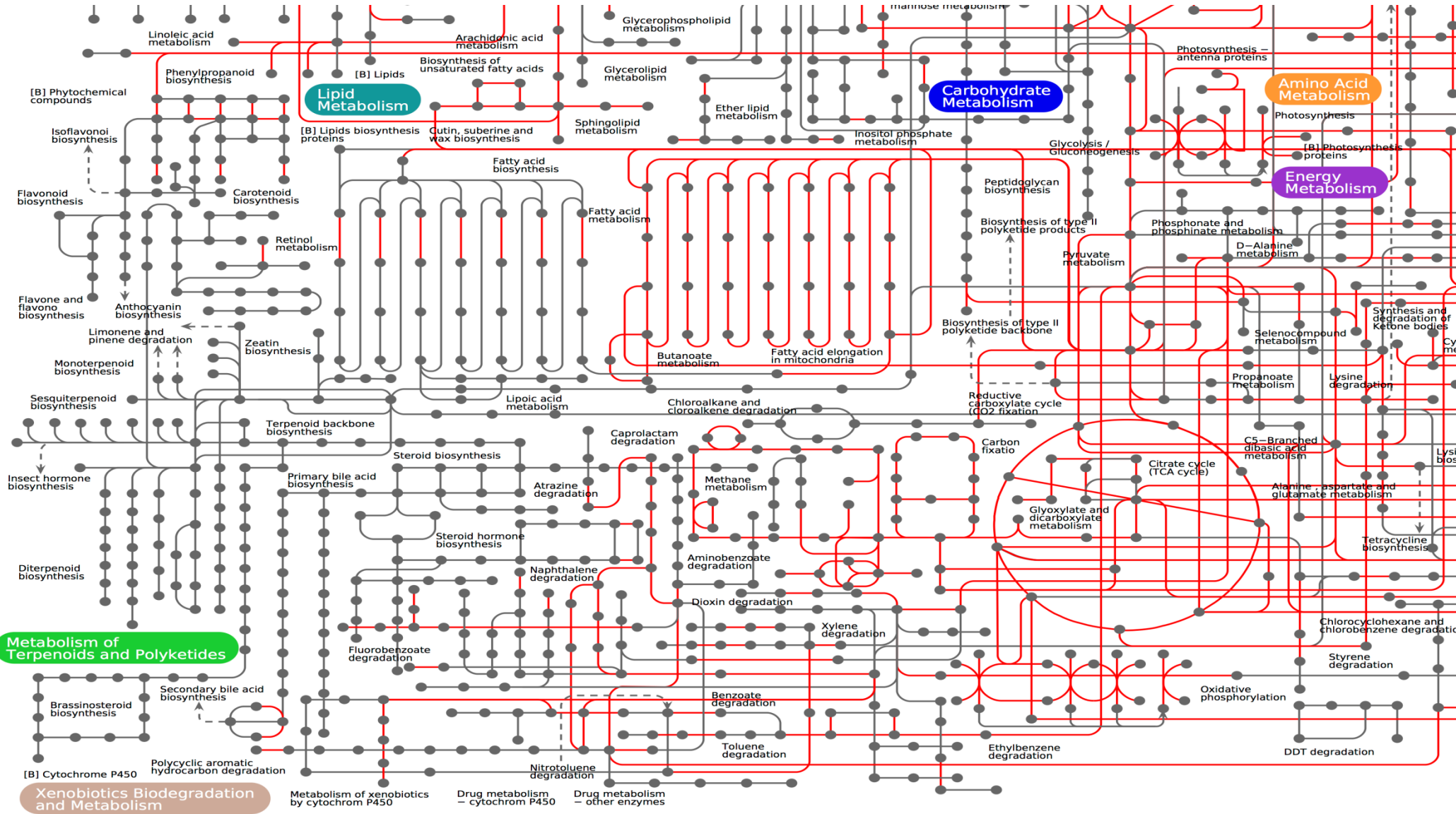


*Miért két enzimmel hasítunk?*





- A biokémiai anyagcsere utak bonyolult reakcióhálózatokat alkotnak.
- Célszerű a biotechnológiai termékeket az anyagcsere jellege szerint megkülönböztetni. ➔



# 4. GÉNMANIPULÁLT MIKRO-ORGANIZMUSOK

A biotechnológiai ipar termékei:

- **Elsődleges anyagcsere-termékek**

Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez

- **Másodlagos anyagcsere-termékek**

Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energia-termeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvezőtlen körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására indul be. A termék molekulának nincs közvetlen haszna.

- **„Idegen” (rekombináns) fehérjék**, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén(ek) termékei.



# 4.1. Elsődleges anyagcseretermékek: pl.: triptofán

*Közvetlenül kapcsolódnak a sejt növekedéséhez vagy energiatermeléséhez. Az elsődleges anyagcsere termékre magának a mikróbának is szüksége van, csak nem „ipari” mennyiségben.*

Bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel.

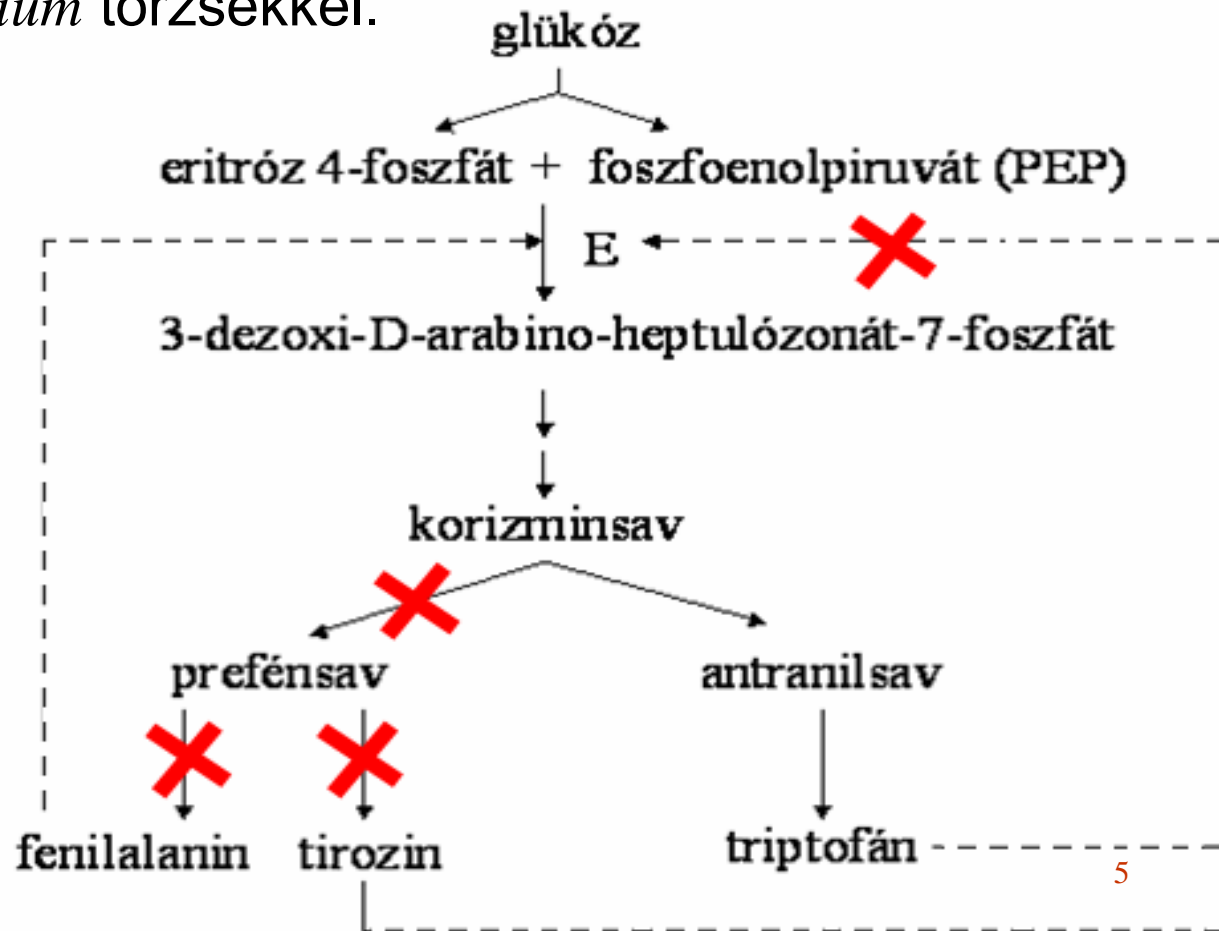
Anyagcsere-mérnöki szelekció ipari mennyiség termeléséhez:

Auxotrófiák:

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

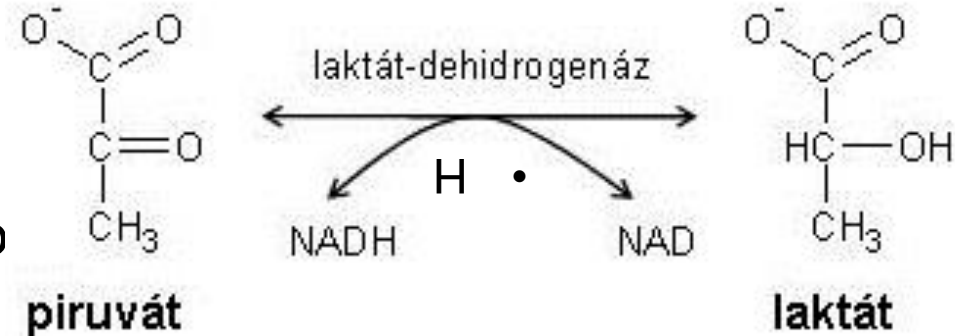
Rezisztencia:

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



# Másodlagos anyagcsere termékek

- Termelődésük nem kapcsolódik közvetlenül a sejt energiatermeléséhez vagy növekedéséhez,
- csak **kedvezőtlen körülmények hatására** indul be.
- Nem a termék a fontos a sejt számára,
- hanem a képződéséhez vezető reakció
- Ezek révén tud a sejt valamilyen, számára nem optimális anyagot átalakítani vagy attól megszabadulni.



*Példa az emberi sejteknél: tejsav termelés megfeszített izommunka mellett. A tejsav azért képződik, mert O<sub>2</sub> hiányában a sejt nem képes megfelelő mennyiségben a mitokondrium elektron transzport láncának átadni az elektronokat, így ezek ebben a formában „tárolódnak”.*



## 4.2. Másodlagos anyagcsere-termékek: például színyanyagok vagy antibiotikumok

*Az antibiotikumok bizonyos fokig hasznosak a sejt számára, de ezek sem termelődnek „fölöslegesen”, a mikroba számára optimális élethelyzetben.*

**Antibiotikumok:** mikroorganizmusok által termelt szekunder metabolitok, melyek más mikroorganizmusokat elpusztítanak vagy gátolják fejlődésüket.

Alkalmazásuk:

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)

Rákellenes antibiotikumok: citosztatikus hatásúak, a kemoterápia eszközei

Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány-adalékként

<http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>



# Egy kis történelem

**Fermentáció:** szerves (táp)anyagok enzimekkel vagy mikróbákkal történő átalakítása.



- 1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemín)
- 1912 - Salvarsan, szerves arzén származék, vérbaj ellen, (Ehrlich-Hata, eleinte káros hatás a központi idegrendszerre)
- 1936 - Szulfonamidok (p-amino-szulfonsav-amidok), Domagk
- 1929 - penicillin észlelése, Fleming
- 1944 - a penicillin ipari gyártása (hadi anyag)
- 1944 - 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka
- 1950 - félszintetikus származékok (**fermentáció** után kémiai reakció)
- 1990 - nincsenek új molekulák, a **szabadalmak** lejártak → generikus terméké váltak, verseny a piacon.

**Gyógyszeripari szabadalom:** 20 vagy 25 év egy hatóanyagra.

**Originális** vs. **generikus** készítmények.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék





# Antibiotikumok

*Miért kevés az új antibiotikus molekula?*

Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikus). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

Miért ilyen kevés?

- toxicitás
- nem elég hatásos, van nála jobb
- mellékhatások
- rezisztencia

**Rezisztencia:** lehet állandó vagy szerzett (pl. plazmid felvételével vagy bakteriofág fertőzéssel).

Vannak **multirezisztens törzsek** is (pl. *M. tuberculosis*, *S. aureus*)



# Példa: penicillin (csoport)

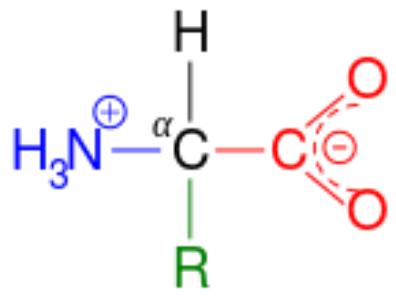
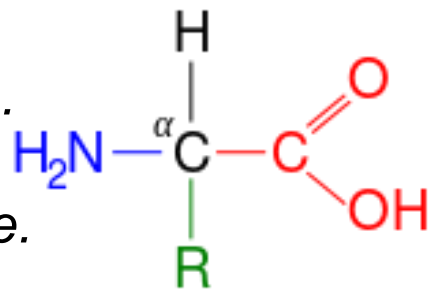
①

②

Jobbra: aminosavak általános szerkezete.

Forrás: Tim Vickers, Yassine Mrabet, Wikipedia.

Lent: 6-aminopenicillánsav általános szerkezete.



Szerkezet: alapváz: 6-amino-penicillánsav két aminosavból tevődik össze, cisztein + valin

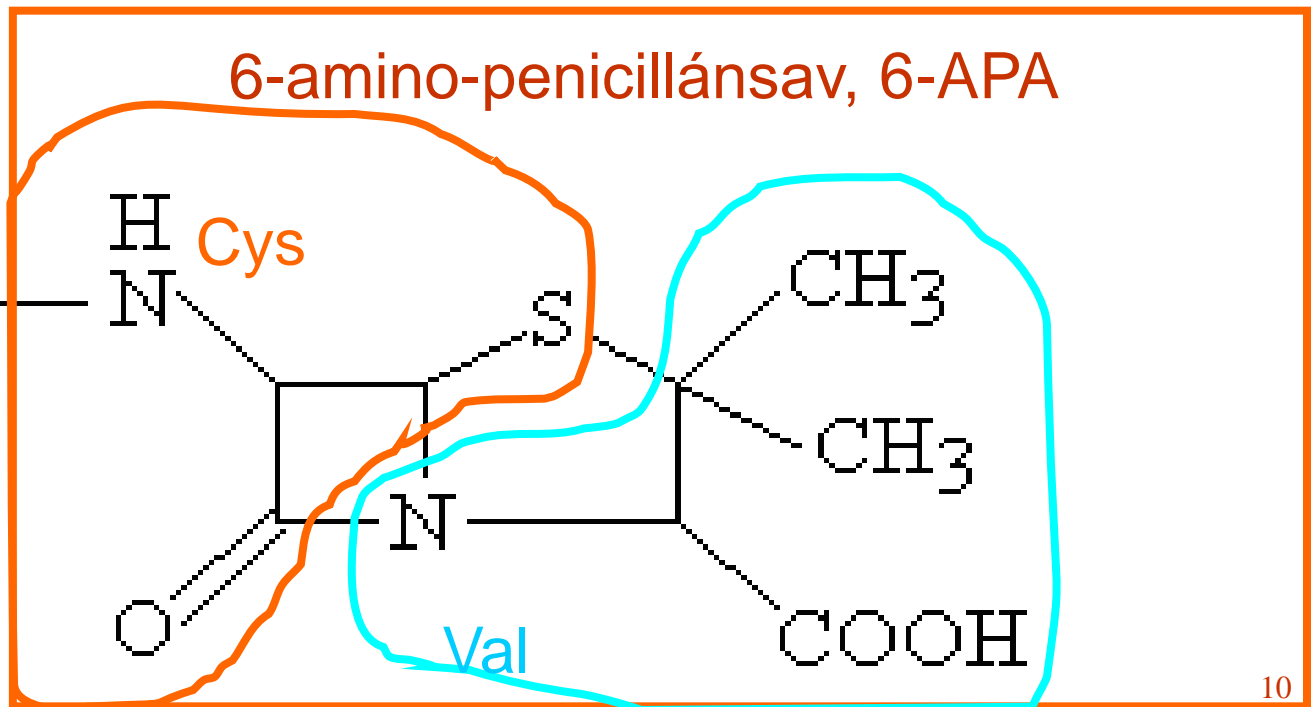
Az aminosavak egymással összekapcsolódva (*peptid kötés*) hozzák létre a fehérje láncokat.

R = bármilyen csoport.

Ebben különböznek egymástól a penicillin molekulák.

Cys = cisztein  
Val = valin

Ez 2 aminosav a 20 fehérjealkotó közül.



# A penicillin tulajdonságai

**BOMLÉKONY!** Savak, lúgok és enzimek hatására többféle reakcióban is gyorsan bomlik – a gyomorsavtól is meg kell védeni.

Az R oldallánc lecserélésével tudtak **savtűrő penicillint** létrehozni. Bélben oldódó kapszulákba csomagolták, ami megvédi a gyomorsavtól.

Mennyiségét nem súlyra mérik, hanem az **antibiotikus hatását**:

1 biológiai egység: 50 ml-nyi standard összetételű tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását.

1 IU = 0,6 µg G-penicillin Na sónak felel meg.



# G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc eredetileg a fenil-ecetsav.

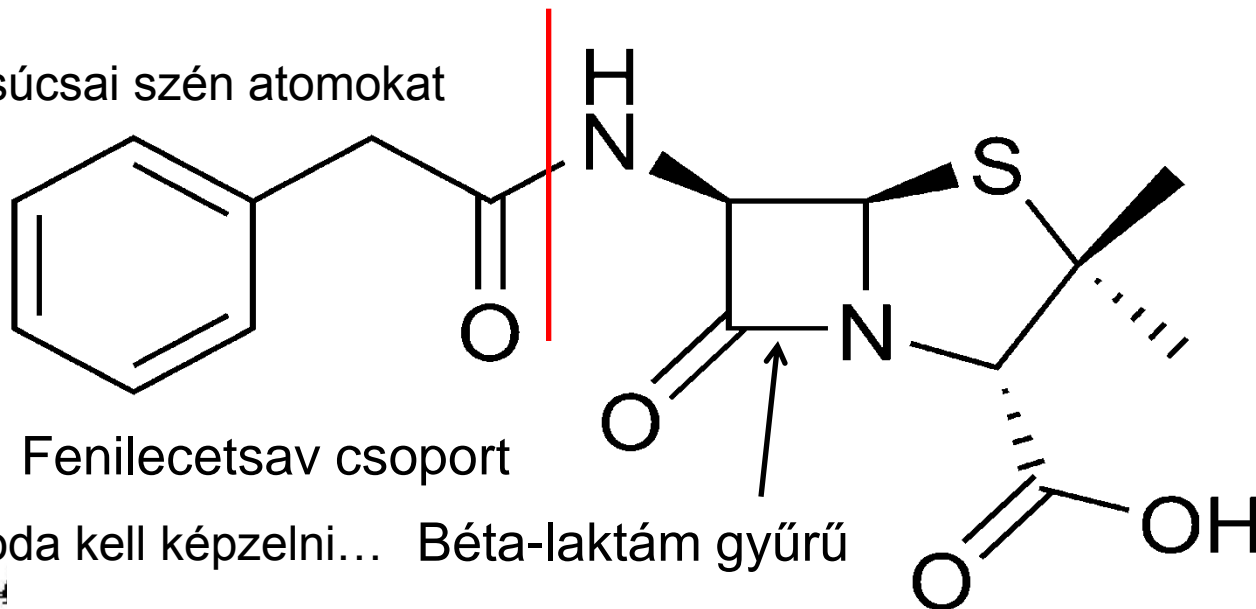
A G-penicillin a fermentált alapmolekula (ezt csinálja a penész), ebből gyártják a többit.

Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak injekcióban adták.

Megj.: a „gráf” csúcsai szén atomokat jelölnek.

A szénen lehet hidrogén úgy, hogy a szén mindig 4 vegyértékű kell, hogy legyen.

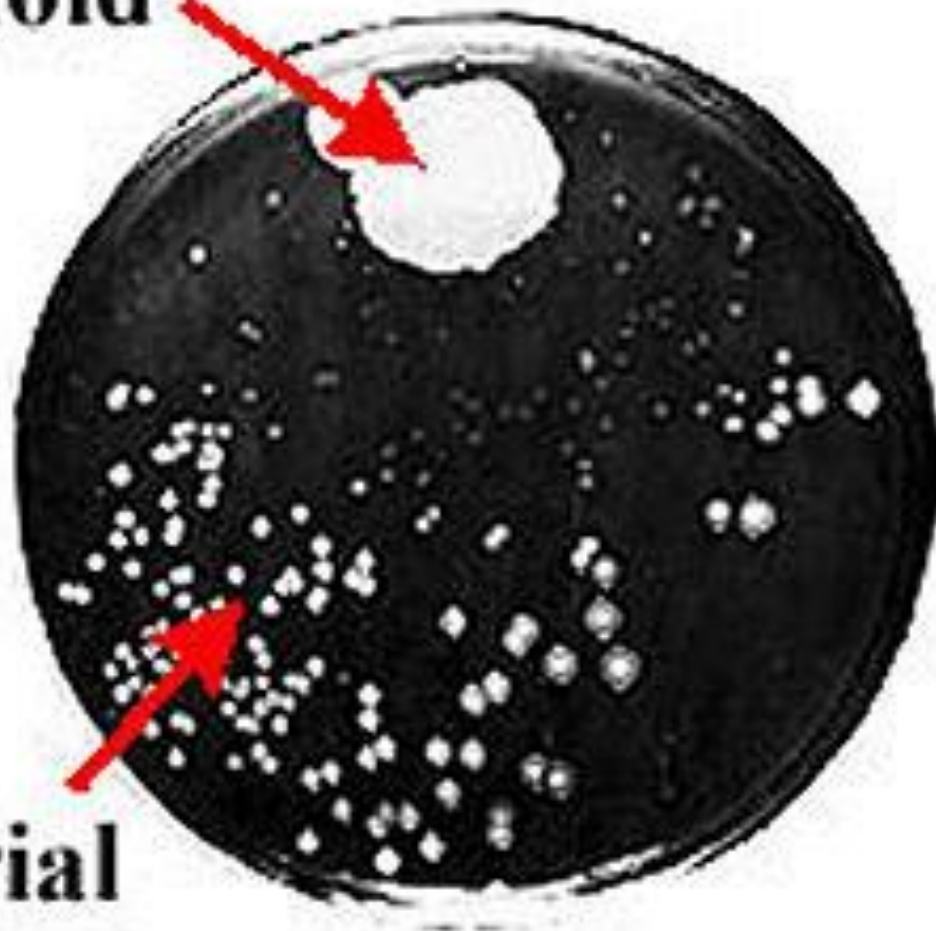
A hidrogéneket oda kell képzelni... Béta-laktám gyűrű



# *Fleming's original plate:*

1929 A. Fleming, k  
Izolálás, tisztítás, sze  
1940 hadianyaggá v  
1943 klinikai kipróbál  
*Penicillium chrysoge*  
1944 2,5 tonna  
szubmerz tenyészet,  
1946 32 tonna  
1952 Magyarország  
1980 kb. 30.000 tonn  
2000 ~ 100.000 tonn

**mold**



**bacterial  
colonies**



# A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, mert a kémiai szintézis nem gazdaságos.

A technológia fejlesztése két fő irányban mehet:

Törzsmunka (biológia):

- törzsizolálás
- indukált mutáció
- szelekció
- törzsfenntartás

Technológia (mérnöki):

- Felületi/szubmerz
- Prekurzorok (4-8 x)
- Tápoldatoptimalálás  
(cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Levegőztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)

*Ezek optimalizálási feladatok...*



# Törzsnemesítés

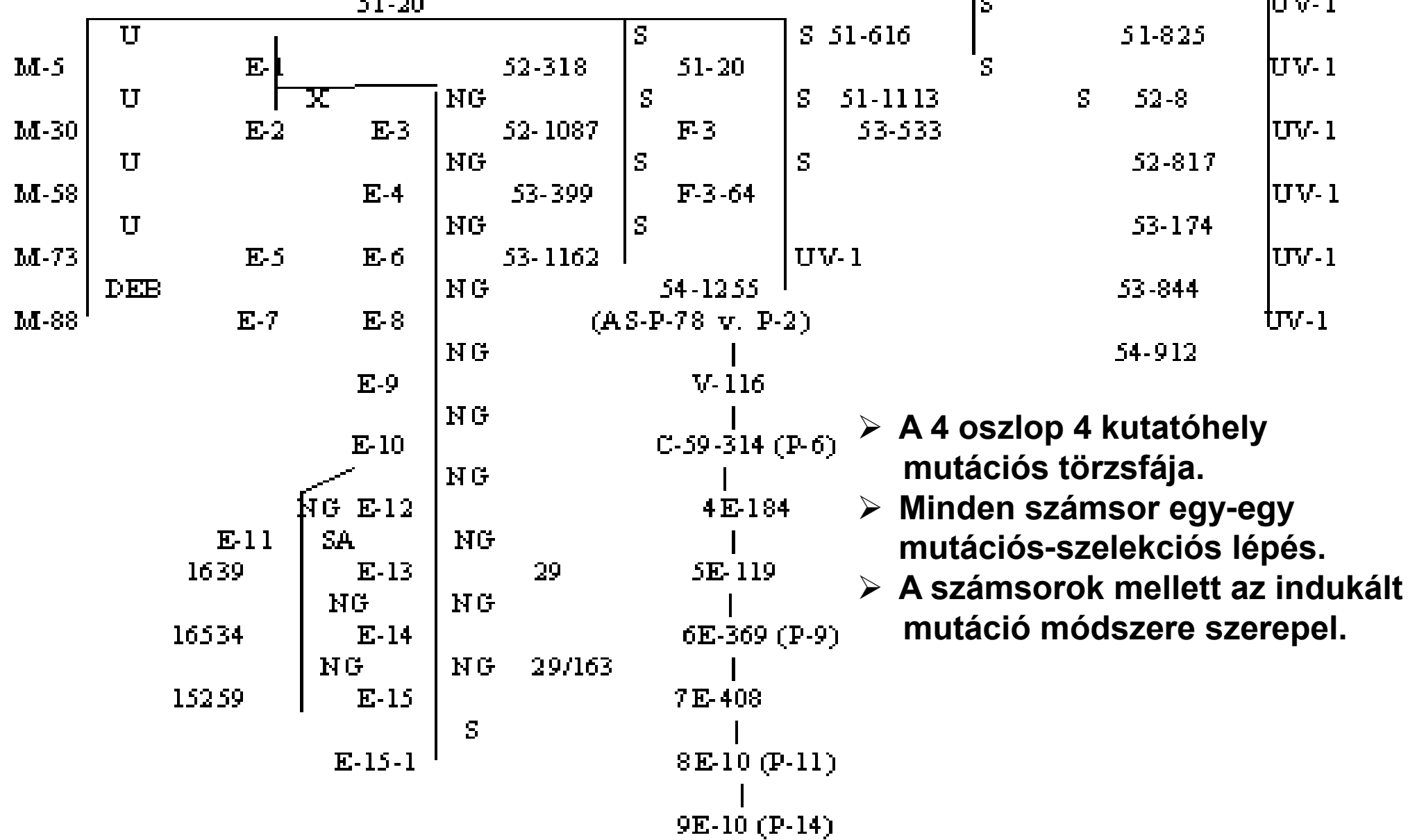
## Célok:

- hozamnövelés,
- fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- az eredeti pigmenttermelés megszüntetése

## Eszközök:

- a célzott génmanipuláció igen bonyolult (sok gén vesz részt a folyamatban), a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs–szelekciós törzsjavítással érték el ( $\sim 2\text{-}3$  ppb  $\rightarrow \sim 50.000$  ppb).
- $1 \text{ ppb} = 1 \cdot 10^{-9}$ .





- A 4 oszlop 4 kutatóhely mutációs törzsfája.
- Minden számsor egy-egy mutációs-szelekciós lépés.
- A számsorok mellett az indukált mutáció módszere szerepel.

Wyeth Lab. West Chester	Eli Lilly Indianapolis	Parlabs Seattle	Univ. Wisconsin Madison
----------------------------	------------------------	-----------------	-------------------------

Ak alkalmazott módszerek: S= szelekció, X= röntgenbesugárzás, UV= ultraibolya kezelés,  
M= metil-bis(β-kloretil)amin, NG = nitrozo-guanidin, NM = nitrogénmustár



# A gyártás lépései:

- 1. Törzsfenntartás:** laboratóriumban, kis méretekben rendszeres átoltással és szelekcióval. Oka: a sikeres termelés után újra „friss” penész kultúrából kell kiindulni (amit még nem „sanyargattak meg”)
- 2. Inokulum lépcső(k):** a tenyésztés fokozatos méretnövelését jelenti.
- 3. Főfermentáció – két szakaszos –** lásd a következő diákat.
  - ”Fed batch” = rátáplálásos szakaszos, **glükóz limit**
  - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
- 4. Feldolgozás, kulcslépése:**  
extrakció: vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléből



# Fermentáció

Jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van:

**Első szakasz** (kb. 40 h): a sejtek elszaporítása, jó tápanyagellátás intenzív levegőztetés, keverés, **elsődleges anyagcsere**.

*Itt még hagyjuk, hogy a penészek „jól érezzék magukat”.*

Tápanyagforrások az első szakaszban:

- szénforrások: néhány könnyen bontható cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet  $\text{NH}_4$  sók formájában, de az a jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére (DNS szintézishez, energia tárolásához (ATP) használja fel a sejt).



# Fermentáció

**Második szakasz**, termelő fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, **kikényszerített másodlagos anyagcsere**.

*Érzékelje azt, hogy kevés a tápanyag...*

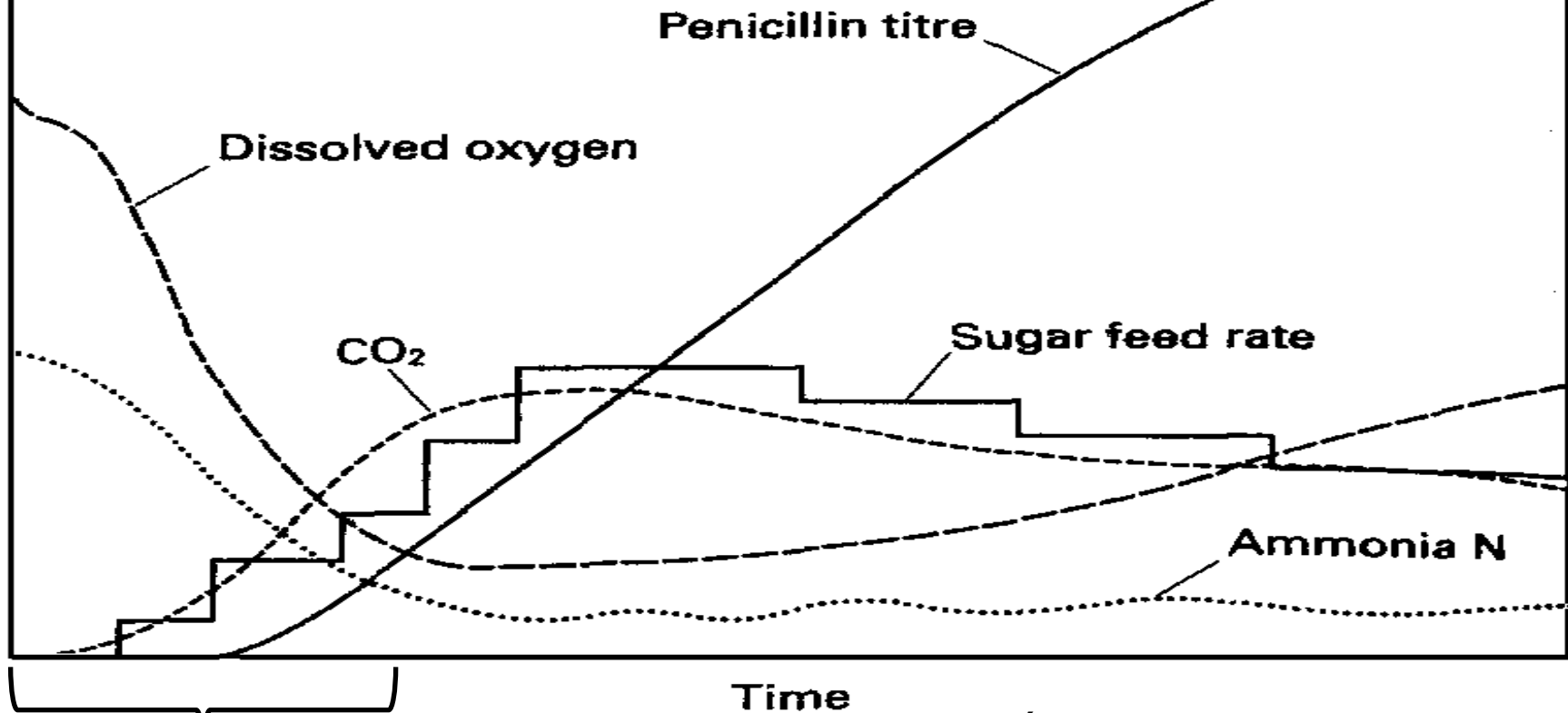
Tápanyagellátás a második szakaszban:

- szénforrás: limitáció (régen: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményítő, ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukoricafehérje, szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt → kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere-re, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- prekursor: fenil-ecetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



# A penicillin fermentáció lefutása

Folyamatosan mérnek bizonyos anyagcsere paramétereket. Innen látják, hol tart a fermentáció és hogy be kell-e avatkozniuk. 120-160 óra (5-7 nap).



2. szakasz: penicillin termelés. Állandósítják a tápanyag és  $O_2$

1. szakasz: sejtszaporodás. hiányos állapotot.

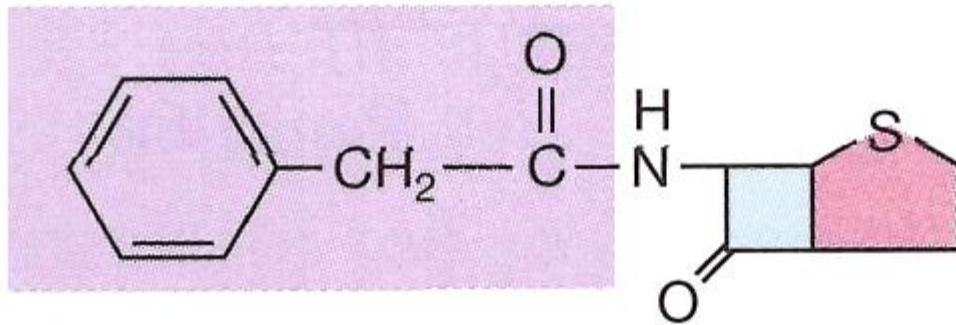
Nagy mennyiségű nitrogén és oxigén fogyasztás (aerob anyagcsere).



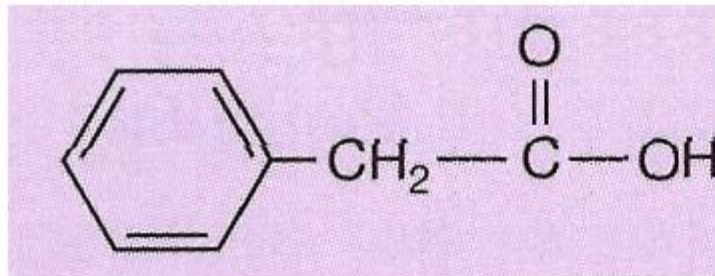
# Prekurzor

Olyan kémiai szintézissel előállított vegyület, amit „készen” adunk a mikroorganizmusnak, és az beépíti a termék molekulába. Így a tenyészetnek nem kell e molekularészt felépíteni – anyagot és energiát takarítunk meg a mikrobának.

**Optimális tartomány**a van: 2-4 g/l.



G penicillin



Fenil-ecetsav



# Félszintetikus penicillinek

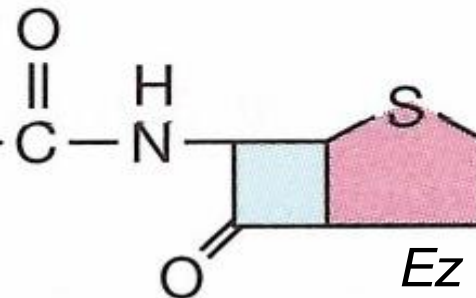
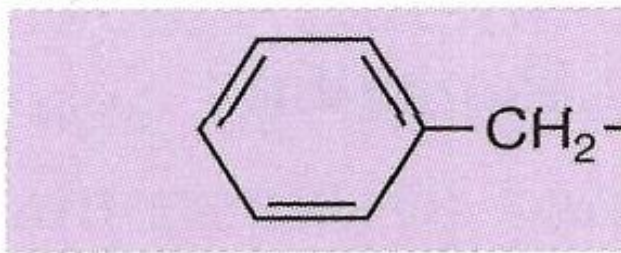
*Az alapmolekulát a mikroorganizmus állítja elő, de ehhez szintetikusan (szerves kémiai úton) olyan oldalláncot kapcsolnak, amelyre fermentációs úton nincs lehetőség.*

A fermentált alapvegyületek:

## Natural penicillins

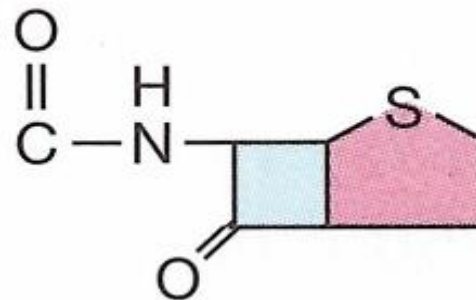
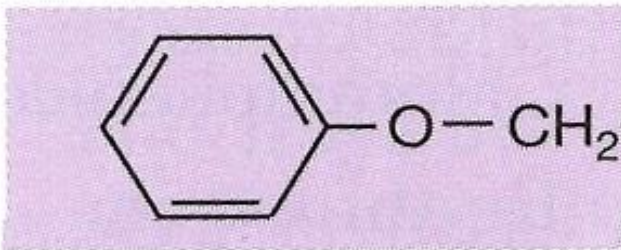
Fejlesztés hajtóereje pl.:

- Szűk hatás spektrum.
- Bomlékonyság.
- Allergén hatások.
- Rezisztencia kialakulása.



Penicillin G  
(Gram-positive cocci)

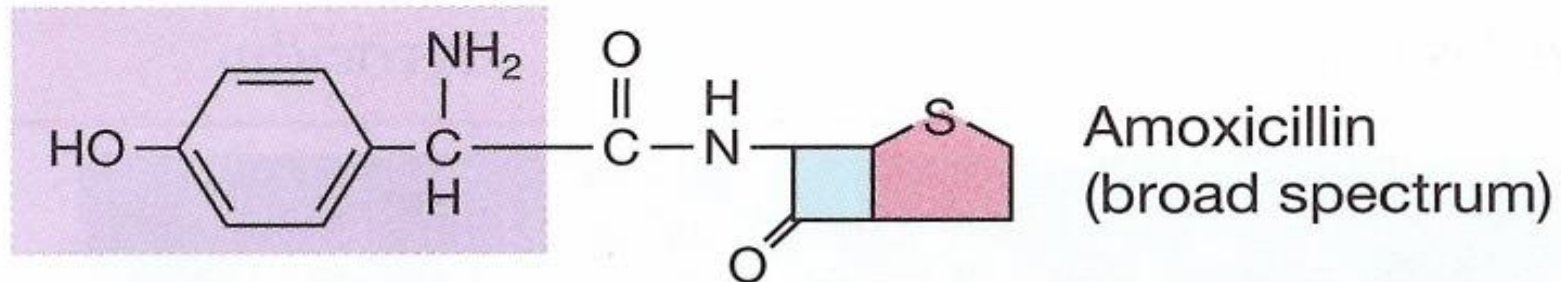
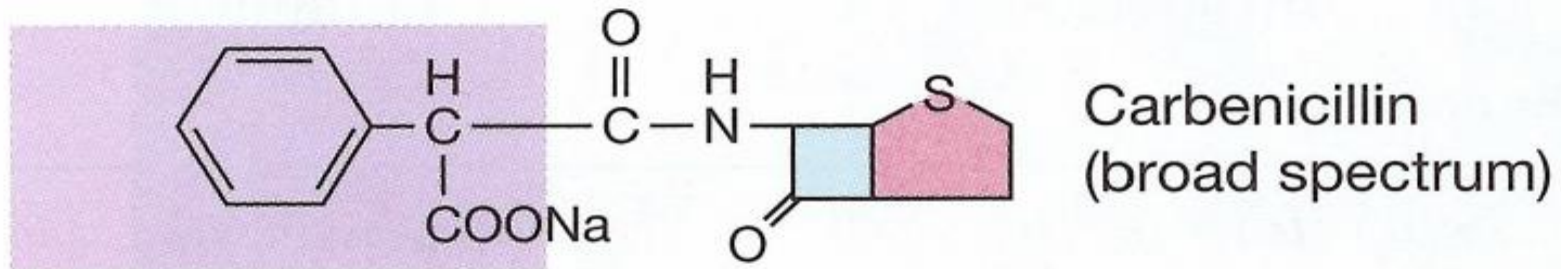
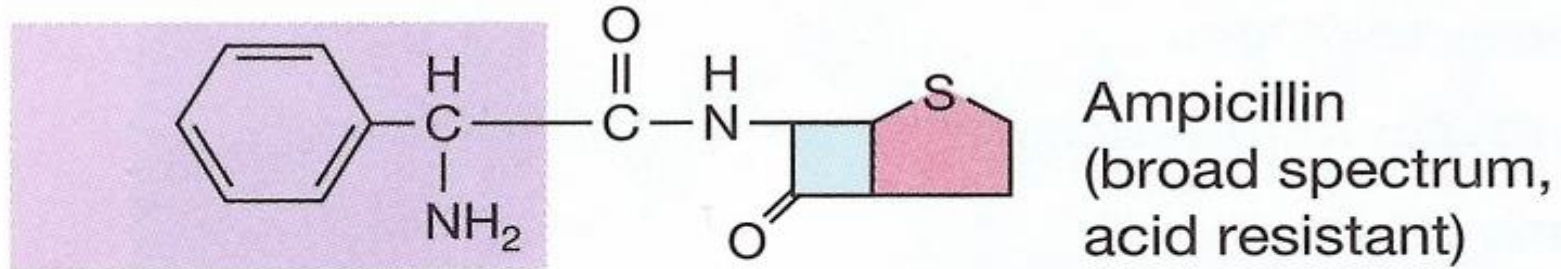
*Ez csak a Gram-pozitív kokkusokra hatékony és savra is érzékeny.*



Penicillin V  
(acid resistant)

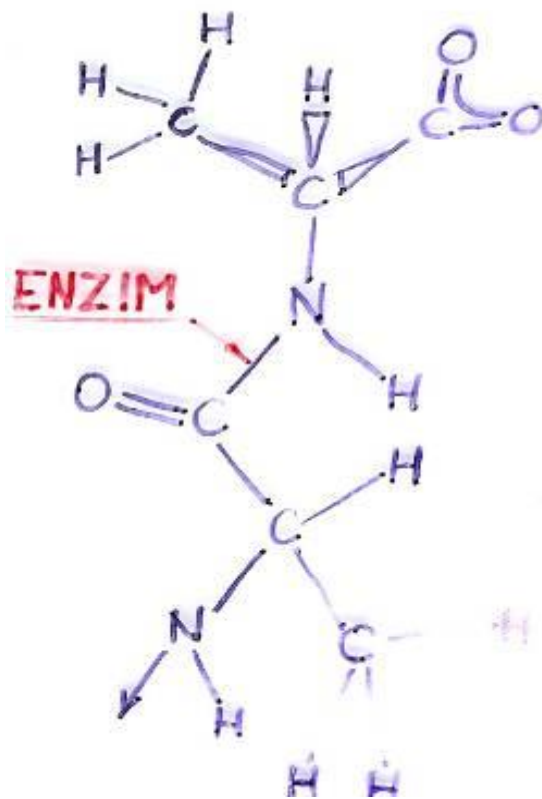


# Félszintetikus penicillinek

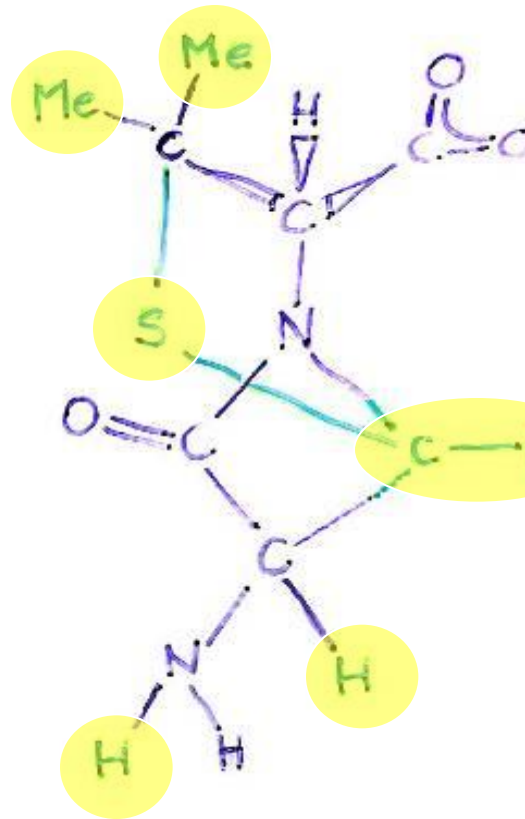


# A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezetanalógián alapul

D-Ala-D-Ala



penicillin



Irreverzibilisen kapcsolódik egy sejtfallépítéző enzim kötőhelyéhez

→ a sejtfallépítés leáll

→ a sejt nem tud nőni, osztódni, elpusztul





# 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 ismételve évtizedeken keresztül. Lassan eléri a határait.

## Technológia:

Kétszakaszos fermentáció, előbb sejtszaporítás, azután termék-képzés

## Piaci helyzet:

a szabadalmak lejártak, generikus készítmények, éles versenyhelyzet, nyomott árak. A gyógyszerkönyvek szigorú előírásai miatt a kínaiak még nem tudnak előretörni, de az indiaiak igen (outsourcing).

