

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1. Inzulin

Az inzulin endőshormon; 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-szigetén termelik. Antagonista párja a glukagon, a két hormon együtt biztosítja a vércukorszint megfelelő szabályozását. Az inzulint először 1922-ben izolálták kutyá pancreasból. Az aminonaszteroidok megkötését 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

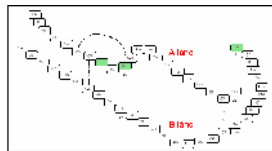


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 hasnyálmirigyből 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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 5

Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből 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 nyerhető peptidáz, ami a bázikus aminosavak (Arg, Lys) melletti peptidkötést bontja → lecsípi a láncvégi alanint.

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

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

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 6

Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:

7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin fermentációs előállítása

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

Kettős fermentáció

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

BME Alkalmazott Biotec

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 enzim lépés):

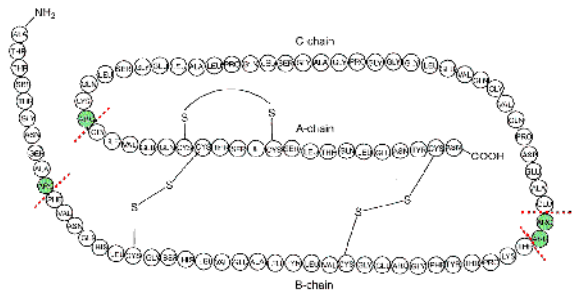
1. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
2. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

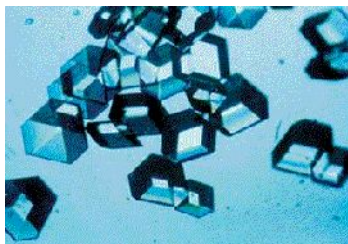


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 résztvevő fehérjék előállításának.

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

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

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 előállításának baktérium fermentációval
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével
6. Rekombináns fehérjék előállításának állati sejtek tenyésztésével



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

REKOMBINÁNS FEHÉRJE VAKCINÁK

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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, tüdővel, 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!)

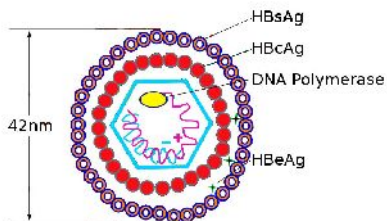


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 19

HEPATITIS B VAKCINA

A felületi antigén génjét el szór *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)

20

HEPATITIS B VAKCINA

Az éleszt be bevitt ingázó vektor (kett s plazmid) szerkezete:

Kétféle marker gén:

- ampicillin rezisztencia
- leucin-2 gén (az éleszt Leu^r mutáns)

Expressziós kazetta:

- konstitutív promóter
- az S fehérje génje
- terminátor

Két replikációs origó:

- egyik a coliban, a másik az éleszt ben m ködik

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 21

HEPATITIS B VAKCINA

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

Feldolgozás:
 Sejtek lecentrifugálása
 Sejteltérés
 ...
 Tisztítási lépések
 ...
 Diszulfid hidak kialakítása kémiai reakcióval
 ...
 Kiszerezési lépések




22
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



23
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

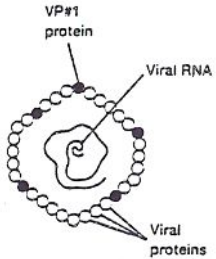
SZKF VAKCINA

SZKF = száj- és körömfájás vírus,
 kér dz kre patogén


RNS vírus (reverz transzkriptáz)

Alegység (subunit) vakcina

Az els rec vakcina az állategész-
 ségügyben.



Foot-and-mouth
disease virus



24
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

