

### 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 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 kutyapancseából. Az aminozsavszekvenencia 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

---

---

---

---

---

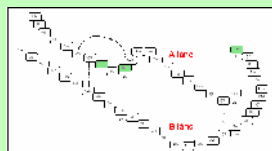
---

---

---

### 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), ebb I három hasítással és két Arg eltávolításával alakul ki a szerkezete.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegy jtött 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 → lecsipi a láncvégi alanint.

Egyszűlyi folyamat, visszafel 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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:

...-COC(=O)CH(CH2OH)CH2- + H2O -> ...-COOH + CH2OH-CH2-

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kettős fermentáció

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

plazmid *E. coli* *genet* for A-chain

protein production

separation

purification

tryptophan-Asn chain

Asn-His

Asn-SO<sub>3</sub>Na

plazmid *E. coli* *genet* for B-chain

protein production

separation

purification

tryptophan-Asn chain

His-His

His-SO<sub>3</sub>Na

CSKIR diszulfid híd

diszulfid híd

oxidatív összekapcsolás

purification

humán inzulin

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 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)



10

---

---

---

---

---

---

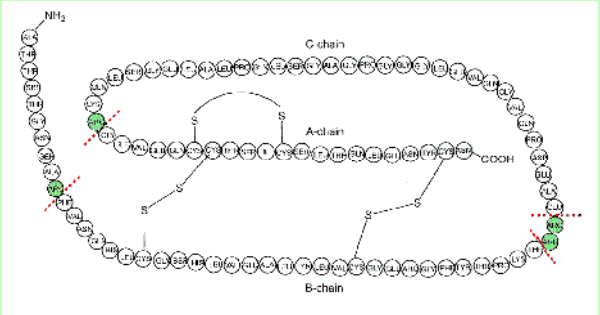

---

---

---

---

### A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

11

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Inzulin feldolgozás

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




12

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## VAKCINAGYÁRTÁS

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

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 Élelmiszertudományi 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 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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi 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 előállítása baktérium fermentációval
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével
6. Rekombináns fehérjék előállítása állati sejtek tenyésztésével

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi 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 májzsugor, esetleg carcinoma.

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

Fertőzés átvitel: 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 izolálhatók, szintetizálhatók – ez volt az első vakcina. → korlátozott mennyiség és veszélyes (vírusátvitel: HBV, HIV is!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

---

---

---

---

---

---

---

---

---

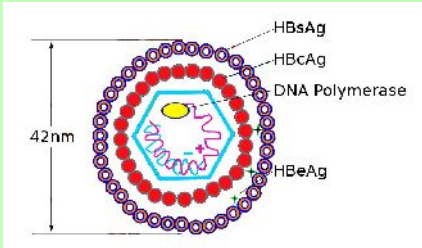
---


### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

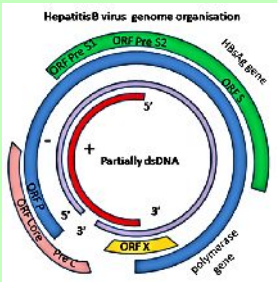
---

---

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék 19

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék 20

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## HEPATITIS B VAKCINA

Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete:

**Kétféle marker gén:**

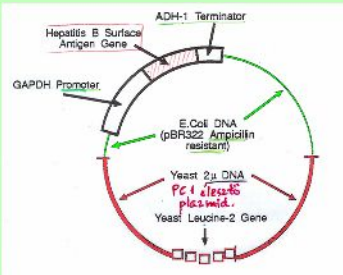
- ampicillin rezisztencia
- leucin-2 gén (az élesztő Leu<sup>-</sup> mutáns)

**Expressziós kazetta:**

- konstitutív promóter
- az S fehérje génje
- terminátor

**Két replikációs origó:**

- egyik a coliban, a másik az élesztőben működik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék 21

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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



22

---

---

---

---

---

---

---

---


---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### SZKF VAKCINA

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

**RNS vírus (reverz transzkriptáz)**

Alegység (subunit) vakcina

Az els rec vakcina az állategészségügyben.



Foot-and-mouth disease virus



24

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



### SZKF VAKCINA

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
25

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### SZKF VAKCINA

Az SZKF burokfehérje gén klónozása *E. coli*-ba:  
 Kifejezik, de intracelluláris, és zárványtestet képez →

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

után jöhet csak a szokásos tisztítás, feldolgozás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---