

4.3. Rekombináns fehérjék előállítása génmanipulált mikroorganizmusokkal

Az elsődleges és másodlagos anyagcseretermékek előállítása után a rekombináns **fehérjék** gyártásáról lesz szó. Ezek olyan fehérjék, melyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, hanem a fehérjék génjét a biotechnológusok vitték be különböző vektorokkal a sejtbe.

Inzulin

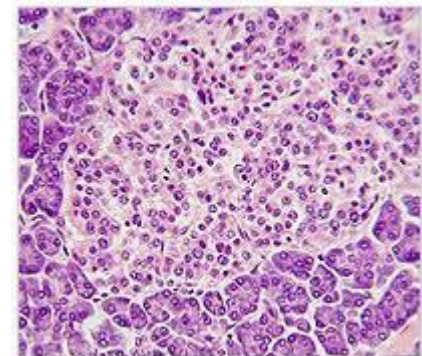
Elsőként az inzulin előállításával foglalkozunk, mert ez egy viszonylag egyszerűbb fehérje, másrészt időrendben, tudománytörténetileg is ez volt az első rekombináns termék.

Mi is az inzulin?

Az inzulin maga egy fehérje típusú hormon, tehát szabályozó jellegű anyag, ami nem a mennyiségével, hanem a **szabályozáson keresztül** hat. Parányi mennyiségben is hatékony, mert a sejtek felületén lévő receptorokhoz köt és a receptorokhoz való kötődés anyagcsere változásokat okoz. Már egy-két inzulin molekula a sejt felületén receptorhoz kötődve meg tudja változtatni a sejtek cukorfelvételét.

Hol termelődik az inzulin a szervezetünkben?

A hasnyálmirigyben, de ennek is csak bizonyos sejtjeiben ún. Langerhans-szigeteken. Az inzulin antagonistá hormonpárja, a glükagon szintén itt termelődik. Ez a két hormon együttesen biztosítja a vércukorszint szabályozását. Az inzulin csökkenti a vércukor szintet, a glükagon emeli, a két ellentétes hatású hormon aránya alakítja ki a közel állandó vércukorszintet.



15. ábra: A hasnyálmirigy Langerhans-szigete

Az inzulinnal kapcsolatos betegség a **diabetes**, köznapi néven cukorbetegség, ami a vércukor szint szabályozásának zavarát jelenti. Többféle típusa van:

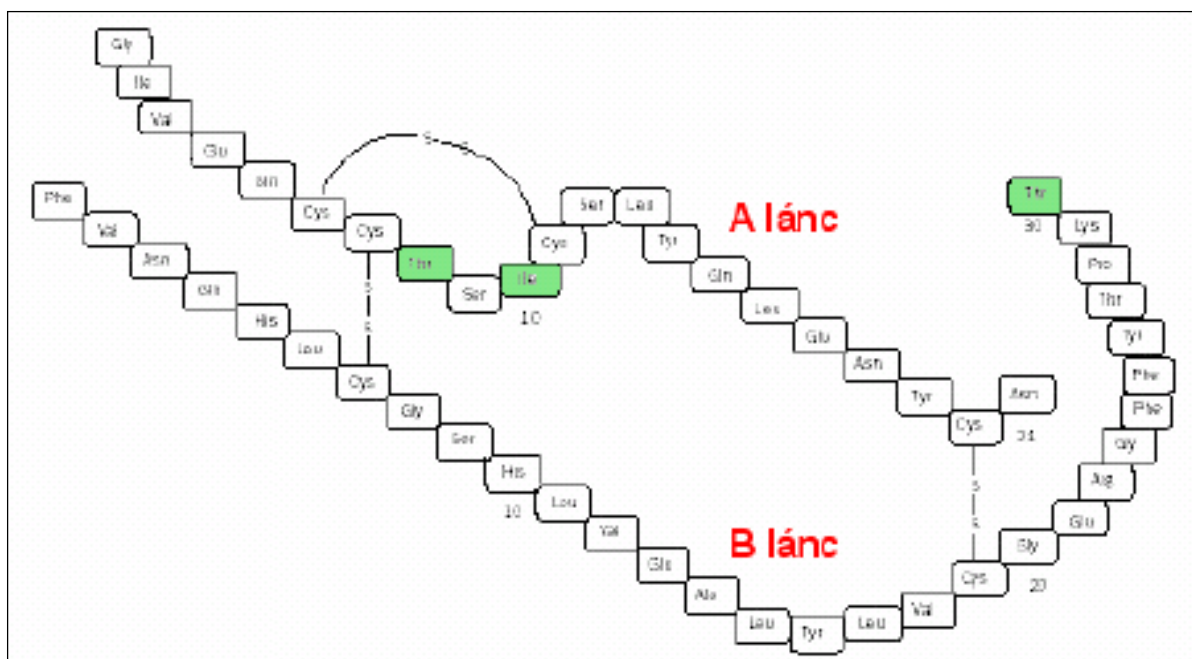
Fiatalkori cukorbetegség: Ez ténylegesen az inzulin hiányán alapszik. A sejtek nem képesek elegendő inzulint termelni, és emiatt a vércukor szint állandóan magas a szervezetben. A fiatalkori cukorbetegség egy autoimmun betegség, melyet abszolút inzulinhiány okoz. Hátterében az áll, hogy a szervezet immunrendszere idegenként ismeri fel a saját sejtek egy részét, és autoimmun gyulladás következtében elpusztulnak a hasnyálmirigy inzulint termelő

béta-sejtjei. A fiatal kori cukorbetegség inzulinos kezelés nélkül súlyos károsodással, és egy-két éven belül halállal jár.

Időskori cukorbetegség: A betegek túlnyomó többsége ebben szenved. Itt nem az inzulintermelés hiánya a probléma, hanem a sejtek felületén lévő inzulin receptorok károsodása. Az időskori cukorbetegség egyfajta civilizációs ártalom, amit a magas glikémiás indexű szénhidrátok fogyasztása (cukor, fehér liszt stb.) idéz elő. A glikémiás index azt fejezi ki, hogy egy szénhidrát milyen gyorsan szívódik fel, és jut a vérbe. Minél nagyobb ez az érték, az ételmiszer annál nagyobb inzulintermelésre serkenti a szervezetet. Az éveken át tartóan magas inzulinszint, pontosabban az étkezéseknél fellépő hatalmas inzulinhullám miatt a sejtek védekezni kezdenek a beléjük pumpált túl sok cukor ellen, és kialakul az inzulinrezisztencia, vagyis a sejtek ellenállnak az inzulin hatásának - a receptorok érzéketlenné válnak az inzulinra. Ám mivel az agy érzékeli, hogy a vérben ott a sok cukor, utasítja a hasnyálmirigyet, hogy még több inzulint termeljen, a sejtek viszont egyre jobban ellenállnak. Egy ponton azonban a hasnyálmirigy feladja a küzdelmet, és a kialakuló tartóan magas vércukorszint károsítja a szervezetet. Rontja a keringést a hajszálerekben, és ennek sokféle következménye lehet (pl. vakság, lábszárfekély, infarktus).

Mind két típusnál inzulin bevitellel lehet a betegten segíteni. Ez a bevitel szájon át (tablettában, kapszulában) nem oldható meg, mert az inzulin az egy fehérje molekula, ami az emésztőcsatornában lebomlik. Ezért az inzulint legtöbbször injekció formájában adják, bár sok próbálkozás történt ennek elkerülésére, pl. a nyálkahártyán keresztül felszívódó preparátumok kifejlesztésére.

Az inzulin molekula szerkezete:



16. ábra: Az inzulin szerkezete

Két peptid láncból (A és B lánc) épül fel. Az egyik 21 a másik 30 aminosavból áll. A két láncot diszulfid hidak (két kénatomból álló, -S-S- felépítésű keresztkötések) tartják össze. A diszulfid hidak a fehérjében lévő cisztein aminosavak között jöhetnek létre. Ezekben az oldallánc végén egy SH csoport található, két ilyen SH csoport képes összekapcsolódni.



(a hidrogéneket valamilyen molekula, pl. NAD veszi fel). Három ilyen kötés található az inzulin molekulában, kettő az A és B lánc között, a harmadik az A láncon belül hoz létre egy hurkot, ezáltal stabilizálja a szerkezetét.

A sertés és a marha szervezete szintén termel inzulint. Ezek az emberi inzulintól csak néhány aminosavban különböznek. E különbségekből az evolúciós elágazások története is kiolvasható.

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

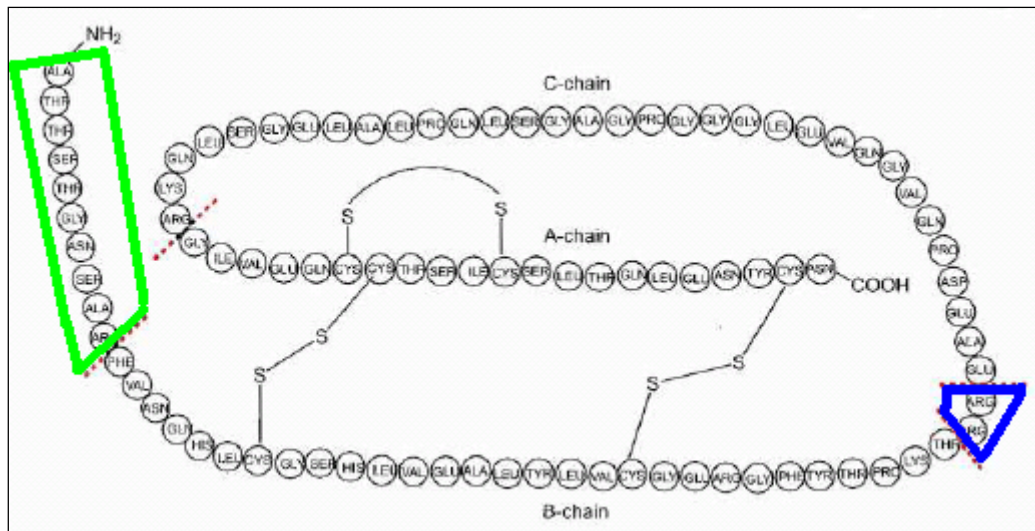
17. ábra: Eltérések a humán, marha és sertés inzulin között

Ha nagyobbak a különbségek, mert több mutáció lépett fel, akkor a fajok korábban váltak el egymástól. A sertés inzulin csak egyetlen aminosavban tér el az emberétől, a marha pedig háromban (a képen zölddel, a táblázatban pirossal jelölve). Ebből látszik, hogy a sertés közelebbi rokona az embernek, mint a szarvasmarha.

A cukorbetegség kezelésére évtizedekig a sertés inzulint alkalmazták. A vágóhidakon összegyűjtötték a hasnyálmirigyeket, és ebből vonták ki a sertés inzulint.

Az inzulin bioszintézise:

Az inzulin két fehérjeláncból áll, de csak egy inzulin gén van. Ennek átírásával - az intronok kivágása után - egy fehérjelánc keletkezik (pre-pro Arg inzulin), és ebből három hasítással és két Arg eltávolításával alakul ki a végső, aktív szerkezet.



18. ábra: Pre-pro Arg inzulin

A pre az egy bevezető szakaszt jelent (zölddel jelölve). A bioszintézis során ezt az enzimek eltávolítják. Marad a proinzulin, ez egy fehérjelánc, amin belül három szakaszt ismerhetünk fel. A már ismert A és B lánc között helyezkedik el a C láncnak nevezett szakasz. További hasításokkal a C lánc kivágásra kerül. A C láncnak a továbbiakban nincs szerepe, elbomlik.

Az inzulin előállítási lehetőségei

1. Szerves vegyészek megoldották, hogy kémiai szintézissel, aminosavakból állítsák elő az inzulint. Ez nem gazdaságos eljárás, a gyakorlatban, ezért nem is alkalmazzák.
 2. Sertés hasnyálmirigyből való kivonás és átalakítás humán inzulinná. A nagy mennyiségű inzulin előállításához korábban a vágóhidakra vitt állatok hasnyálmirigyeit kezdték feldolgozni, de egy idő után ez nem fedezte az igényeket.
 3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
- Ezzel az eljárással nagyon sok gyógyszergyártó cég foglalkozott és foglalkozik. Különböző utakat jártak ezek a cégek, és különböző megoldásokat találtak ki.
- Az első ilyen gondolat az volt, hogy minél egyszerűbb legyen a folyamat, minél rövidebb fehérjéket kelljen előállítani, ezért külön-külön termeltették meg az A és a B láncot.

Ez után:

- a pro inzulin fermentációja *Escherichia coli*-val, majd átalakítása
- a pre-pro-inzulin fermentációja *Escherichia coli*-val, hasítások
- a pro inzulin fermentációja *Saccharomyces cerevisiae*-vel (= pékélesztő)

Kivonás hasnyálmirigyből, átalakítás

Ezt nevezik klasszikus eljárásnak is. Az inzulint először Frederick Bantingnak és Charles H. Bestnek sikerül kivonni a hasnyálmirigyből a XX. század elején. (Érdekesség: Az elsőször

kutyákat vizsgáltak, eltávolították a hasnyálmirigyüket és megfigyelték, hogy mi történik. Különböző enzimekkel próbálták meg pótolni a hasnyálmirigy emésztő enzimeit. Véletlenül figyelték meg, hogy a kutyák vizeletére odagyűltek a legyek. Az okot keresve állapították meg, hogy a kutyák vizeletében sokkal több cukor volt, mint az előtt. Ebből következtettek a hasnyálmirigy szerepére a vércukorszint alakulásában, és ez vezetett el végül az inzulin felfedezéséhez.) A kutyák vizsgálata után átálltak a sertések alkalmazására. A nagyobb mennyiségű inzulin előállításához a tudósok ekkor a vágóhidakról szerzett állati hasnyálmirigyeket kezdték használni. A kísérletek sikeresek voltak; folyamatos adagolással hosszú időn át életben tudták tartani a beteg állatokat. Cukorbeteg ember először 1922. január 11-én kapott a kivonatból; a már haldokló 14 éves fiatalember néhány nap múlva elhagyhatta a kórházat, bár továbbra is rászorult az injekciókra. Az inzulingyártás 60 évig a torontói felfedezők (Banting, Best és Collip) elvei alapján történt. Az inzulint sertés, illetve szarvasmarha hasnyálmirigyéből vonták ki savas-alkoholos módszerrel. Az állatok levágását követően a hasnyálmirigyeket azonnal lefagyasztották. Darabolás, őrlés után savanyú közegben alkoholos kivonatot készítettek. Ezt semlegesítették, és eltávolították a kicsapódó fehérjéket, az alkoholt és a zsírnemű anyagokat. Végül semleges közegben konyhasó (NaCl) hozzáadásával az inzulin kicsapódott. Az így nyert készítmény 80-90 százalék kristályos inzulint tartalmazott, ez a klasszikus "gyors" hatású inzulin. A mindennapi gyógyításban jól alkalmazható kristályos inzulint először Abel állított elő 1926-ban.

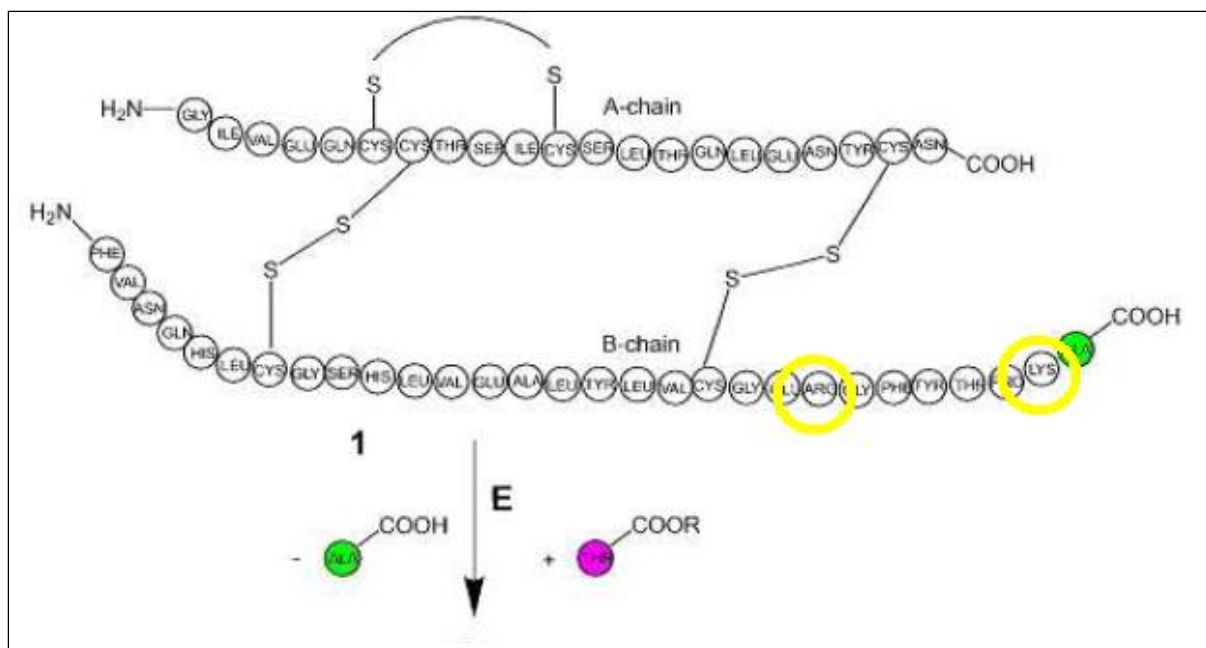
A felfedezésért a kutatók 1923-ban Nobel díjat kaptak.

A nyolcvanas évek közepéig a sertés hasnyálmirigyből való inzulin kinyerés volt az egyedüli technológia, de korlátozó tényezőt jelentett, hogy az alapanyag mennyisége véges (nem vágnak le annyi sertést, mint amennyi hasnyálmirigyre szükség lenne). Másrészt kiderült, hogy a sertés inzulinban lévő egy aminosav különbség a kezelt paciensek egy részénél allergiát okoz. A szervezetük idegen fehérjének tekintette az inzulint és allergiás reakció alakult ki. Az allergia ráadásul ismételt bevitelnél fokozódik, tehát a folyamatos inzulin adásnál egyre erősebb lesz. A különbség a sertés és az emberi inzulin között egyetlen aminosav. Ezt kellene lecserélni, és az allergia probléma megoldódna.

Hogyan lehetne ezt az aminosavat lecserélni?

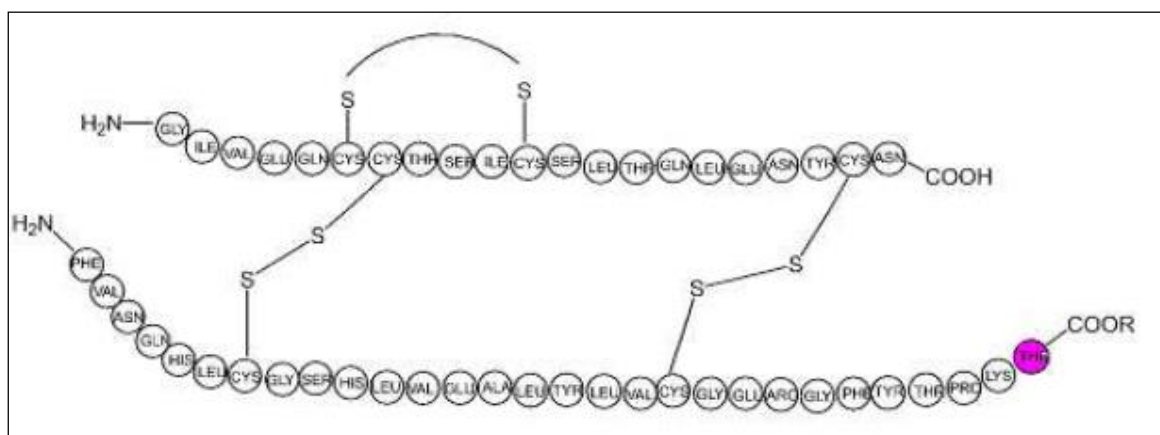
Ismét egy biotechnológiai lépés következik: egy enzimet használunk az átalakításra. Ez az enzim a tripszin, a hasnyálmirigy által termelt emésztő enzim. (Kitekintés: A hasnyálmirigy hormonok mellett nagyon sokféle emésztő enzimet is termel. Ezt a sokféleséget fejezi ki a hasnyálmirigy latin neve is: pancreas, lefordítva: pan = minden, teljes; creas = terem, létrehoz, pancreas = minden(félé)t termelő).

Ez egy nagyon specifikus peptidáz, mivel nem akárhogyan hasítja el a fehérje molekulákat, hanem a bázikus aminosavak mellett. Kétféle bázikus aminosav van az arginin (Arg) és a lizin (Lys). Az oldalláncuk végén egy aminocsoport van, ezt ismeri fel a tripszin. Ahol a fehérje láncban egy ilyen aminosavat talál, odakötődik, és mellette elvágja a peptidkötést.



19. ábra: Az alanin levágása

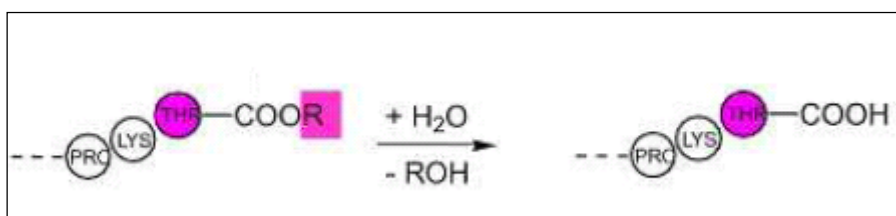
Látható a B láncon, hogy az utolsó előtti aminosav az egy lizin, tehát bázikus aminosav. A lizin melletti vágással a tripszin éppen egyetlen aminosavat, az eltávolítandó alanint hasítja le. Sajnos az inzulinban van még egy bázikus aminosav is, az ábrán sárgával jelölt arginin. Ahhoz, hogy csak a lizin mellett menjen végbe a reakció, pontosan be kell állítani körülményeket (+6 fok, szerves oldószert adni a vizes oldathoz).



20. ábra: A threonin beépülése az alanin helyére

Az alanint treoninra (lilával jelölve) kell cserélni. A cserénél azt használják ki, hogy ezek a reakciók megfordítható, egyensúlyi reakciók. A kémiai reakciók megfordíthatók akkor, ha valamelyik reakciópartnerből nagyon sokat adunk hozzá. Ez esetben treoninból kell nagyon sokat hozzáadni az alaninhoz képest. Így az eredetileg bontási reakció visszafordul, és szintézis, azaz aminosav rákötés is végbemegy. Ha pedig nagyságrenddel több treonin van jelen, mint alanin, akkor a létrejövő inzulin molekulák között is nagyságrenddel több lesz az treoninos, mint az alaninos.

De van még egy probléma, a treonin karbonsav csoportja. Ez a csoport mellékreakciókba léphet, és szennyező melléktermékeket hozhat létre. Ennek kivédésére a savcsoportra egy védő csoportot tesznek, treonin észtert visznek be a rendszerbe. Az R betű azt jelenti, hogy valamilyen, pontosan meg nem határozott alkohollal észterezik a treonint. Így el lehet kerülni a mellékreakciókat, nem képződnek melléktermékek. De ez egyúttal azt is jelenti, hogy legvégül ezt az észterező alkoholt is el kell távolítani az inzulinról.



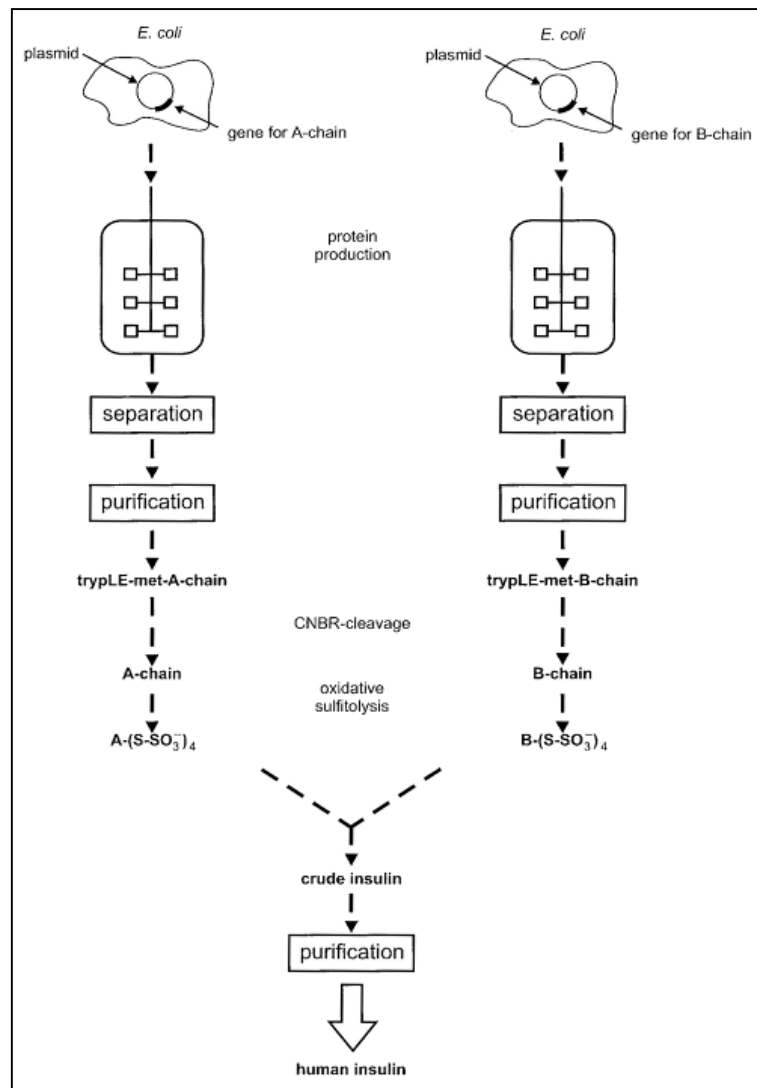
21. ábra: Az észter csoport elbontása

Az inzulin fermentációs előállítása rekombináns fehérjeként

A rekombináns fehérjék előállítását prokariótákkal és eukariótákkal is meg lehet oldani. A két-féle fehérjeszintézis között azonban különbség van. Az eukarióták képesek szénhidrátreszkekkel kiegészített fehérjéket létrehozni, míg a prokarióták csak az „alap” fehérjemolekulát tudják előállítani. Ha tehát olyan fehérjét akarunk termeltetni, amire nem kell cukrokat rákötni (szakkifejezéssel: glikozilálni), akkor ezt a feladatot prokariótákkal is meg lehet oldani a folyamatot. Ha viszont a termeltetni kívánt fehérje csak glikozilált formában aktív, akkor eukariótákkal kell dolgoznunk. Az inzulin nem tartalmaz szénhidrátokat, tehát rekombináns fehérjeként baktériumokkal is előállítható.

Kettős fermentáció

Az inzulin A és B láncának megfelelő génszakaszt megfelelő vektorokkal két külön *E. coli* törzsbe viszik be. Két külön fermentációval előállítják a két fehérjeláncot. Ezek a fehérjék intracelluláris (sejten belül maradó) termékek, így a további feldolgozáshoz egy külön művelettel fel kell tárnai a sejteket. A feltárás és több lépéses tisztítás után kapják meg az inzulin komponenseit. A két lánc között a diszulfid hidakat kémiai reakcióval hozzák létre, majd további tisztítás után hozzák forgalomba.

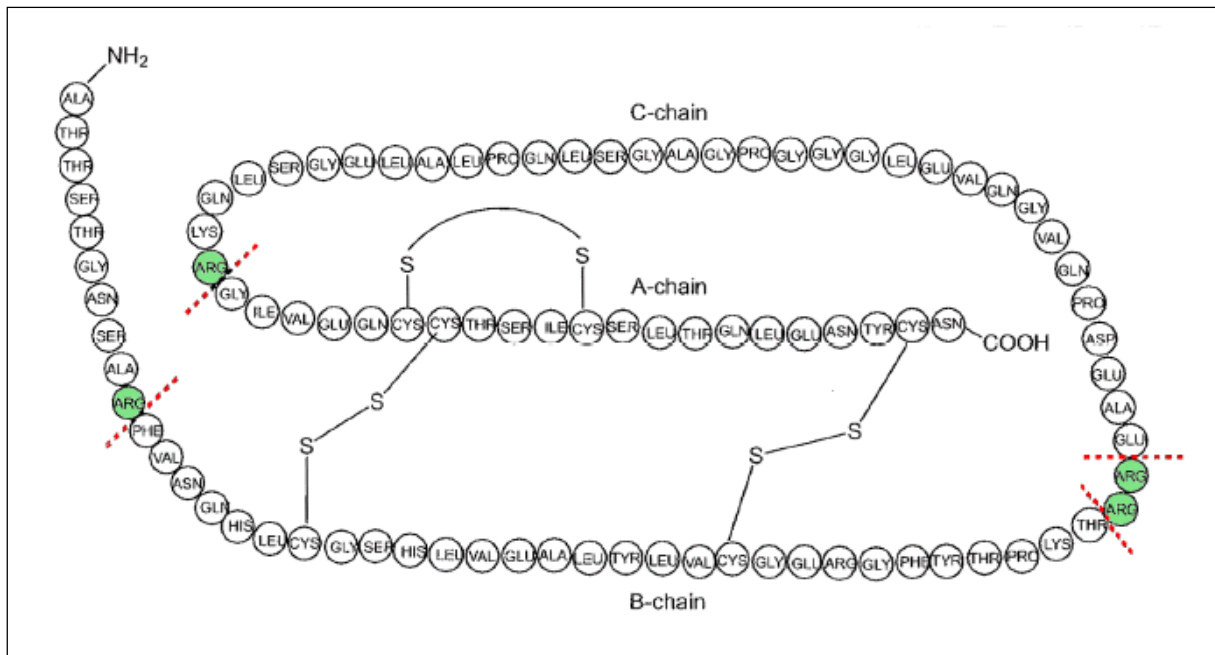


22. ábra: Két külön fermentáció, aztán összekapcsolás

A pre-pro-inzulin előállítása rekombináns fehérjeként

Az egész fehérjelánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) belefér egy *Escherichia coli* plazmidba. A génbevitel és a fermentáció *E. coli*-val az előbbiekkal analóg módon történik, de utána a lánc hasítása bonyolultabb, két enzimes lépés.

Első lépés: a bioszintézissel analóg módon, három helyen kell felhasítani a fehérjét. Szerencsére mindegyik vágási helynél, illetve közelében található egy-egy arginin a fehérjében (az ábrán zölddel jelölve). Láthatjuk, hogy a pre inzulin egy argininnel végződik, majd a B láncnál is a threonin után két arginin jön. A tripszinnről már tudjuk, hogy képes a bázikus aminosavak melletti bontásra, tehát ezzel majdnem pontosan meg tudjuk csinálni a hasításokat. A vágások az arginin „jobb” (karbonsav) oldalán történnek. Két helyen pontosan a megfelelő helyen szakad meg a fehérje lánc, a harmadikon viszont, a B lánc végén két arginin ott marad.



23. ábra: A pre-pro inzulin enzimes hasításai

Második lépés: A két arginin már képes befolyásolni a molekula hatását. Lehet, hogy hatékony lenne így is, de allergiás reakciókat válthat ki egyes betegeknél. A két aminosav eltávolítására egy másik enzimet, egy exopeptidázt alkalmaznak, amely a fehérje karbonsav láncvégeről egyesével hidrolizálja le az aminosavakat.

Inzulin tisztítása

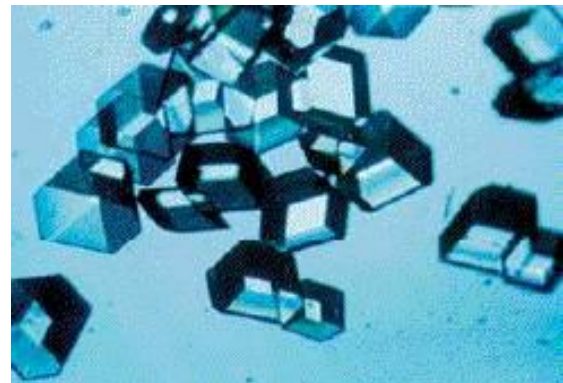
Lépései:

Első lépés: Gélszűrés (kis molekulák kiszűrése)

Második lépés: Ioncsere kromatográfia

Harmadik lépés: Kristályosítás

A fehérjék általában nagyon nehezen kristályosíthatók, de az inzulin kivétel. 55 fokról lehűtve, Zn ion jelenlétében szép szabályos kristályok formájában válik ki. A kristályos cink-inzulin stabil, jól tárolható.



24. ábra: Inzulin kristályok

Eddig a rekombináns fehérjék közül egy hormon, az inzulin előállítását tárgyaltuk. A rekombináns fehérjék között azonban vannak más funkciójú hatóanyagok is.

Az immunrendszer és a vakcina gyártás

A vakcina (védőoltás) fogalmával mindenki találkozott már, hiszen a kötelező védőoltásokkal mindenki megkapta. A vakcina gyártás az oltóanyagok előállítását jelenti. A védőoltások célja a szervezet fertőző betegségek elleni védekezését elősegíteni.

Ez történhet aktív vagy passzív immunizálással. Az aktív immunizálás az immunrendszer “ösztönzése” egy adott kórokozóra specifikus immunsejtek és immunfehérjék termelésére. A passzív immunizálás során közvetlenül az adott kórokozóra specifikus immunfehérjéket juttatják be a szervezetbe.

Hogyan tudják a fertőző betegségek elleni védekezést a vakcinák elősegíteni? Ehhez azt célszerű áttekinteni, hogy hogyan is működik az immunrendszer és hogyan épül fel az immunreakció, vagyis a szervezet válasza egy idegenként azonosított struktúra (óriás molekula, vírus, sejt) szervezeten belüli megjelenésekor.

Az immunrendszer: a szervezet védekező rendszere. “Különbséget tud tenni saját és nem saját, illetve a szervezetre ártalmatlan és veszélyes struktúrák között, és ezekre eltérő módon reagál. Felismerő, információt továbbító és végrehajtó rendszer” [1].

Antigénnek nevezik mindazokat a struktúrákat (molekula komplexeket), amiket az immunrendszer nem sajátjaként, tehát idegen anyagként ismer fel [1]. A kórokozók (baktériumok, vírusok, eukarióta egysejtű paraziták, férgek) mind antigének a szervezet számára. Ugyanakkor nem minden antigén kórokozó vagy annak “származéka” (pl. a virágpollenek, ételben előforduló allergén molekulák nem fertőző anyagok, mégis képesek lehetnek immunválaszt kiváltani a rájuk érzékeny egyéneknél).

Antitestnek nevezik azokat az antigén specifikus felismerő képességgel rendelkező immunfehérjéket, amiket az immunrendszer erre alkalmas sejtjei (B sejtek) egy adott idegen struktúrával (antigénnel) való első találkozást követően termelhetnek.

Az immunrendszernek léteznek sejtjes (celluláris) és oldékony (humorális, molekuláris) elemei. A sejtjes elemeket összefoglalóan fehérvérsejteknek nevezik. Az oldékony elemek közé különböző fehérje természetű anyagok, például az előző bekezdésben említett immunfehérjék (antitestek, immunglobulinok) tartoznak.

A gerinces állatok immunrendszere két, egymásra épülő és egymással kommunikáló részre, a veleszületett és a szerzett (adaptív) immunrendszerre oszlik. A veleszületett immunrendszer szolgál elsődleges védelmi vonalként a szervezetbe jutó antigénekkal (idegenként felismert struktúrákkal) szemben. A szervezetbe bejutó kórokozók először a veleszületett immunrendszer elemeivel találkoznak, az adaptív immunrendszer aktiválódása csak napokkal később indul meg [1]. Az adaptív immunrendszer „tanítható”, antigén felismerő és pusztító képessége a veleszületett immunrendszerrel való kölcsönhatás révén fejlődik ki és válik egy-egy antigénné specifikussá.

A veleszületett immunrendszer sejtjes elemei a falósejtek (fagociták). A falósejteknek több típusa is van. Közös bennük, hogy az antigénként felismert struktúrákat bekebelezik, és ezáltal próbálják meg elpusztítani. Olyan szerkezeti elemeket, molekuláris mintázatokat ismernek fel, amelyek csak a kórokozókra jelennek meg, a magasabb rendű szervezet sejtjein nem. Ez biztosítja azt, hogy az azonnal működésbe lépő védekezési mechanizmusok kizárólag a kórokozók ellen irányuljanak [1]. Például képesek felismerni a baktériumok sejtfalának felépítésében részt vevő, a szervezet saját sejtjeinek felszínén ugyanakkor nem előforduló molekulákat.

Ugyanakkor ennél többet is tesznek: rendelkeznek olyan sejt felszíni fehérje komplexekkel, amelyeken be tudják mutatni a bekebelezett antigénre jellemző fehérje struktúrákat az adaptív immunrendszer sejtjei számára. Ezért szoktak a falósejtekre, mint antigén prezentáló sejtekre is hivatkozni.

A falósejtek az antigén prezentálás (tehát a bekebelezett antigén kisebb szerkezeti egységeinek a sejt felszínén való bemutatása) révén kommunikálnak az adaptív immunrendszerrel.

Az adaptív immunrendszer sejtjes elemei közé a T-sejtek és a B-sejtek (T-limfociták és B-limfociták) tartoznak. A T-sejtek egy csoportja („killer” T-sejtek) képes az antigént a sejt felszínén bemutató (faló)sejteket elpusztítani. (A faló jelző itt azért került zárójelbe, mert a vörösvértesteket kivéve a szervezet bármelyik sejtje képes az „öt” megfertőző antigéneket kisebb-nagyobb mértékben a sejt felszínén megjeleníteni, és ezáltal a „killer” T-sejteket aktiválni.)

Az immunfehérjék, más néven antitestek termeléséért az adaptív immunrendszer B-sejtjei felelősek. Az antitestek az immunrendszer oldékony (molekuláris) elemei közé tartoznak.

Ha a szervezetbe bekerül valamiféle fertőző ágens, vírus vagy baktérium stb. ennek a felületi fehérjéje (ez az antigén) védekező reakciót, immunreakciót vált ki. Ennek egyik fajtája az ún. molekuláris immunválasz, ami részben az antitestek (immunfehérjék) termelését és véráramba juttatását jelenti.

A B-sejtek érésük során egy, a sejtmembrán felszínéhez kötött immunfehérje molekulát fejeznek ki. Az immunfehérjék képesek az antigének specifikus felismerésére, vagyis képesek egy adott antigént nagyon szelektíven megkötni. Az viszont, hogy egy adott, érésben lévő B-sejt felszínén milyen antigén felismerésére alkalmas immunfehérje fejlődik ki, egy teljesen véletlenszerű folyamat eredménye. Minden B-sejt csak egyetlen féle antigénfelismerő hellyel rendelkező immunfehérjét tud a sejtmembránján kifejezni. Azok a B sejtek, amik nem találkoznak olyan antigénnel, amit képesek lennének megkötni, hamarosan elpusztulnak. Azok a B-sejtek viszont, amelyek találkoznak olyan antigénnel a szervezetben, amit képesek megkötni, osztódni kezdenek.

Az osztódás eredményeképpen egyrészt olyan B-sejtek (plazma sejtek) jönnek létre, amik képesek az eredeti sejt membránján kifejezett immunfehérjét nagy mennyiségben megtermelni és a vér- és nyirokkeringésbe juttatni. Ezek a nem membránhoz kötött immunfehérjék az antitestek. Az osztódások során a plazma B-sejtek mellett memória B-sejtek is létrejönnek. Ezek továbbra is a sejtmembránjuk felszínén fejezik ki ugyanazt az immunfehérjét, amivel az antigént eredetileg felismerni képes sejt rendelkezett, és amit a plazma sejtek antitestként a vér- és nyirokkeringésbe juttatnak. Az antitestet termelő plazmasejtek élettartama korlátozott, de a memória B-sejtek nagyon hosszú életűek lehetnek. A fertőzés sikeres legyőzését követően még sokáig „készenlétben állhatnak”. Az antigén ismételt megjelenésekor gyors osztódásba kezdenek, aminek eredményeképpen rövid idő alatt újra plazma sejtek és további memória B sejtek képződnek. Részben ezek a sejtek felelősek az adaptív immunrendszer memóriájáért, és ezt a „tanulási” folyamatot igyekeznek elősegíteni az aktív immunizálást célzó védőoltások.

A fehérvérsejtek közé tartozó plazma B-sejtek tehát antitesteket (immunfehérjéket, immunglobulinokat) termelnek, és az, amelyik éppen pont ráilleszkedik a támadóra, az rákötődik, és hatástalanítja. A hatástalanításnak egyik módja az, hogy beborítja a felületét és ezzel akadályozza a működését. A másik védekezési mód az, hogy a rákötődő antitest egy „címkeként” szolgál, ami a sejt immunválasz sejtjei számára azt az információt hordozza, hogy ezt a megjelölt objektumot (sejt, stb.) kell bekebelezni (fagocitózis), elpusztítani.

Az immunreakciónak tehát két fehérje szereplője van, az antigének és az antitestek. E kétféle fehérje alkalmazása szerint különíthetjük el az aktív és passzív immunizálást.

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

25. ábra: Az aktív és a passzív immunizálás

Passzív immunizálás esetén az antitesteket adjuk be a szervezetbe. Akkor alkalmazzuk, ha a fertőzés már megtörtént, illetve valószínűsíthető, hogy megtörtént. Ilyenkor nincs idő arra, hogy kiválsuk a szervezet saját immunreakcióját, ekkor olyan ellenanyagokat kell bevinni, amelyeket a szervezet maga is termelne, ha lenne ideje rá. A kívülről bevitt ellenanyagok védik

meg a szervezetet. Ez nem megelőzés (profilaxis), hanem kezelés (terápia). Alkalmanként, egyénekenként adják, ezt nem kapja meg mindenki.

Az aktív immunizálásnál nem az antitestet visszük be a szervezetbe, hanem az antitest termelését kiváltó antigént. Ennek hatására a szervezet maga termeli az antitesteket, még a fertőzés fellépése előtt. Ezzel felkészítjük a szervezetet, és nem betegszik meg a fertőző ágens megjelenésekor. Ez megelőzés (profilaxis), és nem kezelés (terápia).

Fejlett egészségüggyel rendelkező társadalmakban a különböző védőoltások rendszerét vezetik be, egy mindenkire kötelező oltási programot, ami megvédi a társadalmat a járványos fertőző betegségektől. Ezt dokumentálja az oltási könyvecske, ami végig kíséri mindenki gyerekkorát. Mindkét fehérjét (antigén és antitest) előállíthatjuk rekombináns fehérjeként, de itt az előadásban az aktív immunizálásra használatos antigén fehérjék gyártásáról lesz szó.

Az immunválaszt kiváltó vakcina jellege szerint lehet:

1. Élő, attenuált (legyengített, már nem virulens) kórokozó baktérium bevitele a szervezetbe.

Edward Jenner is ugyanezt csinálta, aki a védőoltások atyjának tekinthető. Fogalma sem volt az immunreakciókról, de az védőoltások atyja volt, mert azt ismerte fel, hogy a tehénhimlő az sokkal enyhébb lefolyású, mint az emberi himlő, viszont védettséget ad a fekete himlő ellen. Onnan jött rá, hogy a tehénhimlő a tehén tőgyén található himlős sebekről ismerhető fel és azok a fejönők, akik ezekkel a tehenekkel foglalkoztak, azok védettek lettek a himlő ellen. Az ő eljárása az volt, hogy a tehén tőgyén lévő himlős varokat lekaparta és ezt dörzsölte bele az emberen mesterségesen létrehozott sebbe. Így az ember megfertőződött a tehénhimlővel. Ettől keletkezett egy-két himlős folt ott az emberen, de ezek az emberek védettek lettek a himlővel szemben. Ez az 1800 körüli években történt. Edward Jenner is egy gyengébb kórokozót használt. A különbség csak az, hogy nem egy szándékosan legyengített kórokozóról beszélhetünk, hanem egy természetben előforduló kórokozóról. Manapság is használnak ilyent. Ilyen pl.: BCG oltás (a *Bacillus Calmette-Guérin* elnevezés rövidítése) A két francia kutató évekig laborban tenyésztette TBC (tuberkulózis) kórokozóját, és az már nem fertőzőképes, csak védettséget hoz létre a vele való fertőződés, betegséget nem. A törzs a *Mycobacterium tuberculosis avirulens*, immunogén változata.

2. Elölt, inaktivált kórokozó használata. A betegséget okozó törzset használják, de elpusztítják, inaktíválják. Szaporodni, így fertőzni nem tud, de a fehérjéi alkalmasak az immunválasz kiváltására. Baktériumoknál és vírusoknál is alkalmazott technika. Célszerű szelektíven a DNS-t elreagáltatni valamilyen szelektív reagenssel, úgy, hogy a fehérjék épen maradjanak.

3. Fehérje alegység- (subunit) vakcina: Az egész kórokozó helyett csak egy-két jellegzetes immunogén fehérjét visznek be. Ezeket rekombináns fehérjeként más, biztonságos törzsszel termeltetik meg. Biztonságosabb eljárás, mivel maga a mikroba sem elölt, sem élő formában nincs jelen, így garantáltan nem okozhat fertőzést.

4. Nukleinsav alegység vakcina: vírus RNS egy szakaszát, vagy vírus DNS egy vektorba ágyazott részletét tartalmazzák. A vakcinában található RNS vagy DNS szakasz a vírusnak csak egy bizonyos fehérjéjét vagy fehérje alegységét kódolja, ami a beoltani kívánt személy szervezetében fog átmenetileg kifejeződni. Kísérleti fázisban vannak, elsőként az “új koronavírus” vakcina fejlesztés keretében kerülhetnek humán gyógyászati engedélyezésre.

A vakcina gyártás technológiai lehetőségei:

1. Emlősállatokban (lovak, kutyák, disznók, lovak). Nem csak történelem, még ma is előfordul, hogy bizonyos állatokat megfertőznek kórokozókcal, és a vérükben pedig termelődik az ellenanyag. Ezzel a módszerrel passzív immunizálásra alkalmas oltóanyagokat lehet előállítani, hiszen a megfertőzött emlősállatok immunrendszere antitesteket termel az adott kórokozó antigénjei ellen.
2. Csirkeembrióban (tojásban). Az influenza vakcinák előállításának gyakori módja ez. Különlegesen steril tojásokban szaporítják a vírusokat, majd leszívják a megfelelő folyadékokat, és a bennük lévő vírusokat inaktíválják. Ezzel a módszerrel elölt kórokozót tartalmazó, aktív immunizálásra szolgáló vakcinákat lehet előállítani.
3. Attenuált baktérium fermentációval. Az attenuált szó azt jelenti, hogy legyengített baktériumok fermentációja, amelyek csökkent fertőző képességgel rendelkeznek, az immunrendszerünket viszont még így is képesek aktiválni, és többek között antitest termelésre készíteni. Aktív immunizálásra szolgáló módszer.
4. Rekombináns fehérjék előállítása baktérium fermentációval. Azonos a korábban említett alegység vakcina gyártással.
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével. Ez az eddigiekhez képest teljesen új forma. Eddig nem volt szó arról, hogy állati sejteket is lehet szaporítani. Ez egy külön területe a biotechnológiának, eltér a normál fermentációtól. A következő előadáson részletesen tárgyaljuk
6. Rekombináns fehérjék előállítása állati sejtek tenyésztésével.

Ezek az általános előállítási lehetőségek voltak, ezek közül részletesen a rekombináns fehérje vakcinákat tárgyaljuk.

A fehérje alegység vakcinák

Előállításuk lépései a következők:

1. A kórokozóból ki kell szedni vagy mesterségesen elő kell állítani azt a gént, amelyik a vakcinában antigénként használni kívánt felületi fehérjét kódolja.
2. Az antigént kódoló gént egy megfelelő vektorba ültetni.
3. Génmanipulációval bevinni a vektoron kódolt gént egy jól kezelhető gazdasejt kultúrába vagy gazdaszervezetbe.
4. A vektort felvett gazdasejt kultúrát fermentációval szaporítani, majd a fermentáció második lépésében a fehérjét a gazdasejtekkel megtermeltetni (kifejeztetni).
5. Feldolgozás: Először el kell dönteni, hogy a fehérje az extracelluláris vagy intracelluláris.
 - sejtek elválasztása
 - Intracelluláris esetben sejtfeltárás
 - Fehérje tisztítási lépések

A nukleinsav alegység vakcinák

Nukleinsavaknak összefoglaló néven az RNS-t és a DNS-t nevezik. Előállításuk lépései a következők:

1. A kórokozóból ki kell szedni vagy mesterségesen elő kell állítani azt a gént, amelyik a vakcinában antigénként használni kívánt felületi fehérjét kódolja.
- 2A. Az antigént kódoló gént egy megfelelő vektorba ültetni, majd ezt a vektort nagy mennyiségben előállítani.
- 2B. Az antigént kódoló mRNS szakaszt „kémcsőben” nagy mennyiségben előállítani, majd valamilyen biokompatibilis hordozó anyagba csomagolni.
3. Nukleinsav tisztítási lépéseket követően beadni a védőoltást.

Tehát itt kimarad az antigén fehérje gazdaszervezettel való megtermeltetése, hiszen maga az immunizálni kívánt emberi szervezet lesz az a „gazda”, aki a vírus alegység fehérjét kódoló RNS vagy DNS szakasról az antigénként szolgáló kórokozó fehérjét elő fogja állítani. Hatalmas előny lehet, hogy ezáltal lerövidül egy új vakcina kifejlesztésének és gyártásának ideje is, hiszen a gyártási folyamatot kevesebb változóval, kevesebb lépésben meg lehet valósítani. De kockázata is van minden újonnan alkalmazni kívánt módszernek, hiszen még nem volt mód az RNS technológiát korábbi vakcinák alkalmazásán keresztül kipróbálni.

Esettanulmány-1: Az „új koronavírus” (SARS-CoV-2) elleni vakcina fejlesztések

Az „új koronavírus” egy egyszálú RNS-vírus. A sejt plazmába jutó vírus RNS-ről a gazdasejt riboszómákon (fehérje összeszerelés helye) a vírus fehérjék is összeszerelődnek.

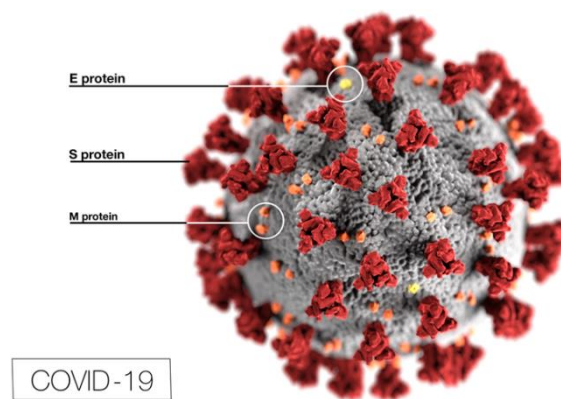
A fertőzéshez a vírusnak fel kell ismernie a gazdasejtjeit. Ezek egy bizonyos sejt felszíni molekulával, az angiotensin-II (ACE II) receptorral rendelkező (alsó) légúti sejtek.

Az angiotensin-II receptort a vírus felszínén található “tüske fehérjék” (spike protein vagy S protein, vörös színnel a 26. ábrán) “ismerik fel”, és ezek kapcsolódnak a célsejthez.

A fejlesztés alatt álló vakcinák túlnyomó többsége ezt a fehérjét kívánja közvetlenül vagy közvetve az immunizálni kívánt emberbe juttatni, és ezáltal az immunrendszert az esetleges fertőzésre felkészíteni. (Itt tehát aktív immunizálásról van szó).

De van egy vakcina, ami egy, a vírust felismerő antitestet (immunglobulint) kódoló DNS szakaszt próbál egy plazmid vektorban a szervezetbe juttatni. Ez közvetve ugyan, de passzív immunizálást jelent.

Passzív immunizálás a betegek gyógyult emberekből származó vérplazmával való beoltása is (vérplazma terápia).



26. ábra. A „coronavirus disease 2019” névre elkeresztelt járványt okozó SARS-Cov-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) külső fehérjeburkának modellje [2]

Nézzünk néhány konkrét példát a fejlesztés alatt álló „új koronavírus” elleni vakcinákra.

Fejlesztés alatt áll legalább két RNS vakcina (nukleinsav alegység vakcina), melyek az “új koronavírus” tüske fehérjéjének mRNS-ét (tehát a vírus genetikai kódjának egy részletét) tartalmazzák lipid nanorészecskébe csomagolva. A vakcinával az izomszövetbe juttatott mRNS-t a falósejtek bekebelezik, és riboszómáikon átírják az mRNS-ről a tüske fehérjét. Ezt követően a tüske fehérjét, mint antigént a felszínükön bemutatják az adaptív immunrendszer részét képező T sejteknek, ezzel elindítva a specifikus immunválasz folyamatát.

A módszer előnye, hogy nincs szükség semmilyen élőlényre a vakcina előállításához, mert az mRNS-t a sejten kívül is meg lehet szintetizálni. Ebből kifolyólag gyorsabb a jelenleg zajló tesztelés és jövőbeni gyártás folyamata is.

A nukleinsav alegység vakcinák másik “altípusát”, DNS vakcinát is fejlesztenek az “új koronavírus” ellen. Ezek a vakcinák a tüske fehérje DNS-re átírt genetikai kódját tartalmazzák. A tüske fehérjét kódoló RNS szakaszt egyrészt mesterségesen, reverz transzkriptáz enzim

alkalmazásával át lehet írni DNS szakaszra. Másrészt, mivel az „új koronavírus” teljes RNS szekvenciája ismert, ezért az ennek megfelelő DNS-t „kémcsőben”, mesterséges DNS szintézissel is elő lehet állítani. A tüske fehérjét kódoló génszakaszról ezt követően PCR reakcióval tetszőleges számú másolatot lehet készíteni. (A koronavírus RNS vírus ugyan, de nem retrovírus. Nem tartalmaz reverz transzkriptázt és így nem is képes a megfertőzött sejtben DNS-re átírni az örökítőanyagát. A vírus RNS nem jut be a sejtmagba, hanem a sejt plazmában marad, ahol a riboszómák felszínéhez kapcsolódva készülnek el róla a vírus fehérjéi.) A tüske fehérjét kódoló génszakaszt ezután egy vektorral juttatják be a szervezetbe. A DNS vakcinák hátránya lehet az RNS vakcinákhoz képest, hogy nemcsak a sejtbe, hanem a sejtmagba is be kell jutniuk, tehát két biológiai membránt (sejthártya és sejtmaghártya) kell „átszelniük” ahhoz, hogy megkezdődhessen róluk a beoltott személy sejtjeiben a vírus tüske fehérje mRNS-ének átírása.

Legyengített vírus vakcina fejlesztések is folynak az „új koronavírus” ellen, de ezek nem magát a koronavírusot tartalmazzák legyengített formában, hanem legyengített adenovírus törzsek genetikai kódjába vitték be a koronavírus tüske fehérjét kódoló RNS szakaszának reverz transzkriptáz segítségével DNS-re átírt megfelelőjét. Az adenovírusok kettős szálú DNS vírusok, melyek elsősorban a felső légutakat tudják megfertőzni. A vakcinaként gyártott legyengített, genetikailag módosított (tehát rekombináns) adenovírus törzs DNS-ébe bejuttatták az „új koronavírus” tüske fehérjéjének génjét. A koronavírus tüske fehérje így kifejeződik a vakcinával beadott adenovírus külső felszínén is, ezzel előkészítve az immunrendszert egy esetleges későbbi új koronavírus fertőzésre.

Új koronavírus fehérje alegység vakcina fejlesztésére is akad több példa. Ezek a vakcinák a koronavírus tüske fehérjéjét közvetlenül (azaz nem nukleinsavon kódolva) fogják majd az immunizálni kívánt személy szervezetébe juttatni. Ehhez viszont gazdasejt kultúrára van szükség. (Fehérjét is lehetne elméletileg sejten kívül, „kémcsőben” szintetizálni, de ez egyrészt sokkal költségesebb, másrészt sok fehérje úgy nyeri el funkcióképes formáját, hogy az élő sejtben a polipeptid lánc még átesik kisebb-nagyobb kémiai módosításokon. Ezeket poszt-transzlációs módosításoknak nevezik, és sokkal egyszerűbb őket élő sejtekre bízni, mint szerves kémiai úton reprodukálni.)

A Sanofi például rovarsejt fermentációval szeretne koronavírus elleni vakcinát gyártani. Ehhez a tüske fehérje kódjának megfelelő DNS szakaszt egy rovarsejteket fertőzni képes vírus vektorba, baculovírus vektorba juttatják be. A rovarsejteket ezután a genetikailag módosított baculovírussal kell megfertőzni ahhoz, hogy a koronavírus tüske fehérjét meg lehessen velük termeltetni. A British American Tobacco pedig bejelentette, hogy dohánynövények segítségével szeretne új koronavírus elleni vakcinát gyártani.

Inaktivált „új koronavírusokat” tartalmaz egy kínai cég vakcinája, amely a sikeresen védte meg a betegség kialakulásától a vakcina tesztelésének preklinikai fázisában „alkalmazott” rhesus majmokat.

A fentebb felsorolt kutatás-fejlesztési irányvonalak mind az aktív immunizálást tűzik ki célul, de futnak a passzív immunizálást célzó fejlesztési programok is. Passzív immunizálásnak akkor van létjogosultsága, ha az aktív immunizálásra már nincs idő (2-3 hétre volna szükség), mert az illető már fertőzött vagy nagy a fertőződés rövid időn belüli bekövetkezésének valószínűsége.

Egy amerikai gyógyszercég a vírust felismerő antitestet (immunglobulint) kódoló DNS szakaszt szeretne egy plazmid vektorban a szervezetbe juttatni. Erről a beoltott személyben íródna át az “új koronavírus” valamelyik antigénjét felismerni képes antitest fehérje. Ez közvetve ugyan, de passzív immunizálást jelent majd. A gyártó hangsúlyozza, hogy a plazmidban kódolt immunoglobulin fehérje DNS-e nem épül be a beteg saját (genomi, kromoszómális) DNS-ébe.

Végül a passzív immunizálásra kézenfekvő lehetőséget nyújt a fertőzésből már felgyógyult személyek vérplazmája (a vér sejtés elemeket nem tartalmazó fázisa), ami tartalmazza a vírus leküzdéséhez szükséges antitest fehérjéket. A módszert jelenleg is alkalmazzák már súlyos tüneteket mutató betegek kezelésére Magyarországon és külföldön is.

Az alábbi két esettanulmány 2020 előtt az órán leadott tananyag részét képezte. Az alább felsorolt esettanulmányok helyett az idén a koronavírus elleni vakcinafejlesztés témaköréből hoztam fel példákat. Amennyiben az alábbi két esettanulmány a május 4-i órán sem hangzik el, sem a 3. zárthelyin, sem a pót és pót-pót alkalmon nem fogom számonkérni ezeket.

Esettanulmány-2: Hepatitis B vírusbetegség vakcinája

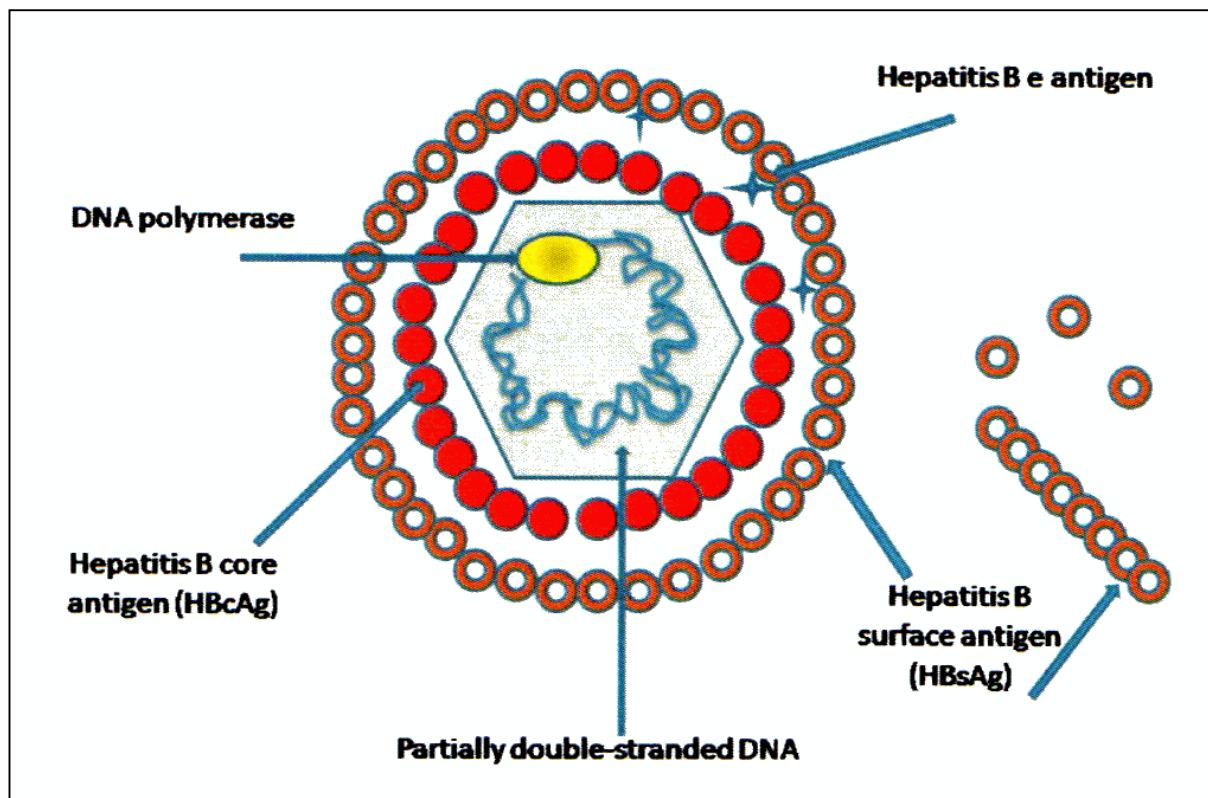
A hepatitis azt jelenti, hogy májgyulladás. Vírusos májgyulladás, melynek különböző típusai vannak (A, B,C, E, F, G), de az A B C azok, melyek a leggyakoribbak. Mindegyik májgyulladást okoz, de mások. A hepatitis A az székllettel terjed. A hepatitis A egy gyors lefolyású betegség, hamar gyógyítható, nagyon legyengült szervezeteknél okoz problémát. Az egészséges ember 1 hónap alatt különösebb következmények nélkül meggyógyul belőle.

A hepatitis B ennél keményebb, ezen is túl lehet lenni, de ez hónapokig tart. Krónikus is lehet, évekig is elhúzódhat és az esetek bizonyos százalékában tartós májkárosodást okoz. Kis százalékban májrákot is okozhat.

Ez a betegség ez testnedvekkel terjed, vérrel, és egyéb váladékokkal. Személyes érintkezéssel.

A vírus lappangási ideje több hónapig tart. A májat pusztítja el. A májsejteket támadja meg. A megtámadás után a májsejtekből kiszabadult vírusok a vérbe kerülnek és így vérrel terjed a betegség.

Amikor a vírusszaporodásról volt szó, elhangzott, hogy a vírusok összeépülésénél sok a selejt, a tokfehérjék egy része „kimarad”. Amikor szétesik a májsejt akkor nagyon sok tokfehérje, burokkfehérje is kiszabadul és kering a vérben. Ezek a mérete lényegesen kisebb, mint a teljes vírusé, tehát megfelelő szűréssel ezeket ki lehet válogatni a vérből. A fehérjék a betegek véréből kimutathatók és izolálhatók, így készültek a legelső hepatitis B vakcinák is.

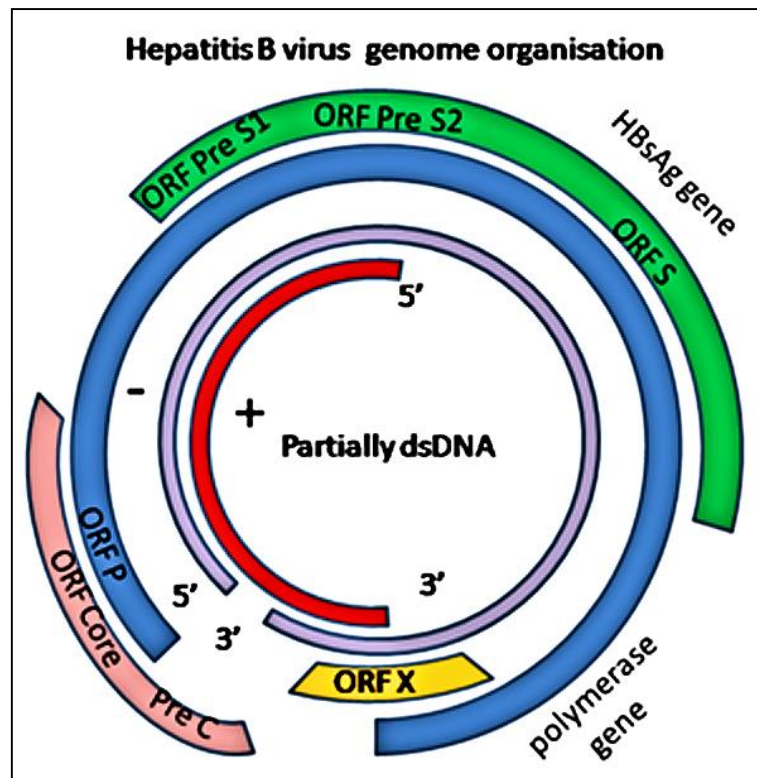


26. ábra: A Hepatitis B vírus felépítése

Ismét azt a felépítést láthatjuk, hogy középen van a nukleinsav és körülötte valamilyen burok, tok, borítás alakul ki. Tulajdonképpen összesen 3 féle fehérjéről van szó. Ami a felületén van pirossal jelölve az a HBs (s=surface). A következő, ami már kristályos szerkezetet mutat a HBc (c=core). A HBe (e=endo). Tehát 3 féle antigénje van a vírusnak: a felületi, a belső és az endo.

A Hepatitis B vírusban a DNS csak részben kettős szálú, van ahol szimpla szálú. A „-” szál (kodogén) 3200 nukleotid a „+” szál ennek csak 55-75%-a.

27. ábra: A Hepatitis DNS-e



A képen kékkel láthatjuk a core antigént, pirossal a surface antigént. A HBV DNS két szála nem egyforma hosszú. Itt is láthatjuk a két Pre, azaz bevezető szakasz, ami a későbbiekben lehasad róla. A HBsAg fehérje az 226 aminosav, lipoprotein, ez a kívánt termék.

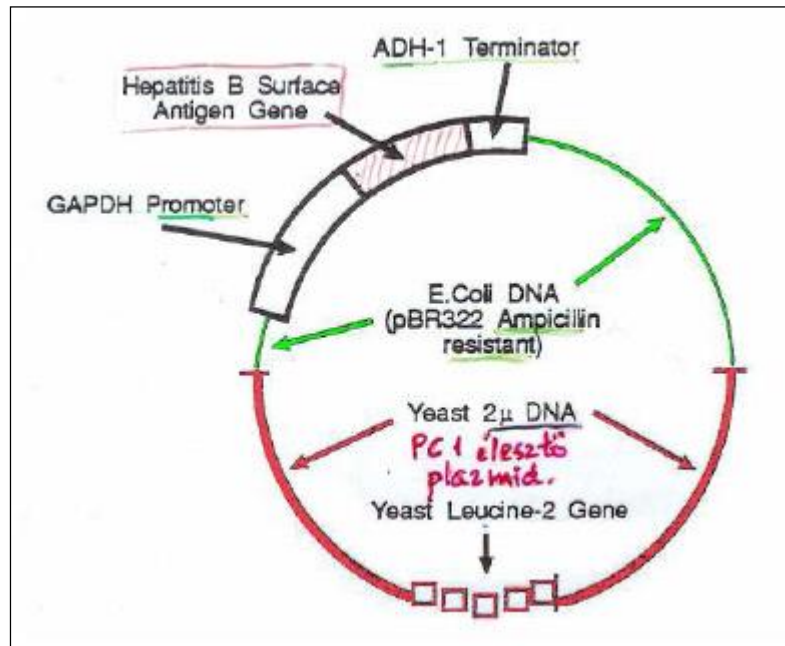
A felületi antigén génjét először *E. coli*-ba plazmiddal klónozták, termelte is, de nem-glikolizált formában (a *coli* nem tudta rárakni a cukrokat), nem alakult ki az aktív folding, ez azt jelenti, hogy nem alakult ki a molekula aktív harmadlagos szerkezete.

További megoldásokat, eukarióta gazdaszervezeteket kellett keresni. Sikeresen klónozták a gént először élesztőbe, majd emlős sejtekbe. Az élesztő glikozilálta, de a sejten belül tartotta a fehérjét (intacelluláris termék), míg az emlős sejtek kiválasztották a lébe a megfelelően glikozilált fehérjét (extracelluláris termék).

Mindkét fehérje engedélyezett, aktív vakcina, piaci termék. Az élesztős technológia olcsóbb és biztonságosabb (onkogének, vírusok előfordulása kizárt). Az emlős sejtenyészetekben minden ellenőrzés után is előfordulhatnak olyan lappangó vírusok, melyek az emberekre is veszélyesek lehetnek.

Maga a gén az *E. coli* pBR322-es antibiotikum rezisztens plazmidjába volt beépítve (az ábrán a zölddel jelölt felső rész). A célgén promóter és terminátor szakasz (együttesen: expressziós kazetta) fogja közre. Ez így nem működik az élesztőben, ezért egy ingázó vektort kellett kialakítani, ami a *coli*-ban és élesztőben is tud szaporodni. Egyesíteni kell egy élesztő plazmiddal (PC1, az ábrán pirossal jelölve). Ebben van az élesztőben működő replikációs origó, ami lehetővé teszi, hogy ott is szaporodjon. Markergénként a leucin (aminosav) bioszintézis

egy lépésének enzimét kódoló gén szerepel, ami akkor biztosít szelektív növekedést, ha az élesztő gazdasejt leucinra hiánymutáns.



28. ábra: Az ingázó vektor szerkezete

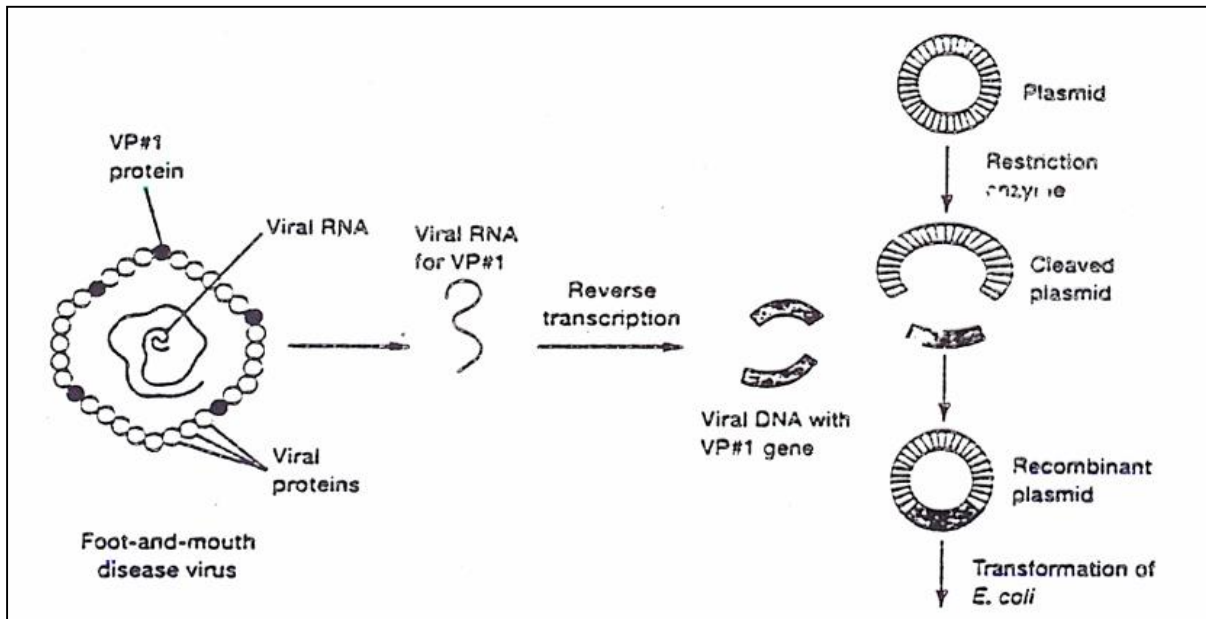
Technológia: szakaszos élesztő fermentáció. Az első, szaporítási fázisban Leu-mentes tápoldatban nevelik a tenyészetet – ekkor azok a sejtek szaporodnak gyorsabban, amelyekben sok plazmid van, ezek tudnak sok leucint termelni a fehérje szintézishez. A második fázisban komplex, fehérje hidrolizátumot tartalmazó tápoldatot adnak, az ebben lévő sok aminosav elősegíti a termék fehérje bioszintézisét.

Feldolgozás: a fermentáció végén a sejteket centrifugálással elválasztják létől, az antigén fehérje a sejtekben maradt. A sejtek feltárása (roncsolása) következik. A kapott kvaccsból több tisztítási lépéssel nyerik ki a célfehérjét.

A **termék ellenőrzése:** sokféle analitikai vizsgálatot végeznek, a fő célok a hatásosság és a tisztaság ellenőrzése. A hatásosságot tökéletesen csak élő állatokon lehet bizonyítani, de ezt érthető állatvédelmi okokból nagyon korlátozottan alkalmazzák. Ehelyett inkább a termelt antigént laboratóriumi körülmények között antitestekkel hozzák össze, és immunreakciójuk erősségét vizsgálják. A tisztaság vizsgálata kiterjed a mikrobamentességre, más fehérjék jelenlétére, így a baktériumok által termelt toxinokra is. Speciális esete a toxinoknak a pirogének csoportja, ezek lázat okoznak. Különösen szigorúak az előírások a plazmid és más DNS jelenlétére. A határ pikogram/liter nagyságrendben van! (1 pikogram = 10^{-12} g, a gramm milliomod részének milliomod része.) Ehhez nagyon-nagyon érzékeny analitikai módszereket kellett kifejleszteni.

Esettanulmány-3: Száj- és körömfájás (alegység)vakcina

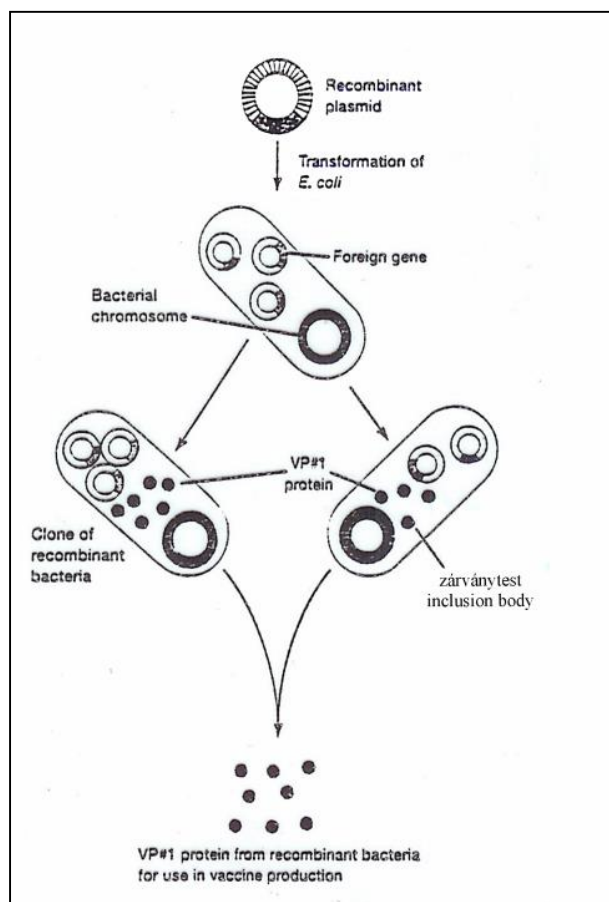
Az SZKF a kérődző állatok erősen fertőző megbetegedése, az állatok leromlásával, kis százalékban elhullásával jár. Gazdaságilag is veszélyes, mert ha egy eset is előfordul, akkor



zárlatot rendelnek el, és a fél országból nem lehet sem szállítani, sem eladni egyetlen vágóállatot sem legalább egy fél évig. Fontossága miatt ez volt az első rekombináns fehérje vakcina az állategészségügyben.

Tudományos érdekessége, hogy ez egy RNS vírus. A génmanipuláció első lépése tehát, hogy a vírus RNS-ből elő kell állítani a megfelelő DNS-t, és csak ezután kezdetük meg a vektorba építést.

Az alegység vakcina kifejeződik *E. coli*-ban, de egyrészt intracelluláris, azaz a sejten belül marad, másrészt kicsapódik a citoplazmában, ún. zárványtestet képez. Emiatt a fehérje kinyerése bonyolultabb, több lépésből áll. A sejtek feltárása után a zárványokat el kell különíteni, és különleges oldószerben fel kell oldani. A feloldott fehérje még nem „érett”, nem vette fel megfelelő háromdimenziós formáját, ez a „hajtogatás” újabb technológiai lépés. Mindemellett a szokásos fehérje tisztítási műveleteket is végrehajtják.



Irodalomjegyzék az írott jegyzet 2020. áprilisi kiegészítéséhez

1. Immunológia. Anna, Erdei, Gabriella, Sármay, József, Prechl (2012) Medicina Könyvkiadó Zrt. ISBN: 978 963 226 370 0
2. Készítette: CDC/ Alissa Eckert, MS; Dan Higgins, MAM - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number. Közkincs,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=86425233>