


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.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az inzulin bioszintézise

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






EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 aminosavszekvencia meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.


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

EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

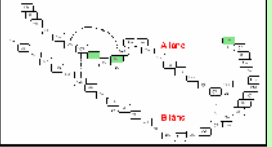


EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


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




EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 nyerhető 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 főlöslégekben treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra. A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak.



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kivonás hasnyálmirigyb I - átalakítás

A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:

7

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

Inzulin fermentációs el állítása

Prokarióttal 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

A pre-pro-inzulin enzim hasításai

11

Kett s fermentáció

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

EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Inzulin feldolgozás

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

12

VAKCINAGYÁRTÁS

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

Passzív immunizálás	Aktív immunizálás
antitest (antitoxin) bevitale	antigén bevitale
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, s t izolálhatók – 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 tápoldattal
Azután termeltetés komplex tápoldaton

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

22

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

A felületi antigén génjét el ször *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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HEPATITIS B VAKCINA

A termék vizsgálata:

- Azonosítás: immunanalitika
- DNS tartalom: max 10 pikogram/l !!!
- Hatékonyság: állatokban
- Pirogénok: 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

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

21

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 állategészségügyben.

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

SZKF VAKCINA

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

The diagram illustrates the cloning process: 1. A Foot-and-mouth disease virus particle is shown with its VP1 protein and viral RNA. 2. Reverse transcription converts the viral RNA into viral DNA containing the VP1 gene. 3. A circular plasmid is cut with a restriction enzyme to create a cleaved plasmid. 4. The viral DNA with the VP1 gene is inserted into the cleaved plasmid to form a recombinant plasmid. 5. This recombinant plasmid is then transformed into *E. coli* cells.

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

The diagram shows the production of VP1 protein: 1. A recombinant plasmid is transformed into *E. coli*. 2. The bacteria contain bacterial chromosomes with foreign genes. 3. Clones of recombinant bacteria are grown, producing VP1 protein. 4. The protein forms inclusion bodies (zárványtest). 5. The final product is VP1 protein from recombinant bacteria for use in vaccine production.