Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στον Ιατροφαρμακευτικό Τομέα

Παρασκευή Αμινοξέων

• Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αμινοξέων, τα οποία βρίσκουν εφαρμογή ως πρόσθετα τροφίμων, ως ουσίες για ιατρική χρήση, ως ενδιάμεσα μόρια κατά τη σύνθεση άλλων ενώσεων, κλπ.

• Η τεχνολογική σημασία των ενζύμων εστιάζεται κυρίως στο γεγονός ότι ορισμένα ένζυμα αναγνωρίζουν ένα από τα δύο ισομερή των αμινοξέων και των παραγώγων τους.

• Αντιθέτως, οι μέθοδοι χημικής συνθέσεως αδυνατούν να εξασφαλίσουν ανάλογη εκλεκτικότητα.

• Οι σημαντικότερες εφαρμογές βιοκαταλυτών στη βιομηχανία παραγωγής αμινοξέων είναι:

1. Ο διαχωρισμός μίγματος D,L-αμινοξέων ή παραγώγων τους, και

2. Η παρασκευή συγκεκριμένων αμινοξέων από άλλες ενώσεις ή από άλλα αμινοξέα.

Ενζυμικός διαχωρισμός μίγματος D,L-αμινοξέων και παραγώγων τους

• Το ένζυμο **αμινοκυλάση** ή **ακυλάση** L-αμινοξέων υδρολύει **εκλεκτικά** το L-ισομερές ακετυλο-D,L-αμινοξέων.

• Η ιδιότητα αυτή αποτέλεσε την αφορμή της πρώτης ενζυμικής εφαρμογής, όπου από ρακεμικό μίγμα χημικής προέλευσης, είχαμε παραγωγή L-αμινοξέων.

• Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην παραγωγή L-μεθειονίνης, αλλά και στην παραγωγή Phe, Ala, Trp και Val.

• Το ένζυμο αμινοκυλάση του μύκητα *Aspergillus oryzae* ακινητοποιείται σε ανιοντοανταλλάκτη (DEAE-Sephadex).

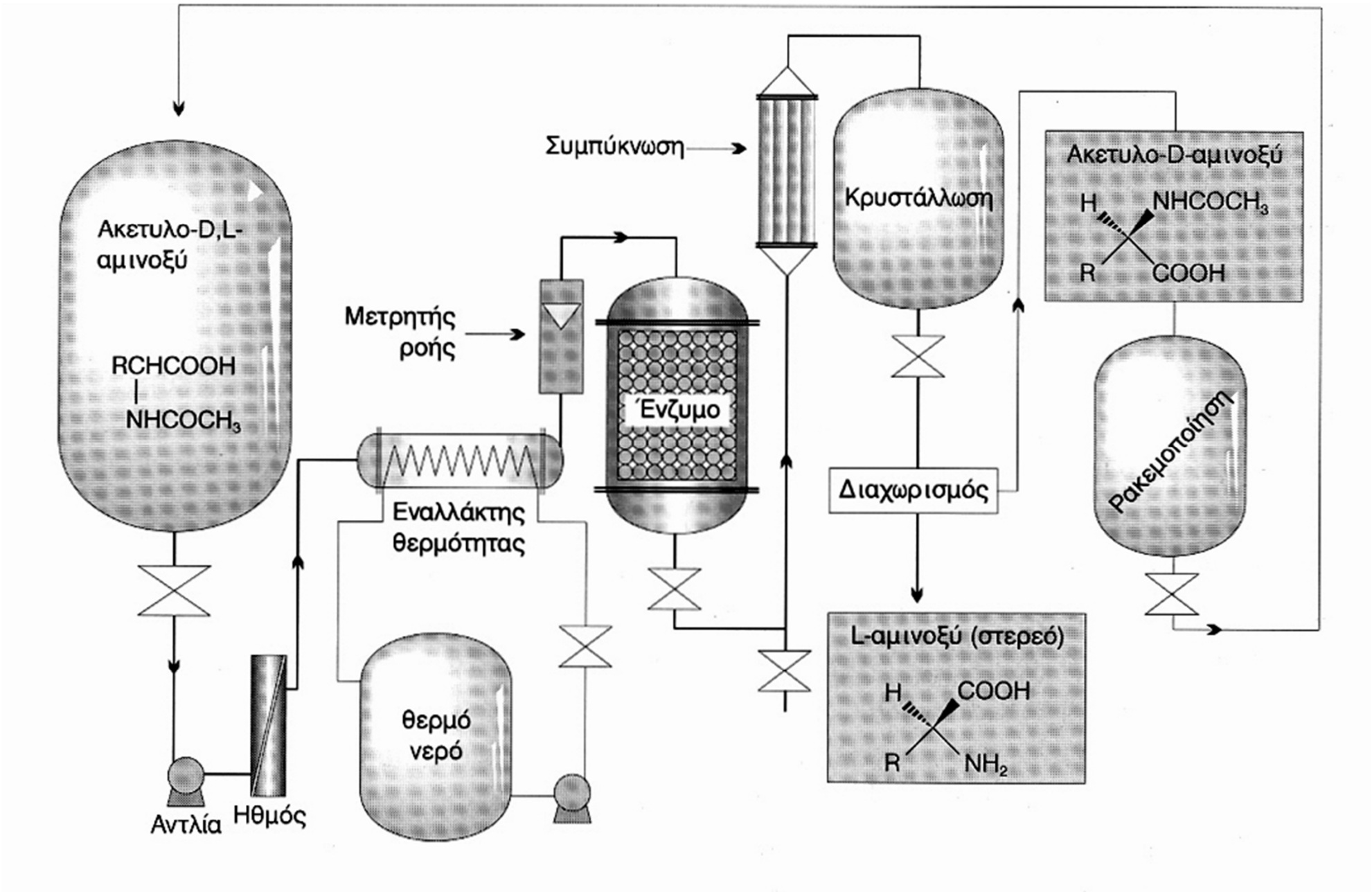
• Το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρεί την δραστικότητά του έως 70°C, ενώ αναγεννάται εύκολα *in situ* κάθε μήνα (το ένζυμο αδρανοποιείται μετά από 2 μήνες λειτουργίας στους 50°C).

• Σύμφωνα με τη μέθοδο, το αρχικό ρακεμικό μίγμα αμινοξέων μετατρέπεται χημικώς σε ρακεμικό μίγμα N-ακετυλο-αμινοξέων παρουσία οξικού ανυδρίτη.

• Στη συνέχεια, το μίγμα διαβιβάζεται συνεχώς στον βιοαντιδραστήρα στήλης που φέρει το ακινητοποιημένο ένζυμο.

• Από τον βιοαντιδραστήρα λαμβάνεται μίγμα L-αμινοξέος και ακετυλο-D-αμινοξέος, το οποίο συμπυκνώνεται με εξάτμιση.

• Το L-αμινοξύ κατακρημνίζεται και παραλαμβάνεται, ενώ το ακετυλο-D-αμινοξύ ρακεμοποιείται χημικώς και ανακυκλώνεται στον βιοαντιδραστήρα (απόδοση μέχρι και 90%).



Σχ. 121. Διεργασία παρασκευής L-αμινοξέων από ρακεμικό μίγμα D,L-αμινοξέων.

Ενζυμική παρασκευή αμινοξέων

• Σημαντικές εφαρμογές αποτελούν οι περιπτώσεις των L-Asp και L-Ala.

• Το L-Asp χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα και σε τροφές, καθώς και στη σύνθεση του γλυκαντικού διπεπτιδίου ασπαρτάμη.

• Η παρασκευή του L-Asp επιτυγχάνεται με ακινητοποιημένα κύτταρα *Esherichia coli* με δραστικότητα αμμωνιολυάσης στο φυσικό πολυμερές *κ*-καραγενάνη μέσω εγκλωβισμού.

• Τα ακινητοποιημένα κύτταρα σταθεροποιούνται στο πολυμερές μέσω γλουταραλαλδεΰδης.

• Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται φουμαρικό αμμώνιο, το οποίο μετατρέπεται σε L-Asp, παρουσία Mg^{2+} (ενεργοποιητής του ενζύμου).

• Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί απομονωμένο και ακινητοποιημένο στον ίδιο φορέα ένζυμο (απόδοση 95%, pH: 8.5, 37°C, $t_{1/2}$= 4 μήνες).

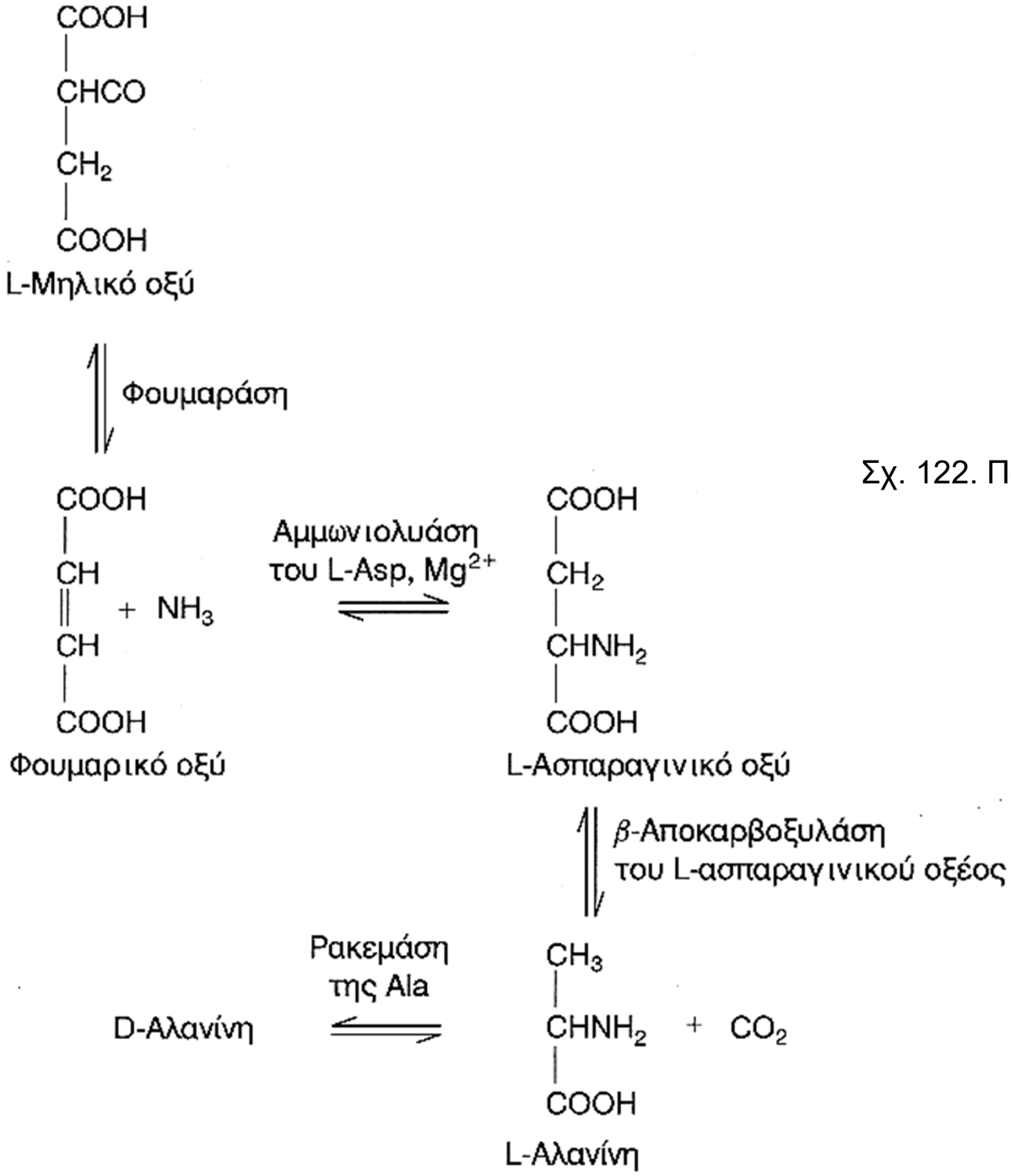
• Η ίδια μέθοδος εφαρμόζεται και για παραγωγή L-Ala από L-Asp, το οποίο λαμβάνεται από φουμαρικό οξύ.

• Η διεργασία προβλέπει την χρήση δύο βιοαντιδραστήρων στήλης σε σειρά.

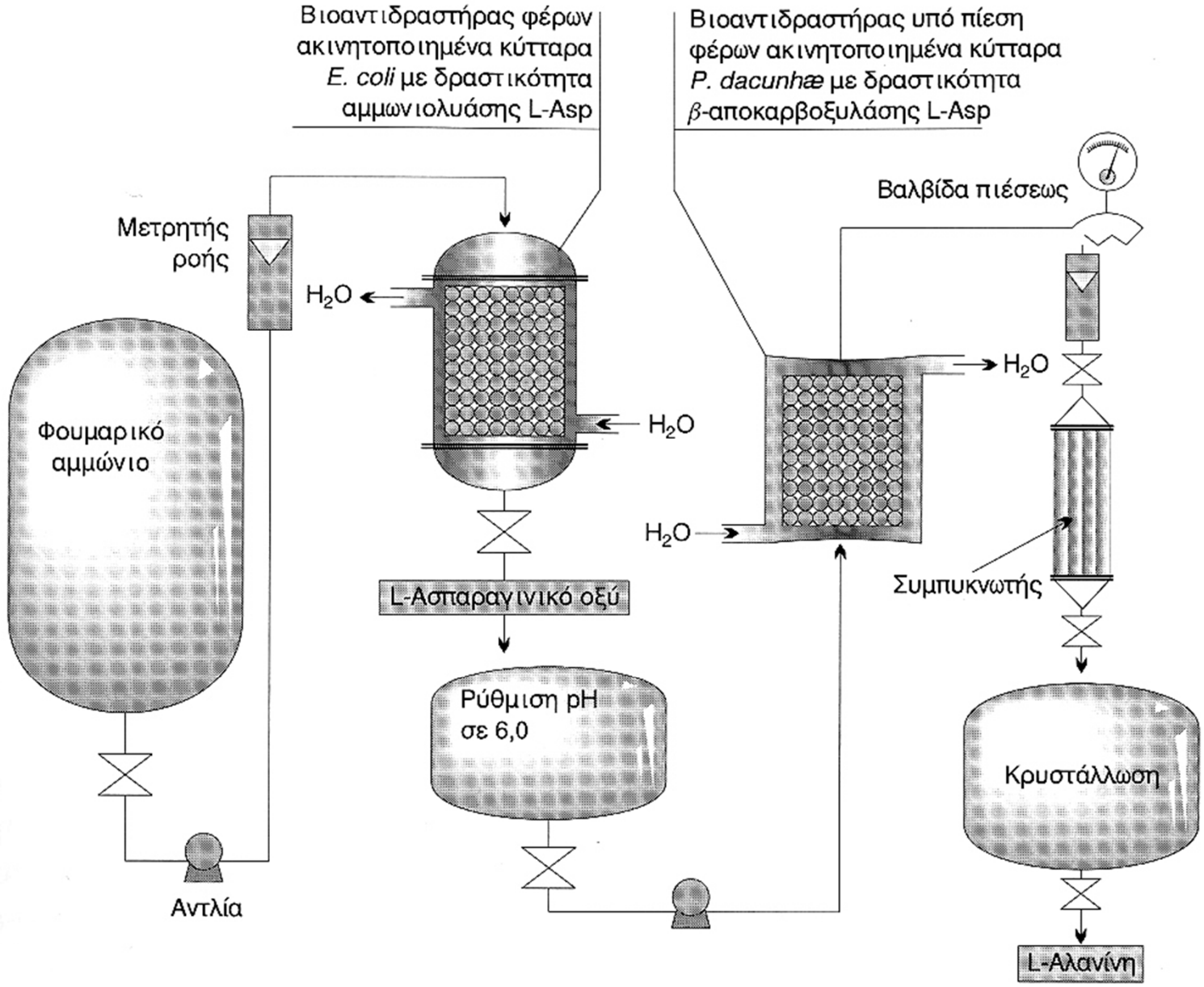
• Ο πρώτος φέρει ακινητοποιήμενα κύτταρα *E. coli* με δραστικότητα αμμωνιολυάσης του L-Asp (pH: 8.5), ενώ ο δεύτερος ακινητοποιημένα κύτταρα *Pseudomonas dacunhae* με δραστικότητα *β*-αποκαρβοξυλάσης του L-Asp (pH: 6.0), οπότε το L-Asp μετατρέπεται σε L-Ala και CO_2.

• Προβλήματα της διεργασίας αποτελούν το ένζυμο φουμαράση στον 1^{ο} βιοαντιδραστήρα, το οποίο αναλώνει μέρος του φουμαρικού οξέος σε L-μηλικό οξύ και το ένζυμο ρακεμάση της αλανίνης που μετατρέπει την L-Ala σε D-Ala στον 2^{ο} βιοαντιδραστήρα.

• Γι' αυτό, συνίσταται η αδρανοποίηση των παραπάνω ενζύμων μέσω έκθεσης των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε κατάλληλες συνθήκες (pH: 5.0, 45°C, 1h για αδρανοποίηση της φουμαράσης και pH: 4.7, 30°C, 1h για αδρανοποίηση της ρακεμάσης).



Σχ. 122. Παρασκευή L-Asp και L-Ala.

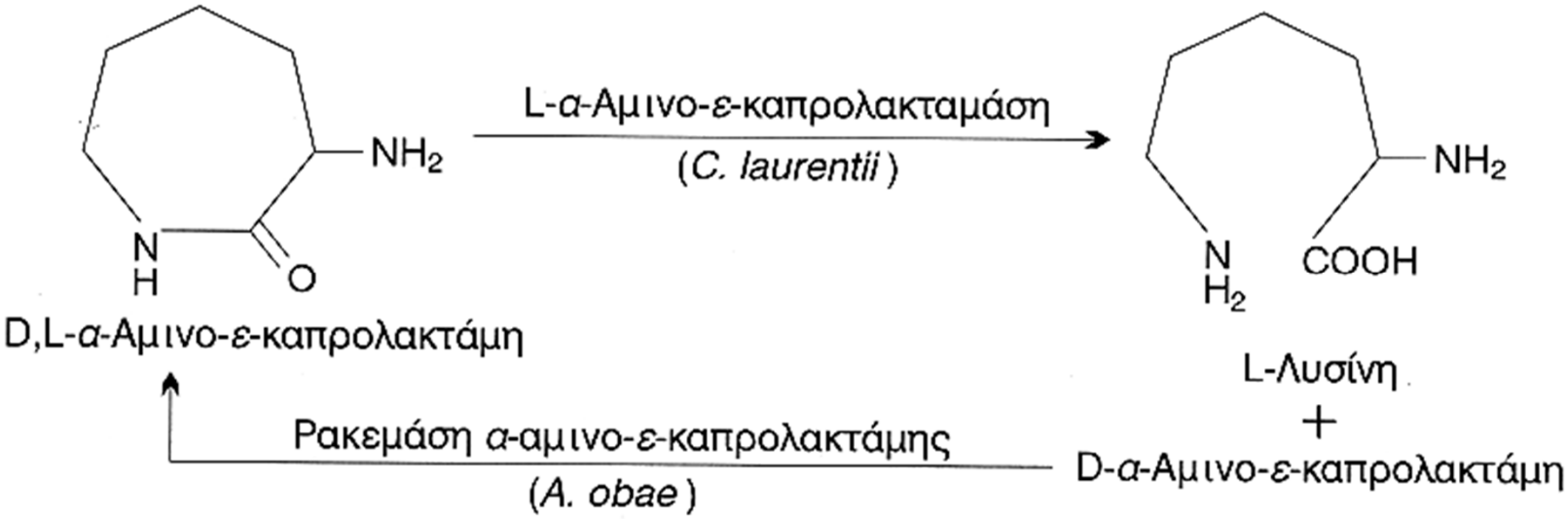


Σχ. 123. Διεργασία παρασκευής L-Asp και L-Ala.

• Η L-Lys χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε τροφές.

• Εκτός από τη δυνατότητα παραγωγής μέσω μικροβιακών καλλιεργειών, είναι δυνατόν να παραχθεί από την συνθετική ένωση D,L-*α*-αμινο-*ε*-καπρολακτάμη μετά από εκλεκτική υδρόλυση προς μίγμα D-*α*-αμινο-*ε*-καπρολακτάμης και L-Lys, παρουσία ακινητοποιημένων κυττάρων *Cryptococcus laurentii*.

• Ρακεμοποίηση του D-ισομερούς επιτυγχάνεται από ακινητοποιημένα κύτταρα *Achromobacter obae* (και τα δύο ένζυμα απαιτούν το ίδιο pH, οπότε μπορούν να συνυπάρχουν στον βιοαντιδραστήρα).



Σχ. 124. Ενζυμική παρασκευή L-Lys από ρακεμικό μίγμα D,L-*α*-αμινο-*ε*-καπρολακτάμης.

Εφαρμογές στην Σύνθεση Ολιγοσακχαριτών και Σακχαρο-Ενώσεων

• Σε αντίθεση με τις χημικές μεθόδους συνθέσεως, η χρησιμοποίηση ενζύμων ως καταλυτών για τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών και παραγώγων τους εξασφαλίζει εκλεκτικότητα ως προς τη θέση και την στερεοδιάταξη των υποστρωμάτων.

• Σημαντικά ένζυμα είναι οι γλυκοζιτάσες και οι γλυκοζυλομεταφοράσες.

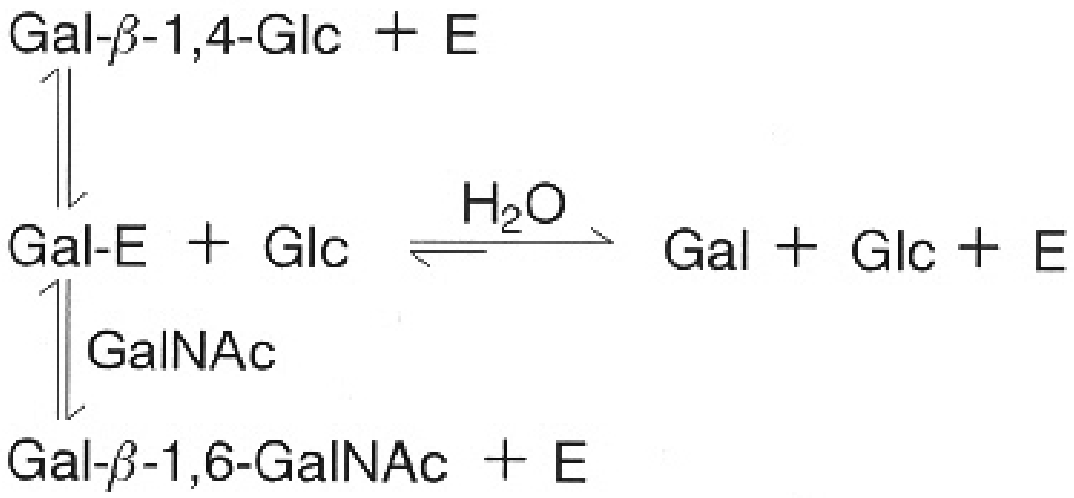
• Οι γλυκοζιτάσες καταλύουν την αντιστρέψιμη υδρόλυση γλυκοζιτικών δεσμών και την ανταλλαγή τελικού σακχάρου με κάποιο άλλο (αντίδραση μεταγλυκοζυλιώσεως).

• Οι γλυκοζυλομεταφοράσες καταλύουν την μεταφορά σακχάρου από κάποιο μόριο-δότη (συνήθως διφωσφορο-νουκλεοζιτικό σάκχαρο) προς κάποιο μόριο-δέκτη.

• Ακινητοποιημένη *β*-γαλακτοζιτάση καταλύει την σύνθεση του δισακχαρίτη γαλακτοζυλο-Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη από λακτόζη.

• Σε κατάσταση ισορροπίας, ευνοείται η υδρόλυση του ενδιάμεσου συμπλόκου γαλακτόζης-ενζύμου.

• Ωστόσο, επειδή η αντίδραση μεταγαλακτοζυλιώσεως είναι ταχεία, επιτυγχάνεται απόδοση περίπου 25%.



Σχ. 125. Ενζυμική σύνθεση γαλακτοζυλο-Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνης (Gal-*β*-1,6-GalNAc) με ακινητοποιημένη *β*-γαλακτοζιτάση (Ε). GalNAc: Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη, Gal-*β*-1,4-Glc: λακτόζη.

Αναλυτικές Εφαρμογές

• Οι ενζυμικές αναλυτικές εφαρμογές αποσκοπούν στην ανίχνευση και στον ακριβή προσδιορισμό πολλών βιολογικών ουσιών. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Αυτές στις οποίες το ένζυμο χρησιμοποιείται είτε ως δείκτης του οποίου προσδιορίζεται η συγκέντρωση στο δείγμα, είτε ως αντιδραστήριο το οποίο υποβοηθεί τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ουσίας-στόχου,

2. Αυτές στις οποίες το ένζυμο χρησιμεύει εμμέσως για να ενισχύσει ή και για να καταστήσει εμφανή μια άλλη μη ενζυμική αντίδραση αναλύσεως.

• Η μεταβολή της συγκέντρωσης συγκεκριμένων ενζύμων σε βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα, κλπ) αποτελεί δείκτη διαφόρων παθήσεων, καθώς κύτταρα των νοσούντων οργάνων εμφανίζουν μειωμένη κατακράτηση του περιεχομένου τους, με συνέπεια να χάνουν μέρος των ενζύμων τους.

• Κύρια ένζυμα-δείκτες είναι:

Α. Η αμινοτρανσφεράση ή αμινομεταφοράση της L-Ala (ALAT),

Β. Η αμινοτρανσφεράση ή αμινομεταφοράση του Asp (ASAT), και

Γ. Η κινάση ή φωσφοκινάση της κρεατίνης (CK ή CPK).

• Καθώς οι δραστικότητες των ανωτέρω ενζύμων δεν προσδιορίζονται εύκολα, οι ενζυμικές αντιδράσεις παρακολουθούνται έμμεσα, συζευγνυόμενες με μία ή περισσότερες άλλες βοηθητικές αντιδράσεις.

• Έτσι, η αρχική κύρια αντίδραση «ανιχνεύεται» έμμεσα παρακολουθώντας την μεταβολή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (συνήθως παρακολουθείται το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης συνενζύμων όπως NADH, NADPH, FAD, FMN ή κάποιας άλλης χρωστικής ένωσης που παράγεται ή καταναλώνεται).

• Η χρησιμοποίηση των ανωτέρω συνενζύμων είναι πολύ συνήθης πρακτική, καθώς τα συνένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την δραστικότητα των αφυδρογονασών, οι οποίες βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην ενζυμική ανάλυση.

• Συνεπώς, η αντίδραση οποιασδήποτε αφυδρογονάσης κατά την οποία ανάγεται $NAD^+/NADP^+$ ή οξειδώνεται NADH/NADPH είναι δυνατόν να μετρηθεί, καθώς καταγράφεται αντίστοιχα η αύξηση ή μείωση της οπτικής απορρόφησης της αντίδρασης στα 340nm.

• Ισχύει:

$$A = \varepsilon \times c \times d \qquad (54)$$

• Όπου: A: οπτική απορρόφηση,

ε: συντελεστής αποσβέσεως,

c: συγκέντρωση συνενζύμου ή χρωστικής,

d: μήκος διέλευσης φωτός δια μέσου του δείγματος.

• Με γνωστά τα A, c και d από την (54) προσδιορίζεται το ε και με γνωστό και σταθερό το ε, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του συνενζύμου σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

Αντιδράσεις προσδιορισμού ALAT

$$\text{L-αλανίνη} + \alpha\text{-κετογλουταρικό οξύ} \xrightarrow{\text{ALAT}} \text{L-γλουταμινικό οξύ} + \text{πυροσταφυλικό οξύ}$$

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{αφυδρογονάση}]{\text{Γαλακτική}} \text{L-γαλακτικό οξύ} + \text{NAD}^+$$

Αντιδράσεις προσδιορισμού ASAT

$$\text{L-ασπαραγινικό οξύ} + \alpha\text{-κετογλουταρικό οξύ} \xrightarrow{\text{ASAT}} \text{οξαλοξικό οξύ} + \text{L-γλουταμινικό οξύ}$$

$$\text{οξαλοξικό οξύ} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{αφυδρογονάση}]{\text{Μηλική}} \text{L-μηλικό οξύ} + \text{NAD}^+$$

Σχ. 126. Παραδείγματα αντιδράσεων προσδιορισμού ALAT και ASAT.

Αντιδράσεις προσδιορισμού CK

(α)

$$\text{φωσφορική κρεατίνη} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{κρεατίνη} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{γλυκόζη} \xrightarrow{\text{Εξωκινάση}} \text{ADP} + \text{6-φωσφορική γλυκόζη}$$

$$\text{6-φωσφορική γλυκόζη} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης}} \text{6-φωσφορική γλυκονολακτόνη} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

(β)

$$\text{κρεατίνη} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{φωσφορική κρεατίνη} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ} \xrightarrow{\text{Πυροσταφυλική κινάση}} \text{πυροσταφυλικό οξύ} + \text{ATP}$$

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Γαλακτική αφυδρογονάση}} \text{L-γαλακτικό οξύ} + \text{NAD}^+$$

Σχ. 127. Παραδείγματα αντιδράσεων προσδιορισμού CK.

Τα ένζυμα ως αντιδραστήρια

• Τα ένζυμα αποτελούν συστατικά πολλών διαγνωστικών εμπορικών πακέτων (kit) για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ουσιών σε βιολογικά υγρά και τρόφιμα.

• Για την ανίχνευση της κύριας αντίδρασης είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση βοηθητικών ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες συνήθως είναι συζευγμένες με την κύρια αντίδραση.

Αντιδράσεις προσδιορισμού ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

$$\text{RCOO-χοληστερόλη} + H_2O \xrightarrow{\text{Υδρολάση εστέρων της χοληστερόλης}} \text{(–OH)-χοληστερόλη} + \text{RCOOH}$$

$$\text{χοληστερόλη} + H_2O + \tfrac{1}{2}\,O_2 \xrightarrow{\text{Οξειδάση της χοληστερόλης}} \text{χοληστεν-4-όνη-3} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-αμινο-αντιπυρίνη} + \text{φαινόλη} \xrightarrow{\text{Υπεροξειδάση}} \text{4-(4-βενζοκινονο-μονοϊμινο)-φαιναζόνη} + 4H_2O\ (510\text{nm})$$

Σχ. 128. Αντιδράσεις προσδιορισμού χοληστερόλης.

Αντιδράσεις προσδιορισμού ΓΛΥΚΟΖΗΣ

$$\beta\text{-D-γλυκόζη} + FAD + H_2O + \tfrac{1}{2}\,O_2 \xrightarrow{\text{Οξειδάση της γλυκόζης}} \delta\text{-γλυκονολακτόνη} + FADH_2 + H_2O_2$$

$$\delta\text{-γλυκονολακτόνη} \rightarrow \text{D-γλυκονικό οξύ}$$

$$2H_2O_2 + \text{4-αμινο-αντιπυρίνη} + \text{φαινόλη} \xrightarrow{\text{Υπεροξειδάση}} \text{4-(4-βενζοκινονο-μονοϊμινο)-φαιναζόνη} + 4H_2O\ (510nm)$$

Σχ. 129. Αντιδράσεις προσδιορισμού γλυκόζης.

Βιοαισθητήρες (biosensors)

• Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που χρησιμοποιούν ακινητοποιημένους βιοκαταλύτες οι οποίοι καταλύουν μια εξειδικευμένη αντίδραση.

• Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από ένα βιολογικό και ένα ηλεκτρονικό τμήμα.

• Στο βιολογικό τμήμα εντοπίζεται το ακινητοποιημένο ένζυμο και πραγματοποιείται η ενζυμική αντίδραση.

• Συνέπεια της ενζυμικής αντίδρασης είναι η μεταβολή κάποιας χημικής ή φυσικής παραμέτρου του συστήματος η οποία μεταδίδεται στο ηλεκτρονικό τμήμα του βιοαισθητήρα που επικοινωνεί με το βιολογικό τμήμα.

Παραδείγματα βιοαισθητήρων

Βιοαισθητήρας γλυκόζης

• Αποτελεί συνδυασμό ακινητοποιημένης οξειδάσης της γλυκόζης και ηλεκτροδίου οξυγόνου.

• Για να μετρηθεί η ροή ηλεκτρονίων και η μεταβολή της συγκέντρωσης ελεύθερου οξυγόνου, εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό μεταξύ του ηλεκτροδίου Pt της καθόδου και της αναφοράς Ag/AgCl.

• Παρουσία κορεσμένου διαλύματος KCl πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις:

Κάθοδος (-0.6V): $O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$

Άνοδος: $4Ag^o + 4Cl^- \longrightarrow 4AgCl + 4e^-$

• Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από εξωτερική συνθετική μεμβράνη, η οποία έρχεται σε επαφή με το προς ανάλυση δείγμα.

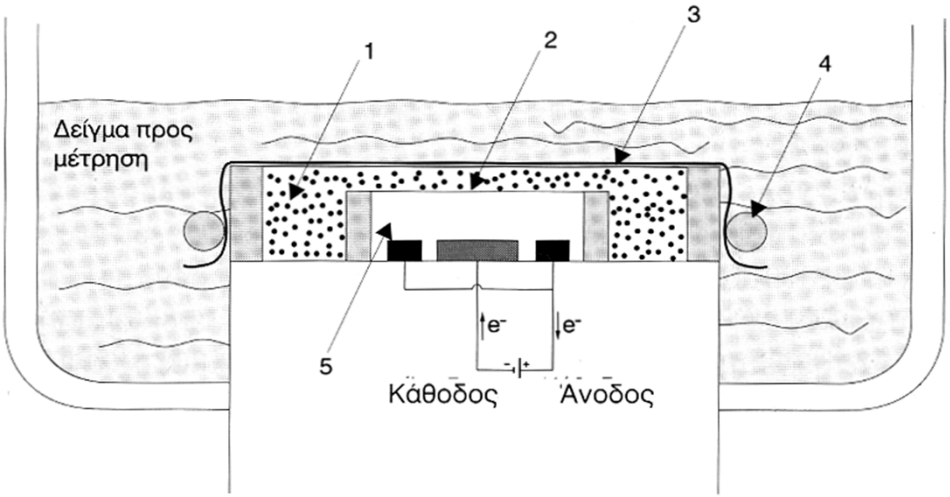
• Το μέγεθος των πόρων της εξωτερικής μεμβράνης είναι τέτοιο ώστε να διαχέονται ελεύθερα γλυκόζη, οξυγόνο, υπεροξείδιο του υδρογόνου και άλλες μικρού μεγέθους ενώσεις, όχι όμως μακρομοριακές ενώσεις και κύτταρα του δείγματος.

• Εσωτερικά της μεμβράνης, υπάρχει άλλη μικροπορώδης μεμβράνη (συνήθως από Teflon) διαπερατή μόνο από οξυγόνο, όχι όμως από γλυκόζη, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ και άλλες ουσίες που παρενοχλούν τη λειτουργία του βιοαισθητήρα.

• Στον χώρο μεταξύ των μεμβρανών βρίσκεται ακινητοποιημένο το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης σε πορώδη σφαιρίδια ρητίνης.

• Η γλυκόζη διαχέεται μέσω της εξωτερικής μεμβράνης και μετατρέπεται από την οξειδάση σε *δ*-γλυκονολακτόνη/γλυκονικό οξύ, καταναλώνεται οξυγόνο και παράγεται H_2O_2.

• Εσωτερικά της μικροπορώδους μεμβράνης βρίσκεται το αμπερομετρικό ηλεκτρόδιο, στο οποίο μετράει το εναπομένον οξυγόνο στην κάθοδο.



Σχ. 130. Ενζυμικό ηλεκτρόδιο γλυκόζης. (1) Ακινητοποιημένη οξειδάση της γλυκόζης, (2) Συνθετική μεμβράνη Teflon, (3) Μεμβράνη οξικής κυτταρίνης, (4) Ελαστικός δακτύλιος, (5) Κορεσμένο διάλυμα KCl.

Ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες

• Πολλές ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν σε απελευθέρωση ή κατανάλωση πρωτονίων (εξαρτάται από την αντίδραση, από το pK_a των ομάδων και από το pH του διαλύματος).

• Αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης είναι η συσσώρευση πρωτονίων στην επιφάνεια εκλεκτικού ηλεκτροδίου και η ανάπτυξη δυναμικού, το οποίο μπορεί να μετρηθεί.

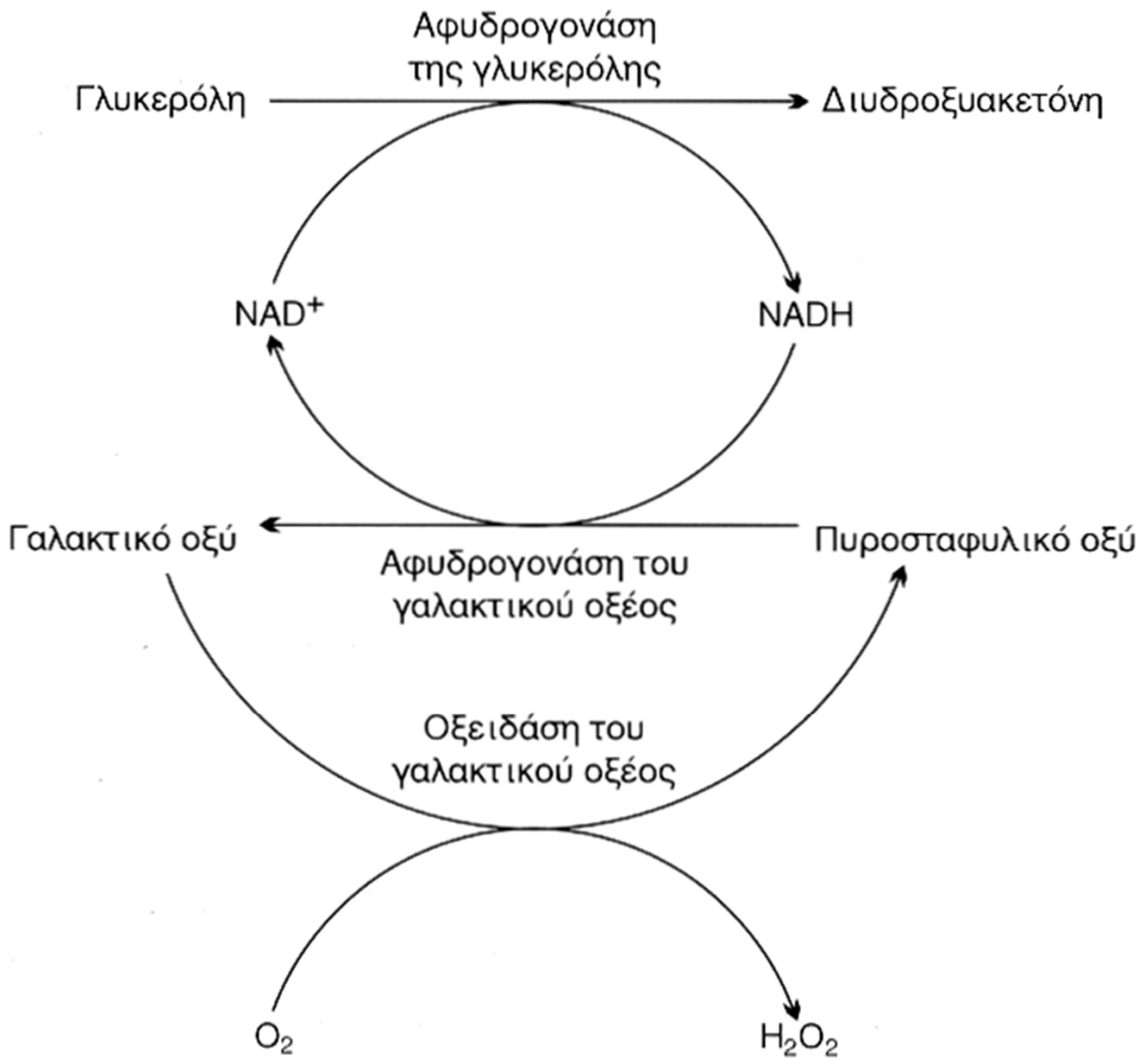
$$\text{πενικιλλίνη} + H_2O \xrightarrow{\text{Πενικιλλινάση}} \text{πενικιλλινικό οξύ} + H^+$$

$$\text{L-ασπαραγίνη} + H_2O \xrightarrow{\text{L-ασπαραγινάση}} \text{L-ασπαραγινικό οξύ} + NH_4^+$$

$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Υπεροξειδάση}} 2H_2O + I_2$$

Σχ. 131. Αντιδράσεις για τον σχεδιασμό ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων.

Βιοαισθητήρες ακινητοποιημένων συζευγμένων ενζύμων

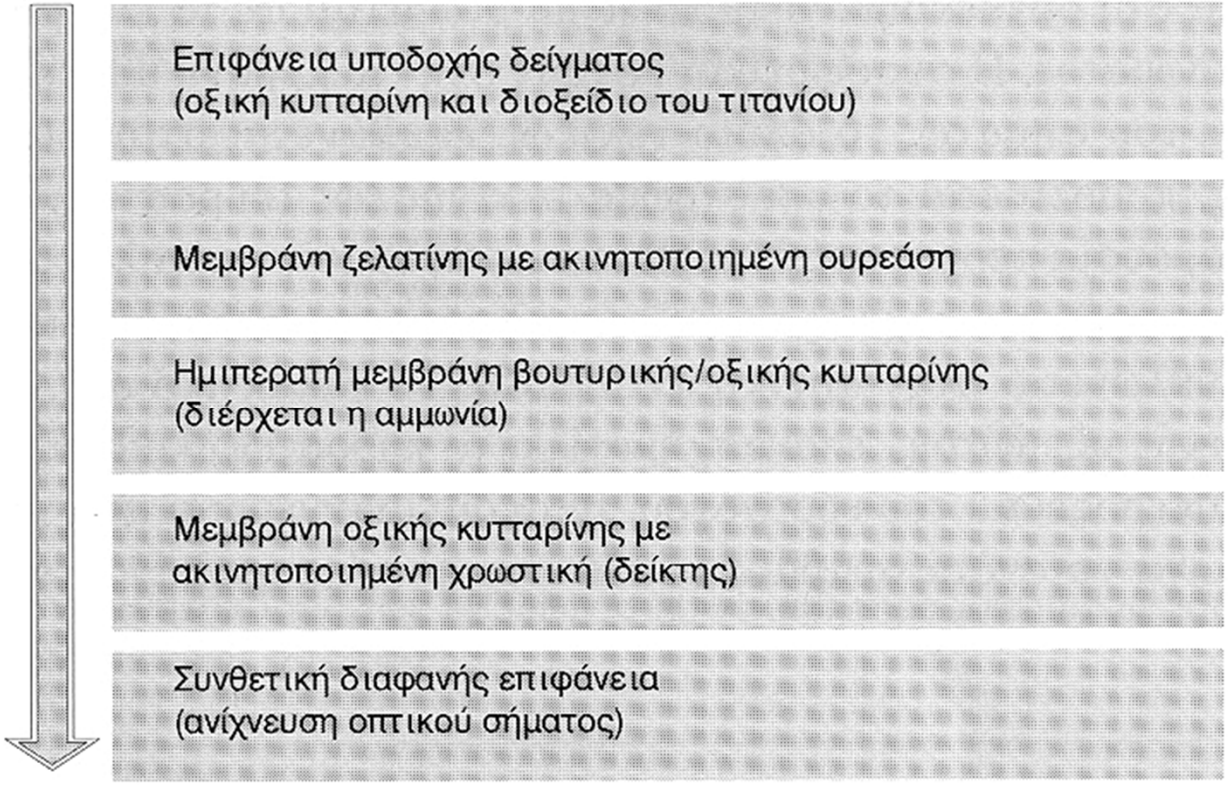


- Το H_2O_2 τελικά ανιχνεύεται από τον βιοαισθητήρα.

Σχ. 132. Βιοαισθητήρας συζευγμένων ενζύμων για την μέτρηση της γλυκερόλης.

Βιοαισθητήρες «ξηρών αντιδραστηρίων»

• Χαρακτηριστικό τους είναι ότι όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση βρίσκονται δεσμευμένα σε ξηρό περιβάλλον πολυμεμβράνης, η οποία αποτελείται από πολλαπλές επιφάνειες.



Σχ. 133. Βιοαισθητήρας «ξηρών αντιδραστηρίων» για τον προσδιορισμό ουρίας.

$$NH_2CONH_2 + 3\,H_2O \xrightarrow{\text{Ουρεάση}} 2\,NH_4^+ + HCO_3^- + OH^-$$

Σχ. 134. Αντίδραση διάσπασης ουρίας από ουρεάση.

Τα ένζυμα σε μη ενζυμικές αναλύσεις

• Ο προσδιορισμός διάφορων ουσιών με φαρμακευτική, διαγνωστική και γενικότερα ιατρική σημασία με χρήση ανοσολογικών τεχνικών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον και βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές.

• Η μεγάλη εκλεκτικότητα της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος οδήγησε στην ανάπτυξη ευαίσθητων και υψηλής ακρίβειας ποσοτικού προσδιορισμού τεχνικών, που βασίζονται στον σχηματισμό τέτοιων συμπλόκων.

• Η ανάπτυξη μιας τεχνικής ανοσοπροσδιορισμού προϋποθέτει την κατάλληλη σήμανση του αντισώματος, ώστε να είναι δυνατή η ποσοτική του μέτρηση.

• Η πιο γνωστή μέθοδος είναι ο **ενζυμοσύνδετος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός** (ELISA).

• Στην ELISA η σήμανση γίνεται με κατάλληλο ένζυμο, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το αντίσωμα.

• Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι η υπεροξειδάση, η αλκαλική φωσφατάση και η *β*-γαλακτοζιτάση.

• Η προσθήκη κατάλληλων ενζυμικών υποστρωμάτων στο τελικό στάδιο της τεχνικής οδηγεί στην ανάπτυξη χρώματος, το οποίο μπορεί να μετρηθεί, παρέχοντας τη δυνατότητα ακριβούς ποσοτικού προσδιορισμού.

• Οι τεχνικές ELISA διακρίνονται σε **ετερογενείς** και **ομοιογενείς**, ανάλογα με το αν πραγματοποιούνται, αντίστοιχα, σε δύο διακριτές (στερεά και υγρή) ή σε μία φάση.

Ετερογενής ELISA

• Υπάρχουν 3 κύριες αρχές ετερογενούς ELISA:

1. Άμεση ELISA για τη μέτρηση αντισώματος.

• Αρχικά, στο φρεάτιο τοποθετείται σε περίσσεια διάλυμα αντιγόνου (Ag), το οποίο προσροφάται στα τοιχώματα.

• Το φρεάτιο εκπλένεται, και συνήθως προστίθεται διάλυμα αδρανούς πρωτεΐνης (συχνά αλβουμίνη μόσχου), η οποία δεσμεύεται στις ακάλυπτες θέσεις και το φρεάτιο εκπλένεται εκ νέου.

• Έτσι, δεν υπάρχει πλέον στο φρεάτιο διαθέσιμη επιφάνεια για μη εκλεκτική δέσμευση αντισωμάτων (Ab).

• Μετά προστίθεται το δείγμα με το προς μέτρηση αντίσωμα, οπότε σχηματίζονται εκλεκτικά σύμπλοκα Ag-Ab.

• Το φρεάτιο εκπλένεται για να απομακρυνθούν αδέσμευτα συστατικά και στη συνέχεια προστίθεται δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο Ε (Ab-E) που δεσμεύεται στις θέσεις που υπάρχουν Ab.

• Η συγκέντρωση των αρχικών Ab στο δείγμα προσδιορίζεται εμμέσως από τα σύμπλοκα Ag-Ab-Ab-E, τα οποία παρουσία υποστρώματος σχηματίζουν χρώμα ως αποτέλεσμα ενζυμικής αντίδρασης, το οποίο μετράται.

2. Άμεση ELISA για τη μέτρηση αντιγόνου.

• Το Ag του δείγματος δεσμεύεται στην επιφάνεια του φρεατίου, η οποία προηγουμένως έχει καλυφθεί με περίσσεια αντίστοιχου αντισώματος (Ab).

• Ακολούθως, προστίθεται δεύτερο αντίσωμα κατά του ίδιου αντιγόνου σημασμένο με ένζυμο (E-Ab´).

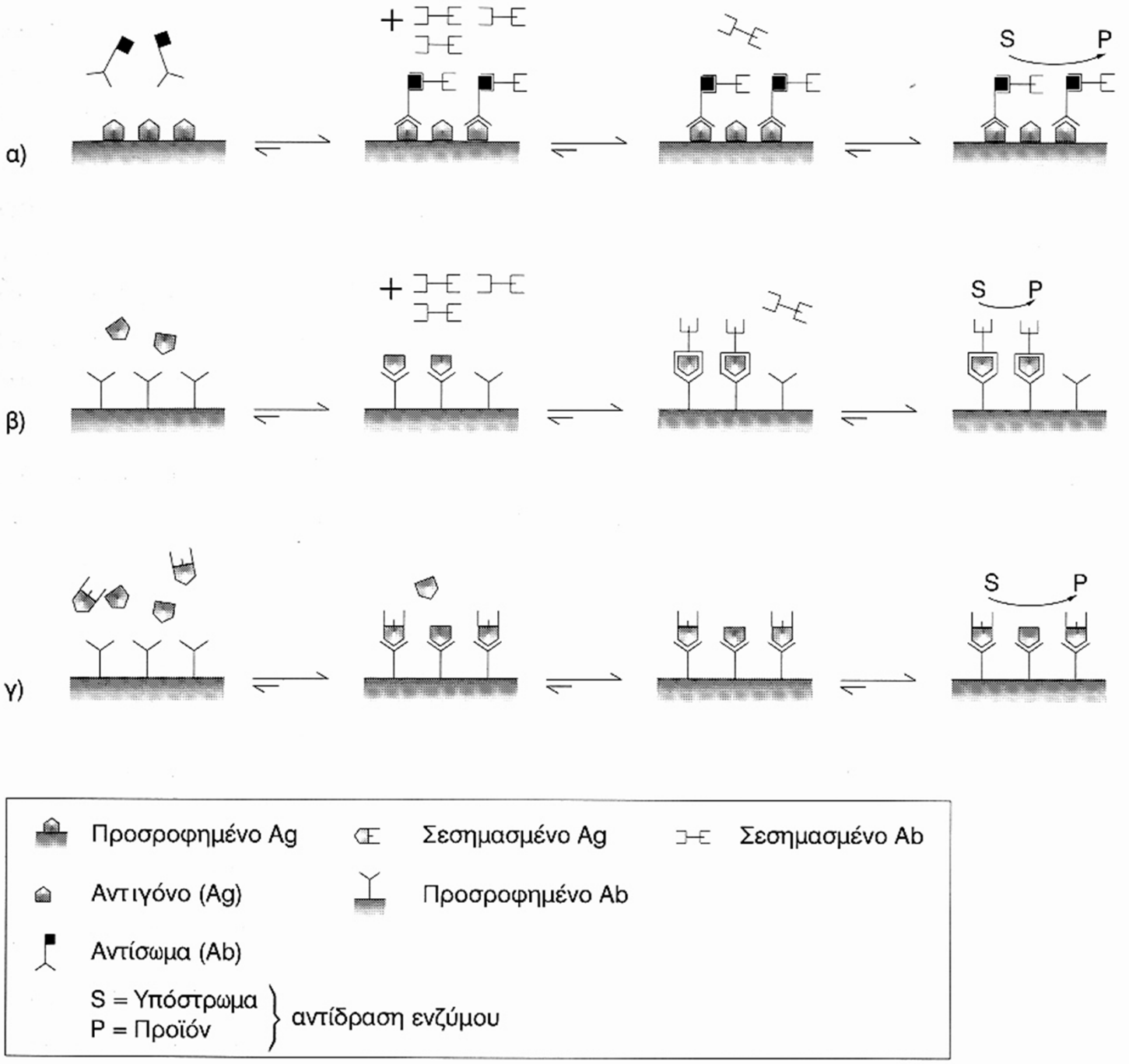
• Αν το δεύτερο αντίσωμα δεν είναι σημασμένο με ένζυμο, τότε απαιτείται και τρίτο αντίσωμα κατά του Ab´, το οποίο να είναι σημασμένο με ένζυμο.

3. Συναγωνιστική ELISA για τη μέτρηση αντιγόνου.

• Παρασκευάζεται μίγμα του προς μέτρηση ελεύθερου αντιγόνου Ag και του ίδιου αντιγόνου σημασμένου με ένζυμο Ag-E.

• Το μίγμα προστίθεται στο φρεάτιο, οπότε τα δύο αντιγόνα συναγωνίζονται για δέσμευση στο αντίστοιχο αντίσωμα Ab, το οποίο είναι ήδη προσροφημένο στα τοιχώματα του φρεατίου.

• Μετά την έκπλυση, προστίθενται τα ενζυμικά υποστρώματα, οπότε η ένταση του αναπτυσσόμενου χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του ελεύθερου αντιγόνου Ag στο δείγμα.



Σχ. 135. Αρχές ετερογενών τεχνικών ELISA. (α) Άμεση ELISA για την μέτρηση αντισώματος, (β) Άμεση ELISA για την μέτρηση αντιγόνου, (γ) Συναγωνιστική ELISA για την μέτρηση αντιγόνου.

Ομοιογενής ELISA

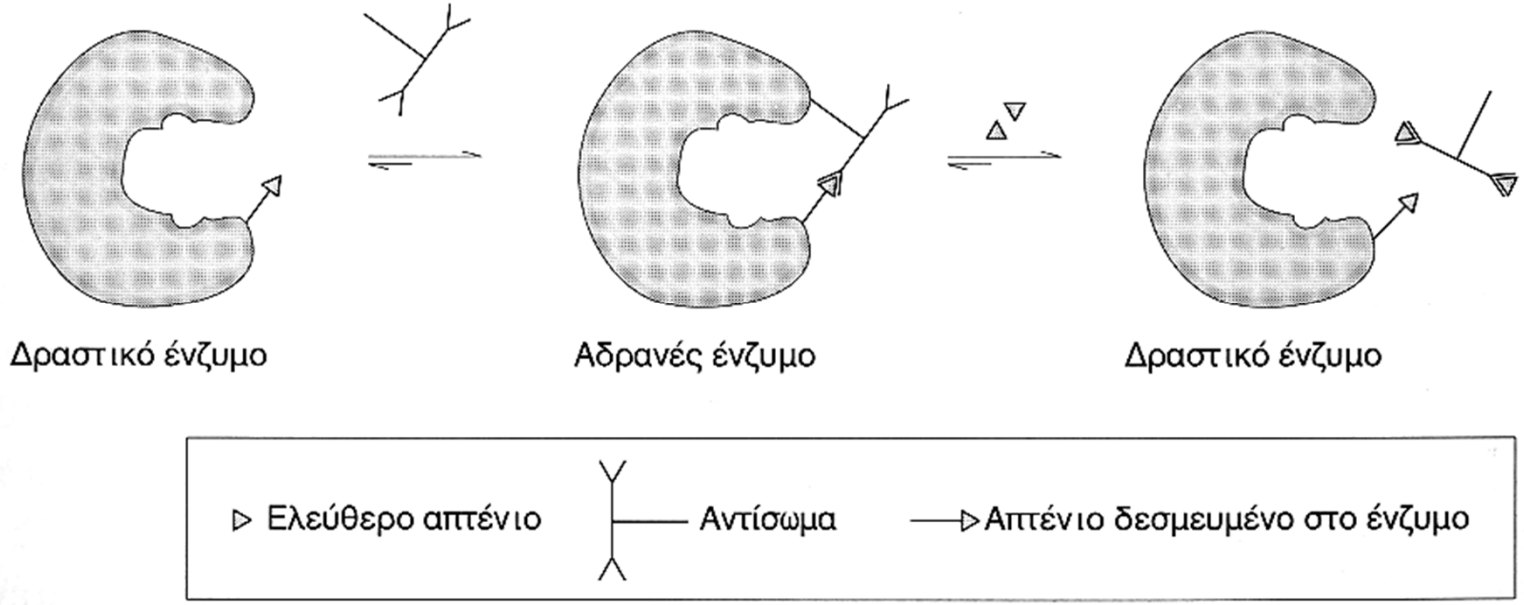
• Η αρχή βασίζεται στην αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας ενζύμου Ε στο οποίο είναι ομοιοπολικά δεσμευμένο απτένιο (αντιγόνο), ίδιο με εκείνο που πρόκειται να μετρηθεί (Ε-απτένιο).

• Η αναστολή της ενζυμικής δράσης εμφανίζεται όταν το ένζυμο δεσμεύσει εκλεκτικά το προστιθέμενο αντίσωμα Ab, οπότε σχηματίζεται μη δραστικό σύμπλοκο Ε-απτένιο-Ab.

• Στη συνέχεια, προστίθεται το προς μέτρηση δείγμα που περιέχει απτένιο, οπότε επέρχεται συναγωνισμός ελεύθερου απτενίου του δείγματος και απτενίου που είναι δεσμευμένο στο αδρανές σύμπλοκο Ε-απτένιο-Ab, με το αντίσωμα Ab.

• Αποτέλεσμα είναι ο «διωγμός» του αντισώματος και η επανάκτηση της ενζυμικής δραστικότητας.

• Είναι προφανές, ότι η ενζυμική δραστικότητα είναι ανάλογη της ποσότητας του απτενίου στο δείγμα.



Σχ. 136. Αρχή λειτουργίας ομοιογενούς ELISA για τη μέτρηση αντιγόνου.

Θεραπευτικές Εφαρμογές

• Οι εφαρμογές αυτές βασίζονται στη χορήγηση συγκεκριμένων ενζύμων με σκοπό τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων.

• Κύρια προβλήματα στη χορήγησή τους αποτελούν η απόρριψή τους από το αμυντικό σύστημα του οργανισμού (αντιμετωπίζονται ως αντιγόνα) και ο μικρός χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$).

• Τον υψηλότερο χρόνο ημιζωής εμφανίζουν οι γλυκοπρωτεΐνες με σιαλικό οξύ, ενώ μικρότερο χρόνο οι μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες και ελάχιστο χρόνο οι γλυκοπρωτεΐνες με μαννόζη ή γαλακτόζη.

• Η εγκαψυλίωση του ενζύμου αυξάνει τον χρόνο ημιζωής, όμως το υλικό της κάψουλας θα πρέπει:

Α. Να μην προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις, και

Β. Να μην υποβοηθά την πήξη του αίματος (αλλιώς απαιτείται η χορήγηση αντιπηκτικών παραγόντων).

Γενετικές ανωμαλίες

• Αφορούν την πλήρη έλλειψη ενζύμου ή την αντικατάστασή του από κάποιο λιγότερο δραστικό ένζυμο, λόγω μετάλλαξης.

• Παράδειγμα αποτελεί η φαινυλκετονουρία, νόσος που οφείλεται σε έλλειψη ή μετάλλαξη της υδρολάσης της Phe, με αποτέλεσμα ανωμαλία στον μεταβολισμό της.

• Κατά συνέπεια, η Phe δεν μετατρέπεται σε Tyr, αλλά μεταβολίζεται σε φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ, το οποίο εκκρίνεται μέσω ούρων.

• Για την αντιμετώπιση του προβλήματος συνίσταται η φτωχή (από νεογνό) δίαιτα σε Phe.

• Πολλές φορές, προσπάθειες αντιμετώπισης προβλημάτων μέσω εξωγενούς χορήγησης ενζύμων δεν έχουν στεφθεί με πλήρη επιτυχία, καθώς τα χορηγούμενα ένζυμα συγκεντρώνονται σε ορισμένα όργανα (ήπαρ, σπλήνα), ενώ άλλα όργανα και ιστοί παραμένουν φτωχά στο δραστικό ένζυμο.

• Ανάλογα προβλήματα παρουσιάζονται με τη χορήγηση ενζύμων εγκλωβισμένων σε λιποσώματα, τα οποία συγκεντρώνονται στα λυσοσώματα των ηπατικών κυττάρων.

• Προσπάθειες αντιμετώπισης των προβλημάτων στρέφονται προς την στόχευση των λιποσωμάτων κατ' αποκλειστικότητα στα συγκεκριμένα όργανα-στόχους, μέσω προσθήκης στην επιφάνεια των λιποσωμάτων ομάδων συγγενείας, οι οποίες αναγνωρίζονται από τους αντίστοιχους υποδοχείς των οργάνων-στόχων.

Θεραπεία νεοπλασιών

• Η ενδοφλέβια χορήγηση L-ασπαραγινάσης (καταλύει τη μετατροπή της L-Asn σε L-Asp) αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική στο 60% των περιπτώσεων λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

• Τα καρκινωματώδη λεμφοκύτταρα χρειάζονται εξωγενή (μέσω διατροφής) παροχή L-Asn, σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα, τα οποία συνθέτουν το αμινοξύ μόνα τους.

• Η εξωγενής χορήγηση L-ασπαραγινάσης οδηγεί σε δραστική μείωση της συγκέντρωσης της L-Asn στο αίμα περιορίζοντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

• Πηγή L-ασπαραγινάσης αποτελούσε μέχρι πρόσφατα ο ορός ινδικών χοιριδίων.

• Σήμερα, χρησιμοποιούνται διάφοροι μικροοργανισμοί (*Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysnthemi*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*).

• Η πηγή παραλαβής του ενζύμου καθορίζεται από την υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμα (χαμηλή K_m) και τον μεγάλο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$).

Προβλήματα κυκλοφοριακού συστήματος

• Ο μηχανισμός πήξης του αίματος αποτελείται από δύο πολύπλοκα συστήματα:

Α. Το σύστημα πήξεως, το οποίο με σειρά ενζυμικών αντιδράσεων εμποδίζει την απώλεια σωματικών υγρών, και

Β. Το ινωδολυτικό σύστημα, το οποίο με σειρά ενζυμικών αντιδράσεων διαλύει τους περιττούς θρόμβους και διασφαλίζει την ελεύθερη ροή αίματος προς τα όργανα.

• Ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες τα δύο συστήματα βρίσκονται σε ισορροπία, είναι δυνατόν για διάφορους λόγους, να σχηματιστούν θρόμβοι ταχύτερα από τον χρόνο που χρειάζεται το ινωδολυτικό σύστημα για να τους διαλύσει, με αποτέλεσμα το έμφραγμα των στεφανιαίων αρτηριών και την επακόλουθη νέκρωση του ιστού του μυοκαρδίου.

• Η παλαιότερη μέθοδος ενζυμικής θρομβολύσεως προέβλεπε την χορήγηση **ουροκινάσης** ή **στρεπτοκινάσης** που δρουν επί του **πλασμινογόνου** (αδρανούς γλυκοπρωτεΐνης) και το μετατρέπουν σε δραστική **πλασμίνη** που λύει τους θρόμβους.

• Η ουροκινάση είναι πρωτεολυτικό ένζυμο που παράγεται στα νεφρά ως προ-ουροκινάση και απαντά σε μικρές ποσότητες στο πλάσμα και στα ούρα.

• Η στρεποκινάση είναι πρωτεΐνη χωρίς καταλυτικές ιδιότητες, η οποία όταν ενωθεί με το πλασμινογόνο (σε αναλογία 1:1) δημιουργεί ισχυρό σύμπλοκο, οδηγώντας σε στερεοδιατακτικές μεταβολές και ενεργοποιώντας άλλα μόρια πλασμινογόνου προς πλασμίνη.

• Μειονεκτήματα θρομβολυτικής θεραπείας με ουροκινάση ή στρεπτοκινάση είναι:

1. Η απομόνωση ουροκινάσης από ανθρώπινα ούρα σε εκμεταλλεύσιμη ποσότητα είναι δύσκολη και πολυέξοδη διεργασία,

2. Η ουροκινάση και η στρεπτοκινάση εμφανίζουν μέγιστη δραστικότητα όταν χορηγηθούν απευθείας στην καρδιά με ενδοστεφανιαίο καθετήρα, διεργασία δύσκολη και επικίνδυνη,

3. Η χρήση της στρεπτοκινάσης αποφεύγεται λόγω μικροβιακής προέλευσης και κατά συνέπεια κινδύνου εμφανίσεως αλλεργικών επιπλοκών, και

4. Η ουροκινάση και η στρεπτοκινάση ενεργοποιούν ευρέως το πλασμινογόνο στον οργανισμό, γεγονός επικίνδυνο.

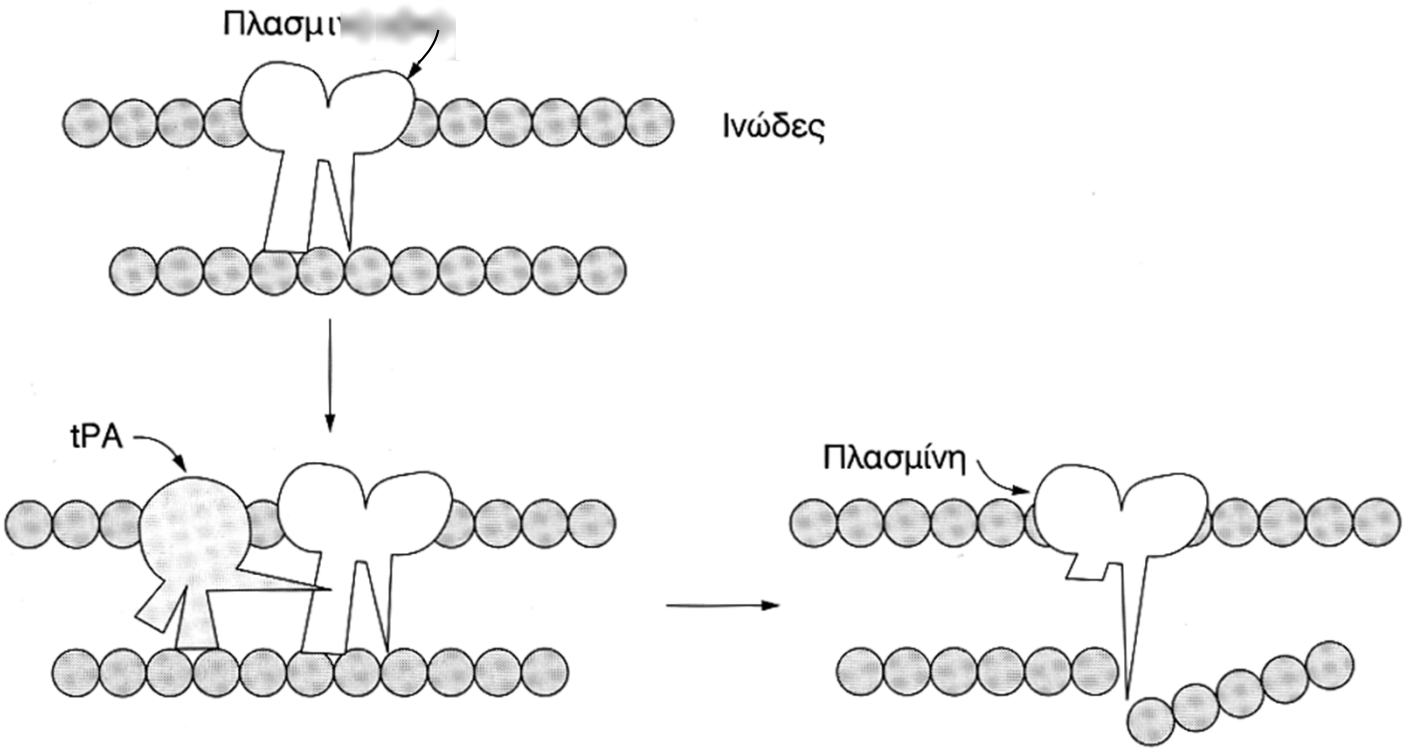
• Σήμερα, ως θρομβολυτικός παράγοντας χρησιμοποιείται ο **ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου** (tissue plasminogen activator, **tPA**), γνωστός και ως **ινωδοκινάση**.

• Παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων και ενεργοποιεί το πλασμινογόνο προς πλασμίνη εκλεκτικά, σε αντίθεση με την ουροκινάση και την στρεπτοκινάση.

• Ο tPA συνδέεται στην επιφάνεια του ινώδους του θρόμβου (το ινώδες φέρει θέσεις δεσμεύσεως τόσο για το πλασμινογόνο, όσο και για τον tPA) και ενεργοποιεί το πλασμινογόνο προς πλασμίνη, η οποία υδρολύει τον θρόμβο.

• Αμέσως μετά τη δράση της στον θρόμβο, η πλασμίνη ελευθερώνεται στο αίμα, όπου δεσμεύεται και αδρανοποιείται από την α_2-αντιπλασμίνη, η οποία κυκλοφορεί ελεύθερη με σκοπό να αποτρέψει τη συστηματική θρομβολυτική δράση της πλασμίνης γενικότερα.

• Η παραγωγή tPA γίνεται κυρίως από διαγονιδιακά ζώα με την τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA.



Σχ. 137. Λύση του ινώδους, ως αποτέλεσμα της δράσης του tPA.

Φαρμακευτικές Εφαρμογές

Αντιβιοτικά

• Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται βιομηχανικώς σε βιοαντιδραστήρες υπό ελεγχόμενες συνθήκες αναπτύξεως μικροοργανισμών.

• Στη συνέχεια, ορισμένα αντιβιοτικά τροποποιούνται με τη βοήθεια ενζύμων και χημικών μεθόδων προς χημικώς διαφορετικές δομές με βελτιωμένες ιδιότητες (**ημισυνθετικά αντιβιοτικά**).

• Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και συνήθως βιοσυντίθενται όταν η καλλιέργεια βρίσκεται υπό συνθήκες περιορισμού της ανάπτυξης.

• Ο αριθμός των ενώσεων με αντιβιοτική δράση ανέρχεται σε χιλιάδες (το γένος *Actinomyces* βιοσυνθέτει ≈2.500 διαφορετικά αντιβιοτικά, ο *Streptomyces griseus* 40, ο *Bacillus subtilis* 60, κλπ).

• Σημαντική προϋπόθεση βιομηχανικής βιωσιμότητας ενός μικροβιακού στελέχους ως πηγής αντιβιοτικού είναι η ικανότητα παραγωγής όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας αντιβιοτικού, γεγονός που επιτυγχάνεται με βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας και με γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού.

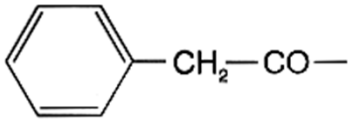
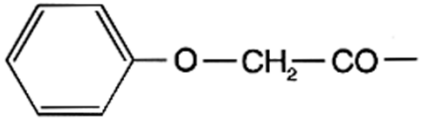
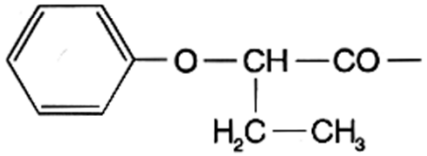
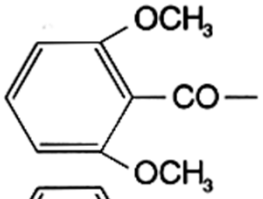
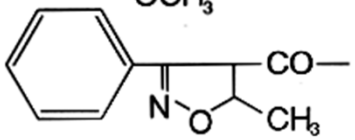
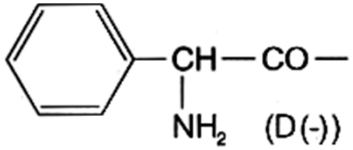
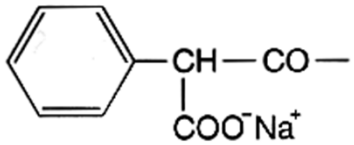
• Η βενζυλο-πενικιλλίνη (από *Penicillium notatum*) ήταν η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε ως αντιβιοτικό.

• Παρουσιάζει, όμως, σημαντικά μειονεκτήματα:

Α. Έχει περιορισμένο φάσμα δράσεως, αφού υδρολύεται και αδρανοποιείται εύκολα από τις *β*-λακταμάσες (πενικιλλινάσες) πολλών μικροοργανισμών,

Β. Προκαλεί συχνά αλλεργικές αντιδράσεις, και

Γ. Είναι ασταθής στο όξινο γαστρικό περιβάλλον.

	Ακυλομάδα	Ονομασία αντιβιοτικού
(α)		Βενζυλοπενικιλλίνη ή πενικιλλίνη G (για ιδιότητες βλ. στο κείμενο)
(β)		Φαινοξυμεθυλοπενικιλλίνη ή πενικιλλίνη V (ιδιότητες σαν της πενικιλλίνης G)
(γ)		Προπικιλλίνη (σταθερή σε H^+, ευαίσθητη σε *β*-λακταμάσες)
(δ)		Μεθυκιλλίνη (σταθερή σε H^+ και *β*-λακταμάσες)
(ε)		Οξακιλλίνη (σταθερή σε H^+ και *β*-λακταμάσες)
(στ)		Αμπικιλλίνη (σταθερή σε H^+, ευρέως φάσματος δράσεως σε κατά Gram-αρνητικά, ευαίσθητη σε *β*-λακταμάσες)
(ζ)		Καρβενικιλλίνη (σταθερή σε H^+, ευρέως φάσματος δράσεως ειδικά σε *Pseudomonas aeruginosa*, ευαίσθητη σε *β*-λακταμάσες, μη αποτελεσματική σε στοματική χορήγηση)

Σχ. 138. Παραδείγματα (α, β) φυσικών και (γ-ζ) ημισυνθετικών πενικιλλινών.

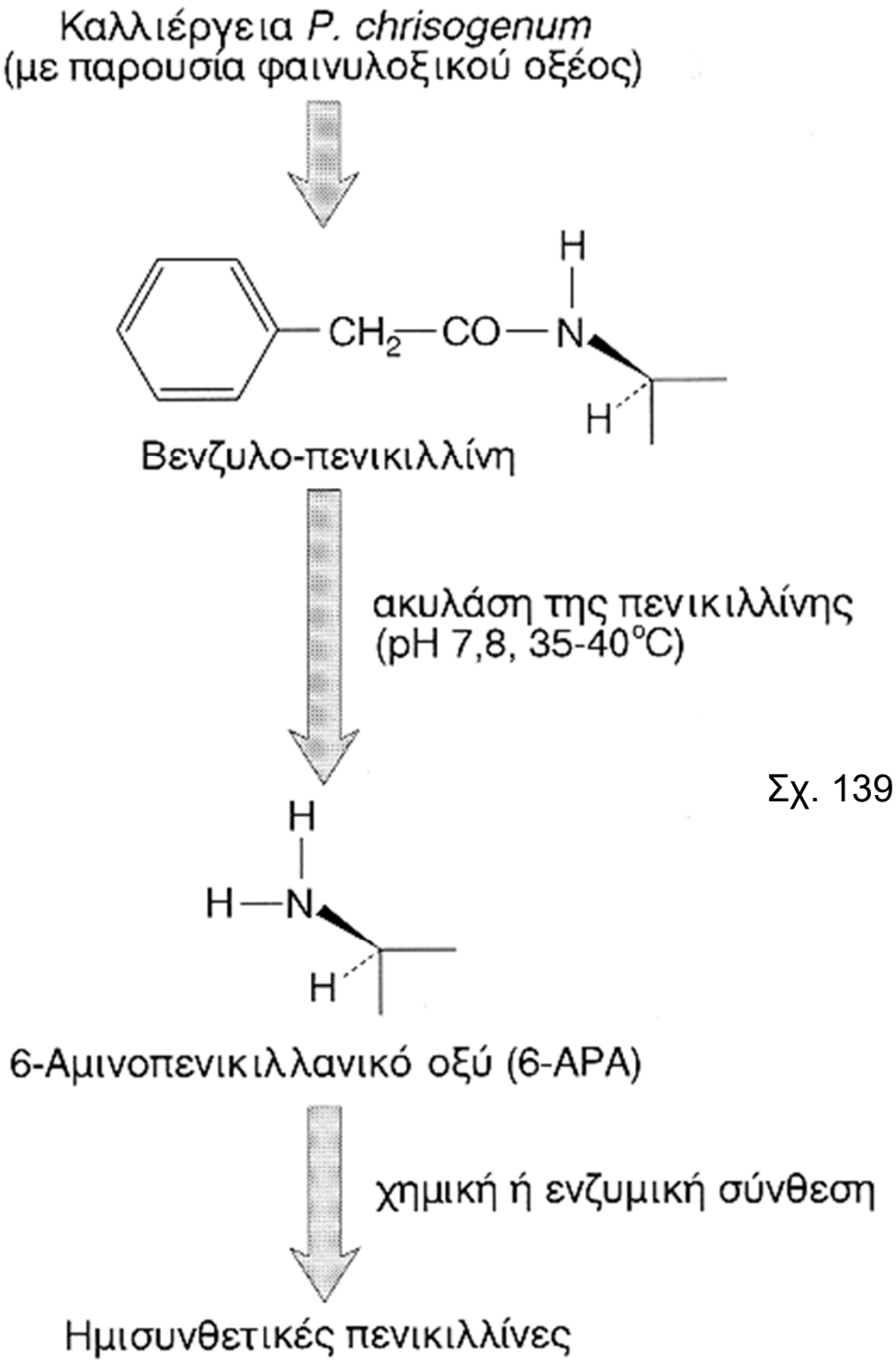
• Ωστόσο, αποτελεί ένωση με μεγάλη πρακτική σημασία, όχι ως αντιβιοτικό, αλλά ως αρχική ένωση για παραλαβή του 6-αμινοπενικιλλανικού οξέος (6-APA), το οποίο είναι ένωση-κλειδί για τη σύνθεση διάφορων ημισυνθετικών αντιβιοτικών.

• Η αντιβιοτική δράση του μορίου της πενικιλλίνης επηρεάζεται άμεσα από τη χημική δομή της πλευρικής ακυλομάδας.

• Επομένως, είναι δυνατή η παραγωγή μεγάλου αριθμού ημισυνθετικών πενικιλλινών με ποικιλία αντιβιοτικών δράσεων.

• Αρχικά, παρασκευάζεται η βενζυλο-πενικιλλίνη από μικροβιακή καλλιέργεια, στη συνέχεια απομακρύνεται η πλευρική ακυλομάδα (ως φαινυλοξικό οξύ) οπότε παράγεται 6-APA, ενώ ο ευαίσθητος *β*-λακταμικός δακτύλιος παραμένει ανέπαφος.

• Η αντίδραση σχηματισμού 6-APA πραγματοποιείται, είτε χημικώς (-40°C, άνυδρες συνθήκες), ή ενζυμικώς παρουσία ακινητοποιημένης σε πολυμερές (π.χ. δεξτράνης) ακυλάσης της πενικιλλίνης (από *E. coli*).



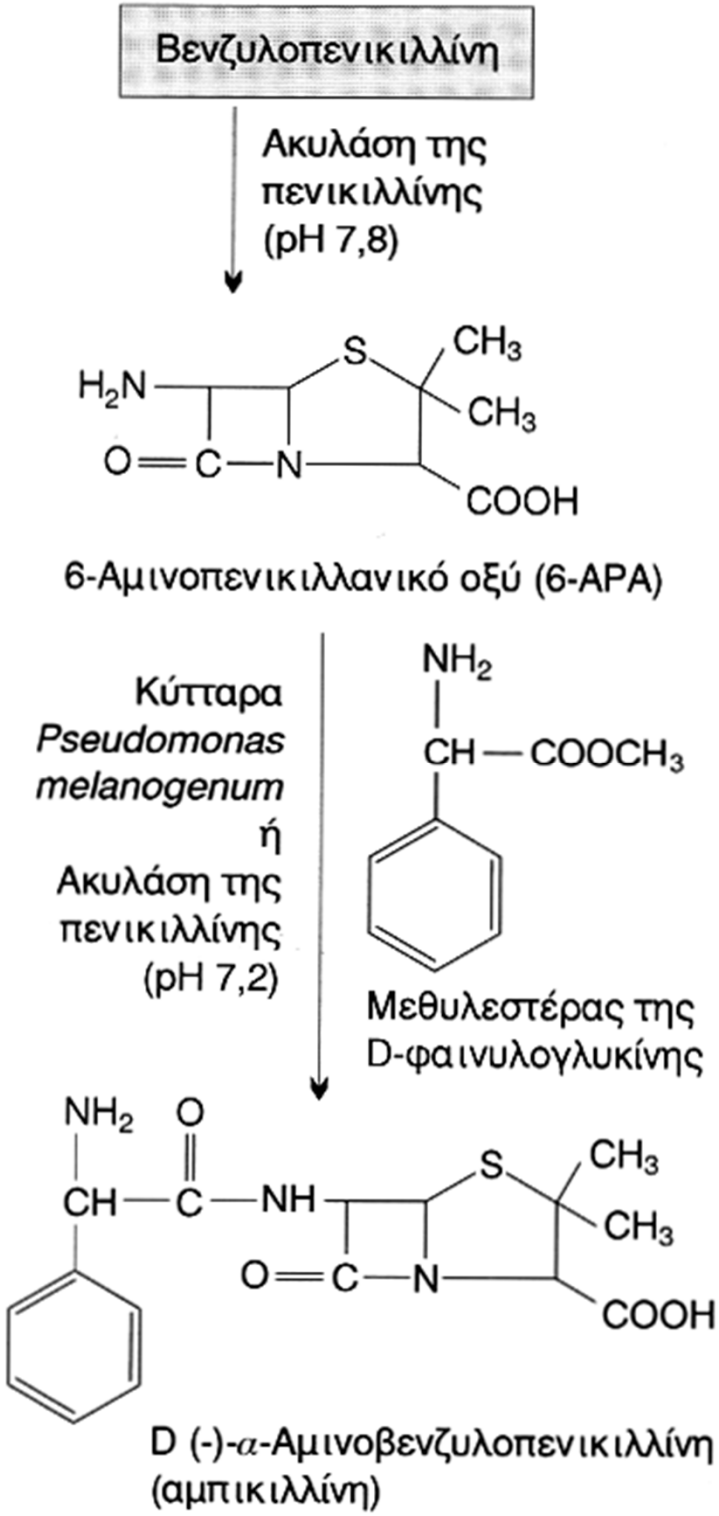
Σχ. 139. Γενική πορεία συνθέσεως ημισυνθετικών πενικιλλινών μέσω 6-APA.

• Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης το pH διατηρείται σταθερό (pH: 7.8, 35°C), ενώ μετά το τέλος της ρυθμίζεται στο 4.2-4.3, ώστε να κατακρημνισθεί το προϊόν.

• Το 6-APA χρησιμοποείται για τη σύνθεση ημισυνθετικών πενικιλλινών, κυρίως με χημικές μεθόδους, κατά τις οποίες η πλευρική αμινομάδα ακυλιώνεται με κατάλληλους υποκαταστάτες, αποκαθιστώντας τον αμιδικό δεσμό.

• Η σύνθεση είναι δυνατόν να γίνει και ενζυμικώς μέσω της αντίστροφης υδρολυτικής αντιδράσεως, παρουσία της ακυλάσης της πενικιλλίνης ακινητοποιημένης σε DEAE-κυτταρίνη σε μειωμένο pH (λίγο υψηλότερο από 7), η οποία, όμως, δεν εξασφαλίζει υψηλό ποσοστό μετατροπής.

• Το προϊόν που λαμβάνεται από το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι υποαλλεργικό και υψηλότερης καθαρότητας σε σχέση με το προϊόν που προέρχεται από ακινητοποιημένα κύτταρα *Bacillus megaterium* ή είδη *Achromobacter*.



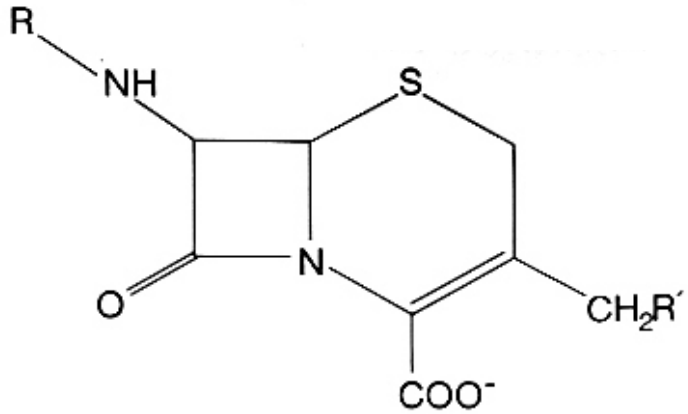
Σχ. 140. Ενζυμική σύνθεση της αμπικιλλίνης.

• Τα αντιβιοτικά της κατηγορίας των κεφαλοσπορινών διαφέρουν από τις πενικιλλίνες.

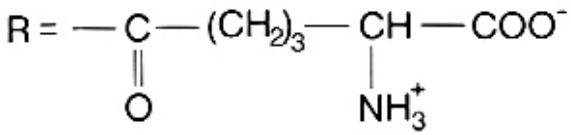
• Στο μόριο της κεφαλοσπορίνης υπάρχουν δύο θέσεις υποκαταστάσεως, οι οποίες οδηγούν σε ποικιλία αντιβιοτικών.

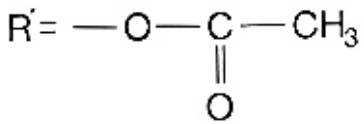
• Οι κεφαλοσπορίνες είτε βιοσυντίθενται από μικροβιακές καλλιέργειες, ή από κεφαλοσπορίνη C, σε αντιστοιχία προς τις ημισυνθετικές πενικιλλίνες.

(α)



(β)





Σχ. 141. Γενική δομή (α) κεφαλοσπορίνης και (β) κεφαλοσπορίνης C.

• Η κεφαλοσπορίνη C διασπάται ενζυμικά από την ακυλάση της κεφαλοσπορίνης προς 7-αμινοκεφαλοσπορανικό οξύ (7-ACA, R=H).

• Η ενζυμική διεργασία είναι όμως βραδεία, οπότε στη βιομηχανία προτιμάται η χημική μέθοδος με NaOCl ή PCl_5.

• Στη συνέχεια, το 7-ACA ακυλιώνεται χημικώς ή ενζυμικώς (με αντίστροφή της προηγούμενης ενζυμικής αντιδράσεως), παράγοντας ημισυνθετικές κεφαλοσπορίνες.

Ενζυμική Κατάλυση σε Οργανικούς Διαλύτες

• Κατά κανόνα, υδατικά μίγματα υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών (ακετόνης, αιθανόλης, κλπ) οδηγούν σε ενζυμική αδρανοποίηση.

• Αντιθέτως, εμφανίζεται ιδιόμορφη ενζυμική συμπεριφορά παρουσία μη υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών και χαμηλής συγκέντρωσης νερού.

• Το ενζυμικό μόριο έχει την ανάγκη παρουσίας νερού, ώστε να λάβει την απαιτούμενη για την κατάλυση δραστική στερεοδιάταξη (ο αριθμός των απαιτούμενων μορίων νερού είναι μικρός).

• Τα μόρια που ενυδατώνουν το ένζυμο είναι ισχυρώς δεσμευμένα και απομακρύνονται δύσκολα.

• Συνεπώς, στα στερεά ενζυμικά παρασκευάσματα εξακολουθεί να υπάρχει αριθμός μορίων ύδατος επί του βιοκαταλύτη.

• Όταν στερεό ένζυμο προστεθεί σε οργανικό διαλύτη, το νερό του ενζύμου κατανέμεται μεταξύ διαλύτη και στερεού.

• Αν ο οργανικός διαλύτης είναι μη υδατοσυμβατός, τότε τα περισσότερα μόρια νερού παραμένουν στο ενζυμικό μόριο.

• Το αντίθετο συμβαίνει με τους υδατοσυμβατούς διαλύτες, οι οποίοι κατά κανόνα οδηγούν σε ενζυμική αδρανοποίηση.

• Συχνά, συστήματα μη υδατοσυμβατών διαλυτών, όχι μόνο υποβοηθούν τη σταθεροποίηση του ενζύμου, αλλά οδηγούν σε καταλυτικές αντιδράσεις διαφορετικές από αυτές που καταλύει το ένζυμο σε υδάτινο περιβάλλον.

• Σημειώνεται ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις σε οργανικά συστήματα χαμηλής συγκέντρωσης νερού είναι γενικά 20-50% βραδύτερες σε σχέση με εκείνες των υδατικών συστημάτων στην ίδια θερμοκρασία.

• Όμως, η παρουσία μη υδατοσυμβατού οργανικού διαλύτη καθιστά το ενζυμικό μόριο σταθερότερο σε υψηλότερες θερμοκρασίες, στις οποίες αυξάνεται και η ταχύτητα αντιδράσεως.

Παρασκευή ανθρώπινης ινσουλίνης

• Το μόριο της ινσουλίνης αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες Α (με 21 αμινοξέα) και Β (με 30 αμινοξέα).

• Οι αλυσίδες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω 2 δισουλφιδικών δεσμών Cys^{A7}-Cys^{B7} και Cys^{A20}-Cys^{B19}, ενώ μια τρίτη δισουλφιδική γέφυρα σχηματίζεται στο εσωτερικό της αλυσίδας Α (Cys^{A6}-Cys^{A11}).

• Η ινσουλίνη αρχικώς συντίθεται ως μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, την προ-προϊνσουλίνη, η οποία στο Ν-τελικό άκρο φέρει επί πλέον μια ακολουθία 23 αμινοξέων που βοηθά το πολυπεπτίδιο για τη διέλευση δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

• Στη συνέχεια, η επί πλέον ακολουθία αποκόπτεται ενζυμικώς, οπότε σχηματίζεται η προϊνσουλίνη.

• Στην τελευταία, οι αλυσίδες A και B συνδέονται μεταξύ τους εσωτερικώς, μέσω του πεπτιδίου C, σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα.

• Τελικά, πρωτεόλυση της προϊνσουλίνης οδηγεί σε ώριμη ινσουλίνη και πεπτίδιο C.

• Η ανθρώπινη ινσουλίνη διαφέρει από αυτή του μόσχου σε 3 αμινοξέα, του αμνού σε 4, ενώ του χοίρου σε 1 αμινοξύ (της θέσης B30 στο C-τελικό άκρο).

• Στον άνθρωπο, την θέση B30 καταλαμβάνει Thr, ενώ στον χοίρο Ala.

• Η μοναδική διαφορά των δύο μορίων επιτρέπει την εύκολη μετατροπή της χοίρειας σε ανθρώπινη ινσουλίνη με **2 διαφορετικές μεθόδους** ενζυμικής καταλύσεως:

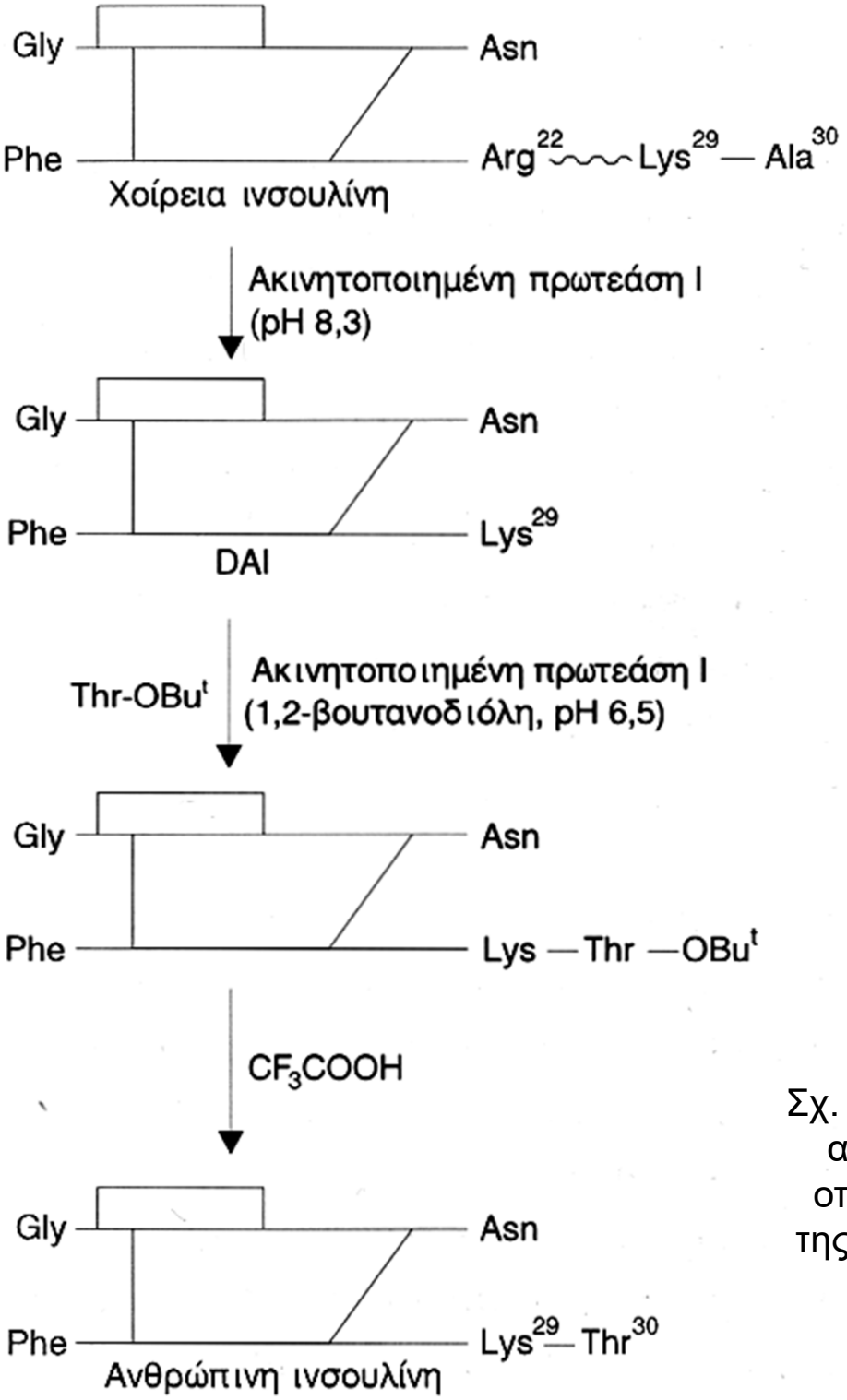
• **Κατά την πρώτη μέθοδο**, σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας του L-Thr-OBu^{t} και της ελεύθερης καρβοξυλομάδας της C-τελικής λυσίνης (Lys^{B29}) της B αλυσίδας της χοίρειας ινσουλίνης, της οποίας έχει προηγουμένως υδρολυθεί η C-τελική Ala.

• Οι αντιδράσεις καταλύονται είτε από πρωτεάση I από *Achromobacter lyticus* ή θρυψίνη.

• Στη βιομηχανική εφαρμογή παραγωγής ινσουλίνης προτιμάται η πρωτεάση I γιατί:

A. Επιτρέπει την εκλεκτική απομάκρυνση (υδρόλυση) της Ala^{B30} από την χοίρεια ινσουλίνη, και

B. Εξασφαλίζει κατά 10 φορές ταχύτερη αντίδραση σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού.



Σχ. 142. Ενζυμική παρασκευή ανθρώπινης ινσουλίνης από χοίρεια ινσουλίνη. DAI: χοίρεια ινσουλίνη της οποίας έχει απομακρυνθεί η C-τελική Ala (θέση 30) της Β-αλυσίδας, Bu^t: tert-βουτυρική ομάδα $(CH_3)_3$-C-.

• Χρησιμοποιείται συνήθως ακινητοποιημένο ένζυμο σε σφαιρίδια οξειδίου του πυριτίου επικαλυμμένα με πολυ-γλουταμινικό οξύ.

• Η υδρόλυση της Ala^{B30} λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH: 8.3), ενώ ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού παρουσία 1,2-βουτανοδιόλης ως οργανικού διαλύτη σε pH: 6.5 (ρυθμισμένο με οξικά ανιόντα).

• Το προϊόν των ενζυμικών αντιδράσεων υφίσταται τελικά επεξεργασία με τριφθοροξικό οξύ, οπότε μετατρέπεται σε ανθρώπινη ινσουλίνη.

• **Κατά τη δεύτερη μέθοδο**, προβλέπεται απευθείας αντικατάσταση της C-τελικής Ala^{B30} με L-Thr, η οποία έχει προηγουμένως ενεργοποιηθεί, σε 1 στάδιο παρουσία ακινητοποιημένης θρυψίνης ή καρβοξυπεπτιδάσης Y ή πρωτεάσης I από *Achromobacter lyticus*.

• Ως προϊόν λαμβάνεται ο αντίστοιχος εστέρας της ανθρώπινης ινσουλίνης, ο οποίος ακολούθως υδρολύεται χημικώς.

• Η μέθοδος αυτή, αν και απλούστερη, δεν προτιμάται διότι απαιτεί 50-100 φορές περισσότερο ένζυμο.

• Ανθρώπινη ινσουλίνη είναι δυνατόν να παρασκευασθεί και με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αρκεί να εισαχθούν τα c-DNA που κωδικοποιούν τις αλυσίδες Α και Β της ινσουλίνης ξεχωριστά σε *E. coli*.

• Ακολούθως, τα ετερόλογα προϊόντα συνδέονται χημικώς μέσω των δισουλφιδικών δεσμών.

• Η μέθοδος αυτή απαιτεί σε δύο ξεχωριστούς βιοαντιδραστήρες καλλιέργειες του μικροοργανισμού και αντίστοιχες διεργασίες καθαρισμού των προϊόντων.

• Σχεδιάζεται η αλληλουχία βάσεων DNA που κωδικοποιεί τη γνωστή αλληλουχία αμινοξέων και συντίθενται χημικώς τα γονίδια των πεπτιδικών αλυσίδων Α και Β ξεχωριστά, καθένα από τα οποία φέρει στο 5΄-άκρο την αλληλουχία βάσεων που κωδικοποιεί Met, η οποία καθίσταται στο Ν-τελικό άκρο του πεπτιδίου.

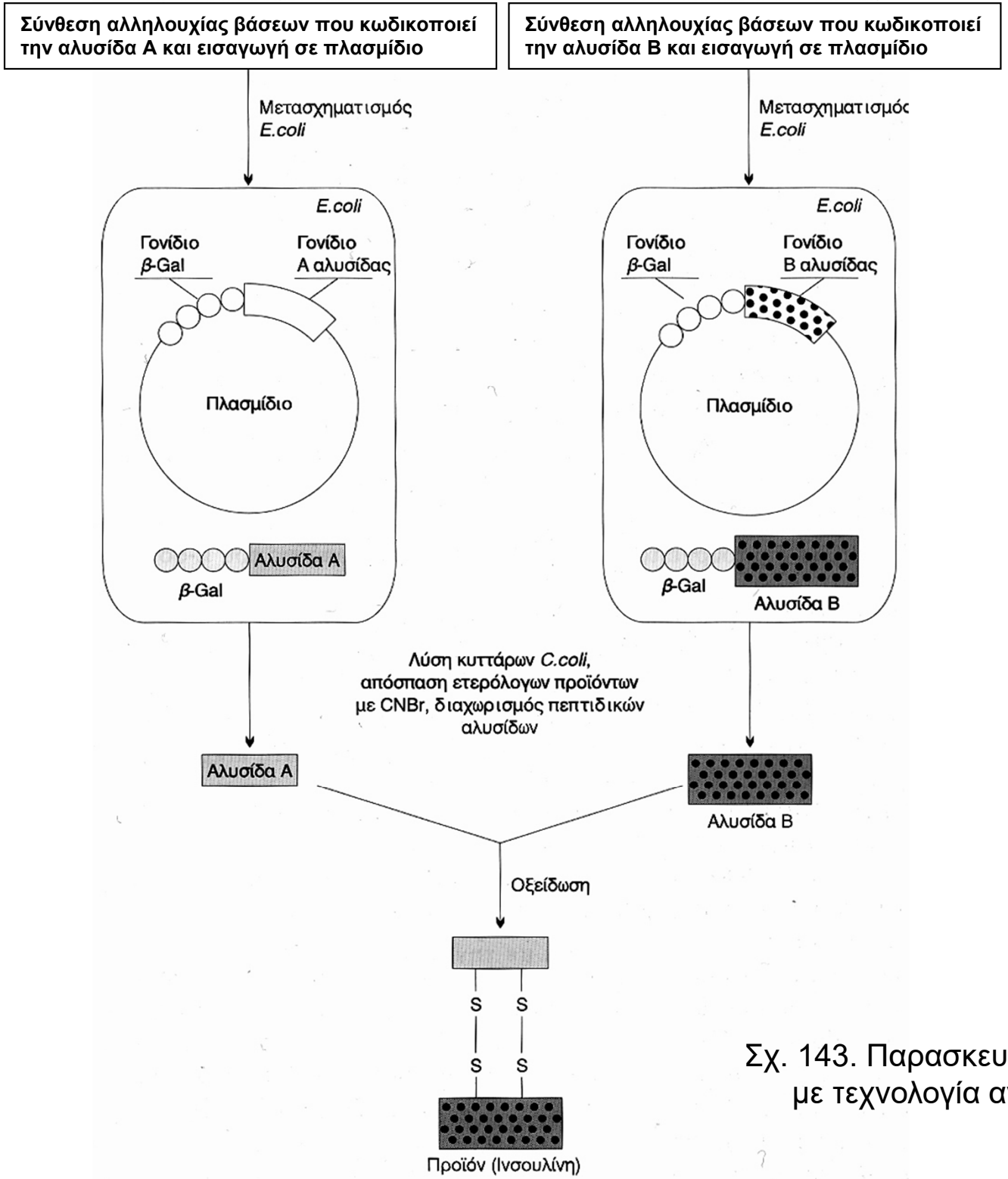
• Κάθε συνθετικό γονίδιο συνδέεται ξεχωριστά σε γονίδιο *β*-γαλακτοζιτάσης και το πλασμίδιο εισάγεται σε *E. coli*.

• Τα βακτήρια καλλιεργούνται απουσία γλυκόζης και παρουσία λακτόζης, οπότε επάγεται η *β*-γαλακτοζιτάση και μαζί της οι αλυσίδες Α και Β της ινσουλίνης που είναι δεσμευμένες ομοιοπολικώς επί του ενζύμου μέσω του τελικού αμινοξέος Met.

• Μετά τη λύση των κυττάρων, ακολουθεί επεξεργασία με CNBr, το οποίο διασπά το μόριο σε θέσεις Met απελευθερώνοντας τις αλυσίδες Α και Β (οι αλυσίδες μένουν ανέπαφες καθώς δεν περιέχουν Met).

• Ίσως καταλληλότερη βιομηχανική μέθοδος είναι αυτή που προβλέπει την έκφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί ανθρώπινη προϊνσουλίνη σε *E. coli* και ακολούθως ενζυμική υδρόλυση παρουσία καρβοξυπεπτιδάσης C και απομάκρυνση του πεπτιδίου C από το προϊόν.

• Η περίπτωση αυτή απαιτεί έναν μόνο βιοαντιδραστήρα, ενώ η μέθοδος καθαρισμού είναι αρκετά πολύπλοκη περιλαμβάνοντας μεγάλο αριθμό σταδίων.



Σχ. 143. Παρασκευή ανθρώπινης ινσουλίνης με τεχνολογία ανασυνδυσμένου DNA.