

# *Klasické biotechnologické postupy ve farmacii*

*Milan Bartoš*

***Přednáška Biotechnologie léčiv 2022***

# ***Obsah přednášky***

- 1) Průmyslová mikrobiologie***
- 2) Enzymové inženýrství***
- 3) Imobilizované enzymy***
- 4) Rostlinné biotechnologie***
- 5) Kultury živočišných buněk***
- 6) Křížení buněk, hybridomy***

# *Průmyslová mikrobiologie*

Moderní průmyslová mikrobiologie má začátek až v technologii výroby penicilínu, vyvinuté ve 40. letech 20. století

- **Bakterie**
- **Aktinomycety**
- **Řasy**
- **Kvasinky**
- **Plísně**

„Ó pane, padám na kolena a prosím Tě, aby mé syntézy nebyly horší než ty, které provádějí bakterie!“

Óda organického chemika

# *Klíčové problémy mikrobiálních výrob*

- 1) Výběr a úprava vlastností produkčního organismu**
- 2) Výběr a zajištění vhodné výchozí suroviny**
- 3) Optimalizace podmínek růstu mikroorganismu a tvorby produktu**
- 4) Konstrukce vhodných výrobních zařízení**

# *1) Výběr produkčního kmene*

## **Cíle šlechtění**

- 1) Zvýšení výtěžků žádané látky**
- 2) Potlačení vzniku doprovodných (kontaminujících) látek (především těch s vedlejšími účinky)**
- 3) Změna metabolismu, aby nebyl nutný drahý induktor**
- 4) Přinutit organismus k produkci i za represivních nebo inhibičních podmínek**

# *Metody šlechtění mikroorganismů*

## **Indukce a selekce**

Mutageny chemické a fyzikální

## **Hybridizace**

Degenerovaný produkční kmen x životaschopný kmen  
s malou produkcí

Nejčastěji fúze sféroplastů/protoplastů

## **Rekombinace DNA**

Nejmodernější způsob šlechtění

# *Nevýhody mikrobiálních výrob*

## **genetická proměnlivost a nestálost vlastností**

- **V důsledku mutací může v populaci vzniknout varianta méně produkční, která původní kulturu přeroste**
- **Nutné pravidelně testovat vlastnosti inokula**
- **Vhodné je udržovat kulturu pod selekčním tlakem – antibiotika, auxotrofie**

## 2) *Výchozí suroviny*

### **Primární**

Přímo z výchozích materiálů – kukuřice (škroby), sacharidy (sacharóza, glukóza, xylóza), celulóza, rostlinné oleje, mléko, ropa

### **Sekundární**

Vedlejší produkty nebo odpady ze zpracování primárních surovin – melasa, kukuřičný výluh, syrovátky, bramborová voda, lignocelulózový odpad, odpady živočišné výroby, ...

### **Produkty jiných mikrobiálních výrob**

Slouží pro výrobu etanolu, metanolu, glycerolu nebo pro biotransformace



# *Lignocelulózový odpad*

## **Předběžná úprava**

Rozdělení na lignin, celulózu a hemicelulózy

- nasekání či rozemletí na menší částice
- odstranění ligninu a hemicelulóz v kyselém nebo zásaditém prostředí

## **Hydrolýza celulózy na jednoduché cukry (zcukření)**

- pomocí kyseliny sírové nebo
- enzymaticky – amylázy, celulózy, galaktázy, xylanázy a další

## **Fermentace glukózy**

Výroba etanolu nebo biomasy (krmných kvasnic)

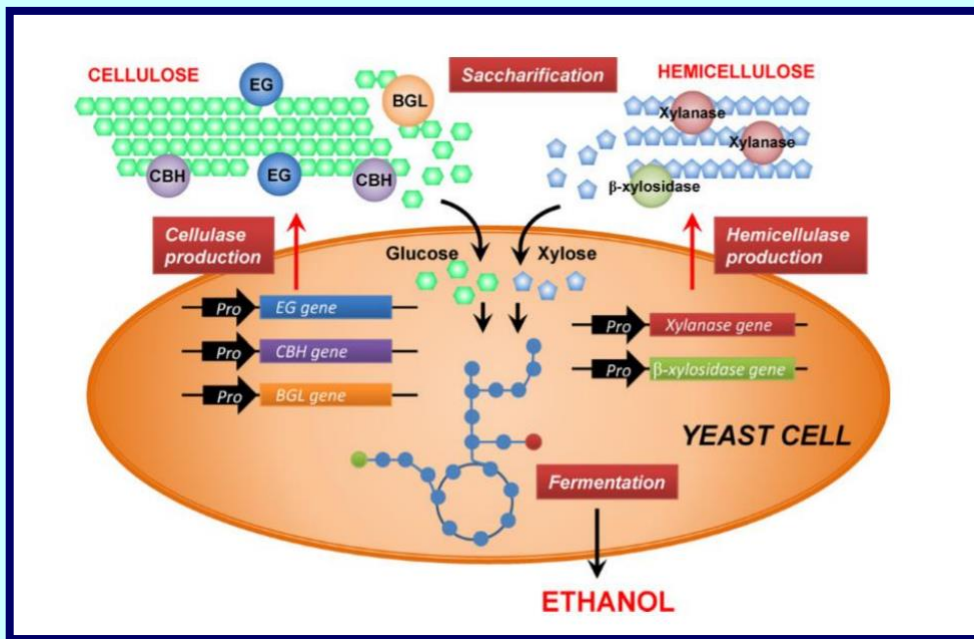
# *Simultánní sacharifikace a fermentace (SSF)*

- nastavení kompromisních podmínek pro sacharifikaci a fermentaci
- nejčastěji se provádí v několika za sebou řazených temperovaných nádobách, přičemž
- v první nádobě (resp. v několika prvních nádobách) jsou podmínky nastaveny blíže optimu pro sacharifikaci
- v poslední nádobě (resp. v posledních několika nádobách) jsou podmínky bližší optimu pro fermentaci

**Předpokladem pro SSF je dostupnost buněk (kvasinek) tolerantních k vyšším teplotám. Teploty až 40-60°C + enzymy, které zaručují rozložení dlouhých řetězců celulózy a hemicelulózy**

# CBP – Consolidated bioprocessing

Způsob kdy jsou sacharifikace a fermentace prováděny jedním druhem organismu - kvasinkami, které jsou schopny jak produkce potřebných enzymů (celulázy, xylanázy), tak metabolismu cukrů na etanol.



Zkratka	Název/význam
EG	endoglukanáza, enzym štěpící celulózu (celulóza)
CBH	celubiohydroláza, enzym štěpící celulózu (celulóza)
BGL	β-glukozidáza, enzym štěpící celulózu (celulóza)
Xylanase	enzym štěpící hemicelulózu
β-xylosidase	enzym štěpící hemicelulózu
EG gene	geny zodpovídající za produkci daného enzymu
CBH gene	
BGL gene	
Xylanase gene	
β-xylosidase gene	

HASUNUMA, Tomohisa a KONDO, Akihiko. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. Process Biochemistry. 2012, 47

### ***3) Výrobní proces***

**Viz samostatná přednáška –  
Biotechnologický proces**

### ***4) Konstrukce výrobních zařízení***

**Viz samostatná přednáška –  
Biotechnologický proces**



# *Enzymové inženýrství*

**Získávání enzymů a jejich úpravy vhodné pro praktické aplikace, optimalizace jejich použití v nejrůznějších oblastech lidské činnosti a snaha o konstrukci umělých enzymů**

**Je to chemická technologie  
nebo biotechnologie?**



# *Jak se získávají enzymy?*

## **Zdroje**

- rostlinná pletiva
- tkáně živočichů
- mikroorganismy

## **Izolace**

- HPLC
- Elektromigrační metody
- Afinitní chromatografie

**Většina enzymů mikrobiálního původu je extracelulární**

- Nacházejí se v kultivačním médiu
- Jejich izolace je snadnější

# Nejčastěji produkované enzymy

Hydroláza, štěpí škrob až na glukózu

škrob na jednodušší

**Proteázy**

**Glukoamyláza**

Izomeráza, mění glukózu na fruktózu

Proteáza, specificky štěpí mléčnou bílkovinu κ-kasein

**Glukoizomeráza**

**Chymozin**

- První velkovýroba – rok 1890
- Hydrolýza škrobu na glukózu extraktem z plísní
- Širší zavádění do průmyslu až po 2. světové válce



# Nejčastější průmysloví producenti

Bakterie	Houby	Kvasinky
<i>Bacillus subtilis</i> var.	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>B. licheniformis</i> var.	<i>A. niger</i>	
<i>B. coagulans</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>R. stolonifer</i>	
<i>Streptomyces olivaceus</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	
<i>S. olivochromogenes</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	
<i>S. rubiginosus</i>	<i>Mucor miehei</i>	
	<i>M. pusillus</i>	
	<i>Claviceps purpurea</i>	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	

# Produkce bakteriální $\alpha$ -amylázy

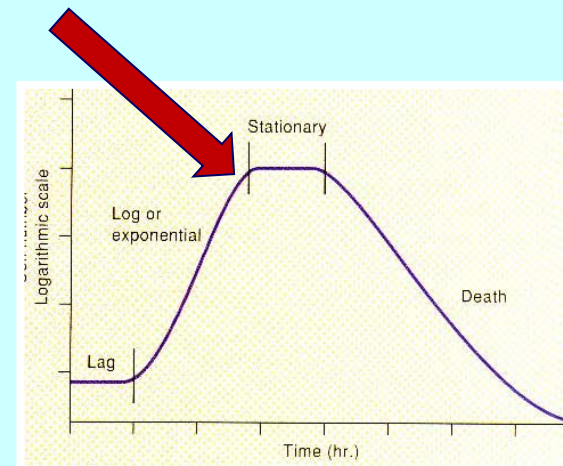
- Jedná se o vnitrobuněčný enzym
- *Bacillus subtilis* nebo *B. amyloliquefaciens* nebo *B. licheniformis*
- Submerzní kultivace
- Inokulum = čistá kultura s 250 násobnou produkcí než byl původní kmen
- Exprese indukována laktózou = v médiu musí být nízká/vysoká koncentrace glukózy



Zopakujte si regulaci laktózového operonu z přednášek MolBiol

# Proces fermentace $\alpha$ -amylázy

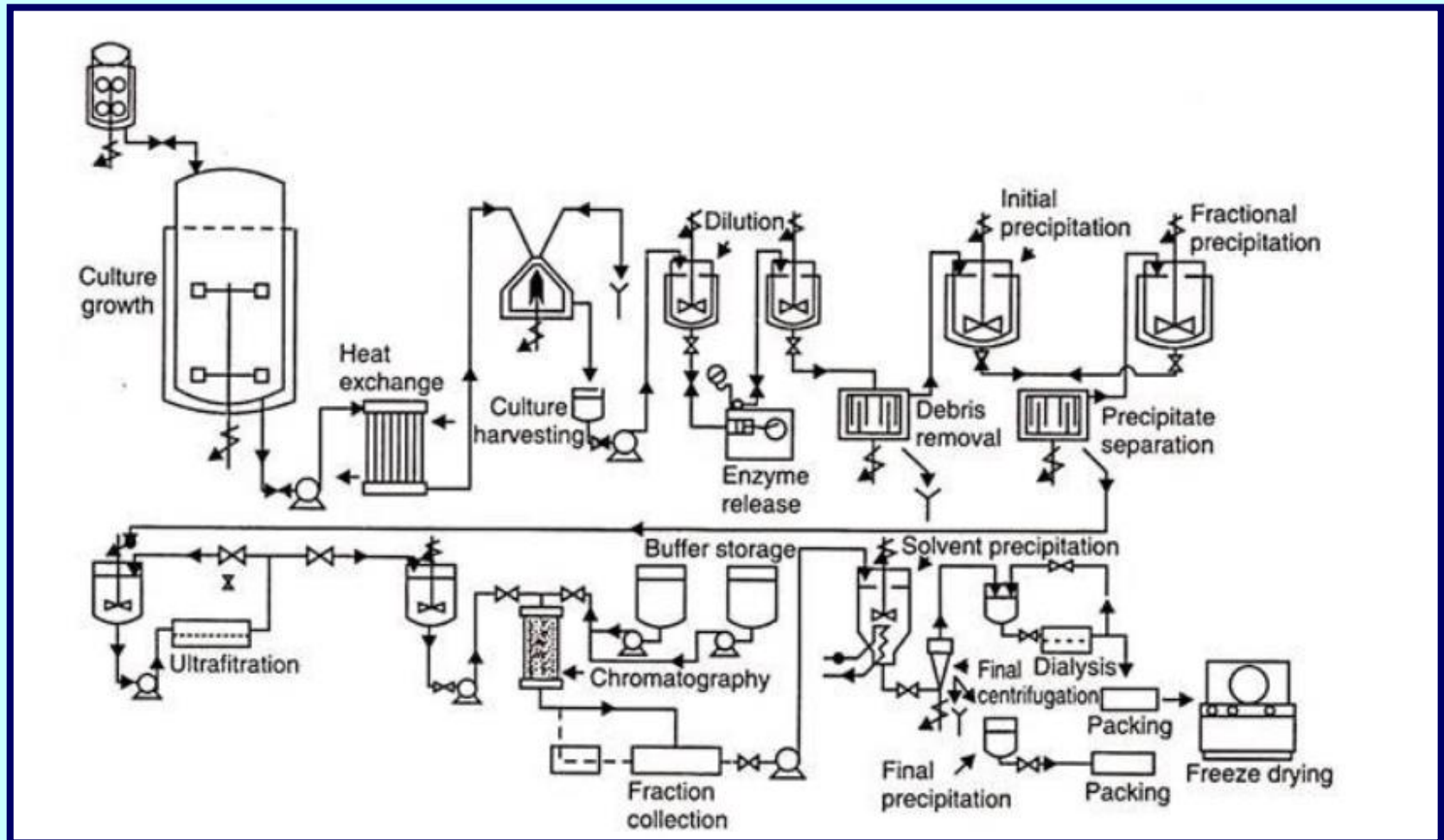
- **Objem fermentoru je 4 500 až 135 000 litrů**
- **Fermentace probíhá 4-6 dnů**
- **pH média = 7,0**
- **Pufrem je uhličitán vápenatý**
- **Teplota média 30-40°C**
- **Produkce  $\alpha$ -amylázy začíná v okamžiku, kdy je hustota kultury  $10^9$ - $10^{10}$  buněk/ml**
- **Nejvyšší produkce na konci log fáze růstu před zahájením sporulace buněk**



# *Sklizeň a příprava $\alpha$ -amylázy*

- **Zabránění degradace enzymu = rychlé zchlazení média na 5°C**
- **Sběr biomasy centrifugací**
- **Degradace buněk, flokulace zbytků fosforečnanem vápenatým**
- **Precipitace enzymu acetonem nebo etanolem nebo amonium sulfátem nebo síranem sodným**
- **Frakční precipitace = nejčistší produkt**
  
- **Tekutá forma obsahuje 2% enzymu**
- **Pevná forma obsahuje 5% enzymu**

# Schéma výroby $\alpha$ -amylázy

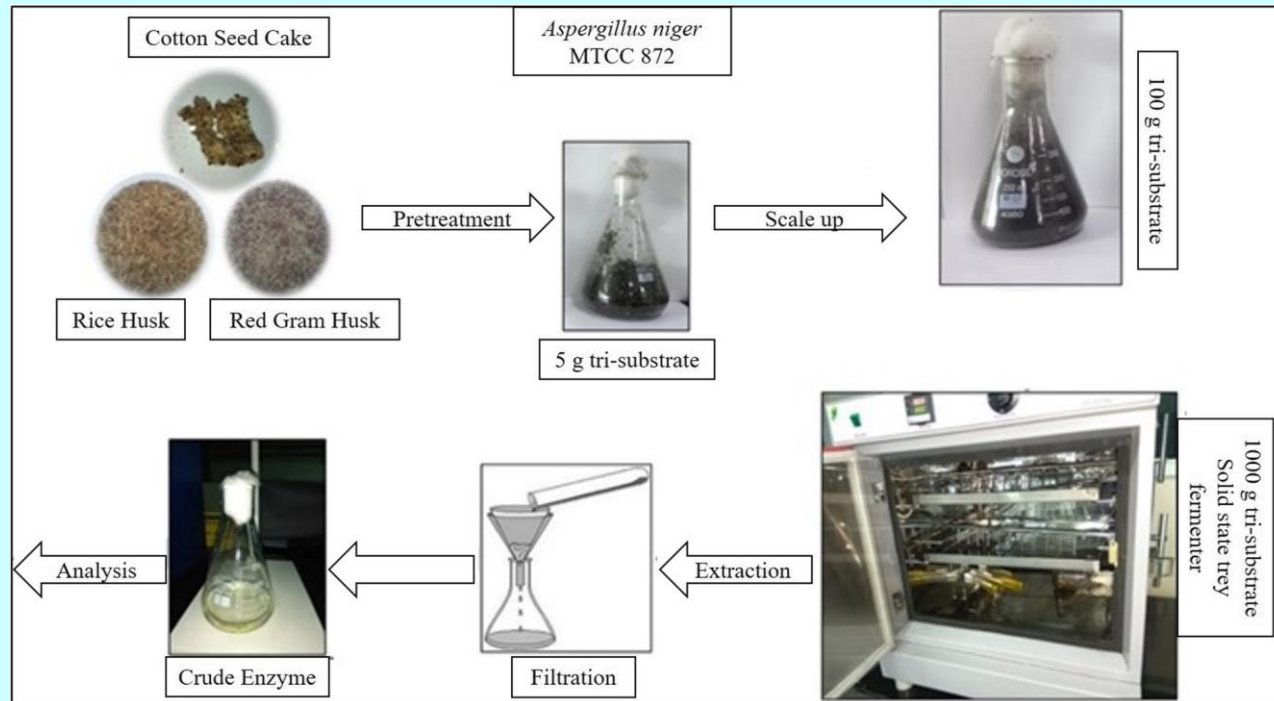


# Produkce $\alpha$ -amylázy z hub

➤ *Aspergillus oryzae*

➤ *Aspergillus niger*

➤ Procesy obdobné jako u bakteriální  $\alpha$ -amylázy



# Další produkty *A. niger*

- **amylázy**
- **hydrolázy**
- **proteázy**



- **Organické kyseliny**
  - **citronová (E330)**
  - **glukonová**

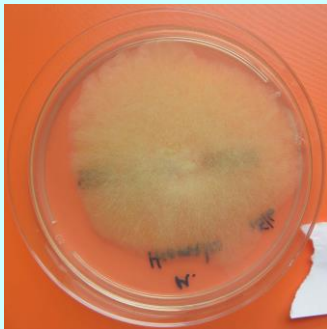
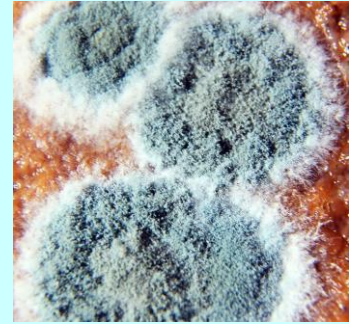
- **Produkty fermentace**
  - **Saké**
  - **Sojová omáčka**



# Další významné houby

## ➤ *Rhizopus stolonifer*

- k. fumarová, citronová, mléčná
- steroidy



## ➤ *Mucor hiemalis*

- k. fumarová, citronová, mléčná
- steroidy

## ➤ *Claviceps purpurea*

- Alkaloidy
- ergotamin a ergometrin







# Stabilizace enzymů



**Stabilita enzymu je mnohdy limitujícím faktorem jeho použití**

- **Přídavkem nízko nebo vysokomolekulárních látek**
- **Chemickou modifikací**
- **Vytvořením příčných vazeb v molekule**
- **Denaturací a znovusbalením (refolding) molekuly**
- **Vazbou na polymerní nosič**
- **Proteinové inženýrství**

# *Volné x imobilizované enzymy*

**K nevýhodám volných enzymů patří**

- **Nestabilita**
- **Jednorázovost použití**
- **Přechod enzymů do reakční směsi a nutnost jejich odstraňování**

**Imobilizované enzymy = biokatalyzátory**

# *Imobilizované biokatalyzátory*

**Biokatalyzátory** - biologický materiál, který má schopnost transformovat určitý reaktant na produkt, aniž by došlo ke změně jeho samotného

**Imobilizace** = proces, při kterém je enzym nebo buňka, případně její část, převeden na formu heterogenního katalyzátoru

- **Enzymy**
- **Živé buňky**
- **Mrtvé buňky**

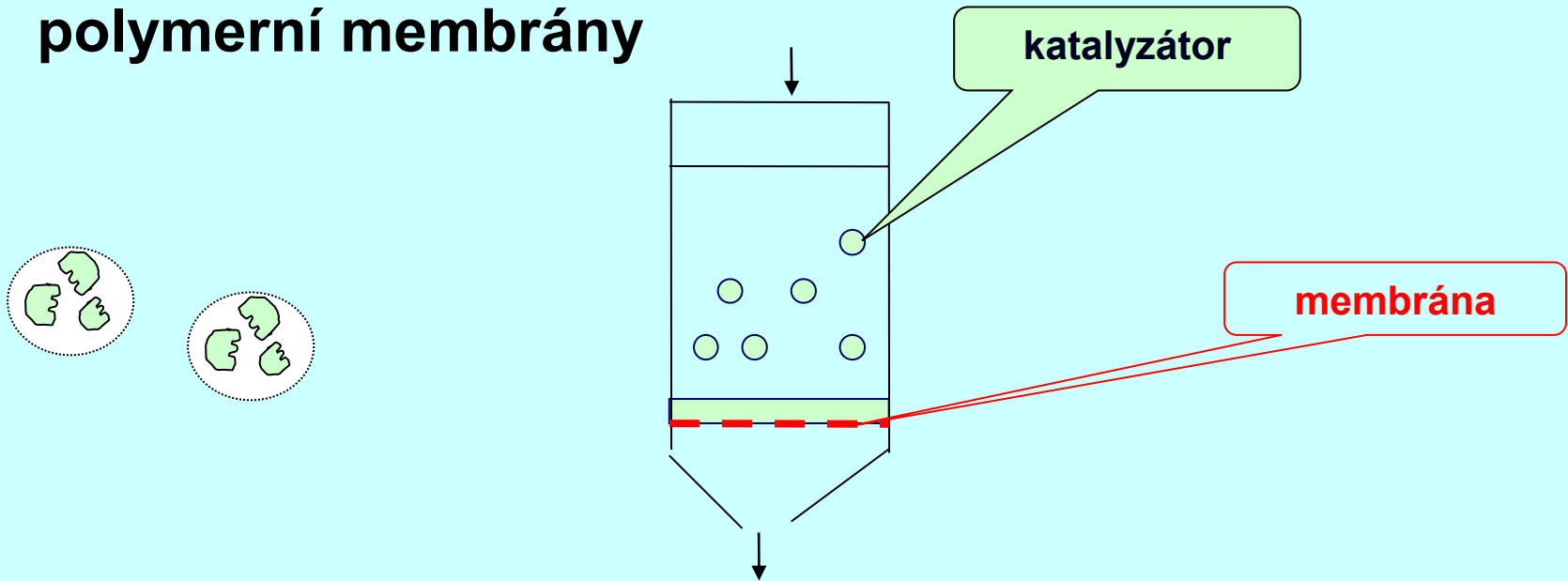
# *Výhody imobilizace*

- **Vyšší ekonomika procesu**
- **Kontinuální operace**
- **Lepší kontrola reakcí**
- **Možnost současného použití nekompatibilních enzymů**
- **Delší doba aktivity enzymu**
- **Rychlejší separace produktu a substrátu**

# Metody imobilizace - I

## 1. Zabudování v polymerech

- zapolymerování do matrice gelů
- dispergace v prostředí biopolymerů
- polymerní membrány



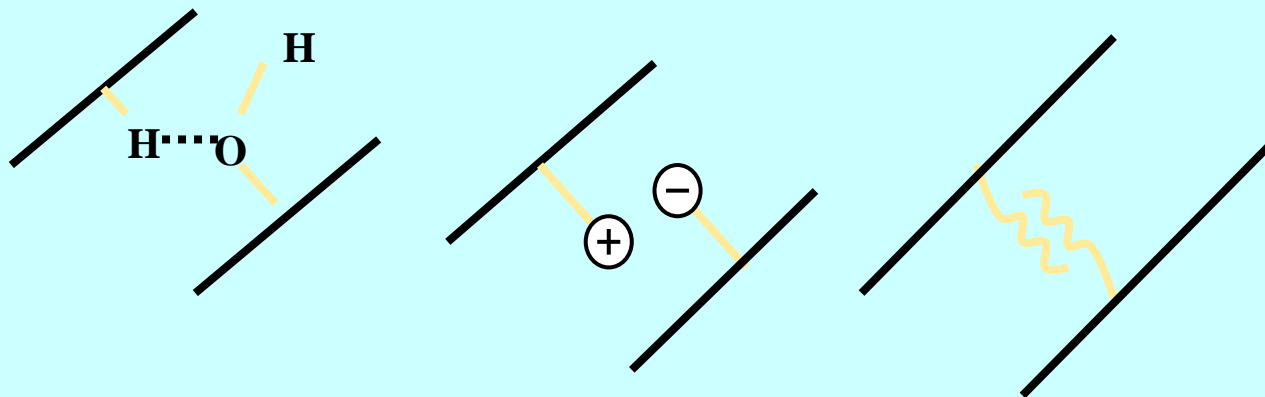
**Mikroenkapsulace** – uzavření biokatalyzátoru membránou do mikrokapsulí → tvorba emulze

# Metody immobilizace - II

## 2. Vazba na pevný nosič

### adsorpce

- nekovalentní vazba pomocí H-vazeb na inertní nosič
- elektrostatickými interakcemi na měničce iontů
- nespecifické interakce hydrofobních skupin, pseudoafinitní interakce...

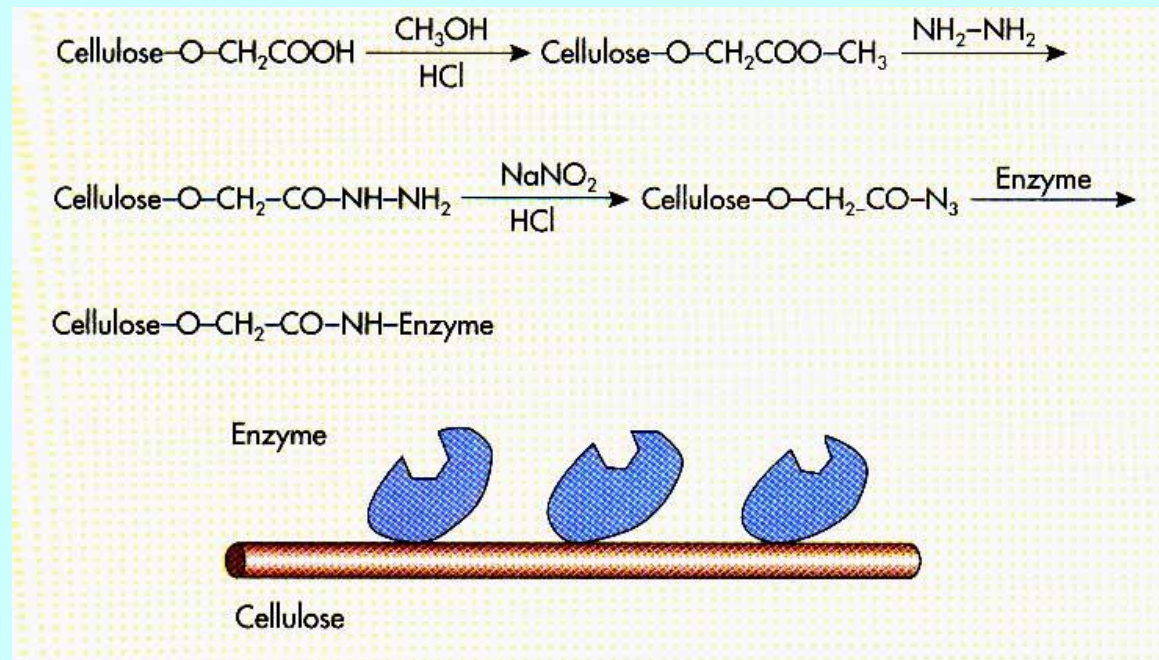


# Metody imobilizace - III

## 2. Vazba na pevný nosič

### kovalentní vazba

- modifikované přírodní polymery (celulosa, dextran, agarosa...), případně i syntetické polymery (polyakryláty...)

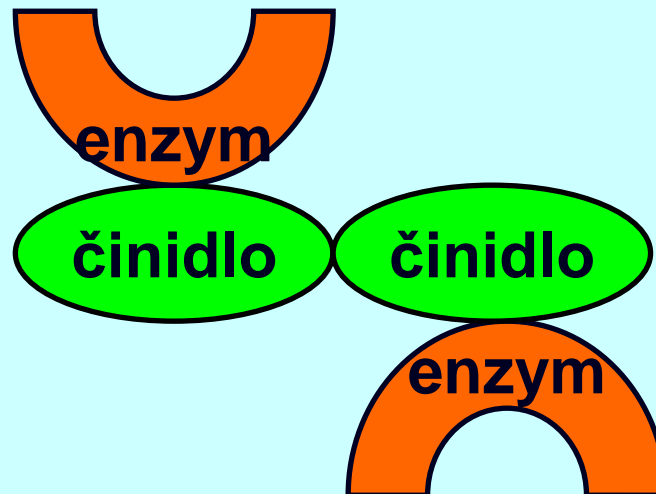




# Metody imobilizace - IV

## 3. Tvorba agregátů bez použití nosiče

- zesítnění molekul enzymu pomocí bifunkčních činidel, nebo jejich vazbou na molekuly jiných inertních proteinů (mezimolekulová vazba - tzv. cross-linking)



# *Multienzymové systémy*

## **Vyšší generace enzymových katalyzátorů**

- **Imobilizované multienzymové systémy**
- **Enzymy vázané na membrány**
- **Imobilizované organely**
- **Imobilizované celé buňky**
  - **Především buňky mikrobů**
  - **Imobilizované buňky rostlin**
    - **Po ukončení růstové fáze (autolyzované)**
    - **V růstové fázi (živé)**

# Proč imobilizované buňky?

- Odstranění pracných a nákladných izolací a purifikací enzymů
- Stabilizace enzymů v přirozeném prostředí buňky
- Možnost využít celé metabolické dráhy

- Chemické reaktory
- Kontinuální procesy na kolonách



Vyšší uniformita produktu

# Závěr

**Používání imobilizovaných buněk umožňuje optimální využití enzymových systémů a tím zvýšení produkce metabolitu při použití stejného množství buněk**



# ***Kde se využívají imobilizované buňky?***

- Výroba etanolu, piva
- Organické kyseliny a aminokyseliny
- $\alpha$ -amyláza
- Bacitracin
- Likvidace toxických látek při čištění životního prostředí

**Bacitracin produkují bakterie *Bacillus subtilis* imobilizované v PVA (poly(vinyl alcohol) kryogelech, i když běžnější je kultivace v tekutém médiu. Bacitracin je secernován do média**

**Mají imobilizované buňky  
nějaké nevýhody ?**



- **Omezení přístupu substrátu = není využita celá kapacita katalyzátoru**
  - **Optimální rychlost jen na povrchu**
  - **Bariérou je i biomembrána = nevhodné pro makromolekuly**
  - **Nežádoucí reakce příměsí dalších enzymů**
  - **Řešením jsou různé kompromisy**
- 
- **Intenzivní růst buněk = destrukce systému**
  - **Médium, které by udrželo buňky při životě a zároveň potlačovalo růst a dělení? NEEXISTUJE**

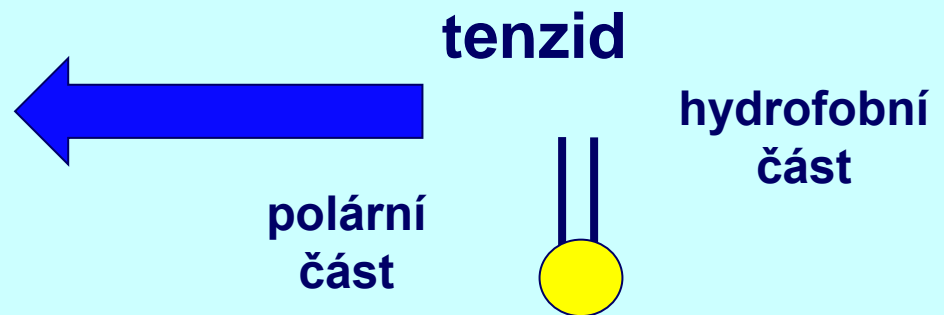
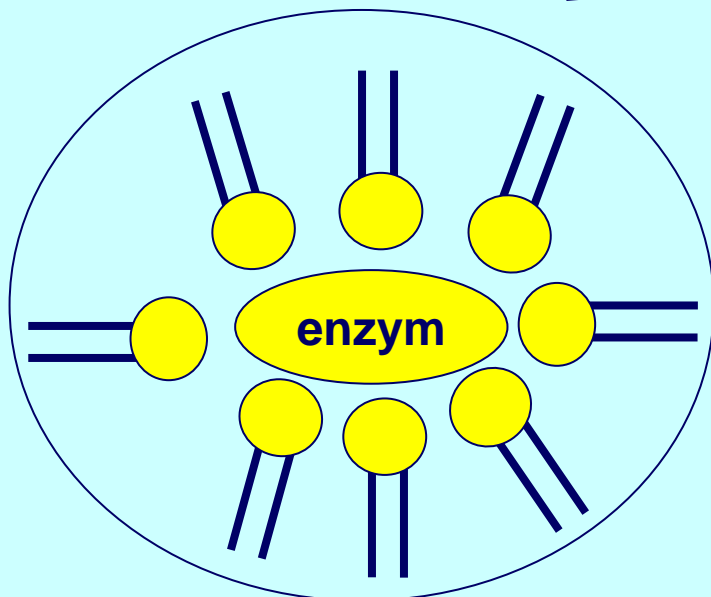
# Enzymové micely

## Ve vodném prostředí

- Standardní micely
- Kondenzační reakce
- Hydrolázy
- Oxidoreduktázy

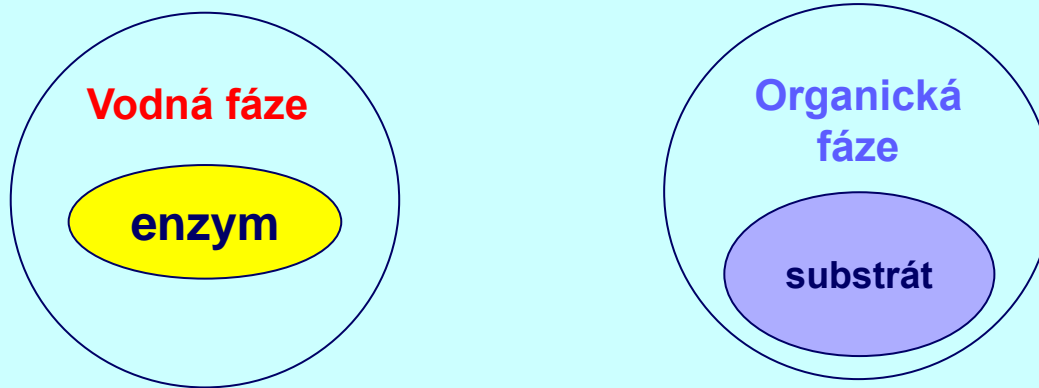
## V nevodném prostředí

- Obrácené micely
- Disperze enzymů v nepolárních rozpouštědlech
- Možnost přeměn ve vodě nerozpustných látek



# Dvoufázové systémy

Určeny k enzymové přeměně látek nerozpustných ve vodě



- Smíchání protřepáním
- Přejít substrátu do vodné fáze
- Katalýza
- Návrat produktu do organické fáze



# *Výhoda dvoufázového systému*

- **Zmenšený objem reakční směsi**
- **Snadná separace produktu i od neimobilizovaného enzymu**

## **Příklady využití**

- **Transformace steroidů**
- **Oxidace uhlovodíků**
- **Konverze glukózy na etanol**
- **Biosyntéza tryptofanu z indolu a serinu**



# *Rostlinné biotechnologie*

**Rostliny – nejpestřejší zdroj přírodních látek**

**Produkty mnohastupňové biosyntézy**

**Klasický přístup**



**Biotechnologie**

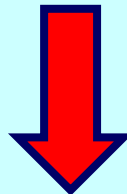


# *Tkáňové kultury*

**Explantátové kultury pěstované jako mikroorganismy**

## **Základní teze**

**Téměř každá somatická buňka je totipotentní**



**Kultura bude produkovat totéž, co celá rostlina**

**Která rostlinná buňka není totipotentní?**

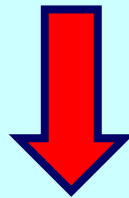


**Pylová**



# *Kultura bude produkovat totéž, co celá rostlina?*

**Rostlina je diferencována v čase i prostoru!**



- **Metabolismus sekundárních metabolitů probíhá pouze během omezených vývojových stádií**
- **Metabolity vznikají jen v určitých pletivech**
- **Procesy jsou složitě regulovány**

**Znáte příklady výjimek?**



# *Převod do explantátu - stres*

## **Důsledky**

- **Metabolit není produkován**
- **Produkce metabolitu je nízká**
- **Hromadí se meziprodukt**
- **Produkuje se něco jiného (aktivace alternativní metabolické dráhy)**

**Je nezbytná selekce vhodného „klonu“**

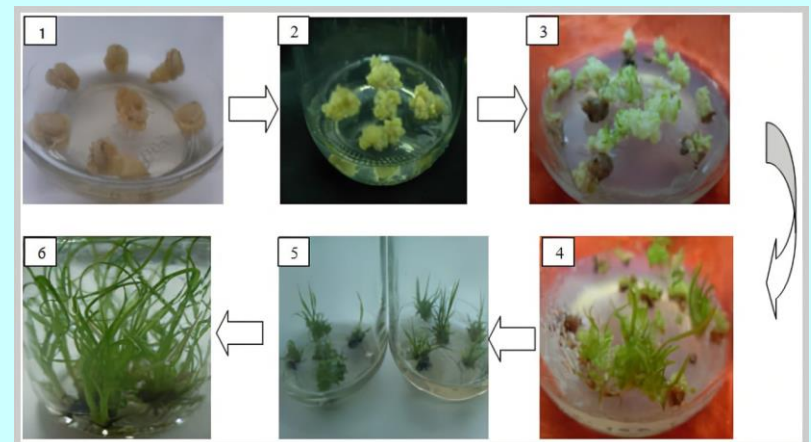
# Typy buněčných kultur

## Kalusová

- Je výchozí pro oba typy
- Rozřezané kousky rostliny na agaru
- Nepravidelný výrůstek = kalus
- Subkultivace a vznik nezávislosti

## Suspenzní

- Vzniká z kalusu po ovlivnění fytohormony a snížení přilnavosti buněk





# *Suspenzní kultura*

**Nelze ji udržet dlouho**

- **Přenáší se 5-10% inokula do čerstvého média**
- **Přenos po 2-4 týdnech**
- **Růst rychlejší než v agaru (dny x týdny)**

**Pro delší uchování je vhodnější kalusová kultura**

# *Typy kultivací*

## **Vsádková**

- **Suspenze buněk v baňkách na třepačce nebo rolleru**
- **Jen laboratorně**
- **Technologicky pro průmysl nevhodné**

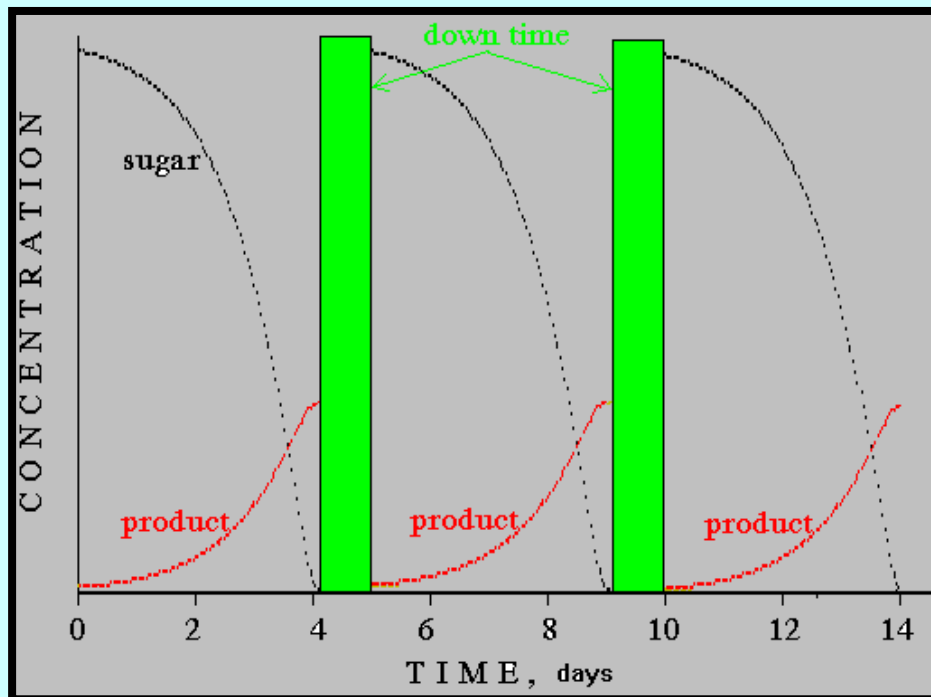
## **Kontinuální**

- **Dlouhá doba kultivace**
- **Fragilita buněk**
- **Změny metabolické aktivity**
- **Tvorba buněčných shluků**
- **Delší fáze lagu a odumírání**

# Kompromisní řešení

## Periodická výměna poloviny objemů nakultivované biomasy a média

- Před ukončením exponenciální fáze růstu



**Semidiskontinuální  
kultivace**

# *Imobilizované rostlinné buňky*

## **Pro velkoprodukci rostlinných látek**

- **Umožňují získat suspenzní kultury s vysokou hustotou buněk**
- **Imobilizací se zvýší životnost buněk**
- **Lze prodloužit biosyntetickou aktivitu**

## **Formy imobilizace**

- **Zabudování do polymerních gelů**
- **Vazba na pevný nosič**
- **Uzavření buněk do definovaných struktur**

# *Přednosti explantátových kultur*

## **Zkuste si je odvodit sami**

- **Řízené podmínky nezávislé na půdě a klimatu**
- **Kultury prosté hmyzu a patogenů**
- **Kontinuální produkce buněk různého původu – tropy, hory, vzácné, ohrožené**
- **Zvýšení produkce po selekci na buněčné úrovni**
- **Uniformní produkty**
- **Produkce nových látek, které se v přírodě nevyskytují**

**Rostliny jsou využitelné především pro  
produkci sekundárních metabolitů  
nepostradatelných pro farmaceutický  
průmysl**



# *Nejčastější produkce*

Viz samostatná přednáška

**Alkaloidy**

**Chinony**

**Steroidní látky**

**Saponiny**

**Kardenolidy**

**Biotransformace**





# *Kultury živočišných buněk*

**Kultura se vytvoří po mechanické nebo enzymatické dezintegraci tkáně, následuje centrifugace a inokulace do živného kapalného média s krevním sérem**

**V kultivační láhvi buňky pokrývají během růstu dno**



**Proteolytickými enzymy se buňky uvolní a reinokulují**

# *Srovnání živočišné buňky a mikroorganismu*

Vlastnost	Mikroorganismus	Buňka živočišná
Složitost	Jednoduchá	složitá
Pevnost	Pevná	Křehká
Obal	Buněčná stěna	Plasmatická membrána
Metabolismus	Nezávislá	Součást organismu
Výživa	Glukóza + soli	Komplexní
Kultivace	Snesou i intenzivní míchání v roztocích	Většinou pevné povrchy
Růst	Rychlý	Pomalý

# *Média pro živočišné buňky*

**Glukóza + ionty + aminokyseliny + 5-20% krevního séra**

**K čemu je zapotřebí krevní sérum?**

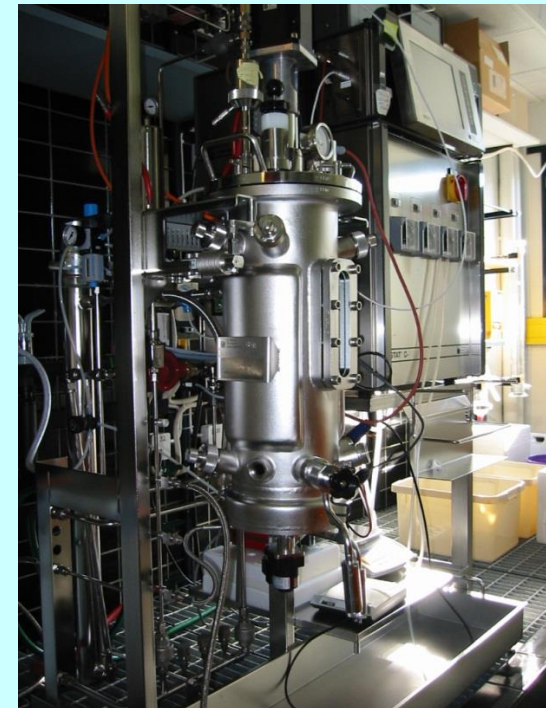
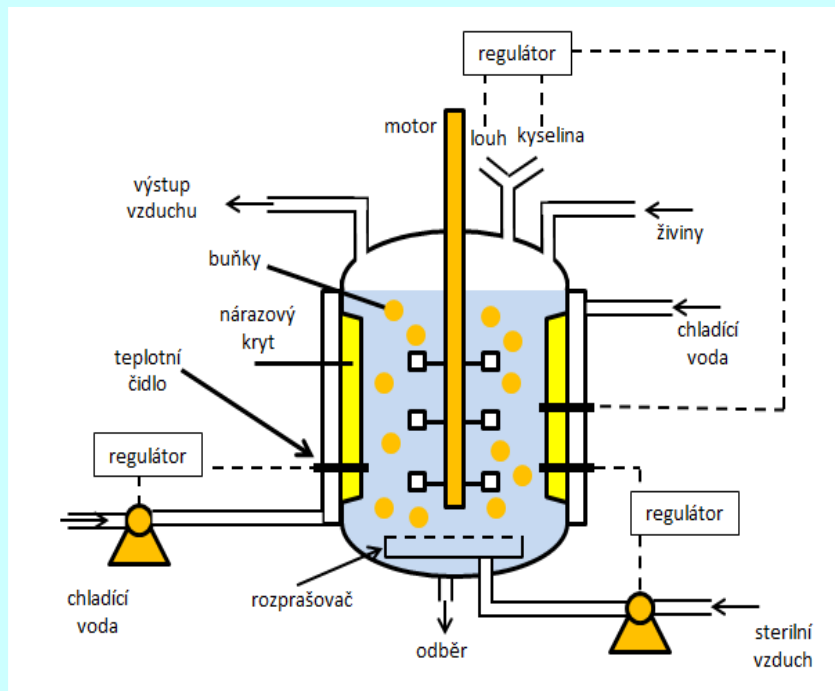


**Slouží k zajištění neidentifikovaných složek nezbytných pro výživu buněk**



# Podmínky kultivace

- Přísně dodržovat pH
- Přísně dodržovat teplotu
- Přísně dodržovat hladinu  $O_2$  a  $CO_2$
- Regulovat koncentraci iontů (osmotický tlak)



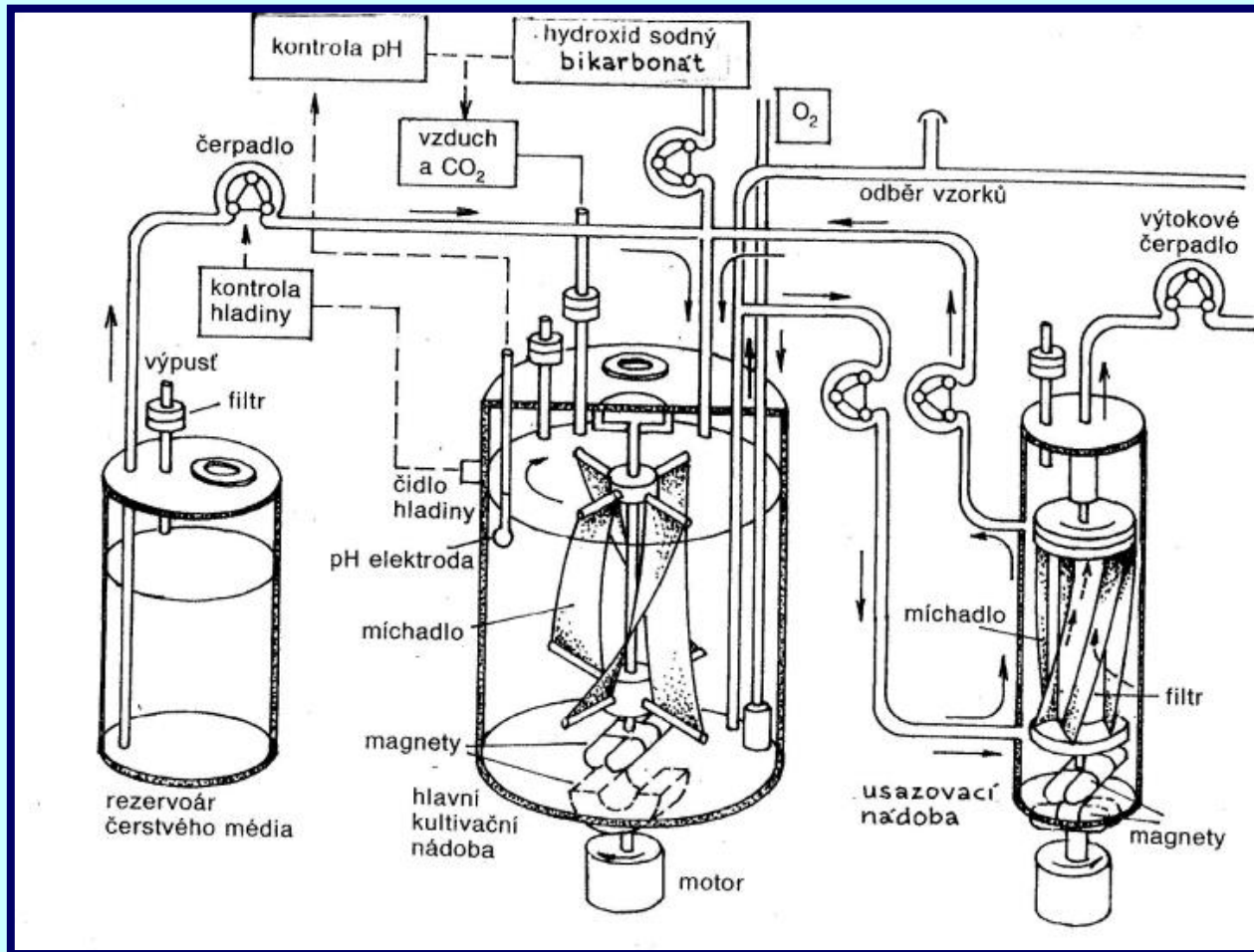
# *Perfuzní bioreaktor*

**Určený pro velkokapacitní kultivaci savčích buněk**

- **Vyvinutý modifikací fermentorů pro submerzní kultivaci mikroorganismů**
- **Vyžaduje absolutní sterilitu – nutno tepelně sterilizovat**
- **Většinou do 100 litrů, aby se vlezl do autoklávu**

**Velkoprodukce se zajišťuje použitím série bioreaktorů**

# Schéma perfuzního bioreaktoru



Převzato z Vodrážka (1991): Biotechnologie, skripta VŠCHT, Praha

**Vyžadují všechny živočišné buňky pevný povrch?**



**Nikoli, krevní buňky, buňky lymfatických tkání a většina rakovinných a jiných transformovaných buněk (hybridomy) lze pěstovat v suspenzích**



# *Jak zvětšit plochu nosičů*

**Povrch stěn bioreaktoru neposkytuje dostatečnou plochu vzhledem k objemu kultury**

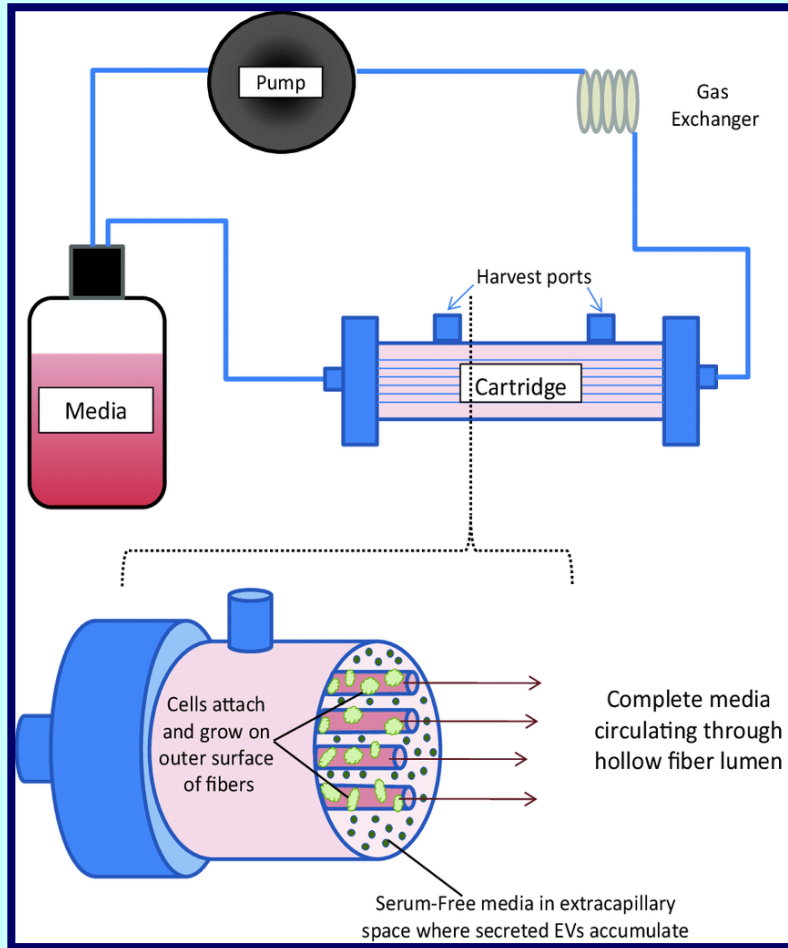
- **Porézní polymery**
- **Trubičky nebo dutá vlákna**
- **Kuličky o průměru 50 $\mu$ m až několik set  $\mu$ m - mikronosiče**

## **Mikronosiče na bázi**

- **Polymerů glukózy**
- **Polystyrenové, polyakrylamidové, epoxidové**
- **Želatinové, potažené dextranem**
- **Skleněné, potažené dextranem nebo syntetickým polymerem**



# Trubičkový bioreaktor



## Hollow fiber

Trojrozměrný systém obsahující duté trubičky = polopropustné kapilární membrány sestavené do paralelních řad umístěných zpravidla v karbonátové trubici.

Buňky na povrchu kapilár  
Médium proudí vnitřkem

# *Použití živočišných buněk*

## **Nejvíce k výrobě vakcín**

- **První lidská vakcína vyrobená kultivací savčích buněk byla vakcína proti polioviru, 1954**

## **Další příklady vakcín**

- **Neštovice**
- **Zarděnky**
- **Žlutá horečka**
- **Chřipka**
- **Herpes simplex II**

**Nastudujte, v jakých buňkách se  
produkují vakcíny proti SARS-CoV-2**



# Křížení buněk

Každé křížení geneticky rozdílných individuí vedoucí k potomkům s genotypem odlišným od jejich rodičů

**Šlechtění hospodářských zvířat i rostlin**



**Somatická fúze buněk**

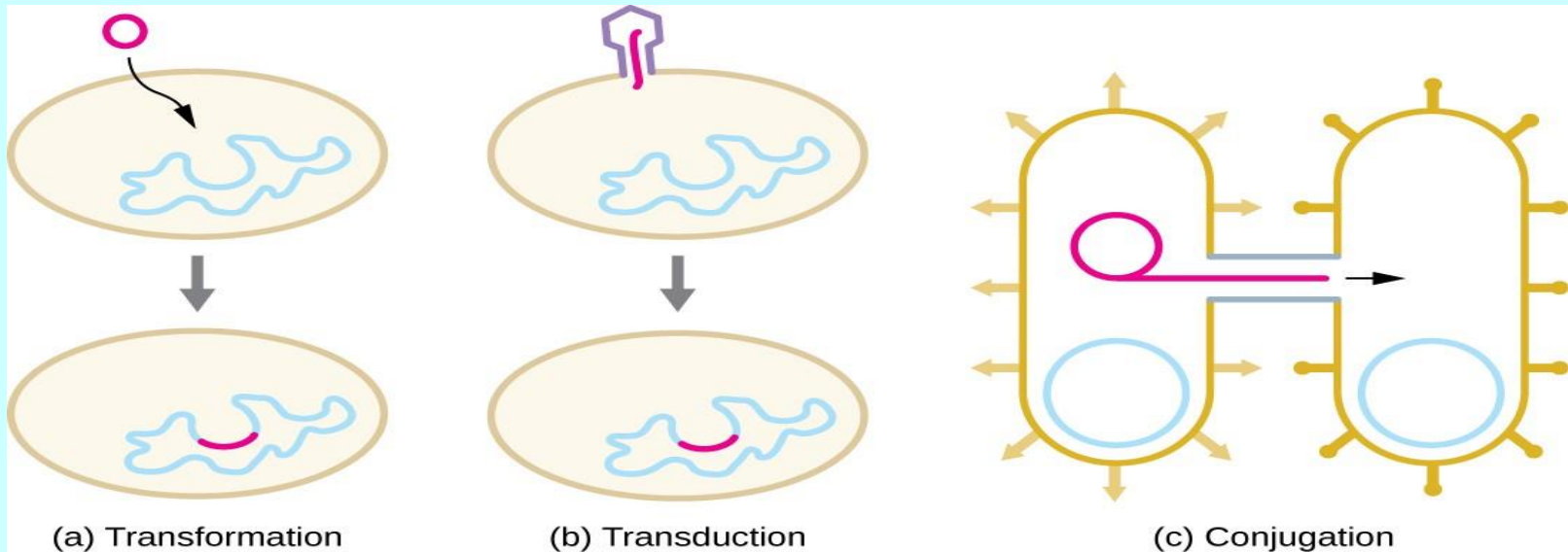
# Křížení → rekombinace genů

V přírodě probíhá přirozeně 3 způsoby

**Transformace**

**Transdukce**

**Konjugace**



**Kterému z uvedených  
procesů se nejvíce podobá  
fúze buněk?**



**Konjugaci**



# Úvaha

## Spojením dvou buněk vznikají nové genotypy

Živočišné buňky obsahují miliardy nukleotidů  
(člověk  $3 \times 10^9$  nukleotidů)

Kolik nových genotypů vznikne, když se genotyp mateřských buněk bude lišit o např. 10 nukleotidů?

2 buňky, 10 nukleotidů

$$2^{10}$$

1 024 nových kombinací

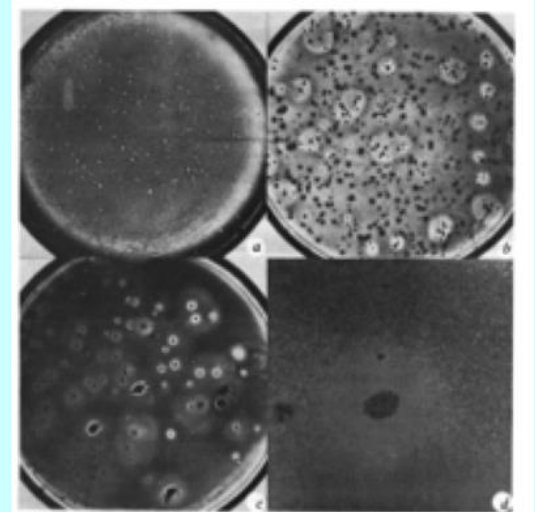




# *Hybridomy*

**Hybridní buňky vzniklé fúzí somatické a nádorové buňky**

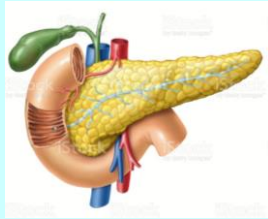
**Köhler a Milstein 1975**



<https://hybridoma.com/kohler-and-milstein/>

# Příklad hybridomu

Buňka lidského pankreasu

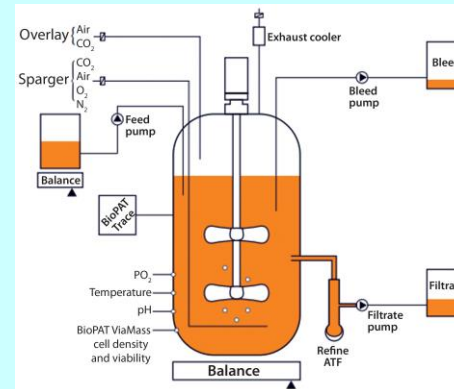


Buňka nádorová



Hybridní buňka

Inzulín



Nepoužívá se kvůli ekonomicky výhodnějším řešením

# *Využití hybridomů*

## **Technologie znamenala revoluci v imunodiagnostice**

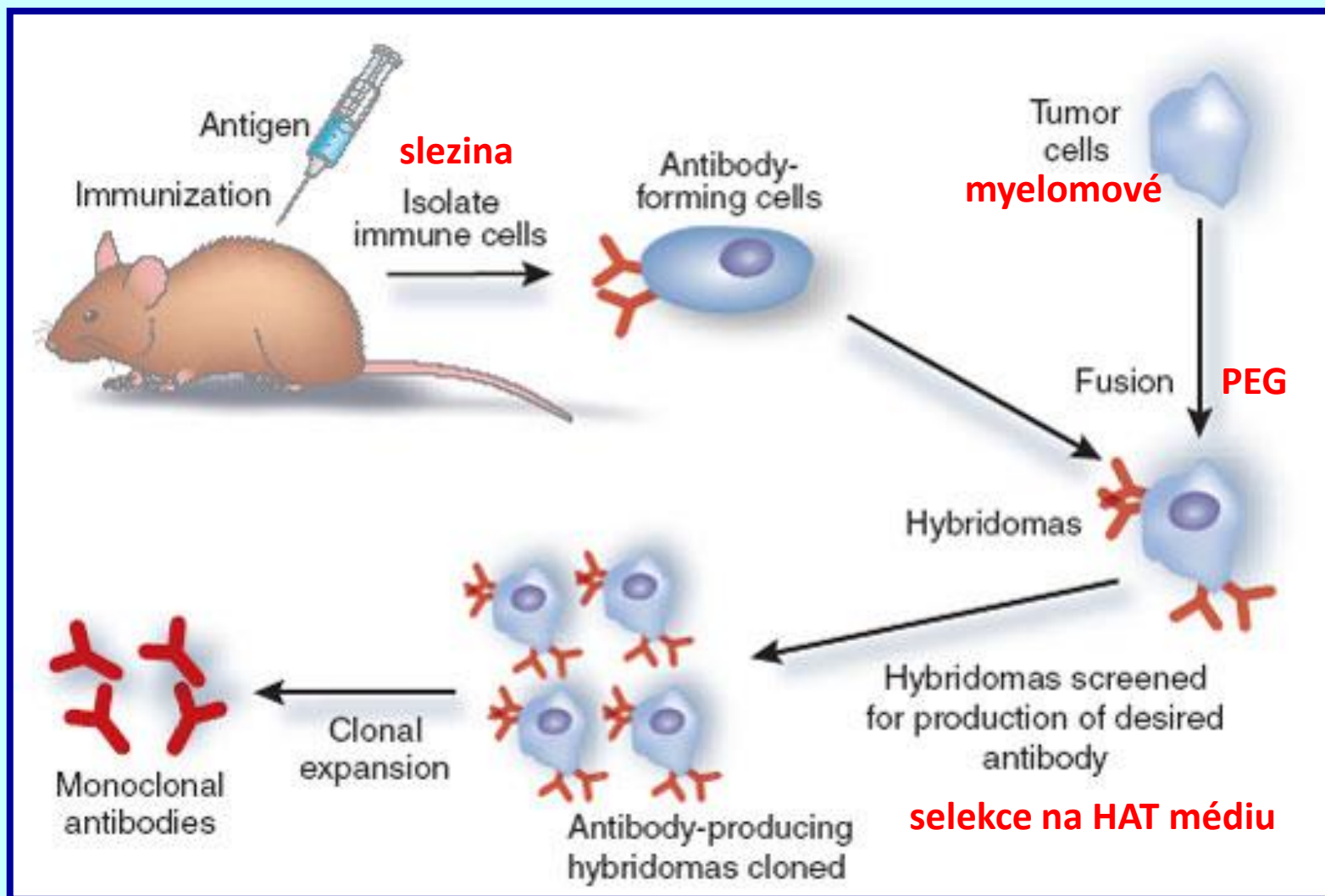
- **Analytické metody, výzkum (struktura proteinů)**
- **Diagnostické metody - patogeny, hormony, interferony, ... (ELISA)**
- **Specifická diagnostika rakovinných nádorů a jejich terapie (nádorově specifické protilátky)**
- **Imunotoxiny**
- **Vakcíny, antivirové protilátky**

# *Výroba monoklonálních protilátek*

**Z hybridních buněk vzniklých fúzí B-lymfocytu a  
nádorové buňky**

- **Lymfocyt produkuje protilátku**
- **Nádorová buňka zajišťuje nesmrtelnost**

# Příprava monoklonálních protilátek



# *Výhody technologie*

- **Antigen pro imunizaci nemusí být zcela čistý, vždy však získáme klon produkující žádanou protilátku**
- **Metoda je šetrná pro pokusná zvířata**
- **Zamražené hybridomy mají neomezenou životnost, přípravu není třeba opakovat**

# Selekce hybridomů

## Rostou na selekčním HAT médiu

- Obsahuje hypoxantin, ametopterin, tymin
- Vyžaduje buňky s funkční hypoxantin-guanin fosforibozyltransferázou (HGPRT<sup>+</sup>)



- **Myelomové buňky nerostou, protože**

**jsou HGPRT<sup>-</sup>**

- **Lymfocyty nerostou, protože**

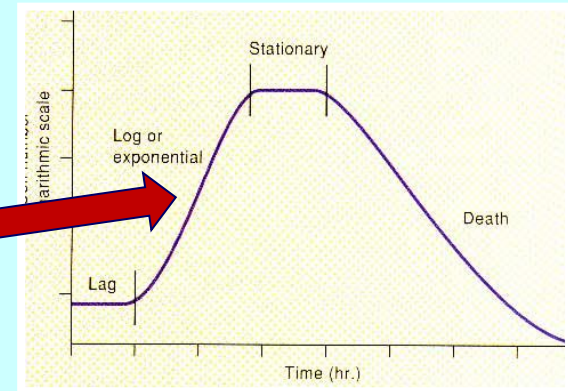
**v kultuře neproliferují**



# Kultivace hybridomů

- Udržování v bezprostředně použitelném stavu - **pasážování**
- **Namnožení** – pro získání inokula, pro uchování v zmraženém stavu
- **Kultivace** za účelem produkce
- **Překlonování** stávající linie

**V exponenciální fázi růstu (mezi 1-2 dne po inokulaci) je generační doba 12-20 hodin**



**Hybridomy se uchovávají neomezenou dobu v tekutém dusíku, DMSO jako protektivum**



# *Problémy*

## **Kritickým parametrem je stálost kultury**

- **Schopnost produkce se ztrácí u 50-70% původních buněk**
- **Nutná pravidelná kontrola produkce**

## **Kultury hybridomů jsou kontaminovány bakteriemi, kvasinkami, plísněmi a mykoplasmaty**

- **Ověřit lze například metodou PCR**
- **Napadenou kulturu zlikvidovat!**

# Možnosti produkce protilátek v hybridomech

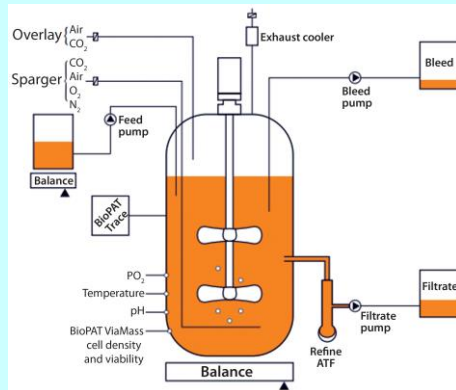
## *In vivo*

- Ve 2-10 ml ascitu 5mg protilátky/ml
- Nehumánní, ale snadné



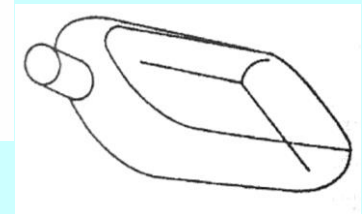
## *In vitro*

- Submerzní
- V médiu 10-100 $\mu$ g/ml



## Stacionární

- Pro menší množství



# *Enkapsulované hybridomy*

## **Jak je připravit?**

- Opouzdření alginátem vápenatým
- Částičky o velikosti 3-5mm
- Ztekucení chelatačními činidly

**Vzniklá homogenní suspenze je tvořena hybridomy uzavřenými polylysinovou membránou**

- Suspendování v růstovém médiu v bioreaktoru
- Buňky rostou do vysokých hustot
- Protilátky zůstávají uvnitř kapsulí a koncentrují se až do 10g/l
- Extrakce protilátek šetrnou homogenizací

# *Příprava MP metodami genového inženýrství*

- **Kódující sekvence imunoglobulinu se naklonuje do expresního vektoru**
- **Hostitelskou buňkou je savčí buňka**
- **Transfektanti se chovají jako hybridomy**

# *Opakování - typy protilátek*

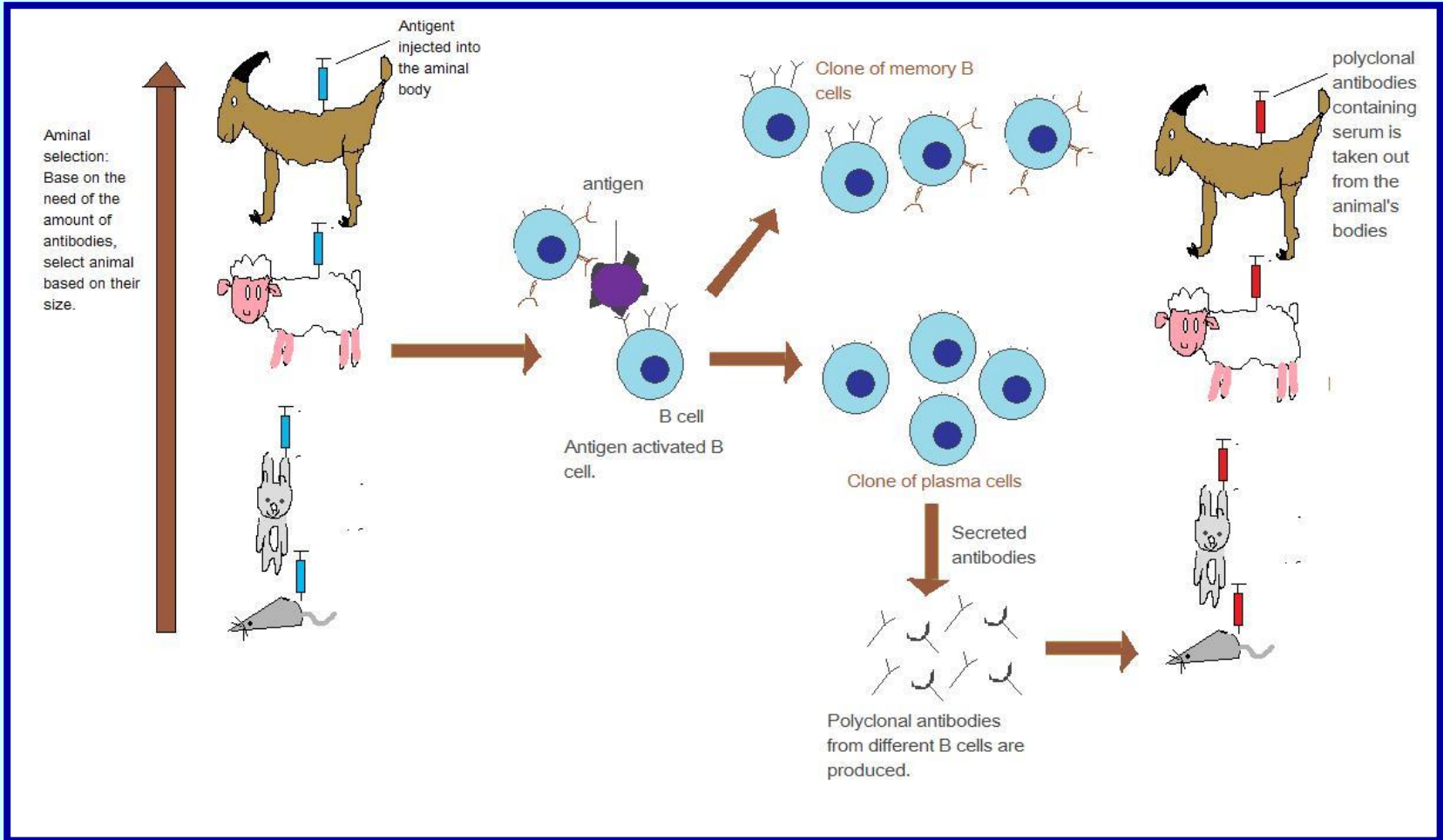
## **Monoklonální**

- Jediný druh molekul imunoglobulinu produkováný jediným klonem B-lymfocytů
- Nelze je produkovat přímo v těle zvířat
- Produkují se v hybridomech

## **Polyklonální**

- Heterogenní směs více protilátek získaných imunizací zvířete (králíka)
- Jsou produktem různých klonů B-lymfocytů

# Příprava polyklonálních protilátek



# ***Obsah přednášky***

- 1) Průmyslová mikrobiologie***
- 2) Enzymové inženýrství***
- 3) Imobilizované enzymy***
- 4) Rostlinné biotechnologie***
- 5) Kultury živočišných buněk***
- 6) Křížení buněk, hybridomy***