



# Biotechnologie léčiv – Aplikace biotechnologií ve farmacii

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.  
hosek@mail.muni.cz

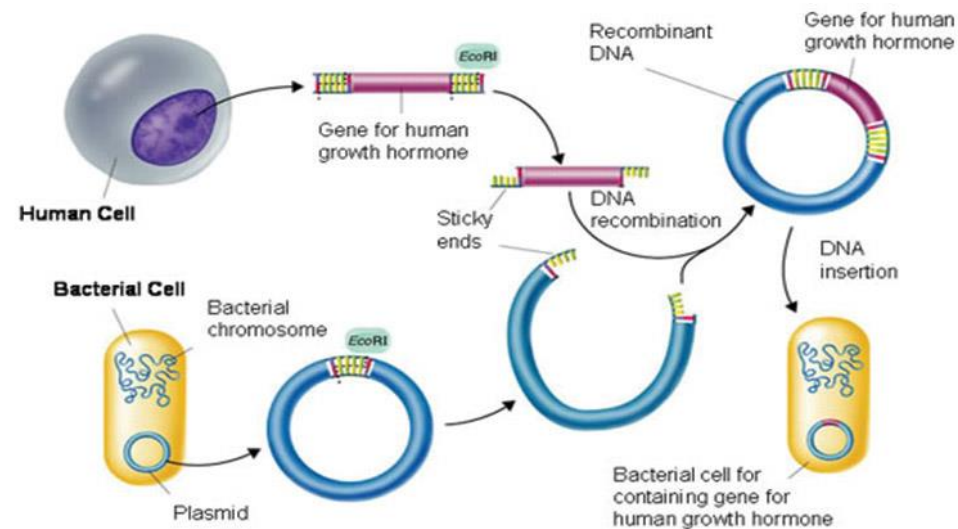
Ústav molekulární farmacie  
FaF MU

# Přehled základních biotechnologických výrob ve farmacii

- **Enzymy**
- **Polysacharidy**
- **Steroidy**
- **Antibiotika**
- **Antimykotika**
- **Vitamíny**
- **Alkaloidy**
- **Hormony**
- **Aminokyseliny**
- **Cytokininy**

# Dva přístupy

- Produkty získané klasickými technikami mikrobiální biotechnologie
- Produkty rekombinantních technologií





**Produkty klasické  
biotechnologie  
mikroorganismů**

# Nejčastější produkt = ENZYMY

## Využití enzymů ve farmacii

- **příprava léčiv** – antibiotika, steroidy, aminokyseliny
- **léčiva** – digestiva, rozpouštění krevních sraženin atd.
- **diagnostické účely** – součást detekčních souprav

## Výstupní formy enzymu

- **Enzymový preparát**
- **Enzym v čisté formě**
- **Imobilizovaný enzym**
- **Imobilizované buňky**

# Příklady enzymů

## Proteázy

- trypsin, chymotrypsin, pepsin, chymosin
- papain, ficin, bromelain
- bakteriální proteázy (*Bacillus*)
- proteázy produkované plísněmi (*Aspergillus*)

## Glukosidázy

- $\alpha$ -amylázy,  $\beta$ -amylázy
- produkují bakterie (*Bacillus*) a plísně (*Aspergillus*)

# Použití amyláz

## Medicína

- usnadnění trávení škrobu při dyspepsii
- omezení meteorismu před chirurgickým výkonem a v pooperačním období

## Potravinářství

- výroba piva, alkoholických nápojů, lihovin
- zpracování škrobu na glukózové a maltózové sirupy a krystalickou glukózu
- sirupy s vysokým obsahem fruktózy

# Lipázy

**Katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů**

## Původ

- pankreas
- pšeničné klíčky
- *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, kvasinky

## Použití

- součást digestiv
- potravinářský průmysl – výroba sýrů



# Penicilinacyláza

Hydrolázy štěpící vazby jiné než C-N

## Mechanismus

- hydrolýza penicilinu na kyselinu 6-aminopenicilanovou

## Původ

- *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Torula sp.*,  
*Rhodotorulla sp.*

## Použití

- výroba polosyntetických penicilinů

# Příklady enzymů II.

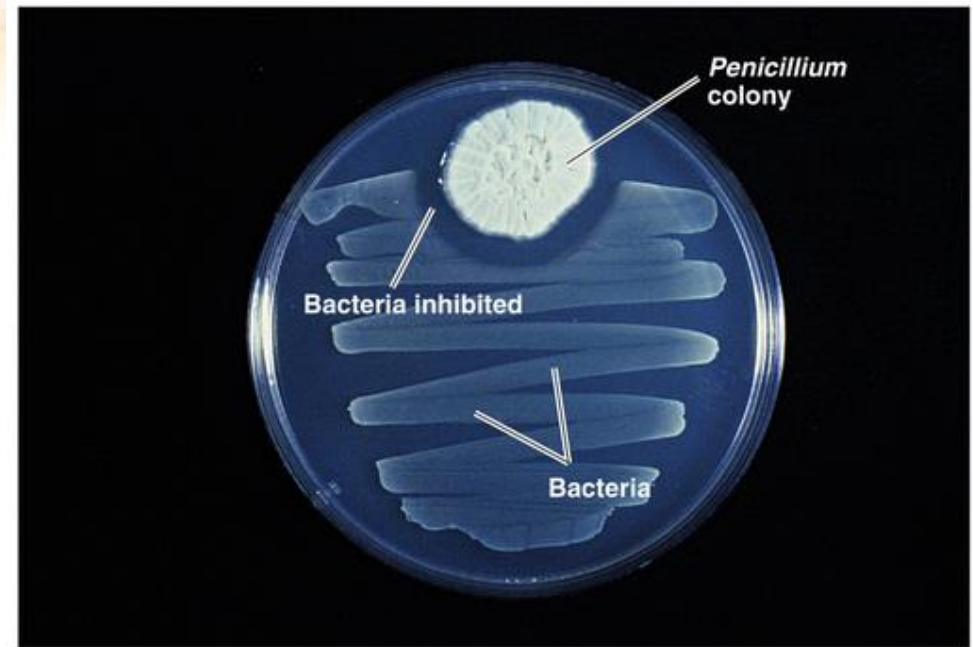
*Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources*

DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90338>

Microbial enzymes	Microorganism	Application
α-Amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Baking, brewing, starch liquefaction
	<i>B. stearothermophilus</i>	Clarification of fruit juice
	<i>B. licheniformis</i>	Textile industry
	<i>B. licheniformis</i>	Paper industry
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	Beer production
	<i>A. awamori</i>	High glucose and high fructose syrups
	<i>Rhizopus oryzae</i>	
Proteases	<i>A. usami</i>	
Lactase (β-galactosidase)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactose intolerance reduction in people
	<i>K. fragilis</i>	Prebiotic food ingredients
Lipase	<i>Candida antarctica</i>	Cheese flavor development
	<i>C. cylindraceae</i> Ay30	Textile industry
	<i>Helvina lanuginosa</i>	Medicinal applications
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Use in cosmetics
	<i>Geotrichum candidum</i>	Use as biosensors Use in biodegradation
Phospholipases	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cheese flavor development
Esterases	<i>Bacillus licheniformis</i>	Enhancement of flavor and fragrance in fruit juice
Xylanases	<i>Streptomyces</i> sp.	Clarification of fruit juice
	<i>Bacillus</i> sp.	Beer quality improvement
	<i>Pseudomonas</i> sp.	
Glucose oxidase	<i>A. niger</i>	Food shelf life important
	<i>Penicillium glaucum</i>	Food flavor improvement
	<i>P. adametzzi</i>	
Laccase	<i>Funalia trogii</i>	Polyphenol removal from wine baking
	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	<i>Bacillus vallismortis</i>	
Pectinases	<i>A. niger</i>	Clarification of fruit juice
	<i>A. wentii</i>	
	<i>Rhizopus</i> sp.	
Catalase	<i>A. niger</i>	Food preservation Removal of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> from milk prior to cheese production
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	<i>Psychrobacter piscatorri</i>	
	<i>piscatorri</i>	
Peroxidase	<i>Streptomyces viridosporus</i>	Development of flavor, color and nutritional quality of food

# ANTIBIOTIKA

- Produkty buněk schopné v nízkých koncentracích inhibovat růst jiných buněk
- Nejčastější producenti G<sup>+</sup> bakterie rodu *Streptomyces*
- Příprava nových ATB modifikací známého ATB, tzv. **mutační syntéza**



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Mutace MO produkující ATB + vhodný prekurzor**



**nové ATB**

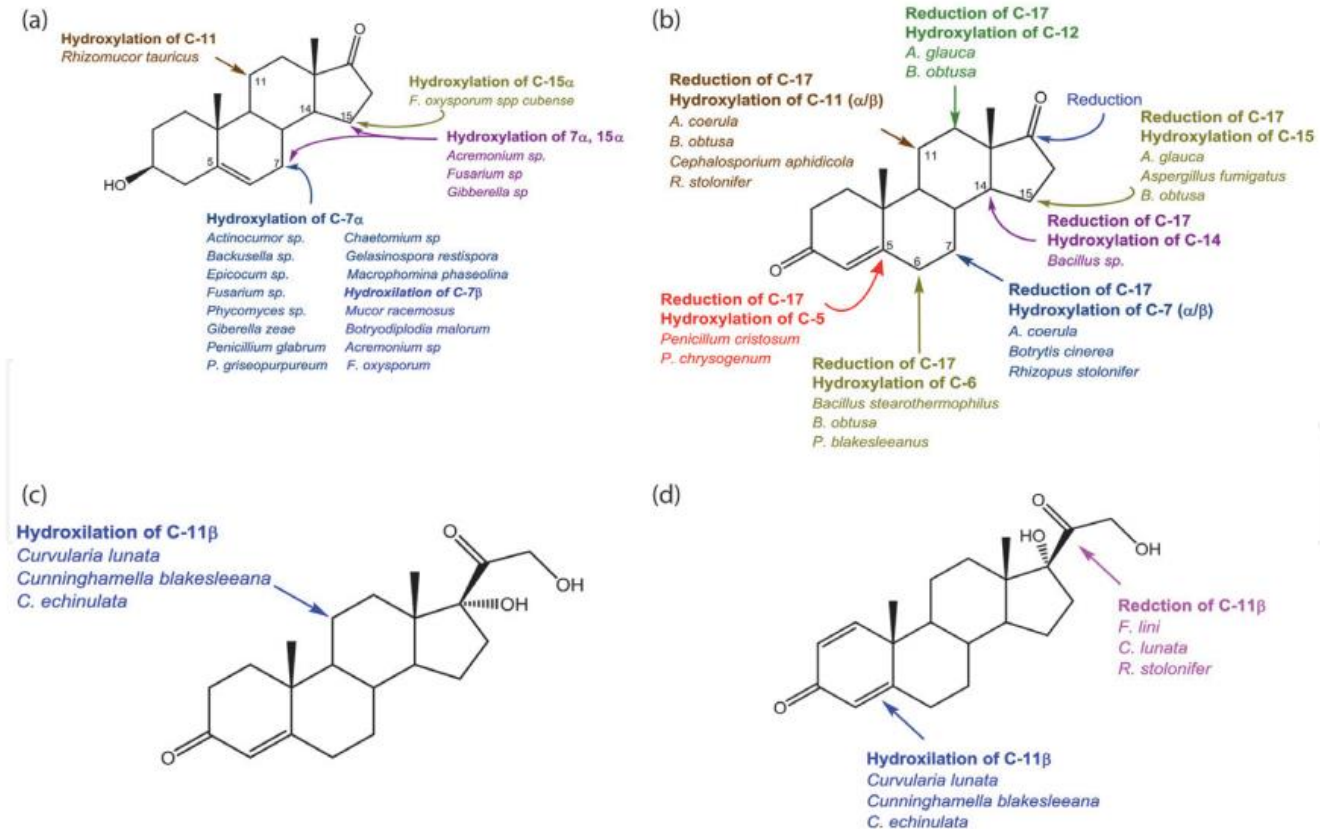
# STEROIDY

- fyziologický účinek závisí na přesné poloze substituentů v základním skeletu
- chemická syntéza je velmi náročná

## Biotransformace steroidů

- 1) Kultivace mikroorganismu - nárůst biomasy
- 2) Přidání steroidu, následná biotransformace
- 3) Izolace do organického rozpouštědla
- 4) Purifikace chromatograficky a krystalizací

*Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90338>



**Figure 11.**

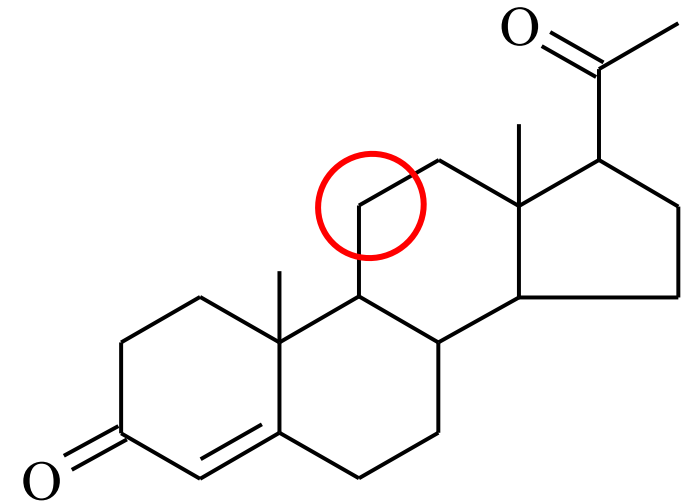
The ability of different fungi to transform DHEA (125), testosterone, corticosterone (126) and prednisone (127). (a) Hydroxylation of 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (DHEA) by various microorganisms. (b) Reduction of C-17 and hydroxylation of testosterone by various microorganisms. (c) Hydroxylation of corticosterone (123) by various microorganisms. (d) Reduction and hydroxylation of prednisone (126) microorganisms.

# Příklady biotransformací I

## 11 $\alpha$ -hydroxylace

příprava 11- $\alpha$ -progesteronu

*Rhizopus nigricans*, *R. arrhizus*, *Aspergillus ochraceus*



## 11 $\beta$ -hydroxylace

příprava kortisolu

*Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana*

# Příklady biotransformací II

## 16 $\alpha$ -hydroxylace

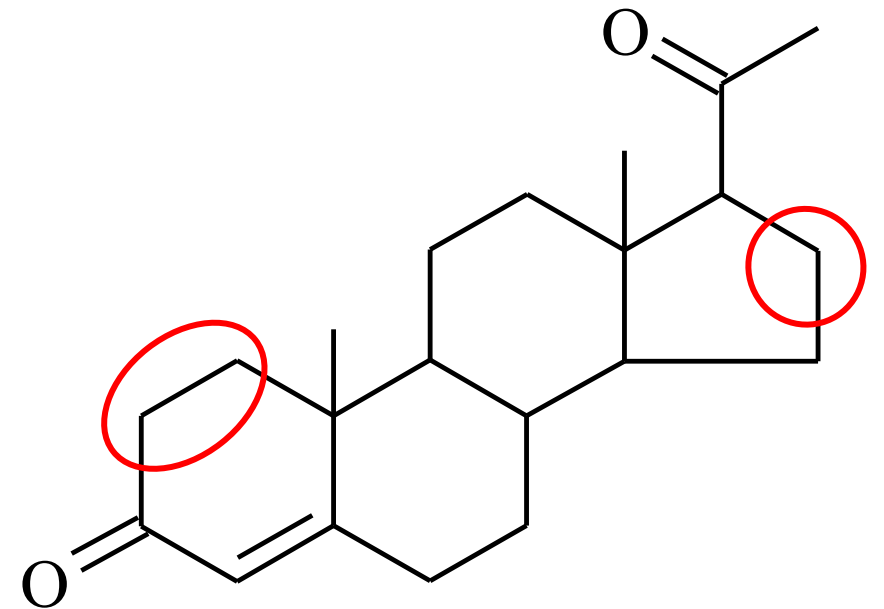
příprava 16 $\alpha$ -hydroxy-9 $\alpha$ -fluoroprednisolonu  
(triamcinolon)

*Streptomyces roseochromogenes*

## dehydrogenace mezi C1-C2

*Bacillus lensus*, *Arthrobacter simplex*

výroba prednisonu, prednisolonu,  
triamcinolonu, 6-methylprednisolonu,  
dexamethasonu...



# NÁMELOVÉ ALKALOIDY

## Zdroje

*Claviceps purpurea* (pěstování na žitě)

*Claviceps paspali* (submerzní kultivace)



Sklerocia paličkovice  
nachové na žitu



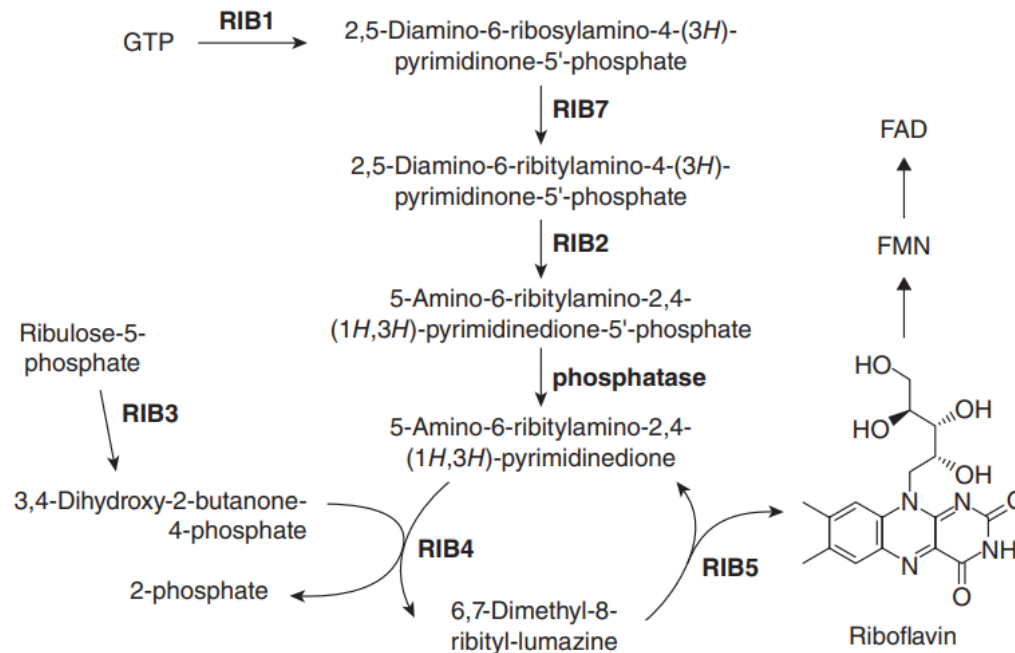
Výtrusnice na  
sklerociu

# VITAMÍNY

## esenciální živočišné nutriční faktory

### Výroba

- chemická syntéza
- izolace z přírodního materiálu
- mikrobiální biosyntéza
- biotransformace



**Fig. 21.6** Biosynthetic pathway of riboflavin in *Ashbya gossypii*. GTP = guanosine 5'-triphosphate; FAD = flavin adenine dinucleotide; FMN = flavin mononucleotide; RIB (1–5 and 7) = riboflavin biosynthesis gene(s).

### Vitamíny vyráběné biotechnologicky

- riboflavin (B<sub>2</sub>)
- kobalamin (B<sub>12</sub>)
- kyselina askorbová (C)
- ergosterol (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>)
- provitamin A
- provitamin D



# AMINOKYSELINY

- Chemická syntéza
- Izolace z přírodních zdrojů
- Enzymové přeměny
  - kultivace MO obsahujících příslušný enzym
  - separace buněk
  - k buňkám se přidá substrát určený pro enzymovou přeměnu
- Biosynteticky - kultivace mikroorganismu - izolace AMK z kultury



## Bakterie přirozeně se vyskytující

- *Corynebacterium*
- *Brevibacterium*
- *Micrococcus*

## Rekombinantní kmeny

- *Escherichia coli*
- *Serratia marcescens*

# ***Rekombinantní léčiva***



# Typy rekombinantních léčiv

- **lídrem jsou USA (Food and Drug Administration)**
- **desítky léčiv, všechny na bázi proteinů**
  - **hormony**
  - **enzymy**
  - **hematopoetické růstové a koagulační faktory**
  - **cytokiny a interferony**
  - **protilátky a jejich deriváty**
  - **vakcíny**
  - **další produkty**

# Rekombinantní hormony

**alterace sekvence aminokyselin**



**změny farmakokinetiky**



**rozdílné biologické účinky**



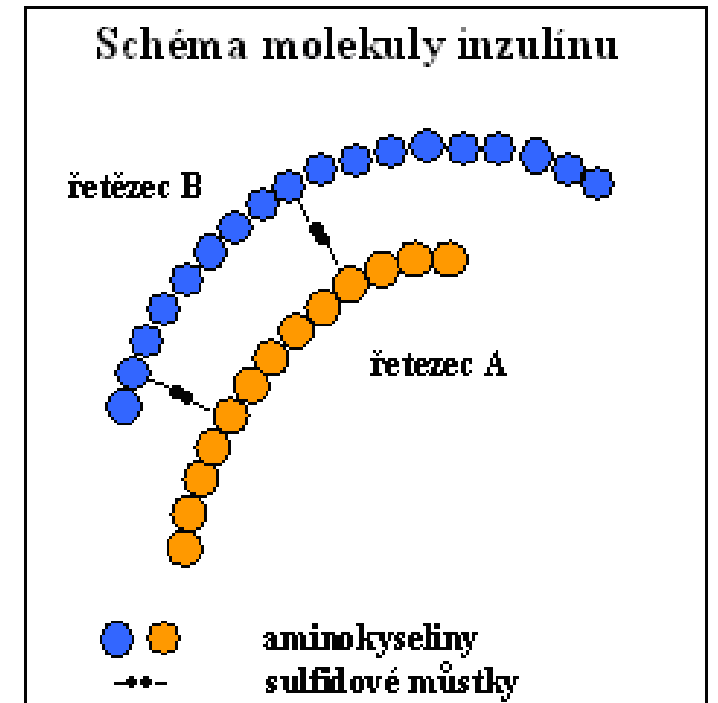
**širší léčebné postupy**

# Rekombinantní hormony byly první

r. 1979 - Goeddel a kol. - produkce inzulínu a somatotropinu pomocí *Escherichia coli*

r. 1982 (28.10.) - inzulín - první klinicky použitý rekombinantní hormon (USA)  
(Humulin-R, Eli Lilly a Genentech)

r. 1985 - somatotropin



# Analoga inzulinu

## Lispro (HUMALOG)

- obrácené pořadí lysinu a prolinu v pozici B28 a B29
- produkce v *Escherichia coli*
- krátce působící inzulin



## Aspart (NOVORAPID)

- substituce prolinu kyselinou asparagovou v pozici B28
- *Saccharomyces cerevisiae*
- krátce působící inzulin



# Další typy inzulínu

## Glargin (LANTUS)

- adice 2 argininů k C-konci řetězce B a náhrada asparaginu glycinem na A21
- *Escherichia coli*
- prodloužený účinek

## Detemir

- odstranění threoninu na B30 a acylace (kys. myristová) lysinu na pozici B29
- prodloužený účinek



# Výhody oproti lidským krátkodobě působícím inzulinům

- **rychlejší a pravidelnější vstřebávání z podkoží**
- **nejlépe napodobují prandiální sekreci**
- **léčba nemocných od 3 let**
- **kratší biologický účinek – nižší riziko hypoglykémie**



# Glukagon

Polypeptidový hormon (29 AMK)

## Účinky

- glykogenolytické
- hyperglykemizující
- relaxace hladké svaloviny GIT

## Příprava

- *Escherichia coli*
- *Saccharomyces cerevisiae*

## Indikace

- hypoglykémie
- radiologická vyšetření – inhibice pohybu GIT



# Somatotropin

Druhově specifický polypeptid (191 AMK)

## Účinky

- stimulace růstu
- zvyšuje proteosyntézu
- snižuje proteokatabolismus

## Indikace

- poruchy růstu

## Příprava

- *Escherichia coli* (od konce 80. let)



# Folitropin

folikulostimulační hormon (FSH)

Dvě podjednotky – alfa (92 AMK), beta (111 AMK)

## Produkce

➤ ovariální buňky čínského křečka

## Indikace

➤ anovulační cykly

➤ amenorea

➤ poruchy spermatogeneze



urofollitropin

# Rekombinantní enzymy

## Příprava léčiv

- antibiotika, steroidy, aminokyseliny

## Léčiva

- digestiva (rozpuštění krevních sraženin, léčba leukémie)

## Diagnostické účely

- Taq polymeráza
- Restrikční endonukleázy



# Hematopoetické a růstové faktory

Epoetin  $\alpha$  (165 AK, glykosylovaný)

Účinky

stimulace tvorby krevních buněk

Příprava

*savčí buňky*

Indikace

léčba anémie



# Cytokiny a interferony

## Interleukin IL-2

### Účinky

imunomodulační účinky

### Příprava

*Escherichia coli*

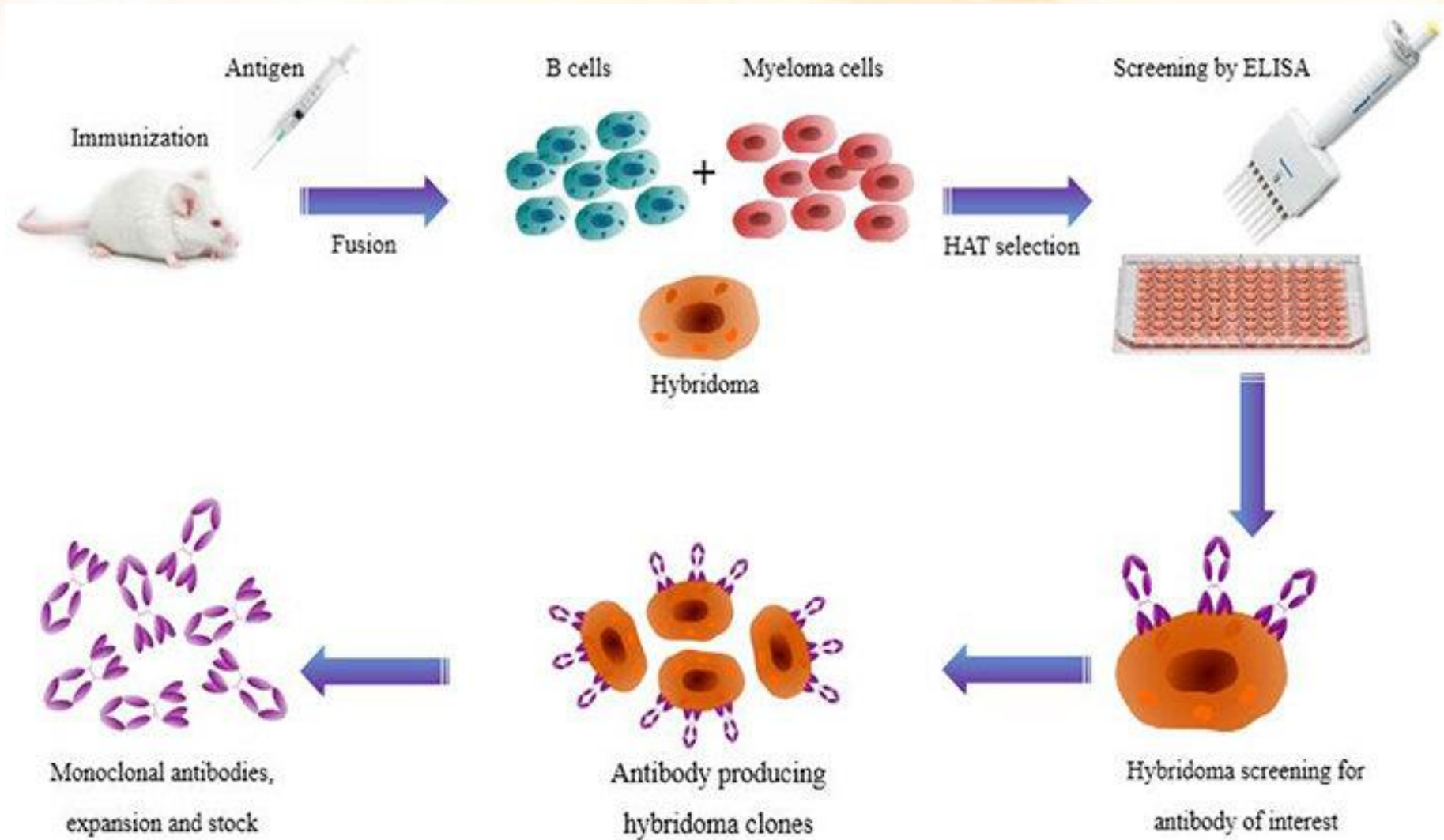
### Indikace

terapie nádorových onemocnění



## Interferony $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$

# Protilátky

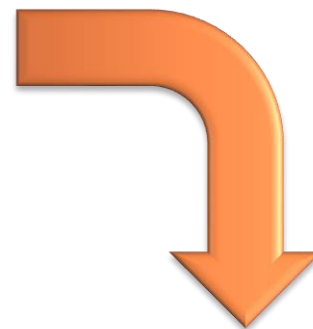


# Rekombinantní vakcíny

## Existuje několik strategií produkce

- **Metody reverzní genetiky**
- **Rekombinantní subjednotkové vakcíny**
- **Produkce „virus-like“ částic**
- **DNA a RNA vakcíny**
- **Vakcíny na bázi virových vektorů**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3548171/>



**Snad příští týden...**



# Transgenní zvířata

## ovce Polly

- srážecí krevní faktor IX
- léčba hemofilie

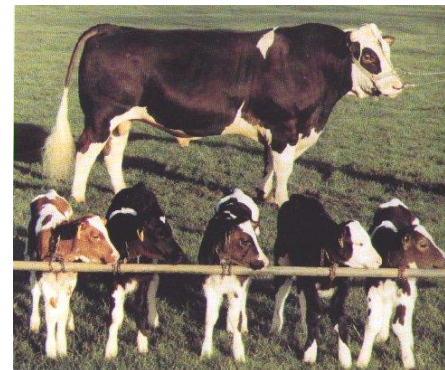


## kozy

- antitrombin III
- zabraňuje vzniku krevních sraženin
- GTC Biotherapeutics, USA

## krávy

- lidský laktoferin
- Pharming, Nizozemí





***Izolace a purifikace  
rekombinantních  
produktů***

**Biotechnologické produkty pro terapeutické použití musí být přesně specifikovány, zvláště když jsou určeny k parenterální aplikaci.**



# Protein Production

## Protein Expression

- Strain selection
- Codon optimization
- Fusion systems
- Co-expression
- Mutagenesis
- Isotope labeling

## Protein Purification

- Soluble Protein
- Folding of insoluble protein
- Membrane proteins
- Cleavage of fusion moieties

## Characterization

### Physiochemical

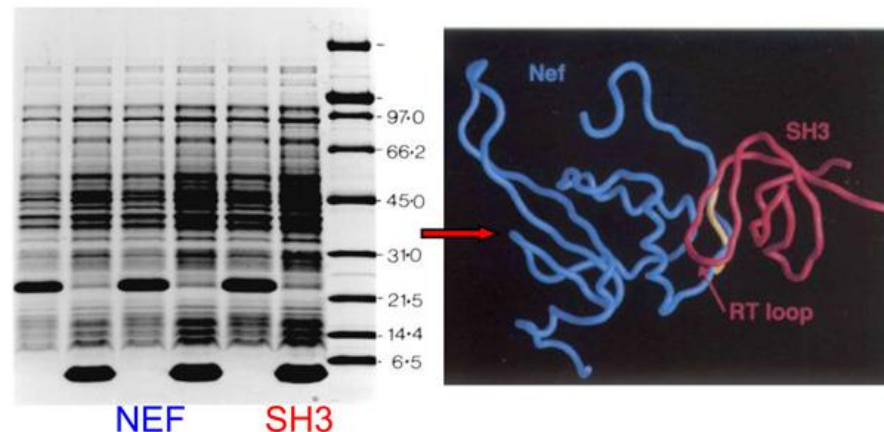
- Mass Spectrometry
- Physical homogeneity
- Association stoichiometry
- Conformational stability

### Functional

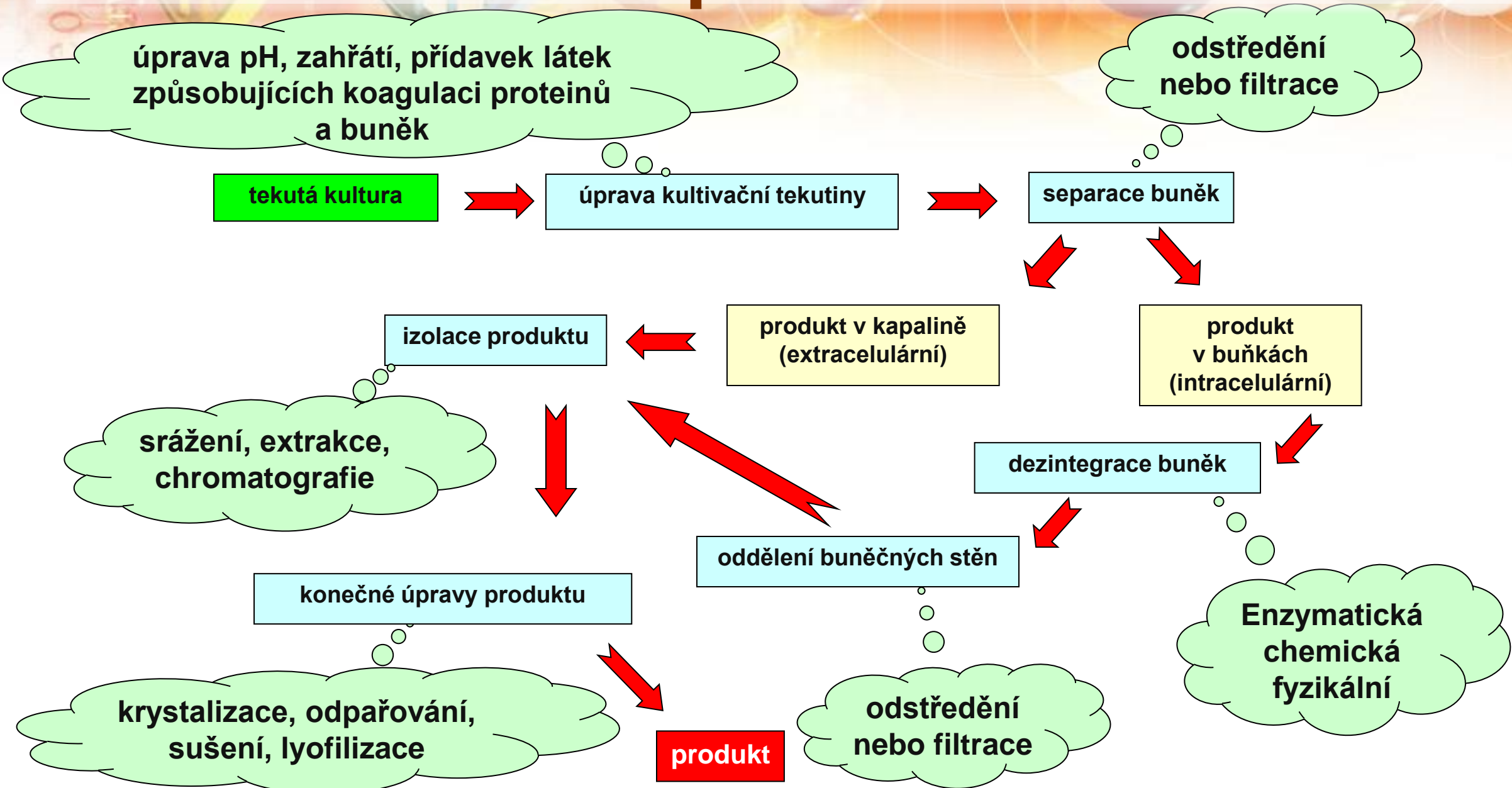
- Biochemical
- Immunochemical
- Protein interactions

## Structure

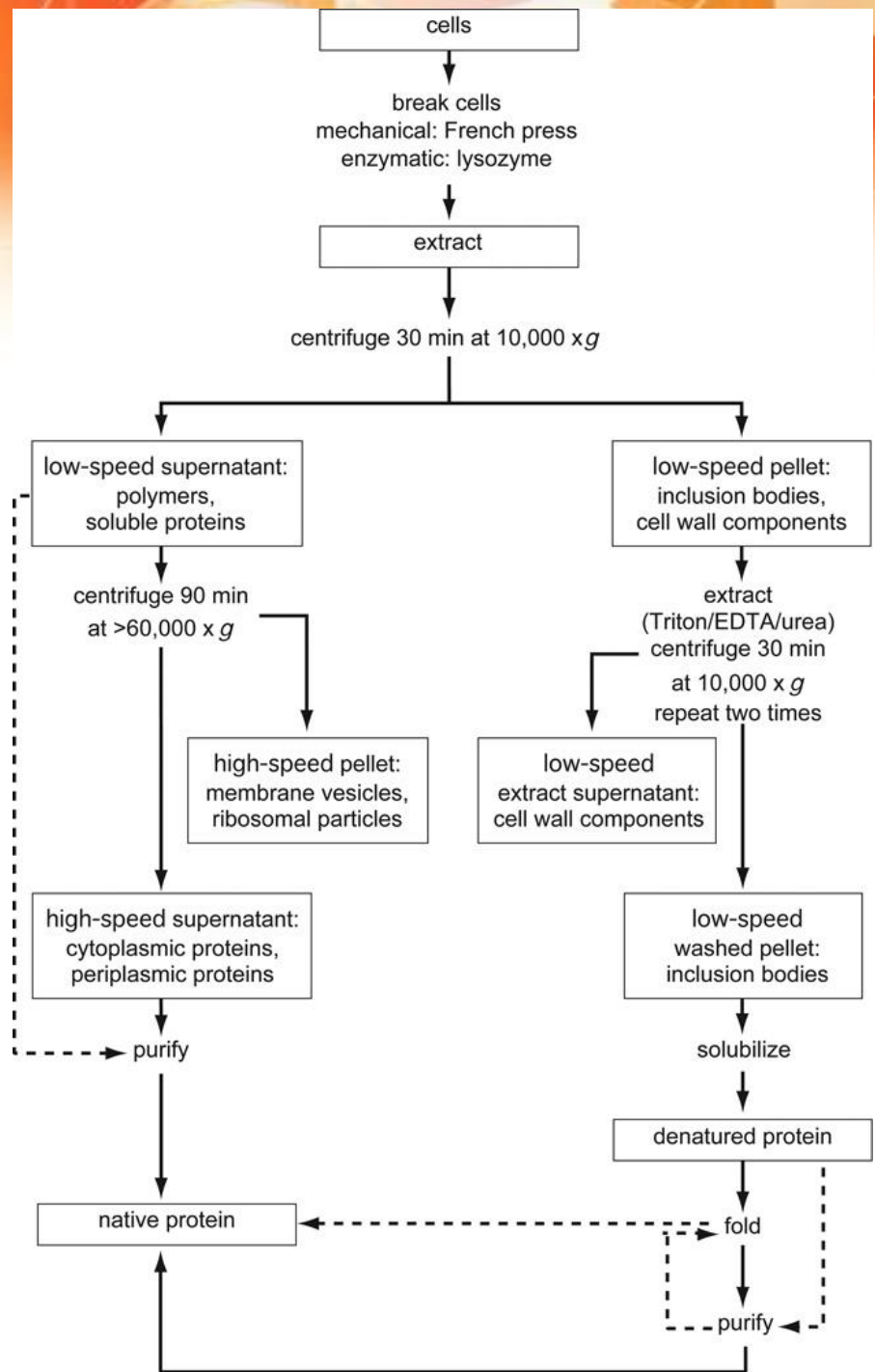
- Protein crystallization
- X ray analysis
- NMR
- Electron Microscopy



# Izolace a čištění produktů



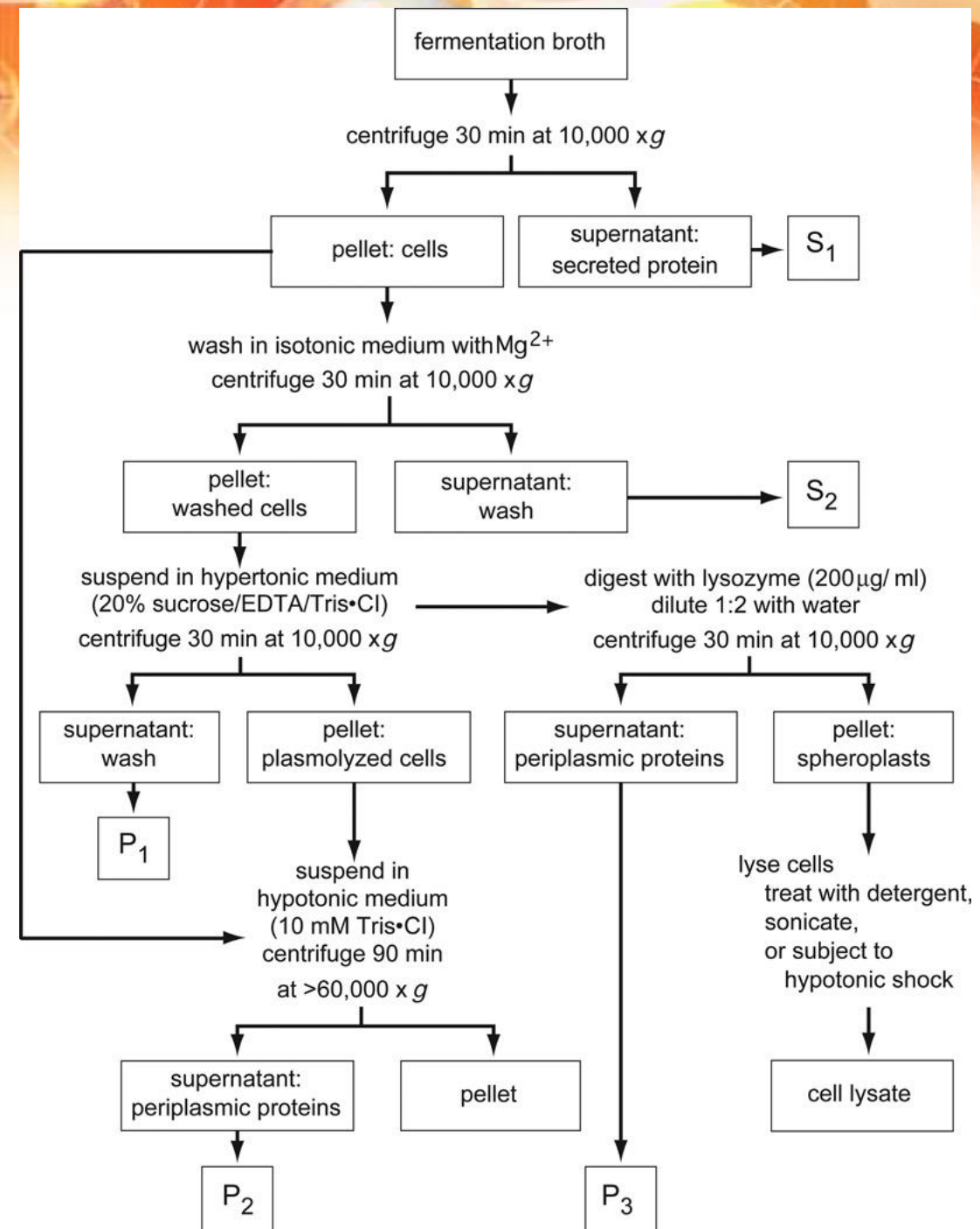
Differential centrifugation of *E. coli* cell lysates. Cells are broken with a French press or by lysozyme treatment. Insoluble (inclusion body) proteins, from either the cytoplasm or periplasm, are located in the low-speed pellet, which is subjected to preextraction to remove outer membrane and peptidoglycan material. Inclusion bodies are extracted from washed pellets with strong protein denaturants such as guanidine·HCl. The solubilized protein, which is denatured and reduced (free sulfhydryl residues), is either directly folded and oxidized (disulfide bonds formed) or purified before folding. Soluble proteins (from the periplasm and cytoplasm) are located in the low-speed and high-speed supernatants. The latter can be used directly for chromatography, whereas the former requires clarification by other techniques such as ammonium sulfate fractionation or membrane filtration.



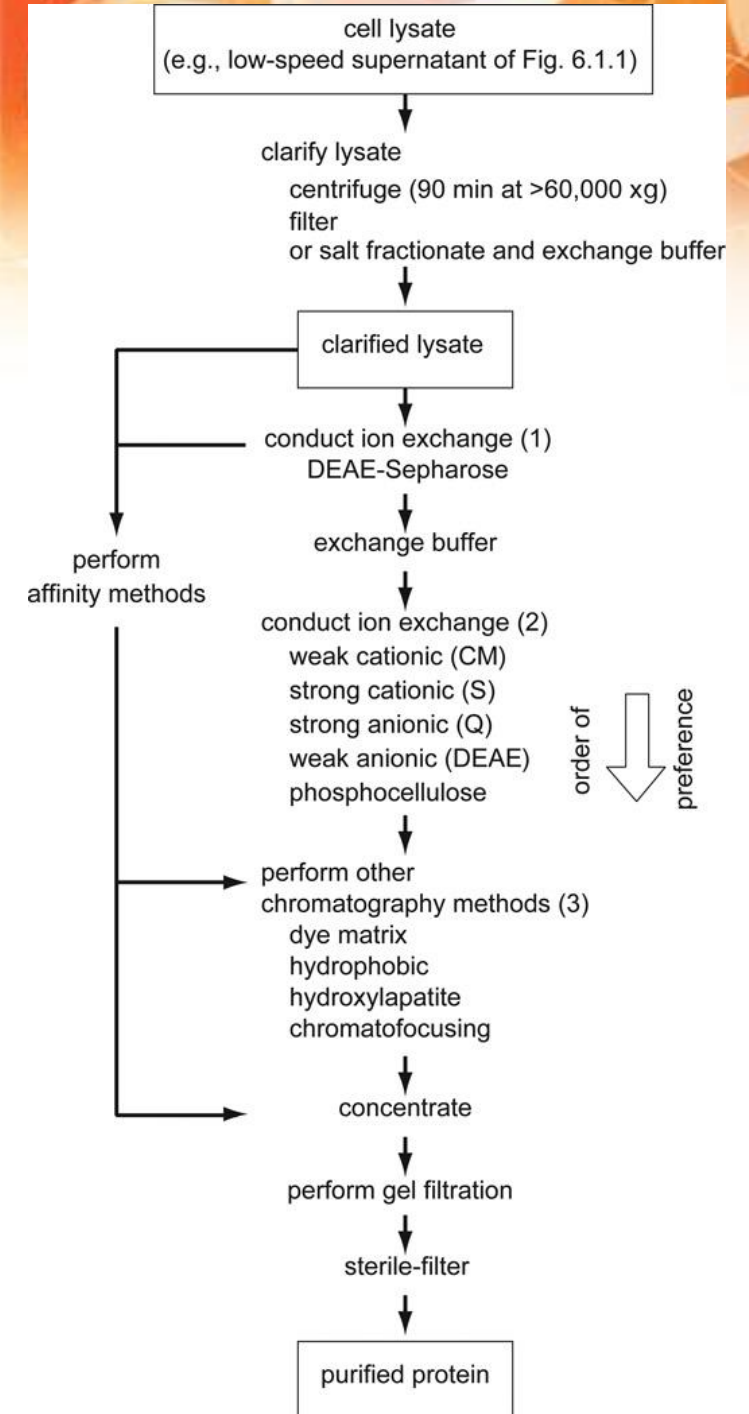
Curr Protoc Protein Sci. 2015; 80: 6.1.1–6.1.35.

Published online 2015 Apr 1. doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80

Localization of secreted and periplasmic proteins in *E. coli*. Periplasmic protein produced via a secretion vector can leak into the medium and be recovered by centrifugation (supernatant, S1) or filtration. Washing cells with an isotonic solution such as lightly buffered 0.15 M NaCl or 0.25 M sucrose can also release protein (S2). The compartmentalized periplasmic proteins are released by isotonic shock treatment by directly suspending normal cell paste or plasmolyzed cell paste into hypotonic medium. Plasmolyzed cell paste is derived by suspending cells in hypertonic medium and then pelleting. (In hypertonic medium the cell contracts, separating the inner membrane from the cell wall, and is said to be osmotically sensitized.) The hypertonic wash often releases protein (P1). The supernatant from shocked cells (P2) will contain constitutive *E. coli* proteins and the recombinant product. Osmotically sensitized cells can also be treated with lysozyme to fragment the outer membrane, thus releasing periplasmic proteins (P3). The pellet from the lysozyme treatment contains spheroplasts (cells with fragmented outer membranes), which are easily disrupted by detergents, sonication, or hypotonic shock to release cytoplasmic proteins.

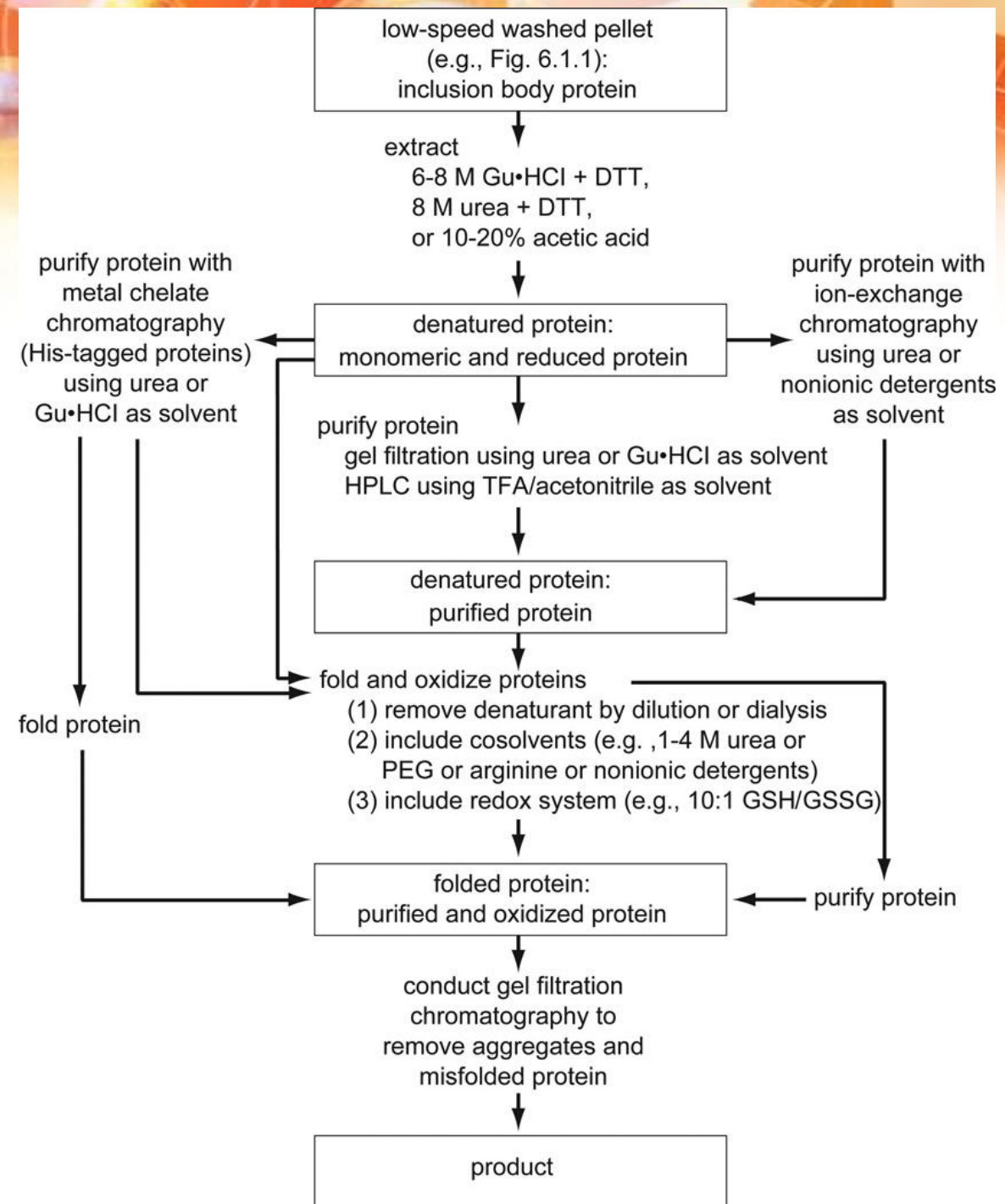


Purification of soluble proteins from bacterial cell and other cell lysates. Abbreviations for ion-exchange resins are as follows: CM, carboxymethyl; DEAE, diethylaminoethyl; Q, quaternary ammonium; S, methyl sulfonate. The order of preference for the stages of ion-exchange (2) and other methods (3) is based on the author's opinion and does not necessarily represent a consensus view. On the other hand, the use of a DEAE-based matrix at an early stage (1) is common practice. Affinity methods (see text and Chapter 9) can be performed at any stage following clarification of the lysate.

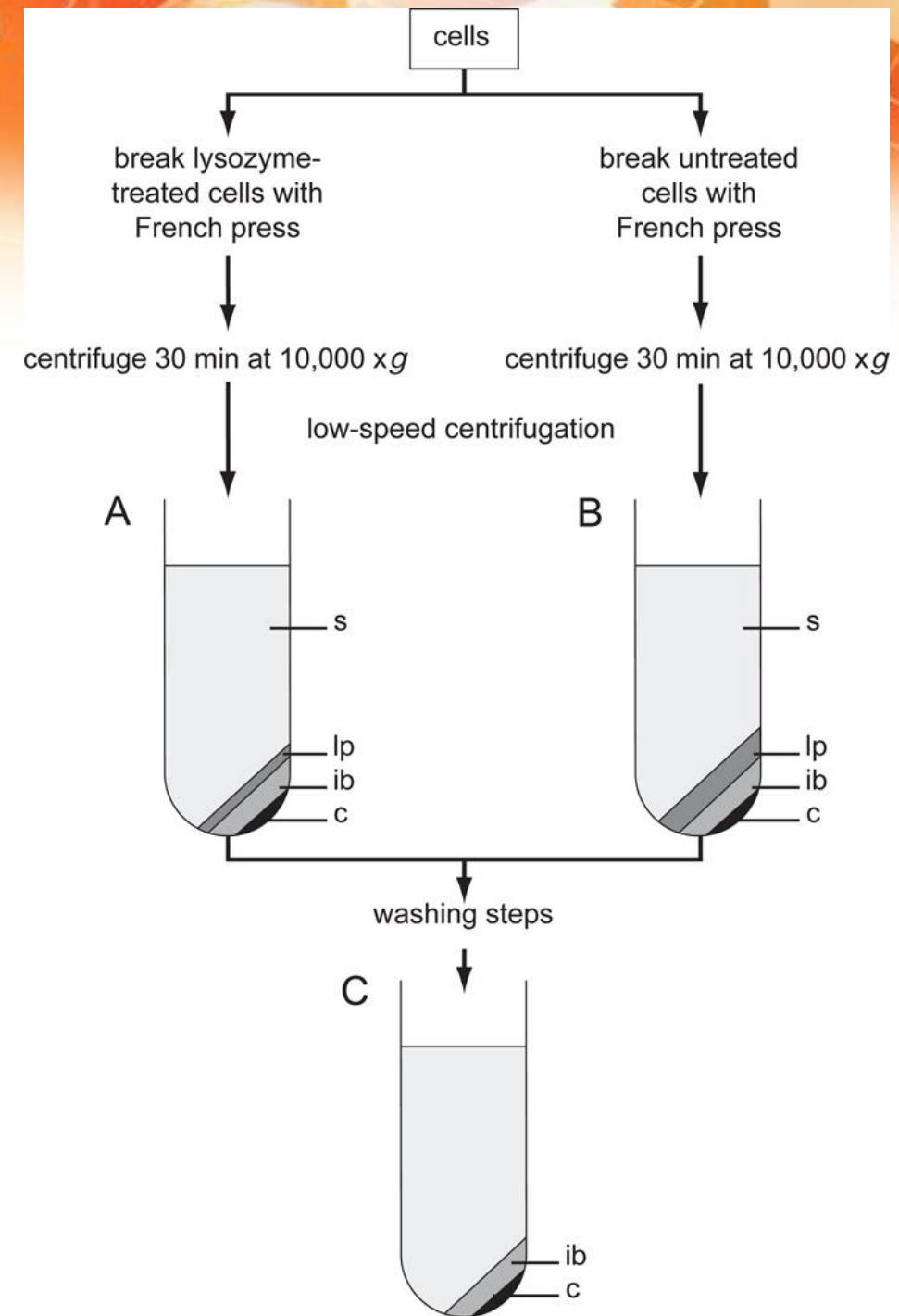




Folding and purification of inclusion body proteins from *E. coli*. The protein is extracted with protein denaturants such as guanidine·HCl (Gu·HCl), urea, or an organic acid. The reductant dithiothreitol (DTT) is included to prevent artificial disulfide bond formation (especially intermolecular bonds). The denatured protein can be purified by various methods and then folded, or it can be directly folded. Typically, some purification (e.g., gel filtration in Gu·HCl) prior to folding is recommended as it often results in higher folding yields. Protein folding and oxidation are carried out concurrently. Disulfide bond formation is catalyzed by low-molecular-weight thiol/disulfide pairs such as reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione. GSH/GSSG ratios of 5:1 to 10:1 are normally used, which are similar to those found in vivo in the endoplasmic reticulum (Hwang et al., 1992). A cosolvent is included to maintain solubility during folding. Folded protein is purified if necessary (purification is usually needed if the protein is directly folded). Gel filtration is a useful final step for removing aggregated and or misfolded protein.



Preparation of washed pellets using lysozyme and the French press. Cells are broken with the French press with or without prior treatment with lysozyme. After low-speed centrifugation using a fixed-angle rotor, the contents of the centrifuge tubes have the characteristics shown. The contents of tubes A and B are labeled: s, supernatant; lp, loose pellet; ib, inclusion body protein; and c, unbroken cells and large cellular debris. The loose pellet material is derived from the outer cell wall and outer membrane (see text for further details). After washing the insoluble material (UNIT 6.3), the pellet should consist mainly of the inclusion body layer (tube C), and the supernatant should be fairly clear.



# Kontaminující složky

- Kvalita se obvykle vyjadřuje v termínech **čistoty a reprodukovatelnosti**.
- Čistota farmaceutických přípravků je většinou **vyšší než 99%**, pokud jsou podávány parenterálně.
- To platí i pro proteinová terapeutika, u kterých je výsledná čistota velmi závislá na procesu purifikace.

# Původ kontaminujících složek proteinových farmaceutik

- **Hostitelský organismus**
- **Produkt**
- **Proces**

# Kontaminující složky hostitelského organismu

- **Viry**
- **Proteiny a DNA hostitele**
- **Glykosylační varianty**
- **Variantní N a C konce**
- **Endotoxiny (u gram-negativních hostitelů)**

# Kontaminující složky původem z produktu

- **Substituce a delece aminokyselin**
- **Denaturace proteinu**
- **Konformační izomery**
- **Dimery a agregáty**
- **Varianty disulfidických můstků**
- **Deaminované proteiny**
- **Fragmenty proteinů**

# Kontaminující složky vzniklé v rámci procesu

- **Komponenty růstového média**
- **Purifikační reagentie**
- **Kovy**
- **Materiály purifikačních kolon**

# Jak se zbavit virových částic?

Kategorie	Způsob	Příklad
<b>Inaktivace viru</b>	Teplo	Pasterizace
	Záření	UV záření
	Dehydratace	Lyofilizace
	Kroslinkující látky, denaturace, rozklad	$\beta$ -propionolakton, formaldehyd, NaOH, org. rozpouštědla, detergenty
	Neutralizace	Specifické protilátky
<b>Odstranění viru</b>	Chromatografie	Iontoměničová, imunoafinitní
	Filtrace	nanofiltrace
	Precipitace	kryoprecipitace



# Co je to nanofiltrace?

**Filtrace přes 15 nm membrány,  
kterými lze zachytit i ty  
nejmenší známé neobalené viry  
typu bovinního parvoviru**



# Bakterie jako kontaminující složka

- **Bakterie z buněčných kultur lze snadno odstranit filtrací**
- **Pracovat sterilně, čisté prostory (sterilizace vzduchu)**
- **Pracovat pod antibiotiky, která se ale pak dají jen nesnadno odstranit!**

# Čím ještě bakterie škodí?

## Pyrogeny – různě velké látky s různou strukturou

- Citliví lidé – horečka až s fatálními následky
- Odstranit iontoměničovou chromatografií
- Horkovzdušná sterilizace nástrojů

## Mykoplasmata

- Mění charakteristiky metabolismu, růst, životnost buněk, apod.
- Odstranit gentamycinem nebo ciprofloxacinem

# Buněčná DNA jako kontaminující složka

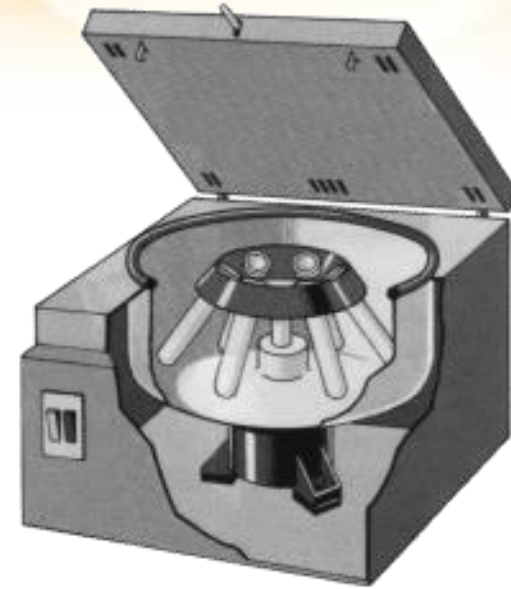
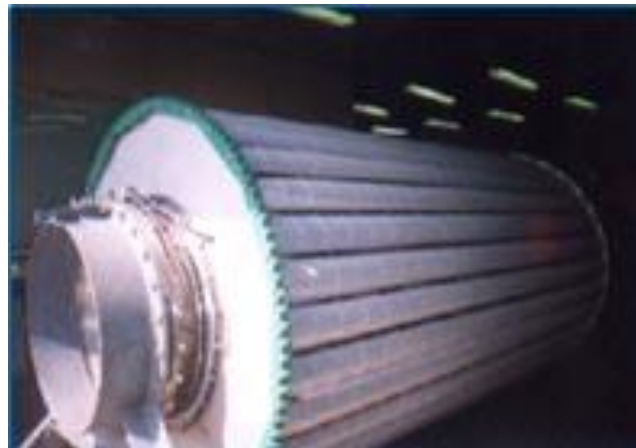
- Při použití savčích buněk se v médiu vyskytují fragmenty DNA
- Jaká je bezpečná úroveň?
- Evropský lékopis doporučuje, aby množství DNA v konečném preparátu terapeutického proteinu nepřesáhlo 100 pg až 10 ng denní dávky podle druhu kultivačního systému

# Kontaminující proteiny

- „Cizí“ proteiny mohou být rozpoznány jako antigeny → imunitní odpověď za kterou rekombinantní protein nemůže
- Zdrojem hostitelská buňka nebo médium
- Pozor na varianty rekombinantních proteinů!
- **Detekce kontaminujících proteinů imunologicky**

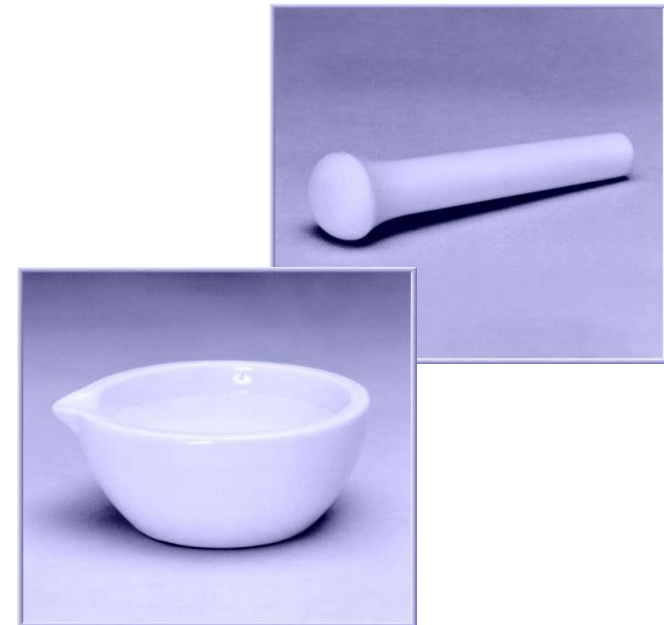
# Separace buněk

- centrifugace
- filtrace (bubnové rotační filtry)



# Dezintegrace buněk

- enzymatická: lysozym
- chemická: alkálie, detergenty
- fyzikální: osmotický šok, drcení buněk s abrazivy, ultrazvuk



# Oddělení buněčných stěn

- **centrifugace**
- **filtrace**





# Izolace produktu z kapaliny

## ➤ Extrakce

- systém dvou nemísitelných rozpouštědel
- při izolaci proteinů PEG a dextran nebo PEG a specifické soli jako  $K_3PO_4$  nebo  $NH_4SO_4$

## ➤ Srážení (precipitace)

- vysolování proteinů  $NH_4SO_4$
- srážení organickými rozpouštědly (EtOH, aceton, ...)

## ➤ Chromatografické metody (gelová, ionexová, bioafinitní, adsorpční)

## ➤ Elektromigrační metody (elektroforéza, isoelektrická fokusace, isotachoforéza)

# Konečné úpravy produktu

## Odpařování

- vakuové odparky
- pozor na termolabilní látky
- pro termolabilní enzymy, jsou nejvhodnější deskové (filmové) odparky

## Sušení

- odnímání vody a těkavých látek z produktu
- sušárny pásové, lískové, bubnové, rozprašovací
- **sušárny fluidní-proudové** (profoukávání materiálu teplým vzduchem) - časté **ve farmaceutickém průmyslu**



# Metody separace proteinů

## Izoelektrická fokusace

- Pohyb proteinů v gradientu pH po aplikaci elektrického pole
- Proteiny migrují do tzv. „izoelektrického bodu“

## Dvourozměrná elektroforéza

- Separace izoelektrickou fokusací – na základě elektrického náboje
- Separace elektroforézou – na základě velikosti

## Chromatografie

- Separace na základě odlišné propustnosti proteinů náplní chromatografické kolony

# Metody identifikace proteinů

## Hmotnostní spektrometrie

- Na základě poměru hmotnosti a náboje ionizovaných molekul (MALDI-TOF)

## Detekce protilátkami

- Protilátky polyklonální
- Protilátky monoklonální
  
- Western blot
- Immunoprecipitace, imunocytochemie a imunohistochemie

# Chromatografické metody

- Je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod
- Slouží k **separaci** a **analýze** složitých směsí látek
- Molekuly analyzované látky se u všech typů chromatografických separací rozdělují mezi tzv. **stacionární** a **mobilní** fázi
- Dělení je založeno na rozdílné distribuci složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi

# Druhy chromatografických metod I

## Podle účelu použití

- analytická chromatografie
- preparativní chromatografie

## Podle fyzikálně-chemického principu

- adsorpční chromatografie
- rozdělovací chromatografie
- iontově výměnná chromatografie
- gelová chromatografie
- (bio)afinitní chromatografie

# Druhy chromatografických metod II

## Podle skupenství mobilní fáze

- kapalinová chromatografie
- plynová chromatografie

## Podle uspořádání stacionární fáze

- kolonová (sloupcová) chromatografie
- kapilární chromatografie
- chromatografie na tenké vrstvě  
(tenkovrstvá chromatografie)
- chromatografie na papíře

# Chromatografie

- biologicky aktivní látky tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin se speciálními funkcemi
- změny pH, iontové síly, koncentrace kovových iontů, kofaktorů atp. mohou mít za následek **velké ovlivnění** izolovaných biologicky aktivních molekul
- aby během izolace nedocházelo ke ztrátám jejich biologické aktivity, je nutné použít pokud možno **co nejmírnější separační metody**



# Strategie při purifikaci - I

- nízká koncentrace biologicky aktivních látek
- směs mnoha podobných látek

## První stupeň izolace = adsorpce

- biospecifická afinitní chromatografie
- při fyziologických hodnotách pH je většina proteinů negativně nabitých → sorpce na anex

## Další stupeň izolace

- gelová chromatografie
- elektroforetické metody

# Strategie při purifikaci - II

Izolaci čisté biologicky aktivní látky dosahujeme nejčastěji **kombinací** několika separačních metod

Při volbě purifikačního schématu bychom měli dbát na to, aby se **neopakovaly metody založené na stejném dělicím principu**

# Adsorpční chromatografie

**Je založena na rozdílné adsorpci látek na povrchu sorbentu, tvořícího stacionární fázi**

- **Látky, které jsou za daných podmínek silněji vázány sorpčními silami, jsou v jednotlivých úsecích naadsorbovány častěji a déle než látky jiné**
- **Sorbenty stacionární fáze se liší polaritou nebo kyselostí**
  - **nepolární – aktivní uhlí, polární kyselý silikagel ( $\text{SiO}_2$ ), polární bazický hydratovaný oxid hlinitý nebo hořečnatý**
- **Mobilní fáze – směsi rozpouštědel (... chloroform, etanol, ...)**
  - **U plynové adsorpční chromatografie dusík nebo hélium**

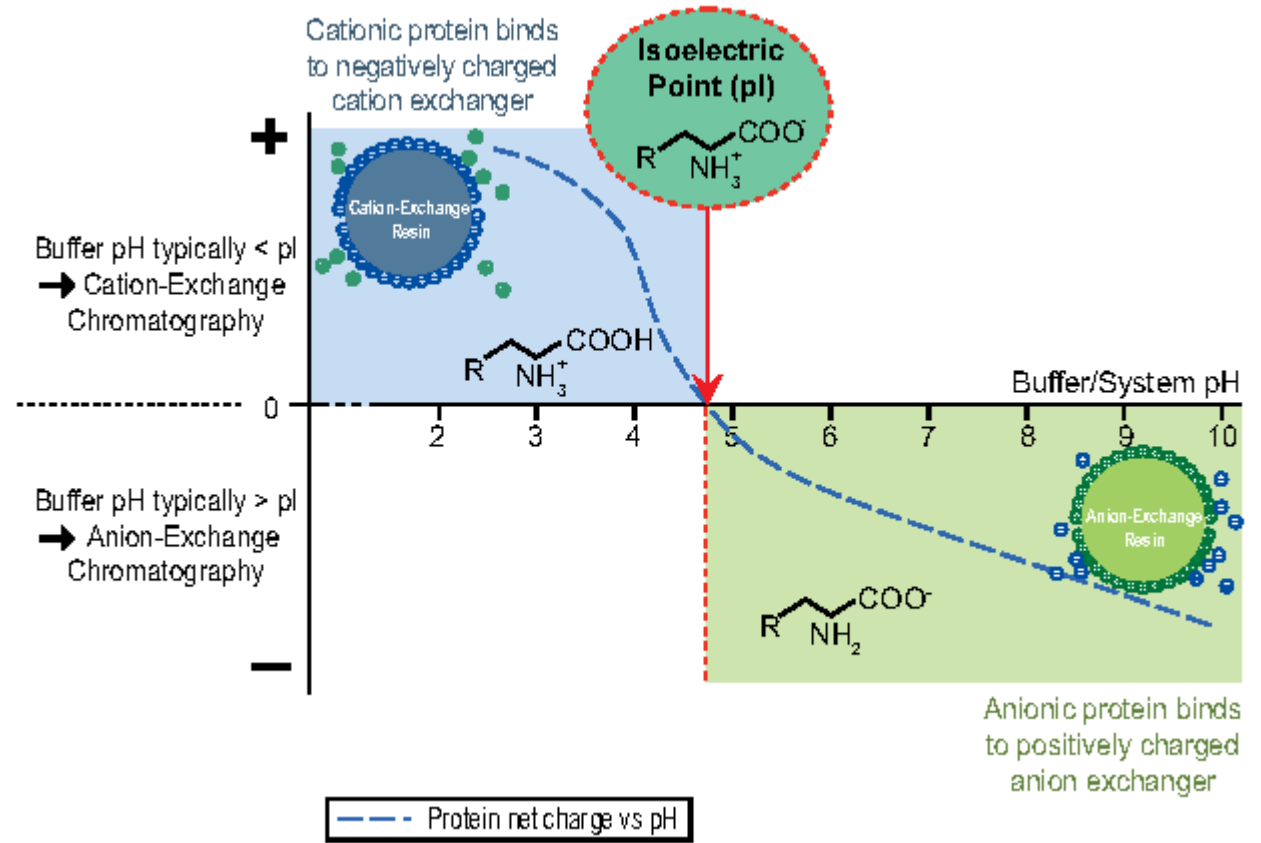
# Rozdělovací chromatografie

Je založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek ve dvou různých kapalinách, tedy na rozdílných hodnotách rozdělovacího koeficientu ( $\alpha = c_m/c_s$ )

- Jedna z použitých kapalin je mobilní fází, druhá je potom zakotvena na nějakém nosiči a tvoří tak stacionární fází
- Vyšší hodnota  $\alpha$  = silnější vazba na stacionární složku = pomalejší průtok kolonou
- Normální fáze = ukotvenou stacionární fází je voda
- Obrácená fáze = ukotvenou stacionární fází tvoří nízkopolární organické kapaliny
- Nosiče –  $\text{SiO}_2$ , sklo, polymery, škrob, celulóza, aj.

# Iontovýměnná (ionexová) chromatografie

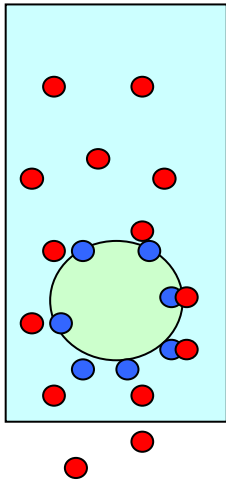
- základem je vratná výměna iontů mezi mobilní kapalnou a stacionární fází
- stacionární fáze – ionexy (anex nebo katex)



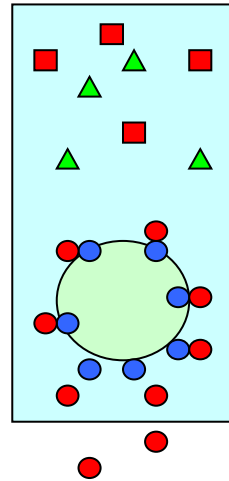
Gendeh, Gurmil et al. "Exploration of pH-Gradient Ion-Exchange Chromatography High-Resolution Protein Separations in Biotechnology and Proteomics." (2012).

# Průběh ionexové chromatografie

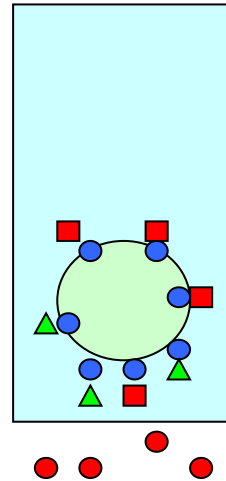
Aktivace  
kolony



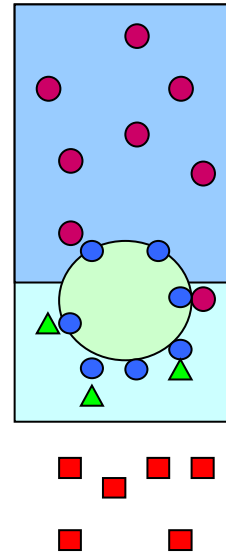
Nanesení  
vzorku



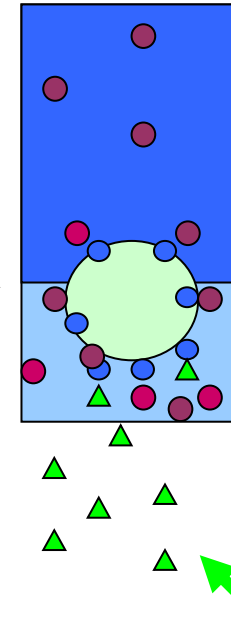
Adsorbce  
částic



Promytí  
kolony



Eluce



produkt

# Gelová chromatografie

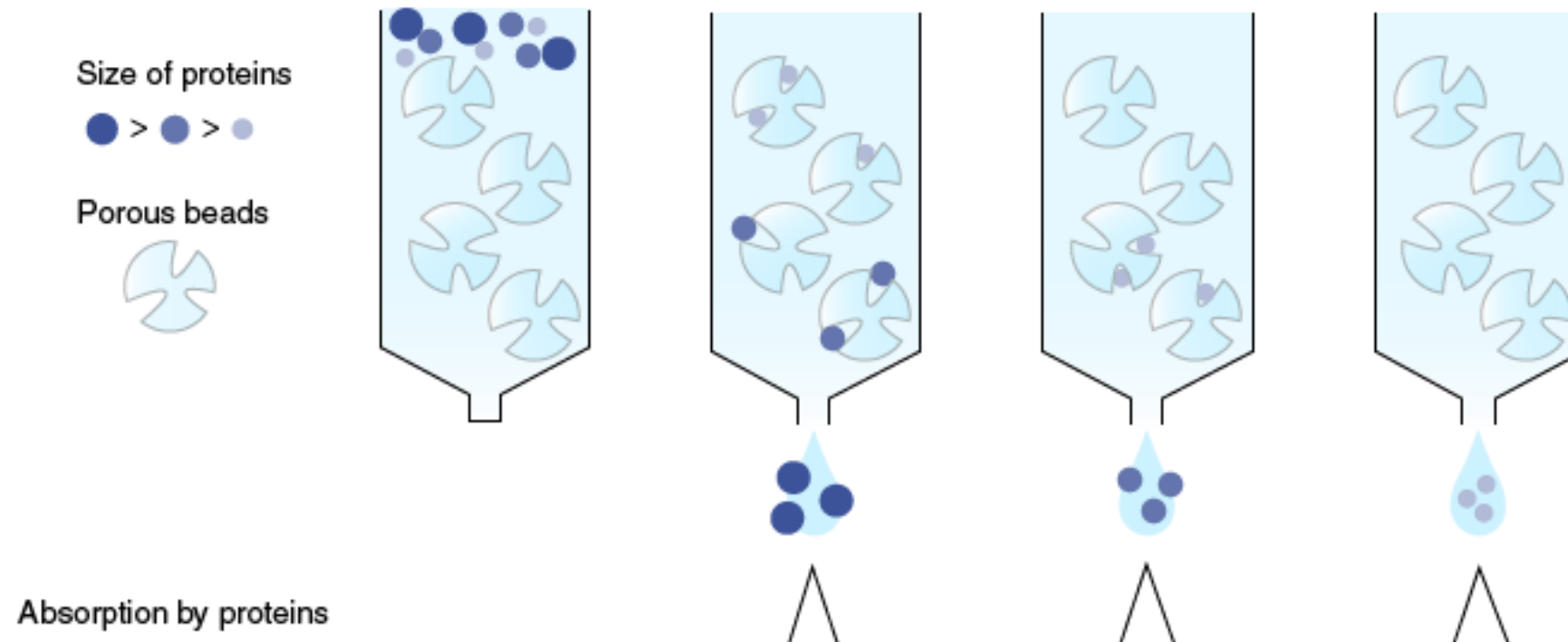
**Separace makromolekul na základě rozdílné velikosti jednotlivých látek na pórovité stacionární fázi (gelová filtrace)**

**Stacionární fáze - inertní porézní materiál nasycený kapalinou**

- agaróza
- zesíťovaný dextran (Sephadex)
- polyakrylamid (BioGel P)
- celuloza (Cellufin)
- materiály založené na silikagelu nebo porézním skle

# Gelová chromatografie

Jinými slovy: je založena na rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze pro různě velké částice dělené směsi



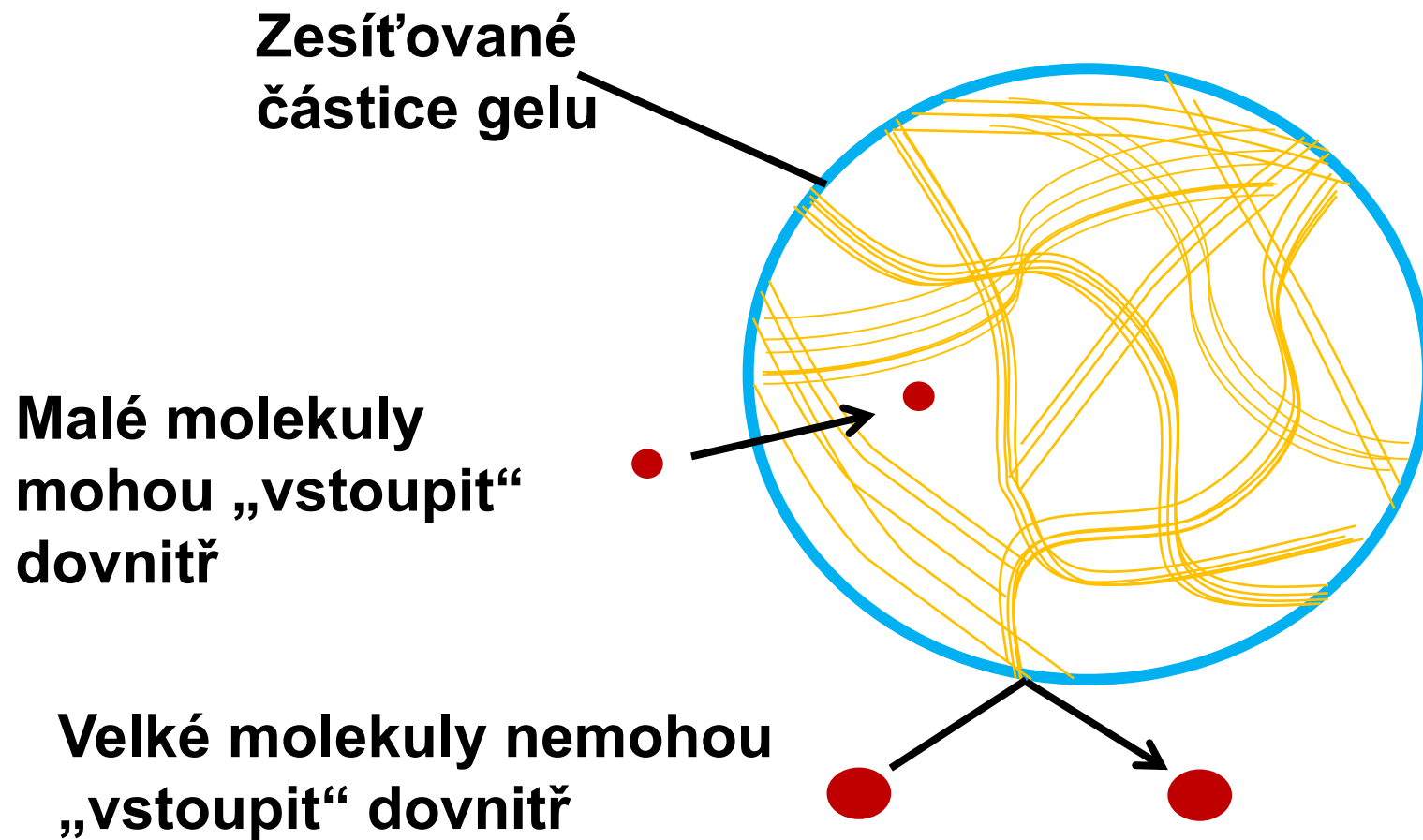


# Princip gelové chromatografie

**Při průchodu směsi látek porézní stacionární fází dochází k tomu, že**

- **malé molekuly jsou schopny difundovat dovnitř pórů matrice a jejich pohyb je tedy zpomalen**
- **velké molekuly se nezachytí a prochází matricí rychleji – čím větší molekula, tím rychleji prochází ven z kolony**
- **Postupným promýváním mobilní fází se ven z kolony vymyjí i malé molekuly**
- **Důležité je, aby mezi děleným roztokem a matricí nedocházelo k žádným vazbám nebo k denaturaci děleného materiálu**

# Gelová filtrace



# Afinitní (bioafinitní) chromatografie

**založena na výjimečné vlastnosti biologicky aktivních látek tvořit pevné specifické reversibilní komplexy s jinými komplexotvornými sloučeninami, tzv. afinitními ligandy**

**enzym – substrát, kofaktor – efektor, protilátka – antigen, hormon – receptor, apod.**

**Principem izolační metody je interakce izolovaného proteinu s ligandem vázaným na pevný nosič**

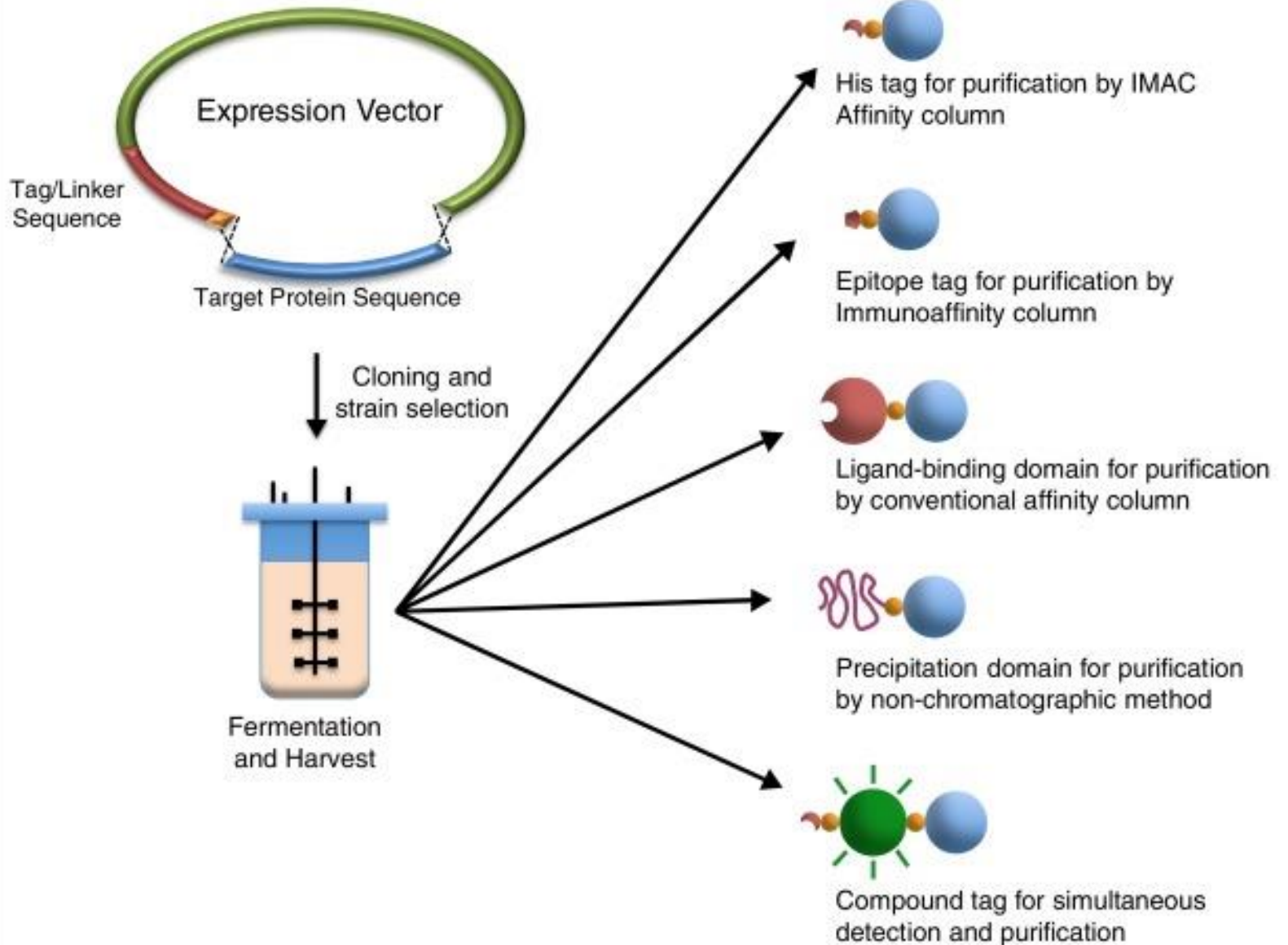
**Ligand = sloučenina, která s danou izolovanou látkou tvoří biospecifický reversibilní komplex**

# Ligandy v afinitní chromatografii

**Jako ligand může být použita každá sloučenina, která s danou izolovanou látkou tvoří biospecifický reversibilní komplex**

- **musí obsahovat funkční skupinu, kterou se kovalentně váže na pevný nosič**
- **musí mít dostatečnou afinitu k izolované látce**
- **imobilizované pyridinové nebo adeninové nukleotidy**
- **barviva s antrachinonovou strukturou**
- **imobilizovaný hemoglobin nebo kasein pro proteolytické enzymy**

## Fusion protein construction strategy





***Metody identifikace  
proteinů***

# Hmotnostní spektrometrie

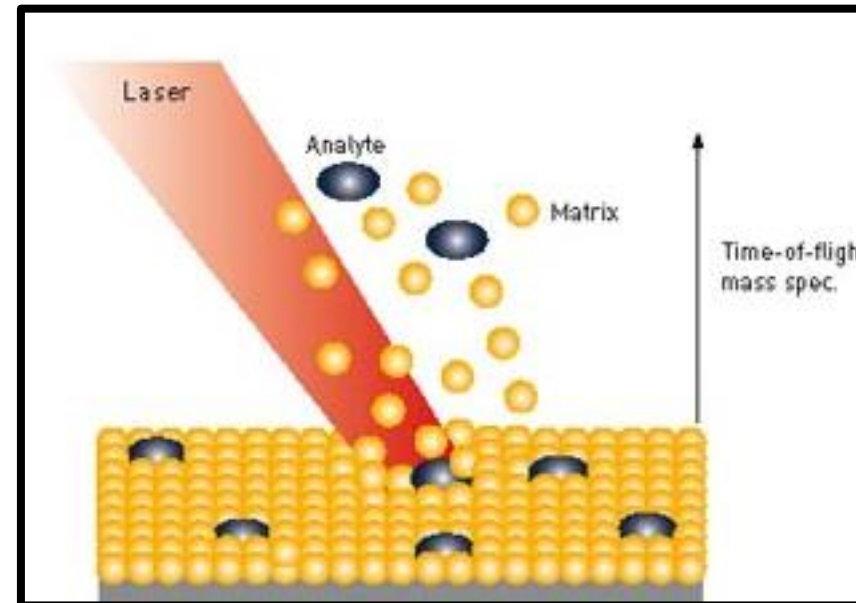
## Metoda stanovení molekulové hmotnosti

- **Rozděluje proteiny (peptidy) podle poměru jejich hmoty a náboje**
- **Molekula se nejprve ionizuje metodou MALDI nebo ESI (electrospray ionization)**
- **Vzniklé ionty jsou vtaženy do analyzátoru elektrickým polem, kde se rozdělují podle poměru hmotnosti a náboje**
- **Následuje počítačové zpracování dat**

# Princip MALDI-TOF

**matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight**

- **varianta hmotnostní spektrometrie**
- **peptidy jsou ionizovány a stanoví se poměr hmoty k náboji na základě doby letu (time-of-flight) k detektoru**
- **vypočte se  $M/z$  a ta je specifická pro každou aminokyselinu**





# Výhody a nevýhody



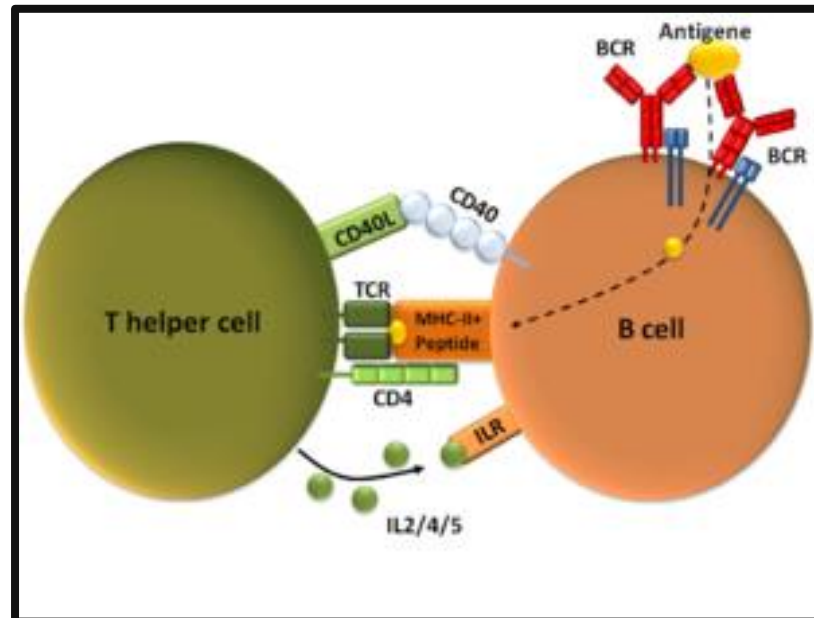
- 1) **Není zapotřebí sekvenovat proteiny**
- 2) **Stačí jen znalost molekulové hmotnosti**



- 1) **Nelze analyzovat multimerní proteiny**
- 2) **Měla by být známá sekvence AK**

# Protilátky jako základní detekční a identifikační nástroj

- Slouží ke studiu výsledků translace
- Vznikají jako reakce organismu na antigen



**Oblast antigenu rozeznávaná protilátkou se označuje jako epitop**

# Epitopy

## Lineární

- Váží se na ně protilátky bez ohledu na konformaci
- Rozpoznávají např. denaturované proteiny



## Konformační

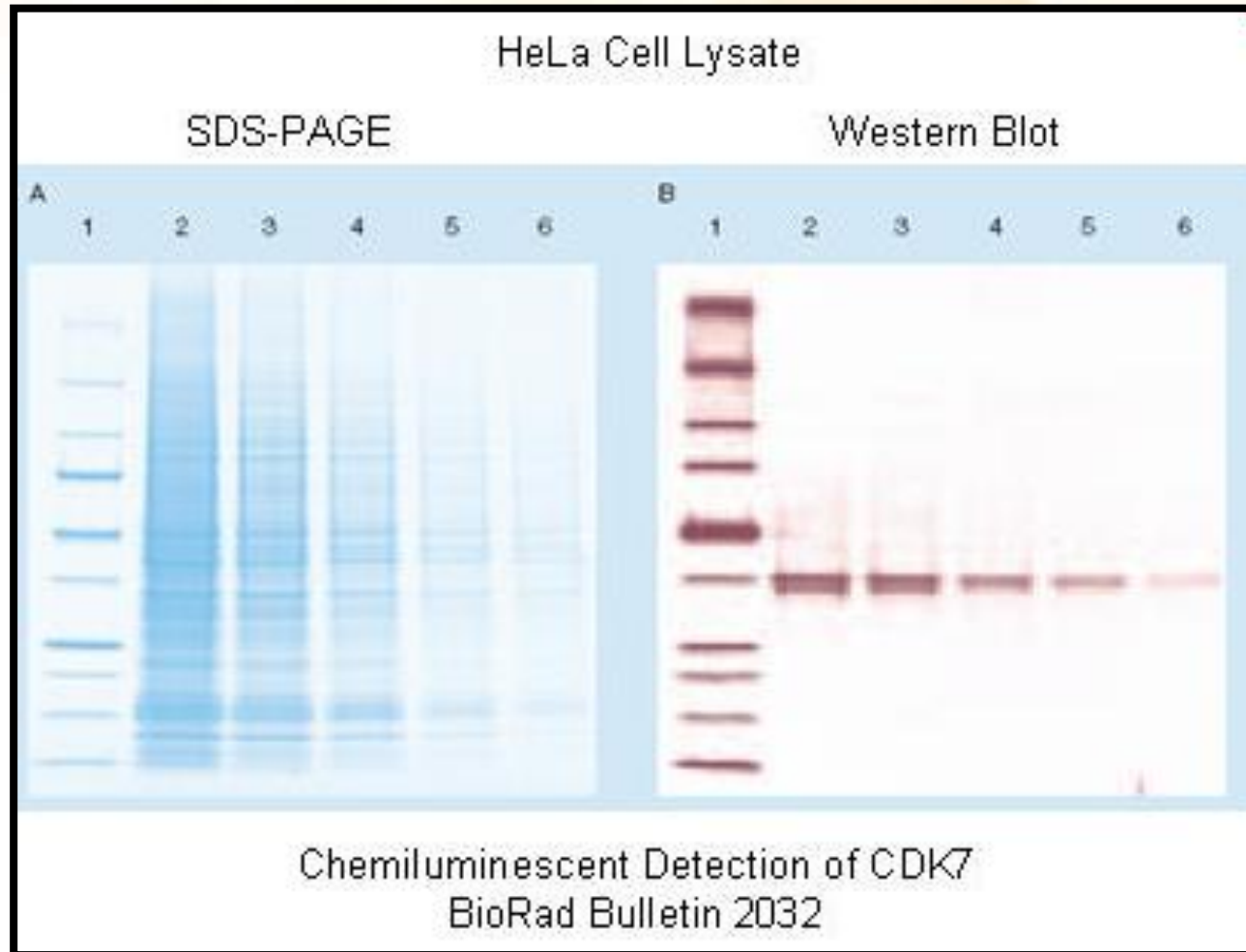
- Váží se na ně protilátky v závislosti na způsobu poskládání polypeptidového řetězce
- Protilátky specifické pro konformační epitopy budou reagovat pouze s proteiny o přirozené konformaci

# Western blotting

## Imunoblotting

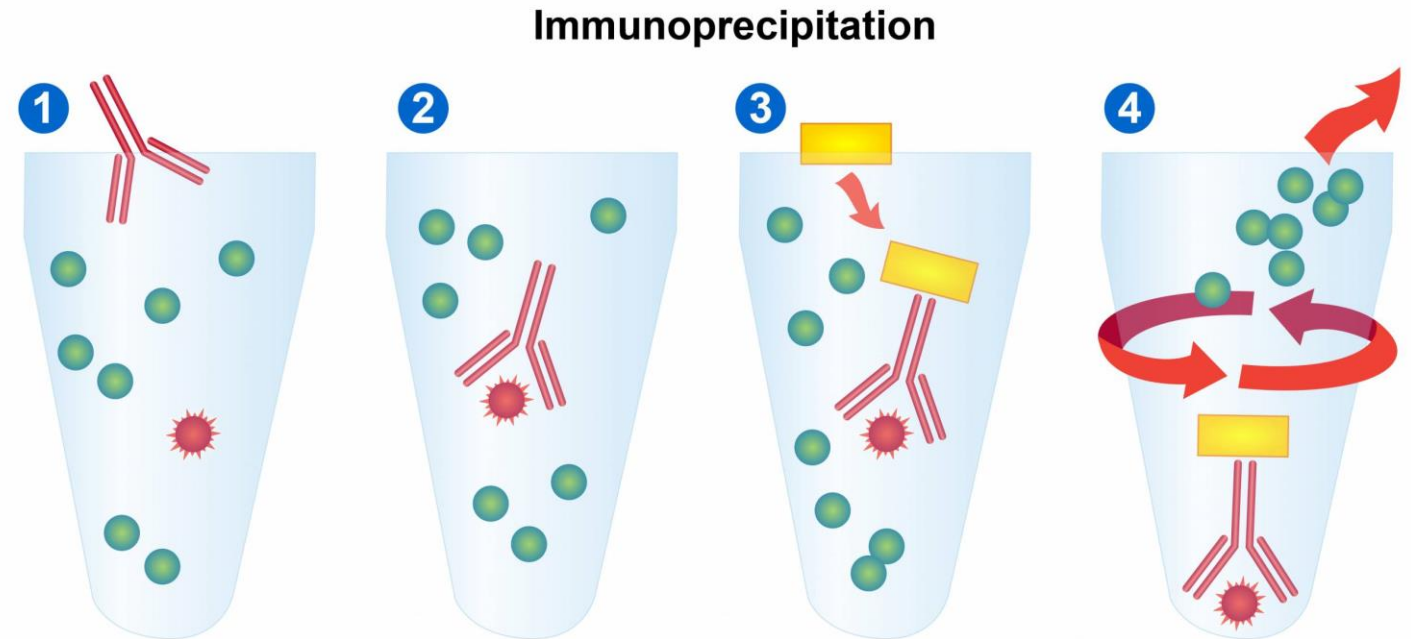
- **Identifikace polypeptidů protilátkami po rozdělení na denaturačním PAGE (alkalický pufr = proteiny získají negativní náboj**
- **Rozpoznání neprobíhá v gelu, ale po přenesení polypeptidů na membránu jako u Southernova přenosu**

# Výsledek imunoblottingu



# Imunoprecipitace

- Slouží k izolaci specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek
- Používá se ke studiu interakcí mezi proteiny



- 1** Suitable antibody is added.
- 2** Antibody binds to protein of interest.
- 3** Protein A or G added to make antibody-protein complexes insoluble.
- 4** Centrifugation of solution pellets antibody-protein complex. Removal of supernatant and washing.

**Diagram 1:** Illustration of Immunoprecipitation process.