

6. Produkce biotechnologických látek a downstream procesy

Produkce terapeutických proteinů je složitý proces, který zahrnuje jak jejich vlastní expresi, tak také purifikační postupy a charakterizaci produktů. Systémy pro expresi byly podrobně charakterizovány v kapitole 4, bioreaktory v kapitole 5. V této kapitole se zaměříme na charakteristiku vlastních biotechnologických produktů vznikajících v bioreaktorech.

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

6.1. Kultivační médium

Pro dosažení optimálních růstových podmínek v bioreaktoru je třeba zabezpečit vhodné složení živného média. Média používaná ke kultivaci buněk jsou komplexní a sestávají ze směsi různých složek, a to cukrů, aminokyselin, elektrolytů, vitamínů a směsi peptonů, růstových faktorů, hormonů a dalších proteinů. Většina těchto látek je dostupná jako komerční preparáty, které stačí jen rozpustit ve vodě a sterilizovat.

V případě savčích buněk tvoří významnou složku média fetální telecí sérum. Některé složky, jako např. právě fetální telecí sérum, obsahují významný podíl proteinů, které jsou kontaminujícími položkami, které interferují s purifikačními procesy. Kromě toho je složení takového séra značně proměnlivé; liší se individuálně zvíře od zvířete, ročního období, zpracování u dodavatele, apod. Sérum také může obsahovat různý nechtěný materiál, např. viry, mykoplazmata, bakterie nebo houby; může tak dojít ke kontaminaci kultury. Hrozbou mohou být i priony, které vyvolávají přenosnou spongiformní encefalitidu a to zejména tehdy, když je použit materiál z krav, koz nebo ovcí. Řada mýněných problémů spojených s použitím séra vedla experimentátory k vytvoření médií, která sérum neobsahují, tzv. **sérum-free médií**. A obecným trendem je vytvářet média taková, která neobsahují složité nedefinované složky. Především při průmyslových aplikacích, např. při výrobě monoklonálních protilátek, se chemicky definovaná média a média bez sérové složky ukázala velmi úspěšná.

6.2. 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.

Přehled potenciálních kontaminujících složek proteinových farmaceutik je uveden v Tabulce 5. 2. Nyní si popíšeme vlastnosti některých z nich.

6.2.1. Viry

Viry jsou potenciálními kontaminantami především pro živočišné buněčné kultury. Jejich koncentrace ve výsledném produktu jsou velmi nízké a je nesnadné je detekovat. Dají se detekovat elektronovým mikroskopem, citlivé testy *in vitro* nejsou k dispozici. U některých virů (např. hepatitidy)

jsou rizika dobře známá, u jiných ale nejsou k dispozici experimentální údaje. Například parvoviry mají dlouhou dobu latence, než se projeví jejich klinický účinek. Dlouhodobé účinky u pacientů léčených rekombinantními proteiny, které jsou kontaminovány takovými viry, samozřejmě nelze zanedbat.

Viry mohou být zaneseny do kultivačních médií přímo ze surovin nebo z infikované buněčné linie. Nejčastějším zdrojem je výše zmíněné živočišné sérum. Sérum mohou být zaneseny také bakterie, mykoplazmata, priony, houby a endotoxiny. K detekci virů ve vstupním materiálu musí být používány certifikované metody, bez jejich použití nemůže být terapeutikum licencováno. Viry lze inaktivovat fyzikálními nebo chemickými metodami, např. teplem, zářením, sonikací, extrémními hodnotami pH, detergenty, rozpouštědly a určitými dezinfekčními prostředky. Tyto postupy mohou mít ale také destruktivní vliv na produkt, a proto musí být velmi opatrně vyzkoušeny a validovány. Elegantním a efektivním postupem pro odstranění virů je **nanofiltrace**. Tento postup je podrobně popsán v „PDA technical report 41“ z roku 2005 (revize v roce 2008). PDA = Parenteral Drug Association.

Tabulka 6.1: Potenciálně kontaminující složky proteinových farmaceutik

Původ	Kontaminující složka
Hostitelský organismus	Viry
	Proteiny a DNA hostitele
	Glykosylační varianty
	Variantní N a C konce
	Endotoxiny (u gram-negativních hostitelů)
Produkt	Substituce a delece aminokyselin
	Denaturovaný protein
	Konformační izomery
	Dimery a agregáty
	Varianty disulfidických můstků
	Deaminované varianty
	Fragmenty proteinů
Proces	Komponenty růstového média
	Purifikační reagenty
	Kovy
	Materiály purifikačních kolon

Nanofiltrace spočívá ve filtraci přes 15 nm membrány, kterými lze zachytit i ty nejmenší známé neobalené viry typu bovinního parvoviru.

Příklady metod, kterými lze redukovat, nebo inaktivovat viry jsou uvedeny v Tabulce 6.2.

Tabulka 6.2: Metody redukce nebo inaktivace virů

Kategorie	Způsoby	Příklad
Inaktivace viru	Teplo	Pasterizace
	Záření	UV světlo
	Dehydratace	Lyofilizace
	Kroslinkující látky, denaturační a rozkladná činidla	β -propionolakton, formaldehyd, NaOH, organická rozpouštědla (např. chloroform), detergenty (např. Na-cholát)
	Neutralizace	Specifické, neutralizující protilátky
Odstranění viru	Chromatografie	Iontoměničová, imunoafinitní
	Filtrace	Nanofiltrace
	Precipitace	Cryoprecipitace

6.2.2. Bakterie

Bakterie mohou kontaminovat buněčné kultury, ale je snadné je odstranit filtrací. Nejjednodušším způsobem, jak zabránit kontaminaci média bakteriemi, je sterilizace všech vstupních materiálů a práce v aseptických podmínkách. Výroba by měla probíhat v tzv. „čistých prostorech“, kde je sterilita prostředí zajišťována např. filtrací vzduchu. V některých případech se do média přidávají antibiotika, což ale komplikuje následné purifikační kroky. Použití beta-laktamázových antibiotik je dokonce zakázáno, protože někteří lidé jsou k těmto antibiotikům zvýšeně citliví. Obecně lze zbytky antibiotik z média odstranit velmi těžko, proto se preferují technologie bez jejich použití.

Bakterie mohou produkovat nebezpečné **pyrogeny**, ke kterým jsou někteří lidé citliví i ve velmi nízkých koncentracích (pikogramy/ml). Pyrogeny mohou vyvolat silnou horečku až s fatálními následky. Filtrací nelze pyrogeny odstranit. Odstranění pyrogenů je komplikováno také jejich různou velikostí a rozmanitou chemickou strukturou. Na druhou stranu jsou ale k dispozici komerční sady, které umožňují detekovat a kvantifikovat i malá množství pyrogenů. Při purifikaci se zpravidla alespoň v jednom kroku používá iontoměničová chromatografie, která by měla zaručit odstranění alespoň negativně nabitých endotoxinů. Skleněné nástroje, které se při purifikacích také používají, jsou před použitím depyrogenovány – horkovzdušnou „sterilizací“ při 180°C.

Buněčné kultury jsou často kontaminovány mykoplazmaty druhu *M. orale*, *M. laidlawii*, *M. arginii* nebo *M. hyorhinis*. Odborná literatura uvádí, že podíl mykoplazmaty kontaminovaných kultur dosahuje až 30% (v závislosti na laboratoři od 5% do 85%). Přítomnost mykoplazmat nezpůsobuje nějakou viditelnou změnu v makroskopických vlastnostech buněk ani ve vlastnostech média. Může ale změnit charakteristiky metabolismu, růst, životnost buněk, apod. Indikátory

přítomnosti mykoplasmat v buněčné kultuře mohou být

- Neschopnost buněk adherovat na povrch kultivační nádoby
- Snížená růstová rychlost buněčné kultury
- Shlukování kultivovaných buněk

Hlavními zdroji kontaminace mykoplasmaty jsou

- samotné buňky
- experimentátor
- sérum, médium a aditiva
- tekutý dusík

Mykoplasmata lze z buněčné kultury odstranit nejlépe antibiotiky gentamycinem nebo ciprofloxacinem.

6.2.3. Buněčná DNA

Když se k produkci terapeutických proteinů použijí savčí buňky, můžou se ve finálních produktech objevit fragmenty DNA. Proto je třeba během purifikace nasadit krok, při kterém jsou molekuly DNA a RNA odstraněny až na bezpečnou úroveň. Kontrolu purifikace lze zabezpečit např. tím, že se buněčná linie inkubuje s radioaktivně značenými nukleotidy, jejichž obsah lze pak ve výsledných produktech snadno změřit. Jsou-li zbytky DNA stále přítomny, měl by být zařazen dodatečný purifikační krok. Otázka týkající se bezpečného množství „kontaminující“ DNA zůstává ale předmětem spekulací. Transformace nahou DNA je velmi obtížná, úspěch je podmíněn spíše vysokou koncentrací DNA. Přesto Evropský lékopis doporučuje, aby množství DNA v konečném preparátu terapeutického proteinu nepřesáhlo 100 pg až 10 ng denní dávky podle druhu kultivačního systému.

6.2.4. Kontaminace proteiny

V biotechnologických produktech se mohou objevovat také zbytky „cizích“ proteinů. Tyto kontaminanty mohou být zdraví nebezpečné, protože mohou být rozpoznány jako antigeny a při opakovaném použití vyvolat imunitní odpověď. A přestože samotný rekombinantní protein žádnou takovou reakci vyvolat nemusí, interpretace může být opačná! Při hodnocení výsledného preparátu je tedy třeba posuzovat opatrně, která složka se na případné imunitní reakci podílí.

Zdrojem kontaminujících proteinů mohou být jak hostitelské buňky, tak i růstové médium. Mezi kontaminujícími proteiny mohou být i varianty rekombinantních proteinů produkované hostitelskou buňkou. Takové proteiny mají s rekombinantním proteinem velmi podobnou strukturu a budou s ním velmi snadno kopurifikovány. Příkladem takového proteinu je urokináza nebo cytokiny hybridomů. Detekce kontaminujících proteinů se provádí citlivými imunologickými testy.

6.3. Downstream processing

Jednou z kritických fází výroby biotechnologických produktů je **izolace biologických produktů** ze supernatantu buněčné kultury; purifikační procedury jsou obvykle finančně náročnější než procesy samotné výroby rekombinantního produkčního organismu. Např. cena za pryskyřice s proteinem A, která se používá k izolaci monoklonálních protilátek, tvoří jen 10% částky použité na výrobu monoklonální protilátky, kdežto cena za filtraci viru představuje asi 40% nákladů.

Rekombinantní produkty získáváme zpravidla ve velmi zředěné formě, kolem 10-200 mg/l (maximálně 500-800 mg/l); cílem jsou koncentrace kolem 5-10 g/l. Zředěné roztoky je třeba zkoncentrovat předtím, než budou produkty purifikovány, protože se jinak pracuje s velkými objemy materiálu. Celý proces purifikace probíhá zhruba ve třech stupních – v prvním je produkt zachycen a primárně purifikován, v dalším kroku je odstraněna hlavní část kontaminant a ve třetím jsou odstraněny zbývající kontaminující látky a variantní formy molekul. Někdy je z ekonomického důvodu vhodná obrácená strategie, kdy jsou nejprve zachyceny hlavní kontaminující složky a produkty jsou purifikovány až v následujících krocích. Tento postup se používá u vnitrobuněčných proteinů nesečernovaných do vnějšího prostředí.

Je-li podíl produktu na celkovém proteinu malý, kolem 1 až 5%, pak je lepší první z popsaných postupů, protože velké množství nespecifických proteinů by mohlo zahltit specifické purifikační nástroje a celý proces zhatit. Po odstranění hlavní části kontaminant se purifikace provádí na co do velikosti malých a tedy levných chromatografických kolonách. Po purifikaci probíhají další kroky, formulace a sterilizace, což jsou procesy popsané v kapitole 8.

V průběhu vytváření purifikačního protokolu by měly být posouzeny také možnosti a úskalí případných kroků vedoucích ke zvýšení objemu výroby. Proces fungující v malých množstvích není často vhodný pro množství velká ať už s ohledem na technické možnosti nebo ekonomiku procesu. Vývoj downstream procesů má dvě stádia – **formulace** (design) a **zvýšení objemu** (scale-up).

Separace nečistot z výsledného proteinu vyžaduje sérii purifikačních kroků (tzv. „process design“), přičemž v každém kroku dochází k odstranění některých nečistot a produkt se přibližuje finální specifikaci. Z obecného pohledu obsahuje výchozí produkt buněčné zbytky anebo celé buňky, které je nezbytné odstranit. **Vytvoření správného purifikačního postupu je usnadněno, když se podaří definovat hlavní kontaminující složky.** Tato definice musí obsahovat detailní informaci o zdroji materiálu (jedná se o bakteriální kulturu nebo kulturu savčích buněk?) a hlavních kontaminujících složkách (např. albumin nebo analoga výsledného produktu). Kromě toho má také **popisovat fyzikální charakteristiky produktu a jejich porovnání s vlastnostmi kontaminant** (teplotní stabilita, izoelektrický bod, molekulová hmotnost, hydrofobicita, denzita, specifické vazebné vlastnosti), protože ty významně určují proces purifikace. Procesy určené k produkci terapeutik musí být reprodukovatelné a spolehlivé. Procesy purifikace mohou vystavit proteiny velkému fyzikálnímu stresu (např. vysoké teplotě nebo extrémním hodnotám pH), který může změnit vlastnosti proteinu vedoucí až ke ztrátě biologické aktivity.

Jakákoli substance, která se aplikuje injekčně, musí být sterilní a prostá pyrogenních látek, respektive pyrogenní látky musí být přítomny v podlimitních množstvích, která jsou definována podle typu produktu. V Evropském lékopisu jsou udávány hodnoty pod 0,2mg/kg tělní hmotnosti. Produkce musí probíhat aseptickými technikami a v prostředí s čistým vzduchem a pod mikrobiologickou kontrolou všech materiálů a zařízení. Během validace purifikačního procesu musí být také prokázáno, že jsou odstraněny potenciální virové kontaminanty. Purifikační matrice musí být sanitovatelné nebo,

je-li to možné, sterilizovatelné přehřátými parami. Aby bylo možné odstranit pyrogeny, musí purifikační materiály vydržet buďto dlouhodobou sterilizaci v suchém vzduchu při 180°C nebo působení 1-2M hydroxidu sodného.

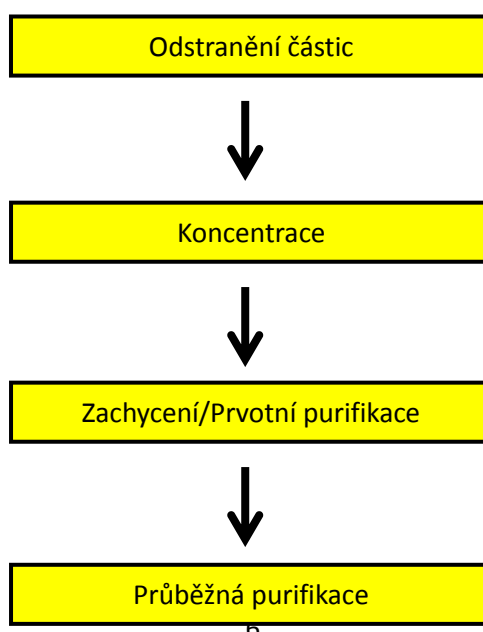
Jestliže nějaký materiál, který je v kontaktu s produktem uvolňuje nějaké komponenty, musí být tyto látky analyzovány a v průběhu validace musí být prokázáno, že je možné je odstranit. V posledních letech se pro výroby používají umělohmotné materiály a výše zmíněné požadavky se proto staly ještě důležitější. Uvolňování nechtěných složek v průběhu purifikace je velkou překážkou pro afinitní chromatografii. V laboratorním měřítku je afinitní chromatografie užitečným nástrojem purifikace, ale pro přímé použití terapeutických proteinů u lidí je nutné naprosto nezvratně prokázat, že je možné odstranit jakékoli z chromatografie uvolněné látky.

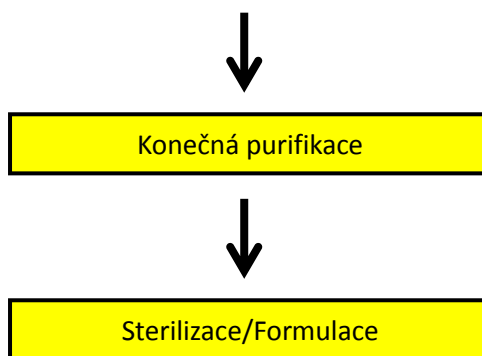
Termín „scale-up“ se používá k popisu procesů konverze laboratorní procedury do ekonomického, průmyslového postupu. Během této fáze se proces posouvá z laboratorních podmínek do poloprovozu a konečně do plnoprovozu. Cílem procesu „scale-up“ je výroba produktu vysoké kvality za kompetitivní cenu. Protože cena downstream procesů představuje 50 až 80% celkových nákladů, je třeba zvolit praktické a ekonomické způsoby purifikace. Kvalita metod purifikace proteinů je klíčem pro silnou pozici na trhu. Základní činnosti při purifikaci makromolekul z biologických zdrojů jsou zachyceny na obr. 6.1.

Jak bylo zmíněno už výše, je formulace procesů purifikace produktů vysoce závislá na druhu produktu. Každý produkt je purifikován specifickým vícekrokovým postupem. Základní schéma uvedené na obrázku 6. 1 je komplexní. Typický příklad činností při purifikaci je zachycen na obr. 6.2. Je zde uveden proces purifikace glykosylovaného rekombinantního interferonu (velikost kolem 28 kDa) produkovaného v savčích buňkách.

Jakmile jsou objem a koncentrace produktu definovány, může začít purifikace. K separaci proteinů na základě širokého spektra různých fyzikálně-chemických kritérií (velikost, náboj, hydrofobicita, rozpustnost) existuje celá řada dostupných metod.

Obr. 6.1: Základní činnosti při purifikaci biofarmaceutických makromolekul





6.3.1. Filtrace/centrifugace

Produkty biotechnologického průmyslu jsou separovány z biologických systémů, které obsahují suspendovaný částicový materiál (a to celé buňky), lyzované buňky (a fragmenty rozbitých buněk), které vznikají poté, co jsou buňky degradovány, aby se z nich uvolnil vnitrobuněčný protein. Většina purifikačních procesů proto počítá s alespoň jedním krokem, ve kterém jsou takové částice odstraněny nebo koncentrovány. Nejčastější metodou je centrifugace nebo filtrace (ultrafiltrace, diafiltrace a mikrofiltrace). Cena a efektivita takových metod je vysoce závislá na fyzikální povaze částicového materiálu a produktu.

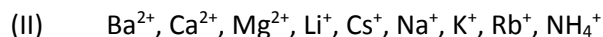
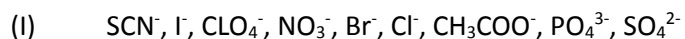
Filtrace. Filtrací lze zkoncentrovat biomasu před její další purifikací. Pro účely oddělení buněk od média bylo vyvinuto několik filtračních systémů, z nichž nejúspěšnější je tangenciální průtokový systém. Při něm je tvorba nánosů na membráně, tvorba gelové vrstvy a polarizaci zabráněno vysokými střížnými silami. Při ultrafiltraci je směs molekul různých molekulových separována protlačováním dispergovaného materiálu přes membrány s póry definované velikosti. V principu je ale ultrafiltrací možno dosáhnout jen nízkého stupně purifikace, používá se spíše ke koncentraci makromolekul nebo k výměně vodné fáze, ve které jsou částice dispergovány nebo molekuly rozpuštěny v médiu, které je vhodnější pro další purifikační kroky.

Centrifugace. Subbuněčné částice nebo organely suspendované ve viskózní tekutině je nesnadné separovat v jednom kroku centrifugace nebo filtrací. Ale je možné je použít centrifugace při různých rychlostech. Jádra buněk lze například získat centrifugací při 400 g po dobu 20 minut, vezikuly plasmatické membrány je třeba oddělit při vyšších otáčkách a za delší dobu centrifugace. Izopyknická centrifugace do rovnováhy je velmi účinným separačním nástrojem. V laboratorních podmínkách se využívá jak kontinuálního, tak i diskontinuálního hustotního gradientu. V průmyslových aplikacích se využívá diskontinuálních gradientů k získání precipitovaných proteinů nebo naopak kontaminujících složek.

6.3.2. Precipitace

Rozpustnost proteinů závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí, např. pH, složení a iontové síle roztoku. Když budeme pomalu zvyšovat iontovou sílu roztoku se směsí proteinů, dojde k selektivní precipitaci jednotlivých proteinů. Tento fenomén se označuje jako „vysolování“. Existuje

řada látek, které mají odlišný vysolovací potenciál. Dvě série látek s rostoucí vysolovací schopností jsou uvedeny níže, jedna pro negativně (I) a druhá pro pozitivně (II) nabitě molekuly:

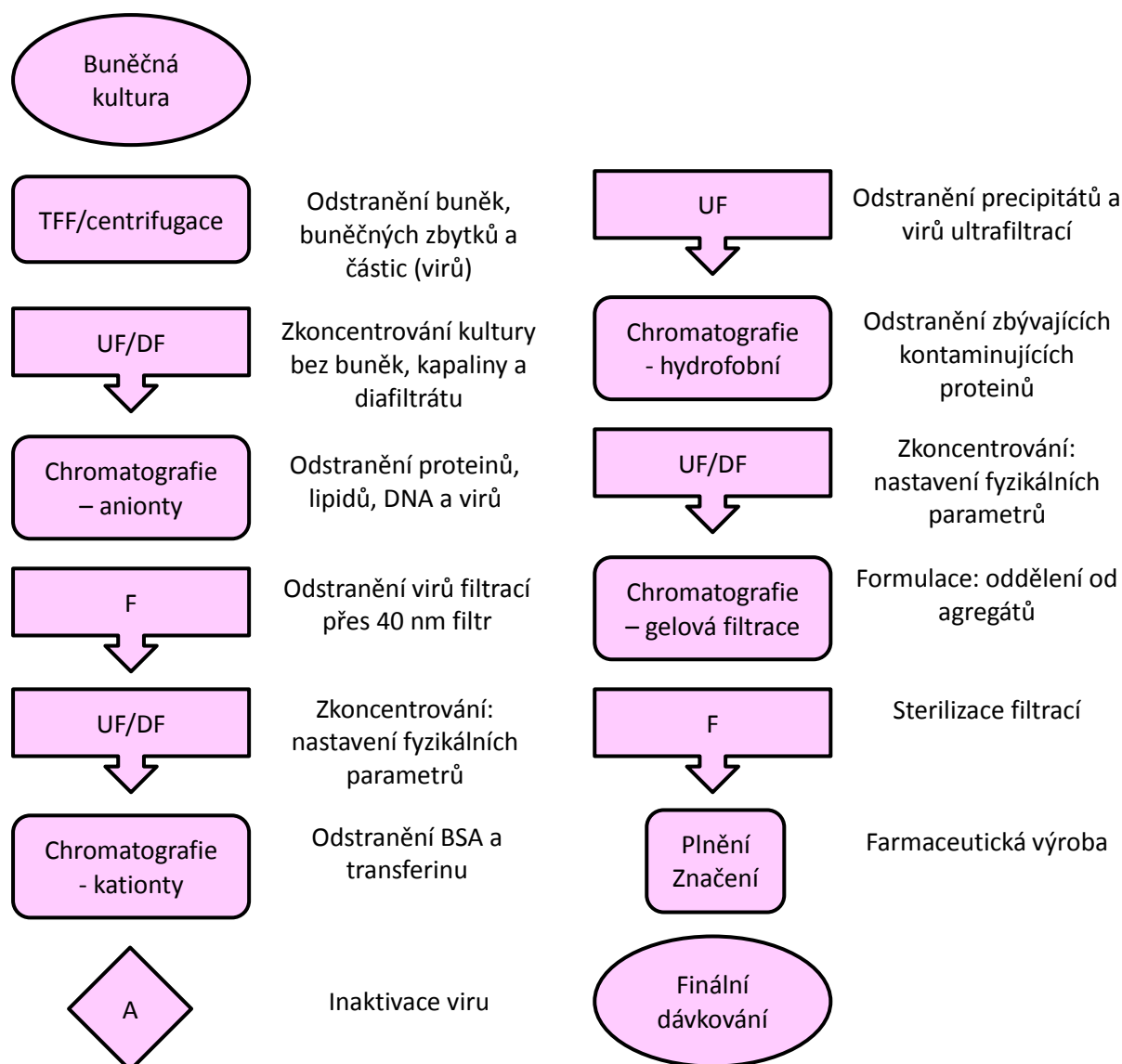


Velmi často se pro vysolování proteinů používá síran amonný.

Dalším způsobem, jak precipitovat proteiny je použití organických rozpouštědel mísitelných s vodou. V tomto případě dochází ke změně dielektrické konstanty. Příkladem takových látek je polyethylenglykol a kyselina trichloroctová. Za určitých podmínek precipitují také chitosany a neiontové polyoxyethylenové detergenty.

Precipitace je jednoduchá a relativně ekonomická technika, kterou lze snadno převádět z malých do velkých objemů. Používají se často k izolaci proteinů ze supernatantu buněčných kultur. Precipitace ale není pro účely purifikace dostačující, protože se spolu s požadovanou látkou sráží i látky kontaminující. S velkým množstvím precipitátu se rovněž často nnesnadno manipuluje. Precipitace je přesto často používaná metoda, zvláště u některých aplikací.

Obr. 6.2: Proces purifikace glykosylovaného rekombinantního interferonu A = adsorpce, DF = diafiltrace, F = filtrace, TFF = tangenciální průtoková filtrace, UF = ultrafiltrace



6.3.3. Chromatografické metody

Biologicky aktivní látky tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin se speciálními funkcemi, které jsou v podmínkách *in vivo* řízeny převážně malými změnami v jejich okolí. Proto mohou mít změny pH, iontové síly, koncentrace kovových iontů, kofaktorů atp. 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. Vývoj účinných izolačních metod, jako jsou **gelová**, **ionexová**, **(bio)afinitní** aj. chromatografie a nejrůznější typy elektroforéz, umožnil vývoj celé řady nových odvětví chemie. Bez rozvoje těchto metod by nebyl možný např. současný rozvoj chemie proteinů a nukleových kyselin se všemi významnými důsledky pro molekulární biologii, genové inženýrství, imunochemii aj. odvětví. Jejich další rozvoj není možný bez dostatečného

množství enzymů, transportních a regulačních proteinů, kofaktorů a jiných přírodních biologicky aktivních sloučenin.

Při **preparativní chromatografii** jsou molekuly separovány na základě rozdílů v distribuci mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární (většinou pevná fáze) a druhá mobilní. Mobilní fáze může být buď kapalina, nebo plyn. V současnosti jsou téměř všechny pevné fáze umístěny v koloně a mobilní fáze procházejí skrz pevnou fázi pomocí tlaku. Procesy purifikace využívají povětšinou dva až tři chromatografické postupy. V tabulce 6.3 je přehled chromatografických metod využívaných při purifikaci biotechnologických produktů.

Koncentrace biologicky aktivních látek ve výchozím materiálu bývá obvykle nízká, navíc ve směsi s velkým počtem podobných látek. S výhodou se proto jako první purifikační stupeň izolace volí **adsorpce**. Je-li k dispozici specifický sorbent, schopný vyvazovat izolovanou biologicky aktivní látku na základě jejího biospecifického komplexu, s výhodou volíme jako první stupeň (a někdy i jako jediný, to v závislosti na účinnosti procesu purifikace) **biospecifickou afinitní chromatografii**. Protože při fyziologických hodnotách pH je většina proteinů nabitá negativně, využívá se pro jejich izolaci **sorpce na anex**. Dalším stupněm potom může být **gelová chromatografie** dělicí na základě rozdílů v molekulové hmotnosti nebo některá z **elektroforetických metod** využívající rozdílu v elektrickém náboji.

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.**

Stacionární fáze při chromatografii. Chromatografické postupy jsou u purifikačních postupů často oním rychlost-limitujícím krokem. Důležitým primárním faktorem, který má vliv na rychlost procesu, je transport dělených částic do pórů materiálu stacionární fáze. Jako adsorbenty slouží anorganické materiály typu silikagelu, skleněných kuliček, hydroxyapatitu, různých oxidů kovů (oxid hlinitý) a organických polymerů (dextrany, celulóza, agaróza). **Separace probíhá na základě diferenciální interakce jednotlivých složek vzorku s chromatografickým médiem.** Na interakci se podílí iontové skupiny (např. aminy nebo karboxyskupiny), dipolární skupiny (karbonylová skupina) a skupiny poskytující vodíkové vazby a skupiny akceptorové.

Stacionární fáze užívané pro chromatografickou separaci velkých objemů se v posledních desetiletích velmi rozvinuly. Kromě konvenčních systémů se objevila technika tzv. **perfúzní chromatografie**, při které mobilní fáze protéká skrz velké póry uvnitř solidní fáze (obr. 6.3). Perfúzní chromatografie je rychlejší a i při vyšší rychlosti mobilní fáze si zachovává stejnou rozlišovací schopnost a vazebnou kapacitu. Dalším vývojem v tomto směru jsou spirálně stočené kolony s vysokým průtokem, velkou kapacitou a dobrou efektivitou zachycování částic.

Ideální stacionární fáze musí mít řadu charakteristik, např. vysokou mechanickou odolnost, vysokou porozitu, žádné nespecifické interakce mezi proteinem a podpůrnou fází, vysokou kapacitu, biokompatibilitu a vysokou stabilitu matrice v různých rozpouštědlech. Především stabilita matrice v různých rozpouštědlech je nezbytná u těch kolon, které se používají k přípravě klinických materiálů a musí být v pravidelných intervalech čištěny, zbavovány pyrogenních látek, dezinfikovány a sterilizovány. Mnoho z uvedených kritérií splňuje **vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)**.

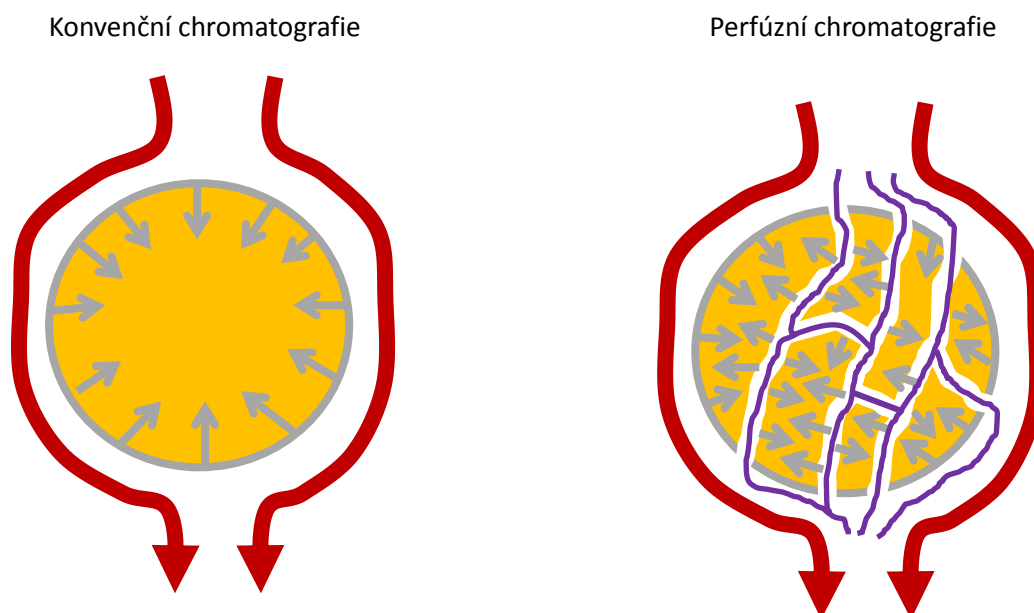
Tabulka 6.3: Často používané separační postupy a jejich fyzikální principy

Separační technika	Model/princip	Parametr separace
Membránová separace	Mikrofiltrace	Velikost
	Ultrafiltrace	Velikost
	Dialýza	Velikost
Centrifugace	Izopyknicá	Denzita
	Izokinetická	Denzita
Extrakce	Fluidní extrakce	Rozpustnost
	Extrakce tekutina/tekutina	Fázové rozhraní, změna rozpustnosti
Precipitace	Frakční precipitace	Změna v rozpustnosti
Chromatografie	Iontoměničová	Náboj
	Gelová filtrace	Velikost
	Afinitní	Specifické interakce ligand-substrát
	Hydrofobní interakce	Hydrofobicita
	Adsorpce	Vazba kovalentní/nekovalentní

Mobilní fáze musí být volena tak, aby docházelo k co nejmenším ztrátám biologické aktivity purifikovaného proteinu. Při HPLC se využívají stacionární fáze s malými póry. Tyto částice jsou malé, pevné a mají přesnou velikost, která zajišťuje velký celkový povrch; ani vysoký tlak tyto částice nedeformuje. Mobilní fáze je protlačována kolonou za vysokého tlaku. **Reverzní HPLC** systémy využívají méně polární stacionární fáze než je fáze mobilní, jsou používány při velkoobjemových purifikacích a mohou být využity jak k purifikaci, tak i ke koncentrování produktu. HPLC je relativně drahá a není tudíž vhodná pro velkoobjemové separace.

Plastové kolony musí být používány jen při nízkém tlaku. Na druhou stranu jsou takové kolony rezistentní vůči všem pufrům na rozdíl o vysokotlakých kolon sestavených z nerezavějících kovových materiálů. Plastové kolony jsou komerčně dostupné a umožňují purifikaci proteinu v jediném kroku, výsledků lze dosáhnout rychle a s vysokým rozlišením.

Obr. 6.3: Struktura konvenčních chromatografických částic a částic využívaných při perfúzní chromatografii



Adsorpční chromatografie. Adsorpční chromatografie se označuje také jako chromatografie na „normální fázi“. Při tomto typu chromatografie je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Proteiny se selektivně váží ke statické matrixi za jednéh podmínek a uvolňují za jiných podmínek. Při adsorpční chromatografii je možné nanášet na stacionární fázi velké objemy vzorku. V principu je tato metoda převoditelná na velká množství při nízkých nákladech.

Iontoměničová (ionexová) chromatografie. Jejím základem je vratná výměna iontů mezi mobilní kapalinou a stacionární fází ionexů. Nerozpustná matrice obsahuje kovalentně vázané nabitě částice, které přitahují opačně nabitě částice mobilní fáze. Tyto opačně nabitě ionty se mohou reverzibilně vyměňovat s jinými ionty stejného náboje. Jestliže matrice obsahuje pozitivně nabitě skupiny, pak se na ni adsorbují negativně nabitě ionty a tento ionex se nazývá **anex** (anion exchanger). V opačném případě obsahuje matrice záporně nabitě skupiny, vážou se na ni kationy a ionex se označuje jako **katex** (cation exchanger). Jako materiál pro ionexy se tradičně používá různě modifikovaná celulóza (CM-celulóza: karboxymethyl $-OCH_2COO^-$, SE-celulóza: $-OCH_2-CH_2-SO_3^-$, P-celulóza: $-O-PO_3^-$, DEAE-celulóza: diethylaminoethyl $-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2$, QAE-celulóza: kvarterní arylaminoethyl $-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_3$, a jiné). Pro průmyslové použití jsou tyto materiály vhodné pouze pro vsádkové procesy, neboť je komplikovaná regenerace kolony do původního stavu. Používají se i matrice založené na Sephadexu, také pro vsádkové procesy. Vhodné je i použití ionexů odvozených od agarózy (Trisacryl, Fractogel...). Používají se i ionexy založené na bázi křemičitanů a syntetických polymerů, např. polyakrylátů. Při iontoměničové chromatografii je možné použít také tzv. „negativního modu“, tedy postupu, při kterém se na kolonu váží kontaminující složky, kdežto protein jí naopak protéká.

Ionexová chromatografie patří mezi nejrozšířenější metody, které byly a jsou používány pro izolace nejrozličnějšíh biologicky aktivních látek (enzymy, nukleové kyseliny, antibiotika, vitamíny, nukleosidy a

nukleotidy, lipidy, aj.). Objemy při iontoměničové chromatografii lze snadno navýšit.

Je také možné, aby mobilní fáze protékala kolonou jako postupný nebo skokový gradient roztoku solí nebo jako roztok s měnící se hodnotou pH. Např. glykosylované proteiny jsou eluovány v relativně širokém spektru hodnot pH a to až do dvou jednotek pH.

Při purifikaci proteinů lze s výhodou využít řízenou mutagenezi a vložit do proteinu dodatečné aminokyseliny, které změni jeho eluční vlastnosti. Vhodně se k tomuto účelu používají molekuly argininu, které zajistí rekombinantnímu proteinu schopnost vázat se na katex za úplně jiných podmínek než ostatní proteiny.

Afinitní (bioafinitní, imunoafinitní) chromatografie je založena na výjimečné vlastnosti biologicky aktivních látek tvořit pevné specifické reverzibilní komplexy s jinými komplexotvornými sloučeninami, tzv. **afinitními ligandy**. Principem izolační metody je interakce izolovaného proteinu s ligandem vázaným na pevný nosič. Pro purifikaci proteinů je to velmi účinná metoda.

Jako ligand může být použita každá sloučenina, která s danou izolovanou látkou tvoří biospecifický reverzibilní komplex – musí obsahovat funkční skupinu, kterou se kovalentně váže na pevný nosič a musí mít dostatečnou afinitu k izolované látce. Ligandy mohou být skupinově specifické nebo obecné. Příkladem tvorby komplexů mohou být dvojice enzym – substrát, kofaktor – efektor, protilátka – antigen, hormon – receptor apod.

Pro účely separace se při afinitní chromatografii nejčastěji používají

- imobilizované pyridinové nebo adeninové nukleotidy nebo barviva s antrachinonovou strukturou (Procion Blue, Brown, Red, Green, Cibacron Blue, ...) především pro separaci dehydrogenáz a kináz,
- imobilizovaný hemoglobin nebo kasein pro proteolytické enzymy,
- organortuňné deriváty pro izolace merkaptosloučenin,
- imobilizované lektiny pro izolace glykoproteinů, povrchových buněčných receptorů nebo celých buněk,
- imobilizované kovové ionty, např. Zn^{2+} nebo Ni^{2+} , pro separaci proteinů.
- Jako pevný nosič se používá Sephadex nebo Trisacryl.

Proteiny se k afinitním kolonám váží převážně za fyziologických podmínek. Kontaminanty jsou odstraněny intenzivním promýváním matrice a čistý protein je získáván poté, co se do mobilní fáze přidá činidlo kompetující s ligandem o vazebná místa na pevné fázi nebo po změně fyzikálních podmínek (např. pH eluentu), které vedou ke změně vazebných schopností proteinu.

Příklady afinitní chromatografie aplikované na proteiny

- Vazba glykoproteinů na imobilizované lektiny (eluentem může být cukr)
- Vazba serinových proteáz na imobilizovaný lyzin (eluentem může být lyzin samotný)
- Protilátka a imobilizovaný protein A, který se váže na Fc fragment protilátky
- Protilátka a imobilizovaný protein G, který se taky váže na Fc fragment protilátky
- Hormony a růstové faktory a jejich imobilizované receptory nebo krátké peptidy tyto

receptory napodobující

Některé proteiny mají vysoce selektivní vazebné schopnosti na komerčně dostupné látky. Při výrobě farmaceutických přípravků je třeba zajistit, aby tyto látky nebyly karcinogenní a aby se během chromatografie neuvolňovaly do mobilní fáze.

Tzv. fúzní rekombinantní proteiny jsou exprimovány s partnerským haptenem, prostřednictvím kterého se jakýkoli protein může afinitně vázat ke specifickému ligandu. Po vyčištění je fúzní partner odštěpen specifickou proteázou a haptenu je pak odstraněn jinou metodou.

Tzv. imunoafinitní chromatografie využívá schopnosti protilátky vázat se ke svému specifickému epitopu. Metoda je použitelná k purifikaci protilátky nebo i antigenu, záleží na tom, co připojíme k pevné fázi. K výhodám imunoafinitní chromatografie patří vysoká specifičnost a spojení zkoncentrování a purifikace do jednoho kroku. Nevýhodou je někdy velmi silná vazba protilátky k antigenu. K imunoafinitní chromatografii je zapotřebí mít specifický „receptor“, což může činit problémy při přechodu na větší purifikační objemy a komercializaci.

Imunoafinitní chromatografie byla využita k purifikaci např. interferonů, urokinázy, faktoru VIII:C, erythropoetinu, interleukinu 2, lidského faktoru X a rekombinantního aktivátoru tkáňového plasminogenu.

Jako nová metoda, využívaná zatím převážně v laboratorním měřítku se používá **vysokoučinná bioafinitní chromatografie (HPLAC)** – plně automatizovaný systém pracující za zvýšeného tlaku. Při této metodě je možno mimo jiné dosáhnout lepšího rozlišení než při klasickém způsobu.

Hydrofobní chromatografie. Principem této metody je dělení na normální fázi, rozpouštědlem je tedy voda. Za fyziologických podmínek je většina hydrofobních aminokyselin zanořena uvnitř proteinové globule a jen malá část je jich vystrčena na povrch. Naopak hydrofilní aminokyseliny se velmi ochotně spojují s okolními molekulami vody. Vysoké koncentrace solí snižují hydrataci proteinu a na jejich povrchu se objevuje více zbytků hydrofobních aminokyselin.

Hydrofobní chromatografie je založena na nekovalentních a ne-elektrostatických interakcích mezi proteiny a stacionární fází. Hydrofobní charakteristiky rozpouštědla lze modulovat koncentracemi anorganických solí. Často se používá síran amonný nebo chlorid sodný. Pokud je koncentrace solí vysoká (až několika molární), jsou proteiny k hydrofobnímu povrchu matrix přitahovány. S klesající koncentrací solí afinita proteinu k pevné fázi klesá a proteiny jsou postupně vymývány.

Metoda sice nemá tak vysokou rozlišovací schopnost jako RF-HPLC, ale použité chemikálie jsou vůči děleným proteinům mnohem méně agresivní, umožňuje obvykle získat vysoké výtěžky nepoškozených správně sbalených proteinů. Je ideální ji v purifikačním schématu zařadit za iontoměničovou chromatografii, při které je protein obvykle eluován v prostředí s vysokou iontovou silou.

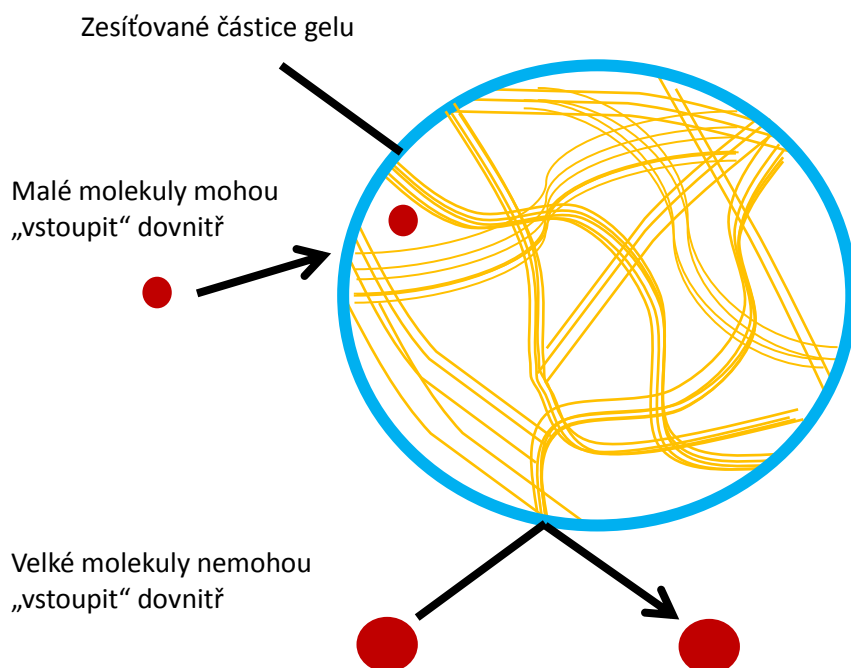
Gelová chromatografie. Dělení je při této metodě založeno na rozdílné velikosti a tvaru jednotlivých látek (obr. 6.4). Označuje se jako GPC (gelová permeační chromatografie) nebo SEC (Size exclusion chromatography nebo Steric exclusion chromatography) nebo taky jako **gelová filtrace**. Stacionární fáze je tvořena porézním materiálem, pro biologicky aktivní látky nejčastěji gelem, jehož inertní zesíťovaná polymerní matrice je nasycena kapalinou, nejčastěji vodou. Stejná kapalina pak může

být použita i jako mobilní fáze. Při průchodu směsi látek touto porézní stacionární fází dochází k tomu, že malé molekuly jsou schopny difundovat dovnitř pórů matrice a jejich pohyb je tedy zpomalen, zatímco 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.

Jako materiál na gelovou filtraci se tradičně používá zesíťovaný dextran (Sephadex) nebo polyakrylamid (BioGel P), které jsou vhodné pro laboratorní měřítka, ale pro výrobní potřeby jsou příliš „měkké“ – v průmyslu se používají rigidnější gely, např. Sephadex G25 nebo G50, Sephacryl (dextran + PAD), Superdex (dextran + agaróza), Ultrogel AcA (agarosa + PAD) Superosa (zesíťovaná agaróza), Cellufin (celulóza) aj. Někdy se používají i materiály založené na silikagelu nebo porézním skle, ale ty nejsou většinou příliš vhodné pro biologické izolace – jejich povrch je hydrofobní, proto nečistota dochází k ireverzibilní vazbě proteinů na povrch matrice a uvolnění z matrice může probíhat pouze za podmínek hrozících denaturací. Řešením je modifikace tohoto materiálu hydrofilním polymerem, který může být dále derivatizován vhodnými skupinami.

Pro průmyslové využití je metoda obvykle nepoužitelná, protože je při ní na malý vzorek zapotřebí velké kolony. Používá se v pozdějších fázích purifikace, kdy je už protein dostupný ve velmi koncentrovaném stavu. Jako konečný krok purifikace se hodí proto, že je při ní protein převeden do vhodného pufru, který se používá před finální preparací produktu. V této fázi už neovlivní konečnou čistotu proteinu.

Obr. 6.4: Schématické znázornění principu gelové filtrace



Vysokotlaká kapalinová chromatografie v reverzní fázi. Tato metoda (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) využívá hydrofobních vlastností proteinů. Funkční skupiny na pevné fázi obsahují jeden až osmnáct atomů uhlíku na uhlovodíkovém řetězci. Čím delší řetězec je, tím hydrofobnější pevná fáze je. Proteiny vázané na matrix jsou z ní uvolněny použitím mobilní fáze s ještě větší hydrofobicitou. Většinou se používá acetonitril nebo etanol. Technika je velmi citlivá, dokáže odlišit molekuly s jediným atomem kyslíku navíc, když například dojde k oxidaci jediného zbytku methioninu nebo když dojde k hydrolýze aminoskupiny na glutaminu nebo asparaginu. Hydrofobicitu proteinu mění taky vytvoření disulfidické vazby. Metodu je tedy kromě studia homogenity proteinového izolátu využít taky ke sledování degradace přípravku např. při dlouhodobém skladování. Vysokoučinná kapalinová chromatografie pracuje v plně automatizovaných zařízeních, které využívají k pohybu mobilní fáze zvýšeného tlaku, což vede k lepšímu rozlišení než při klasickém způsobu chromatografie.

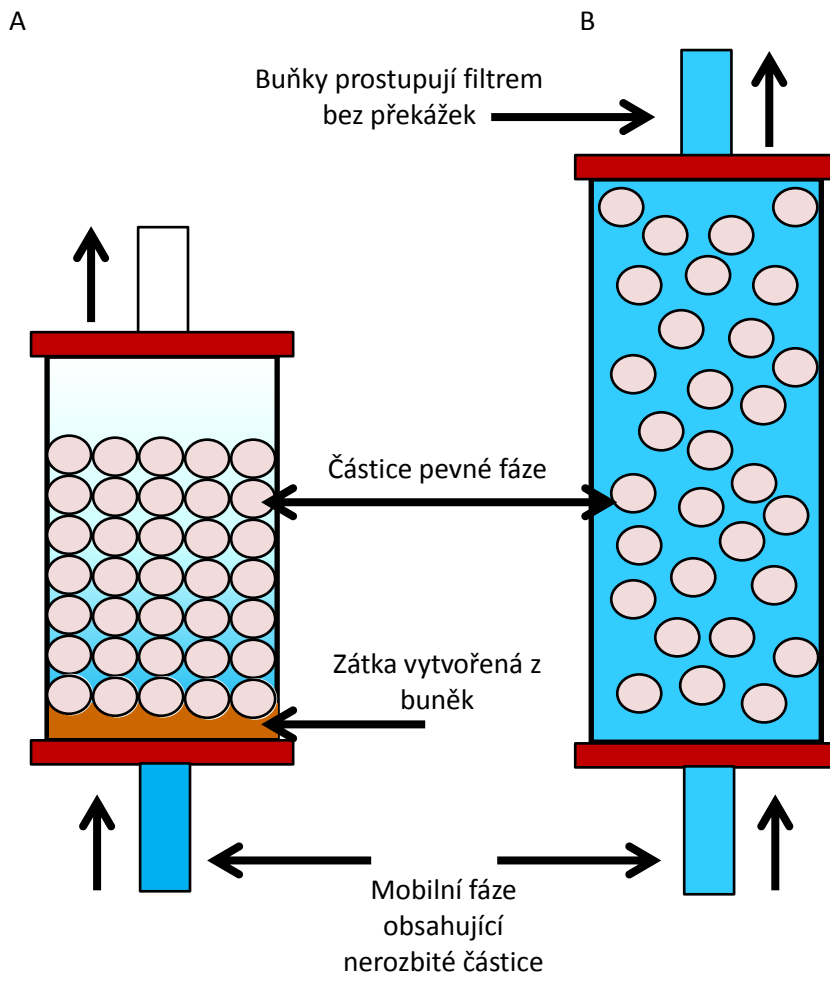
Kolony s rozšířeným filtrem. Jak už bylo řečeno dříve, jsou purifikační schémata založena na několika za sebou seřazených protokolech. To ovšem jednak zvyšuje cenu za purifikaci, ale navíc zvyšuje ztráty, protože v každém purifikačním kroku se část produkce ztratí. Proto se stále vyvíjejí postupy, které mají celou purifikaci zjednodušit. Konvenčním formátem adsorpční chromatografie jsou tzv. „packed columns“ neboli **kolony s pevným filtrem**. V těchto typech kolon ale zůstává část materiálu uchycena ve vstupní části filtru a doslova ho ucpává. Tomu lze zabránit použitím pre-filtru s póry o průměru 0,2 μm . Dalším řešením je použití tzv. „expanded columns“ neboli **kolon s rozšířeným** nebo taky tzv. **fluidním filtrem** (obr. 6.5).

Rozšířený filtr nemá částice upěchované ve vrstvách, ale volně se vznášející v proudící mobilní fázi. Mobilní fáze působí proti gravitační síle, která normálně strhává částice dolů. A pokud je rychlost průtoku mobilní fáze správně vybalancovaná s ohledem na velikost částic, jejich viskozitu a hustotu mobilní fáze, pak se částice v koloně neusazují, ale permanentně se vznášejí. Velké částice (např. buňky) proudí kolonou ven a neucpávají ji. Purifikované molekuly jsou naopak selektivně zachycovány na adsorpčních částicích. Na takovou kolonu je možno aplikovat vzorek bez jeho předchozího pročištění např. centrifugací nebo filtrací, což zkracuje proces purifikace a snižuje cenu. V principu lze použitím rozšířeného filtru dosáhnout pročištění vzorku, jeho zkoncentrování a purifikace v jediném kroku.

Z technologického hlediska je možno použít stejné kolony jako u aplikací s pevným filtrem. Co se separačního principu týče, je nejčastěji využívána iontoměničová chromatografie.

Technika našla uplatnění i v průmyslových aplikacích, při purifikacích antibiotik, např. streptomycinu a novobiocinu.

Obr. 6.5: Srovnání mezi kolonou s fixním (A) a rozšířeným (B) filtrem



6.4. Další otázky spojené s produkcí a purifikací proteinů

6.4.1. Heterogenita N- a C-konců

Hlavním problémem spojeným s expresí rekombinantních proteinů je jejich N-konec, který v případě produkce v *E. coli* začíná formylmetioninem. Pokud exprese proteinu neprobíhá správně, vznikají metionylované varianty polypeptidových řetězců nebo na N-konci chybí jedna nebo i více aminokyselin. Tomuto jevu se říká **heterogenita N-konců**. Tento fenomén je častý u rekombinantních proteinů citlivých k proteázám, které jsou buďto secernovány hostitelem nebo vneseny do média jako součást séra. Tyto proteázy odštěpují aminokyseliny od C- nebo N-konce a vytváří C- nebo N-koncovou heterogenitu.

C- nebo N-koncová heterogenita je jevem nežádoucím, protože může způsobit problémy při purifikaci a charakterizaci proteinů. Přítomnost nadbytečných metioninů na N-konci mění sekundární a terciární strukturu proteinů. To může vést ke změně biologické aktivity a stability a zvyšovat imunogennost proteinu. Kromě toho je N-koncový metionin, ale i metionin uvnitř řetězce citlivý k oxidaci.

6.4.2. Chemická modifikace/konformační změny

Ačkoli jsou savčí buňky schopny produkovat proteiny strukturálně shodné s proteiny endogenními, je třeba vždy postupovat obezřetně. Transkripty, které obsahují kódující sekvence genů pro příslušné proteiny, mohou být matricí pro konformační izomery těchto proteinů, protože neobvyklé sekundární struktury takových transkriptů mohou ovlivnit translaci. Dalším faktorem, který je třeba mít v patrnosti, je možná existence ekvilibria mezi požadovanou přirozenou formou proteinu a formami jinými, např. dimery. Pro biologickou aktivitu proteinů je esenciální jejich správné sbalení. Proto je důležité stanovit, jestli jsou všechny molekuly rekombinantního proteinu produkované v savčích buňkách opravdu sbaleny do správné struktury. Někdy se nesprávně sbalené proteiny stanou snadno, jindy je to obtížné.

Kromě konformačních změn mohou být proteiny v průběhu purifikace modifikovány proteolýzou, deaminací, hydroxylací nebo oxidací sulfhydrylových skupin. Tyto modifikace mohou vést k alespoň částečné denaturaci. A na druhou stranu může denaturace proteinů vést k chemickým modifikacím.

6.4.3. Glykosylace

Mnoho terapeutických proteinů produkováných metodami genového inženýrství jsou glykoproteiny. Přítomnost a povaha postranních řetězců oligosacharidů ovlivňuje řadu důležitých charakteristik, např. poločas proteinu v séru, rozpustnost, stabilitu a někdy i farmakologický účinek. Např. darboetin, geneticky modifikovaný erythropoetin 2. generace, obsahuje 80% uhlovodíků, zatímco přirozený glykoprotein jen 40%. To vede k prodloužení poločasu po intravenózní aplikaci u darboetinu z 8 na 24 hodin.

Glykosylace proteinu není závislá na sekvenci DNA, je to enzymatická modifikace polypeptidového řetězce po translaci a může být závislá na prostředí uvnitř buňky. Savčí buňky obecně glykosylační mechanismy mají, ale stejně není možné kontrolovat celý proces glykosylace. Heterogenita glykosylace se projeví na délce postranních řetězců, typu oligosacharidu a vlastní

sekvenci uhlovodíku. Příkladem heterogenity glykosylace u rekombinantních proteinů jsou interleukin-4, gonádotropin, erythropoetin a tkáňový plasminogenový aktivátor.

Struktura oligosacharidů a jejich složení se pochopitelně u různých expresních systémů liší. U hmyzích buněk jsou sekvence zpravidla kratší, než je tomu u savčích buněk. Rozdíly jsou ale také mezi jednotlivými druhy buněk savčích.

6.4.4. Proteolýza

Proteázy hrají důležitou roli při úpravách rekombinantních proteinů, při jejich maturaci, modifikaci a taky při izolaci. Proteázy savčích buněk se podílejí na sekreci rekombinantních proteinů do kultivačního média. Dochází-li k sekreci kotranslačně, pak vnitrobuněčný proteolytický systém nebezpečný není.

Proteázy se ale vylíjí z buněk, když tyto zahynou nebo jsou poškozeny a lyzují. Je proto nezbytné zajistit, aby k poškození buněk během purifikace nedocházelo. Dalším zdrojem proteolýzy jsou složky média, ve kterém buňky rostou. Sérum obsahuje řadu proteáz a zymogenů, které mohou ovlivnit secernované rekombinantní proteiny. Činnost proteáz lze omezit působením inhibitorů. Je vhodné kontrolovat integritu rekombinantního proteinu v každém kroku purifikace.

Proteiny jsou mnohem citlivější k působení proteáz za zvýšené teploty. Purifikace se proto zpravidla provádějí při 4°C. Protože řada proteáz využívá jako kofaktor Ca^{2+} , přidávají se do purifikačních složek chelatační činidla, která Ca^{2+} vychytávají.

6.4.5. Tvorba inkluzních tělísek

V cytoplasmě bakterií vytvářejí proteiny husté, zrnité inkluze, tzv. inkluzní tělíska. Inkluzní tělíska se často tvoří v bakteriálních buňkách, které exprimují velká množství rekombinantního proteinu. V elektronovém mikroskopu lze inkluzní tělíska pozorovat jako velké husté útvary často přes celý průměr buněk. Inkluzní tělíska jsou amorfní **proteinové agregáty** držené pohromadě kovalentními i nekovalentními vazbami. Množství proteinů uložených v inkluzních tělískách nelze změřit přímo, takže není možno ani přesně změřit množství „vytěženého“ proteinu. Inkluzní tělíska jsou nerozpustné komplexy, což může při velkoobjemových výrobcích být fatální.

Existují ale postupy, kterými je možno z inkluzních tělísek získat plně funkční struktury proteinů. Nejprve je nutné rozbít buňky a inkluzní tělíska uvolnit. Poté následuje rozpuštění inkluzí, což je ale většinou spojeno s velkým navýšením objemu izolátu. Zpravidla se inkluzní tělíska rozpouštějí v denaturačních činidlech, např. SDS, močovíně nebo guanidinium chloridu. Bakteriální expresní systémy zpravidla nedokáží vytvářet disulfidické můstky, opětovné sbalení proteinu (tzv. re-folding) je tedy třeba provádět v oxidačním prostředí. Proces se označuje taky jako renaturace proteinu. Ovšem čím více disulfidických můstků nativní protein obsahuje, tím nižší je výtěžek správně sbalených molekul. Poté, co je protein solubilizován, používá se k další purifikaci konvenčních chromatografických postupů.

Ačkoli se agregované struktury jeví na první pohled jako nežádoucí, mohou být výhodné v takových případech, kdy je protein možno rozbalit a zase správně sbalit. Inkluzní tělíska je totiž možné snadno izolovat v čistotě přesahující 50%. Agregované struktury jsou taky odolné k proteázám.

6.5. Shrnutí kapitoly

Pro dosažení optimálních růstových podmínek v bioreaktoru je třeba zabezpečit vhodné složení živného média. Média používaná ke kultivaci buněk jsou komplexní a sestávají ze směsi různých složek, z nichž většina je dostupná jako komerční preparáty, které stačí jen rozpustit ve vodě a sterilizovat. V případě savčích buněk tvoří významnou složku média fetální telecí sérum, jehož složení bývá velmi proměnlivé. Proto byla vyvinuta tzv. sérum-free média, která sérum neobsahují. Obecným trendem je vytvářet média taková, která složité nedefinované složky neobsahují.

Kvalita se obvykle vyjadřuje v termínech čistoty a reprodukovatelnosti. Čistota farmaceutických přípravků je většinou vyšší než 99%, pokud jsou podávány parenterálně. Ke kontaminujícím složkám patří viry, bakterie, buněčná DNA nebo proteiny.

Procesy purifikace biotechnologických procesů jsou zpravidla finančně náročnější než procesy samotné výroby rekombinantního produkčního organismu. Vývoj procesu purifikace má dvě stádia – formulace (design) a zvýšení objemu (scale-up). Vytvoření správného purifikačního postupu je usnadněno, když se podaří definovat hlavní kontaminující složky a popsat fyzikální charakteristiky produktu. Jakákoli substance, která se aplikuje injekčně, musí být sterilní a prostá pyrogenních látek, respektive pyrogenní látky musí být přítomny v podlimitních množstvích, která jsou definována v lékopisu podle typu produktu.

K separaci proteinů na základě různých fyzikálně-chemických kritérií (velikost, náboj, hydrofobicita, rozpustnost) existuje celá řada dostupných metod. Většina purifikačních procesů počítá s alespoň jedním krokem, ve kterém jsou odstraněny celé nebo lyzované buňky, nejčastěji se používá centrifugace nebo filtrace.

Závislosti rozpustnosti proteinů na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí se využívá při jejich precipitaci. Proteiny lze precipitovat také pomocí organických rozpouštědel mísitelných s vodou. Precipitace je jednoduchá a relativně ekonomická technika, kterou lze snadno převádět z malých do velkých objemů. Používají se často k izolaci proteinů ze supernatantu buněčných kultur.

Chromatografické metody (adsorpční, gelová, ionexová, afinitní, hydrofobní) využívají té skutečnosti, že biologicky aktivní látky tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin se speciálními funkcemi, které jsou v podmínkách *in vivo* řízeny malými změnami v jejich okolí. Proto mohou mít změny pH, iontové síly, koncentrace kovových iontů, kofaktorů apod. za následek velké ovlivnění izolovaných molekul. Při chromatografii jsou molekuly separovány na základě rozdílů v distribuci mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. V současnosti jsou téměř všechny stacionární fáze umístěny v koloně a mobilní fáze procházejí skrz pomocí tlaku. Procesy purifikace využívají převážně dva až tři chromatografické postupy. Obecně platí, že při volbě purifikačního schématu bychom měli dbát na to, aby se neopakovaly metody založené na stejném dělicím principu.

Při purifikaci proteinů se setkává biotechnolog s komplikujícími prvky jako je heterogenita N- a C-konců, změna konformace, proteolýza, deaminace, hydroxylace nebo oxidace sulfhydrylových skupin. Specifickou pozornost je třeba věnovat glykosylovaným proteinům jejichž oligosacharidová složka je u různých expresních systémů různá.

V cytoplasmě bakterií vytvářejí proteiny inkluzní tělíska. Ta se často tvoří také v bakteriálních buňkách, které exprimují velká množství rekombinantního proteinu. Ačkoli se inkluzní tělíska jeví jako nežádoucí, mohou být výhodné tehdy, když je protein možno rozbalit a zase správně sbalit. Inkluzní tělíska je možné snadno izolovat v čistotě přesahující 50% a jsou taky odolná k proteázám.

6.6. Příklady a úlohy k zamyšlení

1) Z uvedeného seznamu dekontaminačních metod vyberte ty, které jsou vhodné k odstranění virů, bakterií, kontaminující DNA nebo proteinů:

- Filtrace přes 0,2 μm filtr
- Nanofiltrace
- Chromatografie

2) Přiřaďte vhodný způsob sterilizace příslušného materiálu

Metoda	Materiál
sterilizace horkým vzduchem při 180°C	Živná média
autoklávování	Antibiotika
filtrace	Skleněné nástroje

3) Jestliže v jednom mililitru lidské krve je obsaženo přibližně 4 až 10 milionů leukocytů, kolik μg DNA je možno maximálně izolovat z 200 μl plné krve? Přitom jeden leukocyt obsahuje DNA o celkové délce 2,9 miliardy nukleotidů, a že průměrná molekulová hmotnost jednoho nukleotidu je 330.

4) Jaké množství vodného roztoku gentamycinu o zásobní koncentraci 50mg/ml použijete k dekontaminaci 1 000 μl buněčné kultury od mykoplasmat, jestliže pracovní koncentrace antibiotika má být 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$?

5) Jaké množství buněčné kultury (v litrech) potřebujete k získání 5g rekombinantního proteinu, jestliže jste dokázali z 500 ml kultury izolovat 100 mg tohoto proteinu?

6) Při jakých otáčkách budete separovat bakteriální buňky od živného média, jestliže máte provádět centrifugaci při 1 000g po dobu 10 minut a máte k dispozici centrifugu s rotorem o poloměru 10cm?

7) Jestliže se kvasinky usazují v centrifuze o poloměru 10 cm při 2 500 rpm, jaká je hodnota relativního odstředivého zrychlení, která na ně působí?