

1/1 Tápanyagok mikroba fermentációknál

Az ipari tömegtermelésben: gazdasági szempontok: olcsó legyen
→ melléktermékek, hulladékok

C- forrás: keményítő, cukrok (melasz, tejcukor, szulfitszennylúg),
néha kőolaj, alkoholok, szerves savak

N-forrás: szerves: műtrágya minőségű sók (ammónium-nitrát,
karbamid, stb.)

szerves: (olajmentesített) szójadara, élesztőkivonat,
húskivonat, kazein...

A gyógyszeriparban ez nem megengedett, a nehezen reprodukálható, szennyezett anyagok helyett tiszta vegyszerekből
összemért tápanyagokat használnak (chemically defined, CD).



Példa: rekombináns *E.coli* tápanyagai

Oltóanyag (inokulum) tápanyag **Termelő tápanyag** **Rátáplált (feed) tápanyag**

Glicerín 99,5%

KH_2PO_4

K_2HPO_4

$(NH_4)_2SO_4$

$Na_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Kanamicin szulfát

Tiamin HCl

Boric acid

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

$MnSO_4 \cdot H_2O$

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

Glicerín 99,5%

KH_2PO_4

K_2HPO_4

$(NH_4)_2SO_4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Kanamicin szulfát

Tiamin HCl

Boric acid

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

$MnSO_4 \cdot H_2O$

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

PPG2000

Glicerín 99,5%

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

EDTA

Kanamicin szulfát

Boric acid

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

$MnSO_4 \cdot H_2O$

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$



Példa: rekombináns *E.coli* tápanyaga

A coli esetében a glükóz szénforrás lenne kézenfekvő, de ebből
jelentős mennyiségű ecetsavat termel. Ezért alkalmaztak glicerín
szénforrást.



Indukció

Az *E. coli*-val történő fehérje termelést rendszerint indukálható promotérral valósítják meg. Leggyakrabban az IPTG-vel indukálható lac promotert építik be.

Some inducible promoters used for separation of the production of recombinant proteins into a cell growth phase and a production phase.

Host	Promoter	Induction method
<i>E. coli</i>	P _R and P _L	Temp. shift 30 to 40°C
	lac	IPTG addition
	pho	Phosphate starvation
	trp	trp starvation or addition of IAA
	tac	IPTG addition
<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	Galactose addition
	PHOS	Phosphate starvation

IPTG: isopropyl β-thio-D galactoside IAA: β-idoöllyl acrylic acid

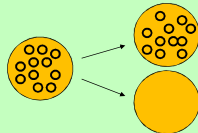


Indukció

Az idegen fehérje termelése megterhelő a gazdaszervezet metabolizmusa számára.

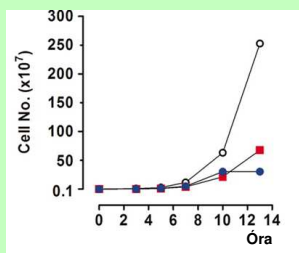
Célszerű a szaporodás alatt szüneteltetni a rekombináns fehérje termelését, majd bekapcsolni azt. Így kisebb a megterhelés és a gén esetleges „ elvesztése ” kisebb kárt okoz. Előfordulhat:

- Strukturális változás (a plazmid elpusztul, vagy nem termel fehérjét)
- Szegregáció (plazmidmentes leánysejtek jelennek meg az osztódás során)



Plazmid instabilitás

Ezek a plazmidmentes sejtek néhány generáció alatt túlnövik (outnumber) a plazmid-tartalmú sejteket, mert gyorsabban nőnek. Ha később indítjuk meg a termelést, akkor ez nem fordulhat elő.



Fermentációs paraméterek: pH

Az optimum a baktériumoknál, így az *E. coli*-nál közel semleges, 6,5-7,5 között van. Az anyagcsere savakat termel, emiatt lúg adagolással tartják a kívánt értéket.

Az élesztők fermentációs optimuma rendszerint savasabb tartományban van, de pH=5 alatti érték nem jellemző.

Az optimalásnál célszerű megvizsgálni a változó pH profil lehetőségét is.



Fermentációs paraméterek: oxigén

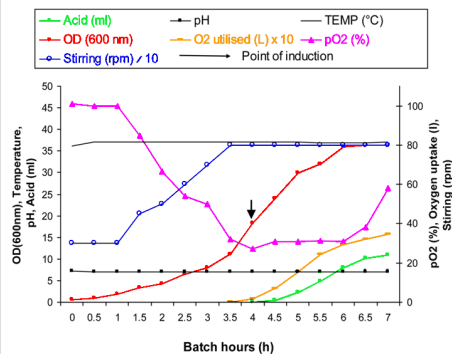
Mind a *coli*, mind az élesztő fakultatív anaerob mikroorganizmus, de a rekombináns fehérje termelésnél teljesen aerob anyagcsere törekednek. Ehhez intenzív levegőztetésre és keverésre van szükség.

Az oldott oxigénszintet elektróddal folyamatosan mérik, és szabályozzák, nem engedik egy megállapított érték alá csökkenni.

Ezzel összeállt egy kép a bakteriális fermentációról:

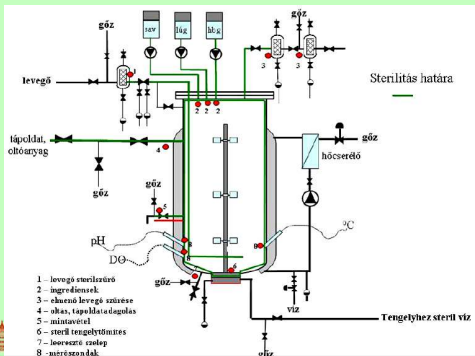


Fermentation process parameters



E. coli fermentáció lefolyása egy IPTG-indukálható rekombináns fehérje termelő technológiában

1/3 Ipari fermentor jellemző szerelvényei



1/4 Fermentációs technikák

Az indukció beépítése a technológiába kétszakaszos fermentációt (sejtszaporítás + termékképzés) tételez fel, ezzel kizárja a félfolytonos és folytonos fermentációs technika alkalmazását.

Ennek megfelelően szakaszos (batch), illetve rátáplálásos (fed batch) fermentációval termelnek. A rátáplálás (feed) összetétele más, mint a szaporító tápoldaté.

A rátáplálással a fermentációs idő meghosszabbítható, nagyobb mennyiségű és koncentrációjú termék keletkezik.

2. Állati sejtek tenyésztése

1. A tápoldat összetétele
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek (felületi és szubmerz)
Egyszer használatos eszközök
4. Fermentációs technikák

2/1 Az állati sejtenyésztés tápoldatai

Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet: vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)

Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), + glutaminsav

15 - 20 féle aminosav, vitaminok, koenzimek, lipidek, ionok (pontos összetétel, pH, ozmózis nyomás)

A sejtek érzékenyek a szervetlen ionok pontos koncentrációjára, pl az üveg edényekből kioldódó anyagokra, ezért vagy műanyag edényeket, vagy víztöltéssel többször autoklávozott üveget használnak tenyésztésükhöz.

A víznek is különösen tisztának kell lennie (ionmentes, szervesanyag-mentes, endotoxin-mentes, pirogén-mentes) és ezt is műanyag edényben tárolják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Component	D5546 [1+] g/L	D5648 g/L		D5546 [1+] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Inosinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	o-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	p-Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11	—
L-Serine	0.042	0.042	ADD		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is → ezt újszülött állatok (borjú) vérérszérérumával biztosítják (5-15%). Ez szörnyű drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekednek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

A szérumentes, kémiai komponensekből összemért tápoldatok olcsóbbak, állandó az összetételük, és reprodukálhatóbbak az eredmények, kisebb a fertőzés kockázata, könnyebb a fehérje termékek izolálása.

Pl. próbálkoznak a szérum részbeni vagy teljes pótlására hidrofíll polimerekkel pl. dextránnal.

Léteznek olyan sejtvonalak, amelyek a szérumból egyedül az inzulin jelenlétét igénylik (de ez lehet rekombináns inzulin is).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A szérum aktív komponensei

Important Components of Serum and Their Probable Role in Cell Culture	
Component	Probable function
Proteins	
Albumin	Osmoticum and buffer Lipid, hormone, mineral carrier
Fetuin	Cell attachment
Fibronectin	Cell attachment
α_2 -Macroglobulin	Trypsin inhibitor
Transferrin	Binds iron
Polypeptides	
Endothelial growth factor (ECGF)	Mitogen*
Epidermal growth factor (EGF)	Mitogen
Fibroblast growth factor (FGF)	Mitogen
Insulin-like growth factors (IGFI and IGFI)	Mitogen
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Mitogen and major growth factor
Hormones	
Hydrocortisone	Promotes attachment and proliferation
Insulin	Promotes uptake of glucose and amino acids
Growth hormones	Mitogen—present in fetal sera
Metabolites and nutrients	
Amino acids	Cell proliferation
Glucose	Cell proliferation
Keto-acids (e.g., pyruvate)	Cell proliferation
Lipids (e.g., cholesterol)	Membrane synthesis
Minerals	
Iron, copper, zinc, and selenium	Enzymes and other constituents
Inhibitors	
γ globulin	
Bacterial toxins from prior contaminants	
Chalones (tissue-specific inhibitors)	

2/2 Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

- nagyon kíméletes keverés,
- sok sejtvonal érzékeny a buborékokra

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtérfogatot átöblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

A pH=7,4, az ozmolaritás 300-400 milliozmól, azonos a vérrel.

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
23

2/3 Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
24

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

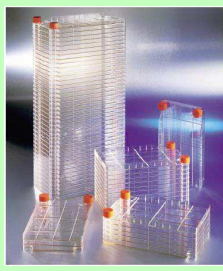


Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



A felület növelése

Multitray



roller bottles



Forgó palackok/roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 28

Mikrokarires tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 29

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú keverés
Mikrokarires és szuszpenziós tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 30

Minibioreaktorok mikroba és emlős sejtekhez



12 ml („tic-tac doboz”)



200 ml

Egyedi hőmérséklet-, pH-, DO-, pCO₂-, keverés-szabályozással, automatikus mintavételezéssel.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Bioreaktorok emlős sejtekhez



Térfogat: 6x2 liter, közös szabályozó egység



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierekkel felületi tenyészetekhez is használható.

Max. 10.000 liter (pl: interferon, tPA)

Energiabevitel kisebb, kevesebb O₂ kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket
Diffúziós levegőztetés: szilikon csövek falán át, nincs károsodás
Keverő: propeller, hajócsavar, lekerékített formák, 25-250rpm

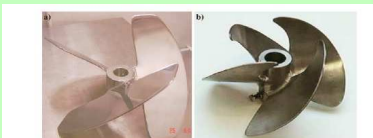


Fig. 13 (a) An ABC 'cylinder cut' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

Léptéknövelés 1000 literre



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Léptéknövelés 10 000 literre



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok

Single-Use Bioreactors

Advantages:

- No CIP/SIP required
- Quick turnaround time
- Lower fixed costs
- Increased flexibility
- Reduced cleaning validation
- Faster procurement & implementation



Courtesy of Wave Biotech, LLC



Courtesy of HyClone



Courtesy of Xcellerex, Inc.



Disadvantages:

- Scaling issues
- Heavy reliance on suppliers for consumables
- **Most systems still require the use of traditional (non-disposable) probes**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok



sartorius stedim
biotech

CultiBag STR 200L Bag Holder: Easy and Efficient


Holder Design:

- Disconnectable from control tower to allow connection spare bagholder skid
- ⇒ no time loss due to bag preparation, harvesting, further process steps
- ⇒ very low operational downtime of equipment
- Opening for harvesting port at lowest point
- Double door for easy installation bag

Egyszer használatos bioreaktorok

Rozsdamentes acél héj (állandó) (1000 literig)

inimation Thermo Fisher_NEV



Egyszer-használatos bioreaktor zsák

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A keverőszár behelyezése




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok

Line	Description
1.4	Multi port fitment - Can be used for: Supplement addition, Gas exhaust/Foam trap assembly inlet, pH regulation inlet, Cell cultura Media or Cell addition, ...
5.8	Multi port fitment - Can be used for: Component addition inlet, Cell cultura Media or Cell addition, Gas inlet, ...
9	Disposable bioreactor bag (ADCF barrier film)
10	Sampling exit
11	Perfusion connection/Extra sampling connection
12	Connection for pH, T or DO probe with sterile Kleopak connector
13	Sensing probe assembly to be connected to (12) by Kleopak counterpart
14	Easy drain connector
15	Micro or macro-sparging unit
16	Paddle mixing stick surrounded by sleeve
17	Gas inlet through sparging unit



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2/4 Tenyésztési módszerek összehasonlítása

A szuszpenziós vagy mikrokarrieres állati sejt tenyészeteket többféle technikával is lehet szaporítani:

Batch Fed-Batch Continuous Perfusion




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Tenyésztési módszerek összehasonlítása

Szakaszos (batch): kis produktivitás, a sejtkoncentráció $1-2 \times 10^6$ sejt/ml, tenyésztés 3-5 nap

Rátáplálásos (fed-batch): +glükóz +aminosavak, 1-3 hét, nagyobb a produktivitás, mint szakaszosban, de toxikus metabolitok felhalmozódása hat a termelésre és a termékminőségre.

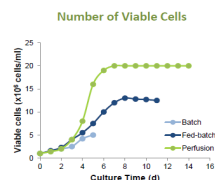
Folytonos (perfúziós): sejtkoncentráció $3-5 \times 10^7$ sejt/ml, 6-8 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a. Jó a szubsztrát ellátottság, és jó a toxikus metabolitok eltávolítása.



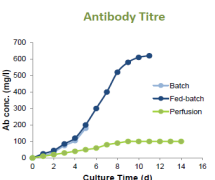
43

Tenyésztési módszerek összehasonlítása

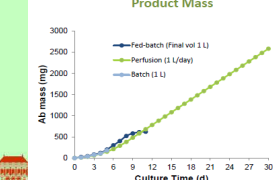
Number of Viable Cells




Antibody Titre



Product Mass



Perfusion : 2600 mg
 Fed-Batch : 620 mg
 Batch : 180 mg



44

Titernövelés: csökkenő költségek

Titre Improvements

- Important cost benefits as titres go beyond 1g/L
- These diminish as we go beyond 5g/L

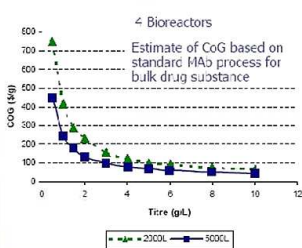
Beyond 5g/L

- Downstream cost dominates
- In this example the plateau is just under \$100/g


Challenge in DSP

- Bioreactors decrease in size?
- Cope with increased titres
- Need to drive out costs
- Implications for facility design

4 Bioreactors



Results from Biopharm Services Generic MAb cost model
 Bulk API Direct manufacturing costs



45

Sejtviszatarthásos (perfúziós) technológiák

Alternatív megoldás: forgó, henger alakú rozsdamentes fémsziita.

Résméret: 20 µm Sejtviszatarthás: 8 µm
 Élő sejt visszatarthás: 97-100%

Méreték: 50 x 5 cm, folyadék réteg: 1 cm
 Fordulatszám: ~1000 rpm
 Függhőleges áramlás: 1,5 – 3 l/perc
 Szűrés sebesség: 12 l/óra
 Tisztítás szükséges: 2-10 naponta



 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Példa: rekombináns eritropoietin termelése

Upstream:
 A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegben +10% szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.

4 nap után az első tápoldat csere: a termelő közeg csak 1,5% szérumot tartalmaz.
 3 naponként lefejtés, feltöltés



EPO fermentációs üzem

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék 50
