

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ИЗВОРИ ЗА ПРОИЗВОДЊУ БИОФАРМАЦЕУТИКА. БИОСИНТЕЗА БИОФАРМАЦЕУТИКА (*UPSTREAM* ПРОЦЕСИ)

2. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Вектори

- Будући да је *E. coli* главни експресиони систем који се користи у фармацеутској биотехнологији, најчешће се користе вектора који могу преживети у *E. coli* или сличним бактеријама (плазмиди, вируси).
- Већина вектора има *origin*, гене за резистенцију на антибиотике или неке друге гене који представљају маркере за селекцију, промотерски регион, полилинкер, терминаторе и место за везивање прајмера. Неки вектори могу имати и место за везивање рибозома, тако да ће се свака инсертована кодирајућа секвенца експримирати као протеин.

Вектори

- **Origin** - гени одговорни за започињање репликације молекула ДНК током ћелијског циклуса и они омогућавају да свака ћерка ћелија добије једну или више копија плазмида. Овај регион на плазмиду одређује колико често се ДНК полимераза везује и индукује репликацију.
- **Ген за резистенцију** на антибиотике представља специфични маркер за селекцију бактерија које садрже плазмид и омогућава да се одвоје од бактерија без плазмида. Осим гена за резистенцију на антибиотике у векору могу бити присутни и други гени за селекцију који плазмиду дају одређену особину на основу које се бактерије које садрже тај плазмид могу одвојити од бактерија које га не садрже.

Вектори

- **Промотер** или промотерски регион се налази пре места на ком је инсертован ген од интереса и има улогу да усмерава РНК полимеразу да направи копије иРНК гена од интереса.
- **Полилинкер** или место вишеструког клонирања, (енгл. *Multiple cloning site*) – представља место на које могу деловати различити рестрикциони ензими. У полилинкер се инкорпорира ген од интереса.
- **Место за везивање прајмера** – ДНК секвенца која је комплементарна секвенци PCR прајмера за амплификацију (умножавање) инсерта. Место за везивање прајмера је такође корисно за традиционално секвенцирање по Сангеру.
- **Терминаторски регион** или терминатор има улогу да дефинише крај транскрипције и обезбеђује да РНК полимеразе транскрибује само ген од интереса.

Вектори

- Најбитније особине које сваки вектор треба да поседује су:
 1. да буде довољно мале величине и да буде погодан за манипулацију;
 2. способност једноставног преноса из једног у други организам;
 3. способност вишеструког умножавања, што помаже у добијању велике количине ДНК - број копија плазмида варира. Наиме, неки плазмиди постоје у само једној или неколико копија у ћелијама домаћина, док други постоје у више копија. Плазмиди који постоје у већем броју копија су кориснији јер је количина плазмидске ДНК већа, што олакшава њихову изолацију и пречишћавање;
 4. једноставна изолација из организма домаћина.

Вектори

Поред ових основних особина постоје и додатне особине које би било пожељно да плазмид поседује:

5. једноставна детекција и селекција - искоришћено је то што они имају гене за резистенцију на антибиотике који су одговорни за отпорност бактерије на одређене антибиотике. Због тога се за утврђивање присуства овог вектора у ћелијама домаћина у медијум додаје одговарајући антибиотик. Када се изложе антибиотику, преживљавају само ћелије које поседују плазмид са геном за резистенцију на антибиотик, док остале ћелије умиру. Са друге стране, када се као вектор користи плазмид квасца (2 μ), за утврђивање његовог присуства у ћелијама домаћина користи се медијум без леуцина. Наиме, ови плазмиди носе гене за синтезу есенцијалних аминокиселина, попут леуцина, који омогућавају раст ћелија и у медијумима којима недостаје леуцин;

Вектори

6. постојање груписаних рестрикционих места (полилинкер) која омогућавају инсертовање клониране ДНК. Већина вектора има неколико места за деловање рестрикционих ензима у оквиру полилинкера. Вектор се отвара на једном месту у полилинкеру, без ометања гена за репликацију вектора. Фрагменти доворске ДНК се обрађују истим ензимима као и полилинкер;
7. једноставно утврђивање присуства инсертоване ДНК одговарајућом методом. Како би се идентификовала ћелија која је прихватила вектор и трансформисала се користе се генски маркери. Такође, код одређених вектора може се проверити и да ли садрже доворску ДНК (уколико она кодира настанак ензима или протеина који се лако детектују). Међутим, у највећем броју случајева неопходно је директно утврдити присуство гена доворске ДНК.

Вектори

7. Један од начина је коришћење плазмида са два гена за резистенцију на антибиотике. Један ген за резистенцију на антибиотике служи да селекује ћелије домаћина које садрже плазмид, док други служи за инсертовање и детектовање доворске ДНК. Место за рестрикциони ензим, који ће отворити плазмид и омогућити инсертовање доворске ДНК се налази у оквиру гена за резистенцију на други антибиотик. Када се фрагмент ДНК инсертује на ово место, ген за резистенцију на други антибиотик се прекида. Уколико ћелија домаћина садржи само плазмид у који се није инсертовала доворска ДНК ћелија је резистентна на оба антибиотика, док уколико садржи плазмид са инсертованом доворском ДНК она ће бити резистентна само на први антибиотик.

Изолација векторске ДНК

- Поступак за изолацију векторске ДНК зависи од природе вектора.
- Један од протокола подразумева промену рН вредности, јер се при специфични алкалним рН вредностима бактеријска геномска ДНК денатурише и таложи накнадном неутрализацијом, док векторска, тј. плазмидска ДНК остаје у раствору.

Врсте вектора

- Бактеријски плазмиди
- Шатл вектори
- Вируси
- Козмиди
- Вештачки хромозоми
 - Бактеријски вештачки хромозоми
 - Вештачки хромозоми квасца
 - Вештачки хромозоми P1 бактериофага

Бактеријски плазмиди

- Плазмиди су екстрахромозомски кратки делови ДНК, кружног облика, састављени од 5 - 350 kb (најчешће 10 kb, док се Р1 плазмид састоји од 100 kb), природно су присутни у великом броју бактерија.
- У зависности од ћелијске врсте из које потичу, плазмиди садрже различит број гена, од којих један или више имају улогу у резистенцији бактерије на одређен(е) антибиотик(е). Бактеријска ћелија у просеку садржи око 10 копија плаزمида.
- Плазмид који се најчешће користи за клонирање у комбинацији са *E. coli* је *pUC18*.

Шатл вектори

- Шатл вектори су пореклом из квасца и засновани су на 2 μ плазмиду. 2 μ плазмид модификован је на разне начине како би се користио као вектор за клонирање. Шатл вектори могу преживети у више различитих домаћина (нпр. у бактерији *E. coli* и квасцу).
- Ови вектори садрже *origin* за два организма, као и све остале секвенце неопходне за преживљавање у било ком од ова два организма. То су ген за резистенцију на антибиотике, полилинкер и додатне компоненте. Једна од додатних компоненти је секвенца за центромеру која омогућава тачну поделу плаزمиде у квасцу. Наиме, када се ћелија квасца подели, дуплирани хромозоми се растављају микротубулама причвршћеним за њихове центромере, тако да свака ћерка ћелија добија пун сет хромозома. Да би се шатл вектори правилно одвојили приликом деобе ћелије, они морају да садрже управо ДНК секвенцу за центромеру.

Шатл вектори

- Такође, шатл вектори садрже и ген за одабир квасаца који садрже вектор. У истраживањима се често користи сој квасца који садржи дефектан ген за стварање есенцијалног органског једињења, као што је леуцин, док шатл вектор садржи исправан ген за синтезу леуцина. Квасац који не поседује вектор неће преживети због недостатка есенцијалног једињења леуцина, док ће преживети онај квасац који садржи шатл вектор.
- На овом приступу се заснива откривање присуства плазмида у квасцу, јер метода примене антибиотика у овом случају није погодна, будући да су ћелије квасца еукариотске и имају дебели ћелијски зид, па већина антибиотика не делује на њих.

Вириси - Ламбда бактериофаг

- Ламбда бактериофаг је вирус који има способност инфицирања бактерија као што је *E. coli*. Они имају линеарне геноме са два кохезивна краја - *cot* секвенце. То су лепљиви крајеви који су састављени од 12 база. Док су унутар вируса, кохезивни крајеви (*cot* секвенце) су обложени протеинима како би се спречило њихово умножавање. Након везивања ламбда бактериофага за *E. coli*, линеарна ДНК бактериофага доспева у *E. coli*, протеини који штите кохезивне крајеве се губе, а геном добија циркуларни (репликативни) облик помоћу ДНК лигазе.
- Ламбда бактериофаг се често користи као вектор за клонирање. Централни део генома ламбда вектора није од суштинске важности за репликацију вируса у *E. coli*, па се он може исећи помоћу одговарајућег рестрикционог ензима, а на његово место се могу инсертовати гени донорске ДНК величине до 20 kb.

Вириси - Аденовируси и Ретровириси

- Аденовируси су хумани дволанчани ДНК вируси и идеални су вектори за трансфер гена код пацијената на генској терапији. ДНК аденовируса се не инкорпорира у хромозоме домаћина, тако да се не репликује у хромозому домаћина, али се спроводи експресија њихових гена помоћу рибозома домаћина. За потребе генетичког инжењеринга користе се аденовируси који су тако генетички модификовани да су изгубили способност репликације и самим тип и способност да индукују смрт ћелије домаћина услед инфекције аденовирусом.
- Ретровириси су хумани вируси, чији је генетички материјал - дволанчани ланац РНК обмотан липидном мембраном. Приликом инфекције, РНК се копира до ДНК која се потом инкорпорира у хромозоме, тако да се страни гени који се преносе ретровирусом репликују и преносе у сваку ћерку ћелију.

Козмиди

- Козмиди су инжењерисани вектори који представљају хибриде плазида и ламбда вектора. У њих се могу инкорпорирати инсерти ДНК већи него у плазмиде или ламбда векторе, јер могу да садрже делове ДНК дужине до 45 kb. Козмиди су модификовани ламбда вектори код којих су готово све секвенце између *cot* крајева уклоњене и замењене простором за ДНК инсерт.
- ДНК инсерт се везује између два *cot* места помоћу рестрикционих ензима и лигазе. Ова конструкција је упакована у ламбда честицу коју производи помоћни фаг, а затим се инсертују у *E. coli*.

Вештачки хромозоми

- У вештачке хромозоме могу да се инсертују највеће ДНК секвенце и због тога су погодни за инсертовање еукаритоских гена. У њих се убрајају:
 - вештачки хромозоми квасца (енгл. *Yeast Artificial Chromosomes* - YAC),
 - бактеријски вештачки хромозоми (енгл. *Bacteria Artificial Chromosomes* - BAC) и
 - вештачки хромозом P1 бактериофага (енгл. *P1 bacteriophage Artificial Chromosomes* - PAC).

Бактеријски вештачки хромозоми

- Бактеријски вештачки хромозоми (BAC) су вектори засновани на F-фактору (енгл. *fertility factor*) плазмида *E. coli* и могу носити много веће инсерте ДНК. BAC могу да циркулишу и да се узгајају у бактеријама, и имају *origin* пореклом из бактерија и гене за резистенцију на антибиотике. Они могу носити инсерте од 300 kb или веће, а да би се ови велики конструкти унели у ћелије *E. coli*, неопходна је електропорација.

Вештачки хромозоми квасца

- Вештачки хромозоми квасца (YAC) су вектори засновани на плазмидима *Saccharomyces cerevisiae* који имају способност самосталне репликације. YAC има два облика, кружни облик за раст у бактеријама и линеарни облик за раст у квасцу. Кружни облик се понаша као и било који други плазмид у бактеријама јер има *origin* пореклом из бактерија и ген за резистенцију на антибиотике.
- Да би се YAC користио у квасцу, кружни облик се мора изоловати и превести у линеаран, тако да се секвенце теломера квасца налазе на сваком крају. У квасцу се YAC понаша попут хромозома квасца и након деобе доспева у ћерке ћелије. Ови вектори могу носити највеће инсерте од свих, величине до 2000 kb и у великој мери се користе за клонирање великих гена, као што су хумани гени.

Вештачки хромозом P1 бактериофага

- Вештачки хромозом P1 бактериофага (енгл. P1 *bacteriophage Artificial Chromosomes* - PAC).
- Овај вектор за клонирање је изведен из P1 бактериофага и користи се за трансфер инсерта до 150 kb.
- Баш као и ламбда вектори, ови вектори захтевају *in vitro* паковање.
- Вештачки хромозоми P1 бактериофага се користе као вектори код ћелија *E. coli*.

Експресиони системи за производњу биофармацеутика

- Као извори за производњу биофармацеутика могу се користити:
 - културе ћелија,
 - културе ткива или
 - живи организми.
- Унутар поменутих система се одвијају биотехнолошки процеси којима се омогућава синтеза биофармацеутика, стога они представљају својеврсне биокатализаторе, а пошто омогућавају експресију гена од интереса називамо их експресионим системима.
- Експресиони системи расту у одговарајућем хранљивом медијуму који користе као супстрат за производњу биофармацеутика током ферментације.

Експресиони системи за производњу биофармацеутика

- Настали биофармацеутик може бити саставни део ћелијске биомасе, производ метаболизма ћелије, ткива или органа, односно живог организма.
- Да би се произвео неки биофармацеутик неопходно је:
 - припремити одговарајући биокатализатор (експресиони систем),
 - припремити супстрат (хранљиви медијум),
 - да се биосинтетише сирови биофармацеутик,
 - издвајање и пречишћавање биофармацеутика,
 - обрадити отпадне воде и материјале.

Експресиони системи за производњу биофармацеутика

- За производњу биофармацеутика присутних на тржишту користи се генетички инжењеринг и одређени број рекомбинантних експресионих система, које по сложености можемо сврстати у прокариотске и еукариотске.
- У прокариотске се сврставају бактерије (нпр. *E. coli*) и актиномицете, док се у еукариотске сврставају гљиве (*Aspergilli*, *S. cerevisiae*), анималне ћелије, као што су ћелијске линије сисара, нпр. ћелије јајника кинеског хрчка (енгл. *Chinese Hamster Ovary* – CHO) и ћелије бубрега младунчета хрчка (енгл. *Baby Hamster Kidney* - BHK), трансгене животиње (овце и козе) и биљни експресиони системи. Међутим, од свих поменутих најчешће се користе *E. coli*, CHO и BHK ћелијске линије.

Прокариотске ћелије као експресиони системи – *E. coli*

- Многи микроорганизми представљају потенцијални систем за производњу терапијских протеина, јер се могу култивисати у великим количинама у кратком временском периоду и то прилично повољно.
- Најчешће коришћени прокариотски систем за добијање рекомбинантних протеина је *E. coli*. Први биофармацеутик добијен генетичким инжењерингом коришћењем *E. coli* био је рекомбинантни хумани инсулин познат као *Humulin*[®]. Један од примера новијих биофармацеутика који користи *E. coli* као експресиони систем је *Palifermin-Kerivance*[®] (рекомбинантни фактор раста кератиноцита), који се користи у терапији мукозитиса.

E. coli као експресиони систем

- Предности *E. coli* као експресионог система су:
 - добро позната молекуларна биологија (јер је *E. coli* дуго служила као модел за испитивање генетике прокариота);
 - висок ниво експресије хетерологих протеина (одређени промотери могу да омогуће експресију протеина и до 30%);
 - брз раст у једноставним и јефтиним медијумима (глукоза и соли);
 - доступан велики број сојева *E. coli*;
 - доступан велики број компатибилних вектора;
 - позната технологија ферментације;
 - једноставна генска манипулација.
- Све ове предности учиниле су *E. coli* примарним експресионим системом у производњи биофармацеутика.

E. coli као експресиони систем

- Недостаци *E. coli* као експресионог система:
 - интрацелуларно акумулирање хетерологих протеина и стварање инклузионих телаца;
 - немогућност посттранслационе модификације добијених протеина, нарочито гликозилације и стварања дисулфидних веза;
 - присуство липополисахарида (LPS) на површини (пирогене природе, обавезно се уклања из производа).

E. coli као експресиони систем

- Приликом производње протеина тежи се да експресиони систем секретује протеин у екстрацелуларни или барем периплазматски простор. Међутим, *E. coli* највећи проценат хомологих протеина синтетише интрацелуларно, око 20% излучује у периплазматски простор, а свега два протеина (колицин и хемолизин) секретује екстрацелуларно. Стога је изолација хетерологих протеина код *E. coli* комплексна, јер се углавном и они синтетишу интрацелуларно, па су у том случају потребни:
 - додатни кораци, нпр. хомогенизација ћелија праћена уклањањем ћелијских остатака центрифугирањем или филтрацијом;
 - интензивнији процеси хроматографских пречишћавања у циљу одвајања протеина од интереса, од неколико хиљада других хомологих протеина који постоје у *E. coli*.

E. coli као експресиони систем

- Такође, као последица велике експресије хетерологих протеина настају и инклузиона телашца која представљају нерастворне агрегате сачињене од делимично савијених хетерологих протеина и других ћелијских састојака. Због њихове густине, лако се уочавају под микроскопом као тамна поља.
- Наиме, када су хетерологи протеини присутни у високој концентрацији, они не могу да се адекватно савију, тј. да заузму адекватне конформације. Због тога су хидрофобни делови протеина делимично изложени спољашњој средини, што резултује настанком интермолекулских хидрофобних интеракција и формирањем агрегата, који нису биолошки активни.

E. coli као експресиони систем

- Са друге стране, формирање инклузионих телашаца у процесу производње има и предности, јер центрифугирањем једноставно долази до њиховог издвајања. Због велике густине инклузиона телашца се брже таложе од остатака ћелија.
- Центрифугирање на мањим брзинама, одмах након ћелијске хомогенизације, омогућава једноставно и селективно издвајање инклузионих телашаца. Након издвајања, инклузиона телашца се инкубирају са јаким денатуришућим агенсима (детерџенти, растварачи или уреа) и растварају.
- Средство за денатурацију се потом уклања дијализом или дијафилтрацијом, што олакшава поновно савијање протеина и формирање његових нативних, биолошки активних конформација.

E. coli као експресиони систем

- Стварање инклузионих телаца приликом експресије хетерологих протеина у *E. coli* може се спречити:
 - смањењем температуре током култивације бактерија (са 37 °C на 30 °C);
 - употребом тиоредоксина, хомологог протеина *E. coli* (користи се инжењерисани плазмидски вектор који омогућава експресију фузионисаног протеина, који уз жељени протеин садржи тиоредоксин везан кратком пептидном секвенцом. Ову пептидну секвенцу препознаје протеаза ентерокиназа и омогућава одвајање протеина од интереса);
 - коекспресија шаперона уз протеин од интереса (шаперони су протеини који стимулишу правилно и потпуно „савијање“ протеина у њихове биолошки активне, нативне тродимензионалне облике.

E. coli као експресиони систем

- Немогућност прокариота (*E. coli*) да спроведу посттранслационе модификације (нарочито гликозилацију) може ограничити њихову употребу као експресионог система за производњу појединих терапијских протеина. Код одређених терапијских протеина неопходно је присуство угљенохидратне компоненте како би испољили терапијски ефекат.
- Насупрот томе, одређени терапијски протеини не захтевају присуство угљенохидратне компоненте, иако је нативни облик тог протеина гликозилиран (нпр. негликозилирани IL-2 има исту биолошку активност као и нативни гликозилирани молекул. У таквим случајевима *E. coli* може да послужи као задовољавајући експресиони систем).

Еукариотске ћелије као експресиони системи

- Од нижих еукариотских ћелија као експресиони системи за производњу рекомбинантних протеина најчешће се користи квасац (*Saccharomyces cerevisiae*) и неке плесни (*Aspergillus nidulans* и *Trichoderma reesei*).
- Иако бактеријске ћелије успешно експримирају многе еукариотске протеине, у неким случајевима је боље да се еукариотски протеини синтетишу коришћењем еукариотских експресионих система.
- Када се као експресиони системи користе бактеријске ћелије унутар синтетисаних протеина се не граде дисулфидне везе, а често не долази ни до правилног савијања ових протеина.

Еукариотске ћелије као експресиони системи

- Још једна од предности експресије еукариотских протеина у еукариотским ћелијама је та што се избегава контаминација бактеријским компонентама (токсичне, пирогене и подстичу имунолошке реакције).
- Такође, неки еукариотски протеини су нестабилни или неактивни ако се стварају у бактеријским ћелијама. Ово се посебно односи на протеине којима је потребна посттранслациона модификација.
- За еукариотске експресионе системе се као вектори најчешће користе шатл вектори, јер су дизајнирани тако да омогуће премештање гена између различитих група организама. Такви вектори омогућавају да се генетички инжењеринг спроведе у бактеријама (*E. coli*), а да се потом експресија настави у другом организму.

Еукариотске ћелије као експресиони системи

- Након синтезе полипептидног ланца, протеини се могу модификовати на различите начине:
 - хемијским модификацијама, при чему у полипептидном ланцу настају нове аминокиселине;
 - стварањем дисулфидних веза између одређених цистеинских остатака (нпр. код инсулина);
 - додавањем функционалних група, ацетил, фосфатне и сулфатне групе или читавих ланаца масних киселина и угљенихидрата;
 - разлагањем прекурсорског протеина, како би се омогућила секреција, правилно савијање и/или активација протеина (може се догодити у неколико фаза, као у случају инсулина).

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

- Квасац *S. cerevisiae* је први еукариотски систем коришћен за производњу рекомбинантних протеина.
- *S. cerevisiae* се користи као експресиони систем из више разлога:
 - геном је секвенциран и многи гени су познати што олакшава генску манипулацију;
 - означен као GRAS-организам (енгл. „*Generally Regarded As Safe*“) јер се дуго користи у прехранбеној индустрији;
 - расте брзо у јефтином медијуму;
 - може се узгајати у великим биореакторима, али и у судовима малих запремина;
 - ћелијски зид их чини отпорним на физичко оштећење;
 - одговарајућа индустријска опрема/технологија је већ доступна;

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

- синтетише мали број хомологих протеина, што значајно олакшава пречишћавање рекомбинатних протеина;
- рекомбинантна ДНК (рДНК) се може инкорпорирати у ћелије квасца након хемијске или ензимске разградње ћелијског зида или електропорацијом;
- природни плазмид квасца (2 μ) доступан је као полазна тачка за развој вектора за клонирање;
- окарактерисани су разни промотери квасца који су погодни за подстицање експресије клонираних гена;
- иако је примитивни једноћелијски организам, квасац има способност извршавања многих посттранслационих модификација типичних за еукариотске ћелије, као што је додавање угљенохидратних ланаца (гликозилација).

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

- У квасцу се могу експримирати бројни протеини. Уз ген за протеин од интереса у векторској ДНК се налази и ген за сигнални пептид, који омогућава да се протеин излучује екстрацелуларно. Ова два гена се експримирају заједно при чему настаје протеин од интереса везан за сигнални протеин секвенцом *Lys-Arg*.
- Пептидаза из квасца препознаје секвенцу *Lys-Arg* и одваја сигнални пептид када протеин прође ћелијску мембрану. Због тога је неопходно поставити два кодона за *Lys-Arg* узводно од кодирајуће секвенце за рекомбинантни протеин, како би се обезбедило да конструисани протеин има исправну N-терминалну секвенцу.

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

- Вектори компатибилни са *S. cerevisiae* могу се класификовати у три главне класе:
 - Плазмидски вектори - они се најчешће користе и у њих се убрајају шатл вектори и 2 μ плазмид квасца;
 - Вектори који се интегришу у хромозоме квасца - овакав приступ повећава стабилност будући да се плазмиди могу изгубити, посебно у културама великих размера. Недостатак је што је присутна само једна копија клонираног гена.
 - Вештачки хромозоми квасца - користе се за клонирање и анализу великих региона еукариотских генома, али нису погодни за употребу као вектори за експресију.
- Коришћењем *S. cerevisiae* могу се произвести бројни терапијски протеини: инсулини, фактор коагулације XIIIa, неколико фактора раста и неколико вирусних протеина (HIV, хепатитис Б и Ц) за вакцине или дијагностичке препарате.

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

Недостаци употребе *S. cerevisiae* као експресионог система:

- иако су многи рекомбинантни протеини успешно синтетисани у квасцу, приноси су често ниски. У највећем броју случајева, експресија хетерологих протеина је мања од 5% у односу на укупну експресију ћелијских протеина, што је значајно ниже у односу на ниво експресије када се користи *E. coli*;
- плазмиди се губе током раста квасца у биореакторима;
- протеини који би требало да се експримирају екстрацелуларно често се задржавају у простору између мембране и зида, уместо да се секретују;

Saccharomyces cerevisiae као експресиони систем

- иако имају способност да спроведу гликозилацију хетерологих хуманих протеина, начин гликозилације није као код нативног гликопротеина. Гликозилација протеина је често прекомерна, па гликопротеин може имати превише угљенохидратних остатака који отежавају правилно функционисање. Сада постоје квасци који производе угљенохидратне структуре сличне хуманим, тако да је могуће превазићи поменуте недостатке.
- олигосахаридне компоненте гликопротеина које се стварају посредством квасница углавном су сачињене од манозе, па имају кратак полуживот када се парентерално примене код људи (неки од тих сахараида су имуногени код људи).

Ћелије сисара као експресиони системи

- Ћелије сисара се користе као експресиони системи само када је неопходно да синтетисани рекомбинантни протеин има идентичан састав и распоред аминокиселина, као и да је посттранслационо измењен као нативни протеин.
- Ензими неопходни за посттранслационе модификације су присутни у већем броју виших организама, тако да је врло ретко неопходно да се протеин експримира у његовом изворном организму, већ се могу користити експресиони системи који поседују сродне ензиме.
- Углавном се протеини производе у ћелијским културама, али је могуће и створити трансгене животиње које ће производити рекомбинантне протеине.

Ћелије сисара као експресиони системи

- За производњу највећег броја биофармацеутика који су гликозилирани користе се ови експресиони системи, од којих су најпопуларније CHO и BHK ћелијске линије.
- Међутим, ови експресиони системи имају и бројне недостатке:
 - захтевају посебне услове за раст (скупе хранљиве подлоге);
 - спорије расту;
 - ограничен век трајања (морталне);
 - подложнији су физичким оштећењима.

Ћелије сисара као експресиони системи

- Ове ћелије се, осим за добијање рекомбинантних протеина, користе и у производњи других биофармацеутика (моноклонских антитела добијених хибридома технологијом и вакцина).
- Бројна моноклонска антитела су добијена коришћењем СНО ћелија као експресионих система (адалимумаб, бевацизумаб, ритуксимаб), док су многи рекомбинантни протеини добијени употребом ВНК ћелија (рекомбинантни хумани фактори коагулације VIIa и VIII).
- Осим СНО и ВНК анималних ћелијских линија, као експресиони систем користе се и хумане ћелијске линије НЕК293 (хумане ембрионалне ћелије бубрега). Овај експресиони систем је послужио за производњу биофармацеутика дулаглутида (*Trulicity*[®]), агонисте рецептора за GLP-1 (енгл. *Glucagon-like peptide-1*).

Ћелије сисара као експресиони системи

- Када је потребно добити протеине кодиране анималним генима као експресиони системи користе се управо ћелије сисара. Различите културе ћелија сисара захтевају различите услове за успешно култивисање.
- Најпогоднији вектори за ове експресионе системе су шатл вектори који поседују:
 - *origin* за бактерије и ћелије сисара;
 - гене за резистенцију на антибиотике;
 - промотерске гене који најчешће потичу од вируса који имају способност да инфицирају анималне ћелије (енгл. *Simian virus 40*, SV40);
 - анималне гене у виду кДНК;
 - сигнал за полиаденилацију на 3' крају инсертованог гена;

Ћелије сисара као експресиони системи

- маркере који ће омогућити изолацију ћелија:
 - ген *npt* (NeoR), који кодира неомицин фосфотрансферазу, ензим који инхибира антибиотик генетецин. Овај маркер се користи за одабир анималних ћелија које садрже вектор. Наиме, додатком антибиотика генетецина у медијум у коме се налазе анималне ћелије преживеће само оне које садрже вектор са *npt* геном.
 - ген *DHFR* за дихидрофолат редуктазу, ензим потребан за синтезу есенцијалне фолне киселине. Еукариотске ћелије не поседују овај ген, већ само плазмид. Користе се ћелије сисара без *DHFR* гена и шатл вектор са *DHFR* геном. Додатком метотрексата у културу ћелија инхибира се дихидрофолат редуктаза и покреће већа експресија *DHFR* гена на вектору. Повећањем концентрације метотрексата повећава се и број копија вектора.

Трансгене животиње као експресиони системи

- Поједини протеини не могу да задрже биолошку активност уколико се синтетишу у прокариотским системима или културама анималних ћелија, у том случају се користе трансгене животиње.
- Најчешће коришћени сисари за ове сврхе су овце, козе и свиње. Животиње се генетски модификују тако да постају „живи биореактори“ који синтетишу протеин од интереса и секретују га у одређену телесну течност, најчешће млеко или урин, из којег се даље пречишћавањем изолује протеин од интереса.
- Производња протеина на овај начин је изузетно скупа, јер захтева мултидисциплинаран тимски рад ветеринара и фармацеута.

Трансгене животиње као експресиони системи

- Рекомбинантни хумани антитромбин III произведен у козјем млеку (*Atryn*[®]) био је први биофармацеутик добијен од трансгене животиње који је одобрен за медицинску употребу код људи 2006. године у земљама Европске уније, а потом и 2009. године у САД.
- У Европи је 2010. године, а затим и 2014. године у САД одобрен и рекомбинантни протеин произведен у млеку зечева – инхибитор C1-естеразе (*Ruconest*[®]), који се користи у терапији акутних епизода код адолесцената и одраслих пацијената са наследним ангиоедемом.

Трансгене биљке као експресиони системи

- Биљни експресиони системи за производњу рекомбинантних протеина појавили су се као прихватљива алтернатива конвенционалним експресионим системима, као што су кваснице, бактеријске и анималне ћелије.
- Од напретка биљног генетског инжењеринга осамдесетих година прошлог века биљке се користе за производњу биолошки активних протеина или биофармацеутика, и овај концепт се назива молекуларно узгајање биљака.
- Од тада се ова врста генетског инжењеринга суочила са неколико препрека, све док 2012. године није коначно одобрен први рекомбинантни производ заснован на биљном експресионом систему (шаргарепи) - талиглуцераза алфа (*Elelyso*®), за лечење Гошеове болести.

Трансгене биљке као експресиони системи

- Молекуларно узгајање биљака се сматра економичном технологијом која је изузетно напредовала протекле две деценије.
- Развој и унапређење система преносне експресије значајно су скратили време потребно за производњу протеина и значајно побољшали принос протеина у биљкама.
- Поједини биофармацеутици, укључујући рекомбинантне вакцине, моноклонска антитела и други комерцијално доступни протеини производе се у биљкама, од којих се бројни испитују у претклиничким и клиничким студијама.

Трансгене биљке као експресиони системи

- Предности биљних експресионих система су: разноврсност, већа стабилност рекомбинантних протеина, исплативост, безбедност (због недостатка штетних супстанци у њима), као и способност производње протеина са жељеним посттранслационим модификацијама.
- Међутим, биљни експресиони системи и даље имају неколико ограничења која треба превазићи да би се побољшали принос и квалитет добијених протеина.
- Ниво експресије протеина је критичан фактор у молекуларном узгоју биљака, а овај ниво варира у зависности од биљне врсте, као и од протеина од интереса.

Нормалне и трансформисане ћелијске линије

- У фармацеутској биотехнологији се користе нормалне и трансформисане анималне ћелијске линије, које се међусобно знатно разликују по карактеристикама.
- Карактеристике нормалне ћелијске линије:
 - за раст неопходно везивање за подлогу;
 - ограничен број деоба (50-100 деоба);
 - расту у једном слоју (инхибира их контакт са другим ћелијама);
 - потребно дуже време да удвоструче број ћелија;
 - потенцијал ка диференцијацији;
 - захтевају комплексни медијум;
 - пролиферација зависи од спољашњих сигнала.

Нормалне и трансформисане ћелијске линије

- Многе од ових особина ограничавају примену нормалних ћелијских линија у индустрији за добијање рекомбинантних протеина, стога се за комерцијалну производњу биофармацеутика користе трансформисане ћелијске линије, односно континуалне ћелијске линије које карактерише:
 - раст у суспензији, тј. везивање за подлогу није услов за раст;
 - континуално размножавање;
 - раст у више слојева (нема контактне инхибиције);
 - за кратко време удвоструче број ћелија;
 - потпуно су изгубиле способност диференцијације;
 - раст у једноставном медијум;
 - не захтевају факторе раста.

Нормалне и трансформисане ћелијске линије

- Трансформација има за циљ да од нормалне ћелијске културе створи континуалну културу која је резистентна на механизме који контролишу раст, што се може постићи на више начина. С обзиром да трансформисане ћелије имају одлике малигних ћелија, када говоримо о континуираном расту, технике за трансформацију се заснивају на третману мутагеним агенсима, вирусима и онкогенима (ген који индукује стварање малигних ћелија).
- Најефикаснија метода је инфекција ретровирусима који активирају онкогенезу, која последично трансформише ћелију. Трансформисане ћелије расту релативно брзо у одговарајућим условима, а за њихово узгајање могу се користити биореактори или системи ваљкова.

ПРОИЗВОДЊА БИОФАРМАЦЕУТИКА

Производња биофармацеутика

- Производња биофармацеутика је један је од најстроже регулисаних и контролисаних процеса производње, а произвођачи биофармацеутика добијају лиценцу тек након што докажу да је производ ефикасан и безбедан, као и да се процес производње спроводи по највишим стандардима и са највећим степеном сигурности.
- Највећи број биофармацеутика представља протеине синтетисане употребом рекомбинантних система: прокариота (нпр. *E. coli*) или еукариота (нпр. ћелије сисара).

Производња биофармацеутика

- Производни процес започиње узимањем једне криовајлице радне банке ћелија из складишта. Ове ћелије се даље култивишу како би се започела биосинтеза серије производа, а сматра се да је производни процес завршен тек када се коначни производ спакује у примарну амбалажу, која је правилно обележена и спакована у финално паковање. Производња биофармацеутика подразумева низ процеса који се могу разврстати у две групе: *upstream* и *downstream* процеси.
- *Upstream* процеси подразумевају:
 - инокулацију,
 - пропaгацију ћелијске културе,
 - ферментацију.

Производња биофармацеутика

- *Downstream* процеси подразумевају:
 - „жетву“ ћелија и изоловање сировог протеина,
 - концентровање и грубо пречишћавање добијеног протеина,
 - фино хроматографско пречишћавање протеина,
 - формулацију финалног производа,
 - пуњење бочица производом, сушење смрзавањем (уколико је потребно) и затварање производа,
 - означавање (сигнирање) и паковање производа.

Процес производње биофармацеутика



Upstream процеси - биосинтеза производа

- *Upstream* процес започиње инокулацијом и наставља се обезбеђивањем адекватних услова за раст ћелија (пропагација) и биосинтезом протеина од интереса (ферментација), који се даље пречишћава током *downstream* процеса.
- Инокулација подразумева одмрзавање једне радне банке ћелија и њено засејавање у фласк који садржи течни хранљиви медијум (запремине 5/15/25 ml). У овој фази ћелије су вулнерабилније, јер током инокулације постоји ризик за контаминацију ћелијске културе, па су превентивне мере за заштиту од нечистоћа и примена асептичних техника неопходне.

Инокулација и пропација ћелија

- Након инокулације ћелије пролазе кроз фазу прилагођавања, на коју се надовезује пропација – раст и размножавање ћелија. У овој фази ћелијама су обезбеђени оптимални услови за раст и размножавање, при чему у овој фази не долази до производње протеина, већ само до повећања запремине биомасе и густине ћелија.
- Описане су четири различите фазе раста ћелија у култури:
 1. ћелије се прилагођавају *in vitro* окружењу - „lag фаза“
 2. ћелије пролазе кроз експоненцијалну фазу раста - „log фаза“
 3. ћелије успостављају равнотежу између стопе раста и смрти - „плато фаза“
 4. стопа ћелијске смрти премашује брзину ћелијске пролиферације и крива раста опада, "фаза смрти"

Инокулација и пропација ћелија

- Током пропације, од првобитно засејане једне генерације ћелија настаје неколико генерација ћелија. Достицање одговарајуће запремине и густине ћелија зависи од типа ћелија, брзине којом се ћелије деле и времена које им је потребно да достигну жељену конфлуентност у медијуму, варира од неколико сати до неколико недеља.
- На пример, *E. coli* је потребно 20 минута да удвостручи број ћелија, док је СНО ћелијама потребно 14 – 17 сати. У зависности од типа ћелија, за пропацију се користи различита опрема (нпр. неке ћелије расту у једном слоју причвршћене за површину судова, док друге расту суспендоване у медијуму).

Инокулација и пропација ћелија

- Када култура ћелија достигне 75 – 100% конфлуентности (процењује се посматрањем флака са ћелијама под микроскопом), готово сав кисеоник и медијум су истрошени те је неопходно да се медијум замени, тј. пасажира и уједно ћелије пренесу у флак веће запремине.
- Уколико се ћелије не пасажирају на време и пренаселе медијум, то лоше утиче на развој ћелијске културе. Са друге стране, уколико се ћелије прерано пасажирају то успорава наставак наредне фазе раста.
- Време између пасажа зависи од типа ћелија и стопе њиховог раста.

Инокулација и пропација ћелија

- Уколико ћелије расту у једном слоју на дну флашка, први корак је да се ћелије одлепе са површине трипсинизацијом или механичким путем. Суспензија ћелија се потом пресеје у нову културу, где се у малу порцију примарне културе додаје нови медијум, при чему настаје секундарна култура. Једноставнија је пасаж култура ћелија које су суспендоване у односу на ћелије које расту у једном слоју причвршћене за дно флашка.
- Ћелије које су суспендоване се узгајају у фласку, при контролисаној температури (35 - 38 °C) и количини угљен диоксида. Уколико је потребно, ћелијама се обезбеђује адекватна влажност ваздуха.
- Оптимална рН вредност је врло битна за адекватан раст ћелијске културе.

Инокулација и пропација ћелија

- Хранљиви медијум је богат бикарбонатима који уз додатак 5% CO_2 праве пуферски систем, који одлично контролише рН вредност ћелијске културе.
- За адекватан раст ћелија битно је и праћење парцијалног притиска CO_2 , који је метаболички индикатор. Наиме, ћелије користе кисеоник и глукозу стварајући угљен диоксид и воду. Ћелије сисара стварају угљен диоксид и млечну киселину, које смањују рН вредност медијума, тако да се рН вредност користи као показатељ (пored конфлуентости и парцијалног притиска CO_2 , присуство нуспроизвода) када треба пасажирати ћелије.

Инокулација и пропагација ћелија

- Промена рН вредности медијума се може пратити променом боје фенол црвеног који се додаје у хранљиву подлогу као индикатор који је осетљив на промене рН у опсегу 6,8 – 7,4.
- При:
 - рН = 6,5 - медијум је жут,
 - рН = 7 – наранџаст,
 - рН = 7,4 – црвен и
 - рН = 7,8 – љубичаст.
- Базни раствори као што су натријум карбонат, натријум бикарбонат и натријум хидроксид се користе за подешавање рН вредности.

Инокулација и пропација ћелија

- Да би постигли жељену биомасу која ће обезбедити добар принос терапијског протеина, неопходно је постепено повећавати волумен ћелијске културе. Процес преноса ћелијске културе из обичног флака који има запремину 25 ml, преко „шејкер“ флака од неколико литара, до крајњег биореактора чија је запремина више стотина литара је веома комплексан, захтеван и дуготрајан. За успешан процес преноса ћелија потребно је узети у обзир много различитих фактора, како биолошких тако и физичких.
- Строга контрола различитих параметара у реалном времену је потребна да би се идентификовали критични параметри процеса, за које је важно да се зна да контролишу биологију ћелија, али и да би се испунили критеријуми регулације у погледу квалитета, ефикасности и исплативости.

Инокулација и пропaгација ћелија

- Да би се испунили ови захтеви за праћење, кључно је имати аутоматизовани систем биореактора који омогућава контролу у реалном времену, праћење, снимање и управљање подацима коришћењем софтвера.
- Процес преноса у комбинацији са повећањем биомасе од флашка до биореактора није увек лак. Окружење за ћелије се потпуно мења, почевши од аерације до самог начина култивације и мешања.
- Чињеница да се ћелије више не „тресу на шејкеру“ већ се мешају унутар биореактора је велики стрес за осетљиве ћелије сисара, а поред тога се јавља и проблем са пењењем медијума, али се оно контролише додавањем антипенећих агенаса и сурфактаната.

Инокулација и пропагација ћелија

- Поред наведених, постоји још неколико критичних параметара које треба пратити приликом раста ћелија у биореакторима:
1. Пренос кисеоника: С обзиром да је култивација ћелија сисара аеробан процес, адекватан пренос кисеоника до ћелија је од кључног значаја. Да би се обезбедила адекватна снабдевеност кисеоником, треба контролисати брзину мешања, проток гаса и састав гаса. С обзиром на то да ћелије сисара немају ћелијски зид, притисак под којим се уводи гас у ћелијску културу мора бити низак да не би дошло до њиховог оштећења, међутим, то са друге стране може узроковати нехомогеност ћелијске културе. Поред поменутих параметара, додатно треба пратити проценат раствореног кисеоника, јер само кисеоник који је растворен у медијуму, ћелије могу да користе.

Инокулација и пропагација ћелија

2. Мешање ћелијске културе: Недовољно мешање доводи до промене pH вредности, неадекватне снабдевености хранљивим материја, као и до неадекватне аерације медијума, што значајно утиче на раст ћелија и производњу терапијског протеина. Тип пропелера, брзина мешања и распршивачи гаса директно утичу на величину вртлога који се ствара при мешању медијума у ком се налазе ћелије и на саму величину мехурића гаса.

Инокулација и пропагација ћелија

3. Акумулација угљен диоксида, CO_2 : Због ниског притиска под којим се уводи кисеоник, концентрација CO_2 у медијуму за културу је повишена, што негативно утиче на квалитет производа, као и на раст ћелија и производњу протеина.

Да би се превазишли могући поменути проблеми неопходно је одабрати оптималан дизајн биореактора. Сви поменути параметри се прате у реалном времену током култивације и при сваком кораку преноса из фласкова мањих запремина у веће, и након тога из већих шејкер фласкова у биореакторе све већих запремина.

Ферментација

- Под ферментацијом у производњи биофармацеутика подразумева се процес раста и размножавања ћелија у течном медијуму, током ког долази до синтезе протеина.
- За ферментацију су неопходни:
 1. Ћелијске линије са рекомбинантном ДНК (микроорганизми, анималне културе ћелија и др.);
 2. Хранљиви медијум (састав медијума и услови ферментације који су потребни за оптималан раст ћелија се утврђују током иницијалног развоја производног процеса, а касније се рутински понављају);
 3. Биореактор (производе се од висококвалитетног нерђајућег челика у запремини од неколико десетина литара, до неколико десетина хиљада литара).

Ферментација

- Ферментација је саставни део процеса производње биофармацеутика без обзира да ли се користе ћелије прокариота или еукариота, иако се дизајн биореактора и услови раста разликују у ова два случаја. Преко половине до сада одобрених биофармацеутика се производи употребом рекомбинантне *E. coli* и *S. cerevisiae*, у биореакторима који имају доста сличности.
- Највећи број преосталих биофармацеутика се производи употребом ћелијских култура сисара, углавном рекомбинантних ВНК и СНО ћелија (или хибридома ћелија у случају неких моноклонских антитела).

Ферментација

- Постоје одређене сличности биореактора за ћелијске културе сисара и микроорганизама, али постоје и одређене разлике. Биореактори или ферментатори представљају судове који су дизајнирани тако да омогуће ћелијама производњу циљног протеина. У већини биореактора ћелије се гаје у течnoj хранљивој подлози, са тачно контролисаним параметрима који се аутоматски одржавају у оптималним границама захваљујући мерно-регулационој опреми. Параметри који се прате су:
 - температура;
 - pH вредност;
 - брзина мешања ћелијске културе;
 - брзина преноса кисеоника и CO_2 ;
 - стварање пене;
 - стерилност подлоге и ваздуха.

Ферментација

- Одабир одговарајућег биореактора је кључан за успешност ферментације, што даље директно утиче на концентрацију производа од интереса, тј. принос, али и количину и тип нечистоћа, односно настанак нуспроизвода.
- Биореактори се у зависности од режима рада сврставају у три категорије:
 - шаржне,
 - доливне и
 - проточне (перфузионе).

Биореактори са шаржним режимом рада

- Биореактори са шаржним режимом рада омогућавају раст ћелијске културе на одговарајућој подлози без накнадног додавања нутријената. Овакав режим омогућава ћелијама да прођу кроз типичне фазе раста, од фазе прилагођавања, преко фазе експоненцијалног раста до фазе успоравања раста, стационарне фазе и фазе умирања ћелија.
- Шаржни режим је погодан за гајење ћелија како у лабораторијским, тако и у индустријским условима. Већина биофармацеутика се производи током стационарне фазе, јер је за време активне фазе раста синтеза протеина инхибирана.

Биореактори са доливним режимом рада

- Биореактори са доливним режимом рада омогућавају континуално додавање супстрата. Овакав режим је неопходан у случају када сам супстрат у високој концентрацији делује инхибиторно, те га је потребно додавати у ниским концентрацијама у континуитету.
- На пример, уколико се *E. coli* гаји у медијуму са високом концентрацијом глукозе, *E. coli* би расла максималном брзином и при том би производила органске киселине и друге метаболите који би инхибирали њен даљи раст. Али када јој се глукоза додаје постепено у медијум, *E. coli* је користи ефикасније и ставра мање нуспроизвода.

Биореактори са перфузионим режимом рада

- Биореактори са перфузионим режимом рада представљају својеврсну алтернативу биореакторима са доливним режимом и најчешће се користе за култивацију анималних ћелијских култура. Овакав режим подразумева константан проток супстрата уз издвајање ћелија помоћу мембрана или центрифугирањем. Перфузиони режим рада омогућава и издвајање нефункционалних ћелијских остатака, нуспроизвода и ензима који могу деградирати производ.
- Недостатак овог типа рада је повећана потрошња хранљиве подлоге.

Типови биореактора

- Тип биореактора који ће се користити за производњу биофармацеутика зависи од типа ћелије, тј. експресионог система.
- Када се за производњу биофармацеутика користе бактерије или квасац, употребљавају се класични биореактори са мешањем, с обзиром да су микроорганизми отпорни на смицајне силе и да се брзо размножавају (квасац се удвостручи за 30 минута, а *E. coli* за 15 - 20 минута).

Типови биореактора

- Биореактори за култивацију ћелија сисара захтевају прецизније контролисане системе који одржавају оптималне услове за ове осетљиве ћелије. Они садрже пропелере бродског типа (неки биореактори за ћелије сисара немају пропелере и користе распршиваче гаса као једино средство за мешање медијума), немају преграде, а унутрашње површине на дну биореактора су закривљене.
- Ове разлике имају за циљ да смање оштећења крхких ћелија сисара које немају спољашњу мембрану и много се спорије размножавају, потребно је 15 - 25 сати да се удвоструче. Пропелери обезбеђују дистрибуцију нутријената до свих ћелија у реактору, а покрећу их спољашњи мотори.

Ферментација култура ћелија микроорганизама

- Најпре се биореактор пуни пречишћеном водом, потом се додају термостабилне хранљиве материје неопходне за раст ћелија, након чега се *in situ* стерилише медијум топлотом. Многи биореактори поседују уграђен систем за грејање или спољашње облоге кроз које пролази пара која греје садржај посуде.
- Термолабилни састојци се стерилишу филтрацијом и потом се након загревања додају у посуду за ферментацију.
- Састав медијума варира, од једноставних (најчешће глукоза и неке минералне соли) до комплекснијих медијума који садрже пептон и екстракт квасца.

Ферментација култура ћелија микроорганизама

- Избор медијума зависи од:
 - нутритивних захтева ћелијских линија (обезбеђује се максимални раст ћелија и производња жељеног протеина);
 - места стварања производа (уколико је биофармацеутик екстрацелуларни производ онда је боље користити мање комплексни медијум, како би поједноставио процес пречишћавања финалног производа).
- Ферментација се дешава неколико дана након инокулације културе ћелија и током овог процеса се акумулира биомаса.

Ферментација култура ћелија микроорганизама

- У највећем броју случајева производ се акумулира интрацелуларно и ћелије се сакупљају (тзв. жетва производа) када се постигне максимални принос биомасе. Овакав приступ се најчешће користи, мада се могу користити и биореактори који функционишу при константном додавању нутријената и константном сакупљању биомасе при чему процес производње несметано тече.
- Током процеса ферментације, ваздух (стерилисан филтрацијом) се убризгава у суд како би се обезбедило снабдевање кисеоником, док је температура у посуди подешена на 25 - 37 °C, како би се обезбедио оптималан раст ћелија.

Ферментација култура ћелија микроорганизама

- Да би се постигле одговарајуће температуре чешће је неопходан систем за расхлађивање, него систем за грејање.
- Током ферментације температура расте услед метаболизма микроорганизама и механичких активности (нпр. мешање).
- Хлађење се постиже проласком расхладног средства (хладне воде или етилен гликола) кроз систем цеви, присутан у спољашњем омотачу посуде или некада кроз унутрашње цеви.

Ферментација култура ћелија сисара

- Култивисање ћелија сисара је технички комплексније и скупље у односу на културе ћелија микроорганизама. Стога се оне користе искључиво за производњу протеина код којих је неопходна посттранслациона модификација. Употреба ћелијских култура сисара је неопходна када је угљенохидратна компонента есенцијална за биолошку активност, стабилност протеина или полуживот у серуму.
- За разлику од микробиолошких ћелија, културе ћелија сисара:
 - захтевају комплекснији медијум;
 - захтевају продужено време ферментације услед спорог раста;
 - немају ћелијски зид па су осетљивије од микробиолошких ћелија.

Ферментација култура ћелија сисара

- *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) је основни медијум за културе ћелије сисара који садржи:
 - већину L-аминокиселина
 - већину витамина (фолна и пантотенска киселина, пиридоксин, рибофлавин, тиамин, итд.)
 - соли (нпр. NaCl, KCl, CaCl₂)
 - извор угљеника (обично глукоза)
 - антибиотике (нпр. пеницилин или стрептомицин)
 - додатни серум
 - пуфере
- Конституенти медијума, од којих су неки термолабилни, растварају се у пречишћеној води и стерилишу филтрирањем, а потом убацују у претходно стерилисан биореактор за ћелије сисара.