

#### 4.6.1. Použití *E.coli* k produkci

Fermentace bakteriálních kultur je relativně jednoduchý proces, který se v mnohém podobá klasickým biotechnologiím, a proto použití *E.coli* je velice výhodné. Samotná kultivace je relativně levný proces, lze ji provádět ve velkých objemech, není tak citlivá na mnoho faktorů jako eukaryotní expresní systémy, dá se velmi dobře optimalizovat. Také první bioléčiva byla vyrobena expresí v *E.coli* – insulin, lidský růstový hormon.

Bakterie *E.coli* byla po mnoho let modelovým organismem pro studium v oblastech biochemie a molekulární biologie a později sloužila k prvním pokusům o expresi rekombinantních proteinů. Její biologie, genetika, biochemie, metody transfekce, exprese a další aspekty byly velmi dobře prostudovány. To je jedna z prvních výhod použití *E. coli* k produkci. Druhou takovou výhodou jsou relativně velmi vysoké výtěžky heterologně exprimovaných proteinů, které dosahují až 25 % podílů na celkových proteinech. Poslední velikou výhodou je již zmíněná snadnost samotné fermentace a nízká cena na růstová média. Tyto výhody proto vedou ke snaze využít exprese v *E. coli* v maximu případů.

Nicméně použití *E. coli* k produkci bioléčiv má také své nevýhody. Mezi ty nejzávažnější patří právě příslušnost k prokaryotnímu světu – tedy neschopnost řady posttranslačních modifikací, především glykosylace, která u řady proteinů hraje důležitou roli při jejich biologické aktivitě. Další nevýhodou je exprese do intracelulárního prostoru, která znamená problém pro následnou izolaci exprimovaného proteinu, a poslední nevýhodou je přítomnost lipopolysacharidu v buněčné membráně. Tyto lipopolysacharidy mají pyrogenní účinky a komplikují čištění konečných produktů. Samostatnou kapitolou je vznik tzv. inklusních tělísek (inclusion bodies). U řady heterologních proteinů dochází k tomu, že po jejich proteosyntéze nedojde ke správnému sbalení (folding) molekuly a tyto denaturované molekuly vytváří velmi hustá, nerozpustná tělíška uvnitř bakteriální buňky. Tato tělíška představují jednak nevýhodu, a jednak výhodu. Nevýhodou je, že u takto exprimovaných proteinů je třeba zařadit další technologické kroky, které slouží k jejich správnému sbalení. K tomu slouží často solubilizace v denaturačním činidle (močovina, detergenty) a následně převedení do roztoku nedenaturujícího pufru. Výhodou je snadná izolace těchto částic, protože mají vysokou hustotu a většinou je velmi snadné po desintegraci buněk použít prostou centrifugaci k odstranění ostatních buněčných komponent id těchto inklusních tělísek, což usnadňuje následnou izolaci produktu. *E. coli* je také vytykáno, že je podmíněným patogenem, a proto se často dává přednost kvasinkám, které patogenní nejsou.

Mezi bioléčiva produkovaná průmyslově v bakteriích *E.coli* patří například : insulin, interferon –  $\alpha$ , interferon  $\gamma$ , interleukin-2, granulocytární kolonie stimulující faktor, lidský růstový hormon.

#### 4.6.2. Použití eukaryotních buněk ze zvířecích zdrojů

Při použití eukaryotních buněk pro expresi heterologních proteinů je situace v mnoha směrech zrcadlovým obrazem použití *E. coli*. Hlavními výhodami u eukaryotních buněk je přítomnost aparátu pro posttranslační modifikaci, především pro glykosylaci, správné sbalování molekuly a možnost exprese extracelulárně, do média. Exprese do media usnadňuje pozdější postupy pro izolaci daných bílkovin. Na druhou stranu nevýhodou jsou – vysoce citlivé kultivační podmínky, velmi nákladná kultivační média, pomalý růst. Celkově je tedy výroba v eukaryotních buňkách o mnoho nákladnější.

#### 4.6.3. Další buněčné systémy pro produkci bioléčiv

Kromě těchto základních dvou modelů se pro produkci bioléčiv testují a používají následující buněčné systémy – kvasinky, především *Saccharomyces cerevisiae*, houby, hmyzí buňky. Pro výrobu proteinů jsou v různých stádiích připraveny také transgenní zvířata a transgenní rostliny.