

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – II/1

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejlesztése:

I. A törzs kialakítása

- 1) A molekula megismerése (aminosav sorrend, glikozilálás)
- 2) Megfelelő analitika kidolgozása
- 3) Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
- 4) Kodonoptimalálás
- 5) A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
- 6) Klónozás, expresszió, szelekció
- 7) Sejtbankok létrehozása

II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalálás (fermentációs körülmények)
- 2) Downstream optimalálás (végtermék izolálása)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1/1 Tápanyagok mikroba fermentációknál

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

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

N-forrás: szervesen: 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).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

1. Upstream optimalálás

A fermentációs technológia optimalálása:

1. A tápanyag összetétele
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek
4. Fermentációs technikák

Mindez nagyon eltérő a különböző gazdaszervezetek (mikroorganizmusok és állati sejtek) tenyésztésénél, ezért célszerű külön tárgyalni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Példa: rekombináns *E.coli* tápanyagok

Oltóanyag (inokulum) tápanyag	Termelő tápanyag	Rátáplált (feed) tápanyag
Glicerín 99,5%	Glicerín 99,5%	Glicerín 99,5%
KH_2PO_4	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
K_2HPO_4	K_2HPO_4	EDTA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kanamicin szulfát
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Boric acid
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Kanamicin szulfát	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Kanamicin szulfát	Tiamin HCl	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Tiamin HCl	Boric acid	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Boric acid	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
	PPG2000	



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

1. Mikrobiális fermentációk

1. A tápanyag összetétele (Indukció)
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek
4. Fermentációs technikák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Példa: rekombináns *E.coli* tápanyagok

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Indukció

Az *E. coli*-val történő fehérje termelést rendszerint indukálható promóterrel valósítják meg. Leggyakrabban az IPTG-vel indukálható lac promótert 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 -idólyl acrylic acid



Rekombináns és plazmid-mentes sejtek ATP igénye

Gazda : *E. coli*; szénforrás: glükóz; 100 plazmid/sejt;
A plazmid móltömege 2.9 MDa;
A rekombináns fehérje 50% -a az összes fehérjének.

	Plazmid-mentes sejtek 10 e(-16) mol/cell	Rekombináns sejtek 10 e(-16) mol/cell
ATP felhasználás:		
poliszacharidok	5.75	5.73
sejt saját fehérje	57.39	57.22
termék fehérje	0.00	57.22
RNS	12.24	12.20
kromoszóma DNS	2.96	2.95
plazmid DNS	0.00	0.27
bioszintézisére		
transzportra	11.88	20.82
összesen:	97.17	163.38

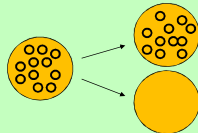


Indukció

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)



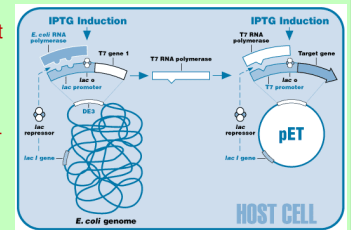
Kettős indukció: T7 polimeráz

Ez a módosított *E. coli* törzs olyan T7 RNS polimeráz gént tartalmaz a kromoszómáján, amely IPTG-vel indukálható.

A célgén elé egy (szintén IPTG-indukálható) T7 promótert kell beépíteni.

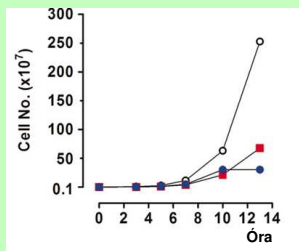
Amíg nincs IPTG a rendszerben, addig a T7 RNS polimeráz sem képződik.

Kettős biztonság, ráadásul a T7 polimeráz gyorsabb.



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.



1/2 Fermentációs paraméterek: hőmérséklet

Az *E. coli*-nál a növekedési optimum 37 °C, de a fehérje termelésnél gyakran alacsonyabban tartják.

Példa: A GCSF fehérjét a *coli* zárványtestek formájában termeli. 37 °C-on ezek olyan kompaktak, hogy a szokásos módszerekkel nem lehet feloldani. 32 fokon puha, laza szerkezetűek, oldhatóak, viszont nem lehet lecentrifugálni. Emiatt olyan csökkenő hőfokprofilot optimáltak, amely a szaporodásban 37 °C, azután fokozatosan csökken.

Élesztőknél a szokásos hőfok 28-30 fok, de minden technológiánál célszerű újra optimalni.



Fermentációs paraméterek: pH

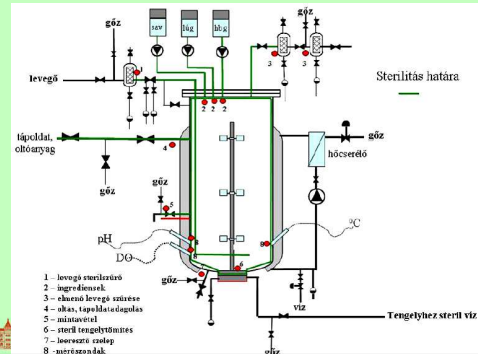
Az optimum a baktériumoknál, így az *E. coli*-nál közel semleges, 6,5-7,5 között van. Az anyagcsere savakat termel, emiatt lúg adagolással tartják a kívánt értéket.

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

Az optimálásnál célszerű megvizsgálni a változó pH profil lehetőségét is.



1/3 Ipari fermentor jellemző szerelvényei



Fermentációs paraméterek: oxigén

Mind a *coli*, mind az élesztő fakultatív anaerob mikroorganizmus, de a rekombináns fehérje termelésénél teljesen aerob anyagcserére 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:



1/4 Fermentációs technikák

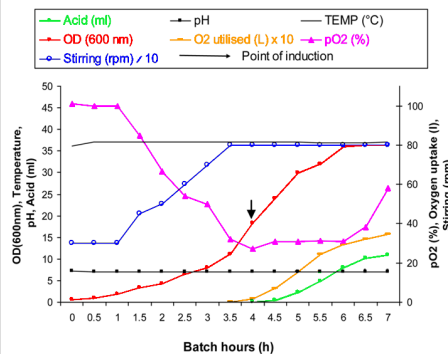
Az indukció beépítése a technológiába kétszakaszos fermentációt (sejtszaporítás + termékképzés) tétel fel, ezzel kizárja a félfolytonos és folytonos fermentációs technika alkalmazását.

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.



Fermentation process parameters



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 szervezetlen 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

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	Lipid 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 (IGF1 and IGF2)	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)	



B

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

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

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 vérel.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfelhárjék jelenlétét is → ezt újszülött állatok (borjú) vérszérumával 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 hidrophil 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

2/3 Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Forgó palackok/roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



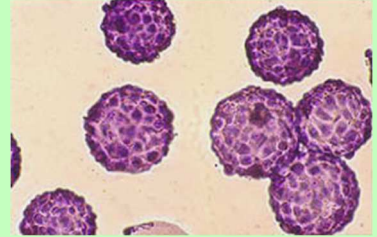
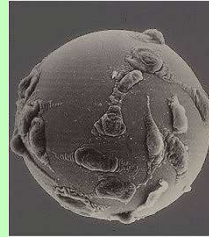
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Mikrokarires tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis

kialakult monolayer



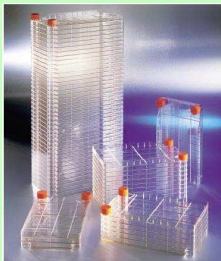
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

A felület növelése

Multitray

roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

„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.

Léptéknövelés 1000 literre



Bioreaktorok emlős sejtekhez



Térfogat: 6x2 liter, közös szabályozó egység

Léptéknövelés 10 000 literre



Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierrel felületi tenyésztetekhez 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

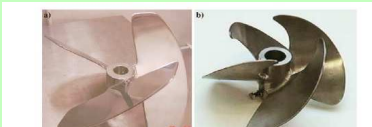


Fig. 13 (a) An ABC "cylinder core" impeller (used down-pumping); (b) Hayward Taylor up-pumping B2 hydrofoil

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

Wave Bioreactor



Courtesy of Wave Biotech, LLC

HyClone S.U.B.



Courtesy of HyClone

Xcellerex XDR



Courtesy of Xcellerex, Inc.

Disadvantages:

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



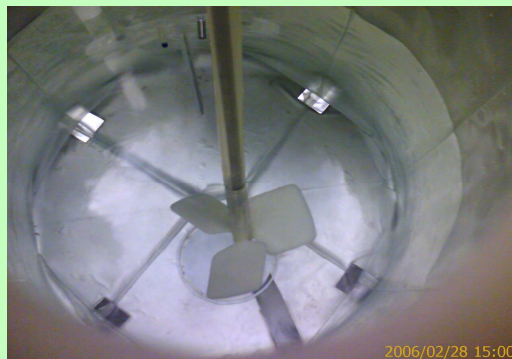
Egyszer használatos bioreaktorok

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok

Rozsdamentes acél héj (állandó) (1000 literig)

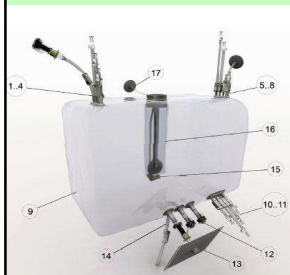


Egyszer-használatos bioreaktor zsák

Unimation Thermo Fisher_NEV

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 Kloenpak connector
13	Sensing probe assembly to be connected to (12) by Kloenpak 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

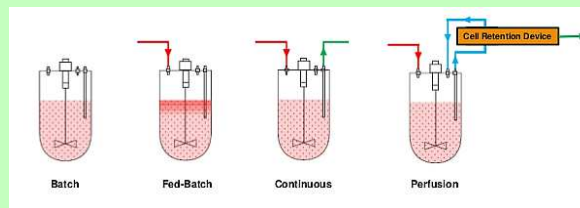
A keverőszár behelyezése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2/4 Tenyésztési módszerek összehasonlítása

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



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.

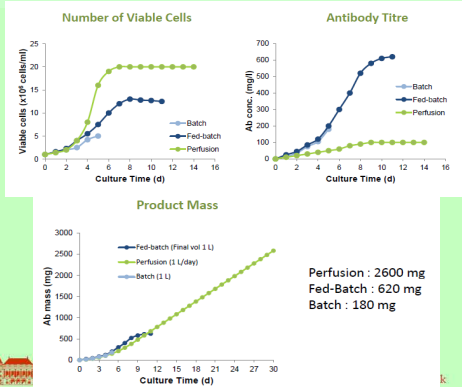


Egy 1000 literes fed-batch technológia tipikus adatai

Hasznos térfogat:	600-950 liter
Reaktor típusa:	S.U.B. 1000L
Inokulum:	~ 60-80 l (induló térfogat/10) Az inokulum 3 tenyészetet átojtják a termelő bioreaktorba, az induló sejtszám $0.4-0.6 \times 10^6$ sejt/ml.
Táplódat térfogat:	530 l alap táplódat (PCHO)
Rátáplálás:	adagolás a 3, 5, and 7 napon, „feed” táplódat
Térfogata:	15% (~90 l) $(V_{\text{alap táplódat}} + V_{\text{inokulum}}) \times 0.15$
Glükóz adagolás:	Gyakori at-line mérés, kézi adagolás a számított fogyáshoz: megfelelően
Fizikai paraméterek:	Hőmérséklet: 37 °C, pH: 7.15, keverés: 40-60 rpm, DO ₂ : 40%, fejnyomás: 0-50 mbar
Ozmoliaritás:	<400 mOsmol
pH szabályozás:	10-16% H ₃ PO ₄ oldattal, 0.5-0.6 M Na ₂ CO ₃ oldattal
időtartam:	7-9 nap

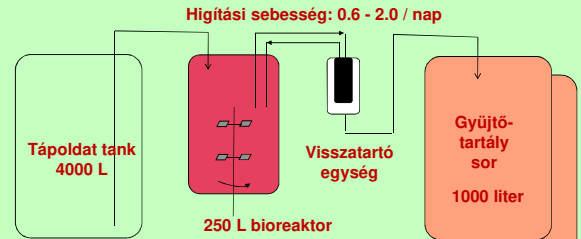


Tenyésztési módszerek összehasonlítása



Tenyésztési módszerek: folyamatos, sejtviisszatartással

Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés, folyamatos átfolyással, sejtviisszatartással, vagy sejt és termék viisszatartással.



Titernövelés: csökkenő költségek

Titre Improvements

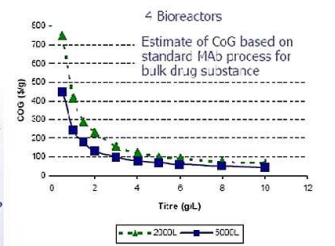
- Important cost benefits as titres go beyond 1g/L
- These diminish as we go beyond 5g/L

Beyond 5g/L

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

Challenge in DSP

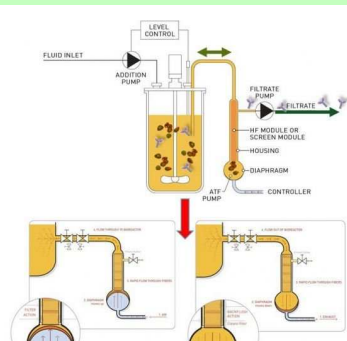
- Bioreactors decrease in size?
- Cope with increased titres
- Need to drive out costs
- Implications for facility design



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



Sejtviisszatartásos (perfúziós) technológiák



ATF = Alternating tangential filtration



SejtviSSzatartásos (perfúziós) technológiák

Alternatív megoldás: forgó, henger alakú rozsdamentes fémszita.

Résméret: 20 μm SejtviSSzatartás: 8 μm

Élő sejt viSSzatartás: 97-100%

Méreték: 50 x 5 cm, folyadék réteg: 1 cm

Fordulatszám: ~1000 rpm

Függőleges áramlás: 1,5 – 3 l/perc

Szűrés sebesség: 12 l/óra

Tisztítás szükséges: 2-10 naponta



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertu

Példa: rekombináns eritropoietin termelése

Upstream:

A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +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 Élelmiszertudomány Tanszék

50