

BIOFARMACEUTICKÁ TECHNOLOGIE: KULTURNĚJŠÍ SBĚR BUNĚK

Peter Rose z firmy Alfa Laval se v tomto článku zaměřuje na jednu z rostoucích oblastí biofarmaceutické filtrace a separace – sběr buněk savců pro výrobu nových vakcín a léků. Článek zkoumá počátky technologií používaných v této oblasti průmyslu a zamýšlí se nad současným vývojem.

My – to jest savci – jsme složeni z buněk. Odraz, který vidíme v zrcadle, se nám může zdát naprosto celistvý, avšak ve skutečnosti jsme souborem zhruba 10 bilionů buněk rozdělených do přibližně 200 různých typů. Tyto skupiny buněk jsou plně specializované – játra jsou tvořena buňkami jater, svaly z buněk svalů a tak dále.

Buňky savců sloužící k výrobě nových vakcín a léků jsou pěstovány mimo tělo a následně sbírány v laboratořích či průmyslových podnicích. Jedná se o jednu z nejužasnějších oblastí moderního průmyslového odvětví zvaného “life science”. I když by se mohlo zdát, že současný vývoj je poněkud překotný, kořeny tohoto ohromného pokroku lékařské vědy vedou až ke kuřeti, které bylo pitváno koncem 19. století, přesněji v roce 1885. Tehdy se Wilhelmu Rouxovi podařilo po několika dnech udržet neurální buňky embrya zmíněného kuřete v teplém solném roztoku a jako prvnímu stanovit princip tkáňové kultury.

Na jeho práci navázali v prvním desetiletí 20. století vědečtí pracovníci Hopkinsovy lékařské školy a university v Yale. Ve čtyřicátých a padesátých letech minulého století pak byly v buněčných kulturách pěstovány viry a buňky pro výrobu vakcín. Kupříkladu vakcína dětské obrny, která nakonec zlikvidovala hrozbu této nemoci, byla vypěstována na buněčných kulturách z ledvin opic.

V současné době patří výroba léků založená na buněčných kulturách k nejrychleji rostoucím oblastem biotechnologií. Za svůj úspěch však vděčí též současnému technologickému vývoji ve třech klíčových stádiích zpracování buněčných kultur, tj. fermentaci, sběru a purifikaci.

Sběr se provádí oddělením buněčné kultury od růstového prostředí. K provedení této choulostivé operace se užívá několika metod: odstředování, mikrofiltrace, hloubková filtrace a filtrace přes membrány charakterizované maximální velikostí pórů. Právě odstředování je jednou z nejpoužívanějších metod, a to v rozmezí od laboratorních měřítek až po průmyslovou výrobu.

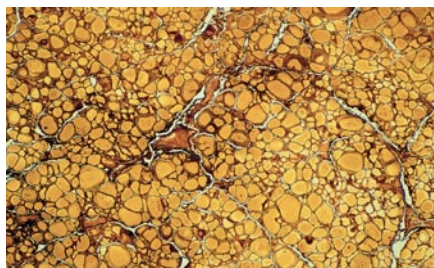
Odstředování využívá rozdíl hustoty mezi pevnými látkami a okolní kapalinou a urychluje dělení, ke kterému běžně dochází během sedimentace. Pro většinu průmyslových aplikací se na oddělování

buněk a zbytků buněčných tkání od růstového média používají separátory se stohem talířů. Tyto talířové odstředivky provádějí kontinuální odstředování a jejich výkonnost umožňuje urychlit proces sběru.

Přirozeně to není až tak jednoduché, jak by se mohlo zdát. Buňky savců jsou totiž velmi křehké organizmy. Takže i když talířová odstředivka vykoná dělení relativně snadno, je nutné dbát na minimální poškození produktu. Buněčná kultura bohatá na protein se urychlí během zlomku sekundy. Ačkoliv je rychlost důležitá, nesmí být na úkor znehodnocení stěny buněčné membrány, která je vůči narušení vysoce citlivá, protože by se do živného roztoku mohly uvolnit nežádoucí vnitřní buněčné proteiny. Tento proces je znám jako lýze (což je smrt buněk spojená s rozpadem a rozpuštěním jejich membrány. Pozn. překl.).

Od nejranějších etap vývoje velkokapacitních zařízení na fermentaci buněčných kultur bylo zřejmé, že charakter buněčných kultur bude vyžadovat mimořádně šetrné separátory. Tehdy konstruktéři obrátili svoji pozornost k duté hřídeli, která pocházela z koncepce původně vyvinuté pro mlékárenský průmysl. Tam byla použita jako vylepšení zabraňující roztržení tukových částic v mléce vlivem zrychlení. O desítky let později se stejná technologie stala základním kamenem moderního zpracování buněčných kultur.

Obr. 1 – Buněčná kultura



Jako v případě mnoha jiných inovací, měl i tento počáteční impulz jen málo společného s konečným výsledkem. Když se inženýři firmy Alfa Laval rozhodli studovat proveditelnost separátoru umožňujícího částečné vyprázdnění bubny pod tlakem, bylo to pivo a nikoliv mléko, se kterým si lámali hlavu. Cílem bylo pod tlakem odstředovat kvasnic z piva bez přístupu vzduchu tak, aby se zabránilo ztrátám oxidu uhličitého.

Jako jediná rozumná cesta, jak dosáhnout uzavřeného systému, se jevil zavedení kapaliny přes dutou hřídel do spodní části bubny separátoru a vyvedení kapaliny u hrdla bubny. Pro hermetický separátor musel být zkonstruován speciální dutý hřídel, který vycházel z hřídele použitého u toho času největšího separátoru na zpra-

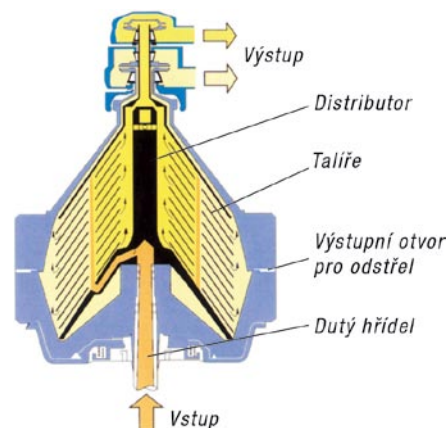
cování kvasinek. Experimentální zařízení na čištění piva bylo vyzkoušeno také na mléce, protože to vypadalo, že by mohlo vyřešit rovněž problém s jeho pěněním. A to se také stalo.

Využití ke zpracování mléka se zdálo být komerčně schůdnější. Inženýři proto původní konstrukci ještě upravili a zařízení opatřili dvěma odtoky, aby se dalo použít i na oddělování smetany. Zkoušky ve švédské mlékárně byly tak úspěšné, že Alfa Laval tehdy vyrobila několik nových separátorů určených pro výstavu Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft, která se konala v Berlíně v roce 1933. První hermetické separátory tak mohly technologii mlékáren i pivovarů posunout radikálně kupředu.

Hermetický separátor se vzhledem k využití nové součásti – dutého hřídele – svým vzhledem lišil od dřívějších odstředivek. Jeho rám byl konstruován tak, aby veškeré vstupy pro plnotučné mléko u dna zařízení byly snadno přístupné. Mléko, které přes dutou hřídel vstupovalo na dno bubny, se na svazku talířů odstřeďovalo běžným způsobem.

Vzhledem k tomu, že narozdíl od odstředivek plněných vrchem neměl distributor kapaliny ve vrchní části nátokový otvor, mohl být vnitřní průměr talířů značně zmenšen. Tím byl uvnitř bubny získán prostor navíc, ve prospěch objemu zpracovávané kapaliny.

Obr. 2 – Řez bubnem separátoru



Mimo dosažení hlavního cíle – tedy získání smetany a odstředěného mléka, měl hermetický separátor Alfa Laval ještě několik dalších předností. Tou nejdůležitější z nich byla jeho výkonnost – lepší, než u jakéhokoliv jiného separátoru. Ke zvýšení úrovně výkonnosti zařízení přispěly dva faktory. Zaprvé, že proud mléka byl v dlouhé duté hřídeli urychlován velmi jemně, což minimalizovalo štěpení tukových částic. Za druhé, talíře měly menší vnitřní průměr, čímž se současně zvětšil využitelný objem bubny.

Stejná konstrukce s dutým hřídelem tvoří základ systému typu Culturefuge – první plně hermetické odstředivky vytvořené pro aplikace v oblasti dělení buněčných kultur savců a vysrážených proteinů. Dutý hřídel je zde základem pro naprosto hermetickou konstrukci, která zcela eliminuje fázové rozhraní vzduch-kapalina uvnitř odstředivky a tím také omezuje pění, hlavní příčinu degradace proteinů. Plynuhé zrychlení minimalizuje stříhovou deformaci buněk zvláště při jejich sběru. Konstrukce navíc umožňuje odvádění odstředěné kapaliny při malém poloměru, což omezuje jak spotřebu energie, tak zvyšování teploty během separace na minimum.

V matematickém modelu destrukce částic citlivých na stříh v dávkovací zóně odstředivky se ukázalo, že tato destrukce nezávisí na rychlosti průtoku. Studie Boychyna a spol. simulovala průtočné pole v urychlovacím pásmu tradiční odstředivky za použití výpočetní dynamiky kapalin (CFD – computational fluid dynamics). Studie srovnávala dva případy: jeden klasický se zavzdušněnou plnicí zónou a druhý s šetrně zaváděnou kapalinou, t.j. bez přítomnosti vzduchu. Uvedená modelovací technika potvrdila, že maximální ztráta energie je během zrychlení za přítomnosti vzduchu až dvojnásobně větší než v případě bez jeho přítomnosti. Vyšší ztráta energie vede k podstatně vyššímu štěpení částic v suspenzi sraženiny proteinu a následně k horšímu vyčištění.

Existuje také studie stejné výzkumné skupiny, která porovnává dvě pilotní talířové odstředivky při zpracování buněčné kultury ve dvou nízkokapacitních provezech. Jedna odstředivka měla klasickou neplněnou urychlovací zónu a druhá hermetický vstup s dutým hřídelem pro jemné urychlování natékající kapaliny. V každém dalším klíčovém ohledu (stejně separační ploše, otáčkách za minutu atd.) byla tato zařízení shodná. Výzkum ukázal, že odstředivka opatřená dutou hřídelí měla v porovnání s klasickou odstředivkou 2,5-krát větší průtok při stejné účinnosti separace.

Jak funguje moderní systém Culturefuge

Přiváděný produkt vstupuje do odstředivého separátoru Culturefuge přes vstupní část duté hřídele a postupně, jak se pohybuje vzhůru, je urychlován. Tím je minimalizována střížná síla kapalin a je zabráněno buněčné lýzi. Plnicí zóna je zcela vyplněna rotující kapalinou. Toto hermetické provedení vylučuje možnost, že by se produkt dostal do kontaktu se vzduchem nebo vnějším prostředím. Tím je zabráněno pění, které způsobuje jeho denaturaci.

Během normálního provozu zajišťuje provozní voda uzavření posuvného dna bubnu proti víku. Během odstřelu posuvné dno na krátký okamžik (méně než sekundu) poklesne a odseparované pevné

částice nashromážděné na stěnách bubnu jsou vystřeleny výstupními otvory na jeho obvodu. Vysoká rychlost vyletujících částic je následně snižována v cyklonu.

Obr. 3 – Modul Culturefuge 400



Získávání buněk pro přípravu nových vakcín a léků se přesunulo z oblasti science fiction do reality, částečně také díky plátku kuřete a separátoru, který započal oddělování mléka od smetany a nyní pomáhá získávat tu nejcennější komoditu ze všech, dobré zdraví.

*Peter ROSE, Alfa Laval,
czechrepublic.info@alfalaval.com,
www.alfalaval.cz*

*Reproduced by kind permission
of Filtration + Separation,
Elsevier Ltd. © 2008, www.filtsep.com*