



Czynniki wpływające na produktywność układu bakulowirusy/komórki owadzie

Anna Olejnik, Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

The influence of factors on baculovirus/insect cell system productivity

Summary

The baculovirus expression vector system (BEVS) is a powerful tool for the heterologous protein production. The productivity of BEVS depends on: insect cell lines and their growth parameters, medium composition, multiplicity of infection (MOI), time of infection (TOI), quality of viral inoculum and scale of cultivation. The factors influencing foreign gene expression level in BEVS – were the subject of the presented review.

Key words:

baculovirus, insect cells, media, MOI, TOI.

1. Wstęp

Rosnące zapotrzebowanie na szczepionki antywirusowe, hormony wzrostowe, interferony i enzymy metaboliczne dla celów farmaceutycznych, weterynaryjnych i diagnostycznych wywołało konieczność poszukiwania bezpiecznych i wydajnych systemów ekspresyjnych do ich produkcji. Jednym z takich systemów jest układ komórek owadzych i bakulowirusów (BSE). Atrakcyjność bakulowirusów zarówno jako bioinsektycydów, jak i wektorów ekspresyjnych, związana jest przede wszystkim z ich bezpieczeństwem dla ludzi, zwierząt wyższych i roślin. Ponadto, z biotechnologicznego punktu widzenia, BSE wykazuje wiele innych cennych właściwości, takich jak: duża pojemność insercyjna ge-

Adres do korespondencji

Anna Olejnik,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza
im. Augusta
Cieszkowskiego,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-623 Poznań.

nomu bakulowirusowego; możliwość jednoczesnej ekspresji kilku heterologicznych genów; wydajna biosynteza obcych białek warunkowana silnymi promotorami: polidrynowym lub białka p10, wysokie prawdopodobieństwo uzyskania białka aktywnego biologicznie poprzez jego prawidłowe i kompletne modyfikacje potranslacyjne (1). Duża popularność bakulowirusowego systemu ekspresyjnego znalazła odbicie w ogromnej ilości białek różnego pochodzenia produkowanych przez komórki owadzie na skutek infekcji bakulowirusowej. W 1997 r. liczbę zrekombinowanych białek uzyskanych w BSE oszacowano na ponad 600 (2). Na podstawie przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach wskazuje się na możliwość wykorzystania zmodyfikowanych genetycznie bakulowirusów do ekspresji heterologicznych genów w komórkach ssaków. Ze względu na nietoksyczny charakter oddziaływania oraz brak ekspresji genów wirusowych w komórkach ssaków związana z wysoką owadospecyficznością bakulowirusowych promotorów transkrypcyjnych, istnieje możliwość stosowania bakulowirusowych wektorów ekspresyjnych w terapii genowej (3,4).

Zastosowanie układu zrekombinowane bakulowirusy/komórki owadzie do wielkoskalowej produkcji biopreparatu wymaga przeprowadzenia szeregu pracochłonnych badań podstawowych. Wstępne badania optymalizacyjne nad BSE prowadzone w skali laboratoryjnej dotyczą przede wszystkim: 1) wyboru odpowiedniej linii komórkowej, zdolnej do efektywnej syntezy biologicznie aktywnego heterologicznego białka, 2) określenia dawki wirusa i czasu infekcji zapewniających maksymalny poziom ekspresji obcego genu, 3) doboru pożywki hodowlanej oraz poznanie znaczenia poszczególnych składników pokarmowych dla metabolizmu komórkowego przed i po infekcji wirusowej, 4) określenia przydatności różnych metod i systemów hodowli do produkcji i oczyszczania biopreparatu.

W przedstawianej pracy wyszczególniono podstawowe czynniki decydujące o produktywności opisywanego systemu ekspresyjnego. Przy czym dokładnie omówiono podstawowe parametry hodowli podlegające szczegółowej analizie przy opracowywaniu technologii produkcji – zrekombinowanych białek.

2. Owadzie linie komórkowe

Duże zainteresowanie owadzimi kulturami tkankowymi spowodowało gwałtowny wzrost liczby ciągłych linii komórkowych. Do chwili obecnej wyizolowano ponad 400 linii pochodzących z owadów rzędów: *Lepidoptera* (motyle), *Hymenoptera* (błonkówki), *Orthoptera* (prostoskrzydłe), *Diptera* (muchówki), *Homoptera* (pluskwiaki) i *Coleoptera* (chrząszcze). Uzyskane kultury komórkowe pochodzą z różnych tkanek: hemocytów, jajników, jąder, jelita czy ciała tłuszczowego oraz ze wszystkich stadiów rozwojowych owadów: zarodków, jaj, larw i postaci dojrzałej (5). Do najczęściej stosowanych linii owadzich należą przede wszystkim komórki *Spodoptera frugiperda* (Sf-9 i Sf-21), *Trichoplusia ni* (Tn-368 i High-FiveTMBTI-TN-5B1-4) oraz *Bombyx*

mori (Bm-5). Kierunki zastosowania powszechnie używanych komórek owadzych oraz ich dokładniejszy opis przedstawiono w tabeli.

Tabela

Owadzie linie komórkowe i ich zastosowanie w biotechnologii (5,69,70)

Linia komórkowa	Pochodzenie	Nazwa	Zastosowanie
Sf-9 i Sf-21	<i>Spodoptera frugiperda</i>	mól bawełniany	rekombinowane białka, bioinsektycydy
Tn-368 BTI-Tn5B1-4	<i>Trichoplusia ni</i>	błyszczka kapuściana	rekombinowane białka, bioinsektycydy
UCR-Se-1	<i>Spodoptera exigua</i>	światłołówkaaziemnica	bioinsektycydy
IZD-MB0503	<i>Mamestra brassicae</i>	piętnówka kapustnica	rekombinowane białka, bioinsektycydy
Bm-5, BM-N	<i>Bombyx mori</i>	jedwabnik morwowy	rekombinowane białka, bioinsektycydy
	<i>Autographa californica</i>	sówka kalifornijska	bioinsektycydy
IPLB-LElta	<i>Lymantria dispar</i>	brudnica nieparka	bioinsektycydy
Hlz-AM	<i>Heliothis zea</i>	słonecznica kukurydziana	bioinsektycydy
IPLB-HvT1	<i>Heliothis virescens</i>	słonecznica tytoniowa	bioinsektycydy
S2	<i>Drosophila melanogaster</i>	muszka owocówka	rekombinowane białka
	<i>Aedes albopictus</i> ,	komar leśny	szeponki,
	<i>Aedes aegypti</i>	komar przenoszący żółtą febrę	antygeny arbowirusowe
IBL-SLO1A	<i>Spodoptera litura</i>	sówka tytoniowa	bioinsektycydy

Owadzie linie komórkowe wykazują wiele cennych – z punktu widzenia biotechnologii – cech, m.in. naturalną zdolność do nieograniczonych podziałów, możliwość wzrostu w hodowlach jednowarstwowych i zawiesinowych, bez konieczności immobilizacji na nośnikach, szybkie i porównywalne tempo wzrostu na pożywkach z dodatkiem i bez dodatku surowicy, a także duże zdolności adaptacyjne, umożliwiające stosowanie różnych metod hodowlanych i technik bioreaktorowych. Zdecydowanie niepożądaną właściwością linii owadzych jest tendencja do zmienności genetycznej, co stwarza konieczność ich zabezpieczania i przechowywania w wielu kopiach w atmosferze ciekłego azotu (6).

Ze względu na znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi, związane z odmiennym źródłem pochodzenia, zróżnicowaną podatnością na infekcję i zdolnością do ekspresji genów wirusowych, wybór najbardziej efektywnej linii powinien być dokonany empirycznie. Linia komórek owadzych, polecaną przez niektórych autorów do ekspresji heterologicznych genów jest linia uzyskana z homogenatów jaj błyszczki kapuścianej *Trichoplusia ni*, klon popularnie nazywany High Five. Stwierdzono, że ekspresja obcego białka w komórkach linii High Five jest 4-, 7- i 23-krotnie wyższa niż w powszechnie stosowanych w BSE komórkach Sf-9 (7-9). Wartościowym systemem produkcyjnym dla BSE okazały się również komórki *Drosophila* S2, z wykorzystaniem których otrzymano tak samo wysokie produktywności

zrekombinowanych białek, jak w przypadku zastosowania komórek pochodzących od owadów z rzędu *Lepidoptera*. Bakulowirusowa infekcja *Drosophila* S2 nie prowadzi do lizy komórek, jak ma to miejsce przy infekcji innych linii komórkowych. Ta cenna właściwość opisywanego układu ma ważne znaczenie dla produkcji białek labilnych, potranslacyjnie modyfikowanych, wrażliwych na działanie enzymów proteolitycznych (10).

2.1. Powinowactwo bakulowirus/komórka owadzia

Bakulowirusy wykazują różny stopień powinowactwa do owadzych linii komórkowych, co wyraża się w zróżnicowanej szybkości wiązania wirusów z powierzchniowymi receptorami komórek. Ze względu na fakt, że jeszcze nie w pełni są poznane wirusowe czynniki odpowiedzialne za wiązanie do powierzchni komórki, trudne są do zidentyfikowania komplementarne do nich błonowe receptory komórek owadzych (11).

W badaniach prowadzonych nad przyczepianiem się i wnikaniem formy BV do komórki wrażliwej wykazano, że prawdopodobnie czynnikiem wiążącym bakulowirusa do powierzchni komórki owadziej jest białko gp64, tworzące wirusowe peplomery (12). Glikoproteina gp64 jest syntetyzowana w zainfekowanej komórce 6 godzin po infekcji, podlega procesom glikozylacji i niekiedy fosforylacji. Następnie odkładana w błonie komórkowej ma zdolność do agregacji w tetramery. Przypuszcza się, że zdolność do tworzenia agregatów może mieć duże znaczenie dla funkcji tego białka (11). Wirus przechodząc przez błonę komórkową uzyskuje otoczkę wraz z białkiem gp64.

Na efektywność wiązania wirus-komórka oraz kinetykę procesu infekcji mają wpływ czynniki fizykochemiczne, takie jak: temperatura, pH, obecność specyficznych przeciwciał oraz jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (11). Zakwaszanie endosomu prowadzi do inicjacji fuzji otoczki wirusa z błoną endosomalną i uwolnienia nukleokapsydów do cytoplazmy. Przeciwciała specyficzne do gp64 nie blokują procesu adsorpcji wirusa, ale ograniczają jego infekcyjność. Także inhibitory, zapobiegające zakwaszaniu endosomów, powodują ograniczenie infekcyjności wirusa, co wskazuje na fakt, że glikoproteina gp64 jest białkiem fuzyjnym zależnym od pH (13). Empirycznie udowodniono również, że przy wiązaniu cząstek wirusa do komórek owadzych pośredniczą powierzchniowe receptory komórkowe.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń Hammer i in. (11) stwierdzili różne szybkości przyczepiania wirusa do różnych owadzych linii komórkowych. W hodowlach jednowarstwowych największą szybkość wiązania wirusa AcNPV i infekcji wykazywały komórki TN5B1-4 (High FiveTM), niższą komórki TN-368, a najniższą komórki Sf-9. Liczba efektywnych miejsc wiązania AcNPV do komórek TN5B1-4 (High FiveTM) oszacowano na 6×10^3 /komórkę. Podczas analizy zdjęć zainfekowanych komórek High Five, wykonanych pod mikroskopem elektronowym, dowiedziono, że w związ-

ku z zasiedleniem przez wirusy całej dostępnej powierzchni komórek, liczba przyczepiających się cząstek wirusa do błony komórkowej jest limitowana nie tylko przez liczbę dostępnych miejsc receptorowych, ale przede wszystkim przez wielkość powierzchni i uwarunkowania geometryczne komórki (11).

3. Warunki hodowli komórek owadzi

Naturalne środowisko wzrostu komórek owadzi jest ściśle zdeterminowane przez ich udział w metabolizmie tkankowym. Poszczególne rodzaje komórek podlegają różnicowaniu i są zależne od składników wytwarzanych przez inne części organizmu. Odnosi się to zarówno do składników odżywczych, jak i czynników regulacyjnych. Oznacza to, że hodowla komórek owadzi w warunkach *in vitro* jest możliwa tylko, wówczas gdy stworzone zostanie odpowiednie środowisko wzrostu. Dotyczy to parametrów fizykochemicznych hodowli, mianowicie ciśnienia osmotycznego, pH i temperatury oraz odpowiedniego odżywiania.

3.1. Pożywki hodowlane

Pożywki powszechnie stosowane do hodowli komórek owadzi opierają się na recepturze opracowanej w 1962 r. przez Grace'a (14). Modyfikacjami pierwotnej pożywki Grace'a są pożywki: TNM-FH, zawierająca w swym składzie ultrafiltrat ekstraktu drożdżowego (3,33 g/l) i hydrolizat laktoalbuminy (3,33 g/l) oraz TC-100 i IPL-41. Wymienione płyny hodowlane wzbogacane są 5-20% dodatkiem surowicy.

Jednym z głównych składników energetycznych pożywek jest glukoza występująca w ilości 0,7-1,0 g/l. Inne węglowodany, takie jak fruktoza, trehaloza i sacharoza mają mniejsze znaczenie dla proliferacji komórek, a ich konsumpcja rozpoczyna się zazwyczaj dopiero po wyczerpaniu glukozy (15). Duży dodatek sacharozy sięgający 26 g/l związany jest z utrzymaniem odpowiedniego chemicznego potencjału wody w pożywce.

Do aminokwasów zawartych w płynach hodowlanych należą: L i β -alanina, L-arginina, L-asparagina, L-cystyna, glicyna, L-histydyna, L-leucyna, L-izoleucyna, L-lizyna, L-metionina, L-feniloalanina, L-prolina, L-treonina, L-tryptofan, L-tyrozyna, L-walina. Szczególną rolę w metabolizmie komórek owadzi, podobnie jak wszystkich komórek zwierzęcych, spełnia glutamina, która jest ważnym źródłem energii oraz prekursorem syntezy nukleotydów. Niedobory podstawowych aminokwasów mogą indukować uszkodzenia chromosomów i hamować podziały komórkowe (16). W badaniach metabolizmu komórek owadzi wykazano, że najszybciej wyczerpywana jest glutamina, i jako czynnik ograniczający wzrost komórek powinna być uzupełniana w czasie hodowli. Produktem przemiany glutaminy jest alanina, zwykle gromadząca się w pożywce hodowlanej, i amoniak, metabolizowany przez komórki owadzie do

kwasu moczowego (6,17). Spośród innych aminokwasów dobrze wykorzystywana jest seryna (60%), leucyna (50%) i tyrozyna (50%). Pozostałe aminokwasy zużywane są w ilościach mniejszych niż 40% początkowej ich zawartości w pożywce (15).

Zawartość soli mineralnych w płynach hodowlanych pozwala na utrzymanie pożądanego ciśnienia osmotycznego oraz odpowiedniego potencjału błony komórkowej. Obecność w pożywce jonów wapnia, magnezu, sodu, potasu, chlorków, fosforanów, siarczanów i węglanów jest ważnym czynnikiem stymulującym przemiany o znaczeniu globalnym dla metabolizmu komórkowego (16,18). Dodatek wodorowęglanu sodu (0,35 g/L) zapewnia wystarczającą dla komórek owadzych ilość dwutlenku węgla oraz wpływa na utrzymanie optymalnego pH w czasie hodowli.

Pożywki do kultur owadzych zawierają śladowe ilości witamin z grupy B (biotyna, pantotenan wapnia, kwas foliowy, niacyna, pirydoksyna, ryboflawina, tiamina – 0,02 mg/L), które pełnią rolę składników koenzymów w reakcjach enzymatycznych. Obecne w podstawowej recepturze chlorek choliny i inozytol nie są katalizatorami reakcji, lecz stanowią substraty do syntezy fosfolipidów błon komórkowych (16).

Ze względu na wysokie ryzyko zakażeń mikrobiologicznych, szczególnie w hodowlach wielkoskalowych, do pożywek dodawane są antybiotyki. Powszechnie używane substancje przeciwbakteryjne to: gentamycyna, penicilina, streptomycyna i kanamycyna. Dodatkowo gentamycyna i kanamycyna chronią hodowlę przed zakażeniami mykoplazmami. Jako czynnik fungistatyczny stosowana jest nystatyna lub amfoterycyna (1).

Główne znaczenie czynników hodowlanych do wykorzystania komórek owadzych w BSE przyczyniło się do rozwoju prac nad ulepszeniem starych, stosowanych od lat 60.-70., podłoży oraz nad opracowaniem nowych, doskonalszych receptur pozwalających na lepszy rozwój kultury i obniżenie kosztów hodowli. W chwili obecnej istnieje szereg handlowo dostępnych pożywek, wśród których wyróżnia się dwie podstawowe kategorie: pożywki wymagające i nie wymagające dodatku surowicy.

3.1.1. Pożywki z surowicą

Pierwsze pożywki do hodowli komórek owadzych wymagały dodatku owadzych płynów ustrojowych. Ze względu na trudności z uzyskaniem większej ilości owadziej hemolimfy, szybko zastąpiono ją surowicami kręgowców, a w szczególności surowicą bydlęcą (5). Surowica dodawana do pożywek w ilości 5-20% jest bogatym źródłem składników odżywczych i regulatorowych. Dzięki dużej zawartości hormonów i polipeptydowych czynników wzrostu stymuluje ona proliferację komórek. Obecność embrionalnego czynnika wzrostowego, duża zawartość fetuiny i biotyny oraz zmniejszona ilość tłuszczu i gamma-globulin sprawiają, że jedną z najlepszych i najczęściej stosowanych surowic jest bydlęca surowica płodowa (FBS). Wiele cennych substancji zawartych w surowicy m.in. przeciwutleniacze, antytoksyny czy inhibitory proteaz, sprawiają, że jest ona cennym składnikiem pożywek spełniającym

nie tylko funkcje odżywcze, ale również ochronne. Ponadto, surowica stanowi nośnik dla substancji nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak tłuszcze. Ze względu na dużą pojemność buforową wpływa na stabilizację pH hodowli, a także poprzez zwiększanie lepkości płynu hodowlanego chroni komórki przed stresem mechanicznym. Biorąc pod uwagę wszystkie zalety surowicy, jej obecność w pożywce ma niewątpliwie duże znaczenie dla żywotności i stanu odżywienia kultury komórkowej (16,18,19).

Mimo szeregu zalet surowicy coraz częściej dąży się do jej całkowitego wyeliminowania z pożywek. Decyduje o tym wysoka cena, która znacznie podnosi koszt procesów biotechnologicznych. Ponadto, dodatek surowicy zwiększa ryzyko zakażeń mikrobiologicznych przez mykoplazmy oraz utrudnia separację i oczyszczanie preparatów białkowych, co jest szczególnie dotkliwe przy produkcji zrekombinowanych białek, wydzielanych na zewnątrz komórek.

Od wielu lat prowadzi się badania nad składem jakościowym i ilościowym surowicy. Na podstawie wyników tych doświadczeń opracowano pożywki hodowlane zawierające substytuty surowicy zapewniające prawidłowy wzrost komórek *in vitro*.

3.1.2. Pożywki bez surowicy

Wśród pożywek nie wymagających dodatku surowicy wyróżnia się pożywki niskobiałkowe (Ex-Cell 400TM, Ex-Cell 401TM) i nie zawierające białek (Sf900, Sf900 II). Skład pożywek i rodzaj suplementu zależy od przeznaczenia i skali hodowli oraz kierunku wykorzystania BSE. Odmiennie mogą być wymagania dla wzrostu komórek nie infekowanych, dla replikacji bakulowirusa czy ekspresji genów wirusowych i produkcji zrekombinowanego białka (20).

Pożywki bezsurowicze, oprócz podstawowych składników, powinny być wzbogacone w substancje będące substytutami surowicy, takimi jak: nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe, sterole (np. cholesterol), przeciwutleniacze (tokoferole, etanolamina), prekursorzy błonowe (monotioglicerol) i powierzchniowo czynne polimery (alkohole polihydroksylowe typu Pluronic F-68, metyloceluloza, Tween 80). Dodatkowo, pożywki bezsurowicze zawierają w zwiększonej ilości kwasy organiczne i witaminy, szczególnie z grupy rozpuszczalnych w wodzie (20,21). Często do pożywek bezsurowicznych dodaje się również hydrolizaty białkowe (baktipepton, baktotryptozę, hydrolizat laktoalbuminy) i ultrafiltrat ekstraktu drożdżowego. Hydrolizaty białkowe i ekstrakty drożdżowe stanowią cenne źródło dobrze przyswajalnych małych peptydów i wolnych aminokwasów. Autolizaty drożdżowe są dodatkowo nośnikiem witamin, szczególnie z grupy B, nukleotydów i innych ważnych składników pokarmowych (20,22).

W przeprowadzonych badaniach nad hodowlami kultur owadzych wykazano dużą zdolność adaptacyjną linii komórkowych do wzrostu w pożywkach nie zawierających surowicy. Stwierdzono również, że kinetyki wzrostu komórek rosnących

w pożywkach z dodatkiem i bez dodatku surowicy są porównywalne zarówno w hodowlach jednowarstwowych, jak i zawiesinowych (20). Obserwacje te zostały także potwierdzone w hodowlach na dużą skalę (23,24). Pomimo wielu doświadczeń przeprowadzonych nad optymalizacją warunków hodowli i doбором pożywek nie można jednoznacznie określić, które z nich są przydatne do uzyskania wysokiego poziomu replikacji wirusa i ekspresji obcych genów. Odmienne rezultaty badań uzyskane przez różnych autorów przy produkcji zrekombinowanych białek i bakulowirusów z wykorzystaniem tych samych pożywek hodowlanych, wskazują na konieczność ich eksperymentalnego wyboru.

Lynn (1999) porównywał namnażanie wirusów AcMNPV i LdMNPV w linii komórkowej *Limantia dispar* IPLB-LdElta hodowanej w dwóch pożywkach TC-100 z dodatkiem surowicy i Ex-Cell 400TM. Autor stwierdził wyższą produktywność wirusa LdMNPV w podłożu z surowicą niż bez surowicy, czego nie zaobserwował w przypadku wirusa AcMNPV. Lynn (1999) otrzymał również zwiększoną ilość wirusa LdMNPV uzyskanego przy zmianie pożywki w momencie infekcji z Ex-Cell 400TM na TC-100 i odwrotnie (25).

Weiss i in. (20) stwierdzili wyższy poziom produkcji β -galaktozydazy w komórkach Sf-9 i Tn-368 w pożywkach bezsurowiczych SF-900 i SF-900 II niż w pożywce Grace'a z 10% dodatkiem surowicy. Autorzy prac nad syntezą β -galaktozydazy w BSE wskazali na intensywne pobieranie podstawowych składników pożywek bezsurowiczych (glukozy, glutaminy i innych aminokwasów, tłuszczu, kwasów organicznych, witamin). Szybkie zużycie substancji pokarmowych w hodowlach bez dodatku surowicy stwarza konieczność wymiany zużytej pożywki na świeżą lub dodatku poszczególnych jej składników, np. w formie ultrafiltratu ekstraktu drożdżowego, mieszaniny aminokwasów czy wieloskładnikowych koncentratów (23,24,26).

Obok szeregu zalet wynikających z zastosowania w BSE pożywek bezsurowiczych istnieją również pewne niekorzystne zjawiska. Jednym z nich jest zwiększona wrażliwość komórek utrzymywanych na podłożach nie zawierających surowicy na wszelkie czynniki stresowe, jak wirowanie, zamrażanie dla ich długoterminowego przechowywania, siły hydrodynamiczne występujące w bioreaktorach, obecność antybiotyków i toksycznych metabolitów (1). Kolejnym niepożądanym efektem zastosowania pożywek niskobiałkowych, stwierdzonym w przypadku niektórych systemów bakulowirusowych, jest niekompletna modyfikacja potranslacyjna zrekombinowanych białek, co uniemożliwia uzyskanie białka identycznego z jego naturalnym odpowiednikiem. Niepełne modyfikacje dotyczą najczęściej procesów glikozylacji (1).

Zjawiskiem o ujemnym znaczeniu dla BSE jest zaobserwowany przez Clemm (27) tzw. „efekt pasażowania”. Wielokrotne pasażowanie komórek (>50 pasaży) w pożywkach nie zawierających surowicy zdecydowanie obniża ich podatność na infekcję i zdolność do syntezy zrekombinowanych białek. Clemm (27) stwierdził, że najlepsze właściwości posiadają komórki będące pomiędzy 12. a 15. pasażem od momentu zaadaptowania do pożywki bezsurowiczej (27).

Mimo dość szerokiej oferty gotowych pożywek, zarówno surowiczych, jak i bezsurowiczych, wielu badaczy prowadzi prace nad ulepszeniem starych i poszukiwaniem tańszych receptur. Przykładem może być opracowanie przez Donaldsona i Shulera (22) pożywki oznaczonej jako ISYL. Podłoże ISYL jest modyfikacją podstawowej pożywki IPL-41, do której dodano hydrolizat białka sojowego „Hy-Soy”, ultrafiltrat ekstraktu drożdżowego, emulsję tłuszczowo-sterolową i Pluronic F-68. Zastosowanie pożywki ISYL pozwoliło autorom na uzyskanie ludzkiej alkalicznej fosfatazy na poziomie porównywalnym do ilości otrzymanej przy wykorzystaniu znacznie droższej pożywki Ex-Cell 405TM (22). W wyniku badań prowadzonych przez Shih i Changa (28) doprowadzono również do stworzenia taniego, prostego podłoża będącego modyfikacją pożywki Mitsuhashi MTCM-1601 i służącego do hodowli komórek *Spodoptera litura* SL7B oraz namnażania dzikiego i zrekombinowanego wirusa AcNPV. Nowa pożywka ISC-03 przygotowana była na wodzie morskiej rozcieńczonej 4-krotnie wodą dejonizowaną i zawierała w swym składzie: ekstrakt drożdżowy, hydrolizat laktoalbuminy, glukozę i fruktozę. Pożywka ISC-03 mogła być sterylizowana przez 30-minutowe autoklawowanie w temperaturze 120°C. Do wyjałowionej pożywki dodawano surowicę bydlęcą w stężeniu 8%. Badając ekspresję obcego białka – transferazy acetylochloramfenikolu oraz ilość produkowanych ciał wtrętowych wirusa AcNPV w komórkach SL7B utrzymywanych w pożywkach TNM-FH i ISC-03, stwierdzono porównywalny poziom syntezy enzymu i replikacji wirusa (28).

Nową, nie wymagającą dodatku surowicy, pożywką jest podłoże oznaczone przez twórców jako YPR. Bazę dla YPR stanowi ultrafiltrat ekstraktu drożdżowego i Primatone[®] RL. Primatone[®] RL jest cennym źródłem wielu aminokwasów i peptydów uzyskanych poprzez enzymatyczne trawienie wybranej tkanki zwierzęcej. Autorzy prac stwierdzili, że zastosowanie pożywki YPR do hodowli komórek Sf-9 i High Five pozwala na osiągnięcie wysokiej koncentracji komórek, wynoszącej odpowiednio 5,4 i 6,1 × 10⁶/cm³ oraz na wydłużenie stacjonarnej fazy wzrostu, która często traktowana jest jako faza produkcyjna. Produktywność objętościowa zrekombinowanej, sekrecyjnej alkalicznej fosfatazy w pożywce YPR wynosiła 58 mg/dm³ (29).

Biorąc pod uwagę koszt i skalę procesu, stopień trudności w oczyszczaniu produktu i podatność białka na procesy degradacji można wstępnie ocenić przydatność pożywek surowiczych i bezsurowiczych. Jednak wobec wielu czynników wpływających na poziom ekspresji oraz trudności w sprecyzowaniu uniwersalnych reguł, dla osiągnięcia wysokiej produktywności zrekombinowanych białek czy uzyskania wydajnego preparatu wirusowego wyboru pożywki należy dokonać eksperymentalnie (27).

3.2. Warunki fizykochemiczne hodowli

Stworzenie optymalnych warunków wzrostu dla kultury owadziej pozwala na utrzymanie jej prawidłowego stanu, wysokiej żywotności i szybkiego tempa rozwoju. Zastosowanie właściwej pożywki hodowlanej i odpowiednich warunków fizyko-

chemicznych (temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, stopień natlenienia) pozwala na podwajanie populacji komórkowej w czasie od 20 do 24 godzin (30).

Owadzie kultury komórkowe są zdolne do namnażania się w szerokim zakresie temperatur od 18 do 30°C, jednak największy potencjał wzrostu wykazują w temperaturze 27-28°C. W temperaturach poniżej 24°C i powyżej 30°C obserwowane jest zdecydowane zmniejszenie szybkości metabolizmu komórkowego (21,30,31). Temperatury powyżej 35°C indukują syntezę związanych z szokiem termicznym białek stresowych (21-27 kDa i 67-78 kDa) (32).

Autorzy prac nad BSE nie są zgodni w formułowaniu wzajemnych relacji pomiędzy temperaturami optymalnymi dla wzrostu komórkowego, replikacji wirusa i syntezy rekombinowanych białek. Większość badaczy zakłada, że są one jednakowe, a co najwyżej mogą wystąpić między nimi nieznaczne różnice (21,31,33). Reuveny i in. (33) uzyskali zbliżony poziom syntezy dwóch białek β -galaktozydazy i glukocerebrozydazy w komórkach Sf-9 infekowanych w różnych temperaturach 22, 25 i 27°C. Badacze zanotowali znaczne zmniejszenie ilości syntetyzowanych białek w temperaturze 30°C (33).

Optymalne pH dla kultur owadzych jest lekko kwaśne i mieści się w zakresie 6,2-6,4. Ze względu na małe wahania pH w czasie namnażania komórek, jego kontrola i regulacja w hodowlach wielkoskalowych nie jest konieczna (31).

Kultury owadzie wykazują stosunkowo dużą tolerancję na zmiany ciśnienia osmotycznego pożywki. Dougherty i in. (34) stwierdzili, że komórki owadzie nie ulegają uszkodzeniu nawet przy wzroście ciśnienia osmotycznego z 50 do 450 mOsm/kg H₂O w ciągu 1 godziny (34). Dla komórek owadzych optymalną wartością opisywanego parametru jest 315-375 mOsm/kg H₂O (31).

Wieloletnie doświadczenia nad BSE wskazują na duże znaczenie tlenu dla metabolizmu i wzrostu komórkowego. Zapotrzebowanie komórek owadzych na tlen zależy od rodzaju linii komórkowej i fazy wzrostu. Szybkość zużycia tlenu przez komórki *T. ni* (Tn-368) w fazie logarytmicznej oszacowano na $6,2 \times 10^{-17}$ mola O₂/komórkę/sekundę, natomiast przez komórki Sf-21 na $4,5 \times 10^{-17}$ mola O₂/komórkę/sekundę (21). Natlenianie hodowli prowadzonych w małej skali, w butelkach czy naczyniach typu spinner, nie jest konieczne, gdyż ilość tlenu znajdująca się nad powierzchnią pożywki jest wystarczająca dla pokrycia zapotrzebowania rosnących komórek. Problem dostarczania tlenu pojawia się w hodowlach bioreaktorowych, szczególnie przy dużych gęstościach komórek. Kamen i in. (35) stwierdzili, że pobór tlenu w czasie logarytmicznej fazy wzrostu jest liniowo skorelowany z ilością żywych komórek (35). Hugler i in. (32) pozbawiając całkowicie komórki Sf-9 dostępu do tlenu, spowodowali w ciągu trzech pierwszych godzin zahamowanie ich rozmnażania, a następnie powolny spadek ich przeżywalności. W wyniku odcięcia dostępu tlenu po 21 godzinach hodowli przeżywalność kultury zmniejszyła się do 81%, a 15% populacji komórkowej uległo lizie. Autorzy stwierdzili również, że brak tlenu indukuje syntezę białek stresowych (32). Niedobór tlenu (poniżej 15% nasycenia) wywołuje również intensyfikację metabolizmu beztlenowego – glikolizę, której produktem

końcowym jest kwas mlekowy powodujący spadek pH pożywki (33). Optymalny stopień nasycenia pożywki powietrzem zapewniający całkowite pokrycie zapotrzebowania rosnących komórek na tlen oszacowano na 50% (36,37).

Większość badaczy zgadza się, że zapotrzebowanie komórek na tlen wzrasta po infekcji bakulowirusami (24,33,35,38,39). W zależności od typu wirusa użytego do infekcji, wzrost ten wynosi od 7 do 56% (38). Największy pobór tlenu notowany jest między 3 a 15 godziną po infekcji, kiedy zachodzą intensywne przemiany metaboliczne związane z produkcją białek wirusowych, replikacją DNA i tworzeniem potomnych pączkujących form wirusa.

Skuteczność natleniania pożywki zależna jest w dużym stopniu od procesu mieszania hodowli. Intensywne mieszanie pożywki generuje duże siły hydrodynamiczne, powodujące uszkodzenia błon cytoplazmatycznych (40-42). Niszczenie komórek powodować mogą również szybko wznoszące się, pękające i wywołujące małe zawrowania (Kolmogorowa) pęcherzyki powietrza (43). W celu uniknięcia napowietrzania pęcherzykowego opracowano specjalne bioreaktory, w których transport gazów do pożywki odbywa się na drodze dyfuzji cząsteczkowej (np. system *cell-lift*). Dla zmniejszenia bezpośredniego działania sił ścinających, proponuje się także zastosowanie systemów immobilizowanych, gdzie komórki owadzie są przyczepione do powierzchni porowatych lub włóknistych nośników, np. spiekanego szkła czy włókien poliestrowych (44,45). Dodatkowo w celu zwiększenia odporności komórek na mechaniczne uszkodzenia stosuje się w hodowlach bioreaktorowych dodatek substancji podnoszących lepkość pożywki, takich jak niejonowe polimery typu Pluronic czy karboksymetylocelulozę. Negatywnym efektem intensywnego napowietrzania jest również wzrost koncentracji wapnia wewnątrz komórek bezpośrednio narażonych na działanie stresu mechanicznego (46).

4. Parametry infekcji wirusowej

Poziom produkcji obcego białka w BSE jest zależny od wielu czynników środowiskowych, związanych zarówno z hodowlą komórkową, jak i procesem infekcji wirusowej. Podstawowymi parametrami infekcji są: dawka wirusa (MOI, *Multiplicity of Infection*), określająca początkową ilość cząstek wirusowych przypadającą na pojedynczą komórkę owadzią i czas infekcji (TOI, *Time of Infection*), wyrażany najczęściej przez gęstość populacji komórkowej w momencie infekcji (1,47).

Na podstawie przeprowadzonych badań nad BSE stworzono kilka modeli matematycznych, opisujących proces bakulowirusowej infekcji komórek owadzych. Shuler i in. (48) skoncentrowali się na opisie zjawiska replikacji bakulowirusa, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu wiązania cząstek wirusowych do powierzchni komórek (48). Gooijer i in. (49) określili model przebiegu procesu infekcji w różnych bioreaktorowych konfiguracjach wykorzystywanych do ciągłej hodowli komórek i bakulowirusów (49). Licari i Bailey (50) modelowali proces infekcji kultur owadzych w hodowlach

jednowarstwowych, gdzie głównym czynnikiem limitującym był brak powierzchni do wzrostu komórek, a nie ograniczenia pokarmowe. Autorzy pracowali również nad określeniem interakcji pomiędzy czasem infekcji i dawką wirusa (50,51).

Dogodnym obiektem do badań nad wpływem parametrów MOI i TOI okazał się bakulowirus β -gal-AcNPV zawierający gen β -galaktozydazy z *E. coli* działający pod promotorem poliedrynowym. Dogodność tego rekombinanta wynikała przede wszystkim z łatwości detekcji uzyskiwanego białka i jego ilościowego oznaczenia poprzez pomiar aktywności enzymatycznej (23,50-53). Wszyscy badacze wykorzystujący układ β -gal-AcNPV, niezależnie od uzyskanych wyników, zaobserwowali wzajemne korelacje pomiędzy dawką wirusa a fazą wzrostu komórek w momencie infekcji.

Licari i Bailey (50) stwierdzili nieznaczny wpływ MOI, którego wartość mieściła się w zakresie od 0,1 do 100 przy wirusowaniu komórek owadzych we wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego. Natomiast przesunięcie infekcji do fazy późnej wzrostu logarytmicznego i fazy stacjonarnej spowodowało zróżnicowanie w poziomie uzyskanej β -galaktozydazy przy odmiennych parametrach MOI. Maksymalną ilość produktu uzyskano przy infekcji komórek w późnej fazie wzrostu logarytmicznego przy MOI wynoszącym 100 (50). Dla hodowli na dużą skalę tak wysokie MOI nie jest korzystne, gdyż wymaga zastosowania ogromnej ilości wirusowego inokulum. Poza tym, wysoka dawka wirusa powoduje natychmiastowe zahamowanie podziałów komórkowych i wpływa na szybki wzrost śmiertelności zainfekowanych komórek, zazwyczaj jeszcze przed osiągnięciem maksimum produkcji obcego białka. Stwierdzono również, że zastosowanie wysokiego MOI generuje produkcję defektywnych cząstek wirusowych, co znacznie obniża zarówno ilość jak i jakość uzyskiwanych produktów białkowych (54). Wong i in. (52), Power i in. (51) oraz Bedard i in. (23) wykazali, że zbliżony poziom produkcji β -galaktozydazy można uzyskać stosując niższe wartości MOI i przeprowadzając infekcję we wcześniejszych fazach wzrostu komórkowego. Infekcja komórek o dużym potencjale wzrostu przy zastosowaniu niskiej dawki wirusa nie powodowała ograniczenia żywotności i pozwoliła na co najmniej dwukrotne zwiększenie populacji komórkowej, co pozytywnie wpłynęło na wydajność syntezy β -galaktozydazy (23,51,52).

Kioukia i in. (53) oraz Bedard i in. (23) wykazali duże znaczenie dostępności składników pokarmowych w momencie infekcji dla wzajemnych zależności pomiędzy parametrami MOI i TOI. Autorzy otrzymali porównywalną wydajność produkcji β -galaktozydazy przy MOI 1 i 50 infekując komórki w logarytmicznej fazie wzrostu i jednoczesnej wymianie pożywki na świeżą (23,53).

Na podstawie badań przeprowadzonych nad wpływem parametrów MOI i TOI na syntezę β -galaktozydazy, nie udało się stworzyć uniwersalnego modelu dla produkcji innych obcych białek w BSE. W większości przypadków pewne reguły i zależności są powtarzalne, ale nie pozwalają na dobór optymalnej dawki wirusa i czasu infekcji bez wykonania podstawowych doświadczeń. Odmienny charakter uzyskiwanych białek i ich różnorodne oddziaływanie na komórkę gospodarza mają duże znaczenie dla wartości MOI i TOI pozwalających na osiągnięcie maksymalnej wydajności synte-

zy. Na przykład Carpentier i in. (55) opisali bardzo korzystny wpływ niskich dawek wirusa (MOI 0,005) na końcową produktywność objętościową rekombinowanych białek, które posiadają tendencję do akumulacji w komórkach w formie nieaktywnej. Tak małe inokulum wirusowe powoduje opóźnienie procesu infekcji do późnego stadium fazy wzrostu logarytmicznego, charakteryzującego się wysoką gęstością populacji komórkowej i niedoborem podstawowych składników pokarmowych (55).

Podstawowe parametry infekcji – MOI i TOI – mają również wpływ na poziom aktywności proteolitycznej i rozkład enzymatyczny obcych białek wewnątrz i na zewnątrz infekowanych komórek. Cruz i in. (56) oraz Naggie i Bentley (57) stwierdzili, że komórki infekowane przy zastosowaniu wyższych dawek wirusa (np. 10 pfu/kom.) wykazują obniżoną wewnątrzkomórkową aktywność proteolityczną. Autorzy zanotowali jednak wzrost zawartości proteaz w pożywce hodowlanej przy infekcji przeprowadzonej przy dużych wielokrotnościach MOI (56,57). Mniejsze dawki wirusa (np. 0,5 pfu/kom.) nie indukowały żadnych zmian aktywności enzymatycznej wywołanej procesem zawirusowania (56).

Naggie i Bentley (57) stwierdzili, że na aktywność proteolityczną w pożywce istotny wpływ wywiera również czas infekcji. Infekcja komórek we wczesnej i środkowej fazie logarytmicznego wzrostu powodowała maksymalną zewnątrzkomórkową aktywność proteaz w 72 g.p.i. Niższą aktywność enzymatyczną pożywki przy zawirusowaniu w późnej fazie wzrostu logarytmicznego autorzy wiążą z przesunięciem czasowym, wywołanym wolniejszym przebiegiem infekcji i późniejszą lizą komórek. Analogiczne procesy stwierdzono w odniesieniu do aktywności wewnątrzkomórkowej, która w 72 g.p.i. znacznie spadła przy infekcji we wczesnej i środkowej fazie, natomiast zachowywała się bez zmian podczas infekcji w fazie późnej logarytmicznego wzrostu (57).

Wielu autorów w przeprowadzonych badaniach wskazywało na bardzo silne związki jakie istnieją pomiędzy parametrami MOI i TOI, aktywnością proteolityczną oraz jakością i ilością uzyskiwanych zrekombinowanych białek w różnych BSE. Dlatego dobór optymalnych warunków infekcji i ekspresji obcych genów jest dla niektórych BSE trudny i często związany z koniecznością poszukiwania kompromisowych rozwiązań.

5. Jakość wirusowego inokulum

Jednym z czynników warunkujących skuteczny proces infekcji oraz wydajną produkcję zrekombinowanego białka jest jakość wirusowego inokulum. Świadczy o tym nie tylko wysokie miano, ale również obecność zmutowanych wirusów, tzw. mutantów poliedrowych (FP, *few polyhedra*) oraz defektywnych, interferujących cząstek wirusowych (DIPs, *defective interfering particles*) (5,58).

Zawartość w inokulum nieprawidłowych cząstek FP wirusa typu dzikiego powoduje wzrost ilości infekcyjnych form pączkujących BV i obniżenie wydajności proces-

su tworzenia ciał okluzyjnych wirusa. Oszacowano, że przy infekcji z udziałem FP liczba uzyskiwanych poliedrów na komórkę wynosi 15, co stanowi wartość co najmniej o połowę niższą niż przy infekcji z zastosowaniem standardowego wirusa MP, zawierającego wiele poliedrowych ciał okluzyjnych (58). W wyniku przeprowadzonych analiz restrykcyjnych zaobserwowano, że większość mutacji FP jest związanych z insercją komórkowego DNA do wewnątrz genu *fp25* wirusowego genomu (5). Produkcja poliedrowych mutantów zachodzi *in vitro* i indukowana jest przez wielokrotne pasażowanie wirusa oraz *in vivo* przez zakażanie larw formą BV. Nie zaobserwowano natomiast obecności mutantów FP przy infekcji larw realizowanej przez podawanie larwom pokarmu skażonego ciałami okluzyjnymi wirusa (5).

Seryjne pasażowanie wirusa, nawet przy niskich jego dawkach, może wywoływać również innego typu mutacje. O'Reilly i Miller (59) stwierdzili w niektórych ułomnych cząstkach wirusowych delecję w regionie genu *egt*, kodującego UDP – glukozylotransferazę specyficzną dla ekdysteroidów, umożliwiającą wirusowi blokowanie przeobrażania owadów (59).

Defektywne, interferujące cząstki wirusowe obserwowane są w prawie wszystkich zwierzęcych systemach wirusowych i tworzą się również na skutek tzw. „efektu pasażowania”. Zmutowane cząstki zawierają tylko część wirusowego genomu, zbudowane są z normalnych strukturalnych białek wirusowych, namnażają się tylko w obecności wirusa pomocniczego i specyficznie interferują z replikującym homologicznym wirusem standardowym (57). Autorzy wykazali, że nawet kilkukrotne pasażowanie wirusa AcNPV może prowadzić do utraty 43% jego DNA (60)

Lier i in. (61,62), Gooijer i in. (49), Wickham i in. (54) oraz Vlak i in. (63) badali defektywne cząstki wirusa zrekombinowanego β -gal-AcNPV i proces ich tworzenia przez wielokrotne pasażowanie wirusowego inokulum. Autorzy stwierdzili, że anormalne wirusy posiadają genom zmniejszony o około 44% i mają mniejsze rozmiary, co zostało udokumentowane i przedstawione w pracy Wickhama i in. (54). Skracanie wirusowego DNA było wynikiem delecji dużych fragmentów w obrębie regionu poliedrynowego zawierającego gen β -galaktozydazy oraz regionu kodującego polimerazę DNA. Badacze zaobserwowali, że zmutowane cząstki zrekombinowanego wirusa były niezdolne do samodzielnego namnażania i wykorzystywały aparat replikacyjny wirusów prawidłowych. Zawartość krótszego DNA w DIPs wirusa pozwalała im na intensywniejsze rozmnażanie i szybszą dominację środowiska, co w konsekwencji doprowadzało do zmniejszenia miana wirusa i ograniczenia produkcji β -galaktozydazy (49,54,61-63).

Przedmiotem badań był również wpływ dawki wirusa na produkcję ułomnych cząstek wirusowych. Autorzy opisali, że zastosowanie wysokich dawek wirusa zwiększa ryzyko powstawania DIPs. Natomiast niskie dawki powodują zmniejszenie prawdopodobieństwa zainfekowania komórki owadziej przez dwa wirusy wadliwy i prawidłowy (wspomagający), dając większą szansę wirusowi prawidłowemu, i tym samym przyczyniają się do zmniejszenia procentowego udziału zmutowanych cząstek wirusa w hodowli (54).

Z uwagi na duże znaczenie „efektu pasażowania” dla wydajności produkcji obcych białek oraz miana i jakości uzyskiwanego wirusa, proponuje się stosowanie oczyszczonego inokulum wirusowego o niskim numerze pasażu. Niestety niemożliwe jest wyeliminowanie efektu pasażowania przy prowadzeniu hodowli metodą ciągłą. W procesach ciągłych już po 10-20. dniach hodowli obserwuje się znaczny spadek produktywności bioreaktora (62). Alternatywą dla systemów ciągłych, pozwalającą na ominięcie negatywnego wpływu wielokrotnego pasażowania wirusa, są wielkoskalowe hodowle okresowe. W tym przypadku jednak dużym problemem staje się konieczność zastosowania dużej ilości wirusowego inokulum o bardzo wysokim mianie (54).

6. Skala hodowli

W uzyskanych wynikach badań nad BSE wskazuje się na duże zróżnicowanie wzrostu i metabolizmu komórek owadzych w zależności od skali hodowli. Odmienne warunki panujące w kolejnych naczyniach hodowlanych o coraz większej pojemności decydują o konieczności adaptacji komórek i optymalizacji ich wzrostu na każdym etapie powiększania skali. W butelkach hodowlanych komórki przyczepiają się do powierzchni naczynia i rosną w bezpośredniej bliskości, tworząc kulturę jednowarstwową. Kultury takie mają charakter stacjonarny, nie wymagają mieszania i napowietrzania. Pośrednim naczyniem pomiędzy butelką a bioreaktorem jest proste naczynie hodowlane wyposażone w mieszadło magnetyczne tzw. spinner. Warunki przemysłowej produkcji wielkoskalowej najlepiej oddają laboratoryjne bioreaktory umożliwiające mieszanie i napowietrzanie kultury, ciągłe monitorowanie jej przebiegu i automatyczne regulowanie podstawowych jej parametrów.

W studiach nad proliferacją i metabolizmem komórek owadzych w różnej skali hodowli, wykazano, że najlepsze warunki środowiskowe zapewniające szybki i efektywny rozwój kultury panują w hodowlach zawieszinowych o małych objętościach (do 2 dm³) prowadzonych w spinnerach (53,64). W badaniach przeprowadzonych nad wydajnością bakulowirusowego systemu ekspresyjnego w różnej skali produkcji wskazano, że najwyższe objętościowe produktywności heterologicznych białek i okludowanych form wirusa obserwowane są w hodowlach stacjonarnych (64,65). Uważa się jednak, że hodowle zawieszinowe zapewniają lepsze warunki środowiskowe dla procesu infekcji wirusowej. Brak ograniczeń dyfuzyjnych i swobodna ekspozycja komórkowych miejsc receptorowych to cenne właściwości charakteryzujące kultury zawieszinowe (66,67). Dzięki tym zaletom szybkość przyłączania cząstek wirusa do powierzchni komórki wrażliwej w spinnerach jest 2-3 razy większa niż w butelkach, a proces infekcji jest bardziej skuteczny i lepiej zsynchronizowany (68). Niestety niewystarczająca ilość tlenu w pożywce będąca następstwem obniżonego współczynnika transferu tlenu z fazy gazowej do ciekłej, stres mechaniczny i hydrodynamiczny prowadzący do uszkodzenia komórek są przyczyną ograniczonej

i zmniejszającej się w miarę wzrostu skali hodowli, wydajności produkcji heterologicznych białek w BSE.

Literatura

1. O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A., (1994), *Baculovirus expression vectors*, Oxford University Press.
2. Life Technologies™ Bac-to-Bac™ baculovirus expression systems instructional manual GibcoBRL, (1998).
3. Huser A., Rudolph M., Hofmann C., (2001), *Biotech. Nature*, 19, 451-455.
4. Duisit G., Saleun S., Douthe S., Barsoum J., Chadeuf G., Moullier P., (1999), *J. Gene Med.*, 1, 93-102.
5. Granados R. R., McKenna K. A., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc. New York, 13-39.
6. Shuler M. L., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc. New York, 41-49.
7. Taticek R. A., Choi C., Phan S. E., Palomares L. A., Shuler M. L., (2001), *Biotechnol. Prog.*, 17, 676-684.
8. Wickham T. J., Davis T. R., Granados R. R., Shuler M. L., Wood H. A., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 391-396.
9. Davis T. R., Wickham T. J., McKenna K. A., Granados R. R., Shuler M. L., Wood H. A., (1993), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A, 388-390.
10. Lee D. F., Chen C. C., Hsu T. A., Juang J. L., (2000), *J. Virol.*, 74, 11873-11880.
11. Hammer D. A., Wickham T. J., Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc. New York, 103-119.
12. Hefferon K. L., Oomens A. G. P., Monsma S. A., Finnerty C. M., Blissard G. W., (1999), *Virology*, 258, 455-468.
13. Rohrmann G. F., (1992), *J. General Virol.*, 73, 749-761.
14. Grace T. D. C., (1962), *Nature*, 195, 788-789.
15. Tom R. L., Debanne M. T., Bedard C., Caron A. W., Massie B., Kamen A. A., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 53-58.
16. Lambert K. J., Birch J. R., (1985), *Animal cell Biotechnology*, 1, Eds. Spier R. E., Griffiths J. B., Acad. Press, New York, 86-122.
17. Jesionowski G. A., Atai M. M., (1997), *Biotechnol. Progress.*, 13, 355-360.
18. Maurer H. R., (1992), *Animal Cell Culture*, Ed. Freshney R. I., IRL Oxford University Press, 15-46.
19. Butler M., (1991), *Mammalian Cell Biotechnology. A practical Approach*, IRL Press, Oxford University Press, 1-24.
20. Weiss S. A., Godwin G. P., Gorfien S. F., Whitford W. G., (1993), *Insect cell culture engineering*, Marcel Dekker Inc., New York, 179-219.
21. Trampler J., Lier F. L. J., Kool M., Gooijer C. D., Vlak J. M., (1992), *Rec. Adv. Biotechnol.*, 263-284.
22. Donaldson M. S., Shuler M. L., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 573-579.
23. Bedard C., Jolicoeur M., Jardin B., Tom R., Perret S., Kamen A., (1994), *Biotechnol. Tech.*, 8, 605-610.
24. Wong T. K., Nielsen L. K., Greenfield P. F., Reid S., (1994), *Cytotechnol.*, 15, 157-167.
25. Lynn D. E., (1999), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.*, 35, 248-251.
26. Elias C. B., Zeiser A., Bedard C., Kamen A. A., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 381-388.
27. Clemm D. L., (1994), *Baculovirus Expression Vectors*, Oxford University Press, 241-248.
28. Shih C.-J., Chang J.-C., (1997), *Appl. Entomol. Zool.*, 32, 589-594.
29. Ikonomou L., Bastin G., Schneider Y. J., Agathos S. N., (2001), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.*, 37, 549-559.

30. King L. A., Possee R. D., (1992), *Baculovirus expression system. A laboratory guide*, Chapman & Hall UK.
31. Hild H. M., Emery A. N., Al-Rubeai M., (1992), *Work on baculovirus and recombinant protein production processes*, Roche, Basel, Switzerland, 316-321.
32. Hugler W., O'Connor K. C., Landry S. J., Bivins J. E., (1995), *Cytotechnol.*, 15, 91-101.
33. Reuveny S., Kim Y. J., Kemp C. W., Shiloach J., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 619-623.
34. Dougherty E. M., Weiner R. M., Vaughn J. L., Reichelderfer C. F., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1168-1172.
35. Kamen A. A., Bedard Ch., Tom R., Perreet S., Jardin B., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 36-48.
36. Hu Y. C., Bentley W. E., (1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 1065-1071.
37. Zhang F. M., Saarinen M. A., Itle L. J., Lang S. C., Murhammer D. W., Linhardt R. J., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 219-224.
38. Kioukia N., Nienow A. W., Al-Rubeai M., Emery A. N., (1996), *Biotechnol. Prog.*, 12, 779-785.
39. Caron A. W., Tom R. L., Kamen A. A., Massie B., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 881-891.
40. Grajek W., (1993), *Biotechnologia*, 2(21), 22-34.
41. Malinowski J. J., Daugulis A. J., (1993), *Insect cell culture engineering*, Marcel Dekker Inc., New York, 51-68.
42. Tramper J., Gooijer de K. D., Vlák J. M., (1993), *Insect cell culture engineering*, Ed. Goosen M. F. A., Daugulis A. J., Faulkner P., Marcel Dekker, Inc., New York, 139-177.
43. Jankowski T., Grajek W., (1993), *Biotechnologia* 3(22), 166-183.
44. Agathos S. N., (1993), *Insect Cell Culture Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York, 221-240.
45. Kompier R., Kislev N., Segal I., Kadouri A., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 822-827.
46. Aloï E., Cherry R. S., (1994), *J. Biotechnol.*, 33, 21-31.
47. Shuler M. L., Hammer D. A., Granados R. R., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc., New York, 1-12.
48. Shuler M. L., Cho T., Ogonah O., Kool M., Hammer D. A., Granados R. R., Wood H. A., (1990), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 589, 399-422.
49. Gooijer C. D., Koken R. H. M., van Lier F. L. J., Kool M., Vlák J. M., Tramper J., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 537-548.
50. Licari P., Bailey J. E., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 432-441.
51. Power J. F., Reid S. R., Radford K. M., Greefield P. F., Nielsen L. K., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 710-719.
52. Wong K. T. K., Peter C. H., Greefield P. F., Reid S. R., Nielsen L. K., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 659-666.
53. Kioukia N., Nienow A. W., Emery A. N., Al-Rubeai M., (1995), *J. Biotechnol.*, 38, 243-251.
54. Wickham T. J., Davis T., Granados R. R., Hammer D. A., Shuler M. L., Wood H. A., (1991), *Biotechnol. Lett.*, 13, 483-488.
55. Carpentier E., Lebesgue D., Kamen A. A., Hogue M., Bouvier M., Durocher Y., (2001), *Protein Exp. Purif.*, 23, 66-74.
56. Cruz P. E., Martins P. C., Alves P. M., Peixoto C. C., Santos H., Moreira J. L., Carrondo M. J. T., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 133-143.
57. Naggie S., Bentley W. E., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 227-232.
58. Taticek R. A., Hammer D. A., Shuler M. L., (1995), *Overview of issues in bioreactor design and scale-up*, in: *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc., 131-174.
59. O'Reilly D. R., Miller L. K., (1989), *Science*, 245, 1110-1112.
60. Pijlman G. P., van den Born E., Martens D. E., Vlák J. M., (2001), *Virology*, 283, 132-138.
61. van Lier F. L. J., van der Meijis W. C. J., Grobbsen N. G., Olie R. A., Vlák J. M., Tramper J., (1992), *J. Biotechnol.*, 22, 291-298.
62. van Lier F. L. J., van Duijnhoven G. C. J., de Vaan M. M. J. A. C. M., Vlák J. M., Tramper J., (1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 60-64.
63. Vlák J. M., van Lier F. L. J., Voncken J. W., Kool M., van den End E. J., Usmany M., de Gooijer C. D., Tramper J., (1990), *Biologicals from recombinant microorganisms and animal cells. Production and recovery*

- ry, Eds. White M. D., Reuveny S., Shafferman A., Proceedings of the 34th Oholo Conference Eilat, Israel, VCH, 221-233.
64. McKenna K. A., Hong H., Nunen E., Granados R. R., (1998), *J. Invertebrate Pathol.*, 71, 82-90.
 65. Pasumarthy M. K. Murhammer D. W., (1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 314-319.
 66. Dalal N. G., Bentley W. E., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 325-329.
 67. Dee K. U., Shuler M. L., Wood H. A., (1997a), *Biotechnol. Bioeng.*, 54, 191-205.
 68. Dee K. U., Shuler M. L., (1997), *Biotech. Bioeng.*, 54, 468-490.
 69. Agathos S. N., (1991), *Biotech. Adv.*, 9, 51-68.
 70. Davis T. R., Granados R. R., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc., New York, 121-130.