

Agregatna onečišćenja u monoklonskim protutijelima - imunogenost i izazovi u provjeri kakvoće

Portolan, Katarina

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:082733>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Katarina Portolan

**AGREGATNA ONEČIŠĆENJA U MONOKLONSKIM PROTUTIJELIMA –
IMUNOGENOST I IZAZOVI U PROVJERI KAKVOĆE**

Specijalistički rad

Zagreb, 2024

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 5. rujna 2024.

na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Biljana Nigović
2. izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček
3. dr. sc. Maja Lusina Kregar, znanstvena suradnica

Rad ima 130 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad izrađen je pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Iskreno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na mentorstvu, susretljivosti, pomoći i iznimnoj strpljivosti koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i Agenciji za lijekove i medicinske proizvode na pruženoj prilici za stručnim usavršavanjem i novim izazovima te kolegicama iz Odsjeka za ocjenu kakvoće za ideje, potporu i pomoć.

Najveće hvala upućujem svojoj obitelji na bezgraničnoj pomoći, podršci i razumijevanju.

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

Agregatna onečišćenja u monoklonskim protutijelima – imunogenost i izazovi u provjeri kakvoće

Cilj istraživanja

Cilj rada je dati sveobuhvatnu analizu karakterizacije i kontrole agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima, radi osiguravanja odgovarajuće kakvoće i učinkovitosti te smanjivanja njihove imunogenosti.

Hipoteze istraživanja su:

- nastanak agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima se može smanjiti, ali ne i u potpunosti izbjeći;
- razumijevanje mehanizama agregacije i primjena najsuvremenijih metoda karakterizacije i kvantifikacije agregata u monoklonskim protutijelima osigurava odgovarajuću kontrolu kakvoće i smanjuje mogućnost nastanka agregata tijekom proizvodnje i čuvanja lijeka;
- agregacija proteina između referentnog i biosličnog lijeka je usporediva.

Materijal i metode

Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu, od općih prema specijaliziranim člancima, na temu razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela, nastanka agregatnih onečišćenja i njihovog imunogenog potencijala te načina kako izbjeći, odnosno minimizirati agregaciju proteina. Pri pretraživanju literature su traženi odgovori na specifična pitanja vezana uz problematiku ovog specijalističkog rada, u cilju potkrepe predloženih hipoteza.

Pretražene su bibliografska baza podataka (*PubMed*) i baza podataka s cjelovitim tekstom (*Science Direct*), kojima je pristupano elektroničkim putem preko umreženog računala koje ima

online pristup spomenutim bazama. Regulatorne smjernice i pravni dokumenti relevantni za problematiku ovog rada su istraženi pristupom mrežnih stranicama i bazama regulatornih Agencija (EMA, FDA, HALMED), Europske komisije te Europske (Ph. Eur.) i Američke farmakopeje (USP). Na temelju pretraživanih izvora su izvedeni vlastiti zaključci o predmetnoj problematici.

Rezultati

Agregacija proteina je neizbježan događaj karakterističan za gotovo sve faze u proizvodnji proteina, transport, čuvanje i primjenu lijeka te predstavlja velik izazov u proizvodnji monoklonskih protutijela. Proteinska agregacija se uglavnom može predvidjeti i donekle prevenirati još tijekom razvoja formulacije i proizvodnje monoklonskih protutijela. Agregati različitih proteina pokazuju veći imunogeni potencijal u odnosu na pojedinačne podjedinice (monomere), a pretpostavlja se da je razlog tomu razlika u veličini i vrsti agregata, njihovoj konformaciji te morfologiji. Razumijevanje mehanizama agregacije i razvoj prikladnih strategija njezine minimizacije su zadnjih desetljeća postali imperativ u razvoju proteinskih lijekova, u cilju osiguravanja njihove kliničke učinkovitosti. Zasad nije u potpunosti jasno imaju li sve vrste agregata jednak imunogeni potencijal te se ne može unaprijed znati koja je agregatna onečišćenja potrebno kontrolirati u lijeku. Prema posljednje važećim smjernicama i preporukama regulatornih agencija, svojstva svih agregata koji se mogu detektirati trebaju biti odgovarajuće karakterizirana, a sadržaj kontroliran i rutinski nadziran u svim biološkim lijekovima. Na temelju dosadašnjeg iskustva, zaključeno je kako se kvantifikacija proteinskih agregata treba provesti na temelju njihove veličine te se uobičajeno istovremeno koriste barem dvije ortogonalne metode temeljene na različitim principima rada. Usporednim ispitivanjima na razini kakvoće između biosličnih i referentnih lijekova je utvrđeno kako imaju slične profile onečišćenja, obzirom na sadržaj agregatnih onečišćenja.

Zaključak

Obzirom na strukturne i ostale karakteristike proteina, tijekom proizvodnje, čuvanja, transporta i primjene većine monoklonskih protutijela često dolazi do agregacije proteina. Ovisno o svojstvima, agregatna onečišćenja mogu značajno utjecati na kakvoću, djelotvornost i sigurnost monoklonskih protutijela, posebice u vidu izazivanja pojačane imunogenosti, što može dovesti do smanjenog djelovanja lijeka i značajnih nuspojava kod pacijenata. Nastanak agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima se može smanjiti, ali ne i u potpunosti izbjeći.

Razumijevanje mehanizama agregacije i razvijanje strategija smanjivanja nastanka agregatnih onečišćenja su bitni za minimiziranje nastanka imunogenog učinka monoklonskih protutijela. Isto tako, primjena sofisticiranih i specifičnih ortogonalnih analitičkih metoda za karakterizaciju i kvantifikaciju agregatnih onečišćenja te njihov daljnji razvoj osiguravaju odgovarajuću kontrolu kakvoće i smanjuje mogućnost nastanka agregata tijekom proizvodnje i čuvanja lijeka. Utvrđeno je kako su referentni biološki lijekovi i njihove bioslične inačice usporedivi obzirom na čistoću i profil onečišćenja (obzirom na fragmente, procesna onečišćenja i neglikozilirane forme), stupanj agregacije te vrstu agregata i ostalih molekula veće molekulske mase.

Summary

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Aggregates in monoclonal antibodies – immunogenicity and challenges in quality control

Objectives

The objective of this work is to provide the comprehensive analysis of the characterization and quality control of the aggregate impurities in monoclonal antibodies (mABs). The aim is to ensure that mABs and other biotherapeutics are of adequate safety, quality and efficacy, with the reduced immunogenic potential as much as possible.

Hypotheses are the following:

- the formation of aggregate impurities in mABs can be decreased, but not completely avoided;
- understanding of the mechanisms of aggregation and the use of the sophisticated methods of characterization and quantification of aggregates in mABs ensure an adequate control of aggregation and reduce the possibility for the formation of aggregates during the production and storage of the drug products;
- protein aggregation between the reference drug product and the biosimilar is comparable.

Material and methods

Through this work, the importance of an adequate characterization and control of the aggregate impurities in monoclonal antibodies in a timely manner has been emphasized, in order to ensure their safety, quality and efficacy. This is especially important from the aspect of the mABs immunogenicity and its consequent possible decrease. The mechanisms of protein aggregation and the specific types of aggregates that can occur considering the protein properties and the drug product storage conditions have been described. There is a special emphasis on the

possible enhanced immune response of the patients on the drug product due to the presence of aggregate impurities.

Results

Protein aggregation is an inevitable event specific for almost all protein manufacturing stages, as well as its transport, storage and drug administration. It represents a huge challenge in the production of monoclonal antibodies. Protein aggregation is mostly predictable and in some way it can be prevented during the development of the formulation and the production of mABs. Aggregates from different proteins show a higher immunogenic potential compared to the monomers and it is assumed that the main reason for this is the difference in size and type of aggregates, their conformation and morphology. Understanding of the mechanisms of aggregation and the strategy development for its minimization have become imperative in the development of protein drug products in recent decades, all with the aim to ensure their clinical efficacy. So far, it is not entirely clear whether all types of aggregates have the same immunogenic potential and it is not possible to know which aggregate impurities should be controlled in the drug product in advance. According to the recent guidelines and the recommendations from the regulatory bodies, the properties of all detectable aggregates should be properly characterized and their content routinely monitored in mABs. Based on the previous experience, it was assumed that the quantification of protein aggregates should be carried based on their size, at least with two orthogonal methods based on different principles. From the comparative studies regarding quality between biosimilars and the reference drug products it has been concluded that impurity profiles are similar, also considering the content of protein aggregates.

Conclusion

Considering the structural and other characteristics of proteins, protein aggregation occurs often during the production of the most of monoclonal antibodies, their storage, transport and administration. Depending on their properties, aggregates could significantly affect the quality, safety and efficacy of mABs, especially considering the immunogenic potential that could lead to decreased drug activity, as well as significant side effects in patients. The formation of protein aggregates in mABs can be reduced but not completely avoided. Understanding of the mechanisms of aggregation and strategy development for reduction of aggregates formation are essential for minimization of the immunogenic effects of mABs. Likewise, the application of

sophisticated and specific orthogonal analytical methods for the characterization and quantification of aggregates and their further development ensure adequate quality control and reduce the possibility of aggregates formation during the production and storage of biological drugs. It has been established that the reference biological drug products and their biosimilar versions are comparable considering the purity and impurity profile (with regard to fragments, impurities and non-glycosylated forms), the level of aggregation, as well as the type of aggregates and other molecules of higher molecular weight.

SADRŽAJ SPECIJALISTIČKOG RADA:

1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1 Monoklonska protutijela	3
1.1.1 <i>Građa monoklonskih protutijela</i>	3
1.1.2 <i>Funkcija i mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela</i>	4
1.1.3 <i>Konjugati i derivati monoklonskih protutijela</i>	6
1.2. Vrste monoklonskih protutijela i njihova proizvodnja	9
1.2.1 <i>Mišja monoklonska protutijela</i>	11
1.2.2 <i>Kimerna monoklonska protutijela</i>	12
1.2.3 <i>Humanizirana monoklonska protutijela</i>	13
1.2.4 <i>Humana monoklonska protutijela</i>	13
1.3 Izazovi u razvoju i proizvodnji monoklonskih protutijela	16
1.3.1 <i>Faze u proizvodnji monoklonskih protutijela</i>	17
1.3.2 <i>Varijabilnosti i kritični parametri kakvoće u procesu proizvodnje monoklonskih protutijela</i>	19
1.4 Agregacija i agregatna onečišćenja u monoklonskim protutijelima	21
1.4.1 <i>Vrste agregata</i>	22
1.4.2 <i>Uzroci i mehanizmi agregacije</i>	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNAJA O TEMI	28
4. RASPRAVA	30
4.1 Imunogenost agregata u monoklonskim protutijelima	31
4.1.1 <i>Čimbenici koji utječu na imunogenost monoklonskih protutijela i ostalih bioloških lijekova</i>	32
4.2 Agregati u monoklonskim protutijelima – regulatorni aspekti	36
4.3 Kontrola agregacije tijekom razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela – smjernice i iskustva	38
4.4 Kontrola i minimiziranje agregacije u monoklonskim protutijelima	40
4.4.1 <i>Kontrola agregacije tijekom proizvodnje bioloških lijekova</i>	40
4.4.1.1 <i>Uzvodna faza uzgoja u bioreaktoru (engl. upstream process)</i>	40
4.4.1.2 <i>Nizvodna faza proizvodnje bioloških lijekova (engl. downstream process)</i>	41
4.5 Prevencija i minimiziranje intrinzične agregacije proteina te uzroci nestabilnosti koje dovode do agregacije proteina	43
4.5.1 <i>Faktori koji utječu na fizičko – kemijsku stabilnost monoklonskih protutijela</i>	45
4.5.1.1 <i>Fizičke nestabilnosti koje mogu dovesti do agregacije proteina</i>	50
4.5.1.2 <i>Kemijske nestabilnosti koje mogu dovesti do agregacije</i>	51

4.6 Karakterizacija i provjera kakvoće monoklonskih protutijela	52
4.6.1 Zahtjevi kakvoće (specifikacije) monoklonskih protutijela – regulatorni zahtjevi	56
4.6.2 Onečišćenja u monoklonskim protutijelima i ostalim biološkim lijekovima	58
4.6.3 Metode korištene u karakterizaciji i ispitivanju kakvoće monoklonskih protutijela	59
4.6.3.1 Kromatografske metode.....	60
4.6.3.2 Elektroforetske metode	60
4.6.3.3 Spektroskopske metode.....	61
4.6.3.4 Elektrokemijske metode.....	62
4.6.3.5 Ostale metode	62
4.7 Kontrola kakvoće monoklonskih protutijela tijekom čuvanja, transporta i primjene lijeka	62
4.8 Metode karakterizacije i kvantifikacije proteinskih agregata	63
4.8.1 Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena koloidne stabilnosti:	65
4.8.1.1 Upotreba fluorescentnih boja.....	65
4.8.1.2 Hidrodinamična kromatografija (engl. hydrodynamic chromatography, HDC)	66
4.8.1.3 Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. dynamic light scattering, DLS)	66
4.8.1.4 Tehnika razdvajanja protočnim poljem (engl. field-flow fractionation, FFF)	66
4.8.1.5 Kapilarna gel elektroforeza (engl. capillary gel-electrophoresis, CGE).....	67
4.8.1.6 Mjerenje rezonancije mase (engl. resonant mass measurement, RMM)	68
4.8.2 Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena konformacijske stabilnosti	68
4.8.2.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR).....	68
4.8.2.2 Masena spektrometrija (engl. mass spectrometry, MS) i spektrometrija ionske pokretljivosti	70
4.8.2.3 Ultrazvučna spektroskopija (engl. ultrasound spectroscopy, US).....	70
4.8.2.4 Raman spektroskopija (engl. Raman spectroscopy, RS).....	71
4.8.2.5 Cirkularni dikroizam (engl. circular dichroism, CD)	71
4.8.3 Tradicionalne metode za karakterizaciju agregatnih onečišćenja.....	72
4.8.3.1 Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) i kapilarna elektroforeza (engl. capillary electrophoresis, CE).....	72
4.8.3.2 Kromatografija isključenjem po veličini spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti (engl. size-exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering, SEC-MALLS)	72
4.8.3.3 Analitičko ultracentrifugiranje (engl. analytical ultracentrifugation, AUC)	73
4.8.3.4 Analiza i praćenje nanočestica (engl. nanoparticle tracking analysis, NTA)	74
4.8.3.5 Cirkularni dikroizam (engl. circular dichroism, CD)	74

4.8.3.6 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR</i>).....	74
4.8.3.7 Fluorescencija	74
4.8.3.8 Kvantitativna laserska difrakcija (engl. <i>quantitative laser diffraction, QLD</i>)	75
4.8.3.9 Flow-imaging analiza (engl. <i>flow imaging analysis, FIA</i>)	75
4.8.4 Nove tehnologije za karakterizaciju agregatnih onečišćenja (engl. <i>emerging technologies, state-of-the art technologies</i>).....	76
4.8.4.1 Mjerne / slikovne tehnike (engl. <i>imaging technologies</i>)	76
4.8.4.1.2 Transmisijska elektronska mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy, TEM</i>).....	76
4.8.4.1.3 Mikroskopija atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy, AFM</i>).....	76
4.8.4.2 Makroskopske tehnike.....	77
4.8.4.2.1 Masena spektrometrija (engl. <i>mass spectrometry, MS</i>) i spektrometrija ionske pokretljivosti	77
4.8.4.2.2 Raspršenje rendgenskog zračenja pod malim kutom (engl. <i>small-angle X-ray scattering, SAXS</i>) i raspršenje neutrona pod malim kutom (engl. <i>small-angle neutron scattering, SANS</i>).....	77
4.8.4.2.3 Ograničena proteoliza i analiza interakcije proteina umrežavanjem (engl. <i>cross-linking</i>).....	77
4.8.4.3 Tehnologije visoke razlučivosti (engl. <i>high resolution technologies</i>).....	78
4.8.4.3.1 Metoda izmjene vodik / deuterij povezana s masenom spektrometrijom (engl. <i>hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry, HDX-MS</i>)	78
4.8.4.3.2 Nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance, NMR</i>)	79
4.8.4.4 Algoritmi za predviđanje agregacije <i>in silico</i>	80
4.8.5 Usporedba agregacije između referentnih i biosličnih lijekova.....	82
4.8.5.1 Bioslični lijekovi (engl. <i>biosimilars</i>).....	82
4.8.5.2 Usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka (faza 3).....	85
4.8.5.3 Usporedna ispitivanja kakvoće.....	85
4.8.5.4 Usporedna neklinička ispitivanja	86
4.8.5.5 Usporedna klinička ispitivanja	87
4.8.5.6 Usporedba agregacije kod biosličnog i referentnog monoklonskog protutijela	87
5. ZAKLJUČAK	93
6. LITERATURA	99
7. ŽIVOTOPIS	110

1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

U posljednjih nekoliko desetljeća ubrzan je razvoj biotehnoških lijekova, dominantno monoklonskih protutijela, obzirom na njihovu visoku specifičnost, ciljano djelovanje i sve bolji profil nuspojava koji pokazuju u odnosu na ostale lijekove. Njihova dostupnost je omogućila lakše i kvalitetnije liječenje brojnih kroničnih i često životno ugrožavajućih bolesti, poput različitih vrsta tumora, infektivnih, autoimunih i upalnih bolesti te različitih poremećaja koji mogu zahvatiti mnoge druge organske sustave (1).

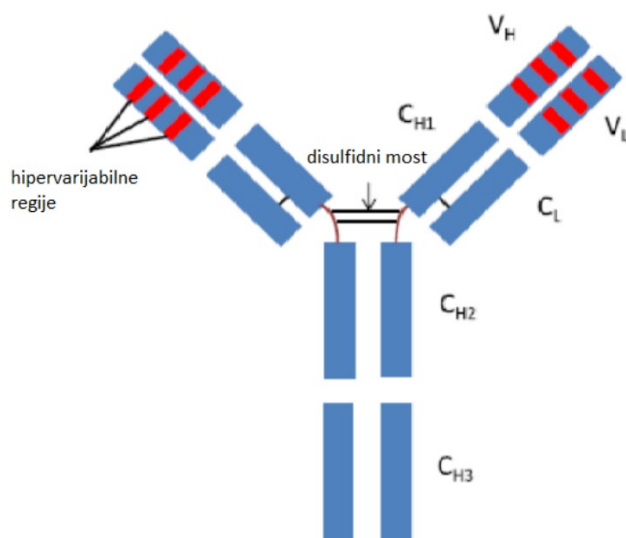
Razvojem novih tehnika proizvodnje i naprednijih molekularno – bioloških metoda, razvijaju se nova monoklonska protutijela čija će se primjena u budućnosti širiti i na druga terapijsko – dijagnostička područja. No, niti napredne tehnologije ne mogu u potpunosti eliminirati izazove i probleme u njihovoj proizvodnji koji su direktna posljedica svojstava proteina – primjerice nastanak proteinskih agregata. Reverzibilni i ireverzibilni agregati različitih veličina i svojstava mogu nastati tijekom svih faza proizvodnje, kao i tijekom njihovog čuvanja, transporta i primjene (2). Agregacija proteina se smatra kritičnim svojstvom kakvoće koje može značajno utjecati na sigurnost, djelotvornost i kakvoću monoklonskih protutijela. Osim smanjenog djelovanja, do kojeg može doći uslijed smanjenja biološke aktivnosti, jako važna direktna posljedica prisutnosti agregatnih onečišćenja je i izazivanje pojačane imunogenosti monoklonskih protutijela, odnosno stvaranja protutijela na lijek, što može imati višestruko ozbiljne posljedice na zdravlje pacijenta (3).

Razumijevanje procesa agregacije, razvijanje odgovarajuće strategije minimiziranja nastanka različitih vrsta agregata u monoklonskim protutijelima, kao i njihova adekvatna karakterizacija i kontrola kakvoće pomoću sve naprednijih i specifičnih analitičkih metoda su od iznimne važnosti u generiranju kvalitetnog i učinkovitog lijeka sigurnog za primjenu, s minimalnim rizikom od imunogenih reakcija.

1.1 Monoklonska protutijela

1.1.1 Građa monoklonskih protutijela

Monoklonska protutijela proizvode plazma stanice koje nastaju aktivacijom, proliferacijom i diferencijacijom pojedinačnog klona B-limfocita, nakon njihova kontakta s epitopima antigena (dio antigena na koji se veže protutijelo preko paratopa – vezno mjesto za antigen na protutijelu) (4). To su velike heterodimerne glikoproteinske molekule građene od četiri polipeptidna lanca, dva teška i dva laka, povezana disulfidnim vezama i koja tvore oblik slova Y (Slika 1).

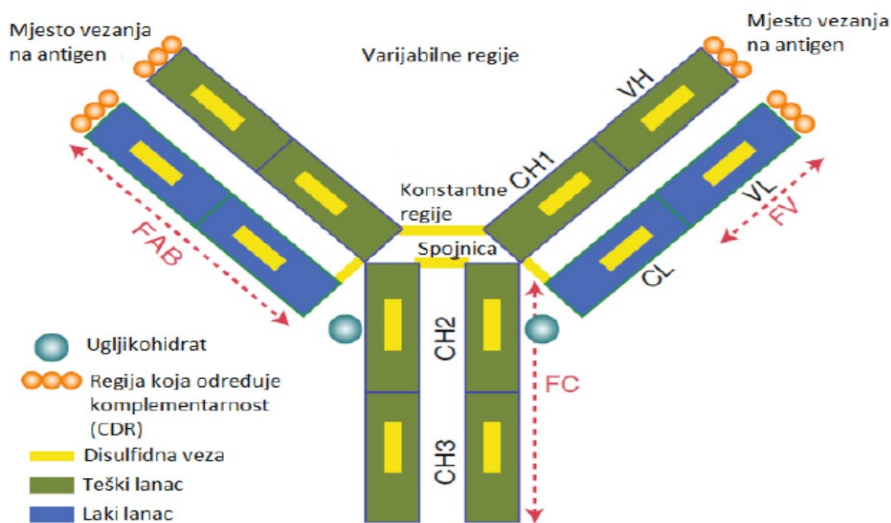


Slika 1. Struktura monoklonskog protutijela (preuzeto i prilagođeno iz (5)).

Laki lanci humanih monoklonskih protutijela spadaju u jednu od dvije klase, κ ili λ , dok ovisno o tipu teškog lanca u serumu čovjeka postoji 5 izotipova imunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM (6). Sva su monoklonska protutijela građena od konstantne (engl. *constant*, C) i varijabilne (engl. *variable*, V) regije. Teški lanac svih izotipova imunoglobulina sadrži tri ili četiri konstantne (C_H) i jednu varijabilnu regiju (V_H), dok laki lanac sadrži po jednu konstantnu (C_L) i varijabilnu (V_L) regiju (6). Obzirom na teške i lake polipeptidne lance, razlikujemo varijabilnu regiju teškog i lakog lanca (engl. *variable heavy*, V_H ; *variable light*, V_L) te konstantnu regiju teškog i lakog lanca (engl. *constant heavy*, C_H ; *constant light*, C_L) (7,8). Varijabilna regija teškog i lakog lanca čini Fv-fragment (engl. *fragment variable*) i sastoji se od tri hipervarijabilne sekvence odgovorne za vezanje na epitop antigena (engl. *complementarity determining region*, CDR – regije koje određuju komplementarnost).

CDR regija Fv-fragmenta odgovorna je za vezanje monoklonskog protutijela na epitop, dok Fc-fragment reagira s receptorima različitih stanica i odgovoran je za efektorsku funkciju IgG-a (8,9).

Većina monoklonskih protutijela dosad odobrenih u terapijske svrhe pripada skupini imonoglobulina G, koji se dijele na četiri podtipa: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 (5). Dvije su glavne funkcionalne domene protutijela: Fab (paratop; funkcija vezanja za antigen) i Fc (domena koja posreduje u imunološkom odgovoru uslijed interakcije protutijela s antigenom) (Slika 2).



Slika 2. Struktura imunoglobulina G (preuzeto i prilagođeno iz (7,8)).

1.1.2 Funkcija i mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela

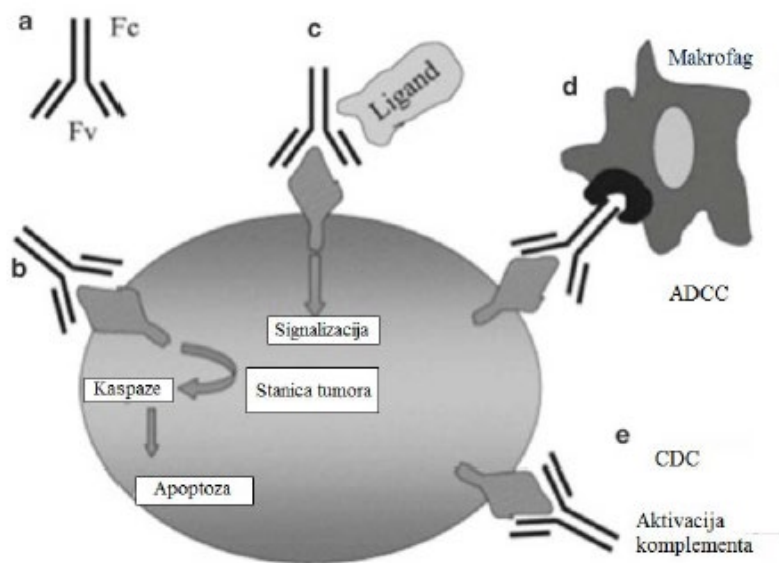
Protutijela se specifično vežu na epitope antigena te, ovisno o svojstvima tog epitopa, protutijela mogu imati antagonističko djelovanje (blokiranje, odnosno sprečavanje djelovanja antigena) ili agonističko djelovanje. Osim djelovanja na ciljne antigene, također mogu imati efektorske funkcije i djelovati posredno aktivirajući staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (engl. *antibody dependent cell cytotoxicity*, ADCC) kao i toksičnost ovisnu o komplementu (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC) (7,8,10).

Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela su mnogostruki (Slika 3):

- direktno agonističko ili antagonističko djelovanje na ciljni antigen preko epitopa (npr. antagonisti faktora tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), IgE i različitih

interleukinskih (engl. *interleukin*, IL) receptora, lijekovi koji ih blokiraju i sudjeluju u uklanjanju ciljnih antigena);

- citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC), posredovana reakcijom između Fc regije protutijela i proteina C1q iz sustava komplementa, što u konačnici dovodi do stvaranja kompleksa koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*, MAC) i uzrokuje lizu stranih stanica (npr. rituksimab koji se veže na transmembranski antigen CD20 B-limfocita) (11);
- stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody dependent cell cytotoxicity*, ADCC), koja za posljedicu ima aktivaciju prirodno-ubilačkih stanica (engl. *natural killer*, NK), monocita ili makrofaga (npr. trastuzumab koji inhibira receptor humanog epidermalnog rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor 2*, HER2) (12);
- inhibicija rasta i poticanje apoptoze stanica (aktivacija unutarstaničnih kaspaza, cijepanje DNA, fragmentacija jezgre te bubrenje stanične membrane) (7).



Slika 3. Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela na stanicu tumora. a) monoklonsko protutijelo; b) inhibicija rasta i poticanje programirane smrti stanice; c) direktno vezanje na epitop ciljnog antigena (agonističko ili antagonističko djelovanje); d) aktiviranje stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC); e) citotoksičnost ovisna o komplementu (preuzeto i prilagođeno iz (8,10)).

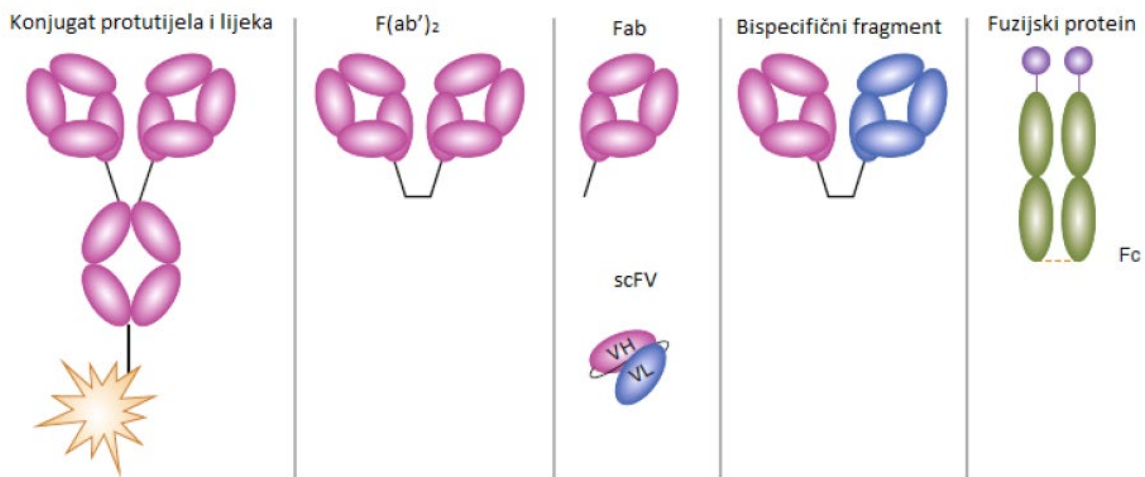
1.1.3 Konjugati i derivati monoklonskih protutijela

Iako su imunoglobulini G dominantno korištena protutijela u kliničke svrhe, njihova primjena u liječenju karcinoma je ograničena, obzirom na njihovu veličinu i posljedično otežan ulazak u stanice solidnih tumora. Nadalje, Fc fragment imunoglobulina G može dodatno dovesti do imunogene reakcije posrednom aktivacijom imunosnog sustava (13). Po uzoru na monoklonska protutijela i njihovu uspješnu i raznovrsnu kliničku primjenu, danas se u terapijske svrhe koriste i njihove sljedeće inačice:

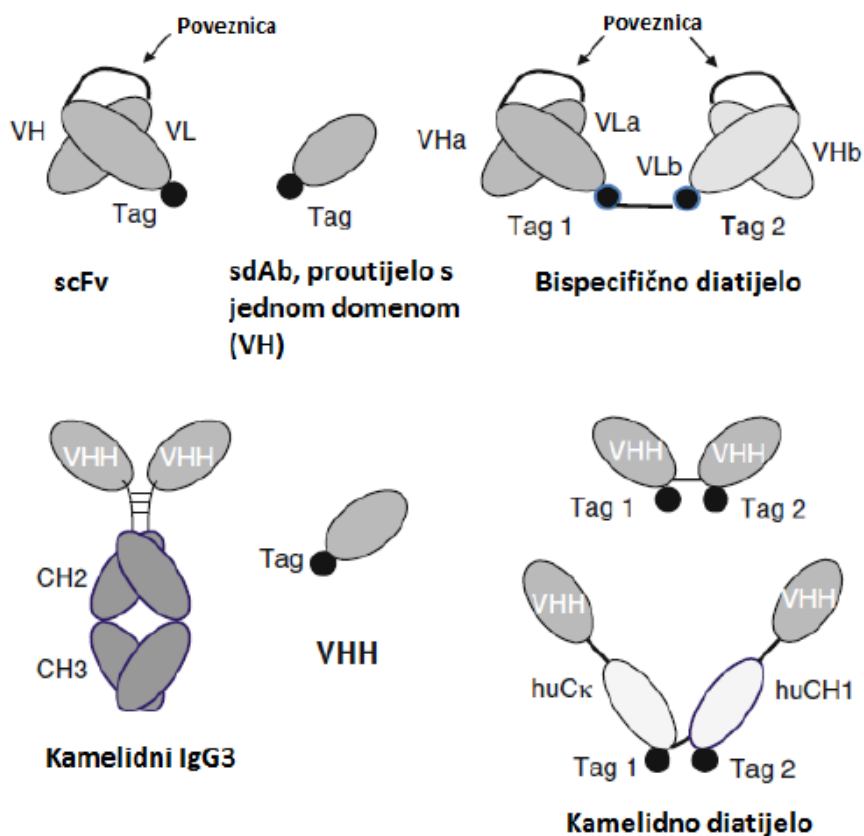
- fragmenti protutijela: fuzijski proteini poput Fab fragmenata (fuzijski proteini koji se sastoje od konstantne Fc regije i receptora), scFV fragmenata (engl. *single chain Fv*; fuzijski proteini varijabilne regije teškog i lakog lanca imunoglobulina), dimernog F(ab')₂ fragmenta, Fc fragmenti (neposredni produkti kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga dobivenih kloniranjem komplementarne DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) varijabilnih reagija imunoglobulina (4,8,14);
- bispecifična monoklonska protutijela – fragmenti dva različita monoklonska protutijela koji se vežu na dva različita antigena (direktna aktivacija i usmjeravanje T-limfocita prema tumorskim antigenima (13,15–17);
- IgG – scFv fuzijska protutijela – tetravalentna bispecifična monoklonska protutijela kod kojih je scFv-fragment spojen na konstantni dio bispecifičnog monoklonskog protutijela te se i scFv i protutijelo vežu za različite antigene (8,13);
- bispecifični scFv fragmenti koji aktiviraju T-limfocite (engl. *bispecific T-cell engagers*, BiTEs) – sastoje se od dva scFv fragmenta različitih protutijela, a vežu se na receptore tumorskih stanica i na CD3 receptore na površini T-limfocita, potičući staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (8,13,18);
- diatijelo (engl. *diabody*) – bivalentni dimer scFv-fragmenta (ukoliko se veže s još jednim bivalentnim dimerom scFv-fragmenta, tvori bispecifično tandemsko diatijelo (7,8);
- protutijela s jednom domenom (engl. *single-domain antibody*, sdAb) ili nanotijela (engl. *nanobodies*) (13);
- protutijela kamelida – teški lanci koji se sastoje od varijabilne regije teškog lance (VHH) i dvije konstantne regije teškog lanca (CH2 i CH3) izolirani iz deve, ljame, alpake i sl.) (8,13);

- ne – IgG proteinski nosači (engl. *non-IgG protein scaffolds*) – afitijela (engl. *affibodies*), antikalini (engl. *anticalins*), DARPini (engl. *designed ankyrin repeat proteins*, DARPins), monotijela (engl. *monobodies*) itd. – fragmenti koji lakše ulaze u stanice tumora i imaju brži klirens u serumu u odnosu na čitava protutijela (prednost primjene u dijagnostici tumora) (13);
- imunocitokini – fuzijski proteini protutijela i citokina (npr. interleukini (IL-2, IL-12), interferoni, TNF- α , kemokini i dr.) koji podupiru imunski odgovor protiv tumorskih stanica i imaju veliki afinitet i specifičnost za antigene tumorskih stanica (engl. *tumor-associated antigen*) (bolja učinkovitost i viša lokalna koncentracija citokina, što prevenira nastanak sistemske toksičnosti) (13).

Neke od spomenutih inačica su prikazane niže na Slikama 4 i 5.



Slika 4. Konjugati i derivati monoklonskih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz (7,8)).



Slika 5. Derivati monoklonskih protutijela novije generacije (preuzeto i prilagođeno iz (8)).

Monoklonska protutijela mogu služiti i kao prijenosnici citotoksičnih radionuklida i drugih lijekova te u tom slučaju govorimo o radioimunoterapeuticima (engl. *radioimmunotherapy*, RIT) ili konjugatima protutijela i lijeka (engl. *antibody drug conjugate*, ADC) (13,19,20). Ovakva ciljana isporuka lijeka na mjesto djelovanja (engl. *target drug delivery*) se ostvaruje u nekoliko koraka:

- 1) kovalentnim vezanjem radionuklida ili drugog lijeka na monoklonsko protutijelo;
- 2) internalizacijom protutijelo – antigen kompleksa u ciljanu stanicu;
- 3) otpuštanjem radionuklida ili drugog lijeka unutar ciljane stanice i
- 4) uplitanjem lijeka u unutarstanične mehanizme (npr. razaranje DNA i mikrotubula posredovanih citotoksičnom tvari kalikeamicinom ili taksanskim derivatima ili pak inhibicija sinteze DNA posredovana doksorubicinom) (13,18,21).

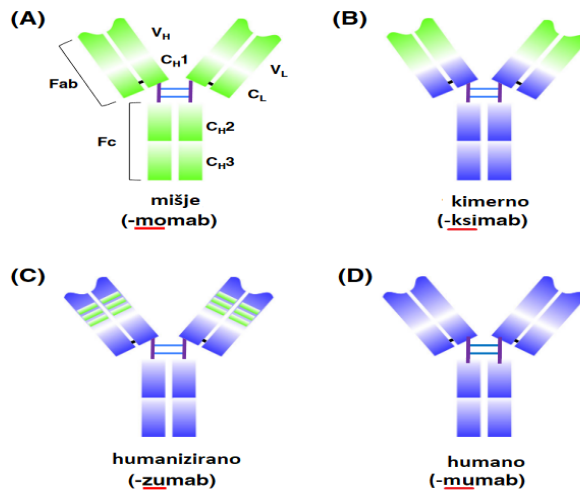
Dosad je za kliničku primjenu odobreno 15 konjugata protutijela i lijeka. Da imaju obećavajući terapijski potencijal u području liječenja malignih bolesti, svjedoči i podatak kako se trenutno preko 100 konjugata protutijela i lijeka nalazi u različitim fazama kliničkog razvoja (13,20,22). Kroz 2024. i 2025. se očekuje odobravanje 3 konjugata od strane FDA (datopotamab

deruxtecan – Dato DXd (AstraZeneca/Daiichi Sankyo), patritumab deruxtecan - HER3-DXd) (Daiichi Sankyo / Merck') i telisotuzumab vedotin – ABBV-399 (AbbVie) (22).

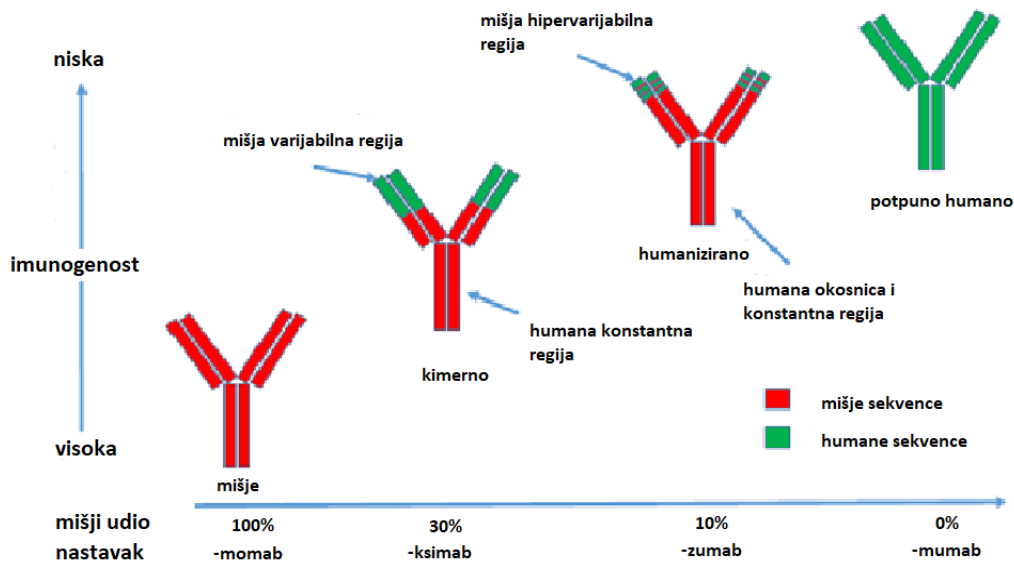
1.2. Vrste monoklonskih protutijela i njihova proizvodnja

Inicijalno razvijena monoklonska protutijela su bila u potpunosti mišjeg porijekla (i varijabilna i konstantna regija) (23). Svojevrsna era monoklonskih protutijela je počela 1986. odobravanjem lijeka Orthoclone OKT3[®] (proizvođač Ortho Biotech – danas Janssen Biotech, Inc), monoklonskog protutijela mišjeg porijekla (muromonab-CD3). Radi imunosupresivnog učinka, lijek je inicijalno indiciran za sprečavanje odbacivanja tkiva nakon transplantacije organa (24). Osim što označava službeni početak primjene revolucionarnih lijekova koji su do danas dominantni među ostalim biološkim lijekovima, odobravanje prvog monoklonskog protutijela ujedno označava i prekretnicu u polju transplantacije solidnih organa. Obzirom na svoju karakterističnu građu, muromonab-CD3 je prilikom primjene dovodio do oslobađanja velikih količina proupalnih citokina, što je uzrokovalo jake imunosne reakcije i nuspojave kod pacijenata. Radi dostupnosti drugih bioloških lijekova koji su u međuvremenu razvijeni i registrirani, a koji su imali isti ili bolji učinak te bolji sigurnosni profil (manje imunogen potencijal), Orthoclone OKT3[®] je 2011. povučen s tržišta (24,25).

S razvojem molekularno – biotehnoških metoda u proizvodnji monoklonskih protutijela, od prvog odobrenog monoklonskog protutijela mišjeg porijekla do danas, za različite je indikacije razvijen i odobren velik broj monoklonskih protutijela složenije građe, preko kimernih, humaniziranih do naposljetku humanih inačica koje se odlikuju visokom specifičnošću vezanja za ciljne antigene i manjim imunogenim potencijalom (Slike 6 i 7).



Slika 6. Shematski prikaz humanizacije protutijela od mišjih (zelene domene) do potpuno humanih protutijela (narančaste domene) i pripadajućih nastavaka. A) Mišje monoklonsko protutijelo. B) Kimerno monoklonsko protutijelo: varijabilne regije su mišjeg porijekla, a ostatak lanca je humanog porijekla. C) Humanizirano monoklonsko protutijelo: uključuju samo hipervarijabilne regije mišjeg porijekla. D) Humano monoklonsko protutijelo. C_H : domena konstantne regije teškog lanca; C_L : konstantna regija lakog lanca; Fab i Fc: fragmenti nastali proteolizom; V_H : varijabilna regija teškog lanca; V_L varijabilna regija lakog lanca (preuzeto i prilagođeno iz (25)).



Slika 7. Humanizacija monoklonskih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz (23)).

1.2.1 Mišja monoklonska protutijela

Mišja monoklonska protutijela su u potpunosti (100%) mišjeg porijekla i dobivaju se tehnologijom hibridoma stanica. Navedena tehnologija je prvi put uvedena 1975. godine (Köhler i Milstein) i omogućila je proizvodnju čistih monoklonskih protutijela u velikim količinama, pritom omogućavajući osnovna istraživanja monoklonskih protutijela, kao i ispitivanje njihovog potencijala u kliničkoj primjeni (7,25). Hibridoma stanice nastaju spajanjem stanične linije tumora (mijeloma stanica – tumorskih B-limfocita) i stanica imunskog sustava (stanica slezene miša: B-limfocita koji proizvode protutijela nakon imunizacije miša nekim antigenom) (8,23,26). Na taj se način mogu proizvesti neograničene količine bilo kojeg protutijela i proizvode se protutijela specifična samo za jedan antigen (27). Osim ranije spomenutog muromonaba-CD3, prvog odobrenog terapijskog monoklonskog protutijela (24), još neki primjeri čistih mišjih monoklonskih protutijela su ibritumomab tiuksetan (specifičan za CD20 antigen B-limfocita) (28), blinatumomab (bispecifični aktivator T-limfocita preko proteina CD3 i B-limfocita preko proteina CD19) (29) i moksetumomab pasudotoks

(imunotoksin s ciljanim djelovanjem na protein CD22 na B-limfocitima) čije je odobrenje ukinuto 2021 (30).

1.2.2 Kimerna monoklonska protutijela

U cilju prevladavanja nedostataka i problema u proizvodnji mišjih monoklonskih protutijela (velik imunogeni potencijal, smanjena djelotvornost, upotreba stanica domaćina porijeklom iz životinja, nedovoljan titar protutijela dobiven hibridoma tehnologijom), znanstvenici su razvili metode pomoću kojih su mišja protutijela preinačili u strukture sličnije ljudskim protutijelima, a bez gubitka specifičnih svojstava vezivanja (25). Tehnologija rekombinantne DNA omogućila je razvoj sljedeće generacije – kimernih monoklonskih protutijela. Ova metoda podrazumijeva umetanje čitave antigen – specifične varijabilne regije mišjeg protutijela u konstantne regije humanog protutijela, što za posljedicu ima nastanak kimernog monoklonskog protutijela, u kojem je udio humanih sekvenci 60 – 70% (31). Početak proizvodnje kimernih monoklonskih protutijela istovjetan je proizvodnji mišjih protutijela tehnologijom hibridoma stanica (izolacija B-limfocita iz slezene miša nakon imunizacije antigenom te njihovo spajanje s mijeloma stanicama, nakon čega slijedi proizvodnja željenih monoklonskih protutijela). Izolirani genski fragmenti za varijabilne teške i lake lance se spajaju s genskim odsječcima za konstantne teške i lake lance iz humanih stanica. Transfekcijom gena u stanice sisavaca dobivaju se klonovi koji se uzgajaju u kulturi stanica u cilju proizvodnje željenih protutijela (8,32).

Specifičnost vezanja na antigen je usporediva s onom kod mišjih monoklonskih protutijela, no humana Fc-regija omogućuje dulje vrijeme poluživota *in vivo* i manju imunogenost u usporedbi s mišjim, dok su efektorske funkcije (citotoksičnost ovisna o komplementu i stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima) slične za obje vrste monoklonskih protutijela (8,31). Prvo kimerno monoklonsko protutijelo je bilo abciksimab, antagonist glikoproteina IIb/IIIa (Fab fragment), koje je odobreno 1994. u SAD-u i koristilo se za inhibiciju agregacije trombocita u kardiovaskularnim bolestima (25). Nadalje, prvo kimerno monoklonsko protutijelo indicirano za onkološke bolesti bio je rituksimab, antagonist transmembranskog antigena CD20 na B – limfocitima, odobren 1997. u SAD-u i 1998. u EU za liječenje ne-Hodgkinovog limfoma (11,25).

1.2.3 Humanizirana monoklonska protutijela

Daljnjom humanizacijom kimernih monoklonskih protutijela su razvijena humanizirana monoklonska protutijela, kod kojih je mišjeg porijekla jedino regija koja određuje komplementarnost (engl. *complementary-determining region*, CDR) (7,8). Postupak mora biti selektivan kako bi se zadržala specifičnost vezanja protutijela na antigen, tj. ne smije doći do promjene u regijama koje određuju komplementarnost (8,25). Najčešće korištena metoda za dobivanje humaniziranih monoklonskih protutijela je metoda umetanja mišjih CDR-regija u okvir varijabilne regije humanih monoklonskih protutijela (engl. *CDR-grafting*). Iz mišjeg protutijela se izolira DNA koja kodira za regije koje određuju komplementarnost i uvodi se u DNA koja kodira za humano monoklonsko protutijelo. Vektor koji nosi rekombinantnu DNA se nakon toga eksprimira u kulturi stanica sisavaca (8,33,34). U tako proizvedenom monoklonskom protutijelu je udio humanih sekvenci 90 – 95% te je posljedično i puno manji imunogeni potencijal u odnosu na mišja i kimerna monoklonska protutijela (9,25,31). Prvo humanizirano monoklonsko protutijelo je bilo daklizumab, blokator IL-2 receptora na T-limfocitima, koje je odobreno 1997. u SAD-u za prevenciju odbacivanja presađaka kod transplantacije (25,35). Neki od primjera odobrenih humaniziranih monoklonskih protutijela i danas korištenih u klinici u rutinskom liječenju malignih bolesti su trastuzumab (veže se na HER2 receptore (12)), bevacizumab (veže se na receptor za VEGF (36)) i obinutuzumab (veže se na receptore CD20 antigena na B-limfocitima) (37).

1.2.4 Humana monoklonska protutijela

U cilju daljnjeg smanjenja imunogenosti i postizanja bolje kompatibilnosti monoklonskih protutijela s ljudskim organizmom, otkrivene su nove metode humanizacije protutijela koje su omogućile razvoj potpuno humanih monoklonskih protutijela. Takva monoklonska protutijela ne sadrže mišje sekvence. Jedna od takvih metoda – kombinatorijske knjižnice bakteriofaga – je razvijena 1990., a zasniva se na mogućnosti kloniranja strane DNA u filamentozne bakteriofage (7,14,34). Nakon što se željene DNA sekvence kloniraju u genom bakteriofaga, one se ekspimiraju kao fuzijski proteini na površini bakteriofaga (25). Zahvaljujući metodi lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) pomoću koje je omogućeno kloniranje komplementarne DNA (cDNA) varijabilnih regija imunoglobulina, kombinatorijske knjižnice bakteriofaga čine skup B-limfocita jedinice od koje je cDNA dobivena (8,14). Do danas je razvijen veliki broj knjižnica koje se razlikuju u dizajnu, porijeklu

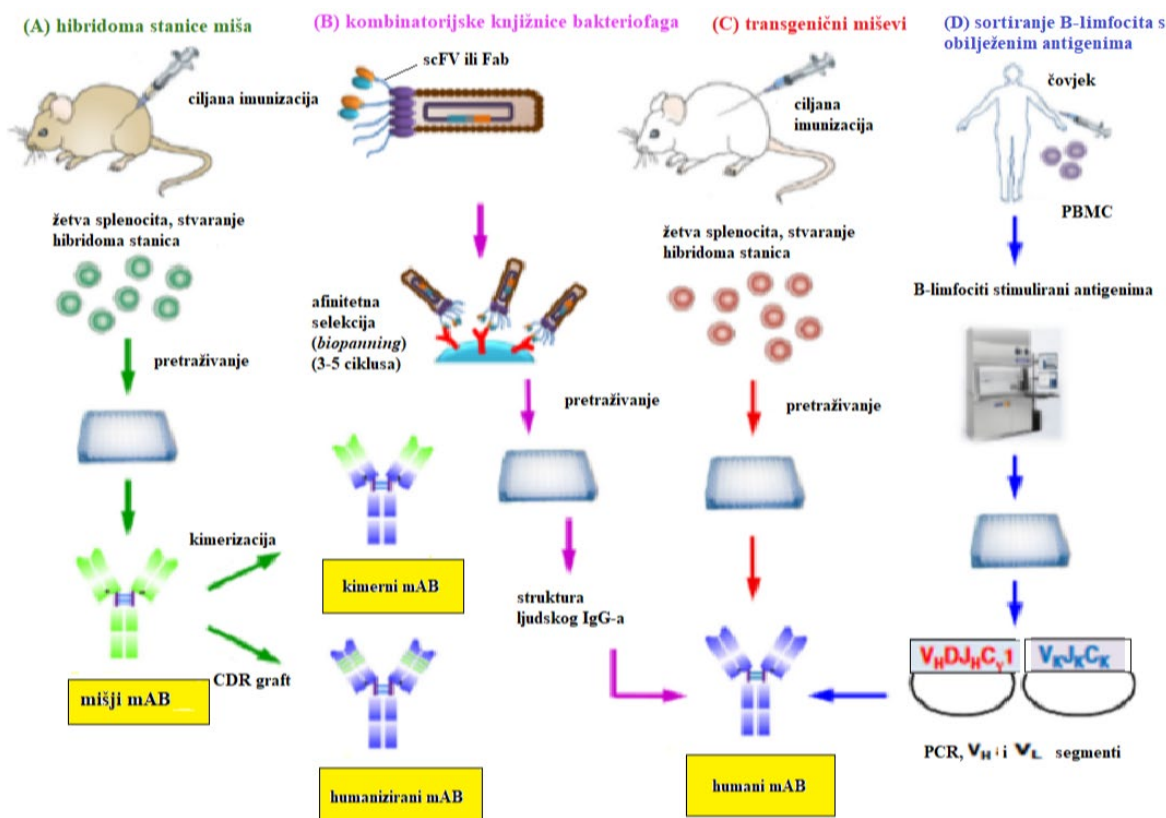
i raznolikosti. Obzirom na izvor gena, može se proizvesti nekoliko glavnih vrsta knjižnica: imunosne (kloniranje gena ili cDNA varijabilnih regija protutijela plazma stanica imuniziranih ili inficiranih jedinki), sintetske i polusintetske (izolacija fragmenta protutijela koji ima visok afinitet za gotovo svaki antigen) (14,38). Geni se kloniraju u bakteriofag pomoću vektora (fagmid - hibrid plazmida i bakteriofaga), koji se uvodi u stanicu *E. coli*. Zbog ograničenja u sklapanju ljudskih proteina u *E. coli*, u bakteriji je moguće eksprimirati samo fragmente protutijela poput scFv-a i Fab-a (8,14,38). Nakon što je stvorena, cijela knjižnica bakteriofaga se pretražuje kako bi se identificiralo željeno protutijelo ili njegov fragment (engl. *biopanning*, afinitetna selekcija) i može se koristiti za dobivanje novih protutijela (8,14,38).

Uz kombinatorijske knjižnice bakteriofaga, druga najčešće korištena metoda za dobivanje humanih monoklonskih protutijela su transgenični miševi. U transgeničnim miševima, mišji imunoglobulinski geni zamijene se humanima, a potom se miševi imuniziraju antigenom kako bi se dobila specifična humana protutijela. Nastala protutijela su cjeloviti imunoglobulini G, imaju potpuno humanu sekvencu te visok afinitet i specifičnost vezanja (8).

Transgenični miševi se imuniziraju na klasičan način te se iz mišjeg tkiva izoliraju zreli B-limfociti. Takva se protutijela mogu jednostavno proizvesti koristeći uobičajenu hibridoma tehnologiju (8,39). B-limfociti se spajaju s mijeloma stanicama te se nastale hibridoma stanice uzgajaju u mediju, gdje proizvode veće količine protutijela (8,26,27). Danas odobrena monoklonska protutijela ili ona u kliničkim ispitivanjima iz transgeničnih miševa dobivena su uporabom nekoliko mišjih linija, poput *XenoMouse*, *UltiMab*, *TransChromo* i *VelocImmunea* (8,40).

Adalimumab je prvo humano monoklonsko protutijelo dobiveno iz kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga (odobren je u EU 2003. godine za liječenje reumatoidnog artritisa, a 2007. za liječenje Chronove bolesti), dok je panitumumab prvo humano monoklonsko protutijelo dobiveno iz transgeničnih životinja i odobren je u EU 2007. godine (7,8,41,42).

Osim kombinatorijskih knjižnica bakteriofaga, za dobivanje humanih monoklonskih protutijela uspješno su razvijene i bakterijske i ribosomske knjižnice te knjižnice kvasca, no unatoč razvoju drugih metoda, knjižnice bakteriofaga su i dalje najčešće korištena metoda za dobivanje humanih monoklonskih protutijela (8). Niže je priložena shema različitih pristupa u razvoju i proizvodnji monoklonskih protutijela (Slike 8 i 14).



Slika 8. Pristupi u razvoju monoklonskih protutijela: (A) Tradicionalni pristup pomoću hibridoma stanica miša počinje imunizacijom miševa željenim antigenima u cilju izazivanja imunogenosti. Hibridoma stanice koje proizvode protutijela nastaju fuzijom stanica slezene miša i mijeloma stanica. Nakon pretraživanja, izoliraju se nukleotidni sljedovi iz željenih protutijela koja se koriste za stvaranje kimernih ili humaniziranih monoklonskih protutijela. (B) Kombinatorijske knjižnice bakteriofaga se koriste za identifikaciju željenog protutijela (ili njegovog fragmenta), što se uglavnom postiže putem afinitetne selekcije (engl. *biopanning*). Nakon 3-5 ciklusa afinitetne selekcije, pomoću ELISA metode se pretražuju bakteriofagi od interesa. Provodi se analiza DNA te se izoliraju geni koji kodiraju za željeni protein iz genoma bakteriofaga koji se mogu klonirati u prikladan ekspresijski sustav radi dobivanja većih količina proteina. (C) Transgenični miševi – slično pristupima hibridoma stanica miša i sortiranja humanih B-limfocita s obilježenim antigenima. (D) Sortiranje B-limfocita s obilježenim antigenima – iz B-limfocita bolesnih ili cijepljenih donora, izoliraju se PBMC stanice pomoću protočne citometrije (engl. *flow cytometry*). Nadalje, pomoću RT-PCR metode se dobivaju informacije o V_H i V_L fragmentima B-limfocita potrebnih za nastanak humanih protutijela.

CDR graft (engl. *transferring parental complementarity determining regions (CDR) into human framework (FR) regions*, modifikacija CDR regija protutijela), scFv (engl. *single chain Fv*; fuzijski proteini varijabilne regije teškog i lakog lanca imunoglobulina), Fab (engl. *fragment antigen binding*, fragmenti fuzijskih proteina koji se sastoje od konstantne Fc regije i receptora), mAb

(engl. *monoclonal antibody*, monoklonsko protutijelo), PBMC (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, mononuklearne stanice periferne krvi), $V_H D J_H C_H \gamma$ / $V_K J_K C_K$ – genski fragmenti teških i lakih lanaca varijabilnih i konstantnih lanaca na V, D, J i C segmentima kromosoma humanih imunoglobulina), RT-PCR (engl. *real time-polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu), ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, enzimski imunotest na čvrstoj fazi) (preuzeto i prilagođeno iz (25)).

1.3 Izazovi u razvoju i proizvodnji monoklonskih protutijela

Proizvodnja bioloških lijekova se značajno razlikuje od proizvodnje lijekova dobivenih kemijskim reakcijama (malih molekula). Monoklonska protutijela i ostali proteinski lijekovi se proizvode pomoću vrlo složenih staničnih mehanizama, što uključuje njihovu izolaciju iz bioloških izvora sofisticiranim metodama. Obzirom na indikaciju, željeni put primjene i karakteristike same djelatne tvari, nakon proizvodnje se i kemijski i biološki lijekovi oblikuju u odgovarajući farmaceutski oblik (43,44).

Industrijska proizvodnja proteinskih lijekova obuhvaća različite procese, poput kreiranja ekspresijskog sustava i optimiranja ekspresije, odabira odgovarajućeg procesa proizvodnje, izolacije i pročišćavanja proteina te konačnog oblikovanja farmaceutskog oblika proteinskog lijeka (43,45,46). Uobičajeni način proizvodnje monoklonskih protutijela se bazira na tehnologiji hibridoma stanica: započinje imunizacijom laboratorijske životinje (najčešće miša) pročišćenim ljudskim proteinom od interesa, na koji protutijelo treba biti usmjereno. Iz mišje se slezene potom izoliraju limfociti koji se spajaju s mijeloma stanicama, pri čemu nastaju hibridoma stanice. One mogu proizvoditi protutijela (svojstva limfocita) i mogu se neograničeno dijeliti (svojstva mijeloma stanične linije). Kako bi se hibridoma stanice izdvojile od ishodnih limfocita i mijeloma stanica, stanice se uzgajaju u HAT mediju (od *hipoksantin*, *aminopterin* i *timidin*), prilikom čega nastaju individualni klonovi (svaki klon je potomak jedne hibridoma stanice i proizvodi jednu vrstu protutijela). Ovako se dobivaju mišja monoklonska protutijela, koja izazivaju značajne imunosne reakcije u ljudi, jer imaju značajne razlike u aminokiselinskom slijedu u odnosu na ljudska protutijela. Da bi se mišja protutijela učinila manje imunogenima, konstantnu regiju imunoglobulina potrebno je zamijeniti odgovarajućim slijedom ljudskog proteina, pri čemu se dobiju kimerna i humanizirana protutijela. PCR metodom može se umnožiti odgovarajući fragment koji sadrži varijabilne sljedove za humanizirana protutijela i klonirati u ekspresijski vektor koji kodira konstantnu regiju

imunoglobulina G. Dobiveni se klonovi testiraju na proizvodnju protutijela te se klonovi s najvećim proizvodnim kapacitetom selektiraju za daljnju upotrebu (26,27,43).

1.3.1 Faze u proizvodnji monoklonskih protutijela

Proizvodnja proteinskih lijekova podrazumijeva skup vrlo složenih i međusobno različitih procesa koji se višestruko ponavljaju radi dobivanja velikih količina proteinskog lijeka. Postupak proizvodnje monoklonskih protutijela (i ostalih rekombinantnih terapijskih proteina) se može podijeliti na tri osnovne faze:

- 1) Proces proizvodnje proteina, tzv. uzvodna faza uzgoja u biorektoru (engl. *upstream process, USP*) – uključuje kreiranje ekspresijskog sustava i optimiranje ekspresije, izbor stanica domaćina, sastava medija / nutrijenata potrebnih za rast i ekspresiju proteina, optimizaciju uvjeta u staničnoj kulturi, u cilju postizanja proizvodnje odgovarajuće količine monoklonskih protutijela (47,48).

U kulturi stanica, koja sadrži gen za protein od interesa, započinje uzgoj u laboratorijskom mjerilu, na tekućoj hranjivoj podlozi za rast i razvoj stanica. Stanice se odande prenose u velike proizvodne bioreaktore volumena do 20 000 litara u kojima se provodi biosinteza u uvjetima podešenim za rast stanica i sintezu rekombinantnog proteina. Količina proteina sintetiziranih u bioreaktorima je proizvodne veličine, odnosno proizvodi se u većem mjerilu u odnosu na količinu proteina uzgojenog na hranjivoj podlozi (engl. *scale-up*) (48,49).

- 2) Procesi poslije bioreaktora, tzv. nizvodna faza (engl. *downstream, DSP*) – uključuju višestruko pročišćavanje proteina od ostataka stanica, virusa, agregata filtracijom, centrifugiranjem, dijalizom te različitim kromatografskim tehnikama (obzirom na svojstva željenog proteina (molekulska masa, naboj)), inaktivaciju virusa te analitička ispitivanja u cilju procjene kakvoće i djelotvornosti konačnog lijeka (43,47,49).

- 3) Oblikovanje farmaceutskog oblika proteinskog lijeka – kod oblikovanja prikladnog farmaceutskog oblika, u obzir je potrebno uzeti koncentraciju djelatne tvari (pročišćenog proteina), korištene pomoćne tvari i njihovu kompatibilnost (međusobnu i s djelatnom tvari), primarni spremnik i materijal od kojeg je izrađen, način primjene te uvjete čuvanja. Nakon postizanja željene, odgovarajuće formulacije, lijek se filtrira i

aseptički puni u sterilni spremnik (48,49). Finalno se provodi analitička provjera kakvoće lijeka, u cilju praćenja proizvodnje te procjene kakvoće i djelotvornosti konačnog lijeka (43,47).

Shema postupka proizvodnje monoklonskih protutijela je priložena niže (Slika 9).



Slika 9: Prikaz uobičajene proizvodnje monoklonskih protutijela. U uzvodnoj fazi se u bioreaktoru uzgajaju stanične linije, a njihovim rastom eksprimiraju proteini, dok se u nizvodnoj fazi protein od interesa izolira i pročišćava do finalnog proteinskog lijeka (preuzeto i prilagođeno iz (50)).

Proteinski lijekovi se proizvode u ekspresijskim sustavima, gdje kao domaćini služe prokariotske ili eukariotske stanice (bakterije, kvasci, gljive, biljke, stanice insekata, stanice sisavaca), biljni organizmi ili transgениčne životinje. Na odabir domaćina utječu priroda i porijeklo proteina od interesa, njegova funkcija i količina koju je potrebno proizvesti, cijena te posttranslacijske modifikacije (43). Najčešće korištene stanice domaćina za proizvodnju proteina su stanice sisavaca (43%), *E. coli* (31%) i *Saccharomyces cerevisiae* (15%) (43,51). Čitava monoklonska protutijela ili njihovi dijelovi mogu biti proizvedeni rekombinantnom DNA tehnologijom u mikroorganizmima, poput *E. coli* ili kvasaca, no za proizvodnju humaniziranih monoklonskih protutijela najčešće se koriste stanice jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary Cells*, CHO stanice) (43,52).

1.3.2 Varijabilnosti i kritični parametri kakvoće u procesu proizvodnje monoklonskih protutijela

Zbog visoke varijabilnosti živih sustava iz kojih se dobivaju, biološki lijekovi su dosta osjetljivi na promjene u postupku proizvodnje koje mogu utjecati na kakvoću, djelotvornost i sigurnost lijeka. Na varijabilnost utječu ekspresijski sustav, uvjeti uzgoja, metode pročišćavanja, kao i sama formulacija lijeka te transport i uvjeti pri kojima se lijek čuva. Male promjene u proizvodnom postupku mogu značajno utjecati na trodimenzionalnu strukturu proteinske molekule, što dalje može utjecati na sigurnost i djelotvornost lijeka. Biološki lijekovi zahtijevaju posebne uvjeta čuvanja i transporta, jer su proteinske molekule vrlo osjetljive na vanjske uvjete. Iz istih razloga rukovanje biološkim lijekovima također zahtjeva posebnu pozornost (49).

Varijabilnosti u postupku proizvodnje monoklonskog protutijela mogu biti posljedica varijabilnosti između različitih serija sirovina korištenih u proizvodnji lijeka ili pak nabavljanja sirovina od različitih proizvođača. Tijekom postavljanja proizvodnog procesa, nužno je definirati parametre i zahtjeve kakvoće sirovina, kao i provjeravati kakvoću sirovina prije njihove upotrebe u proizvodnji (43,53). Cilj razvoja i proizvodnje svih lijekova, pa tako i bioloških, jest proizvesti siguran, učinkovit i kvalitetan lijek. Odgovarajuće osmišljenim proizvodnim procesom dobivaju se željeni proteinski lijekovi, prikladni za kliničku primjenu. Kroz odgovarajuće nadziran i kontroliran proizvodni proces, nužno je osigurati sigurne i učinkovite proteinske lijekove ujednačenog sadržaja i usporedive kakvoće između različitih serija, odnosno između primijenjenih doza u kliničkoj primjeni (43,54).

Svi biološki lijekovi, uključujući i monoklonska protutijela, su vrlo kompleksne i heterogene molekule koje sadrže brojna onečišćenja. Prikladna i pravovremena fizičko – kemijska i biološka karakterizacija proteinskih molekula i njihovih onečišćenja treba biti okosnica kroz razvoj te kasnije kroz čitav životni ciklus lijeka. U cilju postizanja navedenog, potrebno je definirati i redovno ispitivati kritične parametre kakvoće (engl. *critical quality attributes*, CQAs) djelatne tvari i konačnog ljekovitog pripravka namijenjenog za kliničku primjenu (54). Kritični parametri kakvoće su fizičke, kemijske, biološke ili mikrobiološke karakteristike koje moraju biti unutar predviđenih i definiranih granica, kako bi lijek bio odgovarajuće kakvoće (48,55). Utvrđivanje kritičnih parametara kakvoće za monoklonska protutijela je zahtjevan proces te ne postoji univerzalan popis takvih karakteristika koje je potrebno ispitivati tijekom

njihova razvoja i proizvodnje, kao niti jedinstvena metoda za identifikaciju i određivanje CQA (54).

Kod osmišljavanja procesa proizvodnje lijekova se zadnjih godina sve više koristi koncept kakvoće osmišljene kroz dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD), koji podrazumijeva odstupanje od tradicionalnog pristupa, kod kojeg je proizvodni proces dizajniran s uskim zahtjevima procesnih parametara i proizvod takvog procesa proizvodnje se analizira prema unaprijed definiranim zahtjevima (55). Cilj QbD koncepta je da se dobrim poznavanjem proizvoda i postupka proizvodnje osigura da se svaka potencijalna varijabilnost djelatne tvari i lijeka tijekom razvoja i proizvodnje identificira, obrazloži i njome upravlja prikladnim mjerama. Time se postiže dosljedna kakvoća lijeka i kontrola procesa od samog početka njegova razvoja (49). QbD se sastoji od definiranja profila kakvoće ciljanog proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP), utvrđivanja kritičnih parametara kakvoće (engl. *critical quality attributes*, QCAs) proizvodnog postupka i lijeka, utvrđivanja operativnih raspona tih parametara unutar kojih se dosljedno postiže prihvatljivo iskorištenje postupka/proizvoda te definiranja prostora za dizajn (engl. *design space*, DS), odnosno proizvodnog područja unutar kojeg je osigurano postizanje QCA (49,55–58). QbD pristup podrazumijeva dobro poznavanje odnosa između varijabilnosti ulaznog materijala, procesnih parametara i produkta proizvodnje te je u slučaju odstupanja jednog parametra moguće prilagoditi druge parametre unutar definiranih granica, a da se i dalje dobije produkt odgovarajućih i željenih karakteristika. Ovim se omogućava smanjenje varijabilnosti između različitih serija lijeka u proizvodnom procesu (43,55–58). Iako ne postoji službena lista karakteristika koje se ispituju kao kritična svojstva svakog biološkog lijeka, na temelju dosadašnjih iskustava farmaceutske industrije i regulatornih tijela se navode neki od sljedećih primjera kritičnih parametara kakvoće povezanih sa strukturnim promjenama proteina:

- cijepanje disulfidne veze između lanaca monoklonskog protutijela (može dovesti do agregacije i pogrešnog smatanja proteina);
- kompleksnost / heterogenost imunoglobulina G (npr. različite izoforme protutijela mogu imati različit afinitet i jačinu vezanja s drugim protutijelima i antigenima);
- pogrešno smatanje proteinskih molekula (važno kod Fc fuzijskih proteina);
- kemijske modifikacije bočnih lanaca proteina (glikacija do koje može doći tijekom proizvodnje proteina ili u prisutnosti visokih koncentracija šećera u puferskim otopinama tijekom oblikovanja gotovog farmaceutskog pripravka);

- agregacija proteina (agregati mogu nastati tijekom gotovo svih faza u proizvodnji proteina i mogu ugroziti učinkovitost lijeka i njegovu sigurnost, povećavajući njegovu imunogenost) (54).

1.4 Agregacija i agregatna onečišćenja u monoklonskim protutijelima

Razvojem novih tehnika proizvodnje i naprednijih molekularno – bioloških metoda analize razvijaju se nova monoklonska protutijela. No, niti napredne tehnologije ne mogu u potpunosti eliminirati izazove i probleme u njihovoj proizvodnji, a koji su direktna posljedica svojstava proteina. Jedan od takvih primjera je formiranje agregatnih onečišćenja do kojih može doći tijekom procesa proizvodnje lijeka, ali i u kasnijim fazama kod čuvanja lijeka u roku valjanosti, njegova transporta te kod same primjene kod pacijenata. Agregacija proteina se smatra kritičnim svojstvom kakvoće koje može značajno utjecati na sigurnost, kakvoću i djelotvornost monoklonskih protutijela. Osim pada učinkovitosti lijeka, do koje može doći uslijed smanjenja biološke aktivnosti, jako važna direktna posljedica prisutnosti agregatnih onečišćenja je i povećanje imunogenosti monoklonskih protutijela, odnosno stvaranja protutijela na lijek, što može imati višestruko ozbiljne posljedice na zdravlje pacijenta (2,3).

Obzirom na strukturu i svojstva proteina, pojava agregacije se smatra uobičajenom i često neizbježnom manifestacijom fizičke nestabilnosti monoklonskih protutijela, koja može imati značajan utjecaj na njihovu sigurnost i kakvoću (59). Brojne su vrste / tipovi agregata koji mogu nastati, a klasifikacija se bazira na različitim mehanizmima agregacije, topljivosti (reverzibilnosti), veličini, a značajno ovisi i o različitim internim (strukturne karakteristike proteina) i vanjskim (okolišnim) čimbenicima (2,60). Razumijevanje mehanizama agregacije proteina je od kritične važnosti za razvoj strategija za njezino smanjenje i bolju kontrolu u biološkim lijekovima. Proteinski agregati generalno mogu nastati tijekom gotovo svih faza proizvodnje monoklonskih protutijela; tijekom procesa ekspresije proteina u bioreaktoru (engl. *upstream process*), izolacije i pročišćavanja (engl. *downstream process*), tijekom formulacije i pakiranja lijeka, kao i tijekom čuvanja, transporta i primjene lijeka (60,61).

Proteinska agregacija jedan je od najviše proučavanih faktora imunogenosti terapijskih proteina, ali usprkos tome do danas nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim agregati terapijskih proteina izazivaju imunski odgovor. Pokazano je, međutim, kako ključnu ulogu u stvaranju imunskog odgovora ima multimerno predočavanje antigena, kao i konformacijske promjene proteina (2,62). Razumijevanje procesa agregacije, razvijanje odgovarajuće strategije

minimiziranja nastanka različitih vrsta agregata u monoklonskim protutijelima, kao i njihova adekvatna karakterizacija i kontrola kakvoće pomoću sve naprednijih i specifičnijih analitičkih metoda su od iznimne važnosti u generiranju kvalitetnog i učinkovitog lijeka, sigurnog za primjenu, s minimalnim rizikom od imunogenosti.

1.4.1 Vrste agregata

Naziv “proteinski agregati” se odnosi na čitavu skupinu proteina većih molekulskih masa, oligomera, odnosno multimera koji su međusobno vezani kovalentnim i nekovalentnim vezama (2). Prema FDA smjernici *Guidance Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products*, proteinski agregati se definiraju kao samoudruženi proteinski dijelovi (unutar istog proteinskog lanca), gdje je monomer najmanja funkcionalna podjedinica (63). Postoje različite vrste agregata, a klasificiraju se obzirom na sljedeće:

- 1) tip veze (i kemijske modifikacije) – nekovalentni (slabe sile, poput van der Waals-ovih interakcija, vodikovih i elektrostatskih veza te hidrofobnih interakcija) i kovalentni agregati (inter- i intramolekularne reducibilne ukrižene i nereducibilne disulfidne veze, koje se ostvaruju preko tiolske skupine ili ne-sulfidne interakcije, npr. stvaranje ditirozina);
- 2) reverzibilnost – reverzibilni (nastaju uslijed promjena uvjeta otopine – pH, ionska jakost i sl.) i ireverzibilni agregati (mogu se trajno ukloniti filtracijskim tehnikama) koji mogu biti različitih veličina i svojstava, a mogu nastati tijekom svih faza proizvodnje lijeka, kao i tijekom njegova čuvanja, transporta i primjene (2);
- 3) veličinu – mali topljivi oligomeri (dimeri, trimeri, tetrameri i sl.), agregati veličine 20 nm do 1 µm, netopljive čestice veličine u rasponu 1 – 25 µm, velike netopljive čestice vidljive golim okom (netopljivi oligomeri mogu biti amorfni ili vlaknasti, ovisno o samom proteinu i uvjetima u kojima nastaju);
- 4) konformaciju proteina – agregati nativne (prirodne) konformacije i agregati denaturiranog oblika proteina (2).

Različite vrste agregata mogu nastati tijekom postupka proizvodnje monoklonskih protutijela zbog mnoštva vanjskih faktora, kao što su promjene temperature i pH, potresanje, procesi smrzavanja – otapanja (engl. *freeze-thaw*), oksidacija te različiti uvjeti čuvanja. Tako nastali agregati pokazuju veliku varijabilnost u izgledu (morfologiji) i veličini čestica, stupnju agregacije i površinskoj hidrofobnosti te imaju najveći utjecaj na biološku aktivnost monoklonskih protutijela, kao i na imunogenost. Primarna struktura proteina može biti glavna odrednica sklonosti agregaciji. Općenito, što je protein hidrofobniji, skloniji je stvaranju agregata. Također, i sekundarna struktura proteina utječe na agregaciju; β -nabrane ploče najzastupljenija su sekundarna struktura kod proteinskih agregata, dok su α -zavojnice manje zastupljene. Pretpostavlja se da je to radi snažnije izraženog dipolnog momenta između C- i N-kraja molekule, što poboljšava termostabilnost (62).

Poznavanje i razumijevanje mehanizama kojima dolazi do nastanka proteinskih agregata od kritične je važnosti za konzistentnu proizvodnju lijeka odgovarajuće kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti (2,3,61).

1.4.2 Uzroci i mehanizmi agregacije

Monoklonska protutijela imaju dva jednaka Fab fragmenta (antigen vezujuće domene) i jednu Fc domenu (tvore ju konstantne regije teškog lanca). Fab domene sadrže aminokiselinski slijed koji određuje specifičnost i afinitet svakog monoklonskog protutijela na pojedinačne epitope ciljanog antigena. Ukoliko dođe do konformacijske deformacije ili pogrešnog smatanja proteina, aminokiselinski nizovi skloni agregaciji postaju izloženi na monoklonskim protutijelima i dolazi do stvaranja snažnih međuproteinskih veza te se u konačnici formiraju agregati (64). Aminokiselinski nizovi koji pokazuju sklonost agregaciji se mogu nalaziti na više od jednog mjesta na istom proteinu. U uvjetima gdje je favorizirano smotano stanje proteina u odnosu na nesmotano, monomeri proteinskih molekula se inicijalno mogu reverzibilno međusobno povezati, čime mogu nastati smotani ili djelomično nesmotani agregati (64).

Do proteinske agregacije dolazi kroz tri glavna mehanizma, ovisno o konformacijskom stanju proteina: agregacija monomera proteina u nativnoj formi, agregacija denaturiranih proteina te agregacija na prethodno formiranim agregatima. Monomeri nativnih proteina se mogu samoudruživati u oligomere pomoću elektrostatskih veza ili kovalentnih veza između hidrofилnih i hidrofobnih ostataka na proteinu. Nekovalentni oligomeri niže molekulske mase mogu se konvertirati natrag u svoje nativno stanje, ali ukoliko dođe do porasta molekulske mase

oligomera, veze unutar agregata postaju ireverzibilne. U većini proteinskih lijekova su prisutne frakcije denaturiranih proteina, koje imaju veću sklonost za nastanak ireverzibilnih agregata. Nadalje, proteinski monomeri nativne forme mogu agregirati adherirajući na druge postojeće oligomere, onečišćenja ili pak na površinu bioreaktora i širiti se brzo procesom nukleacije (2).

Proces agregacije se odvija po sljedećim koracima:

- 1) razmatanje proteina: remećenje ravnotežne energetske barijere u korist proteina s djelomično razmotanim konformacijama;
- 2) spajanje proteina: interakcije između aminokiselinskih sljedova na monoklonskim protutijelima koji pokazuju sklonost agregaciji (posredovano hidrofobnošću ili nabojem proteinskih molekula);
- 3) nukleacija: strukturna reorganizacija proteinske molekule radi stvaranja dodatnih agregata, uz promjene u površinskom naboju na proteinima; izloženost hidrofobnih regija i promjene sekundarne strukture u cilju postizanja energetski povoljnije konformacije β -ploča (65).

Obzirom na moguće uzroke agregacije proteina, postoji pet osnovnih mehanizama nastanka agregata:

- 1) reverzibilno združivanje nativnih monomera proteina (interakcije između strukturno neizmijenjenih aktivnih oblika proteina kojima nastaju dimeri i ostali multimeri);
- 2) agregacija konformacijski izmijenjenih monomera (nesmotani, djelomično smotani i pogrešno smotani proteini);
- 3) agregacija kemijski izmijenjenih proteinskih molekula (kao posljedica oksidacije, deamidacije, cijepanja disulfidne veze);
- 4) površinski inducirana agregacija (kontakt proteina i spremnika u kojima se provodi proizvodni postupak ili proteina s primarnim spremnikom u koji se oprema konačna formulacija lijeka; potresanje proizvoda tijekom proizvodnje);
- 5) kontrolirana agregacija praćena nukleacijom i rastom čestica (metalni katalizatori, tvari koje se otpuštaju iz materijala od kojih su izrađeni primarni spremnici lijeka – engl. *leachables*) (61,66).

Navedeni mehanizmi agregacije nisu nužno međusobno isključivi, ali razumijevanje kritičnih koraka i procesnih parametara tijekom proizvodnje monoklonskog protutijela mogu pomoći u

osmišljavanju i definiranju odgovarajućih strategija za kontrolu agregacije. Primjerice, ukoliko je konformacijska promjena monomera okidač nastanka agregatnog onečišćenja, dodatak pomoćnih tvari koje su konformacijski stabilizatori (npr. saharoza) može smanjiti stupanj agregacije (66). Različiti putevi agregacije monoklonskih protutijela definirani su različitim svojstvima navedenih proteina, kao i svojim okolišom te uvjetima pri kojima se proizvode i obrađuju. U cilju razvijanja i definiranja prikladne strategije kontrole agregacije, potrebno je u obzir uzeti sve navedene kritične faktore i svojstva.

Izuzev navedene klasifikacije agregata i opisa različitih mehanizama kojima se ona može odvijati, agregacija proteina može biti klasificirana i kao unutarnja (engl. *intrinsic*, intrinzična) i vanjska (engl. *extrinsic*, ekstrinzična). Unutarnja agregacija vezuje se uz formulaciju proteina tijekom sinteze i tijekom koraka pročišćavanja, dok do vanjske agregacije proteina dolazi uslijed kontakta proteina s vanjskim izvorima tijekom proizvodnje, kao npr. staklene površine unutarnje strane spremnika, oprema korištena u proizvodnji načinjema od nehrđajućeg čelika ili kapljice silikonskog ulja u napunjenim štrcaljkama (2).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je dati sveobuhvatnu analizu karakterizacije i kontrole agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima, radi osiguravanja odgovarajuće kakvoće i učinkovitosti te smanjivanja njihove imunogenosti.

Hipoteze istraživanja su:

- nastanak agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima se može smanjiti, ali ne i u potpunosti izbjeći;
- razumijevanje mehanizama agregacije i primjena najsuvremenijih metoda karakterizacije i kvantifikacije agregata u monoklonskim protutijelima osigurava odgovarajuću kontrolu kakvoće i smanjuje mogućnost nastanka agregata tijekom proizvodnje i čuvanja lijeka;
- agregacija proteina između referentnog i biosličnog lijeka je usporediva.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Prilikom pisanja ovoga rada su pretraživani objavljeni znanstveni, stručni i pregledni radovi, kao i ostala stručna literatura na temu razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela, nastanka agregatnih onečišćenja i njihovog imunogenog potencijala te načina kako izbjeći, odnosno minimizirati agregaciju proteina.

Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisima. Pri pretraživanju literature su traženi odgovori na specifična pitanja vezana uz problematiku ovog specijalističkog rada, u cilju potkrepe predloženih hipoteza.

Pretražene su bibliografska baza podataka (*PubMed*) i baza podataka s cjelovitim tekstom (*Science Direct*), kojima je pristupano elektroničkim putem preko umreženog računala koje ima *online* pristup spomenutim bazama.

Pri proučavanju relevantnih članaka su izdvojeni najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su navedeni u ovom radu. Nadalje, konzultirane su smjernice regulatornih Agencija, kao što su Europska agencije za lijekove (engl. *European Agency for Medicinal Products*, EMA) i Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) te kompendijalne preporuke Europske Farmakopeje (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) i Američke Farmakopeje (engl. *U.S. Pharmacopoeia*, USP).

Pravni dokumenti (uredbe, direktive, zakoni i pravilnici) su preuzeti s mrežnih stranica Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Narodnih novina i Europske komisije.

Kroz ovaj specijalistički rad fokus je stavljen na važnost adekvatne i pravovremene karakterizacije i kontrole agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima, kako bi se osigurala njihova sigurnost, djelotvornost i kakvoća, posebno s aspekta imunogenog potencijala koji imaju. Na temelju pretraživanih izvora su izvedeni vlastiti zaključci o predmetnoj problematici, koja je tema ovog specijalističkog rada.

4. RASPRAVA

4.1 Imunogenost agregata u monoklonskim protutijelima

Agregacija proteina je svojstvena za različite neurodegenerativne bolesti koje u pozadini imaju formiranje i nakupljanje amiloida, poput Alzheimerove demencije, amiotrofične lateralne skleroze (ALS), Huntingtonove bolesti te različitih amiloidoza. Također, proteinski agregati su specifično prisutni tijekom procesa starenja, obzirom da njihovo prisustvo u ljudskom organizmu nerijetko ima citotoksične učinke (oksidativni stres koji dovodi do smrti stanica) (67).

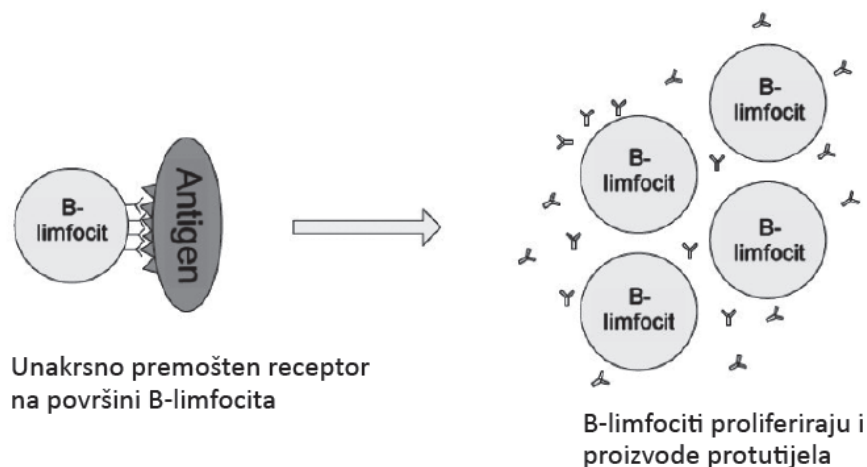
Glavni cilj u razvoju monoklonskih protutijela nove generacije i njihovih inačica je postizanje većeg afiniteta za ciljane antigene / molekule i smanjenje imunogenosti. Humanizacijom (razvojem humaniziranih i humanih protutijela) monoklonskih protutijela zadnjih desetljeća se smanjuje njihova imunogenost, ali ona se ne može apsolutno izbjeći (2). Brojne su studije pokazale kako čak potpuno humana protutijela mogu dovesti do nastanka neutralizirajućih protutijela na biološke lijekove prilikom primjene (engl. *anti-drug antibody*; ADA) (2). Osim neutralizirajućih, protutijela na unešene proteinske lijekove mogu biti i vezujuća. Obje se vrste protutijela javljaju uslijed primjene bioloških lijekova, mogu utjecati na učinkovitost te farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka, kao i posredovati u infuzijskim reakcijama kod davanja lijeka. Vezujuća protutijela na lijek mogu ubrzati izlučivanje lijeka ili pak produljiti njegovo zadržavanje u organizmu, ovisno o tipu. Najčešće nemaju klinički značajne posljedice. Neutralizirajuća protutijela na lijek smanjuju mogućnost vezanja molekula lijeka na ciljna mjesta, čime umanjuju (i poništavaju) njegovo djelovanje. Učinkovitost i biološka aktivnost lijeka ovise o količini (titru) i vrsti protutijela na lijek (68).

Dva su glavna puta kojim biološki lijekovi mogu dovesti do nastanka imunosne reakcije: put ovisan o T-limfocitima i put neovisan o T-limfocitima. Na temelju dosadašnjih istraživanja je zaključeno kako većinu nuspojava uzrokuju visoke razine IgG protutijela, nastalih dominantno putem ovisnim o T-limfocitima. Neutralizirajuća protutijela na biološke lijekove (ADA) čine većim dijelom IgG protutijela. Bitna je tu uloga antigen-prezentirajućih stanica (engl. *antigen-presenting cells*, APC) koje unose molekule proteinskog lijeka endocitozom, razgrađuju ih i pomoću glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) klase II ih predočavaju na svojoj površini. T-limfociti dolaze u kontakt s kompleksom antigena proteinskog lijeka i MHC II te se aktiviraju. Tako aktivirani T-limfociti aktiviraju B-limfocite i potiču njihovu diferencijaciju u plazma stanice, koje potiču proizvodnju protutijela

na lijek. Neki B-limfociti postaju memorijski te u naknadnom susretu s istim antigenom brže luče veće količine protutijela, odnosno dovode do još brže i jače imunosne reakcije (8,69).

Protutijela mogu nastati i putem koji ne ovisi o direktnoj aktivaciji T-limfocita, odnosno posredovan je direktnom aktivacijom B-limfocita specifičnih za lijek. Takva protutijela su imunoglobulini M visokog afiniteta i imunoglobulini G niskog afiniteta. U ovom procesu antigen proteinskog lijeka biva unesen u drugi tip antigen-prezentirajućih stanica – dendritičke stanice (engl. *dendritic cells*), koje nakon razgradnje proteina predočavaju B-limfocitima u slezeni. U nastavku signala, antigen se neutralizira, a B-limfociti predočavaju epitope neutraliziranog antigena pomoćničkim T-limfocitima, koji zatim dodatno aktiviraju B-limfocite što dovodi do pojačanja imunosne reakcije (8,69).

Pretpostavlja se kako kod proteinskih agregata dolazi do unakrsnog multimernog premošćivanja receptora na površini B-limfocita, nakon čega dolazi do pojačane proizvodnje protutijela (Slika 10).



Slika 10. Shema mehanizma nastanka imunogenosti uslijed nastanka agregata (preuzeto i prilagođeno iz (62)).

4.1.1 Čimbenici koji utječu na imunogenost monoklonskih protutijela i ostalih bioloških lijekova

Imunosne reakcije na biološke proteine mogu biti različitog intenziteta, od prolaznog porasta protutijela na lijek bez kliničkog značaja, do životno ugrožavajućih stanja i komplikacija. Zbog potencijalne ugroze zdravlja pacijenata i smanjene učinkovitosti lijeka, važno je znati i razumjeti faktore koji mogu dovesti do imunogenosti bioloških lijekova. Mnogo je čimbenika koji utječu na imunogenost koju izazivaju biološki lijekovi, a najbitnije su karakteristike

pacijenta koji prima lijek i režim doziranja te karakteristike samog lijeka (43,69). Svi se čimbenici moraju predvidjeti, kontrolirati i minimizirati tijekom razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela (Tablica 1).

Tablica 1. Čimbenici koji utječu na imunogenost monoklonskih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz (69,70)).

Svojstva specifična za lijek	Svojstva specifična za pacijenta	svojstva vezana uz režim doziranja lijeka
struktura proteina (humano / ksenogeno (animalno) porijeklo, posttranslacijske ili kemijske modifikacije, epitopi T – stanica)	stanje / bolest koja se liječi ciljanim monoklonskim protutijelom	doza
parametri kakvoće lijeka (izoforme, fizički i kemijski razgradni produkti, pomoćne tvari, uvjeti tijekom proizvodnje i čuvanja), formulacija, način pripreme, primarna ambalaža	dob	put primjene
agregati, onečišćenja iz proizvodnje i adjuvansi, razgradni produkti	genetika (MHC genotip i HLA fenotip)	učestalost doziranja
mete / ciljna mjesta djelovanja (stanične ili topljive)	stanje imuniteta, podležuća bolest i konkomitantna terapija	duljina trajanja terapije

Vrlo bitan čimbenik u posredovanim reakcijama imunogenosti je vrsta primarnog spremnika lijeka, obzirom da je primarni spremnik u direktnom doticaju s lijekom te može utjecati na njegovu biološku aktivnost i potencijalnu imunogenost. Primarni spremnik može otpuštati tvari u formulaciju koje mogu ući u interakciju s lijekom. Jedan od odličnih primjera je slučaj lijeka Eprex® (Janssen-Cilag GmbH, odobren u EU 10.7.1996.), koji kao djelatnu tvar ima rekombinantni humani eritropoetin, rHuEPO (epoetin alfa) i namijenjen je liječenju anemije povezane s kroničnim zatajenjem bubrega. Navedeni je lijek u periodu između 1998. i 2003. doveo do povećane incidencije čiste aplazije crvenih krvnih stanica (engl. *pure red cell aplasia*, PRCA). Kod pacijenata kod kojih je zabilježena navedena nuspojava, lijek je primijenjen supkutano, uslijed čega je došlo do stvaranja neutralizirajućih protutijela na rekombinantni i endogeni eritropoetin. Uočeni porast imunogenosti podudara se s malom promjenom u formulaciji lijeka, kada je stabilizator humani serumski albumin zamijenjen glicinom i

polisorbatom 80. Obzirom na opisano, može se zaključiti kako male izmjene u proizvodnom postupku mogu imati značajan utjecaj na klinički učinak lijeka. Mehanizam kojim dolazi do nastanka PRCA-e uslijed supkutano g davanja Eprex[®]-a nije u potpunosti razjašnjen, ali postoji više mogućih rješenja. Jedna od teorija tumači kako su iz neobloženog gumenog čepa štrcaljke za supkutanu primjenu otpušteni neki organski spojevi (derivati fenola) koji su reagirali s polisorbatom 80. Fenolni derivati se često koriste kao sredstva za stvrđnjavanje u gumenim čepovima. Provedene su i studije na životinjama u kojima je ispitan imunosni odgovor samog ovalbumina i onog u kombinaciji s fenolnim derivatima. Zaključeno je kako kombinacija s fenolnim derivatima daje jači imunosni odgovor u odnosu na sam ovalbumin. Nadalje, kada je ovalbumin zamijenjen epoetin alfa, djelovanje fenolnih derivata otpuštenih ih primarnog spremnika dovelo je do pada hematokrita (karakteristično za PRCA-u). Nakon zamjene neobloženog čepa obloženim i zabranom supkutane primjene lijeka, incidencija aplazije eritrocita se smanjila. Slučaj Eprex-a ukazuje na nepredvidivost i važnost imunogenosti bioloških lijekova, kao i važnost sastava primarnog spremnika u koji se oprema lijek (43,49,71).

Proteinski agregati također imaju značajan utjecaj na zdravlje i sigurnost pacijenata ukoliko su prisutni u biološkim lijekovima. Agregacija proteina u monoklonskim protutijelima može dovesti do snažne imunogene reakcije kod pacijenata tijekom i nakon primjene lijeka. Posljedice imunogenosti mogu biti razne, od blažih reakcija preosjetljivosti na mjestu primjene do ozbiljnih nuspojava te do smanjenja ili čak potpunog gubitka terapijskog odgovora (72).

Pojava imunosnog odgovora uvelike ovisi o primijenjenom lijeku, vrsti agregata, ali i o pojedincu kojemu se lijek daje, kao i o brojnim drugim faktorima. Imunosni sustav nije jednako tolerantan na sve endogene proteine, već ključnu ulogu u određivanju tolerancije imunosnog sustava na određeni terapijski protein ima zastupljenost antigena endogenog proteina. Npr., agregati biološkog lijeka, čiji su proteini manje zastupljeni unutar organizma, mogu imati snažniji imunosni odgovor prilikom davanja lijeka, dok oni čiji su proteini visoko zastupljeni izazivaju slabiji imunosni odgovor (62).

Agregati različitih proteina pokazuju veći imunogeni potencijal u odnosu na pojedinačne podjedinice (monomere), a pretpostavlja se da je razlog tomu razlika u veličini i vrsti agregata, njihovoj konformaciji te morfologiji. Dodatno, prema dosadašnjim studijama se može zaključiti kako monomerne inačice agregata imaju izmijenjena svojstva antigena i njihove izloženosti u odnosu na multimerne forme. Tako izmijenjena svojstva antigena mogu uzrokovati različit afinitet B-limfocita za epitope ili aktivaciju različitih signalnih putova unutar stanice, kao i

promijenjenu osjetljivost endosomalnih proteaza, što u konačnici može imati smanjen ili povećan imunogeni odgovor na agregate biološkog lijeka (62). Uočeno je kako imunogeni odgovor raste s veličinom agregata koji ga izaziva, isto kao i stupnjem glikozilacije i prisustvom onečišćenja. Imunogenost može dovesti do neutralizacije monoklonskih protutijela, odnosno posljedično do smanjenja (ili gubitka) njihove učinkovitosti te može uzrokovati preosjetljivost i anafilaktički šok posredovan IgE protutijelima (73). Na temelju dosadašnjih studija je pokazano kako agregati koji nastaju pri ekstremnim uvjetima (npr. pri pH vrijednosti 3.5 ili 11.0, kod velikih brzina miješanja, visoke temperature – preko 65°C i oksidacije pomoću CuSO₄) pokazuju veći utjecaj na biološku aktivnost i imunogenost monoklonskih protutijela. S druge strane, agregati koji nastaju uslijed pipetiranja, pri blažim pH vrijednostima (4.3 ili 8.5), oksidaciji pomoću vodikovog peroksida ili tijekom procesa zamrzavanja / otapanja (engl. *freeze-thaw process*) proteina imaju nešto manji utjecaj na njihovu učinkovitost i imunogenost (3).

Izostavljanje Fc regije na monoklonskim protutijelima dovodi do nedostataka, kao što su niska termostabilnost u odnosu na protutijela koja imaju tu domenu, veća sklonost agregaciji (veći rizik od imunogenosti) te kraće vrijeme poluživota takvih monoklonskih protutijela, obzirom na nemogućnost vezanja na FcRn receptore (engl. *neonatal Fc receptor*). Vezanjem na FcRn receptor monoklonsko protutijelo se reciklira, odnosno odgađa se njegova razgradnja i produljuje vrijeme poluživota protutijela (8,74). Navedeno dovodi do potrebe za češćim doziranjem i višim dozama lijeka. Jedan od primjera fragmenata monoklonskog protutijela bez Fc regije su scFv fragmenti (engl. *single chain variable fragment*), fuzijski proteini varijabilne regije teškog i lakog lanca povezani kratkim peptidima (8,74).

Fab fragmenti se sastoje od konstantne regije teškog i lakog lanca, vezanih disulfidnom vezom, i varijabilne regije Fv. U odnosu na scFv fragmente, Fab fragmenti su veće molekulske mase te posljedično slabije prolaze kroz tkivo prilikom injektiranja lijeka. Fab fragmenti nemaju Fc domenu, što smanjuje rizik od imunosne reakcije i olakšava proizvodnju bioloških lijekova, na račun povećane agregacije, niže stabilnosti i kraćeg vremena poluživota (74,75). Fab fragmenti su stabilniji od scFv fragmenata, obzirom na veze između varijabilnih i konstantnih regija lakih i teških lanaca, a obzirom da je riječ o nativnim proteinskim strukturama, mala je vjerojatnost od imunosne reakcije (64).

Više je intrinzičnih (unutarnjih) i ekstrinzičnih (vanjskih) faktora koji mogu dovesti do imunogenog odgovora na proteinske agregate u monoklonskim protutijelima. Od intrinzičnih

faktora su to veličina i količina agregata, kao i prisustvo te broj epitopa na površini agregata. Vanjski faktori koji mogu utjecati na imunogenost agregata iz proteinskih lijekova su primjerice put primjene, prisustvo onečišćenja, učestalost doziranja, zdravstveno stanje pacijenta i aktivnost imunomodulatora koji se koriste uz proteinski lijek.

Zasad nije u potpunosti jasno imaju li sve vrste agregata jednak imunogeni potencijal te se ne može unaprijed znati koja je agregatna onečišćenja potrebno kontrolirati u lijeku (64,76). Prema posljednje važećim smjernicama i preporukama regulatornih agencija, svojstva svih agregata koji se mogu detektirati trebaju biti odgovarajuće karakterizirana, a sadržaj kontroliran i rutinski nadziran u svim biološkim lijekovima. Karakterizacija i kvantifikacija agregata je u pravilu prilično zahtjevna, uzevši u obzir činjenicu kako se agregati mogu pojavljivati u brojnim različitim oblicima (62). Razumijevanje prirode agregata i mehanizama njihova nastanka, svojstava proteina, unutarnjih i vanjskih čimbenika koji uzroku agregaciju te osmišljavanje strategija prevencije i minimiziranja agregacije mogu značajno smanjiti vrijeme i troškove potrebne za proizvodnju i odobravanje monoklonskih protutijela, ali i ponajprije smanjiti njihov imunogeni potencijal (64).

4.2 Agregati u monoklonskim protutijelima – regulatorni aspekti

Prema dosadašnjim iskustvima i većini dosad objavljenih radova, proteinski agregati izazivaju probleme u razvoju i proizvodnji svih bioloških lijekova pa tako i monoklonskih protutijela. Obzirom da mogu dovesti do imunosnog odgovora na proteinske lijekove, agregatna onečišćenja mogu dovesti u pitanje sigurnost, učinkovitost i kakvoću lijeka (77). Zasad nema regulatornih smjernica niti egzaktnih propisa specifičnih za kontroliranje agregatnih onečišćenja u biološkim lijekovima, no sva nadležna regulatorna tijela ističu važnost odgovarajuće i pravovremene karakterizacije i kontrole agregacije u proteinskim lijekovima (78).

Jako važan parametar kakvoće lijeka koji je potrebno pratiti u svim parenteralnim farmaceutskim pripravcima su čestice čija je veličina ispod granice vidljivosti (engl. *sub – visible particles*), u rasponu 0,1 μm do 100 μm . Kod bioloških lijekova, posebno onih s visokim koncentracijama proteina, većina takvih čestica zapravo su proteinski agregati. Samoudruživanjem proteinskih molekula nastaju agregatni dimeri, oligomeri i polimeri, koji mogu biti veći od 100 μm .

U Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) i farmakopeji SAD-a (engl. *United States Pharmacopeia*, USP) su objavljene monografije u kojima su definirani kriteriji prihvatljivosti za mehanička onečišćenja, odnosno vidljive čestice, kao i za čestice čija je veličina ispod granica vidljivosti (netopljive proteinske agregate). U USP su to monografije <787> *Subvisible Particulate matter in therapeutic protein injections* i <788> *Particulate matter in injections*, dok su u Ph. Eur. to monografije 2.9.19 *Particle contamination: sub-visible particles* i 2.9.20 *Particle contamination: visible particles*, uz opće poglavlje 5.17.2 *Recommendations on testing of particulate contamination: visible particles* (79,80). Prema navedenim monografijama, broj vidljivih čestica i čestica ispod granica vidljivosti bi se trebao rutinski kontrolirati i smanjiti na najmanju moguću mjeru u svim parenteralnim pripravcima namijenjenim ljudima i životinjama, obzirom da se čestice tih veličina smatraju potencijalnom ugrozom sigurnosti takvih lijekova (79). Međutim, obzirom da za topljiva agregatna onečišćenja ne postoje kompedijalno definirane najveće dozvoljene granice, iste se postavljaju u zahtjevima kakvoće lijeka individualno, od situacije do situacije. Čestice koje su ispod granica vidljivosti obično ne čine značajan udio u masi ukupnih proteina u lijeku da bi bile kvantificirane prema gubitku mase proteina na kraju procesa proizvodnje ili tijekom stabilnosti. Broj takvih čestica se obično određuje prebrojavanjem u definiranom području veličina. Za čestice ispod granica vidljivosti se često kaže kako su prevelike da bi ih se odredilo pomoću kromatografije isključenjem po veličini (engl. *size exclusion chromatography*, SEC), ali da su suviše male da bi se vidjele golim okom (čestice u rasponu veličina između 0,1 i 10 µm su građene od milijuna proteinskih molekula) (81). Nadalje, čestice veličine ispod 10 µm nisu obuhvaćene ranije navedenim monografijama Ph. Eur. i USP. Prema tome, iako agregati veličine ispod granica vidljivosti predstavljaju proteinska onečišćenja koja potencijalno izazivaju najviše imunogenosti, čestice koje su manje od 10 µm se trenutno uopće ne kontroliraju u monoklonskim protutijelima i ostalim proteinskim lijekovima, što je nedostatak u trenutno važećim regulatornim preporukama i smjernicama (63,79,81).

Agregati veličina preko 1 – 2 µm se mogu detektirati i kvantificirati metodama prebrojavanja, dok se za one veličinom ispod 0,1 µm koriste metode bazirane na određivanju koncentracije (77). Brojni radovi govore u prilog tome kako su proteinski agregati jedan od glavnih faktora koji uzrokuje imunogenost monoklonskih protutijela. Zahtjevi kakvoće za sadržaj proteinskih oligomera u biološkim lijekovima se postavljaju prije no što ti lijekovi uđu u kliničke studije, a granice tako postavljenih zahtjeva se kvalificiraju upravo na temelju rezultata dobivenih u tim studijama (77).

Ispitivanje vidljivih čestica i onih koje su ispod granice vidljivosti se rutinski provodi u parenteralnim lijekovima kod puštanja u promet, kako bi se minimizirao rizik od začepljenja krvnih žila sitnim egzogenim česticama iz injekcijske otopine prilikom intravenske primjene. U skladu s navedenim su postavljene i kompedijalne granice za ispitivanje brojanjem čestica ispod granice vidljivosti u prigušenoj svjetlosti (USP <787>); pripravak udovoljava ispitivanju ako prosječan broj čestica prisutnih u spremnicima do maksimalnog volumena 100 ml veličine 10 µm ili veće ne prelazi 6000 po spremniku, odnosno broj čestica veličine 25 µm ili veće ne prelazi 600 po spremniku (77,80,81).

Čestice ispod granice vidljivosti mogu imati negativan utjecaj na farmakokinetiku lijeka, kao i na njegovu učinkovitost, u istom ili čak i većem opsegu kao i ostali razgradni produkti u lijekovima, poput topljivih agregata i drugih onečišćenja koja su kvalificirana i kvantificirana tijekom karakterizacije lijeka.

4.3 Kontrola agregacije tijekom razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela – smjernice i iskustva

Kako bi se proizveo djelotvoran lijek adekvatne kakvoće i sigurnosnog profila, u razvoju, proizvodnji i provjeri kakvoće lijeka kod puštanja u promet i u roku valjanosti se primjenjuju regulatorno-znanstvene smjernice za proizvodnju i provjeru kakvoće bioloških/biotehnoških lijekova, objavljene na mrežnim stranicama EMA-e (engl. *European Medicines Agency*, Europska Agencija za lijekove) (82). Glavna smjernica korištena u razvoju, proizvodnji i kontroli kakvoće monoklonskih protutijela je *Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products* (EMA/CHMP/BWP/532517/2008), važeća od rujna 2016. i bazirana na Ph. Eur. monografiji *Monoclonal antibodies for human use* (07/2023:2031) (53,79).

Cilj pretformulacijskih ispitivanja u razvoju monoklonskih protutijela je proizvesti učinkovit i siguran lijek, odgovarajuće kakvoće tijekom proizvodnje, primjene te tijekom čuvanja lijeka u roku valjanosti (44,53). Tijekom razvoja monoklonskog protutijela je potrebno odgovarajuće karakterizirati strukturu djelatne tvari te obrazložiti njezin mehanizam djelovanja, biološku aktivnost i stabilnost. Potrebno je dobro poznavanje strukture željenog proteina, a time i njegovih svojstava, da bi se prilikom definiranja procesa proizvodnje izbjegle moguće promjene strukture koje mogu imati neželjene kliničke ishode. Svojstva proteina ovise o poziciji aminokiselina koje ga čine i lokaciji svakog bočnog lanca u prostornoj strukturi (43).

Bitno je definirati i opisati njegova imunokemijska svojstva, kao što su izotip, alotip, afinitet prema antigenima te njihove efektorske funkcije. Naglasak treba biti stavljen i na potencijalnu imunogenost monoklonskog protutijela koje se želi proizvesti, posebno u slučaju kada protutijelo sadrži strane, animalne sekvence (npr. mišja, kimerna ili humanizirana monoklonska protutijela) ili su u njegovoj strukturi detektirani potencijalno imunogeni epitopi (53).

Većina proteinskih lijekova se proizvodi tehnologijom rekombinantne DNA (engl. *recombinant deoxyribonucleic acid technology*, rDNA), koja omogućuje manipulaciju genima i stanicama s ciljem proizvodnje strukturno složenih lijekova koje nije moguće ili je teško dobiti kemijskom sintezom ili izolacijom iz prirodnih izvora (49,83).

Kroz opis postupka proizvodnje monoklonskih protutijela je potrebno demonstrirati kako je definirana odgovarajuća strategija kontrole kvalitete u svim fazama proizvodnje lijeka i da se čitavo vrijeme proizvodnje mogu detektirati i po potrebi kvantificirati sva potencijalna onečišćenja. Poseban naglasak treba se staviti na parametre procesne kontrole (engl. *in-process parameters*), što podrazumijeva (kritična) svojstva kakvoće samog lijeka i parametre proizvodnog procesa (npr. pH, temperaturu, vrstu kolone i dr.). Predložena strategija kontrole tijekom proizvodnje treba osigurati da je proteinski lijek odgovarajuće kakvoće tijekom svih faza proizvodnje, što uključuje i odgovarajuću kontrolu onečišćenja koja mogu nastati uslijed agregacije ili posttranslacijskih modifikacija monoklonskog protutijela (44,53). Svi koraci u industrijskoj proizvodnji proteinskih lijekova trebaju biti odgovarajuće opisani i validirani, kako bi se lakše mogla procijeniti mogućnost nastanka agregatnih onečišćenja, kao i njihovih svojstava i mehanizama stvaranja (43).

Industrijska proizvodnja bioloških lijekova obuhvaća skup složenih procesa, čiji finalni produkt treba biti proteinski lijek u prikladnom farmaceutskom obliku, učinkovit i siguran za primjenu te odgovarajuće kakvoće. Regulatorna tijela imaju zadaću procjene kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti bioloških lijekova, temeljem koje daju ili ukidaju odobrenje za stavljanje lijeka u promet. Prilikom te procjene, ne provodi se analiza svake serije biološkog lijeka, već je obveza proizvođača da osigura ujednačenost i minimalne varijabilnosti između serija lijeka. Navedeno proizvođač lijeka osigurava kroz postavljanje odgovarajuće nadziranog i kontroliranog procesa proizvodnje, kojim se dobivaju konzistentni proteinski lijekovi prikladni za planiranu kliničku primjenu (43).

4.4 Kontrola i minimiziranje agregacije u monoklonskim protutijelima

Agregacija proteina je neizbježan događaj karakterističan za gotovo sve faze u proizvodnji proteina, transport, čuvanje i primjenu lijeka te predstavlja velik izazov u proizvodnji učinkovitog biološkog lijeka odgovarajuće kakvoće, prvenstveno sigurnog za primjenu. Brojni su faktori koji utječu na stabilnost i funkciju proteina. U izloženosti stresnim uvjetima, poput visoke temperature ili oksidativnog stresa, može doći do razmatanja ili pogrešnog smatanja proteina, što za posljedicu može imati nastanak disfunkcionalnih proteina. Preko 30 različitih humanih bolesti, kao što su Alzheimerova, Parkinsonova ili Huntingtonova bolest, dovodi se u vezu s pogrešnim smatanjem i agregacijom proteina, uslijed čega nastaju različiti oligomeri, linearni agregati i vidljive čestice niske topljivosti. Osim što je u pozadini različitih neurodegenerativnih bolesti, agregacija proteina predstavlja veliki izazov u razvoju i svim fazama proizvodnje bioloških lijekova. Tijekom faze pročišćavanja proteina, otapanje netopljivih agregatnih čestica predstavlja poseban izazov, obzirom da se uvođenjem dodatnih koraka za pročišćavanje u konačnici može smanjiti ukupni finalni prinos proteina (66).

4.4.1 Kontrola agregacije tijekom proizvodnje bioloških lijekova

4.4.1.1 Uzvodna faza uzgoja u bioreaktoru (engl. *upstream process*)

U cilju smanjenja troškova i problema sa stabilnošću, sigurnošću, djelotvornošću i kakvoćom bioloških lijekova, kontrolu nastanka i uklanjanja agregatnih onečišćenja iz lijeka je najoptimalnije provesti još tijekom same proizvodnje. Velik pomak i napredak u optimizaciji proizvodnje monoklonskih protutijela predstavlja upotreba dizajna eksperimenta (engl. *design-of-experiment, DoE*), principa u nadzoru proteinske agregacije. U jednoj od studija je provedeno ispitivanje utjecaja temperature, pH, osmolarnosti, agitacije, valproatne kiseline i sredstava protiv pjenjenja na agregaciju u CHO kulturi stanica. Zaključeno je kako promjena pH ima minimalan utjecaj na agregaciju proteina, dok su promjene temperature dovele do pojačanog formiranja agregata (nakon dulje izloženosti višoj temperaturi u kulturi stanica je došlo do povećanog nastanka agregata, a nakon pomaka ka nižim temperaturama došlo je i do promjena u svojstvima agregata – na temperaturama ispod 32°C smanjile su se agregatne čestice, a na onim od 32-35°C došlo je do pojačanog stvaranja agregata).

U drugoj su studiji ispitivani različiti odnosi između vrijednosti pH i temperature u nastanku agregata u eritropoetin fuzijskom proteinu (engl. *erythropoietin fusion protein, Epo-Fc*) u CHO

kulturi. Sumarno je zaključeno kako standardizirana temperatura od 37°C pri pH od 7.0 možda ipak nije optimalna u staničnoj kulturi kod proizvodnje bioloških lijekova te da manje snižavanje temperature i pH u prikladnom trenutku imaju bolji utjecaj na minimiziranje agregacije proteina.

Iako su kulture stanica sisavaca (dominantno CHO stanice) standard u sintezi bioloških lijekova, sve se više razvijaju mnoge *in vitro* metode sinteze proteina (engl. *cell-free protein synthesis* (CFPS)) kao brze i učinkovite visoko protočne metode (engl. *high-throughput methods*). Pomoću tih su metoda enzimske komponente ekstrahirane iz staničnog lizata i potom upotrijebljene kako bi ubrzale procese translacije, transkripcije i smatanja proteina. Posljednjih godina CFPS metode su usavršene te umjesto za sinteze manjih proteinskih fragmenata sada služe za proizvodnju čitavih molekula monoklonskih protutijela. Ipak, taj napredak u kompleksnosti je doveo i do povećanog rizika od agregacije proteina. Prema jednoj od studija iz 2017. zaključeno je da, ukoliko se teški lanci protutijela sintetiziraju neovisno o lakim lancima, dolazi do formiranja više agregata. S druge strane, ukoliko se kreće prvo sa sintezom lakih lanaca, a naknadno s teškim lancima, uočena agregacija proteina je minimalna. Na temelju navedenog je zaključeno kako laki lanci omogućavaju lakše i nesmetano smatanje teških lanaca, odnosno da su bitni u njihovoj stabilizaciji (2).

4.4.1.2 Nizvodna faza proizvodnje bioloških lijekova (engl. *downstream process*)

Pročišćavanjem proteina se uklanjaju potencijalno prisutna onečišćenja poput stanica domaćina i proteinskih molekula koje potječu iz njih, nukleinskih kiselina, virusa i ostataka medija. To je bitno iz razloga što navedena onečišćenja mogu imati negativan utjecaj na kakvoću i sigurnost biološkog lijeka. Proces pročišćavanja mora biti siguran, ponovljiv, robustan i ekonomičan, a ovisi o svojstvima biološkog lijeka i njegovoj proizvodnji (43,84). Različite se separacijske tehnike koriste prilikom pročišćavanja proteina, primjerice membranska odjeljivanja (različite vrste filtracija, dijaliza i sl.), centrifuga, ekstrakcija, taloženje i kromatografije. Potrebno je ukloniti stanične ostatke, što se provodi postupcima centrifugiranja ili filtracije.

Uklanjanje patogena jako je bitno u proizvodnji proteinskih lijekova za primjenu kod ljudi. Lijekovi namijenjeni parenteralnoj primjeni moraju biti sterilni. U njihovoj je proizvodnji nužno primjenjivati aseptične tehnike kad god i gdje god je to moguće, uz odgovarajuću primjenu čistog zraka i mikrobiološku kontrolu sirovina i opreme. Bakterije se mogu ukloniti

filtracijom upotrebom filtera promjera pora manjih od 0,2 μm , dok se sirovine se steriliziraju pri temperaturama od 121°C radi smanjivanja rizika onečišćenja bakterijama (43,84).

Prilikom pročišćavanja proteina je potrebno provesti inaktivaciju i uklanjanje potencijalno prisutnih virusa. Oni se mogu unijeti različitim putevima, a najčešće je to preko inficiranih staničnih linija ili putem životinjskog seruma. Obzirom da njihova koncentracija u pročišćenom proizvodu može biti vrlo niska, često ih je teško detektirati. Zato je nužno imati odgovarajuće validirane metode za inaktivaciju i uklanjanje moguće viralne kontaminacije. Metode koje se najčešće koriste su toplina, zračenje, ultrazvuk, nanofiltracija, ekstremne pH vrijednosti, deterdenti, različita otapala te neki dezinficijensi (43,84).

Proteinska onečišćenja koja mogu biti prisutna u gotovom lijeku su agregirani proteini, deaminirani proteini, proteini s varijabilnostima glikozilacije te mnogi drugi. Proteini su podložniji razgradnji proteazama na višim temperaturama te je pročišćavanje potrebno provoditi na nižim temperaturama (2-8°C), što može predstavljati probleme u proizvodnji većih proizvodnih serija lijeka (43).

Tijekom proizvodnog procesa u bakterijskim stanicama mogu se nakupljati inkluzijska tijela, odnosno agregirani amorfnj proteini koji su vezani kovalentnim i nekovalentnim vezama. Proteini se mogu osloboditi iz inkluzijskih tijela razbijanjem stanica, izdvajanjem inkluzijskih tijela te njihovim otapanjem, pri čemu se koriste denaturirajući agensi poput natrijevog dodecil sulfata, ureje ili gvanidin hidroklorida (43,84).

Agregacija otežava proces pročišćavanja proteina u završnoj fazi njihove proizvodnje. Uobičajeni postupak pročišćavanja protutijela podrazumijeva izdvajanje djelatne tvari afinitetnom kromatografijom na proteinu A, uklanjanje onečišćenja, ispiranje kiselinom (pH 3.5), neutralizaciju te poliranje i filtraciju. Najčešći primjer afinitetne kromatografije je kromatografija s protein-A ligandom koja se desetljećima koristi u znanosti i industriji. Spomenuta metoda omogućava uklanjanje većine proteina stanica domaćina i indirektno uklanja viruse iz medija (npr. engl. *Simian vacuolating virus 40*, SV40 i engl. *Minute virus of mice*, MMV) (43,84).

Protein A se često koristi za specifično i reverzibilno vezanje na Fc domenu protutijela ili drugih proteina koji sadrže taj fragment. Proces adsorpcije i desorpcije proteina s kolone tijekom kromatografije pomoću proteina A mijenja sloj vode oko pročišćenog proteina, što posljedično utječe na promjene u proteinskoj konformaciji i dovodi do povećane sklonosti agregaciji. Na temelju nekih ispitivanja, utvrđeno je kako se agregati monoklonskih protutijela iz uzvodne

faze bioproizvodnje mogu puno jače vezati na kromatografsku smolu proteina A od monomera protutijela. Također, uočeno je i kako su agregati koji uključuju i Fab-Fab i Fc-Fc interakcije između protutijela stabilniji i vežu se za više protein A liganda nego agregati koji uključuju samo Fab-Fab interakcije. Obzirom na navedeno, može se zaključiti kako razlika u afinitetu za vezivanje na protein A utvrđuje razliku u mogućnosti uklanjanja agregata protutijela tijekom inicijalne faze njihova pročišćavanja (85).

Nadalje, tijekom koraka ispiranja proteina kiselinom može doći do denaturacije proteina, što povećava rizik od agregacije. Nekim studijama je utvrđeno kako optimizirani pH i odabir odgovarajuće kromatografije pomoću proteina A smanjuju proces agregacije monoklonskih protutijela za čak 25-30%, a molekulska masa proteinskih agregata je tako smanjena s 18% u pročišćenoj kulturi stanica na 12% u eluatu nakon protein A kromatografije (85).

4.5 Prevencija i minimiziranje intrinzične agregacije proteina te uzroci nestabilnosti koje dovode do agregacije proteina

Proteinska agregacija se uglavnom može predvidjeti i donekle prevenirati (smanjiti) još tijekom razvoja formulacije bioloških lijekova i njihove proizvodnje, kroz procjenu čimbenika važnih u oblikovanju lijeka koji uključuju koncentraciju djelatne tvari, puferne i pomoćne tvari. Koncentracija proteinskog lijeka utječe direktno na koloidalnu stabilnost čitavog sustava te posljedično i na sklonost agregaciji. Nadalje, obzirom da stabilnost proteina ovisi o pH i ionskoj jakosti, kritični korak u formulaciji je i procjena sastava najoptimalnijeg pufera i soli korištenih u proizvodnji lijeka. Osim navedenog, u stabilizaciji otopina proteina se mogu koristiti i dodaci poznatiji kao kaotropi i kozmotropi. Kaotropi su tvari koje remete i uništavaju strukturu proteina, poput magnezijevog klorida i ureje čija je uloga poboljšati topljivost proteina i smanjiti sklonost agregaciji kroz destabilizaciju unutarmolekulskih vodikovih veza u proteinu. S druge strane, kozmotropi su tvari koje stabiliziraju izvornu strukturu proteina, poput magnezijevog sulfata. Određivanje koncentracije ovakih dodataka je kritično, obzirom da visoka koncentracija kozmotropa može dovesti do isoljavanja proteina u otopinu, a visoka koncentracija kaotropa može uzrokovati denaturaciju nativnih proteina. Obzirom da su interakcije između soli i proteina elektrostatske prirode, određivanje prikladne količine soli uglavnom ovisi o pH, koncentraciji proteina te pI vrijednosti (66,85).

Različiti uvjeti i čimbenici, poput visoke koncentracije proteina, mehaničkog stresa, promjena pH i ionske jakosti može dovesti do proteinskih nestabilnosti. Primjerice, kromatografija, kao

jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda u pročišćavanju, može uzrokovati agregaciju proteina, što se može izbjeći dodatkom stabilizatora proteina. Dodatni primjer je dodatak glutationa i askorbatne kiseline u prevenciji reaktivnih kisikovih radikala koji mogu uzrokovati agregaciju proteina. Nadalje, u kromatografiji može biti potreban niski pH, što može uzrokovati konformacijske ili koloidalne nestabilnosti proteina i dovesti do njihove agregacije (66,76,85).

Isto tako, do agregacije proteina može doći tijekom ili nakon primjene lijeka. Nakon proizvodnje, većina terapijskih proteina može u idealnom slučaju imati rok valjanosti između 2 i 3 godine uz čuvanje na temperaturi 2-8°C, što je izazovno postići, obzirom na sklonost proteina agregaciji, fizičko – kemijskoj razgradnji i posljedičnom gubitku aktivnosti.

Fizička se razgradnja proteina odvija tijekom njihova razmatanja i agregacije, a kemijska razgradnja podrazumijeva oksidaciju, deamidaciju i kidanje disulfidnih veza. Isto tako, osim pod utjecajem stresnih uvjeta, do agregacije proteina može doći i u „normalnim“ (povoljnim) uvjetima native konformacije proteina. Nastanak malih agregata je reverzibilan proces, dok su agregacija denaturiranih proteina ili oblikovanje nenativnih β -ploča ireverzibilni procesi (76,85).

Preferirani način primjene otopina pripravaka monoklonskih protutijela je supkutani, što uglavnom zahtijeva visoke koncentracije protutijela. Uslijed promjena temperature, pH, koncentracije soli, vrste pufera i uvjeta čuvanja, može doći do nastanka ireverzibilnih agregata, uslijed čega se najčešće formiraju amiloidne strukture s karakterističnim β -nabranim pločama. Na primjeru ispitivanja procesa agregacije na dva protutijela (s pI vrijednostima ok 8.5 i 8.0) pri različitim temperaturama u acetatnom i citratnom puferu (koncentracije 100 mM i pH 3.0 sa 100 mM NaCl), zaključeno je kako je agregacija veća u prisustvu citratnog pufera. Utvrđeno je kako je stabilnost protutijela u citratnom puferu vrlo niska, što posljedično dovodi do visoke stope agregacije (76).

Tijekom pročišćavanja proteina, agregati i ostale netopljive čestice se otapaju, što uključuje uvjete visoke koncentracije proteina, smicanja proteina (engl. *shear stress*, centrifugiranje visokom brzinom), promjena u pH i ionskoj jakosti, što sve može dovesti do nestabilnosti proteina. Postupci pročišćavanja, kao što su filtracija i inaktivacija virusnih stanica te kromatografija mogu također dovesti do agregacije proteina (66,76). Isto tako, može doći adsorpcije proteina na površinu stacionarne faze, što može dovesti do razmatanja proteina i povećane stope agregacije. Priređivanje proteinskih preparata gotovo uvijek podrazumijeva i postupke kao što su centrifugiranje i naprezanje smicanjem te izlaganje proteina dodirnoj

površini zraka i tekućine (engl. *air – liquid interface*), također mogu dovesti do agregacije proteina te njihov utjecaj treba biti minimiziran (66,76).

Razumijevanje mehanizama agregacije i razvoj prikladnih strategija njezine minimizacije su zadnjih desetljeća postali imperativ u razvoju proteinskih lijekova, u cilju osiguravanja kliničke učinkovitosti takvih lijekova. Poznavanje strukture protutijela te mehanizama nastanka agregata, njihova nakupljanja i zadržavanja u proteinskim lijekovima važno je za ispravno shvaćanje funkcioniranja nastanka različitih vrsta agregatnih onečišćenja. Mnogobrojni su faktori koji doprinose agregaciji proteina, ali fizičko – kemijska svojstva monoklonskih protutijela određuju vrstu te ostale karakteristike različitih oligomernih formi agregatnih onečišćenja (66,86).

Utvrđeno je kako su nestabilnosti uslijed promjena različitih proteinskih konformacija vezane uz nastanak agregatnih onečišćenja različitih veličina, od topljivih oligomera preko dispergiranih nanočestica do vidljivih precipitata. Isti osnovni mehanizam agregacije proteina može dovesti do nastanka agregata različitih veličina, što ovisi o topljivosti agregatnih čestica (66). Konformacijske karakteristike proteina i sklonost agregaciji ovise o uvjetima u okolini u kojoj se taj protein nalazi, odnosno o uvjetima u proizvodnom postupku, kao što su pH otopina, ionska jakost, koncentracija ostalih tvari u otopini i dr.

4.5.1 Faktori koji utječu na fizičko – kemijsku stabilnost monoklonskih protutijela

Mnogi faktori mogu utjecati i na fizičku i kemijsku stabilnost monoklonskih protutijela, zbog čega su razvoj formulacije i upotreba odgovarajućih pomoćnih tvari dosta izazovni za proizvođače monoklonskih protutijela (87).

Faktori koji utječu na stabilnost monoklonskih protutijela su sljedeći:

- **Struktura proteina** – sve razine strukture proteina utječu na njegovu stabilnost. Glikani mogu stabilizirati molekule monoklonskih protutijela i time smanjiti potencijal njihove agregacije. Tercijarna struktura može imati značajan utjecaj na agregaciju, obzirom da su dosadašnja istraživanja pokazala kako su djelomično smotani proteini više skloni agregaciji od nativnih ili kompletno smotanih proteina (86,87).

- **Koncentracija proteina i potencijal samoasocijacije proteina** – visoke koncentracije proteina povećavaju viskoznost otopina, što povećava potencijal za agregacijom proteina, povećavajući mogućnost međuproteinskih interakcija i samoasocijacije proteinskih molekula (86,87).
- **Temperatura** – visoke temperature mogu uzrokovati promjene u konformaciji proteina koje mogu dovesti do agregacije. Toplinom uzrokovano razmatanje proteina uglavnom dovodi do ireverzibilnih konformacijskih promjena i ubrzava kemijske reakcije, kao što su deamidacija i oksidacija. Niske temperature također mogu uzrokovati proteinsku denaturaciju, utječući na koloidalnu i konformacijsku stabilnost proteina. Agregacija uzrokovana zamrzavanjem je uglavnom reverzibilna, obzirom da većina proteina ostaje u svojoj nativnoj konformaciji (86,87).
- **Dodirne površine (engl. *interfaces*)** – obzirom da su proteini površinski aktivne molekule, može doći do adsorpcije različitih tvari na hidrofobne dijelove proteina. Adsorpcija može utjecati na stabilnost i gubitak sadržaja lijeka te posljedično subdoziranje i smanjenu djelotvornost. S druge strane, desorpcija molekula s monoklonskih protutijela može dovesti do njihove denaturacije i agregacije (86). Pojave adsorpcije i desorpcije se najviše mogu uočiti kod interakcija lijeka sa spremnikom, odnosno materijalom od kojeg je načinjen. Najčešće korišteni primarni pakirni materijal bočica je staklo klase I, koje na sebe može adsorbirati velike količine proteina tijekom roka valjanosti lijeka. Za staklo i silikonske mikročestice je karakteristična adsorpcija humaniziranih monoklonskih protutijela, ali bez utjecaja na njihovu sekundarnu strukturu (87). Interakcije proteina sa staklom mogu uzrokovati i analitičke probleme, obzirom da se proteini mogu adsorbirati na staklene površine kromatografskih bočica i utjecati na analitičku reproducibilnost (primjerice kod kromatografije isključenjem po veličini). Isto tako, materijal od kojeg su napravljene IV (engl. *intravenous*, intravenske) vreće koje služe za pohranu formulacija s monoklonskim protutijelima, mogu imati utjecaj na koncentraciju proteina i proces formiranja agregata. Npr., kod IgG₄ otopina opremljenih u PVC (engl. *polyvinyl chloride*, polivinil klorid) vreće je uočen pad koncentracije protutijela i povećano formiranje čestica ispod granice vidljivosti te zamućenje, u odnosu na poliolefinske IV vreće, kod kojih je to uočeno u manjem obimu. Dodatak polisorbata 20 je značajno smanjio nastanak proteinskih čestica i zamućenost u oba tipa IV vreća. Za polisorbate je poznato da povećavaju otpuštanje tvari iz PVC-a

(engl. *leachables*), a koje mogu ući u interakciju s proteinima i formirati heterogene čestice. Prema jednoj od studija, otopine bevacizumaba koje su iz originalne staklene bočice prepakirane u plastične štrcaljke (detalji o tipu plastične ambalaže se ne navode) iz tri različite ljekarne su analizirane i u svim je uzorcima uočen niži sadržaj IgG proteina, a povećana količina agregiranih čestica. Opisano se često uočava i tijekom postupka proizvodnje i čuvanja bioloških lijekova (87).

Organske tvari koje se često koriste tijekom proizvodnje bioloških lijekova mogu ući u interakcije s proteinima. Jedan od takvih primjera je i silikonsko ulje, koje se koristi kao sredstvo za podmazivanje (lubrikant) klipova štrcaljki i čepova bočica. Adsorpcija proteina na silikonsko ulje može dovesti do nastanka viskoelastičnog gel sloja, a proces je brži što je veća koncentracija proteina(87). Ukoliko tako formiran gel pukne pod utjecajem mehaničkog stresa, može doći do oslobađanja agregatnih čestica i čestica koje su ispod granice vidljivosti u otopinu. Tako nastali agregati su nerijetko nepravilnih oblika i veličina te su često netopljivi.

Nadalje, ukoliko su agregati prisutni u otopini monoklonskog protutijela, mogu se adsorbirati na filtere korištene tijekom proizvodnje i provjere kakvoće navedenih bioloških lijekova te ih u nekim slučajevima začepiti ili pak dovesti do smanjenja aktivne doze lijeka planirane za primjenu. Prema nekim ispitivanjima, upotreba 5%-tne otopine glukoze može smanjiti adsorpciju proteina na neke vrste filtera (polietersulfonske i poliamidne).

Osim proteina, može doći do adsorpcije pomoćnih tvari korištenih u oblikovanju pripravaka monoklonskih protutijela te posljedično smanjenje njihove koncentracije u formulacijama navedenih bioloških lijekova može dovesti do smanjenja njihove stabilnosti.

- **Svjetlost** – izlaganje proteina svjetlosti može dovesti do njihove razgradnje i umrežavanja. Posebno se to odnosi na aromatske aminokiseline koje su vrlo fotoosjetljive i dovode do razgradnje kroz fotooksidaciju i oksidirajuće radikale. Pokazano je i kako izlaganje svjetlosti ne utječe značajno na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina te da su tekuće formulacije fotoosjetljivije od liofiliziranih. Ispitivanja pokazuju kako izlaganje različitih formulacija monoklonskih protutijela svjetlosti pod ICH uvjetima (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove) dovodi do obojenja otopina,

nastanka agregata veće molekulske mase te fotooksidacije aminokiselinskih ostataka u Fc ili Fab regijama (71). Izlaganje dnevnom svjetlu dovodi do manjih modifikacija u nekim formulacijama monoklonskih protutijela, dok je većina nepromijenjena i stabilna u ambijentalnim uvjetima (71,73). Daljnje su studije pokazale i da fotostabilnost monoklonskih protutijela ovisi više o ukupnom trajanju izloženosti svjetlosti u odnosu na intenzitet te svjetlosti.

- **Pomoćne tvari** – proteini su uobičajeno stabilni obzirom na agregaciju u uskom pH području. Niže pH vrijednosti mogu dovesti do cijepanja proteina i izomerizacije, dok više pH vrijednosti uzrokuju deamidaciju i oksidaciju, što sve povećava potencijal za proces agregacije. Elektroliti imaju značajan učinak na stabilnosti proteina utječući na njihovu konformacijsku stabilnost, topljivost, međumolekulska odbijanja i stupanj nastanka agregata (87). Obzirom na nabijene aminokiselinske ostatke na proteinskoj površini koji ulaze u interakcije s ionima, na proteine se vezuju soli, čiji učinak ovisi o njihovoj prirodi i koncentraciji te u konačnici mogu dovesti do stabilizacije proteina (engl. *salting in*) ili taloženja (engl. *salting out*). Tip soli bitno utječe na kinetiku agregacije. Primjerice, natrijevi ioni uzrokuju manji porast agregacije proteina u odnosu na kalcijeve ili kalijeve ione, pri pH 4, ali u nekim slučajevima dodatak odgovarajućeg aniona (npr. sulfatnog) može vratiti molekulu protutijela u nativnu formu. Razrjeđenje pomoćnih tvari koje služe za stabiliziranje proteina (npr. surfaktanata) može uzrokovati nestabilnosti proteina, posebno u slučaju kad je formulacija lijeka umetnuta u vreću za infuziju. Primjerice, otopine bevacizumaba i trastuzumaba razrijeđene 5%-tnom glukozom pokazuju brzu agregaciju kad se *in vitro* miješaju s ljudskom plazmom, što je posredovano precipitacijom proteina plazme uslijed promjene pH. Obzirom na uočeno, FDA je zabranila korištenje 5%-tne glukoze kao sredstva za razrjeđivanje intravenskih formulacija Herceptina, Avastina i Remicade-a (2). Surfaktanti se uobičajeno dodaju formulacijama monoklonskih protutijela kako bi se smanjila izloženost hidrofobnih regija te posljedično umanjile međuproteinske interakcije i prevenirala agregacija proteina. U formulacijama protutijela se često koriste neionski surfaktanti polisorbati 20 i 80 te poloksameri kao alternativa. Polisorbat 80 pokazuje dobra svojstva zaštite od mehaničkog stresa u odnosu na druge neionske i anionske surfaktante u istoj koncentraciji. Polisorbati pokazuju dobra antiagregacijska svojstva ukoliko se dodaju u otopine različitih koncentracija humaniziranog imunoglobulina G (86,88). U nekim slučajevima surfaktanti mogu smanjiti stabilnost monoklonskih

protutijela, primjerice ukoliko se ponajprije vežu na nesmotane proteine, čime smanjuju stabilnost nativnih proteina. Ipak, unatoč dobrim svojstvima sprječavanja agregacije proteina, polisorbati pokazuju fotoosjetljivost i mogu se razgraditi lipazama i drugim enzimima koji potječu iz onečišćenja zaostalih iz proizvodnog procesa. Ciklodekstrini predstavljaju moguće dobru alternativu surfaktantima, obzirom da imaju dobar toksikološki profil, nisu podložni autooksidaciji i manje ometaju stabilnost proteina.

Konzervansi mogu potaknuti agregaciju proteina kroz još nerazjašnjeni mehanizam. Uočeno je kako primjerice dodavanje benzilnog alkohola može poremetiti terciarnu strukturu nekih proteina, bez da ima utjecaj na sekundarnu strukturu. Također, porastom koncentracije benzilnog alkohola raste i stupanj nastanka proteinskih agregata. Neke studije pokazuju kako fenolni konzervansi potiču termalnu nestabilnost i agregaciju proteina (88).

Šećeri i polioli korišteni kao pomoćne tvari mogu ući u interakcije s proteinima i posljedično stabilizirati proteine obzirom na smanjenu sklonost razmatanju i agregaciji. Često se koristi saharoza, ali još češće drugi nereducirajući šećeri, obzirom da su neutralniji (ne vode do glikacije proteina). Formulacije protutijela koje sadrže melibiozu (reducirajući šećer) su manje sklone agregaciji. Primjerice, u formulacijama rituksimaba koje sadrže melibiozu su uočene manje promjene u odnosu na onu bez tog šećera (utjecaj na sekundarnu strukturu i nekovalentna agregacija) (87).

Kada imaju ulogu pomoćnih tvari, pojedine aminokiseline pokazuju utjecaj na stabilnost monoklonskih protutijela. Jedan od primjera je arginin, koji smanjuje potencijal agregacije u formulacijama protutijela, povećavajući topljivost proteina i štiteći od agregacije potaknute svjetlošću i toplinom. Nadalje, histidin se često koristi kao pufer u formulacijama monoklonskih protutijela, koji može djelovati i proagregacijski i protuagregacijski, ovisno o koncentraciji u kojoj se nalazi u formulaciji. Za prolin je također specifično da povećava topljivost monoklonskih protutijela vezujući se za aromatske aminokiselinske ostatke i izlažući hidrofobne regije proteina, uslijed čega smanjuje međuproteinske interakcije, viskoznost otopine i agregaciju pri pH koji je blizu pI vrijednosti proteina.

Metalni ioni mogu dovesti do fragmentacije monoklonskih protutijela i nastanka slobodnih radikala. Mogu ući u direktnu interakciju s proteinima uslijed proizvodnje radikala ili s kisikom kad formiraju reaktivne kisikove radikale koji mogu dovesti do cijepanja proteina. Na temelju dostupnih ispitivanja, utvrđeno je kako su ioni bakra i željeza najštetniji za monoklonska protutijela. Zaštita od nestabilnosti uzrokovanih

metalnim ionima se postiže upotrebom kelirajućih sredstava, kao što je EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*). Osim njihove prirode, kakvoća pomoćnih tvari i potencijalna onečišćenja koja mogu nastati tijekom njihove proizvodnje i čuvanja mogu imati bitan učinak na stabilnost monoklonskih protutijela i formiranje agregatnih onečišćenja (87).

- **Mehanički stres** – monoklonska protutijela mogu biti izložena značajnim razinama mehaničkog stresa tijekom transporta (prijevoza od proizvođača do korisnika) i manipulacija pripravkom (priprema IV-vreća, nestručno rukovanje). Jedan od čestih primjera mehaničkog stresa je agitacija (potresanje) koja se koristi radi postizanja homogenosti formulacije lijeka. Često se prilikom agitacije stvaraju mjehurići zraka, što u konačnici dovodi do formiranja čestica ispod granice vidljive svjetlosti, u rasponu veličine od 1,5 – 80 μm (najzastupljenije ove do 2 μm). Za formulacije monoklonskih protutijela koje se čuvaju u čvrstom stanju, agitacija može potaknuti trenje u bočici između praha lijeka i stijenki bočice, što u pojedinim slučajevima može biti pogoršano lokalnim zagrijavanjem i u konačnici dovesti do nastanka agregata. Ovo je jedan od razloga zašto su liofilizirani prašci formulacija monoklonskih protutijela osjetljiviji na mehanički stres i skloniji nastanku agregatnih onečišćenja od tekućih formulacija navedenih bioloških lijekova (87).

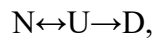
Drugi čest oblik mehaničkog stresa je smicanje koje ovisi o brzini kojom teku fluidi. Miješanje otopine dovodi do smicanja između faza (između otopine i površine), ali agregacija kao posljedica miješanja otopina može nastati kao posljedica trenja između štipića za miješanje i spremnika. U konačnici, navedeno može dovesti do nastanka malih čestica (manjih od 2 μm), unatoč tome što se u formulaciji može koristiti surfaktant. Postupci kao što su pumpanje, kavitacija u cijevima i filtracija se povezuju s pojavom smicanja i posljedičnog agregiranja čestica.

4.5.1.1 Fizičke nestabilnosti koje mogu dovesti do agregacije proteina

Proteinska agregacija nastaje uslijed fizičke nestabilnosti proteina, kao što je denaturacija proteina. Agregati mogu nastati procesom tzv. fizičke agregacije (samoasocijacije), kada agregati mogu nastati uslijed slabijih van der Waalsovih interakcija ili stvaranja vodikove veze između proteinskih struktura, bez promjena u primarnoj strukturi proteina. Također, mogu

nastati i kao kovalentni agregati uslijed stvaranja disulfidnih veza između (i unutar) proteinskih molekula.

Agregacija je često ireverzibilan proces, a agregati sadrže visoku koncentraciju proteina nenativne konformacije. Ireverzibilna agregacija se može opisati Lumry-Eyring-ovim modelom koji glasi:



gdje se N odnosi na nativni, U na nesmotani (razmotani), a D na deaktivirani oblik proteina. Na proteinu u nativnom obliku se prvo odvijaju konformacijske promjene koje su reverzibilne uslijed povoljnih energetske prijelaza. U nesmotanom proteinu su dostupniji hidrofobni krajevi koji su većinom skriveni u nativnom obliku te se uslijed njihovog izlaganja smanjuje topljivost proteina u vodenim puferima i povećava sklonost (samo)agregaciji.

Tijekom proizvodnje monoklonskih protutijela pomoću stanica sisavaca (npr. CHO stanica), različiti faktori mogu uzrokovati neželjene promjene na protutijelima. Primjerice, varijabilnost stanične linije, broj staničnih supkultura proizvedenih tijekom vremena, pasaža stanica i uvjeti u staničnoj liniji. Posttranslacijske modifikacije, poput glikozilacije ili fukozilacije, mogu utjecati na biološku aktivnost monoklonskih protutijela, npr. ADCC. Neka istraživanja su pokazala kako oligosaharidi na monoklonskim protutijelima smanjuju stopu njihove fragmentacije pri pH 4, ali ne između pH 5 i 9 (87). Nadalje, u kasnijim fazama životnog vijeka monoklonskih protutijela, može doći do drugih nestabilnosti uslijed prepakiravanja, slučajnih zamrzavanja ili kod razrjeđivanja prilikom primjene lijeka (87).

4.5.1.2 Kemijske nestabilnosti koje mogu dovesti do agregacije

- **Oksidacija** (uključujući nastanak disulfidne veze) je najčešći oblik kemijske razgradnje koji može dovesti do agregacije proteina. Neki su aminokiselinski ostaci podložniji oksidaciji od drugih, npr. metionin, histidin i cistein. Upravo oksidacija cisteina dovodi do stvaranja disulfidnih veza između aminokiselina, a disulfidne veze mogu nastati unutar molekule ili između više molekula i preferirano je pri bazičnom pH (87).
- **Deamidacija**, najčešće asparagina, može dovesti do poremećaja u polipeptidnoj strukturi.

- **Fragmentacija** u monoklonskim protutijelima se može dogoditi u disulfidnim i peptidnim vezama. Razaranjem disulfidne veze nastaju veći polipeptidni fragmenti (laki ili teški lanci monoklonskog protutijela), dok cijepanjem peptidne veze nastaje više fragmenata niže molekulske mase, različite veličine i svojstava (87).
- Iako se šećeri koriste kao pomoćne tvari koje stabiliziraju formulacije monoklonskih protutijela i kao diluensi u IV vrećama (5% dekstroza), **glikacija** monoklonskih protutijela može dovesti do nastanka neželjenih razgradnih produkata. Primarno se odvija između reducirajućih šećera i proteina, prilikom čega nastaju Schiffove baze iz kojih dalje mogu nastati stabilni ketoamini koji mogu utjecati na strukturu i funkciju proteina (87).

Kemijske modifikacije monoklonskih protutijela mogu dovesti do razlika u naboju mijenjajući im vrijednost izoelektrične točke (pI). Primjerice, kod deamidacije dolazi do smanjenja pI vrijednosti (porasta ukupnih negativnih naboja), a kod oksidacije dolazi do porasta pI vrijednosti (porasta ukupnih pozitivnih naboja). Veće promjene pI vrijednosti mogu utjecati na farmakokinetiku lijeka. Primjerice, porast pI vrijednosti može dovesti do smanjenja poluvremena života monoklonskih protutijela u serumu, dok smanjenje pI vrijednosti može utjecati na porast brzine (stupnja) eliminacije monoklonskog protutijela iz tijela (87).

4.6 Karakterizacija i provjera kakvoće monoklonskih protutijela

Karakterizaciju monoklonskih protutijela je potrebno provesti obzirom na strukturalna, fizičko – kemijska, imunološka i biološka svojstva, a obuhvaća i provjeru čistoće (sadržaja djelatne tvari) te sadržaja onečišćenja u monoklonskim protutijelima, u skladu s navedenim u ICH Q6B smjernici (45,89).

Strukturalna i fizičko – kemijska karakterizacija uključuju analizu slijeda aminokiselina, N- i C-terminalno sekvenciranje, peptidno mapiranje, određivanje klase, podklase, sastava lakih lanaca monoklonskog protutijela, određivanje slobodnih sulfhidrilnih grupa i disulfidnih mostova između lanaca, sastav ugljikohidrata te glikozilacijska mjesta i glikanske strukture, ukoliko su prisutne na teškim lancima monoklonskih protutijela, kao i posttranslacijske modifikacije (oksidacija, deamidacija itd. (45,53). Sekundarna, tercijarna i kvaternarna struktura proteina se skupno zovu strukturama višeg reda (engl. *higher order structures*, HOS) i odgovorne su za 3D oblik proteina i njegovo ispravno smatanje. Pogreške do kojih može doći prilikom smatanja proteina utječu na njegovu funkciju i mogu spriječiti vezivanje antigena na ciljano mjesto na

protutijelu, dovesti do izlaganja epitopa koji dovode do imunogenosti te posredovati u agregaciji proteina (89).

Što se imunokemijskih svojstava tiče, ispituju se svojstva vezanja protutijela i ciljnog antigena (afinitet vezanja, čvrstoća veze (avidnost), imunoreaktivnost (uključujući i ukriženu reaktivnost s drugim homolognim proteinima)), identifikacija CDR regija, biokemijska identifikacija epitopa te ispitivanje efektorskih funkcija ciljnog protutijela (npr. sposobnost vezanja i aktivacije sustava komplementa) (45,53). Biološka aktivnost i farmakokinetika monoklonskih protutijela ovise o vezi između protutijela i ciljnog antigena te je kontrola ove veze iznimno važna u karakterizaciji monoklonskih protutijela. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) i površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) su primjeri imunokemijskih metoda korištenih za karakterizaciju interakcije antigena i protutijela (89).

Biološka aktivnost protutijela treba biti ispitana prikladnim *in vitro* (posredovanim enzimima, radioizotopima ili fluorescencijom) i *in vivo* testovima, a mehanizam djelovanja i važnost efektorskih funkcija trebaju biti objašnjeni, uzevši u obzir sigurnost i učinkovitost lijeka (ukoliko je primjenjivo, potrebno je provesti detaljnu analizu ADCC, citotoksičnih svojstava, kao što je apoptoza stanice, sposobnost aktivacije sustava komplementa te afinitet vezanja na Fc γ i na FcRn receptore) (53).

Obzirom na vrlo složenu i heterogenu građu, monoklonska protutijela uglavnom imaju vrlo kompleksne profile onečišćenja koje je potrebno karakterizirati. Nastanak agregata, vidljivih čestica i čestica koje su ispod granice vidljivosti u lijeku su bitne pojave koje je potrebno pratiti na serijama monoklonskih protutijela kod puštanja u promet i tijekom ispitivanja stabilnosti (45,53). Polimeri i agregatna onečišćenja također trebaju biti adekvatno karakterizirani odgovarajućim ortogonalnim metodama. Potencijalna procesna onečišćenja, npr. proteini iz stanica domaćina (engl. *host cell proteins*, HCPs), stanična DNA, ostaci stanične kulture i slično, trebaju biti identificirani te kvalitativno i kvantitativno određeni, ukoliko je primjenjivo. Isto tako, sva ostala onečišćenja, koja mogu biti nenamjerno uvedena u proizvodni proces (mikroorganizmi, endotoksini) se također moraju kontrolirati u zahtjevu kakvoće lijeka (45,49,53).

Niže u Tablici 2. su prikazana svojstva monoklonskih protutijela koja se ispituju u cilju njihove karakterizacije, zajedno s najprikladnijim metodama korištenim u tu svrhu.

Tablica 2. Karakterizacija monoklonskih protutijela – svojstva i metodologija (preuzeto i prilagođeno iz (89)).

Tip karakterizacije	Svojstvo proteina	Analitičke metode
	Slijed aminokiselina	LC-MS/MS (ESI-MS, MALDI-TOF-MS)
	Sastav aminokiselina	AAA
	Slijed aminokiselina na N- i C- kraju	LC-MS/MS
	Peptidna karta	LC-MS/MS
	Slobodne sulfhidrilne skupine i disulfidni mostovi	LC-MS/MS (MALDI-TOF, ESI-MS), peptidno mapiranje, kolorimetrijski testovi
	Sastav ugljikohidrata	MALDI-TOF/MS, HPLC, HILIC, CE-LIF, IEX
Strukturna i fizikalno kemijska	Sastav glikana (stupanj galaktozilacije, manozilacije, sijalizacije i fukoziacije; prisutnost i raspodjela glikanskih struktura)	Peptidno mapiranje, GC-MS, ispitivanje enzimske aktivnosti, CE ili LC normalne faze, MALDI-TOF
	Posttranslacijske modifikacije (deamidacija, glikozilacija, oksidacija, fosforilacija, alkilacija, acetilacija, metilacija, sulfacija, trunkacije i dr.)	MS (Orbitrap i QToF)
	Strukture višeg reda (sekundarne, tercijarne)	CD, FT-IR, NMR, UV-ViS
	Agregacija (ireverzibilni oligomeri proteina i agregati viših struktura)	SEC, SV-AUC, DLS
Imunološka	Ispitivanje vezanja antigena i protutijela; identifikacija CDR regija, afinitet vezanja, čvrstoća veze	ELISA, SPR
Biološka	Apoptoza, sposobnost vezivanja i aktivacije, druge efektorske uloge (ADCC i dr.)	In vitro ispitivanja pomoću metoda baziranih na enzimima, radioizotopima i fluorescenciji
Čistoća i onečišćenja	Fizikalno-kemijska svojstva poput molekulske mase, veličine, izoforme proteina, molarne apsorptivnosti	Separacijske kromatografske i elektroforetske tehnike, UPLC, SEC, SDS-PAGE, Orbitrap, QToF, AAA
	Elektroforetski profili (obzirom na veličinu i naboj molekula)	SDS-PAGE, western blot, CE, CIEF, iCIEF, PAGE

	Kromatografski profili (obzirom na veličinu, naboj te hidrofilnost / hidrofobnost molekula)	RP-HPLC, SEC, IEX
	Spektroskopski profili (analiza sekundarne i tercijarne strukture)	UV-Vis, CD, NMR, FT-IR
	Multimeri i agregati	AUC, SV-AUC, SEC, SEC-MALS, DLS, FFF
	Procesna onečišćenja i onečišćenja koja potječu iz djelatne tvari / lijeka (proteini iz stanica domaćina, nukleinske kiseline, mikroorganizmi, endotoksini)	GC-MS, LC-MS, real time multiplex PCR
Kvantifikacija	Procjena ukupne količine monoklonskog protutijela	Kolorimetrijska ispitivanja, HPLC, IC

LC-MS/MS (engl. liquid chromatography with tandem mass spectrometry, spregnuti sustavi tekućinske kromatografije i spektrometrije masa), ESI-MS (engl. electrospray ionization mass spectrometry, elektrosprej ionizacija s masenom spektrometrijom), MALDI-TOF-MS (engl. matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, matriksom potpomognuta laserska ionizacija/desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona), AAA (engl. amino acid analysis, analiza aminokiselina), HPLC (engl. high performance liquid chromatography, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti), HILIC (engl. hydrophilic interaction chromatography, tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama), CE-LIF (engl. capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence, kapilarna elektroforeza spregnuta s laserom induciranom fluorescencijom), IEX (engl. ion exchange chromatography, ionsko izmjenjivačka kromatografija), GC-MS (engl. gas chromatography-mass spectrometry, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom), CE (engl. capillary electrophoresis, kapilarna elektroforeza), MS Orbitrap i QtoF (engl. mass spectrometry with Orbitrap and Quadrupole-Time of Flight Analyser, masena spektrometrija s Orbitrap analizatorom i četveropolnim analizatorom vremena leta), CD (engl. circular dichroism, cirkularni dikroizam), FT-IR (engl. Fourier transform – infrared spectrometry, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom), NMR (engl. nuclear magnetic resonance, nuklearna magnetska rezonancija), UV-Vis (engl. UV-Vis spectroscopy, UV Vis spektroskopija), SEC (engl. size exclusion chromatography, kromatografija isključenjem po veličini), SV-AUC (engl. sedimentation velocity – analytical ultracentrifugation, analitičko ultracentrifugiranje izvedeno pristupom brzine sedimentacije), DLS (engl., dynamic light scattering, dinamičko raspršenje svjetlosti), ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay, enzimski imunotest na čvrstoj fazi), SPR (engl. surface plasmon resonance, površinska plazmonska rezonancija), UPLC (engl. ultra-performance liquid chromatography, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti), SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulphate-polyacryamide gel electrophoresis, denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata), Western blot (metoda prijenosa proteina na membranu uz imunodetekciju), CIEF (engl. capillary isoelectric focusing, kapilarno izoelektrično fokusiranje), iCIEF (engl. imaged capillary isoelectric focusing, snimljeno kapilarno izoelektrično fokusiranje), RP-HPLC (engl. reversed phase – high performance liquid chromatography, obrnuto-fazna kromatografija visoke djelotvornosti), SEC-MALS (engl. size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering, kromatografija isključenjem po veličini spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti), FFF (engl. field-flow fractionation, tehnika razdvajanja protočnim poljem), real time multiplex PCR (engl. polymerase chain reaction, višestruka lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu), IC (engl. ion chromatography, ionska kromatografija).

4.6.1 Zahtjevi kakvoće (specifikacije) monoklonskih protutijela – regulatorni zahtjevi

Kakvoća monoklonskih protutijela se ispituje tijekom razvoja i postupka proizvodnje (procesna kontrola), prilikom puštanja u promet i u roku valjanosti (ispitivanje stabilnosti), a ispituju se fizičko-kemijska svojstva, biološka aktivnost, imunokemijska svojstva, sadržaj onečišćenja i djelatne tvari (45,53). Specifikacija ili zahtjev kakvoće (engl. *specification*) predstavlja skup različitih parametara s unaprijed definiranim granicama, odnosno kriterijima prihvatljivosti koje dobiveni rezultati ispitivanja provedeni na djelatnoj tvari, lijeku ili drugim sirovinama korištenim i proizvodnom procesu trebaju ispunjavati. Zahtjeve kakvoće predlažu i obrazlažu proizvođači, a odobravaju regulatorna tijela te se smatraju dijelom ukupne strategije kontrole kakvoće lijeka i konzistentnosti proizvodnje (45).

Izbor ispitivanja koja će se provoditi na monoklonskom protutijelu i koja će se propisati u zahtjevu kakvoće ovise o svojstvima tog protutijela. Sva ispitivanja koja su propisana i predložena u zahtjevu kakvoće je potrebno odgovarajuće obrazložiti i opravdati, zajedno s predloženim granicama / kriterijima prihvatljivosti. Granice i kriteriji prihvatljivosti za sve parametre propisane u zahtjevu kakvoće trebaju biti predloženi na temelju pretformulacijskih studija iz razvoja (koje ukazuju na ujednačenost i konzistentnost postupka proizvodnje različitih serija biološkog lijeka), provedene karakterizacije djelatne tvari / onečišćenja / ostalih sirovina, rezultata dobivenih tijekom pretkliničkih i kliničkih studija te rezultata dobivenih tijekom validacije postupka proizvodnje i ispitivanja stabilnosti (45,53).

U ICH Q6B smjernici *Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products* su propisani sljedeći parametri zahtjeva kakvoće djelatne tvari i biološkog lijeka kao minimalni i primjenjivi za sve biološke lijekove (45):

- izgled i opis
- identifikacija (fizičko – kemijska, biološka, imunokemijska)
- sadržaj / čistoća djelatne tvari (određivanje kombinacijom dovoljno specifičnih metoda)
- onečišćenja – koja potječu iz djelatne tvari (engl. *product-related*), uključujući i razgradne produkte nastale tijekom proizvodnje, formulacije i čuvanja lijeka; iz postupka proizvodnje, staničnog supstrata, kulture stanica i slično (engl. *process-related*),

- potentnost (engl. *potency*)
- količina (engl. *quantity*) – uglavnom se određuje na temelju mase (sadržaja) proteina.

Prema EMA smjernici *Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products* (EMA/CHMP/BWP/532517/2008), zahtjev kakvoće za monoklonska protutijela treba postaviti na način da obuhvaća sve parametre kontrole koji su identificirani kao kritični i važni tijekom pretformulacijskih i karakterizacijskih studija, kao i tijekom postupka proizvodnje lijeka (53). U skladu s ICH Q6B smjernicom, u zahtjevu kakvoće za monoklonska protutijela minimalno trebaju biti propisana ispitivanja identifikacije, čistoća (sadržaj djelatne tvari i onečišćenja), potentnost i količina (45). Kako je prethodno navedeno, monoklonska protutijela mogu imati vrlo kompleksne profile onečišćenja koje je potrebno okarakterizirati i kvantificirati kombinacijom različitih ortogonalnih metoda i za koje je potrebno definirati pojedinačne ili skupne (sumarne) kriterije prihvatljivosti i granice, ovisno o tipu i vrsti onečišćenja (53). Za sve metode korištene za karakterizaciju multimeri i agregata je potrebno pokazati da su prikladne za svoju namjenu, odnosno da su odgovarajuće kvalificirane, dok je metode koje se koriste za ispitivanje kakvoće lijeka kod puštanja u promet i u roku valjanosti potrebno u potpunosti validirati.

Određivanje procesnih onečišćenja koja su se ispostavila relevantnim za kakvoću monoklonskog protutijela je potrebno uključiti u strategiju kontrole kakvoće tog protutijela. Za neka onečišćenja za koja je dokazano da se najvećim dijelom uklanjaju iz djelatne tvari, odnosno lijeka tijekom procesa proizvodnje te da im je razina u finalnom produktu zanemariva, rutinska ispitivanja u zahtjevu kakvoće nisu potrebna. Takva se ne-rutinska ispitivanja provode prema zasebno definiranom i odobrenom protokolu ispitivanja na određenom broju serija djelatne tvari, odnosno lijeka u definiranom vremenskom razdoblju (45).

Osim ispitivanja temeljnih parametara propisanih u zahtjevu kakvoće djelatne tvari / lijeka propisanih u relevantnim ICH i EMA smjernicama, kod provjere kakvoće monoklonskih protutijela se ispituju sljedeći parametri (gdje je prikladno i primjenjivo): topljivost, pH, osmolalnost, iskoristivi volumen parenteralnih pripravaka (engl. *extractable volume*), sterilnost, bakterijski endotoksini, stabilizatori, sadržaj vode i slično (45,82). Također, u zahtjevu kakvoće lijeka se provodi ispitivanje vidljivih čestica i onih ispod granice vidljivosti, s granicama definiranih u skladu s kompendijalnim zahtjevima (44,45,82).

U kompendijalnim monografijama su postavljeni kriteriji prihvatljivosti / granice za vidljive čestice, kao i za one ispod granice vidljivosti (netopljive agregate proteina). S druge strane,

granice za topljive agregate trebaju biti postavljene ovisno od slučaja do slučaja, na temelju dostupnih podataka, obzirom da ne postoje predložene granice za biološke lijekove u regulatornim smjernicama. U cilju kontrole agregacije proteina te osiguravanja sigurnog i učinkovitog lijeka, važno je razumjeti porijeklo proteinskih agregata i primijeniti prikladne analitičke tehnike za njihovu karakterizaciju (60).

4.6.2 Onečišćenja u monoklonskim protutijelima i ostalim biološkim lijekovima

Proteini dobiveni rekombinantnom DNA tehnologijom su najčešće heterogena smjesa izoformi sličnih molekulskih masa i naboja i sadrže cijeli niz procesnih (engl. *process-related impurities*) i strukturnih (engl. *product-related impurities*) onečišćenja. Niže su navedena najčešća strukturna onečišćenja (porijeklom iz djelatne tvari) i procesna onečišćenja, zajedno s porijeklom i najčešće korištenim analitičkim metodama za njihovo ispitivanje (45).

Onečišćenja koja potječu iz djelatne tvari (engl. *product-related impurities*, strukturna onečišćenja), uključujući razgradne produkte:

- krnji proteini (engl. *truncated protein forms*) – proteini kojima su uklonjene neke domene pomoću katalizatora ili hidrolitičkih enzima koji cijepaju peptidne veze; za identifikaciju se mogu koristiti HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) ili SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacryamide gel electrophoresis*, denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata), a i peptidno mapiranje može biti korisno, ovisno o svojstvima proteina;
- deamidirani, izomerizirani, oksidirani, izmijenjeni konjugirani oblici proteina (npr. nakon glikozilacije ili fosforilacije) koji mogu biti detektirani i karakterizirani pomoću kromatografskih, elektroforetskih i / ili drugih relevantnih analitičkih metoda (npr. HPLC, CE (engl. *capillary electrophoresis*, kapilarna elektroforeza), MS (engl. *mass spectrometry*, masena spektroskopija, CD (engl. *circular dichroism*, cirkularni dikroizam);
- agregatna onečišćenja – uključuju dimere i više razrede proteinskih molekula, a najčešće se kvantificiraju metodama poput SEC (engl. *size-exclusion chromatography*, kromatografija isključenjem po veličini) i CE.

Procesna onečišćenja (engl. *process related impurities*) i ostala onečišćenja:

- Onečišćenja koja potječu iz staničnog supstrata (engl. *cell substrate derived impurities*): proteini iz stanica domaćina (engl. *host cell proteins*, HCPs), nukleinske kiseline (genom stanice domaćina ili korištenog vektora). Od analitičkih metoda se koriste osjetljive metode, poput imunotestova (engl. *immunoassays*), kojima se može detektirati širok raspon proteinskih onečišćenja. Količina DNA koja potječe iz stanica domaćina se može detektirati direktnim ispitivanjem na lijeku (tehnike hibridizacije). Ispitivanje klirensa proteina je jedna od metoda kojom se može ispitati jesu li nukleinske kiseline i proteini iz stanice domaćina uklonjeni iz lijeka, kako bi se eliminirala potreba za postavljanjem kriterija prihvatljivosti za navedena onečišćenja u zahtjevu kakvoće za proteinski lijek.
- onečišćenja koja potječu iz kulture stanica i hranjivog medija – antibiotici, serum i ostale komponente iz hranjivog medija;
- onečišćenja nastala u procesu proizvodnje nakon bioreaktora, u nizvodnoj fazi postupka proizvodnje (engl. *downstream*) – enzimi, kemijski i biokemijski reagensi korišteni u procesima izolacije i pročišćavanja (cijanogen bromid, gvanidin, oksidirajuća i reducirajuća sredstva), anorganske soli (teški metali, arsen, nemetalni ioni), otapala, nosači, ligandi (kao što su monoklonska protutijela) i dr.

Složene proteinske molekule su podložne različitim kemijskim promjenama, kao što su agregacija i posttranslacijske modifikacije, a koje mogu utjecati na biološku aktivnost i funkciju proteina. Iz tog je razloga sveobuhvatna karakterizacija proteinskih molekula (u ovom slučaju monoklonskih protutijela) ključna za razumijevanje profila onečišćenja i biološke aktivnosti lijeka namijenjenog kliničkoj primjeni (49).

4.6.3 Metode korištene u karakterizaciji i ispitivanju kakvoće monoklonskih protutijela

Brojne kromatografske, elektroforetske, spektroskopske i elektrokemijske metode se koriste u karakterizaciji monoklonskih protutijela. Obzirom na sve prednosti i nedostatke karakteristične za svaku metodu, većinom se za kvalitetnu i preciznu karakterizaciju proteina koristi više metoda u kombinaciji.

4.6.3.1 Kromatografske metode

Princip separacijskih kromatografskih metoda se temelji na razdvajanju komponenti smjese između dvije faze, na temelju njihovih fizičko – kemijskih svojstava. Jedan od dobrih primjera izmjena na proteinima koji za posljedicu imaju proteinske inačice koje se lako kromatografski razdvajaju su posttranslacijske modifikacije, poput glikozilacije, fosforilacije, ubikvitinacije i metilacije (89).

- tekućinska kromatografija obrnute faze (engl. *reversed phase liquid chromatography*, RPLC) – koriste se i spregnute tehnike poput RPLC-MS (engl. *reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry*, obrnuto fazna tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom), RP-UPLC-MALS (engl. *reversed phase-ultra high pressure liquid chromatography – multi-angle-light-scattering*, obrnuto fazna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti) kojima se postiže bolja karakterizacija proteina temeljena na izračunu molekulske mase za svaki pojedinačni kromatografski pik, a što omogućuje identifikaciju željenih monomernih i ostalih onečišćenja ili razgradnih produkata, kao što su agregati ili fragmenti proteina);
- kromatografija isključenjem po veličini (SEC) – mogućnost upotrebe različitih detektora: UV (engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto), RI (engl. *refractive index*, indeks loma) i MALLS (engl. *multi-angle-laser-light-scattering*) te sprezanje SEC i UPLC metoda (engl. *size exclusion-ultra-high pressure liquid chromatography*) predstavljaju poboljšanje osnovne metode, obzirom na bolju razlučivost i veću preciznost;
- kromatografija ionske izmjene (engl. *ion-exchange chromatography*, IEX) - kromatografija na kationskim izmjenjivačima (engl. *cation-exchange chromatography*, CEX) zastupljenija kod karakterizacije proteina.

4.6.3.2 Elektroforetske metode

Kapilarna elektroforeza se dosad pokazala kao jedna od najučinkovitijih metoda u karakterizaciji monoklonskih protutijela, obzirom na veliku moć razlučivanja između navedenih bioloških lijekova i njihovih derivata (inačica). Od svih elektroforetskih metoda,

najzastupljenije u analizi monoklonskih protutijela su kapilarna gel elektroforeza (*engl. capillary gel electrophoresis*, CGE), kapilarno izoelektrično fokusiranje (*engl. capillary isoelectric focusing*, cIEF) i kapilarna zonska elektroforeza (*engl. capillary zone electrophoresis*, CZE). Navedene se metode koriste za karakterizaciju specifičnog mjesta vezanja antigena i protutijela, kod peptidnog mapiranja, ispitivanja na molekulama temeljenih na naboju i veličini, analizi glikozilacijskih profila, ispitivanju onečišćenja, određivanju stabilnosti proteina te ispitivanju biosličnosti (89).

4.6.3.3 Spektroskopske metode

Posljednjih se desetljeća spektroskopske metode koriste sve više u karakterizaciji proteinskih struktura višeg reda (*engl. high ordered structures*, HOS), odnosno sekundarne i tercijarne strukture proteina (89). To su sljedeće metode:

- jednodimenzionalna ^1H nuklearna magnetska rezonancija (*engl. ^1H -based 1-dimensional nuclear magnetic resonance*, NMR)
- višedimenzionalna ^1H nuklearna magnetska rezonancija (*engl. ^1H -based 1-dimensional nuclear magnetic resonance*, NMR)
- infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (*engl. Fourier transformed infrared spectrometry*, FTIR) – koriste se i unapređenije verzije spregnutih tehnika poput spektrometrije masa uz analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (*engl. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, FT-ICR-MS) u razumijevanju odnosa strukture / funkcije proteina i njihovih interakcija te matriksom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem – spektrometrija masa uz analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (*engl. Matrix assisted laser desorption ionization – Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, MALDI FT-ICR MS) u kontroli glikacije bispecifičnih protutijela
- UV-Vis spektroskopija (*engl. UV-Vis spectroscopy*) i LC-MS (*engl. liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, spregnuti sustavi tekućinske kromatografije i spektrometrije masa)
- cirkularni dikroizam (*engl. circular dichroism*, CD) – karakterizacija sekundarne i tercijarne strukture proteina.

4.6.3.4 Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode se primarno koriste u karakterizaciji liganada monoklonskih protutijela, u dijagnostičke svrhe. Ovaj tip analiza se temelji na upotrebi imunosenzora (biosenzora) te je cilj svojevrsnu interakciju antigena i protutijela konvertirati u električni signal (89).

4.6.3.5 Ostale metode

Od ostalih metoda korištenih u karakterizaciji monoklonskih protutijela se ističu rekombinantna DNA tehnologija (temelji se na Ig transkriptima dobivenim iz hibridoma stanica koje proizvode monoklonska protutijela) i XRD tehnike (engl. *X-ray diffraction*, difrakcija X-zraka), koja radi na principu raspršenja X-zraka pod malim kutom (engl. *small-angle X-ray scattering*, SAX). Navedene metode su najčešće korištene metode za određivanje strukture proteina i proučavanje interakcija među proteinima) (89).

Sve navedene metode imaju svoje prednosti i nedostatke i svakodnevno se ulažu naporu spram usavršavanja i unapređenja metodologija i instrumenata, kako bi se postiglo da te metode budu preciznije i osjetljivije, da imaju veću razlučivost i da su ponovljive (reproducibilne). Izbor metode ovisi o korisniku i zahtjevima za specifičnošću karakterizacije monoklonskih protutijela. Kombiniranje navedenih metoda omogućuje kvalitetniju karakterizaciju s kvantifikacijom proteinskih lijekova, što je u skladu s propisima nadležnih regulatornih tijela (53,63,89).

4.7 Kontrola kakvoće monoklonskih protutijela tijekom čuvanja, transporta i primjene lijeka

Monoklonska protutijela zahtijevaju posebne uvjete čuvanja i transporta, obzirom na to da su proteinske molekule vrlo osjetljive na djelovanje okolišnih čimbenika (49). Konformacija proteinskih molekula i biološka aktivnost proteinskih lijekova ovise o jakosti kovalentnih i nekovalentnih veza koje se ostvaruju između molekula proteina te proteina i molekula koje ih okružuju. Proteinski su lijekovi osjetljivi na okolišne faktore, poput promjene temperature, oksidacije, svjetlosti, sadržaja iona i slično. Kako bi se održala biološka aktivnost bioloških lijekova i izbjegla razgradnja djelatne tvari, potrebno je osigurati strogo kontrolirane uvjete pri

kojima se oni čuvaju i transportiraju nakon proizvodnje (90). Obzirom na kompleksnu proteinsku strukturu, moguće je da kod jednog proteinskog lijeka postoji više mehanizama razgradnje (kemijskih ili fizičkih). Odgovarajuće fizičko – kemijske, biokemijske i imunokemijske metode analize za identifikaciju i kvantifikaciju djelatne tvari i razgradnih produkata trebaju biti dio protokola ispitivanja stabilnosti proteinskih lijekova, u skladu sa svojstvima i čistoćom lijeka od interesa (44).

U slučajevima kada se međuprodukti u proizvodnji monoklonskih protutijela čuvaju određeno vrijeme prije nastavka procesa, potrebno je evaluirati utjecaj vremena i uvjeta čuvanja na kakvoću proizvoda. Potrebno je definirati prikladne parametre i metode koje mogu potvrditi stabilnost proteinskog lijeka tijekom čuvanja (npr. biološka aktivnost, agregacija i razgradnja proteina, pH i biološko opterećenje (engl. *bioburden*)), kako bi se opravdalo najveće predloženo vrijeme čuvanja monoklonskog protutijela (91,92).

Incijalni rezultati koji podupiru predložene uvjete čuvanja djelatne tvari i / ili lijeka trebaju biti podaci dobiveni u stvarnom vremenu (engl. *real-time data*), temeljeni na ispitivanjima provedenim u dugoročnim uvjetima (engl. *long-term condition*). Obzirom na to, razvoj prikladnog dugoročnog protokola ispitivanja stabilnosti u skladu s propisanim smjernicama o ispitivanju stabilnosti je od kritične važnosti za uspješan razvoj svih lijekova pa tako i monoklonskih protutijela (69,93).

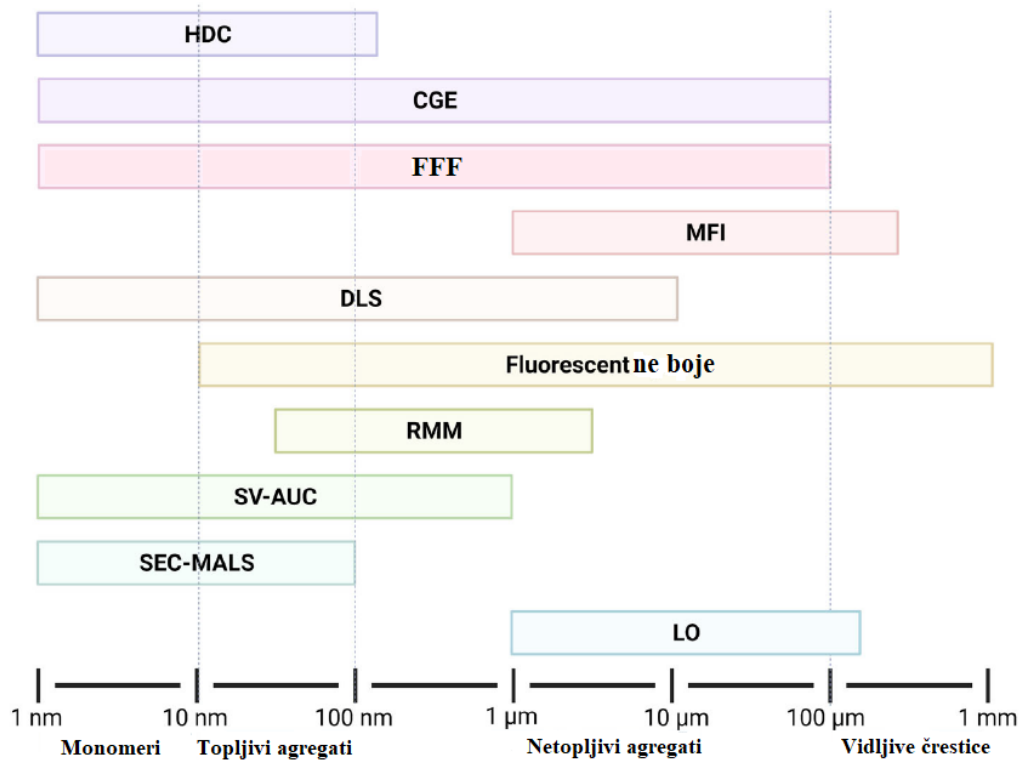
4.8 Metode karakterizacije i kvantifikacije proteinskih agregata

Proteinska agregacija jedan je od faktora koji dovode do imunogenosti terapijskih proteina, ali unatoč tome do danas nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim nastaju agregati te koje vrste i tipovi agregata dovode do imunskih reakcija kod primjene monoklonskih protutijela, a koji ne. Detaljna analiza odnosa kliničkog učinka lijeka i prisustva agregata može pomoći u razvijanju kontrolne strategije koja će osigurati kakvoću takvog lijeka. No, kako bi to bilo moguće, potrebno je prethodno provesti opsežnu detekciju i kvantifikaciju agregatnih onečišćenja pomoću sofisticiranih i ortogonalnih analitičkih metoda te njihovih kombinacija (49,81,90).

Vrste agregata i put njihova nastanka se razlikuju za svaki protein te ne postoji univerzalna analitička metoda za karakterizaciju i kvantifikaciju agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima. Veličina agregata i vrijeme njihova poluživota su faktori koji imaju bitan utjecaj

na izbor analitičke metode u ispitivanju proteinskih agregata. Nadalje, nerijetko i sama analiza može uništiti ili pak proizvesti proteinske agregate te i to treba uzeti u obzir prilikom izbora prikladne kvalitativne i kvantitativne metode analize (62).

Na temelju dosadašnjeg iskustva, zaključeno je kako se kvantifikacija proteinskih agregata treba provesti na temelju njihove veličine. Obzirom da svaka metoda koja se koristi za karakterizaciju i kvantifikaciju agregata pokriva samo manji ograničeni raspon veličina proteinskih čestica, potrebno je istovremeno upotrijebiti barem dvije ortogonalne metode, po mogućnosti temeljene na različitim principima rada (52,94). Niže na Slici 11. je priložen shematski prikaz najčešće korištenih metoda za ispitivanje proteinskih čestica, ovisno o njihovoj veličini (52).



Slika 11. Shematski prikaz najčešće korištenih metoda za ispitivanje proteinskih čestica, ovisno o njihovoj veličini (promjeru). *HDC – hidrodinamička kromatografija (engl. hydrodynamic chromatography), CGE – kapilarna gel elektroforeza (engl. capillary gel electrophoresis), FFF – tehnika razdvajanja protočnim poljem (engl. field-flow fractionation), MFI – snimanje mikro protoka (engl. micro-flow imaging), DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. dynamic light scattering), RMM – mjerenje rezonancije mase (engl. resonant mass measurement), SV-AUC - analitičko ultracentrifugiranje izvedeno pristupom brzine*

sedimentacije (engl. sedimentation velocity analytical ultracentrifugation), SEC-MALS - kromatografija isključenjem po veličini spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti (engl. size-exclusion chromatography; multi-angle laser light scattering, MALLS), LO – brojanje čestica mehaničkog onečišćenja u prigušenoj svjetlosti (engl. light obscuration) (preuzeto i prilagođeno iz (52)).

Obzirom na princip detekcije agregata, analitičke metode koje se koriste za ispitivanje se dijele u dvije skupine: tehnike kojima se provodi karakterizacija na temelju promjena molekulske mase monomera monoklonskih protutijela (princip koloidne stabilnosti; sposobnost proteina da ostane u obliku monomera na koju utječu međuproteinske interakcije) i tehnike koje detektiraju razlike u strukturi monomera monoklonskih protutijela (princip konformacijske stabilnosti: vezana je uz strukturne promjene native forme proteina, a analitičke metode određuju konformacijske promjene u denaturiranom stanju proteina) (52).

4.8.1 Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena koloidne stabilnosti:

4.8.1.1 Upotreba fluorescentnih boja

Postoji više vrsta fluorescentnih boja ovisno o svojstvima i tipu veze koju ostvaruju s molekulom, npr. neke dolaze u interakciju s hidrofobnim dijelovima razmotanih proteina, druge su osjetljive na različite uvjete u ispitivanoj otopini (pH, tip pufera, promjena viskoznosti), uslijed čega dolazi do o(bez)bojenja otopine. Također, indikativne su ovisno i o tipu agregata (ovisno o njegovim svojstvima) s kojim dolaze u kontakt (npr. boja tioflavin se veže na β -nabrane ploče agregatnih struktura, ukoliko su prisutni u uzorku). Mogu se koristiti u kombinaciji s drugim analitičkim metodama, kao što su kromatografija isključenjem po veličini visoke djelotvornosti (engl. *high performance – size exclusion chromatography*, HP-SEC ili asimetrična protočna tehnika razdvajanja protočnim poljem (engl. *asymmetrical flow field-flow fractionation*, AF4), čime se mogu dobiti informacije o agregaciji i strukturnim promjenama i u monomerima monoklonskih protutijela i u agregatima. Ograničenja metode su što kvantifikacija i razlikovanje tipova agregata u monoklonskim protutijelima nisu moguće (52).

4.8.1.2 Hidrodinamična kromatografija (engl. *hydrodynamic chromatography, HDC*)

HDC omogućuje brzu i učinkovitu analizu i odvajanje analita u otopini na temelju njihove veličine (veće se čestice eluiraju prije manjih, obzirom na profil i svojstva protoka kroz kolonu / cijev (brži kroz sredinu cijevi). Glavne prednosti ove metode su visoka moć odjeljivanja, brza analiza (par minuta) i mogućnost analize agregata u rasponu veličina od 0,7 nm do 110 nm (topljivi i netopljivi agregati). Ipak, ova tehnika omogućuje razdvajanje molekula samo na temelju veličine te se za dodatne informacije o karakterizaciji ili kvantifikaciji treba upotrijebiti druge analitičke tehnike (52).

4.8.1.3 Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering, DLS*)

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti se koristi za detekciju i karakterizaciju topljivih agregata, u rasponu veličina od 1 nm do 5 μm . Navedena metoda je poznata i kao korelacijska spektroskopija kod koje se mjeri fluktuacija čestica u otopini uslijed Brownovog gibanja i određuje hidrodinamički volumen (62). Priprema uzorka nije potrebna i sama analiza je vrlo brza i nedestruktivna. Ipak, DLS nije dovoljno osjetljiva metoda, posebno u smislu određivanja agregata manje veličine. Nadalje, otopine monoklonskih protutijela uglavnom imaju visoke koncentracije proteina, zbog čega može doći do pada intenziteta raspršenog svjetla te se DLS smatra semikvantitativnom metodom. Unatoč navedenim nedostacima, ranije studije su pokazale kako je DLS metoda prikladna za karakterizaciju agregata u IgG protutijelima i ispitivanje stabilnosti (52).

4.8.1.4 Tehnika razdvajanja protočnim poljem (engl. *field-flow fractionation, FFF*)

FFF je separacijska tehnika koja funkcionira na principu razdvajanja čestica na temelju njihove veličine, odnosno brzine kretanja opisanog Brownovim gibanjem. Prednost ove metode je da uz visoku razlučivost odvaja čestice širokog raspona veličina (od 1-1000 nm). Postoji više osnovnih tehnika ovisno o tome vrši li se razdvajanje na temelju mase, topljivosti, hidrodinamičkog volumena, električnih ili magnetnih svojstava (95). Slijedom navedenog, primjenjuju se sedimentacijska (engl. *sedimentation FFF, SdFFF*), termička (engl. *thermal FFF, ThFFF*), protočna (engl. *hydraulic/flow FFF, FIFFF*), električna (engl. *electrical FFF, EIFFF*) i magnetska (engl. *magnetic FFF, MgFFF*) tehnika razdvajanja protočnim poljem. Prednost svih navedenih analitičkih tehnika je u tome što se separacija analita postiže isključivo

interakcijom uzorka s vanjskim ortogonalnim fizičkim poljem umjesto npr., sa stacionarnom fazom, kako je to kod kromatografskih tehnika.

Različite tehnike FFF upotrebljavaju različita vanjska polja (52). Najčešće upotrebljavano vanjsko polje pri analizi proteinskih kompleksa je poprečni protok (tehnika protočne FFF) i temperaturni gradijent (tehnika termičke FFF).

Tehnika FFF može pokriti veliki raspon veličina proteina i primjenjiva je za analizu kompleksnih proteina različitih veličina. Neke od prednosti FFF tehnike su njezina osjetljivost i odsutnost nepokretne faze te su izbjegnute potencijalne strukturne promjene proteina.

Protočna FFF tehnika je najčešće korištena tehnika u analizi proteina i proteinskih kompleksa, jer se difuzijski koeficijent može dovesti u vezu s veličinom i oblikom proteina. Na taj se način mogu pratiti vrlo male promjene u strukturi proteina. Nadalje, FFFFF se primjenjuje i kao metoda kojom se potvrđuju rezultati dobiveni drugim analitičkim metodama, poput kromatografije isključenjem po veličini čestica (SEC). Osim fluorescencijskog i UV/VIS detektora, FFF metoda se često spreže s MALS detektorom i takva kombinacija metoda se koristi u karakterizaciji velikih proteinskih kompleksa ili agregata.

4.8.1.5 Kapilarna gel elektroforeza (engl. capillary gel-electrophoresis, CGE)

CGE je tradicionalna gel elektroforeza u kapilari, gdje se kao gelovi koriste polimeri (poliakrilamid, metilceluloza) u kojima se proteinske molekule razdvajaju na temelju njihove veličine. Riječ je o poluautomatiziranoj metodi koja je preciznija u odnosu na ostale elektroforetske tehnike, poput SDS-PAGE-a (može razdvojiti proteinske inačice slične veličine). Raspon veličina proteinskih čestica koje se mogu analizirati CGE metodom je 10 – 220 kDa (netaknuta monoklonska protutijela su otprilike oko 200 kDa veličine). Nedostatak metode je niska učinkovitost (kad treba obraditi više uzoraka), obzirom na vrijeme pripreme uzorka i trajanje čitave analize (30-40 minuta po uzorku). Unatoč tome, CGE metoda je dostatne razlučivosti za razdvajanje netaknutih (čitavih) proteina od agregata (52,96).

Detekcija elektroforetskih vrpca se provodi pomoću UV ili fluorescencijskih detektora, uz prethodno obilježavanje molekula fluorescentnim bojama, što olakšava kvantifikaciju. Sprezanjem CGE metode s masenom spektrometrijom (CGE-MS) mogu se nadići ograničenja optičke detekcije i osigurati strukturne informacije o analiziranim molekulama. Obzirom na navedeno, može se zaključiti kako je CGE metoda prikladna za karakterizaciju i kvantifikaciju monoklonskih protutijela i agregatnih onečišćenja.

4.8.1.6 Mjerenje rezonancije mase (engl. resonant mass measurement, RMM)

RMM metodom se određuje veličina čestica na Arhimedovom principu, koji kaže da na bilo koji objekt uronjen u tekućinu djeluje sila uzgona koja je jednaka težini tekućine istisnute uronjenim objektom. Otopina ispitivanog uzorka se ispire kroz mikrokanal unutar rezonantne konzole (engl. *suspended microchannel resonator*, SMR – suspendirana mikrokanalna konzola), koji mijenja frekvenciju ovisno o masi čestica koje prolaze kroz kanal. Pomoću RMM metode se mogu ispitati čestice ispod granice vidljivosti (u rasponu veličina između 50 nm i 5 μm , ovisno o primijenjenom senzoru). Nedostatak RMM metode je sklonost proteinskih agregata da adheriraju na senzor mikrokanala te su redovna čišćenja sustava između pojedinih mjerenja nužna, što produljuje vrijeme analize i komplicira postupak analize. U kombinaciji s MFI metodom (engl. *micro-flow imaging*) se primjenjuje kao ortogonalna metoda u analizi proteinskih čestica i kapljica silikonskog ulja, u submikronskom i mikronskom rasponu veličina.

4.8.2 Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena konformacijske stabilnosti

4.8.2.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

FTIR metoda koristi se u ispitivanju sekundarne strukture proteinskih molekula, kao što su inkluzijska tijela, toplinski gelirani proteini (engl. *heat-gelled proteins*) i amiloidni fibrili koji se mogu naći *in vivo*, kao i kod topljivih oligomera i netopljivih agregata proteina i drugih proteinskih depozita koji nastaju *in vitro* tijekom smatanja proteina ili u slabim nativnim uvjetima, a posebno pri visokim koncentracijama proteina u formulaciji. Prednost primjene ove metode je što IR spektar daje informacije o strukturi i koncentraciji molekula, što je metoda visoko osjetljiva i omogućuje relativno brzo, jednostavno i jeftino određivanje sekundarne strukture proteina i međuproteinskih interakcija. FTIR metoda pokazuje izuzetnu točnost obzirom na valne brojeve od $0,01\text{ cm}^{-1}$, što omogućava utvrđivanje niskih koncentracija agregata od interesa. Za analize proteina je od glavnog interesa srednje IR područje, između 4000 cm^{-1} i 1000 cm^{-1} . Peptidna veza omogućava proteinima apsorpciju IR zračenja u rasponu $1\ 700\text{--}1\ 500\text{ cm}^{-1}$ (97).

Apsorpcija IR zračenja pobuđuje vibracijske prijelaze u molekuli, a apsorbira se samo svjetlost frekvencije koja se podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli (frekvencije zračenja i

vibracije moraju biti jednake da bi došlo do apsorpcije). Postoje dvije vrste vibracija: rastezanje (engl. *stretching*) (ν), koje podrazumijeva promjene u duljini kemijske veze, i svijanje (engl. *bending*), koje uključuje promjenu kuta između kemijskih veza (δ – u ravnini i π – izvan ravnine) (97). Jačina vibracije ovisi o jačini i duljini kemijske veze, odnosno o tipu atoma koji su uključeni u tu vezu (C-H; C-O). U FTIR spektru proteina dominiraju vibracije peptidne veze, koje su osjetljive na utjecaj okoline (98,99). Vibracijsko rastezanje C=O veza peptidne okosnice u rasponu valnih duljina 1700 cm^{-1} i 1600 cm^{-1} formira amid I vrpce, dok vibracijsko rastezanje C-N veze i vibracijske promjene kuta u N-H vezi u području valnih duljina između 1580 cm^{-1} i 1480 cm^{-1} formira amid II vrpce. Kombinacija vibracijskog svijanja N-H veze u ravnini i rastezanja C-N veze stvara amid III vrpce u rasponu 1330 cm^{-1} i 1230 cm^{-1} . Sve tri spomenute vrpce koriste se u proučavanju konformacijskih promjena u proteinima, a vrpca amid I je u području „otiska prsta“ (engl. *fingerprint region*) u analizi sekundarne strukture proteina (98,99).

Monoklonska protutijela, kao i većina ostalih bioloških lijekova, dolaze uobičajeno kao formulacije visokih koncentracija, što otežava njihovu karakterizaciju, obzirom da faktori poput pH i temperature otopine te mehaničkog i oksidativnog stresa imaju kritičan utjecaj na fizičko – kemijsku stabilnost otopina lijeka, posebno pri visokim koncentracijama proteina (100). Glavna prednost FTIR spektroskopije je nesmetano nadziranje i praćenje agregacije i u čvrstim i u tekućim formulacijama lijeka s visokom koncentracijom proteina. FTIR je dobro prilagođena za ispitivanje β -nabranih ploča proteina, koje su specifične upravo za protutijela, obzirom da β -ploče imaju najviši apsorpcijski koeficijent. Što je još bitnije, apsorpcija koju pokazuju β -nabrane ploče protutijela se pomoću FTIR metode mogu dobro razlikovati od agregata, obzirom na konverziju intramolekulskih β -ploča koje apsorbiraju zračenje valnog broja 1635 cm^{-1} , u intermolekularne agregate koji apsorbiraju zračenje valnog broja 1620 cm^{-1} .

Prema ispitivanju konformacije proteinskih agregata nastalih *in vivo* i *in vitro* provedenom pomoću infracrvene spektroskopije tehnikom atenuirane totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR), za sve proteinske agregate je karakteristična sekundarna β struktura s pozicijama vrpce na nižim frekvencijama (97). Svi proteinski agregati dobivaju ovu novu β vrpce uslijed procesa agregacije koji uključuje međumolekularne interakcije. Prema spektroskopskim ispitivanjima, vrpce koje se javlja pri valnim duljinama od oko 1689 cm^{-1} i 1616 cm^{-1} se mogu povezati s međumolekulskim β -nabranim pločama koje se dovode u vezu s proteinskim agregatima (100).

Obzirom na specifičnost amidnih vrpca i vezanost uz sekundarnu strukturu proteina, FTIR spektroskopija se često koristi upravo za ispitivanje pogrešno smotanih proteina i agregacije unutar živih stanica i tkiva.

4.8.2.2 Masena spektrometrija (engl. mass spectrometry, MS) i spektrometrija ionske pokretljivosti

Masena spektrometrija se smatra jednom od najmoćnijih analitičkih tehnika, obzirom na visoku osjetljivost, točnost i visok kapacitet provedbe analiza (visoku učinkovitost kod višestrukih analiza na više uzoraka). Pomoću MS se dobivaju informacije o masi i naboju te konformaciji nekovalentnih proteinskih molekula, ponajprije agregata (52).

Nekovalentne nakupine proteina mogu ostati sačuvane kroz postupni prijelaz u plinsku fazu, što se prvenstveno realizira metodama tzv. blage ionizacije (engl. *soft ionization*; ESI i MALDI metode) i procesa desolvatacije (100). Spektrometrijom ionske pokretljivosti (plazma kromatografija / ionska kromatografija; engl. *ion mobility mass spectrometry*, IMS) se može postići razlikovanje agregata različitih struktura i oblika, a jednake ili slične mase. Iako je spektrometrija ionske pokretljivosti odlična samostalna tehnika za odjeljivanje iona u plinskoj fazi, povezivanjem sa spektrometrijom masa je postignuto povećanje njezine analitičke moći i područja primjene. Vezane metode IMS-MS se koriste za dobivanje strukturnih informacija o ionima malih molekula te o ionima makromolekula, kao što su proteini (74).

Spektrometrija ionske pokretljivosti poboljšava kapacitet spektara masa i kompatibilna je s drugim analitičkim metodama, kao što su tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. U tom kontekstu, IMS može biti upotrijebljena kao komplementarna tehnika odjeljivanja. Nadalje, IMS se može povezati i s ostalim metodama, kao što su SEC, raspršenje svjetlosti i gel elektroforeza (74,100).

4.8.2.3 Ultrazvučna spektroskopija (engl. ultrasound spectroscopy, US)

Ultrazvučna spektroskopija je metoda koja u odnosu na ostale metode za ispitivanje proteinskih agregata pokazuje najveći potencijal za detekciju strukturnih promjena tijekom procesne kontrole bioloških lijekova. Riječ je o relativno brznoj tehnici, s minimalnom prethodnom pripremom uzorka, s mogućnošću detekcije strukturnih promjena koje su posljedica agregacije ili konformacijskih nestabilnosti proteina. Princip rada ultrazvučne spektroskopije se bazira na

kompresiji i dekompresiji medija u kojem se nalazi uzorak tijekom prolaska ultrazvučnih valova kroz otopinu uzorka. Kompresija i dekompresija otopine uzorka uzrokuju promjene u udaljenosti između čestica i molekula u uzorku, a što dovodi do međumolekulskih privlačenja i odbijanja koje predstavljaju strukturne promjene u proteinskim molekulama. Obzirom da je trenutno malo dostupnih studija o ultrazvučnoj spektroskopiji korištenoj u karakterizaciji i ispitivanju agregatnih onečišćenja proteinima, potrebno je uložiti dodatan napor u daljnja razumijevanja metode.

4.8.2.4 Raman spektroskopija (engl. Raman spectroscopy, RS)

RS mjeri neelastično raspršenje svjetlosti iz molekula nakon što su one pobuđene monokromatskim izvorom svjetla. Iako se većina fotona svjetlosti rasprši bez promjene u energiji, manji dio ipak će biti raspršen na nižoj energiji u odnosu na onu razinu energije koju je imao inicijalni izvor svjetlosti (Raman raspršenje). Ova uočena razlika u frekvencijama se zove Ramanski pomak (engl. *Raman shift*) i karakteristična je za kemijsku vezu, odnosno pomak je jedinstven za svaku molekulu. Raman spektroskopija može dati informacije o sekundarnim i tercijarnim strukturama, kao i o mehanizmima agregacije. Robusna je i nedestruktivna metoda, za koju nije potrebna priprema uzorka. Nedostatak RS metode je to što je Ramansko raspršenje slab proces pri kojemu se raspršuje samo minimalna svjetlost. Činjenica je da je fluorescencija poznato ograničenje RS metode i da laserska svjetlost može dovesti do promjena u uzorku.

RS metoda je metoda koja se kao dio procesne analitičke tehnologije (engl. *process analytical technology*, PAT) u sklopu koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) u proizvodnji monoklonskih protutijela, koristi tijekom uzvodne faze uzgoja u bioreaktoru (engl. *upstream process*, USP) (52,56,57,101). Njezina primjena u procesima poslije bioreaktora, tijekom tzv. nizvodne faze proizvodnje monoklonskih protutijela (engl. *downstream*, DSP) nije u potpunosti istražena, kao niti primjena u detekciji agregata koji mogu nastati u monoklonskim protutijelima. Ipak, dostupna istraživanja pokazuju da se RS može koristiti za detekciju različitih razgradnih produkata i agregata IgG4 molekule (52,100).

4.8.2.5 Cirkularni dikroizam (engl. circular dichroism, CD)

Metoda cirkularnog dikroizma je spektroskopska metoda koji se bazira na različitoj apsorpciji lijevo i desno kružno polarizirane svjetlosti, kao posljedice strukturne simetrije molekula. Snimanje spektara se provodi u dalekom UV području (između 190 nm i 250 nm, u kojem

apsorbira amidna veza), pri čemu se dobivaju podaci o sekundarnoj strukturi proteina, i u bliskom UV području (između 250 nm i 320 nm, gdje dolazi do apsorpcije aromatskih kromofora), pri čemu se dobivaju podaci o tercijarnoj strukturi proteina (98,100). Obzirom na to da su proteini optički aktivne molekule, jer su građene od L-aminokiselina, cirkularni dikroizam često je korištena spektroskopska metoda u određivanju sekundarne i tercijarne strukture monoklonskih protutijela i pratećih agregatnih onečišćenja (89).

4.8.3 Tradicionalne metode za karakterizaciju agregatnih onečišćenja

4.8.3.1 Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) i kapilarna elektroforeza (engl. capillary electrophoresis, CE)

SDS-PAGE je robusna metoda koja se koristi u rutinskoj kontroli kakvoće proteina, na temelju separacije obzirom na molekulsku masu i količinu. Nedostatak ove denaturirajuće metode je to što se pomoću nje mogu detektirati samo kovalentni agregati, obzirom da su nekovalentni agregati poremećene strukture uslijed djelovanja SDS-a. Ukoliko se ispitivanje provodi u reducirajućim uvjetima, SDS-PAGE omogućuje razlikovanje agregata koji u svom sastavu imaju disulfidne veze od onih koji su vezani nereducirajućim kovalentnim vezama. SDS-PAGE se posljednjih godina u industrijskim analizama često kombinira s kapilarnom elektroforezom, obzirom da je CE metoda robusna, kvantitativna, automatizirana i široko primjenjiva. Ipak, mogućnost detekcije agregatnih onečišćenja ograničena je dostupnim komercijalnim kitovima koji su namijenjeni analizi proteina molekulske mase manje od 250 kDa, što je manje od mase dimernih IgG molekula (100).

4.8.3.2 Kromatografija isključenjem po veličini spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti (engl. size-exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering, SEC-MALLS)

Kromatografija isključenjem po veličini (SEC) je najčešće korištena metoda za rutinsku analizu i kvantifikaciju agregata, obzirom da je riječ o jednostavnoj, točnoj, preciznoj i osjetljivoj metodi. Uobičajeno se koristi kod kontrole procesa proizvodnje i kontrole kakvoće bioloških lijekova, kao i za kvantifikaciju topljivih agregata kod puštanja u promet serija biološkog lijeka (96,100). Usprkos širokoj primjeni i brojnim prednostima, uslijed interakcija uzorka s kolonom, izmjena u matriksu puferских otopina ili razrjeđenja otopine uzorka, može doći do potencijalnog

gubitka agregata (posebice multimera). Nadalje, nemogućnost detekcije i karakterizacije agregata koji su veći od 40 – 60 nm uslijed zadržavanja na koloni predstavlja dodatni nedostatak ove metode (96). Poznato je kako ne postoji jedinstvena metoda koja bi mogla dati sve potrebne informacije o karakterizaciji i količini svih vrsta agregata te se iz tog razloga najčešće koriste ortogonalne metode (ispitivanje istih parametara metodama koje se baziraju na različitim principima analize). Kombinacija SEC i MALLS metode se rutinski koristi u provjeri čistoće i sadržaja proteina, međuproteinskih interakcija i agregacije. Ovakvo kombiniranje analitičkih metoda u detekciji topljivih agregata omogućuje analizu u širem rasponu veličina i veću heterogenost agregatnih onečišćenja u odnosu na samu SEC metodu (100).

4.8.3.3 Analitičko ultracentrifugiranje (*engl. analytical ultracentrifugation, AUC*)

Analitičko ultracentrifugiranje je svestrana i robusna metoda koja se koristi za kvantitativnu analizu makromolekula (ponajprije proteina) u otopini uzorka. Na temelju analize sedimentacije čestica iz uzorka se provodi karakterizacija biomolekula na temelju njihove veličine, mase, oblika i hidrodinamičkih svojstava (96,102). Određivanje molekulske mase makromolekula analitičkim ultracentrifugiranjem se može provesti korištenjem dva glavna pristupa: brzine sedimentacije (*engl. sedimentation velocity, SV*) i sedimentacijske ravnoteže (*engl. sedimentation equilibrium, SE*). Pomoću pristupa brzine sedimentacije se dobivaju informacije o hidrodinamičkim svojstvima biomolekula (npr. koeficijent difuzije i sedimentacije, intrinzična viskoznost i dr.), dok se pristupom sedimentacijske ravnoteže uspostavlja ravnoteža između sedimentacije i difuzije kako bi se odredila distribucija masa biomolekula (103).

Uobičajeno se agregacija kontrolira i agregati kvantificiraju u nativnim (nedenaturirajućim) uvjetima pomoću SEC metode, zajedno s AUC metodom, kao konfirmativnom ortogonalnom metodom. Analitičko ultracentrifugiranje izvedeno pristupom brzine sedimentacije (SV-AUC) je komplementarna metoda SEC metodi, obzirom da se njihovom kombiniranom primjenom nadilaze neka ograničenja SEC metode. Ponajprije se to odnosi na detekciju velikih agregata koji ne mogu proći kroz SEC kolone, a također analiza uzorka ne ovisi o uvjetima u otopini (94,98). Dodatno, SV-AUC je točna metoda obzirom da upotreba standarda ili disociranih agregata nije potrebna te može biti korištena kao ortogonalna metoda za potvrdu rezultata dobivenih SEC metodom. Ipak, kao veći nedostatak u odnosu na SEC, kod SV-AUC metode se ističe niža preciznost (96,98,102).

4.8.3.4 Analiza i praćenje nanočestica (engl. nanoparticle tracking analysis, NTA)

NTA je tehnika koja prati o vremenu i prostoru ovisno raspršenje svjetlosti od nevidljivih čestica i koja ovisi o veličini čestica (promjer agregata se određuje pomoću Stokes-Einstein jednadžbe, uz pretpostavku da su svi agregati sferičnog oblika (104). NTA mjeri samo dio otopine te količina submikronskih agregata u ispitanoj otopini ne može reflektirati koncentraciju agregata čitave otopine kad su agregatna onečišćenja heterogeno raspršena. Veći agregati, poput onih mikronskih veličina često otežavaju točnu kvantifikaciju pomoću NTA metode, obzirom da njihovi signali mogu maskirati signale raspršenja svjetlosti koje proizvode manji, submikronski agregati (94).

4.8.3.5 Cirkularni dikroizam (engl. circular dichroism, CD)

- vidjeti iznad : Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena konformacijske stabilnosti

4.8.3.6 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

- vidjeti iznad : Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena konformacijske stabilnosti

4.8.3.7 Fluorescencija

Intrinzična (nativna) fluorescencija proteina najčešće potječe od aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana, od kojih najznačajniji doprinos ukupnoj fluorescenciji daje triptofan. On apsorbira pri višim valnim duljinama i ima najveći ekstinkcijski koeficijent pa je prijenos apsorbirane energije s ostalih aromatskih aminokiselina na triptofan čest. Jedan od razloga zašto je triptofan prikladna fluorescentna proba u biološkim sustavima je mogućnost da ga se selektivno pobudi pri valnoj duljini od 295 nm, čime se izbjegava nespecifična pobuda drugih aromatskih kiselina. U vodenoj otopini je raspon valnih duljina emisijskog maksimuma triptofana između 308 nm i 355 nm (105).

Strukturne i druge konformacijske promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina utječu na intrinzičnu fluorescenciju. Promjene intenziteta fluorescencije ovise o mikrookolišu u kojem se nađu triptofanski ostaci. Primjerice, u nepolarnoj okolini, intenzitet fluorescencije je niži

(niže su vrijednosti za valnu duljinu maksimuma intenziteta). Suprotno je u polarnom mediju, kao što je voda, gdje dolazi do porasta intenziteta fluorescencije, uslijed stvaranja vodikovih veza između indolnih prstenova triptofana i vode (100,105).

Spektroskopske i mikroskopske metode bazirane na fluorescenciji se sve učestalije koriste za razumijevanje organizacije unutar proteinskih struktura te njihovih promjena, obzirom da je riječ o visoko osjetljivim, prilagodljivim i neinvazivnim metodama. Primjeri metoda koje se temelje na principu fluorescencije i prikladne su za detekciju agregatnih oligomera su metoda Försterovog rezonancijskog prijenosa energije (engl. *Förster/fluorescence resonance energy transfer*, FRET), metoda oporavka fluorescencije nakon fotoizbijedenja (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP), fluorescencijska korelacijska spektroskopija (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) i metoda mjerenja trajanja fluorescencije donora mikroskopijom (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM). Dodatno, prednost navedenih metoda je da omogućavaju kvantitativnu analizu oligomernih molekula proteina, kao i praćenje kinetike agregacije, što je iznimno bitno za razumijevanje procesa nastanka oligomera (106).

4.8.3.8 Kvantitativna laserska difrakcija (engl. *quantitative laser diffraction, QLD*)

QLD je moćna tehnika pomoću koje se može procijeniti raspodjela veličine proteinskih agregata u području submikronskih i mikronskih veličina. Uključivanje podataka o indeksu refrakcije za proteinske agregate u analizu podataka dobivenih ispitivanjem čini raspodjelu veličine za ispitivane agregate točnijom i pouzdanijom. Isto tako, ova je metoda prikladna za praćenje agregatnih onečišćenja u stvarnom vremenu, kad nastanak agregata ovisi o vremenu, na temelju čega se može razjasniti i mehanizam agregacije ispitivanih agregata (94).

4.8.3.9 Flow-imaging analiza (engl. *flow imaging analysis, FIA*)

FIA je učinkovita metoda za točnu kvantitativnu analizu agregata mikronske veličine (ispod 10 μm), što je iznimno bitno obzirom na njihov utjecaj na sigurnost bioloških lijekova. Određeni tip proteinskih agregata spomenute veličine ima indeks refrakcije sličan onom otapala, što ih čini transparentnima u otopini. Obzirom da je FIA mikroskopska metoda, dobivene mikroskopske slike agregata se analiziraju te njihova transparentnost ne predstavlja problem, za razliku od metode prigušivanja svjetlosti (engl. *light obscuration*, LO). Iako je FIA učinkovita u karakterizaciji agregata mikronskih veličina, potpuno razlikovanje agregata od

kapljica silikonskog ulja iz napunjenih štrcaljki u kojima se nalazi lijek je otežano, obzirom da su sličnog izgleda.

4.8.4 Nove tehnologije za karakterizaciju agregatnih onečišćenja (engl. emerging technologies, state-of-the art technologies)

4.8.4.1 Mjerne / slikovne tehnike (engl. imaging technologies)

4.8.4.1.2 Transmisijska elektronska mikroskopija (engl. transmission electron microscopy, TEM)

TEM je često korištena metoda karakterizacije monoklonskih protutijela, ali je njena važnost u karakterizaciji agregatnih onečišćenja prepoznata relativno nedavno. Ova je metoda uvjerljivo jedina tehnika koja može dati vizualne podatke o agregatima submikronske veličine (između 100 nm i 1 μ m) prisutnim u biološkim lijekovima. Varijanta TEM u kojoj se analiziraju uzorci koji su prethodno bojani negativnim bojama (engl. *negative stain electron microscopy*) se koristi u proučavanju morfologije proteinskih kompleksa, nanočestica i drugih bioloških struktura, kao i utjecaja koji na agregaciju monoklonskih protutijela imaju čimbenici poput temperature i uvjeta čuvanja. Ipak, nedostatak metode je što osim dobivanja vizualnih (kvalitativnih) informacija, kvantitativni rezultati ispitivanja su vrlo manjkavi, a taj se problem pokušava riješiti kombiniranjem TEM s drugim ortogonalnim metodama poput DLS i SEC (107).

Primjena TEM u ispitivanju relativno velikih proteinskih molekula je obećavajuća u razumijevanju agregata višeg reda veličina te se u daljnjem razvoju metode nade polažu u to da će TEM uskoro omogućiti razjašnjenje puta i mehanizma nastanka agregata u biološkim lijekovima (100).

4.8.4.1.3 Mikroskopija atomske sile (engl. atomic force microscopy, AFM)

AFM se koristi za prikupljanje informacija o proteinskim česticama u nanometarskom području veličina. Iako je riječ o tehnici koja se primjenjuje već dugo, lošija razlučivost i svojstva proteina za posljedicu imaju grube i nejasne slike čestica. Ipak, unatoč ograničenjima, riječ je o metodi koja može dati korisne podatke o morfologiji agregata u monoklonskim protutijelima, kao i putevima kako oni nastaju (100).

4.8.4.2 Makroskopske tehnike

4.8.4.2.1 Masena spektrometrija (engl. mass spectrometry, MS) i spektrometrija ionske pokretljivosti

- vidjeti iznad : Metode koje se koriste za karakterizaciju agregatnih onečišćenja na osnovi promjena konformacijske stabilnosti

4.8.4.2.2 Raspršenje rendgenskog zračenja pod malim kutom (engl. small-angle X-ray scattering, SAXS) i raspršenje neutrona pod malim kutom (engl. small-angle neutron scattering, SANS)

SAXS i SANS su metode koje daju informacije o proteinskim neuređenim strukturama, a koje je teško analizirati drugim metodama. Obje ove metode nisu ograničene nedostacima ostalih metoda, kao što su zahtjev za visokom difrakcijskom kakvoćom kristala proteina analiziranih kristalografijom ili molekulskom masom koja je ograničenije NMR metode. Mogu se koristiti u ispitivanju otopina s visokom koncentracijom protutijela, obzirom da njihovu izvedbu ne ometa direktna posljedica visoke koncentracije proteina u otopini (uslijed visokih koncentracija protutijela u otopini može doći do promjene u strukturi i stabilnosti protutijela, a što u konačnici može dovesti do agregacije proteina i promjene fizikalnih svojstava proteina. Nadalje, SANS se može koristiti u analizi debljine adsorbiranog sloja i agregacije protutijela na hidrofilnim i hidrofobnim površinama pri visokim koncentracijama proteina (100).

4.8.4.2.3 Ograničena proteoliza i analiza interakcije proteina umrežavanjem (engl. cross-linking)

Ograničena proteoliza i metoda ukriženog povezivanja su pristupi temeljeni na masenoj spektrometriji koji omogućuju ispitivanje dinamičkih interakcija između proteina, a koje nije moguće ispitati pomoću NMR metode ili kristalografskim tehnikama. Ograničena proteolitička razgradnja u nenedenaturirajućim uvjetima udružena s MS metodom može se koristiti u ispitivanju i karakterizaciji terciarne i kvaterne strukture proteina. Proteaze korištene u ispitivanju se biraju, obzirom na raspodjelu aminokiselina u ciljnom proteinu. Peptidi dobiveni cijepanjem proteina se mogu analizirati pomoću MALDI-TOF-MS metode (engl. *matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry*; matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom uz separaciju nakon vremena leta u ionskoj cijevi, spregnuta s masenom spektrometrijom) ili RP-HPLC metode udružene s ESI-MS

metodom (engl. *electrospray ionization-mass spectrometry*; elektrosprej ionizacijom udruženom s masenom spektrometrijom) za identifikaciju peptida (100).

Karakterizacija agregata i ostalih struktura nastalih udruživanjem proteinskih molekula uspješna je uz primjenu analize interakcije proteina umrežavanjem. Veze unutar i između oligomera i agregata su većinom nekovalentne, iako su moguće i kovalentne veze poput disulfidnih mostova između agregatnih čestica. Obzirom na to, takvi agregati nisu prikladni za provođenje ispitivanja koja daju informacije o molekulskoj masi (MS, gel elektroforeza) ili o veličini čestica (raspršenje svjetlost, SEC) (100).

Analiza interakcije proteina umrežavanjem se temelji na dostupnosti slobodnih amina i da bi došlo do umrežavanja, dvije takve skupine moraju biti blizu jedna drugoj na površini agregata. Ukoliko se amini nalaze na različitim proteinskim lancima, oligomerni agregat će biti kovalentno stabiliziran i stoga prikladan za daljnje analize pomoću metoda kao što su MS ili SDS-PAGE. Ograničenje ovog pristupa temeljenog na masenoj spektrometriji je u tome što je stabilnost linkera koji sudjeluju u umrežavanju i povezivanju proteina najčešće niska, što otežava detekciju manjeg dijela proteinskih čestica (100).

4.8.4.3 Tehnologije visoke razlučivosti (engl. *high resolution technologies*)

4.8.4.3.1 Metoda izmjene vodik / deuterij povezana s masenom spektrometrijom (engl. *hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry, HDX-MS*)

HDX-MS je tzv. „strategija otiska prsta“ (engl. *footprinting strategy*) i pristup temeljen na masenoj spektrometriji u određivanju strukture proteina. Ova se strategija temelji na kemijskim modifikacijama do kojih dolazi zamjenom vodikovih atoma atomima deuterija unutar amidne okosnice proteina, što stvara pomak mase vidljiv MS metodom. Jedna od prednosti metode je svakako velik raspon veličina proteina koji se na ovaj način mogu analizirati (9 – 300 kDa).

Vodikovi atomi na proteinskim molekulama se mogu klasificirati u tri klase, na temelju brzine izmjene, odnosno poluživota. Prvu klasu čine atomi vodika iz amidnih veza koji se izmjenjuju s atomima deuterija srednjom brzinom (od nekoliko sekundi do nekoliko sati). U drugu klasu spadaju vodikovi atomi iz funkcionalnih grupa s bočnih ogranaka aminokiselina, koji se s atomima deuterija izmjenjuju velikom brzinom (mikrosekunde). Treću klasu čine atomi vodika koji su kovalentno vezani na atome ugljika te se ti atomi zapravo ne izmjenjuju s atomima deuterija. Poznavanje ovih karakteristika omogućava mjerenje unosa deuterija u aminokiseline unutar proteina, što nam daje informacije o dinamici unutar proteinskih struktura (95,100).

U većini slučajeva se promjene u konformaciji proteina dešavaju na manjem broju regija unutar velikog proteina te je te manje izmjene teško uočiti i analizirati dok se ispituju svojstva čitavog proteina. Kako bi se otkrile sve te manje izmjene unutar proteinske strukture, potrebna je veća prostorna rezolucija koju ima HDX-MS metoda, a osigurana je pomoću proteolitičke fragmentacije (razgradnjom pomoću enzima pepsina ili proteina XIII dobivaju se regije proteina duljine od po 6 – 10 aminokiselina) (108).

Obzirom da se HDX-MS metoda može provoditi na monoklonskim protutijelima u otopini, u većini pufera korištenih u izradi formulacija lijeka, ima mogućnost prikupljanja informacija o agregatnim molekulama, koje mogu biti od koristi kod razvoja i optimizacije formulacije lijeka, kao i karakterizacije monoklonskih protutijela i u njima prisutnih agregatnih onečišćenja.

Uvođenjem automatizacije, HDX-MS metoda je postala metoda visoke protočnosti (engl. *high-throughput*) za karakterizaciju i ispitivanje svojstava proteinskih (agregatnih) molekula. Za analizu navedenom metodom su potrebne vrlo male količine proteina (0,5 – 2 nmol) i rezultati ispitivanja su brzo gotovi. Iako ima puno prednosti i izgledno je kako bi mogla postati jednom od ključnih metoda u karakterizaciji i ispitivanju proteinskih struktura (uključujući i agregate), uzevši u obzir kako je HDX-MS relativno nova tehnika u odnosu na ostale tehnike koje se koriste desetljećima, predstoji još puno rada i istraživanja kako bi se usavršila i poboljšala (100,108).

4.8.4.3.2 Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance, NMR*)

NMR je jedna od najmoćnijih apsorpcijskih tehnika određivanja atomske strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula u otopini. Odlična je tehnika potvrde strukture i rutinske analize u razvoju lijekova malih molekula. U principu se pomoću NMR metode u otopini može provesti karakterizacija monoklonskih protutijela i njihovih inačica na atomskoj razini, obzirom da svaki NMR signal predstavlja specifični proton ili odnos proton – dušik u proteinskoj molekuli, što je u teoriji ograničeno samo instrumentalnom preciznošću spektrometra, a koja je kod modernih NMR tehnika na visokom nivou. Standardne NMR analize su prilagođene za proteine mase od oko 50 kDa ili manje. Ukoliko se analiziraju proteinske strukture veće mase, na NMR spektrima se dobivaju široki signali, što otežava daljnja mjerenja i izračune obzirom na osjetljivost i razlučivost metode. Posljednjih je godina NMR metoda poboljšana obzirom na ograničenja vezana uz lošiju razlučivost i manju osjetljivost u analizama bioloških lijekova, obzirom na metodologije jednodimenzionalnih (1D) i dvodimenzionalnih (2D) tehnika

(43,108). Jednodimenzionalne NMR tehnike su jednostavne i osjetljive tehnike kojima se osigurava prikladno ispitivanje strukturne proteinskih molekula. Princip kombiniranja više ortogonalnih metoda, poput NMR i elektronske mikroskopije ili NMR i SAXS metode također se sve više upotrebljava u analizi oligomera i proteinskih agregata (108).

4.8.4.4 Algoritmi za predviđanje agregacije *in silico*

Posljednjih nekoliko desetljeća je razvijeno nekoliko računalnih tehnika i alata vezano uz proces agregacije proteina, a koji se ugrubo mogu podijeliti na nekoliko klasa: a) agregaciji sklone regije (engl. *aggregation prone regions*, APR) i predviđanje sklonosti agregaciji (engl. *aggregation propensity prediction*), b) predviđanje kinetike agregacije i c) tehnike molekularnih simulacija (109).

a) APR regije i predviđanje sklonosti agregaciji

Nastanak agregatnih molekula, poput amiloidnih fibrila je pod utjecajem brojnih ekstrinzičnih (pH, temperatura, koncentracija iona i proteina) i intrinzičnih faktora (sastav aminokiselina, regije sklone agregaciji). Mutacije u regijama koje su sklone agregaciji utječu na sklonost proteina agregaciji, kinetiku agregacije i na morfologiju agregata. Razvijeno je nekoliko računalnih tehnika pomoću kojih se mogu identificirati APR regije i predvidjeti sklonost proteina agregaciji, a te se tehnike klasificiraju obzirom na sekvence i na strukturu.

Pristup temeljen na sekvenci za predviđanje agregacije u proteinima se bazira na svojstvima kao što su fizikalno – kemijska svojstva aminokiselina, uzorak sekvence, karakteristike sekundarne strukture proteina i dr. Neki od algoritama temeljeni na sekvenci predviđanja agregacije su AGGREGSCAN, TANGO, BETASCAN, PASTA i AMYLPRED2 (109).

Primjer algoritma s pristupom temeljenim na strukturi je SAP algoritam (engl. *spatial aggregation propensity*) koji je prikladan za sva monoklonska protutijela na čijim površinama su detektirane zone koje imaju povećanu sklonost agregaciji. Za analizu pomoću SAP algoritma je potrebno poznavati trodimenzionalnu strukturu monoklonskog protutijela koje se ispituje (108,109).

b) Predviđanje kinetike agregacije

Pomoću kinetike agregacije se određuje kojom će brzinom doći do agregacije proteina pod definiranim eksperimentalnim uvjetima. Dosadašnje studije su pokazale kako na brzinu agregacije utječu i minimalne promjene u eksperimentalnim uvjetima, primjerice u koncentraciji proteina ili pufera, pH, temperaturi i dr. Trenutno je dostupno nekoliko *in silico* metoda pomoću kojih se može predvidjeti apsolutna brzina agregacije ili promjene agregacije uslijed mutacija (109).

c) simulacije smatanja proteina pomoću molekulske dinamike

Molekulska dinamika je metoda određivanja ponašanja dinamičkog molekuskog sustava ovisno o vremenu. Dinamičke promjene sustava u vremenu su predstavljene simulacijama. Bolje razumijevanje samog fenomena samoasocijacije proteinskih čestica i fizičko – mehanističkih detalja se često postiže kroz molekulske simulacije.

Jedna od takvih molekulskih simulacija je i Monte Carlo simulacijska metoda koja se bazira na nastanku različitih konformacija sustava na temelju stvaranja slučajnih pozicija čestica (109). Navedena se metoda može primijeniti na ponašanje proteina u različitim otopinama. Kod proteina u otopini se može pratiti njihovo smatanje te formiranje sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture. Monte Carlo simulacija koristi dvodimenzijski proteinski model rešetke koji opisuje hidrofobne interakcije proteina s otopinom i na taj način prikazuje kompeticiju između smatanja i agregacije proteina (109).

Neke od često korištenih simulacijskih tehnika za ispitivanje molekulske dinamike proteina (uključujući i proces agregacije) su i molekulsko-dinamičke (MD) simulacije s eksplicitnim tretiranjem svih atoma (eng. *all-atom molecular dynamic approach*) te tzv. metoda „krupnog zrna“ (engl. *coarsed grain model*), kojim se ispituje ukupna potencijalna energija više atoma grupiranih na hrpu („zrno“) (85,109).

4.8.5 Usporedba agregacije između referentnih i biosličnih lijekova

4.8.5.1 Bioslični lijekovi (engl. biosimilars)

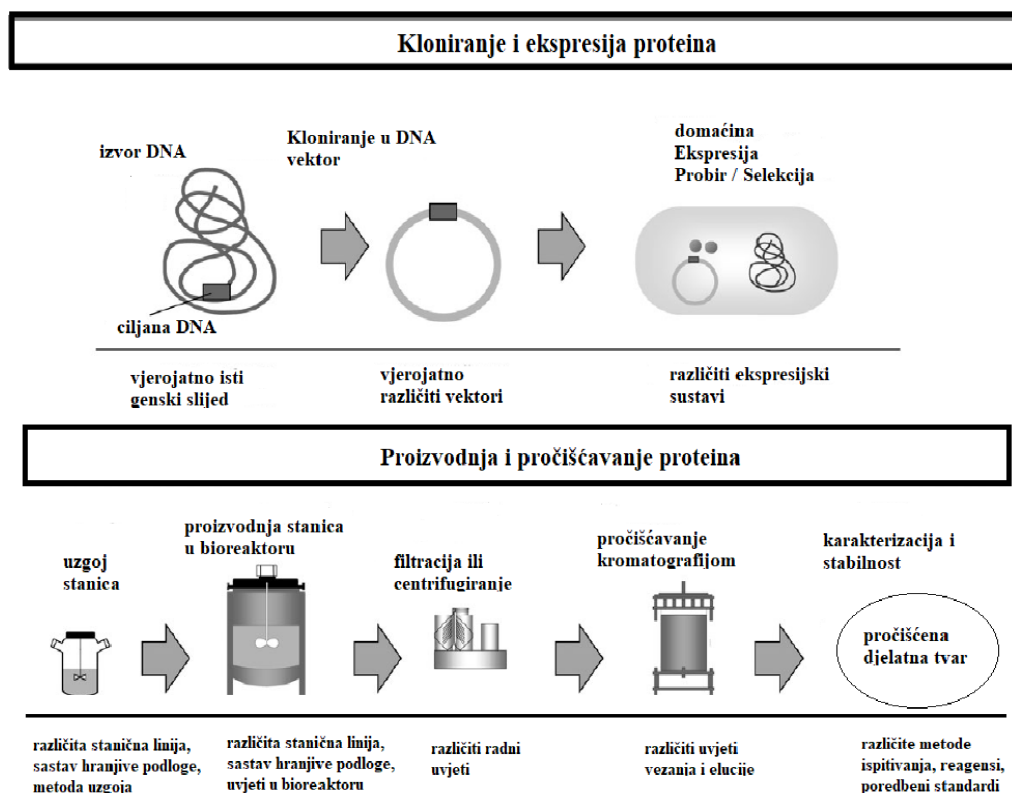
Iako su biološki lijekovi označili novu eru u liječenju mnogih teških bolesti te svakodnevno poboljšavaju kvalitetu života brojnim bolesnicima, njihov postupak proizvodnje je puno kompleksniji u odnosu na klasične kemijske lijekove te su takvi lijekovi vrlo skupi i veliko su financijsko opterećenje zdravstvenom sustavu i pacijentima. Kako bi se povećala dostupnost bioloških lijekova i smanjili troškovi zdravstva, paralelno s razvojem i odobravanjem prvih bioloških lijekova je krenulo osmišljavanje pristupa za razvoj i odobravanje njihovih jeftinijih „kopija“ (49,110). Pojam biološkog lijeka sličnog referentnom biološkom lijeku (engl. *similar biological medicinal product*) se u europsko zakonodavstvo uvodi Direktivom 2003/63/EZ od 25. lipnja 2003., dopunom glavne Direktive 2001/83/EZ za lijekove za primjenu kod ljudi. Dodatnom dopunom glavnoj Direktivi o lijekovima za primjenu kod ljudi (Direktiva 2004/27/EZ od 31. ožujka 2004.) je uvedena zakonska osnova za odobravanje biosličnog lijeka (navodi se u Članku 10 (4) glavne Direktive 2001/83/EZ, odnosno u Članku 33. Zakona o lijekovima Republike Hrvatske) (49,111)). U skladu s navedenim u Zakonu o lijekovima, uz zahtjev za davanje odobrenja biološkog lijeka sličnog referentnom biološkom lijeku (biosličnog lijeka) je obvezno priložiti rezultate odgovarajućih nekliničkih i kliničkih ispitivanja, ukoliko bioslični lijek ne odgovara definiciji generičkog lijeka, zbog razlika u postupku proizvodnje biološkog lijeka i biosličnog lijeka (prema definiciji navedenoj u članku 29 (5) Zakona o lijekovima, generički lijek je lijek koji ima isti kvalitativni i kvantitativni sastav djelatnih tvari i isti farmaceutski oblik kao i referentni lijek te čija je bioekvivalentnost s referentnim lijekom dokazana odgovarajućim ispitivanjima biološke raspoloživosti). Referentni biološki lijek je odobren ili je bio odobren u državi članici EU na temelju potpune dokumentacije o kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti primjene lijeka (110). U tom se slučaju davanje odobrenja za stavljanje u promet biosličnog lijeka temelji na dokazu sličnosti s referentnim biološkim lijekom, te je potrebno provesti dodatna usporedna ispitivanja biosličnog lijeka i referentnog lijeka i dokazati njihovu sličnost u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti (49). Razvoj i postupak registracije biosličnog lijeka se temelji na znanstveno – regulatornom konceptu usporedivosti definiranom i opisanom u smjernici o usporedivosti biotehnoških/bioloških lijekova (engl. *Comparability of Biotechnological/Biological Products, ICH Topic Q5E*), kao i u smjernici Europske agencije za lijekove za bioslične lijekove (engl. *Guideline on similar biological medicinal products*), objema objavljenim 2005. godine (112,113). U navedenim se

smjernicama prvi put uvodi pojam usporednih ispitivanja (engl. *comparability exercise*), a odnosi se na aktivnosti koje uključuju dizajn, ispitivanje te analizu prikupljenih podataka, s ciljem provjere usporedivosti dva proizvoda.

Kasnije su objavljene i ostale specifične smjernice o ispitivanjima i potrebnoj dokumentaciji o kakvoći biosličnog lijeka (engl. *similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues*) te nekliničkim i kliničkim ispitivanjima (engl. *similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues*) sa zasebnim dodacima o specifičnostima skupina biosličnih lijekova koji sadrže djelatnu tvar inzulin, eritropoetin, somatotropin, filgrastim, folitropin, interferon, heparin niske molekulske mase i monoklonsko protutijelo (49,113,114).

Primarni cilj razvoja biosličnog lijeka je dokazati visoki stupanj sličnosti između njega i referentnog biološkog lijeka te tako potvrditi da su djelotvornost i sigurnost, koje su ranije utvrđene za referentni lijek, primjenjive i na bioslični lijek. To obuhvaća opsežnu fizičko-kemijsku i biološku karakterizaciju i usporedbu. Izazovi razvoja biosličnog lijeka uzrokovani su kompleksnošću strukture biološkog lijeka i limitiranim informacijama o referentnom lijeku zbog zaštićenih podataka o proizvodnom postupku, pročišćavanju, zahtjevima kakvoće, korištenim sirovinama i formulaciji referentnog lijeka (49).

Unatoč praćenju gotovo svih koraka u proizvodnji lijeka, uslijed velike varijabilnosti biološkog sustava nije moguće proizvesti bioslični lijek identičan referentnom lijeku. Niže priložena shema prikazuje koje su sve moguće razlike u proizvodnom postupku među različitim proizvođačima bioloških lijekova (Slika 12).



Slika 12. Shema postupka proizvodnje rekombinantnih proteina (preuzeto i prilagođeno iz (115)).

Razvoj biosličnog lijeka može se podijeliti u 3 osnovne faze (116):

- Faza 1: karakterizacija referentnog lijeka – razvoj i validacija naprednijih (engl. *state of the art*) analitičkih metoda za karakterizaciju referentnog lijeka i provjeru kakvoće biosličnog lijeka; dobiveni podaci o parametrima kakvoće (engl. *quality attributes*) predstavljaju okvire (engl. *target range / goal posts*) unutar kojih će se razvijati bioslični lijek (110,117).
- Faza 2: razvoj postupka proizvodnje biosličnog lijeka – formulacija biosličnog lijeka može biti različita od referentnog lijeka te je potrebno dokazati prikladnost predložene formulacije s obzirom na stabilnost, kompatibilnost (interakcije djelatne tvari s pomoćnim tvarima, otapalima, primarnim spremnikom), aktivnost i jačinu djelatne tvari (odabir različite formulacije i/ili primarnog spremnika u odnosu na referentni lijek potrebno je obrazložiti s obzirom na mogući utjecaj na djelotvornost

i sigurnost primjene lijeka). Proizvodni postupak treba biti prikladno dizajniran u cilju postizanja zadanih okvira unutar kojih će se razvijati bioslični lijek (naglasak na prikladno odabranom ekspresijskom sustavu, obzirom da veće razlike u ekspresijskim sustavima mogu dovesti do neželjenih posljedica, kao što su netipične glikozilacije, različit profil onečišćenja i veće varijabilnosti u odnosu na referentni lijek (49,118).

- Faza 3: usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka (49,110).

4.8.5.2 Usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka (faza 3)

U trećoj fazi razvoja biosličnog lijeka se provode usporedna ispitivanja kakvoće, neklinička i klinička ispitivanja između biosličnog i referentnog lijeka. Princip usporedivosti ne podrazumijeva da dva lijeka budu identična već da se dokaže kako uočene razlike u kakvoći neće negativno utjecati na djelotvornost i sigurnost lijeka. Dokazivanje biosličnosti prema navedenom principu usporedivosti temelj je razvoja i registracije biosličnog lijeka. Prema smjernici za bioslične lijekove, djelatna tvar biosličnog lijeka mora biti slična djelatnoj tvari referentnog lijeka na molekulskoj i biološkoj razini. Režim doziranja i put primjene biosličnog lijeka moraju biti jednaki referentnom lijeku. Moguće razlike u jačini, farmaceutskom obliku, formulaciji i pomoćnim tvarima s referentnim lijekom moraju biti obrazložene i ne smiju ugrožavati sigurnost lijeka (49,118).

4.8.5.3 Usporedna ispitivanja kakvoće

Usporedna ispitivanja na razini kakvoće obuhvaćaju usporedbu fizičko-kemijskih i bioloških svojstava biosličnog i referentnog lijeka upotrebom različitih sofisticiranih i ortogonalnih analitičkih metoda, pomoću kojih je moguće potvrditi da bioslični i referentni lijek imaju vrlo slične profile kakvoće. Posebnu pozornost potrebno je obratiti na razlike u parametrima kakvoće koji mogu utjecati na imunogenost ili biološku aktivnost lijeka (49,113).

- a) Fizičko – kemijska ispitivanja – određivanje sastava, fizičko – kemijskih svojstava (masa i veličina molekula pomoću SEC, SDS-PAGE ili MS, profili izoformi pomoću IEF, molarni apsorpcijski koeficijent i ukupni proteini pomoću UV/VIS spektrofotometrije, određivanje elektroforetskih, kromatografskih i spektroskopskih profila), strukturna karakterizacija (usporedba sastava aminokiselina, N- i C-

terminalnog slijeda aminokiselina, slobodnih tiolnih skupina, disulfidnih mostova između biosličnog i referentnog lijeka), prisutnosti posttranslacijskih modifikacija (glikozilacija);

- b) biološka aktivnost – određuje se biološkim (engl. *biological assay*) testovima na životinjama (određuju biološku reakciju organizma na lijek), na staničnim kulturama (mjeri se biokemijski ili fiziološki odgovor na staničnoj razini), biokemijskim testovima (brzina enzimske reakcije ili biološki odgovor induciran imunskim interakcijama) te testovima baziranim na vezanju liganada i receptora;
- c) imunokemijska ispitivanja – imunokemijska karakterizacija monoklonskih protutijela i srodnih spojeva (fuzijskih proteina) – usporedba afiniteta za ciljano mjesto, afiniteta vezanja Fc-regije na receptore, sposobnost induciranja Fab- i Fc-povezanih funkcija;
- d) čistoća djelatne tvari i sadržaj onečišćenja – usporedba sadržaja djelatne tvari i profila onečišćenja biosličnog i referentnog lijeka pomoću specifičnih ortogonalnih analitičkih metoda, uzimajući u obzir putove razgradnje djelatne tvari (oksidaciju, deamidaciju, agregaciju) i moguće posttranslacijske modifikacije proteina. Bitno je provesti ispitivanje u stresnim i ubrzanim uvjetima, kako bi se na temelju rezultata ispitivanja parametara kakvoće dobila bolja predodžba o razgradnji djelatne tvari. Onečišćenja koja potječu iz djelatne tvari, kao što su prekursori ili razgradni produkti (agregati, izoforme, deamidirani, oksidirani i glikozilirani oblici) nastaju tijekom proizvodnje i/ili čuvanja djelatne tvari i moraju biti slične referentnom lijeku. Procesna onečišćenja (ostatni proteini stanica domaćina, stanična DNA, sastojci hranjive podloge, onečišćenja iz postupka pročišćavanja proteina) se razlikuju od postupka do postupka proizvodnje te njihova usporeba nije značajna za dokaz biosličnosti.
- e) Sadržaj djelatne tvari - najčešće se ispituje tehnikama kao što su HPLC, SEC, CE, MS i CD; izražava se istim jedinicama kao i kod referentnog lijeka i vrijednost bi trebala biti usporediva između biosličnog i referentnog biološkog lijeka.

4.8.5.4 Usporedna neklinička ispitivanja

Kod biosličnih lijekova se provodi skraćeni program *in vitro* i *in vivo* ispitivanja koja najčešće uključuju ispitivanje toksičnosti ponovljenih doza, ispitivanja farmakokinetike (engl. *pharmacokinetic*, PK) / farmakodinamike (engl. *pharmacodynamic*, PD) na životinjskim modelima te ispitivanje lokalne podnošljivosti (49,110,114).

- a) *In vitro* ispitivanja - ispitivanja vezanja na ciljno mjesto (receptori, antigeni, enzimi) te stanični testovi (funkcionalna aktivnost/vijabilnost stanica) za koje je poznato da su značajni za farmako-toksikološki učinak referentnog lijeka – provode se s ciljem detekcije razlike u biološkoj aktivnosti između biosličnog i referentnog biološkog lijeka.
- b) *In vivo* ispitivanja - ako se usporedna ispitivanja u *in vitro* uvjetima pokažu zadovoljavajućima (nisu identificirani faktori koji bi sprečavali direktnu primjenu lijeka kod ljudi), ispitivanja na životinjama nisu nužna. Ako faktori svojstveni lijeku, a koji utječu na farmakodinamiku (npr. glikozilacija) ne mogu biti dovoljno karakterizirani u *in vitro* uvjetima, potrebno je provesti *in vivo* ispitivanja, treba provesti ispitivanja na životinjama ili na zdravim dobrovoljcima kao dio kliničkog ispitivanja.

4.8.5.5 Usporedna klinička ispitivanja

Klinička ispitivanja za bioslični lijek se provode u manjem opsegu u odnosu na ispitivanja za novu djelatnu tvar, zbog dostupnih podataka za referentni lijek. Usporedna klinička ispitivanja započinju s PK ispitivanjima i, ako je moguće, PD ispitivanjima nakon čega slijedi ispitivanje kliničke djelotvornosti i sigurnosti. Usporedna klinička ispitivanja obuhvaćaju farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja, ispitivanje djelotvornosti i sigurnosti biosličnog lijeka te ekstrapolacija indikacija (49,114).

4.8.5.6 Usporedba agregacije kod biosličnog i referentnog monoklonskog protutijela

Monoklonska protutijela dobivena iz neljudskih izvora (ksenogeno porijeklo), imaju najveći potencijal za imunogenost, uslijed većeg odstupanja u slijedu aminokiselina u odnosu na ljudske proteine. Iako bi humana monoklonska protutijela trebala biti najmanje imunogena, postoje mnogi drugi čimbenici koji mogu dovesti do imunosne reakcije kod ljudi uslijed davanja takvih lijekova (čimbenici vezani uz proizvod, uz karakteristike pacijenata ili bolesti, sadržaj i tip protutijela) (70). Usporednim ispitivanjima na biosličnom i referentnom biološkom lijeku na razini kakvoće koja uključuju ispitivanja onečišćenja i razgradnih produkata, naglasak treba staviti na agregatna onečišćenja koja mogu nastati tijekom proizvodnje, pročišćavanja, čuvanja i primjene monoklonskih protutijela, obzirom na njihov veliki imunogeni potencijal. U cilju provjere usporedivosti stupnja agregacije proteina između biosličnih i referentnih monoklonskih protutijela, provedena su ispitivanja na nekim od najčešće korištenih monoklonskih protutijela, adalimumabu, infliksimabu i rituksimabu.

4.8.5.6.1 Ispitivanje sličnosti između biosličnih inačica adalimumaba i referentnog lijeka Humira®

Adalimumab (Humira®) je bilo prvo odobreno rekombinantno humano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na TNF i neutralizira njegovu biološku funkciju. Odobren je u više od deset indikacija za liječenje upalnih bolesti, među ostalim i reumatoidnog artritisa i Chronove bolesti (41). Provedene su dvije neovisne studije ispitivanja usporedivosti biosličnih serija adalimumaba i originalnog monoklonskog protutijela Humira®.

1) ispitivanje fizičko – kemijske i funkcionalne sličnosti između biosličnog adalimumaba MSB11022 i referentnog lijeka Humira®

Na tri serije biosličnog lijeka MSB11022 (Merck) i više serija referentnog lijeka Humira® (AbbVie; 13 – 23 serija uzorkovanih s tržišta EU i SAD) je provedeno usporedno ispitivanje pomoću fizičko – kemijske i biološke karakterizacije sofisticiranim ortogonalnim metodama. Provedena je karakterizacija primarne strukture proteina i posttranslacijskih modifikacija, karakterizacija viših proteinskih struktura, ispitivanje čistoće i profila onečišćenja (agregatna onečišćenja pomoću SEC metode, proteini velike molekulske mase (engl. *high-molecular-weight*, HMW) pomoću AUC i naboj molekula pomoću IEF) i ispitivanje afiniteta vezanja Fc i Fab regija. Prema dostupnim rezultatima, zaključeno je kako svi ispitani fizičko – kemijski i biološki parametri pokazuju slične rezultate kod biosličnog i referentnog lijeka, uz manje varijabilnosti. Slična agregatna onečišćenja / proteini velike molekulske mase i čistoća proteinskih monomera su detektirana u biosličnom i u referentnom lijeku pomoću SEC, a rezultati su dodatno potvrđeni ortogonalnim metodama, pomoću AUC. Kao treća metoda analize čistoće i sadržaja onečišćenja u biosličnom i referentnom lijeku se spominje automatizirana gel elektroforeza (engl. *gel-on-chip electrophoresis, bioanalyzer*). Pomoću sve tri bioanalitičke metode je pokazano kako je razina agregatnih onečišćenja između biosličnog i referentnog biološkog lijeka usporediva. Dapače, na temelju dostupnih rezultata se može zaključiti kako između serija referentnog lijeka (Humira®) postoji veća varijabilnost nego između biosličnog i referentnog lijeka, što može biti uzrokovano izmjenama u postupku proizvodnje (119).

2) usporedno ispitivanje forsirane razgradnje na serijama biosličnog adalimumaba i referentnog lijeka Humira®

Na po tri serije proizvodne veličine biosličnog adalimumaba CinnoRA® (CinnaGen Co.) i referentnog lijeka Humira® (Abbvie) je provedeno usporedno ispitivanje obzirom na profile razgradnje djelatne tvari i lijeka dobivene u uvjetima forsirane razgradnje. Nestabilnosti i promjene fizikalnih i kemijskih uvjeta mogu poremetiti tercijarnu, a nekad i sekundarnu strukturu proteina, dok nastanak i kidanje kovalentnih veza može poremetiti primarnu proteinsku strukturu i dovesti do smanjenja biološke aktivnosti monoklonskog protutijela, dovesti do nastanka ireverzibilnih agregata i mnogih drugih procesa, poput oksidacije, deamidacije, razmatanja i denaturacije proteina i dr.

Ispitivanje stabilnosti je provedeno u uvjetima oksidacije (3,0% H₂O₂ / 25±2°C), u kiselim (HCl 0,1M / 25±2°C) i bazičnim uvjetima (NaOH 0,1M / 25±2°C), u uvjetima termalne hidrolize (40±2°C), izloženosti svjetlu (1,2 *million lux hours* / 25±2°C) i mehaničkim utjecajima (vrtnja pri brzini 512 rpm / 25±2°C). Ispitivanja su provedena u definiranim vremenskim intervalima pomoću validiranih analitičkih metoda (SEC za detekciju agregata, nabijene izoforme u kiselim i bazičnim uvjetima pomoću ionoizmjenjivačke kromatografije (engl. *ion-exchange chromatography*, IEC) i TNF- α neutralizirajuće aktivnosti adalimumaba pomoću *in vitro* biološkog ispitivanja (engl. *in vitro bioassay*). U svim ispitanim uvjetima (osim kod izloženosti svjetlu) je uočena pojačana razgradnja proteina, porast agregacije te posljedični pad biološke aktivnosti i u serijama biosličnog i referentnog adalimumaba. Kod izlaganja svjetlu nije uočena razgradnja, niti nastanak agregatnih onečišćenja. Vrste i količina agregatnih onečišćenja između biosličnog i referentnog adalimumaba su usporedive i ukazuju na sličnost oba lijeka kod izlaganja stresnim uvjetima (pri forsiranoj razgradnji) (120).

4.8.5.6.2 *Ispitivanje sličnosti između biosličnih inačica infliksimaba i referentnog lijeka Remicade®*

Infliksimab (Remicade®) je kimerno (25% mišje i 75% ljudsko) monoklonsko protutijelo IgG1, proizvedeno na mišjim hibridoma stanicama tehnologijom rekombinantne DNA. Blokator je faktora tumorske nekroze i vezivanjem na TNF- α receptor neutralizira njegovu biološku aktivnost. Indiciran je za smanjivanje znakova i simptoma reumatoidnog artritisa, liječenje Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa, ankilozantnog spondilitisa, psorijatičnog artritisa i

psorijaze (49,121) Infliksimab je prvo monoklonsko protutijelo za koje je odobren biosličan lijek u EU (Remsima[®], Celltrion i Inflectra[®], Hospira) (122).

1) ispitivanje sličnosti između biosličnog lijeka Remsima[®] i referentnog lijeka Remicade[®] u uvjetima forsirane razgradnje

Na serijama biosličnog infliksimaba Remsima[®] i referentnog lijeka Remicade[®] (oba u obliku liofiliziranog praha) je provedeno ispitivanje sličnosti u uvjetima forsirane razgradnje (povišena temperatura: 40 – 60°C i vlažnost (do 97% relativne vlažnosti). Utvrđeno je kako gubitak monomera native konformacije i nastanak topljivih agregata ovise o vremenu i količini vlage. Pri 60°C je kod oba lijeka uočena brza agregacija i taloženje agregata i zaključeno je kako je kinetika formiranja agregata ispitana SEC metodom slična za oba lijeka. Nastanak proteinskih agregata je bio na 97% relativne vlažnosti, uz 0.42% gubitka sadržaja monomera po danu za referentni lijek Remicade[®], odnosno 0.44% po danu za bioslični lijek Remsima[®]. Za suhe uzorke nije uočen pad sadržaja monomera. Zaključeno je kako Remsima[®] i Remicade[®] imaju istu primarnu strukturu proteina, fizičke karakteristike i formulaciju, dok su im razine različitih onečišćenja, kao što su topljivi agregati, nabijene izoforme i razine glikana, različite. Izuzev manjih razlika u inicijalnim profilima (povećana glikozilacija i veći udio agregata) i u postupcima proizvodnje, zaključeno je kako su ispitivani lijekovi slični u uvjetima forsirane razgradnje. I kod biosličnog i kod referentnog lijeka je uočen sličan stupanj razgradnje proteina te posljedično i profil onečišćenja (123).

2) ispitivanje stabilnosti u ubrzanim i dugoročnim uvjetima na serijama biosličnog infliksimaba i referentnog lijeka Remicade[®] - primjena metodologije ubrzanog ispitivanja stabilnosti (engl. *accelerated stability assessment program, ASAP*)

Na proizvodnim serijama biosličnog infliksimaba Remsima[®] (Celltrion Healthcare) i Flixabi[®] (Biogen) i referentnog lijeka Remicade[®] (Merck) je provedena karakterizacija molekule u uvjetima forsirane razgradnje i ispitivanje stabilnosti nakon rekonstitucije lijeka (engl. *in-use stability*, stabilnost lijeka u primjeni / nakon otvaranja), kako bi se ispitala njihova sličnost obzirom na puteve razgradnje. Karakterizacija posttranslacijskih modifikacija na molekulama lijekova je provedena pomoću LC-MS/MS metode, dok su agregatna onečišćenja i fragmenti slobodnih lanaca karakterizirani pomoću SEC-MALS-UV/RI metode (engl. *size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering with ultraviolet or refractive index detectors*, kromatografija isključenjem po veličini spregnuta s višekutnim laserskim raspršenjem svjetlosti uz UV detektor / detektor indeksa refrakcije). Rezultati ispitivanja stabilnosti u svim uvjetima

ukazuju na sličnost između oba bioslična lijeka i referentnog lijeka te da je stupanj agregacije u biosličnim i referentnom lijeku podjednak. Primijenjen je i model ubrzanog ispitivanja stabilnosti (engl. *accelerated stability assessment program*, ASAP) koji na temelju ispitivanja stabilnosti u uvjetima povišene temperature (50-80°C) i relativne vlažnosti (10 – 75%) može projicirati put razgradnje molekula u „normalnim“, dugoročnim uvjetima (124). Usporedbom rezultata dobivenih statističkom obradom rezultata dobivenih ASAP modelom i rezultata u stvarnom vremenu (engl. *real-time data*) dobivenih ispitivanjem stabilnosti serija biosličnih infliksimaba i referentnog lijeka u dugoročnim uvjetima (engl. *long-term condition*), utvrđeno je kako su rezultati u korelaciji, odnosno da je ASAP model dobro predvidio rezultate u dugoročnom ispitivanju stabilnosti. Obzirom da se ASAP model najčešće koristi za procjene stabilnosti kemijskih molekula, ovdje je pokazano kako primjenu može naći i kod ispitivanja stabilnosti bioloških lijekova (u ovom slučaju monoklonskih protutijela (125).

4.8.5.6.3 Ispitivanje sličnosti između biosličnih inačica rituksimaba i referentnog lijeka MabThera[®]

Rituksimab (MabThera[®], Rituxan[®]) je prvo registrirano cjelovito kimerno monoklonsko protutijelo koje se veže na transmembranski antigen CD20 na pre-B-stanicama i zrelim B-limfocitima. Također, prvo je monoklonsko protutijelo odobreno za liječenje B-staničnih limfoma. Indiciran je za liječenje ne-Hodgkinovog limfoma (NHL), kronične limfocitne leukemije (KLL), reumatoidnog artritisa, granulomatoze s poliangitisom i mikroskopskim poliangitisom i običnog pemfigusa (11).

1) ispitivanje fizičko – kemijske i funkcionalne sličnosti između biosličnog rituksimaba HLX01 i referentnog lijeka MabThera[®] (EU i kinesko tržište)

Na dvanaest serija biosličnog rituksimaba HLX01, 7 serija referentnog lijeka s EU tržišta i 15 serija referentnog lijeka s kineskog tržišta je provedeno ispitivanje sličnosti obzirom na fizičko – kemijska (svojstva primarne, sekundarne i tercijarne strukture proteina, naboj, glikozilacija, agregacija, nastanak fragmenata niske molekulske mase) i biološka svojstva (afinitet vezanja za receptore, izazivanje ADCC i CDC toksičnosti, ostatna onečišćenja iz staničnih produkata (HCP, DNA)). Svi dostupni rezultati su usporedivi između biosličnog lijeka i referentnog lijeka s oba tržišta, što potvrđuje njihovu sličnost. Ispitivanja čistoće i profila onečišćenja provedena su ortogonalnim analitičkim metodama (SEC i CE-SDS) i pokazala su kako je sadržaj

agregatnih proteinskih onečišćenja i fragmenata niske molekulske mase u biosličnom lijeku nešto niži od onog u referentnom lijeku i s EU i s kineskog tržišta (126).

2) usporedno ispitivanje sličnosti između biosličnog rituksimaba CT-P10 (Truxima[®]) i referentnih lijekova Mabthera[®] (EU) i Rituxan[®] (SAD)

Provedeno je ispitivanje sličnosti između biosličnog rituksimaba CT-P10 i referentnih lijekova MabThera[®] s europskog, odnosno Rituxana s američkog tržišta, a ispitani su fizičko – kemijski i biološki parametri kakvoće. U cilju usporedbe sadržaja agregatnih onečišćenja između navedenih lijekova, korištene su SEC-HPLC, SEC-MALS i AUC metode. Utvrđeno je kako je sadržaj agregata i molekula veće mase dobiven SEC-HPLC analizom u biosličnom CT-P10 nešto niži od razine u oba referentna lijeka, dok je taj sadržaj dobiven SEC-MALS i AUC analizama podjednak i usporediv u sva tri ispitana lijeka. Primjenom sofisticiranih ortogonalnih metoda je utvrđeno kako su, osim agregatnih onečišćenja i ostalih molekula veće molekulske mase, čistoća i profil onečišćenja (obzirom na fragmente, procesna onečišćenja i neglikozilirane forme) usporedivi za biosličnu Truximu[®] i referentne lijekove s oba tržišta. Na temelju dostupnih rezultata ispitivanja, zaključeno je kako je bioslični rituksimab CT-P10 jako sličan referentnom rituksimabu s EU i američkog tržišta obzirom na fizičko – kemijska svojstva, biološku aktivnost, djelotvornost i sigurnost (127).

5. ZAKLJUČAK

Cilj razvoja i proizvodnje svih lijekova, pa tako i bioloških, jest proizvesti siguran, učinkovit i kvalitetan lijek. Kroz odgovarajuće osmišljen, nadziran i kontroliran proizvodni proces nužno je proizvesti sigurne i učinkovite biološke lijekove koji su ujednačenog sadržaja i usporedive kakvoće između različitih serija, odnosno između primijenjenih doza u kliničkoj primjeni.

Monoklonska protutijela i ostali proteinski lijekovi se proizvode pomoću vrlo složenih staničnih mehanizama, što uključuje njihovu izolaciju iz bioloških izvora. Zbog visoke varijabilnosti živih sustava iz kojih se dobivaju, biološki lijekovi su vrlo osjetljivi na promjene u postupku proizvodnje koje mogu utjecati na kakvoću, djelotvornost i sigurnost lijeka. Također, biološki lijekovi zahtijevaju posebne uvjeta čuvanja i transporta, jer su proteinske molekule vrlo osjetljive na vanjske uvjete.

Glavni cilj u razvoju monoklonskih protutijela nove generacije i njihovih inačica je postizanje većeg afiniteta za ciljane antigene / molekule i smanjenje imunogenosti. Humanizacijom (razvojem humaniziranih i humanih protutijela) monoklonskih protutijela zadnjih desetljeća se smanjuje njihova imunogenost, ali ona se ne može apsolutno izbjeći. Imunosne reakcije na biološke proteine mogu biti različitog intenziteta, od prolaznog porasta protutijela na lijek bez kliničkog značaja, do ozbiljnijih zdravstvenih komplikacija i životno ugrožavajućih stanja. Imunogenost može dovesti do neutralizacije monoklonskih protutijela, odnosno posljedično do smanjenja (ili gubitka) njihove učinkovitosti te može dovesti do snažne preosjetljivosti (primjerice anafilaktički šok posredovan IgE protutijelima). Zbog potencijalne ugroze zdravlja pacijenata i smanjene učinkovitosti lijeka, važno je znati i razumjeti faktore koji mogu dovesti do imunogenosti bioloških lijekova. Mnogo je čimbenika koji utječu na imunogenost koju izazivaju biološki lijekovi, a najbitnije su karakteristike pacijenta koji prima lijek i režim doziranja te karakteristike samog lijeka. Svi se čimbenici moraju predvidjeti, kontrolirati i minimizirati tijekom razvoja i proizvodnje monoklonskih protutijela.

Razvojem novih tehnika proizvodnje i naprednijih molekularno – bioloških metoda analize razvijaju se nova monoklonska protutijela. No, niti napredne tehnologije ne mogu u potpunosti eliminirati izazove i probleme u njihovoj proizvodnji, a koji su direktna posljedica svojstva proteina. Brojni su faktori koji utječu na stabilnost i funkciju proteina. U izloženosti stresnim uvjetima, poput visoke temperature ili oksidativnog stresa, može doći do razmatanja ili pogrešnog smatanja proteina, što za posljedicu može imati nastanak disfunkcionalnih proteina.

Obzirom na strukturu i svojstva proteina, pojava agregacije proteina se smatra uobičajenom i često neizbježnom manifestacijom fizičke nestabilnosti monoklonskih protutijela, koja može

imati značajan utjecaj na njihovu sigurnost i kakvoću. Proteinski agregati generalno mogu nastati tijekom gotovo svih faza proizvodnje monoklonskih protutijela; tijekom procesa ekspresije proteina u bioreaktoru (engl. *upstream process*), izolacije i pročišćavanja (engl. *downstream process*), tijekom formulacije i pakiranja lijeka, kao i tijekom čuvanja, transporta i primjene lijeka.

Poznavanje i razumijevanje mehanizama agregacije proteina je od kritične važnosti za konzistentnu proizvodnju lijeka odgovarajuće kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti. Razumijevanje kritičnih koraka i procesnih parametara tijekom proizvodnje monoklonskog protutijela mogu pomoći u osmišljavanju i definiranju odgovarajućih strategija za kontrolu agregacije. Kroz opis postupka proizvodnje monoklonskih protutijela je potrebno demonstrirati kako je definirana odgovarajuća strategija kontrole kvalitete u svim fazama proizvodnje lijeka i da se čitavo vrijeme proizvodnje mogu detektirati i po potrebi kvantificirati sva potencijalna onečišćenja. Poseban naglasak treba se staviti na parametre procesne kontrole (engl. *in-process parameters*), što podrazumijeva (kritična) svojstva kakvoće samog lijeka i parametre proizvodnog procesa. Predložena strategija kontrole tijekom proizvodnje treba osigurati da je proteinski lijek odgovarajuće kakvoće tijekom svih faza proizvodnje, što uključuje i odgovarajuću kontrolu onečišćenja koja mogu nastati uslijed agregacije ili posttranslacijskih modifikacija monoklonskog protutijela. Svi koraci u industrijskoj proizvodnji proteinskih lijekova trebaju biti odgovarajuće opisani i validirani, kako bi se lakše mogla procijeniti mogućnost nastanka agregatnih onečišćenja, kao i njihovih svojstava i mehanizama stvaranja. Različiti putevi agregacije monoklonskih protutijela definirani su različitim svojstvima navedenih proteina, kao i svojim okolišom te uvjetima pri kojima se proizvode i obrađuju. U cilju razvijanja i definiranja prikladne strategije kontrole agregacije, potrebno je u obzir uzeti sve navedene kritične faktore i svojstva.

Agregacija proteina se smatra kritičnim svojstvom kakvoće koje može značajno utjecati na sigurnost, kakvoću i djelotvornost monoklonskih protutijela. Različite vrste agregata mogu nastati tijekom postupka proizvodnje monoklonskih protutijela zbog mnoštva vanjskih faktora, kao što su promjene temperature i pH, potresanje, procesi smrzavanja – otapanja (engl. *freeze-thaw*), oksidacija te različiti uvjeti čuvanja. Tako nastali agregati pokazuju veliku varijabilnost u izgledu (morfologiji) i veličini čestica, stupnju agregacije i površinskoj hidrofobnosti te imaju najveći utjecaj na biološku aktivnost monoklonskih protutijela.

Osim utjecaja na biološku aktivnost, jako važna direktna posljedica prisutnosti agregatnih onečišćenja je i povećanje imunogenosti monoklonskih protutijela, odnosno stvaranja protutijela na lijek, što može imati višestruko ozbiljne posljedice na zdravlje pacijenta.

Agregati različitih proteina pokazuju veći imunogeni potencijal u odnosu na pojedinačne podjedinice (monomere), a pretpostavlja se da je razlog tomu razlika u veličini i vrsti agregata, njihovoj konformaciji te morfologiji. Uočeno je kako imunogeni odgovor raste s veličinom agregata koji ga izaziva, isto kao i stupnjem glikozilacije i prisustvom onečišćenja. Zasad nije u potpunosti jasno imaju li sve vrste agregata jednak imunogeni potencijal te se ne može unaprijed znati koja je agregatna onečišćenja potrebno kontrolirati u lijeku.

Prema posljednje važećim smjernicama i preporukama regulatornih agencija, svojstva svih agregata koji se mogu detektirati trebaju biti odgovarajuće karakterizirana, a sadržaj kontroliran i rutinski nadziran u svim biološkim lijekovima. Karakterizacija i kvantifikacija agregata je u pravilu prilično zahtjevna, uzevši u obzir činjenicu kako se agregati mogu pojavljivati u brojnim različitim oblicima.

Razumijevanje prirode proteinskih agregata i mehanizama njihova nastanka, unutarnjih i vanjskih čimbenika koji uzroku agregaciju te razvijanje odgovarajuće strategija prevencije i minimiziranja agregacije u monoklonskim protutijelima mogu značajno smanjiti vrijeme i troškove potrebne za proizvodnju i odobravanje sigurnih, kvalitetnih i učinkovitih monoklonskih protutijela, s minimalnim rizikom od imunogenosti. U konačnici, nastanak agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima se može smanjiti može se kontrolirati i odgovarajuće pratiti, ali se ne može u potpunosti izbjeći, obzirom da je riječ o neizbježnoj fizičkoj nestabilnosti koju pokazuju monoklonska protutijela i ostali proteinski lijekovi.

Iznimno je bitna adekvatna i pravovremena karakterizacija te kontrola kakvoće agregatnih onečišćenja pomoću sve sofisticiranijih i specifičnijih analitičkih metoda. Vrste agregata i put njihova nastanka se razlikuju za svaki protein te ne postoji univerzalna analitička metoda za karakterizaciju i kvantifikaciju agregatnih onečišćenja u monoklonskim protutijelima. Veličina agregata i vrijeme njihova poluživota su faktori koji imaju bitan utjecaj na izbor analitičke metode u ispitivanju proteinskih agregata. Obzirom da svaka metoda koja se koristi za karakterizaciju i kvantifikaciju agregata pokriva samo manji ograničeni raspon veličina proteinskih čestica, uzevši u obzir i prednosti i nedostatke svake metode, većinom se za kvalitetnu i preciznu karakterizaciju proteina koriste barem dvije ortogonalne metode, po mogućnosti temeljene na različitim principima. Kombiniranje metoda omogućuje kvalitetniju

karakterizaciju s kvantifikacijom proteinskih lijekova, što je u skladu s propisima nadležnih regulatornih tijela. Primjena najsuvremenijih metoda karakterizacije i kvantifikacije agregata u monoklonskim protutijelima, zajedno s razumijevanjem mehanizama agregacije i vrste agregata, osiguravaju odgovarajuću kontrolu kakvoće te se minimizira mogućnost nastanka agregata tijekom proizvodnje i čuvanja lijeka.

U cilju povećanja dostupnosti bioloških lijekova i racionalizacije troškova u zdravstvu, pred nešto manje od 20-ak godina je odobravanjem prvog biosličnog lijeka (Omnitrope (somatotropin), Sandoz, 2006., EMA) pokrenuta nova era razvoja i odobravanja lijekova sličnih referentim biološkim ijevovima. Tijekom razvoja biosličnog lijeka, provode se usporedna ispitivanja kakvoće te klinička i neklinička ispitivanja između biosličnog i referentnog lijeka. Princip usporedivosti ne podrazumijeva da dva lijeka budu identična, već da se dokaže kako uočene razlike u kakvoći nemaju negativan utjecaj na djelotvornost i sigurnost lijeka. Usporednim ispitivanjima na biosličnom i referentnom biološkom lijeku na razini kakvoće koja uključuju ispitivanja onečišćenja i razgradnih produkata, naglasak treba staviti na agregatna onečišćenja koja mogu nastati tijekom proizvodnje, pročišćavanja, čuvanja i primjene monoklonskih protutijela, obzirom na njihov veliki imunogeni potencijal.

Na temelju dostupnih rezultata ispitivanja usporedivosti stupnja agregacije između referentnih monoklonskih protutijela adalimumaba, infliksimaba i rituksimaba i njihovih biosličnih inačica, zaključeno je kako svi ispitani fizičko – kemijski (svojstva primarne, sekundarne i tercijarne strukture proteina, naboj, glikozilacija, agregacija, nastanak fragmenata niske molekulske mase) i biološki parametri (afinitet vezanja za receptore, izazivanje ADCC i CDC toksičnosti, ostatna onečišćenja iz staničnih produkata (HCP, DNA)) pokazuju slične rezultate kod biosličnog i referentnog lijeka, uz manje varijabilnosti. Primjenom sofisticiranih ortogonalnih metoda je utvrđeno kako su, osim agregatnih onečišćenja i ostalih molekula, veće molekulske mase, čistoća i profil onečišćenja (obzirom na fragmente, procesna onečišćenja i neglikozilirane forme) usporedivi između biosličnih i referentnih bioloških lijekova. Dapače, na temelju dostupnih rezultata se može zaključiti kako je sadržaj agregatnih proteinskih onečišćenja u biosličnom lijeku nešto niži od onog u referentnom lijeku, neovisno o tržištu s kojeg dolazi. Također, između serija svih ispitanih referentnih lijekova uočena je veća varijabilnost nego između biosličnog i referentnog lijeka, što može biti uzrokovano izmjenama u postupku proizvodnje.

U konačnici, na temelju dostupnih rezultata ispitivanja analiziranih u ovom radu, zaključeno je kako su referentni adalimumab, rituksimab i infliksimab slični svojim biosličnim „kopijama“, obzirom na fizičko – kemijska svojstva, biološku aktivnost, djelotvornost i sigurnost.

6. LITERATURA

1. Strohl WR, Strohl LM. Introduction to biologics and monoclonal antibodies. U: Therapeutic antibody engineering. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Biomedicine; 2012. str. 1–6.
2. Pham NB, Meng WS. Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. Sv. 585, International Journal of Pharmaceutics. Elsevier B.V.; 2020.
3. Bansal R, Dash R, Rathore AS. Impact of mAb Aggregation on Its Biological Activity: Rituximab as a Case Study. J Pharm Sci. 01. rujun 2020.;109(9):2684–98.
4. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology. veljača 2010.;125(2 SUPPL. 2).
5. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 01. rujun 2017.;6(9):576–88.
6. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. Sv. 8, Antibodies. MDPI; 2019.
7. Davis JD, Deng R, Andrew Boswell C, Zhang Y, Li J, Fielder P, i ostali. Monoclonal antibodies: From structure to therapeutic application. U: Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Fourth Edition. Springer New York; 2013. str. 143–78.
8. Milčić E. Monoklonska protutijela: humanizacija i imunogenost [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2016. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:912991>
9. Vrhovac M. Biološka terapija i biosimilar u javnim ljekarnama [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:870067>
10. Jarboe J, Gupta A, Saif W. Therapeutic human monoclonal antibodies against cancer. Methods in Molecular Biology. 2014.;1060:61–77.
11. European Medicines Agency (EMA). Product Information - MabThera [Internet]. 2023 [citirano 26. siječanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_hr.pdf
12. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Herceptin [Internet]. 2023 [citirano 26. siječanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_hr.pdf
13. Jin S, Sun Y, Liang X, Gu X, Ning J, Xu Y, i ostali. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. Sv. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2022.
14. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. Curr Opin Immunol. kolovoz 2008.;20(4):450–9.
15. Tian Z, Liu M, Zhang Y, Wang X. Bispecific T cell engagers: an emerging therapy for management of hematologic malignancies. Sv. 14, Journal of Hematology and Oncology. BioMed Central Ltd; 2021.
16. Wu Z, Cheung N V. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. Sv. 182, Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc.; 2018. str. 161–75.

17. Moon D, Tae N, Park Y, Lee SW, Kim DH. Development of Bispecific Antibody for Cancer Immunotherapy: Focus on T Cell Engaging Antibody. Sv. 22, Immune Network. Korean Association of Immunologists; 2022.
18. Zhou Y, Marks JD. Biosimilars of Monoclonal Antibodies: A Practical Guide to Manufacturing, Preclinical, and Clinical Development, First Edition. Edited Mechanism of Action for Therapeutic Antibodies. U: Morrow KJ, Liu C, urednici. 2017. str. 85–111.
19. Tazi I, Nafil H, Mahmal L. Monoclonal antibodies in hematological malignancies: Past, present and future. Sv. 7, Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2011. str. 399–407.
20. Samantasinghar A, Sunildutt NP, Ahmed F, Soomro AM, Salih ARC, Parihar P, i ostali. A comprehensive review of key factors affecting the efficacy of antibody drug conjugate. Sv. 161, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson s.r.l.; 2023.
21. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Mylotarg [Internet]. 2023 [citirano 25. siječanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/mylotarg-epar-product-information_hr.pdf
22. Biopharma PEG. High Purity PEG Derivatives - Development, Synthesis and GMP Manufacturing of Tailor-made Activated PEG Linkers [Internet]. 2024 [citirano 15. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.biochempeg.com/article/397.html>
23. Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, i ostali. Monoclonal Antibodies: A Review. Curr Clin Pharmacol. 09. listopad 2018.;13(2):85–99.
24. Becker H, Reichert JM. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT[®] 3). U: Handbook of Therapeutic Antibodies. 2nd izd. str. 1645–78.
25. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, i ostali. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. Sv. 27, Journal of Biomedical Science. BioMed Central Ltd.; 2020.
26. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975.;256:495–7.
27. Valinger Radovan. Biotehnologija u farmaceutskoj industriji Biotechnology in the Pharmaceutical Industry. Medicus. 2006.;15 (1):187–8.
28. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Zevalin [Internet]. 2020 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/zevalin-epar-product-information_hr.pdf
29. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Blincyto [Internet]. 2024 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/blincyto-epar-product-information_hr.pdf
30. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Lumoxiti [Internet]. 2021 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/lumoxiti-epar-product-information_hr.pdf
31. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. Sv. 12, Current Opinion in Pharmacology. 2012. str. 615–22.
32. Chintalacharuvu KR, Morrison SL. Chimeric Antibodies: Production and Applications. Sv. 8, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology. 1995.

33. Roguska MA, Pedersent JT, Keddy CA, Henryt AH, Searlet SJ, Lambert JM, i ostali. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing [Internet]. Sv. 91, *Biochemistry Communicated by Stuart F. Schlossman*. 1994. Dostupno na: <https://www.pnas.org>
34. Ahmadzadeh V, Farajnia S, Feizi MAH, Nejad RAK. Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. Sv. 33, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. str. 67–73.
35. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Zinbryta [Internet]. 2018 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/zinbryta-epar-product-information_hr.pdf
36. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Avastin [Internet]. 2023 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/avastin-epar-product-information_hr.pdf
37. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Gazyvaro [Internet]. 2023 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/gazyvaro-epar-product-information_hr.pdf
38. Nixon AE, Sexton DJ, Ladner RC. Drugs derived from phage display from candidate identification to clinical practice. *MAbs*. siječanj 2014.;6(1):73–85.
39. Jakobovits A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol*. 1995.;6:561–6.
40. Brüggemann M, Osborn MJ, Ma B, Hayre J, Avis S, Lundstrom B, i ostali. Human Antibody Production in Transgenic Animals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 14. ožujak 2015.;63(2):101–8.
41. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Humira [Internet]. 2022 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/humira-epar-product-information_hr.pdf
42. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Vectibix [Internet]. 2022 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/vectibix-epar-product-information_hr.pdf
43. Gračić N. Dizajn i konzistentnost industrijske proizvodnje proteinskih lijekova [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2017. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:046610>
44. European Agency Medicines (EMA). Development pharmaceuticals for biotechnological and biological products (CPMP/BWP/328/99) Annex to note for guidance on development pharmaceuticals (CPMP/QWP/155/96) [Internet]. 2000 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/development-pharmaceuticals-biotechnological-and-biological-products-cmpbw32899-annex-note-guidance-development-pharmaceuticals-cmpqwp15596_en.pdf
45. European Medicines Agency (EMA). ICH: Q 6 B: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, CPMP/ICH/365/96 [Internet]. 1999 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-and-acceptance-criteria-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf

46. European Medicines Agency (EMA). Guideline on manufacture of the finished dosage form, EMA/CHMP/QWP/245074/2015 [Internet]. 2017 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-manufacture-finished-dosage-form-revision-1_en.pdf
47. Carrara SC, Ullitzka M, Grzeschik J, Kornmann H, Hock B, Kolmar H. From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. Sv. 594, International Journal of Pharmaceutics. Elsevier B.V.; 2021.
48. Strohl W R, Strohl L M. Fundamental technologies for antibody engineering. U: Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Biomedicine; 2012. str. 57–76.
49. Sokol P. RAZVOJ I ODOBRAVANJE BIOSLIČNIH LIJEKOVA U EUROPSKOJ UNIJI. [Zagreb]: Sveučilište u Zagreb; 2016.
50. McMahon HE, Schwartz JW, Ray S. Monoclonal Antibody Production and Purification [Internet]. Philadelphia; 2018. Dostupno na: https://repository.upenn.edu/cbe_sdrhttps://repository.upenn.edu/cbe_sdr/104
51. Berlec A, Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells. Sv. 40, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2013. str. 257–74.
52. São Pedro MN, Klijn ME, Eppink MHM, Ottens M. Process analytical technique (PAT) miniaturization for monoclonal antibody aggregate detection in continuous downstream processing. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 01. rujan 2022.;97(9):2347–64.
53. European Medicines Agency (EMA). Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products, EMA/CHMP/BWP/532517/2008 [Internet]. 2016 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-and-specification-monoclonal-antibodies-and-related-products-revision-1_en.pdf
54. Brorson K, Kendrick B. Perspectives on Well-Characterized Biological Proteins. U: Schiel JE, Davis DL, Borisov O V., urednici. State-of-the-art and emerging technologies for therapeutic monoclonal antibody characterization Monoclonal antibody therapeutics: structure, function, and regulatory space. ACS SYMPOSIUM SERIES; 2014. str. 99–145.
55. European Medicines Agency (EMA). ICH Q5A(R2) Guideline on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin - Scientific guideline, EMA/CHMP/ICH/804363/2022 [Internet]. Sv. Step 5 version. 2023 [citirano 15. prosinac 2023.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q5ar2-guideline-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin-step-5_en.pdf
56. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development, EMA/CHMP/ICH/167068/2004 [Internet]. Sv. Step 5 version. 2017 [citirano 10. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international->

- conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf
57. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline Q9 on quality risk management, EMA/CHMP/ICH/24235/2006 [Internet]. 2015. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-guideline-q9-quality-risk-management-step-5-first-version_en.pdf
 58. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system, EMA/CHMP/ICH/214732/2007 [Internet]. 2015 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-guideline-q10-pharmaceutical-quality-system-step-5_en.pdf
 59. Schuster J, Mahler HC, Joerg S, Huwylar J, Mathaes R. Analytical Challenges Assessing Protein Aggregation and Fragmentation Under Physiologic Conditions. Sv. 110, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V.; 2021. str. 3103–10.
 60. Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. Sv. 98, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. John Wiley and Sons Inc.; 2009. str. 2909–34.
 61. Power CA, Bates A. David vs. Goliath: The structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies*. 01. lipanj 2019.;8(2).
 62. Mijić I, Marinc S, Cindrić M. Imunogeničnost agregata terapeutskih proteina 2009. *Medicina (B Aires)*. 2009.;45(3):245–51.
 63. Food and Drug Administration (FDA). Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products [Internet]. 2014 [citirano 23. travanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-assessment-therapeutic-protein-products>
 64. Carpenter JF, Randolph TW, Jiskoot W, Crommelin DJA, Middaugh CR, Winter G, i ostali. Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality. *J Pharm Sci*. 01. travanj 2009.;98(4):1201–5.
 65. Philo JS, Arakawa T. Mechanisms of Protein Aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009.;10:348–51.
 66. Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol*. 2014.;32(7):372–80.
 67. Wang W, Roberts CJ. Protein aggregation – Mechanisms, detection, and control. *Int J Pharm*. 25. listopad 2018.;550(1–2):251–68.
 68. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci*. 2011.;100(2):354–87.
 69. European Agency Medicines (EMA). Quality: stability. [citirano 29. svibanj 2024.]; Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-and-development/scientific-guidelines/quality-guidelines/quality-stability>

70. Bošnjak L. Predviđanje imunogeničnosti bioloških lijekova [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:808724>
71. Schellekens H, Jiskoot W. Erythropoietin-associated PRCA: Still an unsolved mystery. *J Immunotoxicol.* 01. rujan 2008.;3(3):123–30.
72. Jahn EM, Schneider CK. How to systematically evaluate immunogenicity of therapeutic proteins - regulatory considerations. Sv. 25, *New Biotechnology.* 2009. str. 280–6.
73. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* siječanj 2020.;109(1):169–90.
74. Marino JP, Brinson RG, Hudgens JW, Ladner JE, Gallagher DT, Gallagher ES, i ostali. Emerging Technologies To Assess the Higher Order Structure of Monoclonal Antibodies. U: Schiel JE, Davis DL, Borisov O V., urednici. *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 3 Defining the Next Generation of Analytical and Biophysical Techniques.* Washington: ACS; 2015. str. 17–43.
75. Singh SK, Afonina N, Awwad M, Bechtold-Peters K, Blue JT, Chou D, i ostali. An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. Sv. 99, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* John Wiley and Sons Inc.; 2010.
76. Roberts CJ. Protein aggregation and its impact on product quality. *Curr Opin Biotechnol.* 2014.;30:211–7.
77. Mills BJ, Moussa EM, Jameel F. Monoclonal Antibodies: Structure, Physicochemical Stability, and Protein Engineering. U: Jameel F, Skoug JW, Nesbitt RR, urednici. *Development of Biopharmaceutical Drug-Device Products [Internet]. American Association of Pharmaceutical Scientists;* 2020. str. 3–17. Dostupno na: <http://www.springer.com/series/8825>
78. Fernandes JC. Therapeutic application of antibody fragments in autoimmune diseases: current state and prospects. *Drug Discov Today.* 01. prosinac 2018.;23(12):1996–2002.
79. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. European Pharmacopoeia 11.4 [Internet]. 2024 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://pheur.edqm.eu/subhome/11-4>
80. United States Pharmacopeial Convention. USPNF 2023 [Internet]. 2022 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://online.uspnf.com/uspnf>
81. Rosenberg A. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J [Internet].* 2006.;8 (3)(59):E501–7. Dostupno na: <http://www.aapsj.org>
82. Mrežne stranice [Internet]. [citirano 13. veljača 2024.]. European Medicines Agency (EMA). Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/homepage>
83. Walsh G. *Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications.* Wiley; 2007.
84. Kopf E, Friess W. Protein pharmaceuticals: challenges and approaches . *PHARMAKON.* 2016.;4(2):125–33.
85. Das TK, Narhi LO, Sreedhara A, Menzen T, Grapentin C, Chou DK, i ostali. Stress Factors in mAb Drug Substance Production Processes: Critical Assessment of Impact on Product Quality and Control Strategy. *J Pharm Sci.* 01. siječanj 2020.;109(1):116–33.

86. Shah M. Commentary: New perspectives on protein aggregation during Biopharmaceutical development. *Int J Pharm.* 01. prosinac 2018.;552(1–2):1–6.
87. Rajan R, Ahmed S, Sharma N, Kumar N, Debas A, Matsumura K. Review of the current state of protein aggregation inhibition from a materials chemistry perspective: Special focus on polymeric materials. *Mater Adv.* 2021.;2(4):1139–76.
88. Tomin M. Molekulsko modeliranje bakterijskih dipeptidil-peptidaza III [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2018. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:561583>
89. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical Techniques for the Characterization and Quantification of Monoclonal Antibodies. Sv. 16, Pharmaceuticals. MDPI; 2023.
90. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characteristics biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol.* studeni 2004.;22(11):1383–91.
91. Sing SK, McAuley A, Rathore N, Rathore AS. Best Practices for Formulation and Manufacturing of Biotech Drug Products. *Biopharm Int.* 2009.;22(6).
92. European Medicines Agency (EMA). Guideline on process validation for the manufacture of biotechnology-derived active substances and data to be provided in the regulatory submission, EMA/CHMP/BWP/187338/2014 [Internet]. 2016 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-manufacture-biotechnology-derived-active-substances-and-data-be-provided-regulatory-submission_en.pdf
93. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q 5 C Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products, CPMP/ICH/138/95 [Internet]. 1996 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnologicalbiological-products_en.pdf
94. Uchiyama Susumu. American Pharmaceutical Review. 2019 [citirano 28. svibanj 2024.]. Aggregates Quantification of Biopharmaceuticals in a Wide Range of Sizes Using Orthogonal Methods. Dostupno na: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/362044-Aggregates-Quantification-of-Biopharmaceuticals-in-a-Wide-Range-of-Sizes-Using-Orthogonal-Methods/>
95. Prabakaran R, Rawat P, Thangakani AM, Kumar S, Gromiha MM. Protein aggregation: in silico algorithms and applications. *Biophys Rev* [Internet]. 2021.;13:71–89. Dostupno na: http://amypdb.genouest.org/e107_plugins/amypdb_
96. Krishnamurthy R, Sukumar M, Das TK, Lacher NA. Emerging Analytical Technologies for Biotherapeutics Development.
97. Miller LM, Bourassa MW, Smith RJ. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2013.;1828(10):2339–46.
98. Seshadri S, Khurana R, Fink AL. Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits. *Methods Enzymol.* 1999.;309:559–76.
99. Šprung M. KONFORMACIJSKA DINAMIKA ADENILACIJSKE DOMENE TIROCIDIN-SINTETAZE 1 PRAĆENA METODOM FLUORESCENCIJSKE SPEKTROSKOPIJE. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2014.

100. Remmele Jr. RL, Bee JS, Phillips JJ, Mo WD, Higazi DR, Zhang J, i ostali. Characterization of Monoclonal Antibody Aggregates and Emerging Technologies. U: Schiel JE, Davis DL, Borisov O V, urednici. State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 3 Defining the Next Generation of Analytical and Biophysical Techniques. Washington DC: American Chemical Society; 2015. str. 113–58.
101. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline Q8, Q9 and Q10 - questions and answers volume 4, EMA/CHMP/ICH/265145/2009 [Internet]. 2010 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q8-q9-and-q10-questions-and-answers-volume-4_en.pdf
102. Sapkota Anupama. Ultracentrifuge: Principle, Types, Parts, Procedure, Uses [Internet]. 2023 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://microbenotes.com/ultracentrifuge/>
103. Gokarn Y, Agarwal S, Arthur K, Bepperling A, Day ES, Filoti D, i ostali. Biophysical Techniques for Characterizing the Higher Order Structure and Interactions of Monoclonal Antibodies. U: Schiel JE, urednik. State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study. Washington: ACS; 2015. str. 285–327.
104. European Medicines Agency (EMA). ICH: Q 1 B: Photostability testing of new active substances and medicinal products, CPMP/ICH/279/95 [Internet]. 1998 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-b-photostability-testing-new-active-substances-and-medicinal-products-step-5_en.pdf
105. Mirdha L, Chakraborty H. Fluorescence-based techniques for the detection of the oligomeric status of proteins: implication in amyloidogenic diseases. European Biophysics Journal. 01. srpanj 2021.;50(5):671–85.
106. Kumar M, Pant A, Bansal R, Pandey A, Gomes J, Khare K, i ostali. Electron microscopy-based semi-automated characterization of aggregation in monoclonal antibody products. Comput Struct Biotechnol J. 01. siječanj 2020.;18:1458–65.
107. Klarić D. PRIMJENA SPREGNUTOG SUSTAVA SPEKTROMETRIJA IONSKE POKRETLJIVOSTI-SPEKTROMETRIJA MASA U ANALIZI IZOMERA BIOLOŠKIH MOLEKULA. Sv. 30, J. Am. Soc. Mass Spectrom. Sveučilište u Zagrebu; 2020.
108. Mijić I, Madunić J, Marinc S, Cindrić M. Razdvajanje protočnim poljem u analizi kompleksnih bioloških uzoraka. Kem Ind [Internet]. 2014.;63 (3-4):99–106. Dostupno na: www.postnova.com
109. Marguš M. ELEKTROANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE I KARAKTERIZACIJU NANOČESTICA METALNIH SULFIDA I ELEMENTARNOGA SUMPORA U VODENOM OKOLIŠU. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2016.
110. EUROPEAN GENERIC MEDICINES ASSOCIATION. biosimilars handbook [Internet]. 2016 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2016/03/EGA_BIOSIMILARS_handbook_en.pdf
111. Zakon o lijekovima [Internet]. Narodne novine, broj 76 Croatia; 2013. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html

112. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological/Biological Products, CPMP/ICH/5721/03. 2005. [citirano 29. svibanj 2024.]; Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf
113. European Medicines Agency (EMA). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1), EMA/CHMP/BWP/247713/2012. 2012. [citirano 29. svibanj 2024.]; Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active-substance-quality-issues-revision-1_en.pdf
114. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues, EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev1 [Internet]. 2014 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active-substance-non-clinical-and-clinical-issues-revision-1_en.pdf
115. Mellstedt H, Niederwieser D, Ludwig H. The challenge of biosimilars. *Annals of Oncology*. ožujak 2008.;19(3):411–9.
116. Kirchoff CF, Wang XZM, Conlon HD, Anderson S, Ryan AM, Bose A. Biosimilars: Key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol Bioeng*. 01. prosinac 2017.;114(12):2696–705.
117. McCamish M, Woollett G. Worldwide experience with biosimilar development. *MABs*. 2011.;3(2):209–17.
118. European Medicines Agency (EMA). Guideline on similar biological medicinal products, CHMP/437/04 Rev 1. 2014. [citirano 29. svibanj 2024.]; Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf
119. Magnenat L, Palmese A, Fremaux C, D’Amici F, Terlizese M, Rossi M, i ostali. Demonstration of physicochemical and functional similarity between the proposed biosimilar adalimumab MSB11022 and Humira®. *MABs*. 02. siječanj 2017.;9(1):127–39.
120. Shabestari AB, Mostafavi SM, Malekzadeh H. Force Degradation Comparative Study on Biosimilar Adalimumab and Humira. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2018.;13(6):496–508.
121. European Medicines Agency (EMA). Product Information - Remicade [Internet]. 2024 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/remicade-epar-product-information_hr.pdf
122. Generics and biosimilars Initiative. EMA approves first monoclonal antibody biosimilar [Internet]. 2013 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://gabionline.net/biosimilars/news/EMA-approves-first-monoclonal-antibody-biosimilar>
123. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, i ostali. Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsima™. *MABs*. 03. listopad 2017.;9(7):1197–209.

124. Rack C. An Introduction to the Accelerated Stability Assessment Program [Internet]. 2017 [citirano 29. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/341253-An-Introduction-to-the-Accelerated-Stability-Assessment-Program-ASAP/>
125. Legrand P, Dufaÿ S, Mignet N, Houzé P, Gahoual R. Modeling study of long-term stability of the monoclonal antibody infliximab and biosimilars using liquid-chromatography–tandem mass spectrometry and size-exclusion chromatography–multi-angle light scattering. *Anal Bioanal Chem.* 01. siječanj 2023.;415(1):179–92.
126. Xu Y, Xie L, Zhang E, Gao W, Wang L, Cao Y, i ostali. Physicochemical and functional assessments demonstrating analytical similarity between rituximab biosimilar HLX01 and the MabThera®. *MAbs.* 03. travanj 2019.;11(3):606–20.
127. Lee KH, Lee J, Bae JS, Kim YJ, Kang HA, Kim SH, i ostali. Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *MAbs.* 03. travanj 2018.;10(3):380–96.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Prezime / Ime	Portolan Katarina
E-mail	katarina.portolan@halmed.hr
Državljanstvo	hrvatsko
Datum rođenja	07.09.1989.
Radno iskustvo	
03/2024 - danas	Ocjenitelj za europske poslove u Odsjeku za ocjenu kakvoće, Odjel za odobravanje lijekova <i>Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, RH</i>
01/2021 – 03/2024	Viši stručni suradnik – specijalist za ocjenu dokumentacije o kakvoći lijeka u Odsjeku za ocjenu kakvoće, Odjel za odobravanje lijekova <i>Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, RH</i>
01/2018 – 01/2021	Viši stručni suradnik za ocjenu dokumentacije o kakvoći lijeka u Odsjeku za ocjenu kakvoće, Odjel za odobravanje lijekova <i>Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, RH</i>
05/2015 – 01/2018	Stručni suradnik za ocjenu dokumentacije o kakvoći lijeka u Odsjeku za ocjenu kakvoće, Odjel za odobravanje lijekova <i>Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, RH</i>
02/2015 – 05/2015	Farmaceut – ljekarnik <i>Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, RH</i>
09/2013 – 09/2014	Farmaceut – ljekarnik – pripravnički staž magistara farmacije <i>Ljekarna Splitsko – dalmatinske županije, Split, RH</i>

Obrazovanje i osposobljavanje

- 12/2021 - danas Specijalizacija iz ispitivanja i kontrole lijekova
Ministarstvo zdravstva RH, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb, RH
- 02/2018 – danas Poslijediplomski specijalistički studij “Razvoj lijekova”
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, RH
- 16.12.2024. Položen stručni ispit za magistre farmacije
Ministarstvo zdravstva RH, Hrvatska Ljekarnička Komora, Zagreb, RH
- 10/2008 – 05/2013 Magistra farmacije
Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2004. – 2008. Prirodoslovno – matematička gimnazija
Gimnazija Županja, Županja, RH

Osobne vještine i kompetencijeMaterinski jezik **Hrvatski**

Drugi jezici

Samoprocjena prema Zajedničkom europskom referentnom okviru)

Engleski**Njemački**

Razumijevanje		Govor		Pisanje
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C1	B2	B2	B2
A2	A2	A2	A2	A2

A1, A2 (temeljni korisnik); B1, B2 (razvojni korisnik); C1, C2 (iskusni korisnik)

Publikacije	
2014.	"Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation", Scientific Reports https://www.nature.com/articles/srep04347

Temeljna dokumentacijska kartica

Specijalistički rad

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Agregatna onečišćenja u monoklonskim protutijelima – imunogenost i izazovi u provjeri kakvoće

Katarina Portolan

SAŽETAK

Obzirom na strukturne i ostale karakteristike proteina, tijekom proizvodnje, čuvanja, transporta i primjene većine monoklonskih protutijela često dolazi do agregacije proteina. Ovisno o svojstvima, agregatna onečišćenja mogu značajno utjecati na kakvoću, djelotvornost i sigurnost monoklonskih protutijela, posebice u vidu izazivanja pojačane imunogenosti, što može dovesti do smanjenog djelovanja lijeka i značajnih nuspojava kod pacijenata. Razumijevanje procesa agregacije i razvijanje strategija smanjivanja nastanka agregatnih onečišćenja su bitni za minimiziranje nastanka imunogenog učinka monoklonskih protutijela. Isto tako, primjena sofisticiranih i specifičnih ortogonalnih analitičkih metoda za karakterizaciju i kvantifikaciju agregatnih onečišćenja te njihov daljnji razvoj osiguravaju odgovarajuću kontrolu kakvoće navedenih bioloških lijekova.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 114 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 127 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: monoklonska protutijela, agregacija proteina, imunogenost, agregatna onečišćenja

Mentor: **Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači:

1. prof. dr. sc. Biljana Nigović
2. izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček
3. dr. sc. Maja Lusina Kregar, znanstvena suradnica

Rad prihvaćen: 5.rujna 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb

Postgraduate thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Aggregates in monoclonal antibodies – immunogenicity and challenges in quality control

Katarina Portolan

Summary

Considering structural and other specific characteristics of proteins, protein aggregation occurs through upstream and downstream processes, formulation, drug delivery development process operations, as well as during storage and administration of monoclonal antibodies (mABs). Depending on their properties, aggregates could have a great impact on quality, efficacy and safety of biotherapeutics, especially in inducing immunogenicity, which could lead to decrease of biological activity and occurrence of the significant adverse effects in patients. A thorough understanding of possible protein aggregation pathways and use of sophisticated orthogonal methods for characterisation and quantification of aggregates could provide an adequate control of aggregation in mABs and contribute in development of mitigating strategies. Thus, the need to develop new technologies for quality control of aggregate impurities in mABs will become increasingly important in the future.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 114 pages, 12 figures, 2 tables and 127 references. Original is in Croatian language.

Keywords: monoclonal antibodies, protein aggregation, immunogenicity, aggregates

Mentor: **Gordana Maravić Vlahoviček, PhD**, *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers:

1. Prof. Biljana Nigović, PhD
2. Prof. Gordana Maravić Vlahoviček, PhD
3. Maja Lusina Kregar, PhD, Research Associate

The thesis was accepted: 5th September 2024