

# Dizajn i konzistentnost industrijske proizvodnje proteinskih lijekova

---

**Gračić, Nikolina**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2017**

*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:163:046610>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nikolina Gračić

**DIZAJN I KONZISTENTNOST INDUSTRIJSKE PROIZVODNJE PROTEINSKIH LIJEKOVA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

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

Specijalistički rad obranjen je dana 10. travnja 2017. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
2. izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
3. dr. sc. Vesna Eraković Haber, nasl. prof., Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet.

Rad ima 77 listova.

Ovaj specijalistički rad prijavljen je na poslijediplomskom specijalističkom studiju Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na uloženom trudu, stručnim savjetima i vodstvu tijekom pisanja ovog specijalističkog rada.

## Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je napraviti pregled trenutno dostupnih postupaka u industrijskoj proizvodnji proteinskih lijekova i definirati čimbenike koje je potrebno razmotriti prilikom postavljanja ponovljivog proizvodnog procesa. Postavljene su hipoteze da se odgovarajuće postavljenim proizvodnim procesom dobivaju željeni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu te da se odgovarajuće nadziranom i kontroliranim proizvodnim procesom kontinuirano dobivaju konzistentni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu.

Dostupna literatura pregledana je u širokom opsegu te su u radu sistematično iznesene opisane mogućnosti pojedinih procesa. Izneseni su i čimbenici za koje je opisano da imaju ili mogu imati utjecaj na ishod procesa. Utvrđeno je da je industrijska proizvodnja proteinskih lijekova složen proces koji je potrebno dizajnirati na način da se u svakom koraku procesa proizvodnje dobije produkt željenih karakteristika bez prisutnih onečišćenja ili s vrstom i količinom onečišćenja unutar definiranih zahtjeva. Dizajniranje proizvodnog procesa uglavnom podrazumijeva individualan pristup proizvodnji različitih proteina. Pritom se, osim karakteristika proteina i onečišćenja, u obzir uzimaju i željeni prinos procesa i troškovi proizvodnje. Pristup odabiru svakog koraka procesa, posebno koracima pročišćavanja, treba biti takav da se u obzir uzimaju drugi koraci procesa te upotrijebljena oprema i materijali. Veći broj koraka u procesu proizvodnje i korištenje sofisticiranih metoda analize čine proces proizvodnje proteinskih lijekova složenijim i skupljim od procesa proizvodnje lijekova malih molekula.

Zaključeno je da se odgovarajuće postavljenim, nadziranom i kontroliranim proizvodnim procesom dobivaju proteinski lijekovi prikladni za kliničku primjenu.

## Summary

The objective of this work was to provide an overview of currently available manufacturing possibilities in industrial protein production and an overview of parameters that should be taken into account when designing a repeatable production process. It was hypothesized that with appropriately designed production process it is possible to obtain products that are adequate for clinical application and that by using appropriately monitored and controlled process it is possible to continuously obtain consistent products that are adequate for clinical application.

Available literature was reviewed in broad extent and described possibilities were systematically presented in this work. Parameters with possible effect on process outcome were also described. It was found that industrial protein production is a complex process that has to be designed in a way that a product with defined characteristics is obtained at each step of production with type and content of impurities within defined limits. Design of production process usually means individual approach to production of different proteins. Characteristics of protein and impurities, required process yield and cost of production have to be taken into account during the design of protein production process. Other production steps and material and equipment used have to be taken into account when deciding on methods that will be used for production and purification. More production steps and use of sophisticated analytical methods makes protein production process more complex and costly than production of small molecule drugs.

In conclusion, appropriately designed, monitored and controlled production process continuously results with protein drug products adequate for clinical application.

## Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja.....	1
2. Cilj istraživanja.....	3
3. Materijali i metode – pregled saznanja o temi .....	4
3.1. Ekspresijski sustavi.....	4
3.1.1. Kreiranje vektora i transformacija stanice domaćina .....	9
3.1.2. Odabir stanice domaćina i optimiranje ekspresije.....	15
3.2. Proizvodni proces .....	23
3.2.1. Proizvodnja proteina .....	23
3.2.2. Izolacija i pročišćavanje proteina .....	34
3.2.3. Karakterizacija proteina .....	48
3.3. Formulacija proteinskog lijeka.....	50
3.4. Dobra proizvođačka praksa .....	52
4. Rasprava .....	57
5. Zaključci .....	63
6. Literatura.....	64
7. Životopis .....	76

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

Industrijska proizvodnja lijekova prije svega omogućava proizvodnju velikih količina različitih farmaceutskih oblika s djelatnim tvarima koje po svojoj strukturi mogu biti male molekule i makromolekule. Male molekule industrijski se proizvode kemijskim reakcijama u reaktorima nakon čega slijedi izdvajanje molekula procesima poput destilacije ili centrifugiranja. Proizvodnja makromolekula je proces koji se uvelike razlikuje od proizvodnje lijekova malih molekula. Makromolekule proteina proizvode se korištenjem složenih staničnih mehanizama i njihovim izdvajanjem iz bioloških izvora često visoko sofisticiranim metodama. Obje vrste molekula djelatnih tvari zatim se oblikuju u odgovarajući farmaceutski oblik ovisno o karakteristikama djelatne tvari i željenom putu primjene lijeka.

Liječenje proteinima počelo je iskorištavanjem prirodnih izvora i prirodnih oblika proteina. Početkom 1890-ih korištena je serumska terapija u liječenju difterije i tetanusa, pri čemu je antiserum dobiven iz imuniziranih zečeva i konja, a ranih 1920-ih počela je upotreba pročišćenog inzulina izoliranog iz gušterače svinja i krava. Daljnjim razvojem znanosti i otkrivanjem novih spoznaja, omogućena je proizvodnja rekombinantnih proteina. Prvi komercijalno dostupan rekombinantni protein koje je odobrilo regulatorno tijelo bio je inzulin proizveden u bakteriji *Escherichia coli* 1982. godine. Od tada su odobreni i koriste se mnogi rekombinantni lijekovi uključujući trombolitike, hormone, faktore rasta, interferone i protutijela (1). Danas javno dostupni sljedovi deoksiribonukleinskih kiselina (DNA) i glasničkih ribonukleinskih kiselina (mRNA), te slijed aminokiselina svakog proteina u ljudskom tijelu, omogućavaju jednostavniji pristup kreiranju rekombinantnih proteina. Sljedovi DNA i mRNA te sljedovi aminokiselina mogu se pronaći u biološkim bazama podataka poput Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) i Europski laboratorij za molekularnu biologiju (engl. *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL) (2).

Biofarmaceutska industrija je u posljednjih trideset godina na tržište stavila više od 220 bioloških lijekova iz biotehnoške proizvodnje s prometom od 70 – 80 milijardi američkih dolara godišnje (3). Većina ovih komercijalno dostupnih proteina proizvodi se u stanicama sisavaca. Međutim, za proizvodnju se koriste i stanični mehanizmi drugih tipova stanica poput bakterija,



kvasaca i algi. Godine 2012. nadležna regulatorna tijela odobrila su prvi protein proizveden u biljnim stanicama za stavljanje na tržište i kliničku primjenu. Spomenuti protein proizvodi kompanija Protalix BioTherapeutics (Izrael) u stanicama mrkve i stavlja na tržište gotov proizvod pod nazivom Elelys, a radi se o rekombinantnom obliku ljudske glukocerebrozidaze, indicirane u liječenju Gaucherove bolesti (4). Proteini se, osim u staničnim kulturama, mogu proizvoditi u živim organizmima. Nadležna tijela Europske unija odobrila su 2006. godine, a Sjedinjene Američke Države 2009. godine, prvi rekombinantni protein proizveden i izoliran iz mlijeka transgenične životinje. Radi se o antitrombinu III (ATryn<sup>®</sup>, GTC Biotherapeutics), koji je proizveden i izoliran iz mlijeka koza. Odobrenje nadležnog tijela podrazumijeva prethodnu uspješnu procjenu procesa proizvodnje i ishoda kliničkih ispitivanja prema važećim i na znanstvenim dokazima utemeljenim smjernicama.

Nadležna tijela Europske Unije i Sjedinjenih Američkih Država odobrila su velik broj biosličnih lijekova u zadnjih desetak godina. Biosličan lijek je dokazano sličan inovativnom proteinskom lijeku u pogledu kakvoće, biološke aktivnosti, sigurnosti primjene i djelotvornosti. Dolaskom biosličnih lijekova na tržište sniženi su troškova liječenja ozbiljnih bolesti te zdravstveni sustavi mogu većem broju pacijenata osigurati pristup potrebnim lijekovima i kontinuiranom liječenju.

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je napraviti pregled trenutno dostupnih postupaka u industrijskoj proizvodnji proteinskih lijekova i definirati čimbenike koje je potrebno razmotriti prilikom postavljanja ponovljivog proizvodnog procesa.

Industrijska proizvodnja proteinskih lijekova podrazumijeva skup i slijed složenih i međusobno različitih procesa. Produkt tih procesa treba biti farmaceutski oblik proteinskog lijeka koji će dati željeni klinički odgovor u pogledu djelotvornosti i sigurnosti lijeka. Stoga se postavlja hipoteza da se odgovarajuće postavljenim proizvodnim procesom dobivaju željeni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu.

Regulatorna tijela procjenjuju djelotvornost, sigurnost i kakvoću proteinskog lijeka proizvedenog određenim proizvodnim procesom i temeljem procjene daju odobrenje za stavljanje određenog proteinskog lijeka u promet. Industrijska proizvodnja proteinskih lijekova podrazumijeva višestruko ponavljanje postavljenog procesa proizvodnje radi dobivanja velikih količina proteinskog lijeka i osiguravanja kontinuiteta opskrbe lijekom. Nadležna regulatorna tijela ne procjenjuju kritički svaku seriju lijeka, već je proizvođač dužan osigurati da nema takvih varijacija u procesu proizvodnje koje će dovesti do promjena u pogledu djelotvornosti, sigurnosti i kakvoće lijeka. Stoga se postavlja hipoteza da se odgovarajuće nadziranim i kontroliranim proizvodnim procesom kontinuirano dobivaju konzistentni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu.

### 3. Materijali i metode – pregled saznanja o temi

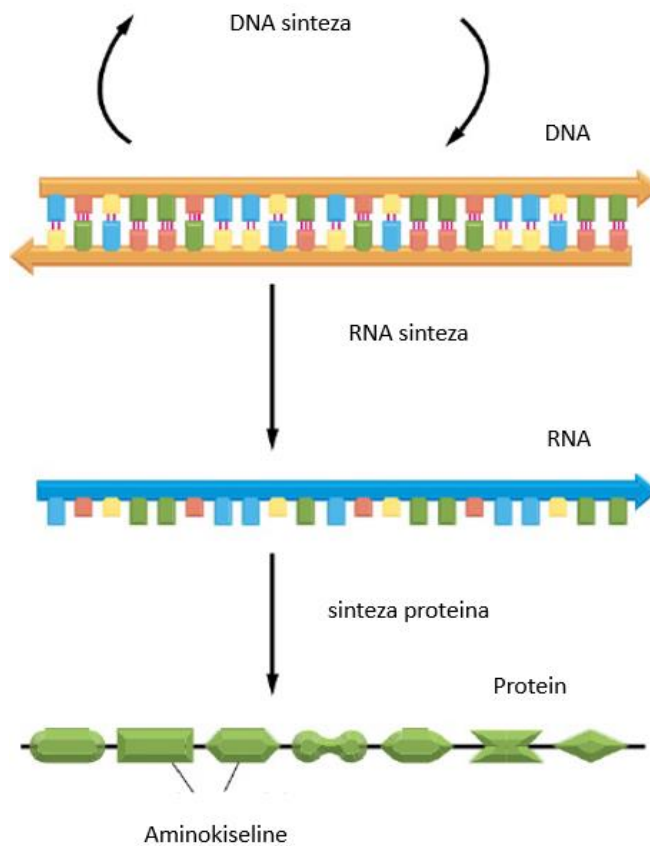
Industrijska proizvodnja proteinskih lijekova podrazumijeva skup međusobno različitih procesa koji uključuju kreiranje ekspresijskog sustava i optimiranje ekspresije, odabir odgovarajućeg procesa proizvodnje, izolacije i pročišćavanja proteina te oblikovanje farmaceutskog oblika proteinskog lijeka. Dostupna literatura za svaku vrstu procesa pregledana je u širokom opsegu te su u ovome poglavlju sistematično iznesene opisane mogućnosti pojedinih procesa. Izneseni su i čimbenici za koje je opisano da imaju ili mogu imati utjecaj na ishod procesa.

Pretraženi su dostupni znanstveni, stručni i pregledni radovi. Direktive i znanstvene smjernice preuzete su sa mrežnih stranica Europske komisije, Europske unije, Europske agencije za lijekove (EMA) i Internacionalne konferencije za harmonizaciju (ICH). Pretražene su baze podataka Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) radi utvrđivanja trenutno odobrenih biosličnih lijekova.

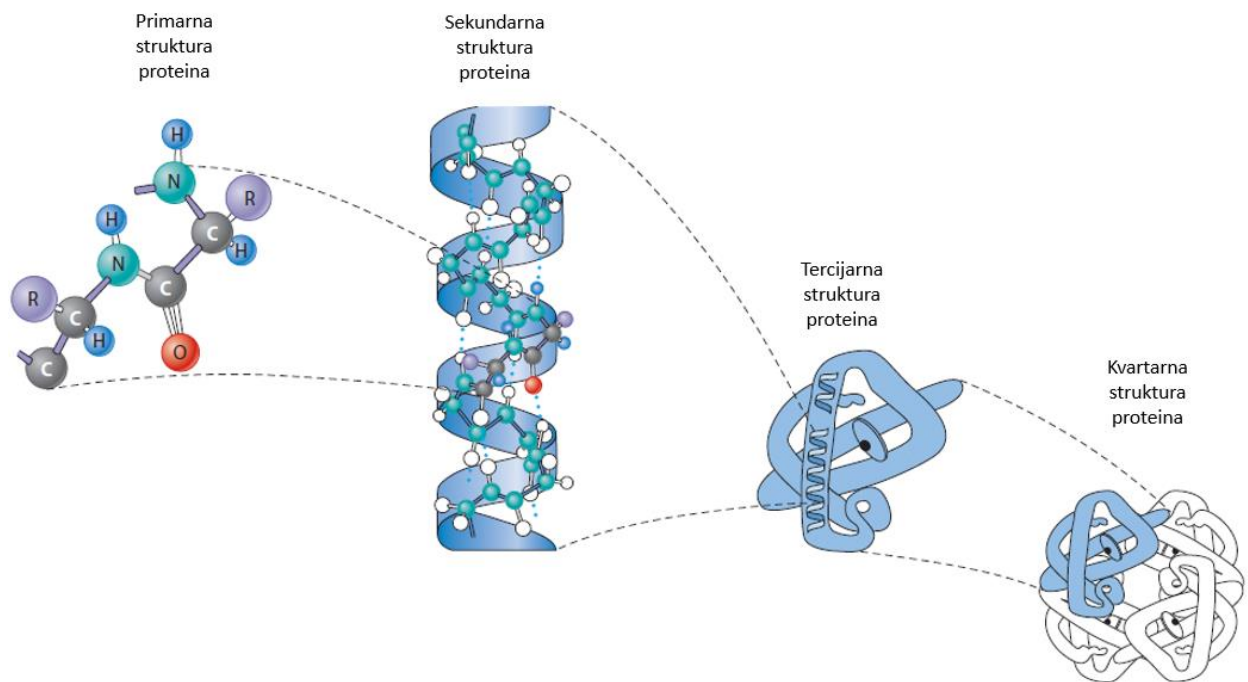
#### 3.1. Ekspresijski sustavi

Proteinski lijekovi proizvode se korištenjem složenog staničnog mehanizma živih stanica. Proces sinteze proteina u stanicama opisan je kao središnja dogma molekularne biologije (Francis Crick, 1958. godine) (Slika 1). Središnja dogma molekularne biologije i postranslacijske modifikacije osnova su industrijske proizvodnje proteinskih lijekova. Proteini su makromolekule za koje je karakteristična velika složenost i raznolikost strukture (Slika 2, Tablica 1). Dok su male molekule zbog svoje veličine i jednostavne strukture manje zahtjevne za kemijsku sintezu i oblikovanje, veličina, složenost i nestabilnost proteinske strukture trebaju biti uzeti u obzir prilikom postavljanja procesa proizvodnje. Potrebno je dobro poznavanje strukture željenog proteina, a time i njegovih svojstava, da bi se prilikom postavljanja procesa proizvodnje izbjegle promjene strukture koje mogu imati neželjene kliničke ishode. Svojstva proteina ovise o točnoj poziciji svake aminokiseline i lokaciji svakog bočnog lanca u trodimenzionalnoj strukturi. Prosječna svojstva proteina mogu biti procijenjena iz aminokiselinskog sastava. Korištenjem vrijednosti konstante disocijacije ( $K_a$ ) bočnih lanaca i jednog amino i karboksilnog kraja, moguće je izračunati

naboj proteina. Ostali molekularni parametri koji mogu biti procijenjeni temeljem aminokiselinskog sastava su izoelektrična točka (pI), molekulska masa i hidrofobnost.



Slika 1 – Prikaz središnje dogme molekularne biologije (preuzeto i prilagođeno iz 5) – Osnovna informacija za sintezu proteina nalazi se u redosljed u sparenih baznih parova u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA), koji se prepisuju u ribonukleinsku kiselinu (RNA). Adenin (A) formira bazni par s timinom (T) u DNA, koji se prepisuje u uracil (U) u RNA, a guanin (G) formira bazni par s citozinom (C). Informacija se prepisuje iz DNA u RNA pomoću RNA-polimeraza i transkripcijskih faktora. Sljedeći je korak prevođenje mRNA molekule u protein. Proces počinje vezanjem mRNA molekule na ribosom koji čita mRNA kao slijed od po tri nukleotida (kodona). Kompleksi specifičnih proteina (inicijacijskih i elongacijskih faktora) približavaju transportnu ribonukleinsku kiselinu (tRNA) u kompleks ribosom-mRNA. Svaka se tRNA antikodonom spaja s baznim parom na mRNA dodajući time aminokiselinu u slijed kodiran genom. Genetički kod sastoji se od 64 kodonska slijeda, od kojih 61 kodon kodira za 20 aminokiselina. 3 kodona koja ne kodiraju za aminokiselinu označavaju mjesto završetka transkripcije i nazivaju se STOP kodonima. Translacija počinje na kodonu AUG, koji kodira za metionin i završava s jednim od STOP kodona UAA, UGA ili UAG.

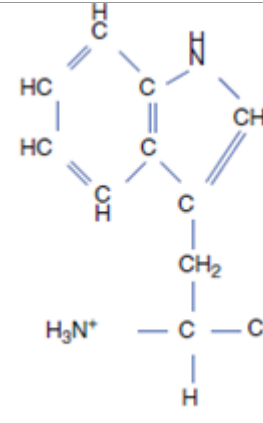


Slika 2 – Struktura proteina (preuzeto i prilagođeno iz 6) – Smatanje proteina u konačnu strukturu temelji se na slijedu amiokiselina. One su peptidnim vezama povezane u polipeptid i čine primarnu strukturu proteina. Stvaranjem vodikovih veza između bočnih ogranaka aminokiselina nastaju sekundarne strukture, od kojih su najčešće  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča. Peptidne veze među aminokiselinama su jednake, tako da su tercijarne strukture prije svega određene interakcijama između bočnih lanaca aminokiselina. Interakcije među bočnim lancima temelje se na hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama te disulfidnim i vodikovim vezama, i dovode do smatanja polipeptidnog lanca u najstabilnije ili energetski najpovoljnije stanje. Povezivanjem više istih ili različitih tercijarnih jedinica nastaje kvartarna struktura proteina.

Tablica 1 – Struktura aminokiselina (preuzeto i prilagođeno iz 7).

Struktura	Naziv	Struktura	Naziv
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Glicin (Gly, G)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Alanin (Ala, A)
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Valin (Val, V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Izoleucin (Ile, I)
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Leucin (Leu, L)	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ // \quad   \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Fenilalanin (Phe, F)
$\begin{array}{c} \quad \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Prolin (Pro, P)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{S} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$	Metionin (Met, M)

$  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{O}^- \\  \parallel \quad   \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Asparaginska kisleina (Asp, D)</p>	$  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{O}^- \\  \parallel \quad   \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Glutaminska kisleina (Glu, E)</p>
$  \begin{array}{c}  \text{N}^+\text{H}_3 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Lizin (Lys, K)</p>	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\    \\  \text{C} = \text{N}^+\text{H}_2 \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Arginin (Arg, R)</p>
$  \begin{array}{c}  \text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Serin (Ser, S)</p>	$  \begin{array}{c}  \text{HO} \quad \text{CH}_3 \\  \diagdown \quad / \\  \text{CH} \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Treonin (Thr, T)</p>
$  \begin{array}{c}  \text{OH} \\    \\  \text{C} \\  / \quad \backslash \\  \text{HC} \quad \text{CH} \\     \quad   \\  \text{HC} \quad \text{CH} \\  \backslash \quad / \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Tirozin (Tyr, Y)</p>	$  \begin{array}{c}  \text{HN} \quad \text{CH} \\    \quad    \\  \text{HC} \quad \text{N}^+\text{H} \\  \backslash \quad / \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	<p>Histidin (His, H)</p>

$  \begin{array}{c}  \text{SH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	Cistein (Cys, C)	$  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{NH}_2 \\  \diagdown \quad / \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	Asparagin (Asn, N)
$  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{NH}_2 \\  \diagdown \quad / \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	Glutamin (Gln, Q)		Triptofan (Trp, W)

### 3.1.1. Kreiranje vektora i transformacija stanice domaćina

Prvi korak u procesu industrijske proizvodnje proteinskih lijekova podrazumijeva kreiranje vektora za ekspresiju željenog proteina. Niže je opisan postupak koji se koristi za kreiranje vektora, a u osnovi podrazumijeva dobivanje željenog slijeda DNA i njegovo kloniranje u vektor.

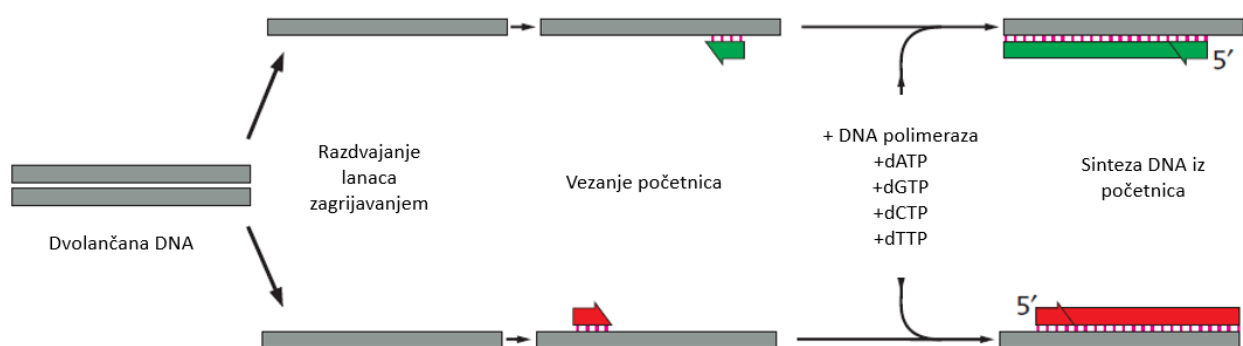
Iz tkiva koje ekspirira željeni protein izolira se mRNA i prevodi u komplementarnu DNA (cDNA) korištenjem reverzne transkriptaze u prisutnosti jednolančanih oligonukleotida koji sadrže oko 20 timidina (oligo-dT). Oligo-dT se veže na poli-A rep RNA i reverzna transkriptaza spaja deoksiribonukleotide komplementarne mRNA na 3`-kraj rastuće komplementarne DNA. Na ovaj se način dobiva knjižnica cDNA, koja predstavlja sve mRNA eksprimirane u nekoj stanici ili tkivu. Komplementarna DNA se zatim umnaža pomoću lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Slika 3) (2).

Lančana reakcija polimeraze koristi DNA kalup, dvije početnice, četiri vrste deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),  $\text{Mg}^{2+}$  i termostabilnu DNA-polimerazu. DNA-



polimeraza dodaje slobodne nukleotide na 3'-kraj novnonastajućeg lanca čime se lanac produljuje u 5' → 3' smjeru. DNA-polimeraza može dodati nukleotid samo na postojeći slobodan 3'-OH kraj, stoga je potrebna početnica na koju se može dodati prvi nukleotid. PCR početnice su jednolančani oligonuklotidi koji sadrže 20-30 nukleotida i koji su komplementarni krajevima ciljane DNA koju želimo umnožiti. PCR se obično provodi u 30-ak ciklusa. Svaki ciklus ima tri koraka. U prvom se DNA denaturira na oko 94°C i dvolančana DNA prelazi u jednolančanu DNA. U drugom se koraku početnica veže na jednolančanu DNA na oko 60°C. U zadnjoj fazi na 72°C dolazi do produljivanja lanca. Broj molekula DNA se u teoriji udvostručuje sa svakim ciklusom, čim PCR od 30 ciklusa daje oko  $2^{30}$  (oko  $10^9$ ) molekula DNA. U praksi se prema kraju procesa, produktivnost ciklusa smanjuje.

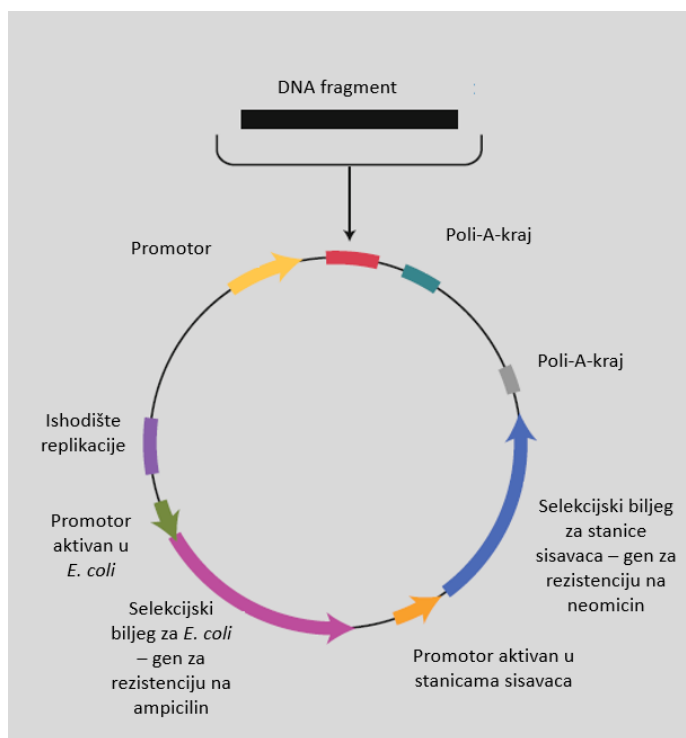
Različite termostabilne DNA-polimeraze imaju različite mogućnosti popravka pogreške, stoga se koriste enzimi koji provjeravaju produljivanje lanca u 3' → 5' smjeru (2). Taq-polimeraza, enzim bez 3' → 5' egzonukleazne aktivnosti, u prosjeku radi 10 puta više pogrešaka od Pfu-polimeraze s kontrolnom aktivnosti, koja uvodi 1 krivi nukleotid na svakih  $10^6$  baznih parova. Zbog provođenja kontrolne aktivnosti, Pfu polimeraza dodaje 1000 nukleotida u minuti na rastući DNA lanac i time je sporija, odnosno manje procesivna od Taq-polimeraze koja dodaje 6000 nukleotida u minuti.



Slika 3 – Lančana reakcija polimeraze (preuzeto i prilagođeno iz 5).

Dobivenu željenu DNA potrebno je klonirati u vektor (Slika 4). Jedan od načina je kloniranje koje koristi svojstvo Taq-polimeraze da dodaje adenozin (A) na 3'-kraj PCR produkta (TA kloniranje; terminalna aktivnost transferaze) (2). Takav PCR produkt zatim se pomoću DNA ligaze uvodi u plazmid s 5'-timidinskim privjeskom. PCR produkti dobiveni uz pomoć DNA-polimeraze s

kontrolnom aktivnošću imaju tupe krajeve, odnosno nemaju 3'-A privjesak (2). Međutim, takvi se PCR fragmenti mogu inkubirati s Taq-polimerazom i dATP-om radi dodavanja A-kraja. PCR fragment s tupim krajevima također se može direktno klonirati u linearizirani plazmid s dva tupa kraja. Efikasnost kloniranja tupih krajeva je manja od one kod tzv. TA-kloniranja. Nedostatak oba načina kloniranja je nemogućnost kontroliranja smjera ugradnje PCR fragmenata. PCR produkti se također mogu klonirati dodavanjem jedinstvenih mjesta prepoznavanja za restrikcijske enzime na oba kraja konačnog produkta – primjerice dodavanjem tih mjesta na 5'-kraj PCR početnice i time je moguće klonirati gen u željenoj orijentaciji naspram promotora i ostalih regulatornih sljedova u vektoru koji omogućuju učinkovitu ekspresiju.



Slika 4 – Shematski prikaz ekspresijskog plazmida za stanice sisavaca (preuzeto i prilagođeno iz 2).

Nakon kloniranja PCR fragmenta u vektor potrebno je plazmid, koji sadrži konstrukt od interesa i selekcijski biljeg (gen za rezistenciju na antibiotik), unijeti u *E. coli* procesom transformacije. Najviše se koriste metoda s kalcijevim kloridom uz toplinski šok i elektroporacija (izlaganje bakterija kratkom i snažnom električnom pulsom) (2). Sve metode dovode do otvaranja

kanala u membranama bakterijske stanice kroz koji plazmid ulazi u stanicu. Bakterija se zatim nasađuje na agarnu podlogu s antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C. Preživjet će samo one bakterije koje sadrže plazmid s genom za rezistenciju na antibiotik. Zatim se alikvoti određenog broja prekonoćnih kolonija uzgajaju preko noći u tekućem mediju na 37°C. Iz tih se kultura mogu izolirati plazmidi. Sljedeći je korak potvrda sadrži li dobiveni plazmid insert i ovisno o metodi kloniranja, koja mu je orijentacija s obzirom na promotor ekspresije rekombinantnog proteina. Orijentacija se, primjerice, može odrediti korištenjem restriksijskog enzima koji će zarezati plazmid na jednom mjestu i drugog restriksijskog enzima koji će zarezati na drugom mjestu unutar inserta. Orijentacija fragmenta se zatim određuje agaroznom gel elektroforezom, odnosno usporedbom fragmenta s odgovarajućim standardom s obzirom na molekulsku masu.

Sekvenciranjem DNA je potrebno potvrditi da je slijed nukleotida u fragmentu ispravan (2). U novije doba razvijeno je više različitih metoda sekvenciranja zasnovanih na različitim principima, no za provjeru kloniranja još se uvijek vrlo često koristi Sangerova metoda koja upotrebljava dideoksinukleotid trifosfate (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) kojima nedostaje 3'-OH skupina, nužna za stvaranje veze između dvaju nukleotida. Svaki dideoksinukleotid je označen različitom fluorescentnom bojom. Ugradnjom ddNTP-a zaustavlja se rast lanca te se po završetku PCR procesa dobiva smjesa fragmenata različite duljine. Razdvajanjem dobivenih lanaca temeljem njihove molekulske mase kapilarnom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu koji omogućava razlučivanje u razlici fragmenata od samo jednog nukleotida dobiva se slijed fluorescentnih signala i tako određuje slijed nukleotida.

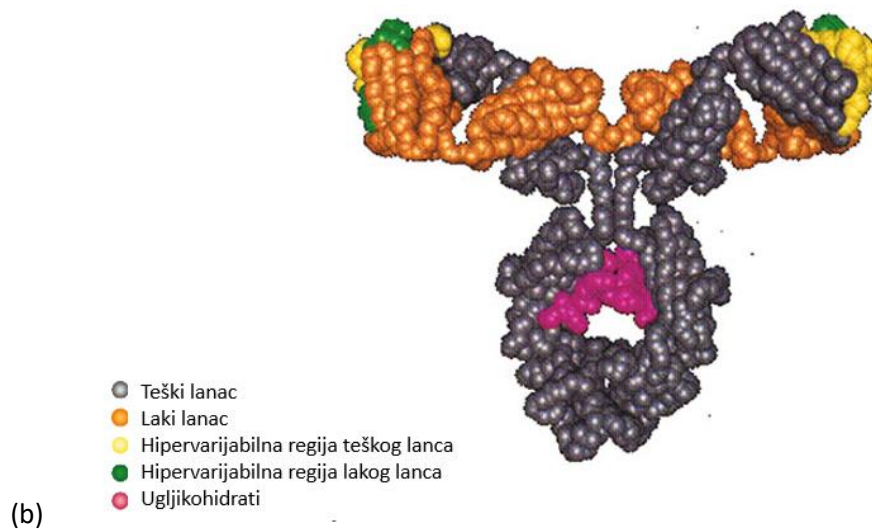
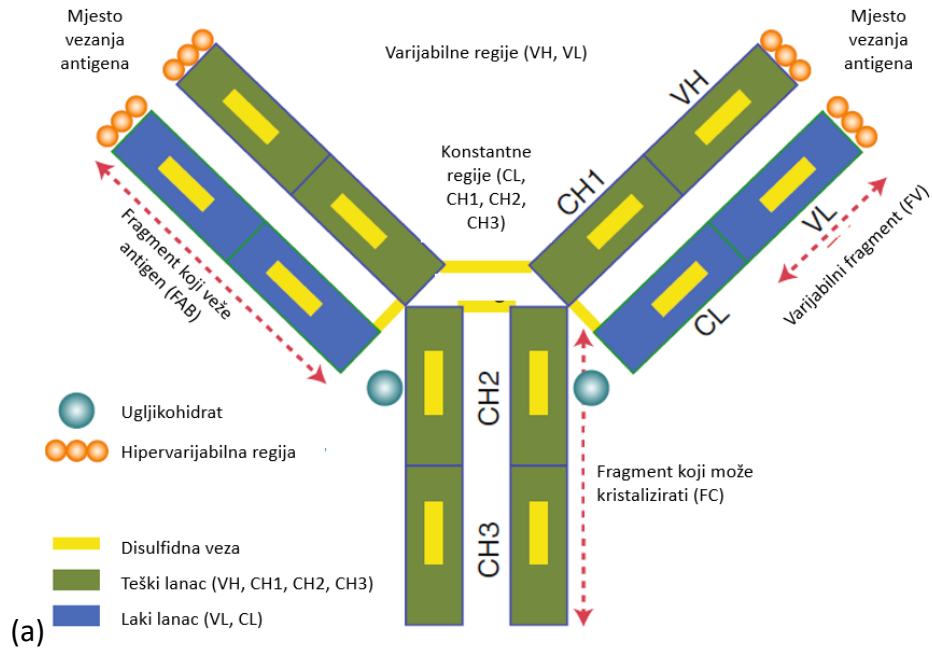
Uvođenje DNA u stanicu sisavaca naziva se transfekcija. Postoji nekoliko metoda za uvođenje DNA u staničnu liniju sisavaca (2). Najčešće se plazmidna DNA u stanicu unosi kao kompleks s kationskim lipidima (npr. lipofektamin) ili s polimerima (npr. polietilenimini). DNA se može unijeti vezanjem pozitivno nabijenog agregata na negativno nabijenu staničnu membranu i endocitozom. Plazmidna DNA izlazi iz endosoma i tijekom diobe stanica, kada jezgrena membrana nije formirana, ulazi u jezgru stanice, gdje može početi sinteza mRNA. DNA se u citosol može uvesti i elektroporacijom (2). Korištenjem električnog impulsa formiraju se male pore u staničnoj membrani kroz koje plazmidna DNA ulazi u stanicu.

Transfekcija dovodi do privremene ekspresije unesenog gena. Uvedeni plazmidi se reduciraju kao posljedica stanične diobe i razgradnje. Međutim, moguća je i stabilna transfekcija stanice kada se plazmid integrira u genom stanice domaćina (2). Da bi se to postiglo, u ekspresijski vektor se uvodi selekcijski gen, koji stanicama sa stabilnom transfekcijom daje prednost pri selekciji. Samo one stanice koji imaju integriran selekcijski marker (i time, ali ne i uvijek, gen od interesa) u genom će preživjeti. Većina ekspresijskih plazmida u stanicama sisavaca kao selekcijski marker sadrže gen za rezistenciju na neomicin (Neo<sup>r</sup>). Ovaj gen kodira za protein koji neutralizira toksični lijek geneticin (G418). Cijeli proces selekcije traje oko 2 tjedna i rezultira kulturom tkiva s nekoliko kolonija. Svaka je kolonija potomak jedne stanice sa stabilnom transfekcijom. Zatim se svaka individualna kolonija izolira i dalje uzgaja. Sljedeći je korak kvantifikacija proizvodnje rekombinantnog proteina iz dobivenih staničnih kultura i odabir onih s najvećim prinosom.

Transfekcija stanica sisavaca je u usporedbi s transformacijom *E. coli* vrlo neučinkovit proces koji zahtijeva velike količine plazmidne DNA. Integracija DNA u genom je vrlo rijedak događaj – od 10<sup>7</sup> stanica sisavaca, dobije se 10<sup>2</sup> klonova sa stabilnom ekspresijom (2).

Mnogi proteinski lijekovi trenutno dostupni na tržištu su imunoglobulini, odnosno monoklonska protutijela (Slika 5). Monoklonska protutijela ili dijelovi monoklonskih protutijela mogu biti proizvedeni rekombinantnom DNA tehnologijom u mikroorganizmima poput *E. coli* ili kvasaca (8), no za proizvodnju humaniziranih monoklonskih protutijela najčešće se koriste stanice jajnika kineskog hrčka (CHO stanice, engl. *Chinese Hamster Ovary Cells*) (9). Klasični način proizvodnje monoklonskih protutijela počinje imunizacijom laboratorijske životinje pročišćenim ljudskim proteinom, na koji protutijelo treba biti usmjereno. U većini se slučajeva koriste miševi. Proces imunizacije traje nekoliko tjedana, zatim se miševima uklanja slezena i izoliraju limfociti te se limfociti spajaju s mijeloma stanicama upotrebom polietilenglikola. Hibridoma stanice imaju svojstva limfocita (proizvodnja protutijela) i svojstva mijeloma stanične linije (mogućnost beskonačne diobe). Kako bi se hibridoma stanice izdvojile od ishodnih limfocita i mijeloma stanica, stanice se uzgajaju u selekcijskom mediju koji sadrži hipoksantin, aminopterin i timidin (HAT medij). Mijeloma stanice nemaju aktivni enzim hipoksantinguanin fosforibozil-transferazu koji je nužan za sintezu nukleinskih kiselina, ali još uvijek imaju mogućnost sinteze purina *de novo*. Izlaganjem mijeloma stanica aminopterinu inhibira se sinteza purina *de novo* i stanice ne

preživljavaju. Odvajanje limfocita nije nužno jer oni ne preživljavaju dugo u staničnoj kulturi. Nakon tretmana polietilenglikolom, stanice se razrjeđuju i nanose na nekoliko podloga. Nakon približno dva tjedna vidljivi su individualni klonovi. Svaki klon potomak je jedne hibridoma stanice i proizvodi jednu vrstu protutijela stoga se takvo protutijelo naziva monoklonsko protutijelo.



Slika 5 – Prikaz strukture imunoglobulina (a) i primjer monoklonskog protutijela efalizumab (Raptiva®) (b) (preuzeto i prilagođeno iz 10).

Sljedeći je korak izoliranje hibridoma stanica iz individualnih klonova i uzgoj u odvojenim jažicama (pločice s 96 jažica). Upotrebom odgovarajućeg testa, poput enzimskog imunotesta (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), dobiveni se medij može pretraživati u potrazi za protutijelom koje se veže na određeni antigen. Ovako dobivena mišja monoklonska protutijela ne mogu se koristiti za liječenje ljudi jer je aminokiselinski slijed značajno drugačiji od ljudskog i izaziva imunološke reakcije. Da bi se mišja protutijela učinila manje imunogenima, konstantnu regiju imunoglobulina potrebno je zamijeniti odgovarajućim slijedom ljudskog proteina. Tada se dobiju kimerne i humanizirane protutijela. PCR metodom umnoži se odgovarajući fragment koji sadrži varijabilne sljedove za humanizirane protutijela i klonira se u ekspresijski vektor koji kodira konstantnu regiju imunoglobulina G i signalni peptid. Signalni peptid nužan je za glikozilaciju. Zatim se ekspresijski konstrukt koristi za stabilnu transfekciju CHO stanica. Dobiveni se klonovi testiraju na proizvodnju protutijela te se klonovi s najvećim proizvodnim kapacitetom selektiraju za daljnju upotrebu.

### **3.1.2. Odabir stanice domaćina i optimiranje ekspresije**

Proteinski lijekovi proizvode se u ekspresijskim sustavima gdje kao domaćini služe prokariotske ili eukariotske stanice (bakterije, kvasci, gljive, biljke, stanice insekata, stanice sisavaca), biljni organizmi ili transgenične životinje. Odabir odgovarajućeg domaćina prije svega ovisi o prirodi i porijeklu proteina od interesa. Ostali elementi koji utječu na odabir ekspresijskog sustava su funkcija proteina, količina proteina koju je potrebno proizvesti, cijena te potreba prisutnosti ili odsutnosti pojedinih posttranslacijskih modifikacija. Posttranslacijske modifikacije su specifične za pojedine stanice ili vrste. U većini je slučajeva protein koji se proizvodi stran stanici domaćina pa kažemo da se radi o heterolognoj ekspresiji proteina (2). Najčešće korištene stanice domaćina za proizvodnju proteina su *Saccharomyces cerevisiae* (15%), *E. coli* (31%) i stanice sisavaca (43%) (11).

## Bakterije

Uspostavljeni prokariotski ekspresijski sustavi uspješno upotrijebljeni u heterolognoj industrijskoj ekspresiji proteina uključuju *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces spp.* i *Corynebacterium glutamicum* (12).

*E. coli* najkorištenija je bakterijska stanica za ekspresiju rekombinantnih proteina. Najveća prednost ove bakterije njezina je mogućnost brzog rasta u fermentorima uz upotrebu jednostavnog medija. *E. coli* je odgovarajući domaćin za ekspresiju proteina molekulske mase manje od 100 kDa, ako postranslacijske modifikacije nisu neophodne za odgovarajuće formiranje strukture proteina i njegovu biološku aktivnost (13).

*E. coli*, kao prokariotskoj stanici, nedostaju sekrecijske mogućnosti zbog kojih je većina eksprimiranih proteina u netopljivom obliku te može doći do formiranja netopljivih agregata u citoplazmi koji se nazivaju inkluzijskim tijelima. Prednosti formiranja inkluzijskih tijela su mogućnost ekspresije citotoksičnih proteina bez oštećivanja stanice domaćina te mogućnost zaštite proteina od interesa u inkluzijskom tijelu od razgradnje proteazama. Negativna strana inkluzijskih tijela može biti neuspješan proces postekspresijske denaturacije i formiranja strukturno ispravnog proteina. Prilikom kloniranja moguće je na krajeve ciljanog gena dodati sljedove koji kodiraju za visokotopljive polipeptide s visokom razinom ekspresije kako bi se povećala topljivost i ispravno smatanje rekombinantnog proteina. Ovaj se pristup pokazao uspješnim te neki od komercijalno dostupnih polipeptida za ovu svrhu uključuju: tioredoksin, protein koji veže maltozu (*engl. Maltose Binding Protein, MBP*), glutation-S-transferaza (GST), domena B1 streptokoknog proteina G i HaloTag (13).

Kultivacija na niskim temperaturama predstavlja dokazani način poboljšanja topljivosti proteina i povećanja ekspresije heterolognog proteina u *E. coli*. Komercijalno dostupan vektor pCold (proizvođača Takara, Japan) često se koristi za heterolognu ekspresiju u *E. coli*. Vektor pCold sadrži promotor CspA koji se snažno aktivira spuštanjem temperature na 15°C. Stoga je moguće klonirati gen od interesa pod kontrolu promotora CspA i potaknuti ekspresiju heterolognog proteina kultivacijom na niskoj temperaturi (13).

*E. coli*, kao i većina gram-negativnih bakterija, sadrži potentne imunostimulacijske molekule lipopolisaharide odnosno endotoksine. Endotoksini mogu kod sisavaca inducirati pirogeni odgovor i septički šok. Kontaminirajući lipopolisaharidi stoga moraju biti uklonjeni iz rekombinantnih lijekova. Uklanjanje endotoksina iz rekombinantnih lijekova i određivanje razine endotoksina, radi potvrde da su vrijednosti ispod određene granice, podrazumijeva uvođenje dodatnih koraka u proces proizvodnje i povećanje troškova same proizvodnje. Umjesto uklanjanja endotoksina iz proteinskog lijeka, moguće je proizvoditi proteine u sojevima *E. coli* koji ne sadrže endotoksine kao što su K-12 i BL21 (DE3) (14). Navedeni sojevi nemaju agoniste signalnog puta hTLR4/MD-2 kojima se aktivira proizvodnja normalnog endotoksički aktivnog lipida, ali zadržavaju vijabilnost predominantnom sintezom lipida IV<sub>A</sub>. Lipid IV<sub>A</sub> je endotoksički inaktivni prekursor lipida A. Sam dizajn sojeva onemogućava da se mutacijama jednostavno povрати sposobnost sinteze normalnog lipopolisaharida ili endotoksički aktivnog lipida IV<sub>A</sub>.

*C. glutamicum* je gram-pozitivna nepatogena bakterija koja ne producira endotoksine i može izlučivati ispravno smotane funkcionalne proteine u medij. *C. glutamicum* ima minimalnu proteaznu aktivnost, što joj daje veliku prednost u proizvodnji proteina osjetljivih na proteaze. U usporedbi s *E. coli*, *C. glutamicum* ima manju transformacijsku efikasnost i tek nekoliko komercijalno dostupnih ekspresijskih vektora (12).

## Kvasci

Kvasci su jednostanični eukarioti koji mogu brzo rasti na jednostavnom mediju u velikim fermentorima te omogućavaju određene posttranslacijske modifikacije (15). Najupotrebljavaniji kvasac u industrijskoj proizvodnji proteinskih lijekova je *S. cerevisiae* i izvor je polovice svjetske proizvodnje inzulina (16). Nekoliko nekonvencionalnih vrsta kvasaca sve se više koristi u industrijskoj proizvodnji: *Hanacsenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* i *Yarrowia lipolytica* (15). *P. pastoris* posjeduje mogućnost brzog rasta na relativno jeftinom mediju do velike gustoće stanica upotrebom jakog promotora AOX koji se inducira metanolom. *P. pastoris* omogućava ekspresiju velikih količina proteina: od 22 g/L za unutarstanične proteine do 14,8 g/L za sekretorne proteine, a prema nekim izvorima moguće je proizvesti i do 30 g/L rekombinantnog proteina (17, 18, 19). Do velike gustoće stanica mogu rasti



i kulture kvasaca *H. polymorpha* i *K. lactis*. U *K. lactis* ekspresija heterolognog proteina regulirana je promotorom LAC4 koji se inducira dodatkom galaktoze u kultivacijski medij (13). *H. polymorpha* može rasti na temperaturama do 45°C te je otporna na teške metale i oksidativni stres. *H. polymorpha* i *Y. lipolytica* pokazuju manju hipermanozilaciju u usporedbi sa *S. cerevisiae* te ne sintetiziraju imunogenične  $\alpha$ -1,3-vezane manozne ostatke. *Y. lipolytica* može rasti u hidrofobnom mediju, odnosno može metabolizirati trigliceride, masne kiseline i alkane. *S. pombe* ima mnoge stanične procese slične onima kod viših eukariota, uključujući prekranje mRNA, kontrolu staničnog ciklusa, mjesto početka transkripcije te posttranslacijske modifikacije, pri čemu je galaktoza prisutna i kod O- i N-vezanih glikana (13).

### Kulture stanica sisavaca

Stanice sisavaca mnogo je teže uzgojiti u kulturi, u usporedbi sa stanicama bakterija i kvasca, zbog duljeg trajanja procesa rasta i diobe i kompleksnijeg medija za uzgoj (9). Stanice sisavaca dijele se približno svaka 24 sata, dioba stanica kod bakterija traje otprilike 20 minuta, a kod kvasca 30 minuta. Također, stanice sisavaca zahtijevaju skupi medij za rast i najčešće zahtijevaju goveđi fetalni serum kao izvor faktora rasta. Od stanica sisavaca najviše se koriste stanice jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary Cells*, CHO), stanice mišjeg mijeloma NS0 ili SP2/0, stanice bubrega mladoga hrčka (engl. *Baby Hamster Kidney Cells*, BHK) i stanice bubrega humanog embrija (engl. *Human Embryonic Kidney Cells*, HEK 293) (15).

Najveća prednost kultura stanica sisavaca su posttranslacijske modifikacije, jer su najbližnje modifikacijama koje se odvijaju u ljudskim stanicama. Važne posttranslacijske modifikacije su formiranje disulfidnih veza između dvaju cisteina te glikozilacija. Disulfidne veze važne su za stabiliziranje tercijarne strukture proteina. Glikozilacija podrazumijeva kovalentno vezanje oligosaharida na asparagin (N-vezana) i serin ili treonin (O-vezana). Prisutna je kod približno 70 % proteina na tržištu, uključujući monoklonska protutijela (9). Oligosaharidni dio proteinskog lijeka utječe na farmakološka svojstva proteina, uključujući stabilnost, topljivost, bioraspoloživost, aktivnost *in vivo*, farmakokinetiku i imunogenost. Ostale potencijalne posttranslacijske modifikacije su oksidacija, fosforilacija, sulfatacija, lipidacija i deaminacija.

N-vezana glikozilacija se odvija kod svih eukariota u lumenu endoplazmatskog retikuluma i u Golgijevom aparatu te kod nekih bakterija. Svi N-vezani oligosaharidi imaju istu jezgru sačinjenu od pet šećernih ostataka – tri manoze i dva N-acetilglukozamina (GlcNAc). Dodatni se šećeri vežu na ovu jezgru. Sazrijevanja se događaju u Golgijevom aparatu i razlikuju se između domaćina, između različitih tipova stanica iste vrste te čak između pojedinih serija proteina proizvedenih od iste kulture stanica. Zreli glikoproteini kvasaca bogati su manozom i zbog toga su podložniji degradaciji i smanjenju poluživota. Kod stanica sisavaca moguće su složenije strukture. N-vezani glikani nađeni u prokariotskim stanicama različiti su od struktura koje su nađene kod eukariota. O-vezana glikozilacija odvija se samo u Golgijevom aparatu. Glikozilacija proteina koji su proizvedeni u staničnim linijama CHO i NS0 je međusobno različita i drugačija od prirodne glikozilacije ljudskih proteina. U konkretnom slučaju utvrđeno je da razlike nemaju značajan utjecaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku proteina jer se lijekovi iz obje stanične linije koriste kod ljudi bez neželjenih posljedica (20).

Stanice sisavaca vrlo često zahtijevaju uzgoj adherirane na podlozi, ali neke mogu biti prilagođene uzgoju u suspenziji (21). Prilagodba stanica ovom uzgoju dovodi do promjena u ekspresiji proteina stanične površine što posljedično može utjecati na glikozilaciju kao što je stupanj sijalinizacije (22).

## Životinje

Strani geni potrebni za proizvodnju željenog proteina mogu biti uvedeni u životinje poput miševa, zečeva, svinja, ovaca, koza i krava, kloniranjem čitavog organizma tehnikom prijenosa jezgre (23). Prednost ove tehnologije je relativno niska cijena dobivanja velike količine željenog proteina kada se koriste velike životinje poput krava. Negativne strane su vrijeme koje je potrebno utrošiti da se uzgoji krdo te briga oko zdravlja životinja.

Upotrebom specifičnih promotora može se postići ekspresija proteina u željenom tkivu ili organu čime se olakšava izolacija i pročišćavanje. Strategije pročišćavanja i zahtjevi za čistoćom mogu se razlikovati od onih koji se koriste za pročišćavanje proteina dobivenih iz stanica bakterija ili stanica sisavaca (9). Nadležna tijela Europske unije odobrila su 2006. godine, a Sjedinjene Američke Države 2009. godine, prvi rekombinantni protein proizveden i izoliran iz mlijeka

transgenične životinje. Radi se o antitrombinu III (ATryn®, GTC Biotherapeutics) koji je proizveden i izoliran iz mlijeka koze.

Najčešće korišteni sojevi stanica insekata su Sf9 i High-Five. Mnogi su uspješni primjeri visoke ekspresije heterolognih proteina koje je inače teško ekspimirati u bakterijskim stanicama (24). Najčešće korišteni polipeptidi za povećanje topljivosti u stanicama insekata su glutation S-transferaza i mali modulator ubikvitina (13).

### Kulture biljnih stanica i biljke

Proteinski lijekovi mogu se ekspimirati u biljkama i kulturama biljnih stanica. Sustavi bioreaktora sa suspenzijama stanica koriste se proizvodnju manjih količina proteina, dok se velike količine proteina proizvode uzgajanjem usjeva na poljima. Postoje regulatorni zahtjevi koji reguliraju uzgoj transgeničnih biljaka u poljima i smjernice dobre proizvođačke prakse. Proizvodnja proteina u biljkama na poljima trenutno ih teško može zadovoljiti (25, 26, 27). Proizvodni sustavi temeljeni na biljkama imaju određene prednosti pred kulturama stanica sisavaca i mikroorganizama jer ne proizvode endotoksine niti podržavaju rast patogena koji inficiraju životinje što smanjuje troškove pročišćavanja (28).

Biljke mogu relativno uspješno provoditi neke posttranslacijske modifikacije koje su nužne za aktivnost eukariotskih proteina jer mogu sintetizirati neke N-glikanske strukture identične onima kod sisavaca. Biljkama nedostaju šećeri  $\beta(1,4)$ galaktoza i  $\alpha(1,6)$ fukoza, ali imaju  $\beta(1,2)$ ksilozu i  $\alpha(1,3)$ fukoza koje se ne nalaze kod sisavaca. Glikani biljaka pokazali su se imunogenima kod nekoliko sisavaca (4). Taligluceraza  $\alpha$ , odnosno  $\beta$ -glukozidaza (Protalix Biotherapeutics), prvi je proteinski lijek ekspimiran u biljnim stanicama koji su odobrila regulatorna tijela diljem svijeta.  $\beta$ -glukozidaza dobiva željenu manoznu strukturu usmjeravanjem proteina u vakuole biljnih stanica tijekom proizvodnje. Manozna struktura je neophodna za unos proteina u ciljane stanice tijekom kliničke primjene (29). Isprobano je i zadržavanje proteina u endoplazmatskom retikulumu, ali je bolja ekspresija i aktivnost proteina utvrđena kada je protein usmjeravan u vakuole.

Stabilna ekspresija proteina dobivena je i u jestivom sjemenju. Rekombinantni ljudski inzulin uspješno je ekspimiran i proizveden u biljci *Arabidopsis thaliana* (30). Visoka ekspresija

inzulina postignuta je usmjeravanjem proteina u stanične organele za pohranu ulja unutar sjemena. Biljni izvori mogli bi biti prikladne alternative za lijekove ili cjepiva koja se primjenjuju oralnim putem iz razloga što su sami biljni izvori jestivi. Potencijalna onečišćenja u gotovom proizvodu ovise o upotrijebljenoj biljnoj vrsti, stoga će u nekim slučajevima biti potrebno ukloniti određene tvari, poput nikotina iz duhana (4).

### Alge

Zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* uspješno je korištena za proizvodnju rekombinantnih proteina uključujući protutijela i hormone rasta (31). Dobiveni su ispravno formirani i biološki aktivni proteini te je postignuto uspješno nakupljanje eksprimiranog proteina u kloroplastu (32). Zelene alge su veoma efikasne u pretvaranju sunčeve svjetlosti i ugljikova dioksida u organski ugljik, te je prednost zelenih algi što u medij nije potrebno dodavati izvor ugljika. Time se smanjuje rizik mikrobne kontaminacije i pojednostavljuje proces pročišćavanja. *Dunaliella* ima veliki potencijal kao ekspresijski sustav proteina zbog brzog rasta i potencijala za posttranslacijske modifikacije (33).

### Optimiranje ekspresije u stanici domaćina

Posljednja dva desetljeća velik se trud ulagao u dobivanje stanica domaćina s boljim karakteristikama. Stanični metabolizam se modulirao s ciljem smanjivanja proizvodnje laktata u metabolizmu glukoze, iskorištavanjem fruktoze kao izvora ugljika, suprimiralo se proapoptičke gene ili pojačano ekspimiralo anitapoptičke, te moduliralo glikozilaciju i sposobnost stanice da proizvodi određene količine proteina. Također, s obzirom da se većina rekombinatnih proteina secernira iz životinjskih stanica radilo se na izmjenama gena koji su uključeni u proces sekrecije (20).

Ekspresija šaperona je u osnovi prilagođena potrebama stanice domaćina. Povećana ekspresija rekombinantnog proteina može dovesti do zasićenja kapaciteta formiranja proteina u endoplazmatskom retikulumu. Stoga se često koriste metode povećanja ekspresije šaperona radi povećanja prinosa (34).

Optimiranje kodona se provodi jer je poželjan velik prinos proizvodnog procesa. Različiti organizmi koriste različite kodone za pojedine aminokiseline zbog degeneracije genetičkog koda. Zato je moguća značajna razlika u upotrebi kodona između kloniranog gena i stanice domaćina prilikom heterologne ekspresije proteina i time smanjenje količine proizvedenog proteina. Da bi se to izbjeglo potrebno je kodone u kloniranom genu prilagoditi uporabi kodona stanice domaćina. Razvijeni su mnogi samostalni računalni programi i programi dostupni u sklopu internet servisa kao pomoć kod optimiranja kodona (35). Alternativno, moguće je koristiti *E. coli* koja koeksprimira tRNA rijetkih kodona primjenjivih na gen od interesa. Takvi komercijalno dostupni sojevi *E. coli* su Rosetta2 (proizvođača Novagen, Njemačka) i CodonPlus (proizvođača Agilent Technologies, CA, SAD) (13).

Neke stanice domaćina su se s vremenom prilagodile uvjetima uzgoja u kulturi u proizvodnji, a koji uključuju kemijski definiran medij, rast u suspenziji te veći mehanički stres. Činjenica da su ovakve stečene sposobnosti nasljedne, sugerira da je uzrok ovih promjena genetičke ili epigenetičke prirode, iako genetički mehanizam ovih modifikacija još nije dovoljno razjašnjen (20).

### Održavanje stanične linije

Jednom dobivenu genetički stabilnu staničnu liniju potrebno je adekvatno održavati u obliku glavne stanične banke (26, 36, 37). Glavna stanična banka je ujednačena masa mikroorganizama ili stanica koje su ujednačeno razdijeljene u određeni broj spremnika i skladištene na način da se osigurava stabilnost. Iz glavne stanične banke pripremaju se radne stanične banke.

U slučaju ekspresije u biljkama, potrebno je održavati banku biljnog materijala (sjeme) (38), a u slučaju ekspresije u životinjama, potrebno je održavati glavnu transgeničnu banku (embrijske matične stanice, oplođene jajne stanice, embrije, spermu i drugo) (23). Stanice iz glavne transgenične banke ne mogu izravno proizvoditi željni rekombinantni protein, već je potrebno kroz seriju reproduktivnih faza i selekcije životinja uzgojiti životinje koje mogu odgovarajuće eksprimirati transgenični proizvod.

### 3.2. Proizvodni proces

Proces proizvodnje proteinskih lijekova može se podijeliti na proces proizvodnje proteina (engl. *upstream process*) i proces izolacije i pročišćavanja proteina (engl. *downstream process*).

#### 3.2.1. Proizvodnja proteina

Stanice koje eksprimiraju proteine prije svega zahtijevaju određene nutrijente za rast i ekspresiju proteina u industrijskoj proizvodnji. Osnovni tipovi i primjeri nutrijenata potrebni većini stanica za ekspresiju proteina navedeni su u Tablici 2 (9). Medij se sastoji od mnogo različitih komponenti koje uključuju šećere, aminokiseline, elektrolite, vitamine, fetalni teleći serum i/ili mješavinu peptona, faktore rasta, hormone i druge proteina.

Tablica 2 – Tipovi nutrijenata (preuzeto i prilagođeno iz 9).

Tip nutrijenta	Primjer
Šećeri	Glukoza, laktoza, saharoza, maltoza, dekstrin
Voda (visoke kakvoće, sterilizirana)	Voda za injekcije
Aminokiseline	Glutamin
Elektroliti	Kalcij, natrij, kalij, fosfati
Vitamini	Askorbinska kiselina, tokoferol, tiamin, riboflavin, folna kiselina, piridoksin
Serum (fetalni teleći serum / sintetički serum)	Albumin, transferin
Minerali u tragovima	Željezo, mangan, bakar, kobalt, cink
Hormoni	Faktori rasta

Odabir nutrijenata ovisi o stanici domaćina i načinu ekspresije željenog proteina. Mediji koji se koriste za kulture stanica sisavaca mnogo su složeniji od medija potrebnih za uzgoj stanica

mikroorganizama. Mnogi mediji dostupni na tržištu dolaze kao gotove koncentrirane mješavine koje se prije filtracije otapaju u pročišćenoj vodi (9). Filtracija medija se provodi kroz filtere s porama promjera 0,2 ili 0,1  $\mu\text{m}$  da bi se spriječila moguća kontaminacija mikroorganizmima.

Glukoza je glavni izvor energije u kulturi stanica sisavaca. Rast stanica u uvjetima s manjkom glukoze dovodi do abnormalnosti u sintezi glikoproteina poput vezanja nenormalnih prekursora na protein, smanjenja ili odsutnosti glikozilacije (21). Abnormalnosti glikozilacije mogu se objasniti nedostatkom glikanskih prekursora izvedenih iz glukoze i/ili manjkom stranične energije. Oboje varira ovisno o tipu stanice i željenom proteinu (21).

Glutamin je izvor energije i esencijalni prekursor za sintezu nukleotida. Međutim, glutamin dovodi do nakupljanja amonijaka u mediju što inhibira stanični rast i utječe na proces glikozilacije s najvećim učinkom na smanjivanje terminalne sijalilacije. Ovaj se učinak na glikozilaciju pripisuje smanjenoj aktivnosti nekih glikoziltransferaza u Golgijevom aparatu zbog povećane koncentracije amonijaka i time povećanog pH (21). Ispitan je i učinak drugih tvari, poput lipida, aminokiselina, mangana, dimetilsulfoksida, glicerola i natrijevog butirata, na glikozilaciju proteina (21).

Dodavanje životinjskog seruma u medij često je neophodno za stanični rast i proliferaciju stanica. Međutim, od izbijanja bolesti kravljeg ludila u Ujedinjenom Kraljevstvu 1986. godine, fetalni se teleći serum smatra sigurnosnim rizikom (39). Transmisivne spongiformne encefalopatije (TSE), uključujući bolest kravljeg ludila, kronične su degenerativne bolesti živčanog sustava karakterizirane nakupljanjem abnormalne izoforme staničnog glikoproteina priona (PrP). Abnormalna izoforma priona razlikuje se od normalne izoforme po tome što je visoko otporna na proteaze i denaturaciju povećanom temperaturom. Moguća prisutnost priona skoro isključuje serum iz upotrebe. Međutim, kako je njegovu upotrebu najčešće nemoguće izbjeći, potrebno je minimizirati vjerojatnost prijenosa priona putem lijekova. Preporuka je, kada je to moguće, koristiti sirovine koje nisu životinjskog porijekla ili od životinja koje nisu podložne infekciji prionima. Kada upotrebu seruma nije moguće izbjeći, serum je potrebno nabavljati od životinja mlađe životne dobi (stoka, ovce, koze i druge životinje podložne infekciji prionima) iz zemalja s najmanjim mogućim rizikom pojave bolesti kao što su Sjedinjene Američke Države, Australija i Novi Zeland. Dijagnostički testovi za jednoznačno otkrivanje infekcije kod živih životinja još nisu razvijeni. Određeni proizvodni procesi poput precipitacije ili filtracije mogu značajno pridonijeti

smanjivanju rizika. S obzirom na biološko porijeklo seruma i potencijalne značajne kontaminacije u serumu, moguće su varijabilnosti između različitih serija proteinskog lijeka što može predstavljati izazov za dizajniranje koraka pročišćavanja.

Aditive, poput inhibitora histon deacetilaze (primjerice valproična kiselina ili natrijev butirat), moguće je upotrijebiti kao zamjenu za hormone rasta. Ovi aditivi dekonduziraju kromatin i povećavaju transkripcijsku aktivnost integriranih gena s posljedičnim povećanjem iskorištenja procesa. Postignuto je četverostruko povećanje iskorištenja procesa dodavanjem valproične kiseline staničnoj liniji HEK293E za proizvodnju protutijela (40).

U slučaju metanolom inducibilnog AOX promotora kod *P. pastoris*, podrazumijeva se upotreba toksičnog i lako zapaljivog organskog otapala. Radi izbjegavanja upotrebe velikih količina metanola u industrijskoj proizvodnji, ispituju se mogućnosti upotrebe drugih promotora za povećanje ekspresije proteina i iskorištenja procesa (41). Opisana je upotreba metanolom inducibilnog promotora gena za enzim metanol-oksidazu i formaldehid-dehidrogenazu bez dodavanja metanola, ali korištenjem konstitutivne koekspresije transkripcijskog faktora Prm1p iz GAP (gliceraldehid-3-P dehidrogenaza), TEF (translacijski elongacijski faktor 1) ili PGK (3-fosfoglicerat kinaza) promotora. Relativna aktivnost fitaze, proteina reportera, bila je tri puta veća bez dodatka metanola u usporedbi s kontrolnim sojem u kojem je gen PRM1 bio pod svojim nativnim promotorom. Razina ekspresije nije uspoređena sa standardnom metanolnom indukcijom i konstitutivnim Prmp1p ekspresijskim uvjetima.

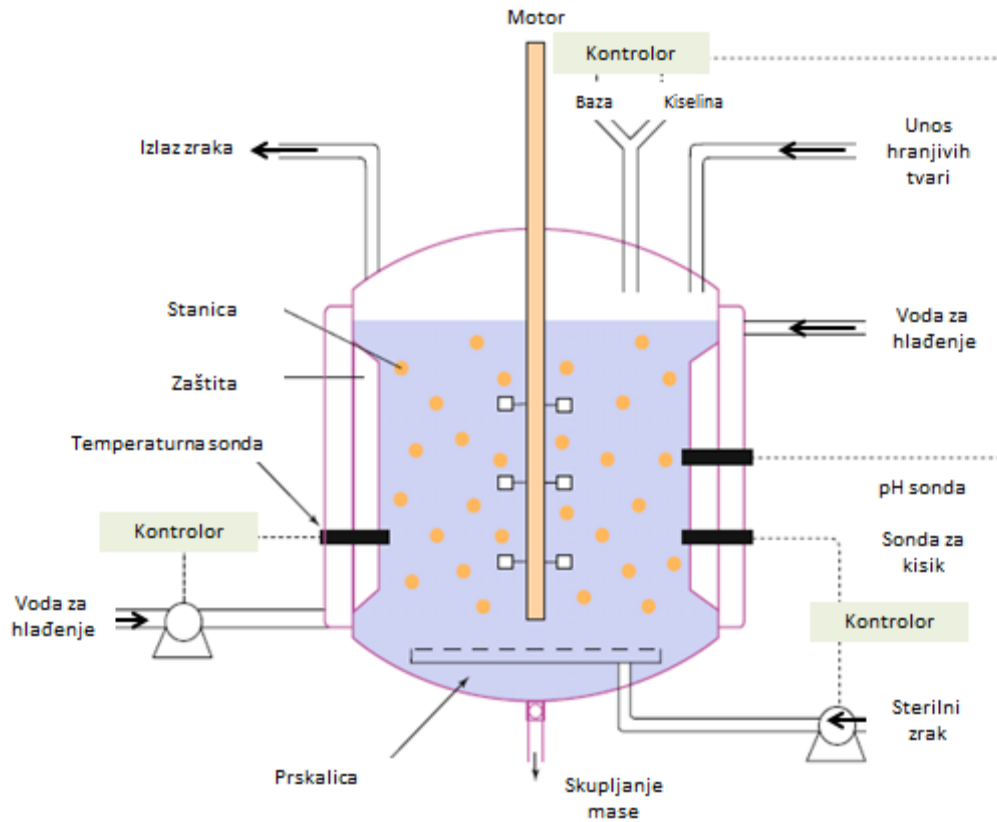
Kisikom obogaćeni zrak koristi se u bioreaktorima za održavanje aerobnih uvjeta rasta prokariotskih i eukariotskih stanica radi povećanja stanične gustoće i poboljšanja produktivnosti procesa. Izlaganje stanica visokim koncentracijama kisika dovodi do povećanog nakupljanja unutarstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu preopteretiti antioksidativnu obranu i stanični sustav popravljajući oštećenja. Stanice bakterija su otpornije na hiperoksidaciju od stanica sisavaca jer bolje održavaju ravnotežu kisikovih reaktivnih spojeva (42). Dodavanjem tvari koje smanjuju otpuštanje elektrona iz respiratornog lanca u medij moguće je smanjiti oštećenje stanice i eksprimiranog proteina koja nastaju zbog povećanih razina reaktivnih kisikovih spojeva.

Varijabilnosti u proizvodnom procesu i time varijabilnosti proteinskog lijeka mogu biti posljedica varijabilnosti između različitih serija sirovina koje se koriste u procesu proizvodnje ili

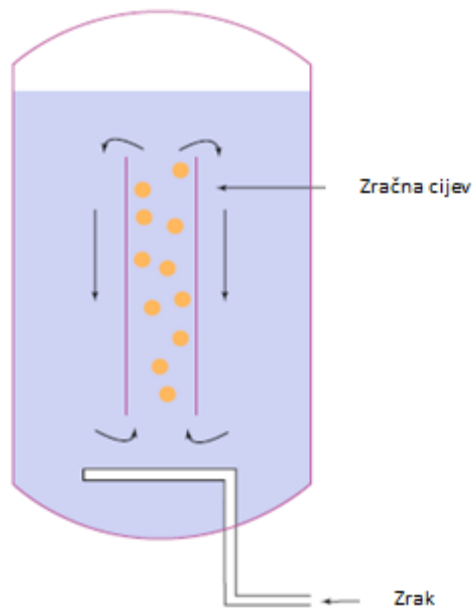


moгу biti posljedica nabave sirovina od razliĉitih proizvođaĉa. Neophodno je definirati parametre i zahtjeve kakvoće sirovina tijekom postavljanja proizvodnog procesa i kakvoću potvrđivati analizom sirovina prije njihova stavljanja u proizvodni proces.

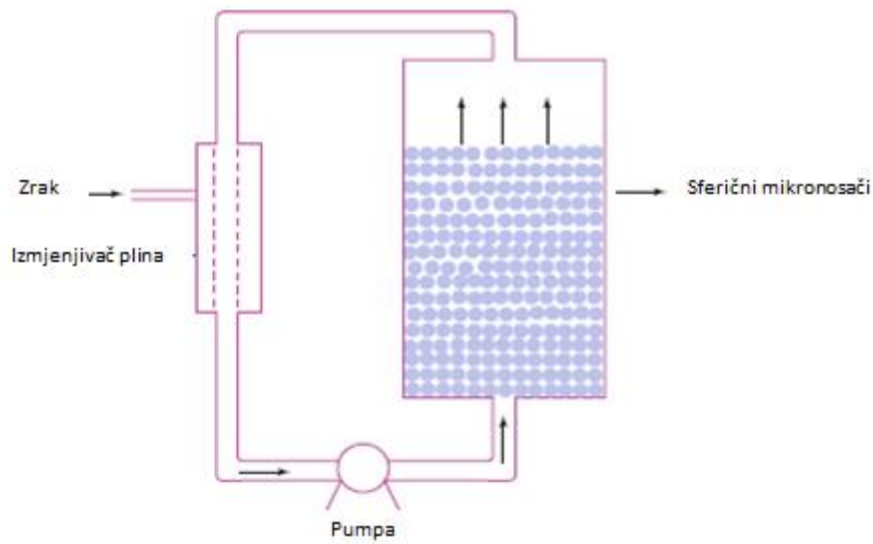
Generalno se stanice mogu kultivirati u posudama koje sadrže odgovarajući tekući medij za rast u kojem su stanice imobilizirane i rastu kao monosloj, adheriraju na mikronosaĉe ili su slobodne u suspenziji, ili su inkorporirane u matriks (obiĉno oĉvrnut agarom). Kultivacija stanica koje se koriste za ekspresiju proteina provodi se u fermentorima (stanice bakterija i kvasaca) ili bioreaktorima (stanice sisavaca i kukaca). Bioreaktore se može klasificirati u ĉetiri razliĉita tipa: spremnik s mješaĉem (engl. *stirred tank bioreactor*), spremnik s podizanjem zraka (engl. *airlift*), spremnik s fiksnim sferama (engl. *fixed bed*), reaktor s membranom (9, 43) (Slika 6, 7, 8, 9). Spremnik s mješaĉem trenutno je najĉešće korišten bioreaktor. Koristi se za stanice u suspenziji poput CHO, HEK293 i PER.C6<sup>®</sup> te za adherirajuće stanice poput Vero i MDCK (engl. *Madin-Darby Canine Kidney*) stanica. U potonjem sluĉaju proizvodnja se provodi na mikronosaĉima. Stanice sisavaca su osjetljive i mogu se lako oštetiti miješanjem ili pumpanjem tekućine u ili iz bioreaktora. U tom je pogledu *E. coli* mnogo otpornija i stoga bakterije mogu biti uzgajane u mnogo većim fermentorima (9).



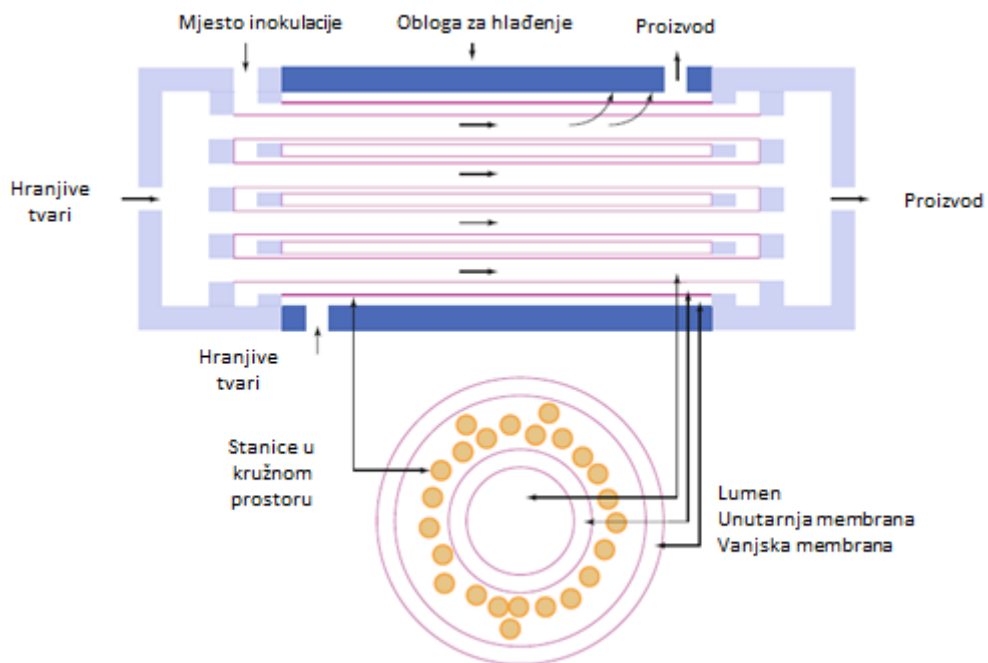
Slika 6 – Shematski prikaz bioreaktora (spremnika) s mješačem (preuzeto i prilagođeno iz 9).



Slika 7 – Shematski prikaz bioreaktora (spremnika) s podizanjem zraka (preuzeto i prilagođeno iz 9).



Slika 8 – Shematski prikaz bioreaktora (spremnika) s fiksnim sferama i mješačem (preuzeto i prilagođeno iz 9).



Slika 9 – Shematski prikaz perfuzijskog bioreaktora (preuzeto i prilagođeno iz 9).

Najkorišteniji materijal za izradu proizvodne opreme je nehrđajući čelik te je stoga ta tehnologija dobro poznata i kontrolirana. Nedostatci ove tehnologije su skupi dizajn, instalacija, troškovi održavanja i kvalifikacije opreme.

Sve je češća upotreba opreme za jednokratnu primjenu (Slika 10). Tvrtka Shire (Dublin, Irska) primijenila je prvi takav bioreaktor (2000 L) za proizvodnju jednog od svojih proizvoda (9). Neki od proizvođača sustava za jednokratnu primjenu su: Sartorius Stedim Biotech, GE Healthcare Life Sciences, Mesissner i EMD Millipore.

Prednost jednokratne tehnologije je ta što se njezinom upotrebom snižavaju troškovi proizvodnje. Moguće je iz procesa ukloniti svu opremu koja nije direktno vezana za proizvodni proces poput sustava za čišćenje (engl. *clean-in-place*, CIP) i sustava za sterilizaciju (engl. *steam-in-place*, SIP). Cijevi od nehrđajućeg čelika mijenjaju se plastičnim cijevima, a umjesto spremnika od nehrđajućeg čelika upotrebljavaju se plastične vreće. Moguće je proizvesti veći broj serija proizvoda jer se manje vremena troši na čišćenje i sterilizaciju. Izostanak potrebe za čišćenjem i sterilizacijom smanjuje troškove utroška vode i zbrinjavanja otpadnih voda te troškove rada. Također, smanjuju se troškovi validacija jer nije potrebno provoditi validacije čišćenja i sterilizacije te se eliminira mogućnost kontaminacije drugim proizvodom odnosno drugom serijom proizvoda. Nedostatak upotrebe sustava za jednokratnu primjenu jesu troškovi skladištenja sustava (vreća i cijevi), zbrinjavanje otpadne opreme nakon korištenja te ovisnost o jednom dobavljaču sustava s obzirom da standardizirani sustavi još nisu razvijeni. Nedostatak sustava za jednokratnu primjenu je i mogućnost kontaminacije ljekovitog pripravka tvarima iz materijala od kojeg je jednokratna oprema napravljena.



Slika 10 – Primjer jednokratne opreme – vreća za kultivaciju (preuzeto iz 44).

Protein taligluceraza  $\alpha$ , odnosno  $\beta$ -glukozidaza (Protalix Biotherapeutics), proizvodi se u stanicama mrkve u bioreaktoru ProCellEx™ baziranom na velikim fleksibilnim polietilenskim vrećama u koje se zrak i medij za rast dovode iz centralnog sustava pod sterilnim uvjetima (Slika 11) (29).

U ovom sustavu više bioreaktora može biti serijski složeno unutar čistog prostora dozvoljavajući rast tisuća litara transformiranih biljnih stanica koje ekspiriraju željeni protein na industrijskoj skali uz prihvatljive troškove. Kulture biljnih stanica se uzgajaju u vodenom mediju koji sadrži definirane anorganske nutrijente u potpuno zatvorenom i kontroliranom sustavu. Reaktori su izrađeni od polimernih materijala koje je odobrila Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) poput polietilena s minimalnim aditivima. Dizajn reaktora dozvoljava uklanjanje viška zraka i otpadnih plinskih produkata te dodavanje inokuluma i medija. Na reaktoru se nalazi mjesto za izdvajanje cijelog sadržaja ili njegova dijela s ostavljanjem inokuluma za sljedeći ciklus rasta. Protalixov bioreaktor (ProCellEx™) korišten je za uzgoj kulture stanica dobivenih iz različitih biljnih vrsta uključujući duhan, *Nicotiana tabacum*, i mrkvu, *Daucus carota* (29). Stanice dobivene iz svih biljnih vrsta pokazale su uspješan rast i dostigle su veliku gustoću u kratkom ciklusu rasta od 3-14 dana.

Tijekom kultivacije stanice prolaze kroz četiri faze rasta (9). U lag fazi stanice se prilagođavaju uvjetima u bioreaktoru i ne dijele se. U fazi eksponencijalnog rasta ili log fazi broj stanica se više ili manje konstantno udvostručuje kroz određeni period. Vrijeme udvostručavanja broja stanica sisavaca ovisi o vrsti stanice i obično varira između 20 i 40 sati. Faza rasta stanica u ovisnosti je o uvjetima poput temperature, pH, kisika, sile miješanja i drugih sila, opskrbe nutrijentima i nakupljanja otpadnih tvari. Rast stanica je usporen u stacionarnoj fazi zbog iskorištenja nutrijenata i/ili nakupljanja toksičnih tvari poput laktata i amonijaka. U ovoj je fazi broj stanica konstantan zbog toga što je jednak broj stanica koji nastaje i broj stanica koje umiru. U zadnjoj fazi dolazi do smrti stanica zbog nedostatka nutrijenata i prisutnosti visokih koncentracija toksičnih tvari.



Slika 11 – Bioreaktori s biljnim stanicama u proizvodnom postrojenju Protalix Biotherapeutics ( preuzeto iz 29).

Tri su najčešća načina proizvodnje u upotrebi: serijska proizvodnja, proizvodnja s dodavanjem hranjivih tvari (engl. *fed-batch*) i perfuzijska proizvodnja (9, 45).

Bioreaktor se u serijskoj proizvodnji napuni cjelokupnim volumenom medija potrebnim za cijelo vrijeme trajanja procesa, odnosno za vrijeme diobe i rasta stanica. Hranjive se tvari ne dodaju tijekom procesa, a proizvod se, kao i otpadne tvari, poput laktata i amonijaka, nakupljaju u bioreaktoru. Proizvod se izdvaja po završetku procesa. Maksimalna gustoća stanica i prinos proizvoda manji je u usporedbi s procesom s dodavanjem hranjivih tvari. Nakupljanje otpadnih tvari mijenja stanično okruženje što dovodi do varijabilnosti u glikozilaciji tijekom procesa (46). Serijska proizvodnja ima niske prinose te se zbog toga može upotrijebiti za proizvodnju lijekova za liječenje rijetkih i teških bolesti (engl. *orphan drugs*) ili niskodozirnih lijekova. Ovaj način proizvodnje nije često korišten proces u proizvodnji proteinskih lijekova (45).

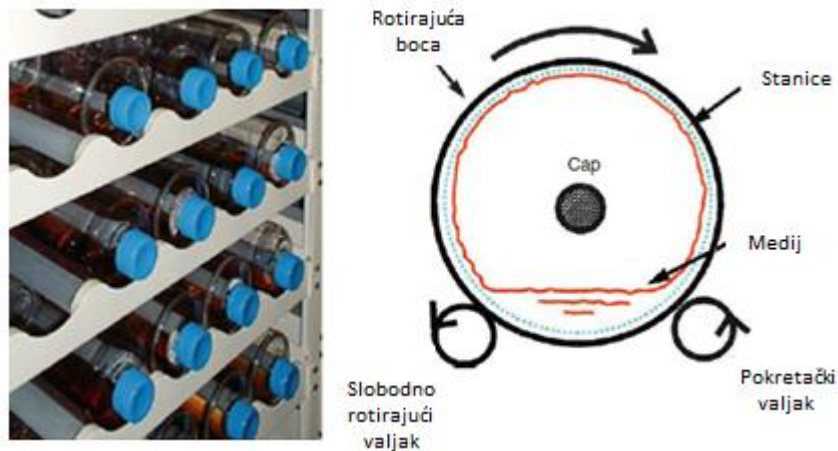
Visokokonzentrirani medij u bioreaktoru procesa s dodavanjem medija nadopunjuje se na dnevnoj bazi ili neprekidno tijekom trajanja procesa. Medij se sastoji od hranjivih tvari koje su potrebne za rast i diobu stanica i proizvodnju željenog proteina. Otpadne tvari se nakupljaju u bioreaktoru, a proizvod se izdvaja po završetku procesa. Ovim načinom proizvodnje moguće je

postići veću gustoću stanica i veći prinos u odnosu na serijsku proizvodnju. Ovaj je proces dobro poznat i opisan te se trenutno široko primjenjuje (9). Učestalost unosa hranjivih tvari postavlja se praćenjem statusa pH medija i/ili količine kisika otopljenog u mediju, poznavanjem krivulje rasta stanica, te temeljem količine prisutnih esencijalnih tvari poput, primjerice, glukoze (45). Kod praćenja pH medija unos nutrijenata se provodi kada pH poraste, što ukazuje da su zalihe hrane iscrpljene i da stanice počinju umirati. Poznavanje krivulje rasta stanica omogućuje prethodno izračunavanje količine potrebnih nutrijenata i njihovo unošenje u proces u određenim vremenima. Praćenje i potom korigiranje razine tvari esencijalnih za rast rijetko se koristi u industriji.

U perfuzijskom se procesu medij i otpadne tvari neprekidno izmjenjuju i proizvod se skuplja tijekom cijelog procesa kultivacije. Otpadne se tvari uklanjaju iz medija, a stanice zadržavaju u bioreaktoru, korištenjem membrane. Svježi se medij dodaje u bioreaktor radi održavanja konstantne količine medija. Kontinuiranim uklanjanjem otpada, razina otpadnih tvari se održava konstantnom i generira se stabilno okruženje za rast stanica i proizvodnju proteina. Perfuzijskim procesom postižu se velike gustoće stanica i velik prinos procesa. Nedostatak perfuzijskog procesa je veće opterećenje standardnih sustava uklanjanja stanica zbog veće početne biomase iz koje se izdvaja proizvod.

Razvoj industrijskog procesa proizvodnje obično započinje u bioreaktorima laboratorijske veličine (npr. 5-30 L) na kojima se utvrđuju odgovarajućih uvjeti za rast stanica i ekspresiju proteina. Zatim se proces prebacuje na pilot razinu (npr. 200-600 L) radi utvrđivanja optimalnih procesnih parametara. Serije komercijalne veličine proizvode se u velikim razmjerima (npr. preko 2000 L). Važni biološki, kemijski i fizikalni parametri koji utječu na rast stanice i ekspresiju proteina mijenjaju se s povećanjem skale. Najčešće se javlja problem neujednačene raspodjele kisika, nutrijenata, pH, topline i metabolita unutar bioreaktora, zbog neodgovarajućeg miješanja (45). Razlike između laboratorijske i komercijalne skale mogu se smanjiti održavanjem jednog od parametara konstantnim. Parametri koji se mogu održavati konstantnim uključuju unos energije po litri tekućine, količinu unesenog kisika, vrijeme ili brzinu miješanja. Održavanje parametra vremena ili brzine miješanja konstantnim ima veći učinak na smanjivanje razlika što je faktor uvećanja manji (45).

Adherirajuće stanice sisavaca u velikim količinama uzgajaju se u rotirajućim bocama ili na površinama malih kuglica (sfera) (Slika 12) (2). Boce se rotiraju polako (5-60 puta na sat) pri čemu se stanice koje su vezane na unutarnju površinu kupaju u mediju (Slika 12). Površina kuglica za uzgoj adherirajućih stanica se nakon nekog vremena u potpunosti prekrije stanicama i tada se stanice odvajaju sa kuglica, nasađuju na dodatne sfere i prenose u bioreaktor većeg radnog volumena.



Slika 12 – Rotirajuće boce za uzgoj adherirajućih stanica (preuzeto i prilagođeno iz 2).

Postoji nekoliko metoda uklanjanja adheriranih stanica s podloge (47). Moguća je enzimska razgradnja upotrebom tripsina, kolagenaze ili komercijalno dostupne mješavine nekoliko nespecifičnih endoproteaza i egzoproteaza koje eksprimira *Streptomyces griseus*. Ovi enzimi razgrađuju proteine na površini stanica koji stupaju u interakcije s podlogom na kojoj stanice rastu i proteinima susjednih stanica. Tripsin se može kombinirati s ne-enzimskom metodom poput korištenja etilendiamin tetraoctene ksiline (EDTA). EDTA kelira divalentne katione te tako inhibira interakcije nekih proteina. Veoma je važno optimirati izlaganje stanica enzimu. Nedovoljno duga izloženost dovodi do nepotpunog odvajanja stanica od podloge, a preduga izloženost rezultira smanjenjem integriteta staničnih membrana i smrću stanica (9).

Manualna metoda uz upotrebu gumenih ili plastičnih špatula neprikladna je za procese na industrijskoj razini zbog čega se uglavnom koristi na laboratorijskoj razini. Metodu je moguće primijeniti kada stanice rastu na glatkim površinama. Prednost metode je što se ne unose dodatne



tvari koje kasnije moraju biti uklonjene. Nedostatak metode je mogućnost oštećenja stanica i potreba za ispitivanjem prikladnosti materijala od kojeg je špatula izrađena.

Kombinirana mehaničko-kemijska metoda podrazumijeva protresanje uz upotrebu blagog enzimskog tretmana. Podloga se može obložiti termoosjetljivim tvarima poput poli(N-izopropilakrilamida) (pNIPAAm) radi olakšavanja odvajanja proteina. pNIPAAm mijenja oblik snižavanjem temperature kulture ispod 32°C što potiče odvajanje stanica zbog promjena u hidrofobnosti polimera. Mogu se upotrijebiti pH-osjetljivi polimeri koji se nanose na podloge na kojima stanice rastu. Promjenom pH dolazi do odvajanja stanica. Proučavane su metode upotrebe tvari osjetljivih na svjetlo i električni potencijal, označavanje stanica magnetnim nanočesticama ili liposomima, upotreba šok valova te smrzavanje stanica.

Uzgoj biljaka jednostavnije se prenosi iz manjih na poljoprivredne razmjere (4). Biljke se mogu uzgajati na tlu, upotrebom svjetla, vode i gnojiva te ne zahtijevaju velike investicije kao sustavi koji se baziraju na fermentorima i bioreaktorima. Međutim, biljke se u svrhu proizvodnje protenskih lijekova trenutno uzgajaju u zatvorenim i strogo kontroliranim uvjetima (48).

Promjene fizikalno-kemijskih uvjeta okoliša imaju potencijal da izmijene stanični metabolizam i posljedično dovedu do promjena u posttranslacijskim modifikacijama rekombinantnog proteina. Manja je mogućnost kontrole uvjeta kada se biljke uzgajaju u staklenicima ili na otvorenim poljima, nego kada se biljne stanične kulture uzgajaju u kontroliranim uvjetima. Razlika u glikozilaciji može postojati čak i između starog i mladog lišća cijele biljke. Mnogo bolja ujednačenost može se postići uzgojem stanica biljaka u potpuno kontroliranim uvjetima bioreaktora. Protralix kontinuirano proizvodi rekombinantnu  $\beta$ -glukozidazu s minimalnom varijabilnosti između serija (29).

### **3.2.2. Izolacija i pročišćavanje proteina**

Svrha izolacije i pročišćavanja proteina je uklanjanje potencijalno prisutnih onečišćenja poput stanica domaćina, proteina stanica domaćina, nukleinskih kiselina, fosfolipida, virusa i sastojaka kultivacijskog medija. Njihova prisutnost u konačnom proizvodu nije poželjna zbog potencijalnog negativnog utjecaja na protein, odnosno kakvoću i sigurnost proizvoda.

Nukleinske kiseline su anioni koji se pri kiselom pH mogu elektrostatskim interakcijama vezati na pozitivno nabijene proteine. Vezanje nukleinskih kiselina može promijeniti sekundarnu strukturu i potaknuti konformacijske promjene proteina. Gotov proizvod, proizveden u staničnim linijama sisavaca, može sadržavati fragmente DNA s onkogenima. Jedna od metoda praćenja količine DNA u pročišćenom proizvodu je inkubacija stanične linije s radio- ili fluorescentno obilježenim nukleotidima (9). Ovisno o tipu korištenih stanica kontaminacija finalnog produkta nukleinskim kiselinama ne smije prelaziti 100 pg ili 10 ng po dozi (49).

Proteini stanica domaćina ili proteini seruma mogu biti prisutni u gotovom proizvodu te ih stanice pacijenta mogu prepoznati kao antigen. Kod ponovljene primjene može doći do imunosne reakcije što može biti pogrešno protumačeno kao imunosni odgovor na proteinski lijek. Proteinska onečišćenja koja mogu biti prisutna u gotovom proizvodu su agregirani proteini, proteini s heterogenim disulfidnim vezama, varijabilnostima glikozilacije, deaminirani proteini i dr. Proteini su podložniji razgradnji proteazama na višim temperaturama. Pročišćavanje se stoga treba provoditi na temperaturama od 2-8 °C, što može biti problematično na većoj skali komercijalne proizvodnje (9). Također, mogu se dodati agensi koji tvore komplekse s kalcijem (npr. citrat), s obzirom da aktivnost mnogih proteaza ovisi o  $\text{Ca}^{2+}$  (9).

Masne kiseline i lipidi mogu potencijalno utjecati na stabilnost proteina vežući se na njega najvjerojatnije hidrofobnim reakcijama. Međutim, nije nađeno da tragovi masnih kiselina i lipida utječu značajno na stabilnost proteina. Vjerojatni razlog je njihova mala topljivost. Dizajn procesa uklanjanja masnih kiselina i lipida može se temeljiti na pročišćavanju upotrebom membrane ili podešavanjem pH (50).

Oprema koja se koristi u proizvodnom procesu, odnosno materijal od kojeg je oprema načinjena, ne smije otpuštati komponente. U slučaju njihova otpuštanja oni se moraju ukloniti daljnjim koracima pročišćavanja ili moraju ostati prisutni u dozvoljenim koncentracijama. Isto se potvrđuje validacijom procesa (26). Oprema načinjena od nehrđajućeg čelika može korodirati u različitim stupnjevima ovisno o sastavu medija kojima je oprema izložena. Željezo, krom i nikal su potvrđeni kao tvari koje se otpuštaju iz opreme pri različitim sastavima pufera i različitim pH (51). Utjecaj metala na protein, uključujući metale dodane u medij za rast stanica u ulozi nutrijenata, ovisi o količini i vrsti metala te sastavu proteina. Metali najčešće kataliziraju oksidaciju proteina.

Aminokiseline osjetljive na oksidaciju su: Met, Cys, His, Trp, Tyr, Pro, Arg, Lys i Thr (50). Protein je podložniji oksidaciji što sadrži više navedenih aminokiselina. Dodatno, sirovine koje se koriste u prethodnim koracima procesa, kao i one koje se koriste tijekom procesa pročišćavanja, mogu sadržavati tragove metala koji su u sirovini zaostali tijekom procesa njezine proizvodnje. Važno je da dobavljači/proizvođači plastične jednokratne opreme mogu ponuditi informacije o tvarima koje materijal opreme otpušta i kakve je kompatibilnosti s različitim otapalima.

Proces pročišćavanja koji se koristi u proizvodnji proteinskih lijekova mora biti siguran, ponovljiv, robustan i ekonomičan. Dizajniranje procesa pročišćavanja ovisi o karakteristikama proizvoda i načinu njegove proizvodnje pri čemu se u obzir uzima tip stanica, sirovine i oprema korišteni u procesu proizvodnje. U slučaju pročišćavanja kulture biljnih stanica, u obzir trebaju biti uzete i jedinstvene karakteristike biljnih stanica, poput prisutnosti stanične stijenske. Potrebno je u obzir uzeti odnos karakteristika proteina stanice domaćina i proteina koji se želi izolirati, odnosno potrebno je poznavati fizikalno-kemijske razlike između proizvoda i onečišćenja, kao što su razlike u termalnoj stabilnosti, izoelektičnoj točki, molekulskoj masi, hidrofobnosti, gustoći, specifičnim svojstvima vezivanja i drugo. Posebnu pozornost treba biti obratiti na očuvanje djelotvornosti lijekova pri upotrebi fizičkog stresa, poput visoke temperature i pH krajnosti.

Rekombinantni proteini najčešće se pročišćavaju iz supernatanta stanične kulture ili staničnog ekstrakta metodama filtracije i kromatografije. Često korištene separacijske tehnike i njihovi principi odjeljivanja navedeni su u Tablici 3 (9, 52). Najčešće nije moguće sva onečišćenja ukloniti jednom tehnikom u jednom koraku te se primjenjuje više različitih koraka pročišćavanja od kojih svaki uklanja dio onečišćenja.

Prvi korak u procesu pročišćavanja podrazumijeva uklanjanje stanica i staničnih ostataka centrifugiranjem ili filtracijom. Stanične ostatke potrebno je ukloniti kada se stanice moraju uništiti radi oslobađanja rekombinantnog proteina. Ovo se najčešće postiže centrifugiranjem na različitim brzinama. Jezgre se mogu izdvojiti centrifugiranjem na 400 g tijekom 20 minuta, dok se vezikule stanične membrane moraju centrifugirati dulje i na većim g vrijednostima (9). Za razdvajanje čestica može se koristiti i Bouyant tehnika koja koristi viskozni fluid s kontinuiranim gradijentom. Ova se metoda u industriji uglavnom primjenjuje kada je potrebno izdvojiti prethodno istaložene proteine ili kontaminante (9). Postoji više filtracijskih sustava od kojih su

najkorišteniji dubinski filteri (engl. *depth filters*) i to u kombinaciji s pomoćnim filterom ili dijatomejskom zemljom (9).

Tablica 3 – Separacijske tehnike (preuzeto 9).

Separacijska tehnika	Princip	Odjeljivanje se temelji na
Membrana	Mikrofiltracija	Veličini
	Ultrafiltracija	Veličini
	Nanofiltracija	Veličini
	Dijaliza	Veličini
	Nabijene membrane	Naboju
Centrifuga	Izotopno vezanje	Gustoći
	Neravnotežno stanje	Gustoći
Ekstrakcija	Fluid ekstrakcija	Topljivosti
	Ekstrakcija tekuće/tekuće	Raspodjeli, promjeni topljivosti
Taloženje	Djelomično taloženje	Promjeni topljivosti
Kromatografija	Ionska izmjena	Naboju
	Gel-filtracija	Veličini
	Afinitetna	Specifičnoj interakciji ligand-substrat
	Hidrofobna interakcija	Hidrofobnosti
	Adsorpcija	Kovalentno/ne-kovalentnom vezanju

Membrane i sustavi temeljeni na membranama se u biotehnološkoj industriji koriste za pročišćavanje i ukoncentriravanje proteina temeljem veličine i naboja (53, 54, 55). Najkorištenije su metode koje kojih je proces ubrzan primjenom tlaka – ultrafiltracija, mikrofiltracija i nanofiltracija.

Ultrafiltracijske membrane obično sadrže pore promjera 1-20 nm i njihova sposobnost zadržavanja proteina je velika. Uglavnom se koriste za ukoncentriravanje proteina te izmjenu pufera i daje im se prednost u industrijskoj primjeni pred gel-filtracijom (56). Upotrebom ultrafiltracijske membrane rekombinantni kolagen iz ekstrakta kukuruza pročišćen je do čistoće

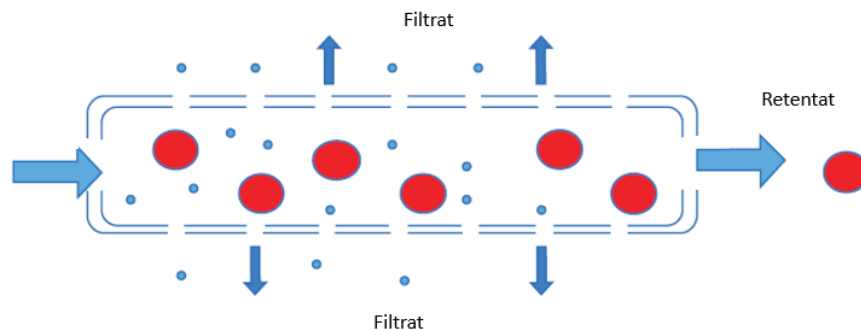
od 99% (57). Permeabilnost membrane ovisi o distribuciji veličine čestica, poroznosti, debljini i svojstvima otapala. Naboj prisutan na membrani mijenja tok te posljedično transport proteina preko membrane. Hidrofobnost membrane dovodi do adsorpcije proteina i usporavanja toka. Polietersulfonske membrane su hidrofobnije u usporedbi s celuloznim membranama. Ultrafiltracijske membrane mogu također biti napravljene od poliakrilonitrila, celuloza acetata i keramike. Klasične ultrafiltracijske membrane uglavnom razdvajaju proteine temeljem njihove veličine. Potrebna je deseterostruka razlika u veličini proteina za postizanje uspješnog razdvajanja.

Ultrafiltracija s primjenom električnog polja povećala je tok permeata za 25-50% u otopini proteina od 1-5 g/L u usporedbi s ultrafiltracijom provedenom bez korištenja električnog polja (58). Utvrđeno je da se najveće povećanje filtracijskog tijeka postiže primjenom pulseva veće jakosti (voltaža) u kratkim intervalima i s duljim trajanjem samog primijenjenog pulsa (59). Međutim, elektroliza koja se događa na membrani te posljedične lokalne promjene pH mogu rezultirati inaktivacijom ili denaturacijom željenog proteina.

Ultrazvuk visoke energije primijenjen na tekućinu proizvodi zvučne valove i sile kavitacija u tekućini, što dovodi do smanjenog nabiranja membrane i povećanog tijeka permeata (60). Veće strujanje se postiže primjenom većih frekvencija ultrazvuka nego primjenom nižih frekvencija konstantnog intenziteta (61). Neke studije su utvrdile da istovremena primjena električnog polja i ultrazvuka ima sinergistički učinak (62, 63).

Filtracija tangencijalnog tijeka (engl. *tangential flow system*) (Slika 13) visoke djelotvornosti može razdvojiti molekule koje se veličinom razlikuju 1-3 puta, što je velika prednost u odnosu na klasičnu filtraciju tangencijalnog tijeka, koja može razdvajati molekule koje se veličinom razlikuju 10 ili više puta. Filtracija tangencijalnog tijeka visoke djelotvornosti uzima u obzir veličinu i naboj molekule i može provesti ukoncentriravanje proteina, pročišćavanje i zamjenu pufera u jednom koraku čime se reduciraju troškovi proizvodnje (64). Pri izoelektričnim točkama proteini imaju neutralan naboj te stoga imaju manji ionski omotač i time manji efektivni volumen što rezultira većim protokom kroz pore membrane. Zato je pažljivim optimiranjem pH pufera, ionske jakosti i upotrebe nabijene membrane moguće dizajnirati proces koji je visoko selektivan za retenciju proteina i propuštanje onečišćenja (65). Filtracija tangencijalnog tijeka

visoke djelotvornosti visoko je selektivna što je dokazano uspješnim odvajanjem proteinskih monomera od oligomera, proteina koji se razlikuju u samo jednoj aminokiselini i Fab fragmenta (engl. *fragment-antigen binding*) od otprilike jednako velikog onečišćenja (66, 67). Tehnika je korištena u kombinaciji s membranskom ionsko izmjenjivačkom kromatografijom za pročišćavanje rekombinantnog proteina acilaze iz bakterijske kulture (55).



Slika 13 – Princip filtracije tangencijalnog tijeka – membrana dozvoljava prolaz molekula određene veličine; veće molekule zadržavaju se u retentatu (preuzeto i prilagođeno iz 52).

Metoda pročišćavanja razdvajanjem faza koristi se kao metoda predobrade radi smanjivanja opterećenja daljnjih koraka pročišćavanja (52). Vodeni dvofazni sustavi izrađuju se miješanjem dviju vodenih otopina koje sadrže strukturno različite komponente odgovarajuće koncentracije. Ove komponente mogu biti dva različita polimera ili polimer i sol. Metoda je prikladna za procese proizvodnje proteina jer omogućava ukoncentriravanje i pročišćavanje u jednom koraku. Metoda se jednostavno prilagođava povećanju procesa u odgovarajućem omjeru. Također, polimeri imaju stabilizirajući učinak na protein u vodenom mediju (52).

Vodena dvofazna ekstrakcija je primijenjena za pročišćavanje stanica, virusnih čestica i plazmidne DNA (68, 69, 70). Na odjeljivanje molekule u dvofaznom sustavu utječu hidrofobnost, površinski naboj, veličina i sastav sustava. Zbog toga se na odjeljivanje proteina može utjecati mijenjanjem mase polimera i koncentracije komponenti u fazi, promjenom pH i ionske jakosti ili dodavanjem afinitetnih liganada. Metoda dozvoljava velike fleksibilnosti pri optimiranju odjeljivanja željenog proteina u jednu i onečišćenja u drugu fazu. Provedeno je istraživanje koje je ispitalo koeficijent raspodjele i utjecaje različitih karakteristika komponenti poput mase

polimera, pH i ionske jakosti (71). Neki od korištenih dvofaznih sustava su: polietilen glikol – dekstran i polietilen glikol – sol (npr. kalijev fosfat), etilen oksid – propilen oksid te pH osjetljivi polimeri poput polidialilaminetanoat-dimetilsulfoksid (72, 73, 74). Nakon što je željena molekula izdvojena u odgovarajuću fazu, polimeri mogu biti odijeljeni promjenom pH ili temperature, ovisno o njihovim karakteristikama. Iskorištenje procesa povećano je dodavanjem neionskog detergensa u sustav etilen oksid – propilen oksid (75).

Tijekom proizvodnog procesa u bakterijskim stanicama mogu se nakupljati inkluzijska tijela, odnosno agregirani amorfni proteini koji su vezani kovalentnim i nekovalentnim vezama. Proteini se mogu osloboditi iz inkluzijskih tijela razbijanjem stanica, izdvajanjem inkluzijskih tijela i njihovim otapanjem, pri čemu se koriste denaturirajući agensi poput natrijevog dodecil sulfata, uree ili guanidin hidroklorida (9).

Topljivost proteina ovisi o fizikalno-kemijskom okruženju (npr. pH, ionska jakost otopine). Isoljavanje, odnosno sporo kontinuirano povećavanje ionske jakosti otopine, dovodi do selektivnog izdvajanja proteina iz otopine (9). Ioni s potencijalom izoljavanja proteina su primjerice: tiocijanat ( $\text{SCN}^-$ ), jodid ( $\text{I}^-$ ), perklorat ( $\text{ClO}_4^-$ ), nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), bromid ( $\text{Br}^-$ ), klorid ( $\text{Cl}^-$ ), acetat ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), fosfat [ $\text{PO}_4^{3-}$ ], sulfat [ $\text{SO}_4^{2-}$ ], ion barija ( $\text{Ba}^{2+}$ ), ion kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ion magnezija ( $\text{Mg}^{2+}$ ), ion litija ( $\text{Li}^+$ ), ion cezija ( $\text{Cs}^+$ ), ion natrija ( $\text{Na}^+$ ), ion kalija ( $\text{K}^+$ ), ion rubidija ( $\text{Rb}^+$ ), ion amonija ( $\text{NH}_4^+$ ). Druga metoda za taloženje proteina je promjena dielektrične konstante upotrebom organskih otapala koja se miješaju s vodom poput polietilenglikola i triklorooctene kiseline (9). Precipitacija je jednostavan i relativno ekonomičan postupak. Nedostatci su ograničavajuća sposobnost pročišćavanja te uvođenje dodatnih supstanci koje kasnije moraju biti uklonjene.

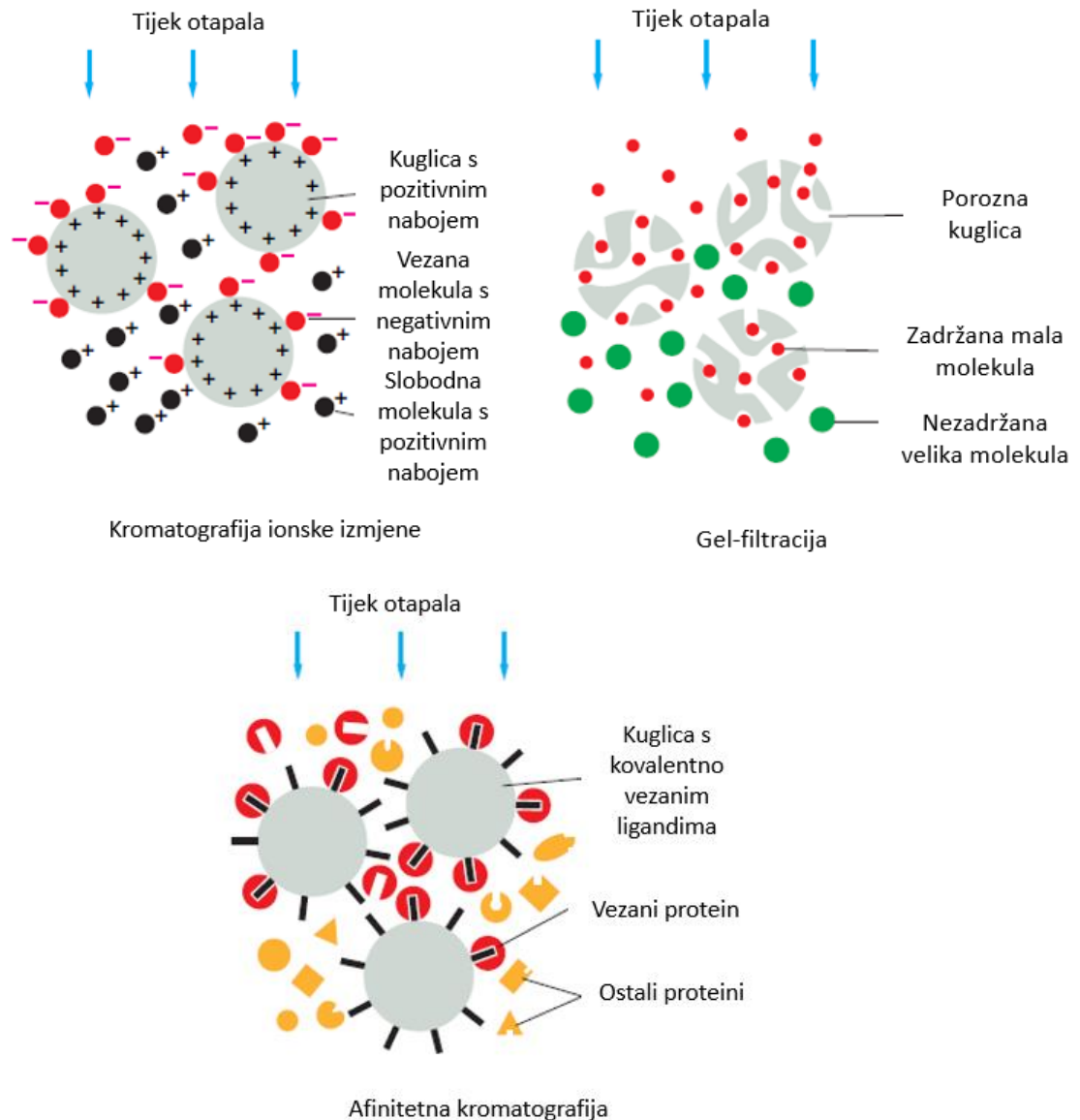
Kada se protein izlučuje iz stanice u medij kulture, udio željenog proteina u ukupnoj količini staničnih proteina je 1-5%. Stoga je kod procesa niskog prinosa nužan korak ukoncentriravanja radi smanjivanja volumena koji dalje ulazi u proces pročišćavanja.

Kromatografija podrazumijeva odjeljivanje molekula primarno temeljem razlike u raspodjeli između dviju faza, od kojih je jedna stacionarna, uglavnom čvrsta faza, a druga je mobilna faza, plin ili tekućina. Danas je većina stacionarnih faza pakirana u kolone kroz koje se uz pomoć pumpi potiskuje mobilna faza. Proces pročišćavanja može uključivati više vrsta i/ili sljedova kromatografija.

Protein od interesa se kod adsorpcijske kromatografije selektivno veže na nepokretni matriks pod jednim uvjetima, a otpušta u drugim (9). Ova metoda ima pozitivne ekonomske aspekte jer dozvoljava vezanje velikih količina proteina na stacionarnu fazu. U kromatografiji stacionarnih faza kao adsorbensi se koriste anorganski materijali poput silika gela, staklenih kuglica, hidroksiapatita, raznih metalnih oksida i organskih polimera (umreženi dekstrani, celuloze, agaroze). Odjeljivanje se temelji na različitoj interakciji komponenti uzorka s komponentama kromatografskog medija. Ionske grupe poput amina i karboksilnih skupina, dipolarne grupe poput karbonilnih funkcionalnih skupina, proton donora i proton akceptora, kontroliraju interakciju komponenti uzorka sa stacionarnom fazom i usporavaju eluciju ako se interakcije dogode. Svojstva odgovarajuće stacionarne faze za odjeljivanje proteina su velika mehanička jakost, visoka poroznost, odsutnost nespecifičnih interakcija između proteina i suportne faze, visok kapacitet i stabilnost matriksa u raznim otapalima. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) zadovoljava velik broj ovih kriterija. Tekuće faze trebaju biti pažljivo odabrane radi smanjivanja gubitka biološke aktivnosti do koje može doći upotrebom nekih organskih otapala. Čestice stacionarne faze imaju pore, malene su, čvrste i jednoličnog oblika. Mobilna se faza potiskuje kroz kolonu materijala upotrebom visokog tlaka. HPLC sustavi obrnutih faza koriste se i za ukoncentriravanje i pročišćavanje. Troškovi HPLC opreme i smola su visoki. HPLC je teško prilagoditi na veću skalu stoga tehnologija nije pogodna za pročišćavanje većih količina proteina.

Kromatografija ionske izmjene (Slika 14) može biti jednostavno prilagođena velikoj skali (9). Može se koristiti na način da proizvod prolazi kroz kolonu dok se onečišćenja vežu na matriks. Tip kolone koja se koristi ovisi o svojstvima proteina koji treba pročititi. Primjenom gradijenta pH postiže se eluiranje glikoziliranih proteina u širokom rasponu pH vrijednosti (i do 2 pH jedinice). Kratki slijed od nekoliko uzastopnih arginina može pojednostaviti pročišćavanje omogućujući proteinu da se veže na kationski izmjenjivač pod uvjetima u kojima se drugi proteini neće vezati. Ovakvo se pročišćavanje koristi na laboratorijskoj razini zbog regulatornih problema uklanjanja arginina ili drugih specifičnih oznaka tijekom komercijalne proizvodnje.





Slika 14 – Principi nekih kromatografskih metoda (preuzeto i prilagođeno iz 5).

Afinitetna kromatografija se temelji na visokospecifičnim interakcijama između imobiliziranog liganda i proteina od interesa (Slika 14) (52). Intenzivno ispiranje matriksa uklonit će onečišćenja, a pročišćeni se protein može odvojiti dodavanjem liganada koji kompetiraju za vezna mjesta sa stacionarnom fazom ili promjenom fizikalnih uvjeta (npr. pH) koji smanjuju postojeći afinitet.

Dodavanje sekvence proteinu od interesa opcija je koja može omogućiti pročišćavanje metal-afinitetnom kromatografijom. Često se koristi označavanje polihistidinom (6 ili više

histidina), koji se dodaje N- ili C-kraju rekombinantnog proteina (9). Ova oznaka ima veliki afinitet prema smolama koje sadrže metalne ione poput nikla i cinka, a ispiranje se provodi upotrebom kelatora metala poput imidazola (52). Dva su načina za dodavanje 6 histidinskih ostataka. Nukleotidni slijed koji kodira za protein klonira se u plazmid koji već ima kod za histidinsku oznaku. Druga mogućnost je provedba lančane reakcije polimeraze s običnom početnicom i početnicom sa 6 histidinskih kodona na 5' kraju (CAT ili CAC). Da bi se omogućilo lako uklanjanje histidinske oznake, oznaka može biti vezana s pogodnim aminokiselinskim slijedom koji prepoznaje određena endopeptidaza. Ovaj princip podrazumijeva još jedan korak pročišćavanja radi uklanjanja afinitetne oznake, što otežava validaciju i poskupljuje proizvodni proces.

Najčešći primjer afinitetne kromatografije je kromatografija s protein-A ligandom koja se više od desetljeća koristi u znanosti i industriji. Osim u proizvodnji monoklonskih protutijela, ova metoda pročišćavanja nije u industrijskoj upotrebi (9). Protein-A kromatografija ima veliku selektivnost prema rekombinantnom proteinu te mogućnosti izdržavanja procesa sterilizacije (52). 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) (52). Upotrebu protein-A kromatografije olakšavaju komercijalno dostupne protein-A smole s visokim kapacitetom vezanja rekombinantnih proteina (52).

Alternativne oznake, poput FLAG, Softagl i Softagl3, vežu se za specifična monoklonska protutijela. Specifično vezanje protutijela za epitope naziva se imunoafinitetna kromatografija i koristi se za pročišćavanje antigena ili protutijela (9). Upotreba imunoafinitetne kromatografije smatra se, s regulatornog aspekta, korištenjem drugog proizvoda koji mora udovoljavati svim regulatornim zahtjevima kao i djelatna tvar od interesa. Upotreba imunoafinitetnih liganada utječe na povećanje troškova proizvodnje.

Rekombinantni proteini u *E. coli* često se proizvode kao fuzijski proteini. Proteini koji se koriste za fuziju su tioredoksin (Trx),  $\beta$ -galaktozidaza i glutation S-transferaza (GST). Ovakvi fuzijski partneri, uz poboljšavanje smatanja rekombinantnog proteina, mogu biti korišteni kao afinitetna oznaka za pročišćavanje (9). Oznaka Fh8 mali je antigen (8 kDa) koji izlučuje *Fasciola hepatica*, a koristi se za povećanje topljivosti proteina i kao afinitetna oznaka za kromatografsko pročišćavanje (76).

Kromatografija hidrofobnih interakcija temelji se na nekovalentnim i neelektrostatskim interakcijama između proteina i stacionarne faze. Blaga je tehnika koja dozvoljava visoke prinose odgovarajuće smotanih i neoštećenih proteina koji su odvojeni od strukturno sličnih onečišćenja (9). Većina hidrofobnih aminokiselinskih ostataka proteina u fiziološkim je uvjetima smještena unutar proteina. Mali dio hidrofobnih aminokiselina izložen je na površini proteina i pritom je ta izloženost suprimirana jer hidrofilne aminokiseline u njihovom okruženju privlače molekule vode. Visoke koncentracije soli (npr. amonijev sulfat) smanjuju hidriranost proteina te površinske hidrofobne aminokiseline postaju dostupnije i mogu se vezati na kolonu (52).

Gel-filtracija odvaja molekule temeljem njihovog oblika i veličine (Slika 14). Na gel pakiran u kolonu nanosi se mješavina proteina koja zatim difundira u gel. Najveće molekule izlaze prve, a najmanje zadnje. Proteini također reagiraju s molekulama stacionarne faze elektostatskim i hidrofobnih interakcijama, što utječe na vremena njihova zadržavanja te može utjecati na gubitak razlučivanja. Očuvanje razlučivanja kiselih proteina može se postići snižavanjem pH mobilne faze, što posljedično reducira interakciju kiselih proteina sa stacionarnom fazom. pH mobilne faze stoga mora biti odabran uzimajući u obzir prirodu proteina koji se želi izolirati i prirodu onečišćenja, s ciljem produljivanja vremena zadržavanja onečišćenja, odnosno skraćivanja vremena zadržavanja željenog proteina ili obrnuto. Ionska jakost također utječe na vrijeme zadržavanja te se promjenama ionske jakosti može mijenjati vrijeme zadržavanja. Visoke koncentracije fosfata i umjerene koncentracije natrijeva klorida suprimiraju elektrostatske interakcije proteina sa stacionarnom fazom (52). Visoke koncentracije amonijeva sulfata mogu povećati vezanje proteina na stacionarnu fazu hidrofobnim interakcijama, što povećava vrijeme zadržavanja (52). Uvođenje organskog otapala, poput acetonitrila, u mobilnu fazu može reducirati interakcije sa stacionarnom fazom, ali može dovesti i do denaturacije željenog proteina (52).

Gel-filtracija se često koristi u laboratoriju. U proizvodnim uvjetima korištenje ove tehnike je ograničavajuće jer je na kolonu moguće nanijeti samo male volumene uzoraka (9). Ukoncentriravanje uzorka može povećati troškove proizvodnog procesa. Ova metoda se najčešće koristi kao zadnji korak pročišćavanja kada je volumen otopine koji je potrebno obraditi smanjen, te kada je potrebno odijeliti agregate i promijeniti pufer. Negativne strane gel-filtracije su duge kolone i polagani protok mobilne faze koji su nužni za postizanje dobre separacije, ali zato

usporavaju proces pročišćavanja (52). Filtracija tangencijalnog tijeka također ukoncentrirava i zamjenjuje otopinu u jednom koraku te polako zamjenjuje gel-filtraciju u industrijskom procesiranju (52).

Multimodalna kromatografija temelji se na elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama te stvaranju vodikovih veza. Primjer ove kromatografije je hidroksiapatit kromatografija (HA) u kojoj se protein na smolu veže ili kationskom izmjenom na HA-fosforil ili temeljem afiniteta za metal (52). Mali bazični proteini se najčešće vežu na multimodalnu kolonu temeljem kationske izmjene, dok kiseli proteini reagiraju primarno temeljem afiniteta za HA-kalcij. Veliki se proteini mogu vezati kombinacijom obaju mehanizama. Hidroksiapatit je dostupan u obliku sferičnih čestica ili u mikrokristaliničnoj formi. Mikrokristalinična forma nije mehanički stabilna što ograničava njezinu upotrebu na jednu seriju proizvoda, dok sferične čestice mogu biti korištene u više ciklusa. Hidroksiapatit kromatografija je korisna za uklanjanje agregata (52). Keramička hidroksiapatit kromatografija koristi se za pročišćavanje rekombinantnih protutijela za uklanjanje proteina A otpuštenog u prethodnom kromatografskom koraku. Također je uspješno korištena za uklanjanje DNA, virusa, endotoksina, proteina stanica domaćina i agregata iz monomernog imunoglobulina G (77). Nedostatci metode su mehanička nestabilnost, nemogućnost ponovnog korištenja i visoka cijena (52).

Da bi se spriječila začepeljivanja kolona koriste se prekolonski filteri ili šireće sfere (engl. *expanded beads*) koji omogućavaju učinkovito pročišćavanje i ukoncentriravanje (9). Princip širećih sfera podrazumijeva čvrst sferični adsorbent s uzlaznim tokom tekućine koji omogućava međusobno udaljšavanje sfera što olakšava protok tekućine i prolazak stanica. Željene molekule se selektivno zadržavaju na adsorbirajućim sferama principima ionske ili afinitetne adsorpcije. Prethodno nije potrebno uklanjati čestična onečišćenja centrifugiranjem ili filtracijom, čime se reduciraju troškovi i trajanje procesa.

Velik dio troškova procesa proizvodnje proteina pripada dijelu procesa koji podrazumijeva izolaciju i pročišćavanje proteina stoga se stalno razvijaju nove cjenovno pristupačnije metode poput onih koje koriste električna, zvučna ili magnetna polja (78). Metode se primjenjuju same ili u kombinaciji s već utvrđenim metodama. Primjerice, magnetne čestice s afintetnim ligandima mogu biti dodane u medij i odijeljene magnetom.

Uklanjanje patogena od iznimne je važnosti kod proizvodnje proteinskih lijekova za primjenu kod ljudi. Lijekovi namijenjeni parenteralnoj primjeni moraju biti sterilni. Potrebno je primjenjivati aseptične tehnike gdje god je to moguće te koristiti odgovarajuće procedure koje uključuju primjenu čistog zraka i mikrobiološku kontrolu korištenih sirovina i opreme. Bakterije se efikasno mogu ukloniti filtracijom kroz filtere promjera pora manjih od 0,2  $\mu\text{m}$ . Sirovine sterilizirane na temperaturama od 121°C koriste se radi smanjivanja rizika onečišćenja bakterijama. U nekim slučajevima proizvodnja se provodi u strogim aseptičkim uvjetima ili se koriste antibiotici (9).

Oprema za pročišćavanja, ako nije za jednokratnu upotrebu, mora biti pogodna za sanitizaciju ili sterilizaciju parom, produljenom izlaganju temperaturi od najmanje 180°C, ili tretmanu sa 1-2 M natrijevim hidroksidom radi depirogenacije.

Procesom pročišćavanja potrebno je osigurati inaktivaciju i uklanjanje potencijalno prisutnih virusa (9). Koncentracija virusa u pročišćenom proizvodu može biti vrlo niska te ih stoga može biti teško detektirati. Virusi mogu biti unijeti nutrijentima ili inficiranim staničnim linijama, ali najčešće se unose putem životinjskog seruma. U proizvodnji lijekova upotrebom stanica sisavaca ili transgeničnih životinja, nužno je imati validirane metode za inaktivaciju i uklanjanje moguće viralne kontaminacije. Metode koje se koriste su toplina, zračenje, ultrazvuk, nanofiltracija, ekstremne pH vrijednosti, detergensi, otapala i neki dezinficijensi. Međutim, ove procedure mogu biti štetne za proizvod, stoga moraju biti dobro evaluirane i validirane.

Velik broj proteina proizvodi se korištenjem gram-negativnih bakterija, stoga je važno da se razine endotoksina spuste na regulatorno dozvoljene razine, odnosno manje od 0,2 intratekalne jedinice po kg tjelesne mase za intratekalnu primjenu (49). Endotoksini su visoko stabilne molekule, otporne na ekstremne temperature i pH, što onemogućava njihovu jednostavnu neutralizaciju bez da se pritom ne izgubi i aktivnost željenog proteina. Razne metode su s različitim uspjehom primijenjene za uklanjanje endotoksina. Neke od korištenih metoda su upotreba afinitetnih smola, adsorbirajućih membrana, kromatografije ionske izmjene i hidrofobnih interakcija (79). Većina metoda za uklanjanje endotoksina dizajnira se za specifični slučaj. Pozitivno nabijeni proteini, poput urokinaza, mogu biti dekontaminirani upotrebom kromatografije anionske izmjene zbog negativnog naboja endotoksina (52). Pročišćavanje

negativno nabijenih proteina kromatografijom anionske izmjene može dovesti do gubitka proteina, zbog vezanja željenog proteina na kolonu zajedno s endotoksinom i posljedično manjeg iskorištenja procesa. Veliki agregati endotoksina mogu biti uklonjeni ultrafiltracijom kada je željeni protein manja molekula, ali to nije moguće primijeniti kada je željeni protein velika molekula zbog preklapanja s veličinom molekule endotoksina. Alkohol se može upotrijebiti za uklanjanje lipopolisaharida iz kompleksa s proteinom, međutim prednost imaju druge predložene nezapaljive alternative alkandiola u kombinaciji s kromatografijom ionske izmjene (80). Evaluirani su različiti faktori koji utječu na uklanjanje endotoksina iz otopine proteina korištenjem kromatografije anionske izmjene (81). Vrijednost pH može se održavati dovoljno visokom da se spriječi prijenos pozitivnog naboja na protein i da se ubrza disocijacija endotoksina vezanog na protein. Volumen smole može se povećati radi sprečavanja zasićenja smole. Za uklanjanje endotoksina iz otopine proteina, korištene su afinitetne smole s imobiliziranim L-histidinom, poli-L-lizinom, poli ( $\gamma$ -metil L-glutamatom) i polimiksinom B (82, 83, 84, 85). Primijenjena je i metoda dvofaznog vodeno micelnog sustava, gdje se surfaktant odjeljuje između dviju faza, micelama bogate i micelama siromašne faze (86). Optimiranjem uvjeta može se postići odjeljivanje proteina u jednu fazu i endotoksina u drugu. Opisano je odjeljivanje zelenog fluorescentnog proteina proizvedenog u *E. coli* u micelama siromašnu fazu, dok su lipopolisaharidi odijeljeni u micelama bogatu fazu (87).

### 3.2.3. Karakterizacija proteina

Biofizička i biokemijska svojstva proteinskih djelatnih tvari moraju biti dobro poznata. Biološka aktivnost proteina posljedica je njihova smatanja u odgovarajuću prostornu strukturu i odgovarajućih postranslacijskih modifikacija, stoga je nužno poznavanje svojstva proteina radi definiranja uvjeta koji će održati njegovu strukturu tijekom proizvodnje, skladištenja i transporta u roku valjanosti proizvoda.

Promjene proteina kao posljedica promjena u slijedu aminokiselina ili vrsti i opsegu postranslacijskih modifikacija mogu dovesti do narušavanja njegove topljivosti i stabilnosti, promjena biološke aktivnosti proteina, vremena poluživota i opsega imunogene reakcije kod pacijenta. Navedeno je razlog zbog kojeg je potrebno ispitati definirane parametre te utvrditi reproducibilnosti procesa proizvodnje između različitih serija proizvodnje proteinskog lijeka prije odobrenja za primjenu kod pacijenta i stavljanja na tržište.

Masena spektroskopija je metoda potvrđivanja željene strukture proteina praćenjem mase proteina ili njegovih fragmenata. Metodom se mogu uočiti promjene u glikozilaciji proteina i varijabilnost u glikozilaciji između različitih proizvodnih serija proteina. Masena spektroskopija također može biti korištena za potvrđivanje sličnosti ili uočavanja razlika između inovativnog proteinskog lijeka i biosličnog lijeka. Razlike u strukturi posljedica su razlika u proizvodnim procesima. Upotrebom tekućinske kromatografije i masene spektroskopije uočene su razlike u glikozilaciji i mutacije aminokiselina teškog lanca između inovativnog monoklonskog protutijela trastuzumaba (Herceptin®, Genetech/Rosch) i njegovog biosličnog lijeka (88).

Masena spektroskopija se može upotrijebiti za karakterizaciju N-vezanih glikana nakon njihovog enzimskog uklanjanja s proteina. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) prikladnija je spektroskopska metoda za ispitivanje O-vezanih glikana (89). Ova je metoda 2008. godine primijenjena za utvrđivanje prisutnosti hipersulfuriranog kondroitin-sulfata kao onečišćenja u heparinu. Namjerno uvedeno onečišćenje dovelo je do imunosne reakcije i smrti pacijenata (90). Onečišćenje je detektirano primjenom 600 MHz NMR spektroskopije pri čemu je utvrđena lokacija, identitet i orijentacija O-glikanskih lanaca (91).

Metode kristalografije X-zraka i NMR-a koriste se za analizu prostorne strukture proteina, ali nisu praktične za rutinsku primjenu (89). Nedostatak metode kristalografija X-zraka je dugotrajnost zbog potrebe za prethodnom kristalizacijom uzorka. Veličina proteina, relativno niska osjetljivost NMR signala i relativno mali broj jezgri koje daju odgovor (izuzev  $^1\text{H}$  izotopa) čine NMR tehniku nepraktičnom za rutinske analize.

Ostale metode koje se koriste za karakterizaciju proteinske strukture su cirkularni dikroizam, fluorescencija, diferencijalna pretražna kalorimetrija, izotermalna kalorimetrija, analitičko ultracentrifugiranje, gel-filtracija (89). Gel-filtracija se koristi za karakterizaciju proteinskih agregata, dok se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti primjenjuje u karakterizaciji glikanskih profila.



### 3.3. Formulacija proteinskog lijeka

Većina proteinskih lijekova primjenjuje se parenteralno, stoga mora biti sterilna. Gotov proizvod mora biti izrađen u aseptičkim uvjetima jer su proteini osjetljivi na toplinu i ne mogu se autoklavirati ili sterilizirati plinom ili ionizirajućim zračenjem (26). Moguće je provesti sterilizaciju membranskom filtracijom neposredno prije punjenja u primarni spremnik (92). Farmaceutski oblik proteinskih lijekova uključuje uglavnom vodene otopine i liofilizirane praške. Voda koja se koristi za proizvodnju gotovog proizvoda mora biti standarda vode za injekcije sukladno europskoj farmakopeji (49).

Ekscipijensi prisutni u proteinskim lijekovima trenutno dostupnim na tržištu su: sredstva za sprječavanje agregacije i adsorpcije proteina, sredstva za puferiranje, konzervansi i antioksidansi, punila, sredstva za prilagodbu izotoničnosti te kriozaštitna i liozaštitna sredstva (93). Prilikom razvoja formulacije proteinskog lijeka potrebno je ispitati i potvrditi kompatibilnost djelatne tvari i ekscipijensa (92). Sredstva za sprječavanje agregacije i adsorpcije proteina su posebno značajni kod neglikoziliranih proteina koji imaju tendenciju agregacije i precipitacije. Proteini koji sadrže velik udio metionina, cisteina, triptofana, tirozina i/ili histidina podložniji su oksidaciji.

Glavna je zadaća primarnog spremnika zaštita formulacije od utjecaja čimbenika koji mogu potaknuti razgradnju proteina tijekom roka valjanosti. Spomenuti čimbenici mogu biti svjetlost, reaktivni plinovi, gubitak otapala, onečišćenje mikroorganizmima.

Odabir primarnog spremnika važan je i iz razloga što u doticaju s formulacijom može potencijalno utjecati na aktivnost i imunogenost proteinskog lijeka. Primarni spremnik i materijali korišteni u izradi moraju biti kompatibilni s proizvodom (94). Hidrofobne površine (npr. staklo spremnika) i lubrikanti (npr. silikonsko ulje za oblaganje tijela i klipova injekcija) mogu potaknuti denaturaciju proteina. Imunogenost proizvoda može biti posljedica reakcije na tvari koje primarni spremnik otpušta u formulaciju ili formulacija uzrokuje njihovo ekstrahiranje. Organske komponente koje se koriste za vulkanizaciju i plastifikaciju mogu prijeći u ljekoviti pripravak s

neobloženih gumenih površina. Metali koje se koriste za izradu injekcija također mogu reagirati sa proizvodom.

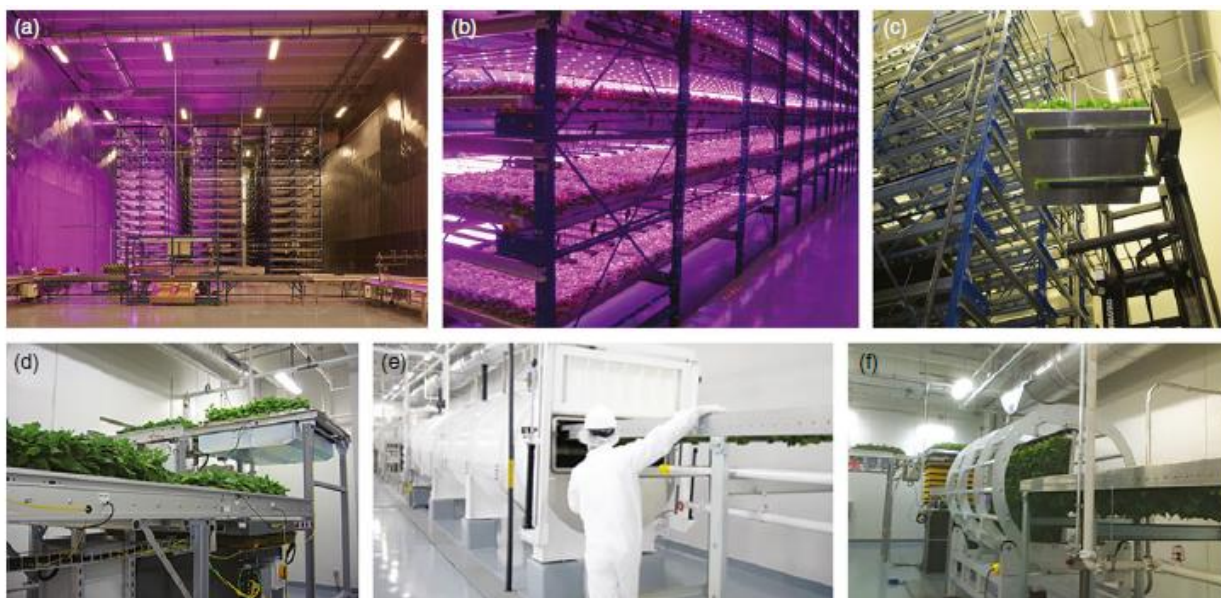
Primarni spremnik lijeka Eprex® koji sadrži djelatnu tvar epoetin (rekombinantni humani eritropoetin, rHuEPO) imao je velik utjecaj na imunogenost proizvoda izazvavši promjenu sastava formulacije (94). Iako rijedak poremećaj, incidencija aplazije eritrocita počela se povećavati 1998. godine kod bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem koji su primali subkutane injekcije rHuEPO, s najvećom incidencijom 2002. godine. Poveznica je napravljena s primjenom lijeka Eprex®. Istraga je utvrdila prisutnost tvari ekstrahiranih polisorbatom 80 iz neobloženih gumenih čepova injekcija kao najvjerojatniji uzrok povećane incidencije aplazije eritrocita posredovane protutijelom. Ekstrahirane tvari identificirane su kao fenolni derivati koji se često koriste kao sredstva za stvrdnjavanje u gumenim čepovima i nisu bili povezani s prethodnim formulacijama proizvoda gdje je umjesto polisorbata 80 kao ekscipijens korišten ljudski serumski albumin. Provedene su i animalne studije primjene ovalbumina s ekstrahiranim tvarima iz neobloženog gumenog čepa koje su potvrdile da navedena kombinacija daje jači imunogeni odgovor od samog ovalbumina. Kada je ovalbumin zamijenjen epoetinalfom, učinak ekstrahiranih fenolnih derivata je povezan sa smanjenjem hematokrita, što je sukladno simptomima aplazije eritrocita. Nakon zamjene neobloženog gumenog čepa obloženim, incidencija aplazije eritrocita se smanjila i vratila na uobičajene razine.

### 3.4. Dobra proizvođačka praksa

Proteinskih lijekovi moraju biti proizvedeni sukladno smjernicama Europske unije za dobru proizvođačku praksu za lijekove (26). Dobra proizvođačka praksa između ostalog podrazumijeva: praćenje zdravstvenog statusa zaposlenika te ograničavanje rada zaposlenika ako njihov zdravstveni status može utjecati na kakvoću i sigurnost proizvoda; sprečavanja kontaminacije česticama, mikroorganizmima, virusima i/ili drugim proizvodima odgovarajućim dizajnom prostora i opreme; osiguravanje otpornosti procesa na manja odstupanja i time osiguravanje smanjene varijabilnosti i povećane reproducibilnosti procesa; poznavanje porijekla i potvrdu prikladnosti početnih materijala (sirovina); karakterizaciju i nadzor onečišćenja banki stanica i sjemenja; postojanje propisanih kriterija prihvatljivosti, operativnih uvjeta i metoda regeneracija kolona; nadzor procesa provedbom procesnih kontrola; odgovarajuće održavanje mjerne opreme; osiguravanje zdravlja transgeničnih životinja i biljaka i sprečavanje onečišćenja proizvoda lijekovima kojima su tretirane životinje ili pesticidima kojima su tretirane biljke; sprečavanje onečišćenja okoliša biološkim materijalom i drugo.

Smjernice dobre proizvođačke prakse ne odnose se na uzgoj biljaka i životinja odnosno proizvodnju proteina u njima. Na uzgoj biljaka koje se koriste za ekspresiju proteina primjenjive su smjernice dobre poljoprivredne i sakupljačke prakse koje podrazumijevaju edukaciju osoblja, korištenje odgovarajuće opreme i odgovarajuće postupanje s biljkama (95). Međutim, Caliber Biotherapeutics primjer je proizvodnog postrojenja za proizvodnju rekombinantnih proteina u cijelim biljkama koje se uzgajaju u kontroliranim uvjetima sukladno smjernicama dobre proizvođačke prakse (96). Slika 15 (a-c) prikazuje automatizirani uzgoj biljke *Nicotiana benthamina* u kontroliranim uvjetima koji smanjuju mogućnost unosa onečišćenja i inficiranja biljke mikroorganizmima. Biljka se uzgaja pod diodom koja emitira svjetlo (engl. *light-emitting diode*, LED) i s automatiziranim dovodom hranjivih tvari u određenim intervalima. Nakon što biljka dovoljno naraste, upotrebom vakuuma unosi se *Agrobacterium tumefaciens* s ekspresijskim konstruktom u biljku (Slika 15, d-f). Proces do unosa ekspresijskog konstrukta može trajati 37-43 dana što ovisi o postavljenom protokolu uzgoja biljke i o proteinu koji će se proizvoditi. Protein kodiran unesenom DNA eksprimira se koristeći stanične mehanizme biljke. Po završetku

ekspresije biljke se automatski homogeniziraju. Homogenat se pročišćava centrifugiranjem i višestrukom filtracijom. Daljnji koraci pročišćavanja podrazumijevaju taloženje temeljem razlike u masi mase, ukoncentriravanje, višestruku izmjenu pufera između više koraka kromatografije. Potom se proizvod ukoncentrirava i pufer se mijenja još jednom prije sterilnog opremanja i krio pohrane. Metode koje se koriste za karakterizaciju finalnog proizvoda su tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom (LC-MS), MALDI-TOF-MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry*), gel permeacijska visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (engl. *Size Exclusion HPLC, SE-HPLC*) te denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).



Slika 15 – Prikaz poluautomatske procedure uzgoja biljaka: (a) Prostor za klijanje biljaka sa zidovima za osiguravanje laminarnog strujanja zraka; (b) uzgoj *N. benthamina* ispod LED svjetla; (c) viličar za premještanje stalaža, (d, e) unos biljaka u prostor za inficiranje; (f) izlaz stalaža iz prostora za infiltraciju i prijenos u prostor za rast biljaka (preuzeto i prilagođeno iz 96).

Proteini koji se u Caliber Biotherapeutics trenutno proizvode namijenjeni su kliničkim istraživanjima. Međutim, ovakvo postrojenje osigurava mogućnost brze reakcije i proizvodnje protutijela i cjepiva u slučaju pojave bioloških prijetnji (96).

Svrha dizajniranja procesa proizvodnje postavljanje je industrijskog procesa proizvodnje koji je sposoban dosljedno proizvoditi proizvod željene kakvoće. Dosljednost procesa proizvodnje potvrđuje se provedbom validacije procesa koji uključuje procese evaluacije i verifikacije (97). Prije svega potrebno je definirati ulazne parametre poput karakteristika materijala i parametara procesa, te izlazne parametre, poput parametara kakvoće, indikatora izvedbe i iskorištenja. Dizajn procesa potrebno je evaluirati provođenjem studija na malim, takozvanim pilot serijama, i/ili komercijalnim serijama s ciljem potvrde dobivanja proizvoda željene kakvoće. Proces je potrebno verificirati, odnosno potvrditi da svaki korak procesa može udovoljiti unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti, na odgovarajućem broju serija komercijalne veličine.

Svi koraci procesa moraju biti uključeni u validaciju, a s obzirom na sam dizajn procesa, mogu uključivati: odmrzavanje spremnika iz radne banke stanica, uzgoj i skupljanje stanica, uništavanje stanične stijenke, ukoncentriravanje i uklanjanje onečišćenja raznim kromatografskim metodama i metodama filtracije, modificiranje međuproizvoda i drugo.

Tijekom validacije proizvodnje u staničnoj liniji potrebno je definirati parametre koji trebaju biti evaluirani. Neki od parametara su: morfološke karakteristike stanica, karakteristike rasta, broj stanica, vijabilnost, biokemijski markeri, sposobnost proizvodnje željenog produkta, stopa potrošnje glukoze ili kisika, stopa proizvodnje amonijaka ili laktata te procesni parametre i uvjeti procesa poput temperature, miješanja, radnog volumena, dodavanja medija i drugo. Uvjeti procesa uzgoja kulture te kriteriji za njegov završetak moraju biti odgovarajuće definirani. Kriteriji za završetak procesa moraju biti odgovarajuće pravdani na temelju informacija o iskorištenju, maksimalnom broju generacija, konzistentnosti staničnog rasta, vijabilnosti, mikrobiološkoj čistoći, konzistentnosti dobivanja djelatne tvari odgovarajuće kakvoće. Aktivnosti verifikacije usmjeravaju se na potvrdu da je kakvoća konzistentna tijekom cijelog trajanja procesa kultivacije kada su uvjeti i parametri procesa unutar prethodno definiranih zahtjeva. Tijekom višekratnih skupljanja biomase tijekom kultivacije jedne stanične linije potrebno je uzeti u obzir starenje stanica te konzistentnost unutar jedne kultivacije i između različitih kultivacija.

Prilikom primjene jednokratne opreme, potrebno je uzeti u obzir količine i načine uklanjanja tvari koje se oslobađaju ili se ekstrahiraju medijem iz materijala od kojeg je oprema napravljena, te je verifikaciju potrebno provesti na različitim serijama jednokratne opreme.

Potrebno je odgovarajuće evaluirati uvjete procesa poput protoka, kapaciteta, duljine i regeneracije kolone kroz njezin očekivani životni vijek.

U slučajevima kada se međuproizvodi čuvaju određeno vrijeme prije nastavka procesa, potrebno je evaluirati utjecaj duljine i uvjeta čuvanja na kakvoću proizvoda.

Potrebno je evaluirati procese uklanjanja i/ili inaktivacije virusa. Porijeklo virusa može biti iz same glavne stanične linije ili virusi mogu biti uvedeni tijekom procesa proizvodnje (98). Virusni mogu biti uvedeni u glavnu staničnu liniju na sljedeće načine: izolacijom stanica iz izvora, upotrebom virusa za uspostavu rekombinantne stanične linije, upotrebom onečišćenih bioloških reagensa poput komponenti životinjskog seruma ili onečišćenjem stanica za vrijeme njihove manipulacije. Tijekom procesa proizvodnje virusi mogu biti uvedeni neodgovarajućim čišćenjem prostora i opreme, korištenjem onečišćenih sirovina i reagensa i neodgovarajućom manipulacijom proizvodom. Smjernica ICH Q5A definira određivanje prisustva virusa u proizvodnji biotehnoloških proizvoda izvedenih iz staničnih linija ljudskog ili životinjskog porijekla i daje smjernice za evaluaciju i karakterizaciju procedura uklanjanja virusa. Odabir virusa za potvrdu učinkovitosti procesa uklanjanja i/ili inaktivacije virusa mora se temeljiti na sličnosti s virusima koji mogu inficirati stanice tijekom procesa.

Materijal dobiven iz transgeničnih životinja koji je potrebno dalje preraditi, često ima veću početnu kontaminaciju mikroorganizmima i virusima, negoli stanične kulture uzgojene u bioreaktorima. Navedeno predstavlja veće opterećenje na daljnje korake pročišćavanja. Proces proizvodnje u transgeničnim životinjama manje je dosljedan, zbog veće varijabilnosti među životinjama u vidu broja kopija gena integriranih u genom, mjesta integracije i razine genske ekspresije. Ekspresija gena može varirati tijekom laktacije i između laktacija. Veća varijabilnost materijala posljedično dovodi do manje dosljednosti koraka pročišćavanja. Zbog toga je potrebno definirati koje količine djelatne tvari u početnom materijalu mogu biti efikasno izolirane i pročišćene odgovarajućim koracima proizvodnog procesa (23). Potrebno je pratiti genetičku stabilnost transgeničnih životinja definiranjem maksimalnog broja generacije ili praćenjem određenih parametara fenotipa, genotipa ili procesa (23).

Proizvodnja u biljkama, kao i proizvodnje u životinjskom organizmu, podrazumijeva potpunu validaciju samo onog dijela proizvodnog procesa koji se odnosi na pročišćavanje i izolaciju produkata.

#### 4. Rasprava

Istražena je dostupna literatura i dan je pregled procesa, materijala i metoda za koje je opisano da se primjenjuju u razvoju i proizvodnji proteinskih lijekova. Utvrđeno je da je industrijska proizvodnja proteinskih lijekova složen proces koji je potrebno dizajnirati na način da se u svakom koraku procesa proizvodnje dobije produkt željenih karakteristika bez prisutnih onečišćenja ili s vrstom i količinom onečišćenja unutar definiranih zahtjeva. Jedino na taj način se može dobiti proteinski lijek koji će dati željeni klinički odgovor u pogledu djelotvornosti i sigurnosti.

Dizajniranje proizvodnog procesa uglavnom podrazumijeva individualan pristup proizvodnji različitih proteina. Pritom se, osim karakteristika proteina i onečišćenja, u obzir uzimaju i željeni prinos procesa i troškovi proizvodnje. U slučaju proizvodnog postrojenja Caliber Biotherapeutics razmišljalo se o osiguravanju prilagodljivosti proizvodnje na način da se istim proizvodnim procesom uz manje izmjene u kratkom vremenu mogu proizvesti različiti proteini. Pristup odabiru svakog koraka procesa, posebno koracima pročišćavanja, treba biti takav da se u obzir uzimaju drugi koraci procesa te upotrijebljena oprema i materijali. Veći broj koraka u procesu proizvodnje i korištenje sofisticiranih metoda analize čine proces proizvodnje proteinskih lijekova složenijim i skupljim od procesa proizvodnje lijekova malih molekula.

Kod odabira najprikladnije formulacije proteinskog lijeka potrebno je temeljito procijeniti sve čimbenike koji mogu imati utjecaja na klinički odgovor. U suprotnom postoji vjerojatnost pojave neželjenih nuspojava u pacijenata, kao što je to bila povećana incidencija aplazije eritrocita zbog neodgovarajućeg spremnika proteinskog lijeka s djelatnom tvari epoetin.

Proizvodni procesi proteinskih lijekova koji su u kliničkoj primjeni nisu uvijek poznati i nisu detaljno opisani u dostupnoj literaturi i stoga u ovome radu nisu opisivani. Međutim, nadležna tijela Europske Unije i Sjedinjenih Američkih Država zadnjih su godina odobrila velik broj biosličnih lijekova koji su proizvedeni neovisno razvijenim proizvodnim procesima (Tablice 4 i 5). Proizvođači biosličnih lijekova nemaju pristup staničnoj liniji originatora, nemaju informacije o korištenoj opremi i sirovinama te o koracima pročišćavanja, stoga se koriste druge stanične linije i razvijaju



drugi proizvodni procesi. Broj odobrenja biosličnih lijekova je u porastu zbog isteka perioda patentne zaštite na inovativne lijekove.

Tablica 4 – Trenutno odobreni bioslični lijekovi u Europskoj Uniji (99).

<b>Naziv lijeka</b>	<b>Nezaštićeni naziv lijeka</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Godina odobrenja</b>
Abasalgar®	Insulin glargin	Eli Lilly Regional Operations GmbH	2014.
Abseamed®	epoetin alfa	Medice Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG	2007.
Accofil®	filgrastim	Accord Healthcare	2014.
Bemfola®	folitropin alfa	Gedeon Richter Plc.	2014.
Benepali®	etanercept	Samsung Bioepis UK Limited	2016.
Binocrit®	epoetin alfa	Sandoz GmbH	2007.
Epoetin Alfa Hexal®	epoetin alfa	Hexal AG	2007.
Filgrastim Hexal®	filgrastim	Hexal AG	2009.
Flixabi®	infliksimab	Samsung Bioepis UK Limited	2016.
Grastofil®	filgrastim	Apotex Europe BV	2013.
Inflectra®	infliksimab	Hospira UK Limited	2013.
Inhixa®	enoksaparin natreij	Techdow Europe BV	2016.
Lusduna®	inzulin glargin	Merck Sharp & Dohme Limited	2017.
Nivestim®	filgrastim	Hospira UK Ltd	2010.
Omintrope®	somatropin	Sandoz GmbH	2006.
Ovaleap®	folitropin alfa	Teva Pharma B.V.	2013.
Ratiograstim®	filgrastim	Ratiopharm GmbH	2008.
Remsima®	infliksimab	Celltrion Healthcare Hungary Kft	2013.
Retacrit®	epoetin zeta	Hospira UK Limited	2007.

Silapo®	epoetin zeta	Stada Arzneimittel AG	2007.
Tevagrastim®	filgrastim	Teva GmbH	2008.
Thorinane®	enoksaparin natrij	Pharmathen S.A.	2016.
Zarzio®	filgrastim	Sandoz GmbH	2009.

Tablica 5. Trenutno odobreni bioslični lijekovi u Sjedinjenim Američkim Državama (100).

Naziv lijeka	Nezaštićeni naziv lijeka	Proizvođač	Godina odobrenja
Amjevita®	adalimumab atto	Amgen	2016.
Erelzi®	etanercept szzs	Sandoz	2016.
Inflectra®	infliksimab dyyb	Pfizer	2016.
Zarxio®	filgrastim sndz	Sandoz	2015.

Opisani procesi proizvodnje, sve osjetljivije metode analize proteina koji su u literaturi navedeni kao uspješno upotrijebljeni, te velik broj regulatorno odobrenih proteinskih lijekova koji su u kliničkoj primjeni, potvrđuju hipotezu da se odgovarajuće postavljenim proizvodnim procesom dobivaju željeni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu.

Odgovarajuće nadziranom i kontroliranom proizvodnim procesom kontinuirano se dobivaju konzistentni produkti proizvodnje proteinskih lijekova koji su prikladni za kliničku primjenu ako se slijede smjernice dobre proizvođačke prakse i postavljeni proizvodni proces. Smjernice dobre proizvođačke prakse moguće je slijediti u određenom opsegu jer se ne odnose na sve korake procesa proizvodnje svih proteinskih lijekova, ali su uspješno primijenjene u proizvodnom postrojenju Caliber Biotherapeutics i na uzgoj biljaka. Ovo ukazuje da je moguće proširiti opseg primjene smjernica i na druge dijelove procesa za koje smjernice trenutno nisu regulatorno obvezujuće.

Dizajnu procesa proizvodnje i održavanju njegove konzistentnosti odnosno kakvoće posljednjih se godina sve više pristupa sistematskim pristupom koji se naziva kakvoća kroz dizajn (engl. *Quality by Design*) (101, 102, 103) i podrazumijeva odstupanje od tradicionalnog pristupa. Tradicionalno je proizvodni proces dizajniran s uskim zahtjevima procesnih parametara i proizvod takvog procesa proizvodnje analiziran je prema unaprijed definiranim zahtjevima. Ako je kakvoća proizvoda bila zadovoljavajuća, izveden je zaključak da je ponavljanjem istog procesa moguće kontinuirano dobivati proizvod iste kakvoće. Kakvoća kroz dizajn podrazumijeva utvrđivanje kritičnih karakteristike kakvoće proizvoda koje su značajne za njegovu sigurnost i djelotvornost, kontrole koje osiguravaju konzistentnu izvedbu procesa, parametre procesa sa širim zahtjevima, validaciju procesa radi potvrđivanja učinkovitosti definiranih kontrolnih strategija i kontinuirano nadziranje procesa radi potvrde njegove robusnosti. Pristup kakvoći kroz dizajn podrazumijeva oslanjanje na znanstveno utemeljene dokaze i provedbu analiza rizika. Osnove za odabir ovog pristupa su upravljanje sirovinama, korištenje statističkih pristupa i procesnih analitičkih tehnologija (engl. *Process Analytical Technology*, PAT). Važno je utvrditi odnose između varijabilnih ulaznih parametara i parametara procesa kod ovog pristupa dizajnu procesa proizvodnje.

Opisan je primjer upotrebe pristupa kakvoća kroz dizajn u dizajniranju procesa pročišćavanja faktora stimulacije kolonije granulocita (GCSF) (102). Prvo je provedena detaljna pretraga literature uključujući dostupne monografije za GCSF i istraživanje komercijalno dostupnih proteinskih lijekova radi utvrđivanja kritičnih karakteristika kakvoće. Utvrđene kritične karakteristike kakvoće uključivale su koncentraciju i biološku aktivnost proteina, onečišćenja srodna proteinskom lijeku za koja je opisano da imaju utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva proteina i promjenu biološke aktivnost te onečišćenja iz procesa (DNA, stanice domaćina, endotoksini). Provedena je analiza rizika kojom su utvrđeni parametri u procesu ponovnog smatanja proteina koje je bilo potrebno detaljnije ispitati. Ispitan je utjecaj temperature, pH, koncentracije ureje, cisteina i inkluzijskih tijela na prinos procesa ponovnog smatanja, koncentraciju proteina i udio pojedinih onečišćenja te su definirani odnosi među varijablama. Ispitivane su kromatografija kationske izmjene, kromatografija anionske izmjene i multimodalna kromatografija. Ispitivane su kolone različitih dobavljača i različiti parametri procesa radi

utvrđivanja optimalnih uvjeta. Utvrđeno je da je prinos procesa najbolji s jednom upotrebom multimodalne kromatografije uz prethodnu prilagodbu pH. Ispitivano je nekoliko metoda analize za kontrolu procesa te su metode uspoređivane prema osjetljivosti, točnosti, otpornosti i vremenu potrebnom za provedbu analize. Odabrane su visoko djelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza i gel permeacijska visoko djelotvorna tekućinska kromatografija. Karakterizacija proizvoda i usporedba s inovativnim proteinskim lijekom i drugim biosličnim lijekovima provedena je upotrebom masene spektroskopije, ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza, gel permeacijske visoko djelotvorne tekućinske kromatografije, cirkularnog dikroizma i denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu. Provedeno je *in vitro* ispitivanje biološke aktivnosti. Potvrđen je strukturni i funkcijski integritet proteina.

Uspoređeni su postojeći komercijalni proces proizvodnje GCSF-a i proizvodni proces postavljen pristupom kakvoće kroz dizajn (Tablica 6). Proces pročišćavanja postavljen pristupom kakvoće kroz dizajn sastoji se od ponovnog smatanja proteina, prilagodbe pH, filtracije i jednog koraka multimodalne kromatografije. Postojeći komercijalni proces proizvodnje sastoji se od ponovnog smatanja proteina, izmjene pufera upotrebom ultrafiltracije ili gel filtracijske kromatografije, 3 do 4 koraka kromatografskog pročišćavanja s izmjenama pufera prema potrebi. Proces pročišćavanja postavljen pristupom kakvoća kroz dizajn rezultirao je boljim prinosom procesa i skraćivanjem vremena proizvodnje što značajno smanjuje troškove proizvodnje.

Tablica 6 – Usporedba komercijalnog procesa proizvodnje GCSF-a i procesa postavljenog pristupom kakvoća kroz dizajn (preuzeto i prilagođeno iz 102).

<b>Karakteristika</b>	<b>Komercijalni proces proizvodnje</b>	<b>Proces proizvodnje postavljen pristupom kakvoća kroz dizajn</b>
Prinosi pojedinih koraka procesa	Ponovno smatanje 40-60% Izmjena pufera 75-80% 3-4 koraka kromatografije 30-45%	Ponovno smatanje >70% Prilagodba pH 100% 1 korak kromatografije 80-85%
Ukupni prinos procesa	9-22%	>55%
Trajanje procesa	3-4 dana	<1 dan

Opisana je i upotreba pristupa kakvoća kroz dizajn u procesu kultivacije CHO stanica u proizvodnji monoklonskih protutijela (103). Provedena je analiza rizika i utvrđena su 4 potencijalno kritična procesna parametra koja uključuju vijabilnosti, trajanje kultivacije, pH i temepraturu. Odnosi između ovih parametara i varijabilnost ulaznog materijala eksperimentalno su ispitivani te su uspješno određene granice raspona za vrijednosti kritičnih procesnih parametara (engl. *design space*). Pristup kakvoća kroz dizajn podrazumijeva dobro poznavanje odnosa između varijabilnosti ulaznog materijala, parametra procesa 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 karakteristika. Ovim se omogućava smanjenje varijabilnosti između produkata proizvodnje različitih serija procesa.

## 5. Zaključci

Dostupan je velik broj procesa i metoda koji mogu biti upotrijebljeni za dizajniranje i nadzor procesa proizvodnje, izolacije i pročišćavanja proteinskih lijekova. Dizajnu procesa proizvodnje svakog proteinskog lijeka potrebno je pristupiti pojedinačno, prije svega uzimajući u obzir strukturne karakteristike proteina koje trebaju biti očuvane tijekom cijelog procesa proizvodnje. Prikladnost procesa potvrđuje se kontinuiranim nadzorom karakteristika dobivenih proteinskih djelatnih tvari i farmaceutskog oblika proteinskog lijeka te potvrđivanjem njihove sukladnosti postavljenim zahtjevima. Odgovarajuće postavljenim, nadziranim i kontroliranim proizvodnim procesom dobivat će se željeni produkti proizvodnje prikladni za kliničku primjenu.

## 6. Literatura

1. Overtone TW Recombinant protein production in bacterial host. *Drugs Discov Today* 2014; 19(5):590-601.
2. Oosting RS. *Molecular Biotechnology: From DNA Sequence to Therapeutic Protein*. U: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, ur. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications Fourth Edition*. Springer; 2013, str. 1-18.
3. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnol* 2010; 28: 917-24.
4. Sabalza M, Christou P, Capell T. Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economical bottlenecks. *Biotechnol Lett* 2014; 36(12):2367-79.
5. Alberts B. *Molecular biology of the cell Fifth Edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group LLC; 2008.
6. Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ. *Becker's world of the cell Eight Edition*. Pearson; 2012.
7. Arakawa T, Philo JS. *Biophysical and Biochemical Analysis of Recombinant Proteins*. U: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, ur. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications Fourth Edition*. Springer; 2013, str. 19-45.
8. European Medicines Agency. *Guideline on Development, Production, Characterisation and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Information (EMA/CPMP/BWP/157653/2007)*. 2008. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003074.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003074.pdf). Pristupano: 17.09.2016.
9. Kadir F, Ives P, Luitjens A, van Corven E. *Production and Purification of Recombinant Proteins*. U: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, ur. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications Fourth Edition*. Springer; 2013, str. 46-67.
10. Davis JD, Deng R, Boswell CA, Zhang Y, Li J, Fielder P i sur. *Monoclonal Antibodies: From Structure to Therapeutic Application*. U: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, ur.

Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications Fourth Edition. Springer; 2013, str. 143-178.

11. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeast and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013; 40: 257-274.
12. Liu X, Yang Y, Zhang W, Sun Y, Peng F, Jeffrey L i sur. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium glutamicum*: progress, challenges and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36(4):652-64.
13. Sugiki T, Fujiwara T, Kojima C. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2014; 9(10):1189-204.
14. Mamat U, Wilke K, Bramhill D, Schromm AE, Lindner B, Kohl TA i sur. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbl Cell Fact* 2015; 14:57.
15. Kim H, Yoo SJ, Kang HA. Yeast sythetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res* 2015; 15(1):1-16.
16. Meehl MA, Stadheim TA, Biopharmaceutical discovery and production in yeast. *Curr Opin Biotechnol* 2014; 30: 120-127.
17. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bora R, Rumbold K, Luecki J i sur. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brassiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif* 1997; 11, 61-71.
18. Werton MWT, van der Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. High-yield secretion of recombinant gelatines by *Pichia pastoris*. *Yeast* 1999; 15:1087-1096.
19. Morrow KJ. Improving protein production processes. *Gen Eng. News* 2007; 27:50-54.
20. Le H, Vishwanathan N, Jacob NM, Gadgil M, Hu W. Cell line development for biomanufacturing processes: recent advances and na outlook. *Biotechnol Lett* 2015; 37(8):1553-64.
21. Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol* 2014; 34(4):281-99.



22. Watson E, Shah B, Leiderman L, Hsu YR, Karkare S, Lu HS, Lin FK. Comparison of N-linked oligosaccharides of recombinant human tissue kallikrein produced by Chinese hamster ovary cells on microcarrier beads and in serum-free suspension culture. *Biotechnol Prog.* 1994; 10(1):39-44.
23. European Medicines Agency. Guideline on Quality of biological active substances produced by transgene expression in animals (EMA/CHMP/BWP/151897/2013) 2013. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/06/WC500144136.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/06/WC500144136.pdf). Pristupano 17.09.2016.
24. Maeda S, Schertler GF. Production of GPCR and GPCR complexes for structure determination. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23(3):381-92.
25. The European parliament and council. Directive 2001/18/EC on deliberate release into the environment of genetically modified organisms. *Official Journal of the European Communities.* 2001; 106/1. Dostupno na: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018>. Pristupano: 17.09.2016.
26. Commission Directive 2003/94/EC laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. *Official Journal of European Union.* 2003; L262/22. Dostupno na: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32003L0094>. Pristupano: 22.03.2016.
27. European Commission. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4. EU guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 2 Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human and Veterinary use, Ref.Ares (2012)778531. Dostupno na: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/vol4-an2\\_2012-06\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/vol4-an2_2012-06_en.pdf). Pristupano: 22.03.2016.
28. Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Pezzotti M, Avesani L. Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *Biomed Res Int* 2014; 2014:136419.

29. Tekoah Y, Shulman A, Kizhner T, Ruderfer I, Fux L, Nataf Y i sur. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the protalix experiment. *Plant Biotechnol J* 2015; 13:1199-1208.
30. Nkiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA i sur. Transgenic expression and recorvery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J* 2006, 4:77-85.
31. Rasala BA, Mayfield SP. Photosythetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutirtional and medical uses. *Photosyath Res.* 2015; 132(3):227-39.
32. Almaraz-Delgado AL, Flores-Uribe J, Pérez-Espana VH, Salgado-Manjarrwz E, Badillo-corona JA. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express* 2014; 4:57.
33. Akbari F, Eskandani M, Khosroushahi AY. The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins. *World J Micorbiol Biotechnol* 2014; 30(11):2783-96.
34. Royel K, Kontoravdi C. A systems biology approach to optimising hosts for industrial protein production. *Biotechnol Lett* 2013; 35(12):1961-9.
35. Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. Codon optimization can improve expression of human genes in Eschericha coli: a multi-gene study. *Protein Expr and Purif* 2008; 59(1):94-102.
36. European Medicines Agency. Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates used for Production of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/294/95). 1998. Dostpuno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003280.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003280.pdf). Pristupano: 24.03.2016.
37. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Derivation and Characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q5D. 1997. Dostupn na:

- [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf). Pristupano: 24.03.2016.
38. European Medicines Agency. Guideline on the Quality of Biological Active Substances Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants (EMA/CPMP/BWP/48316/2006). 2008. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003154.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003154.pdf). Pristupano: 06.06.2016.
39. European Commision. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 rev.3.) *Official Journal of the European Union*. 2011. C 73/1-18. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003700.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003700.pdf). Pristupano: 06.06.2016.
40. Almo SC, Love JD. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol* 2014; 26:39-43.
41. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein Expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98(12):5301-5317.
42. Baez A, Shiloach J. Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts and cell propagated for production of biological compounds. *Microb Cell Fact* 2014; 19:13:181.
43. Klegerman M.E., Groves M.J. *Pharmaceutical biotechnology*. Interpharm Press, Buffalo, Grove. 1992.
44. Sartorius Stedim Biotech SA. Dostupno na: <http://microsite.sartorius.com/single-use-technology/products/flexelr-3d-bioprocessing.html>. Pristupano: 17.12.2016.
45. Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012; 39:383-399.
46. Hahn TJ, Goochee CF. Growth-associated glycosylation of transferrin secreted by HepG2 cells. *J Biol Chem* 1992; 267:23982-7.

47. Simon M, Giner-Casares JJ. Adherent cell culture in biopharmaceutical applications: the cell detachment challenge. *Biopharm Int* 2016;29(3):26-31.
48. Fisher R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv* 2012; 30:434-439.
49. European Directorate for the Quality of Medicines and Helathcare. *European Pharmacopoeia*. 2011.
50. Wang W, Ignatius AA, Thakkar SV. Impact of Residual Impurities and Contaminats on Protein Stability. *J Pharma Sci* 2014; 103:1315-1330.
51. Zhou S, Schoneich C, Singh SK. Biologics formulation factors affecting metal leachables from stainless steel. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(1):411-421.
52. Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B, Holthoffer H, Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *Biomed Res Int* 2013; 2013:312709.
53. Bhut BV, Christensen KA, Husson SM. Membrane chromatography: protein purification from *E. coli* lysate using newly designated and commercial anion-exchange stationry phases. *J Chromatogr A* 2010; 1217(30):4946-4957.
54. Boi C, Dimartino S, Hoefler S, Horak J, Williams S, Sarti GC i sur. Influence of different spacer arms on Mimetic Ligand A2P and B14 membranes for human IgG purification. *J Chromatogr B Analyt Technol biomed Life Sci* 2011; 879(19):1633-1640.
55. Orr V, Scharer J, Moo-Young M, Honeyman CH, Fenner D, Crossley L i sur. Simultaneous clarification of *Escherichia coli* culture and purification of extracellularly produced penicillin G acylase using tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatografy. *J Chromatogr B Analyt Technol biomed Life Sci* 2012; 900:71-78.
56. Kurnik RT, Yu AW, Blank GS, Burton AR, Smith D, Athalye AM. i sur. Buffer exchange using size exclusion chromatography, countercurrent dialysis, and tangential flow filtration: models, development, and industrial application. *Biotechnol Bioeng* 1995; 45(2):149-157.
57. Aspelund MT, Glatz CE. Purification of recombinant plant-made protiens from corn extracts by ultrafiltration. *J Memb Sci* 2010; 353(1-2):103-110.

58. Mameri N, Oussedik SM, Khelifa A, Belhocine D, Ghrib H, Lounici H. Electric fields applied in the ultrafiltration process. *Desalination* 2001; 138(1-3):291.
59. Ahmad AL, Ibrahim N. Automated electrophoretic membrane cleaning for dead-end microrfiltration and ultrafiltration. *Sep Purif Technol* 2006; 29(2):105-112.
60. Suslick KS., Sonochemistry. *Science* 1990; 247:1439-1445.
61. Suslick KS. *Ultrasound: Its Chemical, Physical and Biological Effects*, VCH, New York, NY, USA, 1988.
62. Wakeman RJ, Tarleton E. Modelling, simulation and process desing of the fitler cycle. *Filtr and Sep* 1990; 27(6):412-419.
63. Wakeman RJ, Williams CJ. Additional techniques to improve microfiltration. *Sep Purif Technol* 2002; 26(1):3-18.
64. Christy C, Adams G, Kuriyel R, Bolton G, Seilly A. High-performance teangential flow filtration: a highly selective membrane separation process. *Desalination*. 2002; 144(1-3):133-136.
65. Saxena A, Tripathi BP, Kumar M, Shahi VK. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: and overview. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009; 145(1-2):1-22.
66. van Reis R, Gadam S, Frautschy LN, Orlando S, Goodrich EM, Saksena S i sur. High performance tangential flow filtration. *Biotechnonol Bioeng* 1997; 56(1):71-82.
67. Van Eijndhoven RHCM, Saksena S, Zydney AL. Protein fractionation using electrostatic interactions in membrane filtration. *Biotechnonol Bioeng* 1995; 48(4):406-414.
68. Azevedo AM, Fonseca LP, Prazeres DM. Two-phase affinity partitioning of animal cells: implications of multipoint interactions. U: Gupta MN ur *Method for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins*. Springer 2002; 163-180.
69. Kamei DT, King JA, Wang DIC, Blankschtein D. Understanding viral partitioning in two-phase aqueous non-ionic micellar systems: 2. effect of entrained micelle-poor domains. *Biotechnonol Bioeng* 2002; 78(2):203-216.

70. Kepka C, Rhodin J, Lemmens R, Tjerneld F, Gustavsson PE. Extraction of plasmide DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. *J Chromatogr* 2004; 1024(1-2):95-104.
71. Bensch M, Selbach ., Hubbuch J. High throughput screening techniques in downstream processing: preparation, characterisation and optimisation of aqueous two-phase systems. *Chem Eng Sci* 2007; 62(7):2011-2021.
72. Li M, Peeples TL. Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B Analyt Technol biomed Life Sci* 2004; 807(1):69-74.
73. Kepka C, Collet E, Persson J, Ståhl A, Lagerstedt T, Tjerneld F. i sur. Pilot-scale extration of an intracellular recombinant cutinase from *E. coli* cell homogenate using a thermoseparating aqueous two-phase system. *J Biotechnol* 2003; 103(2):165-181.
74. Waziri SM, Abu-Sharkh AF, Ali SA. Protein partitioning in aqueous two-phase systems composed of a pH-responsive copolymer and poly(ethylene glycol). *Biotechnol Prog* 2004; 20(2):526-532.
75. Nilsson A, Mannesse M, Egmond MR, Tjerneld F. Cutinase-peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: prediciton of partitioning and enhanced tagefficiency by detergent addition. *J Chromatogr A* 2002; 946(1-2):141-155.
76. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol* 2014; 19;5:63.
77. Gagnon P, Ng P, Zhen J, Aberin C, He J, Mekosh H i sur. A ceramic hydroxyapatite based purification platform: simulataneous removal of leached protein A, aggregates, DNA and endotoxins. *Bioprocess Int* 2006; 4(2):50-60.
78. Šafarík I, Šafaríková M. Overview of magnetic separations used in biochemical and bitechnological applicatiuons. U: Häfeli U, Schütt W, Teller J, Zborowski M. ur. *Scientific and Clinical Applications of Mangetic Carriers*. Springer 1997; 323-340.

79. Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TCV, Pessoa Jr A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci* 2007; 10(3):388-404.
80. Lin MF, Williams C, Murray MV, Ropp PA. Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharides complex by nonflammable solvents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 816(1-2):167-174.
81. Chen RH, Huang CJ, Newton BS, Ritter G, Old LJ, Batt CA. Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography. *Protein Expr Purif* 2009; 64(1):76-81.
82. Karplus TE, Ulevitch RJ, Wilson CB. A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions. *J Immunol Methods*. 1987; 105(2):211-220.
83. Anspach FB, Hilbeck O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J Chromatogr A*. 1995; 711(1):81-92.
84. Matsumae H, Minobe S, Kindan K, Watanabe T, Sato T, Tosa T. Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilised histidine. *Biotechnol Appl Biochem* 1990; 12(2):129-140.
85. Sakata M, Kawai T, Ohkuma K, Ihara H, Hirayama C. Reduction of endotoxin contamination of various crude vaccine materials by gram-negative bacteria using aminated poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) spherical particles. *Biol Pharm Bull* 1993; 16(11):1065-1068.
86. Liu CL, Kamei DT, Kind JA, Wang DIC, Blankschtein D. Separation of proteins and viruses using two phase aqueous micellar systems. *J Chromatogr B* 1998; 711(1-2):127-138.
87. Lopes AM, Magalhães PO, Mazzola PG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JC, Penna TC i sur. LPS removal from *E. coli* fermentation broth using aqueous two-phase micellar system. *Biotechnol Prog* 2010; 30(6):1644-1653.
88. Xie H, Chakraborty A, Ahn J, Yu YQ, Dakshinamoorthy DP, Gilar M i sur. Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. *MAbs*. 2010; 2:379-394.

89. Berkowitz SA, Enger JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(7):527-40.
90. Hedlund KD, Coyne DP, Sanford DM, Huddelson J. The heparin recall of 2008. *Perfusion*. 2013; 28(21):61-5.
91. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi A, Viswanathan K, Bisio A i sur. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol*. 2008; 26:669-675.
92. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for proprietary medicinal products. Development Pharmaceuticals for Biotechnological and Biological Products (CPMP/BWP/328/99), Annex to Note for Guidance on Development Pharmaceuticals (CPMP/QWP/155/96). 1999. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003603.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003603.pdf). Pritupano: 06.06.2016.
93. Crommelin DJA. Formulation of Biotech Products, Including Biopharmaceutical Considerations. U: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, ur. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications Fourth Edition*. Springer; 2013, str. 68-99.
94. Sharma B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: Impact of container closures. 2007. *Biotechnol Adv* 2007. 25:318-324.
95. European Medicines Agency. Guideline on Good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin (EMA/HMPC/246816/2005). 2005. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003362.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003362.pdf). Pritupano: 23.03.2016.
96. Holtz BR, Berquist BR, Bennett LD, Kommineni VJM, Muniguntti RK, White EL. Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals. *Plant Biotechnol J* 2015: 13:1180-1190.



97. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use. 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. 2016. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/04/WC500205447.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/04/WC500205447.pdf). Pristupano: 17.09.2016.
98. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Line of Human or Animal Origin. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q5A (R1). 1999. Dostupno na: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5A\\_R1/Step4/Q5A\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1_Guideline.pdf). Pristupano: 17.09.2016.
99. European Medicines Agency. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fepar\\_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=searchByAuthType&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Withdrawn&status=Suspended&status=Refused&keyword=Enter+keywords&searchType=name&taxonomyPath=&treeNumber=&searchGenericType=biosimilars&genericsKeywordSearch=Submit](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=searchByAuthType&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Withdrawn&status=Suspended&status=Refused&keyword=Enter+keywords&searchType=name&taxonomyPath=&treeNumber=&searchGenericType=biosimilars&genericsKeywordSearch=Submit). Pristupano: 18.03.2017.
100. Food and Drug Administration. Dostupno na: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/UCM439049.pdf>. Pristupano: 18.03.2017.
101. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Pharmaceutical Development Q8(R2). 2009. Dostupno na: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf). Pristupano: 17.09.2016.

102. Rathore AS. Quality by Design (QbD)-Based Process Development for Purification of a Biotherapeutic. *Trends Biotechnol* 2016; 34(5):358-70.
103. Nagashima H, Watari A, Shinoda Y, Okamoto H, Takuma S. Application of a quality by design approach to the cell culture process of monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a design space. *J Pharm Sci* 2013; 102(12):4274-83.

## 7. Životopis

OSOBNI PODATCI	
Prezime i ime:	Gračić Nikolina
Adresa:	[REDACTED]
Broj mobilnog telefona:	[REDACTED]
E-mail:	ngracic@gmail.com
Državljanstvo:	Hrvatsko
Datum rođenja:	[REDACTED]
Spol:	Ženski
RADNO ISKUSTVO	
10/2015 -	Specijalist osiguranja kvalitete za upravljanje dobavljačima i ugovornom suradnjom JGL d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska
01/2015-10/2015	Specijalist osiguranja kvalitete za ugovornu suradnju JGL d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska
05/2013-12/2014	Asistent za poslove puštanja u promet JGL d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska
06/2012-05/2013	Specijalist osiguranja kvalitete za puštanje u promet – pripravnik JGL d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska
10/2010-06/2012	Pripravnički staž, Zdravstveni djelatnik (magistar farmacije) Zdravstvena ustanova ljekarne „Jadran“ Rijeka, Trg Vlačića – Flaciusa 3, 51 000 Rijeka, Hrvatska
OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE	
02/2015-	Poslijediploski specijalistički studij Razvoj lijekova Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
06.12.2011.	Položen stručni ispit za magistre farmacije Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske

10/2005-06/2010      Magistar farmacije  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

09/2001-06/2005      Opća gimnazija  
Prva riječka hrvatska gimnazija, Rijeka

**OSOBNJE VJEŠTINE I  
KOMPETENCIJE**

Materinski jezik      Hrvatski

Drugi jezici  
(Samoprocjena  
prema  
Zajedničkom  
europskom  
referentnom  
okviru)

	Razumijevanje		Govor		Pisanje
	Slušanje	Čitanje	Slušanje	Čitanje	Pisanje
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1
Talijanski jezik	B1	B1	A2	A2	A2
Njemački jezik	B1	B1	A2	A2	A2

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

Druge vještine i kompetencije      Poznavanje Microsoft Office paketa, služenje Internetom

Seminari      Pharmaceutical contracts: GMP and Legal compliance, European compliance academy, Berlin, 19.-20.03.2013.  
Nutritional support in cancer, ESPEN – The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism, Ljubljana, 16.06.2012.  
5th Master Class in Oncology Pharmacy, European Society of Oncology Pharmacy, Zagreb, 21.-25.11.2011.