



Gibanje

MLADI RAZISKOVALCI KOROŠKE

Raziskovalno področje: farmacija

**PRIPRAVA MODELA ZA OPTIMIZACIJO
PROIZVODNJE BIOLOŠKIH IZDELKOV**

Raziskovalna naloga

Avtorja: Zala Špoljar Slivnik, 3. b, in Tilen Štifter, 3. b

Mentorji: mag. Judita Čas Krneža, dr. Rok Brišar

Leto izdelave: 2023/2024

Šola: ŠC Ravne na Koroškem, Gimnazija Ravne na Koroškem

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA.....	6
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	7
POVZETEK	8
ABSTRACT	9
1 Uvod.....	10
1.1 Namen naloge	11
1.2 Metode dela in hipoteze	11
2 TEORETIČNI DEL.....	13
2.1 Opredelitev pojmov	13
2.1.1 Opredelitev pojma biološka zdravila	13
2.1.2 Opredelitev pojma upstream	14
2.1.3 Opredelitev pojma downstream	16
2.1.4 Opredelitev pojma N-1 perfuzija (»n minus ena«)	17
3 PRAKTIČNO-RAZISKOVALNI DEL	22
3.1 Pomen nacepitvene koncentracije celic v proizvodnji bioloških izdelkov in učinkovitost perfuzije N-1	22
3.1.1 Vpliv nacepitvene koncentracije celic na produkcijo zdravilne učinkovine.....	22
3.1.2 Vpliv nacepitvene koncentracije na količino proizvedenega produkta v procesu MS	25
3.1.3 Učinkovitost perfuzije N-1 v proizvodnji bioloških izdelkov	27
3.2 Povečava produktivnosti obrata z različnimi ukrepi in N-1 perfuzijo.....	28
3.3 Matematični modeli proizvodnje bioloških izdelkov	31
4 Interpretacija in zaključek	38
4.1 Interpretacija rezultatov	38
4.2 Zaključek	40
5 Viri in literatura	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava velikosti in kompleksnosti molekul različnih zdravil (prirejeno po: Yale school of medicine, 2021)	13
Slika 2: Upstream proces (Prirejeno po: Upstream process in biotechnology, 2020).....	15
Slika 3: Shematski prikaz downstream procesa (prirejeno po: PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, in May/June 2015)	16
Slika 4: Shematski prikaz bioreaktorja (prirejeno po: General structure of a continuous stirred-tank type bioreactor, Wikipedia, 2024).....	18
Slika 5: Primer zibalnega bioreaktorja v proizvodnji (fotografija iz proizvodnje).....	18
Slika 6: Bioreaktor in njegovi sestavni deli v proizvodnji bioloških učinkovin (fotografija iz proizvodnje)	19
Slika 7: Shema ATF in TFF perfuzije N-1 (prirejeno po: N-1 perfusion ATF in TFF scheme, 2019, eScience direct)	21
Slika 8: Količina produkta v različnih procesih (povzeto po: Intensified fed-batch and fed-batch, ResearchGate, 2024).....	21
Slika 9: Shema bioreaktorskih konfiguracij	31
Slika 10: Shematski prikaz konfiguracije 2 N-1, 3 MS BR	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razlaga okrajšav in simbolov.....	7
Tabela 2: Hipoteze	12
Tabela 3: Trajanje procesa z N-1 perfuzijo	29
Tabela 4: Trajanje procesa brez N-1 perfuzije	29
Tabela 5: Primerjava letnega števila serij	30
Tabela 6: Model utilizacije opreme.....	32
Tabela 7: Utilizacija opreme pri različnih BR konfiguracijah	33
Tabela 8: Letno št. serij pri različnih BR konfiguracijah	34
Tabela 9: Bioreaktorska konfiguracija 2 N-1 BR na 3 MS BR.....	36
Tabela 10: Finančna primerjava fed-batch procesa in N-1 perfuzije	37
Tabela 11: Potrjene in ovržene hipoteze	39

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava dosežene KŽC v perfuzijskem procesu N-1 in v navadnem procesu N-1.	20
Graf 2: Vpliv različnih nacepitvenih koncentracij ŽC na nadaljnjo rast koncentracije ŽC	22
Graf 3: Rast celic in pogoji v BR	23
Graf 4:4.1-4.4: Začetek produkcijske faze procesa glede na različne KŽC	25
Graf 5: Predvidevana in dejanska količina produkta glede na različne nKŽC	26
Graf 6; Dosežene KŽC v različnih procesih	27
Graf 7: Količina produkta pri različnih prestage procesih po vstopu v MS	28

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentorici, profesorici kemije, mag. Juditi Čas Krneži, ki nama je omogočila izvajanje raziskovalne naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujema podjetju Novartis d.o.o Mengeš, ki nama je omogočilo vpogled v svoje proizvodne prostore in samo izdelavo raziskovalne naloge pod njihovim okriljem. Hvala dr. Vesni Stergar, ki naju je sprejela v podjetju in nama predstavila raziskovalne možnosti. Iskrena hvala pa tudi dr. Roku Brišarju, ki je kot zunanji mentor podjetja bdel nad najinim delom in nama pomagal z razlagami, dodatnimi primeri ter naju spodbujal, da je raziskovalna naloga nastala v pričujoči obliki. Zahvaljujema se tudi prof. Luciji Mirkac, ki je poskrbela za lektoriranje raziskovalne naloge, ter vsem ostalim, ki ste kakorkoli pripomogli k temu, da je raziskovalna naloga takšna.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

	Pomen
BR	bioreaktor
US	upstream
DS	downstream
MS	produkcijski del procesa
N-1	N-1 perfuzija
g/L	gram na liter
KŽC	koncentracija živih celic
nKŽC	nacepitvena koncentracija živih celic
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (chinese hamster ovarian cells)
μ	specifična celična produktivnost

Tabela 1: Razlaga okrajšav in simbolov

POVZETEK

V tem času nenehnega razvoja in napredka, ko se znanost neustavljivo premika naprej, je optimizacija procesov ključnega pomena za uspešnost in učinkovitost proizvodnje v biofarmaceutski industriji. Ta raziskovalna naloga je posvečena optimizaciji N-1 perfuzije, ene izmed najnovejših tehnik v proizvodnji biofarmaceutskih izdelkov.

N-1 perfuzija, ki predstavlja predzadnjo stopnjo v bioreaktorski kaskadi, se uvaja v več proizvodnih obratih z namenom povečanja proizvodnih kapacitet in s tem zagotavljanja potreb pacientov povsod po svetu. V zgodnjih fazah implementacije te tehnike je njena optimizacija pogosto zapostavljena, kar lahko vodi do zmanjšanja učinkovitosti in donosnosti celotnega procesa.

Raziskovalno delo, ki ga bova predstavila, se osredotoča na načine za izboljšanje učinkovitosti in optimizacijo N-1 perfuzije. Najin cilj je razumeti, kako lahko spremembe v tem postopku vplivajo na kapaciteto proizvodnega obrata in kako lahko s pomočjo tehnoloških inovacij izboljšamo in optimiziramo ta proces. Tako smo se skozi to raziskovalno delo podali na potovanje odkrivanja, kako lahko optimizacija N-1 perfuzije vodi do boljše proizvodnje biofarmaceutskih izdelkov, zmanjša odpadke in izboljša donosnost.

Tekom raziskovalnega dela sva ustvarila simulacijski model, s pomočjo katerega sva preučila različne možnosti ureditve proizvodnega obrata. S pomočjo zbranih podatkov sva izrisala grafe za primerjavo navadnega fed-batch procesa in procesa z N-1 perfuzijo. Prek modela za primerjavo utilizacije proizvodne opreme v teh dveh procesih sva določila ugodnejšo ureditev v obratu. Raziskovala sva tudi pomen nacepitvene koncentracije celic in njeno povezavo s količino nastalega produkta. Na podlagi ugotovitev sva ustvarila sheme bioreaktorskih konfiguracij v proizvodnji in primerjala njihovo ekonomičnost. Nazadnje sva ustvarila tudi lasten matematični model inovativne bioreaktorske konfiguracije, ki v proizvodnji trenutno ni ustaljena, a bi lahko z njegovo implementacijo bistveno izboljšali produktivnost proizvodnega obrata.

Ključne besede: biološka zdravila, N-1 perfuzija, razvoj, proizvodnja, (farmaceutska) industrija, biološke molekule

ABSTRACT

In this time of constant development and progress, when science is moving forward relentlessly, process optimization is crucial for the success and efficiency of production in the biopharmaceutical industry. This research project is dedicated to the optimization of N-1 perfusion, one of the latest techniques in the production of biopharmaceutical products.

N-1 perfusion, which is the last subcultivation step in the bioreactor cascade, is being implemented in multiple production plants with the aim of increasing production capacity and thus meeting the needs of patients worldwide. In the early stages of implementing, the optimization of this technique is often neglected, which can lead to a decrease in overall process efficiency and productivity.

The research work we will present focuses on ways to improve the efficiency and optimize N-1 perfusion in real life production plant. Our goal is to understand how changes in this process can impact the capacity of the production plant and how technological innovations can help us improve and optimize this process. Through this research, we embarked on a journey to understand how optimizing N-1 perfusion can lead to better production of biopharmaceutical products, reduce waste, and improve productivity.

During the research work, we created a simulation model to study various arrangements of the production plant. By analyzing data we were able to compare the regular fed-batch process with the N-1 perfusion process. Using the model to compare equipment utilization in these two processes, we determined the more favorable arrangement in the plant. We also explored the importance of inoculation cell density and its connection to the quantity of the product produced. Based on our findings, we also created bioreactor configuration schemes in production and compared their cost-effectiveness. Finally, we created our own mathematical model of an innovative bioreactor configuration, which is not currently established in production. Its implementation could, however, significantly improve the productivity of the production plant.

Key words: biopharmaceuticals, N-1 perfusion, development, production, (pharmaceutical) industry, biological molecules

1 Uvod

Živimo v sodobnem času, sodobni družbi, kjer so nam na vsakem koraku dostopne vse življenjsko pomembne stvari. Tega se niti ne zavedamo, niti temu ne posvečamo pretirane pozornosti, dokler vse s primernim tokom teče dalje, iz dneva v dan, iz meseca v mesec in iz leta v leto. Šele takrat, ko grejo stvari narobe, se zavemo, kako lepo je naše življenje brez zdravstvenih težav. Pogosto jih pozdravimo antibiotiki, po katere se lahko sprehodimo do lekarne in v nekaj dneh preženejo bolezen. Problem nastane, ko je za naše zdravljenje potrebno dražje in težje dostopno zdravilo, kakršne so po navadi biološke učinkovine.

Sva dijaka tretjega letnika Gimnazije Ravne na Koroškem in odločila sva se, da izdelava raziskovalno nalogo o pripravi modela za optimizacijo proizvodnje bioloških izdelkov. Zanimala so naju predvsem biološka zdravila, za katera bi lahko rekli, da včasih celo čudežno pripomorejo k izboljšanju zdravstvenega stanja posameznika. Ker pa so biološka zdravila zaradi izredno dolgega proizvodnega procesa precej nedostopna tako finančno kot tudi fizično, sva se ukvarjala predvsem s postopki skrajšanja in čim boljše optimizacije procesa proizvodnje teh zdravil, da bi lahko bila čimprej dostopna vsakemu posamezniku, ki bi tovrstno zdravilo potreboval.

K uvodnemu delu naloge je najin mentor dodal: »To delo je plod nadobudnih dijakov, ki sta dobila priložnost sodelovati v najmodernejših proizvodnih obratih in s pomočjo svežih idej prispevati k optimizaciji procesa, ki lahko koristijo celotni industriji. Verjamemo, da bo naše delo pomagalo pri oblikovanju bolj učinkovitih, trajnostnih in donosnih proizvodnih procesov z namenom oskrbovati večje število pacientov povsod po svetu.«

Vzpodbudilo naju je predvsem dejstvo, da je raziskav na to vedno aktualnejšo temo relativno malo. Naloga odpira mnoga vprašanja in poskuša na nekatera od njih tudi odgovoriti. Usmerjena je v aplikativne rešitve, ki pa jih je mogoče direktno implementirati v proizvodnji. Tema pa je bistveno preobširna, da bi se ji lahko posvetila zgolj v eni raziskovalni nalogi.

1.1 Namen naloge

Namen najine naloge je bil slehernemu posamezniku vsaj približno opredeliti pojem »proizvodnja biološkega zdravila«, ga s pojmom seznaniti in mu odpreti širšo sliko in vpogled v dolžino in kompleksnost samega procesa. Želiva si, da bi po branju naloge vsak, ne glede na stroko in izobrazbo, spoznal vsaj del procesa in razumel, zakaj moramo na biološka zdravila tako dolgo čakati in kaj do te mere poviša stroške proizvodnje bioloških učinkovin.

Najina naloga pa ima tudi globlji raziskovalni namen. Z raziskovalnim delom sva želela dokazati postavljene hipoteze iz poglavja 1.2, torej dokazati in odkriti, v kolikšni meri N-1 perfuzija pripomore k izboljšanju procesa proizvodnje bioloških izdelkov, ter ugotoviti in optimizirati zasedenost potrebne proizvodne opreme v samem produkcijskem procesu, jo z izdelavo matematičnega modela tudi popolnoma izkoristiti ter s tem skrajšati čas produkcije zdravila in minimalizirati proizvodne stroške, da bi bila zdravila dostopna večjemu številu pacientov.

1.2 Metode dela in hipoteze

Najino raziskovalno delo se je opiralo predvsem na tiskano literaturo in spletne vire. Iz vsega prebranega sva dobila osnovno teoretično znanje o področju raziskovanja, ostale vire, ki sva jih potrebovala za spoznanje proizvodnje in proizvodnih procesov, pa sva pridobila od zunanjih mentorjev v podjetju Novartis d.o.o. Pri svojem teoretskem raziskovalnem delu sva se posluževala predvsem spletnih znanstvenih člankov predavateljev različnih biotehnoloških fakultet, večinoma v angleščini ali nemščini.

Ravno zaradi recenzij člankov in podatkov o avtorjih pa lahko trdimo, da so vsi najini podatki verodostojni in objektivni. Podatke, pridobljene iz literature, sva primerjala s praktičnimi izkušnjami iz proizvodnje bioloških izdelkov, da sva zagotovila skladnost med teoretičnimi in dejanskimi vrednostmi v praksi. Zbrano teoretsko znanje sva nato združila s podatki, ki sva jih pridobila med samim raziskovalnim delom, ter nato to znanje uporabila za potrditev oziroma ovržbo hipotez, ki sva jih postavila pred začetkom raziskovalnega dela (tabela na naslednji strani):

HIPOTEZA 1	Nacepitvena (začetna) koncentracija celic v bioreaktorju ne vpliva na količino proizvedenega produkta.
HIPOTEZA 2	Pri enakem celičnem klonu lahko s perfuzijo N-1 pridobimo več produkta kot v navadni tehnologiji.
HIPOTEZA 3	V daljšem časovnem obdobju je klasičen proces fed-batch prav tako učinkovit kot proces z N-1 perfuzijo.
HIPOTEZA 4	Matematični model perfuzije N-1 lahko izboljša učinkovitost proizvodnje.
HIPOTEZA 5	Z manjšimi posegi v ustroj obstoječe proizvodnje lahko povečamo produktivnost obrata.

Tabela 2: Hipoteze

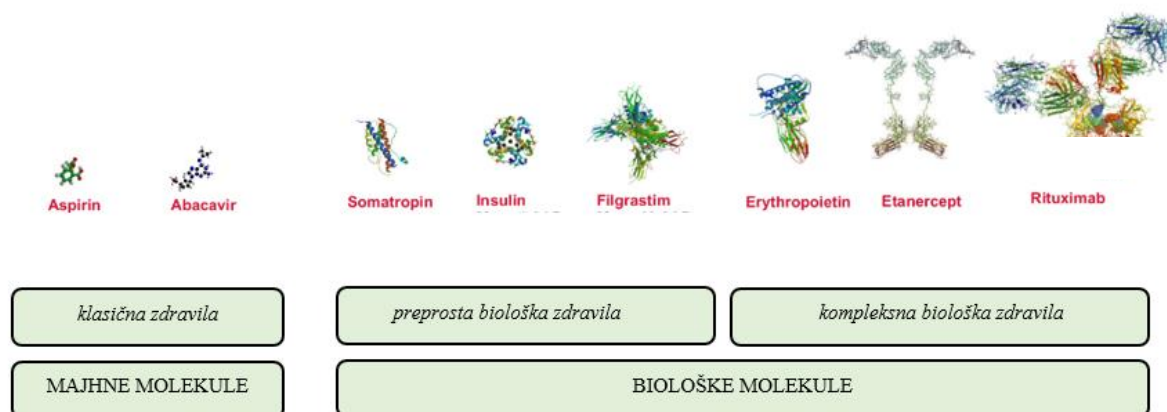
Z namenom pridobivanja potrebnih podatkov sva zbrala tudi različne poglede in možnosti različnih proizvodnih procesov, za katere sva nato izdelala približne matematične modele in izrisala grafe za uporabo v proizvodnji.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Opredelitev pojmov

2.1.1 Opredelitev pojma biološka zdravila

Zdravilo je širok pojem za vse učinkovine, ki na določen način zdravijo ali preprečujejo bolezen. Poznamo mnogo vrst zdravil, ki se razlikujejo glede na sestavo in način njihovega pridobivanja. V raziskovalni nalogi se bova osredotočila na poseben postopek pridobivanja bioloških zdravil. Biološka zdravila so terapevtski produkti, proizvedeni s pomočjo živih celic. Te celice so lahko bakterijske, glivne, rastlinske ali živalske, odvisno od produkta, ki ga želimo pridobiti. Med biološka zdravila prištevamo rekombinantne proteine, cepiva, alergene in produkte iz krvi ali njenih komponent. Biološka zdravila so kemijsko večinoma proteini, zahtevnejša tudi glikoproteini, kar pomeni, da imajo izjemno kompleksno strukturo, ki jo je nemogoče poustvariti le preko kemične sinteze, kot pridobivamo enostavnejše molekule, na primer paracetamol ali acetilsalicilno kislino (aspirin) (<https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/podobna-bioloska-zdravila/bioloska-zdravila-in-podobna-bioloska-zdravila>). Iz tega razloga potrebujemo za proizvodnjo bioloških zdravil žive celice, v najinem primeru celice iz jajčnikov kitajskega hrčka ali celice CHO (chinese hamster ovarian cells).



Slika 1: Primerjava velikosti in kompleksnosti molekul različnih zdravil (prirejeno po: Yale school of medicine, 2021)

Učinkovitost bioloških zdravil lahko v veliki meri pripišemo strukturi njihovih zdravilnih učinkovin, saj jim ta omogoča vezavo na točno določeno tarčno tkivo in preprečuje delovanje na napačnega. Ta lastnost biološkim zdravilom omogoča, visoko učinkovitost zdravljenja bolezni, hkrati pa povzročajo minimalne stranske učinke. Primeri bolezni, za zdravljenje katerih je razširjena uporaba bioloških zdravil, so rak, revmatoidni artritis, anemija, sladkorna bolezen, luskavica in mnoge druge (<https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/podobna-bioloska-zdravila/bioloska-zdravila-in-podobna-bioloska-zdravila>).

Ravno tako kot sta raznolika struktura in pridobivanje bioloških zdravil, so široke tudi možnosti njihove uporabe. Med enostavnejša biološka zdravila spadajo tudi različni hormoni, kot je inzulin, ključno orodje pri zdravljenju sladkorne bolezni ali somatropin, rastni hormon. Za proizvodnjo enostavnejših zdravil se najpogosteje uporabljajo celične kulture bakterij ali kvasovk, medtem ko so za proizvodnjo kompleksnejših bioloških zdravil, po zgradbi tipično glikoproteinov (beljakovin z vezanimi oligosaharidi), uporabljajo celične kulture sesalcev, ki so zmožne glikolizacije ali pripenjanja sladkorjev na beljakovinske osnove. Primer takšnih zdravil so monoklonska protitelesa, vrsta protiteles, usmerjenih proti enemu antigenu, torej substanci na površini tujka, ki se veže s protitelesom. Monoklonska protitelesa se uporabljajo večinoma pri zdravljenju raka, avtoimunih bolezni (Škufca, 2021).

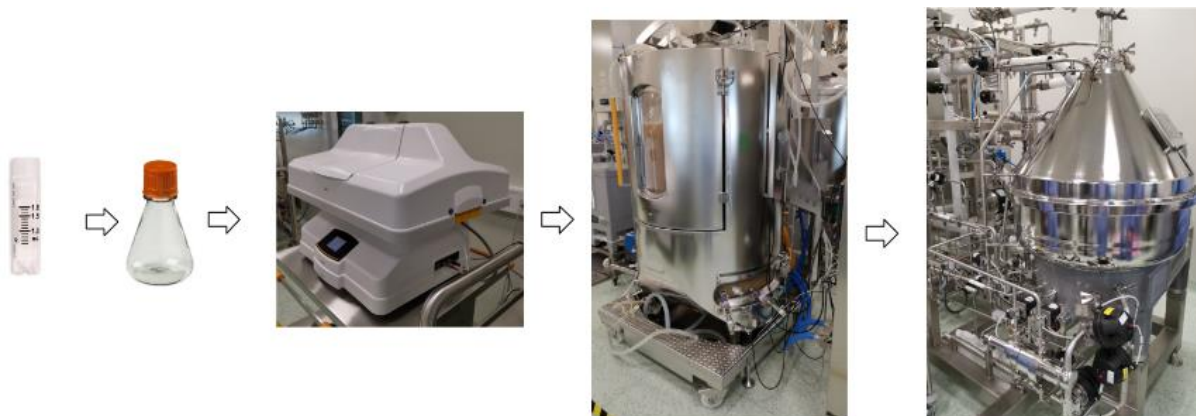
Prvo biološko zdravilo je bilo v Evropi odobreno leta 2006, v Sloveniji pa je dovoljenje za trženje dobilo leta 2008. Danes je uporaba bioloških zdravil že precej razširjena, velik pa je tudi potencial za razvoj novih vrst, ki bi v prihodnosti lahko pripomogle k zdravljenju različnih bolezni (<https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/podobna-bioloska-zdravila/bioloska-zdravila-in-podobna-bioloska-zdravila/>).

2.1.2 Opredelitev pojma upstream

Za proizvodnjo bioloških zdravil torej potrebujemo žive celice, ki jih pred začetkom procesa spremenimo tako, da v genski zapis celice vnesemo navodila za proizvodnjo želene končne učinkovine. Naslednji korak je začetek procesa kultivacije ali namnoževanja celic. Bioprosesi, torej procesi, v katerih uporabljamo različne žive sisteme za pridobivanje bioloških produktov, se v osnovi delijo na produkcijske in izolacijske procese (Škufca, 2021). V biotehnologiji se za to delitev pogosteje uporabljata angleška izraza upstream za produkcijski

(bioproceni) del in downstream za proces izolacije, zato sva se odločila za uporabo angleških izrazov tudi v najini raziskovalni nalogi.

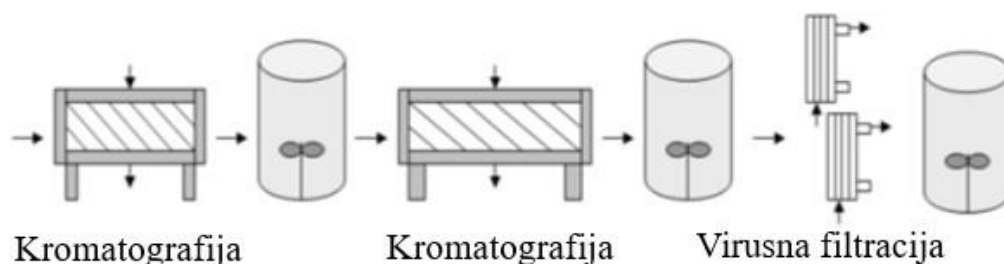
Prvi del proizvodnega procesa bioloških zdravil je upstream, katerega glavni cilj je v prvi fazi rast celične kulture in pridobitev čim večje koncentracije živih celic, ki lahko v drugi fazi upstream procesa proizvedejo veliko zelenega produkta. Na začetku imamo torej majhno koncentracijo celic v vialah (1–2 mL), ki so globoko zamrznjene (na manj kot $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) in se v prvem koraku odtalijo ter prenesejo v sveže gojišče, kar povzroči razmnoževanje celic. Celice za razmnoževanje potrebujejo ugodne pogoje, kot na primer zadostno količino hranil, kisika, ugoden pH in temperaturo (Škufca, 2021). V primeru celic CHO, ki so sesalske celice, morajo biti ti pogoji čim bolj podobni tistim v telesu sesalskega (človeškega) organizma. Z večanjem števila celic se povečuje njihova koncentracija, zato jim kmalu začenja primanjkovati hranil. Iz tega razloga se celice za neprekinjeno rast po nekaj dneh prenese v večjo posodo s svežimi hranili. Tako celice skozi proces rasti predstavljamo v vedno večje posode s primernim gojiščem in pogoji za rast, dokler ne dosežemo dovoljšne koncentracije živih celic, da lahko celice gojimo že v več sto ali celo tisočlitrskih bioreaktorjih. Temu delu procesa pravimo subkultivacijska faza (<https://pharsol.com/knowledge-hub/blog/upstream-downstream>).



Slika 2: Upstream proces (Prirejeno po: *Upstream process in biotechnology*, 2020)

V drugi fazi upstream procesa se tako z dovolj visoko koncentracijo celic lahko osredotočimo na njihovo proizvodnjo zelenega produkta, kar dosežemo z izpostavitvijo celic manj ugodnim pogojem. V prvi fazi potrebujejo celice optimalne pogoje za rast, v produkcijski fazi pa v bolj stresnih pogojih pričnejo proizvajati več celičnih produktov. Tako je na koncu produkcijske faze na gojišču pomešanih ogromno komponent, kot so na primer ostanki gojišča, stranski

produkti celic in pa tudi želena zdravilna učinkovina. Zadnja stopnja upstream procesa je odstranjevanje celic, saj so le-te svojo nalogo opravile. Odstranjevanje celic z gojišča imenujemo žetev in jo izvedemo s centrifugiranjem, ob katerem se celice zaradi večje gostote oprimejo stene posode, tekočina pa lahko steče iz nje in je tako ločena od celične kulture. Na koncu se za popolno ločitev izvede še globinska filtracija ostalega medija (Prasad, 2010).



Slika 3: Shematski prikaz downstream procesa (prirejeno po: PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, in May/June 2015)

Za čim bolj ekonomično proizvodnjo je najbolje, da je faza rasti celic karseda kratka, saj od tega dela procesa nimamo direktne koristi in jo je z različnimi ukrepi tako boljše skrajšati, medtem ko se v drugi, produkcijski fazi želena učinkovina aktivno proizvaja, zato želimo, da je ta del procesa daljši in da so celice zmožne produkt proizvajati čim več časa. Ustvarjanje matematičnega modela, ki bi omogočil takšno ureditev proizvodnje, je bil tudi eden izmed ciljev najine raziskovalne naloge. Ugotovitve bova bolj podrobno opisala v poglavju 3.4.

2.1.3 Opredelitev pojma downstream

Downstream proces predstavlja drugi del proizvodnje biofarmaceutikov, v katerem ločimo zeleni celični produkt (zdravilno učinkovino), ki je nastal v produkcijski fazi, od ostalih nečistoč. Poznamo mnogo različnih tehnik ločevanja snovi. Izbira pravega načina ločevanja je odvisna od fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti snovi, ki jih želimo ločiti. Najpogosteje se v industriji uporabljajo kombinacije različnih tehnik ločevanja, najpomembneje pa je, da z malo koraki in v čim krajšem času pridobimo produkt s karseda majhnimi izgubami (Prasad, 2010).

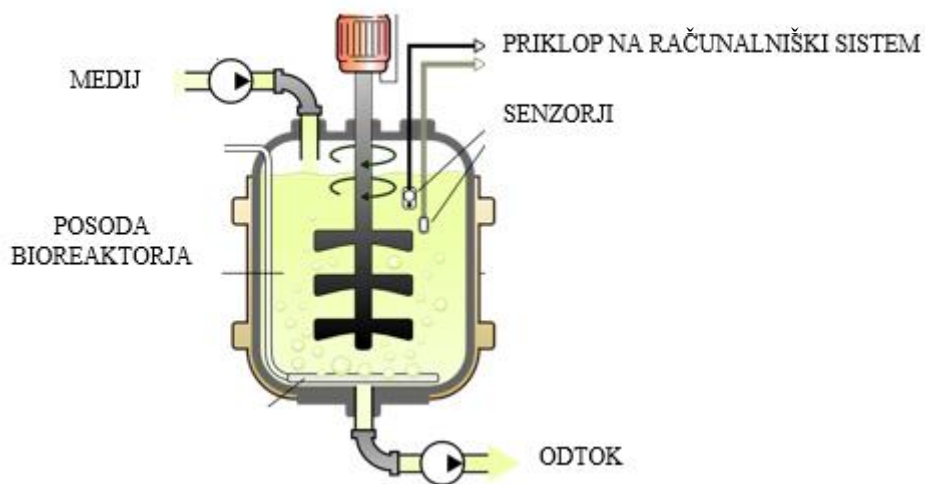
Najpomembnejša metoda čiščenja produkta je kromatografija, metoda, pri kateri izkoristimo različne fizikalno kemijske lastnosti zdravilne učinkovine, da jo ločimo od preostalih komponent v raztopini.

Downstream proces ima v proizvodnji bioloških zdravil tudi poseben pomen za varnost končnega izdelka. Značilnost bioloških zdravil je, da jih pacient prejme z injiciranjem v žilo, zato je zelo pomembno, da je končni produkt popolnoma očiščen vseh kontaminantov, ki bi lahko predstavljaj nevarnost za pacientovo zdravje (Škufca, 2021). To dosežemo s postopkoma virusne inaktivacije in virusne filtracije.

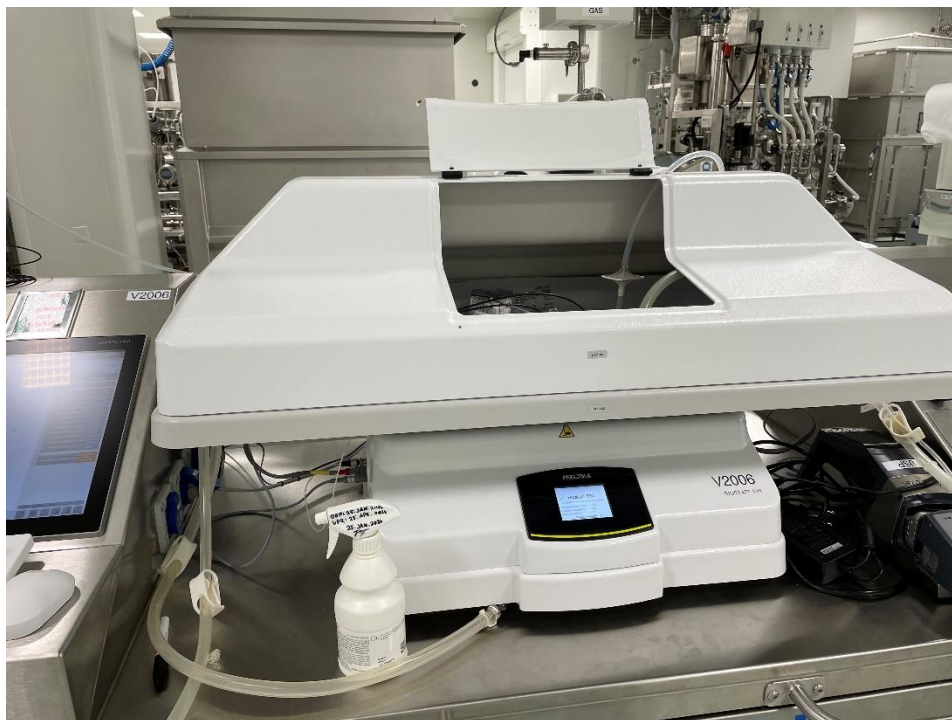
Z downstream procesom v drugem delu proizvodnje torej dosežemo končni produkt, izoliran od ostalih celičnih produktov in snovi. V raziskovalni nalogi sva se osredotočila predvsem na upstream proces in njegovo optimizacijo v proizvodnji, kljub temu pa je poznavanje osnovnih principov downstream procesa ključno, če želimo razumeti proizvodnjo bioloških izdelkov v celoti in kompleksnost procesa, ki vodi do končnega produkta.

2.1.4 Opredelitev pojma N-1 perfuzija («n minus ena»)

Za opredelitev pojma perfuzija je dobro, da poznamo tudi pomen pojma bioreaktor. Bioreaktor oz. fermentator je naprava, ki poustvarja biološko okolje, v katerem lahko potečejo različni bioprocesi s celicami. Delimo jih na več vrst glede na njihovo uporabo, ena izmed njihovih glavnih značilnosti pa so različni volumni; v najinem primeru gre za volumne vse od 20 pa do 20.000 L. V osnovi je bioreaktor sestavljen iz več komponent, za nas so bistveni posoda bioreaktorja ter cevi za dotok plinov in medijev. Ker pa je pri perfuzijskih procesih, ki so razloženi v nadaljevanju, bistveno ohranjanje volumna, je bioreaktor opremljen tudi z odtokom. Za vzpostavljanje konstantnih razmer je v notranjosti bioreaktorja tudi mešalo, za zunanje načrtovanje razmer znotraj bioreaktorja pa so ključni tudi senzorji (za pH, temperaturo itd.). Za določanje KŽC je pomembno tudi vzorčenje vsebine bioreaktorja, s katerim preverjamo ustreznost parametrov za čim optimalnejše pogoje in čim boljšo rast celic. Za vzpostavljanje optimalnih pogojev danes skrbijo računalniški sistemi (kontrolne enote bioreaktorja), ki po potrebi sami regulirajo parametre v bioreaktorjih (Madigan in sod., 2018).



Slika 4: Shematski prikaz bioreaktorja (prirejeno po: General structure of a continuous stirred-tank type bioreactor, Wikipedia, 2024)



Slika 5: Primer zibalnega bioreaktorja v proizvodnji (fotografija iz proizvodnje)

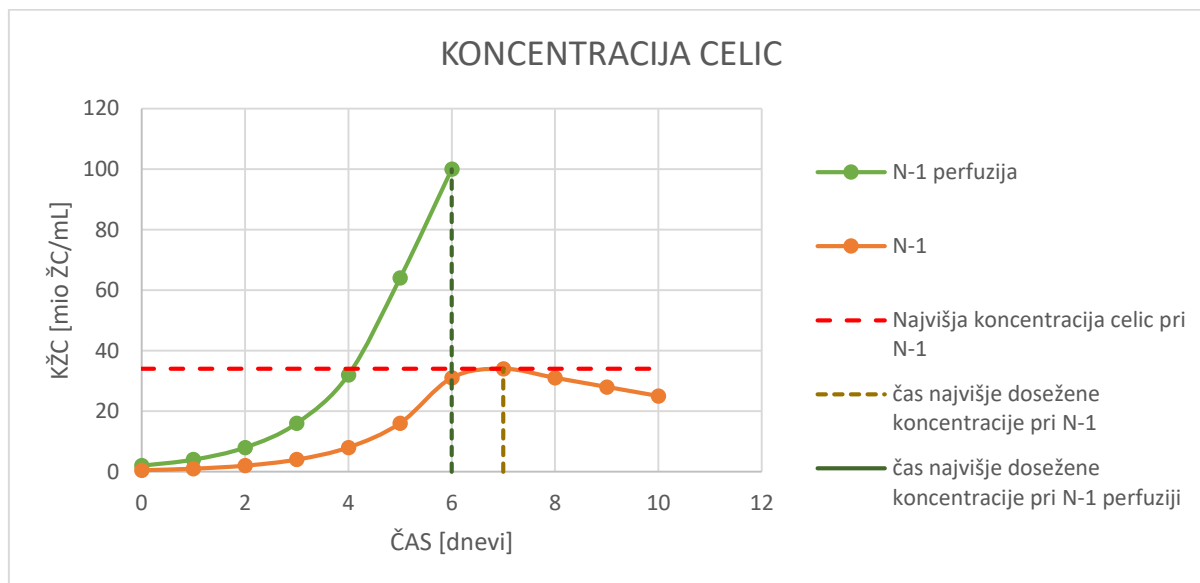


Slika 6: Bioreaktor in njegovi sestavni deli v proizvodnji bioloških učinkovin (fotografija iz proizvodnje)

Pri perfuzijskem bioprocesu N-1 je osnovni princip, da celice ohranimo v eksponentni fazi rasti. To storimo s stalnim dovajanjem hranil oz. svežega gojišča in s hkratnim odvajanjem izrabljenega medija. Skupaj z izrabljenim medijem pa odvajamo tudi celice, ki jih s pomočjo filtra ali membrane ločimo in nato vračamo v bioreaktor. V bioreaktorju tako vzdržujemo konstanten volumen. Z opisanim procesom so tudi koncentracije hranil idealne, kar povzroči izjemno hitro rast celic (eksponentna faza rasti) in nam omogoča doseganje veliko višjih koncentracij živih celic kot v klasičnem bioreaktorju (Flickinger in sod., 2013).

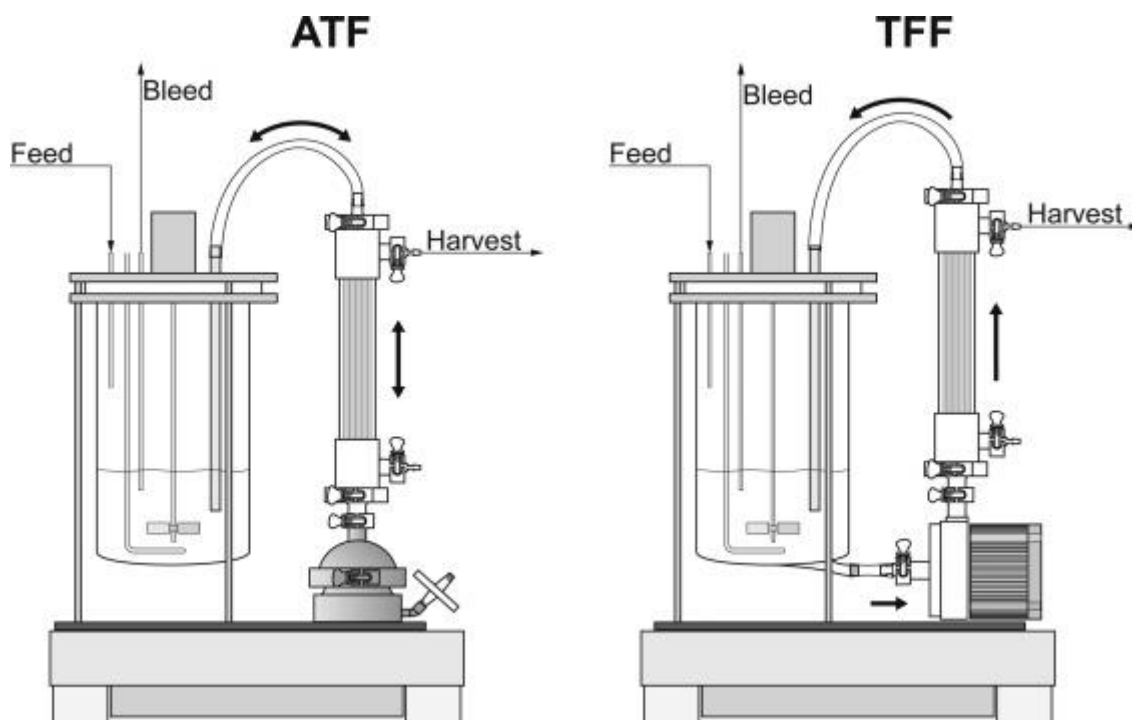
Perfuzija je zato idealen postopek tudi za zmanjševanje potrebnega volumna, saj lahko s perfuzijo N-1 proces izvajamo v manjših bioreaktorjih kot sicer in v postopku vseeno pridobimo enake koncentracije živih celic.

Za boljšo predstavo opisanega postopka sva izdelala tudi graf, ki prikazuje doseženo KŽC v klasičnem procesu N-1 v primerjavi z doseženo KŽC v perfuzijskem procesu N-1.



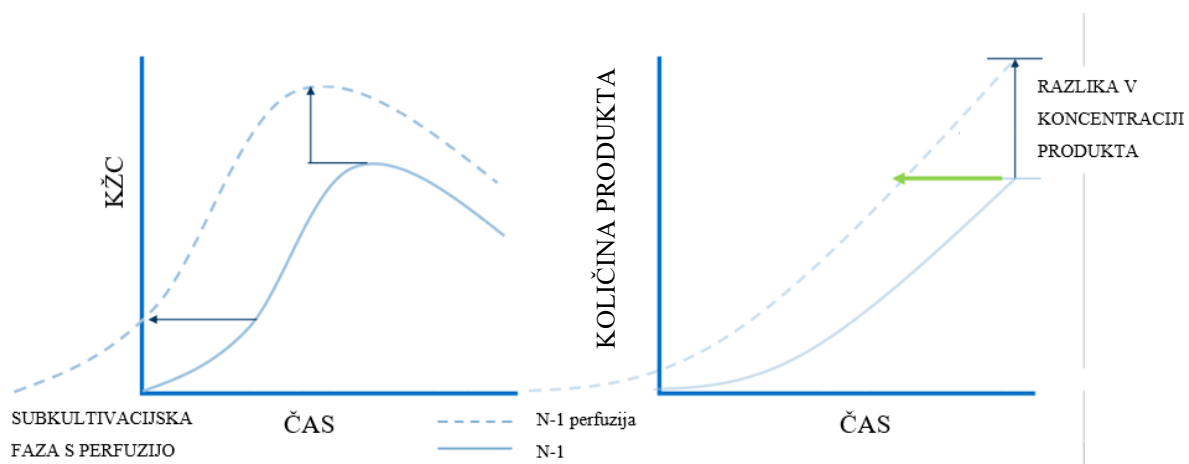
Graf 1: Primerjava dosežene KŽC v perfuzijskem procesu N-1 in v navadnem procesu N-1

Graf 1 prikazuje dosežene KŽC po dnevih v različnih procesih. Z grafom, ki sva ga na izrisala na podlagi prej pridobljenih teoretičnih znanj opisanih v tem poglavju, sva želela prikazati predvsem ugodnost perfuzijskega predprodukcijskega procesa v proizvodnji. Perfuzijski proces sva po pridobljenih virih zaključila po šestih dneh, saj se je to na podlagi preteklih raziskav izkazalo kot ena optimalnejših opcij za nacepitev zadostne KŽC, prikaz pa je zgolj generičen, saj je hitrost rasti odvisna od več faktorjev, kot so npr. klon, gojišče, pogoji v BR idr. Vmesne vertikalne črte prikazujejo najvišje dosežene koncentracije celic v perfuzijskem in navadnem procesu N-1. Rdeča črtkana črta na grafu pa prikazuje najvišjo doseženo KŽC v navadnem procesu N-1. Vidimo lahko, da v navadnem procesu N-1 dosežemo najvišjo koncentracijo celic po šestih dneh, v perfuzijskem procesu pa isto koncentracijo celic dosežemo že po štirih dneh. Po šestih dneh pa dosežemo že bistveno višjo KŽC (zelena črtkana črta). Z zgornjega grafa lahko zato razberemo, da je perfuzija veliko učinkovitejši proces za skrajšanje postopka proizvodnje bioloških učinkovin. Spodnja shema prikazuje tudi shemo perfuzijskega procesa N-1 v proizvodnji. (Development of an intensified fed-batch production platform with doubled titers using N-1 perfusion seed for cell culture manufacturing; Bioresources and Bioprocessing).



Slika 7: Shema ATF in TFF perfuzije N-1 (prirejeno po: N-1 perfusion ATF in TFF scheme, 2019, eScience direct)

Bistvena prednost N-1 perfuzije pred navadnim MS procesom pa je, da lahko v MS bioreaktor nacepimo višje koncentracije celic, s tem pridobimo na času MS procesa in hkrati prej začnemo produkcijsko dobo naših celičnih klonov, ko njihova koncentracija doseže cca. 30 mio ŽC/mL in po spremembi pogoja začnejo (pH, temperatura itd.) z izdelavo našega titra (produkta). Opisano razliko prikazuje tudi slika 8.



Slika 8: Količina produkta v različnih procesih (povzeto po: Intensified fed-batch and fed-batch, ResearchGate, 2024)

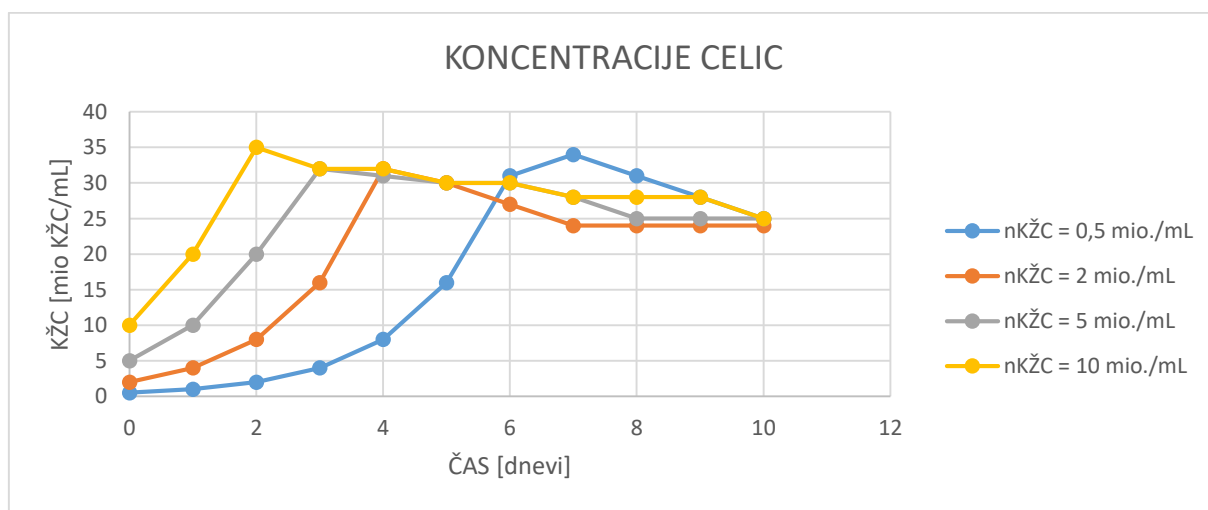
3 PRAKTIČNO-RAZISKOVALNI DEL

3.1 Pomen nacepitvene koncentracije celic v proizvodnji bioloških izdelkov in učinkovitost perfuzije N-1

Nacepitvena koncentracija živih celic nam pove, koliko živih celic na mL smo nacepili (ponavadi jih karseda veliko količino nacepimo s perfuzijo N-1) pred začetkom glavne produkcijske faze (največji bioreaktor) procesa izdelovanja bioloških učinkovin – pove nam, s kakšno koncentracijo živih celic smo vstopili v upstream proces. V raziskovalni nalogi naju je zanimalo predvsem, kako to vpliva na proizvodnjo biološke učinkovine v odvisnosti od časa, v katerem nato dobimo naš produkt. Glede na ugotovitve, ki sva jih z raziskovalnim delom pridobila, sva izrisala grafa 2 in 3, ki prikazujeta pomen različnih nacepitvenih koncentracij ŽC v sami proizvodnji učinkovine.

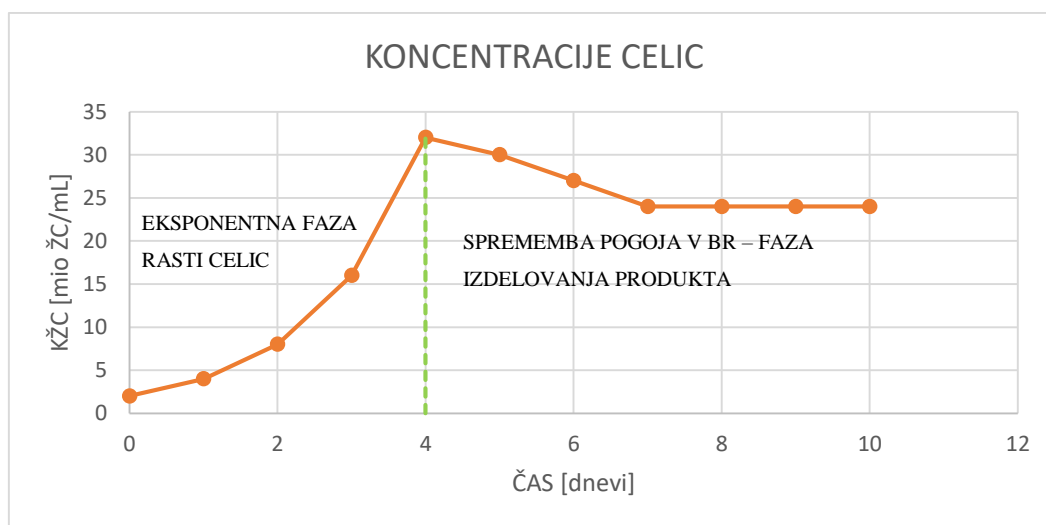
3.1.1 Vpliv nacepitvene koncentracije celic na produkcijo zdravilne učinkovine

Pri opredelitvi nacepitvene koncentracije živih celic gre za eksponentno sorazmerje, saj naj bi se število celic v matematičnem smislu vsak dan eksponentno povišalo, kar ustrezno prikazuje tudi graf 2 (spodaj).



Graf 2: Vpliv različnih nacepitvenih koncentracij ŽC na nadaljnjo rast koncentracije ŽC

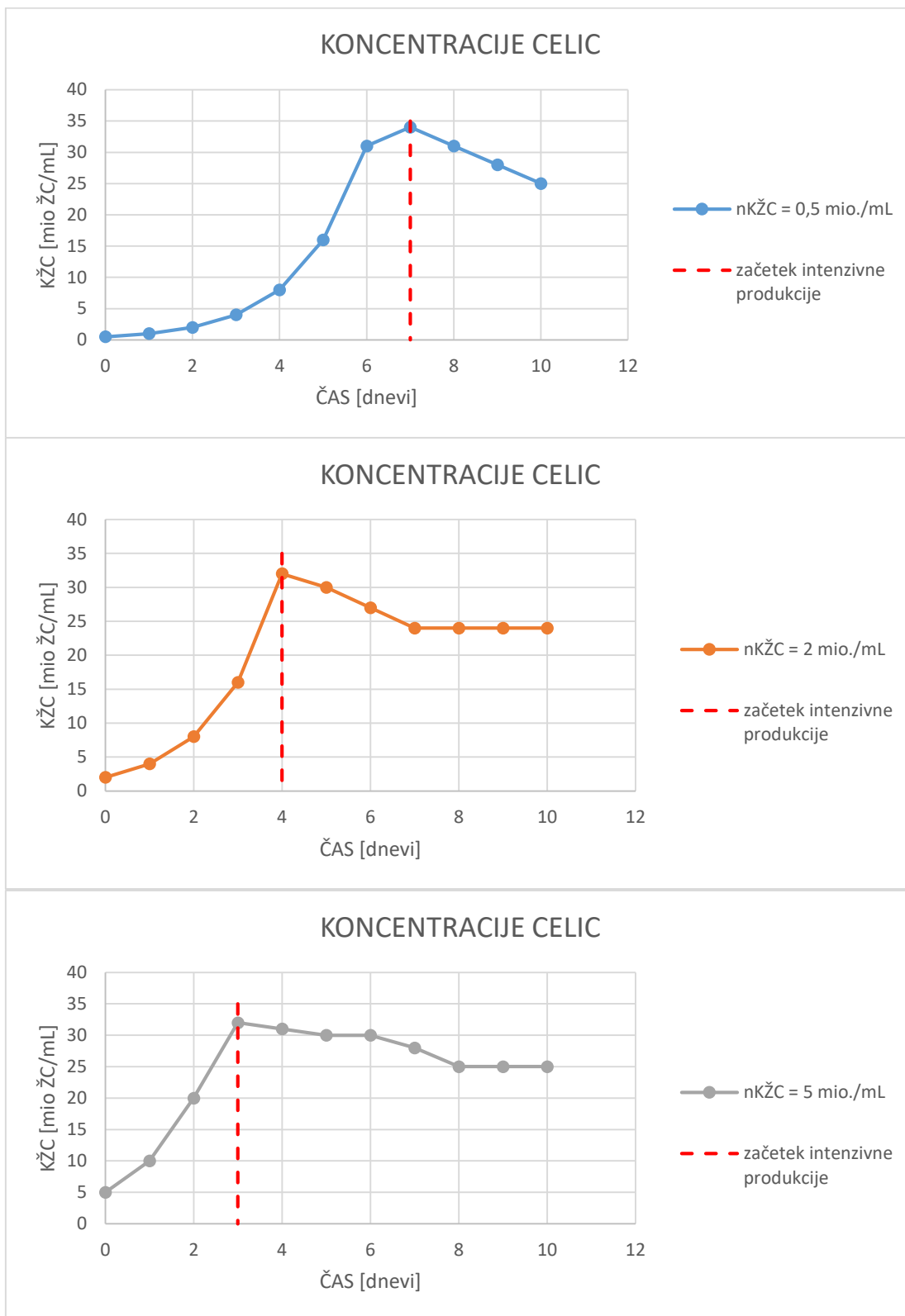
Ker pa gre za žive celice, njihove rasti ne moremo omejiti zgolj na idealne matematične postopke. Z grafa 2 lahko razberemo, da se KŽC ne glede na nacepitvene koncentracije živih celic, ko dosežejo mejo med 30 in 35 mio ŽC/mL, ustavijo in začnejo počasi padati, in sicer zaradi spremembe razmer v BR (T-shift), ki jo po navadi povzročimo s spremembo temperature (McHugh et. al., Biotechnology process, 2020). S tem spodbudimo celični metabolizem, kar pomeni, da se začne intenzivna produkcija naše zdravilne učinkovine. Prej kot lahko začnemo temperaturni shift, več produkta bo nastalo, saj je s tem produkcijska faza daljša. Ta del procesa pa opiše tudi graf 3, ki prikazuje potek procesa MS v BR.

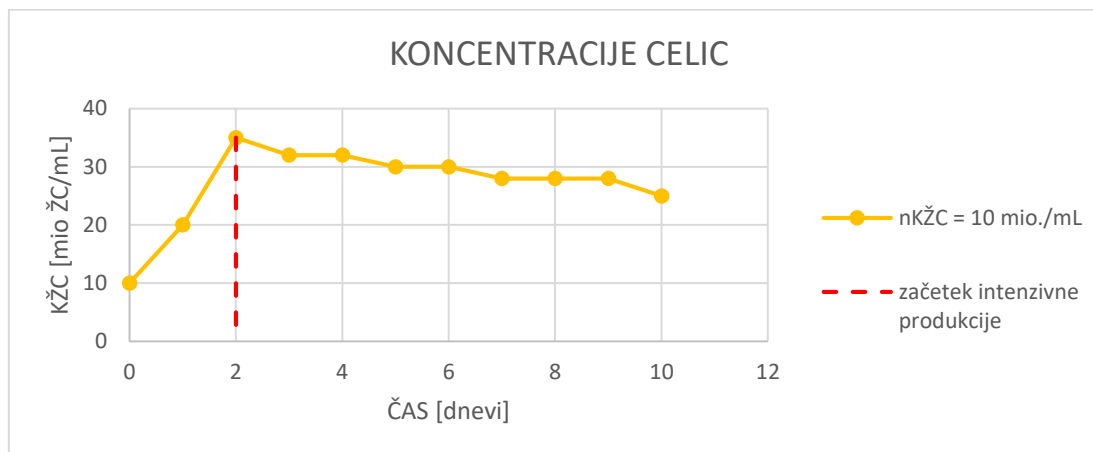


Graf 3: Rast celic in pogoji v BR

Bistvo vprašanja, ki sva ga postavila tudi v hipotezi 1, je odvisnost količine proizvedenega produkta od nacepitvene koncentracije. Z grafa 2 vidimo, da je v primeru nizke nacepitvene koncentracije (0,5 mio KŽC/mL) potrebnih 6 dni, da pridejo celice v produkcijsko fazo (nad 30 mio KŽC/mL), kar pomeni, da lahko celice v primeru 10-dnevnega procesa produkt proizvajajo samo 4 dni. Na drugi strani pa sta v primeru nacepitvene koncentracije 10 mio KŽC/mL potrebna le 2 dneva, da celice zrastejo dovolj, da lahko izvedeno T-shift in s tem sprožimo produkcijo učinkovine. S tem pridobimo dodatne 4 dni produkcije v primerjavi z najnižjo nacepitveno koncentracijo.

Spodaj sledi še ločen prikaz grafov rasti celic z različnimi nacepitvenimi koncentracijami.





Graf 4:4.1-4.4: Začetek produkcijske faze procesa glede na različne KŽC

Zgoraj predstavljeni grafi (4.1–4.4) so bili pridobljeni s pomočjo matematičnega modela, ki sva ga izdelala na podlagi referenc iz znanstvene literature in praktičnih izkušenj iz proizvodnje. Matematični model omogoča spreminjanje različnih parametrov (hitrost rasti celic, koncentracija ob T-shiftu, trajanje procesa ...), kar lahko spremeni naravo procesa, vendar sva v vseh primerih prišla do istega zaključka: višja nacepitvena koncentracije drastično izboljša učinkovitost procesa. (Solle, D. Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles).

3.1.2 Vpliv nacepitvene koncentracije na količino proizvedenega produkta v procesu MS

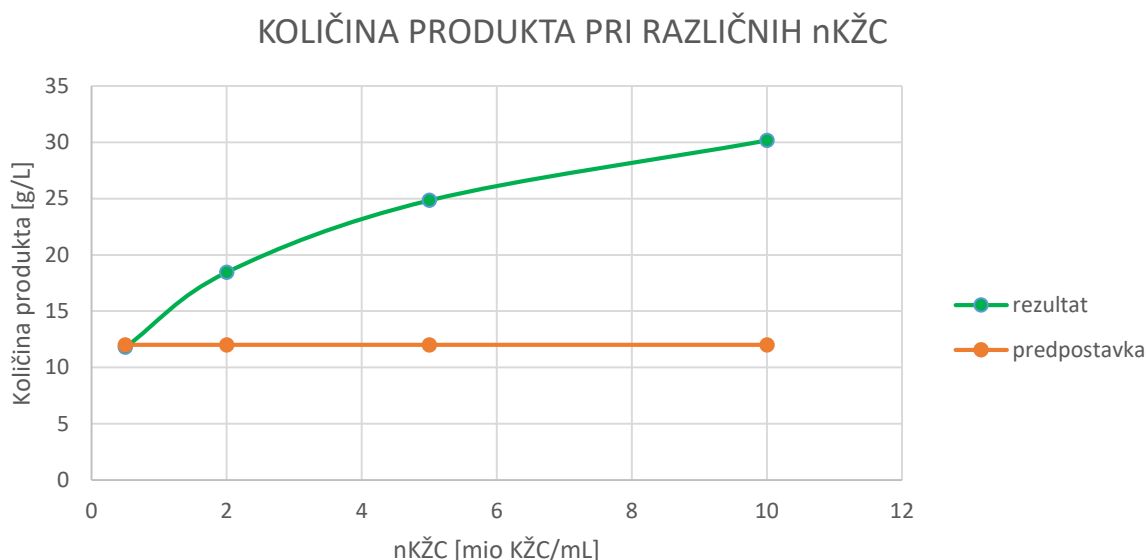
V hipotezi 1 sva se ukvarjala predvsem še s količino produkta, ki po najinih predvidevanjih pred začetkom raziskovanja ne bi bila odvisna od nacepitvene koncentracije, kar sva sklepala predvsem po tem, da se rast koncentracije celic upočasni, ustavi in celo zmanjša po tem, ko celice dosežejo cca. 30 mio ŽC/mL. Za namen potrditve hipoteze 1 sva prav tako na podlagi aproksimacije izkušenj izrisala graf 5, ki prikazuje količino produkta v odvisnosti od koncentracije ŽC. Za vstop v bioprocen z različnimi nacepitvenimi koncentracijami celic pa je bistven prestage, za katerega sva privzela perfuzijski proces N-1, katerega bistvo je, da celice čim bolj namnožimo, podrobneje pa je proces opisan v poglavju 2.1.4.

Na podlagi vseh do sedaj razloženih ugotovitev sva nato izrisala še graf 5, ki prikazuje količino produkta glede na različne nKŽC.

Po postavljeni hipotezi

HIPOTEZA 1 Nacepitvena koncentracija celic v bioreaktorju ne vpliva na količino proizvedenega produkta.

in najinih predvidevanjih bi moral graf količine produkta v odvisnosti od nKŽC potekati linearno (graf 5, oranžni trend):



Graf 5: Predvidevana in dejanska količina produkta glede na različne nKŽC

Ker nisva našla posebnih raziskav in objektivnih virov na to temo, sva graf 5, ki prikazuje dejansko količino produkta v odvisnosti od nacepitvene koncentracije živih celic, izrisala na podlagi aproksimacij in proizvodnih izkušenj.

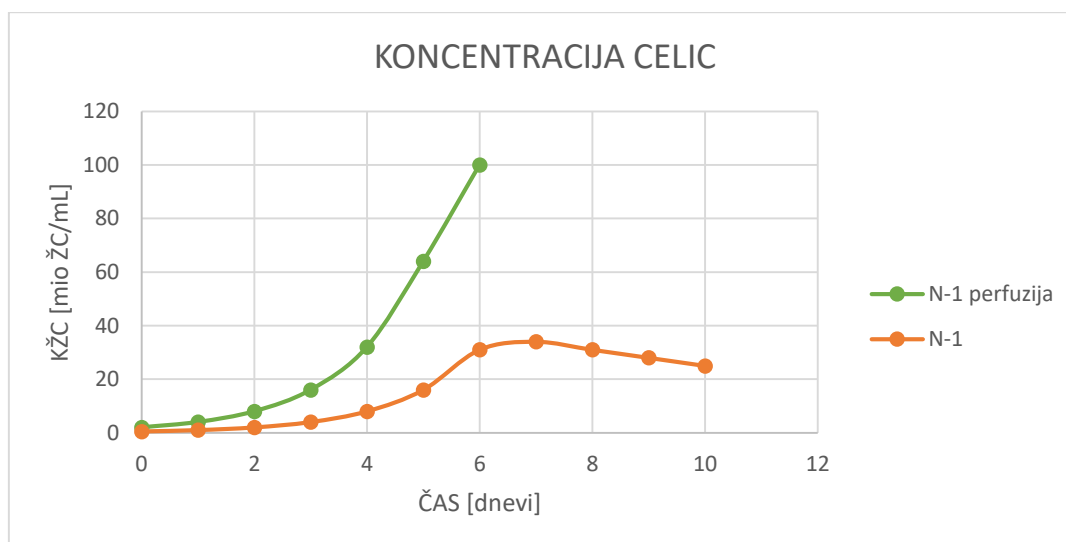
Kot je razvidno z grafa 5, se količina produkta v odvisnosti od nacepitvene koncentracije ŽC spreminja (graf 5, zeleni trend) in to je dokaz, s katerim sva morala ovreči hipotezo 1. Komentar na hipotezo je zapisan v poglavju 4.1.

3.1.3 Učinkovitost perfuzije N-1 v proizvodnji bioloških izdelkov

Z raziskovanjem hipoteze 1 sva hkrati nevede košček za koščkom odkrivala tudi ozadje hipoteze 2.

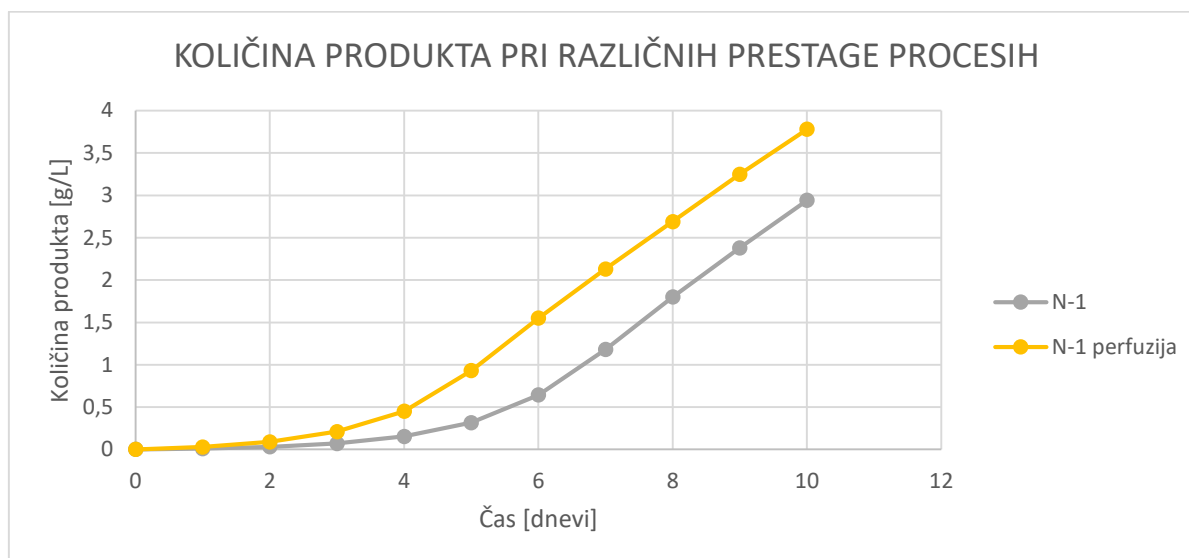
HIPOTEZA 2 Pri enakem celičnem klonu lahko s perfuzijo N-1 pridobimo več produkta kot v navadni tehnologiji.

Kot opredeljeno v poglavjih 3.1.1 in 3.1.2, smo s perfuzijo nacepili ustrezno koncentracijo celic, s katero smo nato vstopili v MS proces. Za lažjo obravnavo hipoteze 2 še enkrat dodajava graf 1, ki navaden proces N-1 primerja s perfuzijskim procesom N-1.



Graf 6; Dosežene KŽC v različnih procesih

Kot sva omenila že v teoretičnem delu raziskovalne naloge, je perfuzija bistvena za nacepitev čim višje koncentracije celic pred vstopom v bioprodukcijski proces. V hipotezi 2 pa sva se ukvarjala z učinkovitostjo perfuzijskega prestage procesa v produkcijskem delu MS. Pri perfuziji smo v MS proces tako vstopili s KŽC 100 mio ŽC/mL, pri navadnem procesu N-1 pa s koncentracijo 34 mio ŽC/mL. Graf 7 prikazuje količine produkta, ki smo ga dobili v procesu MS z dvema različnima prestage procesoma.



Graf 7: Količina produkta pri različnih prestage procesih po vstopu v MS

Z grafa 7 razberemo, da je N-1 perfuzijski prestage proces izboljšal učinkovitost produkcijske faze bioprocesa v primerjavi z navadnim N-1 procesom, saj z nacepitvijo višje začetne koncentracije, s katero nato vstopimo v MS proces, v MS procesu dobimo tudi več produkta. S tem je hipoteza 2 potrjena. Podrobnejši komentar hipoteze sva zapisala v poglavju 4.1.

3.2 Povečava produktivnosti obrata z različnimi ukrepi in N-1 perfuzijo

V poglavju 3.1 sva dokazala, da z implementacijo perfuzije v N-1 stopnjo procesa dosežemo višjo KŽC v krajšem časovnem obdobju, kar je bistven podatek za najino raziskovanje tretje postavljene hipoteze:

HIPOTEZA 3 V daljšem časovnem obdobju je navaden fed-batch proces prav tako učinkovit kot proces z N-1 perfuzijo.

Uporaba N-1 perfuzije omogoča višjo začetno nacepitveno koncentracijo celic v produkcijskem bioreaktorju in ob zaključku procesa tudi večjo količino produkta, kot bi nastala pri uporabi klasične tehnologije. Že s tem podatkom samim lahko torej delno ovrževa hipotezo 3, ki sva jo postavila zaradi predvidevanja, da višja nacepitvena koncentracija ne bo vplivala na količino produkta.

Pri vrednotenju učinkovitosti procesa z N-1 perfuzijo pa je treba upoštevati tudi, da z njo potrebno KŽC dosežemo v krajšem času, torej pomeni za proizvodnjo časovni prihranek in omogoča, da letno izvedemo večje število proizvodnih serij ter povečamo celotno količino produkta. Do teh ugotovitev sva prišla z izrisovanjem matematičnih modelov trajanja različnih faz v procesu, ki so predstavljeni v tabelah 3 in 4.

TRAJANJE PROCESA [dnevi]:	1 v 1			
	N-1	BR1	N-1	BR1
1	-1			
2	0			
3	1			
4	2			
5	3			
6	4			
7	5	-1		
8	6	0		
9		1		
10		2		
11		3		
12		4		
13		5	-1	
14		6	0	
15		7	1	
16		8	2	
17		9	3	
18		10	4	
19			5	-1
20			6	0
21				1
22				2
23				3
24				4
25				5
26				6
27				7
28				8
29				9
30				10

Tabela 3: Trajanje procesa z N-1 perfuzijo

TRAJANJE PROCESA [dnevi]:	1 v 1			
	N-1	BR1	N-1	BR1
1	-1			
2	0			
3	1			
4	2			
5	3	-1		
6	4	0		
7		1		
8		2		
9		3		
10		4		
11		5		
12		6		
13		7		
14		8		
15		9		
16		10		
17		11	-1	
18		12	0	
19		13	1	
20		14	2	
21			3	-1
22			4	0
23				1
24				2
25				3
26				4
27				5
28				6
29				7
30				8
31				9
32				10
33				11
34				12
35				13
36				14

Tabela 4: Trajanje procesa brez N-1 perfuzije

V tabelah je predstavljeno trajanje dveh serij v procesu. Levi stolpec predstavlja število dni v procesu, v desnem pa je razvidna razporeditev bioreaktorjev po dnevih. Zeleni stolpci so tako N-1 faza proizvodnje, vijolični pa N oziroma produkcijska faza proizvodnje (označeno z BR1 ali bioreaktor 1). Dan -1 predstavlja dan, ko se bioreaktor pripravlja (čiščenje, sanitacija in priprava gojišča) na novo serijo in je zato zaseden, na dan 0 pa v bioreaktor nacepimo novo gojišče. Temno vijolični stolpci predstavljajo dni, ko bioreaktor stoji neuporabljen.

V tabeli 3 je predstavljeno trajanje celotnega procesa v primeru, da je v N-1 delu izvedena perfuzija, ki običajno traja 4–9 dni (Rittershaus, 2022). Če predpostavimo, da traja perfuzijski proces v tem primeru 6 dni, je MS bioreaktor popolnoma utiliziran in se proces ponavlja na 11 dni. V tabeli 4 pa je izrisano trajanje procesa brez perfuzije, kjer traja N-1 del 4 dni. Po

pregledu podatkov iz literature sva za trajanje MS procesa izbrala 14 dni, kar je povprečje v industriji, poleg tega se to tudi sklada z najinim simulacijskim modelom (Khanal, 2021).

Pri navadnem fed-batch procesu je namreč MS zaradi nižje koncentracije živih celic okoli 4 dni daljši zaradi daljšega časa za rast celic, ki ga z N-1 procesom ne potrebujemo, kot že opisano v poglavju 3.1. Ena serija se tako ponavlja na 15 dni. To pomeni, da bi trajanje procesa v proizvodnji ob takšnih pogojih lahko z uporabo perfuzije vsako serijo skrajšali za 6 dni.

V obdobju enega leta bi s takšno ureditvijo proizvodnje dobili sledeče rezultate:

	Perfuzija v N-1 delu	Proces brez perfuzije
Maksimalno letno število serij	32,4	25,4
Maksimalna letna količina produkta [g]	108.742	85.440

Komentar: Izračun velja v idealnih pogojih, ko ima vsak produkcijski bioreaktor (1.000 L) svoj N-1 bioreaktor in sta oba maksimalno izkoriščena. Predpostavljen titer je 3,36 g/L glede na povprečno simulacijo v modelu.

Tabela 5: Primerjava letnega števila serij

Iz tabele je razvidno, da bi z uporabo perfuzije letno lahko izvedli približno 7 serij več kot pri uporabi navadne tehnologije, kar pomeni, da s perfuzijo dosežemo precejšnjo optimizacijo procesa tako v časovnem smislu kot v količini proizvedenega produkta, ki sva jo izračunala na podlagi istih podatkov, in sicer s spremenljivko letnega števila serij. Ta ugotovitev je v nasprotju s hipotezo 3, ki sva jo tako ovrgla. Podrobnejši komentar je zapisan v poglavju 4.1.

Z navezavo na podatke iz tabel 3, 4 in 5 lahko potrdiva tudi hipotezo 4:

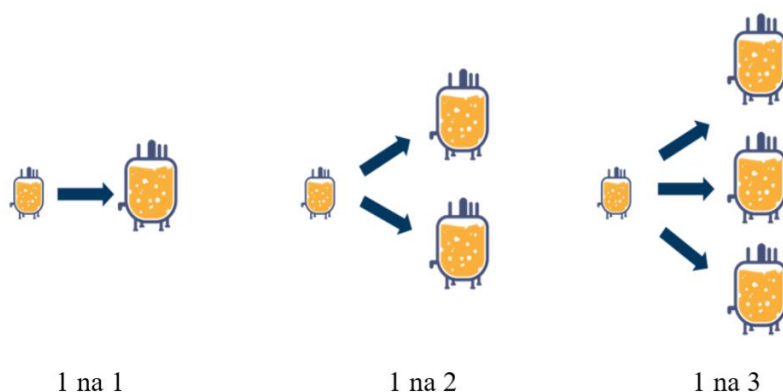
HIPOTEZA 4 Matematični model N-1 perfuzije lahko izboljša učinkovitost proizvodnje.

Z ustvarjanjem matematičnega modela obrata, v katerega je vključena N-1 perfuzija, nama je uspelo ustvariti ureditev proizvodnje, v kateri lahko letno izvedemo 7 serij več kot v modelu brez perfuzije v N-1 delu procesa, kar pomeni, da se letno število serij poveča skoraj za 27 %.

Matematični model nama je tako pomagal pri razmišljanju o optimizirani ureditvi proizvodnje, zato sva hipotezo 4 potrdila.

3.3 Matematični modeli proizvodnje bioloških izdelkov

Pri načrtovanju proizvodnih kapacitet in s tem letne količine proizvedenega produkta pa je zelo pomemben še en aspekt: utilizacija proizvodne opreme. Oprema je namreč izjemno draga (tudi več milijonov na bioreaktor), zato je pomembno, da je oprema ves čas v uporabi in ne stoji prazna, kar se mnogokrat zgodi zaradi kompleksnosti ureditve obratov in zahtevnosti usklajevanja urnikov različnih procesov. Eden izmed najinih ciljev pred začetkom raziskovanja je bil tudi ustvariti matematični model, ki bi omogočal čim boljšo utilizacijo opreme.



Slika 9: Shema bioreaktorskih konfiguracij

Na sliki 9 so prikazane različne bioreaktorske konfiguracije. Bioreaktorska konfiguracija je pojem, ki pomeni povezanost bioreaktorjev v obratu oziroma mesto njihove uporabe. V prvem primeru je na sliki prikazana konfiguracija 1 na 1, kar pomeni, da iz enega bioreaktorja, v katerem je potekal N-1 proces (na sliki N-1 bioreaktorje prikazujejo manjši bioreaktorji), preidemo na en bioreaktor v MS. V drugem primeru iz enega N-1 bioreaktorja izmenično prehajamo na dva različna MS bioreaktorja. Po končani prvi seriji v N-1 BR, ko smo medij nacepili v MS bioreaktor, lahko takoj začnemo z naslednjim procesom, vsebino pa nato nacepimo v drugi MS bioreaktor. Tako se cikel vedno znova ponavlja. Po enakem principu deluje tudi konfiguracija 1 na 3, zadnja na sliki. Iz enega N-1 BR v tem primeru medij izmenično prestavljamo v 3 različne bioreaktorje.

1 na 1			1 na 2						1 na 3													
N-1	BR1	N-1	BR1	N-1	BR2	N-1	BR1	N-1	BR2	N-1	BR1	N-1	BR2	N-1	BR3	N-1	BR1	N-1	BR2	N-1	BR3	
-1				-1						-1												
0				0						0												
1				1						1												
2				2						2												
3				3						3												
4				4						4												
5				5						5												
6				6						6												
	-1				-1						-1											
	0				0						0											
	1				1						1											
	2				2						2											
	3				3						3											
	4				4						4											
	5				5						5											
	6				6						6											
	7				7						7											
	8				8						8											
	9				9						9											
	10				10						10											
		-1				-1						-1										
		0				0						0										
		1				1						1										
		2				2						2										
		3				3						3										
		4				4						4										
		5				5						5										
		6				6						6										
		7				7						7										
		8				8						8										
		9				9						9										
		10				10						10										
			-1				-1						-1									
			0				0						0									
			1				1						1									
			2				2						2									
			3				3						3									
			4				4						4									
			5				5						5									
			6				6						6									
			7				7						7									
			8				8						8									
			9				9						9									
			10				10						10									
				-1				-1						-1								
				0				0						0								
				1				1						1								
				2				2						2								
				3				3						3								
				4				4						4								
				5				5						5								
				6				6						6								
				7				7						7								
				8				8						8								
				9				9						9								
				10				10						10								
					-1				-1						-1							
					0				0						0							
					1				1						1							
					2				2						2							
					3				3						3							
					4				4						4							
					5				5						5							
					6				6						6							
					7				7						7							
					8				8						8							
					9				9						9							
					10				10						10							
						-1				-1						-1						
						0				0						0						
						1				1						1						
						2				2						2						
						3				3						3						
						4				4						4						
						5				5						5						
						6				6						6						
						7				7						7						
						8				8						8						
						9				9						9						
						10				10						10						
							-1				-1						-1					
							0				0						0					
							1				1						1					
							2				2						2					
							3				3						3					
							4				4						4					
							5				5						5					
							6				6						6					
							7				7						7					
							8				8						8					
							9				9						9					
							10				10						10					
								-1				-1						-1				
								0				0						0				
								1				1						1				
								2				2						2				
								3				3						3				
								4				4						4				
								5				5						5				
								6				6						6				
								7				7						7				
								8				8						8				
								9				9						9				
								10				10						10				
									-1				-1						-1			
									0				0						0			
									1				1						1			
									2				2						2			
									3				3						3			
									4				4						4			
									5				5						5			
									6				6						6			
									7				7						7			
									8				8						8			
									9				9						9			
									10				10						10			

Najbolj bistvena pa so v prikazu temno vijolično označena polja tabele, ki predstavljajo dni, ko bioreaktor v obratu stoji neuporabljen. Razlog za to je različna dolžina N-1 in MS procesa, saj morata biti konec N-1 dela in začetek MS dela procesa usklajena.

V primeru ureditve proizvodnje po zgornjih konfiguracijah lahko razberemo, da je pri konfiguraciji 1 na 2, N-1 BR v uporabi ves čas, BR1 in BR2 pa sta po koncu vsake serije 3 dni prazna.

Če na enak način analiziramo konfiguraciji 1 na 1 in 1 na 3 iz tabele 6, opazimo, da v prvem primeru N-1 BR stoji 4 dni na serijo, v tretjem pa vsak izmed produkcijskih BR stoji 12 dni po vsaki končani seriji.

Podatke o utilizaciji (izkoriščenosti) sva za vse tri konfiguracije povzela v tabelah 7 in 8:

KONFIGURACIJA	BIOREAKTOR	UTILIZACIJA OPREME
1 na 1	N-1	80 %
	BR1	100 %
1 na 2	N-1	100 %
	BR1, BR2	89,30 %
1 na 3	N-1	100 %
	BR1, BR2, BR3	66,67 %

Tabela 7: Utilizacija opreme pri različnih BR konfiguracijah

Iz tabele 7 je razvidno, da je utilizacija opreme pri takšnih dolžinah N-1 in MS procesov najboljša v konfiguraciji 1 na 2, medtem ko je pri konfiguraciji 1 na 1 N-1 BR prazen 20 % časa, pri konfiguraciji 1 na 3 pa so produkcijski BR prazni kar tretjino časa.

SISTEM	LETNO ŠT. SERIJ (za en bioreaktor)	KOLIČINA PRODUKTA [g]
1 N-1; 1 BR	32,4	108.742
1 N-1; 2 BR	27,04	90.720
1 N-1; 3 BR	20,3	68.208

Tabela 8: Letno št. serij pri različnih BR konfiguracijah

Nasprotno je po podatkih iz tabele 8 razvidno, da je največ letnih serij izvedenih v konfiguraciji 1 na 3 in da je pri takšni ureditvi proizvedenega tudi največ produkta, saj imamo v zadnjem sistemu tri bioreaktorje in se tako letno število serij poveča. Kljub temu pa lahko ugotovimo, da je takšna konfiguracija v tem primeru za proizvodnjo manj ekonomična kot konfiguracija 1 na 2, saj zasede 3 bioreaktorje in omogoča proizvodnjo le nekaj več produkta, kot ga je proizvedenega v konfiguraciji 1 na 2. Hkrati je lahko prost BR, ki ostane ob izbiri konfiguracije 1 na 2, uporabljen v kombinaciji z drugim N-1 BR in je tako boljje utiliziran v drugačni konfiguraciji.

Na podlagi izdelanega matematičnega modela za primer obrata s prej opisanimi dolžinami N-1 in MS procesa lahko ovrednotiva hipotezo 5:

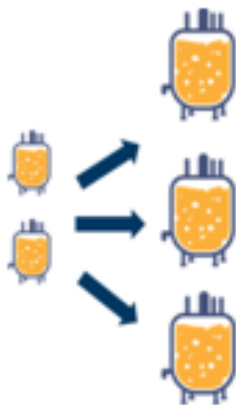
HIPOTEZA 5 Z manjšimi posegi v obstoječo proizvodnjo lahko povečamo produktivnost obrata.

Prek izdelave matematičnega modela različnih bioreaktorskih konfiguracij sva raziskovala vpliv manjših sprememb v organizaciji proizvodnje na produktivnost obrata. Z izračuni utilizacije opreme, letnega števila serij in proizvedene količine končnega produkta sva lahko določila najbolj optimalno ureditev obrata in tako dokazala, da lahko z manjšimi posegi optimiziramo njegovo produktivnost. Na podlagi teh ugotovitev potrjujeva hipotezo 5, ki jo bova podrobneje komentirala v poglavju 4.1.

S pridobljenim znanjem o ustvarjanju modelov bioreaktorskih konfiguracij sva razmišljala tudi o inovativnem modelu, s katerim bi lahko bili bioreaktorji v obratu popolnoma utilizirani. Tako sva ustvarila konfiguracijo z izmenjevanjem dveh N-1 perfuzijskih bioreaktorjev in treh bioreaktorjev v produkcijskem delu procesa. V najini konfiguraciji traja N-1 del s perfuzijo 6 dni, MS del procesa pa 10 dni. Takšna ureditev obrata v proizvodnji ni ustaljena, z njeno implementacijo pa bi lahko utilizacijo opreme dvignili na 100 %.

Model predstavlja zanimivo novost, s katero bi lahko najina raziskovalna naloga precej pripomogla k splošni produktivnosti industrijskih obratov.

Za boljšo predstavo pa sva tudi za najin inovativni model izdelala shematski prikaz.



Slika 10: Shematski prikaz konfiguracije 2 N-1, 3 MS BR

N-1(1)	BR1	N-1(1)	BR2	N-1(1)	BR3	N-1(2)	BR1	N-1(2)	BR2	N-1(2)	BR3	N-1(1)	BR1	N-1(1)	BR2	N-1(1)	BR3	N-1(2)	BR1	N-1(2)	BR2	N-1(2)	BR3
-1																							
0																							
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							

Tabela 9: Bioreaktorska konfiguracija 2 N-1 BR na 3 MS BR

V tabeli 9 je tako prikazan nov matematični model, ki sva ga ustvarila prek preizkušanja različnih možnosti ureditve bioreaktorskih konfiguracij v obratu. Ugotovila sva, da lahko največjo utilizacijo opreme dosežemo z izvajanjem dveh N-1 procesov, ki ju usklajujemo s tremi produkcijskimi bioreaktorji. Najprej trikrat ponovimo N-1 proces v bioreaktorju, ki je označen s svetlo zeleno barvo v tabeli, in po končanem prvem delu procesa gojišče nacepimo najprej v BR1, nato po novem N-1 procesu v BR2 in nazadnje še BR3. Isto nato ponovimo z drugim N-1 bioreaktorjem (stolpci svetlo oranžne barve). Ob izrisu več serij v modelu sva ugotovila, da je trajanje vseh procesov ob takšni ureditvi povsem usklajeno in da je tako proizvodna oprema popolnoma utilizirana. V modelu tako ni nobenih temno vijolično označenih polj, ki so v tabelah 3, 4 in 6 predstavljala opremo, ki ni v celoti utilizirana.

Takšna ureditev bioreaktorjev v proizvodnji trenutno še ni ustaljena, a bi z njeno uporabo lahko dosegli mnogo boljšo utilizacijo opreme in s tem posredno proizvedli večjo količino produkta oz. zdravilne učinkovite. Iz tega razloga verjameva, da ima najin model velik potencial in da bi podjetja s takšno ureditvijo proizvodnje lahko znatno povečala produktivnost svojih obratov za proizvodnjo bioloških izdelkov.

Za lažjo predstavo o pomembnosti optimizacije proizvodnje bioloških izdelkov sva iz literature zbrala še podatke za izračun stroškovnega vidika optimizacije. Proizvodnja biofarmaceutskih učinkovin je izjemno draga zaradi naslednjih dejavnikov (Khanal, 2021):

- uporablja se visokotehnološka oprema, ki je izjemno draga,
- proces se izvaja s surovinami visoke čistosti, ki so redke na trgu oz. jih je treba dodatno razviti,
- proces izvaja visoko usposobljen kader, ki ga je težko pridobiti na trgu dela,
- proces je energetsko zahteven,
- proces se izvaja v čistih prostorih, ki imajo visoke stroške gradnje.

Glede na podatke iz literature sva zasledila, da je cena 1 g učinkovine od 300 do 500 dolarjev na gram (Khanal, 2021).

V tabeli 10 je podana primerjava standardnega fed-batch procesa s procesom z N-1 perfuzijo.

	Število serij letno	Vrednost produkta v dolarjih
Fed-batch (1 na 1 konfiguracija)	25,4	34,2 mio \$
N-1 perfuzija (1 na 1 konfiguracija)	32,4	43,5 mio \$

Tabela 10: Finančna primerjava fed-batch procesa in N-1 perfuzije

Tabela prikazuje, da lahko tovarna bioloških zdravil letno prihrani 9,3 mio \$. Iz tega podatka je razvidna finančna korist uporabe perfuzije v N-1 delu procesa, saj pomeni znaten prihranek in večjo količino produkta, kot bi ga lahko pridobili v navadnem fed-batch procesu. Tudi z optimizacijo utilizacije proizvodne opreme in uporabo najinega matematičnega modela (tabela 9) bi lahko na podoben način dosegli velike izboljšave. Vrednosti produkta so pri izračunih v tabeli ocenjene in veljajo bolj za ameriške razmere. Podatki za slovenski in evropski trg niso na voljo.

4 Interpretacija in zaključek

4.1 Interpretacija rezultatov

Ob pisanju raziskovalne naloge sva ugotovila, da je proizvodnja bioloških izdelkov zelo širok pojem, ki ga niti slučajno nisva mogla v celoti spoznati in opredeliti zgolj v eni nalogi. Ravno zaradi kompleksnosti procesa bi pretirani posegi v proizvodnjo lahko pomenili vprašljivo kakovost bioloških učinkovin in bi s tem še podaljšali čas proizvodnje in proizvodne stroške. Kljub vsemu pa sva ugotovila, da bi lahko z manjšimi posegi dosegla popolno utilizacijo opreme. Primeri posegov so spremembe trajanja N-1 in main stage faze procesa, dodatek enega N-1 perfuzijskega bioreaktorja ali prilagoditev proizvodnega plana. S temi ukrepi bi lahko pospešili proizvodnjo in s tem biološke izdelke naredili splošno bolj dostopne tistim, ki jih nujno potrebujejo. Ugotovila sva tudi, da samo ozadje proizvodnje bioloških učinkovin zahteva ogromno biotehnološkega, kemijskega, biološkega, farmacevtskega in drugih znanj in da kljub napredni računalniški opremi, ki spremlja vse procese, še vedno potrebujemo znanstvenike, ki vse pogoje nadzorujejo, jih optimizirajo ter testirajo kakovost izdelkov, katerih produkcijska doba lahko do začetka razvoja do prodora na trg traja tudi več kot 10 let.

Na podlagi rezultatov, teoretičnega znanja in aproksimacij iz proizvodnje sva nato potrdila in ovrgla hipoteze.

HIPOTEZA 1 Nacepitvena (začetna) koncentracija celic v bioreaktorju ne vpliva na količino proizvedenega produkta. **OVRŽENA**

HIPOTEZA 2 Pri enakem celičnem klonu lahko s perfuzijo N-1 pridobimo več produkta kot v navadni tehnologiji. **POTRJENA**

HIPOTEZA 3 V daljšem časovnem obdobju je proces fed-batch prav tako učinkovit kot proces z N-1 perfuzijo. **OVRŽENA**

HIPOTEZA 4 Matematični model N-1 perfuzije lahko izboljša učinkovitost proizvodnje.

POTRJENA

HIPOTEZA 5 Z manjšimi posegi v obstoječo proizvodnjo lahko povečamo produktivnost obrata.

POTRJENA

Tabela 11: Potrjene in ovržene hipoteze

Ovrgli smo torej prvo hipotezo, ki kaže na pomen prestage procesov in njihovega vpliva na nacepitvene koncentracije celic, saj so ravno te tiste, ki ključno vplivajo na optimizacijo proizvodnje, ki je tudi predmet najine naloge. Nacepitvene koncentracije ŽC so torej tiste, ki lahko proizvodnjo skrajšajo in s tem omogočijo hitrejšo in lažjo dostopnost bioloških izdelkov. Pri tem pa je treba dodati še opazko, da kakovosti učinkovin hitrejša proizvodnja ne sme poslabšati. Vsekakor pa lahko ovržba prve hipoteze bralce navdaja z optimizmom, saj lahko nadaljnji razvoj te tehnologije kmalu pripomore k višji produktivnosti farmacevtske industrije, ki je v sodobnem svetu vsekakor eno izmed gonil svetovnega razvoja.

Pomembna je tudi potrditev druge hipoteze, ki se prav tako ukvarja z optimizacijo proizvodnje in biotehnologom ključno pomaga do željenih rezultatov v krajšem produkcijskem času. Vsekakor pa naju je presenetila ovržba tretje hipoteze, ker pred samo poglobitvijo v praktično-raziskovalni del nisva predvidevala ustavitve rasti koncentracije celic po določenem obdobju oz. doseženem maksimumu. Presenetilo naju je tudi dejstvo, kako lahko isti celični kloni v dveh različnih procesih reagirajo različno do te mere, da pri enem procesu dobimo $K_{\check{Z}C} = 100$ mio $\check{Z}C/mL$, pri drugem pa le 34 mio $\check{Z}C/mL$.

Potrditvi četrte in pete hipoteze sta bili za najino raziskovalno nalogo izrazito pozitivni, saj sva s tem dokazala, da lahko proizvodnjo bioloških učinkovin, ki je že tako na visokem nivoju, še bistveno izboljšamo in optimiziramo ter s tem dosežemo popolno utilizacijo proizvodne opreme, znižamo stroške proizvodnje in povečamo dostopnost zdravil na svetovnem trgu.

Za to, da sva lahko prišla do teh odgovorov sva razvila matematični model, ki nama je omogočal simulacijo različnih pogojev v bioreaktorju, rasti različnih celičnih kultur, različnih postrojenj proizvodnje in še mnogo drugih parametrov. S pomočjo podatkov iz literature in

glede na izkušnje iz proizvodnje sva simulirala najbolj realne pogoje in ugotovila, da se najin model sklada z realnimi podatki, kar naju navdaja z upanjem, da bo lahko takšen simulacijski model pomagal znanstvenikom in procesnim strokovnjakom pri izboljšavi učinkovitosti proizvodnje bioloških učinkovin.

S tem sva svojo raziskovalno nalogo zaokrožila in zaključila (več o tem v poglavju 4.2), vsekakor pa bi se dalo najino raziskavo še izboljšati, če bi povečala njeno obsežnost, da bi lahko problem proizvodnje še bolj celovito predstavila ali pa bi se bolj podrobno osredotočila predvsem na en del in se mu posvetila v globino. Res pa je, da je proizvodnja bioloških učinkovin zelo širok pojem in bi se lahko z njim ukvarjala v neskončnost. Prav zato je to morda nekaj, k čemur se bova v prihodnosti še vračala.

4.2 Zaključek

Raziskovanje problematike optimizacije proizvodnje bioloških učinkovin nama je predstavljalo užitek, hkrati pa tudi izziv, ker sva se morala z določenimi področji kemije, biologije, farmacije in biotehnologije spoznati povsem na novo. Pri raziskovanju sva zato poglobila svoje znanje o pomembnosti tistih zdravil, ki niso vedno dostopna širšemu krogu ljudi, o njihovi uporabi, predvsem pa o njihovi proizvodnji, pri čemer sva se soočila s problemom njene optimizacije. Naučila sva se tudi jasneje postaviti hipoteze ter kritično obdelovati, izbirati in analizirati različna, tudi mednarodno priznana gradiva na izbranem področju.

Z raziskovalnim delom sva poleg odkrivanja novih obzorij razvila tudi model, ki omogoča optimizacijo proizvodnje (3.3). Prišla sva do konkretnih predlogov za izboljšavo proizvodnje (3.1–3.3) in dokazala, da je optimizacija proizvodnje možna brez večjih sprememb v samem procesu in je zato to primerna pot za nadaljnji razvoj proizvodnje bioloških učinkovin v tej smeri. Hkrati pa raziskovalno delo rešuje tudi enega ključnih problemov omenjene optimizacije, saj je v načrtu, da se bo izdelan matematični/simulacijski model proizvodnje v bodoče uporabljal pri planiranju proizvodnje novih produktov in tako bo tudi najina raziskovalna naloga pripomogla k vsaj malenkost večji učinkovitosti proizvodnje bioloških učinkovin in k lažji ter hitrejši dostopnosti produktov tega tipa.

Ker pa je področje široko, sta se nama ob razmišljanju o možnostih za nadaljnje raziskovanje poleg še poglobljene in še bolj empirično začrtane raziskave z močnejšim poudarkom na globini problema, kar sva izpostavila že v interpretaciji, porodili še dve vprašanji, ki bi ju rada izpostavila:

- Kako narediti biološka zdravila dostopna širšemu krogu ljudi?
- Kako ljudi izobraziti o učinkih in delovanju bioloških zdravil ter o področju njihove uporabe?

Predvsem zanimivo tudi za javnomnenjsko raziskavo bi bilo drugo vprašanje, saj meniva, da ljudje v splošnem ne poznajo bioloških zdravil, njihovega delovanja in uporabe. Mogoče pa bo prav to najina naslednja misija.

Kitajski pregovor pravi: *»Povej mi in bom pozabil. Pokaži mi in si bom zapomnil. Vzbudi mi zanimanje in bom razumel.«*

Raziskovalno področje je tudi nama vzbudilo zanimanje, kar naju je v procesu raziskave pripeljalo do točke, da ga lahko vsaj delno razumeva in ga pokaževa tudi drugim ljudem, da ga bodo razumeli. Kaj pa prihodnost? Kje so stopničke, ki jih mora farmacevtska industrija še prestopiti? Kaj se bo zgodilo, ko pridemo do te točke? Kam nas vodi nadaljnji razvoj? To so vprašanja, ki si jih lahko zastavi prav vsak izmed nas, naši odgovori pa so lahko le plod domišljije posameznikov, ki bodo (bomo) nekoč ustvarjali razvoj in oblikovali nadaljnje stopničke tega razvoja.

5 Viri in literatura

- (1) *Biologicals*. WHO [online]. [citirano: 18. feb. 2024, 14.53]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.who.int/health-topics/biologicals#tab=tab_1>.
- (2) *Biološka zdravila in podobna biološka zdravila*. Sandoz – Lek [online]. [citirano: 19. feb. 2024, 10.42]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/podobna-bioloska-zdravila/bioloska-zdravila-in-podobna-bioloska-zdravila/>>.
- (3) *Uporaba perfuzije v predprodukcijski fazi za okrepitev bioprocesa z dohranjevanjem – magistrsko delo*. ŠKUFGA, Jan. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=152376&lang=slv>>.
- (4) Madigan, M. R., Bender, K. S., Buckley, D.H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. 2018. *Brock of Biology of Microorganisms*. 15. izd. New Jersey, Pearson: str. 1022.
- (5) Xu, J., Rehmann, M. S., Xu, M., Zheng, S., Hill, C., He, Q., Borys, M. C., Li, Z. J. 2020. *Development of an intensified fed-batch production platform with doubled titers using N-1 perfusion seed for cell culture manufacturing*. *Bioresources and Bioprocessing*, str. 7, 17.
- (6) Flickinger, M. C. 2013. *Upstream Industrial Biotechnology, 2 Volume Set*. New Jersey, John Wiley & Sons: str. 4134.
- (7) Agrawal, P. 2015. *Biopharmaceuticals: An emerging trend in drug development*. *Soj Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2, 1: e0020 doi: 10.15226/2374-6866/2/1/00120: str. 2.
- (8) Wohlenberg, O. J., Kortmann, C., Meyer, K. V., Schellenberg, J., Dahlmann, K., Bahnemann, J., Scheper, T., Solle, D. Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles. *Eng Life Sci*. 2022; 22: 484–494. 10.1002/elsc.202100172. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9288990/>>.
- (9) Bausch, M., Schultheiss, C., Sieck, J. B. (2019) Recommendations for comparison of productivity between fed-batch and perfusion processes. *Biotechnol J*. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://doi.org/10.1002/biot.201700721>>.

- (10) Bielser J. M., Wolf M., Souquet J, Broly H., Morbidelli M. (2018) Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing—a critical review. *Biotechnol Adv* 36(4): 1328–1340. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.011>>.
- (11) Du, C., Xu, J., Song, H., Tao, L., Lewandowski, A., Ghose, S., Borys, M., Li, Z. (2019) Mechanisms of color formation in drug substance and mitigation strategies for the manufacture and storage of therapeutic proteins produced using mammalian cell culture. *Process Biochem* 86: str. 127–135. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.013>>.
- (12) Quin, He., Rehman, Matthew S., Tian, Jun., Xu, J. (2022). Improved Titer in Late-Stage Mammalian Cell Culture Manufacturing by Re-Cloning. [citirano: 12. mar 2024, 1.52] Dostopno na spletnem naslovu: <<https://www.mdpi.com/2306-5354/9/4/173>>.
- (13) Prasad, N. K. 2010. *Downstream Process Technology: A New Horizon in Biotechnology*. New Delhi, PHI Learning Private Limited: str. 5–13.
- (14) *What is the difference between upstream and downstream?*. Pharmaceutical solutions [online]. [citirano: 17. mar 2024, 20.44] Dostopno na spletnem naslovu: <<https://pharsol.com/knowledge-hub/blog/upstream-downstream>>.
- (15) Khanal, O., Lenhoff, M. A. (2021). Developments and opportunities in continuous biopharmaceutical manufacturing. National Library of Medicine [online]. [citirano: 17. mar 2024, 20.25]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043180/>>.
- (16) A. Mahé, A. Martiné, S. Fagète, P. Girod; Exploring the limits of conventional small-scale CHO fed-batch for accelerated on demand monoclonal antibody production, *Bioprocess Biosyst Eng*. 2022 Feb; 45(2): 297–307.



MLADI RAZISKOVALCI KOROŠKE 2023/24

Naslov naloge: **Priprava modela za optimizacijo proizvodnje bioloških izdelkov**

Avtor-ice/ji: **Zala Špoljar Slivnik, 3. b, in Tilen Štifter, 3. b**

Mentor-ice/ji: **mag. kemijske tehnike Judita Čas Krneža, prof., in Rok Brišar, dr. kemijske tehnike**

S podpisom potrjujem, da je naloga avtorsko delo mladih raziskovalcev.

Podpis mentorja-ice: _____