

Stanisław LEDAKOWICZ

e-mail: stanleda@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Rola inżynierii biochemicznej w rozwoju biotechnologii**Wstęp**

Intensywny rozwój biotechnologii jest głównie kojarzony w osiągnięciami biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Wiadomo, że zintegrowanie biologii, chemii i inżynierii w celu technicznego wykorzystania potencjału mikroorganizmów kultur tkankowych lub ich części stanowi podstawę biotechnologii i dlatego nie należy zapominać o istotnym wkładzie inżynierii, zwanej czasami bioinżynierią, do jej rozwoju.

Ogólnopolska Konferencja Naukowa *Postępy Inżynierii Bioprocessowej* organizowana w Polsce od ponad 30 lat, co 3 lata, pod patronatem *Komitetu Inżynierii Chemicznej i Procesowej Polskiej Akademii Nauk* jest forum wymiany informacji, a publikacje wystąpień uczestników tej konferencji na łamach *Inżynierii i Aparatury Chemicznej* starają się przybliżyć polskiemu czytelnikowi tę tematykę i zrelacjonować najnowsze osiągnięcia, postępy w obszarze inżynierii biochemicznej [Ledakowicz i in., 2002; 2005; 2009 i 2012].

O poszczególnych obszarach inżynierii biochemicznej m.in. inżynierii bioreaktorowej, inżynierii metabolicznej i inżynierii biologicznej starałem się informować we wspomnianych wyżej publikacjach, jednakże bioinżynieria wciąż jest kojarzona jedynie z techniczną realizacją i powiększaniem skali procesów biotechnologicznych. Owszem, to zadanie jest niebagatelne ale kolejne wyzwania czekają przed inżynierią biochemiczną. *Vranch i Titchener-Hooker* [2013], w publikacji na łamach *Igenia* - kwartalnika *Royal Academy of Engineering* uważają, że specjaliści inżynierii biochemicznej powinni się włączyć aktywniej do rozwoju produkcji biofarmaceutyków. Dotychczas fermentacja mikrobiologiczna była i wciąż jest standardową metodą biosyntezy wielu leków, ale ostatnio rozwój nowych wyrobów przemysłu farmaceutycznego wyraźnie przesuwają się w kierunku produkcji dużych molekuł białkowych typu hormonów, czy przeciwciał monoklonalnych z wykorzystaniem linii komórkowych. Takim spektakularnym bioproduktem była w latach 80. biosynteza insuliny ludzkiej, dzięki zastosowaniu techniki rekombinowanego DNA. Rynek biofarmaceutyków jest olbrzymi i ciągle się rozszerza. Przykładowo w 2010 roku był wart 114 mld USD, przy czym na badania i rozwój (R+D) wydano 25 mld USD; i w tym tylko roku na rynku pojawiło się 11 nowych bioproduktów. W Europie w 2011 roku sprzedaż farmaceutyków osiągnęła wartość 140 mld EUR, wśród których 36 mld EUR stanowiły biofarmaceutyki, a 5 z 10 najlepiej sprzedających się leków na świecie w 2013 roku to przeciwciała monoklonalne.

W Polsce również obserwuje się ten trend, powstały nowe firmy zajmujące się produkcją leków biologicznych (*biologics*) (wytwarzanych przez żywe komórki), bądź leków biopodobnych (*biosimilars*), wytwarzanych przez alternatywnych producentów po wygaśnięciu ochrony patentowej oryginalnych leków biologicznych. Znana polska firma farmaceutyczna *Polpharma* stworzyła specjalną jednostkę biznesową *Polpharma Biologics* i zbudowała supernowoczesne laboratorium (B+R) w *Gdańskim Parku Naukowo Technologicznym*. Jest ono wyposażone w najnowocześniejszy sprzęt umożliwiający efektywną pracę ze skomplikowanymi białkami, jakimi są przeciwciała monoklonalne i inne białka terapeutyczne [Polpharma Biologics, 2014]. Inna firma działająca w Polsce to *Pure Biologics*, która opracowała i wdrożyła specjalistyczną platformę selekcji przeciwciał monoklonalnych i poszukującą metod selekcji aptamerów (oligonukleotydów o wysokim powinowactwie do białek i innych cząsteczek) [Jeleń, 2015]. Kolejną czołową polską firmą biotechnologiczną to *Mabion S.A.*, która została utworzona w celu wprowadzenia na rynek leków biotechnologicznych najnowszej generacji opartych na huma-

nizowanych przeciwciałach monoklonalnych. W ciągu kilku lat *Mabion* osiągnął kompetencję wytwarzania leków biotechnologicznych od fazy projektowania, poprzez wybór platformy i technologii wytwarzania, aż do wyprodukowania gotowego leku. Obecnie w swoich laboratoriach w Łodzi spółka prowadzi prace B+R nad kilkoma lekami biotechnologicznymi, stosowanymi w leczeniu nowotworów oraz w chorobach metabolicznych [Mabion, 2015].

Nakłady na rozwój badań w zakresie biotechnologii medycznej w Polsce również znacznie wzrosły. Na projekty B+R w tej dziedzinie, finansowane przez *Narodowe Centrum Badań i Rozwoju* w ramach *Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka*, wydatkowano w latach 2007-2013 ponad 150 mln USD. Przykładami mogą tu być następujące projekty [Biotech. Im., 2012]:

- *3CLA – Biotechnological targeted anticancer drug (Adamed Sp. z o.o.)* – 26 411 358,98 USD;
- *Silesian Bio-Farm Center of Biotechnology, Bioengineering and Bionics (Politechnika Śląska)* – 26 754 817 USD;
- *The Małopolska Center of Biotechnology (Uniwersytet Jagielloński)* – 27 356 928 USD;
- *Center of Biotechnology of Medical Devices. Package of innovative biopharmaceuticals used for human and animal therapy and prevention (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)* – 29 859 792,36 USD.

Miejmy nadzieję, że te imponujące inwestycje w polskiej biotechnologii przyczynią się do dalszego jej rozwoju nie tylko w wymienionych centrach badawczych, a inżynieria biochemiczna powinna także znaleźć należne miejsce w badaniach B+R.

Korzystając z typowego schematu bioprocessu (*up-stream*, hodowla w bioreaktorze, *down-stream processing*) postaram się przedstawić postępy w dziedzinie inżynierii biochemicznej i perspektywy jej rozwoju.

Up-stream processing

Jak już wspomniano, zgodnie z makroanalizą przemysłowego procesu biotechnologicznego można wyróżnić te trzy podstawowe etapy [Ledakowicz, 2011]:

- (1) przygotowanie materiału biologicznego (*inokulum*) i substratów tzw. *upstream processing* (USP),
- (2) przeprowadzenie właściwego procesu biochemicznego (hodowla w bioreaktorze, czy biotransformacja lub reakcja enzymatyczna),
- (3) oddzielenie biomasy od płynu hodowlanego i oczyszczenie bioproduktów. tzw. *downstream processing* (DSP).

O ile dawniej UPS stanowił domenę mikrobiologów, to zaangażowanie inżynierii biochemicznej w ten etap rozwoju bioprocessu przyczyniło się do wyraźnego postępu, wzrostu wydajności bioproduktów. Ta wydajność zależy od wyboru właściwej linii komórkowej a także od optymalizacji pożywki, medium i może być zwiększona bez wyraźnego wzrostu kosztów inwestycyjnych czy eksploatacyjnych. Wynika to stąd, że objętość reaktora pozostaje ta sama, a selekcja bardziej wydajnego materiału biologicznego i optymalizacja medium powoduje wzrost stężenia bioproduktu.

Dzięki wykorzystaniu wysoko wydajnych nowoczesnych technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz zaangażowaniu inżynierii metabolicznej, która stosuje zasady inżynierii reakcji chemicznych, optymalizacji i inżynierii systemów nastąpiło wyraźne podniesienie wydajności biosyntezy wielu bioproduktów, a także zmniejszenie zużycia energii przez komórki i biosyntezy niepożądanych, ubocznych produktów.

Biochemia dostarcza map szlaków metabolicznych i informacji dotyczących mechanizmów reakcji biochemicznych.

Inżynieria genetyczna dostarcza narzędzi niezbędnych do genetycznych modyfikacji organizmów za pomocą techniki rekombinacji DNA.

Inżynieria biochemiczna wykorzystując stosowane od lat metody podejścia do analizy procesów jednostkowych i reakcji chemicznych, oraz całych systemów, umożliwia właściwą ilościową analizę złożonego, zintegrowanego układu reakcji biochemicznych o różnych szybkościach. Wielkość strumieni metabolitów – według określonej sekwencji reakcji biochemicznych tzw. szlaków metabolicznych to podstawowy wyznacznik, ilościowy parametr szlaków metabolicznych. Takimi zagadnieniami jak identyfikacja struktury sieci metabolicznej, kwantyfikacja strumieni metabolitów *in vivo*, i identyfikacja struktury kontroli strumieni metabolitów, zajmuje się tzw. analiza strumieni metabolicznych MFA (*Metabolic Flux Analysis*). Analiza strumieni metabolicznych nie daje jednak odpowiedzi jak zmienić wartości tych strumieni w pożądanym kierunku. Tymi zagadnieniami zajmuje się drugi ważny dział inżynierii metabolicznej – analiza regulacji, czy kontroli metabolicznej MCA (*Metabolic Control Analysis*). [Stephanopoulos i in., 1998]. Poznanie fluksomu, będącego sumą wszystkich strumieni metabolitów jest następnym celem badawczym, po zidentyfikowaniu genomu, trans- kryptomu, proteomu i metabolomu.

Zespoły badawcze znajdują się pod ciągłą presją czasu aby uzyskać jak największą wydajność bioproduktu o jak najwyższej jakości. Prowadzone są całe serie doświadczeń z wykorzystaniem techniki planowania eksperymentów w stacjach składających się np. z 24 bioreaktorów o małej pojemności rzędu 10-25 mL, z pełnym wyposażeniem (mieszadło, dystrybutor gazu, elektrody pH, pO₂, itp.) i oprzyrządowaniem [Lange i in., 2014].

Zmniejszanie skali bioreaktorów (*scaling-down*) znacznie redukuje czas badań i rozwoju nowego bioproduktu i jest obecnie standardem w firmach biofarmaceutycznych [Shimoni i in., 2014].

Rozwój bioprocessu i jego optymalizacja obejmuje między innymi wysokowydajny *screening* komórek i selekcję udoskonalonych nowych linii komórkowych, optymalizację podłoża hodowlanego, wybór najlepszej strategii dozowania substratów i powiększanie skali procesu. Ciągłe prowadzenie procesów w ramach USP jest już nieźle opanowane dla niestabilnych produktów, ale ich wyodrębnianie i oczyszczanie w sposób ciągły przedstawia wciąż wiele nierozwiązanych problemów i znacznie wydłuża czas produkcji, a trzeba pamiętać, że krótki okres retencji produktów zapewnia ich wysoką jakość [Gronemeyer i in., 2014].

Proces hodowli w bioreaktorach

Inżynieria bioreaktorowa zajmuje się badaniami warunków pracy bioreaktorów, ich optymalizacją, opracowaniem odpowiednich konstrukcji bioreaktorów oraz automatyczną kontrolą i sterowaniem ich pracą.

Bioreaktory jednorazowe. W produkcji biofarmaceutyków coraz częściej używa się jednorazowych bioreaktorów w postaci sterylnej plastikowej worka stanowiącego wnętrze bioreaktora. Te jednorazowe bioreaktory spełniają wymagania GMP i osiągają już objętość rzędu 2 m³. Dostępne są a rynku różne formy tych jednorazowych bioreaktorów, np. do bioreaktorów wstrząsanych czy falujących WBR (*Wave Bioreactors*), stosowanych do hodowli komórek zwierzęcych, które są jak wiadomo bardzo wrażliwe na naprężenia ścinające generowane w bioreaktorach z mieszadłem [Ladakowicz, 2011].

Bioreaktory jednorazowe nie wymagają mycia, czyszczenia i sterylizacji dzięki czemu eliminowane są potencjalne źródła zakażeń [Shukla i Gottshalk, 2013]. Brakuje jednak wciąż metod walidacji tych procesów, ponieważ istnieje ryzyko związane z ekstrakcją szkodliwych substancji z materiału plastikowego, z którego wykonany jest ten jednorazowy pojemnik, czy z możliwością przecieku, bądź adsorpcji bioproduktów na ściankach naczyń, co może obniżyć wydajność procesu.

Wybór strategii prowadzenia fermentacji jest istotną sprawą. Najczęściej konieczna jest decyzja czy realizować bioprocess w sposób ciągły, czy półciągły tzw. dolewowy, o jakiejś wybranej funkcji

zasilania bioreaktora. Wybór zależy głównie od jakości produktu, istniejących urządzeń (infrastruktury) i doświadczenia załogi. Prowadzenie hodowli bioreaktorowych w sposób ciągły umożliwił rozwój bioreaktorów perfuzyjnych. Początkowo płyn pochodzący od biomasy był oddzielany od biomasy w sposób ciągły, za pomocą wirującego filtru typu *Spinfilter*, stosowanego w hodowlach komórek zwierzęcych, ale obecnie używa się głównie modułów membranowych typu *hollow fibers*. Dzięki ciągłej wymianie podłoża składniki odżywcze są utrzymywane na tym samym poziomie stężeń, a produkty są usuwane ze środowiska, zapewniając tym samym optymalne warunki wzrostu komórek i unikając efektów związanych z degradacją białek, inhibicją, czy toksycznością produktów ubocznych. W bioreaktorach perfuzyjnych stężenie żywych komórek osiąga 16 mln w 1 mL, a bioprocess może trwać miesiącami, podczas gdy w klasycznych bioreaktorach zazwyczaj nie przekracza 3 tygodni [Wright i in., 2015].

Down-stream processing

W ostatnim dziesięcioleciu osiągnięto znaczący postęp w rozwoju USP, natomiast *downstream processing* (DSP), który obejmuje procesy wydzielania, oczyszczania bioproduktów a także istotnie przyczynia się do podniesienia wydajności, produktywności a także czystości bioproduktów pozostał jakby w tyle.

Oddzielanie biomasy of płynu hodowlanego, zwane też klarowaniem, odbywa się poprzez filtrację bądź wirowanie, tu także można zaobserwować postęp w nowych technikach filtracyjnych, dalsze zateżanie prowadzi się przy wykorzystaniu technik membranowych (np. ultrafiltracji), przy czym w przypadku produkcji przeciwciał monoklonalnych bardzo ważną operacją jest inaktywacji wirusów, co wymaga zastosowania nanofiltracji, a w końcu diafiltracji.

Separacja przeciwciał monoklonalnych prowadzona jest zazwyczaj przy zastosowaniu technik chromatograficznych, takich jak chromatografia powinowactwa z wykorzystaniem jako ligandu rekombinowanego białka A, wykazującego bardzo wysokie powinowactwo do immunoglobulin różnego pochodzenia. Jest to jedna z najczęściej używanych operacji jednostkowych wychwytu przeciwciał [Grodzki i Berenstein, 2010] obok chromatografii jonowymiennej CEX (*Cation Exchange Chromatography*).

Wzrost wydajności wydzielania i oczyszczania produktów został osiągnięty dzięki optymalizacji poszczególnych operacji jednostkowych i powiększenia skali. Niemniej jednak nowe alternatywne procesy rozdzielania są ciągle badane i rozwijane przy zastosowaniu nowych technik planowania eksperymentów DoE (*Design of Experiments*) i dążeniu do osiągnięcia wymaganej jakości produktu dzięki projektowaniu QbD (*Quality by Design*) [Shimoni i in., 2014a,b].

Techniki nie-chromatograficzne takie jak: procesy membranowe, dwufazowa wodna ekstrakcja ATPE (*Aqueous Two-Phase Extraction*), frakcjonowanie pianowe białek, czy klasyczne, wciąż ulepszone operacje jednostkowe strącania i krystalizacji należą także do metod rozwojowych DSP. Nie-chromatograficzne techniki wydzielania i oczyszczania bioproduktów nie są zazwyczaj stosowane w produkcji biofarmaceutyków, jakkolwiek mają olbrzymi potencjał aplikacyjny a ponadto są znacznie tańsze.

Istotnym problemem w oczyszczaniu produktów biologicznych jest separacja komórek, usuwanie nierozpuszczalnych składników wszelkiego rodzaju niepożądanych zanieczyszczeń, a zwłaszcza białek resztkowych komórek gospodarza HCP (*Host Cell Protein*), czy fragmentów DNA lub innych wielocząsteczkowych aglomeratów. Zastosowanie jednorazowych technologii, a zwłaszcza bioreaktorów perfuzyjnych spowodowało znaczny wzrost stężenia komórek, co spowodowało dodatkowe problemy w DSP. Trwają badania nad zastosowaniem do tych celów ekstrakcji ATPE zamiast drogiej chromatografii powinowactwa. Strącanie jest także stosowane do oczyszczania białek w skali przemysłowej Filtracja membranowa pozwala usunąć supernatant i kolejno następuje rozprowadzenie osadu w odpowiednim buforze. Zamiast filtracji stosowane są także wirówki. Krystalizacja jest bardzo często stosowaną techniką w analizie strukturalnej białek ale jako operacja oczyszczania stosowana jest

raczej do mniejszych molekuł. Postać krystaliczna jest zawsze pożądana w końcowym procesie formulacji bioproduktu ze względu na jej wysoką stabilność.

Techniki chromatograficzne są jednak niezbędne do uzyskania super czystego bioproduktu i nie ustają wysiłki zmierzające do ich ulepszenia, a zwłaszcza do ich uciążenia. Pseudo-ciągła chromatografia z symulowanym przemieszczaniem się złoża SMB (*Simulated Moving Bed*), w której ruch fazy stałej jest symulowany przez przełączanie zaworów zasilania surówki, ekstraktu i rafinatu jest znana i stosowana od lat [Ledakowicz i in., 2003].

Zydney [2013] oraz ostatnio Dutta i in. [2015] zaproponowali zastosowanie ciągłej chromatografii powinowactwa, z wykorzystaniem rekombinowanego białka A, do oczyszczania przeciwciał monoklonalnych metodą CCTC (*Continuous Countercurrent Tangential Chromatography*), polegającej na przeciwwprądowym przepływie złoża w postaci zawiesiny ziaren wypełnienia (adsorbent w postaci drobnych ziaren żywicy) przez kaskadę mieszalników statycznych i modułów membranowych typu *hollow fibres*. Mikroporowate membrany zatrzymują cząstki żywicy, pozwalając przepływać rozpuszczonym składnikom, w tym białkom, przez membranę do permeatu. Roztwory buforów stosowanych do przemywania, elucji i desorpcji przepływają w przeciwwprądzie do fazy zawieszinowej. Dzięki zastosowaniu metody CCTC uzyskuje się bardzo dobry rozdział przy znacznie mniejszym zużyciu buforów stosowanych do oczyszczania białek, w porównaniu do klasycznej chromatografii powinowactwa z udziałem białka A, w kolumnach chromatograficznych ze złożem stałym.

Zastosowanie nowych technik i operacji jednostkowych rozdziału w skali przemysłowej wymaga pewnej standaryzacji i tworzenia platform technologicznych, które spełniają wymogi GMP, znacznie skracają czas i poprawiają efektywność procesów DSP - wydzielania i oczyszczania bioproduktów. Wciąż aktualnym wyzwaniem jest integracja wszystkich etapów wytwórczych USP, biosyntezy i DSP, bo ich wzajemne powiązania wymagają dalszych badań i rozwoju.

LITERATURA

Biotechnological Innovations, 2012. *Biuletyn NCBiR*, 3-22

Boruta T., Bizukojć M., Ledakowicz S., 2012. Modelowanie metabolizmu w erze inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.*, 51, nr 4, 89-94

Dutta A.K., Tran T., Napadensky B., Teella A., Brookhart G., Ropp F.A., Zhang A.W., Tustian A.D., Zydney A.L., Shinkazh O., 2015. Purification of monoclonal antibodies from clarified cell culture fluid using Protein A capture continuous countercurrent tangential chromatography. *J. Biotechnol* (in press.) DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.026

Grodzki A.C., Berenstein E., 2010. Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose. *Met. Moll. Biol.*, 588, 33-41. DOI: 10.1007/978-1-59745-324-0_5

Gronemeyer P., Ditz R., Strube J., 2014. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioeng.*, 1, 188-212. DOI: 10.3390/bioengineering1040188

Jeleń F., 2015. Twarze biotechnologii. *Biotechnologia.pl* (kwartalnik portalu internetowego) nr 1, 13

Lange I., Chhatre S., Zoro B., 2014. Reducing timelines in early process development. *BioProcess Int.*, 12, nr 10, 34-37

Ledakowicz S., 2002. Inżynieria bioreaktorowa. *Inż. Ap. Chem.*, 41, nr 3, 4-5

Ledakowicz S., 2005. Czy biologia molekularna zmienia paradygmat inżynierii bioprocessowej? *Inż. Ap. Chem.*, 44, nr 4, 4-6

Ledakowicz S., 2009. Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.*, 48, nr 3, 17-20

Ledakowicz S., 2011. *Inżynieria biochemiczna*, WNT, Warszawa

Mabion S.A już niedługo nowy kompleks naukowo-przemysłowy, 2015. Portal Finansowy FinWeb.pl (05.2015) <http://www.finweb.pl/aktualnosci/18054-mabion-s-a-juz-niedlugo-nowy-kompleks-naukowo-przemyslowny>

Polpharma Biologics, 2015. *Misja i strategia* (05.2015) <http://www.polpharmabiologics.com/pl/about-us/our-mission.html>

Shimoni Y., Goudar C., Jenne M., Srinivasan V., 2014a. Qualification of scale-down bioreactors. Part 1: Concept. *BioProcess Int.*, 12, 5, 38-45

Shimoni Y., Goudar C., Jenne M., Srinivasan V., 2014b. Qualification of scale-down bioreactors. Part 2: Application. *BioProcess Int.*, 12, nr 6, 54-61

Shukla A., Gottschalk U., 2013. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends Biotech.*, 31, 147-154. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.10.004

Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J., 1998. *Metabolic engineering: Principles and methodologies*. Acad. Press, San Diego CA

Vranch S., Titchener-Hooker N., 2013. Biochemical Engineering. *Ingenia on line*, 56, September, 23- 29 (05.2015) http://www.ingenia.org.uk/ingenia/issues/issue56/Vranch_Hooker.pdf

Wright B., Bruninghaus M., Vrabel M., Walther J., Shah N., Bae S., Johnson T., Yin J., Zhou W., Konstantinov K. 2015. A novel seed-train process: using high-density cell banking, a disposable bioreactor, and perfusion technologies. *BioProcess Int.*, 13, nr 3

Zydney A.L., 2013. *Continuous antibody capture with Protein A countercurrent tangential chromatography: A new column-free approach for antibody purification*. ECI Conf.: On Integrated Continuous Biomanufacturing, Castelfelers, Spain, 20-24 October 2013 (05.2015) <http://www.engconf.org/staging/wp-content/uploads/2013/12/4-ECI-Zydney.pdf>

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu UMO 2013/11/B/ST8/00337.

The scientific and technological journal
INŻYNIERIA I APARATURA CHEMICZNA
Chemical Engineering and Equipment
 published since 1961

Journal is devoted to process calculations, construction and designing problems dealing with equipment and devices for process industries, especially chemical, petrochemical, power and food industry, both municipal engineering and environmental protection.

Readership consists of research workers, constructors and designers, managers and engineers.

Papers are dealing with unit operations of chemical engineering, processes and operations in such areas as bio- and nanotechnology, biomedical engineering, recycling, process safety. Scientific research, improved design methods, proper operating and maintenance of various apparatuses and devices are presented considering better capacity, better use of raw materials, energy saving and environmental protection.

Papers are revised by professional referees.

Journal homepage: <http://chemical-engineering-equipment.eu>