

Analiza osjetljivosti parametara modela proizvodnje monoklonskih protutijela

Herout, Brigita

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:310453>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Brigita Herout

1320/MB

**ANALIZA OSJETLJIVOSTI
PARAMETARA MODELA
PROIZVODNJE MONOKLONSKIH
PROTUTIJELA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ANALIZA OSJETLJIVOSTI PARAMETARA MODELA PROIZVODNJE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA

Brigita Herout, 1320/MB

Sažetak: Matematičko modeliranje biotehnoloških procesa predstavlja pojednostavljenu sliku stvarnog procesa od interesa te uvijek sa sobom nosi određeni stupanj nesigurnosti, a posebno se to odnosi na procjenu vrijednosti kinetičkih parametara. U okviru ovog rada provedena je simulacija i analiza lokalne i globalne parametarske osjetljivosti matematičkog modela proizvodnje monoklonskih protutijela primjenom NS0 stanica u normalnim i hiperosmotskim uvjetima. Simulacije i analize modela provedene su u programskim paketima CellDesigner i WR Mathematica 10.0. Rezultati simulacija pokazuju višu produktivnost monoklonskih protutijela u hiperosmotskim uvjetima. Najveću osjetljivost na lokalno povećanje i na smanjenje vrijednosti kinetičkih parametara u normalnim uvjetima pokazuju intermedijeri monoklonskih protutijela dok se u hiperosmotskim uvjetima najosjetljivijom pokazala koncentracija ukupnih stanica. Prema analizi globalne parametarske osjetljivosti promjena koncentracije glukoze, laktata i protutijela najviše ovisi o maksimalnoj specifičnoj brzini rasta stanica. Analiza osjetljivosti parametara modela daje uvid u ključne točke procesa te omogućava preciznije unaprijeđenje modela.

Ključne riječi: monoklonska protutijela, NS0 stanice, CellDesigner, lokalna parametarska osjetljivost, globalna parametarska osjetljivost

Rad sadrži: 58 stranica, 20 slika, 5 tablica, 61 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. *Kristina Radošević*
2. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
3. Doc.dr.sc. *Davor Valinger*
4. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo* (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

PARAMETER SENSITIVITY ANALYSIS OF MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION MODEL

Brigita Herout, 1320/MB

Abstract: Mathematical model of biotechnological process is a simplified version of the actual process of interest, but it always carries a certain degree of uncertainty, especially regarding the assessment of the kinetic parameters values. Within this work, a simulation and local and global parameter sensitivity analysis of a mathematical model describing of monoclonal antibody production using NS0 cells under normal and hyperosmotic conditions was performed. Simulations and model analyzes were performed in the software packages CellDesigner and WR Mathematica 10.0. The simulation results showed higher productivity of monoclonal antibodies under hyperosmotic conditions. The highest sensitivity to local increase and decrease of kinetic parameters in normal conditions was shown by intermediates of monoclonal antibodies, while in hyperosmotic conditions the concentration of total cells was the most sensitive. According to the global parameter sensitivity analysis, changes in the concentration of glucose, lactate and antibodies mostly depend on the maximum specific cell growth rate. The sensitivity analysis of the model parameters provides insight into the key points of the process and enables more precise model improvement.

Keywords: monoclonal antibody, NS0 cells, CellDesigner, local sensitivity analysis, global sensitivity analysis

Thesis contains: 58 pages, 20 figures, 5 tables, 61 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Kristina Radošević*, Associate professor
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
4. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 23 September 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MATEMATIČKO MODELIRANJE BIOPROCESA	2
2.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE PROCESA U STANIČNIM KULTURAMA	4
2.2.1. Nestrukturni modeli.....	5
2.2.2. Strukturni modeli.....	9
2.3. MONOKLONSKA PROTUTIJELA	10
2.3.1. Primjena monoklonskih protutijela	10
2.3.2. Proizvodnja monoklonskih protutijela.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. CellDesigner 4.4.2.....	15
3.1.2. WR Mathematica 10.0	19
3.1.3. Model biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama u normalnim i hiperosmotskim uvjetima.....	20
3.2. METODE.....	25
3.2.1. Izrada modela u programu <i>CellDesigner</i> i simulacija u programu <i>WR Mathematica 10.0</i>	25
3.2.2. Analiza parametarske osjetljivosti.....	25
3.2.2.1. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti.....	25
3.2.2.2. Analiza globalne parametarske osjetljivosti	26
3.2.3. Analiza stehiometrijske matrice modela	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. PRIKAZ MODELA BIOSINTEZE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA U GS-NS0 STANICAMA IZRAĐENOG U RAČUNALNOM PROGRAMU <i>CellDesigner</i>	30
4.2. SIMULACIJA MODELA BIOSINTEZE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA U GS-NS0 STANICAMA U RAČUNALNOM PROGRAMU <i>WR Mathematica 10.0</i>	32
4.3. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI	39
4.4. ANALIZA GLOBALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI.....	44
4.5. ANALIZE STEHIOMETRIJSKE MATRICE	49
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	52

1. UVOD

Komercijalna proizvodnja monoklonskih protutijela za terapijske i dijagnostičke svrhe čini velik udio u biotehnoškoj industriji, a osobito posljednje desetljeće obilježeno je trendom porasta. Izniman napredak u biofarmaceutskoj industriji pripisuje se primjeni tehnologije rekombinantne DNA i tehnologiji hibridoma koje su omogućile proizvodnju širokog niza prirodnih i modificiranih proteina u velikom mjerilu. Najveće postignuće u primjeni tehnologije hibridoma je upravo proizvodnja monoklonskih protutijela koja su specifična za određeni antigen te kao takva pogodna su u terapiji mnogih bolesti. Trenutno je na svjetskom tržištu komercijalno dostupan velik broj monoklonskih protutijela, a značajan broj ovih bioterapeutika je u raznim fazama kliničkih ispitivanja.

Industrijska proizvodnja monoklonskih protutijela obavlja se pomoću staničnih linija sisavaca, najčešće CHO te GS-NS0 staničnih linija. Stanične linije sisavaca odabrane su zbog mogućnosti provođenja kompleksnih posttranslacijskih modifikacija, procesa nužnog za očuvanje biološke aktivnosti proteina.

Brzorastuća potreba za biofarmaceuticima povećala je konkurentnost velikog broja kompanija koje se natječu za međunarodna tržišta te naglasila potrebu za optimizacijom i boljom kontrolom proizvodnog procesa. Pošto su biološki sustavi vrlo složeni te ih se ne može analizirati determinističkim pristupom koji se inače primjenjuje u ostalim granama znanosti, sistemska biologija nudi sve veći broj uspjeha na polju industrijske biotehnologije. Tradicionalno, razvoj visokoproduktivne stanične linije zahtjeva mnogo vremena i financijskih resursa, a primjenom matematičkih modela promijenjen je pristup u racionalnom dizajnu stanica kao proizvođača. Stoga su matematički modeli postali važan alat u optimiranju izvedbi biotehnoških procesa. Kinetički modeli prikladni su jer mogu prikazati složene biokemijske puteve u stanici na sažetiji način u usporedbi s većinom drugih vrsta modela. Načelno, mogu se upotrijebiti za detaljno razumijevanje, predviđanje i procjenu učinaka dodavanja, uklanjanja ili modificiranja molekularnih komponenti u stanici proizvođaču, ali i za dizajniranje bioreaktora i proizvodnog postupka.

Cilj ovog rada je analizirati matematički model biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 staničnoj liniji. Ključne točke modela definirat će se primjenom analize lokalne i globalne parametarske osjetljivosti te analizom stehiometrijske matrice modela.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MATEMATIČKO MODELIRANJE BIOPROCESA

Matematički modeli su moćan alat u kontinuiranoj težnji prema unapređenju, kako u temeljnim istraživanjima, tako i u primijenjenim istraživanjima i razvoju, a predstavljaju matematičke opise biokemijskih reakcijskih sustava, odnosno pojednostavljenije stvarnih procesa. Mogu se primijeniti za opis procesa na različitim razinama; (i) od aktivnosti enzima unutar stanice, (ii) do uzgoja te stanice u bioreaktoru, s ciljem postizanja optimalne produktivnosti biotehnološkog procesa (Butler i sur., 2019).

Matematički modeli predstavljaju hipoteze o utjecaju bioloških i fizikalnih fenomena na kontrolu procesa. Ako se predviđanje poklapa s eksperimentalnim podacima, poprilično je sigurno kako su upravo ti fenomeni ključni za kontrolu procesa. Jedna od najvažnijih karakteristika modela je mogućnost predviđanja o ponašanju sustava izvan granica uvjeta za koje su originalno razvijeni. Iako to ne znači nužno da će se biološki sustav ponašati u promijenjenim uvjetima kako model predviđa, korist matematičkog modela u usmjeravanju istraživanja i razvoja je neupitna. Također, kombiniranje matematičkih modela i eksperimentalnih podataka ima veću šansu unaprijediti proces nego sami eksperimentalni podaci (Kulov i Gordeev, 2014).

Modelirati se mogu različiti tipovi biotehnoloških sustava i procesa:

- (i) metabolički putevi u stanici,
- (ii) ekspresija gena,
- (iii) smrt stanica tijekom procesa sterilizacije,
- (iv) rast stanica u bioreaktoru i
- (v) aktivnost enzima.

Ovisno o procesu kojeg želimo modelirati, dostupnim podacima i krajnjem cilju, biološki procesi mogu se opisati stehiometrijskim ili kinetičkim modelima (Cvijović i sur., 2011):

- 1) ***Stehiometrijski modeli*** predstavljaju ustaljeno stanje sustava te ne sadrže kvantitativne podatke o regulaciji metaboličkih puteva. Temeljem stehiometrijskih koeficijenata za svaki metabolit u svakoj reakciji, moguće je postaviti jednadžbe ravnoteže masa za svaki metabolit. Prikladniji su od kinetičkih modela prilikom opisivanja velikih metaboličkih mreža. Uspješno se primjenjuju kao metabolički modeli u rekonstrukciji metaboličkih mreža na temelju genomskih sekvenci. Prvi takav rekonstruirani model je metabolički

model bakterije *Haemophilus influenzae* (Schilling i sur., 2000), a danas je poznato više od 80 takvih modela. Budući da stehiometrijski modeli pretpostavljaju ustaljeno stanje promatranog sustava, može doći do nemogućnosti određivanja rješenja te je potrebno uključiti daljnje analize. Analiza metaboličkih tokova (eng. *Metabolic Flux Analysis*, MFA) rješenje je sustava linearnih jednadžbi dobivenih iz masenih bilanci svakog metabolita što daje uvid u regulaciju metaboličkih reakcija. Analiza metaboličkih tokova omogućuje detaljnu kvantifikaciju unutarstaničnih tokova rješavanjem diferencijalnih bilanci mase na osnovu detaljnih mehanističkih modela, najčešće Michaelis-Menten kinetika (Cvijović i sur., 2011). Analiza bilanci tokova (eng. *Flux Balance Analysis*, FBA) oslanja se na stehiometrijske podatke, bez uvažavanja dinamičkih promjena u sustavu, a zahtijeva eksperimentalno određivanje ekstracelularnih tokova i stehiometrijske matrice metabolizma (Cvijović i sur., 2011). Glavna prednost ovih modela je u tome što se ne oslanjaju na informacije o kinetici pojedinih reakcija unutar metaboličke mreže.

- 2) **Kinetičko modeliranje** zahtijeva znanje o kinetici, uključujući i vrijednosti kinetičkih parametara. Kinetika različitih reakcija koristi se u opisivanju dinamičkih promjena varijabla stanja, najčešće koncentracija ključnih komponentni. Ovi dinamički modeli predstavljaju se najčešće u obliku diferencijalnih jednadžbi (kontinuirani dinamički sustavi) (Cvijović i sur., 2011). Diferencijalni modeli sastoje se od sustava diferencijalnih jednadžbi koje uključuju nezavisne, ravnotežne i operativne varijable te kinetičke parametre. Takvi modeli pokazuju kako se ravnotežne varijable mijenjaju s promjenama u jednoj ili više nezavisnih varijabli, odnosno izražavaju promjene u ravnotežnim varijablama s vremenom i/ili položajem. Diferencijalne jednadžbe opisuju kako ključni fizikalni i biološki fenomeni funkcioniraju. U nekim uvjetima, diferencijalne jednadžbe mogu se integrirati analitički ili pojednostaviti u algebarske jednadžbe (Almquist i sur., 2014).

Dinamički pristup modeliranju koristi se u modeliranju regulatornih procesa, primjerice središnji metabolizam ugljika (Chassagnole i sur., 2002), regulacija staničnog ciklusa (Barberis i sur., 2007) i različiti putevi signalizacije (Papin i sur., 2005). Ovakvi modeli olakšavaju razumijevanje kompleksnih dinamičkih karakteristika, poput glikolitičkih oscilacija, povratnog regulatornog

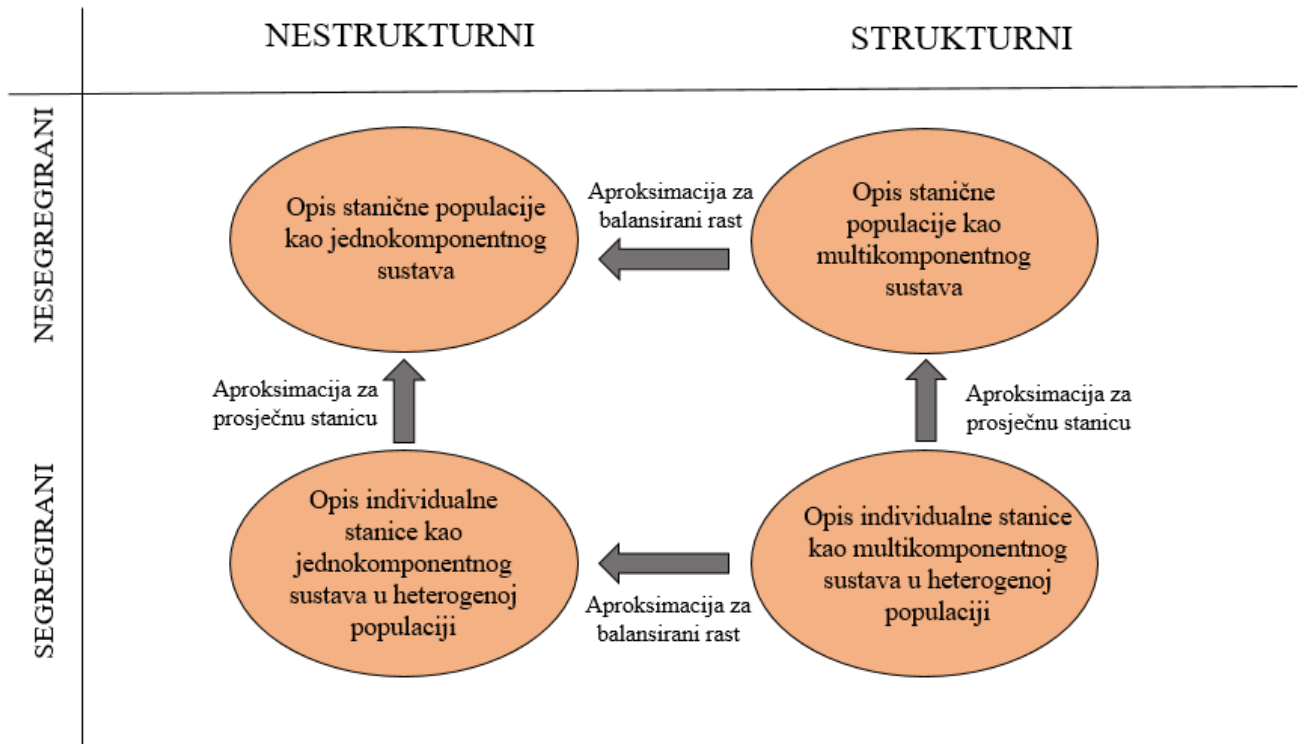
učinka ili oscilacije u staničnom ciklusu. U radu Chassagnole i sur. (2002) dinamički model opisuje središnji metabolizam ugljika kod bakterije *E.coli*, uključujući fosfotransferazni sustav (PTS), glikolizu, pentoza-fosfatni put te predstavlja prvi korak u sistemskoj analizi metabolizma *E.coli*. Glavna karakteristika ovog modela je svakako primjena u poboljšanju procesa mikrobne produkcije. Kinetički modeli mogu biti u raznim oblicima, ali kada su biotehnoški procesi u pitanju, fokus je na nestrukturnim i strukturnim modelima procesa u staničnim kulturama (Kulov i Gordeev, 2014).

Važnost matematičkih modela uočava se u mogućnosti sažimanja velikog broja podataka u jednadžbe kojima se opisuju kompleksne interakcije između radnog organizma, okolišnih uvjeta i fenomena transporta unutar bioreaktora. Odnosno, matematički modeli mogu sažeti prilično kompleksna ponašanja u relativno mali broj jednadžbi.

2.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE PROCESA U STANIČNIM KULTURAMA

Metabolizam životinjskih stanica koje rastu u kulturi je kompleksan i pokušava se opisati skupom matematičkih jednadžbi. Matematičko modeliranje stoga može biti koristan alat u racionalnom dizajniranju i optimizaciji sustava staničnih kultura (Almquist i sur., 2014). Odabir vrste modela ovisi o krajnjoj primjeni modela, vremenu potrebnom da se model postavi, kompleksnosti modela i vremena potrebnog za rješavanje prema dostupnim eksperimentalnim podacima (Craven i sur., 2013). Većina opisanih modela u literaturi karakterizirana je kao nestrukturani modeli (slika 1). Nestrukturani model pruža najjednostavnije metode modeliranja sustava staničnih kultura, a predstavlja polaznu točku za istraživanje relativno novih staničnih sustava s ograničenim izvorima podataka. Strukturni modeli obično imaju više jednadžbi te mogu pružiti više detalja metaboličkih mehanizama, primjerice kinetika transporta i enzimskih reakcija (Sanderson i sur., 1996).

Prednost primjene matematičkih modela u staničnim kulturama je neosporna. Simulacije izvedene pomoću ovakvih modela su jeftine, ne zahtijevaju posebno znanje za korištenje te unutar nekoliko minuta daju rezultate za svaki aspekt staničnog metabolizma. Stoga, primjena matematičkih modela u staničnim procesima znatno olakšava planiranje, optimizaciju i kontrolu procesa (Sanderson i sur., 1996).



Slika 1. Klasifikacija matematičkih modela koji opisuju procese u staničnim kulturama (Gernaey i sur., 2010)

2.2.1. Nestrukturani modeli

Bit ovakvog pristupa modeliranju je izrada integriranih modela, tj. modela koji u određenoj mjeri generaliziraju procese u stanici te ih preslikavaju na razinu cijele populacije (Kulov i Gordeev, 2014). Takvi modeli puno su korisniji za izučavanje biotehnoških procesa. Kompleksne kinetičke veze omogućavaju kvantitativni opis efekata koji su do tada bili poznati samo kvalitativno (Nelsen i Villadsen, 1992). Primjena kompleksnijih kinetičkih veza zahtjeva razvoj algoritama za računanje karakteristika tehnoloških procesa u numeričkoj formi. Neravnotežno stanje biotehnoškog procesa koristi se za procjenu stabilnosti, a metodologija analize za kontinuirane procese temelji se na linearizaciji jednadžbi modela, kao i kod ravnotežnog stanja (Kulov i Gordeev, 2014). Takvo modeliranje biotehnoškog procesa otvara mogućnosti multipliciranja optimalnih uvjeta prilikom implementacije procesa, u cilju dobivanja ciljanog produkta.

Središnji cilj nestrukturiranog modela je korelacija između staničnog rasta, potrošnje supstrata i inhibicije ili opis profila potrošnje supstrata unutar bioreaktora tijekom ekspresije ekstracelularnih proteina, a opis ključnih varijabli doprinosi modelu (Kiefhaber i sur., 1991). Ovakvi modeli opisuju promjene koncentracija stanica i supstrata tijekom proizvodnoga procesa pri čemu se stanice i njihove komponente modeliraju kao jedna cjelina (González-Figueroa i sur., 2018). Temelje se na jednadžbama očuvanja stanične mase, supstrata i metabolita. Nestrukturirane modele moguće je podijeliti prema 3 pojma:

- (i) izrazi za ekspresiju staničnog rasta,
- (ii) izrazi za ekspresiju unosa nutrijenata te
- (iii) izrazi za ekspresiju proizvodnje metabolita.

U tablici 1 dan je prikaz nekoliko različitih izraza za opis staničnog rasta pronađenih u literaturi. Pri opisu eksponencijalnog rasta, što je ujedno i najjednostavniji opis rasta, koncentracijski profili supstrata i stopa smanjenja ponekad se ne uzimaju u obzir. Opći oblik prikazan je jednadžbom 1, a izraz za prinos biomase po supstratu Y_i dan je jednadžbom 2:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = (\mu - k_D) \cdot X \quad [1]$$

$$r_i = \frac{\alpha}{Y_i} \frac{dX}{dt} \quad [2]$$

gdje r ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) predstavlja brzinu reakcije,

X (g L^{-1}) je koncentracija biomase,

μ (h^{-1}) specifična brzina rasta,

k_D (h^{-1}) je stopa smrtnosti,

α je stehiometrijski faktor, a

Y_i (g g^{-1}) je prinos biomase po supstratu (González-Figueroa i sur., 2018).

Ključna varijabla za rast stanica je specifična brzina rasta ($\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$), a ovisna je o vremenu te raznim fizikalnim, kemijskim i biološkim parametrima (koncentracija supstrata, koncentracija stanica, koncentracija produkta, pH, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, različiti inhibitori). Pri opisu specifične brzine rasta stanica najčešće se upotrebljava jednostavni Monodov

model. Monodova jednađba empirijski se izvodi iz Michealis-Menten jednađbe te opisuje proporcionalnost između specifične brzine rasta i niske koncentracije supstrata [3].

$$\mu = \frac{\mu_{\max}[S]}{K_s + [S]} \quad [3]$$

μ_{\max} (h^{-1}) predstavlja maksimalnu specifičnu brzinu rasta,

$[S]$ (g L^{-1}) je koncentracija supstrata, a

K_s (g L^{-1}) je konstanta zasićenja (González-Figueroa i sur., 2018).

Nedostatak ovog modela je pojednostavljeno prezentiranje bioprocesa, odnosno temeljem ovog modela bioproces ovisi direktno i jedino o makroskopskim varijablama koje predstavljaju radne uvjete u bioreaktoru. Nestrukturani modeli mogu izraziti utjecaj važnih procesnih varijabli (pH, pO_2 , temperatura). Međutim, najjednostavniji matematički modeli koriste se za procjenu specifične brzine rasta prema ravnoteži masa s nezavisnim varijablama, primjerice prilikom proizvodnje monoklonskih protutijela u staničnoj liniji ovarija kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) (López-Meza i sur., 2016).

Tablica 1. Kinetički izrazi za opis staničnog rasta

KINETIČKI MODELI	SIMBOLI	AUTORI
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I}$	μ (h ⁻¹) specifična brzina rasta μ_{max} (h ⁻¹) maksimalna specifična brzina rasta S (g L ⁻¹) koncentracija supstrata K_s (g L ⁻¹) konstanta zasićenja supstratom K_i (g L ⁻¹) konstanta inhibicije supstratom	Jackson i Edwards (1975)
$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{S^n + K_S}$	n = konstanta procesa	Moser (1983)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_m}\right)^n$	S_m (g L ⁻¹) maksimalna koncentracija supstrata iznad koje je rast potpuno inhibiran n = empirijska konstanta	Luong (1987)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + \left(1 + \frac{P}{K_p}\right)S}$	K_m = Michealis konstanta K_p (g L ⁻¹) konstanta inhibicije rasta stanica laktatom P (g L ⁻¹) koncentracija produkta	Ishizaki and Ohta (1989)
$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \cdot \left(\frac{K_I}{S + K_I} \right) \cdot \left(1 + \frac{P - K_I}{P_m - P_I} \right)$	K_i (g L ⁻¹) konstanta inhibicije supstratom P_m (g L ⁻¹) maksimalna inhibitorna koncentracija laktata P_i (g L ⁻¹) granična koncentracija laktata prije inhibitornog efekta	Boonmee i sur. (2003)
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right)^f \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^h$	f = parametar povezan s toksičnošću biomase h = parametar povezan s inhibitornim produktom	Altiock i sur. (2006)

2.2.2. Strukturni modeli

Drugo područje modeliranja u biotehnologiji fokusira se na strukturne modele. Strukturni model povezan je s opisom staničnog materijala koristeći više kemijskih komponenti. Ovakvi modeli opisuju promjene u staničnoj populaciji. Tekuća faza (abiotička faza) sadrži hranjive tvari za stanični rast i neke ekstracelularne metabolite. Biotička faza, odnosno stanice, više se ne promatra kao homogena komponenta. Stanice su suspendirane u tekućoj fazi te se ponašaju kao multikomponentni sustavi. Strukturni modeli predstavljaju koncept prema kojem je stanična masa sastavljena od unutarstaničnih struktura (npr. mitohondriji) i funkcionalnih grupa koje su povezane fluksom materijala i informacija. Takvi opisi staničnog metabolizma su početna informacija za generiranje shema rasta i metabolizma stanica.

Strukturni modeli generalno se mogu klasificirati na:

- (i) morfološke (obuhvaćaju potrošnju supstrata i formiranje produkta),
- (ii) kemijske,
- (iii) genetičke (obuhvaćaju molekularne mehanizme) i
- (iv) metaboličke strukturne modele (objašnjavaju mehanizme regulacije procesa) (Bapat i sur., 2006).

Strukturni modeli primjenjuju se u modeliranju stabilnosti ravnotežnog stanja i procjenu osjetljivosti. Ovo područje modeliranja zahtjeva široko razumijevanje metaboličkih puteva u stanici, međutim, za većinu procesa te informacije ne postoje u dovoljnoj količini. Također, određene matematičke poteškoće javljaju se u analizi velikog broja jednadžbi matematičkih modela. Strukturirani modeli omogućavaju saznanja o specifičnim karakteristikama biosintetskih procesa, poput procjene kritične koncentracije intermedijara u stanici ili oscilacije u biomasi, podataka koji bi mogli limitirati primjenu takvog sustava (Kulov i Gordeev, 2014).

2.3. MONOKLONSKA PROTUTIJELA

2.3.1. Primjena monoklonskih protutijela

Monoklonska protutijela su kompleksne molekule sastavljene od 2 teška i 2 laka polipeptidna lanca povezana disulfidnim mostovima. Proizvode se kao rekombinantni proteini u kultiviranim staničnim linijama sisavaca koje omogućavaju pravilno modificiranje, smatanje i sastavljanje polipeptidnih lanaca u native kvaterne strukture (Mead i sur., 2012) Komercijalna proizvodnja monoklonskih protutijela pokrenula je revoluciju na području onkologije, imunologije i transplantacije organa (Elvin i sur., 2013). Trenutno je na svjetskom tržištu komercijalno dostupan velik broj monoklonskih protutijela, a značajan broj ovih bioterapeutika je u raznim fazama kliničkih ispitivanja.

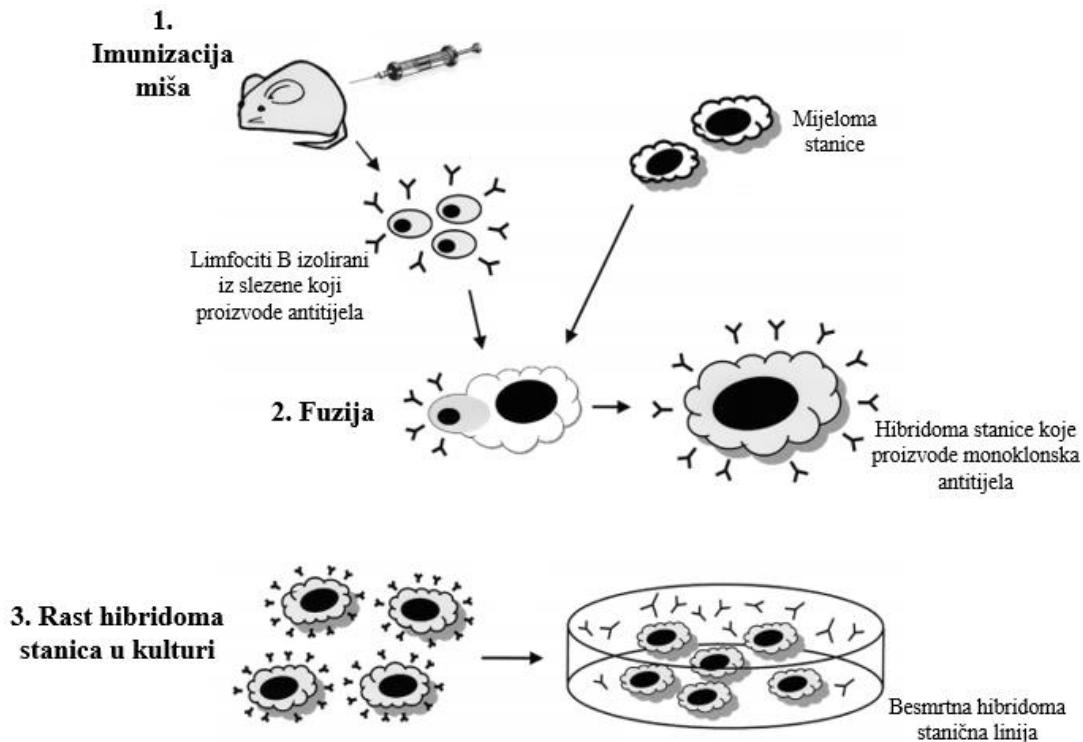
Biofarmaceutska industrija u posljednjih 30 godina svoj izniman napredak duguje prvenstveno tehnologiji rekombinantne DNA i tehnologiji hibridoma. Tehnologija rekombinantne DNA omogućila je proizvodnju širokog niza prirodnih i modificiranih proteina u velikom mjerilu, a jedno od najvećih postignuća u tehnologiji hibridoma je upravo proizvodnja monoklonskih protutijela koja su specifična za određeni antigen te kao takva pogodna su u terapiji mnogih bolesti (Birch i Onakunle, 2005). Iako je tržište monoklonskih protutijela prvotno bilo manje nego tržište cjepiva, u posljednja dva desetljeća je u porastu (Ecker i sur., 2015) što definira važnost monoklonskih protutijela kao terapeutika na globalnoj razini.

Razvijeno je nekoliko različitih staničnih linija sisavaca koje se upotrebljavaju kao stanice domaćini u proizvodnji monoklonskih protutijela, a prvenstveno se koriste stanična linija ovarija kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) te mišje mijeloma stanice (stanična linija NS0), uz korištenje raznih alata koji pridonose optimizaciji proizvodnje u ovim staničnim linijama. Iako je broj odobrenih monoklonskih protutijela proizvedenih u CHO staničnim linijama znatno veći, NS0 mišje mijeloma stanice daju velik doprinos uspjehu biotehnoške industrije. Procjenjuje se kako se otprilike 25 % odobrenih monoklonskih protutijela proizvodi u NS0 staničnim linijama (Dhara i sur., 2018). Ulaganje u detaljnije istraživanje obje stanične linije svakako će pridonijeti poboljšanju proizvodnje bioterapeutika. Unatoč svim prednostima tehnologije hibridoma, postizanje veće produktivnosti u velikom mjerilu ostaje središnji cilj (Kelley, 2007) kako bi se smanjila cijena gotovih bioterapeutika na tržištu. Kako bi se nadomjestili problemi smanjene produktivnosti, uvedena su znatna poboljšanja u razvoju prikladnih staničnih linija, formulaciji

medija, razvoja bioprocasa u vidu poboljšanja uvjeta uzgoja, dizajna nove opreme i optimizacije načina rada bioreaktora.

2.3.2. Proizvodnja monoklonskih protutijela

Proizvodnja biofarmaceutika, uključujući monoklonska protutijela (slika 2), oslanja se na stanične kulture sisavaca. Stanične linije sisavaca u industrijskoj su upotrebi već nekoliko desetljeća u proizvodnji kompleksnih, visokovrijednih rekombinantnih terapeutskih proteina. Kultivirane stanice sisavaca dominantan su ekspresijski sustav najvećim dijelom jer pružaju mogućnost pravilnog smatanja i spajanja peptidnih lanaca. U prilog tome ide i činjenica da osiguravaju provođenje posttranslacijskih modifikacija neophodnih za funkciju rekombinantnih proteina eukariotskog porijekla (Wurm, 2004). Prema tome, kvaliteta i djelotvornost proizvedenog proteina prednjače u odnosu na proteine dobivene u drugim ekspresijskim sustavima poput bakterija, kvasaca i biljaka.



Slika 2. Proizvodnja monoklonskih protutijela tehnologijom hibridoma stanica (Koppe i sur., 2006)

U ekspresijskim sustavima sisavaca proizvode se uglavnom monoklonska protutijela i proteini krvne plazme (Mead i sur., 2012). Kako se povećava zahtjev tržišta za takvim bioterapeuticima, razvija se i područje ekspresijskih sustava sisavaca koje bilježi nemjerljiva dostignuća u odnosu na proizvodnju od prije 30 godina. Najveće promjene uvedene su u formuliranju medija za uzgoj stanica i prilagodba režima prihrane te napredak u strategijama pronalaska stabilnih staničnih linija koje mogu proizvoditi velike količine biomase (Browne i Al-Rubeai, 2007). Razvijeni su razni pristupi kojima se pokušava unaprijediti produktivnost staničnih linija sisavaca, a uključuju izravnu manipulaciju procesima u stanicama, primjerice utjecaj na antiapoptotičke gene, gene povezane sa staničnim ciklusom te translacijskim i sekrecijskim sustavom (Sunley i Butler, 2010). Međutim, navedeni pokušaji nisu doveli do željenih rezultata pošto se temelje na saznanjima sinteze i sekrecije proteina u normalnim stanicama sisavaca, a ne mogu se preslikati na puteve ekspresije rekombinantnih proteina u staničnim linijama.

U slučaju proizvodnje monoklonskih protutijela, provedena su istraživanja kako bi se definirala ograničenja koja se odnose na njihovu specifičnu proizvodnju, prema čemu se mogu identificirati racionalni ciljevi u staničnom inženjerstvu (Khoo i sur., 2007). Istraživanja su većinom bazirana na transkriptomici i proteomici te generalno pokazuju kako postoji mnogo specifičnosti za svaku staničnu liniju koje koreliraju s produktivnošću. Međutim, globalni problem predstavlja definiranje staničnih procesa i kvantificiranje njihovog individualnog doprinosa u ekspresiji protutijela.

Drugi pristup u identificiranju svojstva stanice važnih za proizvodnju monoklonskih protutijela je baziran na principu modela, a obuhvaća sve puteve ekspresije gena. Također, u obzir se uzima i utjecaj raznih staničnih procesa, omogućavajući time predviđanje kako će se manipulacije i inženjerske strategije odraziti na proizvodnju (Ho i sur., 2006).

Upotreba staničnih linija u proizvodnji komercijalno važnih biomolekula primjenjuje se dugi niz godina, a započela je s proizvodnjom polio cjepiva. Danas se koriste besmrtna i kontinuirana stanična linija sisavaca kao stanice domaćini u proizvodnji raznih biomolekula važnih za čovječanstvo (Dhara i sur., 2018). Takve stanične linije dobivaju se serijom subkultiviranja primarnih kultura koje su izolirane direktno iz tkiva organa, a njihova svrha je izbjeći neprestano izoliranje stanica iz tkiva svaki put kada je potrebno uzgojiti kulturu. Dobivene stanične linije mogu rasti neograničeno, uz povremenu izmjenu medija u kojem rastu kako bi se osigurali potrebni nutrijenti. Također, mogu se kontinuirano dijeliti, odnosno besmrtna su, iako ponekad podliježu

genetičkim modifikacijama. Dvije najvažnije stanične linije u proizvodnji monoklonskih protutijela su CHO i NS0 stanične linije. Upravo te stanične linije pogodne su za kultivaciju u velikom mjerilu pošto ih karakterizira visoka gustoća rasta stanica u suspenziji te relativno stabilna ekspresija heterolognih gena tijekom vremena (Ho i sur., 2006). CHO stanice prvotno su izolirane iz tkiva ovarija kineskog hrčka, a s napretkom genetičkog inženjerstva, razvijene su vrste CHO stanica koje amplificiraju egzogene, a predstavljaju dobre ekspresijske sustave u proizvodnji bioterapeutika. NS0 stanice su subklonovi NS-1 mišje mijeloma stanične linije, poznate kao stanice koje ne izlučuju imunoglobuline (Köhler i Milstein, 1976).

Prilikom razvoja procesa u staničnim linijama sisavaca, kako bi povećali proizvodnju i unaprijedili kvalitetu proizvoda (monoklonska protutijela i drugi proteini), pažnja je usmjerena ka razvoju stanične linije, formuliranju medija za uzgoj i bioprocusu.

Razvoj stanične linije odnosi se na amplifikaciju gena i subkloniranje kako bi se odabrali klonovi s najvećom produktivnošću. Amplifikacija gena odnosi se na transfekciju stanica s genom za selekciju prema nekom svojstvu i genom od interesa (geni za monoklonska protutijela). Najčešće korišteni sustavi za selekciju u staničnim linijama CHO i NS0 su DHFR (dihidrofolat reduktaza) i GS (glutamin sintetaza) sustavi (Dhara i sur., 2018). Glutamin-sintetaza (GS) je enzim koji igra ključnu ulogu u metabolizmu dušika, katalizirajući kondenzaciju glutamata i amonijaka u tvorbi glutamina. Pošto se u NS0 stanicama uočava vrlo niska razina endogene glutamin-sintetazne aktivnosti, egzogena glutamin-sintetaza služi kao efikasan selektivni marker za identifikaciju uspješnih transfektanata u prisutnosti glutamina u mediju. Dodatak metionin sulfoksimina (MSX) pojačava inhibiciju aktivnosti glutamin-sintetaze, omogućavajući daljnju selekciju klonova koji proizvode visoke razine transfeciranih glutamin-sintetaza (Barnes i sur., 2000). Stanične NS0 linije transfecirane s glutamin-sintetaza vektorima uzgajaju se u mediju bez glutamina.

Sastav medija za uzgoj stanica sisavaca razlikuje se ovisno o zahtjevima stanica, odnosno temeljem metabolizma stanica i načinu uzgoja. Međutim, osnovni sastojci uvijek su isti. To su glukoza, aminokiseline, vitamini, esencijalni metali, faktori rasta i lipidi. Serum i proteinske frakcije koje su se nekad koristile za uzgoj stanica, zamijenjeni su rekombinantnim proteinima i kemijski definiranim formulacijama bez seruma životinjskog porijekla. Tako se smanjuje problem nejednake koncentracije tvari u životinjskom serumu od šarže do šarže. NS0 stanice su auksotrofi za kolesterol te za optimalan rast zahtjevaju egzogeni izvor kolesterola (Dhara i sur., 2018). Početno, taj problem riješen je upotrebom seruma što je zamijenjeno primjenom sintetskog

kolesterola. Postavljeni su i razni eksperimentalni sustavi gdje su se koristili biljni steroli i lipidni suplementi. Međutim, problem slabe topljivosti lipida u vodi te visoka cijena sintetskog kolesterola onemogućili su proizvodnju u velikom mjerilu. Potom je promijenjen pristup te su stvorene rekombinantne NS0 stanične linije koje su se uspješno adaptirale na rast u mediju bez kolesterola (Burky i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

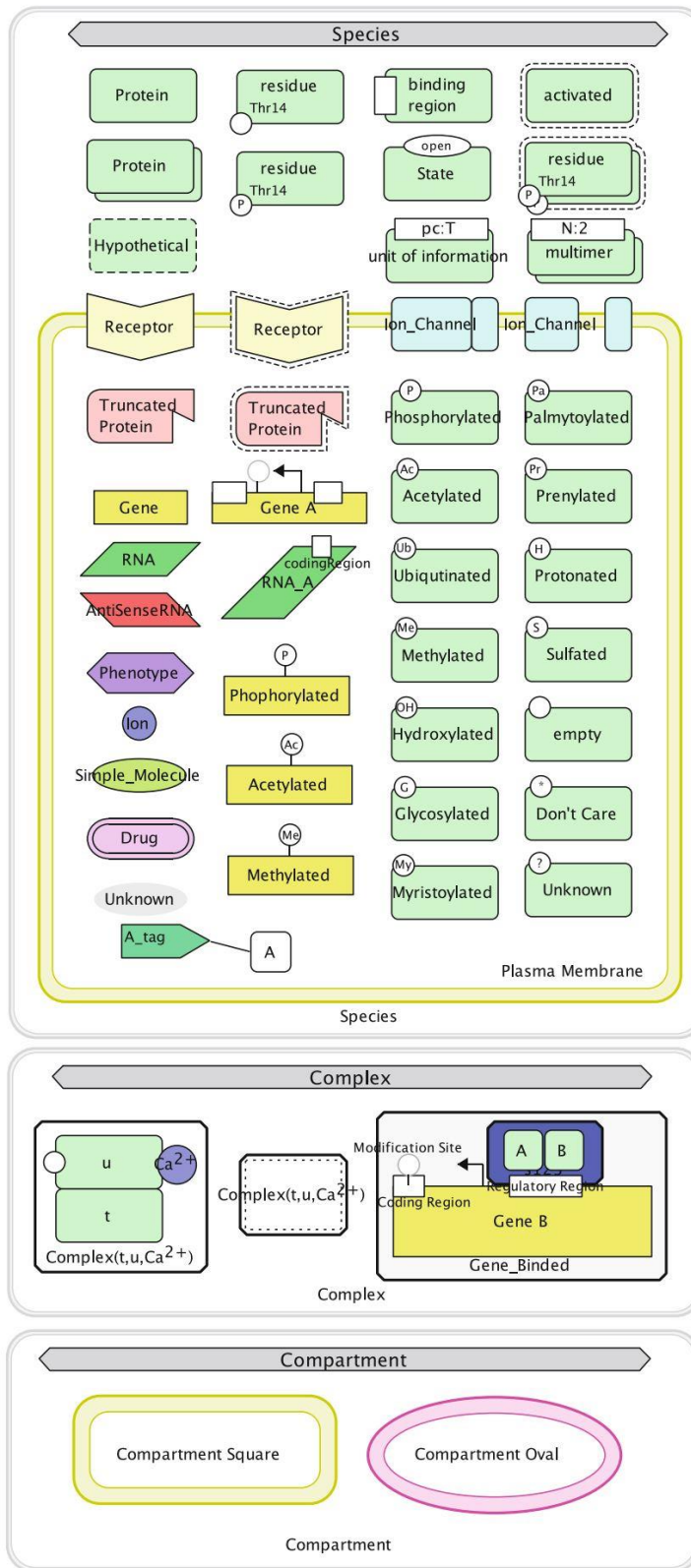
3.1. MATERIJALI

3.1.1. CellDesigner 4.4.2

CellDesigner (Systems Biology Institute, Tokio, Japan) je računalni program koji omogućava grafičko prikazivanje mreža biokemijskih reakcija i genski reguliranih mreža. Ovaj softverski alat ima ulogu strukturnog uređivača dijagrama koji osigurava vizualizaciju, modeliranje i simulaciju mreža. CellDesigner pruža korisnicima sučelje za crtanje mreža temeljem procesnih dijagrama, koristeći definirane grafičke notacije koje su u skladu sa smjernicama SBGN (*Systems Biology Graphical Notation*). CellDesigner podržava simulacije i analize parametara unutar mreža čime omogućava pretraživanje i modificiranje izrađenog modela prema postojećim bazama podataka, simulaciju i praćenje dinamike kroz grafičko sučelje. Izrađeni modeli spremaju se kao SBML dokumenti (Matsuoka i sur., 2014). SBML (Systems Biology Markup Language) je standardni format za prikaz računalnih modela u sistemskoj biologiji, jednostavno čitljiv čovjeku i računalnim programima, a takav dokument sadrži informacije koje se odnose na vrste molekularnih interakcija i transformacija, domena uključenih molekula, kinetike reakcija te konceptualnih informacija poput lokacije komponenti (Zhang i sur., 2020).

Kreiranje novog modela u programu CellDesigner 4.4.2 započinje odabirom [File] > [New], čime se otvara prozor u kojem se definira ime dokumenta te dimenzija radnog prostora (Canvas).

Fundamentalna jedinica entiteta u SBML je vrsta (*Species*) što predstavlja određene molekule u mreži (npr. protein, RNK, gen, ion, jednostavna molekula, itd.) koje se biokemijski i genetski razlikuju prema simbolima (slika 3).

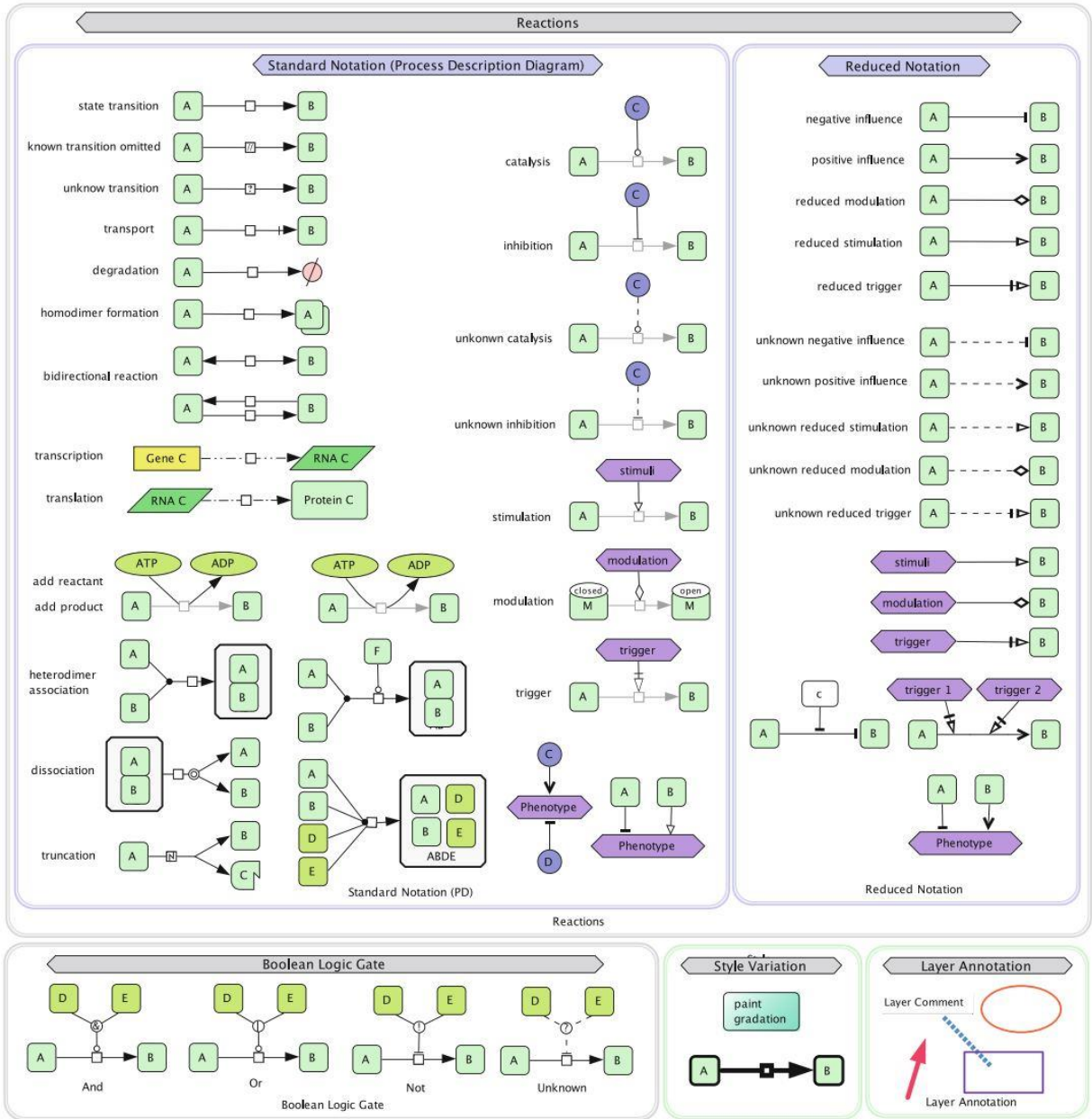


Slika 3. Simboli za vrste, komplekse i odjeljke u CellDesigner programu (Matsuoka i sur., 2014)

Interakcija između vrsta naziva se reakcija (*Reactions*). Odabirom odgovarajućih molekula, one se povezuju strelicama koje predstavljaju reakcije (kataliza, inhibicija, aktivacija, transkripcija, translacija, transport, asocijacija i disocijacija kompleksa, itd.). Na slici 4 prikazani su svi simboli dostupni u CellDesigner programu kojima se označavaju reakcije.

Kako bi se specificirao kinetički zakon za određenu reakciju, desnim klikom na reakciju otvara se izbornik u kojem se odabere [Edit Kinetic Law], pri čemu se otvori prozor u koji se upišu kinetička jednadžba i kinetički parametri.

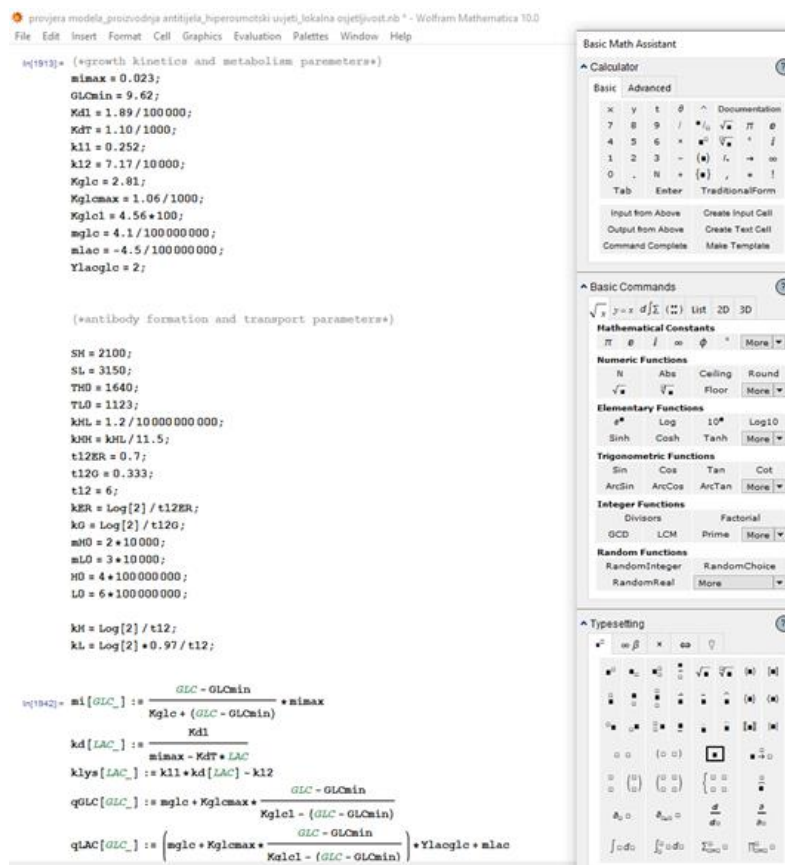
Kako bi se model mogao simulirati, potrebno je unijeti početne koncentracije svih komponenti prije pokretanja simulacije, odabirom [Simulations] > [Control Panel] ili [COPASI GUI]. Rezultati simulacije prikazani su numerički, u obliku tablice, i grafički. Moguće je mijenjati početne vrijednosti komponenti i parametara kinetičkih zakona kako bi se simulacija provela u drugačijim uvjetima, a rezultati i modeli spremaju se kao SBML dokumenti.



Slika 4. Simboli za reakcije, Booleove logičke sklopove, promjene stila i anotacije (Matsuoka i sur., 2014)

3.1.2. WR Mathematica 10.0

WR Mathematica 10.0 (Wolfram, Champaign, SAD) je moderni računalni sustav koji pokriva mnoga područja, uključujući neuronske mreže, obradu slika, geometriju, podatkovnu znanost te vizualizaciju. Sustav omogućava unos (*import*) i prijenos (*export*) podataka u raznim formatima te upravljanje njima, na nižoj razini kao sofisticirani kalkulator ili na višoj razini za rješavanje algebarskih i diferencijalnih jednadžbi. WR Mathematica nudi jedinstveni integrirani sustav koji se temelji na osnovama matematičkog znanja te se neprestano širi primjenom kompleksnih algoritama. Zbog toga je ovaj sustav koristan u tehničkim, znanstvenim, inženjerskim, matematičkim i informatičkim poljima. Sustav se sastoji od grafičkog sučelja preko kojeg se odvija interakcija s korisnikom putem radne bilježnice te jezgre koja obavlja računski dio, koristeći Wolfram programski jezik (Wolfram, 2003). Na slici 5 nalazi se grafički prikaz radne bilježnice izrađenog modela.



Slika 5. Prikaz radne bilježnice u WR Mathematica 10.0 programu

3.1.3. Model biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama u normalnim i hiperosmotskim uvjetima

Korišteni model temelji se na objavljenim podacima u radu Ho i sur. (2006), o kinetici rasta stanica, parametrima metabolizma te formiranju i sekreciji proizvedenih protutijela.

Matematička struktura modela biosinteze monoklonskih protutijela sastoji se od 25 kinetičkih parametara (tablica 2) i 9 biokemijskih reakcija (tablica 3) te 13 varijable. U model su uključena četiri odjeljka, a to su izvanstanični sadržaj, unutarstanični sadržaj GS-NS0 stanica, endoplazmatski retikulum te Golgijevo tijelo. U tablici 4 nalazi se popis masenih bilanci modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama preuzetih iz rada Ho i sur. (2006).

Tablica 2. Popis kinetičkih parametara rasta, parametra metabolizma, parametra stvaranja protutijela te parametra transporta protutijela s pripadnim vrijednostima za normalne i hiperosmotske uvjete (Ho i sur., 2006)

Parametar	Opis	Normalni uvjeti	Hiperosmotski uvjeti
k_{11}	Specifična stopa liziranja povezana s k_d	0,308	0,252
K_{d1}	Minimalna specifična stopa smrtnosti	$2,48 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-2}$	$1,89 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-2}$
μ_{\max}	Maksimalna specifična brzina rasta	$0,125 \text{ h}^{-1}$	$0,023 \text{ h}^{-1}$
K_{dT}	Konstanta specifične stope smrtnosti povezana s koncentracijom laktata	$4,70 \cdot 10^{-3} \text{ L mmol}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-3} \text{ L mmol}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_{12}	Prividna brzina liziranja pri $k_d=0$	$2,84 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	$7,17 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$
S_H	Specifična brzina transkripcije mRNA teškog lanca	1500 mRNA molekule h^{-1}	2100 mRNA molekule h^{-1}
S_L	Specifična brzina transkripcije mRNA lakog lanca	2250 mRNA molekula h^{-1}	3150 mRNA molekule h^{-1}
K_{glc}	Monodova konstanta za glukozu	$46,1 \text{ mmol L}^{-1}$	$2,81 \text{ mmol L}^{-1}$
K_{glcmax}	Maksimalni koeficijent unosa glukoze	$3,08 \cdot 10^{-7} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1,06 \cdot 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$
K_{glc1}	Koeficijent unosa glukoze	$1,94 \cdot 10^1 \text{ mmol L}^{-1}$	$4,56 \cdot 10^3 \text{ mmol L}^{-1}$
T_{H0}	Specifična brzina translacije teškog polipeptidnog lanca	1005 polipeptidni lanac (mRNA molekula) $^{-1} \text{ h}^{-1}$	1640 polipeptidni lanac (mRNA molekula) $^{-1} \text{ h}^{-1}$
Glc_{\min}	Minimalna granična koncentracija glukoze	$8,2 \text{ mmol L}^{-1}$	$9,62 \text{ mmol L}^{-1}$
m_{glc}	Koeficijent održavanja glukoze	$3,16 \cdot 10^{-8} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$4,1 \cdot 10^{-8} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$
m_{lac}	Minimalna stopa proizvodnje laktata	$5,91 \cdot 10^{-8} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$-4,5 \cdot 10^{-8} \text{ mmol L}^{-1} \text{ stanica}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$Y_{lac,glc}$	Prinos laktata po glukozu	$0,968 \text{ mmol mmol}^{-1}$	2 mmol mmol^{-1}
k_{HL}	Konstanta brzine povezivanja teškog i lakog lanca	$3,8 \cdot 10^{-10} \text{ molekula}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$1,2 \cdot 10^{-10} \text{ molekula}^{-1} \text{ h}^{-1}$
T_{L0}	Specifična brzina translacije lakog polipeptidnog lanca	715 polipeptidni lanac (mRNA molekula) $^{-1} \text{ h}^{-1}$	1123 polipeptidni lanac (mRNA molekula) $^{-1} \text{ h}^{-1}$

$t_{1/2ER}$	Vrijeme potrebno za transport 50% protutijela iz ER u Golgijevo tijelo	0,7 h	0,7 h
$t_{1/2G}$	Vrijeme potrebno za transport 50% protutijela iz Golgijevog tijela u ekstracelularni medij	0,333 h	0,333 h
k_{HH}	Konstanta brzine povezivanja dva teška lanca	$3,304 \cdot 10^{-11}$ molekula ⁻¹ h ⁻¹	$1,044 \cdot 10^{-11}$ molekula ⁻¹ h ⁻¹
$t_{1/2}$	Vrijeme poluživota mRNA teških i lakih lanaca	9 h	6 h
m_{H0}	Intracelularna koncentracija mRNA teškog lanca	$2 \cdot 10^4$ mRNA molekula stanica ⁻¹	$2 \cdot 10^4$ mRNA molekula stanica ⁻¹
m_{L0}	Intracelularna koncentracija mRNA lakog lanca	$3 \cdot 10^4$ mRNA molekula stanica ⁻¹	$3 \cdot 10^4$ mRNA molekula stanica ⁻¹
H_0	Koncentracija slobodnog teškog polipeptidnog lanca	$4 \cdot 10^8$ polipeptidni lanac stanica ⁻¹	$4 \cdot 10^8$ polipeptidni lanac stanica ⁻¹
L_0	Koncentracija slobodnog lakog polipeptidnog lanca	$6 \cdot 10^8$ polipeptidni lanac stanica ⁻¹	$6 \cdot 10^8$ polipeptidni lanac stanica ⁻¹

Tablica 3. Popis kinetičkih izraza za brzine reakcija (Ho i sur., 2006)

REAKCIJA		
specifična brzina rasta	$\mu = \mu_{max} \left(\frac{GLC - GLC_{min}}{K_{glc} + (GLC - GLC_{min})} \right)$	[4]
specifična brzina odumiranja stanica	$k_d = \frac{K_{d,1}}{\mu_{max} - K_{d,T} \cdot LAC}$	[5]
specifična brzina liziranja stanica	$k_{lys} = k_{11} \cdot k_d - k_{12}$	[6]
specifična brzina potrošnje glukoze	$q_{glc} = m_{glc} + K_{glc,max} \frac{GLC - GLC_{min}}{K_{glc,1} - (GLC - GLC_{min})}$	[7]
specifična brzina nastajanja laktata	$q_{lac} = q_{glc} \cdot Y_{lac,glc} + m_{glc}$	[8]
nakupljanje molekula mRNA teških lanaca	$R_H = k_{HL} \cdot H \cdot L$	[9]
nakupljanje molekula mRNA lakih lanaca	$R_L = k_{HL} \cdot H \cdot L$	[10]
Potrošnja intermedijera protutijela	$R_{HL} = k_{HL} \cdot H \cdot L$	[11]
nastajanje protutijela u ER	$R_{Ab} = k_{HH} \cdot HL \cdot HL$	[12]

Tablica 4. Popis masenih bilanci modela biosinteze monoklonskih protutijela (Ho i sur., 2006)

	Izraz za bilancu tvari	
Promjena ukupnog broja stanica	$\frac{dX_T}{dt} = \mu \cdot X_V - k_{lys} \cdot X_d$	[13]
Promjena broja živih stanica	$\frac{dX_V}{dt} = (\mu - k_D) \cdot X_V$	[14]
Promjena broja mrtvih stanica	$\frac{dX_d}{dt} = k_D \cdot X_V - k_{lys} \cdot X_d$	[15]
Potrošnja glukoze	$\frac{d[GLC]}{dt} = -q_{glc} \cdot X_V$	[16]
Nakupljanje laktata	$\frac{d[LAC]}{dt} = q_{lac} \cdot X_V$	[17]
Promjena koncentracije molekula mRNA teških lanaca	$\frac{dm_H}{dt} = S_H - k_H m_H - \mu m_H$	[18]
Promjena koncentracije molekula mRNA lakih lanaca	$\frac{dm_L}{dt} = S_L - k_L m_L - \mu m_L$	[19]
Promjena koncentracije teških polipeptidnih lanaca	$\frac{d[H]}{dt} = T_H m_H - \mu m_H - R_H$	[20]
Promjena koncentracije lakih polipeptidnih lanaca	$\frac{d[L]}{dt} = T_L m_L - \mu m_L - R_L$	[21]
Promjena koncentracije intermedijera protutijela	$\frac{d[HL]}{dt} = R_{HL} - R_{Ab} - \mu[HL]$	[22]
Promjena koncentracije molekule protutijela u ER	$\frac{d[H_2L_2]_{ER}}{dt} = R_{Ab} - k_{ER}[H_2L_2]_{ER} - \mu[H_2L_2]_{ER}$	[23]
Promjena koncentracije molekule protutijela u Golgijevom tijelu	$\frac{d[H_2L_2]_G}{dt} = k_{ER}[H_2L_2]_{ER} - k_G[H_2L_2]_G - \mu[H_2L_2]_G$	[24]
Promjena koncentracije molekule protutijela u mediju	$\frac{d[H_2L_2]_{ECM}}{dt} = X_V \cdot k_G \cdot [H_2L_2]_G$	[25]

3.2. METODE

3.2.1. Izrada modela u programu *CellDesigner* i simulacija u programu *WR Mathematica 10.0*

Prema podacima iz rada predloženog od strane Ho i sur. iz 2006. godine, pomoću računalnog programa *CellDesigner*, u ovom radu konstruiran je i analiziran matematički model biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama, pod normalnim i hiperosmotskim uvjetima. Proizvodnja monoklonskih protutijela za terapijske i dijagnostičke svrhe čini značajan dio biotehnoške industrije, a glavni ciljevi biofarmaceutске industrije su postizanje maksimalnih prinosa prilikom proizvodnje u staničnoj kulturi sisavaca. Matematičko modeliranje pri tome ima značajan utjecaj jer smanjuje troškove i vrijeme potrebno za preliminarna eksperimentalna istraživanja. Kako bi se ispitaio utjecaj na proces proizvodnje monoklonskih protutijela, prilikom simulacije izrađenog modela u programu mijenjala se početna koncentracija glukoze ($c_{GLC} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{GLC} = 15 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{GLC} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c_{GLC} = 25 \text{ mmol L}^{-1}$) i početni broj živih stanica ($X_v = 2,5 \cdot 10^5 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 5,0 \cdot 10^5 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 1,0 \cdot 10^6 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 2,0 \cdot 10^6 \text{ stanica mL}^{-1}$).

3.2.2. Analiza parametarske osjetljivosti

Analiza osjetljivosti parametara predstavlja širok skup matematičkih pristupa dizajniranih da kvantificiraju utjecaj vrijednosti, primjerice početni uvjeti i konstante, na izlazne vrijednosti modela. Takvi pristupi omogućavaju procjenu pouzdanosti rezultata dobivenih nekim matematičkim modelom. Također, omogućavaju izolaciju ključnih parametara u kompleksnim biokemijskim reakcijskim mrežama, kako bi se daljnje istraživanje usmjerilo na njih (Link i sur., 2018).

3.2.2.1. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti

Najjednostavniji način izvedbe analize parametarske osjetljivosti je analiza lokalne osjetljivosti, a podrazumijeva varijaciju jednog po jednog ulaznog parametra, dok ostali parametri ostaju konstantnih vrijednosti. Ovakve analize ne proučavaju utjecaj variranja više parametara istovremeno te mogu biti korisne u slučaju postojanja nesigurnosti u ulaznim parametrima ili kada je interakcija između ulaznih parametara slaba. Ove metode pripisuju važnost ulaznim

parametrima prema njihovom utjecaju na izlazne rezultate modela (Link i sur., 2018). Koeficijenti lokalne parametarske osjetljivosti računaju se prema jednadžbi 26:

$$S = \frac{k_j}{c} \cdot \frac{\delta c}{\delta k_j} \cdot 100\% \quad [26]$$

Gdje k_j predstavlja kinetički parametar, a c izlazni signal odabranog modela (Wildermuth, 2000). U ovom radu analiza lokalne parametarske osjetljivosti parametra na koncentracije svih metabolita provedena je za 3 % povećanje i 3 % smanjenje vrijednosti svakog pojedinog parametra u programskom paketu WR Mathematica 10.0, a rezultati su obrađeni pomoću MS Excel 365.

3.2.2.2. Analiza globalne parametarske osjetljivosti

Kako bi se ispitala osjetljivost koeficijenata u širem rasponu od početne vrijednosti definirane modelom, koristi se analiza globalne parametarske osjetljivosti koja će kao rezultat dati niz mogućih vrijednosti, obuhvaćajući nekoliko redova veličine. Raspon potencijalnih osjetljivosti nekog parametra može obuhvatiti pozitivne i negativne vrijednosti, odnosno parametar može imati pozitivan i negativan utjecaj na sustav (Kent i sur., 2013).

Zbog svoje robusnosti i efikasnosti, osobito kada se radi o malim količinama uzoraka, najčešće korištena tehnika analize globalne parametarske osjetljivosti je Fourierova analiza (FAST, eng. *Fourier Amplitude Sensitivity Test*). Primjenom ove metode, koristeći pristup periodičkog uzorkovanja i Fourierove transformacije, postiže se razdvajanje varijanci izlaza modela. Na temelju udjela parcijalnih varijanci u varijancama izlaza modela, izračunava se važnost određenog parametra, s obzirom na doprinos u nestabilnosti izlaza modela (Xu i Gertner, 2011).

FAST metoda bazira se na transformaciji multidimenzionalnog područja parametara u jednodimenzionalno područje pojedinog parametra, s , pomoću nelinearnih transformacija svakog parametra x_i . Svaki ulazni faktor x_i povezan je s parametrom frekvencije ω_i i setom standardiziranih parametarskih jednadžbi (jednadžba 27) što omogućava globalnu analizu svakog faktora kroz raspon varijacija. Koeficijenti osjetljivosti procjenjuju se na temelju krivulje pretraživanja koja

pretražuje područje ulaznih faktora, ispitujući svaki faktor odabranim brojem frekvencija (Saltelli i sur., 2000).

$$x_i = \frac{1}{2} + \frac{1}{\pi} \arcsin(\sin(\pi \cdot \omega_i + \varphi_i)) \quad [27]$$

Fazni kut φ_i je proizvoljno odabrana vrijednost koja se nalazi u rasponu $\in [-\pi, +\pi]$. Također se proizvoljno zadaje frekvencija te se varijabla ispituje u rasponu vrijednosti parametra $s \in [-1, +1]$. Tako je jednadžbom 28 prikazana transformacija normaliziranog parametra x_i u realni parametar k_i , gdje je k_i^{\wedge} nominalna vrijednost parametra u rasponu $k_i \in [10^{-n} \cdot k_i^{\wedge}, 10^n \cdot k_i^{\wedge}]$, a eksponent n predstavlja raspon varijacije parametra:

$$k_i = \frac{k_i^{\wedge}}{2} [10^n + 10^{-n} + x(10^n - 10^{-n})] \quad [28]$$

Jednadžbe 29-31 prikazuju kako se izlazne varijable proširuju na skup Fourierovih serija, a sveukupna varijanca D izlazne funkcije raščlanjuje se na zbrojeve kvadrata Fourierovih koeficijenata A_ω i B_ω :

$$D = 2 \sum_{\omega=1}^{\infty} (A_\omega^2 + B_\omega^2) \quad [29]$$

$$A_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \cos(\omega s) \cdot ds \quad [30]$$

$$B_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \sin(\omega s) \cdot ds \quad [31]$$

Nadalje, prema Fourierovim koeficijentima usklađenim utjecajem parametara određuju se koeficijenti osjetljivosti S_i (jednadžba 33). Jednadžbom 32 prikazana je djelomična suma usklađenosti D_i pri čemu je M je maksimalna frekvencija u Fourierovom proširenju.

$$D_i = 2 \cdot \sum_{p=1}^M A_{p\omega_i}^2 + B_{p\omega_i}^2 \quad [32]$$

$$S_i = \frac{D_i}{D} \quad [33]$$

Ova tehnika bazirana na varijacijama može rangirati ulazne parametre na temelju važnosti, ali ne daje cjelovitu sliku ponašanja svakog koeficijenta osjetljivosti u odabranom spektru parametra (Kent i sur., 2013). U ovom radu koeficijenti globalne parametarske osjetljivosti određeni su u programskom paketu WR Mathematica uz pojačanje vrijednosti parametra od 3 %, a rezultati su obrađeni pomoću MS Excel 365.

3.2.3. Analiza stehiometrijske matrice modela

Stehiometrijska matrica je glavni predmet proučavanja u stehiometrijskom modeliranju. Ovisno o stupnju slobode modela, osnovne analize stehiometrijske matrice modela uključuju analizu stacionarnog stanja, analizu bilanci tokova (FBA, eng. *Flux Balance Analysis*), analizu varijabilnosti fluksa (FVA, eng. *Flux Variability Analysis*) te analize elementarnih načina fluksa (EFMs, eng. *Elementary flux modes* i ExPas, eng. *extreme pathways*) (Maarleveld i sur., 2013).

Prilikom definiranja stehiometrijske matrice, brzine promjena koncentracija pojedinog metabolita mogu se izjednačiti obzirom na brzinu reakcije i stehiometrijske koeficijente što rezultira skupom diferencijalnih jednadžbi, prikazano jednadžbom 34:

$$\frac{d}{dt}x(t,p) = N \times v(x(t,p),p) \quad [34]$$

gdje vektor stanja ili metabolita x predstavlja $m \times 1$ dimenziju, a vektor brzine v sadrži jednadžbe brzine r reakcija u mreži te predstavlja $r \times 1$ dimenziju (Maarleveld i sur., 2013). Odnosno, stehiometrijska matrica N je formata $m \times r$, a čine ju elementi n_{ij} (metabolit i u reakciji j). Ako je metabolit i u reakciji j supstrat, stehiometrijski koeficijent n_{ij} je manji od nule ($n_{ij} < 0$). Odnosno, ako je metabolit i u reakciji j produkt, stehiometrijski koeficijent n_{ij} je veći od nule ($n_{ij} > 0$). Kinetički parametri su elementi vektora p , a t predstavlja vrijeme.

U stacionarnom stanju vrijedi jednadžba stanja 35:

$$N_R J = 0 \quad [35]$$

pri čemu N_R predstavlja reduciranu stehiometrijsku matricu, odnosno matricu dimenzija $m_0 \times r$, a vektor brzine reakcije označen je s J , što je vektor fluksa (Savinell i Palsson, 1992). Unutar nul prostora N_R matrice nalazi se skup svih vektora fluksa metaboličke mreže, tj. nema jedinstvenog vektora fluksa. Kako bi se smanjio broj mogućih rješenja, primjenjuje se analiza bilanci tokova. Ovom analizom selekcioniraju se samo one vrijednosti koje zajedno mogu poboljšati biološki relevantan cilj, primjerice maksimalna brzina rasta stanica ili maksimalna brzina proizvodnje ATP (Schuetz i sur., 2007). Primjena stehiometrijskih, termodinamičkih i okolišnih ograničenja, rezultira optimalnim rješenjima koja u kombinaciji daju maksimalne vrijednosti za ciljanu funkciju

(Maarleveld i sur., 2013). Nadalje, analiza varijabilnosti toka (FVA) je koristan alat u otkrivanju fleksibilnosti metaboličke mreže jer maksimizira i minimizira svaki fluks, uz poštivanje svih ograničenja pri optimalnoj vrijednosti ciljane funkcije (Mahadevan i Schilling, 2003). Elementarni načini fluksa (EFMs i ExPas) razvijeni su kako bi jedinstveno karakterizirali nul-prostor stehiometrijske matrice, odnosno ove analize temelje se samo na stehiometriji metaboličke mreže te se ne nameću načela optimizacije, a kao rezultat dobiju se rubovi prostora u kojem se nalaze moguća rješenja (Schilling i sur., 2000). Zajednička karakteristika svih navedenih analiza stehiometrijske matrice modela je pretpostavka postizanja ustaljenog stanja. Ta pretpostavka smatra se valjanom zbog vremenske odvojenosti brzih intracelularnih reakcija i sporih reakcija genetičke regulacije (Lee i sur., 2006).

U ovom radu provedena je analiza stehiometrijske matrice modela u programskom paketu CellDesigner. Određen je rang matrice i broj konzervativnih bilanci.

4. REZULTATI I RASPRAVA

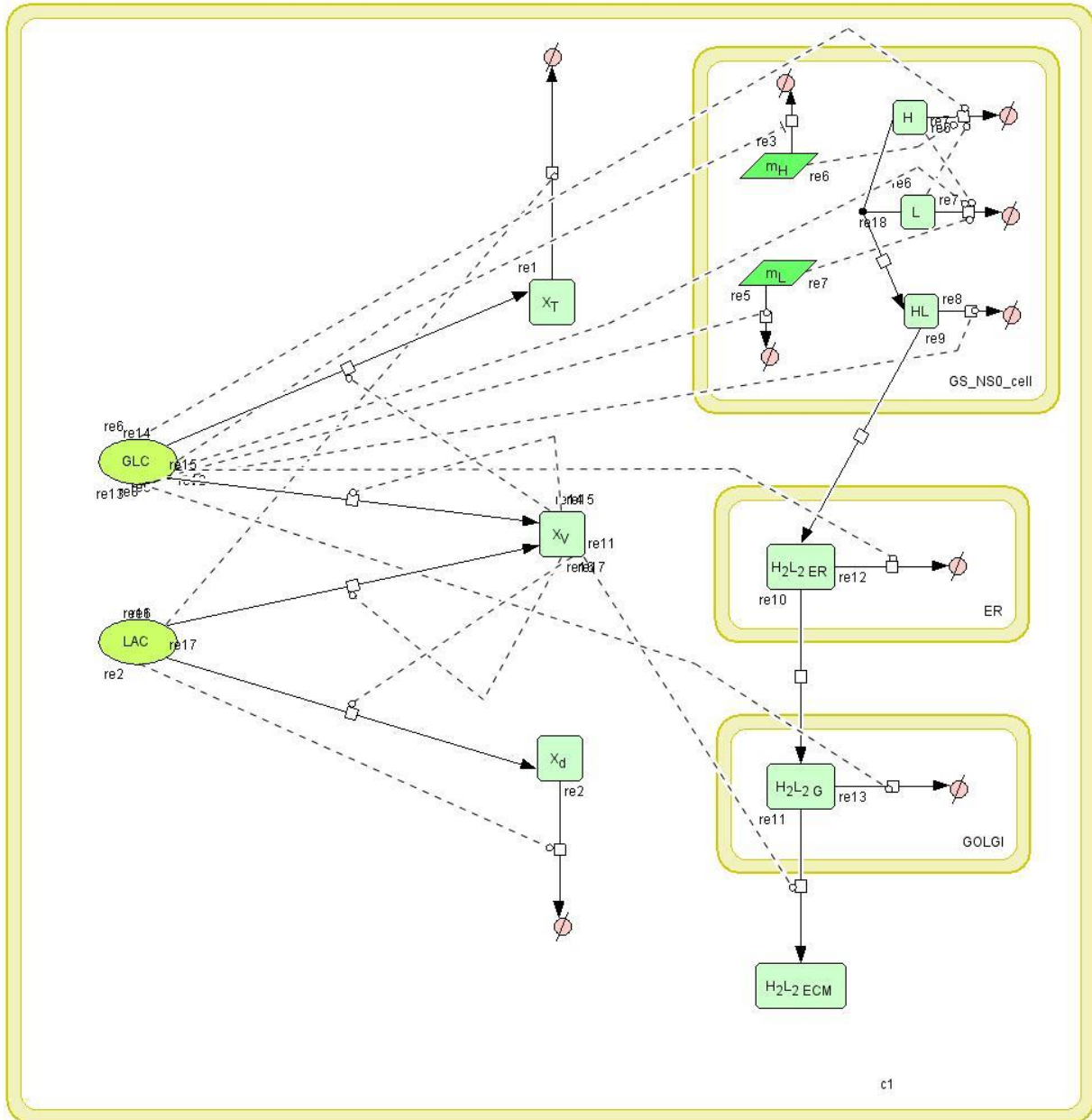
Unutar ovoga rada provedena je analiza modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama. Model je izrađen u programu CellDesigner, a pomoću programa WR Mathematica 10.0 provedena je simulacija za normalne i hiperosmotske uvjete. Na temelju provedenih simulacija praćene su promjene koncentracije glukoze (slika 7a), koncentracije laktata (slika 7b), broja živih stanica (slika 7c), specifične brzine rasta (slika 7d) i stope smrtnosti (slika 7e) te konačno, promjena koncentracije monoklonskih protutijela (slika 7f), tijekom 200 sati za normalne uvjete i 300 sati za hiperosmotske uvjete. Analiza lokalne (rezultati prikazani na slikama 14-17) i globalne parametarske osjetljivosti (slike 18-20) provedena je pomoću programa WR Mathematica 10.0 što je omogućilo određivanje ključnih kinetičkih parametara u ovom modelu. Model je prikazan na slici 6, a rezultati analize na slikama 7-20.

4.1. PRIKAZ MODELA BIOSINTEZE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA U GS-NS0 STANICAMA IZRAĐENOG U RAČUNALNOM PROGRAMU CellDesigner

Model izrađen u računalnom programu CellDesigner prikazuje put biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama. Prema podacima preuzetima iz rada Ho i sur. (2006), glavni nutrijenti u podlozi koji utječu na rast stanica su glukoza (GLC) kao supstrat i laktat (LAC) kao produkt procesa. Korelacija glavnih nutrijenata i ukupnog broja stanica (X_T) te broja živih (X_v) i mrtvih (X_d) stanica prikazana je u odjeljku c1 koji predstavlja izvanstanični sadržaj. Unutar odjeljka koji predstavlja unutarstanični sadržaj GS-NS0 stanica, prikazan je prvi korak biosinteze monoklonskih protutijela, odnosno reakcije translacije mRNA teškog i lakog lanca u slobodne polipeptidne lance koji se povezuju u intermedijer HL. Potom se intermedijeri HL transportiraju u endoplazmatski retikulum (odjeljak ER) gdje nastaju potpuno formirana monoklonska protutijela, dalje u Golgijevo tijelo odakle se transportiraju u izvanstanični sadržaj. Proces biosinteze završava akumulacijom formiranih monoklonskih protutijela u mediju. Opisani model prikazan je slikom 6.

Pošto program CellDesigner omogućava vizualizaciju složenih mreža biokemijskih reakcija i genski reguliranih mreža, pronašao je široku primjenu u modeliranju i analizi biokemijskih puteva. Vrlo je jednostavan za korištenje te je prilagođen korisniku. Također, besplatan je i podržavaju ga

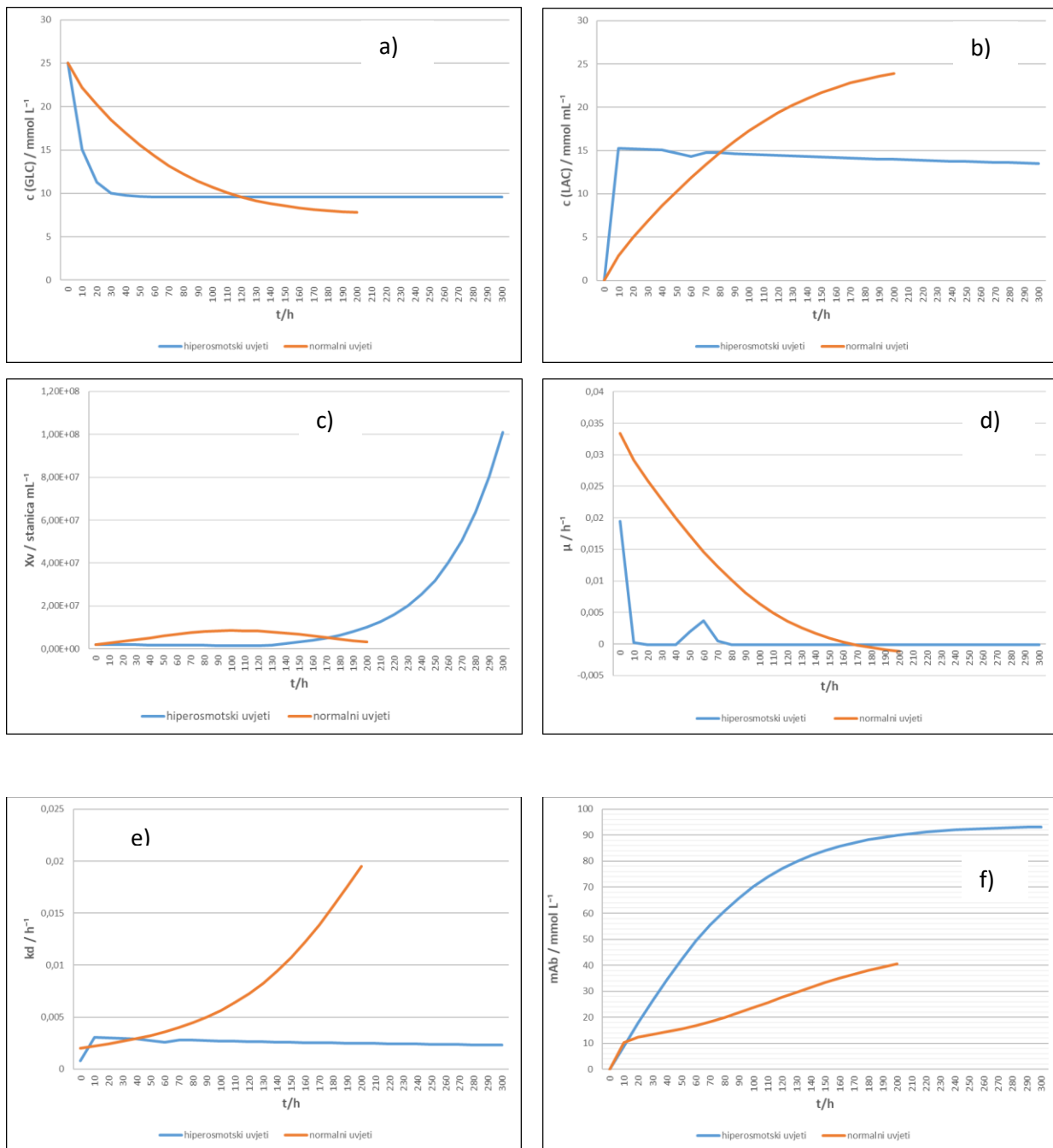
mnogi operacijski sustavi što ga čini dostupnim svima. Nije zahtjevan za rukovanje, a podržava simulacije i pretraživanje parametara povezujući se s brojnim bazama podataka.



Slika 6. Prikaz modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama izrađen u programu CellDesigner

4.2. SIMULACIJA MODELA BIOSINTEZE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA U GS-NS0 STANICAMA U RAČUNALNOM PROGRAMU WR Mathematica 10.0

Provedena je simulacija modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama pri početnoj koncentraciji glukoze $c_0=25 \text{ mmol L}^{-1}$, u normalnim i hiperosmotskim uvjetima. Trajanje simulacije za normalne uvjete je period od 200 sati, a za hiperosmotske uvjete 300 sati. Također je ispitan utjecaj različitih početnih koncentracije glukoze ($c_{GLC} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{GLC} = 15 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{GLC} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c_{GLC} = 25 \text{ mmol L}^{-1}$) i utjecaj različitog početnog broja živih stanica ($X_v = 2,5 \cdot 10^5 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 5,0 \cdot 10^5 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 1,0 \cdot 10^6 \text{ stanica mL}^{-1}$, $X_v = 2,0 \cdot 10^6 \text{ stanica mL}^{-1}$) pri normalnim uvjetima na produktivnost procesa. Pri tome je praćena promjena koncentracije različitih varijabli (koncentracija glukoze, koncentracija laktata, broj živih stanica, specifična brzina rasta, stopa smrtnosti te koncentracija proizvedenih monoklonskih protutijela).



Slika 7. Simulacija procesa proizvodnje monoklonskih protutijela u normalnim i hiperosmotskim uvjetima. Prikaz dinamičke promjene: a) koncentracija glukoze, b) koncentracija laktata, c) koncentracija živih stanica, d) specifična brzina rasta, e) stopa smrtnosti, f) koncentracija monoklonskih protutijela

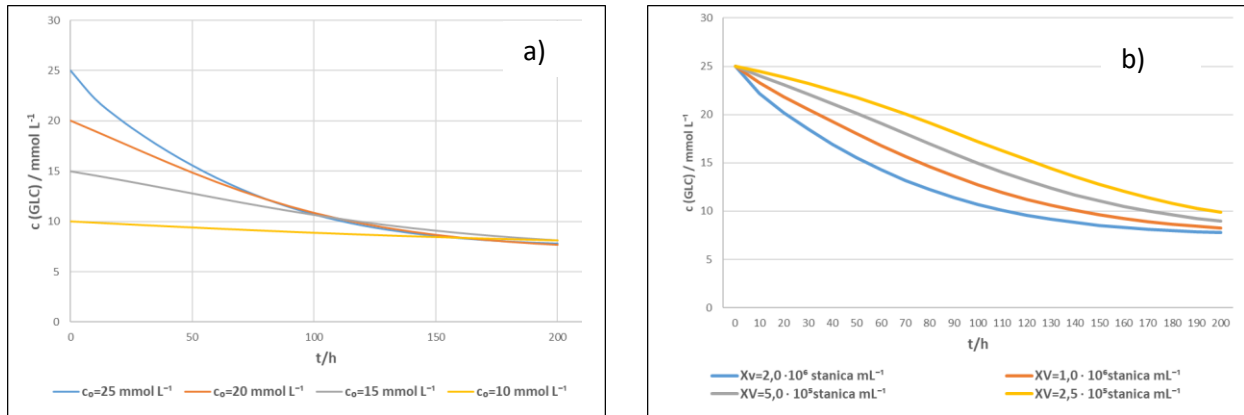
Slikom 7 prikazan je rezultat simulacije modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama provedene u normalnim i hiperosmotskim uvjetima, s istim početnim uvjetima, odnosno s istom početnom koncentracijom glukoze od 25 mmol L^{-1} . Pokušaji simulacije s početnim koncentracijama glukoze nižim od 25 mmol L^{-1} nisu bili uspješni jer simulacije postaje numerički nestabilna već nakon $t = 1 \text{ h}$.

Proces proizvodnje monoklonskih protutijela uključuje procese transkripcije i translacije u stanici, a ti procesi troše puno energije u obliku ATP-a. Kako bi stanica osigurala dovoljnu količinu ATP-a, mora se opskrbiti izvorima energije (npr. glukoza). Metabolizmom glukoze nastaje laktat kao međuprodukt te energija u obliku ATP-a.

Prema radu Lin i sur. (1999) hiperosmotski uvjeti induciraju aktivaciju transkripcije mRNA, uzrokujući promjene u strukturi kromatina u jezgri. Takve promjene dovode do povećanja specifičnih stopa translacije, tj. translacija se odvija češće te je stanici potrebno više ATP-a. Zbog toga, veća je potrošnja nutrijenata, odnosno glukoze u hiperosmotskim uvjetima, što je vidljivo na slici 7a. Posljedično tome nastaje više laktata koji je međuprodukt metabolizma glukoze (slika 7b). Niža koncentracija živih stanica u hiperosmotskim uvjetima u odnosu na normalne (slika 7c) objašnjava se činjenicom da kada se stanice nađu u uvjetima povećanog osmotskog tlaka, u početnom stadiju dolazi do brzog pasivnog odljeva vode iz stanica što rezultira skupljanjem stanica, odnosno stanice prolaze fazu prilagodbe (Lin i sur., 1999). Takav slijed događaja može smanjiti specifičnu brzinu rasta stanica što je vidljivo na slici 7d gdje specifična brzina rasta naglo pada u prvih 10 sati. Posljedično tome, uočen je nagli porast stope smrtnosti u prvih 10 sati (slika 7e), a dalje krivulja stope smrtnosti stagnira jer se pokreće osmoregulacijski sustav u stanicama (Yancey i sur., 1982). Stanice se prilagođavaju okolišnim uvjetima te manji broj stanica umire.

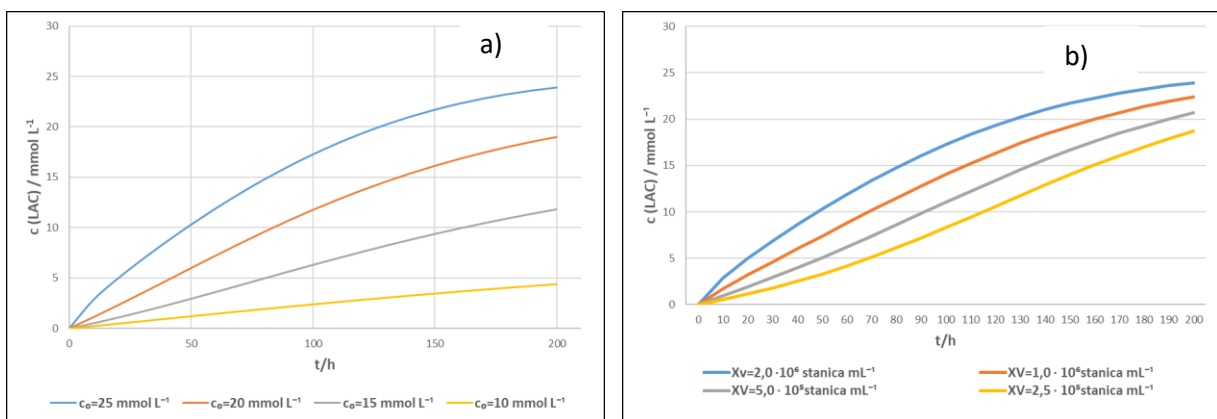
Spomenuta stimulacija transkripcije u hiperosmotskim uvjetima (Lin i sur., 1999) dovodi do povećanja količine mRNA lakog i teškog lanca, time se stimulira proces translacije, odnosno veća je produktivnost monoklonskih protutijela. Upravo takav rezultat vidljiv je na slici 7f gdje krivulja dobivena simulacijom u hiperosmotskim uvjetima pokazuje značajno veću koncentraciju proizvedenih monoklonskih protutijela u hiperosmotskim uvjetima, u odnosu na normalne uvjete. Primjerice, u 200. satu simulacije, pri normalnim uvjetima koncentracija proizvedenih monoklonskih protutijela iznosi $40,47 \text{ mmol L}^{-1}$, a pri hiperosmotskim uvjetima $89,98 \text{ mmol L}^{-1}$.

Kao što je prethodno spomenuto, ispitan je i utjecaj različite početne koncentracije glukoze i broja živih stanica na produktivnost procesa u normalnim uvjetima.



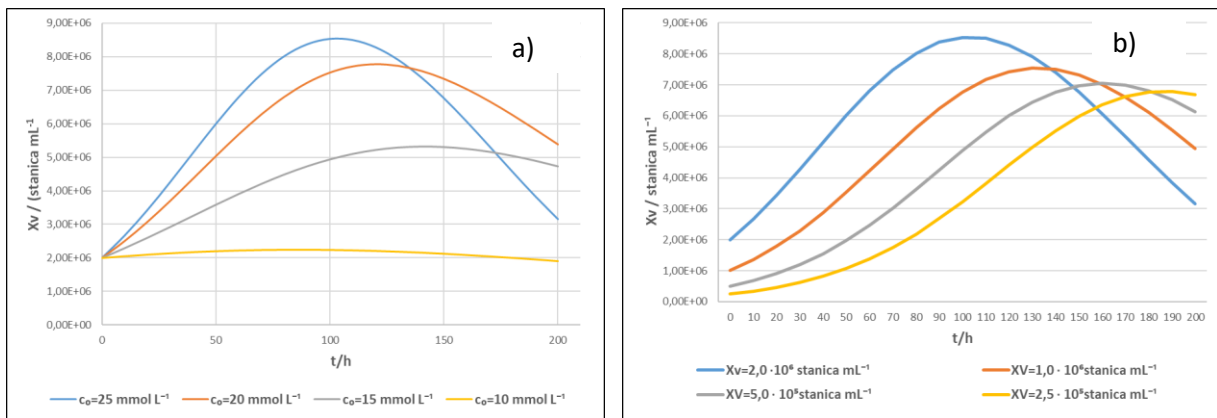
Slika 8. a) Promjena koncentracije glukoze za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena koncentracije glukoze za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Na slici 8 grafički je prikazana promjena koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati simulacije procesa proizvodnje monoklonskih protutijela. S obzirom na različite početne koncentracije glukoze (slika 8a), uočava se najveća brzina potrošnje glukoze u uvjetima gdje je početna koncentracija najveća, odnosno kod $c_0 = 25 \text{ mmol L}^{-1}$. Na slici 8b promjena koncentracije glukoze mijenja se na isti način, a u uvjetima gdje je početna vrijednost broja stanica najveća, uočena je najveća potrošnja glukoze, odnosno koncentracija glukoze je najniža.



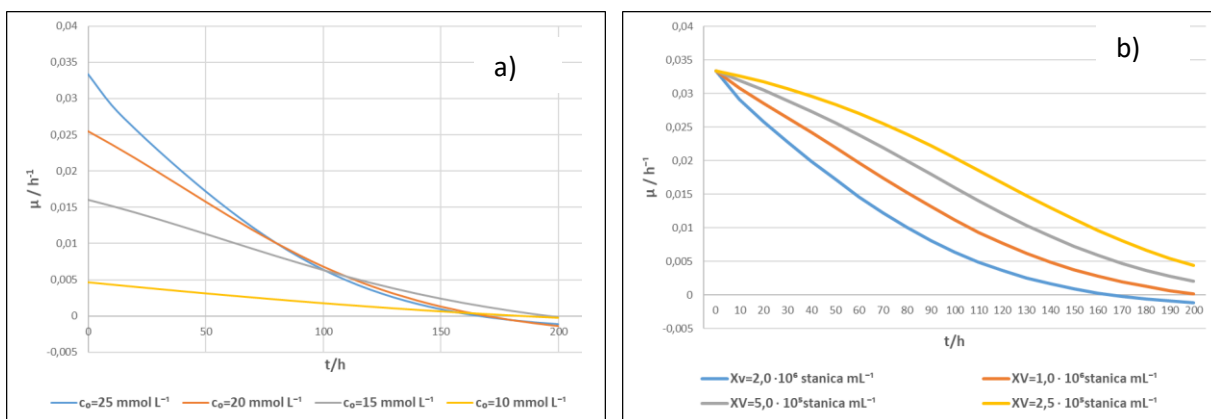
Slika 9. a) Promjena koncentracije laktata za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena koncentracije laktata za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Pračena je promjena koncentracije laktata kao međuprodukta metabolizma GS-NS0 stanica (slika 9). U slučaju simulacije s različitim početnim koncentracijama glukoze (slika 9a), koncentracija laktata je najveća pri najvećoj početnoj koncentraciji glukoze. Na slici 9b također se uočava najveća koncentracija laktata pri najvećem početnom broju stanica. Rezultat je očekivan jer će veći broj stanica trošiti više glukoze, a što je dostupno više glukoze, posljedično će nastajati veća količina laktata.



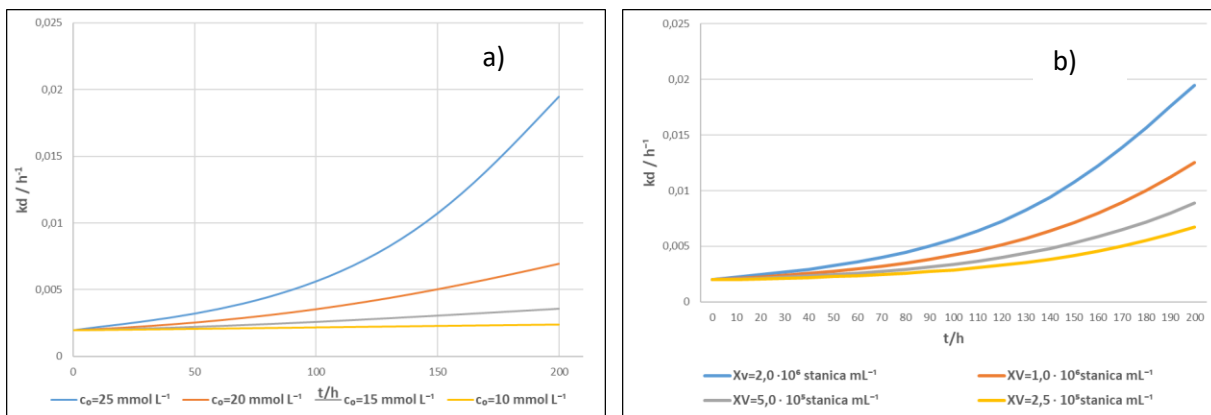
Slika 10. a) Promjena broja živih stanica za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena broja živih stanica za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Prema slici 10a vidljivo je da glukoza ima utjecaj na koncentraciju živih stanica. Uočeno je da što je početna koncentracija glukoze viša, kultura doseže veći broj stanica. Isti trend javlja se i kod simulacije s različitim početnim koncentracijama živih stanica (slika 10b). Krivulja koja opisuje rast stanica s najvećom početnom koncentracijom stanica doseže najveći maksimum u odnosu na druge krivulje, u 100. satu simulacije procesa, a iznosi $8,54 \text{ stanica } mL^{-1}$.



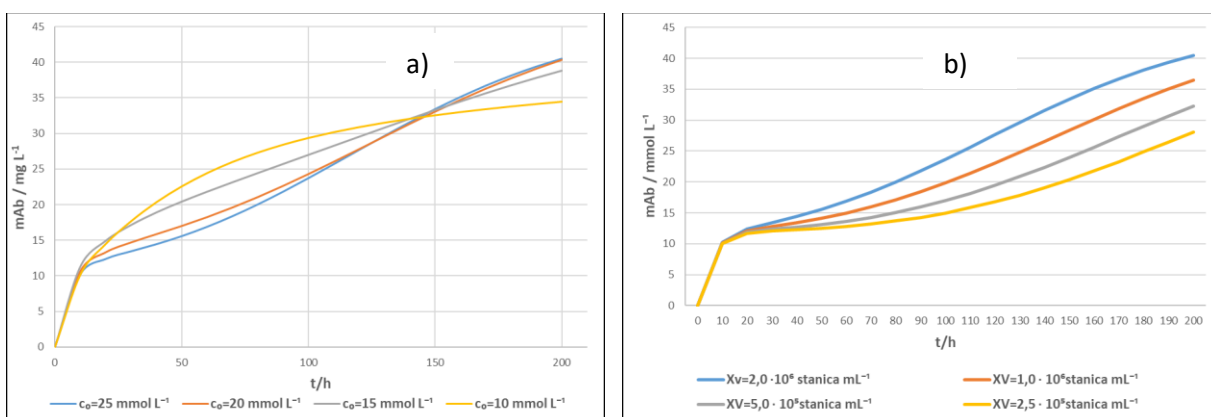
Slika 11. a) Promjena vrijednosti specifične brzine rasta za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena vrijednosti specifične brzine rasta za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Na slici 11a prikazana je promjena vrijednosti specifične brzine rasta pri različitim početnim koncentracijama glukoze, u normalnim uvjetima. Krivulje se mijenjaju na isti način, sukladno početnim koncentracijama glukoze, najveća specifična brzina na početku procesa je u uvjetima najveće početne koncentracije glukoze. Prema slici 11b na kojoj se nalazi prikaz promjene vrijednosti specifične brzine rasta za različite početne koncentracije živih stanica u normalnim uvjetima, uočava se kako se krivulje mijenjaju jednako, međutim najmanje vrijednosti specifične brzine rasta prikazuje krivulja s najvećom početnom koncentracijom stanica. Prema radu Grilo i Mantalaris (2019), ispitan je stanični ciklus GS-NS0 stanica te se može zaključiti kako je specifična brzina manja u kulturi s većom gustoćom stanica, odnosno s većom početnom koncentracijom stanica, zbog manje dostupnosti nutrijenata.



Slika 12. a) Promjena vrijednosti stope smrtnosti za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena vrijednosti stope smrtnosti za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Grafički prikaz na slici 12a predstavlja promjenu vrijednosti stope smrtnosti za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima. Uočava se kako u uvjetima gdje je početna koncentracija glukoze najveća, stopa smrtnosti je najveća što se može objasniti kroz metabolizam GS-NS0 stanica. Naime, metabolizmom glukoze nastaje laktat koji djeluje kao inhibitor rasta stanica te ujedno dolazi do nakupljanja štetnih metabolita (Quiroga-Campano i sur., 2018). Stopa smrtnosti također se povećava što je veći početni broj stanica u kulturi (slika 12b) jer s većim brojem stanica, brže se troše nutrijenti te dolazi do njihovog iscrpljivanja. Prema tome, veći broj stanica umire.



Slika 13. a) Promjena koncentracije monoklonskih protutijela za različite početne koncentracije glukoze pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati b) Promjena koncentracije monoklonskih protutijela za različite početne koncentracije živih stanica pri normalnim uvjetima tijekom 200 sati

Krivulje na slici 13a i 13b prate promjene koncentracije monoklonskih protutijela tijekom simulacije procesa proizvodnje u GS-NS0 stanicama u trajanju od 200 sati, u normalnim uvjetima. U uvjetima promjene početne koncentracije glukoze (slika 13a), uočava se slična promjena krivulja početnih koncentracija $c_0=10 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c_0=15 \text{ mmol L}^{-1}$ te $c_0=20 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c_0=25 \text{ mmol L}^{-1}$. Na grafičkom prikazu uvjeta u kojima se mijenjala početna vrijednost broja stanica (slika 13b) može se uočiti da koncentracija nastalih monoklonskih protutijela raste s porastom početnog broja živih stanica.

4.3. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI

Matematičko modeliranje biotehnoških procesa predstavlja pojednostavljenu sliku stvarnog procesa od interesa. Jednostavni modeli cijenjeni su u industrijskoj praksi jer se lako primjenjuju u karakterizaciji procesa, online praćenju procesnih kontrola i optimizaciji procesa (Gerlach i sur., 2014). Međutim, ovakav pristup uvijek je suočen s problemom nepouzdanosti procjene parametara modela te je važno primijeniti analize koje će omogućiti procjenu učinka promjena ulaznih vrijednosti na izlazne varijable modela. Takva analiza je analiza lokalne parametarske osjetljivosti te omogućava detektiranje odstupanja od pretpostavki te definiranje najvažnijih parametara procesa. Praktična primjena ove analize je mogućnost predviđanja potencijalnih problema, uočavanje pogrešaka te smanjenje količine istraživanja potrebnih za optimiranje procesa.

U ovom radu analiziran je utjecaj promjena u vrijednostima individualnih kinetičkih parametara, pri čemu vrijednost ostalih parametara ostaje konstanta. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti parametara ispitana je pojedinačnim povećanjem parametara za 3%, a potom smanjenjem vrijednosti parametara za 3 %. Tim principom, analiza je provedena za normalne i hiperosmotske uvjete. Analiza je provedena programom WR Mathematica, a rezultati su prikazani pomoću MS Excel-a.

Osjetljivost metabolita prikazana je tehnikom vizualizacije podataka, odnosno gradacijom boja (eng. *heat map*). Pošto parametarski koeficijenti osjetljivosti modela mogu pokazivati pozitivnu i negativnu promjenu vrijednosti kod uvođenja 3 % perturbacije, crvenom bojom su prikazane negativne vrijednosti, a zelenom bojom pozitivne vrijednosti. Intenzitet crvene i zelene boje daje informaciju o utjecaju na izlazne varijable modela, a bijela polja pokazuju područja s najmanjom osjetljivosti.

Ispitana je osjetljivost koncentracije metabolita modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama na 3% povećanje vrijednosti kinetičkih parametara pojedinačno (slika 14), odnosno na smanjenje vrijednosti kinetičkih parametara (slika 15), u normalnim uvjetima. Isto je primijenjeno i za hiperosmotske uvjete (slike 16 i 17). Na slikama su korištene sljedeće skraćenice: Xt-broj ukupnih stanica, Xv-broj živih stanica, Xd-broj mrtvih stanica, GLC-koncentracija glukoze, LAC-koncentracija laktata, mH-intracelularna koncentracija mRNA teškog lanca, mL-intracelularna koncentracija mRNA lakog lanca, kH-konstanta degradacije mRNA teškog lanca, kL-konstanta degradacije mRNA lakog lanca, HL-koncentracija intermedijera monoklonskih protutijela, H2L2ER-koncentracija monoklonskih protutijela u Endoplazmatkom retikulumu, H2L2G-koncentracija monoklonskih protutijela u Golgijevom tijelu, H2L2EMC-koncentracija monoklonskih protutijela u izvanstaničnom sadržaju; μ_{max} -specifična brzina rasta, GLCmin-minimalna koncentracija glukoze, Kd1-minimalna specifična stopa smrtnosti, KdT-specifična stopa smrtnosti povezana s laktatom, k11-specifična stopa lize povezana s kd, k12-stopa lize pri kd=0, Kglc-Monodova konstanta za glukožu, Kglcmax-maksimalni koeficijent unosa glukoze, Kglc1-koeficijent unosa glukoze, mglc-koeficijent održavanja za glukožu, mlac-minimalna stopa proizvodnje laktata, Ylac,glc-prinos laktata po glukozi, SH-specifična stopa transkripcije mRNA teškog lanca, SL-specifična stopa transkripcije mRNA lakog lanca, TH0-specifična stopa translacije mRNA teškog lanca, TL0-specifična stopa translacije mRNA lakog lanca, kHL-konstanta povezivanja teškog i lakog lanca, kHH-konstanta povezivanja 2 teška lanca, t1/2ER-vrijeme potrebno za transport 50 % molekula monoklonskih protutijela iz ER u Golgijevo tijelo, t1/2G-vrijeme potrebni za transport 50 % molekula monoklonskih protutijela iz Golgijevog tijela u izvanstanični sadržaj, t1/2-vrijeme poluživota mRNA teškog i lakog lanca, kER-konstanta transporta monoklonskih protutijela iz ER u Golgijevo tijelo, kG-konstanta transporta monoklonskih protutijela iz Golgijevog tijela u medij, mH0-intracelularna koncentracija mRNA teškog lanca, mL0-intracelularna koncentracija lakog mRNA lakog lanca, H0-koncentracijaslobodnog teškog polipeptidnog lanca, L0-koncentracija slobodnog polipeptidnog lakog lanca, kH-konstanta degradacije mRNA teškog lanca, kL-konstanta degradacije mRNA lakog lanca.



Slika 14. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti koncentracija metabolita na povećanje vrijednosti kinetičkih parametara za 3 % u normalnim uvjetima



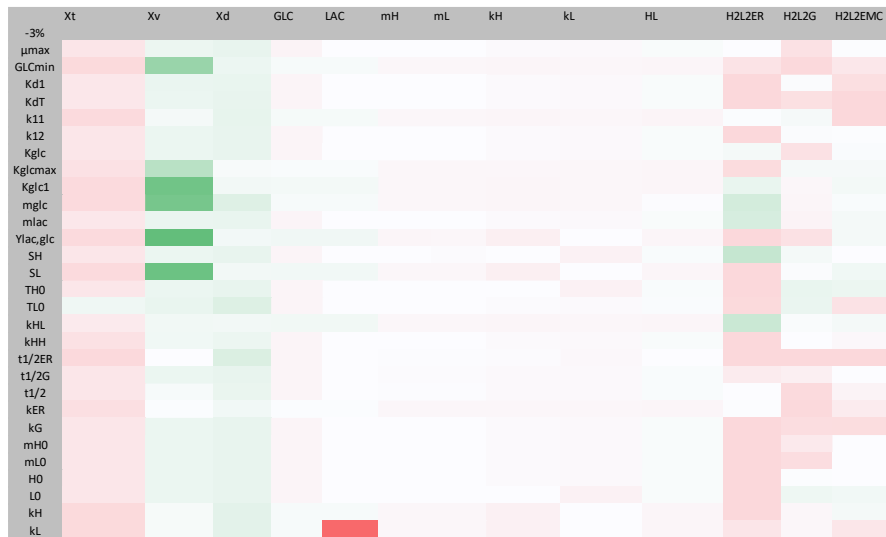
Slika 15. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti koncentracija metabolita na smanjenje vrijednosti kinetičkih parametara za 3 % u normalnim uvjetima

Najveću osjetljivost na povećanje parametara za 3% u normalnim uvjetima (slika 14) pokazuju metaboliti H2L2ER, H2L2G te H2L2EMC (monoklonska protutijela u endoplazmatskom retikulumu, u Golgijevom tijelu te u izvanstaničnom sadržaju) na promjenu većine parametara. Koncentracija živih stanica Xv pokazuje osjetljivost na promjenu parametra L0 (početna koncentracija slobodnih lakih lanaca u endoplazmatskom retikulumu). Isti metaboliti pokazuju najveću osjetljivost na smanjenje vrijednosti parametara za 3% (slika 15) te se ističe koncentracija ukupnih stanica Xt koja pokazuje visoku negativnu osjetljivost na promjenu vrijednosti parametra

K_{glc1} , koji predstavlja koeficijent potrošnje glukoze uključen u izraz za potrošnju glukoze. Koeficijent potrošnje glukoze u izrazu za potrošnju glukoze odlazi u brojnik, tj. njegovim povećanjem pada brzina potrošnje glukoze pa posljedično dolazi do smanjenja ukupnog broja stanica.



Slika 16. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti koncentracija metabolita na povećanje vrijednosti kinetičkih parametara za 3 % u hiperosmotskim uvjetima



Slika 17. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti koncentracija metabolita na smanjenje vrijednosti kinetičkih parametara za 3 % u hiperosmotskim uvjetima

Najveću osjetljivost na povećanje vrijednosti parametara za 3% u hiperosmotskim uvjetima (slika 16) pokazuju koncentracija ukupnih stanica X_t , koncentracija laktata LAC te koncentracija monoklonskih protutijela (H2L2ER, H2L2G te H2L2EMC). Posebice se ističe utjecaj parametara K_{glc} (Monodova konstanta za glukozu uključena u izraz za specifičnu brzinu rasta) i k_L (koeficijent raspadanja molekula mRNA lakih lanaca) na koncentracije monoklonskih protutijela. U slučaju smanjenja vrijednosti parametara za 3% u hiperosmotski uvjetima (slika 17), ističe se osjetljivost koncentracije laktata na promjene vrijednosti parametra k_L te koncentracija živih stanica na promjene vrijednosti GLC_{min} - minimalna koncentracija glukoze, K_{glcmax} - maksimalni koeficijent unosa glukoze, K_{glc1} - koeficijent unosa glukoze, mg_{lc} - koeficijent održavanja za glukozu, Y_{lac} , g_{lc} - prinos laktata po glukozu i SL - specifična stopa transkripcije mRNA lakog lanca. Uočava se da ostali metaboliti u modelu biosinteze monoklonskih protutijela pokazuju izrazito malu ili ne pokazuju osjetljivost na promjene vrijednosti kinetičkih parametara uključenih u model.

Prema analizi lokalne parametarske osjetljivosti provedene na modelu biosinteze monoklonskih protutijela u normalnim i hiperosmotskim uvjetima, najosjetljiviji metaboliti su upravo monoklonska protutijela (H2L2ER, H2L2G te H2L2EMC). U slučaju povećanja vrijednosti parametara za 3 %, uočava se razlika između normalnih i hiperosmotskih uvjeta, odnosno osjetljivost se mijenja iz pozitivnog efekta u negativan i obrnuto. Međutim, smanjenje vrijednosti parametara za 3% u hiperosmotskim uvjetima uzrokovalo je smanjenje osjetljivosti monoklonskih protutijela.

U svrhu boljeg razumijevanja kompleksnih interakcija u matematičkom modelu procesa, potrebni su matematički alati poput ove analize. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti omogućava utjecaj promjene samo jednog parametra na izlazne varijable modela, dok se ostali parametri zadržavaju na nominalnoj vrijednosti. Ova analiza primjenjuje se kao standardna metoda za analizu bioloških modela (Jurina i sur., 2015).

Budući da je većina modela nelinearna, izuzev trivijalnih kinetičkih modela, vrijednosti koeficijenata osjetljivosti su različiti u različitim točkama procesa. Stoga postoji mogućnost da se neki parametri modela, prema ovoj vrsti analize, smatraju nevažnima. Prema tome, rezultate analize lokalne parametarske osjetljivosti treba razmatrati s dozom opreza (Kent i sur., 2013).

4.4. ANALIZA GLOBALNE PARAMETARSKJE OSJETLJIVOSTI

Analiza globalne parametarske osjetljivosti pokušava izbjeći slabosti analize lokalne parametarske osjetljivosti pomoću izračunavanja vrijednosti koeficijenta osjetljivosti u širem području (Kent i sur., 2013). Ova analiza pruža kvantitativnu procjenu učinka svakog parametra kroz cijeli mogući raspon njihovih vrijednosti te se zbog toga preferira u odnosu na analizu lokalne parametarske osjetljivosti (Ho i sur., 2006).

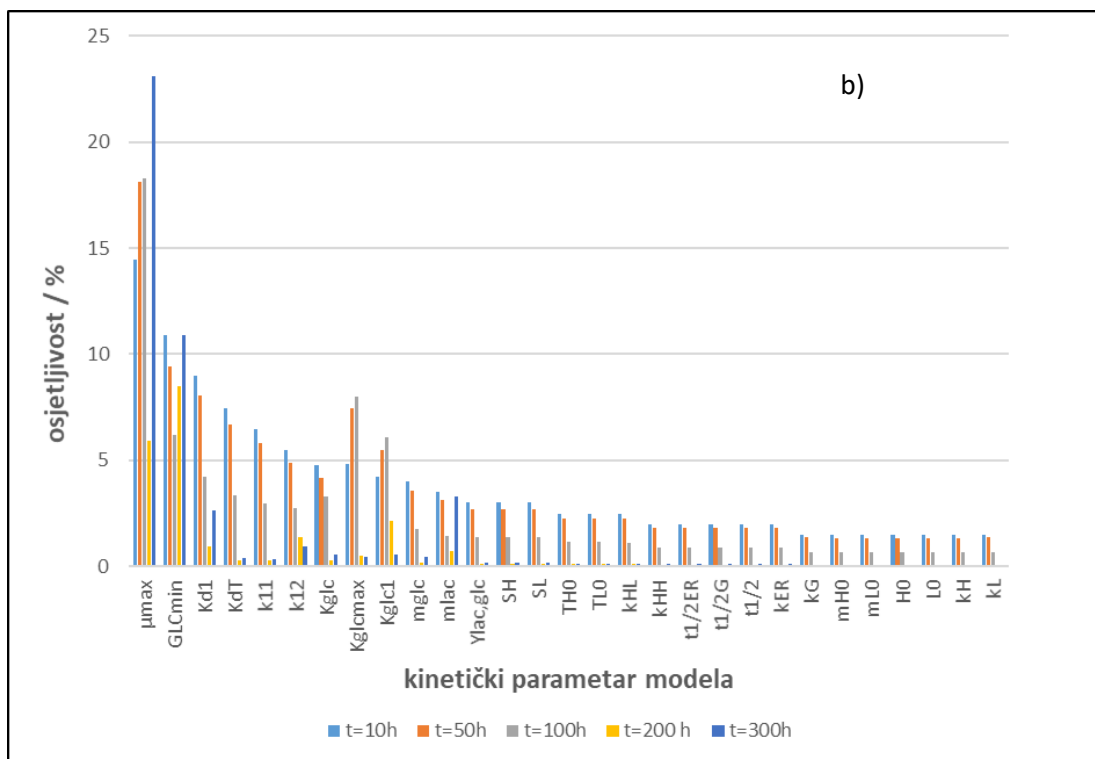
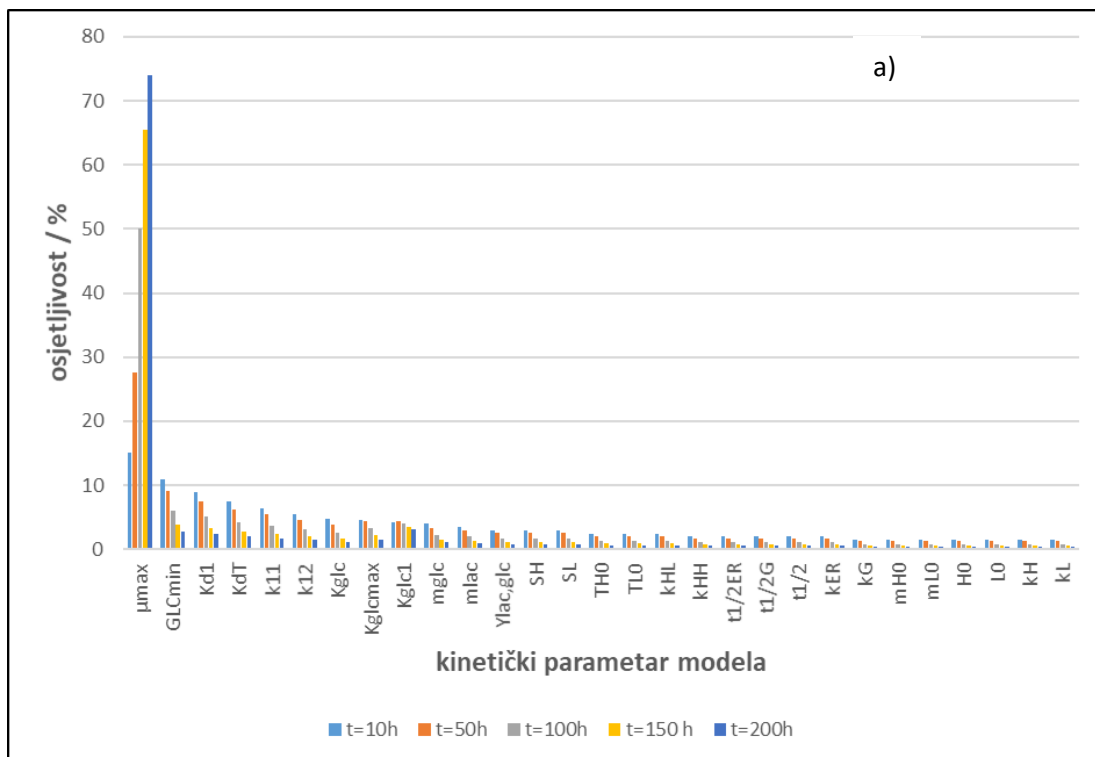
U ovom radu provedena je nestacionarna analiza globalne osjetljivosti parametara povezanih s procesom proizvodnje monoklonskih protutijela za 4 vremena procesa ($t = 10, 50, 150$ i 200 h), pomoću programa WR Mathematica te su rezultati grafički prikazani pomoću MS Excel-a. Nestacionarna analiza globalne osjetljivosti omogućava dobivanje uvida u promjenu važnosti pojedinih parametara tijekom vremena procesa. Navedeni pristup je prethodno opisan u radu Jurinjak Tušek i sur., 2016 gdje je nestacionarnom FAST metodom globalne osjetljivosti analiziran utjecaj kinetičkih parametara biološkog dijela integriranog modela bioremedijacije BTEX-a. Autori navode da je navedeni pristup omogućio dobivanje uvida u „pomak“ u kontroli tijekom procesa, tj. moglo se uočiti da tijekom procesa dolazi do značajnih promjena u ključnim parametrima.

Na slici 18 nalazi se grafički prikaz utjecaja simultane promjene vrijednosti svih parametara modela na koncentraciju glukoze u definiranim vremenskim trenucima. U normalnim uvjetima (slika 18 a) kao najvažniji parametar za vrijednost koncentracije glukoze ističe se μ_{max} , odnosno maksimalna specifična brzina rasta stanica u kulturi. Koncentracija laktata u kulturi također najviše ovisi o parametru μ_{max} što pokazuje najveći pik na grafičkom prikazu. Isti parametar ističe se kao ključan i u normalnim (slika 19a) i hiperosmotskim uvjetima (slika 19b).

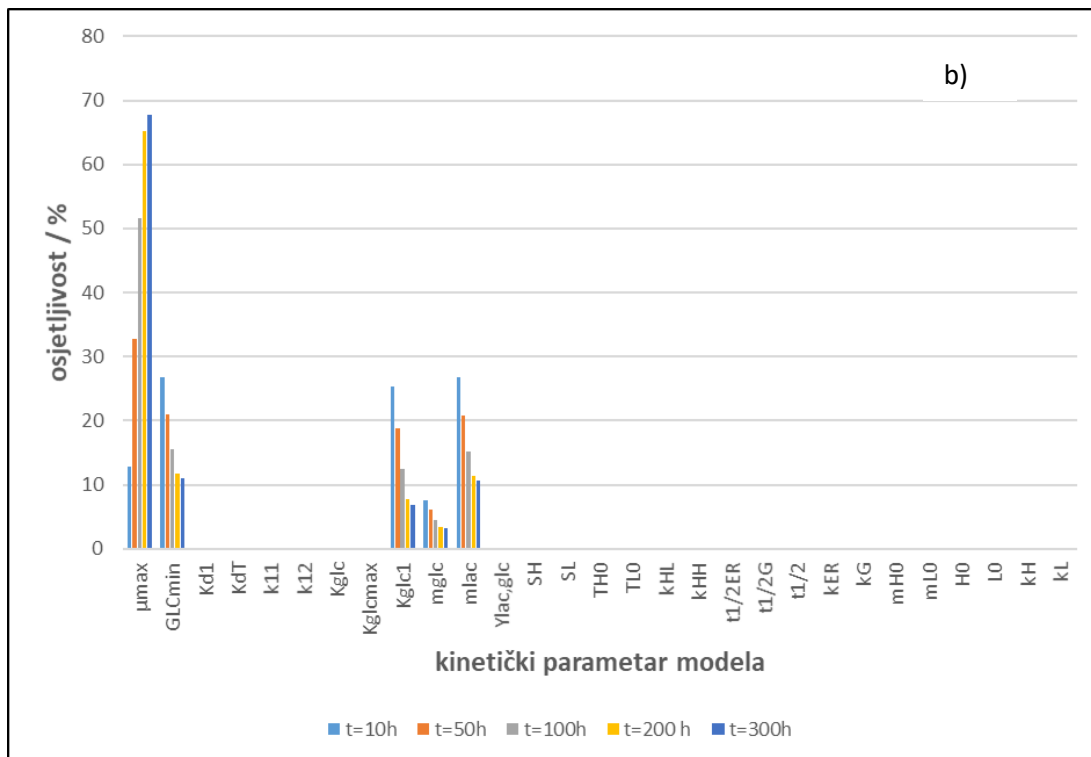
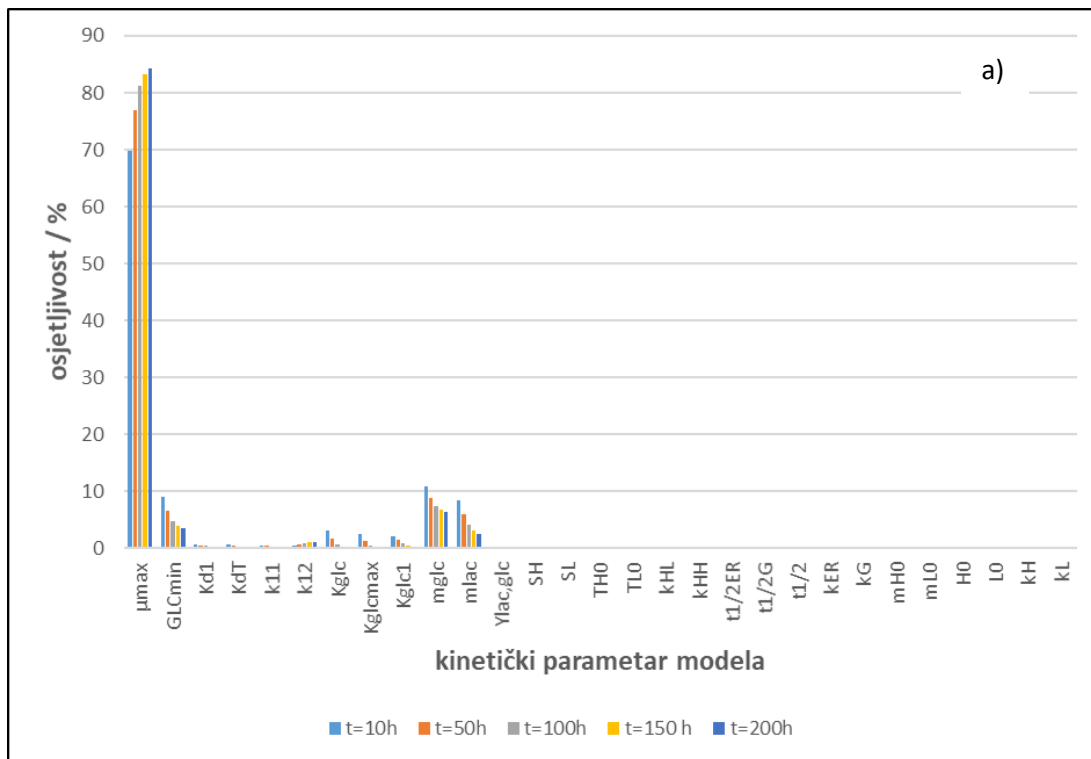
Slikom 20 prikazan je utjecaj pojedinog kinetičkog parametra na koncentraciju monoklonskih protutijela. U normalnim uvjetima (slika 20a) ponovno se ističe μ_{max} , maksimalna specifična brzina rasta, kao parametar s najviše utjecaja. Međutim, slijedi pik parametra TL koji predstavlja specifičnu brzinu translacije lakog polipeptidnog lanca uključen u bilancu promjene koncentracije lakog polipeptidnog lanca. Upravo taj parametar, TL , ističe se kao najvažniji, odnosno s najvećim utjecajem na koncentraciju monoklonskih protutijela u hiperosmotskim uvjetima, a slijedi ga $L0$, početna koncentracija slobodnog lakog polipeptidnog lanca (slika 20b).

Analizom modela biosinteze monoklonskih protutijela u GS-NS0 stanicama primjenom analize globalne parametarske osjetljivosti dolazi se zaključka koji su ulazni parametri najosjetljiviji, odnosno dobivamo podatke o maksimalnim brzinama reakcija i kinetičkih konstanti koje imaju najveći utjecaj na izlazne varijable. U ovom modelu, prilikom simulacije u normalnim i hiperosmotskim uvjetima, to su maksimalna specifična brzina rasta stanica μ_{max} i specifična brzina translacije lakog polipeptidnog lanca TL . Također, uočen je trend povećanja maksimalne specifične brzine stanica μ_{max} s povećanjem vremena procesa. Suprotno tome, vrijednost TL najveća kod $t=0h$, odnosno kod najmanjeg vremena procesa te opada s povećanjem vremena procesa.

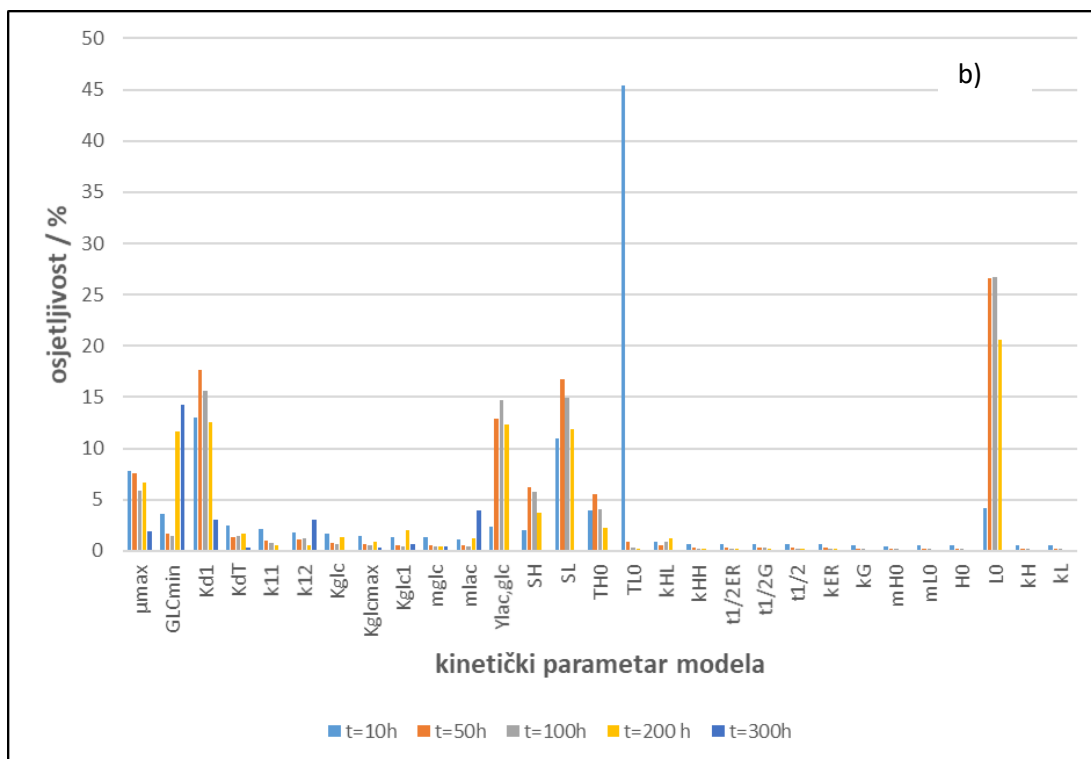
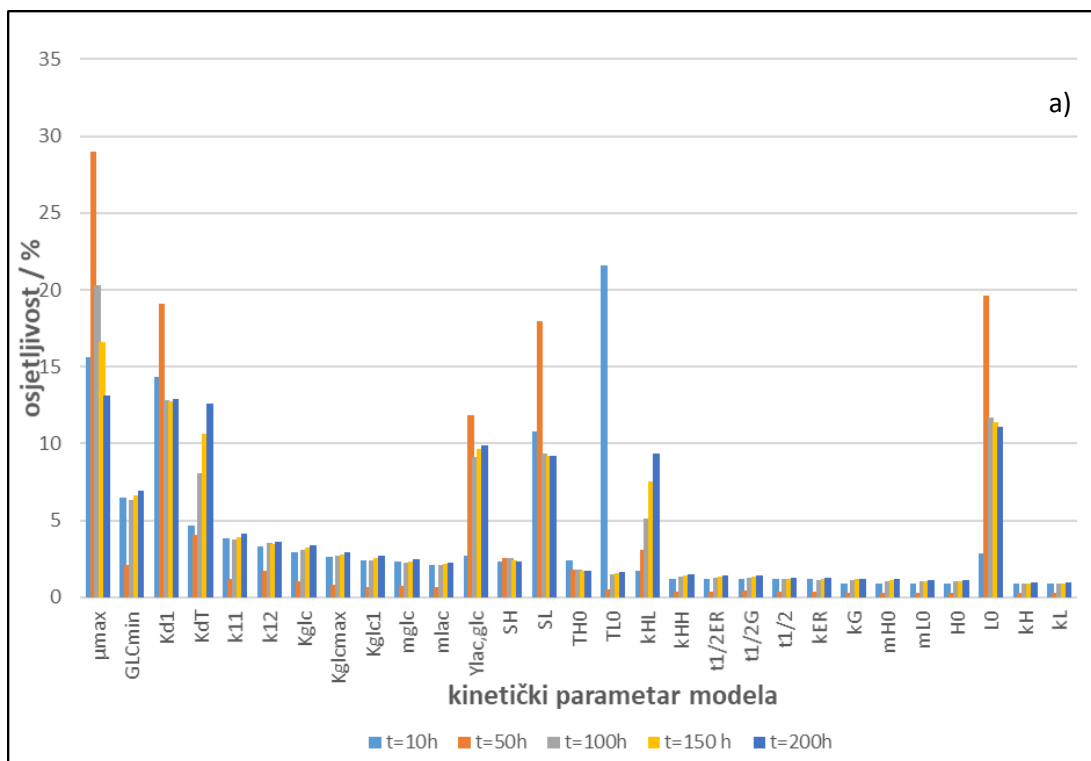
Primjena metoda globalne osjetljivosti za analizu modela proizvodnje monoklonskih protutijela je prethodno opisan u radovima Kontoravdi i sur., 2004, Kontoravdi i sur., 2005 te Kiparissides i sur., 2008. S obzirom na drugačiju strukturu predloženih modela proizvodnje monoklonskih protutijela, rezultate prezentirane u navedenim radovima nije moguće usporediti s rezultatima dobivenim u ovom radu. Nime Kontoravdi i sur., 2004 te Kontoravdi i sur., 2005 proces proizvodnje monoklonskih antijela opisuju nestrukturnim modelom koji uključuje stanični rast, staničnu smrt, metabolizam stanice, sintezu i proizvodnju monoklonskih protutijela u bioreaktoru. Spomenuti model uključuje 16 bilanci tvari i 30 parametara modela. Rezultati pokazuju visoku osjetljivost sljedećih parametara na produktivnost monoklonskih protutijela: (i) koeficijent učinkovitosti glikozilacije u Golgijevom tijelu, (ii) konstanta proizvodnje protutijela, (iii) konstanta degradacije glutamina, (iv) konstanta brzine prijenosa protutijela iz Golgijevog tijela u podlogu.



Slika 18. a) Globalne osjetljivosti koncentracije glukoze na promjene kinetičkih parametara u normalnim uvjetima b) Globalne osjetljivosti koncentracije glukoze na promjene kinetičkih parametara u hiperosmotskim uvjetima



Slika 19. a) Globalne osjetljivosti koncentracije laktata na promjene kinetičkih parametara u normalnim uvjetima b) Globalne osjetljivosti koncentracije laktata na promjene kinetičkih parametara u hiperosmotskim uvjetima



Slika 20. a) Globalne osjetljivosti koncentracije monoklonskih protutijela na promjene kinetičkih parametara u normalnim uvjetima b) Globalne osjetljivosti koncentracije monoklonskih protutijela na promjene kinetičkih parametara u hiperosmotskim uvjetima

4.5. ANALIZE STEHIOMETRIJSKE MATRICE

Metaboličke mreže osiguravaju energiju i građevne elemente za rast i održavanje stanice. Zbog toga stanice kontinuirano podešavaju metaboličke mreže kao odgovor na promjene u okolišu (Maarleveld i sur., 2013). Analiza metaboličkih mreža daje uvid u sposobnost organizma da se prilagodi na promjene u okolišu. Analiza stehiometrijske matrice je jedna od metoda koja se u tu svrhu redovito koristi (Maarleveld i sur., 2015). U ovom radu provedena je analiza stehiometrijske matrice modela proizvodnje monoklonskih protutijela u programskom paketu CellDesigner. Stehiometrijska matrica modela dana je u tablici 5.

Tablica 5. Stehiometrijska matrica modela proizvodnje monoklonskih protutijela

	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	r10	r11	r12	r13	r14	r15	r16	r17
HL	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H2L2G	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	-1	0	0	0	0	0
H2L2ER	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
Xt	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Xv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Xd	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
H	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
GLC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0
mLdeg	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mH	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0
H2L2ECM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H2L2ERdeg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
HLdeg	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ldeg	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xddeg	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hdeg	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xtdeg	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mL	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mHdeg	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2L2Gdeg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Stehiometrijska matrica modela proizvodnje monoklonskih protutijela dimenzije je 22 x 17. Sastoji se od 22 reda koji predstavljaju pojedine metabolite puta sinteze te 17 stupaca koji se odnose na reakcije puta biosinteze monoklonskih antijela. Broj nezavisnih bilanci (varijabli) određen je rangom stehiometrijske matrice koji iznosi 17. Broj konzervativnih bilanci je 5. Na osnovu stehiometrijske matrice moguće je analizirati detalje strukture metaboličke mreže (npr. izraze za očuvanje tvari). Na temelju rezultata analize stehiometrijske matrice dobiveno je da su:

- (i) Nezavisne varijable: mH , H , L , HL , $Ldeg$, $HLdeg$, $mLdeg$, Xt , Xv , Xd , GLC , LAC , $Xddeg$, $H2L2EMC$, $H2L2ER$, $H2L2G$, $H2L2ERdeg$
- (ii) Zavisne varijable: mL , $Hdeg$, $mHdeg$, $Xtdeg$, $H2L2Gdeg$
- (iii) Izrazi očuvanja tvari:
 - i. $H + L - Ldeg + Hdeg$
 - ii. $Xt + Xv + Xd + GLC + LAC + Xtdeg + Xddeg$
 - iii. $mL + mLdeg$
 - iv. $mH + mHdeg$
 - v. $HL + H2L2G + H2L2ER + H2L2EMC + L + H2L2ERdeg + HLdeg + Ldeg + H2L2Gdeg$

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Simulacija modela pokazuje značajno veću koncentraciju proizvedenih monoklonskih protutijela u hiperosmotskim uvjetima, u odnosu na normalne uvjete. Pri normalnim uvjetima koncentracija proizvedenih monoklonskih protutijela iznosi $40,47 \text{ mmol L}^{-1}$, a pri hiperosmotskim uvjetima $89,98 \text{ mmol L}^{-1}$.
2. Najveću osjetljivost na povećanje i na smanjenje vrijednosti kinetičkih parametara za 3% u normalnim uvjetima pokazuju metaboliti H2L2ER, H2L2G te H2L2EMC (monoklonska protutijela u endoplazmatskom retikulumu, u Golgijevom tijelu te u izvanstaničnom sadržaju).
3. Najveću osjetljivost na povećanje i smanjenje vrijednosti parametara za 3% u hiperosmotskim uvjetima pokazuju koncentracija ukupnih stanica X_t , koncentracija laktata LAC te koncentracija monoklonskih protutijela (H2L2ER, H2L2G te H2L2EMC). Posebice se ističe utjecaj parametara K_{glc} (Monodova konstanta za glukozu uključena u izraz za specifičnu brzinu rasta) i k_L (koeficijent raspadanja molekula mRNA lakih lanaca) na koncentracije monoklonskih protutijela.
4. U normalnim uvjetima i hiperosmotskim uvjetima prema analizi globalne parametarske osjetljivost promjena koncentracije glukoze, laktata i protutijela najviše ovisi o parametru μ_{max} , odnosno maksimalnoj specifičnoj brzini rasta stanica u kulturi.
5. Rang stehiometrijske matrice modela iznosi 22×17 te je broj konzervativnih bilanci 5.
6. Analiza osjetljivosti parametara modela proizvodnje monoklonskih protutijela daje uvid u ključne točke procesa te omogućava preciznije unaprijeđenje modela.

6. LITERATURA

Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., Jirstrand, M. (2014) Kinetic models in industrial biotechnology— improving cell factory performance. *Metab. Eng.* **24**, 38–60.

Altiok, D., Tokatli, F., Harsa, S. (2006) Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **81**, 1190-1197.

Bapat, P. M., Bhartiya, S., Venkatesh, K. V., Wangikar, P. P. (2006) Structured kinetic model to represent the utilization of multiple substrates in complex media during rifamycin B fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 779-790.

Barberis, M., Klipp, E., Vanoni, M., Alberghina, L. (2007) Cell size at S phase initiation: an emergent property of the G₁/S network. *PLoS Comput. Biol.* **3**, 649–666.

Barnes, L. M., Bentley, C. M., Dickson, A. J. (2000) Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* **32**, 109-132.

Birch, J. R., Onakunle, Y. (2005) Biopharmaceutical proteins: opportunities and challenges. *Methods Mol. Biol.* **308**, 1-16.

Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., Rogers, P. L. (2003) Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: Experimental data and model development. *Biochem. Eng. J.* **14**, 127-135.

Browne, S. M., Al-Rubeai, M. (2007) Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* **25**, 425–432.

Burky, J. E., Wesson, M. C., Young, A., Farnsworth, S., Dionne, B., Zhu, Y., Hartman, T. E., Qu, L., Zhou, W., Sauer, P. W. (2007) Protein-free fed-batch culture of non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng.* **96**, 281-93.

Butler, G., Rudge, J., Dash, P. R. (2019) Mathematical modelling of cell migration. *Essays Biochem.* **63**, 631-637.

- Chassagnole, C., Rizzi, N. N., Schmid, J. W., Mauch, K., and Reuss, M. (2002) Dynamic modeling of central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 53–73.
- Craven, S., Shirsat, N., Whelan, J., Glennon, B. (2013) Process model comparison and transferability across bioreactor scales and modes of operation for a mammalian cell bioprocess. *Biotechnol Prog.* **29**, 186–196.
- Cvijović, M., Bordel, S., Nielsen, J. (2011) Mathematical models of cell factories: moving towards the core of industrial biotechnology. *Microb Biotechnol.* **4**, 572-584.
- Dhara, V. G., Naik, H. M., Majewska, N. I., Betenbaugh, M. J. (2018) Recombinant antibody production in CHO and NS0 cells: Differences and similarities. *BioDrugs.* **32**, 571-584.
- Ecker, D. M., Jones, S. D., Levine, H. L. (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* **7**, 9-14.
- Elvin, J. G., Couston, R. G., van der Walle, C. F. (2013) Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int. J. Pharm.* **440**, 83–98.
- Gerlach, I., Bruning, S., Gustavsson, R., Mandenius, C. F., Hass, V. C. (2014) Operator training in recombinant protein production using a structured simulator model. *J. Biotechnol.* **177**, 53–59.
- Gernaey, K. V., Lantz, A. E., Tufvesson, P., Woodley, J. M., Sin, G. (2010) Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. *Trends Biotechnol.* **28**, 346-354.
- González-Figueroa, C., Flores-Estrella, R. A., Rojas-Rejón, O. A. (2018) Fermentation: Metabolism, kinetic models, and bioprocessing. U: Current topics in biochemical engineering, (Shiomi, N., ured.), IntechOpen.
- Grilo, A. L., Mantalaris, A. (2019) A predictive mathematical model of cell cycle, metabolism, and apoptosis of monoclonal antibody-producing GS-NS0 cells. *Biotechnol. J.* **14**, 1800573.

- Ho, Y., Varley, J., Mantalaris, A. (2006) Development and analysis of a mathematical model for antibody-producing GS-NS0 cells under normal and hyperosmotic culture conditions. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1560–1569.
- Ishizaki, A., Ohta, T. (1989) Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus* IO-1. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 46-51.
- Jackson, J. V., Edwards, V. H. (1975) Kinetics of substrate inhibition of exponential yeast growth. *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 943-964.
- Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Čurlin, M. (2015) Local sensitivity analysis and metabolic control analysis of the biological part of the BTEX bioremediation model. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **20**, 1071-1087.
- Jurinjak Tušek, A., Jurina, T., Čurlin, M. (2016) Global sensitivity analysis of the biological part of the integrated BTEX bioremediation model. *Environ. Eng. Sci.* **33**, 404-422.
- Kelley, B. (2007) Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnol. Prog.* **23**, 995-1008.
- Kent, E., Neumann, S., Kummer, U., Mendes, P. (2013) What can we learn from global sensitivity analysis of biochemical systems? *Plos One.* **8**, 1-13.
- Khoo, S. H., Falciani, F., Al-Rubeai, M. (2007) A genome-wide transcriptional analysis of producer and non-producer NS0 myeloma cell lines. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **47**, 85–95.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology.* **9**, 825-829.
- Kiparissides, A., Rodriguez-Fernandez, M., Kucherenko, S., Mantalaris, A., Pistikopoulos, E. (2008) Application of global sensitivity analysis to global biological models. *Comput. Aided Chem. Eng.* **25**, 689-694.

Köhler, G., Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**, 511-520.

Kontoravdi, C., Asprey, S. P., Pistikopoulos, E. N., Mantalaris, A. (2005) Application of global sensitivity analysis to determine goals for design of experiments: An example study on antibody-producing cell cultures. *Biotechnol. Prog.* **21**, 1128-1135.

Kontoravdi, C., Mantalaris, A., Pistikopoulos, E. N., Asprey, S. P., Katsika, A., Gavrielides, Y. (2004) Toward the optimisation of the production of monoclonal antibodies. IFAC Proceedings Volumes. IFAC International Symposium on Computer Applications in Biotechnology, Nancy, str. 213-218.

Koppe, M. J., Oyen, W. J., Bleichrodt, R. P., Hendriks, T., Verhofstad, A. A., Goldenberg, D. M., Boerman, O. C. (2006) Combination therapy using the cyclooxygenase-2 inhibitor Parecoxib and radioimmunotherapy in nude mice with small peritoneal metastases of colonic origin. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 47-55.

Kulov, N. N., Gordeev, L. S. (2014) Mathematical modeling in chemical engineering and biotechnology. *Theor. Found. Chem. Eng.* **48**, 225-229.

Lee, J. M., Gianchandani, E. P., Papin, J. A. (2006) Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Brief Bioinform.* **7**, 140-150.

Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., Yoshida, T. (1999) Enhanced monoclonal antibody production by gradual increase of osmotic pressure. *Cytotechnology.* **29**, 27-33.

Link, K. G., Stobb, M. T., Di Paola, J., Neeves, K. B., Fogelson, A. L., Sindi, S. S., Leiderman, K. (2018) A local and global sensitivity analysis of a mathematical model of coagulation and platelet deposition under flow. *Plos One.* **13**, 1-38.

López-Meza, J., Araíz-Hernández, D., Carrillo-Cocom, L. M., López-Pacheco, F., Rocha-Pizaña, M. R., Alvarez, M. M. (2016) Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology.* **68**, 1287-1300.

- Luong, J. H. T. (1987) Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 242-248.
- Maarleveld, T.R., Khandelwal, R.A., Oliver, B.G., Teusink, B., Bruggeman, F. J. (2013) Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. *Biotechnol. J.* **8**, 997-1008.
- Maarleveld, T. R., Wortel, M. T., Oliver, B. G., Teisunk, B., Bruggeman, F. J. (2015) Interplay between constraints, objectives, and optimality for genome-scale stoichiometric models. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004166.
- Mahadevan, R., Schilling, C. H. (2003) The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* **5**, 264–276.
- Matsuoka, Y., Funahashi, A., Ghosh, S., Kitano, H. (2014) Modeling and simulation using CellDesigner. *Method Mol. Cell Biol.* **1164**, 121–145.
- Mead, E. J., Chiverton, L. M., Spurgeon, S. K., Martin, E. B., Montague, G. A., Smales, C. M., von der Haar, T. (2012) Experimental and in silico modelling analyses of the gene expression pathway for recombinant antibody and by-product production in NS0 cell lines. *Plos One.* **7**, 47422.
- Moser, F. A. (1983) Formal macro-approach to bioprocess modeling with analogies. *Acta Biotechnol.* **3**, 195-216.
- Nelsen, J., Villadsen, J. (1992) Modeling of microbial kinetics. *Chem. Eng. Sci.* **47**, 4225-4270.
- Papin, J. A., Hunter, T., Palsson, B. O., Subramaniam, S. (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 99–111.
- Quiroga-Campano, A., Panoskaltis, N., Mantalaris, A. (2018) Energy-based culture medium design for biomanufacturing optimization: A case study in monoclonal antibody production by GS-NS0 cells. *Metab Eng.* **47**, 21-30.

- Saltelli, A., Tarantola, S., Campolongo, F. (2000) Sensitivity analysis as an ingredient of modelling. *Stat. Sci.* **15**, 377.
- Sanderson, C. S., Phillips, P. J., Barford, J. P. (1996) Structured modelling of animal cells. *Cytotechnology*. **21**, 149-153.
- Savinell, J. M., Palsson, B. O. (1992) Optimal selection of metabolic fluxes for in vivo measurement. I. Development of mathematical methods. *Theor Biol.* **155**, 201–214.
- Schilling, C. H., Letscher, D., Palsson, B. O. (2000) Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.* **203**, 229–248.
- Schuetz, R., Kuepfer, L., Sauer, U. (2007) Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 119-129.
- Sunley, K., Butler, M. (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol. Adv.* **28**, 385–394.
- Wildermuth, M. C. (2000) Metabolic control analysis: Biological applications and insights. *Gen. Biol.* **16**, 1031.1-1031.5.
- Wolfram, S. (2003) *The Mathematica Book*, 5. izd., Wolfram Media, Champaign.
- Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–1398.
- Xu, C., Gertner, G. (2011) Understanding and comparisons of different sampling approaches for the Fourier Amplitudes Sensitivity Test (FAST). *Comput. Stat. Data An.* **55**, 184-198.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*. **217**, 1214–1222.
- Zhang, F., Smith, L. P., Blinov, M. L., Faeder, J., Hlavacek, W. S., Juan Tapia, J., Keating, S. M., Rodriguez, N., Dräger, A., Harris, L. A., Finney, A., Hu, B., Hucka, M., Meier-Schellersheim, M.

(2020) Systems biology markup language (SBML) level 3 package: multistate, multicomponent and multicompartment species, version 1, release 2. *J. Integr. Bioinform.* **17**, 32628633.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

B. Herout

Brigita Herout