

Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretim süreci ve kalitesinin güvenlilik ve etkililik üzerine etkisi

The effect of manufacturing process and quality of biosimilar medicinal products on safety and efficacy

Devrim Demir Dora^{1,2}

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

² Gen ve Hücre Tedavisi Uygulama ve Araştırma Merkezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya, Türkiye

Öz

Biyolojik tıbbi ürünler, konvansiyonel tedavilere cevap vermeyen çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni tedavi seçenekleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyobenzer tıbbi ürünler, ruhsatlı bir biyolojik tıbbi ürüne (referans tıbbi ürün) yüksek düzeyde benzerlik gösteren ürünlerdir. Biyobenzer tıbbi ürünler, referans tıbbi ürünlere kalite özellikleri, biyolojik aktivite, güvenlilik ve etkililik açısından benzer olmalı ve benzerlik karşılaştırılabilirlik çalışmaları ile gösterilmelidir. Hedef Ürün Kalite Profili (HÜKP) ve molekül özellikleri referans tıbbi ürünle karşılaştırılabilir olmalıdır. Biyobenzer tıbbi ürünler referans tıbbi ürünler ile aynı gen dizisine sahip olmalarına rağmen; farklı klonlama vektörü, konakçı hücre, fermentasyon koşulları, kültür ortamı, saflaştırma işlemleri ve formülasyon nedeniyle üretim süreci sonunda farklı biyofiziksel özelliklere sahip biyobenzer ürün elde edilir. Üretim sürecinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek değişiklikler üründe farklılıklara neden olarak ürünün kalitesini, güvenliğini ve etkililiğini değiştirebilmektedir. Ürün ya da üretim işlemi kaynaklı safsızlıklar, translasyon sonrası modifikasyonlar, üretim, taşıma, saklama ve hasta kullanımı sırasında meydana gelebilecek stres koşulları, ürünün stabilitesini, biyoaktivitesini ve immünojenitesini değiştirebilir. Bu farklılıkların ürünün güvenlilik ve etkililiğini değiştirmediği prelinik ve klinik çalışmalarla gösterilmelidir.

Anahtar Sözcükler: Biyobenzer tıbbi ürün, üretim süreci, kalite, güvenlilik, etkililik.

Abstract

Biological medicinal products are emerging as new treatment options for the treatment of various diseases that do not respond to conventional treatments. Biosimilar medicinal products are biological medicinal products that are highly similar to an already authorized original biological medicinal products (reference medicinal product). Biosimilar medicinal products should be similar to reference medicinal products in terms of quality characteristics, biological activity, safety and efficacy and biosimilarity should be demonstrated by comparability studies. The quality target product profile (QTPP) and molecular properties should be comparable to the reference medicinal product. Although biosimilar medicinal products have the same gene sequence as reference medicinal products; due to the different cloning vector, host cell, fermentation conditions, purification processes and formulation, a biosimilar product with different biophysical properties is obtained at the end of the manufacturing process. Changes that may occur at any stage of the manufacturing process change the quality, safety and efficacy causing differences in the product. Product or process related impurities, post-translational modifications, stress conditions that may occur during production, handling, storage and patient use may alter the stability, bioactivity and immunogenicity of the product. It should be demonstrated by preclinical and clinical studies that these differences do not change the safety and efficacy of the product.

Keywords: Biosimilar medicinal product, manufacturing process, quality, safety, efficacy.

Sorumlu yazar: Devrim Demir Dora
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye
E-posta: devrimdemirdora@akdeniz.edu.tr

Giriş

Biyolojik tıbbi ürünler, konvansiyonel tedavilere cevap vermeyen çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni tedavi seçenekleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoteknolojik tıbbi ürünler, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak canlı sistemlerde üretilen makromoleküller olup; ulusal ve uluslararası kılavuzlarda biyolojik tıbbi ürün kapsamında değerlendirilir (1). Biyolojik tıbbi ürün; etkin madde veya maddeleri biyolojik bir kaynaktan üretilen ya da biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan, kalitesi, imalat süreci ve kontrolleri fizikokimyasal ve biyolojik testler ile birlikte gösterilen beşerî tıbbi üründür (2, 3). Biyoteknolojik ilaçların kendilerine özel üretim teknolojilerine sahip olmaları nedeniyle maliyetlerinin konvansiyonel ilaçlara göre oldukça yüksek olması, bu ilaçların tedavide yaygın olarak kullanılmasını engellemekte ve tedavide eşitsizliğe neden olmaktadır. Referans tıbbi ürün ile aynı kalite, güvenilirlik ve etkililik profiline sahip biyobenzer tıbbi ürünlerin geliştirilmesi ile sağlık sisteminin sürdürülebilirliğinin sağlanması, tedaviye erişimdeki eşitsizliklerin azaltılması ve hastaların ilaca daha düşük maliyetle erişimlerinin sağlanması hedeflenmiştir.

Biyobenzer tıbbi ürün, ruhsatlı bir biyolojik referans tıbbi ürüne yüksek düzeyde benzerlik gösteren üründür (3, 4). Biyobenzer tıbbi ürünlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri referans tıbbi ürüne benzer olmalıdır. Biyobenzer tıbbi ürünler referans tıbbi ürünler ile aynı gen dizisine sahiptir ve benzer teknoloji ile üretilir. Ancak klonlama vektörü, konakçı hücre, fermentasyon koşulları, saflaştırma işlemleri ve formülasyon farklılıkları nedeniyle üretim süreci sonunda farklı biyofiziksel özelliklere sahip biyobenzer ürün elde edilir (5, 6). Biyobenzer olarak geliştirilen tıbbi ürünün referans tıbbi ürün ile benzerliğinin gösterilmesi için kalite, klinik dışı ve klinik karşılaştırılabilirlik çalışmalarının yapılması gereklidir (6-8). Biyobenzer tıbbi ürün ile referans tıbbi ürün karşılaştırıldığında, klinik güvenilirlik ve etkililik profilleri arasında anlamlı fark yaratmayan minör farklılıklar bulunabilir. Biyobenzer tıbbi ürünlerdeki bu farklılıkların güvenilirlik ve etkililik profiline değiştirmedığı klinik çalışmalarla ispatlanmalıdır (7, 8).

Biyobenzer tıbbi ürünün geliştirmesi sürecinde Hedef Ürün Kalite Profili (HÜKP) belirlenmeli ve molekül özellikleri referans tıbbi ürünle karşılaştırılabilir olmalıdır. Biyobenzer tıbbi ürünün kalite özelliklerinin referans tıbbi ürünle

karşılaştırılabilir olduğunu göstermek için en gelişmiş teknolojik yöntemlerle kapsamlı karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır (3, 5, 6).

Biyobenzer Tıbbi Ürünlerin Üretim Süreci

Biyobenzer tıbbi ürünlerin etkin maddeleri, rekombinant DNA teknolojisi ile canlı hücrelerde fermentasyon yoluyla üretilen peptit/protein yapısında kompleks moleküllerdir. Canlı hücrelerde üretiliyor olmaları, yapılarının kompleks olması, pek çok transkripsiyon sonrası modifikasyon seçeneğinin bulunması, stabilite problemleri, üretim ve saflaştırma süreçlerinin karmaşık olması, karakterizasyonlarının zor olması, immünojenisitelerinin yüksek olması nedeniyle biyobenzer tıbbi ürünler, sentetik olarak üretilen küçük kimyasal ürünlerden farklı özellikler gösterir (9).

Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretim süreci bitmiş ürünün özelliklerine etki eden pek çok basamaktan oluşmaktadır ve üretim süreci ürünün kendisini oluşturur. Üretim kontrollü ve sınıflandırılmış alanlarda cGMP kuralları çerçevesinde gerçekleştirilir ve yukarı akış ve aşağı akış süreçlerini içerir (10). Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretim sürecindeki işlem basamakları Tablo-1'de görülmektedir.

- Hücre Bankalarının Oluşturulması

Üretim basamağından önce hücre hattının geliştirilmesi kritik bir basamaktır. Hücre bankalarının İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practice-GMP) sertifikaları bulunmalıdır. Farmasötik proteinlerin üretimi için kullanılacak hücre bankalarının karakterizasyonları çok iyi bir şekilde yapılmalı ve canlılık, tanıma, saflık, genetik stabilite, sterilite, mikoplazma, beklenmedik virüsler ve retrovirus açısından değerlendirilmiş olmalıdır (11). İstenilen özelliklerdeki hücrelerin taranması ve seçilmesinin ardından ana hücre bankası oluşturulur. Ana hücre bankalarından hareketle çalışma hücre bankaları hazırlanır ve dondurularak saklanır (12). Çalışma hücre bankasındaki hücreler hedef proteinin üretilmesi ve salgılanması için optimize edilmiş, tanımlanmış koşullarda çoğaltılır.

Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretiminde prokaryotik hücreler, mayalar, memeli hücreleri, böcek hücreleri, transgenik hayvanlar veya transgenik bitkiler konakçı hücre olarak seçilir (13-16). Konakçı hücrelerin özellikleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Konakçı hücre seçiminde ekspresyonu yapılması istenen proteinin özellikleri önem taşımaktadır. Sentezlenen her protein fonksiyonel değildir.

Tablo-1. Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretim sürecindeki işlem basamakları.

Üretim Süreci	İşlem Basamakları
Hücre bankalarının oluşturulması	<ul style="list-style-type: none">• İlgili gen ekspresyon vektörüne klonlanır.• İstenen proteini üretebilecek uygun bir konakçı hücre seçilir.• Ekspresyon vektörü seçilen hücreye aktarılır.• İstenen proteinin ekspresyonu için pozitif klon içeren hücre seçilerek çoğaltılır.• Ana hücre bankası ve çalışma hücre bankaları hazırlanır.
Yukarı Akış (Upstream)	<ul style="list-style-type: none">• Çalışma hücre bankasından hareketle ölçek büyütülerek biyoreaktörlerde üretim yapılır (inokulum çoğaltılması).• İstenen proteinin ekspresyonu için uygun fermentasyon koşulları belirlenir.• Fermentasyon sonrası filtrasyonla ürün toplanır (Hasat işlemi).
Aşağı Akış (Downstream)	<ul style="list-style-type: none">• Afinite Kromatografisi (Protein A Kromatografisi)• Düşük pH'da viral inaktivasyon• Katyon Değişim Kromatografisi• Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi• Virüs filtrasyonu• Ultrafiltrasyon / Diyafiltrasyon• Membran filtrasyon• Dolum
Etkin madde eldesi	<ul style="list-style-type: none">• Bulk etkin maddenin elde edilmesi• Stabilite, karakterizasyon ve karşılaştırılabilirlik çalışmaları
Formülasyon	<ul style="list-style-type: none">• Formülasyon yardımcı maddelerinin eklenmesi• Liyofilizasyon (gerekliyse)
Bitmiş ürün eldesi	<ul style="list-style-type: none">• Primer ambalaj materyaline dolum• Stabilite, karakterizasyon ve karşılaştırılabilirlik çalışmaları

Proteinin biyolojik aktivitesi için translasyon sonrası modifikasyon gerekliyse, ökaryotik hücreler seçilmelidir (17). Translasyon sonrası modifikasyonların çeşidi ve sıklığı proteinden proteine farklılık göstermektedir (18). En sık görülen modifikasyon glikozilasyondur ve proteinlerin doğru katlanması, biyolojik aktivitesi, stabilitesi, hedeflenmesi, hücre içi trafiğinin sağlanması, ligand tanınması ve bağlanması, yarılanma ömrünün düzenlenmesi ve immünojenisitesi üzerine etkileri bulunmaktadır (19).

- Yukarı Akış (Upstream) Süreci

Yukarı akış, hücrelerin üretim biyoreaktörü için hazırlanması amacıyla inokulum çoğaltma aşaması ile başlayan süreçtir. Biyoreaktörler ile hücrelerin çoğaltılması, büyümesi ve üretim verimini doğrudan etkileyen pH, ozmotik basınç,

oksijen, substrat, sıcaklık, karıştırma hızı gibi parametreler ayarlanarak; optimum verimde doğru ürün elde edilmesi sağlanır (20). Sonraki üretim basamağında ölçek büyütülerek üretim yapılır ve hasat edilir. Hasat sonrası aşağı akış işlemlerine geçilerek üretimi yapılan protein ortamdan saflaştırılır (21). Donmuş hücre bankalarından ölçek büyütme çok basamaklı ve kritik bir işlemdir. Ölçek büyütme sırasında meydana gelen en ufak değişiklikler, üretim ortamına tanımlanmamış farklı safsızlıkların gelmesine ve ürün varyasyonlarına neden olur (22). Ortamda farklı safsızlıkların bulunması immünojenisiteyi artırır.

- Aşağı Akış (Downstream) Süreci

Aşağı akış, istenilen ürünün amaçlanan kullanıma uygun hale gelmesi için yapılan ayırma ve saflaştırma işlemlerini içeren süreçtir (21).

Safılaştırma basamağı üretimin kritik bir basamağıdır. Safılaştırma işlemleri ile konakçı hücre proteinleri, DNA, ortam bileşenleri, virüsler ve metabolik yan ürünler uzaklaştırılır (23,24). Biyobenzer ürünlerde hücre bankası sistemindeki ve üretim işlemleri sırasındaki farklılıklar nedeniyle referans üründen farklı safsızlıklar gözlenir.

Yukarı akış işlemlerinden (besiyeri ortam bileşenleri, hücre artıkları, konakçı hücre proteinleri, konakçı hücre DNA'sı, vb) ve aşağı akış işlemlerinden (tampon, reçine, vb) gelen ürün ya da işlem kaynaklı safsızlıklar ürünün biyoaktivitesini ve immünojenitesini değiştirebilir (6). Üretimin son basamağında hedef protein yapısal bütünlük ve potens açısından analiz edilir. Bulk etkin madde üzerinde karakterizasyon, karşılaştırılabilirlik ve stabilite çalışmaları yapılır. Formülasyon sonrası ambalajlanır.

- Formülasyon

Biyoteknolojik tıbbi ürünler peptit/protein yapısında ürünlerdir. Protein için uygun formülasyon geliştirme kritik bir basamaktır. Işık, oksidasyon, iyonik bileşenler, sıcaklık değişimi, mekanik karıştırma gibi zayıf non-kovalent etkileşimleri bozan herhangi bir etki biyoaktivitenin kaybına neden olur (25,26). Formülasyon bileşenlerinin ve yönteminin ürünün stabilitesi ve terapötik etkinliği üzerine etkisi bulunmaktadır (27, 28). Formülasyonun uygunluğu, stabilitesi, geçimliliği (yardımcı maddelerle, seyrelticiyle ve ambalaj materyalleriyle), etkin maddenin bütünlüğü, etkililiği ve potensi gösterilmelidir. Formülasyonun referans tıbbi ürünle özdeş olması zorunlu değildir (2, 3).

- Stabilite

Biyoteknolojik tıbbi ürünlerin üretim sürecinin son basamağı ürünün saklanmasıdır. Etkin madde ve bitmiş ürünün raf ömrü boyunca uygun saklama koşullarında saklama kabındaki stabilitesi değerlendirilmelidir. Biyofarmasötikler 2-8°C'de saklanmalıdır. Sıcaklık, pH, ekspananlar, karıştırma/çalkalama, hava ve ışıkla temas, nem, kap kapak sistemi, saklama koşulları protein yapısındaki ürünün stabilitesini değiştiren faktörlerdir (26, 29, 30). Ürünün primer ambalaj materyali ve kap kapak sistemiyle etkileşimi, infüzyon setleri ile geçimsizliği değerlendirilmeli, ekstrakte edilebilen ve sızabilen maddelerin tayini yapılmalıdır. Bu faktörler ürünün biyoaktivitesini ve immünojenitesini etkilemektedir (31-33).

Biyobenzer tıbbi ürünler hastaya seyreltilerek uygulanacak ise, KÜB'de belirtilen geçimsizlik bilgileri dikkate alınmalı; ilaç ile geçimli olmayan seyreltici, infüzyon torbası ve seti kullanılmamalı ve kesinlikle çalkalanmamalıdır. Farklı üreticiler tarafından üretilmiş biyobenzer ve referans tıbbi ürünler birbiri ile karıştırılmamalıdır. Hasta kullanımı sırasında meydana gelebilecek yanlış taşıma ve saklama gibi ürünün stabilitesini etkileyebilecek stres koşulları ürünün biyolojik aktivitesini ve immünojenitesini değiştirebilir. Stabilitesini kaybeden ilacın görünüşünde değişiklikler, biyoaktivite kaybı, biyoyararlanımında farklılıklar, hastada immün reaksiyonlar ve advers etkiler görülebilir (34, 35) .

- Karakterizasyon Çalışmaları

Biyobenzer tıbbi ürünlerin karakterizasyonu etkin madde ve bitmiş ürün düzeyinde yapılmalıdır. Biyobenzer tıbbi ürünlerin karakterizasyon çalışmalarında, ürünün fizikokimyasal özellikleri, biyolojik aktivitesi ve immünokimyasal özellikleri tayin edilmeli, saflığı, safsızlıklar ve kontaminantlar belirlenmeli ve miktar tayini yapılmalıdır (6).

Etkin maddenin bileşimi, fiziksel ve kimyasal özellikleri, büyüklük, yük, hidrofobite, birincil ve kompleks yapıları tayin edilmelidir (36-38). Ürün ya da üretim işlemi kaynaklı safsızlıklar ve transasyon sonrası modifikasyonlar ürünün immünokimyasal özelliğini etkiler. Proteinlerin kompleks yapılarından dolayı, karakterizasyon çalışmalarında birden fazla analitik yöntem kullanılması önerilir. Analitik yöntemlerin validasyonları yapılmalı, yöntem standardizasyonu için farmakope standartları kullanılmalıdır. Kantitatif veriler için istatistiksel analiz yapılmalıdır (6, 39, 40).

- Karşılaştırılabilirlik Çalışmaları

Biyobenzer tıbbi ürünlerin geliştirilmesi sürecinde referans tıbbi ürün ile kalite, klinik dışı ve klinik karşılaştırılabilirlik çalışmaları yapılmalıdır. Biyobenzer tıbbi ürünün; kalite açısından karşılaştırılabilirliğinin gösterileceği çalışmalar, ürünün tüm geliştirme süreci boyunca ve ticari seriler üzerinde yapılmalıdır. Eğer referans tıbbi üründen farklı bir formülasyon ve/veya kap/kapak sistemi seçildiyse (ürünle temas eden herhangi bir materyal varsa) bunun biyobenzer tıbbi ürünün etkililiği ve güvenliliği üzerinde etkisi olmadığı doğrulanmalıdır (3,6-9).

Her biyobenzer tıbbi ürünün gelişim süreci o ürüne özeldir. Ürün geliştirme sırasında, üretim

sürecinde değişiklikler yapıldığı zaman (etkin madde ve/veya bitmiş ürün) karşılaştırılabilirlik çalışması yapılmalıdır ve bu çalışmalar biyobenzer karşılaştırılabilirlik çalışmasından ayrı tutulmalıdır (41).

Sonuç

Rekombinant protein üretimi sırasında üretimde kullanılan hücre hattı, üretim koşulları (sıcaklık, büyüme oranı, besi yeri bileşenleri) ve saflaştırma işlemi gibi üretime ait faktörler proteinin konformasyonel yapısını, translasyon sonrası modifikasyonlarını, safsızlık seviyesini ve

çözünürlüğünü değiştirir. Biyobenzer tıbbi ürünlerin üretim sürecindeki değişkenler elde edilen biyoteknolojik tıbbi ürünün kalitesini, güvenilirliğini ve etkililiğini belirlemektedir. Ürün ya da üretim işlemi kaynaklı safsızlıklar ve translasyon sonrası modifikasyonlar ürünün immünokimyasal özelliğini etkiler. Üretim sürecinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek değişiklikler üründe farklılıklara neden olur. Bu farklılıkların ürünün güvenilirlik ve etkililiğini değiştirmedeği prelinik ve klinik çalışmalarla gösterilmelidir.

Kaynaklar

1. Demir-Dora D. Biyofarmasötik Ürünlerin Geliştirilmesinde Biyobelirteçler. Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics 2017; 5 (2):75-83.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Biyobenzer Tıbbi Ürünlere İlişkin Kılavuz. 07.08 2008.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Biyobenzer Tıbbi Ürünler Hakkında Kılavuz Taslağı. 30.05.2017, <https://www.titck.gov.tr/mevzuat/biyobenzer-tibbi-urunler-hakinda-kilavuzu-taslagi-27122018173016> (Erişim: 20.11.2019)
4. European Medicines Agency and the European Commission. Biosimilars in the EU-Information guide for healthcare professionals. 29.10.2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_en.pdf (Erişim: 20.11.2019)
5. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1), 23 October 2014.
6. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BWP/247713/2012 Rev1), 22 May 2014.
7. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BWP/42832/2005 Rev1), 18 December 2014.
8. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product, Guidance for Industry. April 2015.
9. Özdem S, Çiçin İ, Demir-Dora D, Korucu-Nazlı C. Sorularla Biyoteknolojik ve Biyobenzer İlaçlar. Ed: İrfan Çiçin, Güneş Tıp Kitapevleri 2017. ISBN: 978-975-277-697-5.
10. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Beşeri ve Tıbbi Ürünler İmalathaneleri İyi İmalat Uygulamaları (GMP) Kılavuzu, 05.05.2016.
11. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q5D: Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/294/95). 1998.
12. European Pharmacopoeia 8.0, 5.14. Gene transfer medicinal products for human use, 705-716.
13. Werner RG, Noe W, Kopp K, Schultze M. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. Drug Res 1998; 48: 870-880.
14. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng Bugs 2010; 1: 116-131.
15. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol 2004; 22: 1393-1398.
16. Larrick JW, Thomas DW. Producing proteins in transgenic plant and animals. Curr Opin Biotechnol 2001; 12: 411-418.

17. Winder R. Biomanufacturing, Cell culture changes gear. *Chem Ind* 2005; 20: 18–20.
18. Walsh G. Post-translational modification of protein pharmaceuticals. *Drug Discov Today* 2010;15(17-18):773-780.
19. Walsh G, Jefferies R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1241–1252.
20. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of Fermentation Technology*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Elsevier Science Oxford, 2003: 167-214.
21. Kontoravdi C, Samsatli NJ, Shah N. Development and design of bio-pharmaceutical processes. *Curr Opin Chem Eng* 2013; 2: 435–441.
22. Gronemeyer P, Ditz R and Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing, *Bioengineering* 2014; 1 (4), 188- 212.
23. Cramer SM, Holstein MA. Downstream bioprocessing: recent advances and future promise. *Curr Opin Chem Eng* 2011; 1: 27–37.
24. Hanke AT, Ottens M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Trends Biotechnol* 2014; 32 (4):210-220.
25. Tamizi E, Jouyban A, Forced degradation studies of biopharmaceuticals: selection of stress conditions, *Eur J Pharm Biopharm* 2016; 98: 26–46.
26. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 2010; 27 (4): 544–75.
27. Samir Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Rev. Drug Discov* 2004; 13: 655–672.
28. Arsiccio A, Paladini A, Pattarino F, Pisano R. Designing the Optimal Formulation for Biopharmaceuticals: A New Approach Combining Molecular Dynamics and Experiments. *J Pharm Sci* 2019; 108: 431-438.
29. Sharma B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: impact of container closures. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 318-24.
30. Wang W, Singh SK., Li N, Toler ML, King KR, Nema S. Immunogenicity of protein aggregates-concern and realities. *Int J Pharm* 2012; 431:1-11.
31. Kessler M, Goldsmith D, Schellekens H. Immunogenicity of biotherapeutics. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 9-12.
32. Barbosa M. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. *Drug Discov Today* 2011; 16: 7-8.
33. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006), 13 December 2007.
34. Ebberts HC, Crow SA, Vulvo AG, Schellekens H. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 1186-1190.
35. Korucu FC, Nazlı H, Gedik G, Çiçin İ. Biyobenzer ürünlerde klinik uygulamada karşılaşılabilecek sorunlar. *Marmara Pharm J* 2016; 20: 44-51.
36. Parr MK, Montacira O, Montacir H. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 130: 366–389.
37. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1383–1391.
38. Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Antwerpen PV, Delporte C. Glycan characterization of biopharmaceuticals. *Updates and Perspectives Anal Chim Acta* 2016; 921: 13-27.
39. Büyükköroğlu G, Demir-Dora D, Özdemir F, Hızal C. Techniques for Protein Analysis. In: Debmalya Barh, Vasco Azevedo (eds). *Omics Technologies and Bio-engineering Volume 1: Towards Improving Quality of Life*, Elsevier Inc, Chennai: Academic Press, pp.317-352, 2017.
40. Shintani H. Development of Test Method for Pharmaceutical and BioPharmaceutical Products. *Pharm Anal Acta* 2013; 4:258.
41. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process: comparability of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/5721/03), 01 June 2005.