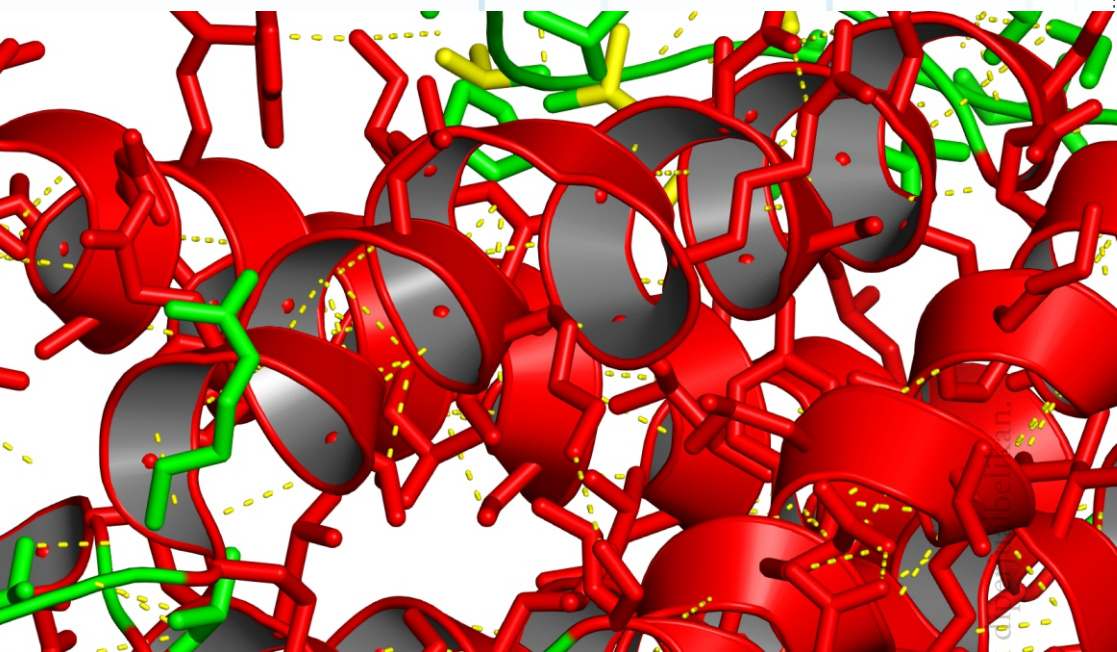




# PENGEMBANGAN OBAT BIOLOGI :

BIOTEKNOLOGI, BIOSIMILAR, DAN *REVERSE ENGINEERING*



Editor :  
Adi Santoso dan Puspita Lisdiyanti



# PENGEMBANGAN OBAT BIOLOGI :

BIOTEKNOLOGI, BIOSIMILAR DAN REVERSE ENGINEERING



Buku ini tidak diperjualbelikan.

Dilarang mereproduksi atau memperbanyak seluruh atau sebagian dari buku ini dalam bentuk atau cara apa pun tanpa izin tertulis dari penerbit.

© Hak cipta dilindungi oleh Undang-Undang No. 28 Tahun 2014

*All Rights Reserved*

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# PENGEMBANGAN OBAT BIOLOGI :

BIOTEKNOLOGI, BIOSIMILAR DAN REVERSE ENGINEERING

**Editor :**

Adi Santoso dan Puspita Lisdiyanti



LIPI Press

Buku ini tidak diperjualbelikan.



© 2021 Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)  
Pusat Riset Bioteknologi

Katalog dalam Terbitan (KDT)

Pengembangan Obat Biologi Bioteknologi, Biosimilar, dan Reverse Engineering/Adi Santoso dan Puspita Lisdiyanti (Ed.)–Jakarta: LIPI Press, 2021.

xxviii + 374 hlm.; 17,6 x 25 cm

ISBN 978-602-496-265-4 (cetak)  
978-602-496-266-1 (e-book)




1. Pengembangan Obat Biologi
2. Biosimilar
3. Reserve Engineering

660.6

*Copy editor* : Risma Wahyu H. & Tantrina Dwi Aprianita  
*Proofreader* : Nikita Daning Pratami & Anggy Denok Sukmawati  
*Penata isi* : Landi A. Handwiko & Meita Safitri  
*Desainer sampul* : Meita Safitri

Cetakan Pertama : Desember 2021



Diterbitkan oleh:  
LIPI Press, anggota Ikapi  
Gedung PDDI LIPI, Lantai 6  
Jln. Jend. Gatot Subroto 10, Jakarta 12710  
Telp.: (021) 573 3465  
*e-mail*: [press@mail.lipi.go.id](mailto:press@mail.lipi.go.id)  
*website*: [lipipress.lipi.go.id](http://lipipress.lipi.go.id)  
 LIPI Press  
 @lipi\_press  
 lipi.press

Buku ini merupakan karya buku yang terpilih dalam Program Akuisisi Pengetahuan Lokal Tahun 2021 Balai Media dan Reproduksi (LIPI Press), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.



Karya ini dilisensikan di bawah Lisensi Internasional Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Daftar Isi

Daftar Gambar.....	vii
Daftar Tabel .....	xiii
Pengantar Penerbit.....	xvii
Kata Pengantar .....	xix
Prakata .....	xxiii
<b>BAB I</b> <b>Bioteknologi dan Biosimilar: Perkembangan Obat Berbasis Protein Terapeutik</b>	
<i>Adi Santoso</i> .....	1
<b>BAB II</b> <b>Regulasi Obat Biosimilar</b>	
<i>Eko Wahyu Putro dan Gita Syahputra</i> .....	21
<b>BAB III</b> <b>Eritropoietin dan Obat Biosimilar: Sejarah Kesuksesan Terapi Anemia, Kemajuan yang Telah Dicapai, dan Tantangan</b>	
<i>Adi Santoso, Yana Rubiyana, Arizah Kusumawati, Popi Hadi Wisnuwardhani, dan Endah Puji Septisetyani</i> .....	67
<b>BAB IV</b> <b>Strategi Produksi Human Insulin Menggunakan Khamir Metilotropik <i>Pichia pastoris</i></b>	
<i>Dini Nurdiani, Neng Herawati, dan Wien Kusharyoto</i> .....	95
<b>BAB V</b> <b>Interferon Alfa-2a: Protein Terapeutik untuk Penanganan Hepatitis dan Kankers</b>	
<i>Ratih Asmana Ningrum, Apon Zaenal Mustopa, dan Andri Wardiana</i> .....	129

<b>BAB VI</b>	<b>Tiga Dekade Human G-CSF dalam Dunia Medis: Perkembangan dan Manfaat</b>	
	<i>Asrul Muhamad Fuad</i> .....	161
<b>BAB VII</b>	<b>Strategi Peningkatan Aktivitas Protein Terapeutik Melalui Modifikasi Protein</b>	
	<i>Kartika Sari Dewi, Yuliawati, dan Dian Fitria Agustiyanti</i> .....	209
<b>BAB VIII</b>	<b>Formulasi Protein Terapeutik Rekombinan</b>	
	<i>Riyona Desvy Pratiwi, Hariyatun, dan Ratih Asmana Ningrum</i> .....	253
<b>BAB IX</b>	<b>Bioproses dan Uji komparasi Produk Obat Biosimilar</b>	
	<i>Andri Wardiana, Ratih Asmana Ningrum, dan Eko Wahyu Putro</i> .....	291
<b>BAB X</b>	<b>Refleksi terhadap Kemajuan, Peluang, dan Tantangan Biosimilar ke Depan</b>	
	<i>Adi Santoso dan Puspita Lisdiyanti</i> .....	325
	<b>Daftar Istilah</b> .....	345
	<b>Daftar Singkatan</b> .....	353
	<b>Indeks</b> .....	357
	<b>Biografi Penulis</b> .....	365



## Daftar Gambar

Gambar 1.1	Nukleus, kromosom, dan struktur DNA menjadi tonggak sejarah bioteknologi modern. ....	4
Gambar 1.2	Proses Pembuatan Obat Biologi.....	8
Gambar 1.3	Perbedaan Pengembangan Produk Obat Biosimilar dan Produk Originator .....	14
Gambar 1.4	Penyerahan <i>Research Cell Bank</i> (RCB) dari Pihak LIPI ke Pihak PT Bio Farma (persero).....	16
Gambar 2.1	Beberapa produk obat biologi yang akan habis masa patennya sebelum tahun 2024 di Uni Eropa dan Amerika Serikat. ....	22
Gambar 2.2	Proses persetujuan obat biosimilar menurut EMA, FDA, dan WHO.....	26
Gambar 2.3	Pengembangan obat biosimilar secara bertahap dengan bukti kemiripan dari hasil evaluasi pada suatu tahapan menjadi dasar untuk merancang evaluasi tahapan selanjutnya.....	29
Gambar 2.4	Negara-negara di dunia yang memiliki regulasi obat biosimilar dan tahun penerbitan regulasi di masing-masing negara.....	35
Gambar 2.5	Sistematika Pedoman Umum Penilaian Produk Biosimilar di Indonesia.....	50
Gambar 2.6	Prinsip Evaluasi Mutu Obat Biosimilar dalam Regulasi BPOM .....	51

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Gambar 2.7	Kendala dan solusi transfer teknologi untuk produksi obat biosimilar di Indonesia. ....	57
Gambar 3.1	Pengaturan dan Stimulasi Pembentukan Sel Darah Merah oleh EPO .....	68
Gambar 3.2	Ilustrasi perbedaan jumlah sel yang memproduksi EPO pada kondisi normoksia dan hipoksia. ....	69
Gambar 3.3	Skema Struktur Molekul EPO dengan Pola Glikosilasi 3 N-link dan 1 O-link .....	73
Gambar 3.4	Proses pengembangan sel mamalia untuk pembuatan protein rekombinan. ....	78
Gambar 3.5	Struktur molekul Epogen dan Aranesp yang masing-masing memiliki gugus 3 dan 5 N-link. ....	79
Gambar 3.6	Analisis <i>Western Blot</i> dan <i>Gel Shift</i> .....	80
Gambar 3.7	Benih tanaman barley yang telah bergerminasi selama 5 hari siap untuk diinfeksi dengan virus BSMV. ....	82
Gambar 3.8	Perbedaan antara tanaman yang tidak terinfeksi (sebelah kiri) dan yang telah terinfeksi (sebelah kanan). ....	82
Gambar 3.9	Analisis <i>Western blot</i> menggunakan antibodi human EPO. ....	83
Gambar 3.10	Hasil Analisis <i>Western Blot</i> Protein Rekombinan Human <i>Erythropoietin</i> (rhEPO). ....	85
Gambar 4.1	Proses modifikasi pasca-translasi dari preproinsulin menjadi insulin aktif. ....	98
Gambar 4.2	Sekuen HI .....	98
Gambar 4.3	Sekuen HI dan analog-analognya yang telah diizinkan untuk digunakan dalam pengobatan diabetes. ....	101
Gambar 4.4	Persentase Produk Biofarmasi yang Diproduksi pada Berbagai Sistem Ekspresi .....	104
Gambar 4.5	A. Skema konstruk dari kaset ekspresi untuk sekresi prekursor insulin oleh <i>P. pastoris</i> untuk produksi human insulin; B. Hasil SDS-PAGE prekursor HI rekombinan. ....	113
Gambar 4.6	Skema fermentasi <i>fed-batch</i> untuk produksi prekursor insulin oleh <i>P. pastoris</i> . ....	116

Gambar 5.1	Struktur Tiga Dimensi IFN $\alpha$ -2a.....	131
Gambar 5.2	Mekanisme Kerja Interferon .....	132
Gambar 5.3	Aktivasi Jalur Transduksi Sinyal JAK-STAT.....	133
Gambar 5.4	Struktur Kimia Pegasys yang Mengandung Dua Senyawa PEG Berkurang 20 kDa .....	141
Gambar 5.5	Urutan Asam Amino Penyandi Interferon Alfa-2 .....	143
Gambar 5.6	Hasil Konstruksi Kerangka Baca Terbuka Penyandi Protein (A) Fusi dan (B) Nonfusi.....	149
Gambar 5.7	Analisis Ekspresi KBT dengan Metode Dot Blot .....	150
Gambar 5.8	Karakterisasi Bobot Molekul dan Identitas dengan Metode Western Blot.....	151
Gambar 5.9	Hasil Purifikasi Protein Nonfusi dan Fusi .....	152
Gambar 5.10	Hasil penentuan urutan asam amino protein fusi (A) dan nonfusi (B). Fragmen merah menunjukkan fragmen yang terkarakterisasi .....	153
Gambar 5.11	Hasil uji aktivitas antiproliferasi protein fusi dan nonfusi pada lini sel kanker payudara MCF-7. ....	154
Gambar 6.1	Diagram Pita dari Struktur Protein hG-CSF .....	167
Gambar 6.2	Diagram skematis proses hematopoiesis dari multipotential HSC menjadi tipe sel yang sepenuhnya terdiferensiasi. ....	170
Gambar 6.3	Tahapan granulopoiesis dari myeloblast menjadi mature granulocyte. ....	171
Gambar 6.4	Urutan nukleotida (parsial) dari gen sintetik <i>CSF3syn</i> dengan kodon <i>P. pastoris</i> ( <i>CSF3_yeast</i> ) dan kodon <i>E. coli</i> ( <i>CSF3_Ecoli</i> ) yang telah didesain dibandingkan gen natural <i>CSF3</i> manusia ( <i>CSF3_human</i> ). ....	181
Gambar 6.5	Sintesis Gen <i>CSF3</i> Sintetik ( <i>CSF3syn</i> ) dengan Metode TBIO .....	182
Gambar 6.6	Analisis DNA dari produk PCR pada proses konstruksi gen <i>CSF3 sintetik</i> ( <i>CSF3syn</i> ) menggunakan metode TBIO. ....	184
Gambar 6.7	Beberapa Konstruksi Plasmid Ekspresi Gen <i>CSF3syn</i> Penyandi hG-CSF Rekombinan untuk Ekspresi pada Sel Inang <i>P. pastoris</i> (pPICZa) maupun sel <i>E. coli</i> (pET21) dengan atau tanpa Protein-tag .....	185

Gambar 6.8	Analisis DNA Sisipan pada Plasmid Rekombinan pPICZa-CSF3syn dengan Metode PCR .....	186
Gambar 6.9	Beberapa klon transforman <i>P. pastoris</i> (A) dan <i>E. coli</i> (B) membawa gen penyandi hG-CSF rekombinan. ....	186
Gambar 6.10	Analisis SDS-PAGE dari hG-CSF rekombinan yang dihasilkan oleh <i>P. pastoris</i> (A) dan <i>E. coli</i> (B). ....	187
Gambar 6.11	Analisis protein met-hGCSF rekombinan dengan metode SDS-PAGE (A) dan <i>western blot</i> (B) dengan pembandingan produk referensi filgrastim (Neupogen). ....	188
Gambar 6.12	Protein (met)-hG-CSF rekombinan asal <i>E. coli</i> hasil purifikasi. ....	189
Gambar 6.13	Preparasi Larutan hG-CSF Rekombinan dalam Larutan 5% (b/v) Dekstrosa. ....	190
Gambar 6.14	Profil neutrofil (A), leukosit (B), limfosit (C), eritrosit (D), & trombosit (E) sebelum induksi (cyclophosphamide) dan setelah perlakuan dengan hG-CSF. ....	192
Gambar 6.15	Tampilan mikroskopik sediaan apus darah dengan pengecatan Giemsa, dengan mikroskop cahaya perbesaran 100x. ....	193
Gambar 6.16	Beberapa foto dokumentasi kegiatan pengujian bioaktivitas secara <i>in vivo</i> di Rumah Sakit Hewan Pendidikan, IPB Bogor. ....	194
Gambar 7.1	Teknik Modifikasi Protein Terapeutik .....	210
Gambar 7.2	Fleksibilitas Desain Fusi Albumin .....	213
Gambar 7.3	Struktur teoretis dari protein albumin yang difusikan secara genetik pada C-terminal IFN $\alpha$ 2a. ....	216
Gambar 7.4	Struktur <i>Etanercept</i> .....	218
Gambar 7.5	Analogi interaksi antara fusi antibodi (scFv::HPR) dan antigen (EGFR::BFP) dengan analisis <i>slot blot</i> (A) dan mikroskop fluoresen (B). ....	223
Gambar 7.6	Dasar Pemikiran Pegilasi Protein.....	226
Gambar 7.7	Tahapan Pegilasi Protein.....	226

Gambar 7.8	Strategi Pegilasi Protein .....	228
Gambar 7.9	Perbedaan susunan asam amino terglisosilasi pada epoetin dan darbepoetin alfa.....	243
Gambar 8.1	Struktur alfa heliks dari protein yang terbentuk dari interaksi gugus amida dan karboksil yang berdekatan dari tiap empat asam amino.....	256
Gambar 8.2	Struktur Beta <i>Sheet</i> dari Protein: Antiparalel dan Paralel .....	257
Gambar 8.3	Struktur Tersier dan Kuartener dari Protein .....	257
Gambar 8.4	Faktor-Faktor yang Memengaruhi Rancangan Formulasi Protein Terapeutik Rekombinan .....	259
Gambar 8.5	<i>Advanced Dosage Form</i> : Jenis-Jenis Partikel Pembawa Protein.....	266
Gambar 8.6	Penghantaran obat pelepasan berkelanjutan dapat meningkatkan efikasi dan mengurangi efek samping..	270
Gambar 8.7	Cara Mengakses Sistem Saraf Pusat untuk Penghantaran Terapeutik.....	272
Gambar 8.8	Struktur Mikrosfer PLGA Berlubang dan Mekanisme Pelepasan Protein Terapeutik (kiri), serta Kepadatan dan Pelepasan Protein Terapeutik dari Mikrosfer Responsif pH (kanan) .....	275
Gambar 8.9	Mekanisme Transpor Obat Melintasi Epitel Mukosa yang Potensial.....	277
Gambar 9.1	Proses Pengembangan Produk Biosimilar .....	292
Gambar 9.2	Proses Hulu dan Hilir Produk Biosimilar .....	293
Gambar 9.3	<i>Quality by Design</i> (QbD) untuk Produksi Obat Bioterapeutik.....	293
Gambar 9.4	Persentase sistem ekspresi .....	295
Gambar 9.5	Jenis-Jenis Bioreaktor .....	302
Gambar 9.6	Produksi Obat Biosimilar Skala Pilot.....	307
Gambar 9.7	Contoh Proses Pemurnian untuk Produk Antibodi Monoklonal .....	308
Gambar 9.8	Kombinasi metode <i>Isoelectro focusing</i> (IEF) Gel dan Western blots untuk deteksi isoform. ....	311



Gambar 9.9	Tumpang tindih kromatogram KCKT (RP-HPLC) produk obat biosimilar GCSF dengan originatornya (filgastrim) menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi. ....	312
Gambar 9.10	Spektrum 1D- <sup>1</sup> H-c-NMR dari produk obat biosimilar GCSF dibandingkan originatornya (filgastrim).....	314
Gambar 9.11	DSC termogram menunjukkan kesamaan tiga temperatur transisi endotermal pada suhu 68°C, 73°C, dan 83°C untuk produk obat biosimilar antibodi monoklonal Remsima (CT-P13) dibandingkan produk originatornya (Remicade).....	315
Gambar 9.12	Sensogram SPR produk biosimilar GCSF (Zarxio) dengan originatornya (Neupogen) memiliki pola dengan tingkat kemiripan yang tinggi.....	316
Gambar 10.1	Setiap <i>batch</i> dapat menghasilkan produk yang berbeda. ....	336
Gambar 10.2	Regulasi dalam Pengembangan Obat Biosimilar .....	337
Gambar 10.3	Perkiraan dan Perbandingan Waktu serta Biaya pada Pengembangan Produk Originator dan Biosimilar.....	339



## Daftar Tabel

Tabel 1.1	Perbandingan obat yang mempunyai molekul kecil dan molekul besar dilihat dari berat molekul. ....	5
Tabel 1.2	Perbedaan karakter antara obat molekul kecil dan besar. ....	6
Tabel 1.3	Beberapa terminologi dan definisi obat biosimilar yang digunakan oleh beberapa negara dan organisasi. ....	10
Tabel 1.4	Peningkatan Nilai Penjualan Produk Obat Biosimilar Dunia Tahun 2008–2015 .....	15
Tabel 2.1	Panduan-panduan terkait biosimilar yang diberlakukan oleh EMA. ....	28
Tabel 2.2	Panduan-panduan terkait biosimilar yang diberlakukan oleh FDA. ....	28
Tabel 2.3	Obat Biosimilar yang Mendapatkan Lisensi oleh EMA Hingga Tahun 2017 .....	30
Tabel 2.4	Obat Biosimilar yang Mendapatkan Lisensi oleh USFDA Hingga Tahun 2017 .....	32
Tabel 2.5	Parameter mutu dalam evaluasi obat biosimilar sesuai regulasi dari EMA, WHO, dan FDA.....	37
Tabel 2.6	Parameter nonklinis dalam evaluasi obat biosimilar sesuai dengan regulasi dari EMA, WHO, dan FDA. ....	39
Tabel 2.7	Parameter klinis dalam evaluasi obat biosimilar sesuai regulasi dari EMA, WHO, dan FDA.....	41

Tabel 2.8	Parameter-parameter yang diperlukan untuk evaluasi obat biosimilar berdasarkan regulasi spesifik dari EMA.....	48
Tabel 2.9	Prinsip Evaluasi Klinis Obat Biosimilar dalam Regulasi BPOM .....	53
Tabel 3.1	Erythropoietin dalam Perspektif Sejarah .....	71
Tabel 3.2	Sejarah Perkembangan Sel CHO .....	76
Tabel 3.3	Contoh Beberapa Produk Obat Biologi yang Diproduksi pada Sel CHO .....	77
Tabel 3.4	Ringkasan Berbagai Jenis Produk Obat Berbasis EPO.....	87
Tabel 4.1	HI Rekombinan/Hasil Rekayasa dan Analog-Analognya yang telah Dipasarkan .....	99
Tabel 4.2	Biosimilar Insulin yang Tersedia atau dalam Pengembangan di Beberapa Negara.....	102
Tabel 4.3	Daftar HI rekombinan yang disetujui untuk digunakan pada manusia.....	106
Tabel 4.4	HI Komersial yang Diproduksi di Khamir .....	107
Tabel 4.5.	Pemurnian Prekursor Insulin dari Medium Kultur .....	118
Tabel 5.1	Dosis dan Pemberian IFN $\alpha$ -2a pada Berbagai Penyakit...	137
Tabel 5.2	Kelemahan dan keunggulan berbagai modifikasi yang dapat dilakukan pada IFN $\alpha$ -2a.....	146
Tabel 6.1	Korelasi Tingkatan Neutropenia terhadap Jumlah Sel Neutrofil (ANC) .....	175
Tabel 6.2	Beberapa Aplikasi Klinis dan Potensi Klinis dari Protein G-CSF .....	177
Tabel 6.3	Sekuen Polipeptida hG-CSF (174 aa) atau met-hG-CSF (175 aa) .....	180
Tabel 6.4	Daftar primer DNA berupa oligonukleotida untai tunggal yang digunakan untuk sintesis gen <i>CSF3syn</i> dengan metode TBIO.....	183
Tabel 7.1	Protein Fusi Albumin dalam Tahap Uji Klinis dan Praklinis.....	215
Tabel 7.2	Protein Fusi Fc yang Telah Disetujui oleh FDA .....	218
Tabel 7.3	Tipe Toksin pada Pembuatan Imunotoksin .....	221
Tabel 7.4	Imunotoksin dalam Tahap Pengembangan .....	222
Tabel 7.5	Keuntungan dan Tantangan Fusi Protein Terapeutik.....	224
Tabel 7.6	Protein Terapeutik Terpegilasi yang Disetujui FDA .....	234
Tabel 7.7	Tipe-Tipe Glikosilasi Protein.....	238
Tabel 7.8	Beberapa Sistem Ekspresi Untuk Memproduksi Glikoprotein Terapeutik.....	242

Tabel 8.1	Jenis-Jenis Mikro/Nanopartikel.....	267
Tabel 8.2	Strategi Aplikasi <i>Advanced Dosage Form</i> untuk Protein Terapeutik Rekombinan.....	269
Tabel 9.1	Marker Seleksi yang Umum Digunakan dan Reagen untuk Seleksi beserta Organisme Target .....	296
Tabel 9.2	Jenis-Jenis Bioreaktor Untuk Kultur Sel Produk Obat Bioterapeutik .....	300
Tabel 9.3	Kriteria Desain Bioreaktor .....	304
Tabel 10.1	Obat Biologi dengan Nilai Penjualan yang Sangat Tinggi .....	326
Tabel 10.2	Peta pengembangan uji klinis dalam biosimilar. ....	327
Tabel 10.3	Tiga Gelombang Berakhirnya Paten Obat Biologi .....	328
Tabel 10.4	Beberapa Sumber Variabilitas pada Proses Pembuatan Obat Biosimilar .....	335





## Pengantar Penerbit

Sebagai penerbit ilmiah, LIPI Press mempunyai tanggung jawab untuk terus berupaya menyediakan terbitan ilmiah yang berkualitas. Upaya tersebut merupakan salah satu perwujudan tugas LIPI Press untuk turut serta membangun sumber daya manusia unggul dan mencerdaskan kehidupan bangsa sebagaimana yang diamanatkan dalam pembukaan UUD 1945.

Buku ini mengulas kemungkinan penggunaan teknologi bioteknologi, biologi molekuler, dan *reverse engineering* dalam riset dan pengembangan obat biosimilar, yang berdasarkan pada pengalaman SDM Iptek LIPI selama kurang lebih 17 tahun. Buku ini terdiri atas 10 bab yang membahas beberapa contoh penelitian yang telah dilakukan, peraturan yang mendasari, formulasi, dan pemikiran lainnya pascabiosimilar.

Selain itu, buku ini ditulis berdasarkan alur riset dan pengembangan obat biosimilar dari pemahaman regulasi dari dalam dan luar negeri, kemudian mulai disampaikan tentang 4 produk biosimilar yang dikembangkan oleh LIPI hingga bioproses produk-produk berbasis terapeutik protein rekombinan.

Kami berharap buku ini dapat bermanfaat bagi peneliti, dosen, mahasiswa, serta pemangku kepentingan dalam memahami obat

biologi, apa yang telah dilakukan, dan kendala dalam pengembangan obat biosimilar di Indonesia.

Akhir kata, kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu proses penerbitan buku ini.

LIPI Press

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Kata Pengantar

Akses terhadap obat yang dibutuhkan dengan harga terjangkau menjadi masalah mendasar dalam pembangunan kesehatan suatu negara. Masalah semacam ini akan dapat dipecahkan apabila obat yang dibutuhkan tersedia dengan harga yang terjangkau oleh mereka yang membutuhkannya. Salah satu masalah mendasar yang saat ini sedang kita hadapi adalah hampir seluruh (95%) bahan baku obat yang kita butuhkan masih harus kita impor, apalagi obat-obat yang berbasis biologi (obat biologi), seperti hormon faktor pertumbuhan (*growth factor*), antibodi, dan vaksin. Sebagaimana sering terjadi di negara berkembang, bahan baku untuk suatu proses produksi masih jauh dari mandiri.

Riset dasar dan pengembangan obat biologi yang baru, biasanya dilakukan di negara maju karena riset semacam ini selain membutuhkan biaya yang luar biasa besar juga membutuhkan perencanaan yang sangat matang. Bersaing dengan negara maju dalam pengembangan obat biologi baru tentunya sangat sulit untuk dilakukan. Cara lain untuk mengembangkan kemampuan teknologi dan memenuhi kebutuhan dalam negeri adalah dengan mengembangkan obat tersebut setelah masa patennya berakhir. Industri farmasi lain dapat mendaftarkan produk obat biologi tersebut yang biasanya dikenal dengan produk obat biosimilar.



Keberadaan teknologi rekombinan DNA, sumber daya manusia iptek yang tersedia, dan jumlah penduduk yang besar, sangat membuka peluang Indonesia untuk mengintroduksi pengembangan teknologi berbasis *reverse engineering* pada bioteknologi kesehatan. Peluang ini terbukti sudah berhasil dilakukan di negara berkembang lainnya, seperti Tiongkok dan India, untuk mengurangi produk impor dalam memenuhi kebutuhan obat biologi dalam negeri. Introduksi produk obat biosimilar memberikan peluang yang sangat besar bagi negara berkembang, termasuk Indonesia, untuk menyusul keteringgalannya dari negara maju. Aplikasi teknologi berbasis *reverse engineering* pada bioteknologi kesehatan bahkan sangat berpotensi digunakan untuk mengejar ketertinggalan Indonesia terhadap negara maju.

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) sejak tahun 2004 mulai mengembangkan riset dasar untuk memproduksi biosimilar dengan menggunakan teknologi rekombinan protein. Buku ini merupakan kompilasi dari kegiatan yang telah dilakukan dan dilengkapi dengan informasi-informasi penting, seperti regulasi dan cara memproduksi obat biosimilar. Produk obat biosimilar yang dipilih berdasarkan analisis kebutuhan masyarakat Indonesia, yaitu human eritropoietin hormon penghasil sel darah merah, hormon insulin pengatur kadar gula dalam darah, hormon interferon Alfa-2 untuk perawatan penderita hepatitis dan kanker hati, serta Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF atau GCSF adalah faktor pertumbuhan yang merangsang sumsum tulang untuk menghasilkan granulosit dan sel punca, dan melepaskannya ke dalam aliran darah). Keempat produk obat biosimilar ini jenis struktur proteinnya adalah glikoprotein. Riset yang dilakukan diharapkan dapat berkontribusi terhadap perkembangan ilmu bioteknologi dan biologi molekuler di Indonesia serta berkontribusi terhadap kemandirian produksi bahan baku obat di dalam negeri yang penuh tantangan.

Meningkatnya kebutuhan obat biologi, meningkatnya teknologi *cell line development*, dan habisnya masa paten obat biologi originator menyebabkan semakin banyak industri biofarmasi yang mengem-

bangkan produk biosimilar. Biosimilar dapat berfungsi sebagai opsi obat dengan harga yang lebih rendah sehingga rakyat dapat mempunyai akses terhadap obat yang dibutuhkannya dan dapat secara umum dapat menciptakan sistem perawatan kesehatan yang lebih berkelanjutan. Pada saat yang sama, kehadiran biosimilar dapat memberikan ruang bagi inovasi dalam asuransi kesehatan dan teknologi, dan akhirnya akan berujung pada lebih banyaknya pasien yang terus menerima perawatan terbaik sehingga kesejahteraan masyarakat dapat meningkat.

Walaupun pengembangan biosimilar mempunyai masa depan yang cerah, penelitian dan pengembangan obat semacam ini tidak mudah dan penuh tantangan. Tantangan tersebut antara lain membutuhkan dana yang sangat tinggi, membutuhkan sumber daya manusia iptek yang sangat kompeten di bidangnya, dan menuntut komitmen jangka panjang dari Pemerintah, terutama dalam hal penyediaan fasilitas, dana, dan keberpihakan dalam membuat peraturan baik dalam tahap riset, pengembangan maupun dalam tahap komersial.

Kami menyadari buku ini masih jauh dari sempurna dan riset yang telah dilakukan juga masih jauh dari harapan industri obat dan pemangku kepentingan di bidang kesehatan. Inisiasi yang telah dilakukan ini diharapkan dapat memberi gambaran riset di Indonesia. Tentu masih banyak kekurangan dari buku ini, kritik dan saran yang membangun sangat kami harapkan. Semoga buku ini bermanfaat.

Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem.  
Kepala Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI





## Prakata

Perkembangan bioteknologi modern, terutama dalam bidang kesehatan, telah memberikan pilihan terapi tambahan dalam layanan kesehatan. Tidak seperti obat kimia tradisional, obat biologi adalah suatu molekul glikoprotein yang diproduksi dalam sel hidup (sel tumbuhan, hewan, bakteri, virus, dan ragi) yang meliputi berbagai jenis molekul, yaitu hormon (hormon pertumbuhan, insulin, eritropoietin), antibodi monoklonal, produk darah, sera, dan vaksin. Karena obat biologi diproduksi dalam makhluk hidup maka obat biologi lebih kompleks dan sangat menantang untuk diproduksi.

Semakin meningkatnya penyakit kronis, meningkatnya umur populasi, dan meningkatnya kemampuan teknologi untuk memproduksi obat biologi telah meningkatkan pasar obat berbasis rekombinan protein. Beberapa jenis penyakit yang sering menggunakan obat biologi dalam metode pengobatannya antara lain adalah penyakit kanker, anemia, rematik, autoimun, alzheimer, dan beberapa penyakit yang berhubungan dengan darah dan kardiovaskular. Semakin banyaknya pasien yang mempunyai akses pada obat ini, obat biologi semakin cepat mendominasi pasar obat dunia, terutama pada negara-negara maju.

Terkait hal tersebut, kami memanjatkan syukur ke hadirat Allah Swt. atas kelancaran dan keberhasilan proses penulisan serta

penerbitan buku ini. Buku ini membahas kemungkinan penggunaan teknologi bioteknologi, biologi molekuler, dan *reverse engineering* dalam riset dan pengembangan obat biosimilar. Buku ini ditulis berdasarkan pengalaman SDM Iptek LIPI dalam mengembangkan obat biosimilar selama kurang lebih 17 tahun. Harapan kami buku ini dapat bermanfaat bagi peneliti, dosen, mahasiswa, dan pemangku kepentingan dalam memahami obat biologi, apa yang sudah dilakukan, dan apa yang menjadi kendala dalam pengembangan obat biosimilar di Indonesia. Beberapa contoh penelitian yang telah dilakukan, peraturan yang mendasarinya, formulasi, dan pemikiran lainnya pasca-biosimilar ditampilkan dalam 10 bab.

Buku ini ditulis berdasarkan alur riset pengembangan obat biosimilar dari pemahaman regulasi dari dalam dan luar negeri dalam pengembangan obat biosimilar, kemudian disampaikan mengenai 4 produk biosimilar yang dikembangkan oleh LIPI dengan segala kendala yang dihadapi, dilanjutkan dengan teori-teori strategi peningkatan aktivitas, formulasi, dan bioproses produk-produk berbasis protein terapeutik rekombinan.

Bogor, Februari 2021

Penyusun



## BAB I

# Bioteknologi dan Biosimilar: Perkembangan Obat Berbasis Protein Terapeutik

*Adi Santoso*

Kemajuan bioteknologi modern yang dimulai sekitar tahun 1960-an dan diawali dengan ditemukannya struktur DNA (Watson & Crick, 1953) telah membawa ilmu ini menjadi fondasi terciptanya produk obat berbasis protein terapeutik. Dikenal dengan istilah obat biologi, dalam tiga dekade terakhir, obat berbasis protein terapeutik ini sekarang telah menjadi obat utama penyakit degeneratif (Lybecker, 2017). Meningkatnya penggunaan obat berbasis protein terapeutik menjadi fokus utama buku ini. Sejarah perkembangan bioteknologi modern, ilmu pengetahuan dan teknologi yang dibutuhkan untuk pengembangan produk biosimilar dan bagaimana kemungkinan pengembangan produk obat ini untuk mencapai kemandirian nasional terhadap kebutuhan obat dalam negeri dibahas pada bab ini.

### **A. Apakah yang dimaksud dengan Bioteknologi?**

Bioteknologi adalah teknologi yang berbasis pada biologi, terutama apabila digunakan dalam bidang pertanian, pangan, kedokteran, lingkungan, dan energi. Pada dasarnya, bioteknologi adalah suatu teknologi yang memanfaatkan proses seluler dan molekuler untuk mengembangkan teknologi dan produk yang membantu memperbaiki kesehatan manusia beserta lingkungannya (CBD, 2014). Manusia telah

Buku ini tidak diperjualbelikan.

menggunakan proses biologis mikroorganisme selama lebih dari 6.000 tahun untuk membuat produk makanan yang berguna, seperti roti, keju, produk susu, dan minuman lain.

Istilah bioteknologi pertama baru terdengar pertama kali pada 1919 saat bioteknologi digambarkan sebagai interaksi antara biologi dan teknologi manusia untuk mengonversi suatu bahan baku menjadi produk tertentu. Pada saat itu, sebagian besar bioteknologi hanya terfokus pada makanan dan minuman. Pada 1940-an, kegiatan bioteknologi berkembang pada obat-obatan sehingga memungkinkan produksi massal antibiotik, seperti penisilin, yang terus digunakan untuk mengontrol penyakit menular (UN, 1992). Terobosan besar yang menjadi *blue print* bioteknologi modern diawali dengan studi tentang DNA. Pada studi ini, akhirnya struktur DNA ditemukan dan dipublikasikan oleh Francis Crick dan James D. Watson pada 1953 dalam jurnal ilmiah *Nature* dengan judul “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid” (Watson & Crick, 1953). Usaha mendefinisikan bioteknologi berjalan cukup lama, hingga akhirnya PBB dan WHO dalam suatu konvensi pada 1992 mendefinisikan bahwa bioteknologi adalah “aplikasi teknologi yang menggunakan sistem biologi, organisme hidup atau derivatnya, untuk membuat atau memodifikasi produk dan proses untuk maksud tertentu” (UN, 1992). Bioteknologi modern sering dikaitkan dengan penggunaan mikroorganisme yang diubah secara genetik, seperti *Escherichia coli* atau ragi (*yeast*) untuk produksi rekombinan protein (misalnya insulin atau antibiotik tertentu). Bioteknologi modern sering juga digunakan untuk membuat hewan transgenik, tumbuhan transgenik, dan penggunaan sel mamalia (contohnya sel *chinese hamster ovary*/sel CHO) untuk memproduksi obat-obatan (Jayapal dkk., 2007). Aplikasi bioteknologi modern yang menjanjikan lainnya adalah pengembangan obat-obatan dengan menggunakan tanaman sebagai bioreaktor, misalnya teknologi *molecular farming*.

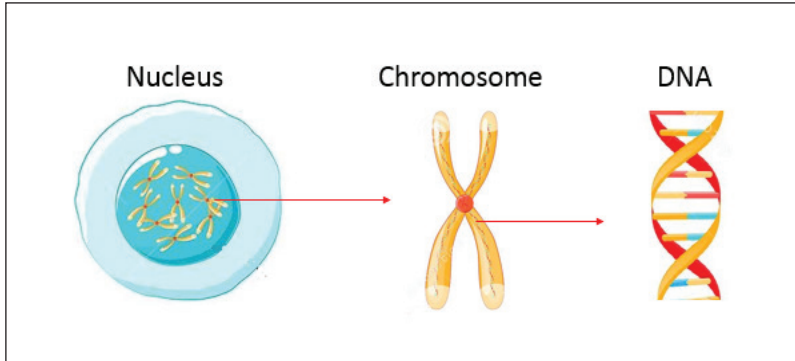
Seiring berjalannya waktu, manusia telah banyak mempelajari dengan sangat detail tentang organisme sampai ke struktur dan urutan basa DNA. Gambar 1.1 menunjukkan gambar nukleus, kromosom,



dan struktur DNA. Gambar tersebut menjelaskan bahwa peningkatan pengetahuan tentang struktur nukleus—dengan kromosom dan *double helix* DNA yang terdapat di dalamnya—membuat para ilmuwan mampu melahirkan ilmu genetika modern di mana pembawa unsur keturunan makhluk hidup adalah melalui molekul DNA. Pengetahuan tentang fungsi organel dalam sel dan struktur DNA secara detail akhirnya membuat bioteknologi modern saat ini memungkinkan kita untuk melakukan penggabungan unsur genetik dari dua atau lebih sel hidup sehingga kita mampu untuk membuat sel bakteri menghasilkan molekul manusia (Alberts, 2002). Dalam bidang tanaman, bioteknologi modern mampu meningkatkan resistansi tanaman terhadap suatu penyakit, meningkatkan toleransi herbisida tanaman dan memfasilitasi penggunaan praktik pertanian yang lebih ramah lingkungan. Dalam bidang peternakan, ternak unggul yang terbebas dari beberapa penyakit tertentu telah berhasil dikembangkan.

Di bidang kesehatan, bioteknologi modern digunakan untuk menyintesis molekul terapeutik yang belum pernah ada sebelumnya untuk memerangi berbagai penyakit serius, vaksin untuk pertahanan tubuh terhadap ancaman suatu penyakit, dan teknologi diagnostik untuk mendiagnosis suatu penyakit dengan presisi yang tinggi. Teknologi produksi obat menjadi semakin modern dengan munculnya teknologi rekombinan (rDNA) pada 1970-an dan 1980-an. Teknologi ini memungkinkan para ilmuwan untuk memanipulasi gen dan sel untuk menghasilkan obat-obatan yang sangat kompleks secara struktural yang tidak mungkin diproduksi melalui sintesis kimiawi atau pemurnian dari sumber-sumber alami (Alberts, 2002). Dengan menggabungkan kemampuan memproduksi, memurnikan, dan mengkarakterisasi molekul kompleks (misalnya molekul antibodi monoklonal) dengan pemahaman tentang mekanisme suatu penyakit, berbagai produk obat biologi telah mampu diproduksi. Habisnya masa paten obat biologi telah memunculkan fenomena baru dengan kehadiran produk biosimilar, yakni suatu produk obat biologi yang mengacu pada produk originator yang telah diakui.





Sumber: Diadaptasi dari University of Waikato (2011)


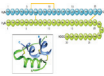



**Gambar 1.1** Nukleus, kromosom, dan struktur DNA menjadi tonggak sejarah bioteknologi modern.

## B. Apa yang dinamakan dengan Obat Biologi?

Obat biologi (*biopharmaceuticals*) meliputi berbagai jenis, yaitu protein, seperti hormon (hormon pertumbuhan, insulin, erythropoietin), enzim yang secara alami diproduksi dalam tubuh manusia, antibodi monoklonal, produk darah, produk obat imunologi (seperti sera dan vaksin), alergen, dan produk sel terapi (USDA, 2016). Karena pada dasarnya obat biologi adalah suatu protein, obat biologi mempunyai berat molekul yang sangat besar dan dapat mencapai 200 sampai 1.000 kali lebih besar dari obat bermolekul kecil (*small molecules drugs*) (Vulto & Jaquez, 2017). Tabel 1.1 menunjukkan perbandingan obat aspirin yang memiliki berat molekul 180 Dalton (Da) dengan obat biologi, seperti insulin, *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), *human erythropoietin* (hEPO), dan *monoclonal antibody* (mAb) yang memiliki berat molekul > 5.000 Da. Selain lebih kompleks daripada obat molekul kecil, obat biologi juga sangat sensitif sehingga lebih sulit untuk diproduksi dan dikarakterisasi (Daubenfeld dkk., 2016). Karena sangat sensitif, dalam penggunaannya obat biologi hampir selalu disuntikkan ke tubuh pasien. Oleh karena itu, peran dokter dalam pengobatan pasien menggunakan produk obat seperti ini sangat penting.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 1.1** Perbandingan obat yang mempunyai molekul kecil dan molekul besar dilihat dari berat molekul.

Jenis Obat	Aspirin	Insulin	GCSF	hEPO	mAb
Struktur Molekul					
Berat Molekul (Dalton)	180	5.800	18.800	30.400	150.500

Ket.: GCSF: granulocyte colony stimulating factor; hEPO: human erythropoietin; dan mAb: monoclonal antibody.

Sumber: diadaptasi dari Amgen Biosimilars (2016)

### C. Bagaimana Perbedaan Obat Biologi dengan Obat Molekul Kecil?

Obat biologi sangat berbeda dalam banyak hal dengan obat molekul kecil, di antaranya tahapan produksi, ukuran molekul, kompleksitas, dan stabilitasnya (Tabel 1.2). Karena protein dipengaruhi oleh sistem pencernaan apabila diberikan secara oral, sebagian besar obat biologi harus diberikan dengan cara disuntikkan atau melalui infus (Samanen, 2013). Obat molekul kecil umumnya memiliki struktur kimia yang terdefinisi dengan jelas untuk dianalisis dalam penentuan berbagai komponen yang melekat di dalamnya. Dalam obat biologi, kasusnya jauh berbeda, faktor-faktor yang membuat produk obat biologi berbeda dengan produk lainnya sangat banyak (Schellekens, 2009). Perbedaan bahkan dapat terjadi pada produk yang sama dengan *batch* yang berbeda. Karena ukurannya yang sangat besar dan komposisinya yang dapat bervariasi, obat biologi memiliki potensi untuk diakui oleh tubuh sebagai benda “asing” sehingga dapat menginduksi reaksi kekebalan yang tidak diinginkan. Hal ini biasanya jarang terjadi pada obat yang berukuran kecil (*small molecule drugs*).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 1.2** Perbedaan karakter antara obat molekul kecil dan besar.

No.	Jenis Karakter	Obat molekul kecil	Obat molekul besar
1	Ukuran molekul	Kecil	Besar
2	Struktur	Sederhana, tidak tergantung oleh cara produksi	Kompleks, sangat tergantung oleh cara produksi
3	Proses karakterisasi	Mudah dikarakterisasi	Sulit dikarakterisasi
4	Cara produksi	Diproduksi secara kimia organik atau anorganik	Diproduksi dengan menggunakan organisme atau sel hidup
5	Imunogenisitas	Biasanya tidak menimbulkan efek imunogenik	Dapat menimbulkan efek imunogenik
6	Tahapan proses produksi	Tahapan yang dibutuhkan yang cenderung sederhana	Membutuhkan tahapan yang kompleks
7	Homogenisitas	Molekul bersifat homogen. Molekul yang identik bisa diperoleh dengan mudah.	Molekul cenderung bersifat heterogen. Sulit untuk mendapatkan molekul yang identik.
8	Stabilitas	Stabil	Tidak stabil dan mudah dipengaruhi oleh banyak faktor eksternal
9	Contoh	Aspirin	Insulin, EPO, GCSF, interferon, antibodi monoclonal

Sumber: Daubenfeld dkk. (2016)

#### **D. Bagaimana Cara Membuat Obat Biologi?**

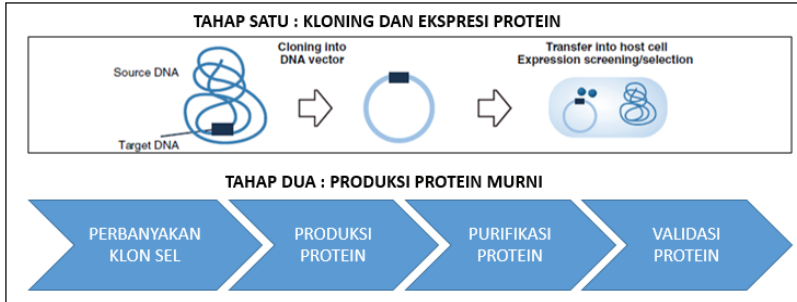
Obat biologi pada dasarnya adalah suatu molekul protein sehingga pembuatannya membutuhkan proses yang sangat kompleks. Protein adalah molekul yang sangat besar yang terdiri dari berbagai macam asam amino sehingga mempunyai struktur yang jauh lebih besar, lebih kompleks, dan lebih bervariasi daripada struktur obat yang berbasis pada molekul kecil. Obat berbasis protein dibuat menggunakan sistem

sel hidup yang rumit dan membutuhkan kondisi yang sangat tepat untuk menghasilkan produk yang konsisten seperti yang diinginkan. Secara teori, proses pembuatan obat biologi mencakup 2 langkah besar (Gambar 1.2).

1. Mentranslasikan gen dari sel tertentu ke dalam suatu sistem ekspresi gen;
  - a. Mendapatkan target DNA yang akan diinsersikan pada suatu vektor
  - b. Mentransformasikan vektor rekombinan ke dalam suatu sel inang (*host cell*)
2. Produksi protein yang meliputi perbanyakan klon sel, purifikasi protein, dan validasi.
  - a. Mengkultur *cell line* pada media yang telah dioptimasi pada suatu reaktor
  - b. Mengkultur *cell line* pada reaktor yang lebih besar
  - c. *Recovery* protein dari supernatan dengan menggunakan kombinasi beberapa teknik purifikasi
  - d. Validasi obat biologi yang didapat

Sebagian obat biologi dapat diproduksi menggunakan bakteri, tetapi sebagian lagi membutuhkan cara yang agak berbeda, misalnya produksi pada sel mamalia (seperti sel CHO). Hal ini karena sebagian protein memiliki fitur struktural yang harus diproduksi oleh sel mamalia, contohnya protein yang mengandung molekul gula (glikoprotein). Pada glikoprotein, molekul gula yang menempel pada protein tersebut harus mempunyai pola yang benar agar glikoprotein yang dihasilkan mempunyai aktivitas seperti yang diharapkan (Omasa dkk., 2010; Jayapal dkk., 2007; Hacker dkk., 2009).

Karena obat biologi diproduksi dengan menggunakan sel hidup, menjaga kondisi yang optimal merupakan kunci yang harus diperhatikan. Proses produksi obat biologi awalnya dilakukan dalam volume yang relatif kecil, berisi media yang mengandung cairan nutrisi yang dibutuhkan sel untuk pertumbuhan. Secara berurutan, kultur sel



Ket.: Obat biologi diproduksi dalam sel hidup.  
 Sumber: Diadaptasi dari Camacho dkk. (2014)

**Gambar 1.2** Proses Pembuatan Obat Biologi

dipindahkan ke tabung lebih besar yang disebut bioreaktor. Beberapa tangki bioreaktor yang digunakan di bidang manufaktur bahkan dapat menampung sampai 20.000 liter kultur sel. Setiap tahap dalam proses manufaktur ini sangat penting untuk menjaga kondisi yang optimal agar sel dapat berkembang dengan efisien. Perubahan yang halus pun dapat memengaruhi sel dan mengubah protein yang dihasilkan. Kondisi yang ketat esensial untuk memastikan kualitas dan konsistensi produk akhir. Pada tahap ini, beberapa variabel, seperti suhu, pH, konsentrasi nutrisi, dan kadar oksigen sangat penting untuk selalu dipantau (Daubenfeld dkk., 2016). Kontaminasi dapat berasal dari bakteri, ragi, dan mikroorganisme lainnya, seperti virus. Protein yang didapat dari bioreaktor kemudian diisolasi dengan berbagai macam teknologi berdasarkan berat molekul dan muatan listriknya. Protein yang telah dimurnikan biasanya dicampur dengan larutan steril yang dapat disuntikkan atau diinfuskan ke dalam tubuh. Tahap akhir yang dilakukan dalam proses manufaktur obat biologi adalah mengisi botol atau jarum suntik dengan dosis individual, memberi label, mengemas, dan membuatnya tersedia untuk dokter dan pasien yang membutuhkannya.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## E. Obat Biosimilar

Pada dasarnya, obat biosimilar adalah produk obat biologi yang telah diakui (*approved*) dan hampir identik dengan produk aslinya (produk originator). Dalam Tabel 1.3, ada beberapa definisi produk obat biosimilar yang digunakan di beberapa negara dan organisasi World Health Organization (WHO), European Medicines Agency (EMA), Food and Drug Administration (FDA) AS, Health Canada di Kanada, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Korea Selatan, dan Agenciade de Vigilancia Sanitaria (Brazil). Di Indonesia, produk obat biosimilar disebut produk bioterapeutik sejenis (*similar biotherapeutic product* = SBP) atau produk biologi sejenis (PBS), yang untuk selanjutnya disebut produk biosimilar.

Karena struktur dan proses produksi obat biologi sangat kompleks, secara teori produk obat biosimilar tidak mungkin bisa identik dengan produk originator. Untuk bisa disetujui sebagai produk obat biosimilar yang resmi, produk obat biosimilar yang bersangkutan harus lolos tiga jenis pengujian, yaitu uji analitik, uji non-klinik, dan uji klinik. Hal ini dilakukan untuk mengevaluasi apakah struktur dan karakteristik, keamanan dan efikasinya sama dengan produk yang original. Perbedaan kecil dapat diizinkan selama perbedaan tersebut tidak bermakna secara klinis.

Selain biosimilar, terdapat juga obat biologi yang berbasis *biobetter*. Istilah *biobetter* pertama kali diperkenalkan oleh Prasad, direktur perusahaan obat Dr Reddy's Laboratories di India, pada 2007 (Anour, 2014). Apabila produk biosimilar adalah produk obat biologi yang mengacu pada produk originator yang telah diakui sebelumnya (*approved*), *biobetter* adalah produk obat biologi yang memiliki khasiat lebih baik daripada produk originatornya (de Mora, 2015). Hal ini dapat terjadi karena produk obat *biobetter* secara umum telah mengalami perubahan, termasuk perubahan struktur, yang membuat produk obat *biobetter* lebih aman dan lebih efektif, atau perubahan formulasi yang mungkin dapat membuat obat *biobetter* lebih mudah untuk mencapai situs target dan mempertahankan integritas dosis (Anour, 2014; Gorham, 2016; de Mora, 2015). Karena produk *biobetter*

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 1.3** Beberapa terminologi dan definisi obat biosimilar yang digunakan oleh beberapa negara dan organisasi.

Region/ Negara	Organisasi	Terminologi	Definisi
<b>Eropa</b>	EMA	Biosimilar	Sebuah obat biologi yang dikembangkan untuk menjadi serupa dengan obat biologi lain yang telah memiliki lisensi. Variabilitas dan perbedaan yang terdapat pada obat biosimilar tersebut tidak memengaruhi keamanan atau efektivitasnya.
<b>USA</b>	FDA	Follow-on Biologic or Biosimilar	Sebuah produk biologi yang sangat mirip dengan produk biologi lain yang telah mendapatkan lisensi di Amerika Serikat; tidak ada perbedaan klinik yang cukup berarti antara produk biosimilar dan produk yang berlisensi dalam hal keamanan, kemurnian dan potensi produk.
<b>Global</b>	WHO	Similar Bio-therapeutic Product	Sebuah produk bioterapeutik yang mirip dari segi kualitas, keamanan dan kemanjuran terhadap referensi produk bioterapeutik lain yang sudah mempunyai lisensi.
<b>Canada</b>	Health Canada	Subsequent Entry Biologic	Sebuah obat biologi yang mirip dan akan masuk pasar komersial setelah produk originator.
<b>Korea Selatan</b>	MFDS	Biosimilar	Produk biologi yang menunjukkan kemiripan dengan produk originator dalam hal kualitas, keamanan dan efikasi.
<b>Brazil</b>	ANVISA	Biologic Product	Obat biologi yang mempunyai aktivitas biologi dan tidak mengandung molekul baru, sudah dilisensikan di Brazil dan telah melalui semua proses produksi.
<b>Indonesia</b>	BPOM	Biosimilar	Produk biologi dengan profil khasiat, keamanan, dan mutu yang similar/serupa dengan produk biologi yang telah disetujui.

Sumber: Kalantar-Zadeh (2017); BPOM (2015)



telah mengalami perubahan, *biobetter* dianggap sebagai obat baru yang berbeda dengan produk originatornya.

## **F. Persamaan dan Perbedaan antara Obat Biosimilar dan Obat Generik**

Persamaan antara obat biosimilar dan obat generik adalah sama-sama obat yang dibuat setelah habis masa patennya. Namun, kedua jenis obat ini jauh berbeda. Seperti yang sudah diuraikan, produk obat biosimilar adalah produk obat biologi yang telah diakui secara resmi dan memiliki struktur dan khasiat yang hampir sama dengan produk aslinya. Khasiat produk obat biosimilar tidak dapat disamakan dengan produk generik karena produk obat biosimilar tidak selalu dapat dipertukarkan secara klinis, dan kinerja klinis obat biologi sangat bergantung pada metode produksi dan pemurnian (Daubenfeld dkk., 2016). Oleh sebab itu, kesamaan antara obat biosimilar dan produk inovatornya harus meliputi uji analitik, uji non-klinik, dan uji klinik. Karena produk obat biosimilar adalah suatu protein, obat ini mempunyai berat molekul yang tinggi dan bersifat kompleks. Sebagai contoh, obat biosimilar antibodi monoklonal mempunyai berat molekul sekitar 150.000 Dalton dengan jumlah atom sekitar 20.000 (Vulto & Jaquez, 2017).

Berbeda dengan obat biosimilar yang merupakan obat biologi dengan berat molekul yang sangat besar, obat generik adalah obat molekul kecil dan merupakan salinan identik dari produk aslinya. Salah satu contoh obat generik yang cukup dikenal adalah aspirin dengan berat molekul 180 Dalton dan hanya memiliki 21 atom (Daubenfeld, dkk., 2016). Karena perbedaan obat biosimilar dan obat generik sangat besar, peraturan dalam pengembangan kedua obat ini juga sangat berbeda. Secara umum, proses persetujuan (*approval*) untuk obat generik lebih simpel bila dibandingkan dengan obat biosimilar (Undela, 2011).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## G. Pengetahuan Singkat tentang Pengembangan Obat Biosimilar

Tidak seperti obat generik yang merupakan obat molekul kecil dan merupakan salinan identik dari produk aslinya, obat biosimilar adalah obat yang serupa, tetapi tidak identik dengan obat aslinya. Perbedaan kecil dapat berimplikasi pada kemanjuran obat dan keamanan pasien (Calo-Fernández & Martínez-Hurtado, 2012). Oleh sebab itu, pengembangan obat jenis ini adalah proses *multistep* yang membutuhkan pemahaman dan pengetahuan yang sangat dalam. Secara teori, proses pengembangan obat biosimilar meliputi dua hal, yaitu pengetahuan tentang produk originator yang akan dijadikan sebagai referensi dan pengetahuan mengenai teknik pembuatan obat biosimilar yang akan diproduksi (Issac dkk., 2017).

Pada tahap awal, memahami karakteristik, baik secara kimia maupun biologi menjadi sangat esensial. Untuk memahami bagaimana mekanisme produk referensi (produk originator) bekerja dalam mengobati pasien, dapat dilakukan dengan cara meneliti secara detail karakteristik produk originator tersebut. Selain meneliti obat originator secara langsung, mempelajari penyakit, data nonklinis, klinis, dan efek samping dari obat yang sedang diteliti dari berbagai macam literatur sangat dibutuhkan.

Pengembangan suatu obat biosimilar membutuhkan pengetahuan, keterampilan, dan infrastruktur dengan presisi yang sangat tinggi. Alat dan metode analisis yang canggih digunakan untuk membandingkan obat biosimilar dengan produk referensi pada detail molekul yang dipelajari. Kesamaan data analitik, nonklinis, dan klinis antara obat biosimilar dan originator merupakan suatu bukti yang menunjukkan kesamaan antara kedua molekul tersebut (Calo-Fernández & Martínez-Hurtado, 2012).

## **H. Mengapa Produk Obat Biosimilar berbeda dengan Produk Originator, dan Apa Perbedaan Pengembangan yang Fundamental antara Obat Biosimilar dan Originator?**

Dalam proses pengembangan suatu produk obat biosimilar, tentu sangat diharapkan produk yang dikembangkan memiliki bahan aktif yang sangat mirip dengan produk aslinya. Namun, hal tersebut tidak mudah untuk dilakukan. Tidak seperti obat generik (molekul kecil) yang bahan aktifnya harus identik, proses pembuatan obat biologi (molekul besar) tidak mungkin diduplikasi di tempat lain karena selain dirahasiakan oleh pembuat produk aslinya, proses pembuatannya juga sangat kompleks (Ventola, 2013; Calo-Fernández & Martínez-Hurtado, 2012). Hal ini membuat perusahaan lain hampir tidak mungkin untuk membuat obat biologi yang identik dengan produk aslinya (originator). Berikut adalah beberapa karakteristik pembuatan obat biologi yang membuat obat biosimilar yang dihasilkan tidak dapat identik dengan produk aslinya (US Department of Health and Human Services, 2015).

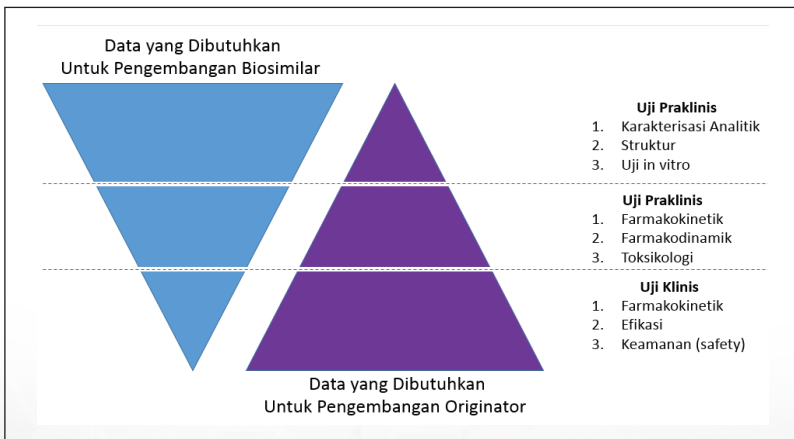
Obat biologi tidak dibuat dengan menggunakan seperangkat bahan standar, tetapi dikembangkan dengan menggunakan sistem biologi dari sel hidup yang unik. Akibatnya, bahan aktif tidak mungkin dibuat ulang dengan tepat. Kultur sel yang digunakan untuk memproduksi obat biologi sangat unik pada masing-masing industri obat dan protein yang dibuat.

Proses pembuatan obat biologi pada umumnya lebih kompleks daripada proses pembuatan obat kimia. Tidak seperti obat molekul kecil, obat biologi diproduksi dalam sel hidup dalam lingkungan yang sangat terkontrol. Protein yang dihasilkan oleh sel akan dipengaruhi oleh karakteristik sel individu serta lingkungan dan nutrisi yang digunakan.

Setiap produsen memiliki detail proses yang berbeda dalam memproduksi obat biologi. Hal ini membuat hubungan yang sangat

unik antara proses pembuatan dan produk akhir dari suatu obat biologi.

Apa perbedaan yang sangat signifikan antara pengembangan produk originator dan biosimilar? Perbedaan yang sangat signifikan adalah pada produk originator, waktu, tenaga, dan dana yang dikeluarkan lebih banyak untuk hal-hal yang berhubungan dengan studi klinis. Sebaliknya, pada obat biosimilar, waktu, tenaga dan dana yang dikeluarkan lebih banyak digunakan untuk studi praklinis yang dalam hal ini adalah studi yang berhubungan dengan kesamaan antara obat biosimilar dan produk yang digunakan sebagai referensi (Bui dkk., 2015; US Department of Health and Human Services, 2015). Studi ini sering juga disebut dengan *biosimilarity study*. Seperti tertulis pada Gambar 1.3, studi praklinis meliputi karakterisasi, analisis struktur protein, studi *in vitro*, farmakokinetik, farmakodinamik, dan toksikologi. Sementara itu, studi klinis meliputi studi farmakokinetik, efikasi, dan keamanan (*safety*) (Dorey, 2014).



Sumber: Diadaptasi dari Bui dkk. (2015)

**Gambar 1.3** Perbedaan Pengembangan Produk Obat Biosimilar dan Produk Originator

## I. Mengapa Obat Biosimilar menjadi Kesempatan Menarik untuk dikembangkan pada Negara Berkembang?

Obat biologi adalah obat yang dikembangkan dengan menggunakan sel hidup dan teknologi yang sangat kompleks. Akhir-akhir ini, obat jenis ini telah memainkan peranan yang sangat penting bagi kesehatan masyarakat dunia, terutama untuk beberapa jenis penyakit degeneratif, misalnya diabetes, kanker, kardiovaskular, dan anemia. Meningkatnya kebutuhan obat biologi dan habisnya masa paten obat jenis ini menyebabkan semakin banyak industri biofarmasi yang mengembangkan produk biosimilar (Dorey, 2014). Tabel 1.4 menunjukkan peningkatan drastis penjualan obat biosimilar dari tahun 2008–2015. Dalam kurun waktu tersebut, terjadi peningkatan sebesar 2250%. Peningkatan sebesar ini tentunya memberikan tujuan yang nyata mengapa riset dalam bidang biosimilar menjadi sangat menarik untuk dilakukan. Namun, pengembangan obat semacam ini membutuhkan dana yang sangat besar (Ventola, 2013, Calo-Fernández & Martínez-Hurtado, 2012; Dorey, 2014). Selain masalah dana, tentu saja kompleksitas penelitian dan pengembangan obat berbasis bioteknologi ini akhirnya akan berefek pada harga jual yang relatif mahal. Tidak hanya Indonesia, tetapi juga di negara maju obat jenis ini masih tergolong mahal. Hal ini membuat obat ini tidak terjangkau bagi sebagian besar penduduk dunia, termasuk Indonesia.

Sangat mahalnya harga obat biologi membuat penelitian dan pengembangan obat biosimilar mulai banyak dikerjakan di banyak laboratorium dunia, termasuk di Indonesia. Salah satu laboratorium

**Tabel 1.4** Peningkatan Nilai Penjualan Produk Obat Biosimilar Dunia Tahun 2008–2015

Tahun	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Revenue (Juta Dolar)	100	150	250	400	750	1200	1750	2250

Sumber: Biosimilar Congress (2017).

di Indonesia yang melakukan riset pengembangan obat biosimilar adalah pada Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) di Cibinong Science Center (CSC), Cibinong, Jawa Barat. Di Pusat Penelitian ini, penelitian dan pengembangan obat biosimilar dimulai pada 2004 dengan tujuan mencari sistem ekspresi protein alternatif dengan biaya yang relatif murah. Awalnya, tanaman *barley*, virus BSMV (*barley stripe mosaic virus*) dan *methylotrophic yeast Pichia pastoris* digunakan untuk mensintesis *human erythropoietin* (hEPO) (Santoso dkk., 2007). EPO adalah suatu glikoprotein yang berfungsi dalam pembentukan sel darah merah. Menyadari betapa kompleksnya pola glikosilasi pada *human erythropoietin*, kerja sama PT Biofarma, laboratorium Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC), dan Universitas Gadjah Mada dalam penelitian dan pengembangan biosimilar hEPO berlanjut dengan menggunakan sel mamalia CHO-DG44. Protein hEPO yang dikembangkan dalam



Ket.: Dari kiri ke kanan: Prof. Dr. Umar Anggara Jennie (Alm.), Dr. Bambang Sunarko, Prof. Dr. Enny Sudharmonowati, Prof. Dr. Iskandar Zulkarnaen (Alm.), Drs. Iskandar, M.M dan staff dari PT. Bio Farma.

Sumber: Yana Rubiyana (2015)

**Gambar 1.4** Penyerahan *Research Cell Bank* (RCB) dari Pihak LIPI ke Pihak PT Bio Farma (persero)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

kerja sama ini adalah hEPO generasi kedua yang memiliki pola 5 N-link sehingga secara teori mempunyai aktivitas biologis lebih tinggi dibandingkan dengan hEPO generasi pertama yang hanya memiliki 3 N-link. Penelitian ini menghasilkan *Research Cell Bank* (RCB) yang kemudian diserahkan (Gambar 1.4) ke pihak industri, PT Bio Farma (Persero), untuk dikembangkan lebih lanjut sampai tahap komersial. Beberapa jenis protein untuk pengembangan obat biosimilar (seperti GCSE, interferon, dan insulin) diharapkan dapat menjadi produk yang dapat dikembangkan oleh industri farmasi.

## J. Penutup

Pembangunan kesehatan suatu negara relatif mempunyai permasalahan yang sama, di antaranya jumlah penduduk yang semakin tinggi, penuaan populasi, dan peningkatan jumlah penderita penyakit kronis dan menular. Hal semacam ini menjadi salah satu masalah utama dalam pembangunan yang dihadapi oleh suatu negara, terutama negara berkembang. Meningkatnya permasalahan kesehatan tentu akan meningkatkan permintaan masyarakat terhadap kualitas kesehatan yang semakin baik. Yang menjadi masalah akhirnya bagaimana pengeluaran biaya untuk kesehatan bisa lebih terjangkau bagi masyarakat yang membutuhkannya, termasuk harga obat yang terjangkau. Untuk menjawab tantangan agar harga obat terjangkau, pemenuhan obat dalam negeri dan penelitian bahan baku obat yang bersifat aplikatif harus dilakukan.

Dalam beberapa dekade terakhir, universitas dan lembaga penelitian di banyak negara telah mengalami transformasi misi dalam menjalankan peranannya. Terjadi pergeseran dari yang awalnya hanya pendidikan dan penelitian murni ke penelitian yang bersifat aplikatif dan mulai melibatkan transfer teknologi yang lebih berdampak pada sisi komersial. Sebagai contoh, dalam 20 tahun terakhir, banyak perusahaan, lembaga penelitian, dan universitas terutama di Tiongkok dan India yang telah berkembang sangat pesat dan telah berhasil dalam melakukan *reverse engineering technology* untuk memproduksi obat biologi berbasis biosimilar yang banyak digunakan untuk mengobati

Buku ini tidak diperjualbelikan.



kanker, diabetes, dan penyakit lainnya. Oleh karena itu, kesempatan untuk melakukan penelitian dan pengembangan obat berbasis bio-similar dapat digunakan sebagai salah satu cara oleh negara berkembang, termasuk Indonesia, untuk mengejar pemenuhan kebutuhan obat dalam negeri. Jika selama ini hanya dijadikan sebagai pasar oleh negara maju, Indonesia diharapkan untuk bertransformasi menjadi negara produsen obat minimal untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri.

## Daftar Pustaka

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). Garland Science.
- Amgen Biosimilars [@AmgenBiosim]. (2016, April 16). *Biologics are often 100–1000 times the size of a chemical drug* [Tweet]. <https://twitter.com/AmgenBiosim/status/721133712616923137/photo/1>
- Anour, R. (2014). Biosimilars versus ‘biobetters’- a regulator’s perspective. *Generics and Biosimilars Initiative Journal*, 3(4),166–167. <https://doi.org/10.5639/gabij.2014.0304.039>
- Biosimilar Congress. (2017). *8th Asian biologics and biosimilars congress*. August 10-12, 2017 Beijing, China. <https://biosimilars-biologics.pharmaceuticalconferences.com/asiapacific/2017/>
- BPOM. (2015). *Pedoman penilaian produk biosimilar*. <https://jdih.pom.go.id/product/search/all/all/biosimilar>
- Bui, L. A., Hurst, S., Finch, G. L., Ingram, B., Jacobs, I. A., Kirchhoff, C. F., Ng, C. K., & Ryan, A. M. (2015). Key considerations in the preclinical development of biosimilars. *Drug discovery today*, 20 Suppl 1, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.03.011>
- Calo-Fernández, B., & Martínez-Hurtado, J. L. (2012). Biosimilars: Company strategies to capture value from the biologics market. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 5(12), 1393–1408. <https://doi.org/10.3390/ph5121393>
- Camacho, L. H., Frost, C. P., Abella, E., Morrow, P. K., & Whittaker, S. (2014). Biosimilars 101: Considerations for U.S. oncologists in clinical practice. *Cancer medicine*, 3(4), 889–899. <https://doi.org/10.1002/cam4.258>

- CBD. (2014). The convention on biological diversity and the Nagoya Protocol: Intellectual property implications. *A handbook on the interface between global access and benefit sharing rules and intellectual property*.
- Daubenfeld, T., Dassow, J., Keßler, M., & Schulze, J. (2016). Practitioner's section understanding the market dynamics of biosimilars. *Journal of Business Chemistry*, 13(1), 33–46.
- Dorey, E. (2014). How the biologics landscape is evolving. *The Pharmaceutical Journal*, 6(9).
- Gorham, H. (2016). The value of biobetters. *PRA Health Sciences*. <https://prahs.com/insights/the-value-of-biobetters>
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6), 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.008>
- Isaacs, J., Gonçalves, J., Strohal, R., Castañeda-Hernández, G., Azevedo, V., Dörner, T., & McInnes, I. (2017). The biosimilar approval process: How different is it? *Considerations in Medicine*, 1(1), 3–6. <https://doi.org/10.1136/conmed-2017-100003>
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., & Yap, M. G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103, 40–47.
- Kalantar-Zadeh, K. (2017). History of erythropoiesis-stimulating agents, the development of biosimilars, and the future of anemia treatment in nephrology. *American Journal of Nephrology*, 45(3), 235–247. <https://doi.org/10.1159/000455387>
- Lybecker, K.M. (2017). *The biologics revolution in the production of drugs*. Fraser Institute. <https://www.fraserinstitute.org/sites/default/files/biologics-revolution-in-the-production-of-drugs.pdf>
- de Mora, F. (2015). Biosimilar: What it is not. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(5), 949–956. <https://doi.org/10.1111/bcp.12656>
- Omasa, T., Onitsuka, M., & Kim, W. D. (2010). Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(3), 233–240. <https://doi.org/10.2174/138920110791111960>



- Samanen, J. (2013). How do SMDs differ from biomolecular drugs? Dalam Ganellin C. R., Jefferis R, & Roberts S. M (eds.), *Introduction to biological and small molecule drug research and development: Theory and case studies (Kindle ed.)* (hlm. 161–203). Academic Press.
- Santoso, A., Fuad, A.M., Ningrum, R. A., Wijaya, S. K., Herawati, N., & Wardiana, A. (2007). Expression of human erythropoietin in barley stripe mosaic virus (BSMV). *Proceeding of international seminar on pharmaceutics: Update on pharmaceutical innovation and new drug delivery system* (hlm. 148–152).
- Schellekens H. (2009). Biosimilar therapeutics-what do we need to consider?. *NDT plus*, 2(Suppl\_1), i27–i36. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfn177>
- Undela, K. (2011). Biogenerics or biosimilars: An overview of the current situation in India. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 1, 1–10.
- UN. (1992) *Convention on biological diversity*. United Nations. <https://www.cbd.int/> University of Waikato (2011, Juni 28). *DNA, chromosomes and cells*. <https://www.sciencelearn.org.nz/images/198-cell-chromosomes-and-dna>.
- USDA. (2016). *What are 'biologics' questions and answers*. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CBER/ucm133077.html>
- US Department of Health and Human Services. (2015). *Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product: Guidance for industry*. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm291128.pdf>
- Ventola C. L. (2013). Biosimilars part 1: Proposed regulatory criteria for FDA approval. *P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 38(5), 270–287.
- Vulto, A. G., & Jaquez, O. A. (2017). The process defines the product: What really matters in biosimilar design and production?. *Rheumatology (Oxford, England)*, 56(suppl\_4), iv14–iv29. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex278>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>



## BAB II

# Regulasi Obat Biosimilar

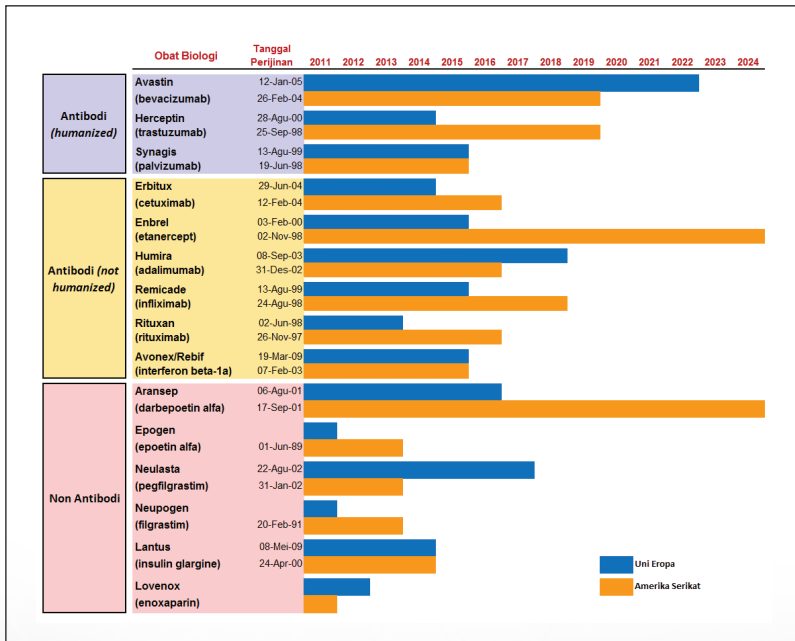
*Eko Wahyu Putro dan Gita Syahputra*

### A. Pendahuluan

Akses terhadap biaya pengobatan yang lebih murah sangat dinantikan oleh pasien, terutama di negara-negara berkembang. Selain itu, efisiensi anggaran belanja pemerintah untuk asuransi kesehatan juga sangat penting. Oleh karena itu, obat biosimilar menjadi salah satu kunci jawabannya. Dengan mutu, keamanan, dan efikasi/khasiat yang serupa dengan obat biologi berlisensi (originator), harga yang harus dibayar lebih murah. Berdasarkan beberapa studi pada rentang waktu 10 tahun, harga obat biosimilar di Amerika Serikat diperkirakan bisa lebih murah antara 10–50% daripada obat originator (Mulcahy dkk., 2014). Melalui program jaminan kesehatan untuk rakyat, pemerintah dapat merekomendasikan pemberian obat biosimilar sehingga dapat menghemat anggaran. Di samping itu, dengan mengeluarkan regulasi yang mendukung kemajuan industri obat biosimilar dalam negeri, negara dapat memperoleh keuntungan lain dalam bentuk pajak dan devisa dari ekspor obat biosimilar.

Produsen obat merespons kebutuhan obat biosimilar dengan mengembangkan obat biosimilar dari obat originator yang akan dan sudah habis masa patennya. Sebelum tahun 2024, beberapa produk obat biologi di Eropa dan Amerika Serikat, seperti insulin glargin, filgrastim, pegfilgrastim, dan epoetin alfa akan habis masa

patennya (Gambar 2.1). Kondisi ini juga menarik bagi perusahaan dari skala kecil hingga besar untuk memproduksi obat biosimilar. Mereka memiliki kesempatan untuk mengambil bagian dalam pasar, terutama di negara-negara yang memerlukan obat biologi dengan harga yang lebih terjangkau (Huzair & Kale, 2015). Masyarakat dan Pemerintah bukan hanya memerlukan nilai ekonomis obat biosimilar, melainkan juga jaminan mutu, keamanan, dan efikasi. Oleh karena itu, regulasi sangat diperlukan untuk melindungi masyarakat. Supaya obat biosimilar lebih cepat dinikmati oleh masyarakat, regulasi perlu mendukung percepatan pengembangan dan produksi dengan tidak mengesampingkan pemenuhan jaminan tersebut.



Ket.: Untuk produk Enbrel, masa paten Amgen diperpanjang hingga tahun 2028.

Sumber: Dimodifikasi dari GaBI (2012)

**Gambar 2.1** Beberapa produk obat biologi yang akan habis masa patennya sebelum tahun 2024 di Uni Eropa dan Amerika Serikat.

Obat biosimilar memiliki kemiripan, tetapi tidak identik dengan obat originator. Obat jenis ini diproduksi dari sel hidup dengan menggunakan proses biologis yang kompleks. Karena memiliki variasi tinggi yang bersumber dari bahan baku, proses produksi, dan zat aktif berupa protein, obat biosimilar memiliki struktur produk yang jauh lebih kompleks daripada obat generik (Casey, 2016). Dari sisi proses produksi, konsistensi produk sulit dipertahankan dan merupakan tantangan serius. Selain itu, profil keamanan dan efikasi produk akhir dalam beberapa kasus dapat berbeda akibat perubahan kecil dalam produksi, transportasi, atau bahkan penyimpanan (BPOM, 2015). Kondisi inilah yang menyebabkan regulasi terkait penilaian obat biosimilar tidak bisa disamakan dengan regulasi untuk obat molekul kecil (generik). Obat generik identik sama dengan obat originator-nya dalam hal jenis zat aktif dan farmakokinetik karena merupakan molekul tunggal yang berukuran kecil.

Menyadari pentingnya regulasi biosimilar, pada 2005, European Medicines Agency (EMA) menjadi pelopor dengan menerbitkan panduan untuk memperkenalkan prinsip-prinsip biosimilaritas. Sebagai badan kesehatan dunia, World Health Organization (WHO) pun mengikuti langkah EMA dengan menerbitkan panduan dengan prinsip serupa pada 2009. Panduan yang dikeluarkan oleh WHO diharapkan menjadi langkah awal dalam penyusunan prinsip-prinsip evaluasi obat biosimilar yang dapat diterima secara global (Olech, 2016). Amerika Serikat, sebagai salah satu produsen sekaligus pasar obat biosimilar utama, juga merespons perkembangan ini dengan memberlakukan regulasi untuk aplikasi perizinan obat biosimilar pada 2009. Food and Drug Administration (FDA) bahkan menerbitkan beberapa seri panduan pengembangan obat biosimilar yang lebih spesifik yang meliputi farmakologis klinis, aspek ilmiah, mutu, dan eksklusivitas obat originator (Daller, 2016; Olech, 2016). Peran penting regulasi juga disadari oleh banyak negara di berbagai belahan dunia. Jepang, Korea, Kanada, Australia, dan Selandia Baru adalah contoh negara yang memiliki regulasi mengacu pada WHO dan EMA. Negara-negara lain di Asia, tak terkecuali Indonesia, juga menyusun dan memberlakukan regulasi tersebut untuk turut serta dalam

Buku ini tidak diperjualbelikan.

pengembangan dan penggunaan obat biosimilar bagi kepentingan masyarakat dan kemajuan ekonomi nasional.

## **B. Prinsip-Prinsip dalam Produksi Obat Biosimilar**

Sebelum membahas regulasi obat biosimilar, prinsip-prinsip dalam proses produksi perlu diketahui karena menjadi kunci dalam menghasilkan obat biosimilar yang memiliki derajat kemiripan tinggi. Perusahaan yang akan mengembangkan dan memproduksi obat biosimilar menghadapi beberapa tantangan. Kemampuan untuk membuat obat biologi rekombinan merupakan tantangan awal yang harus dihadapi (Schiestl, 2011). Setiap perusahaan yang mampu mengembangkan dan memproduksi obat biologi rekombinan yang aman dan efektif sebenarnya telah memiliki modal awal untuk memproduksi obat biosimilar. Tantangan berikutnya adalah bagaimana menghasilkan produk yang memiliki mutu konsisten dan semirip mungkin dengan obat originator. Hambatan pertama yang harus diatasi dalam menjawab tantangan ini terkait *reverse-engineer* untuk mengembangkan proses produksi (Al-Sabbagh dkk., 2016). Dalam melakukan *reverse-engineer*, profil mutu obat originator harus diperoleh. Profil ini merupakan landasan bagi pengembangan obat biosimilar dari obat originator. Pada umumnya, data karakteristik produk dan proses produksi yang rinci dirahasiakan oleh pemegang lisensi (CHMP-EMA, 2014b). Oleh karena itu, profil tersebut biasanya diperoleh dari informasi yang dipublikasikan serta karakterisasi obat originator secara lengkap dengan berbagai metode analisis.

Tantangan dari sisi proses produksi dijawab dengan menerapkan prinsip *Good Manufacturing Practice* (GMP). Terkait GMP, panduan seperti *ICH guidance for industry Q7 (A) Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients* (ICH Q7A) dapat dijadikan acuan. Dengan menerapkan prinsip tersebut, proses produksi diharapkan menghasilkan produk dengan mutu yang konsisten dan perbedaan antara obat biosimilar dan obat originator menjadi sekecil mungkin. Derajat kemiripan yang tinggi dapat meminimalisir kebutuhan uji klinis dan dampak yang ditimbulkan obat terkait keamanan

klinis serta efikasi (WHO, 2009). Untuk menjamin mutu, karakterisasi obat originator dan proses produksi obat biosimilar harus dijalankan dengan menggunakan pengetahuan dan teknologi mutakhir. Selain itu, manajemen risiko dan sistem mutu yang efektif perlu diterapkan dalam proses produksi (USFDA, 2015b).

Selama proses produksi, biasanya dilakukan perubahan pada beberapa komponen proses. Produsen harus mengetahui dampak yang ditimbulkan pada aspek mutu, keamanan, dan efikasi jika perubahan dilakukan terdapat salah satu atau beberapa komponen, seperti sel inang, formulasi, dan sistem enkapsulasi/kontainer (WHO, 2009). Penggunaan sel inang atau *expression construct* yang berbeda dari obat originator dapat berpengaruh pada jenis proses yang dibutuhkan, kadar ketidakmurnian, dan kontaminan. Perbedaan kecil yang tidak mengubah performa produk, contohnya keragaman gugus atom C pada *lysine* dari antibodi monoklonal, dapat diterima jika disertai alasan dan penjelasan kuat. Pedoman khusus untuk sistem ekspresi perlu dijadikan dasar, seperti *ICH Guidance for Industry Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products (ICH Q5B)* (USFDA, 2015b). Jika perubahan dilakukan dalam proses produksi, uji komparasi antara obat biosimilar dan originator harus dilakukan, dengan mengacu pada *ICH guidance for industry Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process (ICH Q5E)* (CHMP-EMA, 2014b).

Pada saat mengajukan perizinan obat biosimilar, pemohon harus menyediakan data-data proses produksi yang lengkap sesuai regulasi di negara terkait. WHO menyatakan bahwa data-data proses produksi yang harus disediakan mencakup data-data vektor ekspresi, bank sel, kultur sel/fermentasi, pemurnian produk, modifikasi reaksi, dan sistem kontainer produk. Di samping itu, data-data eksperimen terkait validasi dosis, formulasi, dan sistem kontainer produk juga harus terdokumentasi (WHO, 2009). Skala produksi komersial sangat direkomendasikan untuk digunakan dalam memperoleh data mutu, keamanan, dan efikasi yang akan diajukan dalam perizinan. Skala tersebut lebih mewakili kondisi profil produk sebenarnya yang akan

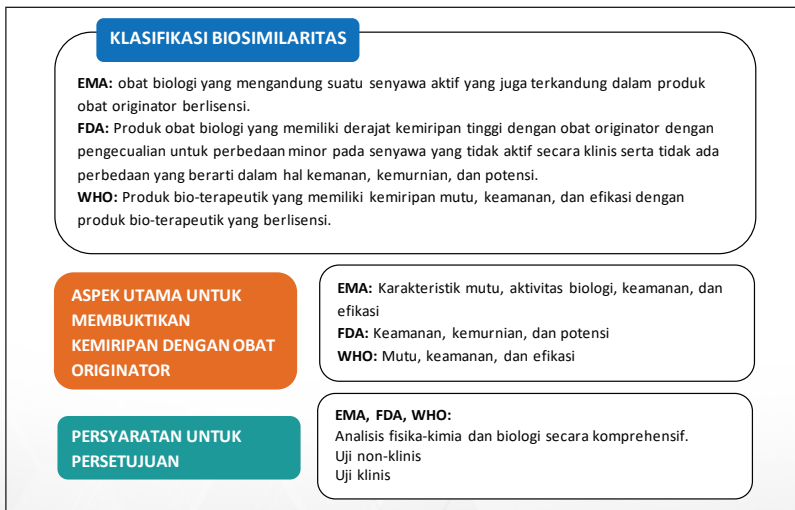
Buku ini tidak diperjualbelikan.



dipasarkan (CHMP-EMA, 2014b). Di samping itu, stabilitas obat biosimilar harus diketahui. Uji stabilitas dapat dilakukan dengan mengacu pada *ICH Guidance for Industry Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products* (ICH Q5C) (CHMP-EMA, 2014b).

### C. Sekilas Mengenai Regulasi Biosimilar Mancanegara

Regulasi yang dikeluarkan oleh EMA, WHO, dan FDA dijadikan acuan oleh beberapa negara lain. Regulasi-regulasi tersebut memiliki sedikit perbedaan dalam hal ruang lingkup, karakteristik obat originator, dan paket data yang diperlukan untuk evaluasi obat biosimilar. Namun, pada dasarnya, regulasi-regulasi obat biosimilar tersebut memiliki kesamaan prinsip (Tsuruta dkk., 2015), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Pendekatan secara bertahap untuk membuktikan biosimilaritas menjadi dasar dalam regulasi WHO. Hal yang serupa



Sumber: Dimodifikasi dari Khraishi dkk. (2016)

**Gambar 2.2** Proses persetujuan obat biosimilar menurut EMA, FDA, dan WHO.

juga diberlakukan oleh EMA dan FDA. Tahapan tersebut dimulai dari karakterisasi mutu, evaluasi nonklinis, dan klinis. Jumlah data uji nonklinis dan klinis yang diperlukan ditentukan kasus per kasus dan tergantung pada kelas produk (Olech, 2016).

### 1. Regulasi EMA, WHO, dan FDA

EMA dengan kantor pusat di London adalah sebuah regulator untuk kawasan Uni Eropa dan menjadi pionir dalam mengesahkan dan menerbitkan panduan untuk persetujuan obat biosimilar. Panduan pertama, *Guideline on Similar Biological Medicinal Products*, berlaku mulai tanggal 30 Oktober 2005, kemudian revisi pertama diberlakukan sejak 30 April 2015 (CHMP-EMA, 2014a). FDA adalah regulator biosimilar di Amerika Serikat, berkedudukan di Maryland. Di Amerika Serikat, proses perizinan produk biosimilar diatur dalam Bagian 7002 dari *Patient Protection and Affordable Care (PPAC) Act* atau dikenal juga sebagai *Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009*. FDA dan EMA juga memberlakukan beberapa pedoman untuk mendukung penerapan dari panduan umum obat biosimilar (Tabel 2.1, Tabel 2.2). WHO yang berkedudukan di Jenewa, Swiss, menerbitkan *Guidelines for Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs)* pada Oktober 2009 melalui Expert Committee on Biological Standardization. Panduan dari WHO diharapkan dapat memberikan prinsip-prinsip yang dapat diterima secara global untuk izin edar obat biosimilar. Regulator di setiap negara dapat mengadopsi sebagian atau keseluruhan dari panduan WHO tersebut atau menggunakannya sebagai dasar penyusunan regulasi. Pada banyak adopsi, proses perizinan dilakukan kasus per kasus oleh regulator nasional dengan jumlah persyaratan data yang bervariasi (WHO, 2009). Selain menerbitkan panduan umum untuk obat biosimilar, WHO juga menyusun panduan penamaan produk biologi dan bioteknologi yang dapat dijadikan acuan global yaitu, *International Non-proprietary Names (INN) for Biological and Biotechnological Substances* (WHO, 2016).

Secara prinsip, baik EMA, FDA, maupun WHO memberikan panduan langkah-langkah yang serupa untuk mengembangkan obat



**Tabel 2.1** Panduan-panduan terkait biosimilar yang diberlakukan oleh EMA.

Cakupan/Tema	Judul Panduan	Tanggal Terbit
Mutu	<i>Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substances: Quality Issues .</i>	1 Desember 2014 (revisi)
Nonklinis dan Klinis	<i>Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues.</i>	1 Juli 2015 (revisi)
Tanya jawab Terkait Obat Biosimilar	<i>Questions and Answers on Biosimilar Medicines (Similar Biological Medicinal Products).</i>	27 September 2012

Sumber: CHMP-EMA (2012a); CHMP-EMA (2014b); CHMP-EMA (2015d).

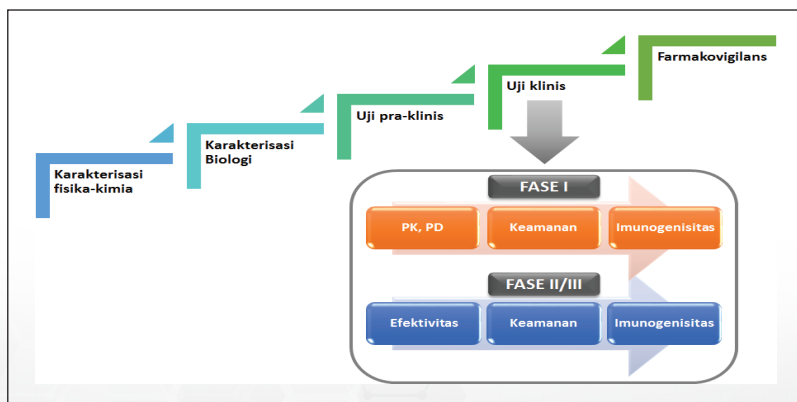
**Tabel 2.2** Panduan-panduan terkait biosimilar yang diberlakukan oleh FDA.

Cakupan/Tema	Judul Panduan	Tanggal Terbit
Mutu	<i>Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product: Guidance for Industry.</i>	April 2015
Farmakologis Klinis	<i>Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product: Guidance for Industry.</i>	Desember 2016
Eksklusivitas Obat originator	<i>Guidance for Industry Reference Product Exclusivity for Biological Products Filed Under Section 351(a) of the PHS Act.</i>	Agustus 2014 (rancangan)
<i>Interchangeability</i>	<i>Considerations in Demonstrating Interchangeability With a Reference Product: Guidance for Industry.</i>	Januari 2017 (rancangan)
Tanya jawab Terkait Obat Biosimilar	<i>Biosimilars: Additional Questions and Answers Regarding Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009: Guidance for Industry.</i>	Mei 2015

Sumber: USFDA (2014; 2015a; 2015b; 2016; 2017b).

biosimilar. Langkah-langkah tersebut dilakukan secara bertahap dengan setiap tahapan menjadi landasan bagi tahapan berikutnya. Pengembangan obat biosimilar terdiri dari 5 tahapan utama, meliputi karakterisasi fisika-kimia, karakterisasi biologi, uji nonklinis pada hewan, uji klinis pada manusia, dan farmakovigilans.

Farmakovigilans merupakan kegiatan yang berkaitan dengan penemuan, penilaian, pemahaman, dan pencegahan terhadap efek samping atau setiap masalah terkait obat lain. Tahapan uji klinis dapat dibagi lagi menjadi fase awal (fase I) dan fase akhir (fase II/III). Pada fase awal, dilakukan uji farmakokinetik (pharmaco kinetics/PK), uji farmakodinamik (pharmaco dynamic/PD), dan keamanan. Pada fase ini, keamanan dititikberatkan pada imunogenisitas atau kemampuan suatu zat untuk memicu respons atau reaksi kekebalan (misalnya menghasilkan antibodi spesifik, respons sel T, reaksi alergi, atau anafilaksis). Uji PK digunakan untuk mengukur bagaimana cara tubuh bereaksi terhadap obat yang diberikan, meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi/ekskresi. Uji PD digunakan untuk mengukur bagaimana cara obat bereaksi terhadap tubuh, yang mencakup efek biokimia dan fisiologi. Pada uji klinis fase akhir, dilakukan uji untuk membuktikan efektivitas dan keamanan pada manusia (Li dkk., 2015). Gambar 2.3 menggambarkan tahapan uji biosimilar.



Sumber: Dimodifikasi dari Li dkk. (2015)

**Gambar 2.3** Pengembangan obat biosimilar secara bertahap dengan bukti kemiripan dari hasil evaluasi pada suatu tahapan menjadi dasar untuk merancang evaluasi tahapan selanjutnya.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Sejak memberlakukan regulasi obat biosimilar pada 2005–2017, EMA telah memberikan persetujuan terhadap 28 obat biosimilar (Siegel & Royzman, 2017). Obat biosimilar pertama yang mendapat izin adalah Omnitrope pada 2006 yang diproduksi oleh Perusahaan Sandoz. Omnitrope memiliki zat aktif somatotropin, yang merupakan hormon pertumbuhan dan salah satunya digunakan untuk memperbaiki pertumbuhan anak-anak yang terganggu akibat penyakit genetik, seperti sindrom Prader-Will dan sindrom Turner. Beberapa obat biosimilar yang mendapat lisensi oleh EMA hingga tahun 2017 dapat dilihat pada Tabel 2.3. Sementara itu, obat biosimilar pertama yang disetujui US FDA adalah Zarxio, diproduksi oleh Perusahaan Sandoz dan disetujui oleh FDA pada 2015. Zarxio memiliki senyawa aktif filgrastim yang digunakan dalam terapi kanker, hematopoietic, transplantasi sel punca, dan terapi neutropenia. Hingga tahun 2020, FDA sudah memberikan izin pada 29 obat biosimilar (USFDA, 2020). Tabel 2.4 memperlihatkan data obat biosimilar yang mendapat lisensi oleh USFDA hingga tahun 2017.

**Tabel 2.3** Obat Biosimilar yang Mendapatkan Lisensi oleh EMA Hingga Tahun 2017

No.	Kategori	Area Terapeutik	Biosimilar dan Tahun Perizinannya
1	Epoetin	Anemia, gagal ginjal, kanker	Abseamed (2007), Binocrit (2007), Epoetin Alfa Hexal (2007), Retacrit (2007), Silapo (2007)
2	Filgrastim	Kanker, Hematopoietic, transplantasi sel punca, Neutropenia	Accofil (2014), Filgrastim Hexal (2009), Grastofil (2013), Nivestim (2010), Ratiograstim (2008), Teva-grastim (2008), Zarzio (2009)
3	Follitropins	Anovulation	Bemfola (2014), Ovaleap (2013)

No.	Kategori	Area Terapeutik	Biosimilar dan Tahun Perizinannya
4	Hormon pertumbuhan	Dwarfism, Pituitary, Prader-Willi Syndrome, Turner Syndrome	Omnitrope (2006)
5	Insulin	Diabetes mellitus	Abasaglar (2014), Lusduna (2017)
6	Low-Molecular Weight Heparins	Anticoagulant	Inhixa (2016), Thorinane (2016)
7	Monoclonal Antibodies	Adalimumab: Rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis/ enthesitis-related arthritis/psoriatic arthritis/ axial podylo arthritis/ ankylosing spondylitis/ psoriasis/ Crohn's disease/ulcerative colitis Infliximab: Arthritis, Psoriatic Arthritis, Rheumatoid Colitis, Ulcerative Crohn Disease Psoriasis Spondylitis, Ankylosing	Amgevita (2017); Solymbic (2017); Flixabi (2016); Inflectra (2013); Remsima (2013); Truxima (2017)
8	Parathyroid Hormone Fragment	Osteoporosis	Movymia (2017); Terrosa (2017)
9	Fusion Proteins	Rheumatoid arthritis, plaque psoriasis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, polyarticular juvenile idiopathic arthritis	Benepali (2016)

Sumber: Siegel & Royzman (2017)

**Tabel 2.4** Obat Biosimilar yang Mendapatkan Lisensi oleh USFDA Hingga Tahun 2017

No.	Kategori	Area Terapeutik	Biosimilar/zat aktif/ tahun Perizinan
1	Filgrastims	Kanker, Hematopoietic, transplantasi sel punca, neutropenia	Zarxio-filgrastim (2015)
2	Monoclonal Antibodies	Adalimumab: Rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis/enthesitis-related arthritis/psoriatic arthritis/axial podylo arthritis/ankylosing spondylitis/psoriasis/Crohn's disease/ulcerative colitis Infliximab: Arthritis, Psoriatic Arthritis, Rheumatoid Colitis, Ulcerative Crohn Disease Psoriasis Spondylitis, Ankylosing Bevacizumab: Carcinoma of the colon or rectum/breast cancer/Lung cancer/renal-cell cancer/Epithelial ovarian, fallopian tube, primary peritoneal cancer/carcinoma of the cervix Trastuzumab: Breast cancer/Gastric cancer	Inflectra-Infliximab (2016); Amjevita-Adalimumab (2016); Renflexis-Infliximab (2017); Cyltezo-Adalimumab (2017); Mvasi-Bevacizumab (2017); Ogivri- Trastuzumab (2017); Ixifi- Infliximab (2017)
3	Fusion Proteins	Rheumatoid arthritis, plaque psoriasis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, polyarticular juvenile idiopathic arthritis	Erelzi-etanercept (2016)

Sumber: Siegel & Royzman (2017)

## 2. Regulasi di Beberapa Negara Lainnya

Negara-negara, seperti Jepang, Korea, Kanada, Australia, dan Selandia Baru pada umumnya mengacu pada WHO dan EMA (Olech, 2016). Walaupun beberapa perbedaan tetap ada di antara regulasi negara-negara tersebut, secara prinsip mereka memiliki beberapa kesamaan. Pertama, penggunaan dosis dan *dosing regimen* yang sama dengan obat originator. *Dosing regimen* merupakan penetapan pemberian

obat menyangkut formulasi, jalur pemberian, dosis, interval dosis, dan durasi perlakuan. Kedua, evaluasi biosimilar berdasarkan uji komparatif untuk membuktikan kemiripan/biosimilaritas. Derajat kemiripan yang tinggi dapat mengurangi jumlah data uji klinis yang harus disertakan untuk perizinan. Ketiga, pada setiap tahap evaluasi, pengujian yang ekstensif diperlukan untuk membuktikan kemiripan mutu, efikasi, dan keamanan (GaBI, 2014).

Negara-negara di Asia Tenggara, seperti Indonesia, Malaysia, Singapura, dan Thailand juga telah memiliki regulasi untuk pengembangan dan perizinan obat biosimilar. Regulasi produk obat biosimilar di Indonesia dikeluarkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) pada 15 Desember 2015, yaitu Peraturan Kepala BPOM RI No. 17 Tahun 2015 tentang Pedoman Penilaian Produk Biosimilar (BPOM, 2015). Panduan obat biosimilar di Malaysia dikeluarkan pada Agustus 2008 di bawah pengawasan National Pharmaceutical Control Bureau, Ministry of Health Malaysia. Panduan tersebut mengacu pada regulasi EMA yang secara komprehensif diadaptasi oleh Malaysia untuk penggunaan produk obat biosimilar. Pada 2010, satu obat biosimilar disetujui oleh Malaysia dengan nama dagang SciTropin A dengan kandungan Somatropin yang diproduksi oleh Sandoz GmbH, Austria, dan dikemas ulang di Singapura. Produk tersebut dikenal luas dengan merek Omnitrope di beberapa negara (Abas, 2011). Singapura memiliki lembaga perizinan yang tugasnya melakukan regulasi produk medis. The Health Products Regulation Group (HPRG) di lembaga Health Sciences Authority (HSA) secara khusus mengurus regulasi produk kesehatan di Singapura. HPRG memastikan produk medis yang ada memiliki kualitas, keamanan, dan potensi yang telah terstandar. *The Guidance on Registration of Similar Biological (Biosimilar) Products in Singapore* telah dirumuskan bersama dengan industri mulai 1 Agustus 2009 yang mengacu pada panduan EMA (Poh & Tam, 2011; Wang & Chow, 2012). Sementara itu, pada 2010 regulator di Thailand melakukan pembaruan panduan obat biologis agar sejalan dengan regulasi di WHO. Panduan tersebut akhirnya menjadi pedoman untuk obat biosimilar di Thailand pada 2013 (Welch, 2017).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Regulasi produk obat biosimilar di wilayah Amerika Latin (Selatan) dikembangkan di beberapa negara di wilayah tersebut guna meningkatkan kualitas standar dan keamanan produk. Panduan WHO banyak diadopsi di beberapa negara di wilayah Amerika Latin, baik dalam segi prinsip obat biosimilar hingga proses produksi dan pengembangannya (Azevedo dkk., 2012). Negara yang sudah memiliki regulasi di antaranya (1) Brazil (tahun 2010) dengan lembaga Agencia Nacional de Vigilancia; (2) Meksiko (tahun 2009) melalui Comision Federal para la Proteccion cintra Riesgos Sanitarios; (3) Chile pada 2011 mengeluarkan panduan produk obat biosimilar melalui Chile's Agencia Nacional de Medicamentos; (4) Venezuela, sejak tahun 2000 memiliki regulasi produk obat biosimilar yang dikendalikan oleh Ministerio del Poder Popular para la Salud; (5) Argentina mengeluarkan regulasi produk obat biosimilar sejak 2002 yang juga merupakan negara utama yang memproduksi produk obat biosimilar di wilayah Amerika Latin di bawah kendali The Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologia Medica.

Beberapa negara di benua Afrika telah memiliki regulasi produk obat biosimilar di bawah pengawasan pemerintah masing-masing, misalnya Afrika Selatan dan Mesir (Kumar dkk., 2015). Sejak Mei 2012, Afrika Selatan memiliki panduan obat biosimilar yang merujuk pada EMA. Panduan ini diterbitkan oleh The Medicine Control Council (MCC) of Department of Health of Republic of South Africa. Panduan produk obat biosimilar yang diterapkan di Mesir merujuk pada EMA, ICH, WHO, FDA, serta panduan dari India. Panduan tersebut diterbitkan pada 20 Januari 2013 dan diberlakukan efektif pada 29 September 2014 oleh The Egyptian Drug Authority (EDA), bersama dengan Central Administration for Pharmaceutical Affair (CAPA) dan National Organization for Research and Control of Biologics (NORCB).

Negara-negara di dunia memerlukan waktu yang berbeda-beda dalam mengikuti jejak WHO maupun EMA untuk memberlakukan regulasi obat biosimilar. Gambar 2.4 merupakan peta sejumlah negara





Sumber: Boren dkk. (2015); Gabi (2013, 2015); Mueller (2015); Tom-B (2011); Welch (2017)

**Gambar 2.4** Negara-negara di dunia yang memiliki regulasi obat biosimilar dan tahun penerbitan regulasi di masing-masing negara.

di dunia, termasuk WHO dan Uni Eropa, yang telah memiliki regulasi terkait dengan obat biosimilar.

#### D. Prinsip-Prinsip Utama dalam Pengembangan dan Perizinan Obat Biosimilar

Obat biosimilar layak untuk memperoleh lisensi apabila memiliki bukti kemiripan dengan obat originator pada parameter mutu, non-klinis, klinis, dan farmakovigilans. Satu paket data lengkap untuk setiap parameter tersebut harus disertakan pada saat pengajuan izin edar. Data-data tersebut diperoleh dengan melakukan serangkaian pengujian/evaluasi secara bertahap untuk membandingkan obat biosimilar dengan obat originator. Rangkaian evaluasi dimulai dari analisis karakteristik mutu, kemudian uji nonklinis, dan klinis. Hasil setiap tahapan diperlukan sebagai dasar pertimbangan untuk menetapkan jenis dan jumlah tahapan selanjutnya yang diperlukan (WHO, 2009).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## 1. Mutu

Perbandingan aspek mutu sangat penting untuk membuktikan seberapa besar kemiripan antara molekul obat biosimilar dan obat originator. Hasil evaluasi dapat digunakan untuk memperkirakan efek keamanan dan efikasi, dibandingkan obat originator. Jika kemiripan efek tersebut tinggi, uji nonklinis dan klinis mungkin tidak harus dilakukan secara keseluruhan sehingga menghemat waktu pengembangan dan biaya. Karakteristik mutu tidak terlepas dari proses produksi, sebagaimana telah dibahas pada subbab sebelumnya. Di samping itu, pemilihan obat originator juga sangat terkait erat dengan aspek mutu.

Kriteria pemilihan obat originator sangat vital karena kemiripan dengan obat originator dalam hal profil mutu, keamanan, dan efikasi menjadi target yang harus dicapai. Obat originator harus sudah beredar dengan rentang waktu dan volume yang cukup karena menyangkut keamanan dan efikasi. Jika hanya beredar di negara lain, obat originator harus mendapatkan lisensi dari regulator yang telah menerapkan regulasi yang sudah mapan, dan regulator tersebut berpengalaman dalam mengevaluasi obat biologi serta melakukan pemantauan pasca-pemasaran. Selama evaluasi mutu, nonklinis, dan klinis, obat originator yang digunakan harus sama. Senyawa obat dalam obat biosimilar pun harus serupa, begitu pula dengan dosis dan jalur pemberian obat harus sama dengan obat originator. Suatu obat biosimilar tidak boleh dijadikan rujukan bagi obat biosimilar lainnya (WHO, 2009). EMA mensyaratkan bahwa obat originator harus diidentifikasi dengan jelas, meliputi produsen, merek, bentuk sediaan farmasi, formulasi, kekuatan, jumlah *batch*, umur *batch*, nomor lot, dan peruntukan. Baik EMA maupun FDA menyatakan bahwa obat originator yang merupakan obat biologis berlisensi tidak dapat digantikan oleh standar acuan. Namun, dalam rangka pengendalian proses produksi maupun standardisasi metode, standar acuan tersebut dapat digunakan (CHMP-EMA, 2014b; USFDA, 2015b).

Parameter dalam uji komparasi mutu pada dasarnya meliputi fisika-kimia, aktivitas biologis, imunokimia, kemurnian, dan stabilitas.

Ketiga regulasi yang menjadi acuan dunia memberikan panduan yang hampir sama terkait uji perbandingan mutu (Tabel 2.5).

**Tabel 2.5** Parameter mutu dalam evaluasi obat biosimilar sesuai regulasi dari EMA, WHO, dan FDA.

Parameter/ Uji	Penjelasan
Fisika-kimia	Karakterisasi fisik-kimia ditujukan untuk menentukan komposisi, sifat fisik, struktur primer/sekunder/tersier/dan seterusnya. Sekuen asam amino obat biosimilar harus sama dengan obat originator. Jika ada modifikasi atau keragaman terkait faktor intrinsik atau sistem ekspresi harus dijelaskan/dikuantifikasi. Uji perbandingan juga meliputi karakterisasi modifikasi pasca-translasi dan struktur karbohidrat. Untuk mengetahui sifat fisika-kimia secara lebih lengkap, direkomendasikan menggunakan lebih dari satu metode analisis.
Biologi/ Aktivitas fungsional	Karakterisasi biologis ditujukan untuk mengukur kemampuan dalam menimbulkan efek biologis. <i>Assay</i> biologis digunakan untuk menentukan ukuran kualitatif suatu protein (aktif/tidak aktif) dan ukuran kuantitatif (potensi), dinyatakan dalam unit aktivitas (unit/mg protein). Beberapa <i>assay</i> dapat digunakan sesuai dengan sifat biologis produk, seperti pengujian ligan/reseptor binding, pengujian enzimatik, pengujian berbasis sel, dan pengujian fungsional. Efek netralisasi oleh antibodi yang terbentuk setelah pemberian obat terhadap aktivitas biologis dari obat atau lainnya harus dikuantifikasi.
Imuno- kimia	Analisis dilakukan pada sifat khusus protein seperti ikatan dengan reseptor yang merupakan fungsi inheren dari protein. Karakterisasi antibodi/produk berbasis antibodi. Spesifitas, afinitas, kinetika ikatan, aktivitas fungsional harus dapat dibandingkan. Kinetika dan termodinamika ikatan dapat dianalisis dengan berbagai metode, seperti <i>surface plasmon resonance</i> , <i>microcalorimetry</i> , atau <i>classical scatchard analysis</i> .
Kemurnian dan ketidak- murnian	Ketidakmurnian terkait proses yang diukur dapat bersumber dari DNA sel inang, protein sel inang, kultur sel (antibiotik, komponen media), proses hilir (reagen, sisa pelarut, zat terlarut, endotoksin). Jika terdapat perbedaan nyata, potensi dampak keamanan, efikasi, dan imunogenisitas harus dievaluasi.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Parameter/ Uji	Penjelasan
Stabilitas	Stabilitas diuji dengan metode percepatan degradasi produk di bawah pengaruh kondisi seperti suhu tinggi, <i>freeze thaw</i> , cahaya, dan agitasi. Data stabilitas yang diperoleh melalui uji pada kondisi dan waktu yang riil diperlukan untuk pengajuan <i>shelf life</i> (masa penyimpanan hingga produk terdegradasi sendiri) serta untuk menetapkan kondisi saat transportasi dan penyimpanan.
Kuantitas	Kuantitas harus diukur dengan <i>assay</i> yang sesuai dan dinyatakan dalam satuan yang sama dengan obat originator untuk menunjukkan perbandingan kekuatan.

Sumber: WHO (2009), USFDA (2015b), CHMP-EMA (2014a)

## 2. Nonklinis

Evaluasi nonklinis dilakukan untuk mengetahui aspek farmakotoksikologis obat biosimilar dibandingkan dengan obat originator. Data-data dari uji nonklinis diperlukan untuk mencapai target keamanan dan efikasi. PHS Act di Amerika Serikat mensyaratkan bahwa data dari pengujian obat biosimilar pada hewan diperlukan untuk evaluasi keamanan dan membuktikan biosimilaritas (USFDA, 2015c). Uji nonklinis dilakukan dengan menggunakan formulasi obat yang sudah final, yang diperuntukkan bagi uji klinis. Dalam merencanakan pengujian, rujukan yang relevan, seperti *ICH guideline S6 (R1)-pre-clinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals* dapat dijadikan pedoman ) (CHMP-EMA, 2011).

Evaluasi nonklinis bagi obat originator meliputi farmakokinetik, farmakodinamik, dan toksikologis dengan cakupan luas. Namun, persyaratan data uji nonklinis untuk obat biosimilar yang terbukti memiliki kemiripan molekul yang tinggi bisa lebih sedikit karena obat originator sudah memiliki data klinis yang jelas. Data tambahan nonklinis juga diperlukan tergantung pada faktor terkait mutu dan farmako-toksikologis obat biosimilar. Faktor terkait mutu meliputi perbedaan signifikan sistem ekspresi sel, metode purifikasi, serta keberadaan campuran kompleks dari produk dan/atau pengotor terkait proses yang tidak dapat dikarakterisasi dengan baik. Faktor terkait

farmako-toksikologis terdiri dari mekanisme aksi obat yang tidak diketahui atau hanya sedikit dipahami, senyawa obat yang memiliki toksisitas signifikan dan/atau indeks terapeutik sempit, serta data klinis obat originator yang terbatas. Oleh karena itu, cakupan dalam evaluasi nonklinis harus ditentukan kasus per kasus (WHO, 2009). Dalam evaluasi nonklinis, uji *in-vitro* dilakukan terlebih dahulu, kemudian hasilnya menjadi dasar untuk menentukan sejauh mana uji *in-vivo* pada hewan harus dilakukan (CHMP-EMA, 2015c), seperti ditunjukkan pada Tabel 2.6.

**Tabel 2.6** Parameter nonklinis dalam evaluasi obat biosimilar sesuai dengan regulasi dari EMA, WHO, dan FDA.

Parameter/ Uji	Penjelasan
<b><i>In vitro</i></b>	Melakukan <i>assay</i> ikatan reseptor (reseptor, antigen, enzim, dll), <i>assay</i> berbasis sel (proliferasi sel, sitotoksitas). Sebagian data pada umumnya bisa diperoleh dari tahapan uji dengan <i>assay</i> biologi. <i>Assay</i> yang dilakukan harus mencakup keseluruhan rentang farmakologis/toksikologis yang relevan secara klinis pada obat originator.
<b>Penetapan perlu/tidaknya <i>in vivo</i></b>	Uji <i>in-vivo</i> tidak perlu dilakukan jika hasil uji fisika-kimia dan biologi menunjukkan kemiripan yang tinggi, tidak ditemukan masalah terkait aspek mutu, serta hasil uji <i>in-vitro</i> dapat divalidasi dan merefleksikan aktivitas farmakodinamika klinis yang relevan dari obat originator.
<b><i>In vivo</i></b>	Uji dilakukan pada spesies hewan yang relevan. Dengan spesies ini, obat originator dapat menunjukkan aktivitas farmakodinamika dan/atau toksikologis.  Faktor yang harus diperhatikan meliputi: aktivitas biologis/farmakodinamika harus relevan dengan aplikasi klinis; toksisitas nonklinis diukur dengan minimal satu uji toksisitas dosis berulang, mencakup toksiko-kinetika seperti pengukuran respons antibodi, kadar antibodi anti-produk, reaksi silang dengan <i>protein endogenous homolog</i> , dan kapasitas netralisasi produk.  Pengujian dosis tunggal pada hewan dengan parameter PK dan PD dapat mendukung pembuktian derajat kemiripan obat biosimilar. Pengukuran PK dan PD juga dapat disertakan dalam uji toksisitas tunggal pada hewan.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Parameter/ Uji	Penjelasan
<i>In vivo</i>	Evaluasi imunogenisitas pada hewan tidak dapat memprediksi respons imun terhadap produk protein pada manusia. Namun, karena perbedaan proses produksi dapat menyebabkan perbedaan kemurnian yang berdampak pada imunogenisitas, pengukuran respons antibodi pada hewan dapat memberikan informasi yang bermanfaat.

Sumber: WHO (2009), USFDA (2015c), CHMP-EMA (2015d).

### 3. Klinis

Evaluasi klinis pada manusia menggunakan obat biosimilar dilakukan untuk menguji obat biosimilar hasil proses produksi skala komersial/ hasil optimasi akhir. Pada umumnya, proses produksi dioptimasi selama pengembangan obat biosimilar. Jika uji perbandingan tidak dapat dilakukan dengan proses produksi hasil optimasi akhir, justifikasi harus diberikan berdasarkan data yang membandingkan hasil uji PK produk formulasi akhir dan formulasi sebelumnya (CHMP-EMA, 2015c; WHO, 2009).

Uji klinis dilakukan secara bertahap, diawali dengan uji PK, kemudian PD, efikasi, keamanan, dan pada kasus tertentu, diperlukan uji konfirmasi PK/PD, serta imunogenisitas (Tabel 2.7). Perbedaan yang muncul dari setiap tahapan uji harus dijelaskan dan dijustifikasi (CHMP-EMA, 2015c; USFDA, 2016; WHO, 2009). Dalam regulasi FDA, uji PK, PD, dan imunogenisitas klinis sudah cukup untuk membuktikan ada/tidak adanya perbedaan nyata antara obat biosimilar dan obat originator. Namun, jika terdapat perbedaan nyata, uji klinis tambahan harus dilakukan (USFDA, 2015c).

**Tabel 2.7** Parameter klinis dalam evaluasi obat biosimilar sesuai regulasi dari EMA, WHO, dan FDA.

Parameter/Uji	Penjelasan
Farmako Kinetik/ Pharmaco Kinetics/PK	Parameter: absorpsi/ <i>bioavailabilitas</i> , karakteristik eliminasi; rancangan uji: <i>cross-over</i> , paralel; dosis: tunggal/jamak; objek studi: sebaiknya relawan yang sehat jika diketahui tidak ada dampak buruk atau efek farmakologis; kriteria keberterimaan: ditetapkan sebelum uji PK dan dijustifikasi, rentang 80–120% ekuivalensi; jalur pemberian obat: <i>intravenous dan subcutaneous</i> .
Farmako Dinamik/ Pharmaco Dynamic/PD	Parameter: hubungan antara dosis dengan efek yang ditimbulkan. Kemiripan antara obat biosimilar dan obat originator diamati pada bagian yang curam pada grafik hubungan antara dosis dan respons; dosis: tunggal/jamak; penanda (marker) PD: dipilih yang relevan secara klinis.
PK/PD Konfirmatif	Uji klinis konfirmatif tidak harus dilakukan jika hasil dari uji fisika-kimia, struktur, biologi in-vitro, PK pada manusia yang dikombinasikan dengan penanda PD menunjukkan bukti kemiripan yang kuat; dosis: dalam rentang tertentu; kriteria keberterimaan: ditetapkan sebelum uji PK/PD dan dijustifikasi.
Efikasi	Dilakukan dengan cara <i>double-blind</i> atau paling tidak <i>observer-blind</i> untuk mengurangi bias dari pelaku uji; desain tipe ekuivalen lebih direkomendasikan daripada <i>no-inferiority</i> karena lebih memungkinkan untuk melakukan ekstrapolasi efikasi ke indikasi lainnya.  Perhitungan untuk memperkirakan jumlah sampel harus dicantumkan dalam protokol uji. Pemilihan margin atas dan bawah harus dapat dijelaskan secara statistik dan klinis. Terkadang perubahan yang terjadi pada praktik klinis memerlukan perubahan pula pada indikasi terapeutik yang harus diajukan perizinannya. Perubahan indikasi ini harus dibicarakan dengan regulator.
Keamanan	Uji keamanan klinis diperlukan jika data profil keamanan tidak dapat dideduksi dari uji efikasi atau PK/PD konfirmatif. Perbandingan yang diamati meliputi jenis, frekuensi, dan keseriusan dari Kejadian Tidak Diharapkan (KTD) atau reaksi. Produsen obat biosimilar harus memberikan deskripsi tentang isu keamanan yang mungkin timbul yang disebabkan oleh perbedaan dalam proses produksi.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Parameter/Uji	Penjelasan
Imunogenisitas	Uji imunogenisitas harus dilakukan pada manusia karena uji pada hewan umumnya tidak dapat memberikan prediksi respons kekebalan pada manusia. Jika ekstrapolasi efikasi dan keamanan akan dilakukan, imunogenisitas harus dievaluasi pada populasi pasien yang berisiko paling tinggi terhadap respons kekebalan dan KTD terkait kekebalan.
	Periode observasi tergantung pada durasi terapi yang diinginkan serta perkiraan waktu terbentuknya antibodi (misalnya 6–9 bulan untuk somatotropin, dan 6 bulan untuk insulin). Evaluasi imunogenisitas lanjutan pasca-pemasaran mungkin diperlukan karena data yang diperoleh sebelum pengajuan izin edar terbatas. Antibodi terkait KTD yang jarang terjadi mungkin belum terbentuk saat diuji sebelum pemasaran.
Ekstrapolasi data efikasi dan keamanan untuk indikasi klinis lainnya	Ekstrapolasi hanya diperbolehkan untuk indikasi pada obat originator yang sebelumnya telah mendapat perizinan. Jika pada indikasi tertentu dari obat originator belum diuji manfaat klinisnya pasca-pemasaran, produsen dapat mempertimbangkan untuk ekstrapolasi ke indikasi lainnya. Data keamanan dan efikasi dapat diekstrapolasi jika bukti kemiripan sudah ditunjukkan melalui uji fisika-kimia, struktur, fungsional in-vitro, dan uji klinis (efikasi, keamanan, PK/PD). Kemiripan obat biosimilar dengan obat originator harus sudah dibuktikan melalui uji efikasi dan keamanan pada salah satu indikasi.

Sumber: WHO (2009), USFDA (2015c), CHMP-EMA (2015d)

#### 4. Farmakovigilans

Farmakovigilans adalah kegiatan yang ditujukan untuk memantau keamanan klinis obat biosimilar pada semua indikasi yang diizinkan pada periode pasca-pemasaran atau setelah digunakan dalam terapi. Pemantauan tersebut sangat penting karena data dari uji klinis yang diperoleh sebelum perizinan biasanya terbatas dan kemungkinan kecil KTD akan dijumpai pada populasi uji yang terbatas. Oleh karena itu, produsen biosimilar harus mengajukan spesifikasi keamanan dan rencana farmakovigilans bersamaan dengan pengajuan perizinan.



Prinsip-prinsip dalam *ICH efficacy guidelines: Pharmacovigilance planning (E2E)* dapat dijadikan rujukan. Pada saat izin edar diperoleh, produsen harus sudah memiliki sistem untuk farmakovigilans meliputi personel yang berkompeten dan sarana untuk memberikan informasi terjadinya KTD di negara tempat beredar obat biosimilar (CHMP-EMA, 2005; USFDA, 2015c; WHO, 2009). Sistem pemantauan keamanan ini harus dapat membedakan KTD yang disebabkan oleh obat biosimilar atau obat originator, termasuk KTD baru yang disebabkan oleh obat biosimilar, yang sebelumnya tidak pernah terjadi akibat penggunaan obat originator. Laporan keamanan pasca-pemasaran mencakup semua informasi terkait toleransi terhadap produk dan harus dievaluasi, terutama menyangkut frekuensi dan penyebab terjadinya KTD. Selain itu, obat biosimilar yang dipasarkan juga harus mudah ditelusuri identitasnya. Dengan demikian, laporan terkait KTD dari suatu obat biosimilar hendaknya disertai dengan informasi tentang *International Non-proprietary Name* (INN), nama merek (*proprietary*), nama perusahaan, nomor lot, dan negara asal (WHO, 2009).

## E. Regulasi Obat Biosimilar Spesifik

Regulasi biosimilar yang spesifik untuk setiap jenis penyakit dibutuhkan karena profil antarpenderita berbeda. Perbedaan ini menyebabkan parameter yang harus diuji secara nonklinis dan klinis juga berbeda. Dalam hal uji efikasi klinis, misalnya, pemilihan *endpoint* dan *time point* untuk menganalisis *endpoint* suatu obat biosimilar berbeda dengan obat originatornya (CHMP-EMA, 2015b). Jika dibandingkan dengan obat biosimilar untuk jenis penyakit lain, perbedaan bisa lebih banyak. *Endpoint* merupakan suatu kondisi yang timbul pada objek uji baik berupa penyakit, gejala, tanda-tanda, dan abnormalitas setelah mendapat perlakuan uji. Kondisi tersebut menjadi dasar pengambilan keputusan untuk menghentikan uji dan tidak memberikan perlakuan lanjutan (Osakwe, 2016). Oleh karena itu, untuk memberikan panduan yang lebih spesifik, khususnya dalam melakukan uji nonklinis dan klinis, EMA menerbitkan beberapa regulasi obat biosimilar

Buku ini tidak diperjualbelikan.



untuk beberapa jenis penyakit. Regulasi spesifik tersebut mengacu pada *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues* sebagai persyaratan umum.

### 1. G-CSF Rekombinan (rG-CSF)

*Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) merupakan protein polipeptida rantai tunggal yang memiliki 174 asam amino. G-CSF rekombinan yang diproduksi di *E. coli* (filgrastim) dan sel Chinese Hamster Ovary (lenograstim) sudah digunakan secara klinis (CHMP-EMA, 2006a). Pemberian obat G-CSF dilakukan melalui jalur *subcutaneous* dan *intravenous*. G-CSF digunakan mengobati neutropenia (kurangnya konsentrasi sel darah putih/*neutrophils* dan infeksi pada pasien kanker). Neutropenia salah satunya disebabkan oleh pemberian kemoterapi (Bendall & Bradstock, 2014). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guidance on similar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor* (tanggal terbit: 1 Juni 2006).

### 2. Low Molecular Weight Heparin (LMWH)

LMWH yang masuk ke dalam famili *glycosaminoglycans*, merupakan rantai polisakarida yang tidak bercabang, terdiri dari unit-unit disakarida. LMWH diaplikasikan dalam pengobatan *thromboembolism prophylaxis* pada pasien yang menjalani pembedahan. Di dalam tubuh, heparin diproduksi dalam rongga sel *mast*, yakni salah satu jenis sel darah putih. sel *mast* memiliki peran penting dalam menunjang sistem kekebalan/pertahanan tubuh dan penyembuhan luka. Di luar tubuh, heparin diproduksi dengan depolimerisasi secara kimia maupun enzimatis dari *unfractionated heparin* (UFH) yang bersumber dari hewan. Setelah proses depolimerisasi, LMWH umumnya tersusun oleh kurang dari 18 unit monosakarida. Saat ini, obat LMWH yang berlisensi diproduksi dari *porcine intestinal mucosa* (CHMP-EMA, 2017; Minghetti dkk., 2013). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low molecular-weight-heparins* (tanggal terbit: 1 Juni 2017).

### 3. *Human Insulin* dan Analog Insulin

*Human insulin* merupakan molekul yang terdiri dari 51 asam amino, sedangkan insulin analog memiliki struktur molekul yang sudah mengalami substitusi asam amino atau perubahan kimia lain, misalnya penambahan molekul asam lemak. Insulin diberikan kepada pasien penderita diabetes melalui jalur *subcutaneous* dan *intravenous*. Bentuk sediaan obat insulin ada empat jenis sesuai dengan kecepatan penyerapan dalam jaringan tubuh dan aliran darah, yaitu *rapid-acting*, *short-acting*, *intermediate-acting*, dan *long-acting*. *Human insulin* terlarut adalah contoh dari *short-acting insulin* (CHMP-EMA, 2015e). Insulin jenis *rapid* dan *short-acting* dapat berpindah dengan cepat dari jaringan lemak (*subcutaneous*) ke aliran darah. Insulin jenis *rapid* dan *short-acting* digunakan untuk mengontrol gula darah pada saat makan dan mengendalikan gula darah yang tinggi. Sementara itu, insulin jenis *intermediate* dan *long-acting* memiliki waktu penyerapan lebih lama dan lebih lama juga berada dalam tubuh. Insulin tersebut digunakan untuk mengontrol gula darah *overnight*, saat berpuasa, dan di antara waktu makan. Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues* (tanggal terbit: 1 September 2015).

### 4. Interferon Beta (IFN- $\beta$ )

Interferon beta diberikan untuk terapi penderita *multiple sclerosis*. Penyakit ini merupakan penyakit autoimun yang menyerang sistem saraf pusat, yaitu otak, saraf mata, dan saraf tulang belakang. Terdapat dua jenis interferon beta, yaitu IFN- $\beta$ -1a dan IFN- $\beta$ -1b. IFN- $\beta$ -1a merupakan rantai polipeptida dengan glikosilasi tunggal yang terdiri dari 166 asam amino, sedangkan IFN- $\beta$ -1b terdiri dari 165 asam amino. IFN- $\beta$  diberikan kepada pasien melalui jalur *subcutaneous* dan *intramuscular* (CHMP-EMA, 2013c). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta* (tanggal terbit: 1 September 2013).

## 5. Antibodi Monoklonal (mAb)

Sebagaimana struktur protein pada umumnya, antibodi monoklonal memiliki struktur yang kompleks dan di dalam molekul bisa terdapat beberapa bagian (domain) yang memiliki fungsi berbeda. Antibodi monoklonal dihasilkan oleh sistem kekebalan tubuh sebagai respons terhadap zat-zat asing. Antigen atau zat asing tersebut dapat berupa bakteri, fungi, virus, dan zat kimia. Antibodi monoklonal memiliki banyak aplikasi dalam *immunotherapy* (pengobatan terhadap penyakit dengan menggunakan mAb dengan target antigen spesifik dalam tubuh). Penggunaan mAb meliputi terapi kanker, *rheumatoid arthritis*, *multiple sclerosis*, penyakit jantung, *systemic lupus erythematosus*, penyakit *crohn's*, *ulcerative colitis*, dan psoriasis (CHMP-EMA, 2012b; Meiller, 2016; Ogbru, t.t.). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah: *Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies-non-clinical and clinical issues* (tanggal terbit: 1 Desember 2012).

## 6. Human Erythropoietin (H-EPO)

*Human erythropoietin* adalah glikoprotein yang tersusun dari 165 asam amino. Protein ini diproduksi dalam ginjal dan berfungsi sebagai pemicu produksi sel darah merah. Untuk keperluan terapi klinis, *erythropoietin* diproduksi dengan teknik DNA rekombinan menggunakan sel mamalia sebagai sistem ekspresinya. *Erythropoietin* rekombinan disebut juga epoetin. Perbedaan antara *human erythropoietin* dan epoetin ada pada pola glikosilasi, sedangkan sekuen asam amino keduanya sama. Epoetin digunakan dalam terapi anemia yang disebabkan oleh penyakit ginjal kronis atau kondisi lainnya, seperti kemoterapi pada penderita kanker (CHMP-EMA, 2010b; Grampp dkk., 2018). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins* (tanggal terbit: revisi I pada 1 Oktober 2010).

## 7. Follicle-Stimulating Hormone (FSH)

FSH tergolong dalam hormon yang merupakan molekul glikoprotein, dihasilkan oleh kelenjar pituitari. Struktur molekul FSH merupakan

hetero dimer yang terdiri dari dua subunit yang mengandung oligosakarida. Sub-unit alfa tersusun atas 92 asam amino, sedangkan sub-unit beta memiliki 111 asam amino. Peran FSH adalah mengatur fungsi reproduksi bagi laki-laki maupun perempuan. Hormon ini diberikan kepada pasien melalui jalur *subcutaneous* dan terkadang melalui *intra-muscular*. FSH rekombinan digunakan untuk merangsang pertumbuhan dan pendarikan *ovarian follicle* untuk perempuan, sedangkan pada laki-laki FSH digunakan untuk menimbulkan dan mempertahankan spermatogenesis (CHMP-EMA, 2013a). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH)* (tanggal terbit: 1 September 2013).

## 8. Somatropin

Somatotropin merupakan hormon pertumbuhan rekombinan (rhGH) yang diproduksi menggunakan sel inang dari *E. coli*, mamalia, dan *yeast*. Di dalam tubuh, hormon pertumbuhan (human Growth Hormone, hGH) dihasilkan dalam kelenjar pituitari anterior. Molekul hGH tersusun atas 191 asam amino yang membentuk rantai tunggal non-glikosilasi. Polipeptida ini berukuran 22 kilo Dalton (kD). Somatropin memiliki rentang terapi yang lebar pada anak-anak yang sedang dalam masa pertumbuhan. Namun, manusia dewasa lebih sensitif terhadap efek samping tertentu. Somatropin yang sudah berlisensi digunakan untuk normalisasi atau meningkatkan pertumbuhan linier dan/atau komposisi tubuh pada pasien yang kekurangan hormon pertumbuhan. Pada kondisi tertentu, somatropin juga diperuntukkan bagi pasien yang memiliki hGH normal (CHMP-EMA, 2006b). Panduan yang diterbitkan oleh EMA untuk obat biosimilar ini adalah *Guidance on similar medicinal products containing somatropin* (tanggal terbit: 1 Juni 2006). Parameter-parameter uji yang diperlukan untuk evaluasi obat biosimilar berdasarkan regulasi spesifik dari EMA dirangkum pada Tabel 2.8.

**Tabel 2.8** Parameter-parameter yang diperlukan untuk evaluasi obat biosimilar berdasarkan regulasi spesifik dari EMA.

Biosimilar	Uji nonklinis			Uji klinis				Farmakovigilans
	In-vitro	In-vivo	Tosikologi	PK	PD	Efikasi	Keamanan	
r G-CSF	√	√	√	√	√	√	√	√
LMWH	√	√ (a)	√	√ (d)	√	√ (f)	√	√
Insulin	√	√ (b)	√ (c)	√	√	√ (e)	√	√
IFN-β	√	√ (a)	-	√	√	√	√	√
mAb	√	√ (a)	-	√	√	√	√	√
EPO	√	√	√	√	√	√	√	√
FSH	√	√	√ (c)	√	√	√	√	√
Somatropin	√	√	√	√	√	√	√	√

Ket.: (a) uji *in vivo* tidak diperlukan jika karakterisasi fisika-kimia dan biologi menggunakan metode mutakhir dan uji *in vivo* telah membuktikan biosimilaritas; (b) tidak diperlukan sebagai bagian dari uji komparatif; (c) uji toksikologis hanya disyaratkan jika uji dilakukan pada eksipien yang baru atau belum banyak digunakan; (d) uji PK konvensional tidak dapat dilakukan karena LMWH heterogen; (e) uji efikasi klinis komparatif tidak diperlukan jika hasil karakterisasi fisika-kimia, fungsional, dan PD menunjukkan kemiripan; (f) tidak memerlukan uji efikasi spesifik karena endpoint yaitu HbA1c tidak cukup sensitif untuk mendeteksi perbedaan klinis antara dua insulin.

Sumber: WHO (2009), USFDA (2015c), CHMP-EMA (2015d), CHMP-EMA (2010a; 2013a; 2013b; 2015a; 2015b; 2017), CHMP-EMA (2006b), CHMP-EMA (2012b).

## D. Regulasi Obat Biosimilar di Indonesia

Regulasi obat biosimilar di Indonesia dikeluarkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) pada 15 Desember 2015, yakni Peraturan Kepala BPOM RI No. 17 Tahun 2015 tentang Pedoman Penilaian Produk Biosimilar. Peraturan ini merujuk pada regulasi obat biosimilar yang dikeluarkan oleh WHO. Dalam peraturan tersebut, definisi produk biosimilar atau *similar biotherapeutic product* (SBP) atau produk biologi sejenis (PBS), yang untuk selanjutnya disebut produk biosimilar, adalah produk biologi dengan profil efikasi, keamanan, dan mutu yang mirip dengan produk biologi sejenis yang berlisensi. Pedoman ini berlaku untuk produk obat biosimilar yang

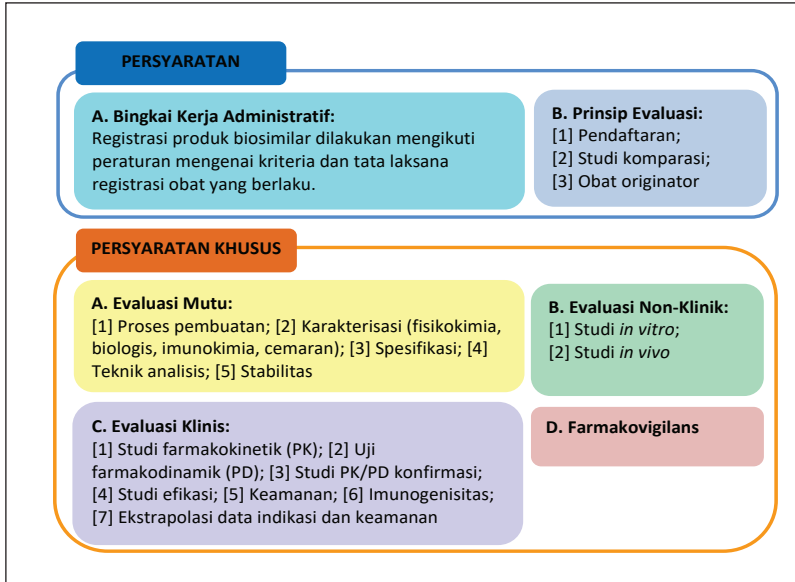
akan didaftarkan di Indonesia dan menjelaskan aspek mutu, keamanan, serta efikasi. Vaksin, produk yang berasal dari darah/plasma, produk darah rekombinan, serta produk biologi lain (misalnya produk untuk terapi gen dan sel punca) tidak tercakup dalam pedoman tersebut.

Saat ini, obat biosimilar yang beredar di Indonesia adalah produk impor, terdiri dari 4 epoetin alfa, 3 insulin rekombinan, dan 3 filgrastim/G-CSF rekombinan. Pengembangan obat biosimilar yang direncanakan hingga tahun 2019 adalah 5 obat biosimilar melalui transfer teknologi, terdiri dari 4 epoetin alfa dan 1 insulin analog, sementara 1 obat biosimilar yang merupakan insulin analog akan dihasilkan dengan teknologi dalam negeri. Transfer teknologi merupakan mekanisme yang paling diminati oleh produsen untuk mengembangkan dan memproduksi obat biosimilar di Indonesia. Metode tersebut dapat mempersingkat durasi pengembangan dan menekan biaya. Namun, di Indonesia saat ini belum ada regulasi untuk evaluasi obat biosimilar yang dikembangkan melalui mekanisme transfer teknologi (Hidayati, 2016). Sistematika pedoman penilaian obat biosimilar terdiri dari persyaratan umum dan khusus (Gambar 2.5). Persyaratan umum mencakup bingkai kerja administratif dan prinsip evaluasi yang meliputi pendaftaran, uji komparasi, dan obat originator.

Secara administratif, registrasi obat biosimilar dilakukan mengikuti peraturan mengenai kriteria dan tata laksana registrasi obat yang berlaku. Dalam rangka pendaftaran obat biosimilar, cara penilaian tidak sama dengan obat generik dan harus mengadopsi pendekatan berdasarkan studi komparasi. Selain syarat keamanan dan efikasi bersifat mutlak, produsen obat biosimilar juga harus melakukan studi farmakovigilans. Pemilihan obat originator untuk studi komparasi harus didasarkan pada prinsip kemiripan zat aktif, baik molekuler maupun efek biologis. Selain zat aktif, bentuk sediaan, kekuatan dan cara pemberian obat biosimilar juga harus sama dengan obat originator. Bila terdapat perbedaan antara obat biosimilar dan obat originator, justifikasi harus dilakukan dengan uji yang sesuai atas dasar kasus per kasus di mana faktor keamanan lebih diutamakan. Obat originator

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Sumber: BPOM (2015)

**Gambar 2.5** Sistematika Pedoman Umum Penilaian Produk Biosimilar di Indonesia

harus digunakan sebagai pembanding pada seluruh uji komparatif untuk aspek mutu, keamanan, dan efikasi.

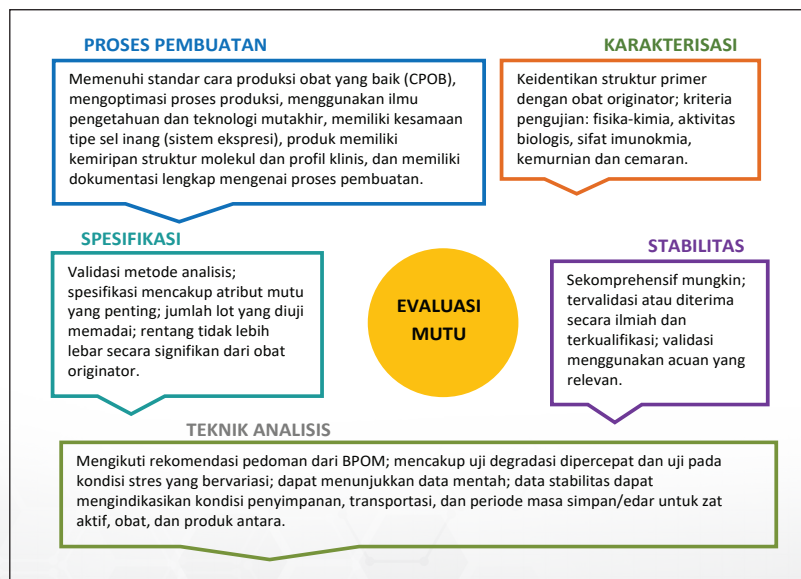
### 1. Evaluasi Mutu

Dalam uji komparasi, aspek mutu, keamanan, dan efikasi merupakan fokus utama. Jika ada variasi modifikasi pasca-translasi, harus diberikan justifikasi. Profil cemaran dan zat aktif dapat memengaruhi keamanan dan efikasi obat biosimilar sehingga berakibat pada perbedaan jumlah data nonklinis dan klinis yang diperlukan. Obat originator yang digunakan bukan merupakan obat biosimilar dan harus sudah memperoleh izin edar berdasarkan pada data mutu, keamanan, dan efikasi lengkap. Justifikasi dalam pemilihan obat originator harus disertai dengan bukti-bukti ilmiah, terutama terkait aspek mutu. Obat originator bisa berasal dari luar negeri, tetapi harus sudah disetujui di



negara-negara dengan sistem evaluasi yang sudah mapan. Jika sudah tidak diproduksi lagi, obat originator yang digunakan adalah obat biologi yang sudah disetujui berdasarkan data mutu, keamanan, dan efikasi lengkap. Obat originator tersebut juga telah lama beredar tanpa adanya isu terkait aspek mutu, keamanan dan efikasi. Identifikasi, seperti nama paten, bentuk sediaan, formulasi dan besar sediaan obat originator harus jelas, termasuk waktu paruh dari profil mutu. Selain itu, zat aktif yang digunakan dalam studi komparasi harus sesuai dengan zat aktif dalam obat originator.

Persyaratan khusus yang tercakup dalam pedoman dari BPOM terdiri dari evaluasi mutu, nonklinis, klinis, dan farmakovigilans. Evaluasi mutu menekankan pentingnya penilaian pada aspek proses pembuatan, karakterisasi, spesifikasi, teknik analisis, dan stabilitas. Beberapa prinsip dalam evaluasi mutu dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Sumber: BPOM (2015)

**Gambar 2.6** Prinsip Evaluasi Mutu Obat Biosimilar dalam Regulasi BPOM

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## 2. Evaluasi Nonklinis

Evaluasi nonklinis bervariasi dan harus ditetapkan kasus per kasus, biasanya meliputi uji PD, PK, dan toksikologis. Uji toksisitas dosis berulang melalui perbandingan langsung dengan obat originator (*head-to-head*) menjadi persyaratan minimal untuk evaluasi nonklinis. Jumlah uji dapat dikurangi jika telah terdapat bukti tingkat kemiripan yang tinggi antara produk obat biosimilar dan obat originator. Obat biosimilar yang diuji harus merupakan sediaan akhir, kecuali ada justifikasi tersendiri. Spesies yang relevan perlu dipertimbangkan untuk uji PD dan toksikologis untuk mengantisipasi munculnya respons dan antibodi hewan pada studi jangka panjang. Studi *in vitro* yaitu uji ikatan reseptor atau uji berbasis sel (misalnya uji proliferasi sel atau uji sitotoksitas) dapat dilakukan untuk memastikan kesetaraan aktivitas biologis/farmakodinamik obat biosimilar dan obat originator. Studi *in vivo* pada hewan harus bersifat komparatif dan menggunakan spesies yang relevan. Pemantauan terhadap *endpoint* meliputi aktivitas biologis/farmakodinamik yang relevan dengan aplikasi klinis serta uji toksisitas nonklinis pada minimal satu uji toksisitas dosis berulang pada spesies hewan yang relevan dan mencakup pengukuran toksikokinetik. Evaluasi *in vivo* terhadap aktivitas biologis/PD tidak diperlukan bila ada uji *in vitro* yang dianggap dapat mewakili aktivitas PD yang relevan secara klinis. Tergantung pada jalur pemberian obat, uji toleransi lokal mungkin perlu dilakukan. Dengan dasar bukti kemiripan dari studi perbandingan, mutu uji toksikologis rutin tidak perlu dilakukan, kecuali bila dipicu oleh hasil studi toksisitas berulang atau studi toleransi lokal dan/atau oleh sifat toksikologis lain yang diketahui pada obat originator (contohnya *adverse effect* terhadap fungsi reproduksi).

## 3. Evaluasi Klinis

Evaluasi klinis yang diatur meliputi PK, PD, PK/PD konfirmatif, efikasi, keamanan, imunogenisitas, dan ekstrapolasi indikasi. Aspek dan prinsip-prinsip dalam evaluasi klinis disajikan pada Tabel 2.9.

**Tabel 2.9** Prinsip Evaluasi Klinis Obat Biosimilar dalam Regulasi BPOM

Aspek	Prinsip-prinsip dalam studi komparatif
Uji Farmako Kinetik/PK	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kesamaan dosis, cara pemberian, dan rentang terapi dengan obat originator</li><li>• Uji dosis berulang jika PK tergantung pada dosis dan waktu</li><li>• Desain menyilang (<i>cross-over</i>) tidak berlaku untuk produk dengan waktu paruh panjang/membentuk antibodi anti-produk</li><li>• Cakupan perbandingan: bioavailabilitas, eliminasi/kliren</li><li>• Kriteria bioekivalensi 80–125%</li></ul>
Uji Farmako Dinamik/PD	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dilakukan jika terdeteksi adanya perbedaan profil PK yang relevansi klinisnya tidak diketahui</li><li>• Dosis dipilih di bagian kurva dosis-respons yang curam</li><li>• Penanda PD dipilih berdasarkan relevansi klinisnya</li></ul>
PK/PD konfirmatif	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dapat menggantikan uji efikasi klinis jika ada bukti kemiripan dari studi PK dan PD, minimal ada satu penanda PD terkait dengan efikasi, hubungan antara dosis/paparan, penanda PD yang relevan dan respons/efikasi dari obat originator diketahui dengan baik</li><li>• Memerlukan populasi studi dan dosis yang sensitif</li><li>• Rentang keberterimaan untuk parameter PK dan PD harus ditetapkan sebelumnya</li></ul>
Efikasi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Studi <i>dose-finding</i> tidak diperlukan</li><li>• Jika potensinya sebanding dalam studi PK dan PD, posologi obat originator digunakan dalam uji klinis</li><li>• Uji efikasi dengan perbandingan langsung (<i>head-to-head</i>) pada populasi studi yang sesuai (sensitif), dengan desain ekivalensi atau non-inferioritas, acak, tersamar ganda atau paling tidak penilainya tersamar, dan dengan <i>power</i> yang cukup</li><li>• Keuntungan pada desain ekivalensi: kemungkinan ekstrapolasi efikasi ke indikasi lain dari obat originator tanpa harus dilakukan uji klinik yang khusus untuk indikasi tersebut</li></ul>

Aspek	Prinsip-prinsip dalam studi komparatif
Keamanan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perbandingan mencakup jenis, frekuensi, dan keparahan kejadian/reaksi yang tidak diinginkan</li> <li>• Data keamanan dari uji klinis untuk mendeteksi kejadian/reaksi tidak diinginkan yang sering terjadi dalam jangka pendek dinyatakan cukup untuk izin edar</li> <li>• Pemantauan keamanan klinis yang ketat diperlukan pada pasca-pemasaran</li> </ul>
Imunogenisitas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imunogenisitas harus dievaluasi sebelum persetujuan izin edar</li> <li>• Imunogenisitas harus selalu diuji pada manusia</li> <li>• Perbandingan dengan kelompok kontrol eksternal dianggap tidak tepat</li> <li>• Jika pembentukan antibodi ditemukan, tetapi terlalu jarang untuk dapat dideteksi sebelum produk diedarkan, maka rencana manajemen risiko (RMP) diperlukan</li> <li>• Jika produsen berniat untuk mengekstrapolasi data efikasi dan keamanan ke indikasi lain yang disetujui, imunogenisitas harus diuji pada populasi pasien yang mempunyai risiko tertinggi dalam timbulnya respons imun dan kejadian tidak diinginkan (KTD)</li> <li>• Periode pengamatan yang dibutuhkan untuk pengujian imunogenisitas tergantung pada lama terapi yang diinginkan dan waktu yang diharapkan untuk terbentuknya antibodi</li> <li>• Karakterisasi lebih lanjut dari profil imunogenisitas mungkin diperlukan pasca-pemasaran</li> </ul>
Ekstrapolasi data efikasi dan keamanan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jika kemiripan efikasi dan keamanan untuk indikasi klinis tertentu telah ditunjukkan, maka ekstrapolasi data ke indikasi lain dimungkinkan dengan syarat:</li> <li>• Dengan model uji klinis yang sensitif perbedaan tetap tidak ditemukan</li> </ul>

Aspek	Prinsip-prinsip dalam studi komparatif
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mekanisme kerja dan/atau reseptor yang terlibat sama. Jika berbeda/tidak diketahui, dibutuhkan alasan ilmiah yang kuat dan data klinik tambahan (misalnya "PD fingerprint")</li> <li>• Keamanan dan imunogenisitas telah diketahui secara memadai dan diprediksi tidak ada isu keamanan lain yang akan timbul pada indikasi yang diekstrapolasi</li> <li>• Jika uji efikasi menggunakan desain studi non-inferioritas dan menunjukkan efikasi dan keamanan yang dapat diterima, pemohon izin edar harus memberikan argumen yang meyakinkan bahwa temuan ini dapat diterapkan pada indikasi yang diekstrapolasi</li> </ul>

Sumber: BPOM (2015)

#### 4. Farmakovigilans

Pemantauan lebih lanjut terhadap keamanan klinis obat biosimilar untuk semua indikasi diperlukan dalam upaya menilai manfaat dan risiko yang pada periode pasca-pemasaran. Produsen harus menyerahkan spesifikasi keamanan dan rencana farmakovigilans pada saat pengajuan izin edar (contoh referensi: ICH E2E). Rencana farmakovigilans harus menggambarkan kegiatan dan metode pasca-pemasaran yang terencana untuk mengevaluasi keamanan produk. Dalam beberapa kasus, dibutuhkan tindakan untuk meminimalkan risiko, misalnya memberikan pendidikan untuk pasien, dokter, dan tenaga medis. Terkait risiko tambahan yang teridentifikasi selama pengkajian, maka pemegang izin edar wajib melakukan pemantauan keamanan lebih lanjut dan dilakukan secara khusus. Laporan keamanan produk pasca-pemasaran harus memuat semua informasi tentang tolerabilitas produk yang disetujui oleh BPOM. Informasi keamanan harus dievaluasi secara ilmiah dan harus mencakup evaluasi terhadap penyebab dan frekuensi terjadinya dampak efek yang tidak diinginkan. Saat mendapat izin edar, produsen harus memastikan telah memiliki sistem farmakovigilans sesuai yang ditetapkan oleh BPOM dalam Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.03.1.23.12.11.10690 Tahun 2011 tentang Penerapan Farmakovigilans Bagi Industri Farmasi dan peraturan lain yang terkait.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## G. Perkembangan Regulasi Obat Biosimilar pada Masa yang akan Datang

Obat biosimilar memerlukan proses panjang, mulai dari perencanaan produk hingga aplikasinya dalam terapi kepada pasien. Selain mutu, efikasi, dan keamanan, waktu dan biaya adalah faktor yang vital bagi kesuksesan pemasaran obat biosimilar. Regulasi diperlukan untuk memastikan derajat kemiripan mutu, efikasi, dan keamanan yang tinggi. Namun, regulasi juga harus dapat mendukung pada sampainya obat biosimilar ke tangan pasien dengan harga yang lebih terjangkau. Sementara itu, keterjangkauan harga sangat tergantung pada biaya pengembangan, produksi, dan pemasaran. Oleh karena itu, regulasi obat biosimilar juga harus senantiasa ditinjau agar harmonis dalam memenuhi berbagai aspek tersebut.

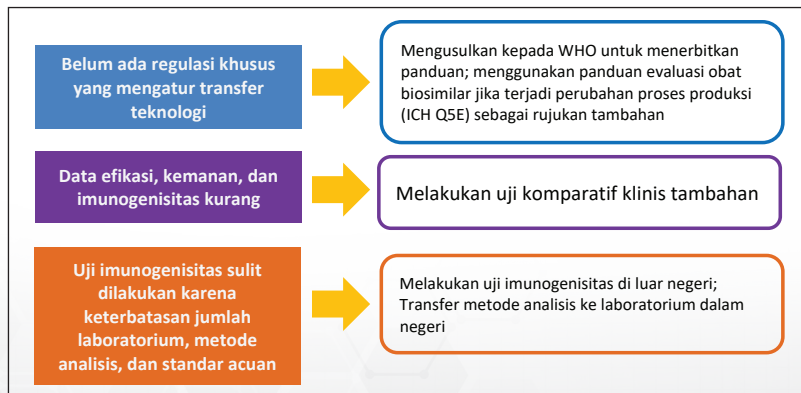
### 1. Regulasi Transfer Teknologi

Menurut BPOM (Hidayati, 2016), produsen di Indonesia lebih berminat pada skema transfer teknologi untuk memproduksi obat biosimilar di Indonesia. Skema ini memang dapat mempercepat masuknya obat biosimilar ke pasar dan menekan biaya mulai dari pengembangan hingga pemasaran. Transfer teknologi tersebut meliputi teknik produksi, metode analisis, dan data evaluasi produk untuk perizinan. Transfer teknologi dari produsen mancanegara ke dalam negeri pada dasarnya dilakukan melalui dua cara. Pertama, jika produsen mancanegara memiliki data studi komparasi dengan obat originator yang cukup, produsen dalam negeri tidak harus melakukan studi komparasi secara keseluruhan. Kedua, produsen dalam negeri melakukan studi komparasi penuh karena produsen mancanegara tidak memiliki data studi komparasi yang memadai.

Sistem penamaan terkait erat dengan keberhasilan farmakovigilans. Efektifitas farmakovigilans ditentukan oleh monitoring keamanan pasca-pemasaran yang akurat serta didukung dengan produk biosimilar yang mudah ditelusuri dan dibedakan dari produk sejenis. Di Uni Eropa, obat biosimilar diperbolehkan memiliki *International Nonproprietary Names* (INN) yang sama dengan produk referensinya. Hal ini berisiko menimbulkan kesulitan identifikasi produk mana yang

bermasalah jika terjadi KTD. Sebagai contoh, ada tiga produk epoetin alfa yang memperoleh lisensi dengan nama yang sama. Akhir-akhir ini, untuk meningkatkan ketertelusuran dalam program monitoring, Uni Eropa mengharuskan pencantuman merek dan nomor lot di samping INN. FDA belum menerbitkan aturan penamaan dengan INN hingga saat ini. Akan tetapi, dilihat dari penamaan obat biosimilar yang sudah diberi izin edar, FDA sepertinya mengikuti panduan INN dari WHO. Menurut WHO, di belakang INN perlu ditambahkan 4 abjad untuk menambah keunikan nama. Walaupun telah memberikan panduan penamaan obat biosimilar dengan INN, WHO belum mewajibkan produsen untuk mengajukan aplikasi ke Sekretariat INN WHO untuk perizinan obat biosimilar. Dengan demikian, saat ini belum ada standar penamaan INN yang diacu secara internasional yang bertujuan agar farmakovigilans lebih efektif (Daller, 2016; Declerck dkk., 2017). Karena sangat penting untuk menjamin ketertelusuran produk terutama dalam pemantauan keamanan, regulator nasional perlu memberlakukan penggunaan INN dan sebaiknya merujuk kepada regulasi WHO agar lebih harmonis secara global.

Produsen menghadapi kendala dalam hal regulasi, uji komparasi, dan uji imunogenisitas. Beberapa upaya dapat dilakukan untuk mengatasi hambatan tersebut dijelaskan dalam Gambar 2.7.



Sumber: Hidayati (2016)

**Gambar 2.7** Kendala dan solusi transfer teknologi untuk produksi obat biosimilar di Indonesia.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Khusus menyangkut regulasi, pemerintah perlu menyusun dan memberlakukan regulasi untuk mengatur dan mendukung transfer teknologi. Di samping itu, WHO sebagai badan kesehatan dunia juga perlu mengeluarkan regulasi terkait yang dapat dirujuk secara global sehingga harmonisasi regulasi antar-negara lebih mempermudah transfer teknologi.

## 2. Regulasi *Interchangeability*

Obat biosimilar yang ditetapkan sebagai obat yang *interchangeable* atau dapat digunakan sebagai pengganti obat originator dalam terapi tanpa petunjuk/sepengertian penyedia layanan kesehatan yang mengeluarkan resep obat originator. Status *interchangeable* tidak secara otomatis diberikan pada saat obat biosimilar mendapatkan izin edar (USFDA, 2019). Baik EMA maupun WHO, tidak mengatur *interchangeability* dalam panduan yang diterbitkan. Di Uni Eropa, EMA masih menyerahkan pengambilan keputusan *interchangeability* kepada masing-masing regulator nasional. Dalam regulasi beberapa negara lainnya, *interchangeability* masih belum diperbolehkan atau dinyatakan bahwa untuk menerapkan *interchangeability* diperlukan studi lebih lanjut untuk membuktikan tidak adanya efek buruk pada kesehatan pasien. Sebaliknya, FDA telah mengeluarkan *draft* panduan yang mengatur *interchangeability*, yaitu *Considerations in Demonstrating Interchangeability with a Reference Product: Guidance for Industry*. Langkah yang dilakukan FDA perlu diikuti oleh regulator nasional lainnya. *Interchangeability* akan menjadi tren untuk diatur dalam regulasi karena secara ekonomi menguntungkan bagi pemerintah dan pasien, serta tentunya bagi produsen obat biosimilar sendiri (Wekselman, 2012; Kumar dkk., 2015). Potensi manfaat bisa lebih besar lagi jika *interchangeability* bukan hanya antara obat biosimilar dan obat originator, tetapi juga antarobat biosimilar sejenis. Lebih jauh lagi, pemberian obat biosimilar tanpa harus memberi tahu pembuat resep obat originator, atau disebut *automatic substitution* akan lebih mempercepat pemanfaatan obat biosimilar oleh pasien. Namun, regulasi harus mengatur dengan jelas persyaratan untuk hal-hal tersebut (Declerck dkk., 2017).

### 3. Regulasi Keseragaman Penamaan dan Ketertelusuran

Sistem penamaan terkait erat dengan keberhasilan farmakovigilans. Efektifitas farmakovigilans ditentukan oleh monitoring keamanan pasca-pemasaran yang akurat serta didukung dengan produk biosimilar yang mudah ditelusuri dan dibedakan dari produk sejenis. Di Uni Eropa, obat biosimilar diperbolehkan memiliki *International Nonproprietary Names* (INN) yang sama dengan produk referensinya. Hal ini berisiko menimbulkan kesulitan identifikasi produk mana yang bermasalah jika terjadi KTD. Sebagai contoh, ada tiga produk epoetin alfa yang memperoleh lisensi dengan nama yang sama. Akhir-akhir ini, untuk meningkatkan ketertelusuran dalam program monitor, Uni Eropa mengharuskan pencantuman merek dan nomor lot di samping INN. FDA belum menerbitkan aturan penamaan dengan INN hingga saat ini. Akan tetapi, dilihat dari penamaan obat biosimilar yang sudah diberi izin edar, FDA sepertinya mengikuti panduan INN dari WHO. Menurut WHO, di belakang INN perlu ditambahkan 4 abjad untuk menambah keunikan nama. Walaupun telah memberikan panduan penamaan obat biosimilar dengan INN, WHO belum mewajibkan produsen untuk mengajukan aplikasi ke Sekretariat INN WHO untuk perizinan obat biosimilar. Dengan demikian, saat ini belum ada standar penamaan INN yang diacu secara internasional yang bertujuan agar farmakovigilans lebih efektif (Daller, 2016; Declerck dkk., 2017). Karena sangat penting untuk menjamin ketertelusuran produk terutama dalam pemantauan keamanan, regulator nasional perlu memberlakukan penggunaan INN dan sebaiknya merujuk kepada regulasi WHO agar lebih harmonis secara global.

### 4. Regulasi Pasca-Pemasaran (Pemanfaatan Obat Biosimilar)

Obat biosimilar mengalami transformasi dari wujud abstrak berupa sains menjadi produk obat dan dari produk obat berpindah ke pasien. Transformasi tahap I melibatkan produsen, regulator, dan pemerintah—khususnya instansi yang menangani kesehatan. Hasil transformasi tahap I adalah perizinan dan pemasaran obat biosimilar. Namun, transformasi tahap II tidak kalah penting karena menyangkut

pemanfaatan secara langsung oleh pasien. Penggunaan obat biosimilar dalam terapi tergantung pada sejauh mana bukti hasil uji, salah satunya keamanan pasca-pemasaran dan mekanisme penetapan resep obat oleh paramedis. Selain itu, pengaturan insentif atas penggunaan biosimilar dan pengaturan kompetisi yang efektif antarobat biosimilar juga penting (Acha & Mestre-Ferrandiz, 2017). Faktor-faktor kunci tersebut perlu diatur dengan regulasi juga. Regulasi obat biosimilar masing-masing negara perlu diatur sehingga transformasi tahap II lebih berhasil mengantarkan obat biosimilar yang aman bagi pasien sekaligus mendukung perkembangan biosimilar dalam negeri.

Khusus menyangkut keamanan pasca-pemasaran yang merupakan program farmakovigilans, regulator juga perlu memberikan panduan lebih spesifik. Transformasi tahap II tergantung pada tingkat keyakinan paramedis dan pasien, khususnya terhadap keamanan dan efikasi. Dengan demikian, petunjuk yang jelas dalam mengumpulkan data-data terkait keamanan dan efikasi harus ada. Saat ini, termasuk di Indonesia, panduan mengenai farmakovigilans masih terlalu umum. Pemantauan keamanan pasca-pemasaran masih tergantung pada pengalaman produsen produk acuan (Declerck dkk., 2017). Hal ini menuntut partisipasi aktif antara regulator dan produsen untuk membahas rencana farmakovigilans. Akan lebih mudah lagi jika regulator membuat panduan farmakovigilans untuk masing-masing produk. Terlebih lagi, farmakovigilans menjadi tantangan yang lebih berat bagi obat biosimilar generasi kedua, seperti mAb dan protein fusi. Obat biosimilar tersebut memiliki struktur lebih kompleks daripada generasi pertama (EPO, G-CSF, somatropin) sehingga memerlukan upaya lebih untuk membuktikan keamanan dan efikasi pasca-pemasaran (Blandizzi dkk., 2018).

## H. Penutup

Obat biologi (originator) memiliki harga yang relatif mahal dan sulit dijangkau oleh pasien—terutama di negara berkembang—serta menjadi beban bagi pemerintah yang harus mengalokasikan dana untuk asuransi kesehatan. Bersamaan dengan mulai berakhirnya

hak paten obat originator, obat biosimilar merupakan solusi bagi penyediaan obat yang lebih terjangkau. Karakteristik obat biosimilar tidak sama dengan obat generik. Tahapan studi untuk membuktikan kemiripan antara obat biosimilar dan obat originator lebih panjang. Kemajuan teknik produksi dan metode analisis mutlak diperlukan untuk mengurangi tahapan studi pembuktian kemiripan serta proses produksi yang lebih ekonomis.

Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) mendukung pengembangan obat biosimilar di Indonesia. Pedoman dan regulasi terkait pengembangan obat biosimilar pun terus disiapkan. Pada 2018, BPOM telah meninjau PT Kalbio Global Medika (KGM) yang akan memproduksi obat-obat biosimilar. PT KGM yang merupakan anak perusahaan Kalbe Farma diharapkan dapat memproduksi obat-obat biosimilar yang berkualitas sehingga dapat memenuhi kebutuhan dalam negeri dan juga untuk ekspor. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang merupakan lembaga pemerintahan juga terus mengembangkan penelitiannya dalam bioteknologi, khususnya pengembangan obat biosimilar. Adapun BPOM sebagai pengawas dan pengendali peredaran obat di Indonesia terus melakukan peninjauan regulasi yang ada.

Regulasi untuk izin edar obat biosimilar diperkirakan akan terus mengalami peninjauan sehingga menjadi lebih spesifik dalam menjawab tantangan ekonomi di satu sisi, dan mutu keamanan serta khasiat di sisi lain. Dengan kata lain, inovasi diperlukan dalam pengembangan regulasi obat biosimilar. Selain regulasi perlu diselaraskan dengan era perdagangan bebas, harmonisasi regulasi juga diperlukan untuk menjamin kesamaan prinsip pengembangan dan mengurangi kompleksitas dalam hal izin edar antarnegara. Namun, setiap negara tetap memiliki otonomi untuk menitikberatkan regulasi obat biosimilar sesuai dengan kebutuhan spesifik negara masing-masing, contohnya pengaturan transfer teknologi pengembangan dan produksi obat biosimilar di Indonesia.

## Daftar Pustaka

- Abas, A. (2011). Regulatory guidelines for biosimilars in Malaysia. *Biologicals*, 39(5), 339–342. .
- Acha, V., & Mestre-Ferrandiz, J. (2017). Translating European regulatory approval into healthcare uptake for biosimilars: the second translational gap. *Technology Analysis & Strategic Management*, 29(3), 263–275.
- AL-Sabbagh, A., Olech, E., McClellan, J. E., & Kirchhoff, C. F. (2016). Development of biosimilars. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45, S11–S18.
- Azevedo, V. F., Sandorff, E., Siemak, B., & Halbert, R. J. (2012). Potential Regulatory and Commercial Environment for Biosimilars in Latin America. *Value in Health Regional Issues*, 1(2), 228–234.
- Bendall, L. J., & Bradstock, K. F. (2014). G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(4), 355–367.
- Blandizzi, C., Galeazzi, M., & Valesini, G. (2018). Transitioning from first- to second-generation biosimilars: an appraisal of regulatory and post-marketing challenges. *Pharmacological Research*, 128, 306–314.
- Boren, J., Congiatu, C., & Hurley, P. (2015). Challenges in global biosimilar development: a regulatory perspective. *Contract Pharma*.
- BPOM. (2015). *Pedoman penilaian produk biosimilar*.
- Casey, D. (2016). Key strategic factors for stakeholders in the current global biosimilar market. *Drug Discovery Today*, 21(2), 208–211.
- CHMP-EMA. (2005). *Guideline on similar biological medicinal product*.
- CHMP-EMA. (2006a). *Biosimilar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor (Annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues)*.
- CHMP-EMA. (2006b). *Guideline on similar medicinal products containing somatropin*.
- CHMP-EMA. (2010a). *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins (Revision) Guideline on non-clinical and clinical*

*development of similar biological medicinal products containing recombinant.*

- CHMP-EMA. (2010b). *Similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins.*
- CHMP-EMA. (2011). *ICH S6 (R1) - Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.* <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>.<https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>.
- CHMP-EMA. (2012a). *Questions and answers on biosimilar medicines (similar biological medicinal products).*
- CHMP-EMA. (2012b). *Similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies: Non-clinical and clinical issues.*
- CHMP-EMA. (2013a). *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH).*
- CHMP-EMA. (2013b). *Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta* *Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta* *Table of contents.*
- CHMP-EMA. (2013c). *Similar biological medicinal products containing interferon beta.*
- CHMP-EMA. (2014a). *Guideline on similar biological medicinal products.*
- CHMP-EMA. (2014b, 22 Mei). *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)* *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substan (1–9).*
- CHMP-EMA. (2015a, 23 Juli). *Concept paper on the revision of the guideline on non- clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor (1–3).*
- CHMP-EMA. (2015b). *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues.*



- CHMP-EMA. (2015c). *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Non-clinical and clinical issues*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active\\_en-2.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf)
- CHMP-EMA. (2015e). *Non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogue*.
- CHMP-EMA. (2017). *Non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight heparins*.
- Daller, J. (2016). Biosimilars: A consideration of the regulations in the United States and European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, 199–208.
- Declerck, P., Danesi, R., Petersel, D., & Jacobs, I. (2017). The language of biosimilars: Clarification, definitions, and regulatory aspects. *Drugs*, 77, 671–677.
- GaBI. (2012). *US\$67 billion worth of biosimilar patents expiring before 2020*.
- GaBI. (2013). *Egypt issues draft guidelines for biosimilars*.
- GaBI. (2014). *Comparison of biosimilars guidelines*.
- GaBI. (2015). *Angular stylized world map*.
- Grampp, G., McElroy, P. L., Camblin, G., & Pollock, A. (2018). Structure-function relationships for recombinant erythropoietins: a case study from a proposed manufacturing change with implications for erythropoietin biosimilar study designs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Hidayati, N. (2016). *Role of regulators in technology transfer of similar biotherapeutic products (Indonesia's experience)*.
- Huzair, F., & Kale, D. (2015). Biosimilars and the long game. *Trends in Biotechnology*, 33(5), 250–252.
- Meiller, J. (2016). What is A Monoclonal Antibody? <http://nicb.ie/biotechnology/what-is-a-monoclonal-antibody/>
- Khraishi, M., Stead, D., Lukas, M., Scotte, F., & Schmid, H. (2016). Biosimilars: a multidisciplinary perspective. *Clinical Therapeutics*, 38(5), 1238–1249.



- Kumar, R., Sigala, S., Malgarini, R. B., Pimpinella, G., Pani, L., Pecorelli, S., & Memo, M. (2015). Pharmacovigilance biosimilars : Regulatory status and implications across the world. *Pharmacovigilance*, *04*(s3). <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6887.S3-002>
- Li, E. C., Abbas, R., Jacobs, I. A., & Yin, D. (2015). Considerations in the early development of biosimilar products. *Drug Discovery Today*, *20*(S2), 1–9.
- Minghetti, P., Cilurzo, F., Franzé, S., Musazzi, U. M., & Itri, M. (2013). Low molecular weight heparins copies: are they considered to be generics or biosimilars? *Drug Discovery Today*, *18*(5), 305–311.
- Mueller, L. L. (2015). Jordan FDA issues a guideline for the registration of biosimilars. *The National Law Review*, *XI*(327).
- Mulcahy, A. W., Predmore, Z., & Mattke, S. (2014). The cost savings potential of biosimilar drugs in the United States. *Perspective*, *1*, 1–16.
- Ogbru, O. (2020, 19 Oktober). Monoclonal antibodies. *MedicineNet*. [https://www.medicinenet.com/monoclonal\\_antibodies/article.htm](https://www.medicinenet.com/monoclonal_antibodies/article.htm)
- Olech, E. (2016). Biosimilars: Rationale and current regulatory landscape. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *45*, S1–S10. <http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.01.001>
- Osakwe, O. (2016). Clinical development: Ethics and realities. *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*, 191.
- Poh, J., & Tam, K. T. (2011). Registration of similar biological products- Singapore's approach. *Biologicals*, *39*(5), 343–345.
- Schiestl, M. (2011). A biosimilar industry view on the implementation of the WHO guidelines on evaluating similar biotherapeutic products. *Biologicals*, *39*, 297–299.
- Siegel, J. F., & Royzman, I. (2017). *Update on biosimilar approvals and pending applications in Europe and the U.S.*
- Tom-b. (2011). *Angular stylized world map*. Wikimedia. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple\\_world\\_map.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_world_map.svg)
- Tsuruta, L. R. M., Santos, L. dos, & Moro, A. M. (2015). Biosimilars advancements: Moving on to the Future. *Biotechnol. Prog.*, *31*(5), 1139–1149.

- USFDA. (2014). *Guidance for industry reference product exclusivity for biological products filed under section 351(a) of the PHS Act* (Vol. 351).
- USFDA. (2015a). *Biosimilars: Questions and answers regarding implementation of the biologics price competition and Innovation Act of 2009-guidance for industry*.
- USFDA. (2015b). *Quality considerations in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product - guidance for industry*.
- USFDA. (2015c). *Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product - guidance for industry*.
- USFDA. (2016). *Clinical pharmacology data to support a demonstration of biosimilarity to a reference product: Guidance for industry*.
- USFDA. (2017b). *Considerations in demonstrating interchangeability with a reference product: Guidance for industry* (tidak diterbitkan).
- USFDA. (2019). *Considerations in demonstrating interchangeability with a reference product: Guidance for industry*. <https://www.fda.gov/media/124907/download>
- USFDA. (2020). *Biosimilar Product Information: FDA-Approved Biosimilar Products*. <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-product-information>.
- Wang, J., & Chow, S.-C. (2012). On the regulatory approval pathway of biosimilar products. *Pharmaceuticals*, 5(4), 353–368.
- Wekselman, K. (2012). *Biosimilar medicinal products : Innovation in regulatory review and approval* (1–6).
- Welch, A. R. (2017). The Thai FDA's approach to biologics and biosimilars.
- WHO. (2009). *Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products* (SBPs).
- WHO. (2016). *International non-proprietary names (INN) for biological and biotechnological substances*.



## BAB III

# Eritropoietin dan Obat Biosimilar: Sejarah Kesuksesan Terapi Anemia, Kemajuan yang Telah Dicapai, dan Tantangan

*Adi Santoso, Yana Rubiyana, Arizah Kusumawati, Popi Hadi  
Wisnuwardhani, dan Endah Puji Septisetyani*

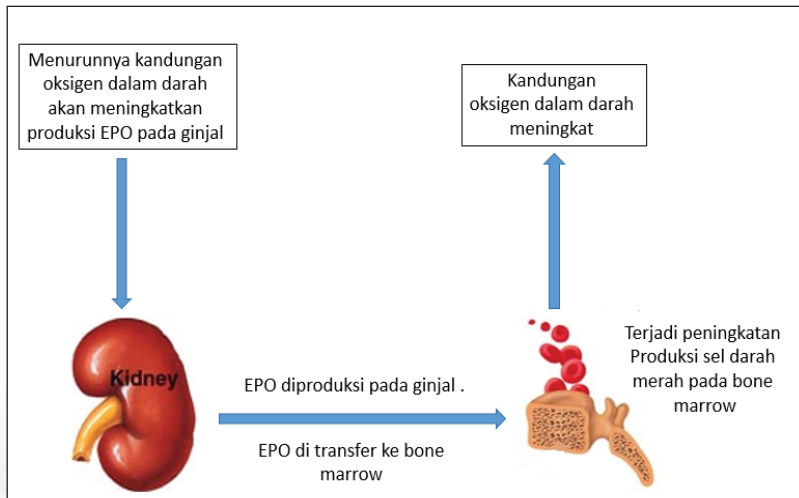
### A. Pendahuluan

Sel darah merah adalah sel yang mempunyai fungsi sangat vital dalam transportasi oksigen ke seluruh tubuh. Untuk memenuhi kebutuhan oksigen ini, setiap detik dalam tubuh manusia dewasa ada 2,5 juta sel darah merah yang harus diproduksi. Sel darah merah mempunyai umur 100–120 hari dalam tubuh dan membutuhkan waktu sekitar satu menit dalam melakukan sirkulasinya (Ng dkk., 2003). Pada manusia dewasa, terdapat  $2-3 \times 10^{12}$  sel darah merah dan 1% dari jumlah ini harus diganti dengan sel darah merah yang baru setiap harinya (Bianconi dkk., 2013). Begitu vitalnya fungsi sel darah merah, tidak mengherankan jika ada sedikit gangguan dalam regulasi, produksi sel dan ketersediaan oksigen dalam tubuh dapat menyebabkan gangguan yang serius dalam tubuh (Bianconi dkk., 2013).

Respons yang begitu cepat dalam pengaturan kandungan sel darah merah dapat dilihat dari meningkatnya level plasma eritropoietin (EPO) sampai sekitar 1000 kali lipat di atas ambang normal saat tubuh mengalami tekanan pada kondisi kekurangan oksigen (Bunn,

2013). Peningkatan level plasma EPO sebesar ini dapat meningkatkan produksi sel darah merah sebesar 10 kali lipat (Jelkmann, 1992). Melihat fungsinya yang sangat esensial dalam tubuh, saat ini EPO menjadi salah satu *blockbuster drug* yang sangat dibutuhkan dunia kesehatan.

Secara umum, produksi EPO di dalam tubuh distimulasi oleh kurangnya kandungan oksigen (*hypoxia*) (Gambar 3.1). Kondisi hipoksia menstimulasi produksi EPO oleh sel *interstitial fibroblasts* pada ginjal. Protein EPO yang dihasilkan oleh ginjal dibawa ke sumsum tulang (*bone marrow*) tempat pembentukan sel darah merah berlangsung. Secara umum, meningkatnya kandungan EPO akan meningkatkan kandungan sel darah merah. Sel darah merah yang diproduksi akhirnya membawa oksigen ke seluruh tubuh. Dengan meningkatnya kandungan oksigen, kondisi *hypoxia* dapat ditanggulangi, dan pada saat kondisi *normoxia* (kandungan normal oksigen dalam darah) telah tercapai, proses stimulasi pembentukan EPO akan menurun (Bunn, 2013).

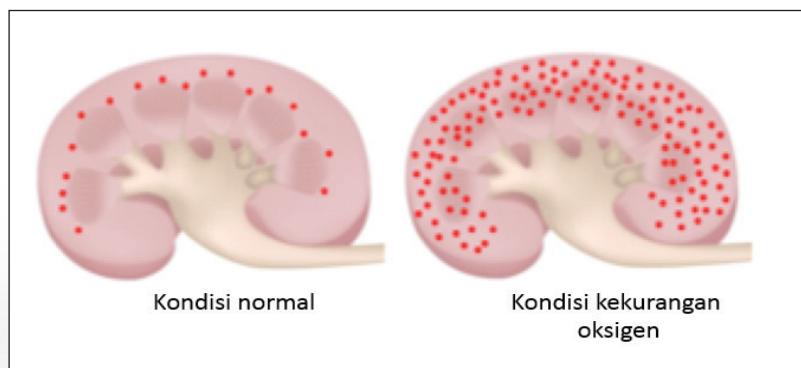


Sumber: Diadaptasi dari Suzana (2017)

**Gambar 3.1** Pengaturan dan Stimulasi Pembentukan Sel Darah Merah oleh EPO

Perbandingan respons ginjal dalam memproduksi EPO pada kondisi normoksia dan hipoksia dapat dijelaskan melalui Gambar 3.2. Pada gambar tersebut, terlihat dengan jelas pada saat kondisi tubuh sedang mengalami hipoksia, jumlah sel interstitial pada ginjal yang memproduksi EPO terlihat sangat banyak. Sebaliknya, pada kondisi normal, jumlah sel interstitial yang memproduksi EPO jauh berkurang. Hal ini menunjukkan bahwa regulasi produksi EPO pada ginjal terjadi dengan cara *on/off* sehingga produksi EPO pada ginjal dapat berlangsung dengan cepat untuk meningkatkan kandungan oksigen dalam darah.

Perkembangan ilmu kedokteran dan bioteknologi yang semakin cepat menghadirkan cara baru dalam memproduksi bahan baku obat berbasis protein yang dikenal dengan nama obat biologi (*biologic drugs*). Hingga saat ini, terdapat sekitar 200 obat dan vaksin dalam kategori produk bioteknologi yang telah secara ilmiah terbukti mampu menyembuhkan ataupun mencegah berbagai jenis penyakit (Lybecker, 2017). Produk obat biologi umumnya digunakan untuk mengobati dan mencegah banyak penyakit yang langka dan serius, seperti kanker, serangan jantung, *stroke*, *multiple sclerosis*, *diabetes*, *rheumatoid arthritis*, penyakit autoimun, dan beberapa penyakit lainnya (Lybecker, 2017).



Sumber: Diadaptasi dari Bowen (2018)

**Gambar 3.2** Ilustrasi perbedaan jumlah sel yang memproduksi EPO pada kondisi normoksia dan hipoksia.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Pengembangan produk obat biologi relatif sangat rumit. Hal ini karena molekul obat yang disintesis dalam obat biologi mempunyai struktur yang sangat kompleks. Molekul obat tersebut diproduksi oleh sel hidup, dan secara intrinsik mempunyai molekul yang sangat bervariasi. Setelah masa paten produk obat biologi originator habis, industri farmasi lain dapat mendaftarkan produk obat biologi tersebut, biasanya dikenal sebagai produk obat biosimilar. Sekitar 10 jenis obat biologi saat ini yang digunakan untuk meningkatkan kandungan EPO dalam tubuh (*erythropoiesis-stimulating agents*) telah beredar secara komersial (Kalantar-Zadeh, 2017). Keberadaan obat biologi EPO ini tentunya dengan cepat diikuti riset dan produksi obat biosimilar EPO di beberapa negara, termasuk Indonesia.

## B. Eritropoietin dalam Perspektif Sejarah

Pada 1890, Viault (1890) mengamati bahwa 2 minggu setelah bepergian di negara Peru pada daerah dengan ketinggian 4.200 m di atas permukaan laut, dia mengamati bahwa jumlah sel darah merah meningkat dari 5,0 juta menjadi 7,1 juta/mm<sup>3</sup>. Pengamatan sederhana ini menunjukkan bahwa meningkatnya proses eritropoiesis (sintesis sel darah merah) akan terjadi dengan drastis pada saat kita terpapar pada kondisi hipoksia (kekurangan oksigen). Sejak saat itu, meningkatnya proses eritropoiesis pada saat tubuh mengalami hipoksia selalu menjadi topik perdebatan sengit. Pada 1906, Carnot & Deflandre melakukan penelitian yang sedikit berbeda dengan menyuntikkan plasma dari kelinci yang mengalami anemia pada kelinci normal. Hasil menunjukkan adanya peningkatan kandungan retikulosit (sel darah merah) pada kelinci normal (Carnot & Deflandre, 1906). Hal ini membuktikan adanya peningkatan faktor humoral, yang saat itu diberi nama *hemopoietin*, pada plasma kelinci yang mengalami anemia (Krumdieck, 1943; Erslev, 1953). Penelitian *milestone* berikutnya dalam EPO adalah penelitian yang dilakukan oleh Miyake dkk. (1977) yang berhasil melakukan purifikasi EPO dari urine dengan kemurnian yang sangat tinggi. Didapatnya protein EPO ini membuat informasi sekuens asam amino dapat diketahui dengan



cepat dan mudah. Keberhasilan Miyake dkk. (1977) akhirnya diikuti oleh keberhasilan Lin dkk. (1985) yang berhasil melakukan kloning gen *human EPO* dari *chinese hamster ovary* (CHO) dan Jacobs dkk. (1985) dari *African green monkey kidney cells*. Dengan ditemukannya gen *human EPO*, produksi *human EPO* memasuki era baru karena dengan teknologi rekombinan, industri farmasi mampu membuat *human EPO* dalam jumlah besar dalam waktu yang sangat singkat.

Riset tentang tempat sebenarnya EPO diproduksi juga mendapat perhatian luar biasa kalangan peneliti EPO. Penelitian ini mulai mendapat titik terang pada saat Jacobson dkk. (1957) melakukan prosedur *nephrectomy* (menghilangkan atau mengurangi sebagian dari fungsi ginjal). *Nephrectomy* yang dilakukan pada beberapa hewan menyebabkan hewan tersebut tidak dapat memproduksi EPO. Ini menunjukkan bahwa ginjal menjadi salah satu pusat produksi EPO dalam hewan mamalia. Tikus yang mengalami gagal ginjal juga menunjukkan penurunan produksi EPO yang sangat drastis (Gurney dkk., 1957). Akhir dari penelusuran tentang organ pengeksresi EPO lebih diyakinkan lagi dengan ditemukannya level mRNA EPO yang sangat tinggi pada ginjal. Pada saat kekurangan oksigen, level mRNA EPO meningkat. Sebaliknya, pada saat suplai oksigen mencukupi, level mRNA EPO akan kembali normal. Sebagian besar mRNA EPO diekspresikan pada jaringan ginjal dan hati (Conrad dkk., 1996; Yin & Blanchard, 2000). Penemuan ini juga menjadi awal ditemukannya fakta bahwa pada saat *fetal life* (kehidupan sebelum lahir), organ utama produksi EPO adalah hati dan setelah lahir, produksi EPO adalah di ginjal (Beru dkk., 1986; Zanjani dkk., 1974). Secara lengkap perkembangan penelitian EPO dijelaskan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Erythropoietin dalam Perspektif Sejarah

Kontributor	Kontribusi	Keterangan
Carnot & Delfandre (1906)	Darah kelinci yang mengalami anemia disuntikkan pada kelinci donor. Terjadi peningkatan sel darah merah 20%–40% pada kelinci donor.	Menunjukkan adanya faktor humoral yang mengontrol produksi sel darah merah.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Kontributor	Kontribusi	Keterangan
Krumdieck (1943)	Darah dari kelinci yang mengalami hipoksia disuntikkan pada kelinci donor. Terjadi peningkatan sel darah merah pada kelinci donor.	Adanya hubungan langsung antara hipoksia dan jumlah sel darah merah.
Erslev (1953)	Plasma dari kelinci yang mengalami anemia disuntikkan pada kelinci donor. Terjadi peningkatan jumlah sel/retikulosit pada kelinci donor.	Molekul EPO kemungkinan bisa digunakan untuk terapi.
Hodgson &Toha (1954)	Deteksi EPO pada urine dan plasma pada kelinci yang mengalami anemia.	Keberadaan EPO pada urine.
Fisher & Birdwell (1961)	Deteksi EPO pada ginjal.	Ginjal dapat memproduksi EPO.
Fried (1972)	Deteksi aktivitas EPO pada hati.	Hati dapat memproduksi EPO.
Miyake dkk. (1977)	Purifikasi EPO dari urin pada pasien anemia.	EPO berhasil diisolasi dan karakterisasi.
Jacobs dkk. (1985) Lin dkk. (1985)	Kloning gen EPO.	EPO dapat diproduksi dengan menggunakan teknik bioteknologi.

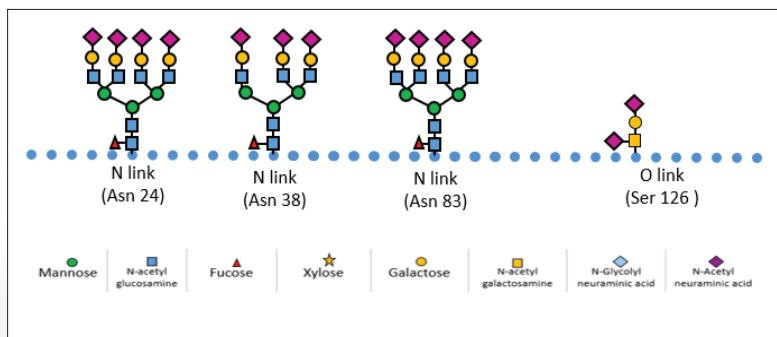
Sumber: Ng dkk. (2003)

### C. Biokimia Eritropoietin dan Perannya dalam Klinis

Human EPO adalah *hematopoietic growth factor* pertama yang diklon (Jacobs dkk., 1985; Lin dkk., 1985) dan mempunyai untai tunggal 165 asam amino dengan 3 posisi N-glikosilasi pada Asn24, Asn38 dan Asn83, dan 1 posisi O-glikosilasi pada Ser126. Molekul hEPO mempunyai berat molekul 30,400 Da (Browne dkk., 1986; Egrie dkk., 1986) (Gambar 3.3). Namun, 40% dari berat molekul ini berasal dari berat molekul karbohidrat EPO dalam bentuk glikosilasi. Walaupun

kontribusi berat molekul karbohidrat hanya 40%, sebagian besar permukaan molekul hEPO ditutupi (*masked*) oleh karbohidrat (Egrie & Browne, 2001). Hal ini yang membuat pola glikosilasi mempunyai fungsi yang esensial terhadap fungsi biologis hEPO. Glikosilasi yang tidak tepat atau modifikasi pada rantai glikan hEPO dapat mengakibatkan perubahan aktivitas, baik *in vitro* maupun *in vivo*.

Unit-unit oligosakarida atau glikan pada glikoprotein memiliki beberapa fungsi, seperti mengatur proses *fold*ing rantai polipeptida pada retikulum endoplasmik, melindungi protein dari proteolisis, dan modulasi aktivitas biologis (Brinkman dkk., 2000; Devasahayam, 2007). Proses sintesis polipeptida diatur secara genetik, sedangkan proses glikosilasi diatur dengan mekanisme yang berbeda. Karbohidrat ditambahkan ke dalam rantai polipeptida melalui serangkaian proses enzimatik (*post-translational modifications*). Konsekuensinya, glikoprotein yang sama dapat ditemui dalam bentuk *glycoforms* yang berbeda. Proses glikosilasi ini sangat spesifik terhadap sel, spesies, dan rantai polipeptida. Setiap glikoprotein memiliki karakteristik pola glikosilasi yang spesifik dan *reproducible* (Skibeli dkk., 2001). Struktur oligosakarida dari suatu protein rekombinan juga tergantung pada metode ekspresi dan kondisi kultur.



Sumber: Diadaptasi dari Boissel dkk. (1993)

**Gambar 3.3** Skema Struktur Molekul EPO dengan Pola Glikosilasi 3 N-link dan 1 O-link

Kecepatan proses eritropoiesis sangat bergantung pada jumlah sel *proerythroblasts* dan konsentrasi EPO dalam darah. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pada saat jumlah sel *proerythroblasts* rendah, dibutuhkan kandungan EPO yang relatif tinggi untuk memenuhi kebutuhan tubuh akan sel darah merah. Demikian juga sebaliknya, pada saat jumlah sel *proerythroblasts* tinggi, jumlah EPO yang dibutuhkan semakin rendah (Stein, 2003; Fried, 2009).

Sebelum tersedianya molekul eritropoietin manusia dalam bentuk protein rekombinan (*recombinant human erythropoietin*, rhEPO), satu-satunya pengobatan untuk pasien dengan anemia gagal ginjal kronis adalah transfusi darah. Namun, transfusi darah yang secara rutin dilakukan untuk menjaga kadar hemoglobin tubuh juga mempunyai risiko. Salah satunya adalah kelebihan zat besi dalam tubuh. Keadaan ini tentu saja akan mengganggu proses manajemen penyembuhan anemia yang sedang dilakukan. Meningkatnya kemajuan teknologi obat biologi telah mendorong tersedianya obat jenis ini untuk penyakit anemia. Serangkaian uji klinis yang dilakukan membuktikan bahwa obat rhEPO dapat digunakan secara efektif sebagai terapi anemia pada pasien yang mengalami gagal ginjal kronis. Keberhasilan ini menjadi tonggak sejarah diterimanya penggunaan rhEPO sebagai agen terapeutik pada 1988 dalam perawatan anemia bagi pasien gagal ginjal. Keberhasilan pertama kali kloning gen EPO yang dilakukan pada 1985 dan diterimanya penggunaan klinis rhEPO secara resmi untuk pasien anemia pada 1988 membuat kemajuan riset EPO tergolong sangat cepat. Beberapa contoh aplikasi klinis rhEPO adalah gagal ginjal kronis dan akut, kemoterapi kanker, HIV/AIDS, pasien yang melakukan transfusi, saat operasi dan pasca-operasi, rheumatoid arthritis, dan segala sesuatu yang berhubungan dengan kondisi anemia.

## D. Sintesis Human Erythropoietin

Sebagai salah satu hormon glikoprotein yang sangat penting dalam tubuh manusia, EPO mempunyai fungsi dalam produksi sel darah merah pada sumsum tulang. Sel darah merah yang dihasilkan esensial fungsinya untuk transportasi oksigen ke seluruh tubuh sehingga proses respirasi pada setiap sel dapat terjadi. Berkurangnya produksi EPO oleh ginjal dapat mengakibatkan anemia. Melihat fungsinya yang vital dan kebutuhan dunia kedokteran yang begitu tinggi terhadap EPO, sintesis human EPO banyak dilakukan oleh industri biofarmasi.

### 1. Sintesis human eritropoietin pada sel mamalia

Sebagai molekul protein yang mempunyai 3 N-link gugus karbohidrat, EPO adalah glikoprotein yang dalam proses pembentukannya dalam tubuh manusia membutuhkan proses modifikasi pascatranslasi yang sangat rumit. Proses pasca-translasi pada molekul EPO sangat esensial, terutama dalam kaitannya agar protein ini mempunyai struktur tiga dimensi yang tepat sehingga secara biologis dapat berfungsi dalam pembentukan sel darah merah seperti yang diinginkan (Jayapal dkk., 2007). Pada proses glikosilasi yang terjadi dalam sel inang, beberapa jenis unit karbohidrat yang sangat spesifik diikatkan pada protein tertentu yang mempunyai motif N-link atau O-link. Proses glikosilasi untuk keperluan obat manusia biasanya dilakukan dalam sel mamalia. Hal ini karena sel inang seperti bakteri tidak mampu untuk melakukan proses glikosilasi seperti pada sel mamalia (Jayapal dkk., 2007). Oleh sebab itu, produk obat berbasis bioteknologi sampai saat ini sebagian besar diproduksi menggunakan sel mamalia yang dalam hal ini adalah menggunakan sel CHO (*Chinese hamster ovary*) (Lai dkk., 2013). Sel CHO berasal dari sel *ovary Chinese hamster (Cricetulus griseus)* dan pertama kali dikembangkan oleh pada laboratorium Theodore Puck pada 1956 (Puck, 1957; Puck, 1985) pada Institute Eleanor Roosevelt, Amerika Serikat. Pada penelitian tersebut, sel CHO berhasil diisolasi dan dapat ditumbuhkan secara *in vitro* pada cawan petri. Tabel 3.2 menjelaskan sejarah perkembangan dan *milestone* pada sel CHO.

**Tabel 3.2** Sejarah Perkembangan Sel CHO

Tahun	Perkembangan sel/produk	Keterangan
1956	Original CHO	Sel line CHO pertama kali dikembangkan oleh Theodore Puck di Institute Eleanor Roosevelt, Amerika Serikat.
1968	CHO-K1	Kao dan Puck berhasil melakukan kloning pada sel original CHO. Sel ini kemudian didistribusikan pada beberapa peneliti di dunia.
1971	CHO-S	Sel CHO berhasil diadaptasikan pada kultur sus-pense.
1980	CHO DXB11	Urlaub dan Chasin berhasil melakukan studi mu-tasi gen DHFR satu lokus ( <i>dihydrofolate reductase</i> ) pada sel CHO.
1981	CHO-MTX Induced	Amplifikasi gen dengan menggunakan methotrex-ate (MTX)
1983	CHO DG44	Urlaub dan Chasin berhasil melakukan studi mu-tasi gen DHFR dua lokus ( <i>dihydrofolate reductase</i> ) pada sel CHO.
1989	CHOK1SV	Vektor untuk kloning dengan menggunakan sistem ekspresi Glutamine Synthetase (GS) berhasil dibuat.

Sumber: Wurm (2013)

Sel CHO telah digunakan untuk produksi protein terapeutik, antibodi monoklonal, hormon, enzim yang terhitung lebih dari 70% dari keseluruhan rekombinan terapeutik dengan nilai pasar lebih dari 99 miliar US\$. Selain kemampuannya dalam melakukan proses modifikasi pasca-translasi sehingga protein yang dihasilkan kompatibel dengan sistem pada tubuh manusia (Kim dkk., 2012), keuntungan lainnya adalah sel CHO mampu tumbuh dan beradaptasi pada kultur suspensi dengan serum *free* media dan sangat terdefinisi secara kimia sehingga dapat dengan mudah untuk dikondisikan dalam produksi skala yang besar pada industri biofarmasi (Lai dkk., 2013). Keuntungan penggunaan sel CHO lainnya adalah sel ini tergolong aman dan mempunyai risiko yang rendah terhadap kemungkinan

Buku ini tidak diperjualbelikan.

terkontaminasi oleh virus manusia (Boeger dkk., 2005). Tabel 3.3 berisi contoh beberapa produk obat biologi yang diproduksi pada sel CHO.

Produksi obat biologi membutuhkan suatu komitmen yang sangat tinggi karena dana yang dibutuhkan sangat besar dan membutuhkan banyak tenaga ahli yang berpengalaman. Tingginya tingkat kompleksitas produksi obat biologi karena pada tahap pengembangan sel *line* terdapat beberapa tahap seleksi sel yang harus dilakukan. Setiap klon sel dapat memiliki sifat yang berbeda sehingga upaya yang signifikan sangat dibutuhkan agar klon yang mempunyai karakter produksi yang tinggi dan sel yang stabil bisa didapatkan (Kim dkk., 2012; Lai dkk., 2013; Jayapal dkk., 2007).

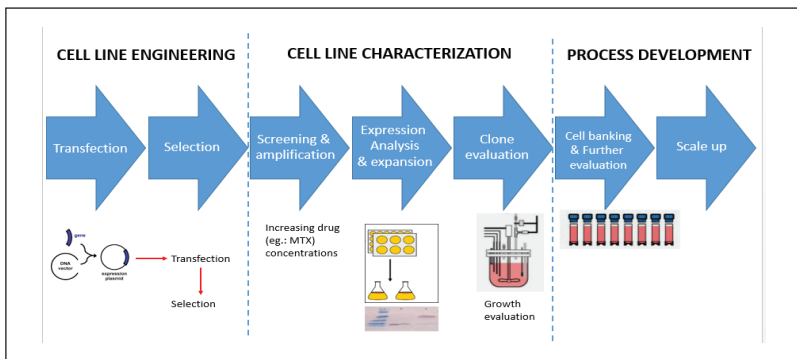
Tahap awal produksi obat biologi adalah pengembangan sel *line* yang akan digunakan untuk produksi obat yang diinginkan. Sel inang ditransfeksi vektor ekspresi yang mengandung gen target dan marker seleksi. Selanjutnya, sel yang telah ditransfeksi

**Tabel 3.3** Contoh Beberapa Produk Obat Biologi yang Diproduksi pada Sel CHO

Nama Dagang	Nama Generik	Kategori Produk	Fungsi Biologis
Enbrel	Etanercept	Antibodi	Antagonis TNF
Rituxan	Rituximab	Antibodi	Sel B non Hodgkin lymphoma
Procrit	Epoetin alfa	EPO	Erythropoietin
Epogen	Epoetin alfa	EPO	Erythropoietin
Pulmozyme	Dornase alfa	Rekombinan Deoxy-ribonuclease1	Cystic Fibrosis
Avonex	Interferon Beta	Interferon	Pasien multiple Sklerosis
Recombinate	Faktor VIII	Faktor darah	Hemofilia A
Benefix	Faktor IX	Faktor darah	Hemofilia B
Follistim	Follitropin Beta	Hormon	Treatment untuk infertility

Sumber: Datta dkk. (2013)

diseleksi untuk mendapatkan sel yang memproduksi protein yang diinginkan (Gambar 3.4). Pada sistem amplifikasi gen, konsentrasi agen penyeleksi, misalnya *methotrexate* (MTX), ditingkatkan secara bertahap untuk memperoleh klon sel yang lebih produktif. Kloning sel tunggal (*single cell cloning*) atau pengenceran terbatas (*limiting dilution*) dilakukan untuk memastikan sel terpilih menghasilkan protein rekombinan. Klon sel dengan titer protein rekombinan tinggi dipilih untuk tahap ekspansi dan evaluasi klon lebih lanjut, di antaranya stabilitas produksi dan kualitas protein rekombinan (Lai dkk., 2013). Klon terpilih selanjutnya dievaluasi dalam bioreaktor dan dilakukan penyimpanan untuk penggunaan ke depannya (Sautter & Enenkel, 2005). Sel klon yang berhasil melewati beberapa evaluasi lanjutan ini akhirnya akan digunakan untuk menghasilkan protein untuk uji nonklinis dan klinis (Jayapal dkk., 2007; Lai dkk., 2013; Kim dkk., 2012).



Sumber: Diadaptasi dari Lai dkk. (2013)

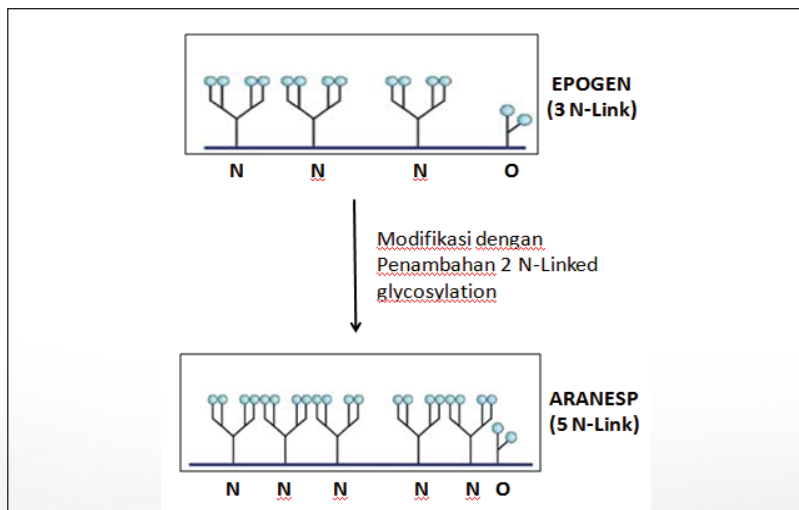
**Gambar 3.4** Proses pengembangan sel mamalia untuk pembuatan protein rekombinan.

Sehubungan dengan pengembangan produk obat berbasis biosimilar, Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, bekerja sama dengan PT Bio Farma (Persero) dan Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada melakukan penelitian pengembangan produksi bahan baku obat berbasis biosimilar rhEPO. Untuk kepentingan ini, dipilihlah sel mamalia



CHO-DG44 yang terkenal banyak digunakan oleh industri biofarmasi. Sel mamalia CHO-DG44 menjadi salah satu pilihan utama karena selain dapat digunakan untuk memproduksi protein terapeutik yang mempunyai pola glikosilasi sama dengan pola glikosilasi pada manusia, sel ini juga mampu menghasilkan produksi yang tinggi sehingga bila ditinjau dari segi ekonomi, dapat memberikan keuntungan yang diharapkan. Pada penelitian ini, dikembangkan proses produksi rhEPO yang telah dimodifikasi dengan penambahan rantai 2 N-linked dengan tujuan jangka panjang produksi obat berbasis biosimilar yang produk originatornya adalah Aranesp (Amgen Co.) (Gambar 3.5). Selain Aranesp, produk biosimilar EPO lainnya yang mempunyai 3 N-linked dan telah beredar secara komersial adalah molekul Epogen (Amgen Co.)

Molekul native hEPO memiliki rantai 3 N-linked dan rantai 1 O-linked dengan total jumlah asam sialat maksimum sebanyak 14 molekul. Dengan penambahan rantai 2 N-linked, molekul rhEPO yang akan disintesis memiliki pola glikosilasi rantai 5 N-linked dan



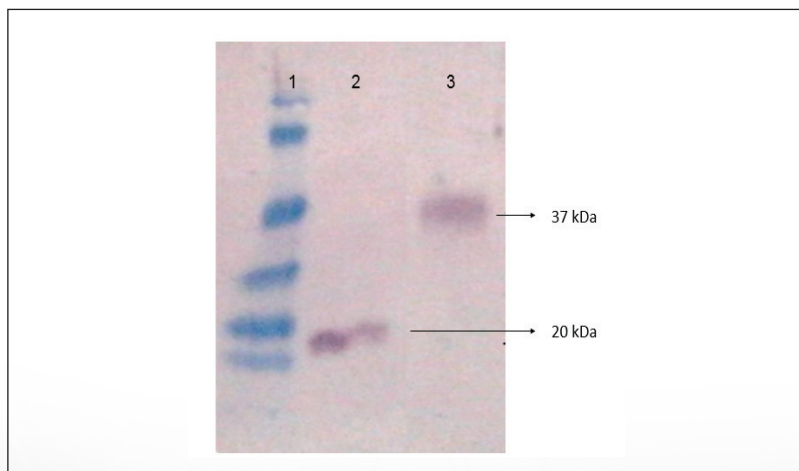
Sumber: Diadaptasi dari Egrie & Browne (2001)

**Gambar 3.5** Struktur molekul Epogen dan Aranesp yang masing-masing memiliki gugus 3 dan 5 N-link.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

rantai 1 O-linked dengan total asam sialat maksimum sebanyak 22 molekul (Gambar 3.5). Penambahan asam sialat pada molekul natif hEPO akan meningkatkan waktu paruh dan aktivitas biologisnya (Egrie & Browne, 2001; Byrne & Donohue, 2007). Peningkatan waktu paruh dan aktivitas biologis mempunyai dampak yang signifikan, termasuk pengurangan jumlah dosis yang diberikan sehingga biaya yang dibutuhkan untuk perawatan rhEPO relatif menjadi semakin murah.

Hasil analisis *Western blot* dengan enzim PNGase F menunjukkan bahwa protein rhEPO yang memiliki 5 gugus N-linked telah didapat seperti yang terlihat pada Gambar 3.6 (Santoso dkk., 2015). Pada gambar tersebut, terlihat bahwa molekul EPO yang memiliki 5 gugus N-linked mempunyai ukuran sebesar 37 kDa. Pemotongan gugus karbohidrat dengan menggunakan enzim PNGase F menunjukkan keberadaan protein backbone EPO dengan ukuran sebesar 20 kDa. Tahap selanjutnya yang sedang dilakukan pada penelitian ini adalah



Ket.: Lane 1: marker; lane 2: protein EPO 5 N-link (20 kDa) dengan gugus karbohidrat telah dipotong oleh enzim PNGase F, lane 3: protein EPO 5 N-link (37 kDa) dengan gugus karbohidrat tidak dipotong.

Sumber: Santoso dkk. (2015)

**Gambar 3.6** Analisis *Western Blot* dan *Gel Shift*

mempelajari profil glikosilasi protein EPO yang dihasilkan. Adanya kerjasama dengan PT Bio Farma (Persero) dan UGM ini diharapkan dapat meningkatkan kemandirian bangsa Indonesia dalam bidang bahan baku obat.

## 2. Sintesis human erythropoietin pada tanaman

Sebelum menggunakan sel mamalia sebagai sel inang untuk memproduksi rhEPO dan dalam rangka untuk mencari sistem produksi alternatif yang jauh lebih murah, digunakanlah teknologi *molecular farming*. *Molecular farming* adalah terminologi yang sering digunakan untuk proses protein skala besar dengan tanaman sebagai bioreaktor. Keuntungan dari teknologi ini adalah dengan meningkatkan jumlah tanaman sehingga jumlah protein yang didapat akan meningkat. Pada penelitian ini, *barley stripe mosaic virus* (BSMV) digunakan sebagai vektor. Virus BSMV telah dipelajari dengan saksama dan memiliki sistem genom yang dapat digunakan sebagai vektor dengan cara skrining yang mudah. BSMV tergolong kelompok *Hordeivirus* yang memiliki materi genetik *single stranded* (ss)<sup>+</sup> RNA dan memiliki tiga genom, yaitu genom  $\alpha$  yang terdiri atas satu protein  $\alpha\alpha$ , genom  $\beta$  yang terdiri atas empat protein  $\beta\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\beta\gamma$ , dan  $\beta\delta$ , dan genom  $\gamma$  yang terdiri atas dua protein  $\gamma\alpha$  dan  $\gamma\beta$  (Santoso & Edwards, 2003).

Pada awal penelitian ini, produksi EPO dilakukan dengan virus BSMV yang telah diintegrasikan dengan gen human EPO. Virus rekombinan yang didapat kemudian ditransfeksikan ke dalam tanaman *barley* (*sejenis tanaman gandum*) yang bertindak sebagai tanaman inang. Melalui bantuan virus rekombinan tersebut, protein human EPO berhasil diproduksi pada tanaman *barley*. Gambar 3.7 memperlihatkan tanaman *barley* yang baru tumbuh dan siap untuk ditransfeksi.

Gambar 3.8 memperlihatkan tanaman yang telah mengalami transfeksi oleh virus BSMV dan terlihat bercak warna putih. Bercak putih tersebut muncul karena sel pada tanaman tersebut telah mati terinfeksi oleh virus, dan pada saat yang sama pada bercak tersebut, protein EPO berhasil diproduksi.



Sumber: Santoso dkk. (2007)

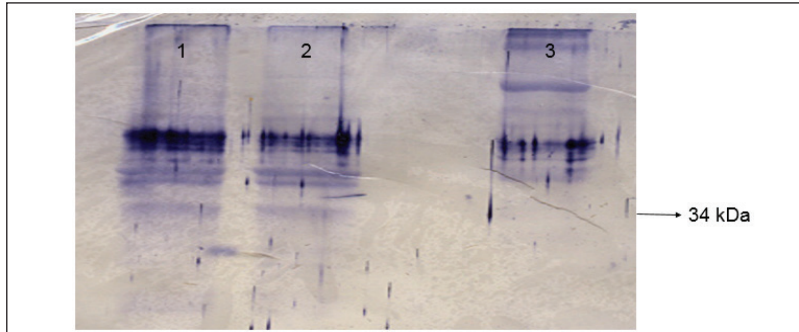
**Gambar 3.7** Benih tanaman barley yang telah bergerminasi selama 5 hari siap untuk diinfeksi dengan virus BSMV.



Sumber: Santoso dkk. (2007)

**Gambar 3.8** Perbedaan antara tanaman yang tidak terinfeksi (sebelah kiri) dan yang telah terinfeksi (sebelah kanan).

Hasil analisis *Western blot* pada Gambar 3.9 memperlihatkan pita protein *human EPO* pada tanaman *barley* yang telah diinfeksi oleh BSMV dengan ukuran 34 kDa. Sementara itu, pada tanaman yang tidak diinfeksi, protein EPO tidak tampak (Santoso dkk., 2007). Pada gambar tersebut juga terlihat *impurities* yang bereaksi silang dengan



Ket.: Lane 1 dan 2 adalah sampel dari tanaman yang terinfeksi oleh virus rekombinan BSMV. Tanda panah menunjukkan keberadaan protein hEPO pada lane 1 & 2. Lane 3 adalah sampel yang diambil dari tanaman yang tidak diinfeksi.

Sumber: Santoso dkk. (2007)

**Gambar 3.9** Analisis *Western blot* menggunakan antibodi human EPO.

antibodi yang digunakan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sistem *molecular farming* dapat digunakan untuk produksi Protein Terapeutik. Namun, karena pola glikosilasi pada tanaman sangat berbeda dengan pola glikosilasi pada manusia, penggunaan tanaman untuk produksi protein terapeutik yang memiliki gugus karbohidrat masih memerlukan studi dan modifikasi lebih lanjut.

Selain menggunakan tanaman, sistem ekspresi alternatif yang telah kami gunakan adalah *yeast Pichia pastoris*. Ragi metilotropik *Pichia pastoris* saat ini berperan besar dalam bidang bioteknologi, terutama untuk produksi protein obat berbasis biofarmasi (Kurtzman, 2009). Hal ini membuat penelitian bioteknologi tentang *P. pastoris* di berbagai laboratorium, baik pada universitas, institusi penelitian pemerintah maupun pada industri, menjadi sangat populer.

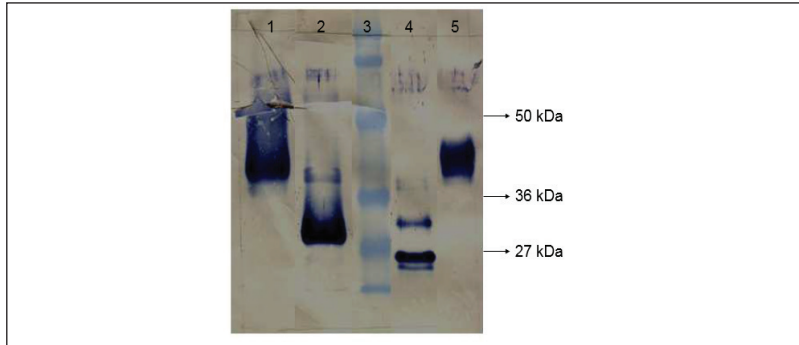
### 3. Sintesis human erythropoietin pada yeast

Penggunaan *yeast* sebagai salah satu sistem ekspresi protein telah cukup lama digunakan. Salah satu contoh *yeast* yang sering digunakan dalam bioteknologi untuk memproduksi suatu protein adalah *Pichia pastoris*. Penggunaan *P. pastoris* sebagai sistem ekspresi produksi protein heterolog telah terbukti mempunyai banyak keuntungan.

Beberapa keuntungan penggunaan *P. pastoris* bila dibandingkan dengan sistem ekspresi lainnya adalah 1) *P. pastoris* hanya menyekresikan sedikit protein endogen (protein yang berasal dari *P. pastoris*) sehingga sangat mempermudah proses purifikasi; 2) *P. pastoris* dapat tumbuh dengan kepadatan sel yang sangat tinggi (> 100 g/l berat sel kering) pada media yang relatif sederhana (Brierley, 1998; Li dkk., 2007); 3) keberadaan promotor AOX1 (alkohol oksidase 1) sangat mempermudah pengontrolan ekspresi protein rekombinan yang dikehendaki melalui mekanisme induksi (Cereghino & Cregg, 2000); 4) ekspresi pada *P. pastoris* juga menghilangkan kemungkinan kontaminasi endotoksin dan bakteriofag (Li dkk., 2007; Cereghino & Cregg, 2000); 5) *P. pastoris* dapat melakukan proses modifikasi pascatranslasi, seperti glikosilasi, metilasi, asilasi, regulasi proteolitik yang dapat ditargetkan pada kompartemen subseluler tertentu. Walaupun pola glikosilasi pada protein rekombinan yang dihasilkan dari *P. pastoris* sedikit berbeda dengan pola glikosilasi pada sel mamalia atau manusia, masalah ini dapat dipecahkan menggunakan sel *humanized P. pastoris* (Hamilton dkk., 2006). Dengan sel *humanized P. pastoris*, pola glikosilasi yang dihasilkan akan menyerupai pola glikosilasi pada manusia. Masalah utama yang dihadapi dengan *Pichia* terletak pada modifikasi lebih lanjut yang harus dilakukan untuk membuat *P. pastoris* menjadi *humanized Pichia*.

Untuk menyintesis molekul hEPO menggunakan *P. pastoris* sebagai sistem ekspresi, gen human EPO diintegrasikan pada genom sel *P. pastoris* strain X33 di bawah kontrol promotor AOX1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rhEPO berhasil disintesis dengan hasil sebesar 4 mg/liter media. Analisis *Western blot* menunjukkan bahwa rhEPO berhasil disintesis oleh sel *P. pastoris* dengan berat molekul sebesar 37 kDa (Gambar 3.10). Untuk membandingkan antara EPO yang diproduksi dengan menggunakan *P. pastoris* dan EPO yang beredar secara komersial, EPO yang diproduksi menggunakan sel mamalia CHO juga dianalisis sebagai pembanding. Untuk analisis lebih lanjut mengenai keberadaan glikosilasi pada molekul hEPO yang berhasil disintesis, enzim PNGase F digunakan untuk memotong gugus karbohidrat yang terbentuk. Terlihat dengan jelas bahwa





Ket.: Lane 1: rhEPO dari *P. pastoris*, Lane 2: rhEPO dari *P. pastoris* setelah perlakuan dengan enzim PNGase F. Lane 3: Marker (*b*-galaktosidase 118 kDa; BSA 90 kDa; ovalbumin 50 kDa; karbonik anhidrase 36 kDa; beta-laktoglobulin 27 kDa dan lysozyme 20 kDa). Lane 4: rhEPO dari sel mamalia CHO setelah perlakuan dengan enzim PNGase F. Lane 5: rhEPO dari sel mamalia CHO.

Sumber: Santoso dkk. (2013)

**Gambar 3.10** Hasil Analisis *Western Blot* Protein Rekombinan Human *Erythropoietin* (rhEPO).

pemotongan gugus karbohidrat EPO yang diproduksi oleh *P. pastoris* dan sel CHO telah terjadi penurunan berat molekul 27 kDa untuk EPO dari *P. pastoris* dan 20 untuk EPO dari sel CHO. Penurunan berat molekul ini adalah karena secara teori 40% dari berat molekul EPO berasal dari gugus karbohidratnya, sedangkan berat molekul yang berasal dari asam aminonya hanya 60%. Hasil berat molekul EPO yang berasal dari *P. pastoris* lebih tinggi daripada EPO yang berasal dari sel CHO karena EPO yang berasal dari *P. pastoris* masih mengandung gugus karbohidrat. Ini dapat terlihat dari *smears* yang terlihat pada Lane 1 dan 2 (Gambar 3.10).

## E. Obat Biosimilar EPO

Sejak disetujuinya rekombinan protein pertama kali di dunia, yakni insulin pada 1982, obat biologi telah terbukti mempunyai peran signifikan dalam pengobatan berbagai penyakit. Habisnya masa paten beberapa obat biologi memungkinkan tumbuhnya produk obat biosimilar. Tersedianya produk obat biosimilar diperkirakan dapat



membantu mengurangi pengeluaran obat minimal sebesar 30%. Hal ini membuat lebih banyak pasien mempunyai akses terhadap obat biologi.

hEPO mempunyai fungsi yang esensial dalam tubuh dan merupakan faktor utama dalam pembentukan darah merah. Menurunnya kandungan hEPO dalam tubuh dapat menyebabkan anemia. Saat ini, rekombinan hEPO menjadi salah satu obat utama dan merupakan prosedur standar dalam penyembuhan penderita gagal ginjal kronis, penderita kanker yang melakukan kemoterapi, AIDS, dan *rheumatoid arthritis*. Penggunaan EPO oleh beberapa penderita penyakit tersebut menunjukkan peningkatan kandungan hemoglobin dan peningkatan kualitas hidup. Hal ini membuat rekombinan hEPO menjadi salah satu *blockbuster drug* yang sangat dibutuhkan dunia.

Epoetin alfa adalah produk eritropoietin pertama kali yang beredar secara komersial dengan nama dagang Epogen pada 1989 oleh pabrik obat biofarmasi Amgen dari Amerika Serikat. Selain Amgen, Johnson and Johnson menjual obat yang sama dengan nama dagang Procrit. Sejak beredar secara komersial, obat ini cukup lama menduduki peringkat pertama dunia dalam penjualan obat biologis. Kuatnya hak paten Epoetin di Amerika Serikat membuat perusahaan lain yang memproduksi obat sejenis sangat sulit untuk menembus pasar obat di Amerika. Namun, di luar Amerika, hak paten obat ini tidak terlalu kuat sehingga obat biosimilar Epoetin pertama muncul. Pada 2007, dua obat biosimilar EPO produk yang disetujui (*approved*) oleh European Medicines Agency (EMA) adalah HX575 (epoetin alfa) dan SB 309 (epoetin Zeta) (Abraham & MacDonald, 2012).

Sebagai obat yang sangat berpengaruh terhadap pembentukan sel darah merah, Epogen adalah obat biologi EPO generasi pertama (memiliki 3 gugus N-link). Epogen memiliki waktu paruh yang relatif pendek (sekitar 8 jam). Hal ini membuat penggunaan Epogen membutuhkan penyuntikan yang relatif sering untuk meningkatkan dan menjaga stabilitas hemoglobin dalam tubuh bagi yang membutuhkannya. Keberadaan generasi kedua EPO, misalnya Darbepoetin (memiliki 5 gugus N-link) dan Mircera (pegylated

Buku ini tidak diperjualbelikan.

EPO, molekul EPO yang dikonjugasikan dengan molekul polietilen glikol), memungkinkan peningkatan waktu paruh EPO menjadi 2–3 kali lebih tinggi dibandingkan Epogen. Peningkatan waktu paruh ini memungkinkan penyuntikan EPO menjadi lebih jarang, menjadi sekali dalam seminggu atau sebulan, tergantung kondisi pasien yang membutuhkan. Darbepoietin dengan nama dagang Aranesp yang dikembangkan oleh Amgen telah disetujui oleh FDA (Food and Drug Administration) pada 2001, sedangkan Mircera yang dikembangkan oleh Roche disetujui oleh FDA dan EMA pada 2007. Secara detail, pengembangan EPO biosimilar dan jenisnya yang telah beredar secara komersial dapat dilihat pada Tabel 3.4.

**Tabel 3.4** Ringkasan Berbagai Jenis Produk Obat Berbasis EPO

Inovasi	Nama Dagang	Nama Perusahaan	Disetujui tahun	Jenis Teknologi
<b>Generasi Pertama</b>				
Epoetinalfa	Epogen <sup>®</sup>	Amgen	1989	Sel CHO
	Epex <sup>®</sup>	Ortho Biotech	1988	
	Procrit <sup>®</sup>	Amgen	1989	
Epoetin beta	Recormon <sup>®</sup>	Boehringer Mannheim	1990	Sel CHO
Epoetin omega	Epomax <sup>®</sup> Hemax <sup>®</sup>	Elanex/Baxter	1990	Sel BHK
<b>Generasi Kedua</b>				
Epoetin beta	Neorecormon <sup>®</sup>	Roche	1997	Sel CHO
Darbepoetinalfa	Aranesp <sup>®</sup>	Amgen	2001	Sel CHO
<b>Generasi Ketiga</b>				
Epoetin delta	Dynepo <sup>®</sup>	Shire	2002	Sel HT-1080
Methoxy poly-ethylene glycol epoetin beta	Mircera <sup>®</sup>	Roche	2007	Sel CHO
Epoetinalfa (biosimilar)	Binocrit <sup>®</sup> Abseamed <sup>®</sup> EpoetinalfaHexal <sup>®</sup>	Sandoz Medice Hexal AG	2007	Sel CHO

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Inovasi	Nama Dagang	Nama Perusahaan	Disetujui tahun	Jenis Teknologi
Epoetin zeta (biosimilar)	Retacrit <sup>®</sup> Silapo <sup>®</sup>	Hospira Stada	2007	Sel CHO
Epoetin theta	Biopoin <sup>®</sup> Eporatio <sup>®</sup>	Teva Ratio Pharm	2009	Sel CHO

Sumber: Kalantar-Zadeh (2017)

Seperti yang tertera pada Tabel 3.4, sejarah pengembangan EPO dan produk obat biosimilar dapat dikategorikan dalam 3 generasi. Secara umum, perbedaan generasi di antara produk EPO ini berkaitan dengan waktu paruh yang dihasilkan. Sebagai contoh, generasi kedua EPO, Darbepoietin alfa, mempunyai waktu paruh 2–3 kali lebih lama dibandingkan EPO generasi pertama, sedangkan generasi ketiga EPO, Mircera, mempunyai waktu paruh 6 kali lebih lama dari Darbepoietin. Teknologi yang digunakan untuk pengembangan EPO di antaranya melakukan modifikasi dalam hal penambahan gugus N-link glikosilasi dan penggunaan PEG dalam rangka meningkatkan waktu paruh dan fungsi biologis dalam tubuh pasien (Vega dkk., 2014).

## F. Penutup

Protein farmasetik EPO merupakan glikoprotein yang berperan fundamental dalam pembentukan sel darah merah. Terapi klinis menggunakan EPO secara umum sangat diperlukan bagi pasien yang mengalami anemia, terutama pada pasien gagal ginjal dan pasien yang sedang dalam perawatan kemoterapi. Molekul EPO merupakan salah satu molekul dalam obat biologi yang mempunyai gugus karbohidrat sangat tinggi dan pola glikosilasi yang sangat kompleks. Karena pola glikosilasi sangat erat kaitannya dengan waktu paruh dan aktivitas biologinya, proses produksi molekul EPO membutuhkan proses produksi yang rumit.

Dalam usaha untuk mendapatkan sistem ekspresi alternatif yang tergolong murah, penggunaan tanaman dan *yeast* telah dilakukan.

Namun, karena usaha ini masih terbentur dengan pola glikosilasi yang tidak kompatibel dengan pola glikosilasi pada manusia, pada penelitian ini akhirnya menggunakan sistem ekspresi pada sel mamalia yang dalam hal ini adalah sel CHO dan CHO-DG44.

Pengembangan produksi EPO dengan penambahan rantai 2 N-linked sedang dilakukan. Molekul rhEPO yang sedang disintesis memiliki pola glikosilasi 5 N-linked dan rantai 1 O-linked dengan total asam sialat maksimum sebanyak 22 molekul asam sialat. Penambahan asam sialat pada molekul natif hEPO akan meningkatkan waktu paruh dan aktivitas biologisnya (Egrie & Browne, 2001; Byrne dkk., 2007). Dengan meningkatnya waktu paruh dan aktivitas biologisnya, diharapkan akan dapat mengurangi jumlah dosis yang diberikan sehingga biaya yang dibutuhkan untuk perawatan dengan molekul EPO relatif menjadi lebih murah.

## Daftar Pustaka

- Abraham, I., & MacDonald, K. (2012). Clinical efficacy and safety of HX575, a biosimilar recombinant human erythropoietin, in the management of anemia. *Biosimilars*, 2, 13–25.
- Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C., & Goldwasser, E. (1986). Expression of the erythropoietin gene. *Molecular Cellular Biology*, 6, 2571–2575.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M., & Tassani, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6), 463–471.
- Boeger, H., Bushnell, A., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, S., Westover, D., & Kornberg, D. (2005). Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters*, 579, 899–903.
- Boissel, J. P., Lee, W. R., Presnell, S. R., Cohen, F. E., & Bunn, H. F. (1993). Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15983–93.
- Bowen, R. (2018). *Erythropoietin*. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/endocrine/otherendo/epo.html>

- Brierley, R. A. (1998). Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-1). *Methods in Molecular Biology*, 103, 149–177.
- Brinkman, E. C., Vander Linden, E. R., Sjoberg, L. R., Juneja, P. R., Crocker, N., & Varki A. (2000). Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution: Implications for sialic acid recognition by siglecs. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 8633–8640.
- Browne, J. K., Cohen, A. M., & Egrie, J. C. (1986). Erythropoietin: Gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 693–702.
- Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(3), a011619.
- Byrne, B., Donohoe, G. G., & O’Kennedy, R. (2007). Sialic acids: Carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*, 12, 319–326.
- Carnot, P., & Deflandre, C. I. (1906). Sur l'activité hématopoïétique de différents organes au cours de la régénération du sang. *Compt. Rend. Acad Sci.*, 143, 432–43.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45–66.
- Conrad, K. P., Benyo, D. F., Westerhausen-Larsen, A., & Miles, T. M. (1996). Expression of erythropoietin by the human placenta. *FASEB Journal*, 10(7), 760–768.
- Datta, P., Linhardt, R. J., & Sharfstein, S. T. (2013) An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol and Bioengineering*, 110(5), 1255–71.
- Devasahayam, M. (2007). Factors affecting the expression of recombinant glycoproteins. *Indian Journal of Medical Research*, 126(1), 22–27.
- Egrie, J. C., & Browne, J. K. (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer*, 84(1), 3–10.
- Egrie, J. C., Strickland, T. W., Lane, J., Aoki, K., Cohen, A. M., Smalling, R., Trail, G., Lin, F.K., Browne, J.K., & Hines, D. K. (1986).

- Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology*, 172(3–5), 213–224.
- Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood*, 8(4), 349–357.
- Fisher, J. W., & Birdwell, B. J. (1961). The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haematologica*, 26(4), 224–232.
- Fried, W. (1972). The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood*, 40, 671–677.
- Fried, W. (2009). Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 37(9), 1007–1015.
- Gurney, C. W., Goldwasser, E., & Pan, C. (1957). Studies on erythropoiesis: VI. Erythropoietin in human plasma. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 50(4), 534–542.
- Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B. K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R. R., Hoopes, J., Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2016). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313(5792), 1441–1443.
- Hodgson, G., & Toha, J. (1954). The erythropoietic effect of urine and plasma of repeatedly bled rabbits. *Blood*, 9(4), 299–309.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawakita, M., Shimizu, T., & Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 313(6005), 806–810.
- Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W., & Plzak, L. (1957). Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, 179(4560), 633–634.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., & Yap, M. G. S. (2007). Generation of recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Chemical Engineering Progress*, 103, 40–47.
- Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiological Reviews*, 72(2), 449–489.



- Kalantar-Zadeh, K. (2017). History of erythropoiesis-stimulating agents, the development of biosimilars, and the future of anemia treatment in nephrology. *American Journal of Nephrology*, 45(3), 235–247.
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930.
- Krumdieck, N. (1943). Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 54(1), 14–17.
- Kurtzman, C. P. (2009). Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 36(11), 1435–1438.
- Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. K. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, 6(5), 579–603.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 105–124.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., & Stabinsky, Z. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22), 7580–7584. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7580>
- Lybecker, K. M. (2017). *The biologics revolution in the production of drugs*. <https://www.fraserinstitute.org/sites/default/files/biologics-revolution-in-the-production-of-drugs.pdf>
- Miyake, T., Kung, C. K., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, 252(15), 5558–5564.
- Ng, T., Marx, G., Littlewood, T., & Macdougall, I. (2003). Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgraduate Medical Journal*, 79(933), 367–376.
- Puck, T. T. (1957). The genetics of somatic mammalian cells. *Adv. Biology. Med. Physics*, 5, 75–101.



- Puck, T. T. (1985). Development of the Chinese hamster ovary (CHO) cell for use in somatic cell genetics. Dalam M. M. Gottesman (ed.), *Molecular cell genetics*. John Wiley and Sons.
- Santoso, A., Fuad, A. M., Ningrum, R. A., Wijaya S. K., Herawati, N., Wardiana, A. (2007). Expression of human erythropoietin in barley stripe mosaic virus (BSMV). *Proceeding of international seminar on pharmaceuticals: Update on pharmaceutical innovation and new drug delivery system*.
- Santoso, A., & Edwards, M. C. (2003). Identification of the nucleotide substitutions required for Barley stripe mosaic hordeivirus pathogenicity to barley possessing the *rsm1* gene. *Phytopathology*, 93, S75–S76.
- Santoso, A., Rubiyana, Y., Wijaya, S. K., Herawati, N., Wardiana, A., & Ningrum., R. A. (2013). Heterologous expression and characterization of human erythropoietin in *Pichia pastoris*. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 4(4), 187–196.
- Santoso, A., Wisnuwardhani, P., Kusumawati, A., Romadhani, Y., Rubiyana, Y., & Romadhani, Y. (2015). Adaptation of Chinese hamster ovary K1 producing human erythropoietin to serum free suspension culture. *Prosiding pertemuan ilmiah tahunan. Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*.
- Sautter, K., & Enenkel, B. (2005). Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity. *Biotechnol and Bioengineering*, 89(5), 530–538.
- Skibeli, V., Nissen, L. G., & Torjesen, P. (2001). Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, 98(13), 3626–3634.
- Stein, R, S. (2003). The role of erythropoietin in the anemia of myelodysplastic syndrome. *Clinical Lymphoma*, 6, 52–55.
- Suzana, A. (2017). *Regulation of erythropoiesis*. <https://thebloodclustersmu.wixsite.com/haematology/single-post/2017/04/02/regulation-of-erythropoiesis>
- Vega, A., Abad, S., Verdalles, U., Aragoncillo, I., Velazquez, K, Quiroga, B., Escudero, V., & JM López-Gómez, J. M. (2014). Dose equivalence between continuous erythropoietin receptor activator (CERA),

Darbepoetin and Epoetin in patients with advanced chronic kidney disease. *Hippokratia*, 18(4), 315–318.

Viault, F. (1890). Sur l'augmentation considerable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hautes plateaux de l'Amerique du sud. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 111, 918–919.

Wurm, F. M. (2013). CHO quasispecies—implications for manufacturing processes. *Processes*, 1(3), 296–311.

Yin, H., & Blanchard, K. L. (2000). DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood*, 95(1), 111–119.

Zanjani, E. D., Ascensao, J. L., McGlave, P. B., Banisadre, M., & Ash, R. C. (1974). Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *Journal of Clinical Investigation*, 67(4), 1183–1188.



## BAB IV

# Strategi Produksi Human Insulin Menggunakan Khamir Metilotropik *Pichia pastoris*

*Dini Nurdiani, Neng Herawati, dan Wien Kusharyoto*

### A. Pendahuluan

Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit yang banyak menimbulkan kematian secara global dengan jumlah penderita pada 2015 mencapai 415 juta orang dan menyebabkan kematian 5 juta orang. Jumlah penderita diabetes diperkirakan akan terus meningkat setiap tahunnya sehingga diprediksi pada 2040 jumlahnya mencapai 642 juta orang (Ogurtsova dkk., 2017). Penderita diabetes melitus (kencing manis) tidak memiliki kemampuan untuk mengambil dan menggunakan gula darah sehingga kadar gula darah meningkat. Ada dua tipe utama diabetes, yaitu tipe 1 dan 2. Pada diabetes tipe 1, pasien mengalami defisiensi insulin yang disebabkan adanya kerusakan imunologis dari sel-sel  $\beta$  pankreas penghasil insulin. Pada diabetes tipe 2, pasien memproduksi insulin, tetapi sel tubuh tidak merespons dengan normal terhadap insulin. Pada kebanyakan kasus, hal tersebut disebabkan oleh resistansi insulin bersamaan dengan kurangnya sekresi insulin dan sering kali berhubungan dengan obesitas (Walsh, 2005; Baeshen dkk., 2016; Zaykof dkk., 2016). Dalam jangka panjang, penyakit diabetes dapat menimbulkan kegagalan dan kerusakan fungsi berbagai organ, seperti komplikasi vaskular pada organ mata, ginjal, jantung, pembuluh darah, dan saraf (Swidan & Montgomery,

Buku ini tidak diperjualbelikan.

1998). Untuk mencegah atau mengurangi komplikasi lebih lanjut dari diabetes, terapi insulin sangat dibutuhkan demi kelangsungan hidup penderita diabetes.

Insulin sebagai agen antidiabetes ditemukan pada 1921 oleh Frederick Banting dan Charles Best. Mereka berhasil mengekstrak insulin dari sel-sel pankreas anjing untuk menyembuhkan anjing yang menderita diabetes. Penggunaan ekstrak insulin kasar selanjutnya digunakan untuk menyembuhkan Leonard Thompson seorang remaja penderita diabetes, dan ini menjadi awal era terapi insulin untuk penyembuhan diabetes. Setelah penemuan tersebut, insulin komersial pertama diproduksi oleh perusahaan farmasi Amerika Serikat Eli Lilly (Walsh, 2005).

Selama beberapa dekade, produksi insulin konvensional berasal dari pankreas dari babi dan sapi. Namun, cara ini dianggap kurang efektif untuk memenuhi permintaan pasar yang diprediksi akan terus meningkat. Munculnya teknologi DNA rekombinan dan perkembangan ilmu kimia protein menjadi alternatif yang menjanjikan untuk produksi Human insulin (HI) secara langsung dan efektif untuk memenuhi kebutuhan pasar di masa kini maupun masa yang akan datang. Produksi HI berbasis bioteknologi ini menggunakan bakteri atau khamir yang dimodifikasi secara genetik sebagai 'mesin produksi' (Vajo dkk., 2001; Heinemann & Hompesch, 2014). Insulin merupakan produk rekombinan pertama yang diizinkan oleh FDA pada awal 1980-an untuk diaplikasikan pada manusia (Walsh, 2005; Ferrer-Miralles dkk., 2009).

Generasi pertama obat-obat biologis berbasis protein rekombinan telah secara signifikan memajukan pengobatan berbagai penyakit, termasuk diabetes (Lavalle-Gonzales & Khatami, 2014). Beberapa obat generasi pertama biofarmasetik berakhir masa patennya pada beberapa tahun terakhir. Hal ini membuka peluang pasar produk-produk biologis global menjadi produk berikutnya yang dinamakan biosimilar (DeVries dkk., 2014). Biosimilar adalah obat biologis yang diizinkan berdasarkan kemiripannya yang tinggi terhadap produk biologis hasil inovasi yang telah diizinkan sebelumnya yang dinamakan

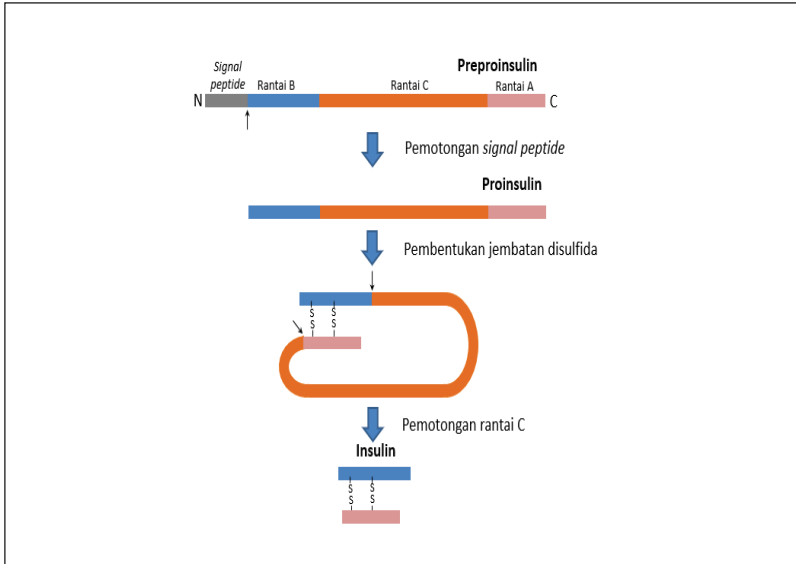
kan produk referensi (Camacho dkk., 2014). Untuk pasar insulin, perlindungan paten sejumlah insulin, seperti human insulin dan analognya, akan atau telah berakhir dalam waktu dekat, termasuk *rapid-acting* dan *long-acting* analog (seperti insulin aspart, lispro, dan glargine) (DeVries dkk., 2014).

Bab ini membahas insulin dan turunannya, biosimilar insulin, sistem ekspresi yang digunakan dalam produksi HI, ekspresi HI di *P. pastoris*, dan tahapan produksi HI rekombinan pada *P. pastoris*.

## B. Insulin dan Turunannya

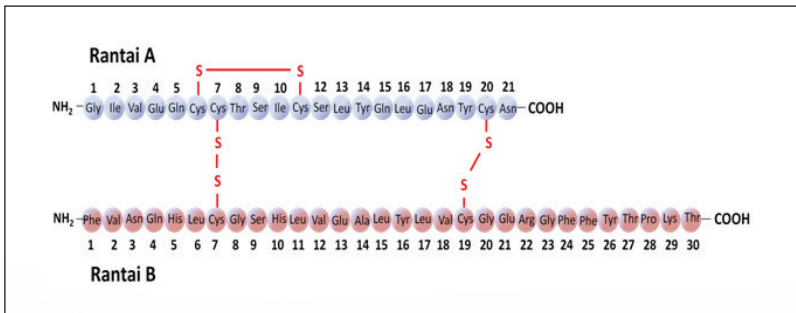
HI tersusun oleh 51 asam amino dan memiliki berat molekul 5.808 Da. HI dihasilkan oleh sel-sel beta pankreas dan berperan penting dalam regulasi metabolisme karbohidrat dan lemak di dalam tubuh. Proses sintesis HI ditampilkan pada Gambar 4.1. HI disintesis sebagai polipeptida tunggal dinamakan preproinsulin di dalam sel-sel beta pankreas. Preproinsulin mengandung 24 residu *signal peptide*, yang mengarahkan polipeptida yang baru terbentuk ke retikulum endoplasma. *Signal peptide* dipotong di dalam retikulum endoplasma menjadi proinsulin. Di dalam retikulum endoplasma, proinsulin dilipat dengan konformasi yang sesuai dengan pembentukan tiga ikatan disulfida. Proinsulin yang telah dilipat selanjutnya diangkut ke trans-Golgi network, di mana proinsulin diubah menjadi insulin aktif dengan endopeptidase seluler dinamakan prohormon convertase (PC1 dan PC2) dan eksoprotease karboksipeptidase E. Endopeptidase memotong pada dua posisi, menghasilkan pelepasan fragmen yang dinamakan C-peptide membentuk insulin aktif (Baeshen dkk., 2014).

Insulin merupakan protein pertama yang struktur primernya berhasil ditemukan oleh Sanger dkk. (1955), terdiri dari dua rantai polipeptida A dan B yang dihubungkan dengan dua ikatan disulfida (A7-B7 dan A20-B19). Rantai A memiliki satu lagi ikatan disulfida dalam rantainya (A6-A11). Sekuen asam amino HI ditampilkan pada Gambar 4.2.



Sumber: Digambar ulang dari Chegg Inc (t.t)

**Gambar 4.1** Proses modifikasi pasca-translasi dari preproinsulin menjadi insulin aktif.



Ket.: Terdiri atas dua rantai polipeptida A (21 asam amino) dan B (30 asam amino) yang dihubungkan dengan dua ikatan disulfida (A7-B7 dan A20-B19). Rantai A memiliki satu ikatan disulfida dalam rantainya (A6-A11).

Sumber: Digambar ulang dari *Insulin is a protein* (t.t).

**Gambar 4.2** Sekuen HI

HI pertama kali disintesis dengan teknologi DNA rekombinan pada 1970-an dan komersialisasinya dilakukan pada awal 1980-an. Biosintesis HI menjadi alternatif produksi insulin selain insulin yang diperoleh dari hewan dan—yang lebih penting—memungkinkan produksi protein manusia dalam jumlah yang hampir tidak terbatas. HI rekombinan yang diproduksi di *E. coli* dan *S. cerevisiae* ditampilkan pada Tabel 4.1. Teknologi DNA rekombinan juga menawarkan produksi analog-analog insulin *non-native* dengan kemampuan farmakologi yang superior. Gambar 4.3 menunjukkan perbedaan sekuen asam amino HI dan analog-analognya yang telah diizinkan untuk digunakan dalam pengobatan diabetes (Zaykof dkk., 2016).

**Tabel 4.1** HI Rekombinan/Hasil Rekayasa dan Analog-Analognya yang telah Dipasarkan

Nama Produk	Karakteristik	Modifikasi	Perusahaan	Izin Komersialisasi
Humulin	HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	Identik dengan <i>native</i> HI	Eli Lilly	1982 (AS)
Novolin	HI rekombinan diproduksi di <i>S. cerevisiae</i>	Identik dengan <i>native</i> HI	Novo Nordisk	1991 (AS)
Insuman	HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	Identik dengan <i>native</i> HI	Hoechst	1997 (Uni Eropa)
Actrapid/Velosulin/ Monotard/ Insulatard/Protaphane/ Mixtard/ Actraphane/ Ultratard	HI rekombinan diproduksi di <i>S. cerevisiae</i> diformulasi sebagai produk <i>short/ ntermediate/ long-acting</i>	Identik dengan HI	Novo Nordisk	2002 (Uni Eropa)
Humalog (Lispro)	Analog <i>short-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	Inversi dari sekuen <i>native</i> pada posisi ProB28LysB29	Eli Lilly	1996 (AS dan Uni Eropa)

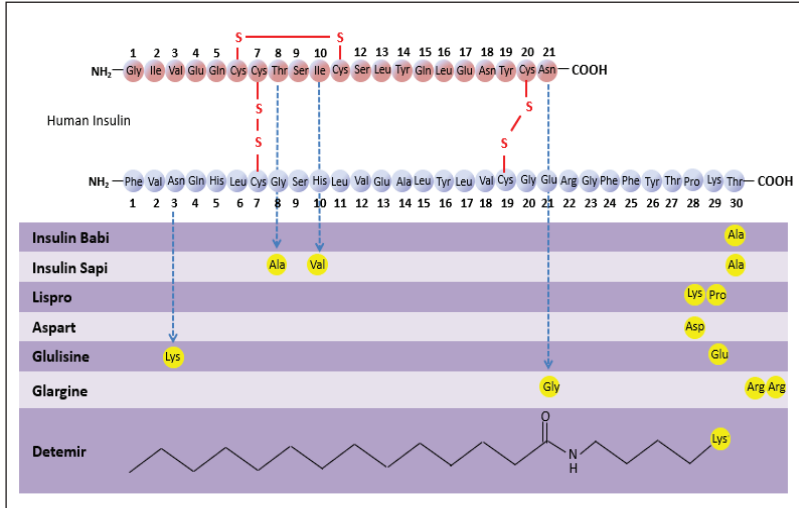
Buku ini tidak diperjualbelikan.



Nama Produk	Karakteristik	Modifikasi	Perusahaan	Izin Komer-sialisasi
Liprolog (Lispro)	Analog <i>short-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	Inversi dari sekuen <i>native</i> pada posisi ProB28LysB29	Eli Lilly	1997 (Uni Eropa)
NovoRapid (Aspart)	Analog <i>short-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>S. cerevisiae</i>	B28Pro digantikan oleh asam aspartat	Novo Nordisk	1999 (Uni Eropa)
Novolog (Aspart)	Analog <i>short-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>S. cerevisiae</i>	B28Pro digantikan oleh asam aspartat	Novo Nordisk	2000 (AS)
Levemir (Detemir)	Analog <i>long-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>S. cerevisiae</i>	Delesi B30Thr dan penam-bahan C14 asam lemak yang terikat secara kovalen pada B29Lys	Novo Nordisk	2006 (Uni Eropa)
Apidra (Glulisine)	Analog <i>rapid-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	B3Asn diganti-kan oleh lysine dan B29Lys di-gantikan asam glutamate	Aventis Pharma-ceu ticals	2006 (AS)
Lantus (Glargine; Optisulin)	Analog <i>long-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	A21Asn digantikan dengan glycine dan rantai B diperpanjang dengan dua arginine	Aventis Pharma-ceu ticals	2001 (AS dan Uni Eropa)
Degludec	Analog <i>long-acting</i> HI rekombinan diproduksi di <i>E. coli</i>	Delesi B30Thr dan penem-pelan asam heksadekan-dioat pada B29Lys	Novo Nordisk	2013 (Uni Eropa) 2015 (AS)

Sumber: Walsh (2005) dan Zaykof dkk. (2016)

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Ket.: Perbedaan sekuen antara HI dan analog-analognya ditandai dengan warna kuning.

Sumber: Digambar ulang dari Zaykof dkk. (2016)

**Gambar 4.3** Sekuen HI dan analog-analognya yang telah diizinkan untuk digunakan dalam pengobatan diabetes.

### C. Biosimilar Insulin

HI rekombinan pertama kali diizinkan untuk digunakan secara klinis pada 1982. Analognya kemudian dikembangkan dan dipasarkan dalam beberapa dekade terakhir. Sejak itu, beberapa biosimilar insulin (BI) nonbasal dan basal telah dikembangkan dan dipasarkan di negara-negara yang tidak memiliki panduan regulasi yang ketat, seperti India dan Tiongkok, baik oleh perusahaan-perusahaan baru di luar perusahaan yang mendominasi pasar insulin di Amerika maupun Eropa. Munculnya BI didukung pula oleh beberapa faktor, yaitu adanya kemajuan dalam teknologi produksi protein terapeutik yang memudahkan produksi insulin dan telah berakhirnya perlindungan paten dari HI dan analog-analognya, seperti insulin glargine dari Lantus 2014–2015, insulin lispro dari Humalog 2013, dan insulin aspart dari NovoRapid 2012 (Heinemann, 2012).

Biosimilar insulin merupakan produk salinan insulin yang diizinkan untuk dipasarkan di luar perlindungan paten. Hal ini menguntungkan bagi kompetisi pasar yang lebih besar dan memiliki potensi dalam menurunkan biaya produksi. Biosimilar insulin pertama yang memperoleh izin pemasaran adalah insulin glargine (Eli Lilly dan Boehringer Ingelheim) dengan nama dagang Abasglar diperkenalkan di pasar Eropa dan Basaglar di pasar Amerika Serikat sekitar tahun 2016. Namun, Basaglar di AS hanya memperoleh izin sementara dan bukan sebagai biosimilar karena belum adanya jalur regulasi untuk insulin. Paten untuk insulin glargine berakhir pada pertengahan tahun 2015, dan salinan insulin glargine yang dibuat oleh perusahaan farmasi yang lain telah dipasarkan di India, Tiongkok, Meksiko, dan negara lainnya (Heinemann dkk., 2015; Heinemann & Carter, 2017). Tabel 4.2 menampilkan beberapa BI yang tersedia ataupun dalam pengembangan di beberapa negara sampai dengan Juli 2014 yang dirangkum dari Lavalle-Gonzales dan Khatami (2014).

**Tabel 4.2** Biosimilar Insulin yang Tersedia atau dalam Pengembangan di Beberapa Negara

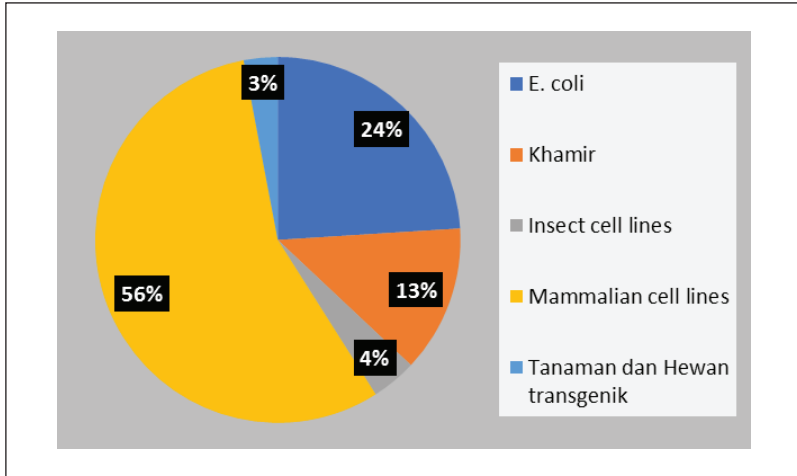
Nama Produk (Perusahaan, Negara)	Produk Referensi/ Produk Pembanding	Sistem Ekspresi	Izin Pemasaran (tahun)
BI Nonbasal			
Wosulin (Wockhardt, India)	Human Insulin/Novolin (Novo Nordisk)	<i>Hansenula polymorpha</i>	India (2003)
Insugen (Biocon, India)	Human Insulin/ Actrapid (Novo Nordisk)	<i>P. pastoris</i>	India (2004)
Gensulin, Scilin Bioton, Polandia)	Human Insulin/ Actraphene dan Humulin (Eli Lilly & Co.), Insuman (Sanofi)	<i>E. coli</i>	Polandia (2001)
Biosulin (Marvel Life Science, India)	Human Insulin/ Actraphene dan Humulin (Eli Lilly & Co.), Insuman (Sanofi)	<i>E. coli</i>	-
Prandilin (Gan dan Lee, Tiongkok)	Human Insulin/ Humalog (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	Tiongkok (2007)

Nama Produk (Perusahaan, Negara)	Produk Referensi/ Produk Pembanding	Sistem Ekspresi	Izin Pemasaran (tahun)
BI Basal			
Glaritus (Wockhardt, India)	Insulin Glargine/ Lantus	<i>E. coli</i>	India (2009). Dipasarkan juga di Tanzania, Nepal, Srilanka, dan Myanmar
Glarvia/Basalog (Biocon, India)	Insulin Glargine/ Lantus	<i>P. pastoris</i>	Proses komer- sialisasi (2013)
Basalin (Gan dan Lee, Tiongkok)	Insulin Glargine/Lantus dan Novolin	<i>E. coli</i>	Mesir, Pakistan, Asia Tenggara, Amerika Latin (2005)
Bonglixan (Landsteiner Scientific, Meksiko)	Insulin Glargine/ Lantus	<i>E. coli</i>	Meksiko (2008)

Sumber: Lavalle-Gonzales & Khatami (2014)

#### D. Sistem Ekspresi untuk Produksi HI

Berkembangnya teknologi rekayasa genetika serta semakin meningkatnya jumlah pasien yang menderita penyakit diabetes melitus (DM) menyebabkan kebutuhan akan insulin sebagai agen pengobatannya juga meningkat (Kjeldsen, 2000). Insulin terapeutik dan produk-produk berbasis insulin lainnya tetap menjadi salah satu produk bioteknologi farmasi yang paling sering digunakan sehingga menguasai penjualan global tahunan mencapai lebih dari 4,5 miliar US\$ (Walsh, 2005). Kondisi ini mendukung munculnya produsen-produsen baru dari berbagai kalangan, baik peneliti maupun perusahaan farmasi, yang berusaha memproduksi insulin, khususnya insulin manusia menggunakan teknologi rekayasa genetika. Kualitas protein, fungsi, kecepatan produksi, dan jumlah protein yang dihasilkan menjadi faktor penting dalam memilih sistem ekspresi untuk produksi protein rekombinan (Demain & Vaishnav, 2009). Berikut akan dibahas beberapa sistem ekspresi yang telah digunakan dalam produksi insulin sebagai produk obat biosimilar (Gambar 4.4).



Sumber: Walsh (2004; 2013)

**Gambar 4.4** Persentase Produk Biofarmasi yang Diproduksi pada Berbagai Sistem Ekspresi

### 1. *Escherichia coli*

*E. coli* merupakan inang pertama dan paling banyak digunakan untuk produksi protein-protein heterolog (Terpe, 2006). Sistem bakteri “meminjamkan” sebagian kompartemen selnya untuk dimanipulasi secara genetik. Hal ini cukup mudah dilakukan karena tingkat reproduksi bakteri yang cepat sehingga mudah menghasilkan populasi genetik identik, atau dalam istilah bioteknologi disebut kloning.

Terdapat beberapa keuntungan menggunakan sel *E. coli* sebagai sistem ekspresi, yaitu tingkat produksi tinggi, mudah diproduksi dalam skala besar (sampai 100 mg per liter kultur), biaya untuk media dan reagen-reagen yang dibutuhkan tidak mahal, dan kondisi pertumbuhan cepat (bakteri bereplikasi setiap 20 menit sampai 2 jam). Ekspresi protein di *E. coli* merupakan metode yang paling cepat, mudah, dan paling murah. Sementara itu, kekurangan bakteri sebagai sistem ekspresi adalah bakteri memiliki keterbatasan dalam mengekspresikan protein-protein eukariotik, disebabkan ketidakmampuannya dalam

melakukan sebagian dari proses modifikasi pascatranslasi, Hal ini karena bakteri tidak memiliki *enzyme-mediated N-linked glycosylation, O-linked glycosylation, amidation, hydroxylation, myristoylation, palmitation, atau sulfation* (Kamionka, 2011; Brondyk, 2009). Selain itu, ukuran plasmid terbatas sampai 15 kb sehingga sulit memperoleh protein terlarut yang memiliki ukuran lebih dari 60 kDa (Ferrer-Mirales dkk., 2009; Graslund dkk., 2008 ), sebagian besar protein yang diekspresikan bersifat toksik untuk bakteri *E. coli*, adanya badan inklusi, serta protein tak terlarut. Pada situasi tertentu, badan inklusi menjadi penghalang terbentuknya protein yang larut dan aktif. Namun, dalam kondisi khusus juga menguntungkan karena organel sel ini resistan terhadap enzim proteolisis, mudah dipisahkan melalui sentrifugasi, tidak terlalu terkontaminasi oleh protein-protein lain, dan mampu melipat kembali menjadi protein aktif dan terlarut (Brondyk, 2009).

Produksi insulin rekombinan pertama kali dilakukan oleh Genentech pada 1978 dengan mengekspresikan secara terpisah cDNA sintetik yang mengkode rantai insulin A dan B di dalam sel bakteri *E. coli* (Chance & Frank, 1993). Insulin rekombinan pertama yang dikomersialkan dan digunakan sebagai agen terapeutik pada manusia dibuat dengan prosedur ini (Chance & Frank, 1993; Chance dkk., 1999). Ekspresi sintetik cDNA yang mengkode satu rantai proinsulin pada bakteri *E. coli* diikuti proses purifikasi dan pemutusan rantai peptida-C oleh reaksi proteolitik. Metode ini dinilai lebih efisien untuk produksi terapeutik insulin dalam skala besar jika dibandingkan dengan metode produksi dua rantai tersebut. Insulin dari proses ini sudah dikomersialisasi sejak tahun 1986 (Chance dkk., 1999). Perusahaan farmasi Eli Lilly meniru teknologi ini untuk memproduksi Humulin, yakni insulin rekombinan pertama yang digunakan untuk pengobatan penderita diabetes. Generasi pertama insulin rekombinan memiliki urutan asam amino yang identik dengan originatornya (*native insulin*). Beberapa jenis HI yang telah digunakan sebagai agen terapi untuk pengobatan DM dapat dilihat pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Daftar HI rekombinan yang disetujui untuk digunakan pada manusia.

<i>International Nonproprietary Names</i>	Nama dagang	Sistem produksi	Farmakokinetik	Produsen
Human insulin	Humulin, Insuman, Exubera	<i>E. coli</i>	<i>Short-acting</i> insulin	Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN
Insulin lispro	Humalog	<i>E. coli</i>	<i>Rapid-acting</i> insulin analog	Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN
Insulin glulisine	Apidra	<i>E. coli</i>	<i>Rapid-acting</i> insulin analog	Aventis pharmaceuticals, Parsippany, NJ
Insulin glargine	Lantus	<i>E. coli</i>	<i>Long-acting</i> insulin analog	Aventis pharmaceuticals, Parsippany, NJ

Sumber: Ferrer-Miralles dkk. (2009); Vajo dkk. (2001)

## 2. Khamir

Khamir juga telah diterima sebagai inang untuk melakukan proses ekspresi protein-protein eukariotik. *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia pastoris* adalah inang yang paling atraktif dalam memproduksi jenis protein ini. Keuntungan utama yang ditawarkan oleh sistem ekspresi khamir, yaitu kemudahan dalam teknik-teknik pengembangan dan akses informasi genetiknya, pertumbuhan yang cepat, media kultur sederhana dan murah, serta proses seluler dan metabolismenya juga bisa ditemukan pada eukariot tingkat tinggi (Gargouri dkk., 2012). Pada sistem ekspresi ini, protein rekombinan dapat diproduksi, baik secara intraseluler maupun direkayasa, untuk masuk ke jalur sekretori khamir agar disekresikan pada medium kulturnya.

Sebagai makhluk eukariot uniseluler, khamir memiliki kemampuan dalam proses modifikasi pasca-translasi, yakni mampu menambahkan gugus glikan pada residu asparagin (N-Linked) dan residu serin/treonin (O-Linked). Secara substansi, struktur-struktur glikan ini berbeda dengan modifikasi yang terjadi pada sel-sel serangga



dan mamalia. Perbedaan inilah yang menjadi kendala jika ekspresi dilakukan pada sel khamir. Selain itu, khusus *S. cerevisiae* terdapat beberapa kelemahan, yaitu ekspresi rendah, hiperglikosilasi, protein mengandung residu-residu mannose sehingga mengubah fungsi dan protein yang disekresikan menjadi bersifat antigenik, adakalanya protein dipertahankan dalam permukaan periplasma sehingga meningkatkan biaya purifikasi, proses fermentasinya menghasilkan metanol yang bersifat toksik untuk sel itu sendiri (Cregg dkk., 1993; Balamurugan dkk., 2006; Waterham dkk., 1997). Tabel 4.4 adalah HI komersial yang diproduksi di khamir.

**Tabel 4.4** HI Komersial yang Diproduksi di Khamir

Sistem Ekspresi	Protein	Nama Dagang	Perusahaan
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Insulin	Actrapid, Velosulin, Monotard, Insulatard, Protaphane, Mixtard, Actraphane, Ultratard	Novo Nordisk
	Insulin aspart	Novolog, Novolog Flexpen, Novolog Denfill, Novo-Rapid, NovoRapid penfill, Novomix 30, Novolog mix 70/30	
	Insulin detemir	Levemir, Levemir, Flexpen	
<i>Pichia pastoris</i>	Insulin	Insugen	Biocon (India)

Sumber: Kim dkk. (2015)

### 3. Tanaman dan Sel Mamalia

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, ekspresi human insulin rekombinan telah dilakukan pada berbagai organisme berbeda, seperti bakteri (Thim dkk., 1986), fungi (Wang dkk., 2001), kultur sel mamalia (Yanagita dkk., 1992), dan tanaman transgenik (Arakawa dkk., 1998). Produksi insulin komersial yang beredar di pasar farmasi masih didominasi oleh insulin yang diproduksi bakteri *E. coli* dan khamir *S. cerevisiae*. Sistem komersial ini telah mengalami penyempurnaan

dan pengoptimalan selama dua dekade, dan telah berhasil mencapai tingkat produksi sebesar lima ton per tahun. Namun, hal yang masih menjadi tantangan bagi perusahaan-perusahaan tersebut adalah mencari beberapa alternatif sistem ekspresi untuk meningkatkan kapasitas dan kebutuhan ekonomi masa depan.

Produksi farmasetikal pada tanaman menjadi daya tarik tersendiri bagi pelaku bisnis dalam dunia farmasi. Mapp Biopharmaceutical Inc., perusahaan lokal di San Diego, California, Amerika Serikat, sukses mengeluarkan obat yang diproduksi pada daun tembakau. Obat tersebut diberi nama ZMapp. ZMapp digunakan untuk melawan virus Ebola yang mewabah pada 2014 di Benua Afrika. Selama bulan Oktober 2014, tujuh pasien terinfeksi Ebola yang diobati lebih awal dengan ZMapp dan berhasil sembuh total. Sementara itu, pasien lain yang terlambat diberikan obat ini dilaporkan meninggal (Yao dkk., 2015).

Penggunaan tanaman sebagai obat telah dilakukan selama berabad-abad. Saat ini, tujuan menggunakan tanaman sebagai bio-platform untuk ekspresi protein rekombinan juga telah menjadi tren dalam perkembangan obat-obatan modern (Soltanmohammadi, 2014). Sistem berbasis tanaman menawarkan potensi produksi yang aman, mudah direkayasa secara genetik, mampu melakukan modifikasi secara glikosilasi, ekonomis, dan berkapasitas tinggi (Deckers dkk., 2020; Daniell dkk., 2001). Studi terbaru membuktikan bahwa teknologi *molecular farming* pada tanaman mempunyai banyak keuntungan dalam aspek ekonomi, keamanan, dan kepraktisannya (Soltanmohammadi dkk., 2014).

Nykiforuk dkk. (2006) melaporkan keberhasilannya dalam melakukan ekspresi human insulin (DesB<sub>30</sub>-insulin) pada biji tanaman transgenik *Arabidopsis thaliana* dan telah memasuki tahap pengujian secara *in vitro* dan *in vivo*. *Arabidopsis thaliana* adalah tanaman berbunga kecil yang merupakan tanaman asli Eurasia. Tanaman ini sering dijadikan model dalam identifikasi gen dan fungsinya. Tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) juga dijadikan sebagai *host* dalam ekspresi protein pro-insulin manusia. Mengingat pentingnya insulin

serta banyaknya manfaat tanaman tomat, sistem ini diharapkan potensial dijadikan alternatif sistem ekspresi untuk produksi protein proinsulin manusia (Soltanmohammadi dkk., 2014).

Ekspresi human pre-proinsulin juga pernah dilakukan pada sel Chinese hamster ovary (CHO). Sel CHO ditransfeksi dengan vektor ekspresi mamalia yang membawa cDNA pengkode human pre-proinsulin, promotor RSV mengontrol proses ekspresi tersebut. Level insulin yang diekspresikan oleh sistem ekspresi tersebut dilaporkan sangat rendah, yaitu 5–10 ng/10<sup>6</sup> sel/24 jam (Pak dkk., 1998).

## E. Ekspresi Insulin di *Pichia pastoris*

Khamir metilotropik adalah grup spesies khamir yang memiliki lintasan umum untuk metabolisme senyawa satu karbon sebagai sumber karbon dan energi (contohnya metanol). Awalnya, grup khamir ini telah digunakan dalam produksi protein untuk pakan (protein sel tunggal), tapi kemudian khamir diminati untuk digunakan dalam sistem produksi protein rekombinan karena 1) khamir memiliki kemampuan untuk tumbuh hingga mencapai kerapatan sel yang tinggi meski menggunakan proses fermentasi sederhana; dan 2) kebutuhan khamir terhadap enzim pengoksidasi metanol (seperti alkohol oksidase) membuat ekspresi di khamir dikendalikan oleh promotor yang sangat kuat (Porro dkk., 2005). Dua spesies yang paling banyak digunakan untuk ekspresi protein heterolog adalah *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) (Cregg dkk., 2000) dan *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) (Gellissen, 2000). Pada bagian ini, pembahasan akan difokuskan pada ekspresi insulin di *P. pastoris*.

Ekspresi protein asing di *P. pastoris* terdiri dari tiga tahap utama, yaitu 1) insersi gen ke dalam vektor ekspresi; 2) introduksi vektor ekspresi ke dalam *P. pastoris* sebagai inang; dan 3) pengujian galur potensial untuk ekspresi gen asing. Di dalam vektor ekspresi, produksi protein heterolog di *P. pastoris* kebanyakan menggunakan promoter untuk metabolisme metanol yang hanya akan bekerja ketika sel ditumbuhkan pada medium yang mengandung methanol. Promotor-

promotor AOX (alkohol oksidase terutama AOX1) menjadi yang paling banyak digunakan untuk produksi protein asing di *P. pastoris*. Namun, pilihan promotor lain juga tersedia untuk produksi protein di *Pichia*, seperti promotor GAP (gliseraldehida 3-fosfat dehidrogenase), AOX2 (alkohol oksidase), FLD1 (formaldehid dehidrogenase), dan ICL1 (isositrat liase) (Macauley-Patrick dkk., 2005).

## **F. Tahapan Produksi Human Insulin Rekombinan pada *P. pastoris***

Dalam memproduksi human insulin rekombinan pada *P. pastoris* diperlukan beberapa tahapan yang dilakukan secara berurutan yang dimulai dengan konstruksi vektor ekspresi prekursor insulin, diikuti dengan pengaturan jumlah salinan gen, proses fermentasi untuk produksi prekursor insulin oleh *P. pastoris*, pemurnian prekursor insulin, dan perubahan atau konversi prekursor insulin menjadi insulin.

### **1. Konstruksi Vektor Ekspresi Prekursor Insulin**

Gen penyandi prekursor insulin dapat diperoleh dengan metode sintesis gen yang disediakan oleh perusahaan penyedia jasa sintesis gen. Metode tersebut memberikan kemungkinan untuk memperoleh gen penyandi protein dalam waktu singkat serta untuk pemilihan kodon yang paling sering digunakan oleh inang yang dipakai untuk produksi protein. Gen penyandi prekursor insulin didesain berdasarkan sekuen asam amino dari prekursor insulin dan disesuaikan dengan preferensi penggunaan kodon dari *P. pastoris*. Pemilihan kodon yang paling sesuai untuk ekspresi protein oleh *P. pastoris* dapat dilakukan dengan piranti lunak seperti Gene Designer (Villalobos dkk., 2006).

Pada ujung 5' atau arah hulu dari sekuen penyandi prekursor insulin terdapat sekuen penyandi faktor perkawinan alfa (atau Faktor- $\alpha$ ) dari *S. cerevisiae*. Faktor- $\alpha$  merupakan peptida pemandu (*prepro-leader peptide*) yang lazim pada khamir dan sering digunakan untuk sekresi berbagai protein heterolog pada *S. cerevisiae* dan *P. pastoris*. Protein yang diproduksi oleh *S. cerevisiae* dan *P. pastoris* melalui fusi dengan Faktor- $\alpha$  akan disekresikan atau dikeluarkan dari sel ke dalam

medium kultur. Pre-peptida dari Faktor- $\alpha$  menjamin bahwa protein fusi antara Faktor- $\alpha$  dan prekursor insulin (Faktor- $\alpha$ //prekursor insulin) yang terbentuk di ribosom ditranslokasi ke dalam retikulum endoplasma (RE) yang merupakan titik awal dari jalur sekresi protein. Pro-peptida kemudian mengarahkan transport protein fusi tersebut dari RE ke dalam badan Golgi, di mana endoprotease Kex2p akan memisahkan Faktor- $\alpha$  dan prekursor insulin pada situs KR. Prekursor insulin yang terbentuk kemudian akan dikeluarkan/disekresikan dari sel ke medium kultur (Julius dkk., 1984).

Penelitian Kjeldsen dkk. (1996) menunjukkan bahwa apabila prekursor insulin secara langsung disambungkan dengan Faktor- $\alpha$ , pemotongan oleh Kex2p-endoprotease tidak berlangsung secara sempurna sehingga terdapat cukup banyak protein fusi Faktor- $\alpha$ //prekursor insulin yang mengalami glikosilasi berlebih yang disekresikan ke dalam medium kultur. Setelah dilakukan deglikosilasi dengan enzim PNGaseF, akan diperoleh protein yang ukurannya setara dengan ukuran protein fusi Faktor- $\alpha$ //prekursor insulin (Kjeldsen dkk., 1996).

Untuk mengoptimalkan pengolahan atau pemotongan Faktor- $\alpha$  dari prekursor insulin oleh Kex2-endoprotease dari *P. pastoris*, perlu ditambahkan sebuah rantai peptida pemisah (*spacer peptide*) yang disisipkan di antara Faktor- $\alpha$  dan rantai B dari prekursor insulin (Egel-Mitani dkk., 1998). Beberapa sekuen rantai peptida pemisah telah diuji coba untuk sekresi prekursor insulin oleh *S. cerevisiae* dan *P. pastoris*, di antaranya EAEAEAK, EEAEAEAK, EEAEAEAEK, dan EEAEAEAPK. Dari keempat sekuen tersebut hanya sekuen peptida pemisah EEAEAEAPK (Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Pro-Lys) yang memungkinkan pemotongan yang sempurna antara Faktor- $\alpha$  dan prekursor insulin. Selain itu, melalui penggunaan peptida pemisah EEAEAEAPK diperoleh peningkatan sekresi prekursor insulin sebesar 2,5 kali dibandingkan sekresi tanpa peptida pemisah (Kjeldsen dkk., 1999). Oleh karena itu, dalam konstruksi gen, sekuen penyandi peptida pemisah EEAEAEAPK disisipkan di antara sekuen penyandi Faktor- $\alpha$  dan rantai B1-29 dari prekursor insulin. Dalam

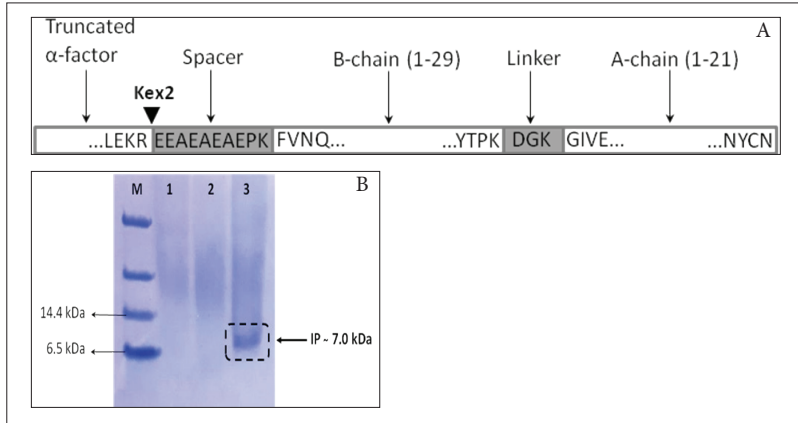
hal ini, prekursor insulin tidak memiliki asam amino Threonin B30 (Thr-B30) pada ujung C-terminal dari rantai B. Asam amino Thr-B30 dapat ditambahkan pada atau disambungkan dengan asam amino Lisin B29 (Lys-B29) melalui proses transpeptidasi yang dimediasi oleh enzim tripsin setelah pemurnian prekursor insulin dilakukan (Morihara dkk., 1986).

Dalam konstruksi prekursor insulin, antara Lys-B29 pada rantai B dan Gly-A1 pada rantai A terdapat rantai peptida penghubung (*linker peptide*) pendek yang menggantikan peptida C pada prekursor insulin asli (*native*) yang diproduksi oleh sel  $\beta$  dari pankreas. Rantai peptida penghubung yang digunakan terdiri dari beberapa asam amino dan pada ujung C-terminal dari peptida penghubung tersebut diakhiri dengan asam amino Lisin (Lys) untuk memberikan kemungkinan pemotongan oleh tripsin. Peptida penghubung yang lazim digunakan pada prekursor insulin adalah AAK (Ala-Ala-Lys) (Kjeldsen, 2000). Namun, untuk meningkatkan stabilitas *fold*ing (pelipatan protein) dari prekursor insulin yang pada akhirnya dapat meningkatkan efisiensi sekresi, dapat digunakan peptida penghubung lainnya yang memberikan kemungkinan tersebut. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa penambahan asam amino aromatik pada peptida penghubung dapat meningkatkan stabilitas struktur prekursor insulin dan efisiensi sekresi. Peptida penghubung dengan sekuen EFK, EYK, EWK, dan LWK dapat meningkatkan hasil sekresi prekursor insulin, di mana peptida penghubung EWK (Glu-Trp-Lys) menyebabkan peningkatan hasil sekresi sekitar 5 kali lipat apabila dibandingkan dengan penggunaan peptida penghubung AAK (Kjeldsen dkk., 2002; Kjeldsen dkk., 2006; Kjeldsen, 2006). Gambar 4.5 menunjukkan skema konstruksi dari kaset untuk produksi prekursor human insulin yang diintroduksi ke dalam vektor ekspresi untuk inang *P. pastoris* yang telah dikerjakan di LIPI beserta hasil ekspresi prekursor insulinnya.

## 2. Pengaturan Jumlah Salinan Gen

Untuk ekspresi gen pada *P. pastoris*, integrasi gen penyandi protein dan komponen untuk regulasi ekspresinya (kaset ekspresi) ke dalam





Ket.: A. Situs pemotongan oleh endoprotease Kex2 ditunjukkan oleh segitiga berwarna hitam. Spacer menunjukkan sekuen rantai pemisah, sedangkan linker mewakili sekuen untuk rantai penghubung.

Sumber: Nurdiani dkk. (2018)

**Gambar 4.5** A. Skema konstruk dari kaset ekspresi untuk sekresi prekursor insulin oleh *P. pastoris* untuk produksi human insulin; B. Hasil SDS-PAGE prekursor HI rekombinan.

genom khamir tersebut merupakan metode yang lazim dipilih, karena klon yang sangat stabil dapat diperoleh serta tidak diperlukan lagi pengulangan proses seleksi klon. Melalui metode tersebut, dapat diperoleh klon *P. pastoris* yang memiliki satu atau beberapa kopi dari kaset ekspresi.

Gen penyandi prekursor insulin yang digunakan telah dioptimasi penggunaan kodonnya untuk ekspresi pada *P. pastoris*. Di samping optimasi penggunaan kodon, jumlah kopi gen merupakan parameter yang dapat dievaluasi untuk meningkatkan ekspresi protein oleh *P. pastoris*. Beberapa studi menunjukkan adanya peningkatan tingkat ekspresi protein pada klon yang memiliki beberapa kopi dari kaset ekspresi (Mansur dkk., 2005; Zhu dkk., 2009). Dengan menciptakan klon *P. pastoris* yang memiliki 11 kopi dari kaset ekspresi, peningkatan produksi mini prekursor insulin dari 19 menjadi 250 mg/L kultur



dapat diperoleh (Mansur dkk., 2005). Perolehan klon yang memiliki multi kopi dari kaset ekspresi juga digunakan untuk optimisasi sekresi prekursor insulin babi (*porcine insulin precursor* atau PIP) oleh *P. pastoris* (Zhu dkk., 2009). Dengan membandingkan klon-klon *P. pastoris* yang memiliki sampai dengan 52 kopi dari kaset ekspresi PIP, diperoleh kurva berbentuk lonceng yang menunjukkan korelasi antara jumlah kopi gen dan tingkat produksi protein. Produksi PIP yang paling tinggi ditunjukkan oleh klon yang memiliki 12 kopi dari kaset ekspresi. Adanya batas maksimal dari jumlah kopi kaset ekspresi yang dicapai untuk produksi PIP kemungkinan besar terkait dengan stres pada retikulum endoplasma pada saat pemrosesan atau modifikasi protein berlangsung (Inan dkk., 2006).

Konstruksi klon yang memiliki beberapa kopi kaset ekspresi dapat dilakukan dengan beberapa metode. Salah satu metode yang terbukti bermanfaat adalah melalui amplifikasi (perbanyak) vektor pasca-transformasi. Pada vektor yang berbasis Zeocin, klon dengan jumlah kopi gen yang rendah dapat ditumbuhkan berulang pada medium dengan konsentrasi Zeocin yang ditingkatkan secara bertahap (Sunga & Cregg, 2004).

Jumlah kopi gen dapat ditentukan dengan analisis Southern blot yang sejauh ini merupakan metode yang lazim digunakan. Namun, metode tersebut sangat menyita waktu dan cukup sulit dilakukan serta membutuhkan DNA genom dalam jumlah besar.

### **3. Proses Fermentasi untuk Sekresi Prekursor Insulin oleh *P. pastoris***

Sistem ekspresi dengan *P. pastoris* memanfaatkan promotor alkohol oksidase (AOX1) yang dapat diinduksi dengan metanol. Promotor tersebut mengontrol ekspresi gen yang menyandi enzim alkohol oksidase dan merupakan enzim yang mengatalisis langkah pertama dalam metabolisme metanol (Cregg dkk., 1993). *P. pastoris* memiliki kemampuan dalam tingkat ekspresi protein yang tinggi, sekresi protein ekstraseluler yang efisien serta untuk tumbuh sampai kepadatan sel yang tinggi dalam medium minimal di dalam bioreaktor.

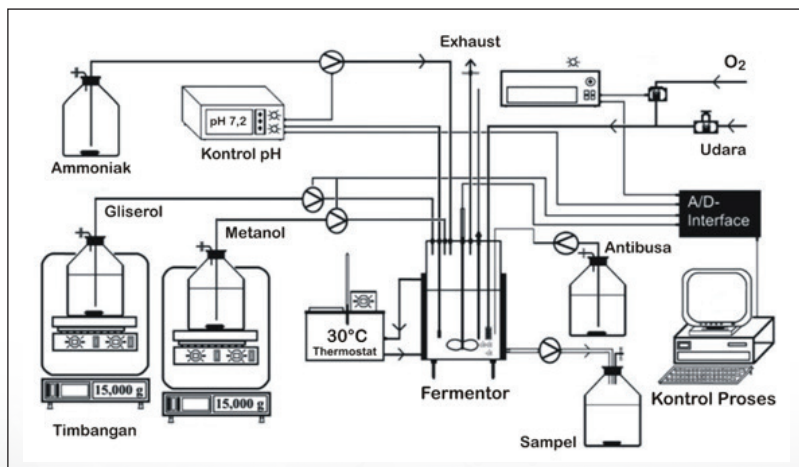
Meskipun ekspresi protein heterolog oleh *P. pastoris* dapat dilakukan dengan kultur yang menggunakan labu kocok (labu Erlenmeyer), tingkat produksi protein yang lebih tinggi dapat diperoleh dengan kultur yang menggunakan fermentor. Medium mineral untuk kultur *P. pastoris* yang umumnya terdiri atas gliserol atau metanol, biotin, senyawa-senyawa garam dan *trace elements* cukup ekonomis dan terdefinisi (Stratton dkk., 1998) sehingga khamir tersebut sangat ideal untuk produksi protein dalam skala besar dengan fermentor. Hanya dengan menggunakan fermentor, parameter-parameter seperti nilai pH, aerasi, dan penambahan sumber karbon atau inducer dapat dikontrol secara tepat sehingga sangat mungkin untuk memperoleh kepadatan sel yang sangat tinggi (400 g/L berat sel basah yang setara dengan 100 g/L berat sel kering) (Lin-Cereghino dkk., 2002). Perpindahan dari kultur dengan labu kocok ke kultur dengan fermentor dalam skala kecil pasti membutuhkan optimisasi ulang sejumlah kondisi kultur yang tidak dapat dielakkan. Namun, parameter-parameter kondisi kultur yang telah ditetapkan pada kultur dengan fermentor skala kecil umumnya hanya membutuhkan sedikit pengaturan lebih lanjut pada saat peningkatan skala (*scale-up*) ke volume kultur yang lebih besar.

Kultur dengan fermentasi *fed-batch* umumnya lebih disukai sebagai cara kultur untuk mencapai kepadatan sel yang tinggi dengan kontrol yang lebih mudah (Gambar 4.6). Terdapat tiga tahap proses yang lazim digunakan untuk produksi protein rekombinan oleh *P. pastoris* dengan fermentasi *fed-batch*. Pada tahap pertama, *P. pastoris* yang telah ditransformasi dengan gen penyandi protein yang akan diproduksi ditumbuhkan terlebih dahulu sampai tingkat kepadatan sel yang diharapkan dengan menggunakan gliserol sebagai sumber karbon. Pada tahap ini, gliserol digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan. Oleh karena itu, sel dengan gliserol menunjukkan laju pertumbuhan spesifik yang lebih tinggi dibandingkan pertumbuhan dengan metanol (0,18 L/jam dengan gliserol dibanding dengan 0,14 L/jam dengan metanol) (Potvin dkk., 2012). Pertumbuhan dengan gliserol berlangsung kira-kira selama 24 jam, dan biasanya diawali dengan konsentrasi gliserol sebesar 40 g/L karena konsentrasi gliserol

Buku ini tidak diperjualbelikan.

yang lebih tinggi dapat menghambat pertumbuhan (Cos dkk., 2006). Tahap kedua dimulai ketika konsentrasi awal gliserol yang diberikan telah dikonsumsi. Tahap kedua ini biasa disebut sebagai fase transisi *fed-batch*, di mana gliserol ditambahkan ke dalam kultur dengan laju yang tidak membatasi pertumbuhan untuk meningkatkan konsentrasi biomassa dan untuk menyiapkan sel ke tahap induksi. Pada tahap ketiga, fase induksi atau fase produksi protein diawali dengan penambahan metanol ke dalam kultur dengan laju yang rendah untuk memungkinkan adaptasi sel ke metanol. Dalam hal ini, metanol berfungsi sebagai inducer dan juga sebagai satu-satunya sumber karbon. Laju penambahan metanol kemudian ditingkatkan sampai diperoleh laju pertumbuhan dan produksi protein yang diharapkan (Lin-Cereghino dkk., 2002; Potvin dkk., 2012). Selama proses pembentukan biomassa dan fase produksi protein, amonia digunakan untuk mengontrol nilai pH, dan pada saat yang sama, juga berfungsi sebagai sumber nitrogen.

Proses fermentasi dengan *P. pastoris* memiliki beberapa keunggulan dibandingkan sistem ekspresi lainnya, tetapi langkah-langkah



Ket.: Untuk mengatur nilai pH dapat digunakan 12,5% amoniak atau larutan 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Sumber: Skema diadopsi dari berbagai sumber

**Gambar 4.6** Skema fermentasi *fed-batch* untuk produksi prekursor insulin oleh *P. pastoris*.

untuk meningkatkan efisiensi dan memaksimalkan produksi protein rekombinan dalam bioreaktor masih tetap diperlukan. Langkah-langkah yang dapat dilakukan meliputi optimasi komposisi awal dari medium kultur maupun parameter fisik dan kimiawi (nilai pH, suhu, dan kandungan oksigen terlarut) dalam proses fermentasi serta strategi dalam penambahan metanol.

#### 4. Proses Pemurnian Prekursor Insulin

Beberapa metode yang berbeda telah digunakan untuk pemurnian prekursor insulin dari medium kultur (Tabel 4.5). Salah satu metode yang digunakan adalah *expanded bed adsorption* (EBA). Metode tersebut memungkinkan pemisahan prekursor insulin dari medium kultur tanpa harus memisahkan sel dari medium kultur, misalnya dengan sentrifugasi atau filtrasi sehingga proses hilir dapat dipermudah. Agar prekursor insulin yang memiliki nilai pI teoretis 4,74 dapat terikat oleh resin yang digunakan, medium kultur perlu diencerkan dan diasamkan atau diturunkan nilai pH-nya terlebih dahulu. Resin yang dapat digunakan dalam EBA, misalnya Streamline SP XL yang disetarakan dengan larutan dapar bernilai pH rendah (pH 2-3). Setelah pemuatan dan pencucian kolom untuk menghilangkan pengotor, elusi prekursor insulin dari resin dapat dilakukan dengan larutan dapar, seperti Tris/HCl pH 8,0 (Brixius dkk., 2006) atau dengan larutan garam seperti NaCl (Gurramkonda dkk., 2010). Dengan metode ini, prekursor insulin dapat dimurnikan hingga tingkat kemurnian 97% meskipun tingkat perolehan kembali tidak tinggi (55%) (Gurramkonda dkk., 2010).

Nilai pI dari prekursor insulin yang rendah juga memungkinkan pemurniannya dengan kromatografi penukar kation. Kolom yang berisi resin CM-Sepharose FF dapat digunakan untuk pemurnian prekursor insulin yang disekresikan oleh *P. pastoris* ke dalam medium kultur (Xie dkk., 2008). Sebelum proses pemurnian, sel *P. pastoris* dipisahkan terlebih dahulu dari medium kultur dengan filtrasi. Prekursor insulin dapat dimurnikan dengan tingkat kemurnian hingga 97% dan tingkat perolehan kembali sebesar 97%.

Pada permukaan protein dari prekursor insulin atau human insulin terdapat gugus imidazol dari asam amino histidin yang memungkinkan ikatan koordinasi dengan beberapa ion logam, seperti  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , atau  $\text{Zn}^{2+}$ . Sifat alami tersebut dapat dimanfaatkan untuk pemurnian prekursor insulin dengan menggunakan kromatografi afinitas pada ion logam terimobilisasi (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography /IMAC*). Sebelum pemurnian dengan IMAC, sel inang yang digunakan untuk produksi prekursor insulin dipisahkan terlebih dahulu dengan sentrifugasi dan dilanjutkan dengan filtrasi. Nilai pH dari supernatan yang diperoleh perlu diatur lebih dahulu hingga pH 7 sebelum dimasukkan ke dalam kolom IMAC yang telah dimuati dengan ion logam. Setelah proses pencucian resin dengan larutan dapar untuk menghilangkan pengotor yang tidak diinginkan, prekursor insulin dapat dielusi dari kolom IMAC dengan larutan dapar yang bernilai pH rendah. Dengan menggunakan Sepharose FF

**Tabel 4.5.** Pemurnian Prekursor Insulin dari Medium Kultur

Inang Ekspresi	Tipe Kromatografi dan Jenis Matriks	Perolehan Kembali	Tingkat Kemurnian	Daftar Pustaka
<i>E. coli</i>	Kromatografi afinitas IgG-Sepharose	90%	TD	Nilsson dkk. (1996)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Expanded bed adsorption</i> Streamline SP (XL)	88%	TD	Brixius dkk. (2006)
<i>P. pastoris</i>	Kromatografi adsorpsi dan filtrasi gel Amberlite XAD-7 dan Sephadex G50	>80%	60%	Wang dkk. (2001)
<i>P. pastoris</i>	Kromatografi penukar kation CM-Sepharose FastFlow	97%	97%	Xie dkk. (2008)
<i>P. pastoris</i>	<i>Expanded bed adsorption</i> Streamline SP (XL)	55%	97%	Gurramkonda dkk. (2010)
<i>P. pastoris</i>	IMAC $\text{Cu}^{2+}$ -Sepharose FastFlow	95%	96%	Gurramkonda dkk. (2010)

Sumber: dari berbagai sumber

yang dimuati dengan ion  $\text{Cu}^{2+}$  dan elusi dengan larutan dapar fosfat dengan nilai pH 3,15, prekursor insulin dapat dimurnikan hingga tingkat kemurnian 96% dan tingkat perolehan kembali sebesar 95% (Gurramkonda dkk., 2010).

## 5. Perubahan Prekursor Insulin Menjadi Insulin

Prekursor insulin yang telah dimurnikan dengan salah satu metode yang disebutkan sebelumnya, kemudian dapat diubah menjadi human insulin melalui proses transpeptidasi secara enzimatik dengan menggunakan enzim tripsin dan *O-tert-butyl-L-threonine tert-butyl ester* (atau disingkat sebagai H-Thr[tBu]-OtBu). Proses transpeptidasi enzimatik tersebut dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode transpeptidasi satu tahap dan metode transpeptidasi dua tahap.

Pada proses transpeptidasi satu tahap, prekursor insulin yang masih mengandung peptida pemisah EEAEAEAPK dan peptida penghubung AAK atau EWK, diubah menjadi human insulin ester (human insulin yang sudah mengandung Thr-B30 yang masih sebagai *tert-butyl ester*). Perubahan tersebut dilakukan dengan menggunakan konsentrasi tripsin dan H-Thr[tBu]-OtBu untuk menjamin rasio konversi yang tinggi (Xie dkk., 2008; Gurramkonda dkk., 2010). Dalam proses transpeptidasi satu tahap, terdapat dua reaksi utama. Reaksi pertama adalah pemotongan oleh enzim tripsin di tiga tempat untuk memisahkan peptida pemisah EEAEAEAPK dan peptida penghubung AAK atau EWK dari prekursor insulin sehingga diperoleh human insulin Des30 (human insulin tanpa Thr-B30), sedangkan reaksi kedua adalah pengikatan H-Thr[tBu]-OtBu dengan Lys-B29 dari insulin Des30 secara enzimatik oleh tripsin untuk memperoleh human insulin ester. Tingkat konversi pemotongan yang rendah dari prekursor insulin menjadi insulin Des30 pada kondisi reaksi yang digunakan menyebabkan tingkat konversi transpeptidasi satu tahap berada di kisaran 40%. Dalam reaksi transpeptidasi satu tahap dengan tripsin, proses pemotongan dan pengikatan merupakan reaksi yang reversibel. Pada proses pemotongan terjadi hidrolisis atau pemotongan ikatan peptida, sedangkan pada proses pengikatan terjadi sintesis



atau pembentukan ikatan peptida oleh tripsin. Rasio antara tripsin dan prekursor insulin pada reaksi transpeptidasi satu tahap umumnya tidak lebih rendah dari 1:5 (Liu dkk., 2014).

Pada umumnya, kondisi reaksi untuk proses transpeptidasi satu tahap dipilih sedemikian rupa agar mendekati kondisi optimum untuk proses pembentukan ikatan peptida yang sangat berbeda dengan kondisi reaksi untuk proses pemotongan oleh tripsin (Gurramkonda dkk., 2010; Liu dkk., 2014). Karena kondisi untuk reaksi pemotongan kurang menguntungkan, proses pemotongan prekursor insulin menjadi insulin Des30 berlangsung lambat sehingga akumulasi insulin Des30 juga berlangsung lama. Hal ini berakibat pada rendahnya jumlah produk akhir yang terbentuk, yakni insulin ester. Di samping itu, dengan meningkatnya waktu reaksi, terjadi pula peningkatan produk-produk samping yang terutama merupakan hasil dari pemotongan non-target pada Arg-B22. Produk-produk samping tersebut, selain menurunkan efisiensi pengubahan prekursor insulin menjadi insulin ester, juga akan menyulitkan proses pemurnian human insulin ester yang merupakan produk yang diharapkan untuk diperoleh.

Pada proses transpeptidasi dua tahap, pemotongan prekursor insulin menjadi insulin Des30 oleh tripsin dan pengikatan H-Thr[tBu]-OtBu pada ujung Lys-B29 dari insulin Des30 oleh tripsin dilakukan secara terpisah, masing-masing menggunakan kondisi reaksi yang berbeda (Liu dkk., 2014). Proses pemotongan oleh tripsin lebih baik dilakukan dengan menggunakan larutan berbasis air sebagai pelarut atau larutan yang mengandung pelarut organik dalam konsentrasi yang rendah. Dalam kondisi pelarut tersebut, proses hidrolisis atau pemotongan rantai peptida oleh tripsin menjadi lebih efektif. Sebaliknya, agar proses pengikatan atau pembentukan ikatan peptida oleh tripsin dapat berlangsung optimal, reaksi untuk pengikatan H-Thr[tBu]-OtBu pada Lys-B29 dari insulin Des30 lebih baik dilakukan dalam larutan yang mengandung sedikit air atau dengan konsentrasi pelarut organik (misalnya 1,4-butendiol, dimetilsulfoxid (DMSO) atau (N,N)-dimetilasetamid) yang tinggi. Proses pengikatan juga akan lebih efektif



apabila salah satu reaktan, dalam hal ini H-Thr[tBu]-OtBu, disediakan secara berlebih (Liu dkk., 2014).

## G. Penutup

Peningkatan jumlah penderita penyakit diabetes akan diikuti pula dengan peningkatan kebutuhan insulin. Untuk memenuhi kebutuhan insulin yang terus meningkat, teknologi DNA rekombinan dengan menggunakan inang prokariotik (seperti *E. coli*) maupun eukariotik (seperti *S. cerevisiae*) cukup menjanjikan untuk produksi insulin yang lebih efisien dan dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan produksi insulin konvensional dari pankreas hewan ternak, seperti sapi dan babi. Selain *S. cerevisiae*, khamir metilotropik *P. pastoris* telah banyak digunakan sebagai inang alternatif untuk berbagai produk biofarmasetik, termasuk insulin. *P. pastoris* menawarkan kelebihan yang sama dengan *S. cerevisiae* dalam efisiensi dan produktivitas yang tinggi dalam sekresi insulin. Protein heterolog yang diekspresikan di *P. pastoris* bahkan tidak mengalami hiperglikosilasi dan lebih cocok untuk aplikasi terapeutik pada manusia dibandingkan protein yang diproduksi di *S. cerevisiae*. Untuk produksi HI di *P. pastoris*, kaset ekspresi yang digunakan terdiri dari faktor  $\alpha$ , peptida pemisah (*spacer peptide*), HI rantai B, peptida penghubung (*linker peptide*), dan HI rantai A. Beberapa pendekatan yang dilakukan untuk meningkatkan produksi HI pada *P. pastoris* adalah rekayasa pada komponen penyusun kaset ekspresi (seperti pada bagian faktor  $\alpha$  dan pemilihan peptida penghubung), pengaturan jumlah salinan kaset ekspresi yang terintegrasi ke dalam kromosom *P. pastoris* dan pada produksi HI skala fermentor dilakukan variasi komposisi media, terutama dalam penggunaan gliserol dan penambahan metanol.

## Daftar Pustaka

Arakawa, T., Yu, J., Chong, D.K., Hough, J., Engen, P.C., & Langridge, W.H. (1998). A plant-based cholera toxin B subunit-Insulin fusion protects

against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol*, 16 (10): 934–938.

- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 141.
- Baeshen, M. N., Bouback, T. A., Alzubaidi, M. A., Bora, R. S., Alotaibi, M. A. T, Alabbas, O. T. O, . Alshahrani, S. M., Aljohani, A. A. M., Munshi, R. A. A., Al-Hejin, A., Ahmed, M. M. M., Redwan, E. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A. (2016). Expression and purification of c-peptide containing insulin using pichia pastoris expression system. *BioMed Research International*, 3423685. <https://doi.org/10.1155/2016/3423685>
- Balamurugan V, Reddy G. R., & Suryanarayana, V. V. S. (2007). Pichia pastoris: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-vaccines. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 175–186.
- Brixius, P., Mollerup, I., Jensen, O. E., Halfar, M., Thömmes, J., & Kula, M. R. (2006). Expanded bed adsorption as a primary recovery step for the isolation of the insulin precursor MI3 process development and scale up. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 14–20.
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in Enzymology*, 463, 131–147.
- Camacho, L. H., Frost, C. P., Abella, E., Morrow, P. K., & Whittaker, S. (2014). Biosimilars 101: Considerations for US oncologists in clinical practice. *Cancer Medicine*, 3(4), 889–899.
- Chance, R. E., & Frank, B. H. (1993). Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin. *Diabetes Care*, 16(Supplement 3), 133–142.
- Chance, R.E, Glazer, N.B, & Wisher, K.L. (1999). Insulin Lispro (Humalog). *Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective*, 149–171.
- Chegg Inc. (t.t.) *Introduction to genetic* [gambar]. <http://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/post-translational-modification-preproinsulin-biologically-active-insulin-preproinsulin-in-q9647139>

- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Gleeson, M. A. G. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 9, 1067–1072.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 16(1), 23–52.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 17.
- Danielle, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants, *Trends Plant Sci*, 6(5): 219–226.
- Deckers, M, Deforce, D, Fraiture, M.A, & Roosens, N.H.C. (2020). Genetically Modified micro-organisms for industrial food enzyme productions: an overview. *Foods*, (9), 326.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
- DeVries, J. H., Gough, S. C., Kiljanski, J., & Heinemann, L. (2015). Biosimilar insulins: a European perspective. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 17(5), 445–451.
- Egel-Mitani, M., Brandt, J., & Vad, K. (1998). *Method for the production of precursors of insulin, precursors of insulin analogues, and insulin like peptides* (WIPO Patent, WO1998001473 A1).
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 17.
- Gargouri, R.M, Soussi, S.A, Abbes, N.H, Amor, I.Y.H, Chabchoub, I.B, & Gargouri, A. (2012). Yeast as a tool for heterologous gene expression. *Methods Mol Biol*, (824): 359–370.
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(6), 741–750.
- Grashlund, S, Nordlund, P, dkk. (2008). Protein Production and Purification. *Nat. Methods*, 5(2): 134–146.

- Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., Swaminathan, S., Khanna, N., Tisminetzky, S., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 31.
- Heinemann, L. (2012). Biosimilar insulins. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(8), 1009–1016.
- Heinemann, L., & Hompesch, M. (2014). Biosimilar insulins basic considerations. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 8(1), 6–13.
- Heinemann, L., Home, P. D., & Hompesch, M. (2015). Biosimilar insulins: Guidance for data interpretation by clinicians and users. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 17(10), 911–918.
- Heinemann, L., & Carter, A. W. (2017). Will biosimilar insulins be cheaper?. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 19(9), 513–515.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., & Meagher, M. M. (2006). Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4), 771–778.
- Insulin is a protein made up of two amino acid chains* [gambar]. (t.t.) [https://235.stem.org.uk/Diabetes/diabetes\\_16plus/diabetes\\_16plus5.html](https://235.stem.org.uk/Diabetes/diabetes_16plus/diabetes_16plus5.html)
- Julius, D., Schekman, R., & Thorner, J. (1984). Glycosylation and processing of prepro- $\alpha$ -factor through the yeast secretory pathway. *Cell*, 36(2), 309–318.
- Kamionka, M. (2011). Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2), 268–274.
- Kim, H., Yoo S. J., & Kang H. A. (2015). Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15, 1–16.
- Kjeldsen, T., Brandt, J., Andersen, A. S., Egel-Mitani, M., Hach, M., Petersson, A. F., & Vad, K. (1996). A removable spacer peptide in an  $\alpha$ -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170(1), 107–112.

- Kjeldsen, T., Pettersson, A. F., & Hach, M. (1999). The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 195–208.
- Kjeldsen, T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 277–286.
- Kjeldsen, T., Balschmidt, P., Diers, I., Hach, M., Kaarsholm, N. C., & Ludvigsen, S. (2001). Expression of insulin in yeast: The importance of molecular adaptation for secretion and conversion. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), 89–121.
- Kjeldsen, T., Ludvigsen, S., Diers, I., Balschmidt, P., Sørensen, A. R., & Kaarsholm, N. C. (2002). Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18245–18248.
- Kjeldsen, T. B., Ludvigsen, S. & Kaarsholm, N. C. (2006). *Methods for making insulin precursors and insulin precursor analogs* (US 7,087,408 B2). United States Patent.
- Kjeldsen, T.B. (2006). *Method for making human insulin precursors* (US 7,105,314 B2). United States Patent.
- Lavalle-González, F. J., & Khatami, H. (2014). The biosimilar insulin landscape: current developments. *Postgraduate medicine*, 126(6), 81–92.
- Lin Cereghino, G. P., Lin Cereghino, J., Ilgen, C. & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329–332.
- Liu, H., Zhou, X., Tian, S., Hao, X., You, J., & Zhang, Y. (2014). Two-step transpeptidation of the insulin precursor expressed in *Pichia pastoris* to insulin ester via trypsin-catalyzed cleavage and coupling. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(4), 408–417.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270.
- Mansur, M., Cabello, C., Hernández, L., País, J., Varas, L., Valdés, J., Terro, Y., Hidalgo, A., Plana, L., Besada, V., García, L., Lamazares, E., Castellanos, L., & Martínez, E. (2005). Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 27(5), 339–345.

- Morihara, K., Ueno, Y., & Sakina, K. (1986). Influence of temperature on the enzymic semisynthesis of human insulin by coupling and transpeptidation methods. *Biochemical Journal*, 240(3), 803–810.
- Nilsson, J., Jonasson, P., Samuelsson, E., Stahl, S., & Uhlén, M. (1996). Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*, 48(3), 241–250.
- Nurdiani, D., Hariyatun, H., & Kusharyoto, W. (2018). Secretory expression of human insulin precursor in *Pichia pastoris* using truncated  $\alpha$ -Factor leader sequence and a short C-peptide. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 23(2).
- Nykiforuk, C. L., Boothe, J. G., Murray, E. W., Keon, R. G., Goren, H. J., Markley, N. A., & Moloney, M. M. (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology Journal*, 4(1), 77–85.
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Shaw, J. E., & Makaroff, L. E. (2017). IDF diabetes atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 40–50.
- Pak, S. C. O., Hunt, S. M. N., Sleight, M. J., & Gray, P. P. (1998). Expression of recombinant human insulin in Chinese hamster ovary cells is complicated by intracellular insulin-degrading enzymes. *New Development and New Applications in Animal Cell Technology*, 59–67.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., & Mattanovich, D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31(3), 245–259.
- Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91–105.
- Sanger, F., Thompson, E. O. P., & Kitai, R. (1955). The amide groups of insulin. *Biochemical Journal*, 59(3), 509.
- Soltanmohammadi, B., Javaran, M.J., Memari, H.R., & Mohebodini, M. (2014). Cloning, Transformation and Expression of proinsulin gene in Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 9(1): 9–15.



- Stratton, J., Chiruvolu, V., & Meagher, M. (1998). High cell-density fermentation. *Pichia Protocols*, 107–120.
- Sunga, A. J., & Cregg, J. M. (2004). The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. *Gene*, 330, 39–47.
- Swidan, S. Z., & Montgomery, P. A. (1998). Effect of blood glucose concentrations on the development of chronic complications of diabetes mellitus. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 18(5), 961–972.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211.
- Thim, L., Hansen, M. T., Norris, K., Hoegh, I., Boel, E., Forstrom, J., Ammerer, G., & Fiil, N. P. (1986). Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. 83(18), 6766–6770. doi:10.1073/pnas.83.18.6766.
- Vajo, Z., Fawcett, J., & Duckworth, W. C. (2001). Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: Insulin analogs. *Endocrine Reviews*, 22(5), 706–717.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 285.
- Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 151–159.
- Walsh G. (2013). Biopharmaceuticals approval trends in 2013. *Biopharm Int.*, 26(4), 54–56.
- Wang, Y., Liang, Z. H., Zhang, Y. S., Yao, S. Y., Xu, Y. G., Tang, Y. H., Zhu, S. Q., Cui, D. F., & Feng, Y. M. (2001). Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(1), 74–79.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koultz, P. J., Lair, S. V., & Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186, 37–44.



- Xie, T., Liu, Q., Xie, F., Liu, H., & Zhang, Y. (2008). Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38(3), 308–317.
- Yanagita, M., Nakayama, K., & Takeuchi, T. (1992). Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to bioactive insulin in the non-endocrine cell line, COS-7. *FEBS Letters*, 311(1), 55–59.
- Yao, C., Zhu, X., Wei, Y., Kou, Z., & Hu, K., (2015). Recent Advances in Vaccines and Drugs against the Ebola virus. *Bing Du Xue Bao*, 31(3): 287–292.
- Zaykov, A., Mayer, J. & DiMarchi, R. (2016). Pursuit of a perfect insulin. *Nat Rev Drug Discov* 15, 425–439. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.36>
- Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., & Zhang, S. (2009). Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 954–963.



## BAB V

# Interferon Alfa-2a: Protein Terapeutik untuk Penanganan Hepatitis dan Kankers

*Ratih Asmana Ningrum, Apon Zaenal Mustopa,  
dan Andri Wardiana*

### A. Interferon: Sejarah Penemuan dan Klasifikasi

Sejak pertama kali ditemukan pada sekitar tahun 1950, Interferon (IFN) menjelma menjadi protein terapeutik populer yang terus mengalami perkembangan. IFN yang potensinya disebut sebagai “cahaya fajar” dari obat berbasis protein rekombinan, telah digunakan selama lebih dari tiga dasawarsa dalam mengobati berbagai penyakit. Sejak tahun 1930, telah diketahui fenomena *viral interference* dalam bidang virologi, ketika infeksi yang disebabkan oleh virus avirulen atau virus yang dilemahkan dapat melindungi sel dari infeksi virus aktif dan bersifat virulen. Penemuan IFN pertama kali diinisiasi oleh Nagano dan Kojima pada 1954 yang melaporkan keberadaan bahan yang bersifat *viral interference* dari kelinci yang terinfeksi virus (Kontsek & Kontseková, 1997). Pada 1957, Alick Isaac dan Lindenmann, dua peneliti asal National Institute of Health, berhasil mengisolasi bahan tersebut dari sel ayam yang diinfeksi oleh virus influenza yang dilemahkan. Pada 1959, IFN juga dilaporkan memiliki aktivitas antivirus terhadap virus polio yang dilemahkan. Pemurnian terhadap IFN kemudian berhasil dilakukan pada kurun waktu 1978–1981 dan menjadi dasar penelitian untuk pengembangan IFN dalam bentuk

Buku ini tidak diperjualbelikan.

rekombinan. Tahun tersebut juga ditandai dengan konfirmasi gen-gen penyandi IFN sekaligus menjadi pembuktian aktivitas IFN sebagai antivirus (Pestka, 2007). IFN kemudian menjadi molekul yang banyak dipelajari aktivitasnya untuk keperluan terapi.

Protein IFN dihasilkan oleh sel sebagai respons terhadap paparan virus, bakteri, dan antigen asing. Klasifikasi IFN didasarkan pada reseptor yang dapat dikenali pada permukaan sel target (Ningrum, 2014). Tipe I adalah kelompok IFN yang dapat mengenali reseptor IFNAR1 dan IFNAR2, tipe II adalah IFN yang mengenali reseptor IFNGR1 dan IFNGR2, dan IFN tipe III adalah IFN yang mengenali kompleks reseptor IL10R2 dan IFNLR1. Tipe I terdiri atas berbagai sub-tipe IFN yang memiliki kemiripan asam amino penyusunnya sebesar 30–80%, yaitu IFN  $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\kappa$ , IFN $\epsilon$  dan IFN $\omega$ . Tipe II terdiri atas IFN $\gamma$ . Tipe III terdiri atas IFN $\lambda$ . IFN tipe I dan II tersebut sangat berperan dalam regulasi dan aktivasi respons sistem imun. Keberadaan IFN I dan III dapat diinduksi oleh virus, sementara IFN tipe II diinduksi oleh sitokin (Vilcek, 2006; Kallioliias & Ivashkiv, 2010; Hermant & Michiels, 2014). Subtipe IFN $\alpha$  diketahui memiliki aktivitas biologis yang luas, yakni sebagai antivirus, antiproliferasi, dan imunomodulator.

Saat ini, diketahui terdapat 23 jenis dari IFN $\alpha$ . Jenis yang paling banyak dikenal adalah IFN $\alpha$ -2a dan IFN $\alpha$ -2b. Kedua molekul tersebut adalah protein yang tersusun atas 165 asam amino dengan bobot molekul 19 kDa serta memiliki gugus gula berupa glikosilasi O yang terletak pada asam amino treonin posisi 106. Struktur molekul IFN $\alpha$ -2a dan IFN $\alpha$ -2b sangat mirip dan hanya dibedakan oleh satu asam amino saja, yaitu posisi 23 berupa asam amino lisin pada IFN $\alpha$ -2a dan arginin pada IFN $\alpha$ -2b (Wang dkk., 2015; Ningrum, 2014). Saat ini, IFN $\alpha$ 2a telah banyak digunakan untuk terapi beberapa tipe kanker, seperti *hairy cell leukemia*, *non-hodgkin lymphoma*, *renal cell carcinoma*, *chronic myelogenous leukemia*, *T-cell lymphoma*, serta penyakit hepatitis C (Jonasch & Haluska, 2001).

## B. Karakteristik dan Mekanisme Kerja Interferon Alfa-2a

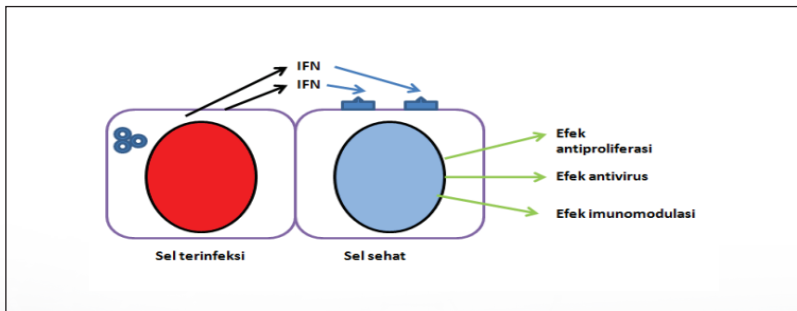
Struktur tiga dimensi IFN $\alpha$ -2a dilaporkan pertama kali oleh F. Hoffman-LaRoche pada 1997 (Klaus dkk., 1997). Secara umum, sifat IFN $\alpha$ -2a adalah sedikit asam dan molekulnya diketahui memiliki dua buah ikatan disulfida yang dibentuk oleh sistein posisi 1 dan 98 serta posisi 29 dan 138 (Neves dkk., 2004). Struktur molekul IFN $\alpha$ -2a terdiri atas lima buah  $\alpha$ -heliks yang dinamakan heliks A sampai E (Gambar 5.1). Terdapat empat daerah penting yang berfungsi sebagai tempat pengikatan reseptor. Daerah tersebut terdiri atas asam amino di daerah A (Metionin posisi 16 sampai Serin posisi 28), AB (Sistein posisi 29 dan Fenilalanin posisi 36), C (Glutamin posisi 78 sampai aspartat posisi 95) dan D (Tirosin posisi 122 sampai Alanin posisi 139) (Klaus dkk., 1997).



Sumber: Wardiana & Ningrum (2015)

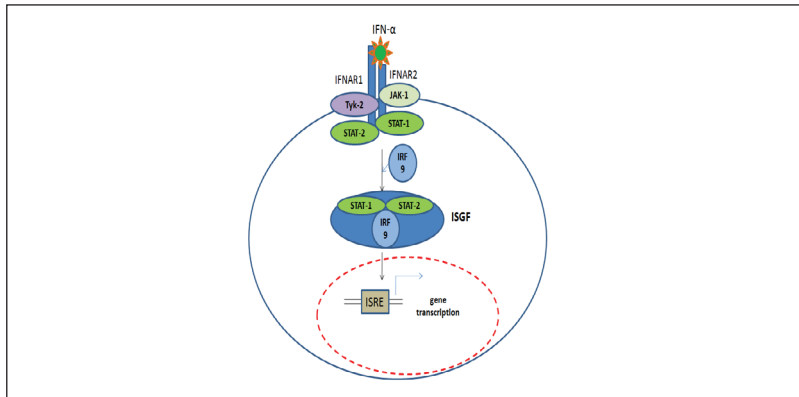
**Gambar 5.1** Struktur Tiga Dimensi IFN $\alpha$ -2a

Mekanisme kerja IFN $\alpha$ -2a diinisiasi oleh paparan sel terhadap senyawa asing (virus, bakteri, antigen, mitogen). Sel yang terinfeksi menghasilkan IFN dan IFN yang dilepaskan berikatan dengan sel sekitarnya serta memberikan efek proteksi terhadap paparan senyawa asing. Pengikatan molekul IFN pada reseptornya mengaktifkan jalur transduksi sinyal dalam sel yang pada akhirnya menghasilkan efek biologis tertentu. Secara sederhana, mekanisme kerja IFN dapat dilihat pada Gambar 5.2. Secara detail, interaksi IFN $\alpha$ -2a dengan reseptornya (IFNAR1 dan IFNAR2), mengaktifkan protein *tyrosine kinase* (TYK-2) dan *janus activated kinase* (JAK-1). Selanjutnya, TYK-2 dan JAK-1 mengaktifkan protein *signal transducer and activator of transduction* (STAT-1 dan STAT-2) yang membentuk kompleks dengan protein *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF-3). Kompleks tersebut ditranslokasi ke dalam inti sel dan berikatan dengan daerah *interferon stimulating response element* (ISRE), seperti terlihat pada Gambar 5.3 (Wardiana & Ningrum, 2015; Ningrum, 2014). Pengikatan ini mengaktifkan gen-gen yang berperan dalam aktivitas antivirus, antiproliferasi, dan modulasi respons imun. Studi pada sel kanker melanoma (WM9) mengungkap bahwa IFN $\alpha$ -2a meregulasi lebih dari 300 jenis gen dalam sel (Samuel, 2001).



Sumber: Wardiana & Ningrum (2015); Ningrum (2014)

**Gambar 5.2** Mekanisme Kerja Interferon



Sumber: Ningrum (2014)

**Gambar 5.3** Aktivasi Jalur Transduksi Sinyal JAK-STAT

Aktivasi jalur transduksi sinyal JAK-STAT dapat menghasilkan aktivitas biologis dalam sel. Efek antiproliferasi terhadap sel kanker terjadi melalui aktivitas langsung dan tidak langsung. Aktivitas tidak langsung terjadi melalui aktivasi sistem imun, sementara aktivitas langsung terjadi melalui penghambatan pertumbuhan sel melalui produksi protein-protein yang berintervensi ke dalam jalur pembelahan sel *mitogen activated protein kinase* (MAPK), contohnya protein p21 dan p27. Aktivitas langsung dapat juga terjadi melalui induksi kematian sel (apoptosis) dengan meningkatkan ekspresi gen pengkode kelompok protein caspase (Bazhanova, 2005; Bekisz dkk., 2010). Efek antivirus juga terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Aktivitas langsung terjadi melalui produksi protein-protein antivirus, yaitu MxA dan GBP (inhibitor transport nukleokapsid dan sintesis RNA virus), 2'-5' OAS (pendegradasi RNA virus), dan PKR (inhibitor translasi protein virus). Sementara itu, aktivitas tidak langsung terjadi melalui produksi protein-protein yang terlibat dalam pemrosesan dan presentasi antigen dalam sel, aktivasi sel T, pergerakan sel limfosit, dan fungsi efektor dalam sistem imun. Aktivitas tersebut akan meningkatkan kemampuan imunitas bawaan (sel *natural killer*)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

dan imunitas dapatan (sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>) terhadap virus yang menginfeksi sel (Samuel, 2001; Gao dkk., 2004).

### C. Penggunaan IFN-2a sebagai Obat Biosimilar

Pada 1986, Food and Drug Administration (FDA) menyetujui penggunaan golongan IFN alfa (IFN $\alpha$ ) sebagai obat pertama berbasis imunoterapi kanker untuk penanganan penyakit *hairy cell leukemia*, *follicular non-hodgkin lymphoma*, *melanoma*, dan *AIDS-related kaposi's sarcoma*. FDA kemudian menyetujui produk IFN $\alpha$ -2b komersial, yakni Intron, sebagai obat hepatitis C pada 1991 dan hepatitis B pada 1992. Varian lainnya, yakni IFN $\alpha$ -2a (Roferon A, Roche), memperoleh persetujuan untuk digunakan pada terapi hepatitis C pada 1996 (Jonasch & Haluska, 2001). Pada 2007, paten untuk produksi IFN $\alpha$ -2a habis sehingga Roferon menjadi produk inovator dan memungkinkan perusahaan lain untuk memproduksi molekul protein yang sama sebagai biosimilar. Saat ini, terdapat 2 produk IFN $\alpha$ -2a, yaitu Roferon-A dan Pegasys yang diproduksi oleh Roche (Reddy dkk., 2002). Pegasys merupakan generasi kedua dari Roferon yang memiliki total nilai pendapatan mencapai 1582 juta US\$ pada 2010 atau lebih dari tujuh kali lipat dibandingkan Roferon. Saat ini, terdapat beberapa produk biosimilar IFN yang sudah dipasarkan ataupun yang masih dalam proses pengujian (Mohamed & Redwan, 2014).

IFN $\alpha$ -2a telah digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit, seperti hepatitis B dan C kronis, kanker paru-paru, *hairy cell leukemia*, *chronic myelogenous leukemia (CML)*, *renal cell carcinoma*, *melanoma*, *hemangioma*, *colorectal carcinoma*, *T-cell* atau *B-cell lymphoma* dan *esophageal carcinoma* (Jonasch & Haluska, 2001). Terapi menggunakan IFN $\alpha$ -2a dilakukan secara tunggal atau dikombinasikan dengan obat lain. Pada pengobatan hepatitis B, IFN $\alpha$ -2a dikombinasikan dengan analog nukleos(t)ida, seperti lamivudin, telbivudin, entecavir, adefovir, atau tenofovir. Pada pengobatan hepatitis C, IFN $\alpha$ -2a dikombinasikan dengan analog nukleos(t)ida, seperti ribavirin, sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir/ledipasvir, parotaprevir/ombitasvir/ritonavir



dan dasabuvir (Wardiana & Ningrum, 2015). Kombinasi dengan obat antikanker, seperti interleukin-2, 5-fluorouracil, cisplatin, rituximab, vinblastine, atau retinoic acid digunakan pada terapi berbagai tipe kanker.

Meskipun IFN $\alpha$ -2a memiliki aktivitas biologis yang luas sebagai antihepatitis dan antikanker, penggunaan IFN $\alpha$ -2a masih memiliki keterbatasan (Ningrum dkk., 2017). Keterbatasan IFN $\alpha$ -2a adalah waktu paruh eliminasi plasma pendek akibat klirens ginjal yang cepat. Karakteristik IFN $\alpha$ 2a yang memiliki bobot molekul 19 kDa dan titik isoelektrik 6 menyebabkan IFN $\alpha$ 2a memiliki jalur utama eliminasi melalui klirens ginjal pada proses filtrasi oleh glomerulus. Filtrasi tersebut bersifat selektif terhadap ukuran dan muatan. Filter glomerulus terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan endotel, membran basal, dan slit diafragma. Membran basal glomerulus terdiri atas protein berukuran besar, seperti laminin, kolagen tipe IV, entaktin, dan proteoglikan sulfat. Proteoglikan sulfat memiliki muatan negatif serta berkontribusi dalam selektivitas muatan. Sementara itu, slit diafragma memiliki ukuran pori-pori 4 $\times$ 14 nm sehingga berperan pada selektivitas ukuran. Protein yang memiliki ukuran kurang dari 30 kDa dan cenderung bermuatan positif akan mudah dieliminasi oleh sistem bersihan ginjal (Tryggvason & Wartiovaara, 2005; Solá & Griebenow, 2011; Kanwar dkk., 2007).

Produk komersial IFN $\alpha$ -2a, Roferon A, memiliki waktu paruh eliminasi 5 jam. Konsekuensi dari waktu paruh yang pendek adalah waktu tinggal rata-rata dalam tubuh (*mean residence time* atau MRT) menjadi singkat sehingga frekuensi terapi harus ditingkatkan. Konsentrasi efektif obat diperoleh melalui frekuensi pemberian tiga kali per minggu selama 24 sampai 48 minggu untuk pengobatan hepatitis, dan setiap hari selama tiga sampai 10 minggu untuk pengobatan kanker. Frekuensi pemberian tinggi dan waktu terapi yang lama dapat menimbulkan fenomena *relapse* pada penanganan infeksi virus. Selain itu, efek samping yang dirasakan saat konsentrasi maksimal dalam tubuh terjadi berulang kali. Efek samping yang banyak dirasakan penderita terjadi dari tingkat menengah sampai

Buku ini tidak diperjualbelikan.

tingkat berat. Efek samping menengah umumnya adalah demam, kelelahan, sakit kepala, mialgia, alopecia, dan reaksi tak nyaman pada tempat injeksi. Efek samping berat adalah gangguan mental dengan keinginan bunuh diri, gangguan jantung, dan penurunan sel darah putih (FDA, 2008).

Strategi peningkatan waktu paruh eliminasi IFN $\alpha$ -2a telah dilakukan dengan berbagai macam pendekatan modifikasi protein. Salah satu pendekatan modifikasi protein yang paling berhasil adalah modifikasi peningkatan bobot molekul protein melalui konjugasi dengan polietilen glikol (PEG). Produk komersial yang telah tersedia di perdagangan adalah PEGASYS (Hoffman La Roche). Produk terpegilasi dari IFN $\alpha$ -2a dapat meningkatkan waktu paruh eliminasi menjadi 70 jam (Reddy dkk., 2002). Hal ini menyebabkan frekuensi pemberian terapi menjadi sekali seminggu. Modifikasi lain yang dapat dilakukan adalah peningkatan bobot molekul melalui fusi dengan albumin (Subramanian dkk., 2007), pengubahan muatan protein menjadi lebih negatif melalui substitusi asam amino protein (Ningrum dkk., 2012), dan glikosilasi (Ceaglio, 2008). Saat ini, belum tersedia produk komersial dari ketiga pendekatan modifikasi tersebut.

Kedua jenis IFN $\alpha$ -2a (bentuk non-modifikasi dan bentuk termodifikasi) digunakan dalam monoterapi maupun terapi kombinasi dengan obat lain. Dosis yang banyak digunakan untuk terapi hepatitis adalah 180  $\mu$ g per minggu sebagai monoterapi atau dikombinasikan dengan analog nukleos(t)ida sebesar 100-1200 mg selama 48 minggu. Pada terapi hepatitis C, dilaporkan bahwa penggunaan hIFN $\alpha$ -2a lebih efektif dibandingkan dengan hIFN $\alpha$ 2b. Berikut adalah rangkuman dari beberapa penggunaan IFN $\alpha$ -2a pada berbagai penyakit (Tabel 5.1).

**Tabel 5.1** Dosis dan Pemberian IFN $\alpha$ -2a pada Berbagai Penyakit

No.	Jenis Penyakit	Dosis dan pemberian	Referensi
1	Hepatitis B	IFN $\alpha$ -2a terpegilasi 180 $\mu$ g per minggu diberikan secara sub kutan selama 48 minggu, dapat dikombinasikan dengan: analog nukleosida lamivudin (100 mg), telbivudine (600 mg), entecavir (0,5 mg) analog nukleotida adevovir (10mg), tenofovir disoproxil fumarate (245mg), tenofovir alafenamide (25mg).	European Association for Study of the Liver (2017)
2	Hepatitis C	IFN $\alpha$ -2a terpegilasi 180 $\mu$ g perminggu dan ribavirin 800-1200 mg per hari selama 24 sampai 48 minggu	Rumi, dkk. (2010), Ascione dkk. (2010), European Association for Study of the Liver (2015)
3	Renal cell carcinoma	IFN $\alpha$ -2a 3 juta unit sebanyak tiga kali seminggu untuk satu minggu, kemudian 18 juta unit sebanyak tiga kali seminggu untuk minggu-minggu berikutnya selama 12 bulan, diberikan secara sub kutan Untuk pasien yang tidak dapat menoleransi terapi, dosis diturunkan menjadi 9 juta unit	Pyrhonen (2004)
4	Hairy cell leukemia	IFN $\alpha$ -2a sebanyak 3 juta unit, diberikan secara sub kutan, setiap hari selama 6 bulan	Smith dkk. (1991)
5	Chronic myelogenous leukemia (CML)	IFN $\alpha$ -2a terpegilasi sebanyak 90 $\mu$ g yang dikombinasikan dengan imatinib 400 mg per hari selama 12 bulan	Preudhomme dkk. (2010)
6	Melanoma	IFN $\alpha$ -2a sebanyak 3 juta unit diberikan tiga kali seminggu selama 18 bulan	Grob dkk. (1998)
7	Hemangioma	IFN $\alpha$ -2a sebanyak 1 juta unit per m <sup>2</sup> area per hari dan 3 juta unit selanjutnya selama 5-11 bulan, diberikan tiga kali seminggu secara sub kutan	Ricketts, Hatley, Corden, Sabio, & Howell (1994)

No.	Jenis Penyakit	Dosis dan pemberian	Referensi
8	Colorectal carcinoma	IFN $\alpha$ -2a sebanyak 9 juta unit per m <sup>2</sup> diberikan tiga kali seminggu dikombinasikan dengan 5 fluorourasil 750 mg setiap hari, selama 12 bulan	Dufour dkk. (1996)
9	T-cell atau B-cell lymphoma	T cell lymphoma: IFN $\alpha$ -2a sebanyak 3 juta unit atau sampai 36 juta unit diberikan secara intramuskular, setiap hari selama 10 minggu B cell lymphoma: IFN $\alpha$ -2a sebanyak 3 juta unit tiga kali seminggu selama 12 bulan	Olsen dkk. (1989)  Cozzio (2006)

Sumber: Dari berbagai sumber.

#### D. Teknologi Produksi Interferon Alfa-2a

Teknologi DNA rekombinan merupakan hal terpenting dalam produksi protein terapeutik. Kebutuhan terhadap IFN $\alpha$ -2a mengalami peningkatan setiap tahun sehubungan dengan status Indonesia sebagai negara dengan peringkat ketiga penderita hepatitis terbanyak di dunia (Kemenkes, 2014). Hal ini juga disebabkan oleh jumlah penderita kanker di Indonesia yang mencapai 21,6 juta jiwa (Kemenkes, 2015). Kondisi tersebut menempatkan IFN $\alpha$ -2a sebagai protein terapeutik yang menjadi salah satu andalan dalam terapi. Namun, hingga saat ini, kebutuhan dan ketersediaan IFN $\alpha$ -2a di Indonesia masih dipenuhi melalui jalur impor karena belum ada perusahaan farmasi dalam negeri yang memproduksi protein tersebut. Berbagai upaya telah dilakukan Pemerintah Republik Indonesia untuk memberikan solusi terhadap pemenuhan kebutuhan bahan baku obat. Paket Kebijakan Ekonomi XI mendorong pengembangan industri farmasi melalui Instruksi Presiden Nomor 6 Tahun 2016 tentang Percepatan Pengembangan Industri Farmasi dan Alat Kesehatan. Selanjutnya, Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2017 memaparkan rencana aksi pengembangan industri farmasi dan alat kesehatan yang salah satunya terdapat skenario pengembangan produk bioteknologi. Skenario tersebut menyatakan bahwa interferon termasuk salah satu

Buku ini tidak diperjualbelikan.

produk protein terapeutik yang fokus dikembangkan pada tahun 2019–2021 (Permenkes No. 7, 2017). Dengan adanya berbagai upaya tersebut, ketersediaan dan pemenuhan kebutuhan dalam negeri diharapkan dapat segera dicapai. Saat ini terdapat beberapa produk IFN $\alpha$ -2a komersial yang dipasarkan secara global, termasuk di Indonesia. Produk nonmodifikasi IFN $\alpha$ -2a dikenal sebagai produk generasi pertama, sementara produk termodifikasinya disebut sebagai produk generasi kedua.

## 1. Roferon-A

Roferon-A merupakan protein rekombinan IFN $\alpha$ -2a yang serupa dengan bentuk natif IFN $\alpha$ -2a yang dihasilkan oleh sel leukosit. Roferon-A merupakan originator produk komersial dan generasi pertama IFN $\alpha$ -2a yang diproduksi oleh Hoffman LaRoche. Roferon-A dihasilkan melalui sistem ekspresi prokariot, yakni bakteri *Escherichia coli* (Baron & Narulla, 1990). Menurut Wardiana & Ningrum (2015), terdapat tiga tahap produksi Roferon-A, sebagai berikut.

### a. Kloning gen penyandi protein IFN $\alpha$ -2a.

Gen penyandi IFN $\alpha$  pertama kali diisolasi dari sel leukosit manusia dan dikloning pada 1980. Hal ini kemudian menjadi awal terpetakannya urutan nukleotida kelompok gen penyandi protein IFN $\alpha$ . Pada tahap kloning, cDNA penyandi IFN $\alpha$ -2a disisipkan ke dalam suatu vektor pembawa, yakni pBR322, agar dapat dimasukkan atau ditransformasi ke dalam bakteri *Escherichia coli*.

### b. Ekspresi gen penyandi protein IFN $\alpha$ -2a dalam sistem prokariot

Vektor rekombinan pBR322 yang membawa materi genetik penyandi IFN $\alpha$ -2a selanjutnya ditransformasi ke dalam sel bakteri *Escherichia coli*. Ekspresi diregulasi oleh promotor triptofan. Pada kombinasi penggunaan galur bakteri dan kondisi fermentasi, level ekspresi yang diperoleh dari satu liter media mencapai  $1 \times 10$  unit/L. Unit merupakan satuan aktivitas dari IFN yang ekivalensinya bervariasi tergantung protein yang dianalisis. Sebagai gambaran, 1 unit interferon gamma sebanding dengan 0,1 mg protein dan 1 unit insulin sebanding dengan 0,03 mg.

### c. Produksi dan purifikasi protein IFN $\alpha$ -2a

Purifikasi merupakan tahapan terpenting dalam proses hilir. Protein rekombinan IFN $\alpha$ -2a diekstraksi terlebih dahulu dari sel *Escherichia coli*. Proses pemecahan sel diperlukan untuk memperoleh protein yang diproduksi secara intraseluler. Debris sel kemudian dihilangkan melalui ultrasentrifugasi. Purifikasi dilakukan menggunakan kromatografi afinitas melalui kolom yang mengandung antibodi monoklonal spesifik yang dapat mengikat protein rekombinan IFN $\alpha$ -2a. Tahapan purifikasi selanjutnya adalah kromatografi afinitas berbasis tembaga dan kromatografi filtrasi gel untuk memperoleh protein IFN $\alpha$ -2a murni.

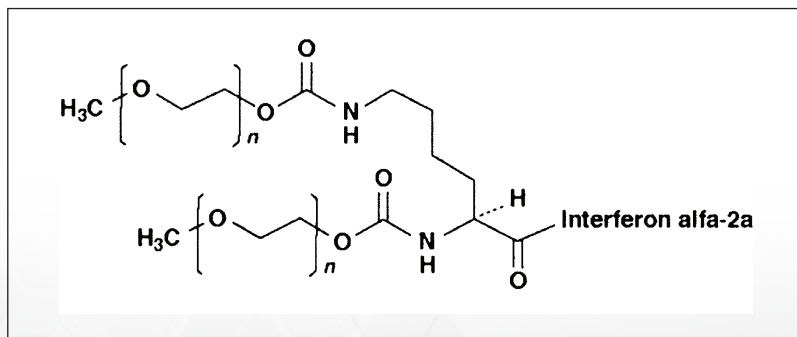
Pengujian praklinis berupa aktivitas antivirus terhadap *rhinovirus*, *herpes*, dan *encephalomyocarditis* menunjukkan bahwa Roferon A memiliki aktivitas yang tidak berbeda secara bermakna dengan bentuk natif dalam tubuh. Namun, aktivitas antiproliferasinya bergantung pada sensitivitas lini sel kanker yang diuji. Analisis farmakokinetik menunjukkan bahwa waktu paruh eliminasi dalam tubuh adalah 1,8–4,8 jam, sedangkan uji toksisitas akut dan sub-kronis menyatakan bahwa Roferon tidak menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan. Pengujian klinis menunjukkan efek yang baik sebagai antivirus pada kasus hepatitis C (Cirelli & Tyring, 1995; Dorr, 1993) dan imunomodulator pada hepatitis B (Haria & Benfield, 1995). Terapi pada kasus sirosis juga mengalami kemajuan yang signifikan (Haria & Benfield, 1995). Pada pemberian secara subkutan, waktu paruh eliminasi mencapai 3 sampai 7 jam ketika terjadi proses eliminasi yang cepat melalui sistem klirens ginjal pada proses reabsorpsi (Wardiana & Ningrum, 2015).

## 2. Pegasys

Pegasys merupakan produk generasi kedua IFN $\alpha$ -2a dari Hoffman LaRoche. Modifikasi yang dilakukan dari bentuk natifnya adalah penambahan bobot molekul melalui pegilasi. Pegasys adalah IFN $\alpha$ -2a yang berikatan dengan Poli Etilen Glikol (PEG) bercabang berukuran 40 kDa sehingga bobot molekul akhirnya 60 kDa. Keuntungan pegilasi

adalah menaikkan bobot molekul sekaligus menahan degradasi protein oleh proteolisis enzim sehingga waktu paruh eliminasi meningkat. Pegilasi dilakukan dengan mengikatkan PEG ke dalam asam amino target dari IFN $\alpha$ -2a. PEG dapat berikatan pada satu atau beberapa lokasi dari protein. Pengikatan pada satu lokasi lebih dipilih karena pegilasi yang berlebih, terutama yang berposisi dekat dengan situs aktif protein, dapat menurunkan aktivitas protein. PEG diaktivasi terlebih dahulu dengan menggunakan senyawa kimia lain, contohnya carbonyl-imidazol sehingga dapat berikatan dengan gugus kimia pada rantai samping asam amino target. Asam amino target dalam Pegasys adalah lisin, yang jumlahnya dalam molekul mencapai 11 residu. Terdapat empat situs pegilasi utama, yaitu lisin posisi 31, 121, 131, dan 134. Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua asam amino lisin dapat berinteraksi dengan dan berikatan dengan PEG. Pegasys mengandung 2 gugus monometoksi PEG yang masing-masing berukuran 20 kDa (Gambar 5.4).

Pegasys memiliki waktu paruh eliminasi 72 jam. Hal ini menyebabkan waktu pemberian pada terapi menjadi satu kali seminggu. Pegasys memiliki aktivitas antivirus yang baik pada pasien yang terinfeksi virus hepatitis C genotipe 1, yaitu genotipe terganas pada hepatitis. Studi yang dilakukan oleh Fried dkk. (2002) menunjukkan



Sumber: Reddy dkk. (2002)

**Gambar 5.4** Struktur Kimia Pegasys yang Mengandung Dua Senyawa PEG Berkurang 20 kDa

Buku ini tidak diperjualbelikan.



efek Pegasys yang lebih baik dibandingkan hIFN $\alpha$ 2a nonmodifikasi pada penanganan hepatitis dengan status fibrosis dan sirosis. Selain itu, Pegasys juga efektif pada pasien dengan tingkat histologi serius, yakni sirosis. Kombinasi dengan antivirus lain, seperti ribavirin, menambah efektivitas Pegasys. Keamanan Pegasys juga sebanding dengan bentuk natifnya sehingga tidak ada efek samping keamanan yang berarti.

## E. Regulasi Produk IFN-2a

Produk berupa biosimilar ataupun protein terapeutik memiliki persyaratan yang sangat ketat sebelum dipasarkan secara komersial. Protein IFN $\alpha$ -2a memiliki berbagai persyaratan untuk memenuhi kualitas, khasiat, dan keamanan obat. Persyaratan tersebut diatur dalam beberapa dokumen standar, misalnya British Pharmacopoeia dan European Medicines Agency (EMA). Sementara itu, persyaratan di Indonesia mengikuti panduan umum produk biosimilar dari badan POM, yaitu Peraturan Kepala BPOM nomor 17 tahun 2015 (Wardiana & Ningrum, 2015). Menurut British Pharmacopoeia, persyaratan produk IFN $\alpha$ -2a harus dikarakterisasi secara biologis dan kimia serta memenuhi konsistensi produk. Sementara itu, urutan asam amino harus diawali dengan asam amino sistein sehingga asam amino metionin sebagai asam amino pertama harus dihilangkan. Protein juga harus memiliki ikatan disulfida yang dibentuk oleh sistein posisi 1 dan 98 serta posisi 29 dan 129 (Gambar 5.5). Secara monografi, sediaan harus berupa larutan yang jernih, dan tidak berwarna atau sedikit kekuningan. Potensi yang dipersyaratkan adalah tidak kurang dari  $1,4 \times 10^8$  IU per mg protein atau  $2 \times 10^8$  IU per mL protein.

Aktivitas biologis ditentukan berdasarkan kemampuan untuk menghambat replikasi vesicular stomatitis virus dalam sel MDBK. Karakterisasi protein ditentukan dengan menetapkan titik isoelektrik protein dengan metode isoelectric Focusing (IEF) yang berada pada rentang 5,8 sampai 6,3. Selain itu, dilakukan SDS PAGE pada kondisi tereduksi untuk karakterisasi bobot molekul sekaligus melihat keberadaan pengotor. Pengotor tidak boleh melebihi angka 0,2%.

## Interferon Alfa-2 Concentrated Solution

General Notices

(Ph Eur monograph 1110)

CDLPQTHSLG    SRRTLMLLAQ    MRX<sub>1</sub>ISLFSCL    KDRHDFGFPO  
EEFGNQFQKA    ETIPVLHEMI    QQIFNLFSTK    DSSAAWDETL  
LDKFYTELYQ    QLNDLEACVI    QGVGVTTETPL    MKEDSILAVR  
KYFQRITLYL    KEKKYSPCAW    EVVRAEIMRS    PSLSTNLQES  
LRSKE

alfa-2a: C<sub>860</sub>H<sub>1353</sub>N<sub>227</sub>O<sub>255</sub>S<sub>6</sub>    19,241    76543-85-9

alfa-2b: C<sub>860</sub>H<sub>1353</sub>N<sub>226</sub>O<sub>255</sub>S<sub>6</sub>    19,269    99210-65-8

Sumber: Commision BP (2009)

**Gambar 5.5** Urutan Asam Amino Penyandi Interferon Alfa-2

Sementara itu, *related protein* atau bentuk lain dari protein target tidak boleh melebihi angka 3%. Karakterisasi juga dilakukan dengan *metode peptide mapping* dengan memberikan protease pada protein dan menganalisis fragmen-fragmen yang terbentuk. Seluruh hasil harus sesuai dengan referensi yang digunakan sebagai standar. Persyaratan lain yang harus dipenuhi adalah endotoksin dengan kadar tidak lebih dari 100 IU per mg protein (Commision BP, 2009).

*European Medicines Agency* (EMA) memiliki standar yang harus dipenuhi untuk persetujuan produk biosimilar IFN $\alpha$ -2a. Berdasarkan dokumen nomor EMA/CHMP/BMWP/102046/2006, pengujian terhadap produk meliputi pengujian nonklinis (farmakodinamik dan toksikologi) serta uji klinis (farmakokinetik, farmakokinetik, khasiat, keamanan, ekstrapolasi dan farmakovigilans). Setiap uji memiliki dokumen spesifik, sebagai berikut.

1. *Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04)*;
2. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005)*;

Buku ini tidak diperjualbelikan.

3. *Note for guidance on repeated dose toxicity (CPMP/SWP/1042/99);*
4. *Note for guidance on toxicokinetics: A Guidance for assessing systemic exposure in toxicological studies (CPMP/ICH/384/95);*
5. *Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00);*
6. *Guideline on risk management systems for medicinal products for human use (EMA/CHMP 96286/2005);*
7. *Note for Guidance on Good Clinical Safety Data Management: Definitions and Standards for Expedited Reporting (CPMP/ICH/377/95);*
8. *ICH Note for Guidance on Planning Pharmacovigilance Activities (CPMP/ICH/5716/03 - Final approval by CHMP on PHV);*
9. *Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins” (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006);*

Setelah persyaratan terpenuhi, diperlukan proses registrasi agar IFN $\alpha$ -2a dapat dikategorikan sebagai obat biosimilar. Pengawasan oleh pihak berwenang tetap dilakukan meskipun obat telah beredar di masyarakat. Hal ini untuk memastikan kualitas dan keamanan sesuai persyaratan.

## **F. Kegiatan Riset IFN-2a di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI**

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sebagai lembaga riset yang memiliki visi menjadi lembaga rujukan bidang bioteknologi di Indonesia, telah berperan serta secara aktif dalam kegiatan riset IFN $\alpha$ -2a sejak tahun 2014. Kluster Bioteknologi Kesehatan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI memiliki berbagai kegiatan riset di bidang protein terapeutik rekombinan. Salah satu jenis protein terapeutik rekombinan yang dikembangkan adalah IFN $\alpha$ -2a melalui Kegiatan Unggulan LIPI Bidang Pengembangan Bahan Baku Obat.

## 1. Fokus Kegiatan

Riset IFN $\alpha$ -2a difokuskan pada modifikasi peningkatan bobot molekul dengan teknologi fusi albumin. Peningkatan bobot molekul diharapkan dapat meningkatkan waktu paruh eliminasi protein. Teknologi fusi dengan *Human Serum Albumin* (HSA) dipilih karena memiliki berbagai keunggulan jika dibandingkan dengan metode pegilasi dan metode alternatif lainnya.

Kelemahan pegilasi adalah terbentuknya produk campuran protein dan senyawa isomer akibat posisi pengikatan PEG pada asam amino target yang berbeda. Hal ini harus diatasi dengan kontrol reaksi yang sangat ketat pada berbagai parameter, yaitu rasio molar protein dan PEG; konsentrasi reaktan dan pelarut; serta pH, temperatur dan waktu reaksi. Selain itu, kelemahan pegilasi yang utama adalah proses modifikasi dengan pegilasi harus dilakukan setiap kali produksi karena bersifat pasca-produksi sehingga kurang efisien dan dapat menyebabkan kenaikan harga obat. Kelemahan lainnya adalah penurunan aktivitas biologis protein menjadi tinggal 28% sampai 7% jika dibandingkan bentuk non-modifikasinya (Ceaglio dkk., 2008; Zhao dkk., 2007).

Metode alternatif selain pegilasi adalah glikosilasi, substitusi asam amino, dan fusi dengan HSA. Glikosilasi adalah penambahan gugus gula pada molekul protein. Penambahan gugus gula dapat dilakukan secara *in vivo* dengan inang eukariot maupun secara *in vitro*. Substitusi asam amino adalah penggantian asam-asam amino target oleh asam amino lain untuk memperoleh sifat yang diinginkan, seperti lebih tahan protease, lebih bermuatan positif atau negatif, serta lebih stabil secara struktur kimia. Fusi dengan HSA adalah menggabungkan protein target dengan HSA. Pada tahapan konstruksi gen, DNA penyandi protein target dan HSA digabungkan, baik menggunakan penghubung (*linker*) atau tidak, untuk diekspresikan dalam suatu inang. Keunggulan pendekatan fusi dengan HSA jika dibandingkan dengan pegilasi adalah modifikasi hanya satu kali dilakukan pada tingkat DNA sehingga tidak dilakukan setiap kali produksi. HSA dipilih karena memiliki waktu paruh yang panjang dalam tubuh (9

Buku ini tidak diperjualbelikan.

hari), terdistribusi luas dalam tubuh, dan tidak bersifat imunogenik. Keunggulan lainnya adalah HSA dapat meningkatkan kelarutan dan stabilitas protein. HSA merupakan protein utama dalam plasma darah yang diproduksi oleh hati dan berperan dalam menjaga osmolaritas darah dan membawa molekul-molekul kecil (Zhao dkk., 2012). Berikut ini ringkasan kelemahan dan keunggulan metode modifikasi yang dapat dilakukan pada IFN $\alpha$ -2a (Tabel 5.2).

**Tabel 5.2** Kelemahan dan keunggulan berbagai modifikasi yang dapat dilakukan pada IFN $\alpha$ -2a

No.	Metode Modifikasi	Keunggulan	Kelemahan	Referensi
1	Pegilasi	Menaikkan bobot molekul protein, menahan degradasi protein oleh proteolisis enzim, menaikkan kelarutan protein, tidak imunogenik	Modifikasi harus dilakukan setiap kali setelah produksi protein, berpotensi tinggi untuk terbentuknya produk campuran protein dan senyawa isomer akibat posisi pengikatan PEG pada asam amino target yang berbeda, memerlukan kontrol reaksi yang ketat pada rasio molar protein dan PEG; konsentrasi reaktan dan pelarut; serta pH, temperatur dan waktu reaksi, dapat menurunkan aktivitas biologi protein	Ceaglio dkk. (2008); Zhao dkk. (2012)
2	Fusi dengan has	Menaikkan bobot molekul protein, tidak imunogenik, terdistribusi luas dalam tubuh, menaikkan stabilitas protein, potensi kenaikan waktu paruh lebih besar, modifikasi cukup dilakukan pada level DNA sehingga efisien	HSA berpotensi mengalami proteolisis dalam inang produksi, dapat menurunkan aktivitas biologi protein	Subramanian dkk. (2005)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

No.	Metode Modifikasi	Keunggulan	Kelemahan	Referensi
3	Glikosilasi	Menaikkan bobot molekul dan mengubah muatan total protein menjadi lebih negatif	Kenaikan bobot molekul protein tidak terlalu besar, jika glikosilasi dilakukan secara in vivo berpotensi imunogenik akibat perbedaan pola glikosilasi inang, jika glikosilasi dilakukan secara in vitro berpotensi tinggi untuk terbentuknya produk campuran protein dan senyawa isomer akibat posisi pengikatan gugus gula pada asam amino target yang berbeda	Ceaglio dkk. (2008)
4	Substitusi asam amino	Mengubah muatan total protein menjadi lebih negatif, dapat mengurangi proteolisis dengan mengganti asam amino target yang dikenali oleh enzim protease	Jumlah asam amino yang dapat diganti terbatas agar tidak berpengaruh pada sisi aktif dan mengubah aktivitas biologis protein	Ningrum dkk. (2012)

Sumber: Dari berbagai sumber

## 2. Metode dan Sistem Ekspresi

HSA terdiri atas 585 asam amino, memiliki 17 ikatan disulfide, dan berbobot molekul 66 kDa (Sugio dkk., 1999). Bobot molekul total protein fusi HSA-hIFN $\alpha$ 2a adalah 85 kDa sehingga memerlukan sistem ekspresi yang dapat mengakomodasi sintesis protein. Sistem prokariot memiliki keterbatasan dalam mensintesis protein berbobot molekul tinggi dan protein berkonformasi kompleks karena lingkungan sel bersifat reduktif. Keterbatasan tersebut menyebabkan protein rekombinan yang dihasilkan cenderung membentuk badan inklusi yang inaktif secara biologi (Ningrum, Retnoningrum dkk., 2011; Beldarraín dkk., 2001; Fischer dkk., 1993). Sistem ekspresi eukariot menyediakan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



kemampuan untuk menghasilkan protein aktif dengan konformasi yang lebih kompleks. Sistem ini juga dapat melakukan modifikasi pasca-translasi berupa penambahan gugus gula atau glikosilasi yang sering kali menentukan aktivitas biologis suatu protein. Berbagai sistem ekspresi yang saat ini banyak digunakan dalam teknologi rekayasa genetika adalah *yeast*, *baculovirus*, dan sel mamalia. *Pichia pastoris* merupakan salah satu jenis *yeast* yang telah tersedia secara komersial. *Pichia pastoris* merupakan *yeast* metilotropik atau *yeast* yang mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya.

Sistem sekresi *P. pastoris* dipilih dalam kegiatan riset IFNa2a untuk menghasilkan protein fusi karena memiliki berbagai keunggulan. Keunggulan *Pichia pastoris* adalah kemampuan untuk produksi protein level tinggi, keberadaan modifikasi pasca-translasi (glikosilasi) dan sistem sekresi protein, kemudahan untuk melakukan manipulasi pada tingkat molekuler, serta kemudahan dalam transformasi, seleksi klon rekombinan dan proses *scale up* pada produksi (Cregg dkk., 2000; Skoko dkk., 2003). Sistem sekresi pada *Pichia pastoris* memungkinkan protein untuk dihasilkan secara ekstraseluler atau dikeluarkan dari sel ke dalam media pertumbuhan. Hal ini sangat memudahkan proses isolasi dan pemurnian protein yang sangat penting dalam proses produksi protein.

Sistem sekresi pada *P. pastoris* diatur oleh promotor alcohol oxidase AOX1 yang dapat diinduksi oleh keberadaan alkohol dalam media pertumbuhan. Sistem ini juga menyediakan sinyal sekuens  $\alpha$ -factor pada vektor ekspresi berupa DNA penyandi untaian asam amino yang bergabung dengan ujung protein target dan akan mentranspor protein tersebut ke luar sel. Sebelum protein ditranspor ke luar sel, sinyal sekuens dipotong oleh enzim protease sehingga hanya protein target yang berada dalam media (Skoko dkk., 2003).

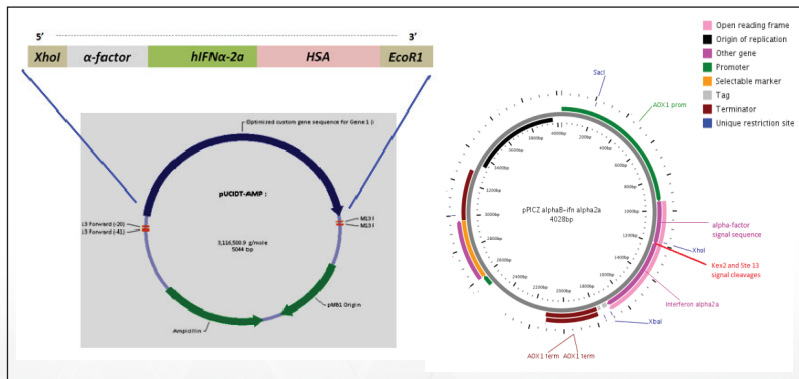
Produksi protein fusi pada *P. pastoris* dimulai dengan memasukkan vektor rekombinan yang disisipi DNA penyandi protein fusi melalui proses elektroporasi. Selanjutnya, dilakukan seleksi dengan menggunakan zeocin sebagai penanda. Klon *P. pastoris* yang tidak mengandung vektor rekombinan tidak dapat tumbuh pada media padat



yang mengandung zeocin. Selanjutnya, klon terseleksi ditumbuhkan dalam media ekspresi selama dua tahap. Tahap pertama ditujukan untuk memperbanyak sel pada media pertumbuhan cair yang mengandung gliserol, sedangkan tahap kedua untuk menghasilkan protein fusi dalam media cair yang mengandung metanol. Proses inkubasi dilakukan pada temperatur 30°C dan pengocokan 200 rpm selama 48 sampai 72 jam. Induksi dengan metanol diulang dan dilakukan setiap rentang waktu 24 jam.

### 3. Hasil Kegiatan Penelitian

Penelitian yang dilakukan selama 3 tahun telah menghasilkan protein fusi IFN $\alpha$ 2a dan protein nonfusi sebagai pembanding. Kedua protein tersebut diproduksi dalam yeast *P. pastoris* dan telah dikarakterisasi. Konstruksi gen dilakukan dengan mendesain urutan nukleotida kerangka baca terbuka penyandi protein IFN $\alpha$ -2a dan HSA (Gambar 5.6). Kerangka baca terbuka merupakan bagian dari gen yang hanya menyandi protein. Selanjutnya, desain tersebut disintesis menggunakan penyintesis DNA yang bisa dilakukan secara mandiri atau melalui perusahaan penyedia jasa komersial dan disisipkan ke dalam vektor.

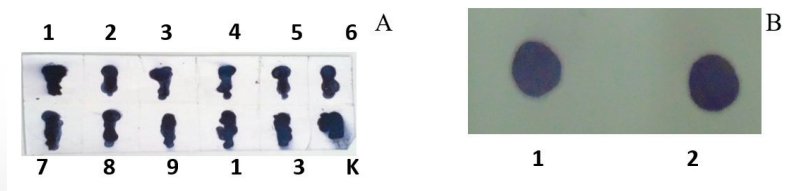


Sumber: Ningrum dkk. (2017); Herawati dkk. (2015)

**Gambar 5.6** Hasil Konstruksi Kerangka Baca Terbuka Penyandi Protein (A) Fusi dan (B) Nonfusi

Tahapan elektroporasi dilakukan dengan mengintroduksi vektor rekombinan ke dalam *P. pastoris*. Galur yang dipilih untuk digunakan adalah GS115, SMD1168, dan *Pichia pink*. Galur SMD1168 dan *P. pink* merupakan galur defisien protease yang telah dimodifikasi untuk mengurangi jenis protease yang dapat mendegradasi protein target. Seleksi dengan menggunakan marka zeocin dengan konsentrasi bertingkat (500, 1000, dan 2000 ug) dilakukan untuk memperoleh klon terpilih yang stabil. Selanjutnya, klon terpilih dianalisis lebih lanjut untuk membuktikan keberhasilan ekspresi. Analisis pendahuluan dilakukan dengan metode *dot blot*. Prinsip dari analisis tersebut adalah reaksi spesifik antara protein dengan antibodi monoklonal. Media yang mengandung protein diimobilisasi pada membran nitroselulosa dan antibodi monoklonal akan mengenali bagian spesifik dari protein HSA atau IFN $\alpha$ -2a yang disebut sebagai antigen. Ikatan antigen antibodi tersebut selanjutnya divisualisasi dengan menggunakan substrat. Analisis *dot blot* (Gambar 5.7) menunjukkan bahwa protein fusi dan nonfusi berhasil diproduksi dalam *P. pastoris*.

Karakterisasi protein selanjutnya ditujukan untuk mengetahui bobot molekul dan identitas protein. Metode SDS PAGE adalah metode elektroforesis protein yang didasarkan pada migrasi protein pada matriks berupa gel poliakrilamid. Bobot molekul diketahui berdasarkan persamaan jarak migrasi protein dengan marka protein berukuran tertentu. Selanjutnya, protein juga dapat dikarakterisasi lebih lanjut dengan metode *Western Blot*, yakni gel hasil elektroforesis



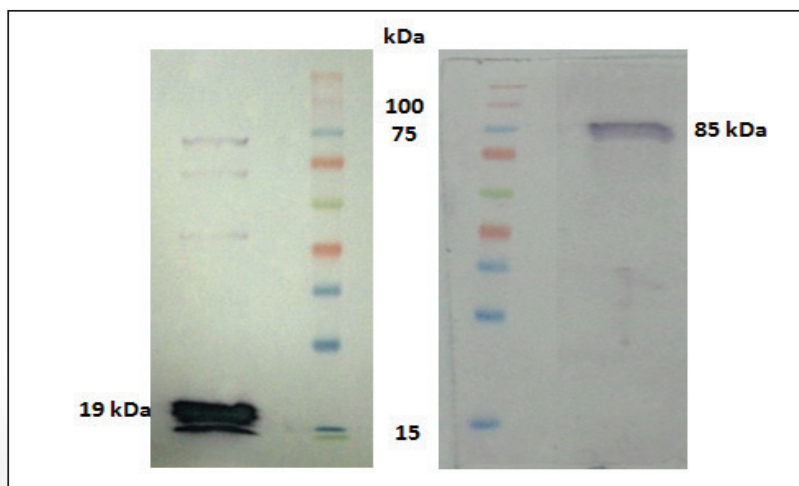
Ket.: A) Protein fusi, 1–9 berasal dari galur SMD1168 dan 1,3 berasal dari galur GS115; B) 1 dan 2 protein nonfusi, berasal dari galur GS115.

Sumber: Ningrum dkk. (2017a); Herawati dkk. (2015)

**Gambar 5.7** Analisis Ekspresi KBT dengan Metode Dot Blot

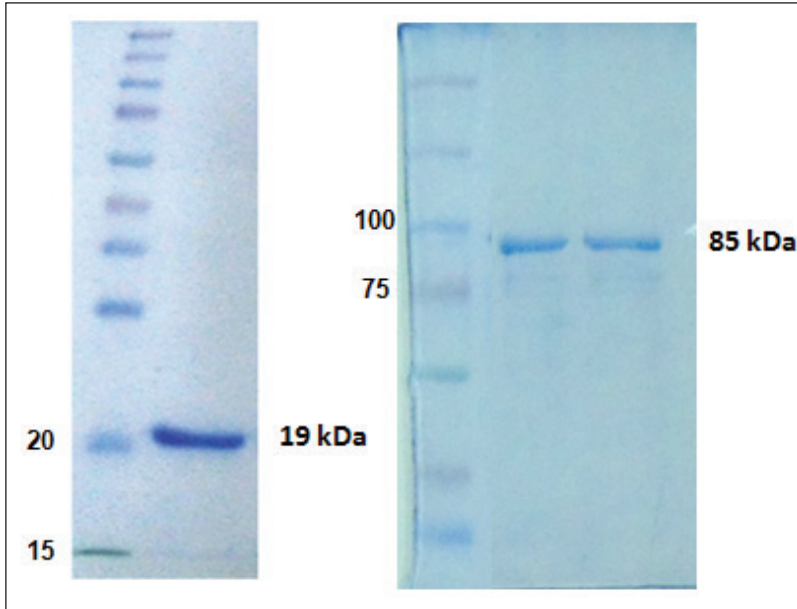
ditransfer ke dalam membran nitroselulosa dan divisualisasi seperti tahapan *Slot Blot*. Hasil karakterisasi bobot molekul dan identitas dengan metode *Western Blot* menunjukkan bahwa protein fusi berukuran 85 kDa dan protein nonfusi 19 kDa dan dikenali oleh antibodi monoklonal anti IFN $\alpha$ -2 (Gambar 5.8).

Protein fusi dan nonfusi kemudian dimurnikan dari pengotor menggunakan teknik kromatografi. Pengotor adalah protein-protein yang berasal dari media pertumbuhan maupun *P. pastoris*. Tahapan pemurnian merupakan tahap yang sangat penting dan diregulasi dengan ketat pada persyaratan produksi protein terapeutik. Pemurnian dilakukan menggunakan kolom berisi resin yang dapat mengikat protein HSA dan IFN. Penelitian ini menggunakan resin *capto blue* (GE Healthcare) dengan dapar fosfat yang mengandung NaCl 300 mM sebagai pengelusi. Hasil pemurnian menunjukkan kemurnian protein yang baik pada protein fusi maupun nonfusi, yakni hanya ada satu pita protein dominan tanpa pita-pita protein lain sebagai pengotor seperti terlihat pada Gambar 5.9.



Sumber: Ningrum dkk. (2017a) ; Herawati dkk. (2015)

**Gambar 5.8** Karakterisasi Bobot Molekul dan Identitas dengan Metode Western Blot



Sumber: Ningrum dkk. (2017a)

**Gambar 5.9** Hasil Purifikasi Protein Nonfusi dan Fusi

Karakterisasi yang sangat penting adalah penentuan urutan asam amino penyusun protein. Metode yang dapat dilakukan adalah spektrometri massa MALDI TOF/TOF atau LCMS/MS2 yang dapat memberikan informasi urutan asam amino dengan orientasi pembacaan dari ujung N ke ujung C. Hasil yang diperoleh pada identifikasi protein fusi menunjukkan bahwa terdapat 10 fragmen yang teridentifikasi yang terdiri atas 3 fragmen IFN $\alpha$ -2a dan 7 fragmen HSA. Fragmen tersebut meliputi 150 residu asam amino dari 750 total asam amino sehingga residu yang terbaca adalah 20%. Hasil ini mengindikasikan dengan kuat bahwa protein yang dihasilkan sesuai identitasnya, yakni protein hIFN $\alpha$ 2a yang difusi dengan HSA (Gambar 5.10). Hasil karakterisasi urutan asam amino protein non-fusi menunjukkan 3 fragmen yang terbaca meliputi 36 asam amino dari total 165 asam amino. Jumlah residu yang terbaca adalah 22% (Ningrum dkk., 2017b; Herawati dkk., 2015).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI A  
 QQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGGVGTETPLMKEDSILAVR  
 KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSKEDAHKSEVAHRFKDLG  
 EENFKALVLIIFAQYLQQCFEDHWKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC  
 TVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDPNPLRPLVRPEVDVMCTAFHONEETFL  
 KKYLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCECQAADKAACLLPKLDLIRDEGKASSAK  
 QRLKCASLQKGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEV SKLVTDLTKVHTECCHGDLLCED  
 DRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADPLSAADEFVESKIDV  
 CKNYAEA KDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD  
 EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGS  
 KCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPFCFALEVDE  
 TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV  
 EKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL.

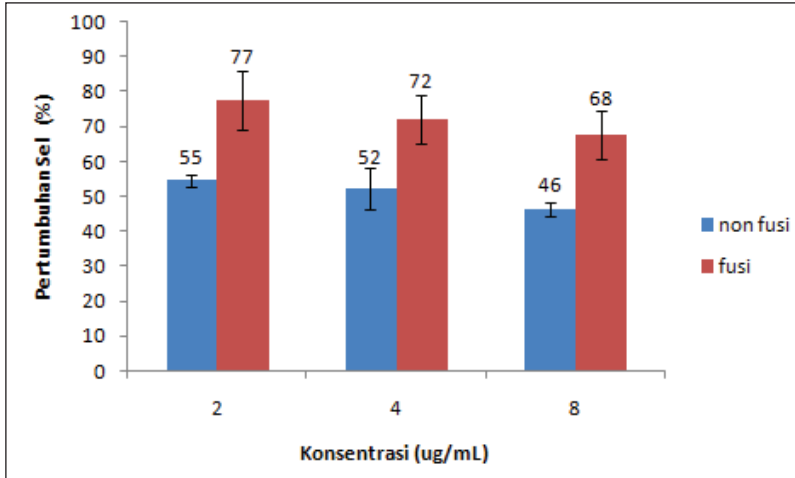
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV B  
 LHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGGVGTETPLM  
 KEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSK

Sumber: Ningrum dkk. (2017b); Herawati dkk. (2015)

**Gambar 5.10** Hasil penentuan urutan asam amino protein fusi (A) dan nonfusi (B). Fragmen merah menunjukkan fragmen yang terkarakterisasi

Uji aktivitas biologis protein fusi dan nonfusi dilakukan pada lini sel kanker payudara MCF-7 (Gambar 5.11). Sebagai antiproliferasi, protein diharapkan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker jika dibandingkan sel yang tidak mengalami perlakuan. Hasil uji memberikan informasi bahwa protein fusi dan nonfusi memiliki aktivitas antiproliferasi yang ditandai dengan penurunan pertumbuhan sel kanker. Pemberian protein fusi dan nonfusi yang dikombinasikan dengan tamoxifen selama 5 hari pada sel kanker, mampu menurunkan pertumbuhan sel sebanding dengan konsentrasi protein yang digunakan. Hasil ini juga memberikan informasi bahwa aktivitas protein fusi hanya berbeda sedikit dengan bentuk nonfusi (natif). Jika dibanding dengan pendekatan modifikasi protein lain (seperti pegilasi), protein yang dimodifikasi hanya memiliki aktivitas 7–28% saja dibandingkan bentuk natifnya. Hasil ini tentu sangat menggembirakan. Meskipun demikian, masih terlalu dini untuk menyatakan bahwa modifikasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Ket.: Pertumbuhan sel tanpa perlakuan adalah 100%.

Sumber: Ningrum dkk. (2017a)

**Gambar 5.11** Hasil uji aktivitas antiproliferasi protein fusi dan nonfusi pada lini sel kanker payudara MCF-7.

tidak menyebabkan penurunan aktivitas biologis yang besar karena masih diperlukan identifikasi lebih lanjut dengan flowsitometer.

Hasil yang telah diperoleh dalam kegiatan riset IFN $\alpha$ -2a akan terus dilengkapi dengan data-data yang diperlukan. Pengujian farmakokinetik dengan metode berbasis penandaan radioaktif sedang dilakukan. Untuk mencapai tahapan komersialisasi, tahapan pengujian yang dilalui masih cukup panjang dan masih diperlukan data-data uji praklinis dan uji klinis.

## G. Penutup

Potensi pengembangan riset IFN $\alpha$ -2a masih sangat besar. Riset-riset pendukung, seperti formulasi, perbaikan sifat protein, sistem penghantaran, dan teknologi produksi sangat diperlukan untuk memperoleh suatu produk generasi terbaru yang memenuhi persyaratan kualitas, khasiat dan keamanan. Indonesia sebagai negara berkembang mengalami ketertinggalan dalam hasil riset dan produk komersial



sehingga upaya untuk meningkatkan kapabilitas dalam menghasilkan produk dalam negeri harus terus dilakukan. Kerja sama antara pemerintah, akademisi, industri, dan komunitas menjadi kunci percepatan hasil riset IFN $\alpha$ -2a untuk dapat dikomersialisasikan dan dirasakan manfaatnya bagi pengguna.

## Daftar Pustaka

- Ascione, A., De Luca, M., Tartaglione, M. T., Lampasi, F., Di Costanzo, G. G., Lanza, A. G., & Leandro, G. (2010). Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis c virus infection. *Gastroenterology*, *138*(1), 116–122. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.005>
- Baron, E., & Narula, S. (1990). From cloning to a commercial realization: Human alpha interferon. *Critical Reviews in Biotechnology*, *10*(3), 179–190. <https://doi.org/10.3109/07388559009038206>
- Bazhanova, E. D. (2005). Participation of interferon-alpha in regulation of apoptosis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, *41*(2), 127–133. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0045-z>
- Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., & Zoon, K. C. (2010). Antiproliferative properties of type I and type II interferon. *Pharmaceuticals*, *3*, 994–1015. <https://doi.org/10.3390/ph3040994>
- Beldarraín, A., Cruz, Y., Cruz, O., Navarro, M., & Gil, M. (2001). Purification and conformational properties of a human interferon alpha2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *33*, 173–182. <https://doi.org/10.1042/BA20010001>
- Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2008). Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, *90*, 437–449. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.013>
- Cirelli, R., & Tyring, S. K. (1995). Major therapeutic uses of interferons. *Clinical Immunotherapeutics*, *3*(1), 27–87. <https://doi.org/10.1007/BF03259051>
- Commission B. P. (2009). *British pharmacopoeia 2009 (eBOOK)*. Stationery Office.
- Cozzio, A., Kempf, W., Schmid-Meyer, R., Gilliet, M., Michaelis, S., Schäfer, L., Dummer, R. (2006). Intra-lesional low-dose

Buku ini tidak diperjualbelikan.



- interferon  $\alpha$ 2a therapy for primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 47(5), 865–869. <https://doi.org/10.1080/10428190500399698>
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Dorr R. T. (1993). Interferon-alpha in malignant and viral diseases. A review. *Drugs*, 45(2), 177–211. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345020-00003>
- Dufour, P., Hussein, F., Dreyfus, B., Curé, H., Martin, C., Prevost, G., Olivier, J.-P., Dumas, F., Duclos, B., Olivarea, R., Lezler, A., Bergerat, J.-P., Audhuy, B., Thill, L., & Oberling, F. (1996). 5-Fluorouracil versus 5-fluorouracil plus -interferon as treatment of metastatic colorectal carcinoma. A randomized study. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology /ESMO*, 7, 575–579. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a010673>
- FDA. (2008). ROFERON®-A(Interferon alfa-2a, recombinant). <https://www.fda.gov/media/74384/download>
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F. L., Jr, Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., & Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 347(13), 975–982. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020047>
- Fischer, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 3–13. <https://doi.org/10.1002/bit.260410103>
- Gao, B., Hong, F., & Radaeva, S. (2004). Host factors and failure of interferon- $\alpha$  treatment in hepatitis C virus. *Hepatology*, 39(4), 880–890. <https://doi.org/10.1002/hep.20139>
- Grob, J. J., Dreno, B., de la Salmoniere, P., Delaunay, M., Cupissol, D., Guillot, B., Souteyrand, P., Sassolas, B., Cesarini, J.-P., Lionnet, S., Lok, C., Chastang, C., Bonerandi, J. J. (1998). Randomised trial of interferon  $\alpha$ -2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases.

*The Lancet*, 351(9120), 1905–1910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12445-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12445-X)

- Haria, M., & Benfield, P. (1995). Interferon-alpha-2a. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of viral hepatitis. *Drugs*, 50(5), 873–896. <https://doi.org/10.2165/00003495-199550050-00007>
- Herawati, N., Wardiana, A., & Ningrum, R. A. (2015). Expression of no affinity tagged recombinant human interferon alpha-2a in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annales Bogorienses*, 19(2), 57–62.
- Hermant, P., & Michiels, T. (2014). Interferon- $\lambda$  in the context of viral infections: Production, response, and therapeutic implications. *Journal of Innate Immunity*, 6(5), 563–574. <https://doi.org/10.1159/000360084>
- Jonasch, E., & Haluska, F. G. (2001). Interferon in oncological practice: Review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist*, 6, 34–55. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-1-34>
- InfoDATIN. (2017). Situasi Penyakit Hepatitis B di Indonesia Tahun 2007. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. <https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/Infodatin-situasi-penyakit-hepatitis-B-2018.pdf>
- Kallioliass, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2010). Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis Research and Therapy*, 12(SUPPL. 1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/ar2881>
- Kanwar, Y. S., Danesh, F. R., & Chugh, S. S. (2007). Contribution of proteoglycans towards the integrated functions of renal glomerular capillaries: a historical perspective. *The American Journal of Pathology*, 171(1), 9–13. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070356>
- Kemenkes. (2014). InfoDATIN: Situasi dan analisis hepatitis. *Pusat data dan Informasi* (8).
- Kemenkes. (2015). Situasi penyakit kanker. *Pusat Data dan Informasi*, 1, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7>
- Klaus, W., Gsell, B., Labhardt, A. M., Wipf, B., & Senn, H. (1997). The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *Journal of Molecular Biology*, 274(4), 661–675. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1396>

- Kontsek, P., & Kontseková, E. (1997). Forty years of interferon. *Acta Virologica*, 41(6), 349–353.
- Mohamed, N., & Redwan, E. (2014). Therapeutic alpha-interferons protein: Structure, production, and biosimilar. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 45. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907175>
- Neves, F. O., Ho, P. L., Raw, I., Pereira, C. A., Moreira, C., & Nascimento, A. L. T. O. (2004). *Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in Escherichia coli*, 35, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.02.005>
- Ningrum, R. A., Retnoningrum, D. S., Cahyati, Y., & Rachmawati, H. (2011). Optimization of human interferon  $\alpha 2b$  soluble protein overproduction and primary recovery of its inclusion bodies. *Microbiology Indonesia*, 5(1), 27–32. <https://doi.org/10.5454/mi.5.1.5>
- Ningrum, R. A., Rahmatika, D. E., Retnoningrum, D. S., Wangsaatmadja, A. H., Sumirtapura, Y. C., & Rachmawati, H. (2012). Development of novel interferon alpha2b muteins and study the pharmacokinetic and biodistribution profiles in animal model. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 05, 104–112. <https://doi.org/10.4236/jbise.2012.53014>
- Ningrum, R. A. (2014). Human interferon alpha-2b: A therapeutic protein for cancer treatment. *Scientifica*, 2014, 970315. <https://doi.org/10.1155/2014/970315>
- Ningrum, R. A., Herawati, N., & Wardiana, A. (2017a). Development of higher molecular weight of recombinant human interferon alpha-2a by albumin fusion technology in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 7, 8. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.6.5.912>
- Ningrum, R. A., Santoso, A., & Herawati, N. (2017b). Overproduction, purification and characterization of human interferon alpha2a-human serum albumin fusion protein produced in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Physics: Conference Series*, 835(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/835/1/012013>
- Ningrum, R. A. (2018). Human interferon alpha2a as anti hepatitis B and C. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*, 6(4), 298–310. <https://doi.org/10.15416/ijcp.2017.6.4.298>
- Olsen, E. A., Rosen, S. T., Vollmer, R. T., Variakojis, D., Roenigk, H. H., Jr., Diab, N., & Zeffren, J. (1989). Interferon alfa-2a in the treatment

of cutaneous T cell lymphoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 20(3), 395–407. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70049-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70049-9)

- Menteri Kesehatan. (2017). Permenkes nomor 17 tahun 2017 tentang rencana aksi pengembangan industri farmasi dan ala kesehatan. <http://www.rsi-ibnusina.com/media/file/86073182620PERMENKES-RI-NO-17-TAHUN-2017-TENTANG-RENCANA-AKSI-PENGEMBANGAN-INDUSTRI-FARMASI-DAN-ALAT-KESEHATAN.pdf>.
- Pestka, S. (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20047–20051. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700004200>
- Pyrhönen, S. O. (2004). Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Scandinavian Journal of Surgery*, 93(2), 156–161.
- Reddy, K. R., Modi, M. W., & Pedder, S. (2002). Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 571–586. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00028-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00028-5)
- Ricketts, R. R., Hatley, R. M., Corden, B. J., Sabio, H., & Howell, C. G. (1994). Interferon-alpha-2a for the treatment of complex hemangiomas of infancy and childhood. *Annals of Surgery*, 219(6), 605–614. <https://doi.org/10.1097/0000658-199406000-00003>
- Rumi, M. G., Aghemo, A., Prati, G. M., D'Ambrosio, R., Donato, M. F., Soffredini, R., Ninno, E. D., Russo, A., & Colombo, M. (2010). Randomized study of peginterferon- $\alpha$ 2a plus ribavirin vs peginterferon- $\alpha$ 2b plus ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 138(1), 108–115. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.071>
- Samuel C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Skoko, N., Argamante, B., Grujičić, N. K., Tisminetzky, S. G., Glišin, V., & Ljubijankić, G. (2003). Expression and characterization of human interferon- $\beta$ 1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(3), 257. <https://doi.org/10.1042/ba20030065>
- Smith, J. W., 2nd, Longo, D. L., Urba, W. J., Clark, J. W., Watson, T., Beveridge, J., Conlon, K. C., Sznol, M., Creekmore, S. P., & Alvord,

- W. G. (1991). Prolonged, continuous treatment of hairy cell leukemia patients with recombinant interferon-alpha 2a. *Blood*, 78(7), 1664–1671.
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2010). Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 24(1), 9–21. <https://doi.org/10.2165/11530550-000000000-00000>
- Subramanian, G. M., Fiscella, M., Lamoué-smith, A., Zeuzem, S., & Mchutchison, J. G. (2007). Albinterferon  $\alpha$ -2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C. *Nature Biotechnology*, 25, 1411–1419. <https://doi.org/10.1038/nbt1364>
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, 12(6), 439–446. <https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439>
- Tryggvason, K., & Wartiovaara, J. (2005). How does the kidney filter plasma? *Physiology*, 20(2), 96–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2004>
- Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: Aiming at a moving target. *Immunity*, 25(3), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.008>
- Wang, Y., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., & Wyss, D. F. (2015). Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4), 547–570.
- Wardiana, A., & Ningrum, R. A. (2015). Roferon-A : a biologic product of human interferon alpha 2a. *Annales Bogorienses*, 19(2), 1–11.
- Zhao, H. L., Xue, C., Du, J. L., Ren, M., Xia, S., & Liu, Z. M. (2012). Balancing the pharmacokinetics and pharmacodynamics of interferon- $\alpha$ 2b and human serum albumin fusion protein by proteolytic or reductive cleavage increases its in vivo therapeutic efficacy. *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), 664–670. <https://doi.org/10.1021/mp200347q>
- Zhao, H. L., Xue, C., Wang, Y., Li, X. Y., Xiong, X. H., Yao, X. Q., & Liu, Z. M. (2007). Circumventing the heterogeneity and instability of human serum albumin-interferon- $\alpha$ 2b fusion protein by altering its orientation. *Journal of Biotechnology*, 131(3), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.04.016>



## BAB VI

# Tiga Dekade Human G-CSF dalam Dunia Medis: Perkembangan dan Manfaat

*Asrul Muhamad Fuad*

### A. Pendahuluan

Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor (disingkat hG-CSF atau G-CSF) adalah suatu molekul glikoprotein manusia (19–25 kDa) yang tergolong sebagai *cytokine* atau faktor pertumbuhan hematopoietik yang secara klinis banyak digunakan untuk memberikan efek *granulopoiesis* selama proses *myelosuppression* (Sivakumar dkk., 2015; Rapoport dkk., 1992; Welte dkk., 1996; Avalos, 1996; Nagata, 1986). Secara sederhana, dapat disampaikan bahwa hG-CSF meregulasikan produksi dan diferensiasi progenitor sel darah, khususnya produksi sel-sel granulosit neutrofilik, serta pembentukan dan aktivasi sel-sel darah putih (neutrofil). Protein ini diproduksi oleh sel makrofaga yang teraktivasi, sel endotelial, dan fibroblast. G-CSF telah banyak digunakan secara klinis untuk pengobatan pasien terindikasi neutropenia akibat kemoterapi kanker. Molekul aktif dari hG-CSF rekombinan dikenal dalam beberapa nama, seperti filgrastim, pegfilgrastim, atau lenograstim. Bila Anda melakukan pencarian singkat di situs PubMed, misalnya, hasilnya tidak ada satu pun artikel berbicara tentang hG-CSF atau G-CSF pada tahun 1953, atau bahkan sebelum tahun 1970. Mulai tahun 1971 sampai dengan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



April 2018, pencarian singkat pada situs PubMed memberikan 40.615 entri artikel bertanda 'G-CSF', 2.520 artikel bertanda 'filgrastim', 691 artikel bertanda 'pegfilgrastim', 383 artikel bertanda 'lenograstim', dan 169 artikel bertanda 'biosimilar filgrastim'. Penelitian tentang faktor pertumbuhan sel (*colony stimulating factor*) sendiri baru dimulai pada era tahun 1960-an. Selanjutnya, baru pada 1991, produk pertama faktor pertumbuhan tersebut, yakni hG-CSF rekombinan, diakui manfaatnya dalam dunia medis dan mulai digunakan secara klinis (US Patent no. US5994518).

Setelah 65 tahun berlalu sejak publikasi Crick dan Watson pertama kali mengungkapkan struktur DNA, dan 27 tahun berlalu sejak pengakuan pertama kali filgrastim oleh Badan Keamanan Pangan dan Obat Amerika Serikat (US-FDA) pada 1991 untuk penggunaan obat tersebut terhadap pasien neutropenia yang terinduksi oleh kemoterapi. Sepanjang 27 tahun sejak pengakuan obat tersebut digunakan secara klinis, sudah tidak terhitung banyaknya jumlah pasien yang telah terbantu dan menerima manfaat yang sangat besar dengan administrasi hG-CSF rekombinan tersebut. Senyawa tersebut telah digunakan untuk pengobatan pasien dengan berbagai indikasi, seperti neutropenia yang terinduksi oleh kemoterapi; neutropenia kronis (*severe chronic neutropenia*); neutropenia karena penyakit; untuk mobilisasi sel punca darah tepi (*peripheral blood stem cells*) untuk tujuan transplantasi, baik *autologous* atau *allogeneic*; dan untuk memperbaiki kondisi sel-sel sumsum tulang belakang setelah proses transplantasi sumsum tulang belakang (sel punca). Senyawa tersebut juga telah dicoba digunakan untuk pengobatan infeksi, *diabetic foot ulcers*, *neonatal sepsis*, dan *pneumonia* (Molineux dkk., 2012).

Pada hampir semua kondisi tersebut, diketahui kemudian bahwa hG-CSF rekombinan mampu memperbaiki kondisi neutropenia pada pasien, meningkatkan kandungan neutrofil, mengurangi penggunaan antibiotik intravena, dan/atau mengurangi perlunya perawatan di rumah sakit atau mengurangi durasinya (Mollineux dkk., 2012). Oleh karena itu, rasa syukur dan apresiasi yang tinggi perlu kita sampaikan kepada para pionir dan peneliti yang telah meneliti dan



mengembangkan senyawa tersebut menjadi suatu produk yang benar-benar bermanfaat bagi kesehatan dan kemanusiaan secara luas. *Review* ini difokuskan pada sejarah dan perkembangan hG-CSF, khususnya rekombinan hG-CSF dalam berbagai bentuknya, serta perkembangan aplikasinya dalam pengobatan berbagai indikasi penyakit.

## **B. Sejarah dan Awal Mula Terkuaknya Potensi hG-CSF untuk Pengobatan**

Setidaknya lebih dari 50 tahun lalu telah diketahui adanya suatu faktor pertumbuhan spesifik yang mengatur proses pembentukan sel-sel darah (hematopoiesis) dalam tubuh kita, yang beraksi terhadap progenitor sel darah untuk menghasilkan berbagai jenis sel darah yang *mature* dan fungsional. Isolasi, purifikasi, dan kloning telah diupayakan dan menciptakan suatu kelas baru agen terapeutik, yang mencakup *colony-stimulating factors* (CSFs) dan *interleukins* (Welte dkk., 1996).

Pada era 1960-an, ada dua grup peneliti yang secara simultan mengembangkan metode untuk menumbuhkan koloni sel granulocytes dan monocytes dari sel sumsum (*bone marrow*) tikus atau sel *spleen* pada media agar semi-solid (Metcalf, 2010). Grup peneliti tersebut adalah Bradley dan Metcalf di Melbourne, Australia, dan grup lainnya (Ichikawa, Pluznik, dan Sachs) di Rehobot, Israel. Secara independen, mereka menemukan senyawa yang kemudian dikenal sebagai *colony-stimulating factors* (CSFs) (Dale, 1998; Metcalfe, 1990; Bradley & Metcalf, 1966; Ichikawa, 1966). Pertumbuhan koloni tersebut ternyata sangat tergantung pada adanya faktor pertumbuhan yang belum diketahui—saat itu disebut *colony-stimulating factors* (CSF). Para peneliti di Melbourne mencoba untuk menumbuhkan *murine lymphoid leukemia cells* (atau sel limfoid leukemia tikus) dengan cara menumbuhkannya dalam kultur agar di atas suatu lapisan *feeder* (*feeder layer*) yang mengandung berbagai tipe sel (Dale, 1998; Metcalf, 1990). Ketika sel-sel asal sumsum tulang belakang normal (*bone marrow cells*) digunakan dan diletakkan di bawah lapisan *feeder*, mereka terkejut karena mengamati bahwa koloni dari sel-sel

Buku ini tidak diperjualbelikan.

sumsum tulang tersebut tumbuh dan berkembang, terstimulasi oleh sesuatu yang terdifusi dari sebelah lain lapisan yang mengandung sel leukemia. Saat melanjutkan observasinya, mereka menemukan bahwa jaringan-jaringan dan lini sel yang lain juga dapat menstimulasi formasi koloni granulocyte-macrophage. Mereka menyebut substansi yang terdifusi tersebut sebagai *colony-stimulating factors* (CSFs).

Sementara itu di Israel, Sachs dkk. tertarik pada penelitian bagaimana regulasi dari klonal diferensiasi sel-sel darah terjadi (Sachs, 1990). Pada awalnya, mereka menggunakan sistem kultur cair, kemudian beralih ke sistem medium semi-solid yang mengandung agar untuk membuatnya lebih sederhana dan mudah untuk membedakan dan mengisolasi klon individual dari sel-sel tersebut. Hasil yang mereka peroleh identik dengan hasil yang didapat oleh grup Melbourne. Lapisan *feeder* original yang mereka gunakan adalah sel embrio tikus. Mereka menemukan bahwa bagian cairan atau supernatan dari kultur cair jenis sel-sel lain dapat menstimulasi terbentuknya koloni sel-sel hematopoietik. Mereka menyebut senyawa aktif tersebut sebagai *mashran-gm*. Nama tersebut (*mashran*) berasal dari bahasa Yahudi yang berarti *to send forth* atau “yang menjadikan”. Huruf ‘gm’ dimaksudkan sebagai granulocyte (g) dan macrophage (m). Selanjutnya, banyak nama telah diberikan kepada senyawa aktif yang menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel myeloid tersebut, tetapi *colony-stimulating factors* (CSFs) adalah nama yang lebih kita kenal sampai dengan saat ini (Metcalf, 1990; Sachs, 1990).

Jarak 20 tahun antara penemuan CSFs pertama kali dan ketersediaannya untuk studi klinis penuh dengan suka-cita maupun kekecewaan dari para investigator atau peneliti yang mencoba melakukan purifikasi dan karakterisasi molekul CSFs dan memahami pentingnya senyawa tersebut secara fisiologis. Dapat dibayangkan bahwa penelitian sejenis itu pada beberapa dekade lalu masih sangat sulit karena sumber yang digunakan adalah jaringan hewan dan cairan biologis yang hanya mengandung sedikit sekali senyawa dengan aktivitas menstimulasi koloni tersebut. Temuan bahwa kandungan molekul CSF meningkat seiring dengan peningkatan jumlah neutrofil

karena adanya infeksi atau setelah terekspos oleh endotoksin, menunjukkan adanya suatu fungsi dari CSF tersebut yang langsung mengatur produksi neutrofil dan pemanfaatannya (Metcalf, 1990; Foster dkk., 1968 ; Metcalf dkk., 1969; Metcalf, 1987) .

Pada akhir 1970-an sampai dengan pertengahan 1980-an, segala upaya identifikasi dan purifikasi molekul CSF telah dilakukan sehingga membuat banyak laboratorium sibuk. Grup peneliti yang menjadi pionir purifikasi G-CSF adalah Nick Nicola dan Donald Metcalf di Melbourne, Australia, pada 1983; dan Erich Platzer dan Welte di New York pada 1983/1984. Nicola dan Metcalf melakukan purifikasi murine G-CSF, sedangkan Platzer dan Welte melakukan purifikasi human G-CSF dari sel human bladder carcinoma lini sel 5637 (Nicola dkk., 1983; Welte dkk., 1985).

Hasil penelitian menemukan fakta yang mencengangkan bahwa terdapat setidaknya empat jenis CSF dengan karakter biokimia berbeda, dan masing-masing memiliki aktivitas stimulasi koloni yang berbeda pula. Keempat jenis CSF tersebut diberi nama sesuai dengan jenis atau tipe koloni sel yang dipengaruhi, yaitu GM-CSF (menstimulasi koloni granulocyte dan macrophage); M-CSF (menstimulasi koloni macrophage); G-CSF (menstimulasi koloni granulocyte); dan Multi-CSF atau disebut interleukin-3 (IL-3) yang menstimulasi koloni sel-sel hematopoietic dalam lingkup yang luas (Metcalf, 2010).

Senyawa CSF yang pada awalnya dideteksi keberadaannya pada contoh air seni manusia telah terkarakterisasi sebagai suatu glikoprotein yang memiliki ukuran antara 50 sampai 70 kDa (Stanley dkk., 1975). Stanley & Heard (1977) juga menemukan adanya senyawa yang mirip pada media kultur lini sel fibroblas tikus, disebut L-cells. Senyawa ini menstimulasi pertumbuhan sel-sel monosit dan makrofag sehingga disebut *macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)*. Dari jaringan paru tikus yang diperlakukan dengan endotoksin, molekul CSF kedua yang menstimulasi terbentuknya koloni granulosit maupun makrofag berhasil diisolasi dan diberi nama *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*. CSF ketiga berhasil ditemukan

dari serum tikus yang diinfeksi dengan endotoksin dan diketahui menstimulasi terbentuknya koloni yang sebagian besar berupa sel neutrofil. Faktor ketiga ini disebut *granulocyte colony-stimulating factor* (**G-CSF**) (Nicola dkk., 1983). Molekul ini tidak dapat dinetralisasi dengan antibodi anti M-CSF ataupun anti GM-CSF. Selanjutnya adalah CSF keempat yang ditemukan sebagai produk dari suatu lini-sel, yakni lini-sel WEHI-3. CSF ini disebut **Multi-CSF** karena mampu menstimulasi terbentuknya berbagai tipe sel hematopoietik atau sel darah (Cutler dkk., 1985). Multi-CSF ini juga dikenal sebagai *interleukin-3* (**IL-3**). Secara independen, molekul ini juga diketahui dapat menstimulasi sel *mast* dan T-limfosit (Dale, 1998).

Selanjutnya, antara tahun 1984 dan 1987, digunakannya metode biologi molekuler modern membuat penelitian melompat jauh ke depan dengan dilakukannya kloning cDNA (*complementary-DNA*), baik dari gen-gen CSF manusia maupun tikus (Metcalf, 2010). Selanjutnya, produksi protein secara heterologus dan pengujian aktivitas biologis dari protein-protein CSF rekombinan berlangsung dengan cepat. Protein CSF rekombinan diekspresikan pada berbagai sel inang, baik bakteri, *yeast* maupun sel mamalia, dan diujikan secara *in vitro* maupun *in vivo* begitu material tersebut tersedia dan berhasil dipurifikasi. Hasilnya menunjukkan bahwa CSF rekombinan tersebut memiliki sifat yang sama dengan protein *native*-nya (Metcalf, 1990).

Kloning gen *CSF3* dan purifikasi protein G-CSF rekombinan (disebut sebagai filgrastim) berlangsung antara tahun 1983 dan 1986 (Welte dkk., 1985; Platzer dkk., 1986; Souza dkk., 1986; Welte, 2012). Pengembangan filgrastim dimulai pada 1986, dan penggunaannya secara klinik untuk penderita kanker yang menjalani kemoterapi dimulai pada 1991, setelah filgrastim resmi disetujui oleh US-FDA sebagai agen pencegah neutropenia yang terinduksi oleh kemoterapi. Sementara itu, struktur molekul yang lebih detail dari protein rekombinan hG-CSF pertama kali berhasil dielusidasi oleh Hill dkk. pada 1993. Struktur molekul hG-CSF memiliki kemiripan dengan struktur IL-3 (interleukin 3). Struktur hG-CSF dalam diagram pita ditampilkan pada Gambar 6.1 (Hill, 1993). Ada 4 domain  $\alpha$ -helix



Ket.: Gambar dibuat dengan program MOLSCRIPT. Struktur sekunder dibuat menggunakan DSSP.

Sumber: Hill dkk. (1993)

**Gambar 6.1** Diagram Pita dari Struktur Protein hG-CSF

utama, yaitu A (residu 11–39), B (71–91), C (100–123), dan D (143–172) diberi label dekat ujung N-nya masing-masing. Dua domain  $\alpha$ -helix lain yang lebih pendek juga ditampilkan, yaitu  $\alpha_{10}$  (residu 44–47) dan  $\alpha_L$  (residu 48–53). Sementara residu 93–95 membentuk *turn* antara helix B dan C. Perkiraan posisi dari residu 65–70 dan 127–136 ditandai dengan garis tipis untuk menunjukkan konektivitas antardomain.

### C. Antara hG-CSF dan Sel Darah Putih: Hematopoiesis

*Granulocyte-colony stimulating factor* atau dikenal sebagai G-CSF adalah faktor pertumbuhan sel-sel darah (*hematopoietic growth factor*). Molekul ini diproduksi oleh sejumlah sel dan jaringan untuk

menstimulasi sel-sel pada sumsum tulang belakang (*bone marrow*) untuk menghasilkan granulosit dan sel punca hematopoietik (HSC, *hematopoietic stem cells*). Selanjutnya, sel tersebut dilepas ke dalam jaringan darah perifer (Adusumilli dkk., 2012; Metcalf, 1989). Protein ini diproduksi terutama oleh monocytes, macrophages, sel endotel, fibroblasts, astrocytes dan sejumlah sel imun lainnya. Selain itu beberapa sel carcinoma dan *myeloblastic leukemia* diketahui juga secara konstitutif memproduksi G-CSF.

Molekul ini diketahui menstimulasi *survival*, proliferasi, diferensiasi, dan pematangan fungsi dari sel-sel prekursor neutrofil (Tsuchiya dkk., 1986; Nicola & Metcalf, 1986 ; Welte dkk., 1987). G-CSF juga terlibat dalam regulasi beberapa jalur transduksi sinyal, seperti JAK, STAT, MAPK, P13K, dan Akt (Schabitz dkk., 2003; Metcalf, 1989; Nagata dkk., 1986). Selama hampir 20 tahun terakhir telah mulai dipahami fungsi biologis dari molekul ini dalam produksi dan aktivasi sel-sel darah (Burgess, 1985; Burgess & Nikola, 1983a, b; Arai dkk., 1986). Telah dibuktikan bahwa beberapa molekul, seperti G-CSF, berperan sangat penting dalam granulopoiesis, yakni menstimulasi *bone marrow* untuk menghasilkan lebih banyak sel darah putih dan meningkatkan kandungan neutrofil dalam sirkulasi. Jadi, fungsi G-CSF tersebut telah dimanfaatkan sebagai cara baru untuk terapi kanker (Cesaro dkk., 2003) untuk mengatasi infeksi yang mengancam jiwa dan regenerasi jaringan. Pemulihan dan penguatan sel-sel darah dalam sirkulasi merupakan suatu paradigma baru dalam teknik *molecular medicine* (Adusumilli dkk., 2012).

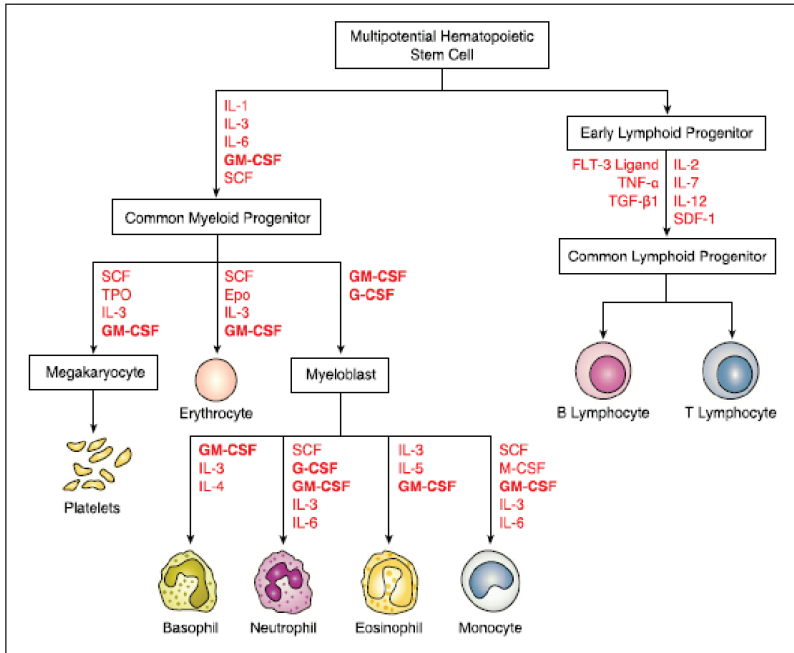
Gen *CSF3* (*colony stimulating factor-3*) yang menyandi protein G-CSF manusia telah berhasil diisolasi pada 1986 dan urutan asam amino penyusun proteinnya telah diseku. Klon cDNA dari hG-CSF telah berhasil diisolasi dari pustaka cDNA lini sel *human squamous carcinoma* (Nagata dkk., 1986). Gen *CSF3* ini ditemukan pada kromosom 17, pada lokus 17q21-q22 (Kanda dkk., 1987; Simmer dkk., 1988; Twardy dkk., 1987). Dari hasil kloning cDNA, diketahui bahwa protein G-CSF disandi oleh suatu gen tunggal yang menghasilkan setidaknya 2 isoform atau 2 bentuk protein yang sedikit berbeda, yaitu



isoform-a yang terdiri atas 177 aa (GenBank akses no. NP\_000750) dan isoform-b yang lebih pendek terdiri atas 174 aa (GenBank akses no. NP\_757373), serta berat molekul sekitar 19.600 Da (Nagata dkk., 1986; Souza dkk., 1986). Kedua bentuk G-CSF tersebut memiliki 5 residu cystein, yaitu satu cystein bebas pada posisi ke-17 (cys17), dan 4 residu cystein lain yang membentuk 2 ikatan disulfida pada posisi cys36-cys42 dan cys64-cys74 (Wang dkk., 2005; Abolghasemi dkk., 2010). Kedua ikatan disulfida tersebut sangat menentukan aktivitas biologis dari G-CSF (Nagata, 1989; Faraji dkk., 2010). Molekul G-CSF ini terutama diproduksi oleh monocytes, macrophages, sel endothelial, fibroblast, astrocytes, dan sejumlah sel imun lainnya (Welte dkk., 1987; Demetri & Griffin, 1991; Wells & deVos, 1996). Beberapa jenis sel karsinoma dan sel *myeloblastic* leukemia diketahui memproduksi G-CSF secara terus-menerus (konstitutif).

Hematopoiesis merupakan suatu proses yang sangat dinamis yang disebabkan oleh berbagai faktor pertumbuhan (*multiple hematopoietic growth factors* dan *cytokines*). Proses ini bersifat proliferasif, hingga  $\sim 10^{10}$  sel per hari (Gambar 6.2). *Hematopoietic growth factors* bersifat multifungsi dan sangat penting untuk proliferasi, survival, dan diferensiasi sel punca hematopoietik (HSC), progenitor, dan sel-sel prekursor hingga sel terdiferensiasi dan menjadi tipe sel matang yang fungsional. *Colony-forming assay* dapat mengidentifikasi suatu sampel biologis yang mengandung cytokine (*crude supernatant*), kemudian cytokine murni, untuk mendorong terjadinya diferensiasi *multi-lineage* dan *single-lineage*. Setelah co-kultur selama 7–14 hari, koloni dari sel mononuklear yang berasal dari *mouse spleen* atau *bone marrow* diamati dalam medium semi-solid. Berdasarkan karakteristik masing-masing sel dari *single colony* (koloni tunggal) akan ditentukan tipe lini-sel (*lineages*) yang disebabkan oleh suatu cytokine. Granulocytes merupakan mayoritas sel yang dijumpai dalam sel darah putih (WBC) dalam sirkulasi darah manusia dan memiliki peran penting dalam proses imunitas *innate* maupun *adaptive* (Mehta dkk., 2015).





Ket.: Cytokine utama yang sangat menentukan proses diferensiasi dicetak tebal. Epo, erythropoietin; SCF, stem cell factor; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; TPO, thrombopoietin.

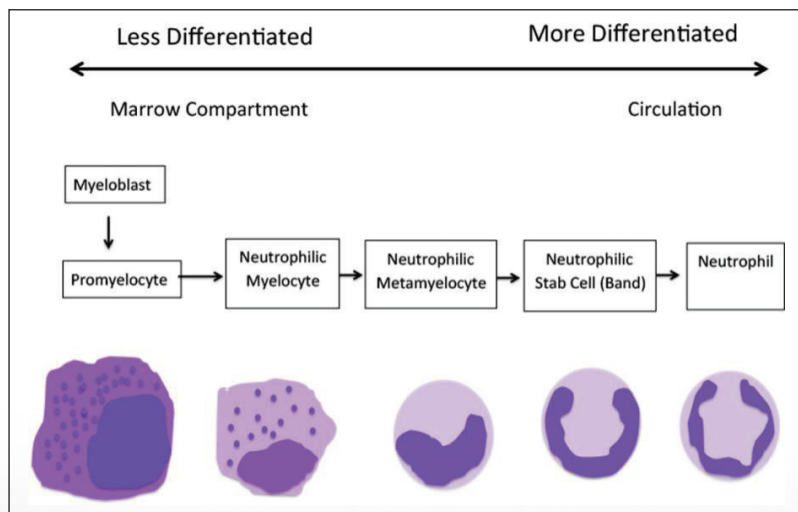
Sumber: Mehta dkk. (2015)

**Gambar 6.2** Diagram skematis proses hematopoiesis dari multipotensial HSC menjadi tipe sel yang sepenuhnya terdiferensiasi.

Dalam granulopoiesis, produksi granulocytes dimediasi oleh sejumlah faktor pertumbuhan, khususnya G-CSF dan GM-CSF (Kawamoto dkk., 2010; Theilgaard-Monch dkk., 2005). Karena pembelahan yang terjadi bersifat asimetris (*asymmetric division*), beberapa sel anakan (*daughter cells*) dari *hematopoietic stem cells* (HSC) akan tetap menjadi HSC sehingga mencegah berkurangnya jumlah *stem cells* tersebut (Morrison dkk., 2006). *Immunophenotyping* dengan multi parameter telah memungkinkan kita untuk dapat mengidentifikasi berbagai tipe sel berbeda dalam proses hematopoiesis (Mehta dkk., 2015). Sebagai contoh, *murine* HSC dapat dikarakterisasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.

sebagai  $lin^- sca1^+ c-kit^+$ , dan *human* HSC memiliki CD34 dalam absen *lineage markers*. Jalur diferensiasi dari HSC menjadi granulocyte tergantung pada adanya G-CSF, dan lebih sedikit pada GM-CSF. Sel HSC akan memberikan kesempatan pada peningkatan sel-sel progenitor myeloid dan progenitor lymphoid (Doulatov dkk., 2012). Sel-sel progenitor myeloid akan terdiferensiasi menjadi myeloblast, erythrocytes, dan megakaryocytes melalui setidaknya dua intermediates, yaitu sel progenitor granulocytes/monocytes dan sel progenitor erythrocytes/ megakaryocytes. Dalam seri granulocytic, myeloblasts (15-20  $\mu m$ ) merupakan sel yang pertama dapat dikenali karena bentuk cytoplasm, absen dari granule, dan inti sel yang tipis dengan nucleoli tampak jelas berkomitmen berdiferensiasi menjadi granulocytes. Myeloblast akan berdiferensiasi menjadi promyelocytes, dengan ukuran lebih besar (20  $\mu m$ ) dan mulai membentuk granule (Gambar 6.3).



Ket.: Selama maturasi neutrofil, yang dipengaruhi oleh G-CSF, sel granulocytic berubah bentuk, membentuk granule spesifik, dan mengalami kondensasi inti sel.

Sumber: Mehta dkk. (2015)

**Gambar 6.3** Tahapan granulopoiesis dari myeloblast menjadi mature granulocyte.

*Promyelocytes* akan berubah menjadi sel-sel prekursor neutrofilik, basofilik, dan eosinofilik. Perubahan sel berlanjut melalui tahapan *promyelocyte*. Granule spesifik yang mengandung protein terkait inflamasi muncul selama proses maturasi myelocyte. Untuk neutrofil, ukuran sel dan inti sel menjadi semakin memadat saat sel menjadi *mature* melalui *myelocyte*, *metamyelocyte*, *neutrophilic stab cell (band)*, dan bentuk akhirnya, yaitu neutrofil (*polymorphonuclear*, ~15  $\mu\text{m}$ ). Dalam kondisi stres, seperti infeksi, sel-sel band dapat dijumpai dalam darah peripheral, dan berguna sebagai pencegah inflamasi. Keseluruhan proses tersebut adalah proses yang kompleks, dinamis, dan dipengaruhi oleh multiple cytokine dan reseptornya masing-masing, terutama oleh G-CSF dan GM-CSF (Mehta dkk., 2015).

Dengan adanya stimulasi oleh suatu antigen (Ag) atau aktivasi oleh cytokines (seperti IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), macrophage, T-cells, endothelial cells, dan fibroblas akan memproduksi dan menyekresikan G-CSF dan GM-CSF. Beberapa jenis sel tumor diketahui juga memproduksi faktor pertumbuhan tersebut dengan fungsi yang masih belum diketahui. Glikoprotein G-CSF dan GM-CSF saat ini telah dapat diproduksi melalui teknologi DNA rekombinan pada *Escherichia coli* ataupun pada *yeast*. G-CSF menginduksi munculnya koloni granulocytes, sedangkan GM-CSF menginduksi munculnya dua macam sel sekaligus, yaitu granulocytes dan macrophages. Dengan membuat suatu galur tikus di mana gen reseptor G-CSF dimatikan (*G-CSFR-knockout mice*) terkonfirmasi bahwa G-CSF benar memicu granulopoiesis (Lieschke dkk., 1994). Reseptor G-CSF (G-CSFR) merupakan protein tunggal transmembran yang akan mengalami homo-dimerisasi saat G-CSF melekat pada reseptor (Mehta dkk., 2015).

#### **D. Dari Gen Menjadi Produk Terapeutik: Filgrastim**

Kloning *human* GM-CSF dan studi ekspresinya pada sel bakteri dan eukariot telah berhasil dilakukan pada 1985 di Genetics Institute (Wong dkk., 1985). Kloning *human* G-CSF dan studi ekspresinya di *E. coli* telah berhasil satu tahun kemudian di Amgen (Souza dkk., 1986). Dikomersialisasi oleh dua perusahaan *start-up* bioteknologi,

G-CSF dan GM-CSF membuat suatu revolusi pengobatan pasien yang mengalami *congenital* atau *acquired-neutropenia*, dan pasien yang menjalani transplantasi stem cells.

G-CSF telah disetujui oleh US-FDA untuk tujuan (1) menurunkan insiden infeksi pada pasien dengan non-myeloid malignancies yang menerima obat myelosuppressive antikanker yang berasosiasi dengan *severe neutropenia* dengan demam; (2) menurunkan waktu untuk pemulihan neutrofil dan durasi demam setelah induksi atau perlakuan kemoterapi pada pasien dengan *acute myeloid leukemia* (AML); (3) mengurangi durasi neutropenia dan *febrile neutropenia* pada pasien dengan non-*myeloid malignancies* yang menjalani proses *myeloablative* kemoterapi, dan diikuti dengan transplantasi *stem cells*; (4) memobilisasi sel-sel progenitor hematopoietik masuk ke dalam darah peripheral untuk dikoleksi dengan leukapheresis; dan (5) mereduksi insiden dan durasi komplikasi *severe neutropenia* pada pasien symptomatic dengan *congenital neutropenia*, *cyclic neutropenia*, atau *idiopathic neutropenia*. Beberapa bentuk G-CSF rekombinan yang tersedia, antara lain filgrastim, pegfilgrastim, dan lenograstim.

Dosis yang direkomendasikan untuk G-CSF adalah 5 µg/kg/h dan untuk GM-CSF adalah 250 µg/kg/h. Kedua jenis obat tersebut dapat diberikan secara subkutan (*s.c*) atau intra vena (*i.v*), meskipun uji klinis secara random menunjukkan bahwa efikasi yang lebih tinggi dicapai melalui jalur *s.c*. (Paul dkk., 2014). Untuk neutropenia yang terinduksi oleh kemoterapi, G-CSF diberikan hingga jumlah sel neutrofil mencapai >1.000 sel/µl. Untuk congenital neutropenia, target utama adalah menjaga agar jumlah sel neutrofil berada pada kisaran ~750 sel/µl (Mehta dkk., 2015). Pemberian G-CSF dapat ditoleransi dengan baik oleh tubuh. Sementara itu, pasien yang menerima GM-CSF umumnya terobservasi mengalami demam sementara dan pegal linu pada tulang. Efusi *pleural* dan atau *pericardial* juga mungkin dialami oleh pasien yang menerima GM-CSF. Efek samping jangka panjang dari penggunaan G-CSF, seperti osteopenia, dipelajari dan dimonitor pada pasien dengan *severe congenital neutropenia* (SCN). Salah satu kekhawatiran adalah bahwa G-CSF akan mempercepat transformasi SCN menjadi *myelodysplastic syndromes* (MDS) atau

Buku ini tidak diperjualbelikan.

*acute myeloid leukemia* (AML), yang berasosiasi dengan mutasi yang terjadi pada reseptor G-CSF (G-CSFR) (Mehta dkk., 2015).

## E. Penyakit terkait Sel Darah Putih: Kanker dan Neutropenia

Sejak tahun 1990, fungsi G-CSF dalam aplikasi klinis telah meluas, dari meningkatkan jumlah sel darah putih (WBC) dan melindungi tubuh dari potensi infeksi bakteri saat pasien menerima perlakuan kemoterapi dosis tinggi, sampai mendukung proses terapi radiasi dan transplantasi bone marrow (Adusumilli dkk., 2012). The American Society of Clinical Oncology (ASCO) dan beberapa organisasi profesional lain telah melakukan beberapa revisi buku petunjuk klinis untuk terapi kanker menggunakan *colony-stimulating factors* (CSFs) atau *hematopoietic growth factors*, seperti G-CSF (Ozer dkk., 2000). Hal ini karena G-CSF memengaruhi proliferasi, diferensiasi, dan maturasi neutrofil, serta meningkatkan laju pemulihan neutrofil saat kemoterapi berlangsung (Jones, 1996; Beveridge dkk., 1998).

The European Society of Medical Oncology (ESMO) dan the Infectious Diseases Society of America (IDSA) telah merekomendasikan antibiotik spektrum luas untuk penanganan segera neutropenia (Hughes dkk., 2002; Lyman, 2006). Neutropenia adalah *hematological disorder* yang dikarakterisasi dengan penurunan jumlah neutrofil secara tidak normal hingga mencapai kurang dari 500 sel/ $\mu\text{l}$  ( $0,5 \times 10^9$  sel/L) (Greil & Psenak, 2007). Kondisi seperti ini sangat berisiko terkena infeksi, yang umumnya terlihat pada *malignancies*, transplantasi *bone marrow*, *suppression*, kemoterapi, leukemia, *lymphoma*, *multiple myeloma*, dan *extensive myelosuppressive therapy* (Velasco, 2010). Jumlah neutrofil diasosiasikan dengan tingkatan tertentu neutropenia. Korelasi antara tingkat neutropenia terhadap jumlah sel neutrofil (ANC) ditunjukkan dalam Tabel 6.1.

G-CSF telah digunakan secara klinis untuk mengatasi *congenital*, *acquired*, dan *febrile* neutropenia sebelum atau selama *cytoreductive therapy* (Beekman & Touw, 2010). G-CSF digunakan untuk menurunkan insiden infeksi yang biasanya terjadi pada pasien *febrile*

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 6.1** Korelasi Tingkatan Neutropenia terhadap Jumlah Sel Neutrofil (ANC)

Neutropenia Grade	ANC
Grade 1	$\geq 1,5$ sampai dengan $< 2,0 \times 10^9$ sel/ml
Grade 2	$\geq 1,0$ sampai dengan $< 1,5 \times 10^9$ sel/ml
Grade 3	$\geq 0,5$ sampai dengan $< 1,0 \times 10^9$ sel/ml
Grade 4	$< 0,5 \times 10^9$ sel/ml

Sumber: Mehta dkk. (2015). (ANC: *absolute neutrophil count*)

neutropenia dengan non-myeloid *malignancies* dan menerima obat antikanker *myelosuppressive* yang berasosiasi dengan insiden *severe* neutropenia dan demam (Garcia-Carbonero dkk., 2001; Ozkaynak dkk., 2005). Dengan mengatur G-CSF, dosis kemoterapi pada pasien dapat dikurangi dengan tujuan mengurangi efek *myelosuppressive*. Namun, hal ini juga dapat mereduksi efektivitas klinis dari kemoterapi. Efek yang utama dari administrasi G-CSF adalah mengurangi waktu pemulihan neutrofil pada pasien yang sedang menjalani kemoterapi (Forrest dkk., 2002). Rata-rata waktu yang diperlukan untuk pemulihan neutrofil adalah 5 hari.

Dalam studi klinis, G-CSF biasanya diberikan untuk memperpendek waktu neutropenia akibat efek kemoterapi pada pasien dewasa yang menjalani pengobatan AML (*acute myeloid leukemia*), mobilisasi sel punca hematopoietik untuk *bone marrow transplantation* (BMT), dan untuk rekonstitusi myeloid dalam proses BMT (Disis, 2005). G-CSF juga telah digunakan dalam terapi kombinasi untuk pengobatan.

## F. Mekanisme Kerja G-CSF: Jalur Aksi (Pathway)

Molekul G-CSF diproduksi pada bone marrow sebagai respons terhadap stimulasi sel, kemudian akan melekat pada reseptor spesifik, yaitu reseptor G-CSF (G-CSFR), yang mengandung domain transmembran dan domain intraseluler transduksi sinyal. Saat ligan (G-CSF) melekat pada reseptornya, akan terjadi homo-dimerisasi reseptor. Reseptor G-CSF (G-CSFR) dijumpai pada beberapa sel,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



seperti sel progenitor hematopoietic, monocytes, platelets, neurons, endothelial (Demetri & Griffin, 1991; Hanazono dkk., 1990; Shimoda dkk., 1993; Morikawa dkk., 2002), dan sel *small-cell lung cancer* (Avalos, 1996; Bussolino dkk., 1989).

Aktivasi reseptor setelah pengikatan ligan (G-CSF) pada reseptornya diikuti dengan sinyal cascade, seperti jalur JAK (*janus kinase*), STAT (*signal transducer and transcription activator*), MAP (*mitogen activated protein kinase*), P13K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), Pkb (*protein kinase B*), dan Akt. Jalur sinyal (*pathway*) tersebut diketahui menginduksi proliferasi sel (Beekman dkk., 2012), proses anti-inflamasi dan proses anti-apoptosis (Tian dkk., 1994; Shimoda dkk., 1997; Hunter & Avalos, 1998; Dong & Larner, 2000; Ward dkk., 2000; Schneider dkk., 2005a dan 2005b). Jalur sinyal ini memiliki peranan dalam memobilisasi sel punca dan menargetkan ke lokasi yang mengalami perlukaan, khususnya di jaringan hati dan otak. Penelitian tersebut dapat menjadi petunjuk tentang potensi penggunaan G-CSF dalam transplantasi *bone marrow* (sumsum tulang belakang), penanganan *myocardial infarction* (Takano dkk., 2003; Kuethe dkk., 2004; Nienaber dkk., 2006; Ripa dkk., 2006; Suzuki dkk., 2006), dan *cerebral ischemia* (Schabitz dkk., 2007; Sanchez-Ramos dkk., 2008).

Selain itu, diketahui juga bahwa reseptor G-CSF (G-CSFR) terlibat dalam beberapa jenis malignancies (tumor) yang disebabkan oleh adanya mutasi yang terjadi pada reseptor tersebut. Hal tersebut menimbulkan dampak berupa implikasi klinis, seperti pada *severe congenital neutropenia* (SCN) (Germeshausen, 2008), *myelodysplastic syndrome* (MS), dan *acute myeloid leukemia* (AML) (Beel & Vandenberghe, 2009).

## **G. Prospek Penggunaan hG-CSF dan Derivatnya sebagai Agen Terapeutik: Beberapa Aplikasi Klinis**

Selain dari aplikasi klinis, G-CSF rekombinan yang telah disetujui oleh US-FDA ternyata juga menyimpan potensi klinis lain yang sebagian



masih dalam tahap investigasi. Pada bagian ini akan direkapitulasi kembali beberapa aplikasi klinis dari G-CSF dan potensi klinis lainnya yang masih belum semuanya terungkap dengan lengkap. Contoh aplikasi klinis dan potensi klinis dari G-CSF dirangkum dalam Tabel 6.2.

**Tabel 6.2** Beberapa Aplikasi Klinis dan Potensi Klinis dari Protein G-CSF

No.	Aplikasi klinis
1	G-CSF menstimulasi produksi sel darah putih (neutrofil) pada pasien kanker ( <i>non-myeloid malignancies</i> ) yang menjalani kemoterapi untuk mempercepat proses pemulihan dari neutropenia yang terinduksi oleh kemoterapi (Cesaro dkk., 2003; Moore, 1991).
2	G-CSF digunakan dalam pengobatan pasien <i>severe chronic neutropenia</i> yang menerima <i>myelosuppressive therapy</i> (Morstyn, 1989) dan transplantasi <i>bone marrow</i> (Faraji dkk., 2010). G-CSF yang digunakan dalam transplantasi <i>stem cells</i> atau <i>bone marrow</i> bertujuan meningkatkan jumlah HSC ( <i>hematopoietic stem cells</i> ).
3	G-CSF mengatur sistem imunitas tubuh sebagai pertahanan terhadap infeksi bakteri. G-CSF digunakan pada pasien yang menjalani kemoterapi yang menginduksi neutropenia dan mobilisasi HSC untuk transplantasi sebelum dimulai <i>myeloablative chemotherapy</i> . Kepada donor dari HSC diberikan G-CSF selama 5 hari sehingga sel-T menghasilkan lebih banyak IL-4 dan lebih sedikit IFN- $\alpha$ yang berasosiasi dengan risiko <i>acute</i> GVHD (Adu-sumilli dkk., 2012).
4	G-CSF juga berperan sebagai faktor neurotropik, yaitu menginduksi neurogenesis dan melawan proses apoptosis. Sifat ini dapat berperan dalam pengembangan metode pengobatan terhadap penyakit neurologik, seperti <i>cerebral ischemia</i> (Schneider, 2005; Takano, 2003).
5	G-CSF dapat menurunkan sitotoksitas dari aktivitas sel NK ( <i>natural killer cells</i> ) melalui reseptor cytokine dan jalur regulasi sinyal lain, seperti P13K/Akt dan ERK/MAPK, dan menurunkan sitotoksitas terkait ekspresi gen (Su, 2012). G-CSF yang dapat menetralkan sitotoksitas sel NK biasanya terlihat pada gejala <i>autoimmunity</i> dan <i>transplant rejections</i> (Weitz-Schmidt, 2009). Setelah administrasi dengan G-CSF selama 5 hari berturut-turut, jumlah sel WBC, CD34+, dan neutrofil secara signifikan meningkat dan akan meregulasi jejaring imunologis, aktivasi sel CD34+, lymphocytes dan granulocytes (Su, 2012).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

No.	Aplikasi klinis
6	G-CSF berperan dalam menginduksi mobilisasi HSC ( <i>hematopoietic stem cells</i> ) dari <i>bone marrow</i> ke dalam sirkulasi darah peripheral (Link, 2000; Vose, 2009).
7	G-CSF berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri, inflamasi dan proses perbaikan, serta mempertahankan keberlangsungan proses hematopoiesis ( <i>steady state hematopoiesis</i> ) (Lieschke dkk., 1994; Liu dkk., 1996; Anderlini & Champlin, 2008). Penelitian terbaru melaporkan bahwa G-CSF juga memiliki fungsi regenerasi dan perbaikan ( <i>repairing function</i> ) dalam terapi regenerasi <i>skeletal muscle</i> (Hara dkk., 2011) dan mereduksi kerusakan jaringan hati (Takayama, 2011)
8	Potensi lain dari G-CSF adalah protein ini diduga memiliki karakteristik khusus, seperti aktivitas anti tumor ( <i>tumoricidal activity</i> ), aktivitas faktor pertumbuhan sel blast, dan mengontrol <i>neuropathic pain</i> (Ro dkk., 2009). <i>Neuropathic pain</i> disebabkan luka atau penyakit yang melibatkan <i>soma-tosensory nervous system</i> (sistem saraf sensorik).

Sumber: Adusumilli dkk. (2012)

## H. Pengembangan G-CSF Rekombinan Menjadi Kandidat Produk Biosimilar: Contoh di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI

Lebih dari 20 tahun setelah registrasi oleh US-FDA, produk biosimilar hG-CSF telah banyak dikembangkan (Mellstedt dkk., 2008). Amgen telah kehilangan hak proteksi paten terhadap filgrastim pada 2008, setelah mengembangkan pasarnya hingga mencapai 4,5 miliar US\$. Agensi Kesehatan Uni Eropa (The EMA) telah menyetujui 8 produk biosimilar hG-CSF sampai dengan tahun 2016, yaitu Tevagrastim (2008), Ratiograstim (2008), Biograstim (2008), Filgrastim Hexal (2009), Zarzio (2009), Nivestim (2010), Grastofil (2013), dan Accofil (2014) (Zielinska & Bialik, 2016). Pada Februari 2015, Agensi Kesehatan Amerika Serikat (The US-FDA) akhirnya menyetujui produk biosimilar hG-CSF yang pertama, yaitu Filgrastim-sndz (Sandoz), di Amerika Serikat sejak diberlakukannya *the Biologics Price Competition and Innovation Act*. Sementara itu, produk lainnya, Tbo-Filgrastim (Teva), telah disetujui di Amerika Serikat pada 2012 sebelum legislasi tersebut berlaku (Mehta dkk., 2015).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Obat-obat tersebut telah menunjukkan kemiripan yang tinggi dalam hal karakterisasi molekular, kemurnian, stabilitas, farmakokinetik, farmakodinamik, efikasi klinis, *tolerability*, dan *safety* seperti produk original (Smith dkk., 2006). Analisis harga menyimpulkan bahwa penggunaan biosimilar filgrastim dan beberapa antibodi, seperti bevacizumab, trastuzumab dan rituximab, dapat menghemat biaya pengeluaran pasien hingga mencapai 44,2 miliar US\$ dalam 10 tahun ke depan (Sun dkk., 2015).

Karena biosimilar menunjukkan prospek yang sangat menjanjikan untuk dikembangkan ke depan bagi Indonesia, dalam beberapa tahun terakhir, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), khususnya Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, telah memulai pengembangan beberapa jenis produk terapeutik berbasis protein rekombinan, seperti human erythropoietin (hEPO), human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF), human interferon-alfa (hIFN- $\alpha$ ), dan human insulin (hINS) sebagai suatu produk biosimilar. Pengembangan hG-CSF rekombinan khususnya telah dirintis sejak tahun 2008.

Permasalahan utama dalam produksi protein heterolog pada sel inang di luar sel aslinya adalah tingkat ekspresi yang beragam dari gen rekombinan yang digunakan. Salah satu penyebabnya adalah perbedaan kodon preferensi antara sel inang dengan organisme dari mana gen tersebut berasal. Untuk meningkatkan ekspresi suatu gen heterolog pada organisme lain, diperlukan suatu modifikasi sekuen gen. Telah diketahui adanya perbedaan kodon yang signifikan antara gen-gen asal manusia dengan gen-gen pada ragi atau bakteri. Sebagai contoh, gen *CSF3*, yang menyandi protein hG-CSF natural pada manusia, memiliki perbedaan kodon preferensi yang cukup signifikan dengan sel ragi atau sel bakteri. Oleh karena itu, diperlukan suatu gen sintetik penyandi hG-CSF rekombinan yang dioptimasi yang mengandung kodon sel inang (*yeast* atau bakteri), agar protein rekombinan dapat terekspresi dengan baik. Dalam proses perakitan gen sintetik tidak diperlukan DNA “cetakan” ataupun sumber DNA dari suatu organisme, tetapi cukup dengan informasi sekuen asam-amino dari protein atau gen target. Melalui teknik bioinformatika dan program seperti DNAWorks, sekuen gen sintetik dapat dirancang

Buku ini tidak diperjualbelikan.

untuk tujuan tertentu. Program ini didukung oleh pangkalan data kodon berbagai organisme (Codon usage database, t.t.). Pada pangkalan data kodon tersebut, dijumpai semua informasi terkait kodon preferensi dan distribusi kodon pada berbagai organisme. Pada kegiatan pengembangan hG-CSF ini, kami telah merancang dan mengonstruksi sendiri dua varian gen *CSF3*-sintetik (disebut *CSF3syn*) yang dioptimasi dengan kodon preferensi *yeast P. pastoris* atau bakteri *E. coli*. Sekuen protein hG-CSF natural digunakan sebagai data masukan (input) untuk merancang sekuen gen sintetik tersebut (Tabel 6.3).

**Tabel 6.3** Sekuen Polipeptida hG-CSF (174 aa) atau met-hG-CSF (175 aa)

Sekuen polipeptida hG-CSF dan Met-hG-CSF
(M)TPLGPASSLPQSFLLKCLQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAP 60
LSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADEFATTIWQQ 120
MEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP 174

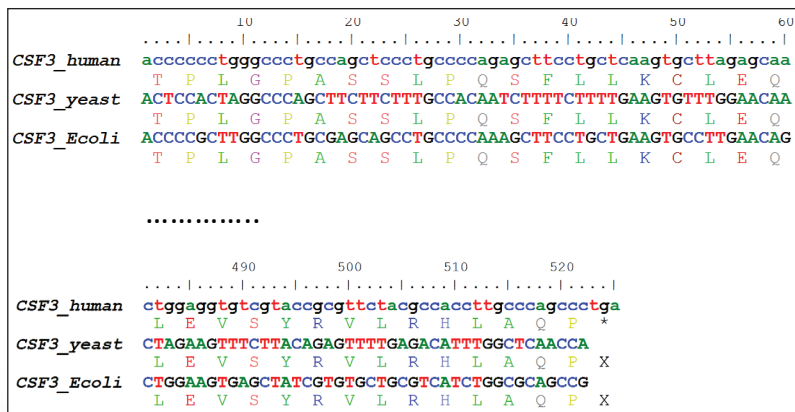
Ket.: digunakan sebagai input untuk desain gen sintetik *CSF3syn* dengan optimasi kodon *yeast* atau bakteri menggunakan program DNAWorks 3.1.

Sumber: Fuad dkk. (2010)

Salah satu parameter dalam rancang bangun gen sintetik adalah nilai CAI (*codon adaptation index*) antara 0 sampai dengan 1. Semakin tinggi nilai CAI suatu gen relatif terhadap sel inang yang digunakan, semakin tinggi tingkat ekspresinya pada sel inang tersebut. Gen *CSF3-human* (*CSF3\_hu*) memiliki CAI sebesar 0,55 pada sel *P. pastoris* dan 0,66 pada sel *E. coli*. Angka tersebut menunjukkan bahwa sekuen gen *CSF3-human* tidak terlalu baik bila digunakan untuk produksi protein rekombinannya pada sistem ekspresi *P. pastoris* ataupun *E. coli*. Oleh karena itu, kami melakukan rancang bangun gen *CSF3* sintetik yang dioptimasi dengan kodon preferensi *P. pastoris* (*CSF3syn\_ye*) atau *E. coli* (*CSF3syn\_ec*). Kedua gen tersebut memiliki nilai CAI sebesar 0,91 dan 0,86 masing-masing untuk sistem ekspresi *P. pastoris* dan *E. coli*. Peningkatan nilai CAI dalam beberapa laporan disebutkan dapat memengaruhi tingkat ekspresi gen tersebut pada sel inang secara signifikan (Puigbo dkk., 2008).

Selain itu, gen sintetik yang dikonstruksi juga mengubah kandungan basa G dan C (%GC), pada sekuen gen tersebut dari 65,71% pada *CSF3\_hu* menjadi 43,67% pada *CSF3syn\_ye* (untuk *yeast*) atau 61,33% pada *CSF3syn\_ec* (untuk *E. coli*) (Fuad dkk., 2010). Jadi, secara umum, perubahan kodon preferensi akan mengubah nilai CAI maupun kandungan basa GC, tetapi tidak mengubah sama sekali urutan asam amino pada protein hG-CSF rekombinan yang dihasilkan.

Sekuen gen sintetik *CSF3syn* yang telah dikonstruksi tidak lagi 100% identik dengan gen naturalnya, yakni gen *CSF3\_human*. Sekuen gen sintetik dengan optimasi kodon *P. pastoris* (*CSF3\_yeast*) dan gen dengan kodon *E. coli* (*CSF3\_ecoli*) hanya memiliki kemiripan sekuen sebesar 69,3% dan 79,0% masing-masing terhadap sekuen gen natural *CSF3* (*CSF3\_human*). Meskipun demikian, sekuen protein yang disandi oleh kedua gen sintetik tersebut 100% identik dengan sekuen protein hG-CSF natural (Gambar 6.4).



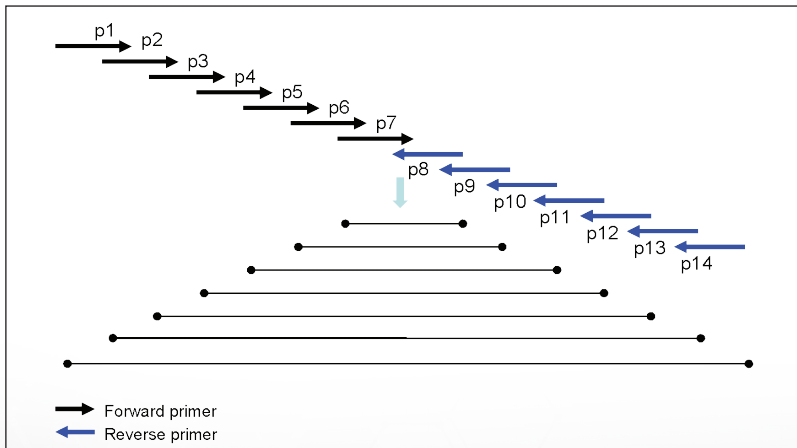
Ket.: Sekuen gen *CSF3\_yeast* dan *CSF3\_Ecoli* memiliki tingkat kemiripan sebesar 69,3% dan 79,0% masing-masing terhadap sekuen gen natural *CSF3\_human*.

Sumber: Fuad dkk. (2010)

**Gambar 6.4** Urutan nukleotida (parsial) dari gen sintetik *CSF3syn* dengan kodon *P. pastoris* (*CSF3\_yeast*) dan kodon *E. coli* (*CSF3\_Ecoli*) yang telah didesain dibandingkan gen natural *CSF3* manusia (*CSF3\_human*).

Selain untuk peningkatan ekspresi protein heterolog, pembuatan gen sintetik dalam kegiatan kami ini juga memiliki tujuan menghindari klaim berbagai paten yang terkait dengan produksi protein hG-CSF rekombinan dan latar belakang genetiknya. Banyak klaim dalam beberapa paten dibuat meliputi banyak hal, termasuk sumber genetik, vektor ekspresi, proses atau teknik, metode purifikasi, dan sebagainya. Dengan mendesain dan membuat gen secara sintetik, pelanggaran terhadap klaim suatu paten yang mungkin terjadi dapat dihindari (Fuad dkk., 2010).

Desain oligonukleotida dan konstruksi gen sintetik *CSF3syn* telah dilakukan, salah satunya menggunakan metode TBIO (*Thermodynamically Balanced Inside-Out*) (Fuad dkk., 2008; Gao dkk., 2003). Proses sintesis dan amplifikasi gen berlangsung secara konsektif dari bagian terdalam gen dan berlanjut ke bagian terluar dari gen. Prinsip metode TBIO dapat dilihat pada Gambar 6.5. Dalam metode TBIO digunakan 14 oligo-nukleotida yang terdiri atas dua kelompok oligo



Ket.: Sebanyak 14 untai oligonukleotida dalam konstruksi gen terbagi dalam dua kelompok, masing-masing 7 primer merupakan untai *sense* (P1~P7), dan 7 primer lain adalah untai *anti-sense* (P8~P14).

Sumber: Fuad dkk. (2008)

**Gambar 6.5** Sintesis Gen *CSF3* Sintetik (*CSF3syn*) dengan Metode TBIO

yang berbeda arah (arah untai *sense* dan untai *anti-sense*) (Tabel 6.4). Hasil dari konstruksi gen tersebut diperlihatkan pada Gambar 6.6.

Tampak pada Gambar 6.6 suatu proses konstruksi gen melalui amplifikasi dan pemanjangan fragmen DNA dengan teknik PCR (*polymerase chain reaction*) dari molekul primer DNA sepanjang 50~60 nukleotida menjadi satu gen sintetik yang utuh, berupa DNA untai ganda sepanjang sekitar 550 pasang basa (Gambar 6.6). Gen sintetik

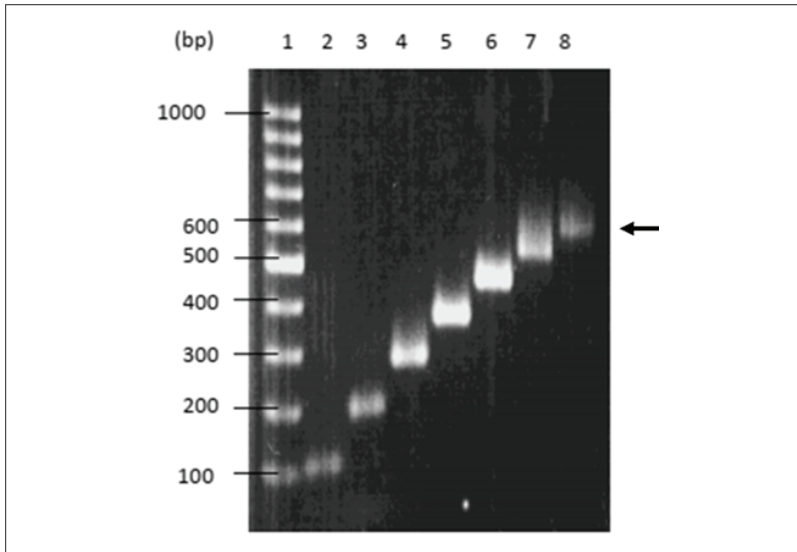
**Tabel 6.4** Daftar primer DNA berupa oligonukleotida untai tunggal yang digunakan untuk sintesis gen *CSF3syn* dengan metode TBIO.

No.	Sekuen oligonukleotida	nt
1	5' TCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCTACTCCACTAGGCC-CAGCTTCTTCTTTG . 3'	54
2	5' GGCCAGCTTCTTCTTTGCC- NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTGAACAAGTTAGAAAG . 3'	60
3	5' AGTGTGGGAACAAGTTAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGC- CTTGCAAGAAAAGTTGT . 3'	60
4	5' GCCTTGCAGGAAAAGTTGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATC- CAGAAGAATTGGTCTTG . 3'	60
5	5' TCATCCAGAAGAATTGGTCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- ATTCCATGGGCTCCATTGTC . 3'	60
6	5' TCCATGGGCTCCATTGTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- CAATTGGCTGGTTGTTTGTGTC . 3'	60
7	5' CAATTGGCTGGTTGTTTGTGTC- NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTCTGTACCAAGGATTGTTG . 3'	60
8	5' GTTGGTCCCAACTCTGGAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- ACAATCCTTGGTACAGAAAC . 3'	60
9	5' GTAGTAGCAAAATCAGCAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAA- GTTGGTCCCAACTCTGGA . 3'	60
10	5' CAGGAGCCATACCTAGTTCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAG- TAGCAAAATCAGCAACAT . 3'	60
11	5' GATGCAAAGGCTGGCATAGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAG- GAGCCATACCTAGTTCT . 3'	60
12	5' GAGAAGCAACCAAAACACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNT- GATGCAAAGGCTGGCATAG . 3'	60
13	5' CTCAAACCTCTGTAAGAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGA- GAAGCAACCAAAACACCA . 3'	60
14	5' ATGGTCTGACTGGTTGAGCCAAATGTCTCAAACCTCTGTAA- GAACTTCTA . 3'	50

Sumber: Fuad dkk. (2008)

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Ket.: 1: marka DNA; 2: P7/P8; 3: P6/P9; 4: P5/P10; 5: P4/P11; 6: P3/P12; 7: P2/P13; 8: P1/P14. Produk final dari gen *CSF3syn* sepanjang 558 nukleotida (nt) ditunjukkan dengan panah.

Sumber: Fuad dkk. (2008)

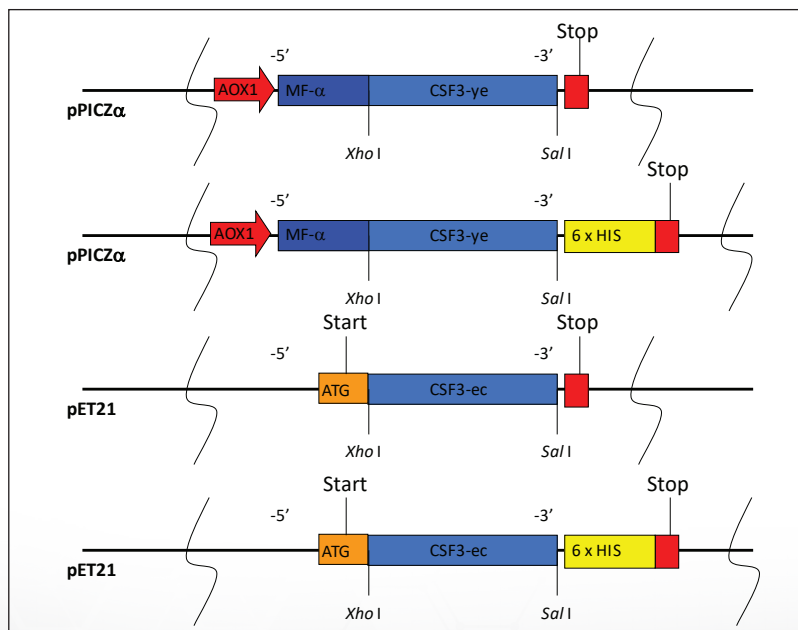
**Gambar 6.6** Analisis DNA dari produk PCR pada proses konstruksi gen *CSF3 sintetik* (*CSF3syn*) menggunakan metode TBIO.

*CSF3syn* menyandi protein yang sama dengan yang disandi oleh gen *CSF3-human*, yaitu protein hG-CSF (Tabel 6.3). Protein natural hG-CSF terdiri atas 174 gugus asam amino, sementara filgrastim yang merupakan protein hG-CSF rekombinan yang diproduksi pada *E. coli* mengandung gugus metionin tambahan pada ujung-N sehingga panjang total adalah 175 asam amino.

Selanjutnya, gen sintetik *CSF3syn* hasil rancang-bangun disubklon ke dalam plasmid pPICZα dan pET21 (atau pJ404), yang masing-masing merupakan vektor ekspresi protein rekombinan pada *yeast P. pastoris* dan bakteri *E. coli*. Pada masing-masing vektor dikonstruksi 2 varian vektor, yaitu vektor yang masih mengandung *protein-tag* (protein penanda) dan yang tidak mengandung *protein-tag* (Gambar

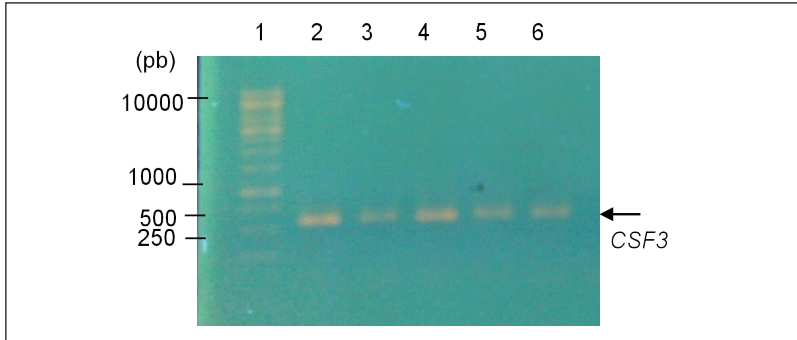
Buku ini tidak diperjualbelikan.

6.7). Terhadap masing-masing plasmid telah dilakukan karakterisasi dan analisis gen yang disisipkan dengan berbagai metode, termasuk metode PCR, analisis restriksi, dan analisis sekuensing DNA. Gambar 6.8 menunjukkan salah satu analisis yang digunakan untuk mengonfirmasi plasmid rekombinan yang dihasilkan. Untuk ekspresi protein hG-CSF rekombinan pada sel inang *yeast*, plasmid pPICZ $\alpha$ -CSF3syn(ye) ditransformasi ke dalam sel *P. pastoris* SMD1168H dan selanjutnya diseleksi pada medium seleksi (Gambar 6.9.A). Demikian pula dengan plasmid pET21-CSF3syn(ec) ditransformasi ke dalam sel *E. coli* BL21(DE3) sebagai inang dan diseleksi pada medium seleksi (Gambar 6.9.B).



Sumber: Fuad dkk. (2008)

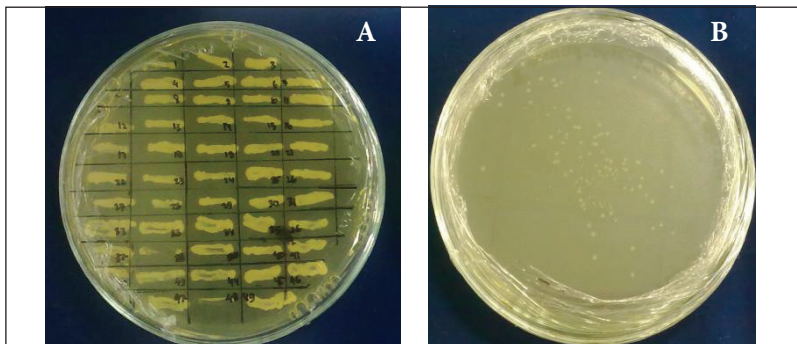
**Gambar 6.7** Beberapa Konstruksi Plasmid Ekspresi Gen CSF3syn Penyandi hG-CSF Rekombinan untuk Ekspresi pada Sel Inang *P. pastoris* (pPICZ $\alpha$ ) maupun sel *E. coli* (pET21) dengan atau tanpa Protein-tag



Ket.: Gen target dideteksi dengan pasangan primer CSF3-Forward dan CSF3-Reverse yang spesifik mengenali gen CSF3syn. 1: marka DNA; 2~6: plasmid pPICZa-CSF3syn klon #1 ~ #5.

Sumber: Fuad dkk. (2008)

**Gambar 6.8** Analisis DNA Sisipan pada Plasmid Rekombinan pPICZa-CSF3syn dengan Metode PCR



Ket.: (A) *P. pastoris* SMD1168H/pPICZa-CSF3syn yang berhasil diseleksi pada medium YPD dengan zeocin 1000 ug/ml. (B) *E. coli* BL21(DE3)/ pJ404-CSF3syn yang berhasil diseleksi pada medium LB agar dengan zeocin 25 ug/ml.

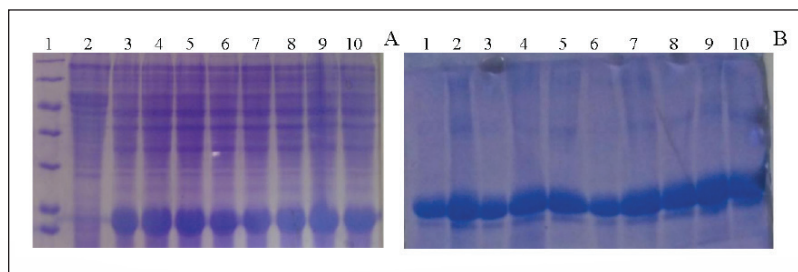
Sumber: Fuad dkk. (2010)

**Gambar 6.9** Beberapa klon transforman *P. pastoris* (A) dan *E. coli* (B) membawa gen penyandi hG-CSF rekombinan.

Selanjutnya, baik galur *yeast* maupun bakteri transforman, digunakan untuk ekspresi dan produksi hG-CSF rekombinan. Tampak

bahwa galur *yeast* dan bakteri transforman yang diperoleh mampu menghasilkan protein hG-CSF rekombinan yang diharapkan. Gambar 6.10 menunjukkan ekspresi protein hG-CSF rekombinan dari *yeast* dan bakteri. Tampak adanya pita protein dominan yang merupakan hG-CSF rekombinan.

Setelah gen sintetik *CSF3syn* berhasil diekspresikan dengan baik pada sel inang *yeast* maupun bakteri, dan protein hG-CSF rekombinan yang disandi oleh gen sintetik tersebut berhasil diproduksi, maka tahapan selanjutnya adalah karakterisasi, purifikasi, dan uji aktivitas biologis dari protein hG-CSF rekombinan yang dihasilkan. Beberapa analisis telah dilakukan terhadap protein hG-CSF rekombinan tersebut, yaitu SDS-PAGE, Native-PAGE, IEF (titik iso elektrik), kromatografi LC-MS/MS, dan spektrometri massa Maldi-TOF/TOF. Beberapa analisis protein yang dilakukan tersebut menunjukkan adanya kesesuaian antara protein rekombinan yang dihasilkan dengan produk referensi hG-CSF, seperti filgrastim. Hasil spektrometri massa dengan teknik Maldi-TOF/TOF dan kromatografi cair LC-MS/MS dengan jelas menunjukkan adanya fragmen-fragmen peptida yang identik dengan sekuen polipeptida dari hG-CSF atau



Ket.: (A) *P. pastoris* SMD1168H/GCSF galur #02: 1~10: beberapa klon *P. pastoris* transforman. (B) *E. coli* BL21(DE3)/GCSF: 1: marka protein; 2: *E. coli* transforman tidak diinduksi (kontrol negatif); 3~10: beberapa klon *E. coli* transforman yang diinduksi. Tanda panah menunjukkan pita protein hG-CSF rekombinan.

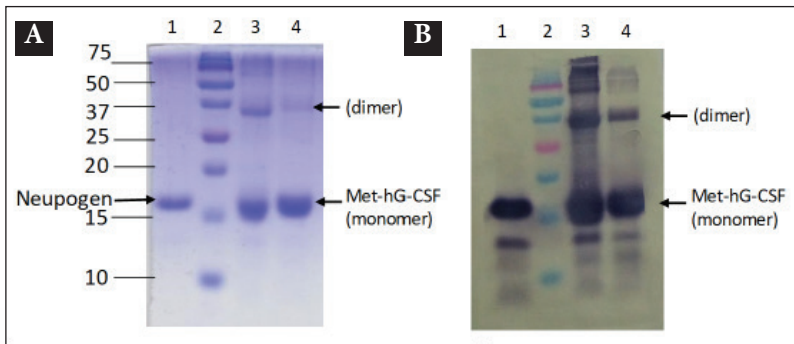
Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.10** Analisis SDS-PAGE dari hG-CSF rekombinan yang dihasilkan oleh *P. pastoris* (A) dan *E. coli* (B).

terhadap filgrastim. Kedua metode tersebut adalah metode terbaik yang ada saat ini untuk analisis “sidik jari” suatu protein (Lundby & Olsen, 2011).

Karena identifikasi protein yang dihasilkan sesuai dengan protein yang diharapkan, analisis *immunoblotting* terhadap protein tersebut juga dilakukan. Gambar 6.11 menunjukkan hasil analisis protein dengan metode *immunoblotting*, yaitu *western blot*, menggunakan antibodi spesifik terhadap hG-CSF. Neupogen (filgrastim) yang merupakan produk referensi digunakan sebagai pembanding. Tampak bahwa met-hG-CSF rekombinan yang dihasilkan menunjukkan kesesuaian dengan Neupogen, baik dari ukuran protein maupun profil *immunoblotting*. Hanya saja, met-hG-CSF rekombinan yang ditampilkan pada Gambar 6.11 belum dipurifikasi. Hal ini membuktikan bahwa *yeast* dan bakteri transforman yang kami buat telah berhasil memproduksi protein yang diinginkan.

Tahapan selanjutnya adalah pengujian aktivitas biologis dari protein rekombinan yang dihasilkan. Protein tersebut perlu dimurnikan



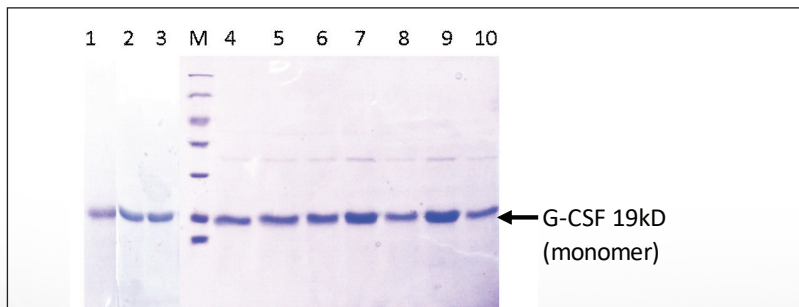
Ket.: Protein dihasilkan oleh *E. coli* BL21(DE3). 1: Filgrastim (Neupogen); 2: marka protein; 3: met-hGCSF (dalam bufer asetat 4.0); 4: met-hGCSF (dalam bufer Tris pH 8.0).

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.11** Analisis protein met-hGCSF rekombinan dengan metode SDS-PAGE (A) dan *western blot* (B) dengan pembanding produk referensi filgrastim (Neupogen).

terlebih dahulu agar bebas dari kontaminan, termasuk endotoksin, khususnya protein yang berasal dari *E. coli*. Purifikasi protein dilakukan menggunakan beberapa teknik kromatografi kolom. Gambar 6.12 menunjukkan kualitas protein hG-CSF rekombinan asal sel *E. coli* hasil dipurifikasi. Protein tersebut selanjutnya dikemas dalam larutan formula khusus yang dapat menjaga kestabilan protein rekombinan. Protein dikemas secara aseptik dalam vial kaca setelah konsentrasi protein dikuantifikasi dan diliofilisasi. Untuk pengujian aktivitas biologis, protein dalam vial tersebut diresuspensi kembali dengan larutan dekstrosa dan siap digunakan untuk pengujian secara *in vivo* (Gambar 6.13). Kandidat protein terapeutik hG-CSF rekombinan ini kami beri nama LIPI-Grastim. Pengujian aktivitas biologis secara *in vivo* dilakukan menggunakan hewan uji berupa tikus jantan galur SD (*Sprague Dawley*) berumur 2–3 bulan dengan berat badan antara 200 sampai 300 g. Pengujian dilaksanakan di Rumah Sakit Hewan IPB, Kampus Dramaga, Bogor, dan dilaksanakan selama 1 bulan.

Prosedur uji *in vivo* yang kami lakukan telah disetujui dan sertifikat dikeluarkan oleh Komite Etik Hewan Uji dari Institut Pertanian Bogor pada Oktober 2017 dengan surat izin AUCC No. 84-2017. Tikus jantan Spargue Dawley umur 2–3 bulan dengan berat



Ket.: M: marka protein; 1: filgrastim (kontrol); 2-10: hG-CSF hasil purifikasi dari beberapa batch produksi.

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.12** Protein (met)-hG-CSF rekombinan asal *E. coli* hasil purifikasi.





Ket.: Sediaan larutan hG-CSF asal *E. coli* (kiri) dan asal *P. pastoris* (kanan) dalam vial siap untuk pengujian bioaktivitas secara *in vivo*.

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.13** Preparasi Larutan hG-CSF Rekombinan dalam Larutan 5% (b/v) Dekstrosa.

200–300 gr (Biofarmaka, IPB) dipilih dan dikelompokkan dalam tujuh grup. Setiap grup terdiri atas enam ekor, mendapat perlakuan sebagai berikut. Grup 1 sebagai kontrol normal tidak mendapat perlakuan induksi dengan cyclophosphamide (Endoxan<sup>®</sup>) ataupun dengan rhG-CSF; Grup 2 sebagai kontrol negatif menerima 5% dextrose, secara subkutan (s.c.); Grup 3 sebagai kontrol positif mendapat Leukokine<sup>®</sup> 40 µg/kg BB, (s.c.); Grup 4, 5, dan 6 diberikan perlakuan dengan rhG-CSF (asal *E. coli*) 40, 80, dan 120 µg/kg BB, (s.c.); Grup 7 diberikan perlakuan dengan rhG-CSF (asal *P. pastoris*) 80 µg/kg BB, (s.c.); Dosis yang diberikan pada kontrol positif dihitung dari konversi dosis pada manusia ke tikus berdasarkan berat badan (Pratiwi dkk., 2020).

Desain eksperimen mengacu kepada Hattori dkk. (1990). Tikus pada grup 2–7 diinduksi dengan cyclophosphamide 100 mg/kg BB, intra peritoneal (i.p.), 24 jam setelah pengambilan sampel darah referensi (*baseline*) (H-1). Perlakuan pemberian rhG-CSF (s.c.) dilakukan 24 jam setelah induksi dengan cyclophosphamide, dan berlanjut selama 4 hari dengan pemberian satu kali per hari. Sampling darah (sekitar 0,5 ml) diambil dari vena pada bagian ekor pada H+1, H+4, dan 6 jam setelah perlakuan pada hari yang sama.

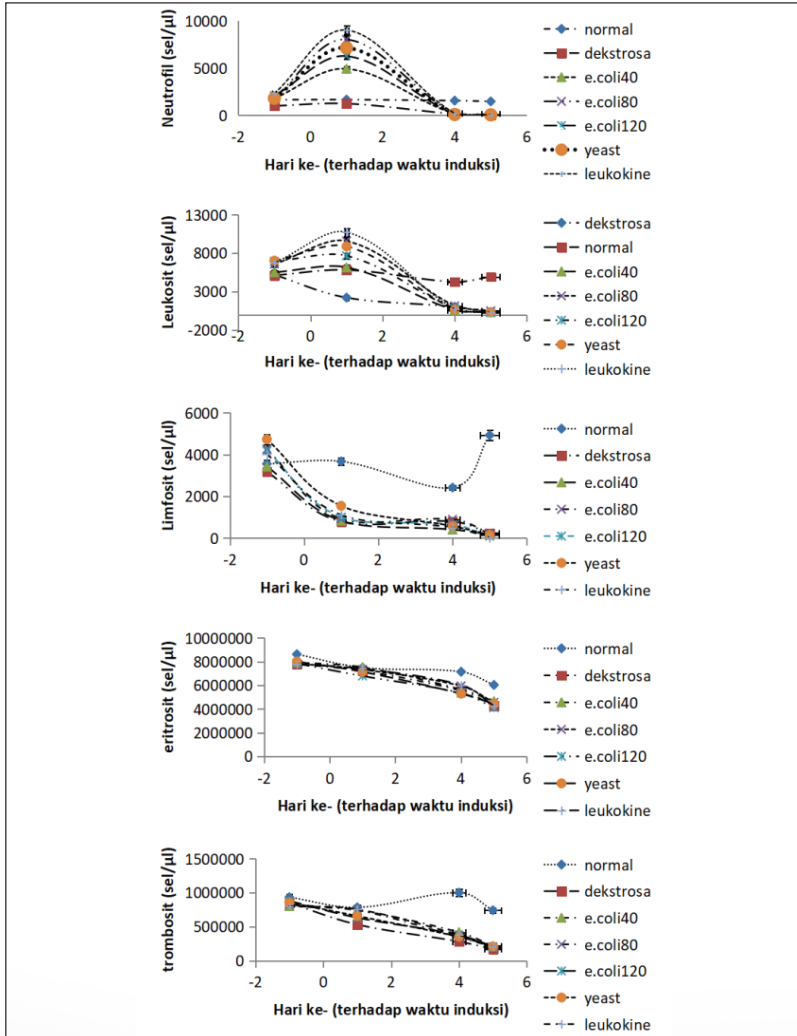
Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tikus disakarifikasi pada H+5 dengan injeksi ketamine (Kepro) dan xylazin (Interchemie) (75 mg/kg BB, 8 mg/kg BB, intramuscular (i.m.)). Selanjutnya, 2–3 ml darah diambil dari vena dekat jantung (Pratiwi dkk., 2020).

Hasil uji secara *in vivo* menunjukkan indikasi positif bahwa hG-CSF rekombinan yang kami hasilkan, baik dari bakteri maupun dari *yeast*, memiliki efek proliferasi terhadap sel neutrofil maupun leukosit setelah diinduksi dengan cyclophosphamide. Perubahan jumlah dari lima jenis sel darah diamati selama proses pengujian aktivitas biologis rhG-CSF secara *in vivo*, yaitu sel neutrofil, leukosit, limfosit, eritrosit, dan trombosit. Gambar 6.14 menampilkan profil perubahan jumlah sel-sel darah dari tikus normal (tanpa cyclophosphamide), kontrol negatif (dekstrosa), kontrol positif (leukokine) dan perlakuan dengan rhG-CSF. Tampak bahwa pada kelompok tikus yang mendapat perlakuan rhG-CSF maupun kontrol positif (leukokine) menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan dari jumlah neutrofil dan leukosit pada 24 jam pertama. Sementara itu, jenis sel lainnya tidak terdampak oleh efek dari rhG-CSF. Jumlah sel dari berbagai jenis sel darah tersebut cenderung turun akibat efek induksi dari cyclophosphamide yang berkelanjutan.

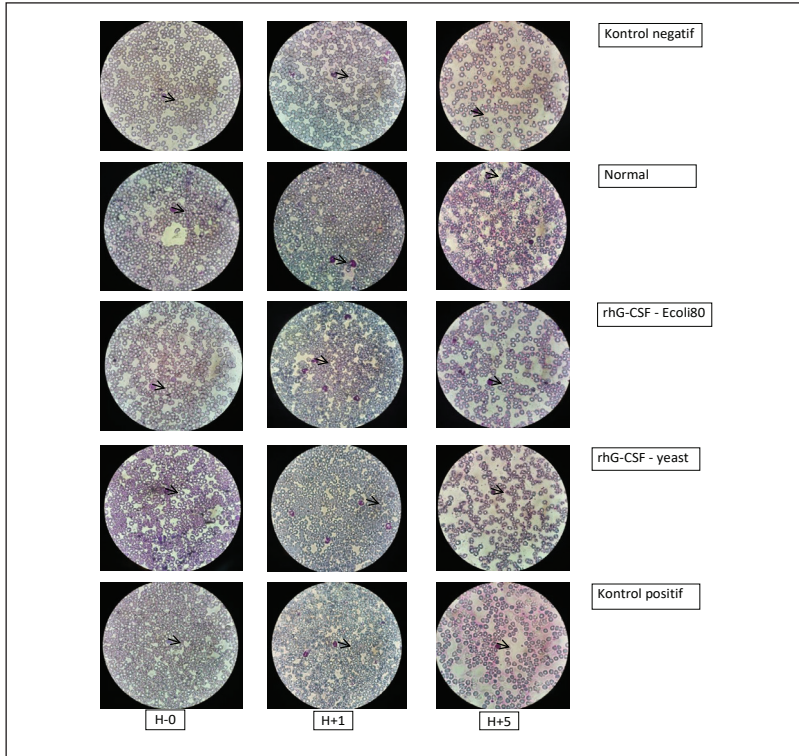
Gambar 6.15 menunjukkan visualisasi sel secara mikroskopis sampel usap darah tikus dari beberapa perlakuan. Tanda panah pada gambar menunjukkan sel-sel neutrofil yang tampilannya sangat berbeda dari sel lainnya dan terwarnai. Hasil uji awal bioaktivitas secara *in vivo* ini sangat menjanjikan dan memberikan kesan yang sangat positif bahwa protein rhG-CSF yang kami hasilkan menunjukkan aktivitas biologis seperti diharapkan. Kajian uji biologis lebih lanjut masih diperlukan untuk mempelajari berbagai hal lebih detail, seperti dosis yang lebih akurat, profil farmakokinetik dan farmakodinamik dari produk rekombinan tersebut. Gambar 6.16 menampilkan sebagian kegiatan yang kami lakukan selama melakukan uji secara *in vivo* di RSHP - IPB.



Ket.: Induksi dilakukan pada hari ke-0, titik (-1) menggambarkan jumlah neutrofil sebelum induksi, sedangkan titik 1, 4, dan 5 menggambarkan jumlah neutrofil/leukosit/limfosit/eritrosit/trombosit setelah mendapatkan hG-CSF.

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.14** Profil neutrofil (A), leukosit (B), limfosit (C), eritrosit (D), & trombosit (E) sebelum induksi (cyclophosphamide) dan setelah perlakuan dengan hG-CSF.



Ket.: Dari atas ke bawah: kelompok kontrol negatif, normal, hG-CSF *E. coli* 80µg/kg BB, hG-CSF *P. pastoris* 80µg/kg BB, dan kontrol positif (Leukokine®). Dari kiri ke kanan: pengamatan pada hari ke-0 (H-0); hari ke-1 (H+1); dan hari ke-5 (H+5). Tanda panah menunjukkan sel neutrofil.

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.15** Tampilan mikroskopik sediaan apus darah dengan pengecatan Giemsa, dengan mikroskop cahaya perbesaran 100x.



Ket.: (A) Kandang tikus selama perlakuan, 2 ekor per kandang; (B) Pemberian perlakuan dengan penyuntikan; (C) Persiapan pengambilan sampel darah; (D) Pengambilan sampel darah dari bagian ekor tikus; (E) Pembuatan apus darah pada slide mikroskop; (F) Persiapan untuk euthanasia; (G) Bedah dan pengambilan sampel darah dari jantung; (H) Tim penelitian hG-CSF: Dr. Asrul Muhamad Fuad, Dian Fitria Agustiyanti, M.Si., Yuliawati, M.Si., Riyona Desvy Pratiwi, Apt., M.Sc., Kartika Sari Dewi, M.Si., Aminah, S.E., dan dibantu oleh Drh. Tri Isyani Tunggadewi dari RSHP-IPB dan Drh. Nina Herlina dari Lab. Keswan Puslit Bioteknologi LIPI.

Sumber: Fuad dkk. (2017)

**Gambar 6.16** Beberapa foto dokumentasi kegiatan pengujian bioaktivitas secara *in vivo* di Rumah Sakit Hewan Pendidikan, IPB Bogor.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

### C. Penutup

Demikian yang dapat kami paparkan mengenai perkembangan dan manfaat dari human G-CSF dalam dunia medis dan perjalanan panjangnya lebih dari tiga dekade, serta program pengembangan produk biosimilar hG-CSF yang telah dimulai oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Secara ringkas perjalanan hG-CSF sebagai suatu produk terapeutik dimulai sejak ditemukannya faktor pertumbuhan tersebut pada 1966 dan diteliti hingga protein tersebut berhasil diisolasi pada 1983/1984 oleh dua grup penelitian, yaitu Metcalf dan Nicola serta Welte dan Platzer. Selanjutnya, sejarah mencatat bahwa gen faktor pertumbuhan tersebut berhasil diisolasi oleh Welte dkk. (1985), Platzer dkk. (1986), dan Souza dkk. (1986). Penemuan besar ini berhasil membuka jalan bagi aplikasi protein G-CSF lebih luas lagi, khususnya untuk aplikasi medis terkait neutropenia. Segera setelah itu, pada 1991, produk hG-CSF rekombinan pertama (filgrastim) mendapat persetujuan US-FDA untuk digunakan secara klinis. Penelitian mengenai protein ini masih terus berjalan, hingga struktur detail dari molekul hG-CSF berhasil dielusidasi pada 1993 oleh Hill dkk. Sejarah kemudian mencatat bahwa akhirnya pada 2008 produk pertama biosimilar dari filgrastim berhasil diterima oleh masyarakat Uni Eropa dan disetujui oleh EMEA untuk dapat dimanfaatkan secara luas oleh masyarakat, khususnya di pasar Uni Eropa. Dengan tekanan yang demikian tinggi, pada 2012 dan 2015 produk biosimilar berhasil menembus pasar Amerika Serikat setelah produk pertama biosimilar filgrastim diakui oleh US-FDA. Hingga tahun 2016 tercatat sedikitnya 8 produk biosimilar dari filgrastim yang telah diakui di pasar Uni Eropa dan Amerika Serikat.

Indonesia dengan jumlah populasi termasuk yang terbanyak di dunia, merupakan potensi pasar yang sangat tinggi untuk produk obat, khususnya produk protein terapeutik dan produk biosimilar. Indonesia perlu mandiri dalam memenuhi kebutuhan akan produk tersebut agar memiliki ketahanan di bidang kesehatan. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, dalam hal ini Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, telah ikut ambil bagian dalam proses pengembangan produk

Buku ini tidak diperjualbelikan.



terapeutik, seperti produk biosimilar dari hG-CSF. Prototipe produk dari hG-CSF rekombinan telah berhasil dibuat dan disintesis. Walaupun demikian, perbaikan-perbaikan masih perlu terus dilakukan agar produk tersebut dapat memenuhi standar kualifikasi yang diperlukan. LIPI adalah lembaga penelitian yang memiliki ruang lingkup terbatas dan memerlukan mitra industri yang dapat merealisasikan produk-produk tersebut menjadi produk yang dapat dipasarkan. LIPI dengan tangan terbuka tentunya membuka diri bagi semua mitra yang berminat untuk bersama-sama mengembangkan produk tersebut ke depan.

## Daftar Pustaka

- Abolghasemi, S., Babaiepour, V., Mofid, M. R., & Divsalar, A. (2010). An efficient purification method for high recovery of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor from recombinant *E. coli*. *International Journal of Environmental Science and Development* 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.7763/IJESD.2010.V1.22>
- Adusumilli, A., Kattapogu, R. R. & Krothapalli, S. R. (2012). The clinical applications of Hematopoietic growth factor-GCSF. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2(14), 1–10.
- Anderlini, P., & Champlin, R. E. (2008). Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: Recent findings and current challenges. *Blood*, 111(4), 1767–1772.
- Arai, K., Yokota, T., Miyajima, A., Arai, N., & Lee, F. (1986). Molecular biology of T-cell-derived lymphokines: a model system for proliferation and differentiation of hemopoietic cells. *Bioessays*, 5(4), 166–171.
- Avalos, B. R. (1996). Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 88(3), 761–777.
- Beekman, R., & Touw, I. P. (2010). G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(25), 5131–5136.
- Beekman, R., Valkhof, M. G., Sanders, M. A., Van Strien, P. M., Haanstra, J. R., Broeders, L., Geertsma-Kleinekoort, W. M., Veerman, A. J. P., Valk, P. J. M., Verhaak, R. G., Löwenberg, B., & Touw, I. P. (2012). Sequential gain of mutations in severe congenital neutropenia progressing to

- acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(22), 5071–5077.
- Beel, K., & Vandenberghe, P. (2009). G-CSF receptor (CSF3R) mutations in X-linked neutropenia evolving to acute myeloid leukemia or myelodysplasia. *Haematologica*, 94(10), 1449.
- Beveridge, R. A., Miller, J. A., Kales, A. N., Binder, R. A., Robert, N. J., Harvey, J. H., Windsor, K., Gore, I., Cantrell, J., Thompson, K. A., Taylor, W. R., Barnes, H. M., Schiff, S. A., Shields, J. A., Cambareri, R. J., Butler, T. P., Meister, R. J., Feigert, J. M., Norgard, M. J., ... Sheridan, M. J. (1998). A comparison of efficacy of sargramostim (yeast-derived RhuGM-CSF) and filgrastim (bacteria-derived RhuG-CSF) in the therapeutic setting of chemotherapy-induced myelosuppression. *Cancer investigation*, 16(6), 366–373.
- Bradley, T. R., & Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 44(3), 287–300.
- Burgess, A. W., & Nicola, N. A. (1983). Effects of 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on the proliferation of granulocyte-macrophage colony-forming cells. *Blood*, 61(3), 575–579.
- Burgess, A. W., & Nicola, N. (1983). *Growth factors and stem cells*. Academic Press.
- Burgess, A.W. (1985). Growth factors and cancer. *Australia and New Zealand Journal of Surgery*, 55,105–110.
- Bussolino, F., Wang, J. M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C. J., Aglietta, M., Arese, P., & Mantovani, A. (1989). Granulocyte-and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 337(6206), 471–473.
- Cesaro, S., Chinello, P., Silvestro, G., Marson, P., Picco, G., Varotto, S., Pittalis, S., & ZanESCO, L. (2003). Granulocyte transfusions from G-CSF-stimulated donors for the treatment of severe infections in neutropenic pediatric patients with onco-hematological diseases. *Supportive Care in Cancer*, 11(2), 101–106.
- Cordon usage database* (t.t.). [www.kazusa.or.jp/codon/Cutler](http://www.kazusa.or.jp/codon/Cutler), R. L., Metcalf, D., Nicola, N. A., & Johnson, G. R. (1985). Purification of a multipotential colony-stimulating factor from pokeweed mitogen-stimulated



- mouse spleen cell conditioned medium. *The Journal of biological chemistry*, 260(11), 6579–6587.
- Dale, D. C. (1998). The discovery, development and clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 109, 27.
- Demetri, G. D., & Griffin, J. D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78(11), 2791–2808.
- Disis, M. L. (2005). Clinical use of subcutaneous G-CSF or GM-CSF in malignancy. *Oncology*, 19(4\_Suppl\_2).
- Dong, F., & Larner, A. C. (2000). Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): Evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(5), 1656–1662.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2), 120–136.
- Faraji, F., Mofid, M. R., Babaeipour, V., Divsalar, A., & Dehaghani, S. A. (2010). The structural characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1(1), 15.
- Forrest, G. N., Schimpff, S. C., & Cross, A. (2002). Febrile neutropenia, colony-stimulating factors and therapy: Time for a new methodology? *Supportive Care in Cancer*, 10, 177–18. <https://doi.org/10.1007/s00520-002-0347-2>
- Foster, R., Jr, Metcalf, D., Robinson, W. A., & Bradley, T. R. (1968). Bone marrow colony stimulating activity in human sera. Results of two independent surveys in Buffalo and Melbourne. *British journal of haematology*, 15(2), 147–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1968.tb01524.x>
- Fuad, A. M., Agustiyanti, D. F., Yuliawati, Fidyani, C., Aminah, Santoso, A. (2008). Construction of a CSF3-synthetic gene for recombinant human G-CSF expression in yeast using TBIO (*thermodynamically balanced inside-out*) method. *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region*, 1, 1–7.
- Fuad, A. M., Santoso, A., Yuliawati, Agustiyanti, D. F., & Aminah. (2010). Ekspresi dan produksi protein terapeutik human G-CSF rekombinan

melalui pendekatan biologi sintetik pada sistem ekspresi eukaryot (yeast). *Laporan akhir tahun kegiatan program kompetitif LIPI tahun 2010*.

- Fuad, A. M., Santoso, A., & Kusharyanto, W. (2017). Pengembangan produk obat biosimilar human erythropoietin (hEPO), human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) dan human insulin. *Laporan akhir tahun, kegiatan program unggulan LIPI tahun 2017*.
- Gao, X., Yo, P., Keith, A., Ragan, T. J., & Harris, T. K. (2003). Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: A novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(22), e143. <https://doi.org/10.1093/nar/gng143>
- García-Carbonero, R., Mayordomo, J. I., Tornamira, M.V., López-Brea, M., Rueda, A., Guillem, V., Arcediano, A., Yubero, A., Ribera, F., Gómez, C., Trés, A., Pérez-Gracia, J. L., Lumberras, C., Hornedo, J., Cortés-Funes, H., & Paz-Ares, L. (2001). Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(1), 31–38. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.1.31>
- Germeshausen, M., Skokowa, J., Ballmaier, M., Zeidler, C., & Welte, K. (2008). G-CSF receptor mutations in patients with congenital neutropenia. *Current Opinion in Hematology*, 15(4), 332–337. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328303b9f6>
- Greil, R., & Psenak, O. (2007). Hematopoietic growth factors: ESMO recommendations for the application. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 18, ii89. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn107>
- Hanazono, Y., Hosoi, T., Kuwaki, T., Matsuki, S., Miyazono, K., Miyagawa, K., & Takaku, F. (1990). Structural analysis of the receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils. *Experimental Hematology*, 18(10), 1097–1103.
- Hara, M., Yuasa, S., Shimoji, K., Onizuka, T., Hayashiji, N., Ohno, Y., Arai T, Hattori, F., Kaneda, R., Kimura, K., Makino, S., Sano, M., & Fukuda, K. (2011). G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 208(4), 715–727. <https://doi.org/10.1084/jem.20101059>

- Hattori, K., Shimizu, K., Takahashi, M., Tamura, M., Oheda, M., Ohsawa, N., & Ono, M. (1990). Quantitative *in vivo* assay of human granulocyte colony-stimulating factor using cyclophosphamide-induced neutropenic mice. *Blood*, 75(6), 1228–1233.
- Hill, C.P., Osslund, T.D., & Eisenberg, T. (1993). The structure of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and its relationship to other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 5167–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5167>
- Hughes, W.T., Armstrong, D., Bodey, G. P., Bow, E. J., Brown, A. E., Calandra, T., Feld, R., Pizzo, P. A., Rolston, K.V., Shenep, J. L., & Young, L. S. (2002). 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clinical Infectious Diseases*, 730–751. <https://doi.org/10.1086/339215>
- Hunter, M. G., & Avalos, B. R. (1998). Phosphatidylinositol 3 -kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *The Journal of Immunology*, 160(10), 4979–4987.
- Ichikawa, Y., Pluznik, D. H., & Sachs, L. (1966). In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 56(2), 488. <https://doi.org/10.1073/pnas.56.2.488>
- Jones, T. C. (1996). The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage function in microbial disease. *Medical Oncology*, 13(3), 141–144. <https://doi.org/10.1007/BF02990842>
- Kanda, N., Fukushige, S. I., Murotsu, T., Yoshida, M. C., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., & Nagata, S. (1987). Human gene coding for granulocyte-colony stimulating factor is assigned to the q21-q22 region of chromosome 17. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 13(6), 679–684. <https://doi.org/10.1007/BF01534488>
- Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H., & Katsura, Y. (2010). A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunological Reviews*, 238(1), 23–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00959.x>

- Kuethé, F., Figulla, H.R., Voth, M., Richartz, B.M., Opfermann, T., Sayer, H.G., Krack A., Fritzenwanger, M., Höffken, K., Gottschild, D., & Werner, G. S. (2004). Mobilization of stem cells by granulocyte colony-stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 129(09), 424–428. <https://doi.org/10.1055/s-2004-820061>
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K. J., Basu, S., Zhan, Y. F., & Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737–1746.
- Link, D. C. (2000). Mechanisms of granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor cell mobilization. Dalam Saunders, W. B. (Eds). *Seminars in hematology*, 37, 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(00\)90086-6](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(00)90086-6).
- Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., & Link, D. C. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*, 5(5), 491–501. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80504-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80504-x).
- Lundby A., Olsen J. V. (2011). GeLCMS for in-depth protein characterization and advanced analysis of proteomes. Dalam Gevaert K., & Vandekerckhove J. (Eds.). *Gel-free proteomics. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, 753, (143–155). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-148-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-148-2_10)
- Lyman G. H. (2006). Chemotherapy dose intensity and quality cancer care. *Oncology* 20(14 Suppl 9), 16–25.
- Mehta, H. M., Malandra, M., & Corey, S. J. (2015). G-CSF and GM-CSF in Neutropenia *The Journal of Immunology*, 195(4), 1341–1349. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500861>
- Mellstedt, H., Niederwieser, D., & Ludwig, H. (2008). The challenge of biosimilars. *Ann. Oncol.*, 19, 411– 419. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm345>
- Metcalf, D., Moore, M. A., & Warner, N. L. (1969). Colony formation *in vitro* by myelo-monocytic leukemic cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(4), 983–1001.

- Metcalf D. (1987). Hemopoietic growth factors and oncogenes in myeloid leukemia development. *Haematology and blood transfusion*, 31, 16–25. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-72624-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-72624-8_4)
- Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*, 339(6219), 27. <https://doi.org/10.1038/339027a0>
- Metcalf, D. (1990). The colony stimulating factors discovery, development, and clinical applications. *Cancer*, 65(10), 2185–2195. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900515\)65:10<2185::AID-CNCR2820651005>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900515)65:10<2185::AID-CNCR2820651005>3.0.CO;2-4)
- Metcalf, D. (2010). The colony-stimulating factors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(6), 425. <https://doi.org/10.1038/nrc2843>
- Molineux, G., Foote, M., & Arvedson, T. (Eds.). (2012). *Twenty years of G-CSF: Clinical and non-clinical discoveries* (Ebook). Springer Science & Business Media.
- Morikawa, K., Morikawa, S., Nakamura, M., & Miyawaki, T. (2002). Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *British Journal of Haematology*, 118(1), 296–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03574.x>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Nagata, S. (1989). Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor. *Bioassays*, 10(4), 113–117. <https://doi.org/10.1002/bies.950100405>
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H., & Ono, M. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 319(6052), 415. <https://doi.org/10.1038/319415a0>
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. & Yamazaki, T. (1986). The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *The EMBO Journal*, 5(3), 575–581. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04249.x>

- Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M., & Johnson, G. R. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Biological Chemistry*, 258(14), 9017–9023.
- Nicola, N. A., Begley, C. G., & Metcalf, D. (1985). Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukemic cells. *Nature*, 314(6012), 625. <https://doi.org/10.1038/314625a0>
- Nicola, N. A., & Metcalf, D. (1986). Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages. *Ciba Foundation Symposium*, 118, 7–28. <https://doi.org/10.1002/9780470720998.ch2>
- Nienaber, C.A., Petzsch, M., Kleine, H.D., Eckard, H., Freund, M., & Ince, H. (2006). Effects of granulocyte colony-stimulating factor on mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction in humans. *Nature Reviews Cardiology*, 3(S1), S73. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0443>
- Ozer, H., Armitage, J. O., Bennett, C. L., Crawford, J., Demetri, G. D., Pizzo, P.A., Schiffer, C. A., Smith T. J., Somlo, G., Wade, J. C., Wade, J. L. 3rd, Winn, R. J., Wozniak, A. J., & Somerfield, M. R. (2000). 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(20), 3558. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.20.3558>
- Ozkaynak, M. F., Krailo, M., Chen, Z., & Feusner, J. (2005). Randomized comparison of antibiotics with and without granulocyte colony-stimulating factor in children with chemotherapy-induced febrile neutropenia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric Blood & Cancer*, 45(3), 274–280. <https://doi.org/10.1002/pbc.20366>
- Paul, M., Ram, R., Kugler, E., Farbman, L., Peck, A., Leibovici, L., Lahav, M., Yeshurun, M., Sphilberg, O., Herscovici, C., Wolach, O., Itchaki, G., Bar-Natan M., Vidal, L., Gafter-Gvili, A., & Raanani, P. (2014). Subcutaneous versus intravenous granulocyte colony stimulating factor for the treatment of neutropenia in hospitalized hematooncological patients: Randomized controlled trial. *American Journal of Hematology*, 89(3), 243–248. <https://doi.org/10.1002/ajh.23622>



- Platzer, E., Oez, S., Welte, K., Sendler, A., Gabrilove, J. L., Mertelsmann, R., Moore, M. A., & Kalden, J. R. (1986). Human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor: Activities on human and murine cells. *Immunobiology*, 172(3–5), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(86\)80098-5](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(86)80098-5)
- Pratiwi, R. D., Agustiyanti, D. F., Dewi, T. I. T., Herlina, N., Dewi, K. S., Yuliawati, Aminah, Fuad, A. M. (2020). Bioassay of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) for neutropenia treatment in male *Sprague dawley* rats. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 4(1), 10–17. <https://doi.org/10.21705/mcbs.v8i1.81>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallvé, S. (2008). E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-65>
- Rapoport, A. P., Abboud, C. N., & DiPersio, J. F. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): Receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood reviews*, 6(1), 43–57. [https://doi.org/10.1016/0268-960x\(92\)90007-d](https://doi.org/10.1016/0268-960x(92)90007-d)
- Ripa, R. S., Wang, Y., Jørgensen, E., Johnsen, H. E., Hesse, B., & Kastrup, J. (2006). Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte colony-stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *European Heart Journal*, 27(15), 1785–1792. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl117>
- Ro, L.S., Chen, S.R., Chao, P.K., Lee, Y.L., & Lu, K.T. (2009). The potential application of granulocyte colony stimulating factor therapy on neuropathic pain. *Chang Gung Med. J.*, 32(3), 235–346.
- Sachs, L. (1990). The control of growth and differentiation in normal and leukemic blood cells. *Cancer*, 65(10), 2196–2206. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900515\)65:10<2196::AID-CNCR2820651006>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900515)65:10<2196::AID-CNCR2820651006>3.0.CO;2-Y)
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cao, C., & Arendash, G. (2008). The potential of hematopoietic growth factors for treatment of Alzheimer's disease: a mini-review. *BMC neuroscience*, 9(2), S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S2-S3>



- Schabitz, W. R., Kollmar, R., Schwaninger, M., Juettler, E., Bardutzky, J., Scholzke, M. N., Sommer, C., & Schwab, S. (2003). Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral Ischemia. *Stroke*, 34(3), 745–751. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000057814.70180.17>
- Schäbitz, W. R., & Schneider, A. (2007). New targets for established proteins: Exploring G-CSF for the treatment of stroke. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.007>
- Schneider, A., Krüger, C., Steigleder, T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., Aronowski J, Maurer, M.H., Gassler, N., Mier, W., Hasselblatt, M., Kollmar, R., Schwab, S., Sommer, C., Bach, A., Kuhn, H.G., & Schäbitz, W.R. (2005a). The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2083–2098. <https://doi.org/10.1172/JCI23559>
- Schneider, A., Kuhn, H. G., & Schäbitz, W. R. (2005b). Review a role for G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) in the central nervous system. *Cell cycle*, 4(12), 1753–1757. <https://doi.org/10.4161/cc.4.12.2213>
- Shimoda, K., Feng, J., Murakami, H., Nagata, S., Watling, D., Rogers, N. C., Stark, G. R., Kerr, I. M., & Ihle, J. N. (1997). Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 90(2), 597–604.
- Shimoda, K., Okamura, S., Harada, N., Kondo, S., Okamura, T., & Niho, Y. (1993). Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(4), 1310–1313. <https://doi.org/10.1172/JCI116330>
- Simmers, R. N., Smith, J., Shannon, M. F., Wong, G., Lopez, A. F., Baker, E., Sutherland G. R., & Vadas, M. A. (1988). Localization of the human G-CSF gene to the region of a breakpoint in the translocation typical of acute promyelocytic leukemia. *Human genetics*, 78(2), 134–136. <https://doi.org/10.1007/BF00278182>
- Sivakumar, R., Atkinson, M. A., Mathews, C. E., & Morel, L. (2015). G-CSF: a friend or foe? *Immunome Research*, 11(S2), 1.

- Smith, T. J., Khatcheressian, J., Lyman, G. H., Ozer, H., Armitage, J. O., Balducci, L., Bennett, C. L., Cantor, S. B., Crawford, J., Cross, S. J., Demetri, G., Desch, C. E., Pizzo, P. A., Schiffer, C. A., Schwartzberg, L., Somerfield, M. R., Somlo, G., Wade, J. C., Wade, J. L., Winn, R. J., ... Wolff, A. C. (2006). 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *24*(19), 3187–3205. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4451>
- Souza, L. M., Boone, T. C., Gabilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barent, J., Platzer, E., Moore, M. A., Mertelsmann, R., & Welte, K. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, *232*(4746), 61–65. <https://doi.org/10.1126/science.232.4746.61>
- Stanley, E. R., Hansen, G., Woodcock, J., & Metcalf, D. (1975). Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage production. *Federation proceedings*, *34*(13), 2272–2278.
- Stanley, E. R., & Heard, P. M. (1977). Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *The Journal of biological chemistry*, *252*(12), 4305–4312.
- Sun, D., Andayani, T. M., Altyar, A., MacDonald, K., & Abraham, I. (2015). Potential cost savings from chemotherapy-induced febrile neutropenia with biosimilar filgrastim and expanded access to targeted antineoplastic treatment across the European Union G5 countries: a simulation study. *Clin Ther.* <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.01.011>
- Suzuki, K., Nagashima, K., Arai, M., Uno, Y., Misao, Y., Takemura, G., Nishigaki, K., Minatoguchi, S., Watanabe, S., Tei, C., & Fujiwara, H. (2006). Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment at a low dose but for a long duration in patients with coronary heart disease. *Circulation Journal*, *70*(4), 430–437. <https://doi.org/10.1253/circj.70.430>
- Takano, H., Ohtsuka, M., Akazawa, H., Toko, H., Harada, M., Hasegawa, H., Nagai, T. & Komuro, I. (2003). Pleiotropic effects of cytokines on acute myocardial infarction: G-CSF as a novel therapy for acute myocardial

infarction. *Current Pharmaceutical Design*, 9(14), 1121–1127. <https://doi.org/10.2174/1381612033455008>

- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L. C., Borup, R., Rasmussen, T., Bjerregaard, M. D., Nielsen, F. C., Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*, 105(4), 1785–1796. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3346>
- Tian, S. S., Lamb, P., Seidel, H. M., Stein, R. B., & Rosen, J. (1994). Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 84(6), 1760–1764.
- Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., & Nagata, S. (1986). Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83(20), 7633–7637. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7633>
- Tweardy, D. J., Cannizzaro, L. A., Palumbo, A. P., Shane, S., Huebner, K., Vantuinen, P., Ledbetter D. H., Finan J. B., Nowell P. C., & Rovera, G. (1987). Molecular cloning and characterization of a cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) from a glioblastoma multiforme cell line and localization of the G-CSF gene to chromosome band 17q21. *Oncogene Research*, 1(3), 209–220.
- Velasco, R. P. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor use in a large British hospital: Comparison with published experience. *Pharmacy Practice*, 8(4), 213. <https://doi.org/10.4321/s1886-36552010000400002>
- Wang, C. Z., Liu, J. F., & Geng, X. D. (2005). Refolding with simultaneous purification of recombinant human (GCSF) from *E. coli* using strong anion exchange chromatography. *Chinese Chemical Letters*, 16(3), 389–392.
- Ward, A. C., Oomen, S. P. M. A., Smith, L., Gits, J., Van Leeuwen, D., Soede-Bobok, A. A., Erpelinck-Verschueren, C.A., Yi, T., & Touw, I. P. (2000). The SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 is induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and modulates signaling from the G-CSF receptor. *Leukemia*, 14(7), 1284. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401822>
- Wells, J. A., & de Vos, A. M. (1996). Hematopoietic receptor complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 609–634. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.003141>

- Welte, K. A. R. L., Bonilla, M. A., Gillio, A. P., Boone, T. C., Potter, G. K., Gabilove, J. L., & Souza, L. M. (1987). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates. *Journal of Experimental Medicine*, 165(4), 941–948. <https://doi.org/10.1084/jem.165.4.941>
- Welte, K., Gabilove, J., Bronchud, M. H., Platzer, E., & Morstyn, G. (1996). Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, 88(6), 1907–1929.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabilove, J. L., Levi, E., Mertelsmann, R., & Moore, M. A. (1985). Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 82(5), 1526–1530. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1526>
- Welte, K. (2012). Discovery of G-CSF and Early Clinical Studies. Dalam Molineux, G., Foote, M., & Arvedson, T. (Eds.). *Twenty Years of G-CSF: Clinical and Nonclinical Discoveries. Milestone in Drug Therapy*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0218-5>
- Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., & Orr, E. C. (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, 228(4701), 810–815. <https://doi.org/10.1126/science.3923623>
- Zielinska, J., & Bialik, W. (2016). Recent changes on the biopharmaceutical market after the introduction of biosimilar G-CSF products. *Oncology Clinical Practice*, 12(4), 144–152. <https://doi.org/10.5603/OCP.2016.0006>



## BAB VII

# Strategi Peningkatan Aktivitas Protein Terapeutik Melalui Modifikasi Protein

*Kartika Sari Dewi, Yuliawati, dan Dian Fitria Agustiyanti*

### A. Pendahuluan

Peptida dan protein diketahui memiliki potensi terapeutik yang sangat baik untuk melawan berbagai jenis penyakit. Selama tiga dekade terakhir, protein muncul sebagai kelas obat-obatan baru dengan sekitar 200 produk yang telah dipasarkan (Carter, 2011). Hingga saat ini bahkan masih terdapat ratusan protein terapeutik yang masih dalam tahap uji klinis. US Food and Drug Administration (FDA) telah menyetujui banyak obat-obatan berbasis protein rekombinan, di antaranya antibodi, vaksin, enzim, sitokin, dan interferon (Leader dkk., 2008). Selain untuk pengobatan, protein-protein rekombinan tersebut juga dapat digunakan untuk berbagai tujuan, termasuk diagnosis, profilaksis, dan manajemen penyakit (Akash & Rehman, 2015).

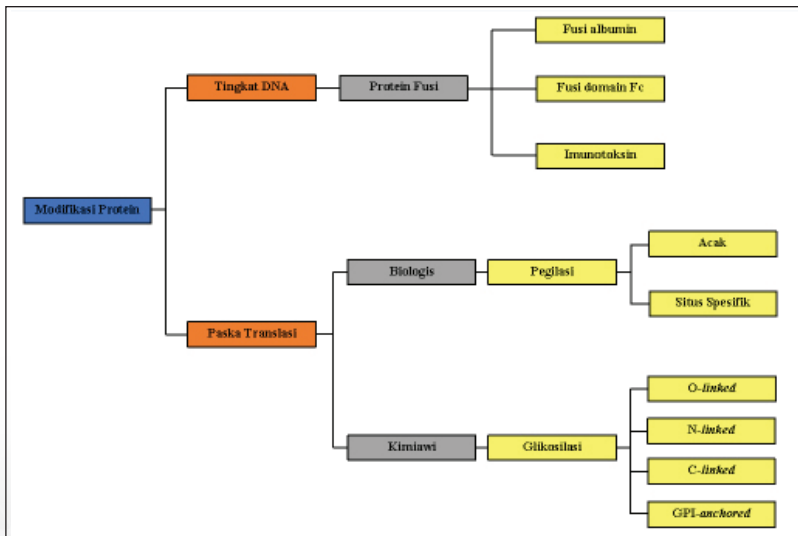
Saat ini, peptida dan protein terapeutik merupakan penyokong utama dalam pertumbuhan pendapatan industri obat biologi. Produknya memiliki rekam jejak yang baik dalam hal penyediaan produk yang aman dan bermanfaat secara klinis. Meskipun protein terapeutik telah berhasil merevolusi banyak pengobatan medis yang sebelumnya tidak terpenuhi, masalah lain pada banyak protein terapeutik generasi pertama (seperti pembersihan cepat, waktu

Buku ini tidak diperjualbelikan.

paruh pendek, dan aktivitas rendah) masih menjadi tantangan yang signifikan bagi industri obat biologi (Li & d'Anjou, 2009). Oleh karena itu, modifikasi generasi kedua atau ketiga dari peptida dan protein terapeutik terus dikembangkan untuk memperbaiki profil farmakokinetiknya.

Teknologi rekayasa protein rekombinan memberikan alternatif dalam melakukan modifikasi protein terapeutik dengan tujuan memperbaiki aktivitasnya. Teknik ini diharapkan dapat memperbaiki beberapa hal terkait aktivitas protein terapeutik, yaitu meningkatkan efikasi dan waktu paruh, mengurangi dosis pemberian obat, toksisitas dan efek samping, serta menghindari timbulnya respons imun negatif. Secara garis besar, teknik modifikasi protein dapat dilakukan pada dua tingkatan struktural, yakni modifikasi pada tingkat DNA dan protein (Gambar 7.1).

Pada tingkat DNA, modifikasi genetik dapat dilakukan dengan cara menggabungkan dua atau lebih gen pengkode protein tertentu



Sumber: Diadaptasi dari Dozier & Distefano (2015); Jenkins (2007); Metzner dkk. (2012); Schmidt (2013), Sinclair & Elliot (2005)

**Gambar 7.1** Teknik Modifikasi Protein Terapeutik



yang nantinya akan diekspresikan menjadi suatu produk protein fusi. Umumnya, salah satu bagian dari protein fusi bersifat terapeutik, sedangkan bagian lainnya memiliki fungsi spesifik tertentu yang membantu meningkatkan aktivitas protein terapeutik tersebut (misalnya fungsi penargetan, efek sitotoksik, dan bertambahnya waktu paruh). Kelebihan metode ini adalah dapat dihasilkannya suatu kombinasi protein terapeutik dengan profil yang unik dan aktivitas yang jauh lebih baik. Beberapa jenis protein fusi yang sering dijumpai adalah protein fusi albumin, fusi domain Fc, dan imunotoksin (Metzner dkk., 2012).

Modifikasi pada tingkat protein, atau sering disebut sebagai modifikasi pasca-translasi, dapat dilakukan, baik secara kimiawi maupun biologis. Pegilasi protein adalah salah satu contoh modifikasi protein yang dilakukan melalui reaksi kimia. Cara ini umum dilakukan untuk meningkatkan bobot molekul protein, dimana gugus tertentu dari salah satu asam amino dikonjugasikan secara kovalen dengan molekul polietilen glikol (PEG). Berdasarkan teknik konjugasinya, pegilasi dibagi menjadi dua kategori, yaitu pegilasi acak dan pegilasi pada situs spesifik (Mishra dkk., 2016). Peningkatan aktivitas protein yang diperoleh dengan cara pegilasi, di antaranya bertambahnya waktu paruh, serta menurunnya imunogenisitas dan laju filtrasi glomerulus (Strohl, 2015).

Glikosilasi merupakan modifikasi protein yang di dalamnya melibatkan reaksi-reaksi biologis. Glikosilasi dapat diklasifikasikan menjadi 4 kategori, yakni *O-linked*, *N-linked*, *C-linked*, dan *glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored* (Sinclair & Elliot, 2005). Pada teknik ini, dilakukan penambahan rantai karbohidrat pada suatu protein melalui ikatan glikosidik. Cara ini dilaporkan dapat mereduksi filtrasi glomerulus serta meningkatkan waktu paruh protein terapeutik. Selain itu, glikosilasi diketahui dapat memengaruhi aktivitas dan sifat pengikatan protein sehingga dapat meningkatkan efikasi secara *in vivo* melalui keseimbangan antara potensi obat dan waktu pemaparan (Kontermann, 2016). Berikut ini akan dibahas secara lebih rinci mengenai modifikasi protein terapeutik dengan metode protein fusi, pegilasi, dan glikosilasi.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## B. Protein Fusi

Perkembangan pesat di bidang teknologi DNA rekombinan memberikan peluang untuk mendesain molekul-molekul baru yang tidak terdapat secara alami, contohnya protein fusi. Jenis protein ini dikembangkan dengan cara mengombinasikan beberapa gen pengkode protein melalui teknik rekayasa genetika. Protein yang diekspresikan dari kombinasi gen tersebut akan menghasilkan protein tunggal baru dengan profil yang unik, yang tiap-tiap bagian protein membawa sifat molekul asalnya. Teknologi protein fusi juga menghasilkan produk yang relatif homogen karena dapat diproduksi dalam satu tahap sehingga proses purifikasi menjadi lebih mudah dan ekonomis. Secara umum, dua molekul protein yang difusikan akan memiliki profil distribusi yang identik. Melalui metode ini, dapat diciptakan suatu fungsi protein terapeutik baru yang tidak terdapat secara alami. Hal ini memungkinkan untuk menciptakan generasi obat baru yang memiliki waktu paruh lebih panjang daripada produk biosimilar yang telah habis paten (Schmidt, 2013).

Pada umumnya, salah satu bagian protein fusi merupakan protein efektor dengan fungsi terapeutik tertentu, sedangkan bagian lainnya memiliki fungsi spesifik, seperti untuk memperbaiki waktu paruh, efek sitotoksik, serta penargetan atau rute penyampaian obat yang baru. Melalui pendekatan fusi genetik, dapat dilakukan kombinasi beberapa jenis protein untuk mendapatkan protein terapeutik baru dengan aktivitas yang jauh lebih baik. Fusi genetik juga dapat memfasilitasi tahap formulasi serta meminimalisasi terjadinya deaktivasi dan agregasi protein. Berikut ini akan dipaparkan beberapa teknik yang dapat dilakukan dalam rangka meningkatkan aktivitas protein terapeutik melalui fusi genetik.

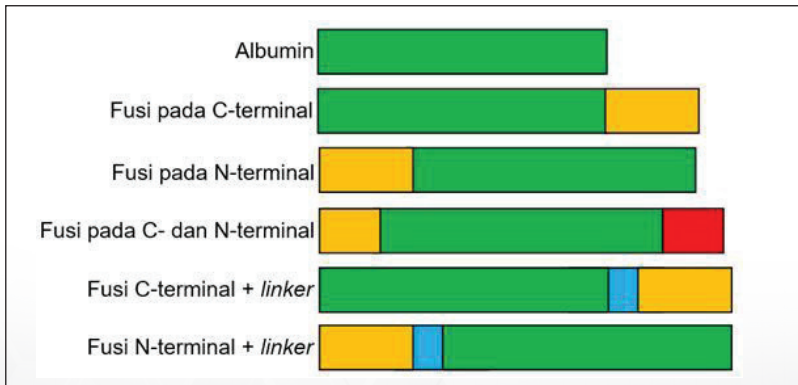
### 1. Fusi Albumin

Albumin merupakan protein plasma yang memiliki kelimpahan pada rentang 35 hingga 50 g/L serum, serta waktu paruh selama 19 hari. Secara struktural, albumin terdiri dari 585 asam amino dengan bobot molekul ~67 kDa (Weimer dkk., 2013). Albumin diproduksi di hati

dan disekresikan sebagai protein yang tidak terglisosilasi (Schmidt, 2009). Waktu paruh albumin yang cukup lama disebabkan oleh mekanisme daur ulang yang bergantung pada pH dan dimediasi oleh reseptor neonatal Fc (FcRn). Mekanisme tersebut berkontribusi dalam memperpanjang waktu paruh protein fusi albumin (Metzner dkk., 2012).

Protein fusi albumin dibuat secara genetik dengan memfuskan gen pengkode albumin dengan protein atau peptida terapeutik melalui rekayasa DNA. Teknologi fusi ini menghasilkan suatu polipeptida hibrid yang memiliki profil farmakokinetik albumin, tetapi masih mempertahankan aktivitas biologis dari protein terapeutik asalnya. Orientasi dari dua gen yang akan difusikan dapat bervariasi sehingga desain fusi protein menjadi lebih fleksibel (Gambar 7.2).

Protein atau peptida terapeutik dapat difusikan baik pada ujung C- atau N-terminal protein albumin, bahkan dapat juga disisipkan di dalam gen pengkode albumin. Kedua gen pengkode protein fusi dapat digabungkan secara langsung ataupun dipisahkan oleh sebuah *linker* (penghubung). Panjang *linker* yang digunakan dapat disesuaikan berdasarkan interaksi antara kedua protein tersebut atau dengan



Ket.: Hijau = albumin, kuning dan merah = protein/peptida terapeutik, biru = *linker*

Sumber: Diadaptasi dari Metzner dkk. (2012)

**Gambar 7.2** Fleksibilitas Desain Fusi Albumin

target molekul lain (Metzner dkk., 2012). Teknologi fusi albumin yang telah dikembangkan oleh *Human Genome Science Inc* diketahui dapat memperpanjang waktu paruh, meningkatkan stabilitas, dan mereduksi imunogenisitas pada protein efektor (Rogers dkk., 2015).

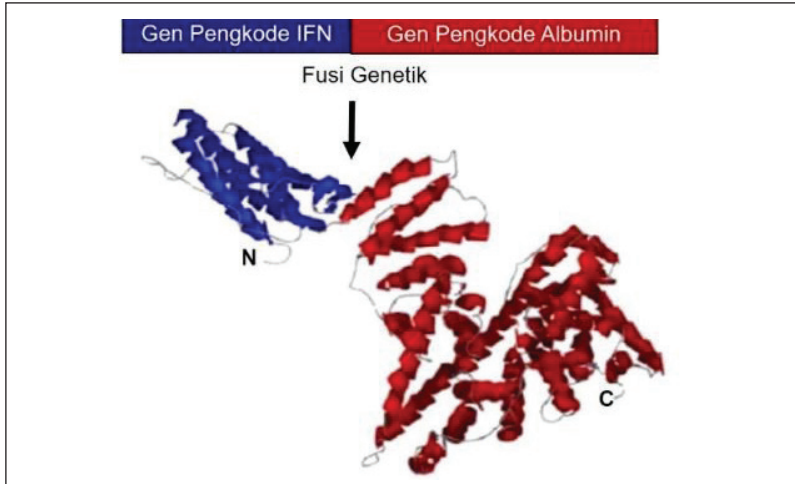
Hingga saat ini, terdapat berbagai macam protein fusi albumin yang sudah melalui tahap uji klinis dan praklinis (Tabel 7.1). Untuk mendapatkan protein fusi albumin dengan efikasi tinggi dan toksisitas rendah, hubungan antara struktur dan fungsi protein efektor terhadap albumin harus diperhatikan. Selain itu, optimasi orientasi protein fusi albumin, jenis *linker*, dan jumlah salinan protein efektor juga perlu dilakukan. Protein efektor dapat ditambahkan, baik pada N-terminal maupun C-terminal dari albumin, tergantung pada letak domain yang berkontribusi dalam bioaktivitasnya. Panjang dan jenis *linker* juga menjadi faktor yang dapat memengaruhi bioaktivitas dari protein fusi albumin, tergantung apakah posisi albumin terhadap protein efektor dapat menghalangi domain aktifnya. Oleh karena itu, panjang dan jenis *linker* merupakan sesuatu yang harus dioptimasi setelah orientasi protein fusi sudah ditentukan (Rogers dkk., 2015). Selain kedua hal tersebut, untuk meningkatkan bioaktivitas dari peptida pendek, dua atau tiga salinan peptida dapat dikonstruksi. Hal tersebut dapat meningkatkan bobot molekul serta aktivitas dari protein fusi, seperti afinitas pengikatan terhadap target (Rogers dkk., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Zhao dkk. (2008) menyatakan bahwa fusi albumin pada N-terminal interferon (IFN)  $\alpha 2a$  dapat menyebabkan heterogenitas karena mengganggu pembentukan ikatan disulfida antara sistein pada posisi 1 dan 98. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan yang berujung pada agregasi sehingga formulasi protein harus dilakukan dalam bentuk terliofilisasi yang membutuhkan lebih banyak waktu dan biaya. Selain itu, ketidakstabilan protein juga menyebabkan rendemen dari proses purifikasi protein menjadi sedikit. Dalam rangka menghindari heterogenitasnya, Ningrum dkk. (2017) dari Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI mencoba melakukan modifikasi pada protein fusi tersebut. Modifikasi ini dilakukan dengan cara mengubah orientasi protein fusi albumin. Kerangka baca terbuka

**Tabel 7.1** Protein Fusi Albumin dalam Tahap Uji Klinis dan Praklinis

Protein Efektor	Mekanisme Fusi	Indikasi Klinis	Status Uji Klinis	Referensi
<i>Glucagon like peptide-1</i> (GLP-1)	C-terminal GLP-1 difusikan terhadap N-terminal albumin. Terdapat 2 salinan GLP-1 (G8A)	Diabetes tipe 2	Disetujui FDA pada tahun 2014 (Albiglutida)	Matthews dkk. (2008)
rG-CSF	N-terminal rG-CSF difusikan terhadap C-terminal albumin	Neutropenia	Fase 3	Volovat dkk. (2014)
Human Growth Hormone	N-terminal hGH difusikan terhadap C-terminal albumin	Defisiensi hormon pertumbuhan	Fase 1	Osborn dkk. (2002)
Interleukin-2	C-terminal IL-2 difusikan terhadap N-terminal albumin	Melanoma dan karsinoma sel ginjal	Fase 1	Yao dkk. (2004)
Extendin-4	C-terminal Extendin-4 difusikan terhadap N-terminal albumin	Diabetes tipe 2	Praklinis	Zhang dkk. (2014)
Insulin	C-terminal insulin rantai B difusikan terhadap N-terminal albumin	Diabetes tipe 1 dan 2	Praklinis	Duttaroy dkk. (2005)
Interferon	N-terminal IFN $\alpha$ difusikan terhadap C-terminal albumin	Hepatitis C kronis	Diskontinu setelah melalui fase 3 (albuferon)	Zeuzem dkk. (2010)

Sumber: Rogers dkk., 2015



Sumber: Dimodifikasi dari Elsadek & Kratz (2012)

**Gambar 7.3** Struktur teoretis dari protein albumin yang difusikan secara genetik pada C-terminal IFN  $\alpha$ 2a.

dari gen pengkode albuferon dioptimasi dengan orientasi albumin pada C-terminal IFN  $\alpha$ 2a (Gambar 7.3). Selanjutnya, ekspresi protein fusi ini dilakukan pada sel inang *Pichia pastoris*. Hasil karakterisasi protein menunjukkan bahwa protein fusi yang dihasilkan memiliki ukuran yang sesuai dengan prediksi secara teoritis, yakni 85 kDa dengan kelimpahan sebesar 14 mg/L. Hasil uji stabilitas ekspresi menunjukkan bahwa galur *P. pastoris* rekombinan tersebut mampu menghasilkan produk protein albuferon dengan jumlah yang relatif stabil hingga generasi ke 60. Namun, uji pendahuluan terkait aktivitas antiproliferatif menunjukkan bahwa terjadi penurunan aktivitas sebesar 20% dibandingkan protein nonfusi.

## 2. Fusi Domain Fc

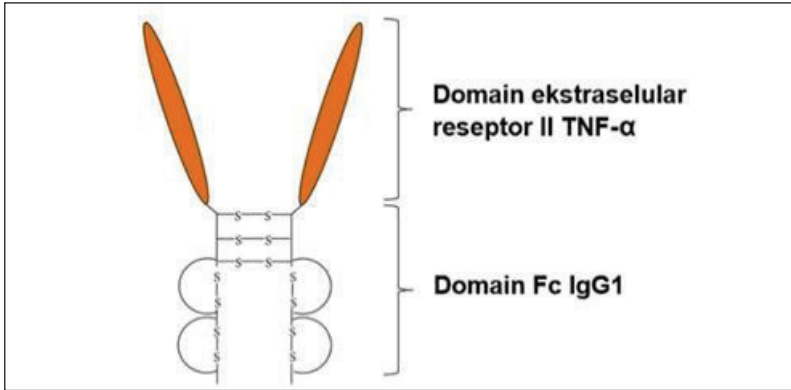
Teknologi fusi protein berbasis domain Fc merupakan salah satu strategi yang cukup sukses dalam mendapatkan generasi baru dari protein terapeutik. Pada protein fusi Fc, domain pengikat antigen (Fab) dari imunoglobulin (Ig) digantikan dengan protein efektor lain

dengan fungsi terapeutik tertentu (Schmidt, 2009). Pada umumnya, protein yang terfusi dengan domain Fc memiliki fungsi terapi yang sangat potensial sehingga hasil penggabungan keduanya menghasilkan suatu protein hibrid baru dengan sifat-sifat biologis dan farmakologis yang jauh lebih menguntungkan. Salah satu yang terpenting adalah adanya peningkatan waktu paruh melalui pertambahan bobot molekul sehingga tidak mudah dibersihkan oleh ginjal. Selain itu, adanya afinitas pengikatan domain Fc dengan reseptor Fc (FcRs) pada sel-sel imun serta daur ulang Fc melalui FcRn dapat memperpanjang aktivitas terapeutik dari protein fusi Fc (Czajkowsky dkk., 2012).

Domain Fc, yang dapat diisolasi dengan cara memecah IgG dengan enzim papain, merupakan faktor utama yang berperan pada panjangnya waktu paruh dan distribusi IgG di dalam tubuh (Jazayeri & Carroll, 2012). Pada umumnya, IgG1 manusia memiliki waktu paruh sekitar tiga minggu, sedangkan fragmen antibodi hanya beberapa jam. Hal ini karena reseptor FcRn pada sel endotel mengikat bagian antara CH2 dan CH3 pada domain Fc sehingga melindungi IgG1 dari mekanisme pembersihan (Kim dkk., 2005). FcRn diekspresikan pada sel epitel yang melapisi usus, paru-paru, dan ginjal sehingga keberadaannya relatif konstan. Pada daur ulang melalui reseptor FcRn, protein fusi Fc diinternalisasi melalui pinositosis dan berinteraksi dengan FcRn di dalam endosom pada pH 6. Protein fusi Fc yang terikat pada FcRn kemudian dikembalikan ke membran plasma sel endotel dan dilepaskan kembali ke serum ekstraselular pada pH 7,4 (Schmidt, 2009).

Enbrel® (*etanercept*) merupakan contoh sukses dari protein fusi Fc yang menggunakan reseptor terlarut sebagai protein terapeutik. Etanercept merupakan gabungan antara domain ekstraseluler terlarut dari reseptor II TNF- $\alpha$  (TNFR II) yang berukuran 75 kDa dan domain Fc IgG1 (Gambar 7.4). Protein fusi terapeutik ini memiliki waktu paruh 68 jam. *Etanercept* memiliki kemampuan untuk menetralkan TNF- $\alpha$ , baik dalam bentuk terlarut maupun yang terikat membran. Bersama obat antagonis TNF- $\alpha$  lainnya, seperti *remicade* (suatu antibodi monoklonal anti-TNF- $\alpha$ ), *etanercept* memiliki dampak yang

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Sumber: Chiran dkk. (2013)

**Gambar 7.4** Struktur *Etanercept*

luar biasa dalam pengobatan *rheumatoid arthritis*. Semenjak disetujui oleh FDA pada 1998, sampai saat ini *etanercept* masih menjadi protein terapeutik yang paling sukses secara komersial. Penjualan obat ini hampir mencapai 3,6 miliar US\$ pada 2008 (Huang & Swanson, 2013).

Hingga saat ini, terdapat sembilan jenis protein fusi Fc yang telah disetujui oleh FDA dan dipasarkan di USA sebagai produk obat biologi (Tabel 7.2). Seluruh protein fusi tersebut memiliki domain Fc dari IgG1 manusia dengan tujuan meningkatkan waktu paruh dari protein terapeutik. Tanda bintang (\*) menunjukkan produk yang ditarik dari pasaran pada 2011.

**Tabel 7.2** Protein Fusi Fc yang Telah Disetujui oleh FDA

Produk	Konstruk molekuler (Sistem ekspresi)	Ligan (efek klinis)	Perusahaan	Tahun persetujuan FDA
Eloctate	FVIII-IgG1 Fc (HEK293)	Faktor pembekuan darah (terapi pengganti untuk hemofilia A)	Biogen Iddec	2014
Alprolix	FIX-IgG1 fc (HEK-293)	Faktor pembekuan darah (terapi pengganti untuk hemofilia B)	Biogen Iddec	2014

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Produk	Konstruk molekuler (Sistem ekspresi)	Ligan (efek klinis)	Perusahaan	Tahun persetujuan FDA
Amevive (alefacept)	LFA3-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat CD2 (menghambat proliferasi sel T pada psoriasis dan penolakan transplan)	Astellas dan Biogen Idec	2003*
Enbrel (etanercept)	TNFR2-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat TNF membran dan terlarut (mereduksi inflamasi yang diinduksi oleh sitokin pada <i>rheumatoid arthritis</i> (RA), <i>plaque psoriasis</i> , dan <i>psoriatic arthritis</i> )	Amgen dan Immunex	1998
Orencia (abatacept)	CTLA4-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat CD80, CD86 (menghambat ko-stimulasi sel T pada RA)	Bristol-Myers-Squibb	2005
Nulojix (belatacept)	CTLA4-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat CD80, CD86 (menghambat ko-stimulasi sel T pada penolakan transplan)	Bristol-Myers-Squibb	2011
Eylea (afibercept)	VEGFR1-VEGFR2-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat VEGF-A, VEGF-B dan faktor pertumbuhan plasenta (mencegah neovaskularisasi pada <i>wet age-related macular degeneration</i> dan <i>macular edema</i> (Eylea))	Regeneron dan Sanofi Aventis	2011
Zaltrap (zivaflibercept)	VEGFR1-VEGFR2-IgG1-Fc (CHO)	Mengikat VEGF-A, VEGF-B, dan PIGF (mengobati kanker kolorektal)	Regeneron dan Sanofi Aventis	2012
Arcalyst (rilonacept)	IL-1R-IgG1 Fc (CHO)	Mengikat dan menetralisasi IL-1 pada <i>cryopyrin-associated periodic syndrome</i> (CAPS)	Regeneron dan Sanofi Aventis	2008
Nplate (romiplostim)	<i>Thrombopoietin-binding peptide-IgG1 Fc</i> (E. Coli)	Bertindak sebagai agonis pada reseptor trombopoietin untuk menstimulasi produksi platelet pada <i>refractory immune thrombocytopenia</i>	Amgen	2008

Sumber: Berry (2014)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

### 3. Imunotoksin

Terapi terarah/target pertama kali didefinisikan oleh Paul Ehrlich pada pertengahan abad ke-19. Ia menggambarkan konsep “peluru ajaib” yang secara selektif menargetkan organisme penyebab penyakit dan menghantarkan toksin untuk mengeliminasi patogen. Hingga saat ini, konsep tersebut masih sangat ideal bagi banyak ilmuwan untuk mengembangkan terapi kanker terarah tanpa memengaruhi sel-sel normal. Pada awalnya, molekul penarget dan toksin dikonjugasikan secara kimiawi. Akan tetapi, hal tersebut menyebabkan banyak masalah pada saat proses produksi. Pendekatan ini kemudian diganti dengan metode fusi genetik. Selain itu, penggunaan toksin yang bukan berasal dari manusia juga menjadi kendala dan menyebabkan timbulnya respons imun yang tidak diinginkan (Schmidt, 2014).

Imunotoksin merupakan suatu molekul protein yang terdiri dari satu ataupun dua ligan penarget yang terikat secara kovalen dengan peptida toksin, baik yang berasal dari tumbuhan maupun mikroorganisme. Ligan pada imunotoksin berfungsi dalam pengenalan sel target, sedangkan toksin akan membunuh sel target berdasarkan mekanisme aksi yang dimiliki toksin tersebut. Beberapa contoh ligan yang digunakan pada imunotoksin, yaitu antibodi monoklonal, fragmen antibodi, molekul adhesi, faktor pertumbuhan, dan sitokin. Terdapat dua tipe toksin yang digunakan untuk konstruksi imunotoksin (Tabel 7.3). Toksin tipe I adalah protein yang aksi enzimatisnya dilakukan di sitosol yang prosesnya dapat menghambat fungsi intraseluler, terutama pada tahap sintesis protein. Toksin tipe II merupakan golongan peptida yang bekerja pada membran sel. Jenis toksin ini mengakibatkan kebocoran pada membran yang berujung pada kematian sel. Pada toksin tipe II, internalisasi toksin untuk intoksikasi sel tidak diperlukan. Namun, kekurangannya ialah adanya toksisitas sel non-spesifik. Oleh karena itu, kebanyakan imunotoksin dikonstruksi dengan toksin tipe I (Woo & Frankel, 2013).

Dalam tiga dekade terakhir, lebih dari 1000 jenis imunotoksin telah dikonstruksi dan saat ini terdapat 12 jenis imunotoksin yang sedang dalam tahap pengembangan (Tabel 7.4). Generasi pertama

**Tabel 7.3** Tipe Toksin pada Pembuatan Imunotoksin

Tipe	Fungsi	Toksin
Toksin sitosolik	Menghambat sintesis protein melalui ribosilasi ADP pada EF-2	Holotoksin: toksin difteri, eksotoksin Pseudomonas
	Menghambat sintesis protein melalui pemotongan RNA ribosom	Holotoksin: ricin, abrin, viscumin, nigrin b Hemitoksin: gelonin, saporin, PAP, luffin, bouganin, trichosantin, ebulin, bryodin, momordin, momorchochin, moschatin, dianthin 30, ocymoidine, pyramidatine, colocin I, $\alpha$ -sarcin, mitogillin, clavin, restrictocin, bamase Holotoksin: toksin antraks
	Modifikasi jalur pensinyalan Menghambat eksositosis (sekresi)	Holotoksin: neurotoksin Botulinum
Toksin membran	Disintegrasi fungsi membrane vital	Hemitoksin: fosfolipase C dari <i>Clostridia perfringens</i> , thionin Pyricularia
	Pembentukan pori pada membrane	Hemitoksin: proaerolysin, CytIAa toksin

Sumber: Woo & Frankel (2013)

dari imunotoksin merupakan suatu konjugat kimia dari toksin dan ligan yang spesifik terhadap tumor. Kekurangan dalam proses konjugasi secara kimiawi adalah diperlukannya toksin dan ligan dalam jumlah besar karena hasil akhir yang relatif sedikit. Konjugasi secara kimiawi menghasilkan produk yang cenderung heterogen. Namun, imunotoksin hasil konjugasi kimiawi memiliki waktu paruh yang lebih panjang (9–24 jam) jika dibandingkan produk rekombinan (1–5 jam). Generasi kedua dari imunotoksin merupakan protein fusi rekombinan. Sebagian besar imunotoksin termasuk ke dalam golongan ini. Dalam mendesain imunotoksin rekombinan, informasi mengenai struktur toksin digunakan untuk meminimalkan efek yang tidak diinginkan serta memaksimalkan efek sitotoksik yang spesifik terhadap sel target. Pada imunotoksin rekombinan, dalam satu

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 7.4** Imunotoksin dalam Tahap Pengembangan

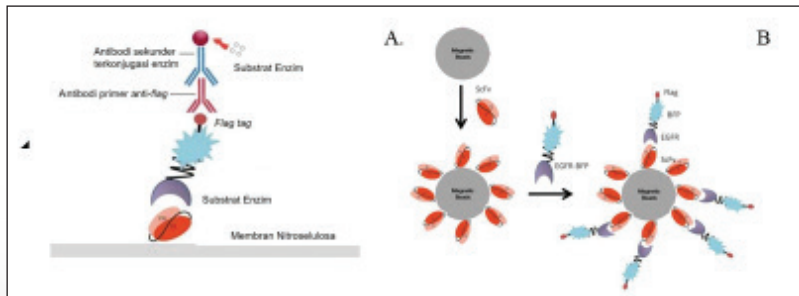
Imunotoksin	Target	Indikasi penyakit	Toksin
Anti-B4-blocked ricin	CD19	<i>Lymphocytic leukemia</i>	Ricin
IL13PE	IL12R $\alpha$	Kanker pankreas	PE
H22ETA	CD64	Arthritis	PE
scFv35-ETA	Reseptor- $\gamma$ Asetilkolin	<i>Rhabdo-myosarcoma</i>	PE
Affitoxin	HER2	Kanker HER2+	PE
VB6-845	EpCAM	Berbagai macam kanker	Bouganin
FR betaPE	Reseptor $\beta$ folat	Inflamasi	PE
26292(Fv)-PE38	CD123/IL3R $\alpha$	<i>Acute myeloid leukemia</i>	PE
SS1P	Mesothelin	Kanker paru-paru	PE
BL22	CD22	<i>Hairy cell leukemia</i>	PE
CD19-ETA	CD19	<i>Lymphocytic leukemia</i>	PE
scFv(MUC1)-ETA	MUC1	Kanker payudara	PE

Sumber: Sharma dkk. (2015)

rantai protein hanya terdapat satu salinan ligan selektif tumor dan satu salinan toksin. Strukturnya yang relatif sederhana menjadikan molekul imunotoksin mudah diproduksi di sel inang *E. coli* (Woo & Frankel, 2013).

Berbeda dengan generasi sebelumnya, imunotoksin generasi ketiga memiliki modifikasi pada domain toksinnya. Modifikasi ini untuk mengurangi imunogenisitas dan degradasi protein lisosomal serta mendapatkan struktur yang lebih kompleks untuk meningkatkan afinitas pada sel target. Sebagai contoh, mutasi titik dan delesi mayor pada domain II PE diketahui dapat menghasilkan imunotoksin PE baru dengan imunogenisitas dan toksisitas yang lebih rendah serta lebih resistan terhadap protease. Untuk meningkatkan efikasi, struktur protein yang lebih kompleks didapatkan dengan menambahkan suatu ligan yang identik maupun berbeda jenis (Woo & Frankel, 2013).

Laboratorium Rekayasa Protein dan Pengembangan Sistem Penyampaian Obat di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah berupaya mengembangkan imunotoksin dengan cara mengonjugasikan suatu fragmen antibodi untai tunggal anti-*epidermal growth factor variant III* (scFv anti-EGFRvIII) dengan toksin berupa varian mutan *human pancreatic ribonuclease* (HPRmut). Ekspresi dilakukan pada sel inang *P. pastoris*. Fragmen antibodi yang digunakan memiliki ukuran yang relatif kecil (30 kDa) sehingga diharapkan dapat menembus jaringan tumor dengan lebih baik (Sun dkk., 2003). EGFRvIII dipilih karena merupakan varian mutan yang paling umum ditemui pada sejumlah tumor padat dan spesifik pada sel kanker. Salah satu penelitian imunotoksin yang banyak dikembangkan saat ini adalah imunoRNase (IR), yang menggunakan molekul ribonuklease (RNase) sebagai toksin (De Lorenzo dkk., 2004). RNase bersifat sitotoksik karena kemampuannya untuk mendegradasi RNA. RNase menyebabkan kematian sel dengan cara menghambat biosintesis protein, baik pada tahap transkripsi maupun translasi. Fusi gen EGFRscFv::HPR telah berhasil terintegrasi ke genom *P. pastoris*. Analisis interaksi antara fusi antibodi (scFv::HPR) dan antigen (EGFR::BFP) juga telah dilakukan dengan analisis *slot blot* dan mikroskop fluoresen. Analogi interaksi dapat dilihat pada Gambar 7.5 (Yuliatwati dkk., 2014).



Sumber: Yuliatwati dkk. (2014)

**Gambar 7.5** Analogi interaksi antara fusi antibodi (scFv::HPR) dan antigen (EGFR::BFP) dengan analisis *slot blot* (A) dan mikroskop fluoresen (B).

#### 4. Keuntungan dan Tantangan dalam Pembuatan Protein Fusi

Seperti yang telah diketahui, banyak keuntungan yang dapat diperoleh dengan mengonjugasikan suatu protein terapeutik dengan protein lain yang memiliki fungsi spesifik tertentu. Bertambahnya waktu paruh, efek sitotoksik, serta rute penyampaian baru adalah sebagian dari keuntungan tersebut. Namun, beberapa hal juga menjadi tantangan yang harus dihadapi dalam memproduksi protein fusi, contohnya [h](#) terbentuknya *human anti-toxin antibodies* (HATA) pada imunotoksin. Tabel 7.5 meringkas apa saja yang menjadi keuntungan dan tantangan pada fusi protein terapeutik, baik berupa fusi albumin, fusi domain Fc, maupun imunotoksin.

**Tabel 7.5** Keuntungan dan Tantangan Fusi Protein Terapeutik

Protein Fusi	Keuntungan	Tantangan	Referensi
Fusi Albumin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningkatkan bioavailabilitas dan waktu paruh;</li> <li>• Berkurangnya dosis pemberian obat;</li> <li>• Mudah diproduksi pada sel inang <i>yeast</i> dalam skala besar dan cenderung ekonomis;</li> <li>• Menghasilkan fusi monomerik sehingga memudahkan proses purifikasi dan perhitungan dosis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menjaga aktivitas protein efektor, serta meminimalisasi risiko toksisitas dan imunogenisitasnya;</li> <li>• Aplikasinya terbatas sebagai peningkat profil farmakokinetik dan agen penstabil, tidak ada kemampuan sekunder lainnya (misalnya efek sitotoksik).</li> </ul>	Strohl (2015); Schmidt (2009); Metzner dkk. (2012)
Fusi domain Fc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memiliki fungsi sitotoksik melalui <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (ADCC) atau <i>complement-dependent cytotoxicity</i> (CDC);</li> <li>• Mempermudah proses purifikasi melalui teknik kromatografi afinitas menggunakan protein A dan G;</li> <li>• Membantu melarutkan protein hidrofobik;</li> <li>• Memperpanjang waktu paruh.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masih memerlukan sistem ekspresi eukariot untuk memfasilitasi pembentukan jembatan disulfida;</li> <li>• Ukurannya yang cukup besar dapat menurunkan laju difusi jika melewati mucus.</li> </ul>	Rath dkk. (2015); Schmidt (2009)

Protein Fusi	Keuntungan	Tantangan	Referensi
Imuno-toksin	<ul style="list-style-type: none"> <li>Memiliki toksisitas yang bertarget sehingga meminimalkan efek samping pada sel-sel normal;</li> <li>Mengurangi dosis yang diberikan pada pasien sehingga dapat menghindari efek racun sistemik.</li> </ul>	Dapat memicu timbulnya respons imun negatif, yakni <i>human anti-toxin antibodies</i> (HATA) dan <i>human anti-mouse antibodies</i> .	Sharma dkk. (2015)

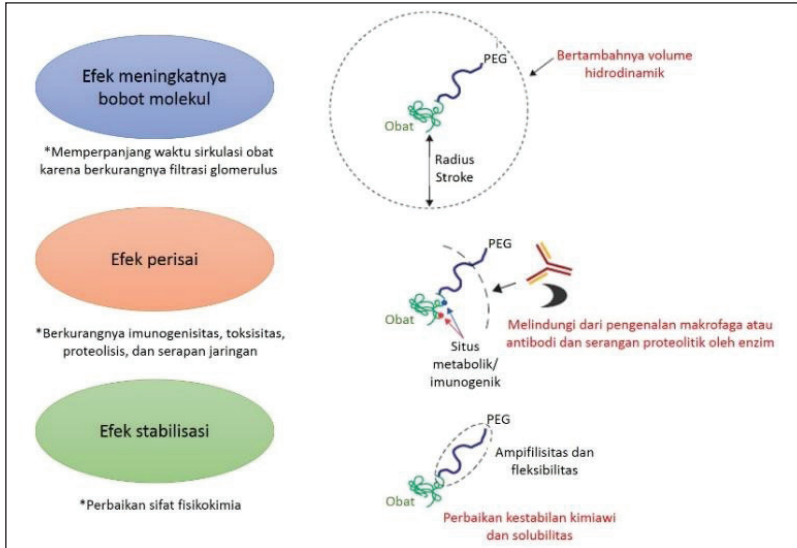
Sumber: dari berbagai sumber

### C. Pegilasi Protein Terapeutik

Pegilasi merupakan teknologi yang telah digunakan secara luas untuk mengubah protein, peptida, molekul kecil, dan oligonukleotida menjadi obat yang lebih potensial dibanding dengan molekul natif. Biomolekul terpegilasi memiliki sifat klinis yang lebih bermanfaat, seperti meningkatnya stabilitas, berkurangnya laju filtrasi glomerulus, meningkatnya waktu paruh, rendahnya imunogenisitas dan antigenisitas, serta terlindungi dari degradasi proteolitik (Bailon & Won, 2009). Secara intrinsik, kelebihan dari PEG adalah bersifat biokompatibel, relatif nontoksik, serta memiliki kelarutan yang baik di dalam air dan berbagai macam pelarut organik. Manfaat lain dari pegilasi adalah dapat meminimalkan pemborosan volume injeksi obat yang berkaitan dengan laju serapan di situs injeksi serta meningkatnya kelarutan protein terapeutik (Gambar 7.6) (Kang dkk., 2009).

Konjugasi antara molekul PEG dan protein terapeutik menghasilkan suatu makromolekul baru dengan perubahan yang signifikan pada karakteristik fisiko-kimia, serta menunjukkan perbaikan sifat farmakokinetik dan farmako-dinamiknya. Proses pembuatan protein terpegilasi dapat dimulai dengan mengetahui secara baik profil protein target yang akan dipegilasi, juga kekurangan yang dapat diperbaiki melalui proses pegilasi. Gambar 7.7 merangkum tahapan mendesain proses pegilasi dari suatu protein.





Sumber: Diadaptasi dari Kang dkk. (2009)

**Gambar 7.6** Dasar Pemikiran Pegilasi Protein

Mempelajari profil protein target	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mengetahui karakteristik profil protein target (ukuran, pl, urutan asam amino, struktur 3D protein, jumlah dan jenis asam amino yang terpapar).</li> </ul>
Memilih PEG yang akan digunakan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menentukan PEG yang dibutuhkan oleh protein sesuai fungsi yang akan direrbaiki (jenis, bentuk, dan ukuran PEG).</li> </ul>
Menentukan situs penempelan PEG	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menentukan posisi penempelan PEG pada protein (penempelan secara acak atau spesifik, penempelan di N terminal atau C terminal, penempelan pada asam amino tertentu).</li> </ul>
Menentukan metode pegilasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menentukan metode pegilasi yang akan digunakan (sistem buffer, pH, dan waktu yang akan digunakan).</li> </ul>
Menentukan metode pemurnian	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metode pemurnian kompleks protein dan menghilangkan protein dari partikel PEG yang tidak membentuk kompleks (mis: kromatografi penukar ion dan kromatografi eksekusi gel).</li> </ul>
Karakterisasi dan pengujian protein terpegilasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Karakteristik protein terpegilasi (ukuran, nilai, pl, stabilitas).</li> <li>Pengujian secara <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i>.</li> </ul>

Sumber: Diadaptasi dari Santos dkk. (2018)

**Gambar 7.7** Tahapan Pegilasi Protein

## 1. Profil PEG dan Ketersediaannya

PEG adalah suatu polimer yang bersifat non-toksik, non-imunogenik, hidrofilik, tidak bermuatan, tidak dapat terdegradasi, serta disetujui oleh FDA sebagai suatu molekul yang aman. PEG merupakan polimer linier dari etilen glikol (etana-1,2-diol). Umumnya, salah satu ujung polimer ditutup dengan gugus metoksi (mPEG) untuk mencegah ikatan silang yang tidak diinginkan saat proses konjugasi. Kelarutan PEG yang baik di dalam air ataupun pelarut organik dihasilkan dari polimerisasi anionik etilen oksida yang diinisiasi oleh serangan nukleofilik dari ion metoksida pada cincin epoksida (Turecek dkk., 2016; Roberts dkk., 2012).

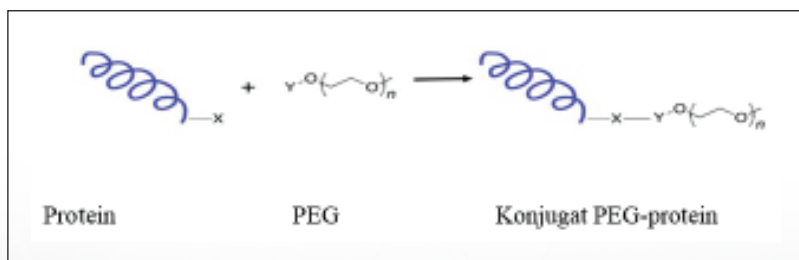
Meskipun banyak format baru PEG bermunculan (contohnya *multiarm*, *comb-shaped*, dan *forked*), PEG dengan bentuk linier dan bercabang dengan bobot molekul hingga 40 kDa masih menjadi pilihan utama karena menghasilkan perbaikan sifat farmakokinetik yang diharapkan. Namun, penggunaan PEG konvensional berbentuk linier panjang dengan bobot molekul di atas 30 kDa memiliki keterbatasan, yakni tingginya viskositas konjugat PEG-protein yang dihasilkan sehingga berpotensi terjadinya akumulasi PEG di dalam tubuh. Dalam hal ini, PEG dengan bentuk *multi-arm* dan khususnya *comb-shaped* memberikan keuntungan dengan mereduksi viskositas konjugat PEG-protein dibandingkan bentuk konvensional karena membawa banyak PEG rantai pendek yang terikat pada *backbone* polimer (Jevsevar dkk., 2010).

PEG dikenal sebagai polimer yang tidak dapat terbiodegradasi. Namun, beberapa laporan menyatakan bahwa PEG dapat didegradasi secara oksidatif oleh berbagai macam enzim, contohnya alkohol dan aldehid dehidrogenase. Rantai PEG dengan bobot molekul di bawah 400 Da dimetabolisme secara *in vivo* oleh alkohol dehidrogenase menjadi metabolit toksik. Sementara itu, PEG dengan rantai panjang yang biasa digunakan untuk mengkonjugasi protein terapeutik tidak dimetabolisme. Eliminasi molekul PEG dan konjugat PEG-protein dengan bobot molekul di bawah 20 kDa dilakukan melalui filtrasi

ginjal, sementara konjugat protein dengan molekul PEG yang lebih besar dieliminasi dari tubuh dengan jalur lain, seperti melalui penangkapan oleh sel hati, sistem imun, dan digesti proteolitik pada bagian proteinnya (Jevsevar dkk., 2010). Secara komersial, PEG tersedia dalam berbagai bentuk, ukuran, dan sifat kimiawi yang berbeda sehingga memungkinkan untuk berinteraksi secara kovalen dengan gugus fungsional tertentu pada protein. PEG dengan bentuk linear dan bercabang telah digunakan pada produk obat-obatan yang saat ini dipasarkan (Jevsevar dkk., 2010; Turecek dkk., 2016).

## 2. Reaksi Pegilasi Protein

Aktivasi molekul PEG diperlukan dalam tahap penempelan PEG terhadap molekul protein. Cara yang dilakukan ialah dengan menyiapkan suatu derivat PEG yang memiliki gugus fungsional pada salah satu maupun kedua ujungnya. Gugus fungsional pada PEG dipilih berdasarkan jenis gugus reaktif yang terdapat pada protein yang akan dikonjugasikan. Beberapa asam amino yang reaktif di antaranya lisin, sistein, histidin, arginin, asam aspartat, asam glutamat, serin, treonin, dan tirosin (Roberts dkk., 2012). Gugus fungsional yang bereaksi dengan PEG adalah  $-NH_2$ ,  $-NH-$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-SH$  termasuk ikatan disulfida ( $-S-S-$ ) (Gambar 7.8). Selain situs penempelan, terdapat beberapa aspek lain yang perlu



Ket.: X merupakan gugus fungsional pada protein yang bereaksi secara komplemen dengan gugus fungsional Y pada molekul PEG, membentuk konjugat PEG-protein

Sumber: Diadaptasi dari Dozier & Stefano (2015)

**Gambar 7.8** Strategi Pegilasi Protein

dipertimbangkan dalam proses pegilasi, yakni tipe aktivasi PEG, sifat (permanen atau dapat dipotong), panjang dan bentuk *linker*, panjang, bentuk, struktur, dan ukuran PEG, termasuk penambahan gugus metoksi pada ujung PEG (Jevsevar dkk., 2010). Seluruh aspek ini diatur sesuai dengan kebutuhan dan profil protein yang akan dikonjugasikan. Berdasarkan teknik konjugasinya, pegilasi terbagi menjadi dua kategori, yaitu pegilasi secara acak (pegilasi generasi pertama) dan pegilasi pada situs spesifik (pegilasi generasi kedua) (Mishra dkk., 2016).

#### **a. Pegilasi secara acak**

Mayoritas reagen PEG yang digunakan untuk pegilasi acak menargetkan gugus amino reaktif pada protein, terutama gugus amino epsilon atau alfa pada rantai samping residu lisin (Roberts dkk., 2012). Lisin merupakan asam amino yang bersifat polar dan keberadaannya relatif melimpah pada bagian permukaan protein, menjadikannya rentan terhadap reaksi kimia dengan PEG. Akibatnya, reaksi terjadi dengan sangat cepat dan membentuk campuran konjugat PEG-protein yang kompleks dengan jumlah dan posisi penempelan rantai PEG yang bervariasi (Jevsevar dkk., 2010).

Sebagian besar reagen pegilasi yang digunakan tidak sangat spesifik bereaksi dengan gugus amino dari residu lisin, tetapi bereaksi secara minor dengan nukleofil protein lainnya, antara lain gugus amino pada N-terminal, nitrogen imidazolyl pada residu histidin, bahkan pada rantai samping residu serin, treonin, tirosin, dan sistein. Meskipun hingga batasan tertentu jalannya reaksi dapat diatur oleh pH medium (agar reaksi berlanjut, nukleofil tidak boleh terprotonasi), jenis reaksi ini selalu menghasilkan campuran pegilasi yang kompleks (Roberts dkk., 2012; Jevsevar dkk., 2010). Teknik pegilasi acak umumnya menggunakan PEG dengan bobot molekul rendah (<12 kDa), membentuk banyak isomer PEG. Penggunaan mPEG menghasilkan pengotor PEG diol yang memicu terbentuknya ikatan silang dan agregat protein inaktif.

Derivat PEG generasi pertama meliputi i) PEG-*dichlorotriazine*, ii) PEG-*tresylate*, iii) PEG-*succinimidyl carbonate*, iv) PEG-*benzotriazole carbonate*, v) PEG-*para-nitrophenyl carbonate*, vi) PEG-*trichlorophenyl carbonate*, g) PEG-*carbonylimidazole* dan h) PEG-*succinimidyl succinate* (Roberts dkk., 2012). Meskipun terdapat banyak variasi pereaksi pegilasi, reagen pegilasi acak yang paling sering digunakan saat ini memiliki gugus karbonil teraktivasi dalam bentuk ester N-hidroksi-suksinimida (NHS), yang nantinya akan membentuk konjugat PEG-protein stabil melalui ikatan amida. Ikatan yang stabil antara PEG dan protein memungkinkan proses produksi, karakterisasi, dan formulasi yang lebih mudah pada protein akhir (Jevsevar dkk., 2010).

Konjugat PEG-protein terapeutik yang pertama kali disetujui FDA, yakni Adagen® (*pegademase*), adalah suatu campuran produk pegilasi yang kompleks dan beragam. *Pegademase* telah terbukti jauh lebih efisien dibandingkan transfusi tukar parsial sel darah merah yang merupakan terapi standar sebelum *pegademase* disetujui. PegIntron® dan Pegasys® juga merupakan produk yang dihasilkan dari reaksi pegilasi acak. Kedua produk obat biologi tersebut merupakan campuran isomer pegilasi tunggal. Pada PegIntron®, rantai PEG linier berukuran 12 kDa terikat di berbagai posisi penempelan (Jevsevar dkk., 2010).

## **b. Pegilasi pada gugus spesifik**

Walaupun proses purifikasi dapat menghasilkan produk pegilasi yang homogen, perkembangan teknik pegilasi cenderung bergeser ke arah pegilasi pada gugus spesifik. Generasi kedua dari teknik pegilasi protein ini didesain untuk mengatasi keterbatasan generasi sebelumnya. Spesifisitas rendah, degradabilitas, berkurangnya aktivitas konjugat, rentan terhadap hidrolisis, kebutuhan akan molekul PEG berbobot molekul tinggi, dan heterogenitas konjugat keseluruhannya berkontribusi terhadap kebutuhan reagen PEG yang lebih selektif (Jevsevar & Kunstelj, 2012; Roberts dkk., 2012; Turecek dkk., 2016).

Dua contoh pendekatan untuk reaksi pegilasi gugus spesifik adalah alkilasi reduktif untuk pegilasi N-terminal dan pegilasi gugus tiol pada residu sistein bebas. Pegilasi N-terminal dilakukan melalui tahap alkilasi reduktif menggunakan reagen PEG-aldehid dan suatu agen pereduksi (contohnya *sodium cyanoborohydride*). Metode ini digunakan untuk menghasilkan Neulasta®, yakni protein *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF) yang terpegilasi tunggal pada gugus N-terminalnya dengan ukuran PEG sebesar 20 kDa. Perbaikan profil farmakokinetik pada Neulasta® memungkinkan pemberian dosis hanya satu kali per siklus kemoterapi, dibandingkan GCSF generasi pertama (Neupogen®) yang diberikan setiap hari sampai dua minggu per siklus kemoterapi (Jevsevar & Kunstelj, 2012).

Pegilasi gugus tiol pada residu sistein bebas merupakan pendekatan utama yang dilakukan pada pegilasi gugus spesifik. Pertimbangannya adalah karena reagen yang bereaksi secara spesifik dengan gugus tiol telah berhasil disintesis, di antaranya PEG-*maleimide*, PEG-*vinylsulfone*, PEG-*iodoacetamide*, dan PEG-*orthopyridyl disulfide*. Selain itu, jumlah sistein bebas pada permukaan protein lebih sedikit dibandingkan residu lisin. Jika pada molekul protein tidak terdapat sistein bebas, satu atau dua sistein bebas dapat ditambahkan melalui rekayasa genetik. Metode ini memungkinkan pegilasi yang spesifik pada area tertentu sehingga dapat meminimalisasi hilangnya aktivitas biologis protein serta mengurangi imunogenisitasnya (Roberts dkk., 2012). Meskipun beragam reagen yang bereaksi spesifik dengan gugus tiol telah tersedia, reagen PEG-*maleimide* paling disukai karena membentuk konjugat PEG-protein yang stabil (Jevsevar dkk., 2010).

### 3. Purifikasi dan Karakterisasi Protein Terpegilasi

Proses pegilasi protein menghasilkan campuran produk yang kompleks dan beragam. Oleh karena itu, tahap purifikasi diperlukan untuk mendapatkan produk akhir yang homogen. Konjugat PEG-protein target harus dipisahkan dari campuran protein-protein yang tidak bereaksi, protein dengan pegilasi tidak spesifik, reagen PEG



yang tidak bereaksi, dan reagen-reagen lainnya yang ditambahkan saat reaksi berlangsung. Perbedaan muatan, bobot molekul, radius hidrodinamik, hidrofobisitas, dan afinitas dapat dijadikan dasar pemurnian konjugat PEG-protein. Secara umum, metode yang dipilih untuk isolasi protein terpegilasi adalah kromatografi penukar kation. Metode ini memungkinkan dilakukannya *single-step purification* yang efisien. Selain itu, suatu isomer konjugat PEG-protein dengan bobot molekul sama dapat dipisahkan berdasarkan perbedaannya (Jevsevar & Kunstelj, 2012).

Secara sederhana, protein terpegilasi dapat dikarakterisasi dengan analisis *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Pada gel akrilamid akan terlihat perbedaan yang signifikan antara waktu retensi dan mobilitas pada protein natif dan terpegilasi. *Reverse phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC) merupakan metode yang sangat baik dalam menentukan kemurnian protein terpegilasi, termasuk mengetahui jumlah protein yang terpegilasi dan tidak terpegilasi, protein teroksidasi, protein terdeamidasi, serta jika ada pemotongan *backbone* protein. Satu-satunya metode analisis yang dapat membedakan bentuk isoform protein terpegilasi dan telah digunakan untuk mengarakterisasi produk komersial (Pegasys® dan PegIntron®) adalah *cation exchange* (CE)-HPLC. Metode ini juga mampu membedakan rantai PEG dengan panjang yang berbeda-beda (Jevsevar & Kunstelj, 2012).

#### **4. Imunogenisitas dan Keamanan Protein Terpegilasi**

Efek sterik dari rantai PEG terhidrasi yang menghalangi akses enzim-enzim proteolitik menjadi dasar berkurangnya imunogenisitas protein terpegilasi. PEG juga dapat meminimalisasi terpaparnya bagian *antigenic determinant* dari protein terapeutik sehingga mencegah terbentuknya antibodi netralisasi. Oleh karena itu, pegilasi protein tidak hanya meningkatkan waktu paruh, tetapi juga dapat mengurangi toksisitas protein (Fishburn, 2008). Namun, pegilasi dapat



menyebabkan berkurangnya bioaktivitas suatu protein terapeutik, terutama dengan memengaruhi interaksi bioterapeutik dengan protein targetnya. Selain itu, sifat PEG yang tidak dapat terdegradasi juga menyebabkan terbentuknya vakuolisasi tubular ginjal. Walaupun pada dasarnya dianggap sebagai molekul yang tidak beracun, PEG ditemukan dapat bersifat imunogenik dan sebanyak 25% individu memiliki antibodi anti-PEG. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh paparan yang relatif tinggi dari molekul PEG yang terdapat di dalam produk kosmetik, makanan, maupun obat-obatan (Kontermann, 2016).

## 5. Produk Biosimilar Terpegilasi

Adagen® dan Oncaspar® ialah generasi pertama dari protein terapeutik terpegilasi yang disetujui oleh FDA. Keduanya merupakan enzim yang dipegilasi secara acak pada beberapa situs di sepanjang protein, menggunakan PEG berbobot molekul kecil (5 kDa). Berbeda dari sebelumnya, generasi kedua dari produk terpegilasi lebih beragam, baik dari jenis efektor (misalnya protein, aptamer, dan antibodi) dan karakteristik PEG (ukuran dan bentuk). Jenis protein terpegilasi yang telah disetujui oleh FDA berikut situs penempelan, jenis PEG, dan protein target terangkum pada Tabel 7.6.

**Tabel 7.6** Protein Terapeutik Terpeglasi yang Disetujui FDA

Tahun	Nama Dagang	Ukuran dan jenis PEG (Da)	Posisi PEG	Berat molekul obat (kDa)	Protein target	Indikasi	Perusahaan	Referensi
1990	Adagen®	5000 banyak Linier	Acak pada residu lisin	96–126	Adenosine deaminase	Severe combined immunodeficiency (SCID)	Enzon	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Booth & Gaspar (2009)
1994	Oncaspar®	5000 Multiple linier	Acak pada residu lisin	483–548	Asparaginase	Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Enzon	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2000	PEG-INTRON®	12.000 Tunggal Linier	Acak pada residu lisin	31	Interferon alpha 2B	Hepatitis C	Schering Plough	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Bukowski dkk. (2002)
2001	PEGASYS®	40.000 Tunggal Bercabang	Acak pada asam amino lisin	60	Interferon alpha 2A	Hepatitis C kronis	Hoffman-La Roche	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Reddy, Modi, & Pedder (2002)
2002	Neulasta® Pegfilgrastim	20.000 Tunggal Linier	Spesifik pada N-terminal	39	GCSF	Neutropenia	Amgen	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Mollineux (2004)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Tahun	Nama Dagang	Ukuran dan jenis PEG (Da)	Posisi PEG	Berat molekul obat (kDa)	Protein target	Indikasi	Perusahaan	Referensi
2003	Somavert® Pegvisomant	5000 5-6 linier	Acak pada lisin dan N-terminal	42-52	Human growth hormone	Acromegaly	Pfizer	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2004	Macugen® Pegaptanib	40.000 bercabang	Lisin	50	Anti VEGFc aptamer	Age related macular degeneration	Pfizer	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2007	Mircera® Peg-epoetin beta	30.000 linier	Acak pada residu lisin	60	mPEG-epoetin beta	Anemia associated with chronic renal failure	Hoffman La-Roche	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2008	Cimzia®	40.000 bercabang	Spesifik C-terminal	91	Fab fragment anti-TNF	Crohn's disease, axial spondyloarthritis	UCB	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2010	Krystexxa® Pegloticase	10.000 9-10 molekul	Acak pada residu lisin	540	Uricase	Chronic gout	Savient pharmaceutical	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2011	Sylatron®	12.000 linier	Acak pada residu histidin, sistein, lisin, serin, tyrosine	31	Interferon alfa 2B	Melanoma (adjuvant therapy for cancer)	Merck	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Tahun	Nama Dagang	Ukuran dan jenis PEG (Da)	Posisi PEG	Berat molekul obat (kDa)	Protein target	Indikasi	Perusahaan	Referensi
2012	Omontys® Peginesatide	40.000 bercabang	Acak pada residu lisin	45	<i>Peptide-Erythropoietin stimulating agent</i>	Anemia associated with chronic kidney failure	Affymax/ Takeda	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Hermanson dkk. (2016)
2014	Plegridy®	20.000	N-terminal	44	Interferon beta 1	Multiple sclerosis	Biogen	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018)
2015	Adynovate®	20.000	Lisin	284	Full length recombinant FVIII	Hemophilia A	Baxalta	Turecek dkk. (2016); Santos dkk. (2018); Wynn & Gumuscu (2016)

Sumber: Dari berbagai sumber

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## D. Glikosilasi Protein Terapeutik

Pembersihan cepat dan aktivitas yang rendah merupakan kekurangan dari banyak protein dan peptida terapeutik. Beberapa strategi yang dapat dilakukan untuk mengatasi kendala tersebut antara lain dengan pegilasi protein, konstruksi protein dimer, atau memfusi protein terapeutik dengan protein lain yang memiliki kemampuan untuk memperpanjang waktu paruh. Namun, hilangnya aktivitas, berubahnya struktur protein, efikasi yang rendah, sulitnya proses pembuatan, atau terbentuknya antibodi netralisasi merupakan keterbatasan yang dihasilkan dari metode-metode tersebut (Elliot dkk., 2003).

Teknik glikosilasi, yakni penambahan rantai oligosakarida terhadap suatu peptida atau protein melalui ikatan glikosidik, merupakan pendekatan alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan profil farmakokinetik protein terapeutik (Fares, 2012). Komponen karbohidrat pada suatu protein memiliki fungsi biologis yang penting dalam mempertahankan stabilitas molekuler, kelarutan, aktivitas *in vivo*, waktu paruh, dan imunogenisitas. Secara khusus, komponen asam sialat pada karbohidrat dapat memperpanjang waktu paruh protein terapeutik (Sinclair & Elliot, 2005).



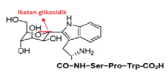

Pada teknik glikosilasi, suatu sekuen konsensus diintroduksi pada peptida atau protein terapeutik melalui teknologi DNA rekombinan. Sekuen konsensus ini nantinya akan dikenali oleh sistem ekspresi protein pada sel inang untuk ditambahkan jenis karbohidrat tertentu, baik pada saat translasi maupun pascatranslasi. Protein yang telah melalui tahap tersebut akan memiliki peningkatan jumlah karbohidrat yang mengandung asam sialat, mengakibatkan peningkatan pada waktu paruh dan aktivitas *in vivo* (Fares, 2012; Sinclair & Elliot, 2005).

### 1. Tipe Glikosilasi Protein

Oligosakarida memiliki peranan penting dalam banyak mekanisme pengenalan, persinyalan, dan peristiwa adhesi yang terjadi di dalam dan antarsel. Bagian karbohidrat juga membantu dalam pelipatan dan sekresi protein. Tidak seperti polimer asam amino dan asam nukleat,

rantai karbohidrat dibuat secara enzimatik yang mekanismenya berlawanan dengan biosintesis dari cetakan yang telah ditentukan. Oleh karena itu, proses glikosilasi menghasilkan keragaman pada jumlah unit dan pola penempelan gugus gula (Sinclair & Elliot, 2005). Glikosilasi diklasifikasikan menjadi 4 kategori, yakni *O-linked*, *N-linked*, *C-linked*, dan *glycosylphosphatidylinositol* (GPI)-anchored protein (Sinclair & Elliot, 2005). Namun, glikosilasi *N-linked* masih menjadi primadona dalam modifikasi protein terapeutik. Tabel 7.7 menjelaskan tipe-tipe glikosilasi protein.

**Tabel 7.7** Tipe-Tipe Glikosilasi Protein

Tipe Glikosilasi	Situs Penempelan	Fungsi	Referensi
<p>N-glikosilasi</p>  <p>N-linked GlcNAc (N)</p>	Gugus amida pada residu aspargin	<p>Mereduksi makro-heterogenisitas</p> <p>Mereduksi mikro-heterogenisitas</p> <p>Mengelimnasi residu gula <i>non human</i> yang berpotensi imunogenik</p>	Dicker & Strasser (2015); Jacobs & Callewaert (2009)
<p>O-glikosilasi</p>  <p>O-linked GalNAc (O)</p>	Gugus hidroksil pada residu serin, treonin, hidroksiprolin, hidroksilisil dan tirosin	<p>Berperan penting dalam pelipatan protein</p>	Vasudevan & Haltiwanger (2014)
<p>C-glikosilasi</p>  <p>C-linked glycosidiks</p> <p>CO-NH-Ser-Pro-Trp-CO<sub>2</sub>H</p>	Atom C pada asam amino triptofan	<p>Berperan penting dalam pelipatan protein dan penargetan substrat protein</p>	Ihara dkk. (2015)
<p><i>Glycosylphosphatidylinositol</i> (GPI)-anchored</p>  <p>Diagram of GPI-anchored protein structure</p>	Situs ω pada C-terminal protein	<p>Sebagai jangkar bagi protein yang akan ditempelkan pada membrane</p>	Paulick & Bertozzi (2008); Ikezawa (2002); Kinoshita & Fujita (2016)

Sumber: Dari berbagai sumber

## 2. Peran Glikosilasi Protein

Glikosilasi protein memiliki dua peranan penting. Pertama, glikan yang terikat pada protein dapat memodulasi sifat biokimia protein, seperti bioaktivitas, pelipatan, dan imunogenisitas. Kedua, glikan tersebut dapat berfungsi sebagai determinan pada proses pengenalan molekuler, seperti penargetan enzim tertentu pada lisosom atau penangkapan asialoglikoprotein oleh reseptor hepar. Situs glikosilasi dan tipe struktur glikan merupakan pengaruh utama dalam memodulasi aktivitas biologis protein (Cumming, 1991).

Glikosilasi N-linked merupakan modifikasi yang paling kompleks dan banyak terjadi di sel eukariot (Lee dkk., 2015). Efek N-glikosilasi pada sifat biofisika protein bergantung pada lokasi, lingkungan sekitar situs glikosilasi, serta jumlah glikan. Ukuran glikan tidak berpengaruh signifikan, biasanya dua atau tiga gugus gula pertama dari suatu glikan yang besar bertanggung jawab terhadap hampir seluruh efek stabilisasi (Lisowska & Jaskiewicz, 2012).

Glikan terlibat pada hampir semua aktivitas biologis, dari fertilitasi, proliferasi sel, persinyalan sel, diferensiasi sel, perkembangan, respons imunitas, interaksi inang-patogen, aktivitas hormonal, dan sebagainya. Hilangnya glikosilasi secara utuh memiliki efek mematikan, sedangkan cacat pada sintesis glikan menyebabkan sejumlah penyakit multisistemik serius yang dikenal sebagai *congenital disorders of glycosylation*. Selain itu, perubahan pada glikosilasi telah diamati pada berbagai macam penyakit, termasuk kanker, diabetes, autoimun, inflamasi, neurodegeneratif, dan penyakit menular (Krištić & Lauc, 2017).

## 3. Pengaruh Glikan terhadap Waktu Paruh Protein

Suatu protein tunggal dapat terlikosilasi pada beberapa situs yang berbeda-beda dan glikan yang menempel pada situs tersebut dapat bervariasi. Oleh karena itu, suatu glikoprotein yang sama dapat memiliki banyak varian glikosilasi yang perbedaannya hanya terletak pada bagian glikannya saja. Sebelumnya, telah diketahui bahwa perbedaan pada residu gula terminal dan jumlah cabang dari suatu glikan dapat



memengaruhi waktu paruh beberapa glikoprotein membran dan sirkuler (Partridge dkk., 2004).

Ashwell dan Morell (1974) melaporkan adanya perbedaan dramatis antara waktu paruh protein terglykosilasi natif (glikan diterminasi oleh asam sialat) ( $t_{1/2} = \sim 56$  jam) dan protein yang terdeglikosilasi parsial (glikan diterminasi oleh glukosa) ( $t_{1/2} = < 30$  menit). Selanjutnya, diketahui bahwa glikan yang diterminasi oleh gugus galaktosa menyebabkan protein yang terdeglikosilasi parsial cepat hilang dari peredaran darah. Ini bisa terjadi karena adanya endositosis spesifik yang dimediasi oleh reseptor asialoglikoprotein—yang diekspresikan oleh hepatosit. Selain itu, dilaporkan juga bahwa glikoprotein dengan glikan yang diterminasi oleh gugus manosa, GlcNAc atau fukosa mudah dihilangkan dari peredaran darah karena adanya interaksi spesifik dengan *mammalian lectin-like receptor* yang diekspresikan oleh beberapa jenis sel.

Studi awal mengenai pengaruh variasi gugus gula pada terminal glikan menyoroti empat fakta penting terkait dengan pengaruh glikan permukaan pada sifat glikoprotein yang bersirkulasi (Sola & Griebenow, 2009). Pertama, protein dengan pola glikosilasi yang tidak sesuai akan cepat hilang dari peredaran darah melalui mekanisme berbasis reseptor spesifik. Kedua, protein terglykosilasi natif (glikan diterminasi oleh asam sialat) memiliki waktu paruh yang lebih panjang dibandingkan protein tidak terglykosilasi dan terglykosilasi parsial. Ketiga, penambahan asam sialat dan glikan berkorelasi dengan bertambahnya waktu paruh protein. Keempat, berdasarkan pola glikosilasinya, protein dapat ditargetkan pada tipe jaringan atau organ tertentu.

#### **4. Rekayasa Glikosilasi dalam Memproduksi Protein Terapeutik**

Telah diketahui bahwa jumlah dan komposisi glikan memiliki peranan penting dalam pelipatan protein, kelarutan, dan mekanisme lalu lintas intraseluler. Bergantung pada spesies, tipe sel, dan status fisiologis sel inang, pola glikosilasi dari glikoprotein rekombinan dapat berbeda

secara signifikan. Secara struktural, glikan pada glikoprotein cukup beragam dan terdiri dari satu set monosakarida yang dihubungkan oleh jenis ikatan yang bermacam-macam. Proses glikosilasi pada RE dan badan golgi diketahui menghasilkan struktur glikan yang heterogen (Dicker & Strasser, 2015). Oleh sebab itu, berbagai strategi dilakukan untuk mengatasi heterogenitas glikan pada glikoprotein rekombinan, termasuk rekayasa glikosilasi secara *in vivo* dan *in vitro* dalam rangka menghasilkan glikoprotein terapeutik yang homogen. Pembuatan glikoprotein rekombinan dengan pola glikosilasi yang didesain khusus sangat penting untuk mengetahui fungsi dari berbagai jenis glikan dan juga untuk mendapatkan generasi baru glikoprotein terapeutik dengan aktivitas biologis yang lebih baik.

## 5. Pemilihan Sel Inang untuk Ekspresi Protein Terapeutik Terglikosilasi

Salah satu faktor yang berpengaruh dalam proses glikosilasi adalah tipe sel inang yang digunakan. Sel inang yang berbeda tentunya juga memiliki enzim-enzim yang berlainan. Hal tersebut akan memengaruhi spesifisitas dan heterogenitas pada profil glikosilasi dan efikasi pada produk terapeutiknya. Sebagai contoh, *Glucocerebrosidase* (GC) rekombinan secara potensial dapat diproduksi menggunakan tanaman *Arabidopsis thaliana* dan *Nicotiana benthamiana*. Kedua tanaman tersebut umumnya memproduksi glikoprotein dengan struktur oligomanosa yang penting dalam efikasi GC untuk pengobatan *Gaucher's disease* (He dkk., 2012; Limkul dkk., 2016). Namun, strategi rekayasa glikosilasi lainnya masih diperlukan untuk mencegah penempelan gugus gula spesifik tanaman ( $\beta$ -1,2-xilosa dan 1,3-fukosa) dalam upaya menurunkan risiko timbulnya reaksi imunogenisitas.

Glikosilasi protein rekombinan pada sistem ekspresi non-mamalia tentunya berbeda dengan manusia sehingga memiliki aplikasi yang terbatas dalam memproduksi glikoprotein terapeutik. Sel mamalia merupakan sistem ekspresi utama yang digunakan untuk memproduksi 60% dari obat-obatan berbasis rekombinan (Goh & Ng,

2018). Terdapat contoh sistem ekspresi sel mamalia dan nonmamalia yang umum digunakan untuk memproduksi glikoprotein terapeutik (Tabel 7.8).

**Tabel 7.8** Beberapa Sistem Ekspresi Untuk Memproduksi Glikoprotein Terapeutik

Sistem Ekspresi	Keuntungan	Produk Glikoprotein Terapeutik	Referensi
<i>Chinese hamster ovary</i> (CHO) (sel mamalia non-manusia)	Memiliki kemampuan beradaptasi dan tumbuh pada suspensi kultur skala industri. Memiliki risiko yang kecil karena hanya sedikit virus manusia yang dapat berpropagasi di dalamnya. Dapat tumbuh pada media bebas serum. Dapat melakukan modifikasi pascatranslasi dan menghasilkan protein bersifat bioaktif dan biokompatibel pada tubuh manusia.	Siltuximab (SYLVANT®) Pertuzumab (PERJETA®) Daratumumab (DARZALEX®) Mepolizumab (NUCALA®) Human DNase (PULMOZYME®)	Lalonde & Durocher (2017); Lai, Yang & Ng (2013)
HT-1080 (sel manusia)	Dapat mengekspresikan gen skala besar. Mudah tumbuh pada suspensi kultur bebas serum. Memiliki pertumbuhan yang relatif cepat. Menghasilkan glikan yang tidak imunogenik.	Epoetin delta (DYNEPO®) Idursulfase (ELAPRASE®) Velaglucerase alfa (VPRIV®)	Lalonde & Durocher (2017); Swiech dkk. (2015)
<i>Yeast</i> (sel inang non-mamalia)	Mudah tumbuh dengan cepat dan menghasilkan produk yang melimpah	Ocriplasmin (JETREA®) Catridecagog (TRETTE®)	Lalonde & Durocher (2017)

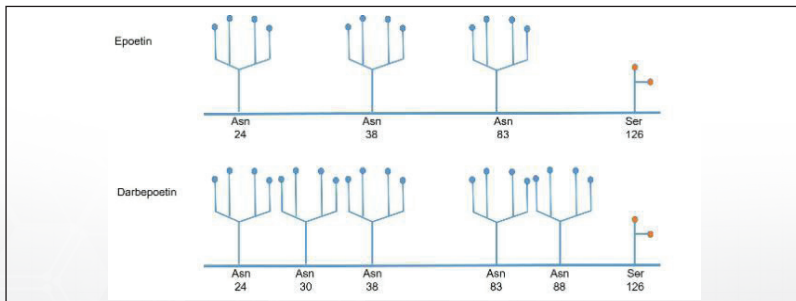
Sumber: Dari berbagai sumber

## 6. Produk Glikoprotein Terapeutik

Eritropoietin ialah hormon glikoprotein yang berperan dalam meregulasi eritropoiesis dengan tujuan menjaga jumlah optimum sel darah merah dalam tubuh. *Recombinant human erythropoietin* (rHu-EPO) memiliki bobot molekul 30,4 kDa dan terdiri dari 165 asam amino. Sebanyak 40% komposisi molekulnya terdiri dari karbohidrat, di dalamnya terdapat 1 *O-linked* dan 3 *N-linked* glikan. Rantai *N-linked* glikan pada rHu-EPO terdapat pada asam amino N24, N38, N83, sedangkan untuk *O-linked* glikan terdapat pada asam amino S126 (Egrie & Browne, 2002).

Darbepoetin alfa merupakan hasil rekayasa genetik dari eritropoietin yang diproduksi pada sel *chinese hamster ovary* (CHO) dan terdapat substitusi 5 asam amino (N30, T32, V87, N88, T90) yang menghasilkan 2 situs *N-glikosilasi* baru (Gambar 7.9). Oleh karena itu, berbeda dengan rHu-EPO, darbepoetin alfa memiliki 5 *N-linked* glikan, berbobot molekul 37,1 kDa, dan komposisi karbohidrat sebesar 51%. Adanya penambahan komposisi karbohidrat menjadikan darbepoetin alfa memiliki waktu paruh yang lebih panjang, aktivitas biologis yang meningkat serta dapat menurunkan afinitas reseptor jika dibandingkan epoetin alfa dan epoetin beta (Powell & Gurk-Turner, 2002).

Secara farmakologi, rHu-EPO dan darbepoetin alfa berikatan dengan reseptor eritropoietin pada sel progenitor eritroida. Ikatan



Sumber: Diadaptasi dari Jelkmann (2007)

**Gambar 7.9** Perbedaan susunan asam amino terlikosilasi pada epoetin dan darbepoetin alfa.

tersebut akan menstimulasi proses diferensiasi sel progenitor menjadi sel darah merah matang serta menghambat terjadinya apoptosis. Secara *in vitro*, afinitas reseptor EPO terhadap darbepoetin alfa lebih rendah dibandingkan rHu-EPO. Namun, hal tersebut tidak berarti bahwa darbepoetin alfa memiliki potensi yang lebih kecil secara *in vivo*. Adanya penambahan 2 rantai karbohidrat N-linked diketahui menambah stabilitas metabolik secara *in vivo* serta memperpanjang waktu paruh sebesar 3 kali lipat dibandingkan rHu-EPO jika diadministrasikan secara intravena (Macdougall, 2000).

Di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, para peneliti dari Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin telah berhasil mengembangkan protein biosimilar rHu-EPO generasi kedua yang diproduksi pada sel CHO-K1. Protein tersebut memiliki modifikasi 5 N-linked glikan dengan aktivitas 0,18 ng yang setara dengan aktivitas 2 ng dari rHu-EPO komersial (Epoetin  $\alpha$ ) (Santoso, 2014). Lebih dari itu, saat ini LIPI telah bekerja sama dengan PT Biofarma untuk pengembangan produksi rHu-EPO generasi kedua secara komersial.

## E. Penutup

Kepentingan untuk mengoptimalkan sifat farmakokinetik dari suatu protein terapeutik akan terus meningkat seiring dengan semakin banyaknya produk obat biologi yang dikembangkan. Hingga saat ini, banyak peptida dan protein yang menjanjikan telah berhasil diidentifikasi dan dikembangkan di laboratorium, tetapi gagal dalam menghasilkan efek yang diinginkan secara *in vivo* karena waktu paruh yang relatif pendek dan rute penyampaiannya yang kurang tepat. Ukuran yang relatif kecil dari peptida dan protein ini juga membuatnya rentan terhadap pembersihan ginjal. Dalam hal ini, modifikasi protein terapeutik dapat dipertimbangkan untuk mengatasi berbagai masalah yang timbul pada protein terapeutik generasi pertama. Meningkatnya efikasi dan waktu paruh, berkurangnya dosis pemberian obat, toksisitas dan efek samping, serta menghindari timbulnya respons imun negatif merupakan perubahan positif yang diharapkan dapat dicapai melalui modifikasi protein terapeutik.

## Daftar Pustaka

- Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2015). Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *Journal of Controlled Release*, 209, 120–138.
- Ashwell, G., & Morell, A. G. (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41, 99–128.
- Bailon, P., & Won, C. Y. (2009). PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1), 1–16.
- Berry, J. D. (2014). Introduction to therapeutic Fc-fusion proteins. *Therapeutic Fc-Fusion Proteins*, 217–232.
- Booth, C., & Gaspar, H. B. (2009). Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologics: Targets & Therapy*, 3, 349.
- Bukowski, R. M., Tendler, C., Cutler, D., Rose, E., Laughlin, M. M., & Statkevich, P. (2002). Treating cancer with PEG Intron: Pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 95(2), 389–396.
- Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1261–1269.
- Chiran, D. A., Litscher, G., Weber, M., Ailioaie, L. M., Ailioaie, C., & Litscher, D. (2013). Intravenous laser blood irradiation increases efficacy of etanercept in selected subtypes of juvenile idiopathic arthritis: an innovative clinical research approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 168134.
- Cumming, D. A. (1991). Glycosylation of recombinant protein therapeutics: Control and functional implications. *Glycobiology*, 1(2), 115–130.
- Czajkowsky, D. M., Hu, J., Shao, Z., & Pleass, R. J. (2012). Fc-fusion proteins: New developments and future perspectives. *EMBO Molecular Medicine*, 4(10), 1015–1028.
- De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D. B., Laccetti, P., Piccoli, R., & D'Alessio, G. (2004). A fully human antitumor immuno



- RNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Research*, 64(14), 4870–4874.
- Dicker, M., & Strasser, R. (2015). Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(10), 1501–1516.
- Dozier, J., & Distefano, M. (2015). Site-specific PEGylation of therapeutic proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25831–25864.
- Duttaroy, A., Kanakaraj, P., Osborn, B. L., Schneider, H., Pickeral, O. K., Chen, C., Zhang, G., Kaithamana, S., Singh, M., Schulingkamp, R., Crossan, D., Cock, J., Kaufman, T. E., Reavey, P., Carey-Barber, M., Krishnan, S. R., Garcia, A., Murphy, Siskind, K. K., ... Blondel, O. (2005). Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology. *Diabetes*, 54(1), 251–258.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., ... Egrie, J. (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology*, 21(4), 414.
- Egrie, J. C., & Browne, J. K. (2002). Development and characterization of darbepoetin alfa. *Oncology* 16(10SUPP/11), 13–22.
- Elsadek, B., & Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery—New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 4–28.
- Fares, F. (2012). *Half-life extension through O-glycosylation* (hlm. 81–94). Wiley.
- Fishburn, C. S. (2008). The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), 4167–4183.
- Goh, J. B., & Ng, S. K. (2018). Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 851–867.
- He, X., Galpin, J. D., Tropak, M. B., Mahuran, D., Haselhorst, T., von Itzstein, M., Kolarich, D., Packer, N. H., Miao, Y., Jiang, L., Grabowski, G. A., Clarke, L. A., & Kermod, A. R. (2012). Production of active



- human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. *Glycobiology*, 22(4), 492–503.
- Hermanson, T., Bennett, C. L., & Macdougall, I. C. (2016). Peginesatide for the treatment of anemia due to chronic kidney disease—an unfulfilled promise. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(10), 1421–1426.
- Huang, C., & Swanson, R. V. (2013). Peptide-Fc fusion therapeutics: Applications and challenges. Dalam Stefan R. Schmidt (Ed.), *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges* (hlm. 123–142).
- Ihara, Y., Inai, Y., Ikezaki, M., Matsui, I. S. L., Manabe, S., & Ito, Y. (2015). C-mannosylation: Modification on tryptophan in cellular proteins. Dalam *Glycoscience: Biology and Medicine* (hlm. 1091–1099).
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(4), 409–417.
- Jacobs, P. P., & Callewaert, N. (2009). N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Current Molecular Medicine*, 9(7), 774–800.
- Jazayeri, J. A., & Carroll, G. J. (2012). Half-life extension by fusion to the Fc region. *Therapeutic proteins* (hlm. 157–188).
- Jelkmann, W. (2007). Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods in Enzymology*, 435, 179–197.
- Jenkins N. (2007). Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology*, 53(1–3), 121–125.
- Jevšvar, S., Kunstelj, M., & Porekar, V. G. (2010). PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 5(1), 113–128.
- Jevšvar, S., & Kunstelj, M. (2012). Half-life extension through PEGylation. *Therapeutic proteins: Strategies to modulate their plasma half-lives* (hlm. 39–61).
- Kang, J. S., DeLuca, P. P., & Lee, K. C. (2009). Emerging pegylated drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 14(2), 363–380.
- Kim, S. J., Park, Y., & Hong, H. J. (2005). Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules & Cells*, 20(1).

- Kinoshita, T., & Fujita, M. (2016). Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *Journal of Lipid Research*, 57(1), 6–24.
- Kontermann, R. E. (2016). Half-life extended biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(7), 903–915.
- Krištić, J., & Lauc, G. (2017). Ubiquitous importance of protein glycosylation. Dalam *High-throughput glycomics and glycoproteomics* (hlm. 1–12). Humana Press.
- Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, 6(5), 579–603.
- Lalonde, M. E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251, 128–140.
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21.
- Lee, H. S., Qi, Y., & Im, W. (2015). Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein data bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*, 5, 8926.
- Li, H., & d'Anjou, M. (2009). Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 678–684.
- Limkul, J., Iizuka, S., Sato, Y., Misaki, R., Ohashi, T., Ohashi, T., & Fujiyama, K. (2016). The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnology Journal*, 14(8), 1682–1694.
- Lisowska, E., & Jaskiewicz, E. (2012). *Protein glycosylation, an overview*. eLS.
- Macdougall, I. C. (2000, Juli). Novel erythropoiesis stimulating protein. Dalam *Seminars in nephrology*, 20(4), 375–381.
- Matthews, J. E., Stewart, M. W., De Boever, E. H., Dobbins, R. L., Hodge, R. J., Walker, S. E., Holland, M. C., Bush, M. A., Albiglutide Study Group. (2008). Pharmacodynamics, pharmacokinetics, safety, and tolerability of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(12), 4810–4817.

- Mishra, P., Nayak, B., & Dey, R. K. (2016). PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 337–348.
- Metzner, H. J., Weimer, T., & Schulte, S. (2012). Half-life extension by fusion to recombinant albumin. *Therapeutic proteins: Strategies to modulate their plasma half-life*. Wiley-VCH Verlag.
- Molineux, G. (2004). The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta®). *Current Pharmaceutical Design*, 10(11), 1235–1244.
- Ningrum, R. A., Herawati, N., & Wardiana, A. (2017). Development of higher molecular weight of recombinant human interferon alpha-2a by albumin fusion technology in methilotropic yeast *Pichia pastoris*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 7(1), 8–14.
- Osborn, B. L., Sekut, L., Corcoran, M., Poortman, C., Sturm, B., Chen, G., Mather, D., Hsiu, L. L., & Parry, T. J. (2002). Albutropin: a growth hormone–albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *European Journal of Pharmacology*, 456(1–3), 149–158.
- Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., & Dennis, J. W. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 306(5693), 120–124.
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, 47(27), 6991–7000.
- Powell, J., & Gurk-Turner, C. (2002, July). Darbepoetin alfa (aranesp). Dalam *Baylor University Medical Center Proceedings*, 15(3), 332–335. Taylor & Francis.
- Reddy, K. R., Modi, M. W., & Pedder, S. (2002). Use of peginterferon alfa-2a (40 KD)(Pegasys®) for the treatment of hepatitis C. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4), 571–586.
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2012). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 116–127.

- Rogers, B., Dong, D., Li, Z., & Li, Z. (2015). Recombinant human serum albumin fusion proteins and novel applications in drug delivery and therapy. *Current Pharmaceutical design*, 21(14), 1899–1907.
- Santos, J. H. P. M., Torres-Obreque, K. M., Meneguetti, G. P., Amaro, B. P., & Rangel-Yagui, C. O. (2018). Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(SPE).
- Santoso, A. (2014). Expression of modified recombinant human erythropoietin in cho-kl cells and its in vitro proliferation assay in TF-1 CELLS. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 25(1), 9.
- Sharma, T., Velmurugan, N., Patel, P., Chon, B. H., & Sangwai, J. S. (2015). Use of oil-in-water pickering emulsion stabilized by nanoparticles in combination with polymer flood for enhanced oil recovery. *Petroleum Science and Technology*, 33(17–18), 1595–1604.
- Schmidt, S. R. (2009). Fusion-proteins as biopharmaceuticals—applications and challenges. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12(2), 284–295.
- Schmidt, S. R. (Ed.). (2013). *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges*. John Wiley & Sons.
- Schmidt, S. R. (2014). Fusion protein with toxic activity. *Therapeutic Fc-fusion proteins* (hlm. 253–265).
- Sinclair, A. M., & Elliott, S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1626–1635.
- Solá, R. J., & Griebenow, K. A. I. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1223–1245.
- Strohl, W. R. (2015). Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *BioDrugs*, 29(4), 215–239.
- Sun, C., Wirsching, P., & Janda, K. D. (2003). Enabling ScFvs as multi-drug carriers: a dendritic approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(8), 1761–1768.
- Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., & Zhang, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 33(1), 102.

- Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F., & Ivens, I. A. (2016). PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 460–475.
- Vasudevan, D., & Haltiwanger, R. S. (2014). Novel roles for O-linked glycans in protein folding. *Glycoconjugate Journal*, 31(6–7), 417–426.
- Volovat, C., Gladkov, O. A., Bondarenko, I. M., Barash, S., Buchner, A., Bias, P., Adar, L., & Avisar, N. (2014). Efficacy and safety of balugrastim compared with pegfilgrastim in patients with breast cancer receiving chemotherapy. *Clinical Breast Cancer*, 14(2), 101–108.
- Weimer, T., Metzner, H. J., & Schulte, S. (2013). Recombinant albumin fusion proteins. Dalam Stefan R. Schmidt (ed.), *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges* (hlm. 163–178). John Wiley & Sons, Inc.
- Woo, J. H., & Frankel, A. (2013). Classic immunotoxins with plant or microbial toxins. Dalam Stefan R. Schmidt (ed.), *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges* (hlm. 271–293). John Wiley & Sons, Inc.
- Wynn, T. T., & Gumuscu, B. (2016). Potential role of a new PEGylated recombinant factor VIII for hemophilia A. *Journal of Blood Medicine*, 7, 121.
- Yao, Z., Dai, W., Perry, J., Brechbiel, M. W., & Sung, C. (2004). Effect of albumin fusion on the biodistribution of interleukin-2. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(5), 404–410.
- Yuliawati, Soejoedono, R. D., & Fuad, A. M. (2014, Juni). Construction and expression of immunotoxin anti EGFRvIII scFv-HPR conjugate in *Pichia pastoris* as a targeted drug candidate for cancer therapy. *ANNALES BOGORIENSES*, 18(1), 13–23.
- Zeuzem, S., Sulkowski, M. S., Lawitz, E. J., Rustgi, V. K., Rodriguez-Torres, M., Bacon, B. R., Grigorescu, M., Tice, A. D., Lurie, Y., Cianciara, J., Muir, A. J., Cronin, P. W., Pulkstenis, E., Subramanian, G. M., McHutchison, J. G., & ACHIEVE-1 Study Team. (2010). Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- $\alpha$  in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1. *Gastroenterology*, 139(4), 1257–1266.

- Zhang, L., Wang, L., Meng, Z., Gan, H., Gu, R., Wu, Z., Gao, L., Zhu, X., Sun, W., Li, J., Zheng, Y., & Dou G. (2014). A novel exendin-4 human serum albumin fusion protein, E2HSA, with an extended half-life and good glucoregulatory effect in healthy rhesus monkeys. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), 511–516.
- Zhao, H. L., Yao, X. Q., Xue, C., Wang, Y., Xiong, X. H., & Liu, Z. M. (2008). Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon- $\alpha$ 2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expression and Purification*, 61(1), 73–77.



## BAB VIII

# Formulasi Protein Terapeutik Rekombinan

*Riyona Desvy Pratiwi, Hariyatun, dan Ratih Asmana Ningrum*

### A. Pendahuluan

Formulasi merupakan bagian yang penting dari pengembangan protein terapeutik rekombinan karena memengaruhi keberhasilan penyampaian pada target terapi. Protein terapeutik rekombinan yang tidak mencapai target terapi dengan baik, tentu tidak dapat menghasilkan respons pengobatan yang optimal. Formulasi meliputi beberapa aspek, yaitu formula, metode pembuatan, proses pembuatan, peralatan, dan pengemasan (Ansel, 2005).

Formulasi protein terapeutik rekombinan yang merupakan suatu makromolekul memberikan tantangan yang lebih besar dibandingkan formulasi sediaan farmasi pada umumnya yang berbahan aktif mikromolekul. Hal ini disebabkan oleh tiga hal krusial yang harus diperhatikan dalam memformulasikan protein terapeutik rekombinan. Ketiga hal tersebut adalah pertimbangan stabilitas protein terapeutik rekombinan, pertimbangan bobot molekul protein yang besar, dan pertimbangan mikrobiologis (Crommelin, 2013; Frokjaer & Otzen, 2005).

Pertimbangan utama dalam formulasi protein terapeutik rekombinan adalah faktor terkait dengan stabilitas protein yang



lebih rendah dibandingkan mikromolekul. Sedikit perubahan pada kondisi penyimpanan (misalnya kelembapan, temperatur, pH, dan cahaya), dapat mengubah struktur protein, padahal aktivitas protein dipengaruhi oleh struktur protein tersebut yang terdiri dari empat tingkat, yakni struktur primer, sekunder, tersier, dan kuarterner. Perubahan struktur protein dapat menghilangkan aktivitas biologis protein. Struktur tersier dan kuarterner sangat rentan dipengaruhi oleh ketidaksesuaian kondisi penyimpanan. Sebaliknya, aktivitas mikromolekul sebagian besar dipengaruhi oleh struktur primer saja, dan hanya sebagian kecil yang dipengaruhi oleh struktur primer dan sekunder. Selain itu, interaksi protein terapeutik rekombinan dengan bahan-bahan eksipien yang tidak sesuai dapat menyebabkan reaksi reduksi-oksidasi. Dengan demikian, kompatibilitas semua bahan yang digunakan dalam formulasi protein terapeutik rekombinan harus diperhitungkan dengan baik (Kamerzell dkk., 2011).

Pertimbangan lain dalam formulasi protein terapeutik rekombinan adalah bobot molekul protein yang besar dapat mengurangi permeabilitas untuk melintasi kulit, membran mukosa, dan membran sel sehingga sulit diabsorpsi oleh tubuh dan menyebabkan bioavailabilitas protein terapeutik rendah. Dengan demikian, rute pemberian yang bisa diaplikasikan untuk sediaan dengan bahan aktif protein terapeutik pun terbatas. Injeksi masih merupakan rute pemberian utama untuk penghantaran protein terapeutik sampai saat ini (Chaurasia, 2016).

Pertimbangan mikrobiologis yang meliputi dekontaminasi mikroba dan dekontaminasi pirogen juga perlu diperhatikan dalam formulasi protein terapeutik rekombinan. Ketiga parameter tersebut menjadi syarat yang harus dipenuhi untuk sediaan farmasi, khususnya sediaan injeksi. Namun, tidak semua metode sterilisasi dapat diaplikasikan untuk protein terapeutik rekombinan. Metode sterilisasi panas, seperti autoklaf, tidak dapat digunakan karena merusak stabilitas protein terapeutik. Pada umumnya, metode sterilisasi yang digunakan untuk protein terapeutik rekombinan adalah metode sterilisasi filter, sinar radiasi, ataupun kimia (Crommelin, 2013).

Probabilitas terjadinya kontaminasi mikroba dan pirogen dalam produk protein terapeutik rekombinan sangat besar karena untuk memproduksi bahan aktif protein tersebut digunakan sel inang mikroba, seperti bakteri, virus, dan *yeast*. Sisa-sisa mikroba maupun pirogen yang dihasilkannya harus dihilangkan dari produk protein terapeutik rekombinan (Crommelin, 2013).

Formulasi protein terapeutik rekombinan dalam bentuk sediaan injeksi atau dalam bab ini disebut sebagai formulasi konvensional memiliki beberapa kekurangan, antara lain spesifisitas rendah pada target terapi tertentu, hanya untuk pelepasan cepat, dan mudah dieliminasi dari tubuh. Oleh karena itu, sejak dua dekade terakhir, formulasi protein terapeutik rekombinan tidak hanya difokuskan pada sediaan injeksi sederhana atau konvensional. Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengembangkan *advanced dosage form* protein terapeutik rekombinan, meskipun belum banyak yang dipasarkan dan digunakan secara klinis. Berbagai strategi dapat diterapkan dalam pengembangan *advanced dosage form* untuk mengatasi kekurangan dari formula konvensional. Strategi tersebut terkait dengan tujuan formulasi *advanced dosage form* protein terapeutik rekombinan, yaitu untuk pelepasan berkelanjutan, meningkatkan bioavailabilitas, penghantaran spesifik ke target terapi tertentu, penghantaran intraseluler atau sitosolik, dan penghantaran non-invasif.

## **B. Preformulasi Protein Terapeutik Rekombinan**

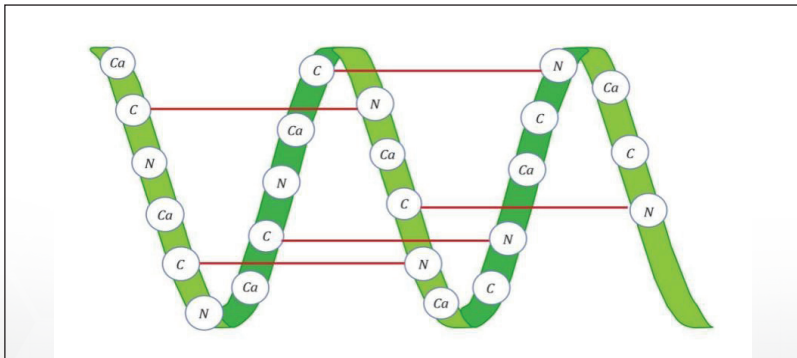
Preformulasi bertujuan mengumpulkan semua informasi berupa data hasil penelitian ataupun studi literatur yang terkait dengan karakteristik protein terapeutik sebelum dilakukan proses formulasi. Karakteristik protein erat kaitannya dengan struktur protein. Karakterisasi protein dapat dilakukan dengan berbagai metode sesuai dengan tingkat struktur protein yang dianalisis (Chaurasia, 2016).

Struktur primer protein yang berupa untai residu asam amino penyusun protein dapat dikarakterisasi dengan metode spektrometri massa. Melalui informasi residu asam amino penyusun protein, sifat fisikokimia protein (seperti asam atau basa, dan bermuatan atau tidak

bermuatan), dapat diketahui. Selain itu, hidrofobisitas dari asam amino penyusun struktur primer menentukan pelipatan protein. Interaksi antar-asam amino dapat membentuk struktur sekunder melalui ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus amida dan gugus karboksil. Gugus amida sebagai donor hidrogen dan gugus karboksil sebagai reseptor hidrogen (Arakawa & Philo, 2013).

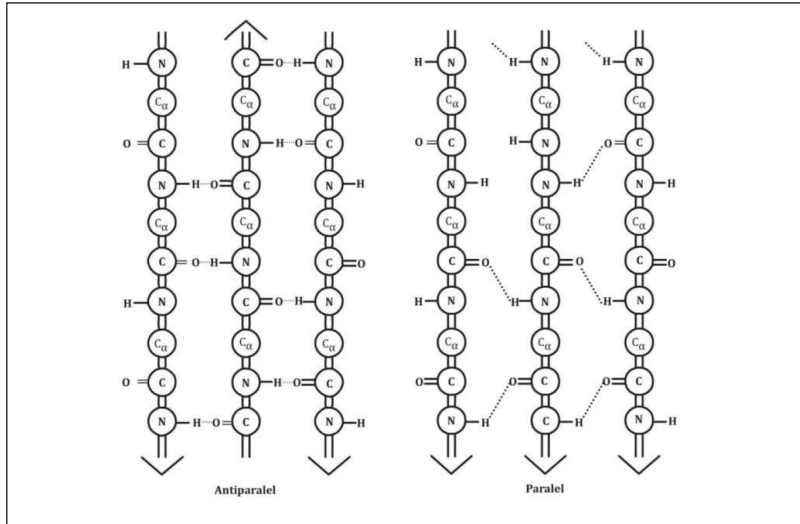
Struktur sekunder terdiri dari konformasi alfa heliks dan beta *sheet*. Struktur alfa heliks dibentuk oleh ikatan hidrogen antara gugus amida dan karboksil yang berdekatan di tiap empat asam amino (Gambar 8.1). Struktur beta *sheet* dibentuk dari ikatan hidrogen antara gugus amida dan karboksil yang berjauhan dengan region yang berbeda. Struktur beta *sheet* terdiri dari struktur paralel dan antiparalel (Gambar 8.2). Analisis konformasi struktur sekunder protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti spektrofotometri *ultraviolet-circular dichroism* (UV-CD), spektroskopi *fourier transform infrared* (FT-IR), dan spektroskopi raman (Pelton & McLean, 2000).

Alfa heliks dan beta *sheet* dari suatu protein bergabung menjadi suatu konformasi globular yang kompak membentuk struktur tersier. Sejumlah struktur tersier yang bergabung dengan sesamanya membentuk struktur kuarterner (Gambar 8.3). Konformasi struktur



Sumber: Digambar ulang dari Arakawa & Philo (2013)

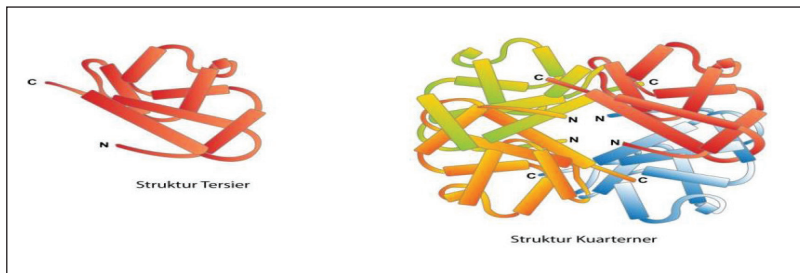
**Gambar 8.1** Struktur alfa heliks dari protein yang terbentuk dari interaksi gugus amida dan karboksil yang berdekatan dari tiap empat asam amino



Ket.: Struktur beta sheet terbentuk dari interaksi gugus amida dan karboksil dari region yang berbeda

Sumber: Digambar ulang dari Arakawa dan Philo (2013)

**Gambar 8.2** Struktur Beta Sheet dari Protein: Antiparalel dan Paralel



Sumber: Digambar ulang dari University of Alaska-Fairbanks (t.t.)

**Gambar 8.3** Struktur Tersier dan Kuartener dari Protein

tersier dan kuartener ini bisa dianalisis dengan spektrofotometri UV-CD, spektroskopi fluoresensi, kristalografi sinar x, spektroskopi *nuclear magnetic resonance* (NMR), dan mikroskopi krioelektron (Lodish dkk., 2000).

Informasi mengenai karakterisasi keempat struktur protein berguna sebagai acuan jika ditemukan kerusakan pada setiap tingkat struktur. Kerusakan pada struktur primer protein berupa degradasi asam amino. Kerusakan pada struktur sekunder dan tersier berupa kesalahan pelipatan protein dan terbukanya lipatan protein. Kerusakan pada struktur tersier ditandai dengan terbentuknya agregat dan disosiasi protein. Kerusakan tersier ini dapat terlihat jelas dengan kasat mata jika terjadi distabilitas protein (Lehninger, 1982).

Beberapa karakteristik protein terapeutik perlu diketahui sebelum dilakukan formulasi. Karakteristik tersebut, yaitu warna, profil termo analitik, higroskopisitas, kelarutan dalam pH yang sesuai, pKa, sekuen asam amino (struktur primer, sekunder, dan tersier), parameter yang terkait stabilitas (seperti pH, temperatur, kelembapan, cahaya, tekanan mekanik, dan sensitivitas terhadap oksigen), profil impuritas (seperti *misfolding*, isoform, dan impuritas dari sistem ekspresi protein), serta potensi dan profil farmakokinetik/farmakodinamik (Lehninger, 1982).

Setelah data mengenai karakteristik dan kestabilan protein dikumpulkan, tahap selanjutnya dalam preformulasi adalah penentuan spesifikasi produk jadi. Hal ini sesuai dengan prinsip pengembangan produk farmasi, yakni *quality by design*, yang artinya spesifikasi kualitas dari produk yang bersangkutan ditentukan sendiri oleh *developer* produk farmasi yang bersangkutan. Meskipun demikian, spesifikasi produk jadi tersebut harus mengacu pada monografi yang berlaku, seperti farmakope dan dokumen regulasi lain, contohnya *The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (Pramad dkk., 2016).

Spesifikasi pertama yang perlu ditetapkan adalah menentukan bentuk sediaan. Bentuk sediaan erat hubungannya dengan rute pemberian. Sediaan protein terapeutik rekombinan hampir sebagian besar diformulasikan dalam bentuk injeksi untuk penggunaan parenteral karena protein mudah terdegradasi oleh variasi pH dan enzim-enzim di dalam sistem pencernaan apabila diberikan *per-oral*. Sediaan injeksi dapat dibuat dalam bentuk cair maupun padat (liofilisasi), yang kemudian direkonstruksi dengan pelarut yang sesuai

sebelum digunakan. Setiap bentuk sediaan dibuat dengan bahan eksipien yang berbeda dan prosedur yang berbeda pula.

## C. Formulasi Konvensional Protein Terapeutik Rekombinan

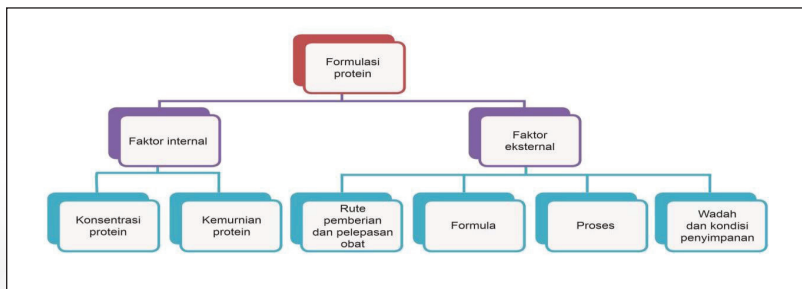
Formulasi protein terapeutik rekombinan harus dirancang sedemikian rupa agar diperoleh sediaan yang sesuai dengan spesifikasi yang telah ditentukan. Rancangan formulasi ini dibuat dengan memperhatikan faktor internal maupun eksternal yang dapat berpengaruh besar terhadap stabilitas protein dan sediaan farmasi hasil formulasi (Gambar 8.4) (Ohtake & Wang, 2013).

### 1. Faktor Internal

Faktor internal yang memengaruhi stabilitas protein, yaitu konsentrasi protein di dalam formula, sumber atau sel inang protein, dan tingkat kemurnian protein (Ohtake & Wang, 2013).

#### a. Konsentrasi protein terapeutik rekombinan di dalam formula

Konsentrasi protein harus optimal karena formula dengan konsentrasi protein yang terlalu tinggi dapat menyebabkan agregasi protein, sedangkan formula dengan konsentrasi protein yang rendah membutuhkan volume yang besar untuk mencapai dosis terapi (Shire



Sumber: Digambar ulang dari Ohtake & Wang (2013)

**Gambar 8.4** Faktor-Faktor yang Memengaruhi Rancangan Formulasi Protein Terapeutik Rekombinan



dkk., 2004). Volume yang besar tidak dianjurkan untuk sediaan injeksi. Volume maksimal untuk injeksi bervolume kecil adalah tidak lebih dari 100 mL, tetapi dalam praktik, volume maksimal sediaan injeksi bervolume kecil adalah 5 mL untuk intramuskular dan tidak lebih dari 2 mL untuk rute pemberian lain, seperti subkutan, intravena, dan intraperitoneal (Turner dkk., 2011).

#### **b. Sumber dan tingkat kemurnian protein terapeutik rekombinan**

Sumber atau sel inang protein berhubungan erat dengan kontaminan. Sebagian besar protein rekombinan diproduksi dalam sel inang, seperti bakteri, virus, atau sel eukariot (contohnya *yeast* dan sel mamalia). Oleh karena itu, protein endogen dari sel inang yang terbawa dalam protein target berpotensi mengganggu stabilitas protein tersebut. Semakin banyak kontaminan dalam suatu bahan aktif protein, akan semakin besar pula kemungkinan terjadinya distabilitas dan degradasi protein (Wang dkk., 2014).

### **2. Faktor Eksternal**

Faktor eksternal yang memengaruhi formulasi protein terapeutik rekombinan, yaitu rute pemberian dan pelepasan obat, formula, proses pembuatan, dan penyimpanan protein (Ohtake & Wang, 2013).

#### **a. Rute pemberian dan pelepasan obat**

Sediaan protein terapeutik rekombinan pada awalnya dibuat dalam bentuk sediaan injeksi untuk pemberian intravena ataupun metode parenteral lainnya. Sediaan parenteral ini biasanya dibuat dalam bentuk larutan sehingga pada rute pelepasannya tidak ada tahapan tertentu yang perlu dilewati oleh protein untuk terlepas dari bahan pembawa, kemudian terdistribusi di dalam aliran darah. Khusus untuk sediaan injeksi yang diberikan secara subkutan dan intramuskular, protein harus terabsorpsi terlebih dahulu ke dalam jaringan lemak maupun jaringan otot sebelum terdistribusi ke dalam darah (Patel dkk., 2014).



## b. Formula

Formula protein terapeutik yang konvensional identik dengan bentuk sediaan injeksi berbasis air. Eksipien yang digunakan dalam sediaan injeksi protein terapeutik rekombinan lebih kompleks dibandingkan eksipien di dalam sediaan injeksi mikromolekul. Sediaan injeksi mikromolekul pada umumnya hanya membutuhkan pelarut dan bahan untuk justifikasi pH, seperti asam/basa kuat atau asam/basa lemah. Beberapa sediaan injeksi mikromolekul juga membutuhkan antioksidan dan preservatif. Sementara itu, sediaan injeksi protein terapeutik rekombinan memerlukan sejumlah eksipien lain yang jarang digunakan dalam sediaan injeksi berbahan aktif mikromolekul. Eksipien yang sering digunakan dalam sediaan injeksi protein berbasis air, yaitu dapar (bufer), peningkat kelarutan, anti adsorpsi dan anti-agregasi, preservatif dan antioksidan, lipoprotektan, serta agen pengatur tekanan osmotik (Crommelin, 2013).

### 1) Dapar

Dapar merupakan komponen yang paling krusial dalam formula protein terapeutik karena berkaitan erat dengan kelarutan dan stabilitas protein. Dapar yang lazim digunakan untuk sediaan injeksi protein terapeutik adalah bufer fosfat, sitrat, dan asetat (Crommelin, 2013).

### 2) Peningkat kelarutan

Masalah kelarutan sering ditemukan pada protein non glikosilasi karena dapat membentuk agregat dan endapan. Pemilihan pH dan kekuatan ion yang tepat bisa memperbaiki masalah kelarutan protein. Selain itu, kelarutan protein juga dapat ditingkatkan dengan penambahan asam amino tertentu, seperti lisin dan arginin; atau penambahan surfaktan, seperti *polysorbate-80* (Crommelin, 2013).

### 3) Anti-Adsorpsi dan Anti-Agregasi

Anti-adsorpsi diperlukan untuk menghindari pengikatan protein pada dinding wadah atau alat untuk pemberian obat, contohnya kateter dan *syringe* injeksi. Bagian hidrofobik dari protein cenderung menghadap keluar mendekati antarmuka, seperti pada antarmuka air sebagai

pelarut protein dan udara, atau antarmuka protein dengan dinding wadah. Protein yang berinteraksi pada antarmuka adalah protein yang tidak terlipat dan protein yang mengalami *misfolding*. Apabila protein tersebut meninggalkan permukaan pada antarmuka, akan terbentuk agregat. Agregat yang semakin membesar menyebabkan terbentuknya endapan. Dengan demikian, untuk menghindari terbentuknya agregat dan endapan ini ditambahkan bahan yang bersifat sebagai surfaktan ke dalam formula sediaan protein yang berfungsi sebagai anti-adsorpsi (Crommelin, 2013).

#### 4) Konservatif dan antioksidan

Konservatif diperlukan dalam formula sediaan protein yang dikemas dalam wadah untuk pemakaian berulang, seperti vial sehingga kemungkinan kontaminasi pada setiap kali pengambilan sediaan dapat dihindari. Beberapa konservatif yang bisa digunakan adalah thimerosal, turunan asam benzoat, dan benzil alkohol. Protein merupakan bahan yang rentan terhadap degradasi oksidatif. Beberapa asam amino, seperti metionin, sistein, triptofan, tirosin, dan histidin, mudah teroksidasi. Asam askorbat dapat digunakan sebagai antioksidan, tetapi jika terdapat logam berat dalam formula, asam askorbat justru akan bersifat sebagai oksidan (Crommelin, 2013).

#### 5) Agen osmotik

Agen osmotik diperlukan khusus untuk sediaan injeksi bervolume besar. Sediaan injeksi harus memenuhi persyaratan isotonis untuk menghindari terjadinya pengembangan sel darah merah yang disebabkan oleh injeksi hipotonis dan pengerutan sel darah merah oleh injeksi hipertonis. Berbeda dengan sediaan injeksi protein bervolume besar, sediaan injeksi protein bervolume kecil masih diperbolehkan hipertonis karena cairan tubuh masih dapat mengencerkan sejumlah volume sediaan tersebut setelah diinjeksikan ke dalam tubuh (Crommelin, 2013).

### c. Proses

Dua komponen dasar yang perlu diperhatikan dalam proses formulasi sediaan protein terapeutik adalah peralatan dan prosedur. Peralatan

atau mesin yang digunakan untuk formulasi sediaan protein terapeutik harus kompatibel dengan bahan aktif dan eksipien, dan sebaiknya terbuat dari bahan kaca ataupun baja untuk menghindari terjadinya adsorpsi protein terapeutik pada permukaan peralatan tersebut. Pemilihan peralatan yang tepat dapat mencegah terjadinya oksidasi selama proses.

Sediaan berbahan aktif protein sangat sensitif terhadap lingkungan selama prosedur pembuatan sediaan. Pembuatan sediaan berbahan aktif protein harus dilakukan pada suhu rendah untuk menjaga stabilitas bahan aktif protein. Selain kondisi lingkungan, pencampuran bahan aktif dengan eksipien juga merupakan tahapan yang perlu diperhatikan. Urutan penambahan eksipien-eksipien harus benar-benar dipelajari terlebih dahulu. Sebagai contoh, sebelum ditambahkan eksipien lain, suatu protein perlu dicampurkan dengan dapar agar tetap stabil. Urutan penambahan eksipien ini tentu berdasarkan fungsi masing-masing eksipien. Setelah semua bahan dicampurkan, tahap selanjutnya adalah pengadukan. Optimasi pengadukan merupakan tahapan yang penting dalam proses pembuatan sediaan protein. Pengadukan yang terlalu lama dapat menyebabkan terbentuknya agregat protein, sedangkan pengadukan yang terlalu sebentar dapat mengurangi homogenitas bahan aktif protein di dalam *bulk* sediaan. Pengadukan yang terlalu cepat menyebabkan semakin tingginya stres dan gesekan yang pada akhirnya dapat mendegradasi protein (Akers, 2006).

Proses pembuatan sediaan protein terapeutik rekombinan tidak terlepas dari proses sterilisasi karena hampir semua sediaan protein terapeutik rekombinan digunakan secara parenteral. Dari dua jenis sterilisasi sediaan farmasi yang umum digunakan, yakni metode autoklaf dan filtrasi, metode filtrasi-lah yang sering dipakai untuk pembuatan sediaan farmasi berbahan aktif protein karena tidak menggunakan panas yang dapat merusak protein seperti pada metode sterilisasi autoklaf. Meskipun demikian, metode sterilisasi filtrasi juga memiliki kelemahan. Suatu protein dapat terikat pada filter jika materi filter tidak sesuai untuk protein tersebut. Jadi, perlu dilakukan studi optimasi untuk menentukan jenis filter. Selain pemilihan jenis

Buku ini tidak diperjualbelikan.

filter, ikatan antara protein dan filter dapat dicegah dengan memperhitungkan volume larutan/*bulk* protein untuk mencapai kondisi jenuh pada filter (Akers, 2006).

Tahapan kritis lainnya dalam formulasi protein adalah penyesuaian pH. Setelah semua bahan, baik bahan aktif dan eksipien, dicampur. Selanjutnya, dilakukan pengecekan pH *bulk* campuran tersebut. Jika pH yang diperoleh tidak sesuai, dilakukan penyesuaian pH. Akan tetapi, sebisa mungkin penyesuaian pH dapat dihindari. Pada *bulk* campuran dengan pH yang lebih tinggi daripada pH target, penambahan asam (meskipun sudah diencerkan) dapat menyebabkan penurunan pH yang drastis. Namun, penurunan ini hanya pada sebagian kecil dari keseluruhan *bulk* campuran sehingga akan sulit mendapatkan pH yang sesuai secara homogen. Penyesuaian pH yang berulang kali dilakukan dengan penambahan asam-basa dapat mengganggu stabilitas protein (Akers, 2006).

#### **d. Penyimpanan**

##### 1) Wadah penyimpanan atau kemasan primer

Kemasan primer adalah wadah untuk menyimpan sediaan yang kontak langsung dengan sediaan. Wadah yang sesuai untuk sediaan injeksi protein adalah dari bahan kaca. Ada dua jenis utama wadah kaca yang dapat digunakan, yaitu *lime silica* dan *borosilica*. Bahan kaca yang sering digunakan untuk sediaan parenteral adalah *borosilica* karena tahan panas, seperti pada proses sterilisasi, depirogenasi, dan liofilisasi (Pillai dkk., 2016).

Wadah vial kaca biasanya ditutup dengan *rubber stopper*. Penggunaan tutup berbahan karet ini perlu diperhatikan karena berpotensi menyerap protein, *leachable*, dan memberikan celah udara dan kelembapan masuk ke dalam wadah. Oleh karena itu, diperlukan uji kompatibilitas penggunaan tutup berbahan karet terhadap kualitas produk akhir. Wadah juga berinteraksi dengan sediaan dalam waktu yang lama. Dengan demikian, pemilihan wadah yang tidak tepat akan mempercepat degradasi protein sehingga dapat mengurangi waktu paruh dan masa kedaluwarsa obat (Pillai dkk., 2016).

## 2) Temperatur penyimpanan

Sediaan protein terapeutik tergolong ke dalam produk farmasetika yang sensitif terhadap panas. Penyimpanan untuk produk farmasetika seperti ini diatur secara ketat di dalam *guideline* pengujian stabilitas senyawa dan produk obat baru (Q1A(R2)) dan produk bioteknologi/biologi (Q5C) ICH dan World Health Organization (WHO), yakni pada temperatur 2–8°C (Guideline I.H.T., 1995; Guideline I.H.T., 2003; WHO, 2009).

## 3) Liofilisasi untuk meningkatkan stabilitas protein

Sediaan protein terapeutik rekombinan sebagian besar dibuat dalam bentuk cair berbasis air karena mudah dan ekonomis terkait proses produksi. Namun, sediaan ini memiliki masa simpan yang tidak lama dan biasanya tidak lebih dari dua tahun meskipun disimpan pada temperatur rendah. Oleh karena itu, proses pengeringan dingin atau dikenal juga dengan istilah liofilisasi dapat diaplikasikan untuk meningkatkan stabilitas protein terapeutik rekombinan selama masa penyimpanan (Crommelin, 2013).

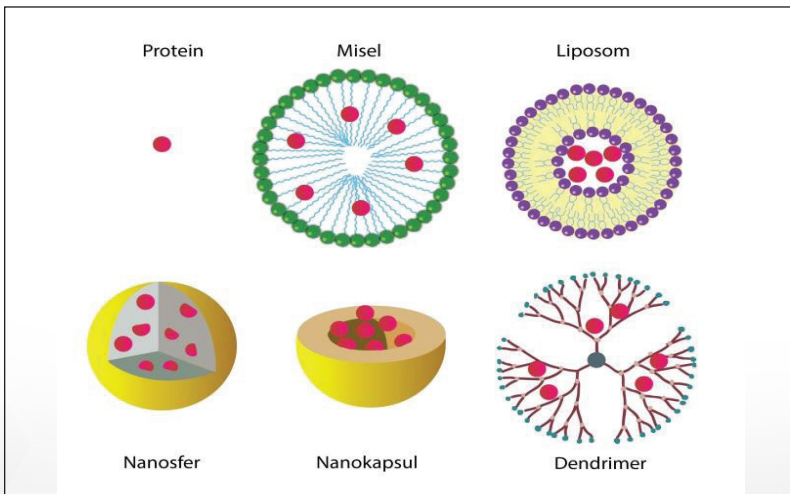
Liofilisasi terdiri dari tiga tahapan, yaitu pembekuan, pengeringan primer untuk sublimasi air yang tidak berikatan dengan protein, dan pengeringan sekunder untuk menghilangkan air yang tidak membeku atau yang berikatan dengan protein dan eksipien lain. Tiga jenis eksipien yang dibutuhkan dalam liofilisasi, antara lain *bulking agent*, seperti glisin dan manitol, untuk menghindari kehilangan protein oleh uap air saat proses liofilisasi; peningkat suhu kolaps seperti dekstran, albumin, dan gelatin; serta lioprotektan untuk menjaga struktur fisika protein, seperti gula dan albumin (Crommelin, 2013).

## D. Formulasi *Advanced Dosage Form* Protein Terapeutik Rekombinan

Pengembangan *advanced dosage form* untuk protein terapeutik rekombinan dilakukan karena adanya keterbatasan sediaan konvensional atau sediaan injeksi yang bersifat invasif dan kurang nyaman bagi pasien. Keterbatasan ini memunculkan ide untuk memformulasikan

protein terapeutik rekombinan ke dalam suatu *advanced dosage form* dengan mengemas protein tersebut ke dalam suatu partikel berukuran mikro dan nano atau ke dalam suatu sistem depot. Protein terapeutik rekombinan yang diformulasikan ke dalam *advanced dosage form* dapat diberikan dengan berbagai rute pemberian, tidak terbatas untuk digunakan secara injeksi, seperti *per-oral*, aerosol, dan topikal. Selain untuk meningkatkan kenyamanan penggunaan bagi pasien, *advanced dosage form* bertujuan meningkatkan stabilitas dan efektivitas protein tersebut untuk mencapai targetnya.

*Advanced dosage form* untuk protein terapeutik rekombinan erat kaitannya dengan enkapsulasi protein tersebut ke dalam suatu partikel, baik dalam ukuran milimeter, mikrometer ataupun nanometer. Partikel pembawa protein tersebut pun bisa bermacam-macam tergantung pada karakteristik dari protein itu sendiri dan tujuan formulasi protein tersebut, seperti liposom, misel, mikrosfer/nanosfer, dendrimer, mikrogel/nanogel, dan implan (Gambar 8.5; Ramos-



Sumber: Digambar ulang dari Ramos-Cabrer & Campos (2013)

**Gambar 8.5** *Advanced Dosage Form*: Jenis-Jenis Partikel Pembawa Protein

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Cabrer & Campos, 2013; Stolnik & Shakesheff, 2009). Setiap jenis partikel pembawa protein dibuat menggunakan bahan-bahan dan proses yang spesifik, tergantung tujuan dan strategi pengembangan *advanced dosage form* (Tabel 8.1).

**Tabel 8.1** Jenis-Jenis Mikro/Nanopartikel

Formulasi nano	Prinsip	Hasil	Limitasi	Contoh
Hidrogel	Matriks polimer 3D dengan kemampuan absorpsi sejumlah besar air dan cairan biologis	Hidrogel polimer yang melindungi insulin dari degradasi enzimatis dalam perut yang asam dan menghantar insulin dengan efektif dalam usus	Mekanisme <i>swelling</i> dan <i>deswelling</i> di bawah kondisi pH tubuh yang dapat meningkatkan pelepasan insulin yang lebih cepat dan tidak diinginkan	Matriks hidrogel responsif glukosa
Misel poli-merik	Pembawa nano yang dihasilkan dengan perakitan sendiri polimer amfifilik dalam air di atas konsentrasi miselar kritis (range ukuran: 10–100 nm)	karena ukuran nanoskopik, misel polimerik memiliki kemampuan untuk melarutkan obat hidrofobik dalam jumlah besar dan mencapai penghantaran spesifik situs	Disagregasi misel pada dilusi dalam cairan fisiologis	Misel poli-merik balik dan campuran
Liposom	Vesikel dibentuk dengan satu atau beberapa dwilapis lipid yang dibuat dari campuran fosfolipid (range ukuran: 20 nm–10 µm)	Sifat permeasi yang baik karena struktur dwilapisnya sama dengan yang ada di membran sel	Efisiensi dan stabilitas penjebaran dalam cairan biologis yang rendah	Niosom, arkaeosom



Formulasi nano	Prinsip	Hasil	Limitasi	Contoh
Nano-partikel lipid padat	Diproduksi dengan satu lipid padat tunggal dan surfaktan, dengan kisi kristalin yang sempurna ( <i>range</i> ukuran: 50–1000 nm)	Daya tahan dan biodegradabilitas, tersusun dari lipid fisiologis yang meminimalkan risiko toksisitas akut dan kronis	Efisiensi enkapsulasi insulin ke dalam inti lipid yang rendah, diperlukan temperatur tinggi untuk melelehkan lipid yang bisa memengaruhi stabilitas insulin, degradasi lambat	Konjugat obat lipid
Nano-kapsul	Cangkang berupa membran polimer dengan inti padat/cair	Baik untuk pelepasan berkelanjutan, untuk mengurangi toksisitas bahan aktif		
Dendri-mer	Tersusun dari molekul simetrik yang bercabang dan homogen, berukuran nanometer	Homogen, jumlah monomer yang digunakan dapat diprediksi secara akurat		
Nanos-fer/ mikros-fer	Partikel berukuran nanometer/ mikrometer, berbentuk sferis, dibuat dari polimer <i>biodegradable</i>			

Sumber: Abbasi dkk. (2014); Kircik (2011); Kothamasu dkk. (2012); Lopes dkk. (2015)

Strategi *advanced dosage form* dibedakan menjadi 5 kelompok berdasarkan tujuannya, yaitu pelepasan berkelanjutan (*sustained release*), peningkatan bioavailabilitas, penghantaran protein spesifik, pelepasan intraselular; dan penghantaran non-invasif (Albarran

dkk., 2011; Mitragotri dkk., 2014; Stolnik & Shakesheff, 2009). Kelima strategi tersebut dapat diaplikasikan melalui modifikasi protein, enkapsulasi, ataupun modifikasi ukuran protein terapeutik (nanometer, mikrometer, dan milimeter), seperti yang ditampilkan dalam Tabel 8.2.

**Tabel 8.2** Strategi Aplikasi *Advanced Dosage Form* untuk Protein Terapeutik Rekombinan

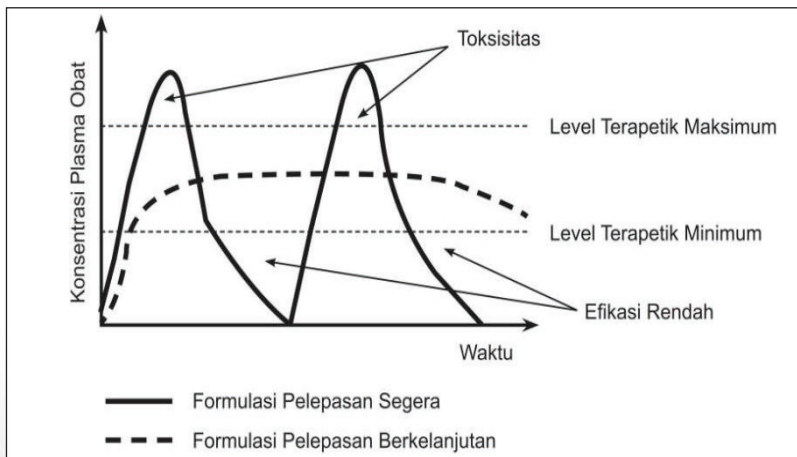
Formulasi	Protein	Ukuran molekul		
		Nanometer	Mikrometer	Mili-meter
Pelepasan berkelanjutan			Injeksi liposom polimerik dan lipid padat	Implan
Biodistribusi/ penghantaran melintasi hambatan biologis	Pegilasi protein: fusi protein dengan ligan penarget	Pegilasi pembawa: penambahan ligan penarget pada pembawa		
Penghantaran intraseluler	Konjugat protein dengan peptida/ ligan untuk endositosis: konjugat protein-polimer responsif rangsangan	Pembawa dengan ligan untuk menginternalisasi reseptor	Pembawa untuk penyerapan oleh sel fagositik: pembawa mikro untuk deposisi paru-paru	
Penghantaran non-invasif (melintasi hambatan mukosa)	Larutan protein dengan <i>enhancer</i> permeabilitas/ pembukaan <i>tight junction</i>	Pembawa nano dengan modifikasi untuk translokasi mukosa (paraseluler atau transe-luler/ transitosis)	Pembawa mikro dan matriks untuk penghantaran protein oral	

Sumber: Stolnik & Shakesheff (2009)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## 1. *Advanced dosage form* untuk pelepasan berkelanjutan

Teknologi pelepasan berkelanjutan (terkontrol) bertujuan mengurangi frekuensi injeksi dengan mengaplikasikan mikropartikel, seperti polimer mikrosfer, nanopartikel, dan injeksi depot (implan *bio-degradable*) (Mitragotri dkk., 2014; Stolnik & Shakesheff, 2009). Strategi ini umumnya digunakan untuk penghantaran obat biologis jangka panjang (satu minggu atau lebih) dan rute pemberian injeksi intramuskular atau subkutan. Teknologi ini mengontrol level obat dan masa hidupnya dalam tubuh (Langer & Folkman, 1976). Dengan demikian, formulasi ini diharapkan dapat meningkatkan ketaatan dan kenyamanan pasien, keamanan dan efikasi, serta mengurangi efek samping, seperti pada Gambar 8.6 (Lewis & Illum, 2010; Lewis & Richard, 2015). Penggunaan formulasi dengan pelepasan perlu segera dilakukan berulang kali untuk mencapai konsentrasi terapeutik (di antara level terapeutik minimum dan maksimum) untuk jangka waktu tertentu, sedangkan formulasi pelepasan berkelanjutan hanya digunakan sekali atau lebih sedikit (Lewis & Illum, 2010).



Sumber: Digambar ulang dari Lewis & Illum (2010)

**Gambar 8.6** Penghantaran obat pelepasan berkelanjutan dapat meningkatkan efikasi dan mengurangi efek samping.

## 2. *Advanced dosage form* untuk meningkatkan bioavailabilitas

Tantangan dalam penghantaran protein terapeutik adalah memperbaiki ketersediaan atau bioavailabilitas protein tersebut di dalam tubuh dan mencapai konsentrasi terapeutik yang diperlukan ke situs spesifik dalam tubuh. Bioavailabilitas protein dapat ditingkatkan melalui fusi dengan suatu agen yang berukuran besar, seperti berbagai jenis polimer polietilen glikol dan polidekstran, atau dengan penambahan glikosilasi sehingga protein tidak mudah melewati filtrasi ginjal. Dengan demikian, waktu paruh protein dapat diperlama sehingga eliminasi dini oleh tubuh dapat dicegah (Tibbitts dkk., 2016).

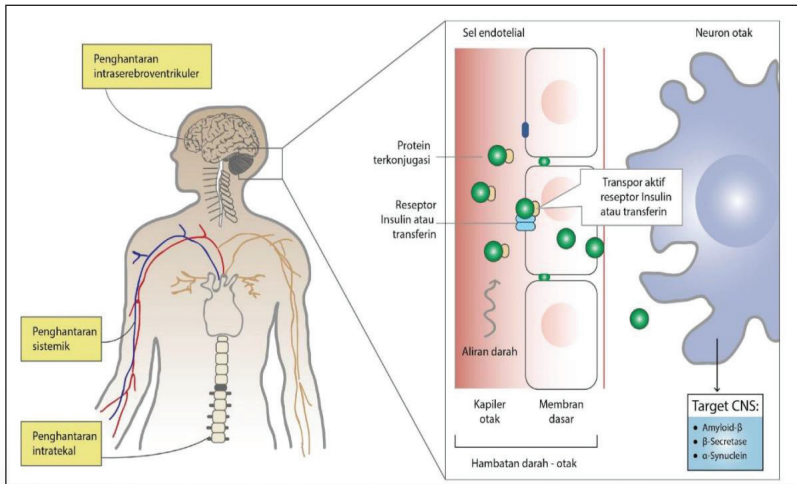
Beberapa protein terapeutik yang berukuran  $\leq 60$  kDa hilang dengan cepat dari tubuh melalui pembersihan ginjal (Florens & Juillard, 2017). Oleh karena itu, diperlukan strategi formulasi untuk mengatasi hal ini agar efektivitas dan efikasi obat tersebut dapat terjaga selama penghantaran sampai ke target, dan akhirnya mengurangi frekuensi injeksi.

## 3. *Advanced dosage form* untuk penghantaran protein yang spesifik

Penghantaran protein yang spesifik dapat dilakukan dengan menginkorporasikan protein terapeutik ke dalam suatu agen pembawa, seperti nanopartikel. Nanopartikel dapat memberikan perlindungan terhadap protein selama distribusi sebelum mencapai situs aksi atau target terapi dan melindungi tubuh dari paparan sistemik protein yang tidak diinginkan (Lagassé dkk., 2017; Lohcharoenkal dkk., 2014). Sementara itu, konsentrasi terapeutik pada situs target dapat ditingkatkan dengan mengakumulasi protein terapeutik pada situs target tersebut dengan menggunakan agen penghantar yang spesifik, seperti ligan antibodi atau fragmen ligan antibodi tersebut, yang berikatan spesifik pada reseptor tertentu di dalam tubuh, contohnya ligan anti *epidermal growth factor receptor* (anti-EGFR) yang berikatan dengan reseptor EGF-yang dominan ditemukan pada sel kanker (Konduri dkk., 2016; Sha dkk., 2015). Melalui strategi ini, diharapkan distribusi protein pada jaringan atau sel nontarget dapat dikurangi.

Aplikasi pembawa nanopartikel juga bertujuan agar protein terapeutik dapat melintasi hambatan biologis tertentu, seperti membran sel pada sel kanker atau jaringan inflamasi atau sawar darah otak, yang harus dilewati oleh protein untuk terapi pada sistem saraf pusat. Namun, penggunaan nanopartikel memiliki kelemahan, yakni *loading* protein terapeutik yang cukup rendah, rata-rata 10–20% dari konsentrasi nanopartikel.

Desain formulasi untuk penghantaran protein terapeutik tertarget yang lain adalah melintasi hambatan darah-otak untuk mencapai otak. Salah satu desain formulasi tersebut adalah melalui transitosi yang diperantarai reseptor, transporter untuk lipoprotein densitas rendah, dan faktor pertumbuhan menyerupai insulin. Transpor aktif tersebut memanfaatkan internalisasi reseptor dengan level ekspresi yang tinggi dalam otak, seperti reseptor transferin dan insulin, untuk meningkatkan penyerapan obat ke dalam otak setelah administrasi sistemik, seperti pada Gambar 8.7 (Mitragotri dkk., 2014).



Ket.: Berbagai cara penghantaran terapeutik untuk mengakses sistem saraf pusat (central nervous system (CNS)), yaitu melalui injeksi intraserebral ventrikular untuk langsung penghantaran obat ke otak, penghantaran sistemik dalam kompartemen vaskular, transpor aktif melintasi endotelium, dan administrasi intratekal

Sumber: Digambar ulang dari Mitragotri dkk. (2014)

**Gambar 8.7** Cara Mengakses Sistem Saraf Pusat untuk Penghantaran Terapeutik

#### 4. *Advanced dosage form* untuk penghantaran intraseluler/sitoplasmik

Beberapa protein terapeutik beraksi di dalam sel, seperti protein pembunuh sel kanker dan protein yang bekerja di sel otak. Sebelum mencapai sel target, protein terapeutik perlu dilindungi dari lingkungan ekstraseluler dengan mengemasnya dalam suatu partikel. Pengemasan protein terapeutik dalam partikel ini juga berguna untuk menghindari interaksi yang tidak perlu antara protein terapeutik dan bagian tubuh lain yang bukan menjadi target terapi. Setelah terinternalisasi ke dalam sel, protein terapeutik dilepaskan dari partikel agar dapat berinteraksi dengan organel-organel dan lingkungan di dalam sel. Metode pelepasan partikel di dalam sel ini pun bermacam-macam, seperti pelepasan berdasarkan perbedaan pH, kekuatan elektrolit, dan tingkat oksidasi reduksi di dalam sel dengan di luar sel (Ray dkk., 2017; Torchilin, 2008).

Tantangan pertama dalam strategi ini adalah partikel penghantar harus dapat diinternalisasikan ke dalam sel. Pendekatan penghantaran intraseluler protein terapeutik meliputi peningkatan permeabilitas membran dan transpor aktif melalui reseptor penginternalisasi pada permukaan sel, seperti reseptor asialoglikoprotein pada hepatosit (Mitragotri dkk., 2014). Salah satu strategi untuk mencapai internalisasi sel dari protein terapeutik adalah menggunakan mekanisme transpor sel normal, misalnya endositosis diperantarai reseptor, seperti transferin. Reseptor transferin dalam sel membran diikat oleh Fe membentuk kompleks reseptor-ligan yang kemudian masuk ke sel melalui endositosis tergantung *clathrin*. Penghantaran juga dapat dilakukan melalui konjugasi protein ke transferin atau antibodi antitransferin. Selain itu, formulasi tertarget ke *intercellular cell-adhesion molecule-1* (ICAM-1) juga menjanjikan untuk penghantaran intraseluler. Konjugat peptida-pentarget nanopartikel *polylactic-co-glycolic acid* (PLGA) dapat masuk ke sel dengan ekspresi ICAM-1 yang diupregulasi dengan efisien, selanjutnya diserap dan dibawa ke lisosom dengan cepat (Chittasupho dkk., 2009; Sari dkk., 2015).

Penghantaran intraseluler protein terapeutik menggunakan peptida spesifik (asal virus atau bakteri, seperti HIV-1 Tat) juga telah dikembangkan. Peptida ini tidak menunjukkan homologi sekuen yang tinggi dan memiliki asam amino kationik (arginin dan lisin) yang membuat struktur peptida tersebut bermuatan positif yang tinggi, yang mampu menembus membran sel melalui mekanisme masuk langsung ke sitosol atau mengikuti jalur endositotik.

Pendekatan lain untuk penghantaran intraseluler adalah desain pembawa protein berbasis pada material polimerik “pintar” yang dapat mengalami perubahan diinisiasi pH dari hidrofilik ke hidrofobik di dalam endosom. Perubahan ini menyebabkan destabilisasi membran endosomal dan pelepasan pembawa ke sitosol. Konsep penghantaran intraseluler dari protein anionik juga telah dipelajari dengan pembentukan kompleks protein anionik dan lipospermin lipid kationik. Pembentukan kompleks ini ditujukan untuk masuk ke sel dalam kultur melalui jalur endositosis, dan protein yang terinternalisasi berada di sitoplasma dan/atau terjebak dalam kompartemen lisosomal (Das dkk., 2011; Yoshida dkk., 2013).

Setelah diinternalisasikan ke dalam sel, partikel pembawa protein terapeutik harus dapat melepaskan bahan aktif yang dibawa melalui proses degradasi ataupun pengembangan partikel yang bergantung pada suatu faktor yang sudah disebutkan sebelumnya. Nano/mikropartikel yang berbasis *polypropylacrylic acid* (PPAA) merupakan satu contoh yang sering digunakan untuk penghantaran intraseluler karena responsif terhadap pH. Polimer PPAA mengalami degradasi di dalam endosom yang ber-pH relatif lebih rendah (sekitar pH 5,5) dibandingkan pH sitosol ataupun ekstraseluler (sekitar pH 7,4). Zat aktif protein terapeutik dilepaskan dari partikel saat partikel polimer terdegradasi, kemudian zat aktif tersebut berinteraksi dengan target di dalam sel (Albarran dkk., 2011).

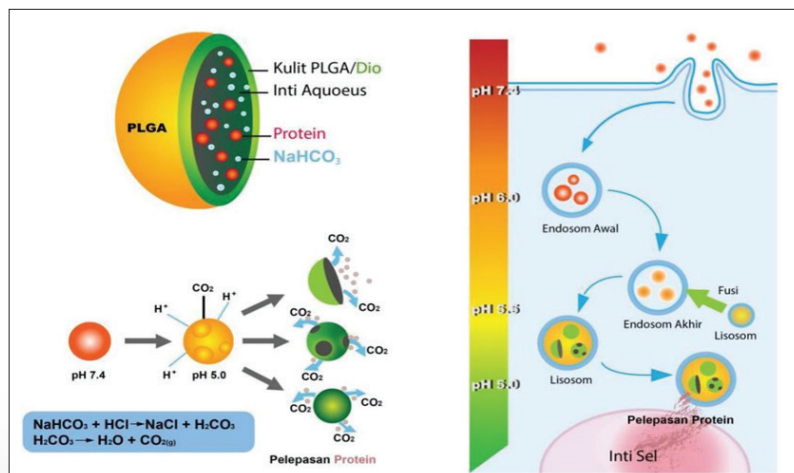
Selain PPAA, polimer lain yang lazim digunakan adalah PLGA. PLGA pernah diaplikasikan pada mikrosfer berlubang (PLGA *hollow microspheres*) oleh Ke dkk. (2011) untuk menghantarkan protein terapeutik ke dalam sel tumor dengan pelepasan tergantung



pH asam, seperti lisosom. Komponen kunci dari sistem ini adalah natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) yang cepat terinkorporasi ke dalam *hollow microspheres* bersama dengan obat melalui metode emulsi ganda. Dalam lingkungan asam,  $\text{NaHCO}_3$  bereaksi dengan asam menghasilkan gelembung  $\text{CO}_2$  dengan cepat sehingga menyebabkan dinding mikrosfer pecah dan melepaskan obat dengan cepat (Gambar 8.8).

### 5. *Advanced dosage form* untuk penghantaran noninvasif atau melalui mukosa

Formulasi protein terapeutik untuk sediaan nonparenteral tidak banyak dilakukan terkait dengan sifat fisikokimia dari kebanyakan protein, seperti ukuran molekuler, hidrofilitas, kerentanan terhadap degradasi enzimatik, dan kurangnya absorpsi sehingga sulit dihantarkan melalui rute potensial, seperti oral atau dihirup (nasal dan paru-paru). Insulin pulmonari (Exubera) termasuk peggagas



Sumber: Digambar ulang dari Ke dkk. (2011)

**Gambar 8.8** Struktur Mikrosfer PLGA Berlubang dan Mekanisme Pelepasan Protein Terapeutik (kiri), serta Kepadatan dan Pelepasan Protein Terapeutik dari Mikrosfer Responsif pH (kanan)

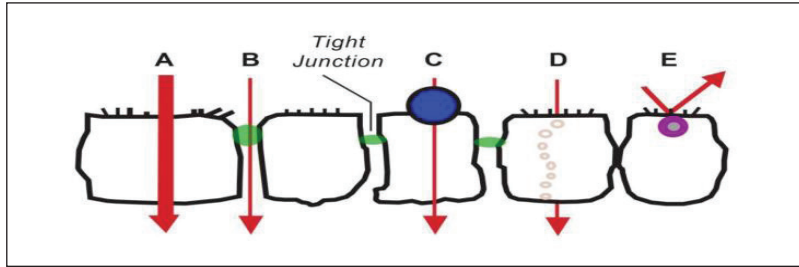
Buku ini tidak diperjualbelikan.

penghantaran protein noninvasif yang pernah dipasarkan meskipun tidak bertahan lama (Barnett, 2004). Di samping itu, insulin juga diformulasikan untuk pemakaian oral dengan nama Oralyn (Muheem dkk., 2016).

Tantangan dalam penghantaran protein noninvasif melalui rute oral adalah degradasi enzimatik, sedangkan untuk rute pulmonari atau intranasal meliputi barrier lapisan mukosa, membran bersilia, dan ekspresi reseptor permukaan pada sel epitel. Strategi yang dapat diaplikasikan untuk mengatasi hambatan dalam formulasi protein terapeutik rute pulmonari atau intranasal diawali dengan pembersihan mukosiliari, yaitu proses fisiologi yang disusun untuk menghilangkan material yang terdeposit secara efektif. Pembersihan ini diatur dengan penggunaan material muko adhesif, seperti kitosan, turunan asam poli akrilat atau polimer tertiolasi, yang berikatan ke mukus secara nonspesifik melalui interaksi ionik, ikatan hidrogen, *van der Waals* dan/atau hidrofobik, dan dengan cara tersebut memperpanjang waktu tinggal dari sistem penghantaran. Waktu tinggal ini dapat diperpanjang lagi dengan bioadhesi, yakni interaksi yang spesifik dan langsung dengan reseptor atau struktur menyerupai reseptor pada membran apikal dari sel epitel. Bioadhesi menawarkan perspektif baru penghantaran transmukosa protein, yaitu transpor melintasi permukaan mukosa, dengan tahap sentral melintasi lapisan sel epitel melalui rute paraseluler (*tight junction*) atau transseluler (Stolnik & Shakesheff, 2009) (Gambar 8.9).

Inkorporasi *enhancer* permeasi ke dalam formulasi protein dapat meningkatkan permeabilitas epitel mukosa. Peningkatan permeabilitas terjadi setelah aplikasi eksipien dengan sifat yang bervariasi, yang bertindak dengan mekanisme berbeda, termasuk meningkatkan fluiditas membran (seperti surfaktan), menurunkan viskositas mukus (agen mukolitik), dan mengganggu *tight junction* (kitosan; pengkelat kalsium, seperti *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA); dan peptida) (Stolnik & Shakesheff, 2009).

Formulasi penghantaran protein melintasi permukaan mukosa sering berbasis pada desain pembawa berukuran nano, khususnya partikel polimerik, kompleks atau liposom, yang permukaannya



Ket.: A. difusi pasif transeluler, B. difusi pasif paraseluler, C. transpor diperantarai pembawa, D. transpor melalui trans-sitosis, dan E. transporter efluks; di mana A dan B tidak sesuai untuk molekul kecil (<500 Da atau peptida hingga 3 asam amino), sedangkan molekul yang lebih besar dapat ditranspor dengan B dan D/ endotrans sitosis

Sumber: Digambar ulang dari Stolnik & Shakesheff (2009)

**Gambar 8.9** Mekanisme Transpor Obat Melintasi Epitel Mukosa yang Potensial

dimodifikasi secara normal dengan material *enhancer* mukoadhesif dan permeabilitas, seperti nanopartikel kompleks insulin-kitosan yang diadministrasikan secara nasal. Potensi transpor transseluler protein pada permukaan mukosa untuk penghantaran protein oral dapat diperantarai oleh reseptor B12 dan melalui modifikasi permukaan nanopartikel dengan vitamin. Penggunaan nanopartikel ini dapat mengeliminasi kebutuhan konjugasi kimia dan juga dapat melindungi protein yang terinkorporasi dari degradasi pH dan enzim proteolitik intestinal (Stolnik & Shakesheff, 2009).

Teknologi penghantaran oral berbasis pada hidrogel sering digunakan untuk mengatasi rintangan di dalam saluran cerna. Hidrogel menunjukkan perilaku *swelling* yang tergantung pH dan reversibel. Hidrogel dapat melindungi insulin dari degradasi enzimatik dalam lingkungan lambung dan melepaskannya setelah paparan ke lingkungan intestinal. *Swelling* dari hidrogel dalam cairan intestinal mengarah pada bioadhesi ke dinding usus. Lebih lanjut, formulasi oral yang lain adalah berbasis pada agregasi molekul kasein di sekitar kalsium fosfat/PEG yang mengandung partikel insulin yang

menunjukkan efek hipoglikemik protein dari partikulat. Dalam pH saluran cerna, relaksasi molekuler dari molekul kasein menyebabkan pelepasan protein (Stolnik & Shakesheff, 2009).

## **E. Formulasi Produk-Produk Protein Terapeutik Rekombinan yang Dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI**

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI mengembangkan penelitian yang diantaranya terkait formulasi produk-produk protein terapeutik rekombinan, baik berbasis formulasi protein terapeutik konvensional maupun *advanced dosage form*. Penentuan jenis formulasi protein terapeutik konvensional atau *advanced dosage form* untuk pengembangan formulasi produk-produk protein terapeutik rekombinan tersebut didasarkan pada karakteristik protein terapeutik, spesifikasi protein terapeutik rekombinan yang akan dikembangkan, dan target penyakit yang akan diterapi.

### **1. Formulasi Protein Terapeutik Konvensional**

Beberapa penelitian terkait formulasi produk-produk protein terapeutik rekombinan berbasis formulasi protein terapeutik konvensional yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, yaitu formulasi Filgrastim atau hG-CSF, formulasi hEPO, formulasi Interferon, dan formulasi Insulin.

#### **a. Formulasi Filgrastim atau hG-CSF**

Filgrastim atau hG-CSF (*human granulocyte colony stimulating factor*) pertama kali dikomersialkan dengan nama dagang Neupogen<sup>®</sup>. Neupogen<sup>®</sup> dibuat dalam bentuk sediaan injeksi cair steril, baik untuk pemakaian intravena maupun subkutan. Produk ini diformulasikan dalam bufer sodium asetat pH 4; 5% sorbitol sebagai kosolven; 0,004% *polysorbate-80* sebagai *stabilizer*; dan *water for injection* (WFI) sebagai pelarut (Electronic medicine compendium, t.t.).

Pembentukan agregat merupakan tantangan terbesar dalam formulasi hG-CSF. Krishnan dkk. (2002) melaporkan bahwa agregasi hG-CSF terbentuk pada pH 6 dalam sistem bufer sitrat dan pH 7 dalam sistem bufer fosfat ataupun PBS. Sodium asetat pH 4 merupakan sistem bufer yang optimal untuk hG-CSF karena pada sistem ini tidak terbentuk agregasi. Selain pemilihan sistem bufer, penambahan sukrosa sebagai kosolven juga diketahui dapat memperlambat terbentuknya agregat hG-CSF. Sorbitol menggantikan sukrosa sebagai kosolven dalam formula Neupogen<sup>®</sup>. Polysorbate-80 ditambah ke dalam formula untuk meningkatkan kestabilan. Polysorbate-80 bekerja sebagai surfaktan untuk mencegah terjadinya adsorpsi bahan aktif pada kemasan primer selama penyimpanan.

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah melakukan penelitian untuk memproduksi bahan aktif Filgrastim yang diekspresikan dalam sistem ekspresi prokariot menggunakan *Escherichia coli* dan sistem ekspresi eukariot menggunakan *Pichia pastoris*. Sebagai bagian dari pengembangan produk biosimilar, rhG-CSF ini diformulasikan menggunakan formula yang mendekati originatornya. Produk hG-CSF skala laboratorium ini menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dibandingkan kompetitor pada uji *in vivo* pada dosis tertentu (Pratiwi dkk., 2020; Santoso dkk., 2017).

## **b. Formulasi hEPO**

*Human erithropoetin* (hEPO) merupakan protein terapeutik pertama yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dan diekspresikan menggunakan sistem ekspresi sel eukariot *Chinese hamster ovarian* (CHO). Originator hEPO (Epogen<sup>®</sup>) diformulasikan dalam bentuk sediaan injeksi menggunakan larutan bufer sodium klorida/sodium sitrat dan asam sitrat. Stabilizer yang digunakan dalam formula Epogen<sup>®</sup> adalah albumin (Niazi, 2016). hEPO yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI menunjukkan hasil yang sama dengan kompetitornya pada uji *in vitro* dan *in vivo* (Santoso dkk., 2017).

### c. Formulasi interferon

Interferon yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI adalah Interferon alfa-2a. Produk ini merupakan biosimilar dari Roferon-A<sup>®</sup>. Bahan eksipien yang digunakan dalam Roferon-A<sup>®</sup>, antara lain ammonium asetat dan sodium klorida sebagai dapar, benzil alkohol yang digunakan sebagai pengawet, *polysorbate*-80 untuk mencegah adsorpsi, asam asetat dan natrium hidroksida sebagai pengatur pH (Lipiäinen dkk., 2015).

### d. Formulasi insulin

Pengembangan sejumlah analog Insulin *rapid*- dan *long-acting*, yaitu molekul Insulin yang memiliki struktur primer yang berbeda dari struktur primer *human Insulin* (hI) sampai taraf tertentu telah dilakukan. Pengembangan ini untuk mencapai formulasi Insulin yang meningkatkan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik dibandingkan formulasi hI alami (Heinemann & Hompesch, 2014). Perubahan struktur hI tersebut relevan terhadap keamanan dan efikasi protein ini. Perbedaan dalam proses produksi juga dapat mengakibatkan Insulin bisa berbeda (di antaranya struktur dan kemurnian) dari originator Insulin sampai taraf tertentu, yang bisa menghasilkan efek biologis yang berbeda.

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sedang fokus untuk mengembangkan produksi Insulin, yaitu prekursor Insulin dan konversinya menjadi hI (Humulin), dan Insulin analog (Glargin), pada *yeast Pichia pastoris*. Produksi Insulin tersebut masih ditujukan untuk rute pemberian injeksi. Untuk tahap formulasi, penelitian dan pengembangan akan didasarkan pada aplikasi industri baru yang berbasis paten untuk formulasi Insulin yang diakui telah atau akan segera kedaluwarsa. Hal ini dilakukan dengan cara memilih paten formulasi Insulin yang ditingkatkan paling lazim, misalnya formulasi Insulin *injection pen* yang terintegrasi dengan perangkat monitoring glukosa dengan notifikasi keadaan darurat otomatis (Arefieg, 2016), kemudian teknologi dari paten tersebut diadaptasi dan dikembangkan dengan cara diperbarui lagi atau diformulasi ulang.



## 2. Formulasi *Advanced Dosage Form*

Beberapa penelitian terkait formulasi produk-produk protein terapeutik rekombinan berbasis formulasi protein terapeutik *advanced dosage form* yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, antara lain nanoformulasi hEGF untuk pengobatan spesifik tukak lambung, nanoformulasi oral vaksin HBcAg, pengembangan scFv sebagai agen penghantaran spesifik HPR untuk pengobatan kanker, dan nanoformulasi fragmen anti-TfR scFv dalam bentuk imunoliposom anti-TfR scFv untuk pengobatan kanker.

### a. Nanoformulasi hEGF untuk pengobatan spesifik tukak lambung

*Human EGF* (hEGF) adalah protein yang berperan dalam proliferasi, diferensiasi dan maturasi sel/jaringan epitel dan epidermal (Carpenter & Cohen, 1990). hEGF telah digunakan secara klinis untuk mengatasi luka pada penderita diabetes. Selain itu, hEGF juga dapat diindikasikan untuk luka atau tukak lambung yang parah. Akan tetapi, penghantaran hEGF harus spesifik pada sel/jaringan target saja. Interaksi hEGF dengan sel/jaringan yang sehat dapat mensuperaktifkan pertumbuhan sel/jaringan sehat tersebut sehingga dapat menyebabkan kanker (Goodsell, 2003). Oleh karena itu, hEGF diformulasikan dalam nanopartikel berbasis kitosan untuk penggunaan oral yang hanya akan melepaskan hEGF ketika berada di dalam jaringan tukak lambung (Pratiwi dkk., 2018).

### b. Nanoformulasi oral vaksin HBcAg

Vaksin oral dilaporkan lebih mudah diaplikasikan dan lebih nyaman digunakan daripada vaksin sediaan injeksi. Oleh karena itu, protein *hepatitis B core antigen* (HBcAg) yang sedang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI diformulasikan ke dalam nanopartikel untuk penggunaan oral. Protein HBcAg tersebut akan diformulasikan dalam berbagai basis nanopartikel, yakni nanopolimer dan liposom (Agustiyananti dkk., 2019).



### **c. Pengembangan scFv sebagai agen penghantaran spesifik HPR untuk pengobatan kanker**

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah mengembangkan *singe chain variable fragment* (scFv), yang merupakan bagian terkecil dan spesifik antibodi dari EGFR *variant III* (EGFRvIII), suatu reseptor EGF yang diekspresikan berlebih pada sel kanker. scFv difusikan dengan suatu obat antikanker agar obat tersebut hanya akan dihantarkan pada sel kanker sehingga interaksinya dengan sel normal dapat diminimalisasi. scFv yang dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI difusikan dengan *human pancreatic ribonuclease* (HPR), suatu enzim yang berpotensi tinggi sebagai antikanker. Melalui strategi fusi HPR dengan scFv, diharapkan scFv tersebut akan dikenali dan terakumulasi pada EGFRvIII sel kanker tertentu sehingga HPR yang dibawanya efektif mencapai sel kanker dan tidak berinteraksi dengan sel yang sehat (Yuliatwati dkk., 2014).

### **d. Nanoformulasi fragmen anti-TfR scFv dalam bentuk imunoliposom anti-TfR scFv untuk pengobatan kanker**

*Transferrin receptor* (TfR) merupakan penanda tumor prognostik. Level TfR pada berbagai jenis sel kanker berkorelasi dengan kemampuan agresif atau proliferasi sel tumor. Oleh karena itu, TfR merupakan target potensial untuk penghantaran obat secara sistemik dalam terapi selektif yang menarget sel tumor dan tidak toksik terhadap sel normal sehingga obat mencapai tumor metastasis maupun primer. Imunoliposom yang diarahkan oleh antibodi monoklonal atau fragmen-fragmennya merupakan kendaraan yang menjanjikan untuk penghantaran obat tertarget tumor. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah mengembangkan nano formulasi fragmen anti-TfR scFv dalam bentuk imunoliposom anti-TfR scFv untuk kendaraan penghantaran obat selektif bertarget tumor secara sistemik. Imunoliposom anti-TfR scFv ini dibuat dengan metode injeksi etanol dan fragmen anti-TfR scFv terkonjugasi secara kovalen ke liposom membentuk imunoliposom anti-TfR scFv dengan ukuran 200–300 nm (Kusharyoto dkk., 2014).

## F. Penutup

Formulasi protein terapeutik rekombinan merupakan bagian yang fundamental dalam pengembangan obat berbasis protein. Tanpa formulasi yang benar dan sesuai, bahan aktif protein yang berkualitas tinggi sekalipun, tidak dapat memberikan efek maksimal. Seiring perkembangan teknologi, formulasi protein terapeutik saat ini tidak hanya terbatas pada formulasi konvensional yang umumnya ditujukan untuk penghantaran sistemik sediaan injeksi. Namun, protein terapeutik telah banyak diformulasikan menjadi *advanced dosage form* yang memanfaatkan bionanoteknologi dan aplikasi agen penghantaran spesifik. Dengan adanya *advanced dosage form*, stabilitas protein terapeutik hingga mencapai target terapi lebih terjaga dan dapat mengurangi efek samping sistemik, seperti yang lazim ditemukan oleh penggunaan protein terapeutik dengan formulasi konvensional. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah berpartisipasi dalam pengembangan formulasi, baik konvensional maupun *advanced*. Meskipun demikian, penelitian di bidang formulasi protein terapeutik di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI masih perlu ditingkatkan, baik meliputi penelitian dasar maupun aplikatif.

## Daftar Pustaka

- Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., & Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 247. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>
- Agustiyanti, D. F., Ferdina, M., Pratiwi, R. D., Dewi, K. S., Fuad., A. M., & Mustofa, A. Z. (2019). Enkapsulasi hepatitis B core antigen (HbcAg). *Laporan teknis prioritas nasional obat dan kesehatan penyediaan sumber bahan baku obat berbasis protein rekombinan dan obat herbal terstandar (OHT) penanganan penyakit menular dan tidak menular*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Akers, M. J. (2006). Special challenges in production of biopharmaceutical dosage forms. *BioProcess Int*, 4, 36–43.

- Albarran, B., Hoffman, A. S., & Stayton, P. S. (2011). Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier. *Reactive and Functional Polymers*, 71(3), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.09.008>
- Ansel, H. C. (2005). *Pengantar bentuk sediaan farmasi (Terj: Farida Ibrahim)* (hlm. 156–162).
- Arakawa, T., & Philo, J. S. (2013). Biophysical and biochemical analysis of recombinant proteins. Dalam *Pharmaceutical biotechnology* (hlm. 19–45). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_2)
- Arefieg, R. J. (2016). *U.S. Patent No. 9,358,334*. U.S. Patent and Trademark Office.
- Barnett, A. H. (2004). Exubera inhaled insulin: a review. *International Journal of Clinical Practice*, 58(4), 394–401. <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00178.x>
- Carpenter, G., & Cohen, S. (1990). Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 7709–7712.
- Chaurasia, G. (2016). A review on pharmaceutical preformulation studies in formulation and development of new drug molecules. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6), 2313. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(6\).2313-20](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(6).2313-20)
- Chittasupho, C., Xie, S. X., Baoum, A., Yakovleva, T., Siahaan, T. J., & Berkland, C. J. (2009). ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.008>
- Crommelin, D. J. (2013). Formulation of biotech products, including biopharmaceutical considerations. Dalam *Pharmaceutical biotechnology* (hlm. 69–99). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_4)
- Das, A. T., Harwig, A., & Berkhout, B. (2011). The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *Journal of Virology*, 85(18), 9506–9516. <https://doi.org/10.1128/JVI.00650-11>
- Electronic medicines compendium. (t.t.). Neupogen singleject 30 MU (0,6mg/ml). Diakses 11 April 2018 dari <https://www.medicines.org.uk/emc/product/608/smcp>

- Florens, N., & Juillard, L. (2017). Large middle molecule and albumin removal: Why should we not rest on our laurels?. Dalam *Expanded Hemodialysis*, 191, 178–187. Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000479266>
- Frokjaer, S., & Otzen, D. E. (2005). Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>
- Goodsell, D. S. (2003). The molecular perspective: Epidermal growth factor. *The Oncologist*, 8(5), 496–497. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-5-496>
- Guideline, I. H. T. (1995). Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Q5C.
- Guideline, I. H. T. (2003). Stability testing of new drug substances and products. *QIA (R2), Current Step*, 4, 1–24.
- Heinemann, L., & Hompesch, M. (2014). Biosimilar insulins: Basic considerations. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 8(1), 6–13. <https://doi.org/10.1177%2F1932296813516958>
- Kamerzell, T. J., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2011). Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(13), 1118–1159. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.07.006>
- Ke, C. J., Su, T. Y., Chen, H. L., Liu, H. L., Chiang, W. L., Chu, P. C., Xia, Y., & Sung, H. W. (2011). Smart multifunctional hollow microspheres for the quick release of drugs in intracellular lysosomal compartments. *Angewandte Chemie*, 123(35), 8236–8239. <https://doi.org/10.1002/ange.201102852>
- Kircik, L. H. (2011). Microsphere technology: Hype or help? *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 4(5), 27.
- Konduri, K., Gallant, J. N., Chae, Y. K., Giles, F. J., Gitlitz, B. J., Gowen, K., Ichihara, E., Owonikoko, T. K., Peddareddigari, V., Suresh S. Ramalingam, S. S., Reddy, S. K., Eaby-Sandy, B., Vavalà, T., Whiteley, A., Chen, H., Yan, J., Sheehan, J.H., Meiler, ... Lovly, C. M. (2016). EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer. *Cancer Discovery*, 6(6), 601–611. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0075>

- Kothamasu, P., Kanumur, H., Ravur, N., Maddu, C., Parasuramrajam, R., & Thangavel, S. (2012). Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems. *BioImpacts: BI*, 2(2), 71. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.011>
- Krishnan, S., Chi, E. Y., Webb, J. N., Chang, B. S., Shan, D., Goldenberg, M., Manning, M. C., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (2002). Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: Characterization and thermodynamic inhibition. *Biochemistry*, 41(20), 6422–6431. <https://doi.org/10.1021/bi012006m>
- Kusharyoto, W., Handayani, I., Sari, M., & Fuad, A. M. (2014, Desember). Preparation of an scFv-based immunoliposome specific towards transferrin receptor. Dalam *Annales Bogorienses*, 18(2), 35–44. <http://dx.doi.org/10.14203/ann.bogor.2014.v18.n2.35-44>
- Lagassé, H. D., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*, 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>
- Langer, R., & Folkman, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, 263(5580), 797–800. <https://doi.org/10.1038/263797a0>
- Lehninger, A. L. (1982). *Dasar-dasar biokimia jilid 1*. Erlangga.
- Lewis, A. L., & Illum, L. (2010). Formulation strategies for sustained release of proteins. *Therapeutic Delivery*, 1(3), 457–479. <https://doi.org/10.4155/tde.10.17>
- Lewis, A. L., & Richard, J. (2015). Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. *Therapeutic Delivery*, 6(2), 149–163. <https://doi.org/10.4155/tde.14.111>
- Lipiäinen, T., Peltoniemi, M., Sarkhel, S., Yrjönen, T., Vuorela, H., Urtili, A., & Juppö, A. (2015). Formulation and stability of cytokine therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(2), 307–326. <https://doi.org/10.1002/jps.24243>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular cell biology*. WH Freeman.

- Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C., & Rojanasakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/180549>
- Lopes, M., Simões, S., Veiga, F., Seica, R., & Ribeiro, A. (2015). Why most oral insulin formulations do not reach clinical trials. *Therapeutic Delivery*, 6(8), 973–987. <https://doi.org/10.4155/TDE.15.47>
- Mitragotri, S., Burke, P. A., & Langer, R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 655–672. <https://doi.org/10.1038/nrd4363>
- Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M. A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G. K., Warsi, M. H., & Ahmad, F. J. (2016). A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 413–428. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.06.004>
- Niazi, S. K. (2016). *Biosimilars and interchangeable biologics: Tactical elements*. CRC Press.
- Ohtake, S., & Wang, W. (2013). Protein and peptide formulation development. *Pharmaceutical sciences encyclopedia: Drug discovery, development, and manufacturing* (hlm. 1–44). <https://doi.org/10.1002/9780470571224.pse510>
- Patel, A., Cholkar, K., & Mitra, A. K. (2014). Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches. *Therapeutic Delivery*, 5(3), 337–365. <https://doi.org/10.4155/tde.14.5>
- Pelton, J. T., & McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry*, 277(2), 167–176. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4320>
- Pillai, S. A., Chobisa, D., Urimi, D., & Ravindra, N. (2016). Pharmaceutical glass interactions: a review of possibilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(2), 103.
- Pramod, K., Tahir, M. A., Charoo, N. A., Ansari, S. H., & Ali, J. (2016). Pharmaceutical product development: A quality by design approach. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(3), 129. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.187350>



- Pratiwi, R. D., Zanjabilla, S., Rosyidi, V. A., Yudasari, N., Fuad, A. M. (2018). Expression of human epidermal growth factor in *Escherichia coli* BL21(DE3) and its nanoformulation for gastric ulcer therapy. *Final Report Indonesia Toray Science Foundation 2017*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Pratiwi, R. D., Agustiyanti, D. F., Dewi, T. I. T., Herlina, N., Dewi, K. S., Yuliawati, Y., Aminah, A., & Fuad, A. M. (2020). Bioassay of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) for neutropenia treatment in male sprague dawley rats. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 4(1), 10–8. <https://doi.org/10.21705/mcbs.v4i1.81>
- Ramos-Cabrer, P., & Campos, F. (2013). Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on neurological targets. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 951. <https://dx.doi.org/10.2147/IJN.S30721>
- Ray, M., Lee, Y. W., Scaletti, F., Yu, R., & Rotello, V. M. (2017). Intracellular delivery of proteins by nanocarriers. *Nanomedicine*, 12(8), 941–952. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0393>
- Santoso, A., Fuad, A. M., Herawati, N., Wardiana, A., Rubiyana, Y., Ningrum, R.A., Wisnuwardhani, P. H., Wijaya, S.K., Kusumawati, A., Septisetiyan, E. P., Yuliawati, Dewi, K. S., Agustiyanti, D. F., Aminah, Y., & Pratiwi, R. D. (2017). Pengembangan produk obat biosimilar human erythropoietin (hEPO), human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) dan insulin. *Laporan kegiatan unggulan LIPI tahun 2017*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Sari, E., Tunc-Sarisozen, Y., Mutlu, H., Shahbazi, R., Ucar, G., & Ulubayram, K. (2015). ICAM-1 targeted catalase encapsulated PLGA-b-PEG nanoparticles against vascular oxidative stress. *Journal of Microencapsulation*, 32(7), 687–698. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1073384>
- Sha, H., Li, R., Bian, X., Liu, Q., Xie, C., Xin, X., Kong, W., Qian, X., Jiang, X., Hu, W., & Liu, B. (2015). A tumor-penetrating recombinant protein anti-EGFR-iRGD enhance efficacy of paclitaxel in 3D multicellular spheroids and gastric cancer in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.020>



- Shire, S. J., Shahrokh, Z., & Liu, J. U. N. (2004). Challenges in the development of high protein concentration formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6), 1390–1402. <https://doi.org/10.1002/jps.20079>
- Stolnik, S., & Shakesheff, K. (2009). Formulations for delivery of therapeutic proteins. *Biotechnology Letters*, 31(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9834-y>
- Tibbitts, J., Canter, D., Graff, R., Smith, A., & Khawli, L. A. (2016, Februari). Key factors influencing ADME properties of therapeutic proteins: a need for ADME characterization in drug discovery and development. *MABs*, 8(2), 229–245. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1115937>
- Torchilin, V. (2008). Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5(2–3), e95–e103. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2009.01.002>
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600–613.
- University of Alaska-Fairbanks. (t.t.). *Fall web projects—protein structures*. <http://ffden-2.phys.uaf.edu/211.fall2000.web.projects/Danie%20Arnold/Intoduction.html>
- Wang, W., Ignatius, A. A., & Thakkar, S. V. (2014). Impact of residual impurities and contaminants on protein stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(5), 1315–1330. <https://doi.org/10.1002/jps.23931>
- World Health Organization. (2009). Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. *WHO Technical Report Series*, 953, 87–123.
- Yoshida, T., Lai, T. C., Kwon, G. S., & Sako, K. (2013). pH-and ion-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(11), 1497–1513. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.821978>
- Yuliawati, Y., Soejoedono, R. D., & Fuad, A. M. (2014, Juni). Construction and expression of immunotoxin anti EGFRvIII scFv-HPR conjugate in *Pichia pastoris* as a targeted drug candidate for cancer therapy. *ANNALES BOGORIENSES*, 18(1), 13–23. <http://dx.doi.org/10.14203/ann.bogor.2014.v18.n1.13-23>





## BAB IX

# Bioproses dan Uji Komparasi Produk Obat Biosimilar

*Andri Wardiana, Ratih Asmana Ningrum,  
dan Eko Wahyu Putro*

### A. Pendahuluan

Tidak seperti obat generik yang mempunyai struktur yang identik dengan produk paten, kebanyakan produk obat biosimilar menghasilkan hasil akhir yang heterogen sehingga dibutuhkan proses produksi dan purifikasi yang cukup kompleks. Hal ini menjadi tantangan tersendiri dalam mengembangkan produk obat biosimilar. Tantangan terbesar dalam memproduksi produk obat biosimilar adalah bagaimana menghasilkan produk yang memiliki karakterisasi semirip mungkin dengan produk pembandingnya tanpa mengetahui proses produksi yang detail dari produk pembanding tersebut. Oleh karena itu, perusahaan yang mengembangkan produk obat biosimilar harus memiliki strategi dalam pengembangan proses hulu dan hilir obat, termasuk pengembangan kultur sel, peralatan produksi, purifikasi, dan metode karakterisasi sehingga menghasilkan produk yang berkualitas tinggi layaknya produk pembandingnya dan siap untuk diuji praklinis dan klinis. Dalam bab ini akan dipaparkan bioproses produk obat biosimilar yang meliputi proses hulu (*upstream processing/USP*), proses hilir (*downstream processing/DSP*), transfer teknologi, dan proses produksi cGMP (*current good manufacturing*

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Sumber: Diadaptasi dari Wardiana & Ningrum (2016)

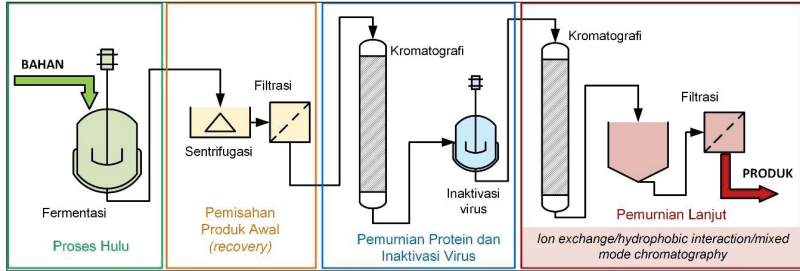
**Gambar 9.1** Proses Pengembangan Produk Biosimilar

*practice*), uji komparasi melalui karakterisasi fisiko-kimia, hingga uji biologis yang meliputi uji *in vitro*, praklinis, dan klinis (Gambar 9.1).

## B. Desain dan Pengembangan Proses Hulu dan Hilir

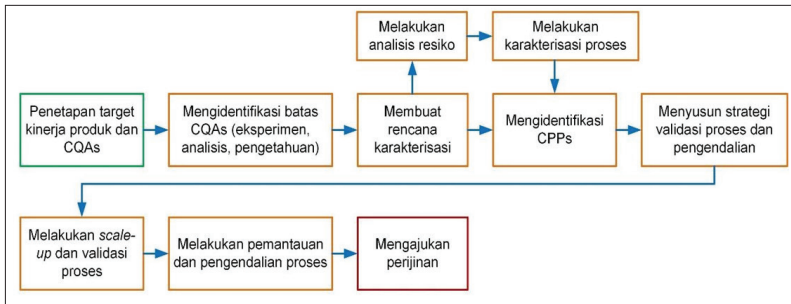
Proses produksi obat biosimilar sebagai faktor kunci perlu dirancang dan dikembangkan untuk mencapai target kemiripan mutu, khasiat, dan keamanan produk. Selain itu, inovasi juga menentukan seberapa besar efisiensi proses yang akan berdampak terhadap harga produk yang lebih kompetitif. Secara garis besar, seperti ditunjukkan pada Gambar 9.2, proses produksi protein dimulai dari tahap produksi hulu, yakni proses fermentasi. Selanjutnya adalah proses hilir yang meliputi pemisahan produk awal, pemurnian protein dan inaktivasi virus, serta pemurnian lanjut.

Secara konvensional, unit operasi dalam proses produksi bergantung pada parameter kunci yang memengaruhi mutu produk pada rentang tertentu. Pengujian dilakukan pada produk antara dan akhir untuk memvalidasi parameter tersebut. Di satu sisi, sistem ini memiliki keterbatasan dalam hal rentang operasi yang sempit. Di sisi lain, proses yang inovatif memerlukan lebih banyak pengujian sebelum mendapat persetujuan dari regulator (Kontoravdi dkk., 2013). Untuk menjawab keterbatasan tersebut, penerapan prinsip *Quality by Design* (QbD) didukung oleh Food Drug Administration (FDA) dan European Medicines Agency (EMA). Berbeda dengan metode konvensional, QbD bertujuan membangun mutu dalam sebuah produk sejak tahap desain, bukan menekankan pada pengujian produk antara dan akhir.



Sumber: Diadaptasi dari Kontoravdi dkk. (2013)

**Gambar 9.2** Proses Hulu dan Hilir Produk Biosimilar



Sumber: Diadaptasi dari Kontoravdi dkk. (2013)

**Gambar 9.3** *Quality by Design* (QbD) untuk Produksi Obat Bioterapeutik

Tahapan QbD sesuai dengan Gambar 9.3 dimulai dari identifikasi kinerja klinik yang diinginkan. Selanjutnya, batas atribut mutu kritis (*Critical Quality Attributes/CQAs*) diidentifikasi melalui pengujian awal atau metode analisis lain dan pengetahuan yang sudah ada. Setelah itu, karakterisasi proses dilakukan untuk menentukan rentang parameter kritis dari proses (*Critical Process Parameters/ CPPs*). Penentuan CPPs memerlukan analisis risiko dan pengetahuan/pengalaman riset sebelumnya. Informasi tentang CPPs digunakan dalam perancangan eksperimen. Rentang operasi yang diperoleh dari eksperimen bersama dengan CPPs akan menentukan pengendalian proses yang sesuai. Pada tahap akhir QbD, validasi mutu produk dilakukan dan dilanjutkan dengan pengaturan ulang parameter

Buku ini tidak diperjualbelikan.

desain agar aplikatif untuk skala manufaktur (ICH, 2009). Harapan utama dengan menerapkan QbD adalah meningkatnya pemahaman terhadap proses. Pemahaman tersebut diharapkan dapat mendorong optimalisasi, pengendalian, dan inovasi proses, serta transfer teknologi. Pada akhirnya, penghematan biaya dan waktu pengembangan proses diprediksi akan dapat diraih. Selain itu, percepatan pendaftaran perizinan proses dan produk pun akan dapat terwujud (Kontoravdi dkk., 2013).

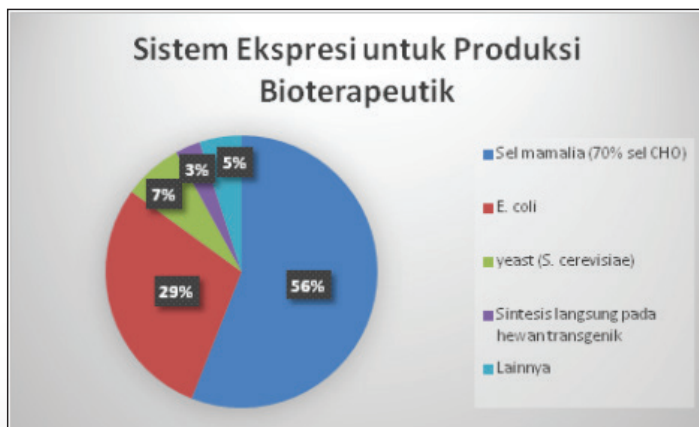
## C. Proses Hulu Produk Obat Biosimilar

Tahapan bioproses produk biologis, termasuk obat biosimilar, dimulai dari proses hulu yang meliputi kultur sel (mamalia, insekta, bakteri, atau *yeast*) dalam suatu wadah yang dapat berupa *disposable bag* atau tangki (*stirred tank*) dengan beberapa metode *feeding*, aerasi, dan strategi produksi lainnya. Untuk mendapatkan hasil yang maksimal, proses optimasi dilakukan sebelum proses kultur sel dalam skala besar yang meliputi seleksi sel lestari, rekayasa sel lestari, seleksi klon, optimasi media, dan optimasi metode panen sel. Selanjutnya, dilakukan pengembangan bioproses yang mencakup desain reaktor, *scaling up* produksi, proses memonitor, dan analisis kualitas produk.

### 1. Seleksi Sel Lestari

Secara umum, untuk produksi obat bioterapeutik termasuk obat biosimilar dapat menggunakan beberapa *platform*, termasuk sistem ekspresi sel mamalia dan nonselektif mamalia (insekta, bakteri, dan ragi). Pemilihan sistem ekspresi yang tepat merupakan hal penting sebelum memulai proses produksi. Sistem produksi menggunakan nonselektif mamalia memiliki tantangan tersendiri, terutama untuk produk glikoprotein yang harus melewati tahapan modifikasi pada saat proses pascatranslasi yang tidak dimiliki oleh nonselektif mamalia. Akibatnya, sistem ekspresi dengan sel mamalia lebih disukai dalam produksi bioterapeutik karena sistem ini mampu memproduksi dalam jumlah besar dan dapat memfasilitasi proses modifikasi pascatranslasi protein yang akan berhubungan dengan aktivitas protein (Durocher & Butler, 2009).

Sistem ekspresi sel mamalia dan sel hewan secara umum memiliki kelebihan dalam proses ekstraksi protein. Protein akan disekresikan ke luar sel sehingga tidak memerlukan tahapan penghancuran sel, dan biasanya diikuti proses *refolding* badan inklusi apabila menggunakan sistem ekspresi prokariot (bakteri). Sel mamalia yang paling umum digunakan untuk produksi bioterapeutik, yaitu sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO), *baby hamster kidney* (BHK21), dan sel *murine myeloma* (NS0 dan Sp2/0) (Estes & Melville, 2014). Pemilihan sistem ekspresi (Gambar 9.4) biasanya didasarkan pada kemampuan sel tersebut dalam menghasilkan produk dengan kualitas yang diinginkan, termasuk struktur dan *yield* protein dan tergantung dari pilihan setiap produsen yang sering dipengaruhi oleh pengalaman dan keahlian masing-masing. Saat ini, produk obat biosimilar yang sedang dikembangkan LIPI, tepatnya di Pusat Penelitian Bioteknologi, Kompleks CSC-BG, Cibinong, Jawa Barat, menggunakan beberapa sistem ekspresi, yaitu sel mamalia CHO untuk produksi eritropoietin, sel *yeast* untuk produksi interferon dan bakteri untuk produksi *granulocyte colony-stimulating factor* (GCSF).



Ket.: Sistem yang digunakan untuk produk bioterapeutik yang telah disetujui untuk dipasarkan rentang waktu 2006 hingga Juni 2010.

Sumber: Diadaptasi dari Walsh (2013)

**Gambar 9.4** Persentase sistem ekspresi



Proses seleksi sel lestari dimulai dengan transformasi/transfeksi vektor rekombinan. Ada beberapa metode yang bisa digunakan untuk mengintroduksi vektor DNA pada sel. Untuk sel mamalia bisa menggunakan kalsium fosfat (Septisetyani dkk., 2012), elektroporasi (Potter, 2003), liposom (Rubiyana dkk., 2020; Wisnuwardhani dkk., 2017), dan penggunaan polimer atau dendrimer (Baker dkk., 2004). Untuk bakteri dan *yeast* bisa menggunakan *heat shock* (Froger & Hall, 2007; Morita & Takegawa, 2004) dan elektroforasi (Herawati dkk., 2015), dan untuk sel insekta bisa menggunakan *polyethyleneimine* (PEI) yang memiliki efisiensi lebih baik daripada metode transfeksi dengan liposom (Roest dkk., 2016). Sel yang sudah tertransformasi akan diseleksi melalui *marker*/penanda yang diintegrasikan pada vektor. Ada dua jenis seleksi penanda (Tabel 9.1), yaitu antibiotik dan non-antibiotik (penanda metabolik atau nutrien). Hanya sel yang memiliki penanda seleksi (gen) target yang akan bertahan tumbuh (seleksi positif).

**Tabel 9.1** Marker Seleksi yang Umum Digunakan dan Reagen untuk Seleksi beserta Organisme Target

Marker Seleksi (Gen)	Reagen yang Digunakan Untuk Seleksi	Organisme Target
<b>Seleksi dengan Marker Antibiotik</b>		
Ampr	Ampicillin	Bakteri
NeoR	Kanamycin dan Geneticin (G418)	Bakteri, Mamalia, dan Fungi
mFabI	Triclosan ( <i>antibiotic free</i> )	<i>E. coli</i>
ZeoR	Zeocin	Semua organisme, terutama <i>yeast</i>
NAT	Nourseothricin (NTC)	Semua organisme
HygR	Hygromycin	Eukariota
SpcR (AadA)	Streptomycin dan Spectinomycin	Bakteri
PuroR	Puromycin	Mamalia
BsdR	Blasticidin	Mamalia
hisD	Histidinol	Mamalia

Marker Seleksi (Gen)	Reagen yang Digunakan Untuk Seleksi	Organisme Target
Bm	Bleomycin	Mamalia
Bm	Bleomycin	Mamalia
<b>Seleksi dengan marker metabolic</b>		
Dihydrofolate reductase (DHFR)	Methotrexate (MTX)	Mamalia
Glutamine synthase (GS)	Methionine sulphoximine (MSX)	Mamalia
<b>Seleksi dengan marker nutrient</b>		
Ura3	Media defisiensi Urasil	Yeast
His3	Media defisiensi Histidin	Yeast
Leu2	Media defisiensi Leusin	Yeast
Trp1	Media defisiensi Tryptofan	Yeast

Sumber: Diadaptasi dari Alfandry (2016); Li dkk. (2010)

## 2. Rekayasa Sel Lestari

Rekayasa sel lestari dapat dilakukan untuk meningkatkan kuantitas (*yield*) dan kualitas (aktivitas biologis) produk bioterapeutik. Beberapa contoh pengembangan rekayasa sel lestari seperti berikut ini.

- 1) Ekspresi berlebih *N-acetylglucosaminyltransferase* III pada ekspresi sel CHO untuk meningkatkan fraksi *bisecting* GlcNAc pada produksi antibodi monoklonal (mAb) sehingga dapat meningkatkan *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) (Saba dkk., 2002).
- 2) RNAi dan delesi gen untuk menurunkan kadar fukosa pada produksi mAb sehingga dapat meningkatkan aktivitas ADCC (Kanda dkk., 2007; Mori dkk., 2004).
- 3) Ekspresi berlebih gen anti-apoptosis atau teknologi RNAi yang memediasi *knock down* ekspresi gen apoptosis untuk meningkatkan viabilitas sel yang dapat meningkatkan produksi (Sauerwald dkk., 2006).

- 4) Rekayasa struktur glikan pada sistem ekspresi *yeast Pichia pastoris* untuk produksi mAb dengan spesifikasi struktur glikan yang tinggi (Li dkk., 2006).

### 3. Seleksi Klon

Proses integrasi gen asing yang ditransformasikan pada sel mengakibatkan adanya perubahan pada genom oleh sistem amplifikasi gen sehingga klon yang dihasilkan sangat heterogen. Populasi klon yang memiliki produktivitas tinggi pun sangat jarang ditemukan dan memiliki pola pertumbuhan yang rendah. Oleh karena itu, dibutuhkan seleksi klon dalam jumlah besar untuk mendapatkan klon yang memiliki produktivitas yang tinggi.

Secara tradisional, metode yang banyak digunakan untuk seleksi klon dengan melakukan pengenceran berseri (*serial dilution*). Metode ini sangat simpel, tetapi cukup memakan waktu, membutuhkan banyak tenaga dan bahan. Pengenceran dilakukan pada 96-well plate. Well/sumuran yang tidak mengandung klon, tidak akan tumbuh. Sebaliknya, sumuran yang mengandung klon yang diinginkan, akan tumbuh. Untuk mendapatkan klon yang tunggal (monoklonal), serial dilusi ini harus dilakukan beberapa kali. Untuk mengetahui jumlah titer yang tinggi dari klon yang tumbuh, dilakukan pengukuran produktivitas protein dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Lai dkk., 2013).

Pengembangan metode seleksi klon yang dapat mengurangi waktu pengerjaan dan menghasilkan kualitas klon dengan produktivitas tinggi telah banyak dilakukan. Beberapa contoh metode yang mutakhir telah tersedia seperti dijelaskan berikut ini.

- 1) Seleksi dengan metode FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Munculnya teknologi FACS telah mengilhami pengembangan protokol yang dapat mempercepat proses seleksi klon secara signifikan. Metode FACS dapat menganalisis sel secara individual dengan cepat dalam populasi yang heterogen. Produktivitas dari setiap sel terlebih dahulu dianalisis dan ditentukan apakah sel tersebut layak untuk dikloning. Hanya sel yang memiliki

standar ambang batas yang akan dikloning ke dalam 96-*well plate*. Proses ini secara signifikan dapat mengurangi analisis klon pasca-pemisahan ketika analisis untuk klon yang memiliki produktivitas yang rendah tidak dilakukan (Gallagher & Kelly, 2017).

- 2) ClonePix. ClonePix FL (Genetix, Sunnyvale, California, Amerika Serikat) merupakan instrumen otomatis untuk pemilihan koloni yang mampu menyeleksi klon dalam jumlah besar dan mengidentifikasi klon yang memiliki produktivitas tinggi dalam waktu singkat. Metode ini digunakan untuk seleksi klon pada sel mamalia yang berdasarkan beberapa parameter, yaitu ukuran sel dan—lebih jauh lagi—dapat menyeleksi berdasarkan jumlah protein yang disekresikan atau yang memproduksi protein tertentu. Antibodi biasa digunakan untuk mengikat protein yang diekspresikan oleh klon tersebut (Lee dkk., 2006).

#### 4. Optimasi Media

Menemukan formula media yang tepat merupakan salah satu hal penting dalam pengembangan proses produksi pada industri protein terapeutik. Salah satu hal yang krusial adalah proses pembentukan struktur primer dari kebanyakan asam amino dalam proses produksi protein terapeutik pada kultur sel yang tergantung pada komposisi media kultur. Oleh karena itu, proses optimasi media menjadi salah satu poin yang harus dilakukan dalam proses produksi protein terapeutik. Terdapat beberapa cara yang bisa digunakan dalam optimasi media kultur, seperti titrasi salah satu komponen media, pencampuran media, dan pengukuran perubahan komposisi kimia dari media yang digunakan selama proses kultur sel (Fletcher, 2005). Walaupun secara umum optimasi media memakan waktu yang lama dan padat karya, penggunaan metode dengan tata kelola manajemen yang baik melalui pendekatan desain percobaan secara statistik sudah digunakan untuk mengurangi waktu pengembangan optimasi media (Castro dkk., 1992; Hammett dkk., 2007).

Optimasi media dapat juga memengaruhi efisiensi produksi dengan menurunkan biaya produksi. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan oleh Pais-Chanfra dan Trujillo-Tledo (Pais-Chanfrau & Trujillo-Toledo, 2016), optimasi media kultur dengan modifikasi media kultur pada proses produksi skala besar untuk protein terapeutik proinsulin pada sistem *Pichia pastoris* menghasilkan metode yang lebih simpel, murah, dan mengurangi polusi dari produk buangan fermentasi.

## 5. Desain Reaktor

Jenis bioreaktor yang ada saat ini umumnya dibedakan berdasarkan bentuk reaktor, jenis media, sumber energi untuk reaksi, ataupun metode pengadukan yang digunakan. Bioreaktor yang dikenal luas dalam dunia industri adalah reaktor tangki berpengaduk (*Stirred Tank Reactor/STR*). Reaktor model STR banyak digunakan dalam industri obat biologi. Jenis bioreaktor lain, yaitu *photobioreactor*, *solid-state*, *bubble column*, *airlift*, *hollow fiber*, *rocking bag*, dan *stem cell*. Tabel 9.2 memberikan gambaran yang lebih detail mengenai perbedaan jenis-jenis bioreaktor tersebut.

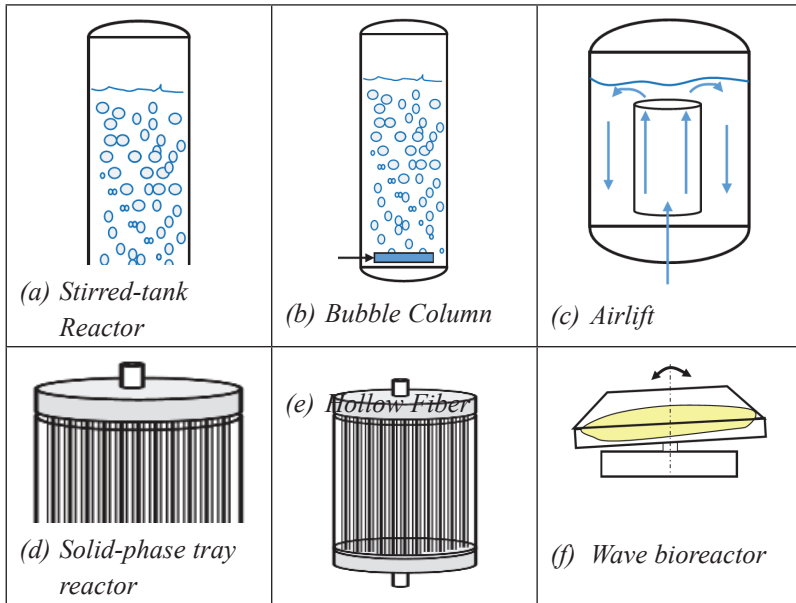
**Tabel 9.2** Jenis-Jenis Bioreaktor Untuk Kultur Sel Produk Obat Bioterapeutik

No.	Jenis Bioreaktor	Kekhususan dan Aplikasi
1	<i>Stirred Tank</i>	Tangki silinder dengan pengaduk, untuk produksi obat biologi
2	<i>Photo-bioreactor</i>	Menggunakan cahaya sebagai sumber energi reaksi; Organisme yang terlibat dapat berfotosintesis (tanaman, alga, bakteri)
3	<i>Solid-state</i>	Menggunakan media fermentasi padat; Organisme yang terlibat: fungi, bakteri, dan kapang; Untuk pengolahan makanan
4	<i>Bubble Column</i>	Menggunakan aliran gas dari dasar reaktor untuk pengadukan dan aerasi
5	<i>Airlift</i>	Serupa dengan reaktor <i>bubble column</i> , ditambah dengan 'draf' untuk meratakan distribusi oksigen dan gaya geser ( <i>shear forces</i> )

No.	Jenis Bioreaktor	Kekhususan dan Aplikasi
6	<i>Hollow Fiber</i>	Memiliki membran/filter silindris tempat bertumbuhnya sel. Filter berada di dalam <i>cartridge</i> dan dialiri media kultur
7	<i>Rocking Bag</i>	Reaktor berbahan plastik dan untuk sekali pakai. Pencampuran larutan dalam reaktor dilakukan dengan menggerakkan pemegang ( <i>holder</i> ) bioreaktor. Reaktor isi sesuai untuk proses kultivasi sel yang hanya memerlukan sedikit transfer oksigen dan pendinginan.
8	<i>Stem Cell</i>	Bioreaktor digunakan untuk kultivasi dan diferensiasi sel. Jenis bioreaktor ini masih dalam tahap pengembangan sehingga belum ada di pasaran.

Sumber: Keijzer dkk. (2011)

Karena proses biologis di dalamnya memerlukan pemantauan dan pengendalian kondisi yang ketat, bioreaktor dilengkapi dengan modul pemantauan dan pengendalian otomatis. Pemantauan dapat dilakukan secara *real-time*. Bioreaktor merupakan sistem tertutup untuk mencegah kontaminasi dan menjamin keselamatan operator. Kontaminasi juga dijaga dengan cara sterilisasi alat sebelum digunakan dan melengkapi bioreaktor dengan penyaring gas yang masuk/keluar reaktor. Berbagai jenis bioreaktor yang ada memberi implikasi yang berbeda dalam hal biaya pengadaan dan pemeliharaan, biaya pengembangan proses, kemampuan *scale-up*, serta kebutuhan jumlah dan kompetensi operator. Keberagaman jenis bioreaktor (Gambar 9.5) tersebut dirancang untuk pilihan yang disesuaikan dengan beberapa kriteria. Untuk menentukan pilihan bioreaktor yang tepat, faktor kondisi kultur, jenis sel/sistem ekspresi, biaya adaptasi dari kondisi kultur awal ke kondisi bioreaktor, kemudahan *scale-up*, kompleksitas sistem, serta biaya bahan, harus dipertimbangkan. Bioreaktor yang tidak terlalu rumit, tetapi dapat dioperasikan pada parameter proses yang diinginkan dan mutu sel yang bagus dan konsisten akan menjadi pilihan (Eaker dkk., 2017).



Sumber: Mandenius (2016)

**Gambar 9.5** Jenis-Jenis Bioreaktor

### a. Tren Pengembangan Bioreaktor

Tren dalam desain dan pengoperasian bioreaktor yang ada saat ini adalah penggunaan bioreaktor yang lebih murah dan kemajuan sistem komputer untuk mengelola jaringan metabolik, dinamika fluida, dan model kinetika yang semakin kompleks. Bahan plastik yang berdaya tahan tinggi terhadap kondisi sterilisasi dan operasi bioreaktor menjadi pilihan karena lebih murah dan mudah dalam fabrikasi dibandingkan logam *stainless*. Efisiensi biaya manufaktur juga berasal dari otomatisasi proses *assembling* untuk menghasilkan bioreaktor sekali pakai tersebut. Bioreaktor sekali pakai yang sedang tren saat ini adalah *wave bioreactor* dengan *bioreactor bag* sekali pakai. Penggunaan bahan polimer untuk bioreaktor tersebut telah dikembangkan untuk membuat reaktor mini demi menjawab kebutuhan riset, efisiensi biaya riset, dan percepatan pengumpulan data (Mandenius, 2016).



Dari sisi pengembangan secara umum, target yang ingin dicapai adalah menurunkan ukuran bioreaktor yang digunakan dalam tahap riset dan pengembangan. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi biaya pengembangan sehingga dalam waktu yang lebih singkat dan biaya yang sama, data yang diperoleh lebih banyak. Dengan demikian, pemasaran produk dapat lebih cepat. Umumnya, volume kerja reaktor minimal besarnya 3 liter supaya dapat diaplikasikan ke skala yang lebih besar, skala pilot, dan pabrik. Pada volume 3 liter, pola pencampuran masih dapat menyerupai pencampuran pada reaktor skala besar, sedangkan sensor dan aktuator yang digunakan juga masih sama dengan yang ada pada reaktor besar. Meskipun demikian, pengembangan lebih lanjut akan memungkinkan penggunaan reaktor yang lebih kecil.

Pengembangan reaktor skala mini sangat bergantung pada hasil pengembangan sensor dan aktuator, serta didukung dengan kemajuan kinerja perangkat lunak pengolahan data. Sensor mini berbasis fluorofor telah dikembangkan untuk pengukuran pH dan oksigen terlarut secara non invasif (PreSens GmbH) pada skala kultivasi mililiter. Sensor pH mini yang dapat disterilisasi dan sensor oksigen yang hanya berdiameter 6 mm juga telah dikembangkan (Applikon Biotechnology) untuk digunakan pada reaktor 50 mL. Salah satu faktor krusial dalam reaktor mini adalah volume penambahan media secara kontinu. Untuk reaktor skala 50 mL, penambahan media harus dalam bentuk *droplet* berukuran nanoliter agar efek penambahan tersebut masih dapat dikontrol. Pada reaktor STR, komponen lain yang vital adalah pengaduk. Dalam skala miniatur, *magnetic stirrer* mungkin masih dapat digunakan untuk kultivasi sel mamalia. Untuk kultivasi sel mikroba, kecepatan pengadukan dan transfer oksigen yang diperlukan lebih besar. Saat ini telah dikembangkan pengaduk *direct drive* mini yang dapat berputar hingga 2.000 rpm untuk keperluan tersebut. Dengan semakin kecilnya reaktor, eksperimen yang dilakukan akan semakin banyak karena waktu dan biaya per eksperimen jauh lebih rendah. Untuk mengelola dan mengolah lonjakan jumlah data-data tersebut, diperlukan juga pengembangan dari sisi perangkat

Buku ini tidak diperjualbelikan.

lunak. Sebagai contoh, model matematis diperlukan untuk dapat memperkirakan hubungan antara komposisi media dan pertumbuhan sel. Selain itu, dampak dari pembentukan produk samping juga dapat diperkirakan sebelum pengujian produk dilakukan. Selanjutnya, pengembangan perangkat lunak yang dapat dioperasikan jarak jauh, salah satunya dengan *smartphone*, juga akan mengurangi durasi dan biaya pengembangan. Reaktor mini akan mengurangi ukuran ruang dan gedung laboratorium yang diperlukan sehingga biaya investasi ruangan juga lebih rendah (Keijzer dkk., 2011)

### b. Prinsip Umum dalam Desain Bioreaktor

Bioreaktor yang efektif bukan hanya sebagai tempat yang sesuai bagi berlangsungnya reaksi biologis, melainkan juga harus mampu mengendalikan dan memengaruhi reaksi tersebut. Desain bioreaktor yang efektif harus mampu memberikan kondisi supaya berbagai jenis sel dapat tumbuh dengan efisien agar dapat mengakomodasi produksi berbagai jenis produk dalam satu unit reaktor. Untuk mencapai tujuan tersebut, desain bioreaktor perlu memperhitungkan dua hal, yaitu parameter reaktor dan reaksi biologis yang tepat. Parameter reaktor yang vital adalah perpindahan massa dan energi. Perpindahan tersebut berlangsung pada semua tahap reaksi, baik di dalam maupun di luar sel. Pada saat sel tumbuh dan menghasilkan produk, terjadi perubahan massa dan energi dalam reaktor. Hal ini memengaruhi kondisi optimum reaksi dalam reaktor. Untuk menjaga kondisi optimum dan kesetimbangan, diperlukan distribusi yang merata di dalam sistem atau transfer massa dan energi ke luar. Selain perpindahan massa dan panas, beberapa parameter desain reaktor disajikan pada Tabel 9.3.

**Tabel 9.3** Kriteria Desain Bioreaktor

Kriteria Desain	Tujuan	Metode	Parameter
Perpindahan gas dalam medium <i>submerged</i>	Mencapai laju pertumbuhan sel yang tinggi; mencegah kekurangan oksigen	Bentuk reaktor; desain sparger; penggunaan sekat; penambahan tekanan; bentuk baling-baling	Aspek rasio, KLa, OTR, OUR, CER

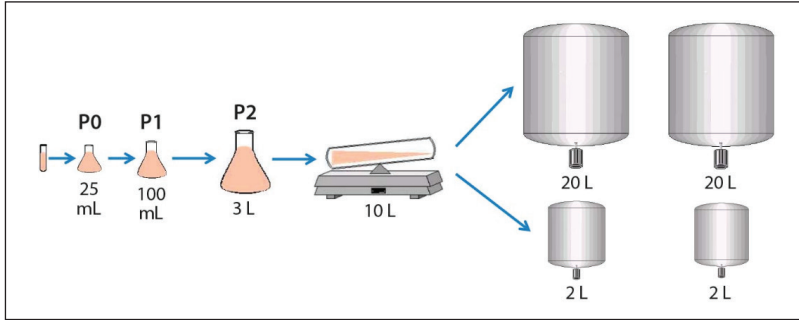
Kriteria Desain	Tujuan	Metode	Parameter
Proses pencampuran	Mencegah ketidak-rataan distribusi panas, nutrisi, dan tekanan; mengurangi energi yang diperlukan	Bentuk baling-baling, bentuk sekat, analisis proses pencampuran, CFD	Aspek rasio, waktu pencampuran (t), power number
Penambahan nutrisi	Transfer yang efisien sesuai volume media	Feeding regimen, <i>multiport</i>	Profil linier dan eksponensial
Perpindahan massa cair-padat	Meningkatkan laju reaksi, mengurangi gradien massa dan energi	Pengatur distribusi aliran, pori-pori penunjang	Thiele modulus
Perpindahan panas	Memindahkan panas hasil metabolisme dengan lebih efisien	Kumparan internal, jaket, sirkulasi media, pendinginan media	Bilangan tak berdimensi
Sterilitas	Memastikan sistem tertutup untuk mencegah kontaminasi dari luar	Prosedur sterilisasi, tekanan tinggi, sekat, kontainmen, filter mikro	Durasi sterilisasi, suhu
Pemilihan strain	Memilih strain yang adaptif terhadap keterbatasan kondisi media dan reactor	Analisis mikroba, omics	Laju spesifik (u, qP, qS), konstanta inhibisi
Prosedur <i>scale-up</i>	Memastikan kondisi yang sama pada skala besar	Desain bentuk tangkai dan baling-baling, rentang pencampuran	Rasio aspek, aturan <i>scale-up</i> , parameter, bilangan tak berdimensi
Rheology		Aditif yang memengaruhi viskositas, CFD	Bilangan Reynold, data CFD
Homogenitas kultur	Mencegah gradient	CFD	Data analisis berdasarkan zona reaksi
Komposisi media	Komposisi media yang seimbang	Analisis factorial, metode omics	Parameter "model fit"

Sumber: Mandenius (2016)

Parameter reaksi biologis yang harus diperhatikan dalam desain adalah suhu, pH, kecukupan substrat, ketersediaan air, garam, vitamin, oksigen (untuk reaksi aerobik), perubahan komposisi gas, serta pemisahan produk dan produk samping. Di samping mengendalikan parameter reaktor dan reaksi biologis, desain harus diarahkan untuk mendukung pembentukan morfologi sel optimal. Selain itu, desain harus mampu meminimalisasi kontaminasi dari organisme yang tidak diinginkan atau mutasi organisme.

#### **D. Riset Skala Pilot**

Dalam industri farmasi, termasuk dalam produksi obat biosimilar, produksi pada skala pilot merupakan bagian dari bioproses karena formula pada skala lab ditransformasikan menjadi suatu produk yang dapat dikembangkan pada skala yang lebih besar (manufaktur). Riset pada skala pilot dapat digunakan untuk menginvestigasi seluruh proses produksi dan mengurangi risiko yang terkait dengan produksi skala besar. Untuk produksi pada skala pilot, kultur sel harus dilakukan secara bertahap. Sel yang mengandung klon positif yang sebelumnya disimpan dalam keadaan beku, dicairkan, dan ditumbuhkan dalam erlenmeyer kecil (misal 20 mL media dalam labu erlenmeyer 100 mL). Selama kurun waktu 2 minggu, sel ditumbuhkan secara bertahap dalam volume yang lebih besar untuk mendapatkan inokulum (*seed culture*) yang akan digunakan untuk proses kultur sel di tangki fermentasi yang besar (20 L) (Gambar 9.6). Proses pertumbuhan secara bertahap ini akan menghasilkan proses pertumbuhan volume sel yang baik. Pada saat inokulum, sel ditumbuhkan pada tangki yang besar, dan sel tersebut akan tumbuh dengan densitas sel yang optimal (Sommerfeld & Strube, 2005). Pada produksi skala pilot ini, beberapa parameter yang digunakan pada skala kecil (erlenmeyer dan *wave bioreactor*), seperti pH, % CO<sub>2</sub>, *feed strategy*, perubahan suhu, dan parameter lainnya harus dipertahankan. Analisis densitas sel, gas, metabolit, dan jumlah titer protein dilakukan selama proses produksi pada skala pilot (Dhanaskharan dkk., 2015).



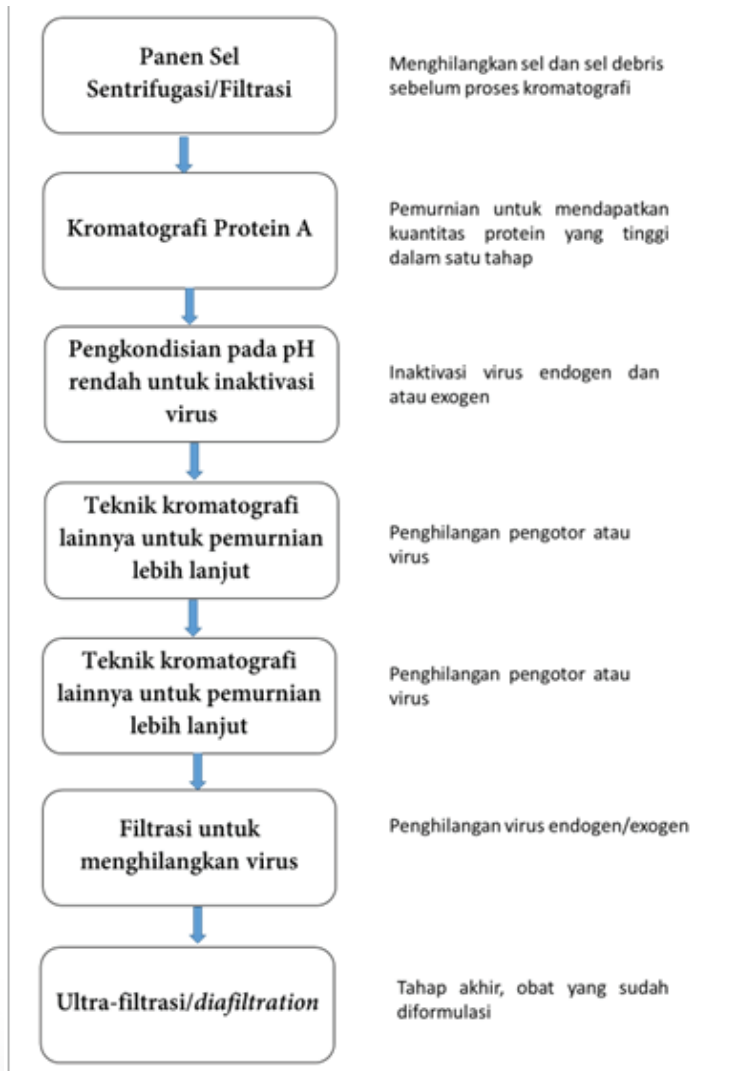
Sumber: Dhanaskharan dkk. (2015)

**Gambar 9.6** Produksi Obat Biosimilar Skala Pilot

## E. Proses Hilir Produk Obat Biosimilar

Proses hilir (DSP) merupakan elemen yang penting dalam tahapan produksi obat biosimilar untuk memastikan proses produksi yang *reliable* dan *reproducible* yang dapat menghasilkan produk dengan kualitas yang sama dengan produk pembandingnya/originator. Pada proses ini juga dilakukan pengembangan untuk menghasilkan total *yield* dan kemurnian yang tinggi dengan kapasitas produksi yang lebih besar dan proses yang lebih cepat. Gambar 9.7 menunjukkan tahapan proses hilir untuk produk antibodi monoklonal. Tahapan proses hilir dimulai dengan pemanenan produk dari bioreaktor. Teknik dan alat untuk pemanenan produk kultur yang akan digunakan dapat tergantung dari jenis sel dan juga protein target. Beberapa teknik yang secara umum digunakan meliputi mikrofiltrasi membran, *tangential-flow filtration* (TFF), sentrifugasi, *depth filtration*, serta gabungan antara sentrifugasi dengan *depth-filtration* dan atau dengan TFF. Metode flokulasi atau pengendapan juga dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa asam atau kation polielektrolit. Proses panen atau pemurnian pada tahap awal ini memiliki peran yang sangat besar sehingga memiliki tantangan yang cukup besar untuk menghindari produk yang terdegradasi dan untuk mendapatkan kuantitas protein target yang optimal (Roush & Lu, 2008).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Sumber: Diadaptasi dari Liu dkk. (2010)

**Gambar 9.7** Contoh Proses Pemurnian untuk Produk Antibodi Monoklonal

Tahapan selanjutnya adalah untuk memisahkan protein target dari protein pengotor pada media tumbuh, seperti protein yang terdegradasi dan protein nontarget lainnya dengan menggunakan teknik kromatografi. Terdapat berbagai metode kromatografi yang dilakukan untuk proses pemurnian produk, seperti kromatografi afinitas, kromatografi penukar ion (anion dan kation), kromatografi interaksi hidrofobik, dan kromatografi filtrasi gel. Dalam industri biofarmasi, termasuk biosimilar, penggunaan teknik kromatografi merupakan aspek kritical dan banyak digunakan karena memiliki peran yang sangat penting untuk menghasilkan produk dengan kemurnian yang tinggi (Liu dkk., 2010). Teknik pemurnian kromatografi ini biasanya digabungkan dengan teknik spektroskopi untuk metode analisis protein target. Metode Spektroskopi yang biasa digunakan adalah spektroskopi UV/Vis untuk mengukur absorbansi protein secara umum pada panjang gelombang 240–340 nm. Absorbansi sinar UV/vis pada panjang gelombang 280 nm secara umum digunakan sebagai metode pengukuran konsentrasi protein (Rüdt dkk., 2017). Pada proses hilir ini dilakukan juga penghilangan virus dengan cara pembuangan dan inaktivasi. Untuk produk biologis, termasuk obat biosimilar, regulasi FDA mengharuskan setidaknya terdapat dua tahap yang berbeda untuk mengurangi virus demi menjamin keamanan dan efikasi produk obat. Tahapan ini harus membuktikan bahwa virus yang diinaktivasi atau dihilangkan tersebut memiliki potensi untuk merusak produk akhir. Terdapat beberapa metode untuk inaktivasi virus yang dapat dilakukan secara fisiko-kimia, seperti penggunaan asam (pH rendah), urea, deterjen, panas, dan radiasi UV. Masalahnya, metode fisiko-kimia tersebut dapat memengaruhi stabilitas protein sehingga harus dipilih metode terbaik yang dapat menginaktivasi virus, tetapi tetap mempertahankan kualitas produk obat. Selain menghilangkan virus, beberapa teknik secara mekanik biasa digunakan, yakni absorpsi protein dengan metode kromatografi dan penggunaan membran dengan metode ultrafiltrasi (Sommerfeld & Strube, 2005).



## F. Proses Transfer Teknologi dan Proses Produksi cGMP

Setelah keseluruhan proses pada skala lab dan skala pilot telah ditetapkan, transfer teknologi ke tahap manufaktur diperlukan untuk cGMP proses produksi produk klinis atau produk komersial. Tujuan dari transfer teknologi ialah mentransfer keseluruhan proses yang diperlukan meliputi informasi, dokumentasi, peralatan, bahan, dan peralatan untuk mengimplementasikan proses manufaktur pada fasilitas yang telah ditentukan dan untuk mendapatkan persetujuan dari regulator. Kolaborasi antardepartemen sangat diperlukan agar proses transfer teknologi ini berhasil. Analisis gap harus dilakukan sebelum memulai proses transfer teknologi ke fasilitas yang baru untuk mengidentifikasi kekurangan dan meminimalisasi risiko proses manufaktur. Modifikasi peralatan dan fasilitas serta kualifikasi aktivitas untuk proses manufaktur harus dilengkapi sebelum proses produksi dengan skala besar dimulai. Pada perubahan skala produksi untuk kepentingan uji klinis dari tahap awal (fase 1 dan 2) ke tahap akhir (fase 3 hingga komersialisasi), modifikasi fasilitas dan peralatan sangat diperlukan (Li dkk., 2010). Seluruh proses transfer teknologi dan proses produksi cGMP produk biosimilar yang dikembangkan oleh Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI akan dilakukan oleh mitra industri.

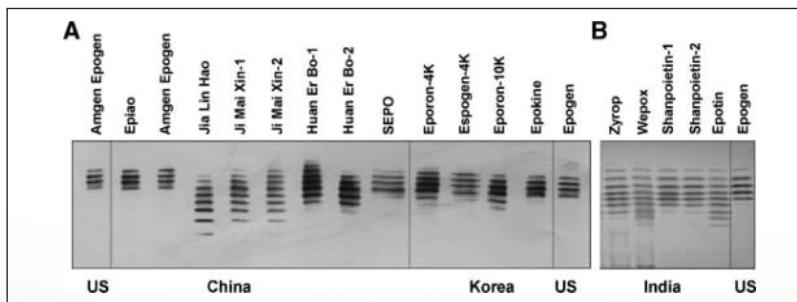
## G. Karakterisasi Protein untuk Uji komparasi Obat Biosimilar

Untuk memenuhi studi komparasi antara kandidat obat biosimilar dan produk pembanding, beberapa metode analitis telah banyak digunakan untuk studi karakterisasi struktur protein dan evaluasi sifat fisiko-kimia. Secara umum, karakterisasi protein meliputi komposisi asam amino, sekuensing N- dan C- terminal asam amino, *peptide mapping*, struktur sekunder protein, dan analisis pola glikosilasi serta komposisi karbohidrat untuk glikoprotein yang berperan penting pada kesamaan sifat biologis antara kandidat biosimilar dan produk pembanding.

## 1. SDS PAGE, IEF, dan *Western blotting*

SDS PAGE merupakan metode kualitatif yang sudah secara luas digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Metode ini secara rutin digunakan pada regulasi uji komparasi obat biosimilar. Pita protein yang diharapkan dapat diisolasi dan digunakan untuk uji lanjutan dengan menggunakan spektroskopi massa (Wilm dkk., 1996). Kelemahan metode ini adalah hasil dari pewarnaan gel SDS sering menghasilkan perbedaan intensitas warna yang mengakibatkan ketidakakuratan dalam pembuktian kemurnian protein. Metode PAGE ini sering dikombinasikan dengan *western blotting*. Dalam prosesnya, gel SDS ditransfer ke membran, selanjutnya diinkubasi dengan antibodi yang spesifik terhadap protein target untuk memvisualisasikan target protein. Metode PAGE/*Western blotting* (Gambar 9.8) dapat digunakan untuk analisis agregasi protein seperti yang dilakukan untuk uji komparasi berbagai obat biosimilar eritropoietin (EPO) dengan produk pembanding (Park dkk., 2009).

*Isoelectric focusing* (IEF) merupakan metode yang mirip dengan PAGE yang memisahkan protein berdasarkan perbedaan titik isoelektrik (pI). Metode ini dapat digunakan untuk analisis kualitatif



Ket.: Produk obat biosimilar produksi Tiongkok, Korea, dan India dibandingkan produk originator dari Amgen (Amerika Serikat).

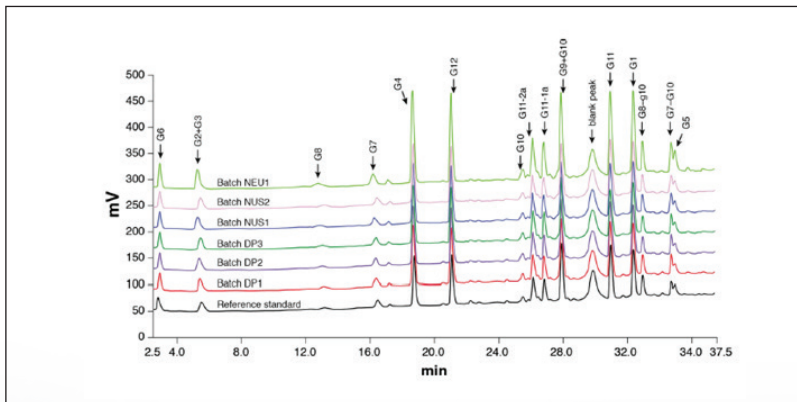
Sumber: Park dkk. (2009)

**Gambar 9.8** Kombinasi metode *Isoelectro focusing* (IEF) Gel dan *Western blots* untuk deteksi isoform.

dan kuantitatif menggunakan *scanning densitometry*. Penggunaan metode IEF juga digunakan untuk uji komparasi biosimilar EPO yang memperlihatkan keragaman produk dibanding dengan produk pembandingnya (Park dkk., 2009).

## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT merupakan metode analisis yang biasa digunakan untuk uji komparasi obat biosimilar yang biasanya dikombinasi dengan metode lain, seperti kromatografi eksklusi untuk menguji kemurnian dan heterogenitas dari protein rekombinan. Metode ini dapat mengarakterisasi agregasi protein dan masih menjadi metode yang unggul untuk uji komparasi obat biosimilar (Falconer dkk., 2011). Gambar 9.9 mendeskripsikan kromatogram tumpang tindih produk obat biosimilar GCSF dengan originatornya yang menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi.



Sumber: Sörgel dkk. (2015)

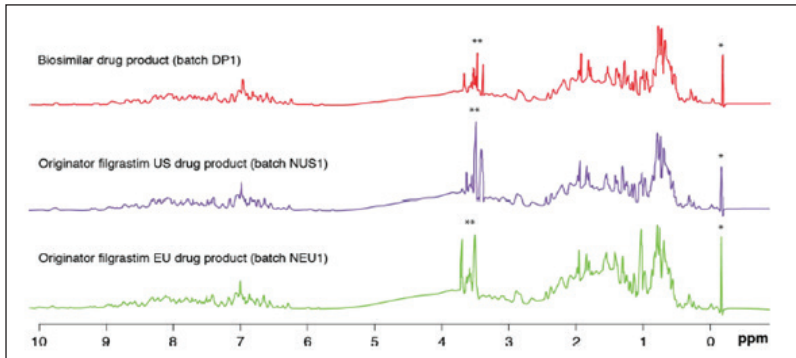
**Gambar 9.9** Tumpang tindih kromatogram KCKT (RP-HPLC) produk obat biosimilar GCSF dengan originatornya (filgrastim) menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi.

### 3. Metode Spektroskopi: UV, Fluoresensi, FTIR dan Raman, CD Spektra dan NMR

Beberapa teknik spektroskopi dapat digunakan untuk uji komparasi obat biosimilar. Spektroskopi sinar UV digunakan untuk mendeteksi pengotor DNA pada protein obat biosimilar. Spektroskopi *fluorescence* digunakan untuk mendeteksi gugus aromatik pada asam amino tirosin, triptofan, dan fenilalanin. Metode ini dapat mendeteksi perubahan konformasi protein yang disebabkan oleh agregasi, *unfolded*, dan pembentukan kompleks pada protein. Sebagai contoh, hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan struktur dari beberapa produk EPO berdasarkan pengukuran protein intrinsik dengan Spektroskopi fluoresensi (Deechongkit dkk., 2006).

Untuk analisis struktur sekunder protein, metode analisis *Circular Dichroism* (CD) spektra dan *Fourier-transform Infrared* (FTIR) & Raman merupakan metode yang lazim digunakan untuk uji komparasi. Analisis CD spektra dapat menentukan perbedaan geometri dari struktur protein (Whitmore & Wallace, 2008). Analisis spektroskopi FTIR dan Raman digunakan untuk deteksi pita Amida I antara 1600–1700  $\text{cm}^{-1}$  yang dipengaruhi oleh struktur sekunder protein. Metode Spektroskopi lainnya yang biasa digunakan untuk analisis struktur protein adalah Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (NMR). Metode ini digunakan untuk determinasi struktur protein terapeutik seperti EPO (Cheetham dkk., 1998) dan IFN *alpha* 2a (Klaus dkk., 1997). Spektroskopi NMR juga dapat digunakan untuk uji komparasi obat biosimilar.

Penggunaan Spektroskopi sebagai metode tandem dengan metode lainnya untuk uji komparasi obat biosimilar juga digunakan untuk beberapa analisis, seperti karakterisasi heterogenitas dan variasi dari produk akhir biosimilar. Kombinasi pematangan dengan enzim, KCKT, dan Spektroskopi Massa-Kromatografi cair digunakan untuk pengujian secara detail dari keragaman produk akhir obat biosimilar yang biasanya terjadi pada produk glikoprotein, seperti EPO, *tissue plasminogen factor*, dan antibodi monoklonal (Falconer dkk., 2011). Gambar 9.10 adalah spektrum dari produk obat biosimilar OCSF dibandingkan originatornya.



Sumber: Sörgel dkk. (2015)

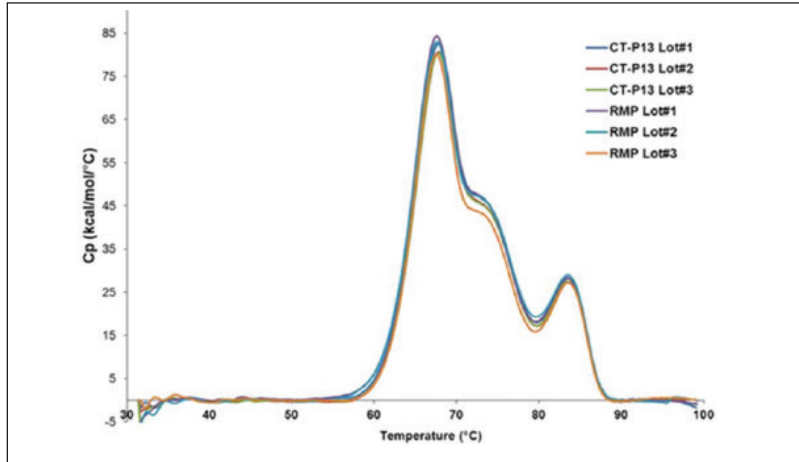
**Gambar 9.10** Spektrum 1D-<sup>1</sup>H-NMR dari produk obat biosimilar GCSF dibandingkan originatornya (filgrastim).

#### 4. Uji stabilitas struktur protein dengan DSC

*Differential Scanning Calorimetry* (DSC) merupakan teknik analisis sederhana yang digunakan untuk mengukur stabilitas termal suatu protein. Metode ini digunakan dalam uji komparasi obat biosimilar seperti yang tercantum dalam regulasi yang dikeluarkan oleh EMA (Mahler dkk., 2016). Analisis DSC (Gambar 9.11) menghasilkan informasi data yang lebih lengkap daripada metode Spektroskopi karena adanya pengukuran perubahan entalpi pada DSC. Apabila nilai perubahan entalpi ( $\Delta H$ ) dari suatu obat biosimilar sama dengan produk pembandingnya, produk obat biosimilar tersebut memiliki lipatan protein yang benar (*correct folding*). Sebaliknya, nilai  $\Delta H$  yang tidak sama menandakan protein tersebut memiliki lipatan yang tidak benar (*incorrect folding*).

#### H. Uji Fungsi Biologis Protein untuk Uji komparasi Obat Biosimilar

Produk obat biosimilar yang dihasilkan harus dibandingkan fungsi biologisnya melalui uji *in vitro* dengan produk originator. Metode yang biasa dilakukan meliputi uji afinitas terhadap reseptor, yaitu



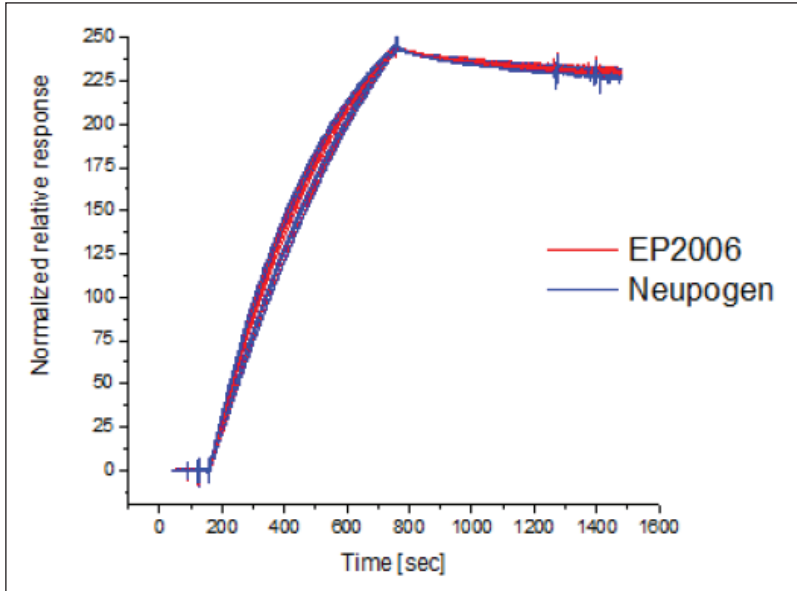
Sumber: Jung dkk. (2014)

**Gambar 9.11** DSC termogram menunjukkan kesamaan tiga temperatur transisi endotermal pada suhu 68°C, 73°C, dan 83°C untuk produk obat biosimilar antibodi monoklonal Remsima (CT-P13) dibandingkan produk originatornya (Remicade).

metode *Surface plasmon resonance* (SPR) (Gambar 9.12), ELISA, dan *isothermal titration calorimetry* (ITC). Uji *in vitro* ini sangat berguna untuk menguji kualitas dari protein. Uji ini dapat berupa langkah awal untuk meyakinkan bahwa produk obat biosimilar yang dihasilkan memiliki aktivitas biologis yang sesuai dengan yang diharapkan sebelum dilakukan uji praklinis dan uji klinis (Falconer dkk., 2011).

## 1. Uji praklinis

Tujuan utama uji nonklinis (praklinis) produk obat biosimilar adalah membandingkan toleransi dan validasi kemiripan dengan produk originator untuk hasil farmakodinamik pada level sensitivitas yang tidak bisa dilakukan pada manusia. Uji ini dilakukan pada hewan uji yang meliputi tikus dan bukan tikus yang secara umum dilakukan injeksi subkutan. Uji keamanan (imunogenisitas relatif, toleransi, dan toksisitas) merupakan rangkaian pengamatan yang harus dilakukan pada tahap ini (ICH, 2012).



Sumber: FDA (2016)

**Gambar 9.12** Sensogram SPR produk biosimilar GCSF (Zarxio) dengan originatornya (Neupogen) memiliki pola dengan tingkat kemiripan yang tinggi.

## 2. Uji klinis

Tidak seperti obat generik, pengembangan produk obat biosimilar harus melalui tahapan uji klinis dengan teliti. Dalam proses produksi biologis, termasuk obat biosimilar, sangat sulit untuk menghindari perbedaan atau heterogenitas produk akhir yang dapat memengaruhi kualitas termasuk identitas dan kemurnian produk. Perubahan tersebut juga dapat memengaruhi perbedaan hasil uji klinis. Oleh karena itu, produsen produk obat biosimilar harus dapat membuktikan bahwa adanya perubahan atau perbedaan produk akhir tidak memengaruhi identitas, kemurnian, potensi, keamanan, dan khasiat dibandingkan produk originatornya (FDA, 2016). Uji perbandingan ini terdapat dalam pedoman *International Conference of Harmonization* (ICH)



Q5E yang mencakup uji analitis, uji biologis, dan—dalam beberapa kasus—uji nonklinis dan uji klinis (ICH, 2004).

Tahapan uji klinis produk obat biosimilar dimulai dari uji perbandingan farmakokinetik dan farmakodinamik (PK/PD) antara produk pembanding dan populasi yang relevan (FDA, 2016). Pada tahapan awal uji klinis juga dilakukan investigasi terhadap keamanan produk, termasuk imunogenisitas. Apabila uji klinis tahap awal ini menghasilkan kemiripan yang cukup tinggi, setidaknya satu uji perbandingan pada fase 3 uji klinis dapat dilakukan untuk membuktikan kemiripan hasil dalam keamanan dan efikasi pada contoh populasi yang sensitif (Berghout, 2011).

Fase 3 uji klinis dimaksudkan untuk meyakinkan apabila masih terdapat ketidakpastian hasil dari uji efikasi dan keamanan produk obat biosimilar dibanding dengan produk originatornya setelah serangkaian uji fisika-kimia, biologis, praklinis, dan juga PK/PD, serta imunogenisitas pada manusia. Untuk produk obat biosimilar, uji klinis fase 3 ini harus menunjukkan bahwa produk tersebut relatif tidak boleh lebih rendah dan juga lebih tinggi terkait dengan aktivitas biologis yang dihasilkan ketika dibanding dengan produk originatornya (FDA, 2016).

## I. Penutup

Produk obat biosimilar menawarkan solusi untuk mengurangi biaya pengobatan dengan menggunakan obat bioterapeutik. Teknik bioproses produk obat biosimilar mengikuti standar produksi obat biologi dengan segala regulasi yang telah ditetapkan. Tahapan bioproses ini sangat penting untuk menghasilkan produk biosimilar yang memiliki kemiripan yang tinggi dengan produk originatornya. Selain itu, pemahaman terhadap berbagai metode pengujian secara fisiko-kimia dan biologis untuk uji komparasi biosimilar dapat memberikan pedoman bagi para periset di bidang pengembangan produk obat biosimilar untuk menghasilkan produk yang sesuai dengan regulasi yang ditetapkan.

## Daftar Pustaka

- Alfandry, R. (2016). How to choose the perfect vector for your molecular biology experiment. *Genome Compiler*. F. <http://www.genomecompiler.com/how-to-choose-the-perfect-vector/>
- Baker, J. R., Jr., Bielinska, A. U., & Kukowska-Latallo, J. F. (2004). Dendrimer-mediated cell transfection in vitro. *Methods Mol Biol.*, 245, 67–82. <https://doi.org/10.1385/1-59259-649-5:67>
- Berghout, A. (2011). Clinical programs in the development of similar biotherapeutic products: Rationale and general principles. *Biologicals*, 39(5), 293–296. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.06.024>
- Castro, P. M., Hayter, P. M., Ison, A. P., & Bull, A. T. (1992). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38(1), 84. <https://doi.org/10.1007/BF00169424>
- Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., Egrie, J., & Harvey, T. S. (1998). NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nature Structural Biology*, 5(10), 861–866. <https://doi.org/10.1038/2302>
- Deechongkit, S., Aoki, K. H., Park, S. S., & Kerwin, B. A. (2006). Biophysical comparability of the same protein from different manufacturers: A case study using epoetin alfa from Epogen® and Eprex. *J Pharm Sci*, 95(9), 1931–1943. <https://doi.org/10.1002/jps.20649>
- Dhanasekharan, K., Berdugo, C., Liu, X., Richey, C., Segu, Z., Vinci, V., Calabrese, D., LeFourn, V., & Girod, P. A. (2015, 14 April). Rapid development and scale-up of biosimilar trastuzumab: A case study of integrated cell line and process development. *BioProcess International*, 13.
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6), 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008>
- Eaker, S., Abraham, E., Allickson, J., Brieva, T. A., Baksh, D., Heathman, T. R. J., Mistry, B., & Zhang, N. (2017). Bioreactors for cell therapies:

- Current status and future advances. *Cytotherapy (Oxford, England)*, 19(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.011>
- Estes, S., & Melville, M. (2014). Mammalian cell line developments in speed and efficiency. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 139, 11–33. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_260](https://doi.org/10.1007/10_2013_260)
- Falconer, R. J., Jackson-Matthews, D., & Mahler, S. M. (2011). Analytical strategies for assessing comparability of biosimilars. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (1986)*, 86(7), 915–922. <https://doi.org/10.1002/jctb.2629>
- FDA. (2016). Clinical pharmacology data to support a demonstration of biosimilarity to a reference product guidance for industry. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM397017.pdf>
- Fletcher, T. (2005). *Designing culture media for recombinant protein production a rational approach*.
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp*, (6), 253. <https://doi.org/10.3791/253>
- Gallagher, C., & Kelly, P. S. (2017). Selection of high-producing clones using FACS for CHO cell line development. *Methods Mol. Biol.*, 1603, 143–152. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6972-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6972-2_9)
- Hammett, K., Kuchibhatla, J., Hunt, C., Holdread, S., & Brooks, J. W. (2007). *Cell technology for cell products vol. 3* (hlm. 683–691). Springer Netherlands.
- Herawati, N., Wardiana, A., & Ningrum, R. A. (2015). Expression of no affinity tagged recombinant human interferon alpha-2a in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annales Bogorienses*, 19(2), 57–62.
- ICH. (2004). Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process Q5E. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use*. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4 / Q5E\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf)

- ICH. (2009). Pharmaceutical Development Q8(R2). *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use*, 8. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf).
- ICH. (2012). Guidance for industry S6 addendum to preclinical safety evaluation of biotechnology- derived pharmaceuticals. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM194490.pdf>
- Jung, S. K., Lee, K. H., Jeon, J. W., Lee, J. W., Kwon, B. O., Kim, Y. J., Bae, J. S., Kim, D.- I., Lee, S. Y., & Chang, S. J. (2014). Physicochemical characterization of Remsima. *MABs*, 6(5), 1163–1177. <https://doi.org/10.4161/mabs.32221>
- Kanda, Y., Imai-Nishiyama, H., Kuni-Kamochi, R., Mori, K., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Okazaki, A., Lida, S., Shitara, K., & Satoh, M. (2007). Establishment of a GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: a new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics. *J Biotechnol*, 130(3), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.04.025>
- Keijzer, T., Kakes, E., & van Halsema, E. (2011). Advances in the design of bioreactor systems. *Innovation in Pharmaceutical Technology*, 60–64. <http://www.iptonline.com/articles/public/advancesinthedesignofbioreactorsystems.pdf>
- Klaus, W., Gsell, B., Labhardt, A. M., Wipf, B., & Senn, H. (1997). The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *Journal of Molecular Biology*, 274(4), 661–675. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1396>
- Kontoravdi, C., Samsatli, N. J., & Shah, N. (2013). Development and design of bio-pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2013.09.007>
- Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. K. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(5), 579–603. <https://doi.org/10.3390/ph6050579>

- Lee, C. L. C., Sauerwald, T., Kelly, T., & Moore, G. (2006). *High-throughput screening of cell lines expressing monoclonal antibodies development of an immunoprecipitation-based method by*.
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. Y., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MABs*, 2(5), 466–479. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>
- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T. A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B.-K., Cook, W. J., Cukan, M., Huoston-Cummings, N. R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S. R., Hoopes, J. P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, R., Nett, ... Gerngross, T. U. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 24(2), 210–215. <https://doi.org/10.1038/nbt1178>
- Liu, H. F., Ma, J., Winter, C., & Bayer, R. (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MABs*, 2(5), 480–499. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12645>
- Mahler, S. M., Wardiana, A., Jones, M. L., Bakker, C. J., Graham, G. G., & Howard, C. B. (2016). Biosimilars approved for treatment of inflammatory rheumatological diseases. *Int . J . Rheum . Dis*. 19(11), 1043–1048. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13037>
- Mandenius, C. F. (2016). *Bioreactors: Desain, operation and novel applications*. Wiley.
- Mori, K., Kuni-Kamochi, R., Yamane-Ohnuki, N., Wakitani, M., Yamano, K., Imai, H., Kanda, Y., Niwa, R., Lida, S., Uchida, K., Shitara, K., & Satoh, M. (2004). Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnol Bioeng*, 88(7), 901–908. <https://doi.org/10.1002/bit.20326>
- Morita, T., & Takegawa, K. (2004). A simple and efficient procedure for transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 21(8), 613–617. <https://doi.org/10.1002/yea.1104>
- Pais-Chanfrou, J., & Trujillo-Toledo, L. (2016). Optimization of culture medium for large-scale production of heterologous proteins in *Pichia pastoris* to be used in nanoscience and other biotechnological fields. *Biology and Medicine*, 8(3). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000279>
- Park, S. S., Park, J., Ko, J., Chen, L., Meriage, D., Crouse-Zeineddini, J., Wong, W., & Kerwin, B. A. (2009). Biochemical assessment of Erythropoietin

- products from Asia versus US Epoetin alfa manufactured by Amgen. *J Pharm Sci*, 98(5), 1688–1699. <https://doi.org/10.1002/jps.21546>
- Potter, H. (2003). Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, 62(1), 931–936. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- Roest, S., Kapps-Fouthier, S., Klopp, J., Rieffel, S., Gerhartz, B., & Shrestha, B. (2016). Transfection of insect cell in suspension for efficient baculovirus generation. *MethodsX*, 3, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.04.011>.
- Roush, D. J., & Lu, Y. (2008). Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane technology. *Biotechnol Prog*, 24(3), 488–495. <https://doi.org/10.1021/bp070414x>
- Rubiyana, Y., Soejoedono, R. D., & Santoso, A. (2020). Enhancement of transient erythropoietin protein expression by valproic acid in CHO-K1 suspension adapted cells. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 25(1), 28–32. <https://dx.doi.org/10.22146/ijbiotech.52621>
- Rüdt, M., Briskot, T., & Hubbuch, J. (2017). Advances in downstream processing of biologics-Spectroscopy: An emerging process analytical technology. *Journal of Chromatography A*, 1490, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.010>
- Saba, J. A., Kunkel, J. P., Jan, D. C. H., Ens, W. E., Standing, K. G., Butler, M., Jamieson, J. C., & Perreault, H. (2002). A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 305(1), 16–31. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5651>
- Sauerwald, T. M., Figueroa, B., Hardwick, J. M., Oyler, G. A., & Betenbaugh, M. J. (2006). Combining caspase and mitochondrial dysfunction inhibitors of apoptosis to limit cell death in mammalian cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 94(2), 362–372. <https://doi.org/10.1002/bit.20874>
- Septisetyani, E., Rubiyana, Y., Wisnuwardhani, P., Wardiana, A., & Santoso, A. (2012). Expression of recombinant human erythropoietin with glycosylation modification in hek293t cells. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 23(3), 177–182.



- Sommerfeld, S., & Strube, J. (2005). Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chemical Engineering and Processing*, 44(10), 1123–1137. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2005.03.006>
- Sörgel, F., Schwebig, A., Holzmann, J., Prasch, S., Singh, P., & Kinzig, M. (2015). Comparability of biosimilar filgrastim with originator filgrastim: Protein characterization, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *BioDrugs*, 29(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0124-7>
- Walsh G. (2013). Biopharmaceuticals approval trends in 2013. *Biopharm Int.*, 26(4), 54–56.
- Wardiana, A., & Ningrum, R. A. (2016). The emergence of Biosimilars in Indonesia: guidelines, challenges and prospects. *Annales Bogorienses*, 20(2), 37–46.
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392–400. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaave, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., & Mann, M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379(6564), 466–469. <https://doi.org/10.1038/379466a0>
- Wisnuwardhani, P., Septisetyani, E., & Santoso, A. (2017). Sequential adaptation in mammalian CHO- K1 cells producing human erythropoietin. *Annales Bogorienses*, 21(1), 15–20.







## BAB X

# Refleksi terhadap Kemajuan, Peluang, dan Tantangan Biosimilar ke Depan

*Adi Santoso dan Puspita Lisdiyanti*

### A. Kemajuan dan Peluang Biosimilar

Dalam dua dekade terakhir, obat biologi dalam kesehatan dan perawatan penduduk dunia telah memainkan peranan yang signifikan. Dengan semakin banyaknya pasien yang membutuhkan obat biologi, obat biologi semakin cepat mendominasi pasar obat dunia, terutama di negara-negara maju. Penggunaan obat biologi dari tahun ke tahun mengalami peningkatan signifikan. Dari keseluruhan produk obat dunia, pangsa pasar obat biologi selalu meningkat secara persentase, dan tampaknya tren tersebut akan terus berlanjut.

Secara global, pada 2002, sekitar 46 miliar US\$ dibelanjakan untuk obat biologi dan jumlah tersebut merupakan 11% dari keseluruhan penjualan obat (Crespi-Lofton & Skelton., 2017). Pada 2017, produk obat biologi diprediksi mencapai 221 miliar US\$ atau 19–20% dari total pengeluaran untuk obat dunia (IMS Health, 2017). Pada 2020, pasar global obat biologi diharapkan melebihi 390 miliar US\$ dan mencapai hingga 28% dari total pengeluaran obat dunia (IMS, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa kecenderungan penggunaan obat biologi saat ini sangat tinggi dan trennya selalu meningkat. Sekitar sepertiga dari obat yang sedang dikembangkan saat ini berbasis pada obat biologi (Lybecker, 2016).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 10.1** Obat Biologi dengan Nilai Penjualan yang Sangat Tinggi

No.	Produk	Teknologi	Jenis Penyakit	Perusahaan
1	Avastin	antibodi monoclonal	Kanker kolorektal	Roche
2	Humira	antibodi monoclonal	Rhematoid arthritis	Abbot & Eisai
3	Rituxan	antibodi monoclonal	Rhematoid arthritis	Roche
4	Enbrel	Protein rekombinan	Rhematoid arthritis	Wyeth
5	Lantus	Protein rekombinan	Diabetes	Sanofi and Aventis
6	Herceptin	antibodi monoclonal	Kanker payudara	Roche
7	Remicade	antibodi monoclonal	Rhematoid arthritis	SGP and J&J

Sumber: Brennan (2018); Urquhart (2018)

Beberapa obat biologi papan atas telah cukup lama mendominasi pasar obat biologi tanpa mendapatkan saingan yang berarti (Tabel 10.1). Namun, dengan telah berakhirnya masa paten yang dibarengi dengan munculnya beberapa inovasi baru dalam teknologi produksi obat biologi, persaingan obat protein terapeutik memasuki babak baru di mana obat biologi (*originator*) bersaing dengan produk obat berbasis biosimilar.

Besarnya peluang bisnis yang menguntungkan dan tersedianya teknologi, terutama di negara-negara yang sudah berpengalaman (*well established*) dalam industri obat, membuat penelitian, pengembangan, dan produksi biosimilar saat ini menjadi tren dalam dunia kesehatan di banyak negara. Tabel 10.2 adalah peta perkembangan uji klinis biosimilar yang sedang dilakukan di beberapa negara (Barry, 2014). Beberapa negara di dunia sedang melakukan pengembangan biosimilar dengan skala yang cukup besar, yaitu Amerika Serikat, Kanada, beberapa negara Eropa Barat, India, Jepang, Australia, Brazil, Korea Selatan, dan Meksiko (Tabel 10.2).

Dimulai dari obat-obat yang relatif sederhana (misalnya insulin, interferon, dan hormon pertumbuhan), dengan kemajuan inovasi dalam bidang rekayasa protein, terutama molekul antibodi monoklonal, saat ini produk-produk obat biologi sudah merambah pada banyak molekul yang lebih kompleks. Dari tahun 1990-an sampai

**Tabel 10.2** Peta pengembangan uji klinis dalam biosimilar.

No.	Negara	Jumlah produk biosimilar Dalam uji klinis
1	Amerika Serikat	19
2	Canada	3
3	Meksiko	8
4	Eropa	35
5	Brazil	5
6	Afrika	3
7	Rusia	8
8	Tiongkok	1
9	India	19
10	Korea Selatan	9
11	Jepang	7
12	Australia	8

Sumber: diadaptasi dari Barry (2014)

sekarang, terdapat peningkatan kompleksitas molekul. Peningkatan ini dimulai dengan produk biologi inovator, dilanjutkan dengan munculnya produk antibodi monoklonal, interferon, dan hormon pertumbuhan pada 2000-an. Selanjutnya pada 2010-an, beberapa produk yang muncul di antaranya eritropoietin, filgrastim, etanercept, dan beberapa antibodi monoklonal. *Large/multi* subunit (terutama molekul antibodi) dan vaksin diprediksi akan menjadi tren molekul biosimilar dunia pada masa depan (Ramzan, 2015).

Dilihat dari masa berakhirnya paten obat biologi yang kemudian diikuti dengan munculnya produk biosimilar, masa paten ini sering dikenal dengan istilah *Three waves of Biosimilar* (Tiga Gelombang Biosimilar) (Tabel 10.3). Obat biologi yang termasuk gelombang pertama (*First Wave*), yaitu produk *cytokin*, faktor pertumbuhan, dan beberapa hormon yang habis masa paten sebelum tahun 2015 (misalnya Neupogen dan Epogen). Produk obat biologi gelombang kedua (*second wave*) terdiri dari jenis obat-obatan berbasis antibodi monoklonal yang masa paten habis sekitar tahun 2015–2020. Beberapa

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Tabel 10.3** Tiga Gelombang Berakhirnya Paten Obat Biologi

GELOMBANG PERTAMA	GELOMBANG KEDUA	GELOMBANG KETIGA
Paten berakhir sebelum tahun 2015	Paten berakhir pada tahun 2015–2020	Paten berakhir setelah tahun 2020
Neupogen dan Epogen	Humira, Rituxan, Avastin, Herceptin, Remicade, Aranesp dan Roferon A	Cimzia, Simponi, Stelara, Soliris, Lucentis dan Eylea

Sumber: Ramzan (2015)

produk obat biologi yang termasuk gelombang kedua antara lain Humira, Enbrel, Rituxan, Avastin, Herceptin, dan Remicade. Obat biologi gelombang ketiga (*third wave*) adalah produk obat biologi yang masa paten habis setelah tahun 2020, termasuk antibodi monoklonal yang lebih kompleks dan produk obat yang hanya berupa fragmen dari suatu antibodi. Beberapa contoh produk obat biologi gelombang ketiga antara lain Cimzia, Simponi, Stelara, Soliris, Lucentis, dan Eylea.

Dengan semakin kompleksnya molekul biosimilar yang mampu diproduksi, jenis penyakit yang dapat ditanggulangi oleh obat berbasis biologi ini juga semakin banyak. Dengan habisnya masa paten obat originator, pesaingnya, obat biosimilar, yang serupa juga akan diproduksi. Melvin (2016) menunjukkan berbagai penyakit yang inovasi dan produksi obat biologi beserta biosimilar telah berhasil dilakukan. Melvin (2016) menjelaskan jenis dan produksi obat biologi dan biosimilar yang berkaitan dengan penyakit kanker menduduki tempat pertama (30%), sedangkan untuk tempat kedua dan ketiga, masing-masing diduduki oleh penyakit *rheumatoid arthritis* (12%) dan penyakit *multiple sklerosis* (10%).

Produksi obat biologi sangat kompleks karena obat ini diproduksi di dalam sel hidup sehingga variabilitas dan stabilitasnya sangat dipengaruhi oleh kondisi produksi yang digunakan. Sesulit apa sebenarnya produksi obat biosimilar? Secara teori, karena produk originator sebelumnya telah terbukti berhasil diproduksi, produk biosimilar juga dapat dilakukan dengan tingkat kesulitan yang se-

Buku ini tidak diperjualbelikan.

harusnya lebih rendah. Jadi, keuntungan yang didapat dari produksi biosimilar adalah kita hanya tinggal memproduksi obat tersebut yang secara klinis telah teruji khasiatnya.

Produksi obat biosimilar diproyeksikan dapat menghemat minimal sebesar 30% lebih rendah dari harga produk originator. Biosimilar dapat berfungsi sebagai opsi obat biologi berbiaya rendah dan dapat menciptakan sistem perawatan kesehatan yang juga memberi ruang bagi inovasi dalam bidang pengembangan teknologi obat berbasis rekombinan DNA. Dengan regulasi yang begitu ketat maka diharapkan kualitas obat biosimilar yang beredar akan berkualitas sama dengan produk originatornya. Karena harganya yang relatif lebih murah, asuransi, pemerintah, dan masyarakat yang membutuhkannya berharap dapat mempunyai akses yang lebih mudah pada obat berbasis protein terapeutik ini. Studi yang dilakukan Frazee dkk. (2013) menunjukkan bahwa dari 11 obat biologi papan atas di Amerika Serikat dalam waktu sekitar 10 tahun, nilai total pembelian untuk obat originator mencapai sekitar 120 miliar US\$. Dengan keberadaan biosimilar, nilai biaya tersebut hanya akan mencapai sekitar 40 miliar US\$ sehingga menghemat 80 miliar US\$. Data ini menunjukkan bahwa penghematan yang terjadi dengan keberadaan biosimilar akan sangat signifikan. Oleh karena itu, secara teori akan lebih banyak pasien memiliki akses terhadap obat yang mereka inginkan.

Di samping mempunyai harga yang lebih terjangkau, penelitian dan pengembangan biosimilar memberikan banyak kemungkinan bagi suatu negara untuk berinovasi dan berkesempatan untuk memenuhi kebutuhan obat dalam negeri. Saat ini, baik di negara yang sudah maju maupun negara yang sedang berkembang, pengembangan, penelitian, dan produksi biosimilar mendapatkan perhatian yang luar biasa.

Seperti yang lazim terjadi dalam kemunculan suatu teknologi, munculnya teknologi biosimilar diawali dengan suatu keraguan. Efek respons imunogenisitas terhadap produk biosimilar yang ditimbulkan menjadi salah satu kekhawatiran pada pasien yang menggunakannya. Kekhawatiran juga dapat bersumber dari ketidaksesuaian profil

farmakokinetik dan farmakodinamik antara produk referensi inovator dan biosimilar. Hal ini tentunya akan menimbulkan efek samping yang sangat berbahaya. Melihat betapa besarnya peluang yang didapat dari penelitian, pengembangan, dan produksi obat biosimilar, negara berkembang sudah seharusnya mengeksplorasi dunia biosimilar ini.

## **B. Beberapa Tantangan dalam Pengembangan Biosimilar**

Biosimilar memang menjanjikan banyak keunggulan, seperti harga yang lebih rendah sehingga para pemangku kepentingan (pasien, pemerintah, dan asuransi kesehatan) dapat mempunyai akses yang lebih mudah dan memberikan peluang pada negara berkembang untuk berinovasi dalam memenuhi kebutuhan obat dalam negeri. Namun, hambatan yang harus dihadapi untuk memproduksi obat biosimilar juga sangat besar (Cecile dkk., 2017). Beberapa hambatan besar dalam produksi biosimilar dapat dikelompokkan menjadi 6, yaitu 1) regulasi, 2) kuatnya hak paten yang melindungi produk originator, 3) kompetisi antarsesama biosimilar dan kompetisi terhadap originator, 4) *interchangeability* dan imunogenisitas, 5) tingginya tingkat kesulitan produksi biosimilar, serta 6) biaya pengembangan biosimilar yang sangat tinggi. Berikut ini adalah beberapa hambatan yang harus dihadapi dalam pengembangan dan produksi biosimilar.

### **1. Regulasi**

Secara umum, regulasi yang harus dilalui produk biosimilar agar dapat mencapai pasar dan bisa diakses oleh pasien, membutuhkan tahapan yang sangat panjang dan tidak mudah untuk dilalui. Sulitnya tahap regulasi ini pada dasarnya untuk meyakinkan bahwa produk yang akan digunakan oleh para pengguna obat ini benar-benar aman dan mempunyai efek seperti yang diharapkan. Walaupun prospek biosimilar sangat cerah, masalah yang harus dihadapi dalam hal regulasi ini sangat nyata. Selain itu, regulasi kadang dapat berubah seiring dengan kompleksitas molekul dan tingkat keamanan yang dibutuhkan. Inti dari regulasi ini adalah mewajibkan obat biosimilar



yang akan dipasarkan tidak mempunyai perbedaan yang signifikan antara produk biosimilar dan obat originator yang menjadi rujukan dalam hal kualitas, keamanan, dan khasiatnya, termasuk respons imunogenisitas.

## 2. Kuatnya Hak Paten Produk Originator

Hak paten dan perlindungan kekayaan intelektual adalah hal yang sangat penting karena perlindungan semacam ini akan memberikan kepastian hukum dan akhirnya berimbas pada iklim yang lebih baik bagi inovasi dan pengembangan suatu teknologi. Suatu perusahaan terkadang memperpanjang masa paten untuk mencegah terjadinya persaingan dan mempertahankan pangsa pasar. Sebagai contoh, perusahaan obat Amgen yang baru-baru ini melakukan aplikasi ekstensi untuk paten Enbrel (obat biologi untuk penyakit *rheumatoid arthritis*). Seperti disampaikan oleh Calo-Fernández dan Martínez-Hurtado (2012), paten obat Enbrel yang seharusnya kedaluwarsa pada Oktober 2012 setelah melalui perjuangan tim hukum akhirnya diperpanjang sampai tahun 2028. Disampaikan pula masa habis paten 9 obat dengan penjualan tertinggi di dunia, yaitu Nolvog dari Novo Nordisk habis masa paten pada 2012; Lantus dari Sanofi-Aventis dan Neulasta dari Amgen pada 2015; Humira dari Abbot, dan Fituxan serta Genedtech pada tahun 2016; Remicade dari Centocor pada 2018; dan Herceptin dan Lucentis dari Genentech pada 2020. Meskipun hal ini sangat penting secara hukum untuk mendorong pengembangan dan proteksi suatu inovasi, produk biosimilar dilihat sebagai pesaing signifikan oleh produk originator. Oleh karena itu, kuatnya proteksi terhadap produk biologi bisa menjadi hambatan pengembangan suatu produk biosimilar.

Selain hak paten obat biologi yang begitu sarat dengan aturan yang ketat, sudah menjadi rahasia umum bahwa pabrik obat ternama yang memproduksi obat biologi originator selalu melobi pembuat kebijakan untuk mempertahankan pangsa pasar obat-obatan mereka—kadang terkesan mengorbankan pasien yang membutuhkan obat jenis ini. Perusahaan-perusahaan ini mengklaim bahwa tujuan

mereka adalah melindungi pasien dari obat-obatan yang tidak aman, tetapi motif sebenarnya sulit untuk diketahui. Yang jelas, efeknya dapat menciptakan hambatan untuk persaingan produk biosimilar.

### 3. Kompetisi antarsesama Biosimilar dan Kompetisi terhadap Originator

Tidak seperti obat biologi yang mempunyai molekul besar, Grabowski dkk. (2007) menyatakan bahwa obat kimia dengan molekul kecil dengan produk obat generiknya dapat menurunkan harga hingga 80–90%. Selain itu, terkadang dapat merebut sebagian besar pasar obat bermerek dalam waktu singkat, bahkan sering kali hanya dalam waktu beberapa bulan. Sebaliknya, obat biosimilar hanya dapat menurunkan produk obatnya 30% lebih murah dari obat originatornya. Dalam menghadapi penurunan harga biosimilar, pihak produsen obat originator dapat menurunkan harganya 10–20% agar pembeli tidak beralih ke produk biosimilar. Penetrasi tingkat penjualan biosimilar diharapkan lebih tinggi pada populasi pasien yang memiliki *turnover* tinggi daripada populasi penyakit kronis. Pasien dan dokter mungkin enggan untuk beralih ke biosimilar untuk menghemat biaya kecil jika produk bermerek berfungsi dengan baik. Namun, pasien baru mungkin lebih suka mencoba biosimilar.

Persaingan antarsesama biosimilar sering terjadi saat perusahaan yang mempunyai nama besar dan sangat berpengalaman dalam pembuatan obat jenis ini (misalnya Amgen, Boehringer Ingelheim, dan Biogen Idec) memiliki keuntungan yang cukup besar dibandingkan mereka yang tidak memiliki nama besar. Untuk menghadapi masalah ini, banyak perusahaan yang belum mempunyai nama besar mengembangkan biosimilar pada terapeutik kunci atau mempromosikan produk mereka pada daerah *emerging market* (daerah pemasaran baru) (Blackstone & Joseph, 2013).

### 4. *Interchangeability* dan Imunogenisitas

Dengan adanya pergeseran produksi obat dari molekul kecil ke molekul besar, tantangan yang dihadapi juga semakin besar. Adanya pergeseran ini juga mengakibatkan keamanan suatu obat mengalami perubahan.

Bila pada produk obat molekul kecil faktor keamanan terfokus pada toksisitas yang tradisional, pada produk obat molekul besar (obat biologi dan biosimilar) masalahnya ada pada imunogenisitas.

Masalah keamanan yang paling serius pada biosimilar adalah reaksi imunogenisitas. Biosimilar yang merupakan produk protein memiliki potensi besar untuk menimbulkan efek imunogenik pada individu yang menggunakannya. Efek imunogenik pada biosimilar adalah ketika tubuh mengeluarkan imun respons yang tidak dikehendaki. Kondisi ini dapat berbahaya karena dapat mengakibatkan hal-hal yang tidak diharapkan pada kesehatan tubuh. Efek imunogenik pada produk biosimilar dapat disebabkan oleh molekul obat biosimilar (*inherent property of the product*), sifat genetik dari pasien (*patient genetic profile*), atau yang berkaitan dengan jalur masuknya obat ke dalam tubuh (*route of administration*) (Balakrishnan & Wagstaff, 2015).

Di Amerika Serikat, meskipun FDA tidak mensyaratkan uji klinis dalam semua indikasi—tidak seperti untuk molekul baru—biosimilar hanya dapat disetujui bila semua indikasi (seperti mekanisme obat, farmakokinetik, farmakodinamik, imunogenisitas, dan data-data lain yang masih tersangkut di dalamnya) terbukti sama dengan produk originator. Agar biosimilar dapat diakui oleh FDA sebagai obat yang secara langsung dapat digunakan sebagai substitusi obat originator oleh apoteker pada suatu apotek dan pihak dokter dapat secara otomatis dapat merekomendasikan (meresepkan) suatu obat biosimilar (*interchangeability*), ada peraturan (uji) tambahan yang harus dilakukan. Pada uji tambahan ini, obat biosimilar tersebut harus mampu memberikan hasil klinis yang sama dengan produk originator pada beberapa pasien tertentu dan tidak menunjukkan adanya penurunan efikasi dan faktor keamanan ketika beralih antara produk biosimilar. Peralihan penggunaan (*switching study*) dari penggunaan produk originator ke penggunaan biosimilar, atau sebaliknya, minimal harus dilakukan sebanyak tiga kali pada populasi sampel yang berbeda. Peraturan mengenai apakah suatu produk biosimilar dapat dikatakan mempunyai kapasitas sebagai obat substitusi dan penggunaan sebagai

Buku ini tidak diperjualbelikan.

obat *interchangeable* terhadap produk originator-nya, sampai saat ini masih menjadi perdebatan, dan masing-masing negara mempunyai aturan yang berbeda.

Kemampuan obat biosimilar untuk memiliki kapasitas sebagai substitusi dari obat originatornya adalah sangat penting. Hal ini karena seorang pasien akan tertarik untuk membeli produk biosimilar apabila produk obat biologi ini benar-benar mempunyai efek yang sama dan telah melewati uji *switching study*. Apabila suatu produk biosimilar tidak memiliki kapasitas sebagai substitusi dari produk originatornya, pihak toko obat (apotek) tidak dapat mengganti produk originator dengan produk biosimilar tanpa harus mendiskusikannya dengan dokter yang menangani pasien. Hal semacam ini tidak dijumpai pada obat molekul kecil karena produk generik sering digunakan tanpa persetujuan dokter apabila produk originator mempunyai harga yang mahal.

Melihat betapa pentingnya obat biosimilar untuk menggantikan obat originatornya, meresepkan suatu obat biosimilar kepada pasien adalah esensial bagi dokter. Selain itu, kesadaran masyarakat, terutama pasien yang membutuhkannya, terhadap pentingnya biosimilar juga memegang peranan. Belum jelas dan konsistennya peraturan biosimilar dalam substitusi dan *interchangeability with reference biologics* membuat dokter yang akan meresepkan obat biosimilar dan pihak apotek menjadi agak ragu-ragu dalam penggunaan biosimilar.

## 5. Tingginya Tingkat Kesulitan Produksi Biosimilar

Hambatan yang ada dalam produksi obat biologi atau biosimilar adalah tingginya tingkat kesulitan pembuatan obat jenis ini. Biosimilar adalah produk serupa, tetapi tidak identik dengan produk originatornya. Walaupun kedua produk ini terlihat sama, bila dianalisis lebih dalam lagi, di antara kedua produk ini pasti akan terdapat perbedaan (Cassels, 2017).

Obat biologi diproduksi di bawah perlindungan hak paten yang sangat kuat. Produksi obat jenis ini melibatkan banyak tahapan dan setiap tahap yang dilakukan penuh dengan kerahasiaan. Oleh

karena itu, produk biosimilar yang dihasilkan tidak mungkin akan bisa identik dengan produk originatornya. Tabel 10.4 menunjukkan kemungkinan sumber perbedaan langkah antara produk originator dan biosimilar. Dalam hal ini, terdapat tujuh sumber perbedaan dalam 1) vektor, 2) sel yang digunakan untuk produksi, 3) sistem yang digunakan untuk pertumbuhan sel, 4) sistem produksi protein yang diharapkan, 5) sistem panen protein yang dilakukan, 6) teknologi purifikasi protein, dan 7) stabilitas dari protein yang didapat. Melihat terdapat banyaknya langkah (setidaknya tujuh langkah) yang dapat menimbulkan perbedaan antara produk biosimilar dengan produk originatornya, jelas bahwa produksi biosimilar mempunyai level kompleksitas yang sangat tinggi. Hal ini sangat esensial karena akhirnya akan berpengaruh terhadap proses registrasi pada institusi badan pengawas obat.

Kompleksnya pembuatan biosimilar membuat setiap *batch* dalam proses produksi obat biologi dan biosimilar mungkin menghasilkan produk yang berbeda (*heterogeneous products*). Secara intrinsik, hal ini dapat terjadi karena sifat bahan dan kondisi yang digunakan. Gambar

**Tabel 10.4** Beberapa Sumber Variabilitas pada Proses Pembuatan Obat Biosimilar

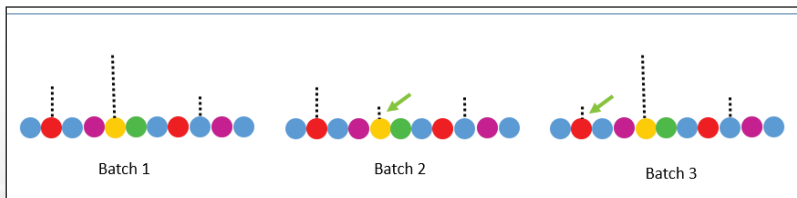
Pem-buatan vektor DNA-Kloning	Ekspresi Sel	Ekspansi Sel	Produksi Protein	Panen Protein	Pemurnian Protein	Karakterisasi/Stabilitas
Penggunaan vektor yang berbeda	Sistem ekspresi galur sel yang berbeda	Media pertumbuhan galur sel yang berbeda, pH, suhu, dan metode ekspansi	Media pertumbuhan galur sel yang berbeda, pH, suhu, dan metode ekspansi	Kondisi dan metode yang berbeda	Kondisi pengikatan dan elusi yang berbeda	Metode yang berbeda, reagen, standar referensi

Sumber: Camacho dkk. (2014)

10.1 menunjukkan bahwa walaupun struktur asam amino (struktur primer) pada protein yang dihasilkan identik, secara keseluruhan protein yang diproduksi pada ketiga *batch* ini (*batch* 1, 2, dan 3) masih memiliki perbedaan pada pola glikosilasinya. Pola glikosilasi menjadi salah satu sumber perbedaan yang sering terjadi pada produksi obat berbasis protein, baik pada obat originator maupun pada biosimilar. Selain pola glikosilasi, stabilitas protein, komposisi, konsentrasi dan aktivitas sering juga menjadi sumber perbedaan.

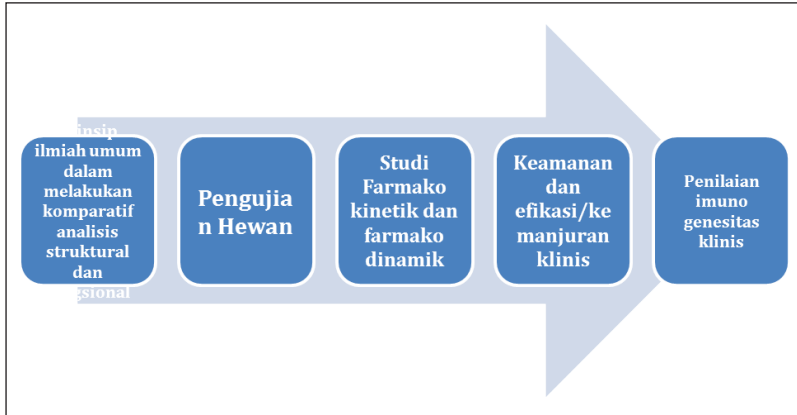
Proses pengembangan biosimilar diawali dengan karakterisasi struktural dan fungsional yang sangat ekstensif dan sarat dengan prinsip-prinsip ilmiah dalam analisis struktural dan fungsional komparatif. Kemudian diikuti dengan percobaan pada hewan dan berakhir dengan uji klinis yang meliputi studi PK (farmakokinetik) dan PD (farmakodinamik) pada manusia, *safety* (keamanan), *efficacy* (kemanjuran), dan imunogenisitas (Gambar 10.2). Mengikuti langkah-langkah ini serta melakukan evaluasi untuk menilai apakah produk biosimilar mempunyai kemiripan yang tinggi dengan produk originator sangat penting untuk meminimalkan beban pengujian praklinis dan klinis.

Kemajuan dalam teknik produksi (*manufacturing*) telah meningkatkan kemungkinan bahwa produk biosimilar yang dihasilkan sangat mirip dengan produk originatornya. Pada kenyataannya, teknik produksi saja masih belum cukup untuk mendeteksi perbedaan yang relevan dan fungsional antara produk originator dan biosimilar. Oleh karena itu, langkah-langkah pada Gambar 10.2 harus dilakukan.



Sumber: Diadaptasi dari Biosim Exchange (2018)

**Gambar 10.1** Setiap *batch* dapat menghasilkan produk yang berbeda.



Sumber: Diadaptasi dari Rock (2012)

**Gambar 10.2** Regulasi dalam Pengembangan Obat Biosimilar

Kerumitan seperti ini yang membuat produksi biosimilar mempunyai tingkat kompleksitas yang sangat tinggi.

Dengan berjalannya waktu, kompleksitas produk biologi meningkat dengan tajam dari yang sekadar bersifat hormon dan faktor pertumbuhan, sampai akhirnya saat ini produk biologi telah mengarah pada produk antibodi monoklonal (*monoclonal antibody*/mAb) yang sangat kompleks. Jenis penyakit yang banyak menggunakan pendekatan mAb adalah penyakit kanker. Pendekatan ini telah dimulai sejak 30 tahun yang lalu. Kelemahan dari pengobatan jenis ini adalah sulitnya molekul antibodi melakukan penetrasi ke dalam jaringan yang terkena kanker. Untuk mengatasi masalah ini, diproduksi antibodi yang hanya berbentuk fragmen yang ukurannya jauh lebih kecil daripada ukuran antibodi monoklonal sebenarnya. Dengan ukuran yang jauh lebih kecil, penetrasi obat ini ke dalam jaringan kanker diharapkan menjadi lebih efisien. Namun, masalah baru yang timbul adalah bahwa molekul yang berukuran kecil mempunyai waktu paruh yang pendek.

Salah satu teknologi antibodi monoklonal yang sedang dikembangkan dengan kompleksitas yang lebih tinggi adalah teknologi ADC (*antibody drug-conjugates*). Dalam teknologi ini, molekul antibodi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



berfungsi dalam proses pengantar (*delivery*) obat dengan ukuran yang jauh lebih kecil (sekitar 300–1000 Dalton) yang mempunyai fungsi sebagai obat kemoterapi. Pada molekul obat ADC, molekul yang berfungsi sebagai obat kemoterapi (*cytotoxic agent molecules*) dikonjugasikan pada molekul antibodi dengan menggunakan molekul linker. Jadi, dalam teknologi ADC terdapat 3 molekul, yaitu 1) molekul antibodi monoklonal, 2) molekul *cytotoxic drug* yang berfungsi sebagai obat kemoterapi untuk membunuh sel kanker, dan 3) molekul linker yang berfungsi untuk menghubungkan molekul (1) dan molekul (2). Dengan menggabungkan ketiga molekul ini, diharapkan molekul antibodi yang berperan dalam proses penyampaian (*delivery*) obat kemoterapi ke sel kanker dapat berjalan dengan presisi yang tinggi dan tepat sasaran.

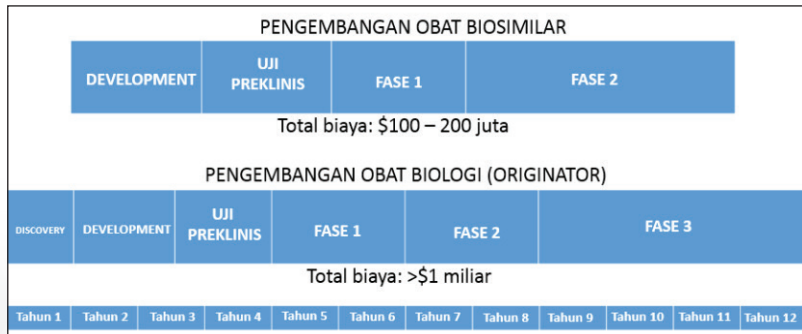
Jain dkk. (2015) menunjukkan bagaimana mekanisme molekul ADC menyerang sel kanker. Pada tahap awal, molekul ADC yang terdapat pada plasma darah akan berikatan dengan antigen yang sangat spesifik pada permukaan sel kanker. Ikatan kompleks kedua molekul ini kemudian mengalami proses internalisasi dan masuk ke dalam sel kanker. Kemudian, molekul ADC di dalam sel kanker mengalami degradasi, sedangkan molekul kecil yang berfungsi sebagai *cytotoxic drug*—dalam hal ini dapat disamakan sebagai obat kemoterapi—menyerang sel kanker itu sendiri, dan sel ini akhirnya mengalami proses apoptosis (*cell death*). Teori mendasar dari teknologi ini adalah sel sehat tidak akan terkena dampak sehingga efek kemoterapi hanya pada sel yang terpapar oleh kanker. Namun, melihat semakin kompleksnya pembuatan obat biologi, tantangan dalam memproduksi obat biosimilar tentunya juga akan semakin kompleks.

## **6. Biaya Pengembangan Biosimilar yang Sangat Tinggi**

Mahalnya obat biologi menjadi salah satu alasan utama dikembangkannya obat biosimilar. Spirit pengembangan obat biosimilar adalah mendapatkan obat yang memiliki kemampuan sama dengan produk originator dengan biaya yang lebih murah, tetapi bila diperhatikan lebih dalam, biaya pengembangan dan proses produksi

(*manufacturing*) biosimilar juga membutuhkan biaya yang hampir sama dengan produk originator. Hal ini karena secara teori obat biosimilar mempunyai proses produksi yang sama dengan yang dilakukan pada obat originator. Jadi, biaya produksi kedua jenis obat ini hampir sama.

Untuk mendapatkan persetujuan (*approval*), produk biosimilar yang sedang dikembangkan harus melalui proses yang rumit, ketat, dan mahal untuk dapat menunjukkan komparasi *bioequivalency* (*purity and efficacy*) dan *immunogenicity* (*safety*) terhadap produk originator (Weise dkk., 2012). Menurut beberapa sumber, pengembangan obat biologi (originator) membutuhkan waktu sekitar 12 tahun dengan dana yang luar biasa mahal dan dapat mencapai sekitar 1 miliar US\$ (Rp13,5 triliun). Sebaliknya, biaya pembuatan biosimilar sekitar 100–200 juta US\$ (Rp 1–2 triliun) (Gambar 10.3). Terlihat di sini bahwa pengembangan obat biosimilar relatif masih sangat mahal. Sebaliknya, pengembangan obat generik hanya membutuhkan waktu sekitar 3–5 tahun dengan biaya 1–5 juta US\$. (Weise dkk., 2012). Jadi, bila proses pembuatan obat originator dan biosimilar dibandingkan, waktu dan biaya pengembangan biosimilar lebih pendek karena tahap penelitian awal dan uji klinis fase 2 pada umumnya tidak diperlukan. Dengan pengembangan yang efisien, biaya yang lebih rendah, dan



Sumber: Diadaptasi dari Biosimilar development: the incentives (2017)

**Gambar 10.3** Perkiraan dan Perbandingan Waktu serta Biaya pada Pengembangan Produk Originator dan Biosimilar

Buku ini tidak diperjualbelikan.

waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan pengembangan produk originator, produk biosimilar dapat ditawarkan dengan harga lebih rendah dibandingkan dengan produk originator. Mahal atau murahnya pengembangan suatu obat memang hal relatif, tetapi biaya yang mahal selalu menjadi faktor penghambat dalam pengembangan suatu obat.

### C. Kesimpulan

Telah diakuinya (*approved*) produk biosimilar di Eropa (2005) dan di Amerika Serikat (2008) menjadi tonggak sejarah meluasnya penggunaan dan pengembangan obat berbasis biosimilar. Secara umum, hal ini membuat seorang pasien bisa mendapatkan akses terhadap produk obat protein terapeutik dengan harga yang lebih terjangkau. Selain itu, dalam skema yang lebih luas, pihak asuransi dan pemerintah dapat merasakan manfaat kehadiran biosimilar untuk mendukung kesehatan masyarakat dan ekonomi suatu negara.

Dengan berjalannya waktu, produksi biosimilar akan menghadapi tantangan yang lebih besar. Tantangan ini tidak hanya menjaga keselamatan pasien dengan produk yang telah disetujui, tetapi juga semakin sulitnya regulasi biosimilar dengan semakin kompleksnya molekul protein terapeutik yang dikembangkan, terutama yang berkaitan dengan kemampuan produksi, efikasi, substitusi, dan *interchangeability* dari produk yang dihasilkan. Pada tingkat pengembangan molekul biosimilar, tantangannya termasuk pemahaman yang rinci tentang hubungan antara struktur dan fungsi dari suatu molekul biologis yang kemungkinan terdiri lebih dari satu molekul protein, rantai gula bercabang yang kompleks, komponen lipid bilayer dan kemungkinan asam nukleat. Variabilitas dalam komponen ini dapat mengakibatkan hilangnya fungsi biologis atau bahkan menimbulkan efek samping yang berbahaya. Oleh sebab itu, unsur kehati-hatian harus dilakukan secara menyeluruh untuk memastikan keseimbangan yang tepat antara pengembangan biosimilar dan keselamatan pasien.

Tingginya tingkat kompleksitas, regulasi, dan hak paten biosimilar jelas memberikan tantangan yang serius dalam pengembangannya. Selain itu, seperti dunia bisnis pada umumnya, kompetisi di antara

sesama industri biosimilar, kompetisi antara biosimilar dan produk originator yang telah mempunyai nama besar, pendidikan pasien calon pengguna produk biosimilar, dan pengetahuan para dokter terhadap produk biosimilar juga memegang peranan kunci dalam pengembangan dan pemasaran biosimilar.

Akhirnya, pelajaran yang bisa diambil dari buku ini adalah bahwa pemenuhan kebutuhan obat dalam negeri membutuhkan kesungguhan yang luar biasa. Selain itu, dalam dunia riset, selain kesungguhan, waktu, dan dana yang besar, penguasaan teknologi dan inovasi juga menjadi kunci sukses dalam pemanfaatan biosimilar untuk pemenuhan kebutuhan obat dalam negeri. Di banyak negara maju, telah terjadi pergeseran paradigma penelitian, dari yang tadinya hanya terfokus pada riset dasar, saat ini mulai bergeser pada *frontier technology* di mana proses inovasi yang dilakukan harus berdampak langsung pada kegiatan ekonomi pada para pemangku kepentingan. Dengan adanya pergeseran semacam ini dan dukungan yang terus-menerus dari Pemerintah Indonesia, pemenuhan obat dalam negeri diharapkan dapat tercapai atau setidaknya ketergantungan obat pada luar negeri dapat dikurangi.

## Daftar Pustaka

- Balakrishnan, V. S., & Wagstaff, A. (2015). Getting serious about biosimilars. *Cancer World*. [https://cancerworld.net/wp-content/uploads/2015/12/CW\\_69-cutting\\_edge.pdf](https://cancerworld.net/wp-content/uploads/2015/12/CW_69-cutting_edge.pdf)
- Barry, F. (2014, 1 Agustus). Where are tomorrow's biosimilar hotspots? *Biopharma Reporter*. <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2014/07/30/Where-are-tomorrow-s-biosimilar-hotspots>
- Biosim Exchange. (2018). Summary of biosimilars research from EULAR 2018. Biosimilars – a major focus at 2017 ACR and EULAR annual meetings. <https://biosim.jointhealth.org/research>
- Biosimilar development: the incentives and challenges. (2017, 28 Februari). *Pharmaceutical Technology.Com*. <https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/commentwhat-are-the-incentives-and-challenges-to-biosimilar-development-5751024/>

- Blackstone, E. A., & Joseph, P. F. (2013). The economics of biosimilars. *American Health & Drug Benefits*, 6(8), 469.
- Brennan, Z. (2018). Top-selling drugs in 2018: Biosimilar competition is FDA approved but not marketed. *Regulatory Focus*. <https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2018/2/top-selling-drugs-in-2018-biosimilar-competition>
- Calo-Fernández, B., & Martínez-Hurtado, J. L. (2012). Biosimilars: Company strategies to capture value from the biologics market. *Pharmaceuticals*, 5(12), 1393–1408.
- Camacho, L. H., Frost, C. P., Abella, E., Morrow, P. K., & Whittaker, S. (2014). Biosimilars 101: Considerations for US oncologists in clinical practice. *Cancer medicine*, 3(4), 889–899.
- Cassels, A. (2017, 9 Januari). Why biosimilars should be interchangeable with biologics. *The Pharmaceutical Journal*. <https://www.pharmaceutical-journal.com/opinion/insight/why-biosimilars-should-be-interchangeable-with-biologics/20202121.article>
- Cécile, R., Julie, D., Olivier, C., Dan, I., Gueric, R., & Mondher, T. (2017). Key drivers for market penetration of biosimilars in Europe. *Journal of Market Access & Health Policy*, 5 (1), 1–15.
- Crespi-Lofton, J., & Skelton, J. B. (2017). The growing role of biologics and biosimilars in the United States: Perspectives from the APhA biologics and biosimilars stakeholder conference. *Journal of the American Pharmacists Association*, 57, e15–e27.
- Fraze, S. G., Garavaglia, S., Houts, J., & Miller, S. (2013). *Express script research report. Ten-year potential savings from biosimilars in California*. <https://patentdocs.typepad.com/files/ten-year-potential-savings-from-biosimilars-in-california.pdf>
- Grabowski, H. G., Ridley, D. B., & Schulman, K. A. (2007). *Entry and competition in generic biologics. Managerial and decision economics*. [https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=992479](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=992479)
- IMS Institute for Healthcare Informatics. (2016). *Delivering on the potential of biosimilar medicines. The role of functioning competitive markets*. [http://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Healthcare%20Briefs/Documents/IMS\\_Institute\\_Biosimilar\\_Brief\\_March\\_2016.pdf](http://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Healthcare%20Briefs/Documents/IMS_Institute_Biosimilar_Brief_March_2016.pdf)

- IMS Health. (2017). *The global use of medicines: Outlook through 2017*. [https://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Reports/The\\_Global\\_Use\\_of\\_Medicines\\_2017/global%20use%20of%20med%202017%20right6%20Biologics\\_Market.pdf](https://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Reports/The_Global_Use_of_Medicines_2017/global%20use%20of%20med%202017%20right6%20Biologics_Market.pdf)
- Jain, N., Smith, S. W., Ghone, S., & Tomczuk, B. (2015). Current ADC linker chemistry. *Pharmaceutical Research*, 32(11), 3526–3540.
- Lybecker, K. M (2016, 12 Juli). The biologics revolution in the production of drugs. *Fraser Institute*. <https://www.fraserinstitute.org/studies/biologics-revolution-in-the-production-of-drugs>
- Melvin, D. (2016). The promise and threat of biosimilars. *Market Access Panorama. PM360*. <https://www.pm360online.com/the-promise-and-threat-of-biosimilars/>
- Ramzan, A. (2015). The future of biosimilars—monoclonal antibodies and beyond. *Regulatory Rapporteur*, 12(9), 5–9. [https://www.topra.org/TOPRA/TOPRA\\_Member/REGRAP/Public/Regulatory\\_Rapporteur\\_Issue\\_Detail\\_Public.aspx?IssueID=484270&ID=57221](https://www.topra.org/TOPRA/TOPRA_Member/REGRAP/Public/Regulatory_Rapporteur_Issue_Detail_Public.aspx?IssueID=484270&ID=57221)
- Rock, M. (2012, 1 November). Best practices for testing biosimilarity during clinical trials. *Genetic Engineering and Biotechnology News*. <https://www.genengnews.com/magazine/best-practices-for-testing-biosimilarity-during-clinical-trials/>
- Urquhart, L. (2018). Top drugs and companies by sales in 2017. *Nat Rev Drug Discov.*, 17, 232. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.42>
- Weise, M., Bielsky, M. C., De Smet, K., Ehmann, F., Ekman, N., Giezen, T. J., Gravanis, I., Heim, H-K., Heinonen, E., Ho, K., Moreau, A., Narayanan, G., Kruse, N. A., Reichmann, G., Thorpe, R., Van Aerts, L., Vleminckx, C., Wadhwa, M., Schneider, C. K. (2012). Biosimilars: What clinicians should know. *Blood*, 120(26), 5111–5117.







## Daftar Istilah

- Alkohol oksidase : enzim pertama pada lintasan metabolisme metanol dan disandikan oleh dua gen, yaitu AOX1 dan AOX2.
- Anemia : Kondisi ketika tubuh kekurangan sel darah merah yang sehat atau ketika sel darah merah tidak berfungsi dengan baik.
- Antibodi : glikoprotein dengan struktur tertentu yang disekresikan oleh sel B yang telah teraktivasi menjadi sel plasma, sebagai respons antibodi.
- Antigen : suatu zat yang merangsang respons imun untuk menghasilkan antibodi.
- Antiproliferasi : golongan obat yang dapat menekan pertumbuhan sel, terutama sel yang ganas yang berada di sekitar jaringan tumor.
- Antivirus : golongan obat yang digunakan untuk menangani penyakit-penyakit yang disebabkan infeksi virus.
- Badan inklusi : agregat inti atau sitoplasmik dari substansi stabil yang biasanya berupa protein.
- Bahan aktif : bahan atau senyawa dalam obat farmasi yang aktif secara biologis.
- Bioavailabilitas : fraksi dari dosis obat diberikan yang dapat mencapai sirkulasi sistemik.

- Biokompatibilitas : kemampuan suatu material untuk berinteraksi dengan sel/jaringan hidup atau sistem metabolisme yang tidak menyebabkan toksisitas, injuri, atau reaksi imun saat berfungsi pada tempat spesifik.
- Biopharmaceuticals* : Produk farmasi yang berbentuk protein dan dikembangkan dengan bioteknologi untuk digunakan sebagai obat, perangkat diagnosis penyakit, dan vaksin.
- Bioreaktor : Sebuah peralatan atau sistem yang mampu menyediakan sebuah lingkungan biologis yang dapat menunjang terjadinya reaksi biokimia dari bahan mentah menjadi bahan yang dikehendaki.
- Bioteknologi : Cabang ilmu yang mempelajari pemanfaatan makhluk hidup (bakteri, fungi, virus, dan lain-lain) maupun produk dari makhluk hidup (enzim, alkohol) dalam proses produksi untuk menghasilkan barang dan jasa.
- cGMP : kebijakan mengenai standar minimum yang harus dimiliki untuk pengembangan obat yang meliputi metode, fasilitas, kontrol yang digunakan dalam proses produksi, dan formulasi produk.
- C-peptide : (connecting peptide) substansi yang dibuat di pankreas bersama dengan insulin. Pada proses sintesis insulin, C-peptide menghubungkan rantai B dan rantai A dalam molekul proinsulin.
- Diabetes mellitus : suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah dan disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin.
- Dosing regimen : merupakan rancangan atau pemberian obat terapeutik berbasis waktu. Sebagai contoh: selang waktu di antara pemberian dosis, waktu saat obat diberikan, dan jumlah dosis yang diberikan pada waktu tertentu.
- Efikasi : kemampuan obat terikat untuk mengubah reseptor sehingga memberikan efek.

- Eksipien : bahan yang tidak aktif yang ditambahkan pada kombinasi bahan aktif dari suatu obat-obatan yang bertujuan untuk meningkatkan volume (*bulking up*) bahan aktif tersebut.
- Ekspresi heterolog : ekspresi suatu gen atau bagian dari gen pada suatu organisme inang yang secara alaminya tidak memiliki gen atau fragmen gen tersebut.
- Ekstrapolasi indikasi : salah satu prinsip dalam pengesahan obat biosimilar, di mana data keamanan, efikasi, dan imunogenisitas klinis pada indikasi utama dapat juga mewakili indikasi-indikasi lainnya, dengan catatan kemiripan dengan obat originator sudah dibuktikan pada indikasi utama. Selain itu, serangkaian uji yang dilakukan terbukti memadai untuk dapat menunjukkan perbedaan signifikan (jika ada) antara obat biosimilar dengan obat originatornya.
- Endotoksin : Toksin pada bakteri gram negatif berupa lipopolisakarida pada membran luar dari dinding sel yang pada keadaan tertentu bersifat toksik pada inang tertentu.
- Endpoint (clinical) : suatu parameter yang menjadi ukuran hasil uji klinis. Ukuran ini mengacu pada timbulnya penyakit, gejala, atau tanda ketidaknormalan hasil uji klinis yang mengharuskan subjek uji atau bagian tertentu dari uji dikeluarkan dari skema uji klinis.
- Farmakodinamik : Studi tentang efek biokimia dan fisiologis obat (terutama obat-obatan farmasi) atau studi tentang bagaimana suatu obat memengaruhi suatu organisme.
- Farmakokinetik : Studi yang mempelajari tentang perjalanan obat mulai sejak diminum hingga keluar melalui organ ekskresi di tubuh manusia atau studi tentang bagaimana organisme memengaruhi obat tersebut
- Farmakologi klinis : cabang ilmu yang mempelajari efek-efek dari senyawa obat pada sukarelawan sehat dan pasien.

	Hasil dan efek samping dari obat-obatan tersebut nantinya dapat diketahui dan dibandingkan.
Farmakope	: buku standar obat yang dikeluarkan oleh badan resmi pemerintah yang menguraikan bahan obat-obatan, bahan kimia dalam obat dan sifatnya, khasiat obat dan dosis yang dilazimkan.
Fast-acting insulin	: jenis insulin yang diabsorpsi ke dalam peredaran darah dengan cepat, bekerja 15 menit setelah injeksi dan mencapai puncaknya dalam satu atau dua jam setelah injeksi.
Formulasi	: perancangan dan pembuatan sediaan obat farmasi
Glikoprotein	: Suatu protein yang mengandung rantai oligosakarida yang mengikat glikan dengan ikatan kovalen pada rantai polipeptida bagian samping.
Glikosilasi	: Modifikasi pasca-translasi yang terjadi di dalam sistem ekspresi sel eukariotik dengan penambahan gugus gula pada untaian polipeptida.
Hipoksia	: Kondisi kekurangan oksigen dalam sel dan jaringan tubuh yang dapat mengganggu fungsi otak, hati, dan organ lainnya.
Ikatan disulfida	: ikatan antara dua asam amino sistein yang terbentuk melalui proses oksidasi dari gugus thiol (sulfhidril) pada tiap asam amino sistein.
Immunomodulator	: pengobatan untuk membantu regulasi atau normalisasi sistem imun.
In vitro	: Istilah yang dipakai dalam biologi untuk menyebutkan kultur suatu sel, jaringan, atau bagian organ tertentu di dalam laboratorium.
Insulin	: hormon yang mengatur kadar gula darah.
Interchangeability	: karakteristik dari obat yang menunjukkan bahwa obat tersebut (biosimilar) menimbulkan efek klinis yang sama dengan obat originator. Jika biosimilar digunakan untuk substitusi obat originator (pada konsumsi obat berulang), risiko keamanan atau penurunan khasiat tidak lebih besar dari risiko yang ditimbulkan oleh penggunaan obat originator tanpa substitusi.

- Intermediate-acting insulin : jenis insulin yang menyediakan kebutuhan basal insulin sepanjang hari.
- Leader peptide : (disebut juga sebagai signal peptide) rantai peptida yang berukuran sekitar 15–30 asam amino pada bagian N-terminus dari protein tertentu yang baru disintesis. Peptida tersebut dapat memfasilitasi transpor protein melewati retikulum endoplasma atau membrane sel.
- Long-acting insulin : jenis insulin yang mulai bekerja 2 jam setelah injeksi dan memiliki durasi kerja yang lebih lama hingga 24 jam.
- Metilotrof : kelompok mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang dengan menggunakan senyawa berkarbon tunggal.
- Molecular Farming* : Suatu proses penggunaan tanaman dan hewan yang direkayasa secara genetis sebagai suatu sistem produksi untuk suatu materi baru dan termodifikasi.
- Obat generik : Obat yang telah habis masa patennya sehingga dapat diproduksi oleh semua perusahaan farmasi tanpa perlu membayar royalti.
- Pegilasi : pengikatan serat polietilen glikol (PEG) pada sebuah molekul protein.
- Pharmacovigilance : suatu ilmu yang mencakup pengumpulan, deteksi, penilaian, pemantauan, dan pencegahan timbulnya kejadian tidak diinginkan yang berisiko akibat dari penggunaan obat.
- Preformulasi : pengumpulan semua informasi berupa data hasil penelitian ataupun studi literatur yang terkait dengan karakteristik protein terapeutik sebelum dilakukan proses formulasi.
- Preproinsulin : prekursor yang inaktif secara biologi yang dikonversi menjadi proinsulin oleh signal peptidase yang memotong signal peptide dari bagian N-terminalnya.
- Produk Originator : Produk biologi yang dikembangkan untuk pertama kalinya oleh suatu produsen dan terdaftar

- berdasarkan data lengkap mutu, keamanan dan efikasi, serta telah memiliki hak paten.
- Proinsulin : rantai tunggal polipeptida prekursor insulin pankreatik yang menghasilkan insulin rantai ganda dengan pemotongan bagian tengah molekul.
- Promoter : Wilayah DNA yang mengarah ke inisiasi transkripsi dari gen tertentu.
- Proses hilir (DSP) : tahapan pemurnian dari produk biomolekul setelah proses pengkulturan yang meliputi proses penghilangan pengotor, inaktivasi virus, dan penghilangan virus sebelum proses formulasi.
- Proses hulu (USP) : tahapan awal di mana biomolekul dikultur, biasanya menggunakan sel lestrai bakteri atau mamalia pada bioreaktor. Setelah mencapai jumlah kultur sel yang diinginkan, dilakukan pemanenan sel dan dilanjutkan ke proses hilir.
- Protein fusi : penyisipan gen penyandi pada suatu sekuens sehingga dapat dihasilkan protein “chimeric” yang memiliki berbagai peran, seperti reporter, membantu purifikasi, atau untuk meningkatkan aktivitas biologis dari protein target.
- protein terapeutik rekombinan : molekul protein yang diproduksi melalui teknologi DNA rekombinan yang memiliki aktivitas sebagai obat sehingga dapat digunakan untuk keperluan klinis
- QbD : pendekatan secara sistematis untuk pengembangan yang dimulai dari tujuan, pemahaman terhadap produk, pemahaman terhadap proses, pengendalian proses yang dilakukan berdasarkan cara-cara ilmiah dan manajemen risiko yang berkualitas.
- Quality by design* : spesifikasi kualitas dari produk yang bersangkutan ditentukan sendiri oleh *developer* produk farmasi yang bersangkutan.
- Reverse Engineering : proses penemuan prinsip-prinsip teknologi dari suatu perangkat, objek, atau sistem melalui analisis strukturnya, fungsinya, dan cara kerjanya.
- Rhematoid Arthritis : Peradangan sendi akibat sistem kekebalan tubuh yang menyerang jaringannya sendiri.

- Riset skala pilot : tahapan intermediet dari industri farmasi di mana formula dari skala laboratorium ditransformasikan ke dalam suatu sistem yang dapat dikembangkan pada skala yang lebih besar.
- Sel inang : Organisme yang menampung virus, parasit, partner mutualisme, atau partner komensalisme, umumnya dengan menyediakan makanan dan tempat berlindung.
- Short-acting insulin : jenis insulin regular yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan insulin pada saat makan, bekerja dalam tubuh sedikit lebih lama daripada fast-acting insulin.
- Sitokin : kategori luas dari protein kecil yang penting dalam pensinyalan sel.
- Studi praklinis : Tahap penelitian yang terjadi sebelum uji klinik atau pengujian pada manusia yang bertujuan mengevaluasi keamanan suatu produk baru.
- Toksitas : tingkat merusaknya suatu zat jika dipaparkan oleh organisme.
- Transfer teknologi : disebut juga dengan komersialisasi teknologi, adalah proses memindahkan kemampuan, pengetahuan, teknologi, metode manufaktur, sampel hasil manufaktur, dan fasilitas, dari individu atau organisasi ke pihak lain.
- Transgenik : Organisme yang telah direkayasa, baik bentuk maupun kualitasnya, melalui penyisipan gen atau DNA bakteri, mikroba, atau virus untuk tujuan tertentu.
- Transpeptidasi : proses pemindahan suatu asam amino atau kelompok asam amino dari suatu senyawa ke senyawa yang lain.
- Uji kinis : suatu pengujian khasiat obat baru pada manusia, di mana sebelumnya diawali oleh pengujian pada binatang atau uji pra-klinik. Pada dasarnya, uji klinik memastikan efektivitas, keamanan, dan gambaran efek samping yang sering timbul pada manusia akibat pemberian suatu obat.



- Uji komparasi : membandingkan secara langsung (*head to head*) suatu produk biologi dengan originator atau obat serupa yang sudah terdaftar di Indonesia, untuk melihat kemiripan atau kesetaraan mutu, khasiat, dan keamanan produk dalam penelitian yang menggunakan rancangan dan prosedur yang sama.
- Uji pra-klinis : suatu uji yang dilakukan pada hewan coba dengan tujuan membuktikan kebenaran khasiat dan keamanan secara ilmiah terhadap suatu bahan/zat yang diduga berkhasiat obat.
- Ultrasentrifugasi : Teknik khusus yang digunakan untuk mensentrifugasi molekul besar, seperti protein, dengan kecepatan yang sangat tinggi, bisa mencapai 150.000 putaran per menit.
- Waktu Paruh : Waktu yang dibutuhkan suatu zat untuk berkurang menjadi setengah dari nilai awal.



## Daftar Singkatan

ADCC	: <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AIDS	: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
ANVISA	: <i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
AOX	: <i>Alkohol oksidase</i>
BHK21	: <i>Baby hamster kidney</i>
B POM	: <i>Badan Pengawas Obat dan Makanan</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSMV	: <i>Barley Stripe Mosaic Virus</i>
CCRC	: <i>Cancer Chemoprevention Research Center</i>
CD	: <i>Circular Dichroism</i>
CDC	: <i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CE-HPLC	: <i>Cation exchange high performance liquid chromatography</i>
cGMP	: <i>Current Good Manufacturing Practice</i>
CHMP	: <i>The Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CHO	: <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CML	: <i>Chronic myelogenous leukemia</i>
CNS	: <i>Central nervous system</i>
CPOB	: <i>Cara produksi obat yang baik</i>
CPPs	: <i>Critical Process Parameters</i>
CQAs	: <i>Critical Quality Attributes</i>
CSC	: <i>Cibinong Science Center</i>
DHFR	: <i>Dihydrofolate Reductase</i>

DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
DSC	: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DSP	: <i>Downstream Processing</i>
EDTA	: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	: <i>EGFR variant III</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	: <i>European Medicines Agency</i>
EPO	: <i>Eritropoietin</i>
Fab	: <i>Fragment antigen-binding</i>
FACS	: <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
Fc	: <i>Fragment constant</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	: <i>fourier transform infrared</i>
GCSF	: <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GLP-1	: <i>Glucagon like peptide-1</i>
GMP	: <i>Good Manufacturing Practice</i>
GPI	: <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GS	: <i>Glutamine Synthetase</i>
HATA	: <i>Human anti-toxin antibodies</i>
HBcAg	: <i>hepatitis B core antigen</i>
hEGFR	: <i>human EGFR</i>
hEPO	: <i>human erithropoetin</i>
hG-CSF	: <i>human granulocyte colony stimulating factor</i>
hI	: <i>human Insulin</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPR	: <i>human pancreatic ribonuclease</i>
HSA	: <i>Human Serum Albumin</i>
ICAM-1	: <i>intercellular cell-adhesion molecule-1</i>
ICH	: <i>the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IEF	: <i>Isoelectric focusing</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
Ig	: <i>Imunoglobulin</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>

INN	: International Nonproprietary Names
ISRE	: <i>interferon stimulating response element</i>
ITC	: <i>isothermal titration calorimetry</i>
JAK-1	: <i>janus activated kinase</i>
KCKT	: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
KTD	: Kejadian Tidak Diinginkan
LMWH	: Low Molecular Weight Heparin
MAPK	: <i>mitogen activated protein kinase</i>
MFDS	: <i>Ministry of Food and Drug Safety</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MTX	: <i>Methotrexate</i>
NMR	: <i>nuclear magnetic resonance</i>
PBB	: Perserikatan Bangsa Bangsa
PBS	: Produk Biologi Sejenis
PD	: Pharmacodynamic
PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PEI	: <i>polyethyleneimine</i>
PHS Act	: Public Health Service Act
pI	: titik isoelektrik
PK	: Pharmacokinetic
PK/PD	: farmakokinetik dan farmakodinamik
PLGA	: <i>polylactic-co-glycolic acid</i>
PNGase F	: <i>Peptide-N-Glycosidase F</i>
PPAA	: <i>polypropylacrylic acid</i>
QbD	: <i>Quality by Design</i>
RCB	: <i>Research Cell Bank</i>
rG-CSF	: <i>recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
r-hFSH	: <i>Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone</i>
r-hGH	: <i>Recombinant Human Growth Hormones</i>
rHu-EPO	: <i>Recombinant human erythropoietin</i>
RP-HPLC	: <i>Reverse phase high performance liquid chromatography</i>
SBP	: <i>Similar Biotherapeutic Product</i>
scFv	: <i>single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPR	: <i>Surface plasmon resonance</i>

STAT : *signal transducer and activator of transduction*  
STR : *Stirred Tank Reactor*  
TFF : *tangential-flow filtration*  
TfR : *transferrin receptor*  
TYK-2 : *tyrosine kinase*  
USP : *Upstream Processing*  
UV-CD : *ultraviolet-circular dichroism*  
WFI : *water for injection*  
WHO : *World Health Organization*



## Indeks

- Absorpsi, 41, 267, 275, 309  
Adsorpsi, 118, 261, 262, 263, 279, 280  
*Advanced dosage form*, 255, 265, 266, 267, 268, 269, 278, 281, 283  
Afinitas, 37, 118, 140, 214, 217, 222, 224, 232, 243, 244, 309, 314  
Agregat, 229, 258, 261, 262, 263, 279  
Aktivitas biologis, 17, 36, 37, 39, 52, 73, 80, 130, 133, 135, 145, 147, 148, 153, 154, 166, 169, 187, 188, 189, 191, 213, 231, 239, 241, 243, 254, 297, 315, 317  
Alkohol oksidase, 84, 109, 110, 114  
Analog insulin, 99  
Anemia, 15, 19, 46, 70, 71, 72, 74, 75, 86, 88, 89, 92, 93, 247  
Antibodi, 3, 4, 6, 11, 25, 29, 37, 39, 40, 42, 46, 52, 53, 54, 76, 83, 140, 150, 151, 166, 179, 188, 209, 217, 220, 223, 232, 233, 237, 271, 273, 282, 297, 307, 311, 313, 315, 326, 327, 328, 337, 338  
Antigen, 39, 46, 130, 132, 133, 150, 172, 216, 223, 281, 283, 338  
Antivirus, 129, 130, 132, 133, 140, 141, 142  
Apoptosis, 133, 155, 176, 177, 201, 244, 297, 322, 338  
Aptamer, 233, 235  
Asam amino, 6, 37, 44, 45, 46, 47, 70, 72, 97, 98, 99, 105, 110, 112, 118, 130, 131, 136, 141, 142, 143, 145, 146, 147, 148, 152, 153, 168, 181, 184, 211, 212, 228, 229, 234, 237, 238, 243, 255, 256, 258, 261, 262, 274, 277, 299, 310, 313, 336  
Autoimun, 45, 69, 239

- Badan inklusi, 105, 147, 295
- Bahan aktif, 13, 254, 255, 260, 263, 264, 268, 274, 279, 283
- Bioaktivitas, 190, 191, 194, 214, 233, 239
- Biobetter*, 9, 11
- Biokompatibel, 225, 242
- Biopharmaceuticals*, 4, 123, 245, 247, 250, 251, 287
- Bioreaktor, 2, 8, 78, 81, 114, 117, 300, 301, 302, 303, 304, 307
- Biosimilar, 1, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 70, 78, 79, 85, 86, 87, 88, 89, 96, 97, 101, 102, 103, 124, 125, 134, 142, 143, 144, 158, 162, 178, 179, 195, 196, 199, 206, 208, 212, 244, 279, 280, 288, 291, 292, 293, 294, 295, 306, 307, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342
- Bioteknologi, 1, 2, 3, 4, 15, 27, 61, 69, 72, 75, 83, 96, 103, 104, 138, 144, 172, 265
- Cell line*, 7, 92, 128, 207, 246, 248, 318, 319, 320
- C-peptide, 122
- Derivat, 228
- Diabetes mellitus, 95, 127
- Domain, 46, 166, 167, 175, 207, 211, 214, 216, 217, 218, 222, 224
- Edar, 27, 35, 42, 43, 50, 54, 55, 57, 58, 59, 61
- Efikasi, 10, 14, 21, 22, 23, 25, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 60, 173, 179, 210, 211, 214, 222, 237, 241, 244, 270, 271, 280, 309, 317, 333, 340
- Eksipien, 48, 254, 259, 261, 263, 264, 265, 276, 280
- Ekstraseluler, 114, 148, 217, 273, 274
- Endotoksin, 37, 84, 143, 165, 166, 189
- Enzim, 4, 39, 76, 80, 84, 85, 105, 109, 111, 112, 114, 119, 141, 146, 147, 148, 209, 217, 227, 232, 233, 239, 241, 258, 277, 282, 313
- Evaluasi, 23, 26, 27, 29, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56, 78, 310, 336
- Farmakodinamik, 14, 29, 38, 52, 143, 179, 191, 258, 330, 333, 336



- Farmakokinetik, 14, 23, 29, 38,  
140, 143, 154, 179, 191,  
213, 224, 244, 258, 330,  
333, 336
- Farmakovigilans, 29, 35, 42, 43, 49,  
51, 55, 56, 57, 59, 60, 143
- Fermentasi, 25, 109, 110, 114, 115,  
116, 117, 139, 292, 300,  
306
- Fermentor, 115, 121
- Folding, 73, 112, 251, 314
- Formulasi, 9, 25, 33, 36, 38, 40,  
51, 154, 212, 214, 230, 253,  
254, 255, 258, 259, 260,  
262, 263, 264, 266, 270,  
271, 272, 273, 276, 277,  
278, 279, 280, 281, 282,  
283
- Fusi albumin, 145, 211, 213, 214,  
215, 224
- Generik, 11, 12, 13, 23, 49, 61,  
291, 316, 334, 339
- Glikan, 73, 106, 239, 240, 241,  
242, 243, 244, 298
- Glikoprotein, 7, 16, 46, 73, 75, 88,  
161, 165, 239, 240, 241,  
242, 243, 294, 310, 313
- Glikosidik, 211, 237
- Glikosilasi, 16, 45, 46, 47, 72, 73,  
75, 79, 81, 83, 84, 88, 89,  
108, 111, 130, 136, 145,  
147, 148, 211, 237, 238,  
239, 240, 241, 243, 261,  
271, 310, 336
- Glomerulus, 135, 211, 225
- Hematopoietic growth factor, 72,  
167
- Hepatitis, 130, 134, 135, 136, 138,  
140, 141, 142, 155, 156,  
157, 158, 159, 160, 249,  
251, 281, 283
- Heterolog, 83, 104, 109, 110, 115,  
121, 179, 182
- Hidrodinamik, 232
- Hidrofobisitas, 232, 256
- Hipoksia, 68, 69, 70, 72
- Hormon, 4, 30, 46, 47, 75, 76, 215,  
243, 326, 327, 337
- Human serum albumin, 158, 160,  
250, 252
- Ikatan disulfida, 97, 98, 131, 142,  
169, 214, 228
- Imunogenisitas, 29, 37, 40, 42, 52,  
54, 55, 57, 211, 214, 222,  
225, 232, 237, 239, 241,  
315, 317, 329, 330, 331,  
332, 333, 336
- Imunotoksin, 211, 220, 221, 222,  
223, 224
- Induksi, 84, 116, 133, 173, 190,  
191, 192
- Inflamasi, 172, 176, 178, 219, 239,  
272
- Injeksi, 136, 191, 225, 254, 255,  
258, 260, 261, 262, 264,  
265, 266, 270, 271, 272,  
278, 279, 280, 281, 282,  
283, 315
- Insulin, 2, 4, 17, 21, 42, 45, 48, 49,  
63, 64, 85, 90, 95, 96, 97,  
98, 99, 101, 102, 103, 105,

- 106, 107, 108, 109, 110,  
111, 112, 113, 114, 116,  
117, 118, 119, 120, 121,  
122, 123, 124, 125, 126,  
127, 128, 139, 179, 199,  
215, 246, 267, 268, 272,  
276, 277, 284, 287, 288,  
326
- Insulin aktif, 97, 98
- Insulin ester, 119, 120, 125
- Interferon, 6, 17, 45, 63, 132, 138,  
139, 143, 155, 156, 157,  
158, 159, 160, 179, 209,  
214, 245, 249, 251, 252,  
295, 318, 319, 320, 326,  
327
- Intermediate-acting*, 45
- In vitro, 14, 52, 73, 75, 108, 145,  
147, 166, 197, 201, 241,  
244, 250, 279, 292, 314,  
315, 318
- In vivo, 39, 48, 52, 73, 108, 145,  
147, 160, 189, 190, 191,  
194, 200, 211, 227, 237,  
241, 244, 246, 279, 288
- Isoform, 168, 169, 232, 258, 311
- Isomer, 145, 146, 147, 229, 230,  
232
- Justifikasi, 40, 49, 50, 52, 261
- Kanker, 15, 18, 30, 44, 46, 69, 74,  
86, 130, 132, 133, 134, 135,  
138, 140, 153, 154, 157,  
161, 166, 168, 174, 177,  
219, 220, 222, 223, 239,  
271, 272, 273, 281, 282,  
328, 337, 338
- Karboksipeptidase, 97
- Keamanan, 9, 10, 12, 14, 21, 22,  
23, 24, 25, 29, 33, 34, 36,  
37, 38, 40, 41, 42, 43, 48,  
49, 50, 51, 52, 54, 55, 56,  
57, 59, 60, 61, 108, 142,  
143, 144, 154, 270, 280,  
292, 309, 315, 316, 317,  
330, 331, 332, 333, 336
- Khamir, 96, 106, 107, 109, 110,  
113, 115, 121
- Klinis, 9, 11, 12, 14, 23, 24, 25, 27,  
29, 33, 35, 36, 38, 39, 40,  
41, 42, 43, 44, 46, 48, 50,  
51, 52, 53, 54, 55, 74, 78,  
88, 101, 140, 143, 154, 161,  
162, 164, 173, 174, 175,  
176, 177, 179, 195, 209,  
214, 215, 218, 225, 255,  
281, 291, 292, 310, 315,  
316, 317, 326, 327, 329,  
333, 336, 339
- Kloning, 71, 74, 76, 104, 139, 163,  
166, 168
- Kodon, 110, 113, 179, 180, 181
- Komparasi, 25, 36, 49, 50, 51, 56,  
57, 291, 292, 310, 311, 312,  
313, 314, 317, 339
- Konjugasi, 136, 221, 227, 273, 277
- Kromatografi, 117, 118, 140, 151,  
187, 189, 224, 232, 309,  
312
- Leader peptide, 110
- Linker, 112, 113, 121, 145, 213,  
214, 229, 252, 338, 343
- Liofilisasi, 258, 264, 265
- Long-acting, 45, 97, 99, 100, 246,  
248, 280

Makromolekul, 225, 253  
 Metanol, 107, 109, 114, 115, 116,  
 117, 121, 148, 149  
 Metilasi, 84  
 Mikromolekul, 253, 254, 261  
*Molecular farming*, 2, 81, 83, 108,  
 123  
 Normoxia, 68  
 Nukleofilik, 227  
 Obat generik, 11, 12, 13, 23, 49,  
 61, 291, 316, 339  
 Oligosakarida, 47, 73, 237  
 Originator, 3, 9, 10, 12, 13, 14, 21,  
 23, 24, 25, 26, 28, 32, 35,  
 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,  
 43, 49, 50, 51, 52, 53, 56,  
 58, 60, 61, 70, 139, 280,  
 307, 311, 314, 315, 316,  
 317, 323, 326, 328, 329,  
 330, 331, 332, 333, 334,  
 335, 336, 338, 339, 340,  
 341  
 Panduan, 23, 24, 27, 28, 33, 34, 37,  
 43, 57, 58, 59, 60, 101, 142  
 Pankreas, 95, 96, 97, 112, 121, 222  
 Pascatranslasi, 75  
 Paten, 3, 15, 22, 51, 61, 70, 85, 86,  
 97, 101, 102, 134, 178, 182,  
 212, 280, 291, 326, 327,  
 328, 330, 331, 334, 340  
 Pegilasi, 140, 141, 145, 153, 211,  
 225, 226, 228, 229, 230,  
 231, 232, 237  
 Pelepasan obat, 260  
 Pemurnian, 3, 11, 25, 110, 112,  
 117, 118, 120, 148, 151,  
 232, 292, 307, 309  
 Penghantaran obat, 270, 272, 282  
 Peptida, 105, 110, 111, 112, 119,  
 120, 121, 187, 209, 210,  
 213, 214, 220, 225, 237,  
 244, 269, 273, 274, 276,  
 277  
 Peptida pemisah, 111, 119, 121  
 Peptida penghubung, 112, 119, 121  
 Perizinan, 23, 25, 27, 33, 42, 56,  
 57, 59, 294  
*Pichia pastoris*, 16, 83, 90, 92, 93,  
 95, 106, 107, 109, 122, 123,  
 124, 125, 126, 127, 128,  
 148, 156, 157, 158, 159,  
 216, 249, 251, 279, 289,  
 298, 300, 319, 321  
 Plasmid, 105, 184, 185, 186, 204,  
 319  
 Polar, 229  
 Polimer, 227, 237, 267, 268, 269,  
 270, 271, 274, 276, 296,  
 302  
 Polipeptida, 44, 45, 73, 97, 98, 180,  
 187, 213  
 Prekursor, 110, 111, 112, 113, 114,  
 116, 117, 118, 119, 120,  
 168, 169, 172, 280  
 Preproinsulin, 97, 98, 122  
 Profilaksis, 209  
 Proinsulin, 97, 105, 109, 126, 128,  
 300  
 Promoter, 84, 109, 114, 127  
 Promotor, 109, 110, 139, 148  
 Proses hilir, 37, 117, 140, 291, 292,  
 307, 309

- Proses hulu, 291, 294
- Protein fusi, 60, 111, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 224
- Protein rekombinan, 73, 74, 78, 84, 85, 96, 103, 106, 108, 109, 115, 117, 129, 139, 140, 147, 166, 179, 184, 187, 188, 189, 209, 210, 241, 260, 283, 312
- Proteolitik, 84, 105, 225, 228, 232, 277
- Purifikasi, 7, 38, 70, 84, 105, 107, 140, 152, 163, 164, 165, 166, 182, 187, 189, 212, 214, 224, 230, 231, 291, 335
- Rapid-acting*, 45, 97, 100
- Regulasi, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 43, 47, 48, 49, 51, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 67, 69, 84, 97, 101, 102, 112, 130, 164, 168, 177, 258, 309, 311, 314, 317, 329, 330, 340
- Rekombinan, 2, 3, 7, 24, 44, 46, 47, 49, 71, 73, 74, 76, 78, 81, 83, 84, 85, 86, 96, 97, 99, 100, 101, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 115, 117, 121, 129, 130, 138, 139, 140, 144, 147, 148, 150, 161, 162, 163, 166, 172, 173, 176, 179, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 195, 196, 198, 209, 210, 212, 216, 221, 237, 240, 241, 253, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 263, 265, 266, 269, 278, 281, 283, 296, 312, 326, 329
- Reseptor, 37, 39, 52, 55, 130, 131, 172, 174, 175, 176, 177, 213, 217, 219, 239, 240, 243, 244, 256, 269, 271, 272, 273, 276, 277, 282, 314
- Reseptor neonatal, 213
- Retikulum endoplasma, 97, 111, 114
- Reverse engineering technology*, 17
- Rhematoid arthritis*, 74, 86, 328
- Rute pemberian, 254, 258, 260, 266, 270, 280
- Safety*, 14, 38, 63, 89, 122, 179, 248, 251, 320, 336, 339
- Salinan gen, 110, 112
- Sediaan farmasi, 36, 253, 254, 259, 263, 284
- Sel inang, 7, 25, 37, 47, 75, 81, 118, 166, 179, 180, 185, 187, 216, 222, 223, 224, 237, 240, 241, 242, 255, 259, 260
- Sel lestari, 294, 296, 297
- Short-acting, 45, 99, 100
- Signal peptide, 97
- Sistem ekspresi, 7, 16, 25, 37, 38, 76, 83, 84, 88, 89, 97, 103, 104, 106, 108, 109, 116, 139, 147, 148, 180, 199,

224, 237, 241, 242, 258,  
 279, 294, 295, 298, 301  
 Sitokin, 130, 209, 219, 220  
 Sitotoksik, 211, 212, 221, 223, 224  
 Slot blot, 223  
 Spesifisitas, 241, 255  
 Stabilitas, 26, 36, 38, 51, 78, 86,  
 112, 146, 179, 214, 216,  
 225, 237, 244, 253, 254,  
 258, 259, 260, 261, 263,  
 264, 265, 266, 267, 268,  
 283, 309, 314, 335, 336  
 Struktur protein, 14, 46, 167, 222,  
 237, 254, 255, 258, 310,  
 313, 314  
 Studi praklinis, 14  
 Terapeutik, 1, 3, 39, 41, 74, 76, 79,  
 83, 101, 103, 105, 121, 129,  
 138, 142, 144, 151, 163,  
 179, 189, 195, 196, 198,  
 209, 210, 211, 212, 213,  
 216, 217, 218, 224, 225,  
 230, 232, 233, 237, 240,  
 242, 244, 253, 254, 255,  
 258, 259, 260, 261, 262,  
 263, 265, 266, 269, 270,  
 271, 272, 273, 274, 275,  
 276, 278, 279, 281, 283,  
 299, 300, 313, 326, 329,  
 332, 340  
 Toksikologi, 14, 143  
 Toksisitas, 39, 52, 140, 210, 214,  
 220, 222, 224, 225, 232,  
 244, 268, 315, 333  
 Transgenik, 2, 107, 108  
 Transpeptidasi, 112, 119, 120  
 Tripsin, 112, 119, 120  
 Uji klinis, 24, 29, 33, 38, 40, 42,  
 53, 54, 74, 143, 154, 173,  
 209, 214, 215, 310, 315,  
 316, 317, 326, 327, 333,  
 336, 339  
 Uji komparasi, 25, 36, 49, 50, 57,  
 292, 311, 312, 313, 314,  
 317  
 Vaksin, 3, 4, 69, 209, 281, 327  
 Vektor ekspresi, 25, 77, 109, 110,  
 112, 148, 182, 184  
 Waktu paruh, 51, 53, 80, 86, 87,  
 88, 89, 135, 136, 140, 141,  
 145, 146, 209, 210, 211,  
 212, 213, 214, 217, 218,  
 221, 224, 225, 232, 237,  
 240, 243, 244, 264, 271,  
 337





## Biografi Penulis



### ADI SANTOSO

Lahir di Jember, Jawa Timur, pada 17 Desember 1960. Ia menempuh pendidikan S1 di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang. Lulus dari Universitas Brawijaya pada tahun 1985, ia lalu diterima di LIPI pada 1986. Pada awal 1988, dengan menggunakan dana Overseas Fellowship Program (OFP), ia melanjutkan studi S2 ke Amerika Serikat dan belajar di North Dakota State University (NDSU), Fargo, North Dakota, pada bidang studi Animal Sciences. Setelah lulus S2, ia melanjutkan studi di Department of Biochemistry and Molecular Biology pada bidang studi Cellular and Molecular Biology di NDSU dengan disertasi tentang enzim ornithine decarboxylase pada *Musca domestica*. Ia kembali ke LIPI Puslit Bioteknologi pada 2003 dan saat ini minat risetnya terfokus pada glikosilasi dan biosimilar, terutama pada glikoprotein erythropoietin. *E-mail*: adi.santoso1960@gmail.com



### ANDRI WARDIANA

Lahir di Bandung pada 15 Oktober 1983. Ia menyelesaikan Pendidikan D3 Analisis Kimia di Universitas Padjadjaran Bandung (2001–2004). Pada 2006, ia bergabung dengan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Jenjang pendidikan Sarjana Kimia ia ditempuh di Institut Pertanian Bogor (2007–2010),



lalu mendapatkan beasiswa dari Australia Award untuk menyelesaikan program Master di bidang Bioteknologi di the University of Queensland, Australia (2013–2014). Pada 2015, ia mendapatkan beasiswa LPDP untuk program Doktor dengan topik rekayasa antibodi di Centre for Biopharmaceutical Innovation, Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, the University of Queensland, Australia (2016–2020). Saat ini, ia tergabung dalam Kelompok Penelitian Produk Biologi di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. *E-mail*: andr011@lipi.go.id



### **ARIZAH KUSUMAWATI**

Lahir di Boyolali pada 11 Oktober 1984. Ia lulus Sarjana (S1) Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM) tahun 2006 dan melanjutkan studi Profesi Dokter Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan UGM, lulus tahun 2007. Ia kemudian meneruskan studi Magister (S2) Farmasi bidang Biologi Farmasi, Universitas Indonesia (UI), lulus tahun 2013, mendapatkan beasiswa dari Kementerian Riset dan Teknologi (KEMENRISTEK). Saat ini ia sedang melanjutkan studi Doktor (S3) Kesehatan Masyarakat Veteriner di Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB), mendapatkan beasiswa program byResearch dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Saat ini ia pun bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. *E-mail*: arizahku@gmail.com



### **ASRUL MUHAMAD FUAD**

Lahir di Jakarta pada 26 Juli 1967. Ia mendapat beasiswa Overseas Fellowship Program (OFP) pada 1987 dan memperoleh Diplome d'Etude de Technologie de Compiègne pada 1991 dari Université de Technologie de Compiègne, di Kota Compiègne, Prancis. Ia mendapatkan gelar Sarjana Kimia pada 1996 di Universitas Pakuan, Bogor. Kemudian, ia melanjutkan pendidikan Pascasarjana di School of Biotechnology and Bioengineering di University of New South Wales, Australia, dan Fakultas Pascasarjana di Institut Teknologi Bandung pada 1998–2000 dan mendapat gelar Magister of Science dalam bidang

Bioteknologi (Dual Diplome) dengan beasiswa dari Kementerian Riset dan Teknologi RI. Pada 2004, ia melanjutkan pendidikan doktorat (S3) di Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, dan memperoleh gelar Doktor dalam bidang Bioteknologi Farmasi pada 2009 dengan beasiswa dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.



#### **APON ZAENAL MUSTOPA**

Lahir di Kuningan pada 12 April 1977. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang peternakan, Universitas Padjadjaran (UNPAD), tahun 2001. Ia melanjutkan studi Magister (S2) bidang Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor (IPB), lulus tahun 2004. Ia juga mendapatkan beasiswa dari Dankook University, Korea, dan lulus Doktor (S3) bidang Bioresources Science tahun 2013. Saat ini, ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Madya di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. *E-mail:* azmustopa@yahoo.com



#### **DIAN FITRIA AGUSTIYANTI**

Perempuan kelahiran Kota Bandung pada 7 Agustus 1980 ini memulai karir di LIPI pada 2005. Pendidikan terakhirnya adalah magister (S2) farmasi Institut Teknologi Bandung, jurusan bioteknologi farmasi. Ia bergabung dengan Laboratorium Rekayasa Protein dan Pengembangan Sistem Pengantaran Obat Pada Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Ia bekerja akrab dengan ekspresi dan purifikasi protein rekombinan, sebagai peneliti ahli muda dengan bidang kepakaran bioteknologi kesehatan. Mulai tahun 2019, ia mengelola fasilitas Laboratorium Biosafety level 3 (BSL-3) LIPI, dan Kelompok Penelitian Pengembangan Produk Biologi. Di era pandemic COVID 19, ia ikut bekerja sama dan berperan aktif dalam tim deteksi virus SARS-CoV-2 di Laboratorium BSL 3 LIPI. *E-mail:* dian.fitria07@gmail.com; dian010@lipi.go.id



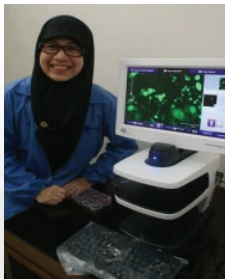
### **DINI NURDIANI**

Lahir di Kuningan pada tanggal 17 Juli 1974. Ia lulus S1 program studi Biologi dari Institut Pertanian Bogor (IPB) pada 1997 dan menjadi staf pengajar di Universitas Kuningan pada 2000–2007. Pada 2006, ia lulus S2 Program Studi Biologi, Sub-Program Mikrobiologi IPB dengan beasiswa Program Pascasarjana (BPPS) dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dikti). Pada 2007, ia bergabung dengan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, kemudian melanjutkan studi S3 dengan beasiswa Global Center of Excellence (global COE) for Practical Chemical Wisdom (2009–2012) di Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, Tokyo, Jepang, dengan bidang keahlian rekayasa biologi molekuler, dan lulus pada 2015. Saat ini, ia tergabung dalam Kelompok Penelitian Produk Biologi di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. *E-mail:* dini011@lipi.go.id.



### **EKO WAHYU PUTRO**

Lahir di Pati pada 27 Mei 1981. Ia lulus Sarjana (S1) di Jurusan Teknik Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang, tahun 2003. Ia lulus Magister (S2) di Jurusan Teknik Kimia, The University of New South Wales, Australia tahun 2013, mendapatkan beasiswa dari AusAID tahun 2012–2013. Saat ini, ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. *E-mail:* eko.wahyuputro@gmail.com.



### **ENDAH PUJI SEPTISETYANI**

Lahir di Rembang, Jawa Tengah, pada 27 September 1984. Dibesarkan dalam keluarga guru yang sederhana, ia mendapatkan beasiswa dari Yayasan Syifa Budi (Bapak Maulwi Saelan) untuk bersekolah di SMU Al-Azhar Boarding School, Lippo Cikarang, Bekasi (1999–2001). Ia menyelesaikan studi S1–S2 di Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada (UGM) (2001–2005; 2007–2009) dan bergabung

dengan *Cancer Research Group* bimbingan Prof. Dr. Edy Meiyanto. Pada saat menempuh S2, ia mendapatkan *on-place scholarship* dari ASEA-Uninet, Austria. Pada tahun kedua studi, ia menjalani Program Research Student (JASSO scholarship) di *Laboratory of Gene Function in Animal, Nara Institute of Science and Technology (NAIST)*, Jepang, di bawah bimbingan Prof. Masashi Kawaichi (2008–2009). Ia mulai bekerja di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI pada 2009, di Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin bimbingan Dr. Adi Santoso, dan memulai pekerjaan kultur sel mamalia untuk ekspresi protein rekombinan erythropoietin. Ia melanjutkan studi S3 di NAIST, Jepang dengan beasiswa dari Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Pemerintah Jepang dan bergabung di *Laboratory of Molecular Signal Transduction* di bawah bimbingan Prof. Hiroshi Itoh (2014–2018). Saat ini, ia kembali bergabung dengan tim peneliti biosimilar erythropoietin. Selain itu, ia ingin menginisiasi pengembangan antibodi monoklonal serta penelitian-penelitian berbasis target molekuler (*molecular targeted therapeutics*). E-mail: enda053@lipi.go.id.

### GITA SYAHPUTRA



Ia adalah Peneliti di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sejak 2015 hingga sekarang dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan dengan fokus pada bidang Biokimia dan Aplikasi Bioinformatika. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang, tahun 2012. Ia melanjutkan studi Magister (S2) bidang Biokimia di Institut Pertanian Bogor (IPB) dan lulus tahun 2014. Saat ini, ia tengah melakukan penelitian mengenai penemuan dan pengembangan obat dari bahan alam serta melakukan penelitian dalam permodelan protein, penambatan molekuler, dan dinamika molekul obat. Beberapa jurnal yang dihasilkan bisa diakses pada [https://www.researchgate.net/profile/Gita\\_Syahputra2](https://www.researchgate.net/profile/Gita_Syahputra2) serta <https://scholar.google.com/citations?user=aif-rbYAAAAJ&hl=en>.



### **HARIYATUN**

Lahir di Klaten pada 30 Agustus 1982. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Kimia Fisika, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, tahun 2005, mendapatkan Beasiswa Bank Indonesia (BI). Lulus Magister (S2) di bidang Bioteknologi Kesehatan, Institut Pertanian Bogor, tahun 2014, mendapatkan Beasiswa Pascasarjana dari Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia dan Beasiswa Tesis dari Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia. Saat ini ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan pada Laboratorium Rekayasa Genetika Terapan dan Desain Protein dan Kelompok Penelitian Pengembangan Produk Biologi Kesehatan, serta bergabung dalam Tim Deteksi Virus SARS-CoV-2 di Laboratorium Biosafety Level-3 (BSL-3) LIPI. *E-mail:* hari023@lipi.go.id.



### **KARTIKA SARI DEWI**

Lahir di Bandung pada 22 Januari 1989. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Kimia Organik, Universitas Padjadjaran pada 2010. Ia mulai bekerja di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI pada 2011 dan mendapatkan beasiswa Karyasiswa Ristek pada 2012–2014 untuk melanjutkan pendidikan Magister (S2) pada program studi Bioteknologi Farmasi, Institut Teknologi Bandung. Saat ini, ia tergabung pada Kelompok Penelitian Pengembangan Produk Biologi sebagai Peneliti Ahli Muda dengan bidang kepakaran Bioteknologi Kesehatan. Ia juga bekerja akrab dengan desain gen sintetik, kloning, dan ekspresi protein rekombinan yang diproduksi secara heterolog. *E-mail:* kart008@lipi.go.id; kasadewi@gmail.com.



### **NENG HERAWATI**

Lahir di Pekanbaru pada 6 Agustus 1978. Sarjana S1 diselesaikannya pada 2003 di Fakultas FMIPA jurusan kimia Universitas Riau (UNRI). Ia lulus Magister (S2) di bidang Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, tahun 2013, dan mendapatkan beasiswa dari Kemenristek Republik Indonesia tahun 2010–2013. Saat ini, ia be-



kerja sebagai Peneliti Ahli Muda di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. *E-mail*: neng07@gmail.com.



### **POPI HADI WISNUWARDHANI**

Kelahiran Bogor 19 Oktober 1981. Ia bekerja di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sejak tahun 2011. Pendidikan terakhir pada Magister (S2) Program Studi Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan di Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin.

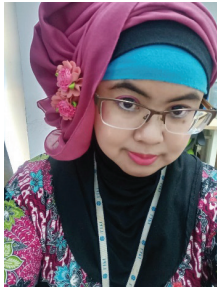
Penelitian yang dilakukan selama bekerja adalah ekspresi dan purifikasi protein rekombinan serta kultur sel mamalia. Selain itu, ia bergabung sebagai pengelola fasilitas Laboratorium Biosafety Level-3 LIPI sejak tahun 2018. Pada 2019, ia mengikuti kegiatan penelitian pengembangan produk biologi, dan pada awal 2020 ia aktif sebagai BioSafety Officer pada kegiatan deteksi virus SARS-CoV-2 COVID-19 sampai sekarang. *E-mail*: popi002@lipi.go.id.



### **PUSPITA LISDIYANTI**

Lahir di Yogyakarta pada 14 Agustus 1967. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Biologi Molekular, Tokyo University of Agriculture and Technology, Jepang, tahun 1992 dengan beasiswa Overseas Fellowship Program (OFP) tahun 1987–1992 dari Pemerintah Indonesia. Kemudian, ia lulus Magister (S2) di bidang Mikrobiologi, Tokyo University of Agriculture, Jepang, tahun 1999 dengan beasiswa

dari Indonesia Petroleum (INPEX) Foundation tahun 1996–1999. Selanjutnya ia melanjutkan studi Doktor (S3) di bidang Mikrobiologi dari Tokyo University of Agriculture, Jepang, tahun 2001 dengan beasiswa dari Pemerintah Jepang (Monbukagakusho) tahun 1999–2001. Ia pun tercatat sebagai penerima penghargaan Habibie Prize tahun 2020. Saat ini, ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Utama di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Mikrobiologi dan Bioteknologi. *E-mail*: puspita.lisdiyanti@bioteknologi.lipi.go.id.



### **RATI H ASMANA NINGRUM**

Lahir di Bandung pada 18 Juni 1979. Ia lulus Diploma III (D-3) di bidang Kimia Analisis Universitas Padjadjaran Bandung tahun 2000 dan Sarjana (S1) di bidang Kimia, Universitas Ahmad Yani, Bandung, tahun 2004. Ia melanjutkan magister (S2) dan doktor (S3) di bidang Bioteknologi Farmasi, Institut Teknologi Bandung (ITB), masing-masing pada tahun 2008 dan 2012, dengan beasiswa dari ITB. Saat ini, ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Madya dan Ketua Kelompok Penelitian Pengembangan Produk Biologi di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. Selain itu, ia bertugas sebagai Kepala Fasilitas Biosafety Level-3 LIPI pada tahun 2018-2020 dan Ketua Komite Biorisiko Instiusional di LIPI sejak tahun 2021.. Ia mendapatkan penghargaan The UNESCO-Loreal for Women in Sciences pada tahun 2013 untuk kategori Life Science. *E-mail:* rati004@lipi.go.id/ ratih.asmana@gmail.com



### **RIYONA DESVY PRATIWI**

Lahir di Padang pada 18 Desember 1986. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Farmasi Sains dan Industri, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, tahun 2008, kemudian melanjutkan Pendidikan Profesi Apoteker Konsentrasi Industri, lulus pada 2009. Ia pernah bekerja sebagai Formulator di Departemen Pengembangan Produk PT. Novell Pharmaceutical Labs, Bogor. Ia lulus magister (S2) di bidang Inovasi Obat pada 2016, dengan topik penelitian *high throughput/high consent screening* untuk senyawa antikanker di Department of Cell Biology, Universiteit Medical Utrecht, dan nanoformulasi protein di Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute of Pharmaceutics Sciences, Universiteit Utrecht. Ia mendapatkan beasiswa dari Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia. Saat ini ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan. *E-mail:* riy003@lipi.go.id.





### **WIEN KUSHARYOTO**

Lahir di Yogyakarta pada 7 Januari 1967. Ia menyelesaikan Pendidikan Kimia dengan fokus pada bidang Biokimia dan Bioteknologi serta mendapatkan gelar Diplom-Chemiker dari Technische Universität Braunschweig, Jerman pada 1994 dengan beasiswa Overseas Fellowship Program (OFP) tahun 1987–1994 dari Pemerintah Indonesia. Ia lulus program Doktor (S3) di bidang Biokimia dan Bioteknologi dari Universität Stuttgart tahun 2001 dengan beasiswa dari Pemerintah Jerman melalui DAAD tahun 1997–2001. Saat ini bekerja sebagai Peneliti Ahli Madya di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan bidang kepakaran Bioteknologi (Rekayasa Genetika dan Protein). *E-mail:* wien.kyoto@gmail.com.



### **YANA RUBIYANA**

Lahir di Bogor, Jawa Barat, pada 21 Februari 1984. Ia lulus pendidikan Diploma III jurusan Analisis Kimia, di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Institut Pertanian Bogor (IPB) pada 2002, lalu pada 2009 ia melanjutkan pendidikan Sarjana (S1) melalui Program Alih Jenjang di Departemen Kimia FMIPA IPB. Pada pertengahan 2017, ia mendapatkan beasiswa SDM-IPTEK (Saintek) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi untuk melanjutkan studi S2 pada Program Studi Bioteknologi IPB. Sejak tahun 2008 sampai saat ini ia bekerja sebagai Perekayasa Ahli Pertama di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan kepakaran Bioteknologi dan Biologi Molekuler. *E-mail:* yana.rubiyana@biotenologi.lipi.go.id.



## **YULIAWATI**

Lahir di Bogor pada 17 Juli 1979. Ia lulus Sarjana (S1) di bidang Biologi, Institut Pertanian Bogor (IPB), Indonesia tahun 2002. Kemudian, ia lulus magister (S2) di bidang Bioteknologi, Pascasarjana IPB tahun 2014, dan mendapatkan beasiswa dari Kementerian Riset dan Teknologi tahun 2010. Saat ini, ia bekerja sebagai Peneliti Ahli Muda dengan kepakaran Bioteknologi Kesehatan, dan bergabung pada Kelompok Penelitian Pengembangan Produk Biologi di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Email:yuliawati.goli@gmail.com.

# PENGEMBANGAN OBAT BIOLOGI :

## BIOTEKNOLOGI, BIOSIMILAR, DAN *REVERSE ENGINEERING*

Obat-obatan merupakan salah satu aspek penting bagi masyarakat dalam pembangunan kesehatan. Namun, tidak semua masyarakat mumpuni untuk mencukupi kebutuhan tersebut karena tidak jarang harga yang dipasarkan tidak terjangkau. Masalah tersebut akan dapat dipecahkan apabila obat yang dibutuhkan tersedia dengan harga yang terjangkau oleh mereka yang membutuhkannya. Buku *Pengembangan Obat Biologi: Bioteknologi, Biosimilar, dan Reverse Engineering* ini membahas cara-cara untuk mengembangkan obat biologi baru melalui biosimilar. Biosimilar merupakan salah satu cara pengembangan obat biologi dengan menggunakan aplikasi teknologi berbasis *reverse engineering* pada bioteknologi kesehatan.

Buku ini merupakan kompilasi dari kegiatan yang telah dilakukan dengan riset mendalam dan dilengkapi dengan informasi-informasi penting. Lebih lanjut, buku ini juga menghadirkan refleksi terhadap kemajuan, peluang, dan tantangan biosimilar di masa yang akan datang. Tentunya, buku ini sangat cocok dibaca bagi para pemerhati industri obat dan pemangku kepentingan di bidang kesehatan.



**Diterbitkan oleh:**

LIPI Press, anggota Ikapi  
Gedung PDDI LIPI Lt. 6  
Jln. Jend. Gatot Subroto 10, Jakarta Selatan 12710  
Telp.: (021) 573 3465 | Whatsapp 0812 2228 485  
E-mail: [press@mail.lipi.go.id](mailto:press@mail.lipi.go.id)  
Website: [lipipress.lipi.go.id](http://lipipress.lipi.go.id) | [penerbit.lipi.go.id](http://penerbit.lipi.go.id)

DOI 10.34903/press-343



ISBN 978-602-496-265-4



9 786024 962654

ini tidak diperjualbelikan.