



Javni razpis za spodbujanje raziskovalcev na začetku kariere 2.1

1) Podatki o upravičencu

Naziv upravičenca:	Univerza v Ljubljani (Fakulteta za farmacijo)
Sedež upravičenca/poslovna enota:	Kongresni trg 12, 1000 Ljubljana
Odgovorna oseba (zastopnik):	prof. dr. Igor Papič, rektor

2) Podatki o operaciji

Številka pogodbe o sofinanciranju operacije:	št. C3330-19-952017
Operacija (e-MA št.):	OP20.04327
Naziv operacije:	Razvoj in vpeljava naprednih analitskih pristopov, ki temeljijo na kvantitativni uporabi masne spektrometrije med razvojem biofarmacevtskih učinkovin
Obdobje izvajanja (od do):	1. 4. 2019 - 31. 3. 2022
Ime in priimek raziskovalca(ke)	dr. Eva Kranjc
Sodelujoči gospodarski subjekt (naziv in naslov/poslovna enota)	Lek farmacevtska družba d.d., Verovškova ulica 57, 1000 Ljubljana
Kohezijska regija izvajanja:	Zahod

3) Poročilo o izvajanju operacije (izvedba)

POROČILO O IZVAJANJU OPERACIJE (april 2019-oktober 2020)

V okviru operacije Razvoj in vpeljava naprednih analitskih pristopov, ki temeljijo na kvantitativni uporabi masne spektrometrije med razvojem biofarmacevtskih učinkovin smo se sprva posvetili predvsem cilju 2 projekta, t. j. razvoj in implementacija multiatributne metode (MAM) za analitiko biofarmacevtskih učinkovin.

V začetni fazi razvoja MAM smo v letu 2019 na podlagi pregleda literature testirali različice MAM. V okviru testiranja tripsinske različice MAM smo metodo tekočinske kromatografije (LC), ki uporablja kot detektor masni spektrometer (MS) visoke ločljivosti, analizirali tri testne proteine. Pri tem enega izmed proteinov predstavlja NIST (NIST - National Institute of Standards and Technology) monoklonsko protitelo, ki je komercialno dostopno in tako lahko analiza le-tega omogoča primerjavo rezultatov razvoja MAM metode med različnimi laboratoriji na globalni ravni. Po procesiranju in interpretaciji rezultatov smo ugotovili, da je

zaradi velikega števila dobljenih peptidov pokritost aminokislinskih sekvenc dobra, vendar pa so prisotne težave zaradi nepopolne cepitve z izbrano proteazo. Poleg tega smo zaznali, da prihaja pri analizah do t.i. fenomena »carry-over«, pri katerem se LC-MS sistem kontaminira z vzorci predhodnih analiz.

V nadaljevanju razvoja MAM smo se v letu 2019 vključili v testiranje preliminarne kromatografske metode na različnih Novartisovih lokacijah. V sklopu teh eksperimentov smo pri pripravi vzorcev testirali različne proteaze in njihove kombinacije. Prav tako smo preizkusili tudi različen čas delovanja proteaz in različna razmerja encim-substrat. Na področju optimizacije kromatografskih pogojev smo preizkusili mobilne faze z različnimi kislinskimi modifikatorji. Nadalje smo uspeli z optimizacijo topila za spiranje avtomatskega vzorčevalnika LC sistema odpraviti ponavljajočo kontaminacijo LC-MS sistema z vzorci predhodnih analiz (t. i. fenomen »carry-over«).

V okviru operacije smo zbrali in obdelali podatke različice MAM za namen kvalifikacije te metode za uporabo pri procesni karakterizaciji kandidata za biološko zdravilo. Prispevek z naslovom »Qualification of multi-attribute method for the application for process characterization of a biosimilar candidate« (slo. Kvalifikacija multiatributne metode za uporabo pri procesni karakterizaciji kandidata za biološko podobno zdravilo) smo predstavili na mednarodni konferenci »16th Symposium on the Practical Applications of Mass Spectrometry in the Biotechnology Industry« (17–20 September 2019, Chicago, IL, ZDA).

V prvem polletju leta 2020 smo izvedli testiranje MAM na različnih Novartisovih lokacijah, pri čemer smo bili vključeni v obsežen eksperiment, ki je bil izveden s poenoteno metodo. Naš cilj v sklopu tega eksperimenta je bilo obsežno testiranje robustnosti parametrov priprave vzorcev, kromatografskih pogojev ter procesirnih nastavitvev. Rezultati eksperimenta so pokazali zelo dobro robustnost ročne priprave vzorcev v različnih laboratorijih. Nadalje smo v sklopu testiranja MAM izvedli tudi avtomatizacijo priprave vzorcev z uporabo robotskega pipetirnega sistema, pri čemer pa se je izkazalo, da so na tem področju potrebne izboljšave. V drugem delu leta 2020 smo pričeli s pripravami na nov obsežen eksperiment, ki se bo izvajal v različnih Novartisovih laboratorijih in pa dodatno v laboratoriju proizvajalca visoko ločljivostnih masnih spektrometrij. Tokrat bo poudarek razvoja MAM na testiranju različnih LC-MS instrumentov.

Nadalje smo v drugem polletju 2020 projektno specifično različico MAM uporabili na razvojnem projektu, kjer smo z uporabo te metode spremljali glikanski profil biofarmacevtske učinkovine iz različnih produkcijskih celičnih linij.

Poleg tega smo se v letu 2020 posvetili tudi izvajanju cilja 1 operacije, t.j. analitika primarnih metabolitov (metabolomika). Z LC-MS metodo smo testirali komercialne standarde, in sicer aktiviran monosaharid, aminokislino ter nekatere intermediate glutationskega cikla. Detekcijo smo izvedli tako v pozitivnem kot v negativnem načinu ionizacije (MS1 eksperimenti). Po pregledu kromatogramov smo ugotovili, da ločba analitov na reverzno fazni koloni ni optimalna, saj se nekateri analiti niso zadostno zadržali na stacionarni fazi, zato bo v nadaljevanju potrebna optimizacija ločbe teh analitov.

Poleg udeležbe na mednarodni konferenci leta 2019 smo se v letu 2019 in 2020 v okviru diseminacijskih aktivnosti preko videokonferenc udeležili rednih MAM konzorcijev, ki ga sestavljajo strokovnjaki, ki se ukvarjajo z MAM (iz akademske in gospodarske sfere).

Javni razpis za izbor operacij delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega sklada za regionalni razvoj (ESRR). Javni razpis za izbor operacij se izvaja v okviru Operativnega programa za izvajanje evropske koezijske politike v obdobju 2014-2020, prednostne osi: 1. Mednarodna konkurenčnost raziskav, inovacij in tehnološkega razvoja v skladu s pametno specializacijo za večjo konkurenčnost in ozelenitev gospodarstva; prednostne naložbe:

1.1. Krepitev infrastrukture za raziskave in inovacije ter zmogljivosti za razvoj odličnosti na tem področju, pa tudi spodbujanje pristojnih centrov, zlasti takšnih, ki so evropskega pomena; specifičnega cilja: 1.1.1. Učinkovita uporaba raziskovalne infrastrukture ter razvoj znanja/kompetenc za boljše nacionalno in mednarodno sodelovanje v trikotniku znanja.