


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) Predstavitev raziskovalnega projekta (izvedba)

Predlagan raziskovalni projekt spada v področje zdravje – medicina (podpodročje biofarmacevtika), osredotočen pa je na razvoj in vpeljavo naprednih analitskih pristopov, ki temeljijo na kvantitativni uporabi masne spektrometrije za kvantifikacijo primarnih znotrajceličnih metabolitov med razvojem biofarmacevtskih učinkovin (cilj 1) in za spremljanje kakovosti same učinkovine (cilj 2). Cilja sta interdisciplinarna ter medsebojno odvisna. Po končanem razvoju in uspešni implementaciji bosta nova analitska pristopa preizkušena v praksi, in sicer pri razvoju biofarmacevtske učinkovine v gospodarski družbi Lek d.d., ki predstavlja pomemben del mednarodne farmacevtske družbe Novartis. Ocenjujemo, da je ravno ta faza velika dodana vrednost projekta.

Uporaba naprednih analitskih pristopov (cilj 1 in 2) bo korenito pripomogla k **pospešitvi razvoja biofarmacevtskih učinkovin in s tem hitrejši prihod učinkovin na trg**. Posledično bo omogočena **hitrejša dostopnost zdravil za paciente**, v primeru biološko podobnih zdravil bo to pomenilo tudi **znatno znižanje stroškov zdravljenja**. Rezultati samega raziskovalnega dela bodo zanimivi za domačo kot tudi za

tujo strokovno javnost, ki se ukvarja z razvojem bioprocsov ter karatkerizacijo biofarmaceutskih učinkovin in drugih proteinov. Sam projekt je plod dosedanjega intenzivnega sodelovanja med Fakulteto za farmacijo (FFA) in gospodarsko družbo Lek d.d., po njegovem zaključku pa pričakujemo še večje sinergije in uspešno sodelovanje med obema inštitucijama. Poleg tega bo skozi raziskovalni projekt FFA dobila podroben vpogled v to, kako poteka zgodnji razvoj biofarmaceutskih učinkovin v praksi ter bo izsledke in izkušnje vključila v študijski program.

PREDSTAVITEV PROBLEMA

V gospodarski družbi Lek d.d. razvijajo in proizvajajo biofarmaceutske učinkovine (različne proteine za terapevtsko uporabo). Biofarmaceutske učinkovine so kompleksni, multimerni glikozilirani proteini, za katere je ključno, da so terapevtsko učinkoviti ter hkrati niso imunogeni za paciente. Da lahko zagotovimo obe lastnosti, je potrebno izbrati optimalen produkcijski sistem in razviti primerne pogoje gojenja.

Cilj razvoja biofarmaceutskih učinkovin je izbira ustrezne celične linije ter razviti biotehnološki proces (bioproc), ki bo proizvajal biofarmaceutsko učinkovino z ustrežno kvaliteto, učinkovitostjo in varnostjo za paciente. Bioproc pa mora biti tudi tehnološko izvedljiv, robusten ter stroškovno učinkovit. Oba vidika sta neposredno povezana s primarnim metabolizmom celične linije, ta je odgovoren za rast samih celic, kot tudi za kakovost biološkega zdravila. Analitski pristopi za spremljanje nivoja celičnih metabolitov so različni, večinoma pa ne omogočajo spremljanja večjega nabora metabolitov hkrati.

Za spremljanje kritičnih atributov biofarmaceutskih aktivnih učinkovin (t.j. različne posttranslacijske modifikacije, sekvenčne variante, ...) se v farmacevtski industriji uporabljajo tradicionalni analitski pristopi. Za vsak posamezen atribut se uporablja specifična analitska metoda, določanje atributov pa poteka dvostopenjsko. Za kvantitativno določanje posameznega atributa se uporabljajo večinoma kromatografske in elektroforetske metode, identifikacija atributov ter morebitnih neznanih kromatografskih vrhov pa poteka s pomočjo masne spektrometrije (MS) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Analitski pristopi med razvojem biofarmaceutskih učinkovin. V preglednici so navedene analitske metode za kvantitativno določanje najpomembnejših atributov ter metode, ki se uporabljajo za njihovo identifikacijo.

Atribut	Kvantitativno določanje	Detekcija	Identifikacija atributov (detekcija z MS)
Glikozilacija	Odcepitev in fluor. označevanje, HILIC analiza	FLD	HILIC-MS analiza
Sialilacija	Odcepitev in fluor. označevanje, RPC analiza	FLD	RPC-MS analiza
Deamidacija	IEC ali IEF	UV	Izolacija kislih IEC frakcij, identifikacija z RPC-MS
Glikacija	IEC ali IEF	UV	Izolacija kislih IEC frakcij, identifikacija z RPC-MS
Oksidacija	Encimska razgradnja, RPC analiza	UV	Encimska razgradnja, RPC-MS analiza
N-term. variante (trunkacije, elongacije)	CE-SDS / Encimska razgradnja, RPC analiza	UV	Encimska razgradnja, RPC-MS analiza

C-term. variante (lizini, prolinamid)	IEC ali IEF	UV	Izolacija bazičnih IEC frakcij, identifikacija z RPC-MS
Sekvenčne variante	/	/	Encimska razgradnja, RPC-MS analiza

HILIC: kromatografija, ki temelji na hidrofilnih interakcijah, IEC: ionsko izmenjevalna kromatografija, RPC: kromatografija z reverzno fazo, IEF: izoelektrično fokusiranje, CE-SDS: kapilarna elektroforeza v prisotnosti natrijevega laurilsulfata. MS: masna spektrometrija.

Pri trenutnem analitskem pristopu za analitiko biofarmaceutskih učinkovin obstajata dve glavni pomanjkljivosti:

1. Dolgotrajen razvoj ter optimizacija metod za vsako biofarmaceutsko učinkovino. Pred začetkom razvoja nove učinkovine je potrebno najprej razviti nove projektne specifične analitske metode, ali pa obstoječe metode prilagoditi in optimirati za novo učinkovino. Ta začetna faza razvoja metod je dokaj zamudna in vključuje pa delo različnih analitskih ekspertov. Ko je končna metoda razvita, je potrebno vse neznane kromatografske vrhove dodatno potrditi še z MS.
2. Trenutne metode ne omogočajo zanesljivega določanja nekaterih atributov. Tako na primer ne moremo natančno določati deamidacije ter različnih C-terminalnih variant, saj se te oblike eluirajo v skupnem kromatografskem vrhu z ostalimi kislimi oz. bazičnimi oblikami proteina. Prav tako trenutne metode ne omogočajo zanesljivega določanje sekvenčnih variant (napake med translacijo - uporaba napačne aminokisljine), ki so pogost pojav pri intenzivnih bioprocseh z visoko produktivnostjo [1].

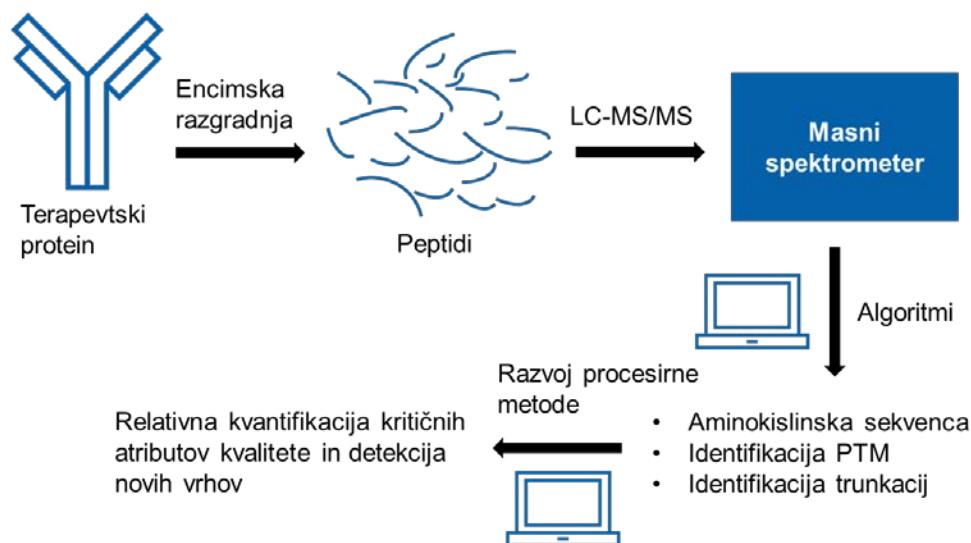
CILJI PREDLAGANEGA PROJEKTA

CILJ 1: ANALITIKA PRIMARNIH METABOLITOV - METABOLOMIKA

Edini pristop, ki omogoča profiliranje širokega nabora primarnih metabolitov je LC-MS (tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo) [2]. Instrumenti visoke ločljivosti, HRMS (ang. High Resolution Mass Spectrometry) nam omogočajo meritve monoizotopskih mas. Na tak način lahko ugotovimo elementarno sestavo, kar nam pomaga pri identifikaciji molekule. Dokončno identiteto molekule potrdimo s fragmentacijo MS/MS. Poleg identifikacije nam MS omogoča kvantifikacijo molekul metabolita. Testiranje različnih pristopov za identifikacijo in kvantifikacijo metabolitov, razvoj same LC-MS metode in MS/MS fragmentacije bodo preizkušeni v okviru cilja 1. Testirali bomo standarde metabolitov v MS načinu ionizacije, sledila bo fragmentacija standardov v MS/MS načinu in testiranje metode na celičnih ekstraktih.

CILJ 2: RAZVOJ IN IMPLEMENTACIJA MULTIATRIBUTNE METODE (MAM) ZA ANALITIKO BIOFARMACEVTSKIH UČINKOVIN

Rešitev za izzive, s katerimi se srečujemo tekom spremljanja kakovosti biofarmaceutskih učinkovin, predstavlja implementacija enotne metode, s katero bi lahko attribute **hkrati identificirali in kvantitativno določali**. V znanstveni literaturi je opisana kot "multiatributna" metoda (MAM) [3]. MAM je v osnovi peptidno kartiranje, pri katerem protein s proteazami razgradimo na manjše peptide. Peptide potem ločimo z RPC ter z MS/MS razbijemo na fragmente. S pomočjo različnih algoritmov ter mas fragmentov identificiramo peptide ter različne posttranslacijske modifikacije (PTM). Relativno kvantifikacijo posameznih PTM izvedemo z MS tako, da upoštevamo pojavnost izvornih peptidov. Oba procesa potekata vzporedno, za analizo pa je potreben masni spektrometer visoke ločljivosti. Tak način detekcije je izredno občutljiv ter omogoča detekcijo in kvantifikacijo peptidov, ki kromatografsko niso ločeni, omogoča pa tudi detekcijo novih (nepričakovanih) postranslacijskih modifikacij ter sekvenčnih variant [4]; Slika 1.



Slika 1: Princip MAM.

MAM je zelo zmogljiva analitska metoda, ki predstavlja alternativo klasičnim analitskim metodam, vendar pa predstavlja njen razvoj ter implementacija zaradi same kompleksnosti velik izziv. V prvi fazi raziskovalnega dela projekta bomo v oviru cilja 2 testirali različne pristope priprave vzorcev, ki bodo uporabni za širok nabor biofarmaceutskih učinkovin. Za analizo bomo uporabili masni spektrometer visoke ločljivosti. V naslednji fazi bo sledil razvoj MAM, ki bo obsegal obsežno testiranje robustnosti parametrov priprave vzorcev, kromatografskih pogojev ter procesirnih nastavitvev. Pomemben del razvoja MAM bo tudi vzpostavitev čimbolj enostavnega in hitrega delovnega procesa. V tej fazi bo zelo pomembna predvsem avtomatizacija priprave vzorca (robotska priprava) ter avtomatizacija procesiranja rezultatov (uporaba programa Genedata Expressionist). V zadnji fazi bomo razvito MAM uporabili pilotno za analitiko nove biofarmaceutske učinkovine v zgodnjih fazah razvoja.

REFERENCE

- [1] Feeney L, Carvalhal V, Yu XC, Chan B, Michels DA, Wang YJ, Shen A, Ressel J, Dusel B, Laird MW (2013) Eliminating tyrosine sequence variants in CHO cell lines producing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng* 110: 1087-97
- [2] Chong WPK, Thng SH, Hiu AP, Lee D-Y, Chan ECY, Ho YS (2012) LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 109: 3103-11
- [3] Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A (2015) Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. *MAbs* 7: 881-90
- [4] Rogers RS, Abernathy M, Richardson DD, Rouse JC, Sperry JB, Swann P, Wypych J, Yu C, Zang L, Deshpande R (2017) A View on the Importance of "Multi-Attribute Method" for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy. *Aaps J* 20: 7

METODE DELA

Projekt zajema široko znanstveno področje, zato bo pristop k reševanju problematike interdisciplinaren. V projekt so posredno ali neposredno vključene različne veje razvoja bioloških zdravil – celična in molekularna biologija, razvoj bioprocesa, razvoj separacij in razvojna analitika. Glavne metode, ki se bodo uporabile tekom projekta vključujejo separacijske tehnike, sklopljene z različnimi detektorji. V ospredju bo uporaba tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo visoke ločljivosti in z detektorjem z nizom fotodiod.

RELEVANTNOST IN POTENCIALNI VPLIV REZULTATOV

Rezultat raziskovalnega projekta bosta dva nova analitska pristopa za:

- Kvantifikacijo primarnih znotrajceličnih metabolitov – **cilj 1**.

- Spremljanje kakovosti biofarmacevtskih učinkovin med razvojem celične linije in procesa – **cilj 2.**

Novi analitski pristopi bodo omogočili farmacevtski industriji učinkovitejše spremljanje metabolizma celic ter posledično boljše kontrolo bioprocesa. Hkrati pa bo podjetje že med samim bioprosesom spremljalo kvaliteto produkta. Vpeljava novih pristopov bo farmacevtski industriji prinesla časovne in stroškovne prihranke, saj bo skrajšala čas, potreben za razvoj in zmanjšala število potrebnih korakov.

Izsledki in izkušnje bodo dragoceni tudi za domačo in tujo zainteresirano strokovno javnost. Razvite MS metode bodo uporabne tako v gospodarstvu (farmacevtska in biotehnoška podjetja), kot tudi v javnih raziskovalnih ustanovah, kjer se ukvarjajo s karakterizacijo kompleksnih proteinov.

GLAVNI MEJNIKI PROJEKTA (PATENTI, ČLANKI, KONFERENCE)

Najpomembnejši rezultati bodo objavljeni v uglednih mednarodnih znanstvenih revijah z SCI faktorjem vpliva. Vodja projekta oz. raziskovalec bo rezultate raziskav znanstveni javnosti predstavljal tudi na ustreznih konferencah, na katerih bo izsledke podal v obliki predavanj ali posterjev. Zanimivosti povezane s projektom bodo predstavljene tudi širši laični javnosti, in sicer preko internetnih strani Univerze v Ljubljani in poljudnih člankov.

Strategija/načrt dolgoročnega sodelovanja med raziskovalno organizacijo in gospodarskim subjektom – strategija/načrt, ki bo zagotavljal trajnost rezultatov in sodelovanja po zaključku operacije

Predlagan projekt je sestavni del večletnega strateškega sodelovanja in sinergističnega dopolnjevanja raziskovalnih ter inovativnih kapacitet med Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani in gospodarsko družbo Lek d.d. Je del strategije za dvig raziskovalne intenzivnosti in kvalitete, ki se neposredno odraža v povezovanju raziskovalnega dela raziskovalcev na začetku kariere z gospodarstvom in hkrati tudi odgovarja na potrebe slednjega. Delo v sklopu projekta bo dograjevalo in poglobljalo obstoječa znanja in hkrati ustvarjalo nove znanstvene pristope. To je izjemnega pomena, saj je nujno, da slovenska znanstvena sfera stopa v korak s svetovnim razvojem in raziskavami.

Rezultati, ki jih bo predlagan projekt generiral, so metode, ki jih lahko družba Lek d.d. aplicira na druge projekte, skrajša in poceni razvoj novega zdravila ter tako omogoči večjo dostopnost zdravil pacientom. Tekom razvoja posameznega biološkega zdravila se namreč uporabljajo podobne metode, zato naprednejša metodologija, ki jo nameravamo razviti tekom projekta, predstavlja veliko dodano vrednost in se bo neposredno odražala pri razvoju številnih novih zdravil. Ker pa gre pri bioloških zdravilih za področje, ki se izjemno razvija in spreminja, bo tudi v prihodnje obilo priložnosti za sodelovanje med FFA in družbo Lek d.d. Raziskovalni projekt, opisan v tej prijavi, bo smiselno integriran v že vzpostavljeno delovno okolje. Glavna dejavnost programske skupine 'P1-0208 Farmacevtska kemija: načrtovanje, sinteza in vrednotenje učinkovin' je odkrivanje novih bioaktivnih molekul in razvoj analiznih metod za preskušanje kakovosti učinkovin in pomožnih snovi. Racionalni razvoj bioaktivne molekule ni mogoč brez ustrezne analitske podpore, s katero je mogoče okarakterizirati tarčo, vrednotiti interakcijo med tarčo in molekulo ter biokemijski odgovor, ki ga takšna interakcija sproži. V preteklih letih je zato programska skupina veliko vložila v razvoj analitskega segmenta; z nakupom analitske opreme (Thermo Scientific Q-Exactive Plus v vrednosti 400 k€), izgradnjo namenskih laboratorijev in vlaganjem v kadre, ki bodo koristili novo opremo. Vse to z namenom, da lahko boljše okarakteriziramo tarče (proteine) in biokemijski odgovor (npr. spremembe v metabolizmu, signalizaciji ...).

Skupna imenovalca družbe Lek d.d. in programske skupine P1-0208 sta protein in biokemijske poti. Oboji imamo podobna vprašanja in zato je obstoječa infrastruktura na FFA komplementarna z infrastrukturo

družbe Lek d.d. Znanje, ki ga bomo pridobili tekom tega projekta, pa bo zelo koristno uporabljeno tudi na drugih projektih raziskovalne skupine.

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 kohezijske 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 takešnih, 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.