



Dan za raziskovalce

Dan za raziskovalce 2019

8. november 2019

Ljubljana, Slovenija

Zlate prakse medsebojnih
sodelovanj



Nova generacija bioloških zdravil – Biopharm.SI

Dr. Drago Kuzman

drago.kuzman@novartis.com

Cilj programa Biopharm.SI

Biološka zdravila so med najbolj sofisticiranimi dosežki medicine in ved o življenju. Ponujajo visoko učinkovitost in zmanjšane stranske učinke. Proizvodnja pa je, z operativnega in tehničnega vidika, izjemno zahtevna. Ponovljivo proizvodnje velikih molekul na industrijskem nivoju zahteva proizvodne zmožnosti, kot si jih pred tem ni bilo mogoče niti predstavljati. Biološka zdravila se proizvajajo v genetsko spremenjenih živih celicah, ki morajo biti skrbno selekcionirane, tako s stališča produktivnosti kot varnosti zmrznjene za shranjevanje, nato odtaljene, ne da bi jih poškodovali in nato v bioreaktorju namnožene do velike gostote. Biološka zdravila, ki so tarčne molekule, morajo biti ločene od proizvodnih celic in medija, ne da bi se pri tem spremenile njihove biološke lastnosti. Pri slabi ponovljivosti tako zahtevnega procesa, je proizvodnja časovno zahtevna in zelo draga. **Glavni cilj programa je zasnova in razvoj kontinuiranih procesov, produktov in storitev, ki bodo visoko ponovljivi, pri obenem nižjih stroških in krajšem času razvoja bioloških zdravil.**

Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega sklada za regionalni razvoj (ESRR) ter Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport.



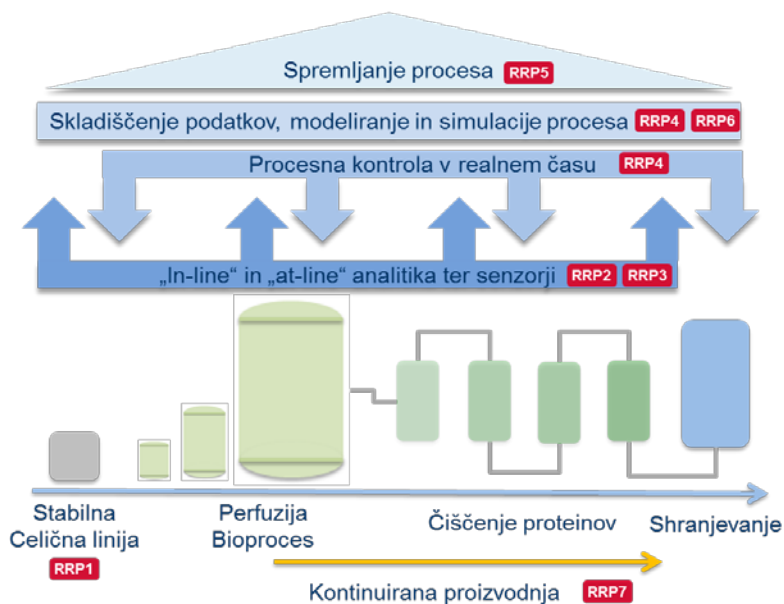
REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT



EVROPSKA UNIJA
EVROPSKI SKLAD ZA
REGIONALNI RAZVOJ
NACIJSKA AGENCIJA ZA REGIONALNI RAZVOJ

Raziskovalno-razvojni projekti v Biopharm.SI programu

Program BioPharm.SI je organiziran v sedem komplemenarnih raziskovalno-razvojnih projektov, ki so shematsko prikazani na spodnji sliki:



- RRP1:** razvoj tehnologije za hitro, usmerjeno ter učinkovito optimizacijo celične linije za namene vsake biološke učinkovine.
RRP2: razvoj tehnologije med naborom biosenzorjev, senzorskih tehnik in analitskih metod za spremljanje kvalitete učinkovine.
RRP3: razvoj tehnološke platforme za spremljanje kvalitete biološkega zdravila z in-line ter at-line metodami ter napravami.
RRP4: razvoj računalniških metod, algoritmov ter orodij za spremljanje, nadzor in podatkovno rudarjenje bioprocasa.
RRP5: razvoj pametne kontrolne plošče, temelječe na urejenem podatkovnem skladišču.
RRP6: projektiranje realističnih simulacij procesa proizvodnje v kontinuirnem režimu.
RRP7: postavitve reprezentativnega »scale-down« modela kontinuiranega procesa.

Partnerji in njihov doprinos

1. CO BIK: razvoj senzorjev in njihov prenos na trg
2. Lek d.d: razvoj podatkovnega skladišča, avtomatizacija analitskih metod, stabilne celične linije, testiranje prototipov v industrijskem okolju
3. I-tech: razvoj senzorjev in njihov prenos na trg
4. Metronik d.d.: razvoj sistemov za nadzor in spremljanje procesov
5. BIA d.d.: karakterizacija celičnih linij
6. NIB: validacija genetskih markerjev in razvoj RNA senzorja
7. FRI UL: razvoj orodij za podatkovno rudarjenje
8. FE UL: razvoj mikroelektronskih in mikrofluidičnih komponent
9. FKKT UL: modeliranje bioprocasa, razvoj senzorjev
10. KI: karakterizacija molekularnih interakcij, modeliranje bioprocasa, simulacije proizvodnih procesov

Reference:

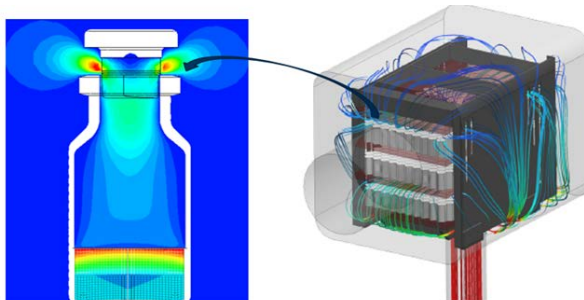
<http://www.biopharm.si/>

Virtualni model liofilizatorja

Dr. Matjaž Hriberšek
matjaz.hribersek@um.si

3D računalniški model liofilizatorja z vijalami

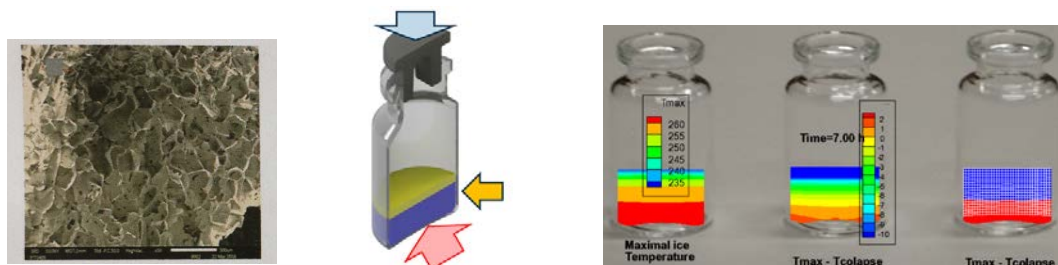
Virtualni model liofilizatorja temelji na numeričnem modelu, ki omogoča izračun časovno in prostorsko (3D) odvisnih tokovnih, toplotnih in snovnih razmer v liofilizatorju za sušenje farmacevtskih formulacij v vijalah. Izračun prenosa toplote in snovi v notranjosti posamezne vijale je izveden z osnosimetričnim modelom sublimacijskega sušenja v vijali, ki upošteva temperaturo polic in lokalne vrednosti tlaka v okolici vijal. Slednje so rezultat izračuna tokovno-toplotnih razmer v okolici posameznih vijal z metodami računalniške dinamike tekočin, ki vključuje 3D geometrijo notranjosti liofilizatorja.



Slika 1: Rezultati virtualnega modela v vijali (levo) in liofilizatorju (desno)

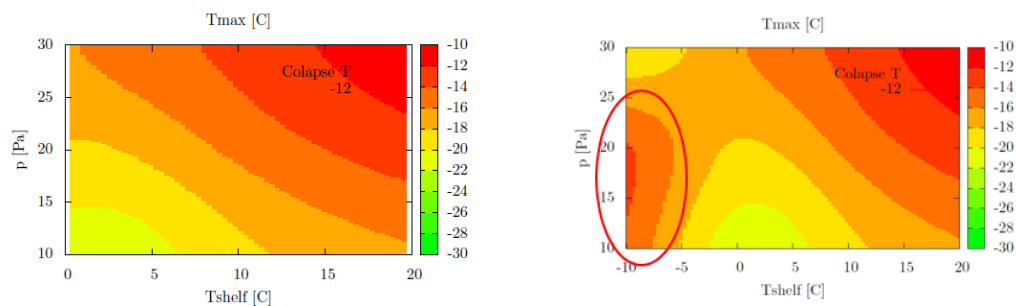
Uporaba virtualnega modela za optimizacijo procesa liofilizacije

Testna izvedba liofilizacije izbrane formulacije na laboratorijskem liofilizatorju s strani farmacevtskih strokovnjakov zadošča za določitev modelnih parametrov sušene snovi. S pridobljenimi podatki o snovi razviti računalniški model omogoča analizo različnih pogojev sušenja, pri čemer je mogoče natančno določiti konec primarne faze liofilizacije za različne pozicije vijal na posamezni polici liofilizatorja kot tudi maksimalne temperature, ki se pojavijo med primarno fazo v zmrznjeni polnitvi, ter tako določiti delovno območje (ang. design space) liofilizatorja za ciljno formulacijo.



Slika 2: Značilna struktura osušene pogače (levo), toplotni tokovi na vijalo (sredina), izračun največjih temperatur v polnitvi vijale (desno).

S tem se je mogoče že v razvojni fazi izogniti nepravilni izbiri delovnih parametrov, ki bi vodili v probleme pri merilnem prenosu iz laboratorijskih naprav na industrijske liofilizatorje.



Slika 3: Primer pravilne (levo) in nepravilne (desno) izbire časa trajanja primarne faze liofilizacije.

Razvojno-raziskovalno sodelovanje in perspektiva

Predstavljeni dosežek je plod nekajletnega sodelovanja med strokovnjaki podjetja LEK (dr. Matej Avanzo, LEK Ljubljana, dr. Špela Irman, LEK Mengeš, s sodelavci), raziskovalci Univerze v Mariboru (prof. dr. Matjaž Hriberšek, Katedra za energetsko, procesno in okoljsko inženirstvo) in Univerze v Ljubljani (prof. dr. Iztok Golobič, Laboratorij za toplotno tehniko) ter dokaz, da sodobne računalniške metode, kombinirane s ciljno razvitimi lastnimi modeli specifičnih procesov, predstavljajo odličen okvir za razvoj virtualnih modelov naprav v mehanski in toplotno-snovni farmacevtski oz. splošni procesni tehniki.

Reference:

- [1.] Ravnik, J. et al, Lyophilization model of mannitol water solution in a laboratory scale lyophilizer. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018.
- [2.] Hriberšek, M. et al.: BEM based design space determination of a protein based solution lyophilization in a vial. 7th European Drying Conference, 2019.

Delavnice preparativne kromatografije: s sodelavo **do večje** kompetitivnosti

Dr. Rok Ambrožič, Petra Modic, Metka Stantič in dr. Aleš Podgornik
aleš.podgornik@fkkt.uni-lj.si



Namen

Prenos znanja in izkušenj med akademijo (FKKT) ter industrijo (Lek d.d.)

- V koraku z industrijsko problematiko in vizijo:
 - ✓ dodana vrednost pedagoškega procesa.
- Znanstveni pristop in teoretično ozadje:
 - ✓ boljše razumevanje zaključnih procesov.



Namen delavnic preparativne kromatografije je teoretični in praktični prikaz ločevanja s HPLC kromatografijo s poudarkom na industrijsko pomembnih sistemih

Zato so delavnice sestavljene iz predavanj na katerih se seznanimo s kromatografsko teorijo in praktičnega dela, kjer eksperimentalne rezultate analiziramo in na osnovi rezultatov načrtujemo nadaljnje eksperimente.

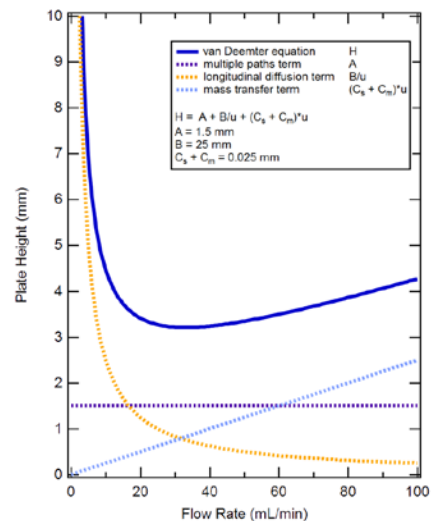
Tekom predavanj si odgovorimo na vprašanja:

- kaj je kromatografija in kaj omogoča;
- katere vrste kromatografije poznamo;
- katere kromatografske metode uporabljamo;
- kaj je prebojna krivulja, vezna statična in vezna dinamična kapaciteta;
- kako preverjamo učinkovitost kromatografske
- kako delujejo kromatografski detektorji.

V praktičnem delu pa preučimo:

- kakšne so hidrodinamske lastnosti kromatografskih kolon in jih med samo primerjamo;
- kako to vpliva na ločbo pri različnih gradientih in kaj vse lahko iz podatkov pridobimo;
- kakšna je dinamične kapacitete, kako jo lahko določimo in kako nanjo vpliva pretok;
- kdaj je kolona regenerana.

Delavnice omogočajo udeležencem ponovitev in uporabo kromatografske teorije v praksi, izvajalcem pa seznanitev z vsakodnevnimi izzivi industrije.





Razvoj liofilizacijskega cikla na modelni proteinski učinkovini

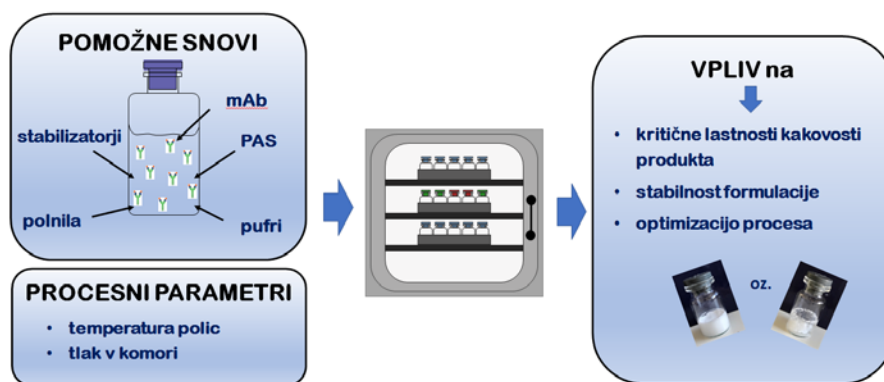
Dr. Pegi Ahlin Grabnar¹, Maja Bjelošević¹,
dr. Odon Planinšek¹, dr. Maja Anko² in dr.
Boris Brus²

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

²Novartis, Razvoj bioloških zdravil Lek

pegi.ahlingrabnar@ffa.uni-lj.si

LIOFILIZACIJA BIOFARMACEVTIKOV



Uvod

Proizvodnja bioloških zdravil je eno najhitreje razvijajočih se področij sodobne farmacevtske znanosti. Zagotavljanje stabilnosti proteinskih molekul je bistvenega pomena, saj neposredno vpliva na varnost, kakovost in učinkovitost zdravila. Zaradi pogoste nezadostne stabilnosti proteinskih molekul v vodni raztopini je sušenje z liofilizacijo metoda izbora pretvorbe v bolj stabilno suho obliko, ki zagotavlja daljši rok uporabe. Liofilizacija je časovno in stroškovno potraten tehnološki proces, ki mora biti zato načrtovan in optimiran. Cilj optimizacije je čim krajši liofilizacijski cikel, ki pa še vedno omogoča nastanek ustreznega produkta, kar pomeni, da ne povzroči nestabilnosti proteinskih molekul in ne vpliva na kritične lastnosti kakovosti produkta (izgled pogače, rekonstitucijski čas, vsebnost vlage). Poleg ustrezno izbranih procesnih parametrov ima pri optimizaciji velik pomen tudi vključitev ustreznih pomožnih snovi v formulacijo.

Metode

Uporabili smo pilotni liofilizator Epsilon 2-6D, Christ, Nemčija. Kritične temperature formulacij smo določevali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in mikroskopijo, ki posnema proces liofilizacije (FDM). Pojavnost polimorfnih oblik polnil smo proučili z rentgensko praškovo difrakcijo (XRPD), prisotnost agregatov pa z dinamičnim sipanjem laserske svetlobe (DLS), pretočno mikroskopijo (MFI) in velikostno izključitveno kromatografijo (SEC).

Rezultati

V prvi fazi projekta smo se ukvarjali z optimizacijo procesa liofilizacije. Z optimizacijo sestave formulacij in procesnih parametrov smo kljub agresivnemu sušenju dosegli ustrezne kritične lastnosti kakovosti produkta in njegovo stabilnost. Čas primarnega sušenja smo na ta način skrajšali za 50 %. V drugi fazi projekta smo proučevali polnilo manitol. Ugotovili smo, da je od masnega deleža manitola v formulaciji in izbire procesnih pogojev liofilizacije odvisna pojavnost polimorfnih oblik manitola v produktu, pri čemer pa njegove nestabilne oblike ne vplivajo na kakovost liofilizata in stabilnost mAb.

Doprinos sodelovanja

V raziskovalno delo smo vključili dodiplomske študente in doktorandko. Z vključitvijo v projekt so študenti pridobili nove kompetence ter se soočili z realnimi problemi v praksi, kar jim bo odprlo nove možnosti na karierni poti. Preko raziskovalnega dela povezujemo tako prostorske (UL FFA, Lek d.d., IJS in KI) kot kadrovske potenciale in prispevamo k povezovanju akademske in gospodarske sfere. Rezultat medsebojnega sodelovanja se kaže v 2 objavljenih člankih, 4 prispevkih na konferencah, 4 zaključenih magistrskih delih, v delu je tudi doktorat.

Reference:

Bjelošević M. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 122, 2018, 292–302
Anko M. et al., Int. J. Pharm., 564, 2019, 106–116

Kaj se zgodi s sertralinom, ko zapusti **človeško telo?**

**Dr. Tina Kosjek, Tjaša Gornik, dr. Jurij
Trontelj in dr. Robert Roškar**

tina.kosjek@ijs.si; tjasa.gornik@ijs.si;

jurij.trontelj@ffa.uni-lj.si;

robert.roskar@ffa.uni-lj.si

Uvod

Sertralin je eden izmed najpogosteje uporabljenih antidepresivov. Po eliminaciji iz človeškega organizma, lahko pa tudi kot posledica nepravilnega odlaganja zdravil ali po čiščenju proizvodnih obratov v farmacevtski industriji, vstopa v odpadne vode. Na čistilnih napravah se deloma razgradi z biomaso, nerazgrajeni delež pa skupaj z metaboliti in produkti mikrobiološke razgradnje vstopi v okolje. V odpadnih in površinskih vodah je prisoten v koncentracijskem območju ng/L, v koncentracijah ng/g pa ga najdemo v sedimentih in ribah. V okolju se v največji meri razgradi pod vplivom sončne svetlobe. Fotorazgradnja je bodisi direktna, pri čemer je razpad posledica absorpcije svetlobe, ali indirektna, kjer spojina reagira z drugimi molekulami, ki so bile predhodno vzbujene s svetlobo.

Na Institutu „Jožef Stefan“, v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani, preučujemo prisotnost, kroženje in produkte razgradnje tega antidepresiva v vodnem okolju.

Metodologija

Za merjenje ostankov sertralina v odpadnih in površinskih vodah uporabljamo tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo, po predhodni pripravi vzorcev z ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Razgradnjo sertralina na čistilnih napravah smo posnemali na pretočnih bioreaktorjih z biomaso, pridobljeno iz čistilne naprave. Za prepoznavanje produktov biorazgradnje smo uporabili modificirane standardne teste biorazgradljivosti. Fotorazgradnjo smo posnemali v fotoreaktorju z lučjo, ki emitira svetlobo valovnih dolžin, primerljivih s sončno svetlobo. Vse rezultate, ki smo jih pridobili v laboratoriju s simulacijo pogojev v naravi, smo potem preverili na dejanskih vzorcih površinskih oziroma odpadnih vod.

Rezultati

V slovenskih površinskih vodah smo sertralin izmerili v koncentracijah do 9.3 ng/L, v odpadnih vodah pa v območju med 23 in 549 ng/L.

Ugotovili smo, da fotorazgradnja sertralina v vodnem okolju poteka po kinetiki psevdo-prvega reda, pri čemer se spojina v največji meri razgradi z direktno fotolizo, medtem ko reaktivne zvrsti še dodatno pospešijo razgradnjo. Od petih produktov razgradnje, ki smo jih identificirali tekom fotorazgradnje, smo tri tudi potrdili v slovenskih površinskih vodah.

Slovenske čistilne naprave so odstranile 77-81 % sertralina, naši poskusi na pretočnih bioreaktorjih v laboratoriju pa so pokazali 94 % odstranitve, pri čemer glavni proces odstranitve predstavlja adsorpcija na biomaso. Z mikrobiološko razgradnjo nastane vsaj deset produktov biorazgradnje, od katerih smo jih osem potrdili v okolju.

Z našo analizno metodo lahko merimo ostanke sertralina v vodnem okolju do spodnje meje določitve 0.4 ng/L za sertralin, in pri 0.4 - 1 ng/L za tiste metabolite in produkte razgradnje, katerih referenčni standardi so komercialno dostopni in smo jih tako lahko izmerili. Naša metoda je sicer zelo zahtevna z vidika izvedljivosti, pa tudi dolgotrajna, zato veliko truda vlagamo tudi v razvoj enostavnejših alternativ.

Zahvala

Za finančno podporo pri naših raziskavah se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (J1-6744: "Razvoj polimerov z molekularnimi odtisi in njihova uporaba na področju okoljske in bio-analitike" in P1-0143: "Kroženje snovi v okolju, snovna bilanca in modeliranje okoljskih procesov ter ocena tveganja").

Reference:

Gornik et al., Determination and photodegradation of sertraline residues in aqueous environment, Environmental pollution, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113431>

Mehanistično fizikalno– kemijsko modeliranje kot orodje za poglobitev razumevanja, napovedovanje in izboljševanje v (bio)farmaceutskih raziskavah, razvoju in proizvodnji

Dr. Blaž Likozar¹, dr. Zdenko Časar², dr. Simon Caserman¹, dr. Pavel Drnovšek², Vivian Erklavec Zajec¹, Matic Grom¹, dr. Mirijam Kozorog¹, dr. Andrej Pohar¹, dr. Gaj Stavber², dr. Dušan Teslić², dr. Drago Kuzman², dr. Boštjan Japelj², dr. Baifan Wang¹, dr. Tine Porenta², dr. Miha Kastelic^{1,2}, Monika Svetina², Blaž Robnik², dr. Ljerka Lah², Matjaž Brinc², Tijana Stanić Ljubin², dr. Kristina Gruden³, dr. Špela Baebler³, dr. Tjaša Stare³, Lara Bezjak¹ in dr. Marko Trampuž¹

¹ Kemijski inštitut

² Lek d.d.

³ Nacionalni inštitut za Biologijo

blaz.likozar@ki.si

Mehanistično modeliranje

Mehanistično modeliranje postaja vedno pomembnejše orodje pri razvoju, optimizaciji in kontroli procesov v farmacevtski, biotehnoški in prehrabeni industriji. V preteklih letih smo s pristopom fizikalno-kemijskega modeliranja uspešno sodelovali pri razvoju in proizvodnji številnih sinteznih kemijskih procesov, bioprosesov in zaključnih procesov (bio)farmacevtskih učinkovin.

Sinteza in kristalizacija nizkomolekularnih učinkovin

Z mehanističnim modeliranjem večstopenjske sinteze učinkovine in stranskih reakcij smo ob upoštevanju kemijske kinetike posameznih vzporednih in zaporednih reakcijskih korakov optimizirali proces za doseg visoke konverzije. Pokazali pa smo tudi, da je potrebno upoštevati kompromis med izkoristkom in produktivnostjo [1]. S podobnim pristopom smo obravnavali tudi kompleksno heterogeno reakcijo za pripravo ključnega intermediata učinkovine, kjer smo pokazali, da hitrost procesa določata topnost učinkovine in kinetika pretvorbe, ki pa sta oba močno odvisna od temperature reakcije [2]. Velik poudarek je bil posvečen študijam šaržne kristalizacije, kjer smo z večnivojskim modeliranjem optimizirali kristalizacijo učinkovine od laboratorijskega do industrijskega nivoja [3]. Pokazali pa smo tudi, da je s pomočjo modeliranja in naprednih procesno-analiznih tehnologij mogoče predvideti končne lastnosti produkta kristalizacije pri najrazličnejših pogojih obratovanja kot tudi pri kompleksnejših procesih, kot je temperaturno kroženje [4]. Trenutno delo na področju modeliranja kristalizacij se osredotoča na kristalizacijo z dodatkom protitopila, napredno več ciljno modelno optimizacijo procesa ter kontinuirno kristalizacijo.

Glikozilacija in izolacija bioloških učinkovin

Z mehanističnim modeliranjem opisujemo metabolne poti CHO celic, z namenom optimizacije bioprosesa [5]. Metabolizem sesalskih celic CHO je sestavljen iz različnih procesov, ki jih opišemo s 135 mikroreakcijami. Omenjene bioreakcije sledijo splošni Michaelis-Menten kinetiki, preko katere dobimo časovno odvisnost koncentracij hranil in določenih aminokislin. Sistem obravnavamo kot »črna skrinjica« (ang. black box), kar pomeni, da opisujemo le merjene metabolite in ne intermediatov v celici.

Proces je sklopljen z glikozilacijskimi stopnjami s katerimi pridobimo informacije o končnih produktih.

Z vpeljavo transkriptomskih podatkov v model smo želeli izboljšati natančnost modela, saj količina transkriptov v celici določa število aktivnih encimov, kar posledično vpliva na hitrost reakcij in s tem na metabolizem.

Reference:

- [1] Grom et. al. (2016), Chem. Eng. J., 283, 703-716; [2] Trampuž et. al. (2019), Chem. Eng. J., 374, 924-936; [3] Pohar et. al. (2014) Ind. Eng. Chem. Res., 53(26), 10762-10774; [4] Trampuž et. al. (2019) Chem. Eng. Sci., 201, 97-111; [5] Grom et. al. (2018), J. Chromatogr. B, 1083, 44-56. [6] Kastelic et. al. (2019) Biochem. Eng. J. 142, 124-134.