

Osnovni podatki glede financiranja

Partnerji:	COBIK, FKKT, LEK
Obdobje:	1.3.2016 – 28.2.2019 (3 leta)
Vrednost:	133 000 EUR/letno (FTE: 1.45) <ul style="list-style-type: none">• 100 000 EUR ARRS• 33 333 EUR LEK

Sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

26055	Dr.	Hribar Gorazd	Biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec	2016- 2019
30700	Dr.	Hudej Rosana	Biotehnologija / Bioinženirstvo	Raziskovalec	2018- 2019
33406	Dr.	Janež Nikolaja	Biotehnologija / Bioinženirstvo	Raziskovalec	2016- 2019
34586	Dr.	Jeromel Luka		Raziskovalec	2017- 2019
16171	Dr.	Jevševar Simona	Biotehnologija	Raziskovalec	2016- 2019
30674	Dr.	Kunstelj Menči	Farmacija	Raziskovalec	2016- 2019
39257		Lukan Tanja		Tehnik	2017- 2019
27882	Dr.	Lukšič Miha	Kemija / Fizikalna kemija	Raziskovalec	2016- 2019
16327	Dr.	Peterka Matjaž	Biotehnologija / Bioinženirstvo	Raziskovalec	2016- 2019
12728	Dr.	Podgornik Aleš	Kemijsko inženirstvo / Separacijski procesi	Vodja	2016- 2019
20681	Dr.	Podobnik Barbara	Farmacija	Raziskovalec	2016- 2019
35857		Prašnikar Edo	Kemijsko inženirstvo	Raziskovalec	2016- 2017
30336	Dr.	Šarac Bojan	Kemija / Fizikalna kemija	Raziskovalec	2016- 2019
39357		Trnovec Helena	Farmacija	Raziskovalec	2017- 2019
37945		Tušar Jasmina	Biotehnologija	Raziskovalec	2016- 2019
36120		Zaletel Eva	Biotehnologija	Raziskovalec	2017- 2019

Faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta

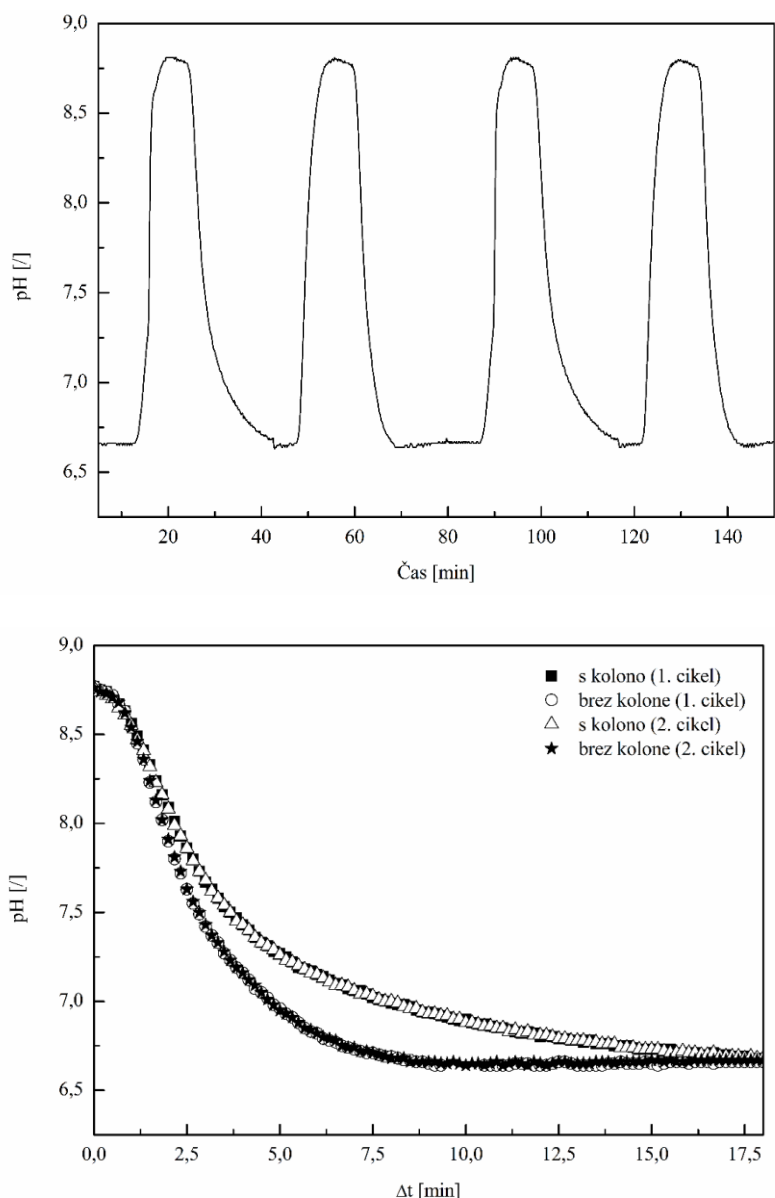
Projekt je potekal v skladu s projektnim planom tekom katerega smo dosegli zastavljene cilje. Vzpodbudni rezultati dajejo dober obet za uporabo razvitih metod v praksi, kar pa je, še posebej v farmacevtski industriji, dolgotrajen proces zaradi številnih regulatornih zahtev. Uspeli smo pripraviti dokaj preprost kontinuirni kromatografski sistem, pa tudi kromatografske kolone, ki so vsebovale šibke in močne ionsko izmenjevalne skupine in jih okarakterizirati. Prav tako smo uspeli pripraviti monolitne nosilce, ki so vsebovali šibke in močne ionsko izmenjevalne skupine s posebnim načinom grafitiranja. Zaradi kompleksnosti razvitega sistema in nosilcev smo tudi razvili ustrezne matematične modele, ki omogočajo za poljuben sistem pufra in aktivnih skupin stacionarne faze določitev pH prehoda kot tudi padca tlaka glede na strukturo nosilca in adsorpcijo molekul na površino pretočnih por. Tekom načrta projekta smo si zastavili štiri glavne cilje, čemur je sledila tudi struktura projekta in sicer:

- Postavitev cikličnega kontinuirnega kromatografskega sistema
- Razvoj delčnih kromatografskih kolon, ki bodo vsebovale šibke in močne IEX skupine.
- Razvoj grafitiranih monolitnih nosilcev s šibkimi in močnimi IEX skupinami.

- Razvoj procesa izolacije MAbs na osnovi kontinuirne kromatografije in inducirane pH gradienta.

Postavitev cikličnega kontinuirnega kromatografskega sistema.

Sistem smo razvili na kromatografskem sistemu Akta tako, da smo razvili algoritem preklapljanja ventilov preko dveh kromatografskih kolon. Izkazalo se je, da je ključnega pomena za enakomerno delovanje kromatografskih kolon, enakost njihovih lastnosti, katere smo lahko zasledovali s stalnim merjenjem padca tlaka na kromatografskih nosilcih. Zato smo podrobno preučili dejavnike, ki na padec tlaka vplivajo, kar je bilo tudi objavljeno v dveh člankih [1,2], predstavljeno na mednarodni konferenci [3], v okviru tega sklopa pa je bilo pripravljeno tudi diplomsko delo [4]. Pridobljeno znanje je omogočilo robustno delovanje razvitega kromatografskega sistema. Robustnost smo preverili tako pri raziskovalnih kot tudi pri industrijskem partnerju, primer delovanja samega sistema pa je predstavljen na spodnji sliki.



Slika 1: Primer sledenju pH vrednosti in posledično pH prehodu na kontinuirnem kromatografskem sistemu dveh kolon, pri čemer primerjamo razliko v pH prehodu v primeru, ko na sistemu ni bilo kolone in s priklopljeno kolono. Ciklično ponavljanje je prikazano na gornji sliki, podrobnosti pa na spodnji. Vidimo popolno prekrivanje med prvim in drugim ciklom, kar potrjuje robustno delovanje sistema.

Ocenjujem, da je bil ta cilj uresničen 100%, saj smo uspeli razviti sistem in ga tudi implementirali na različnih lokacijah. Kot stranski dosežek lahko v okviru tega cilja in sodelave štejejo tudi pobudo in realizacijo delavnice Preparativne kromatografije, ki smo jih na FKKT izvedli za Lek d.d.

[1] PODGORNİK, Aleš. Pressure drop in liquid chromatography. *Journal of separation science*, ISSN 1615-9306, 2018, vol. , iss. , str. 1-17, ilustr. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201800882>, doi: [10.1002/jssc.201800882](https://doi.org/10.1002/jssc.201800882). [COBISS.SI-ID [1538056387](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1538056387)]

[2] ANDREJČIČ, Miha, PODGORNİK, Aleš. Effect of pressure drop model implemented for description of pressure drop on chromatographic monolith on estimated adsorbed layer thickness. *Chemical Engineering Science*, ISSN 0009-2509. [Print ed.], Apr. 2017, vol. 161, str. 370-381, ilustr. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250916306637>, doi: [10.1016/j.ces.2016.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.12.011). [COBISS.SI-ID [1537331651](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1537331651)]

[3] PODGORNİK, Aleš. Estimation of structural and chromatographic properties from a pressure drop data : [plenary lecture]. V: *SBCN 2018*. [S. l.: s. n. 2018], f. 28. [COBISS.SI-ID [1538109635](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1538109635)]

[4] HALAS, Janez. *Padec tlaka na poroznih nosilcih : diplomsko delo : univerzitetni študijski program 1. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [J. Halas], 2018. 28 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537978307](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1537978307)]

Razvoj delčnih kromatografskih kolon, ki bodo vsebovale šibke in močne IEX skupine

Okviru tega sklopa smo testirali različne tržno dostopne kromatografske nosilce, predvsem njihove kromatografske lastnosti. Eden izmed ključnih izzivov je bil karakterizacija kolon pripravljenih iz dveh nosilcev z različnimi skupinami. Samo homogenost smo lahko v grobem ugotavljali vizualno, za natančno kromatografsko karakterizacijo, ki bi jo bilo mogoče uporabiti tudi v industriji, pa smo poleg pulzne motnje razvili metodo na osnovi prehodnega pH prehoda, ki smo jo posplošili na poljuben sistem pufrov in funkcionalnih skupin na nosilcih, kar je bilo tudi opisano v magistrskem delu in diplomskem delu [5,6] poleg tega pa smo natančno preučili vpliv pufrov oziroma soli na površinske lastnosti govejega serumskega albumina, kar smo tudi predstavili v članku [7] in omogoča razumevanje samega procesa vezave na specifične skupine, kar je še posebej pomembno v primeru prisotnosti različnih skupin znotraj iste kromatografske kolone.

Ocenjujem, da je bil ta cilj uresničen 95%, saj smo testirali precej različnih nosilcev, razvili metode njihove karakterizacije, vendar pa se je izkazalo, da je na voljo relativno malo ustreznih nosilcev, ki ustrezajo zahtevanim pogojem, zaradi česar bi bilo pred industrijsko aplikacijo smiselno nadaljevati s pregledom novih tržnih nosilcev, ki se stalno pojavljajo, in jih ovrednotiti po metodologiji razviti tekom projekta.

[5] ANDREJČIČ, Miha. *pH-prehodi in debelina adsorpcije na monolitnih kromatografskih nosilcih : magistrsko delo*. Ljubljana: [M. Andrejčič], 2018. 69 f., [17] f. pril., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537818051](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1537818051)]

[6] PELC, Tin. *Adsorpcija bioloških makromolekul na površine : diplomsko delo : univerzitetni študijski program 1. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [T. Pelc], 2018. 29 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537889219](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1537889219)]

[7] JANC, Tadeja, VLACHY, Vojko, LUKŠIČ, Miha. Calorimetric studies of interactions between low molecular weight salts and bovine serum albumin in water at pH values below and above the isoionic point. *Journal of molecular liquids*, ISSN 0167-7322. [Print ed.], Nov. 2018, vol. 270, str. 74-80, ilustr. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732217338825>, doi: [10.1016/j.molliq.2017.10.105](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.105). [COBISS.SI-ID [1537861315](https://www.cobiss.si/urn:nbn:si:zb:1-1537861315)]

Razvoj grafitiranih monolitnih nosilcev s šibkimi in močnimi IEX skupinami

Tekom tega sklopa smo razvili monolitne nosilce različnih mikrostruktur, pa tudi različnih funkcionalnih skupin, saj gre za novo področje. Pri tem so nas zanimale tako njihove površinske kot hidrodinamske lastnosti. Poleg običajnih struktur, značilnih za metakrilatne monolite, smo uspeli pripraviti tudi različne pretočne monolite s t.i. pHIPE strukturo z različnimi funkcionalnimi skupinami, vključno z mešanimi funkcionalnimi skupinami, v okviru česar je bilo tudi zaključenih več diplomskih [8,9] in magistrskih del [10-13], člankov pa zaradi morebitnega industrijske aplikacije na tem področju še nismo objavljali, pač pa smo objavili članka razlik v kromatografskih lastnostih, ki izhajajo iz različnih struktur [14], pa tudi kako adsorpcija molekul vpliva na padec tlaka [15], kar je bilo tudi predstavljeno v obliki vabljenega predavanja [16]. Ustrezno napovedovanje spreminjanje padca tlaka

med nalaganjem, kot tudi pri morebitni uporabi nosilcev različnih struktur, je namreč pomembno za robustno delovanje kontinuirnega kromatografskega sistema (glej prvi sklop).

Ocenjujem, da je bil ta cilj uresničen 100%, saj smo uspeli razviti precej različnih monolitnih nosilcev, z različnimi mikrostrukturami, ki dosedaj še niso bile testirane pod pretočnimi pogoji. Prav tako je uspelo pripraviti različne funkcionalne skupine na istem nosilcu in jih okarakterizirati. Kot že omenjeno večino rezultatov še ni objavljeno zaradi morebitne aplikacije v praksi.

[8] VALENČAK, Jasmina. *Graftiranje poroznih metakrilatnih nosilcev : diplomsko delo*. Ljubljana: [J. Valenčak], 2016. XII, 48 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537207491](#)]

[9] BIZJAK, Ožbej. *PoliHIPE : diplomsko delo : univerzitetni študijski program 1. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [O. Bizjak], 2018. 24 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537897923](#)]

[10] PUCIHAR, Urh. *Funkcionalizacija kromatografskih nosilcev z ionsko izmenjevalnimi skupinami : magistrsko delo : magistrski študijski program 2. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [U. Pucihar], 2018. 45 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537893059](#)]

[11] MRAVLJAK, Rok. *Priprava, funkcionalizacija in karakterizacija GMA/EGDMA kopolimera iz emulzije z visoko vsebnostjo dispergirane faze : magistrsko delo : magistrski študijski program 2. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [R. Mravljak], 2018. XVII f., 79 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537914307](#)]

[12] LUKAN, Tanja. *Vpliv poroznosti in por konvektivnih nosilcev na hidrodinamske lastnosti : magistrsko delo : magistrski študijski program 2. stopnje Kemijsko inženirstvo*. Ljubljana: [T. Lukan], 2018. 60 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1538100931](#)]

[13] FORTIN, Janja. *Priprava in karakterizacija pretočnih poliHIPE polimerov : magistrsko delo*. Ljubljana: [J. Fortin], 2017. XI f., 44 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [1537646787](#)]

[14] PODGORNIK, Aleš, HAMACHI, Masataka, ISAKARI, Yu, YOSHIMOTO, Noriko, YAMAMOTO, Shuichi. Effect of pore size on performance of monolithic tube chromatography of large biomolecules. *Electrophoresis*, ISSN 0173-0835, 2017, vol. 38, iss. 22/23, str. 2892-2899, ilustr. [COBISS.SI-ID [1537742531](#)]

[15] PODGORNIK, Aleš, ETZEL, Mark Raymond. Adsorbed layer thickness determination for convective-based media from pressure drop data. *Analytical chemistry*, ISSN 0003-2700. [Print ed.], 2018, vol. 90, iss. 8, str. 4992-4998, ilustr. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b04156>, doi: [10.1021/acs.analchem.7b04156](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04156). [COBISS.SI-ID [1537765571](#)]

[16] PODGORNIK, Aleš. Analysis of adsorption phenomena and matrix based on pressure drop data : [lecture]. V: ISPPP 2018. Graz: ACIB. cop. 2018, str. 44. [COBISS.SI-ID [1538108867](#)]

Razvoj procesa izolacije MAbs na osnovi kontinuirne kromatografije in inducirane pH gradienta

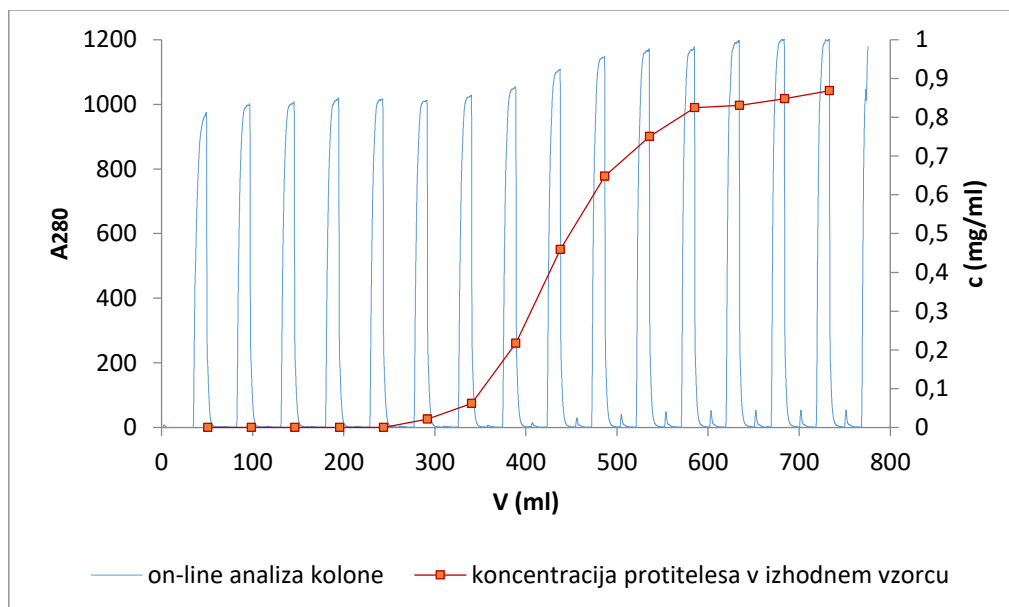
Kromatografske kolone z mešanimi delčnimi nosilci pa tudi z monolitnimi kromatografskimi nosilci smo uporabili na kromatografskem sistemu, ki smo ga razvili v prvem sklopu in ga uporabili za ločevanje izooblik monoklonskih protiteles, v okviru česar je bila tudi opravljena magistrska naloga [17]. Izkazalo pa se je, da zgolj informacija o padcu tlaka ne zadostuje, pač pa potrebujemo tudi informacijo o začetku preboja med nalaganjem vzorca. Zato smo razvili tudi metodo, ki omogoča na istem kromatografskem sistemu izolacijo ciljnega produkta ob sprotni analizi izhoda iz preparativne kolone z uporabo konvektivnih kolon majhnih volumnov, ki omogočajo izredno hitro analizo ob nizkem padcu tlaka in so torej primerne za in-procesno kontrolo ter posledično PAT. Rezultate smo predstavili na več mednarodnih konferencah v obliki predavanj [18-20]. Rezultati samega delovanja sistema pa so povzeti v članku, ki je poslan v objavo, opis delovanja, samo delovanje pa je prikazano na spodnjem primeru.

Sledenje koncentracije protitelesa iz žetve na osnovi sprotne kromatografske analize s konvektivnimi kolonami

Realni vzorec, kot je žetev z željenim produktom, vsebujejo poleg produkta tudi druge molekule z različnimi fizikalno kemijskimi lastnostmi, kot je naboj, velikost, polarnost, afiniteta... Zaradi različne sestave se na preparativno kolono ne vežejo vse molekule in posledično zaznamo na iztoku kolone, nasičen signal absorbance (UV) že v začetnih fazah nalaganja vzorca, kljub temu, da željenega produkta še ni v iztoku, saj kolona še ni nasičena. Problem je torej določiti, kdaj je kolona nasičena z željenim produktom, oziroma kdaj ga lahko zaznamo na iztoku. Zato je potrebno ročno jemanje vzorcev iztoka in analiza na ločenem sistemu, kar je časovno potratno. To je še posebej pomembno v industriji, kjer zaradi tega lahko prihaja do izgube produkta.

Razvit sistem za sledenje omogoča kontinuirno nalaganje vzorca na preparativno kolono in sočasno analizo iztoka na analitski koloni ter posledično določitev prebojne krivulje željenega produkta na istem

kromatografskem sistemu. Prednost takega sistema je avtomatizacija, velika natančnost, saj lahko glede na potrebe prilagodimo število analiz na časovno enoto kot tudi količino injiciranega vzorca na analizno kolono, kar pripomore k izboljšanju meje detekcije. Sistem je primeren tudi na kasnejše faze čiščenja vzorca, npr. pri vzorcih monoklonskih protiteles z agregati, kjer je cilj doseči čim nižje koncentracije agregatov v končnem produktu. Pri prilagojenem sistemu za kromatografijo, so izgube vzorca veliko manjše, kot tudi časovno manj potratne.



Slika 2: Na grafu lahko vidimo primer nalaganja vzorca žetve s protitelesom. Z modro je prikazan signal UV detektorja, kjer avtomatsko preklapljamo signal med preparativno in analitsko kolono v odvisnosti od pretečenega volumna na analitski koloni. Z rdečo pa je prikazana koncentracija produkta (protitelesa), ki smo jo določili z integriranjem vrhov na analitski koloni (afinitetna s proteinom A).

Ocenjujem, da je bil ta cilj uresničen 90%. Kljub uspešnemu razvoju sistema in ustreznih kromatografskih kolon nismo uspeli doseči zadovoljive ločbe, kar sicer do sedaj tudi še ni bilo realizirano v svetovnem merilu. Po drugi strani pa smo uspeli razviti novo metodo spremljanja tovrstnega procesa, kar predstavlja prednost pri sledenju procesa. Z aktivnostmi razvoja kromatografskih metod, ki bi omogočile boljšo ločbo izooblik monoklonskih protiteles nadaljujemo skupaj z industrijskim partnerjem tudi po zaključku projekta.

[17] ŠEDIVY, Maja. *Ločevanje izooblik monoklonskih protiteles z induciranim prehodom pH : magistrsko delo = Separation of monoclonal antibody isoforms with induced pH gradients : M. Sc. thesis*, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrsko delo magistrskega študija - 2. stopnja Biotehnologija, 125). Ljubljana: [M. Šedivy], 2017. XI, 68 f., [2] f. pril., ilustr. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=99153>. [COBISS.SI-ID 8894329]

[18] PODGORNIK, Aleš. Downstream processing and PAT via chromatographic monoliths : [plenary lecture]. V: *Abstracts, First Congress BioProcess Cuba 2017, Camagüey, February 20-24, 2017*. [S. l.: s. n. 2017], str. 58. [COBISS.SI-ID 1537740483]

[19] PETERKA, Matjaž, NABERGOJ, Dominik, JANEŽ, Nikolaja, HABERL MEGLIČ, Saša, MIKLAVČIČ, Damijan, PODGORNIK, Aleš. Kontinuirana proizvodnja velikih bioloških molekul je učinkovita, vendar tehnološko zahtevna : [vabljeni predavanja]. V: VODOVNIK, Maša (ur.), KUŠAR, Darja (ur.), MARINŠEK-LOGAR, Romana (ur.). *Knjiga povzetkov*, 7. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 20.-22. september 2017, Bled, Slovenija. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo. 2017, str. 35. [COBISS.SI-ID 1537732291]

[20] PODGORNIK, Aleš, AMBROŽIČ, Rok, MODIC, Petra, UDOVIČ, Eva. Implementation of chromatography in PAT : [lecture]. V: *BSSS2018*. [S. l.: s. n. 2018], str. [4]. [COBISS.SI-ID 1538108099]

PODGORNIK, Aleš. PAT by high speed chromatography : [lecture]. V: *BSSS2016*. [S. l.: s. n. 2016], str. 5. [COBISS.SI-ID 1537333699]

Pri tem je potrebno poudariti, da je bil objavljen le del rezultatov, ki so bili pridobljeni tekom projekta, saj gre za aplikativni projekt z znatnim potencialom za industrijskega partnerja, zato določeni rezultati lahko predstavljajo

intelektualno lastnino o čemer se še odločamo. Glede na doseženo lahko zaključimo, da je projekt potekal po načrtu in smo uspeli realizirati vse zastavljene cilje, poleg tega pa smo izvedli še nekatere aktivnosti, ki sprva niso bile načrtovane, so pa neposredna posledica sodelave na projektu - predvsem gre tu za izvedbo delavnic za industrijskega partnerja in razvoj nekaterih metod sledenja, kar sprva ni bilo načrtovano. Projekt je tudi vzbudil dodatne sodelave med industrijo in raziskovalnimi inštitucijami, kar presega ozke cilje projekta in se razvija v dolgoročno sodelovanje.