


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. C3330-19-952016
Operacija (e-MA št.):	OP20.04326
Naziv operacije:	Strukturna karakterizacija proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah
Obdobje izvajanja (od do):	1. 4. 2019 - 31. 3. 2022
Ime in priimek raziskovalca(ke)	dr. Aljoša Bolje
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 projektu

S 1. aprilom 2019 smo pričeli z delom na projektu »Strukturna karakterizacija proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah«. Raziskovalec dr. Aljoša Bolje se je zaposlil na Fakulteti za farmacijo (FFA), Univerza v Ljubljani. Raziskovalno delo bo opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca. Kot gospodarski subjekt bo pri raziskovalnem projektu sodelovala družba Lek d.d.. Predvidoma zadnje leto raziskav bo opravljeno v gospodarskem subjektu (cca. 2000 ur). V začetni fazi projekta smo obsežno pregledali literaturo potrebno za raziskovalno delo na tematiki projekta. Kot smo že ob prijavi na razpisu uspeli ugotoviti, je kljub relativno velikem številu publikacij povezanih s tematiko projekta številčno malo le-teh povezanih z zasledovanjem strukture in same stabilnosti proteinov v trdnem. Iz tega sledi, da strukturna karakterizacija proteinov v trdnem ni toliko preučena. V začetnem obdobju projekta smo tudi opravili uvodni sestanek z družbo Lek d.d., kjer smo sestavili kratkoročni plan raziskav. Hkrati smo skupaj razdelali posamezne analitske metode in se dogovorili v sodelovanju s kom bomo dotične analize opravili. Tako smo se za nekatere metode zaradi lažje in učinkovitejše izvedbe odločili, da jih bomo opravili v sodelovanje z drugimi ustanovami (Inštitut Jožef Stefan, Kemijski inštitut, Biotehniška fakulteta). Raziskovalna skupina prof. Gobca, kot tudi družba Lek d.d. redno sodelujeta z njimi. V začetni fazi projekta je bila ključnega pomena učinkovita priprava

dovoljne količine ustreznih trdnih vzorcev (liofilizatov) za pričetek analitskega dela raziskav oziroma vrednotenja z izbranimi analitskimi metodami (projektna prijava, delovni paket DP1, naloga N1A). Prvo serijo vzorcev smo prejeli s strani Lek-a, medtem ko smo drugo serijo pripravili oziroma izpostavili stresnim pogojem na FFA. Vzorci kot učinkovino vsebujejo monoklonsko protitelo 1 (mAb1). Te vzorce smo izbrali kot modelne substrate. Z analizo vzorcev obeh serij smo lahko pričeli nekoliko prej (projektna prijava, delovni paket DP2, naloga N2A) in kot prve analitske tehnike uporabili FTIR (fourier-transformed infrardeča spektroskopija), UV-vis (v trdnem) in pa XRD (praškovna rentgenska difrakcija). Medtem, ko smo FTIR analize opravili na FFA, smo UV-vis in XRD analize opravili v sodelovanju z Inštitutom Jožef Štefan (IJS), na raziskovalnem odseku K9. V nadaljevanju smo vzorce pomerili tudi s Fluorescenčno spektroskopijo (v trdnem) in pa ssNMR (Nuklearna magnetna resonanca v trdnem). Fluorescenco smo merili v sodelovanju z IJS (K9), ssNMR pa s Kemijskim inštitutom (skupina dr. Gregor Mali). Za vse vzorce se je izkazalo, da je uporabljena formulacija izredno stabilna. Tudi vzorci, ki so bili podvrženi nekoliko intenzivnejšim pogojem, kot denimo izpostavljenost visoki temperaturi za daljše časovno obdobje, so bili strukturno gledano v trdnem intaktni. V nadaljevanju smo se odločili uporabiti drugo učinkovino oziroma monoklonsko protitelo 2 (mAb2) kot tudi druge formulacije ter dva različna liofilizacijska cikla (projektna prijava, delovni paket DP1, naloga N1B). Tokrat se je po opravljenih analizah v spektrih že videla razlika med formulacijami oziroma vzorci, ki so nekoliko bolj obstojni in tistimi, kjer je prisotnost nativne strukture proteina manjša. Zasedili smo izginjanje značilnih signalov, kar nakazuje na manjšo vsebnost terciarne kot tudi sekundarne strukture proteina. Pri vseh opravljenih analizah smo poleg proteinskih vzorcev posneli tudi vzorce brez proteina, tako imenovane placebo vzorce. Vzorci vsebujejo vse elemente razen proteinske učinkovine. Analize teh vzorcev so nam služile za primerjavo in tudi kontrolo meritve. V zadnjem mesecu projektnih raziskav leta 2019 smo pričeli z meritvami Ramanske spektroskopije, vendar smo pričeli zgolj z raziskavami pogojev, ki bi lahko bili ustrezni za meritve tovrstnih vzorcev. Poleg omenjene Ramanske spektroskopije bomo v začetku leta 2020 pričeli tudi z meritvami Cirkularnega dihroizma (CD), Diferenčne kalorimetrije (DSC) in Bližnje infrardeče spektroskopije (NIR). Medtem ko bomo DSC meritve opravili na FFA in na Biotehniški fakulteti (BF), na Odseku za živilstvo, Katedri za biokemijo in kemijo živil, bomo NIR meritve izvajala na IJS (odsek K9). CD analize bomo opravljali v sodelovanju z BF (Katedra za biokemijo in kemijo živil), Ramansko spektroskopijo pa bomo merili na IJS (odsek K9). Poleg raziskovanja smo opravili tudi predstavitev projekta na Lek d.d. v okviru optimizacijskega sestanka za DSB in DPB in na seminarju na FFA, v raziskovalni skupini prof. Gobca. Novice o projektnih raziskavah smo predstavili tudi preko predavanja na noči raziskovalcev 2019 in dveh znanstvenih ekspresov (september in oktober 2019). Pričeli smo tudi z delom na publikacijah, saj smo zbirali primerno literaturo za pomoč pri pisanju samih člankov. Pregledni članek na tematiko projekta je v pripravi (predviden zaključek v letu 2020).

Raziskave v letu 2020 smo pričeli z meritvami Ramanske spektroskopije, Cirkularnega dihroizma (CD), Diferenčne kalorimetrije (DSC) in Bližnje infrardeče spektroskopije (NIR) (projektna prijava, delovni paket DP2, naloga N2A). Medtem ko smo DSC meritve opravili na FFA in na Biotehniški fakulteti (BF), na Odseku za živilstvo, Katedri za biokemijo in kemijo živil, smo NIR meritve izvajali na Inštitutu Jožef Štefan (IJS) na Odseku za napredne materiale (K9). Ramansko spektroskopijo smo izvajali z zelenim laserjem, ki se je izkazal kot primerna izbira za naše vzorce. Meritve smo opravili z vzorci protitelesa mAb2, medtem ko bomo vzorce z učinkovino mAb1 analizirali kasneje. Meritve Cirkularnega dihroizma smo izvajali v obeh območjih, bližnji in daljni UV ter tudi v načinu v odvisnosti od temperature. Raziskali smo lastnosti vzorcev mAb1 in tudi mAb2. Meritve DSC smo izvedli tako v trdnem kot tudi v raztopini. Meritve DSC v raztopini nam bomo v pomoč kot komplementarne meritvam temperaturno odvisnega CD. Odločili smo se raziskati vse do sedaj pripravljene vzorce. Meritve nekaterih vzorcev so še v teku. Pričeli smo tudi z meritvami NIR, vendar smo uspeli posneti zgolj testne vzorce (prekinitev meritev zaradi ukrepov za zajezitev pandemije). Meritve bomo nadaljevali konec leta 2020. Poleg tega smo uspešno nadaljevali meritve Fluorescence, Infrardeče in Uv-vis spektroskopije ter Nuklearne magnetne resonance v trdnem in pa Rentgenske difrakcijske analize. Meritve smo opravili z vzorci monoklonskega protitelesa 1 in pa z novimi vzorci protitelesa 2, t.j. vzorci, ki smo jih pred tem inkubirali 3 mesece na 40°C. Rezultati so pokazali, da so vzorci z učinkovino mAb1 relativno dobro stabilni in se jim struktura prične rušiti šele, ko so izpostavljeni višjim temperaturam (nad 70°C). Pri vzorcih z učinkovino mAb2 je bil opazen trend, da so vzorci na stabilnosti 40°C po treh mesecih vsebovali manj sekundarne in terciarne

strukture. Hkrati pa so se izkazali vzorci z večjo vsebnostjo sladkorja kot bolj stabilni na dolgi rok. Ker nas je zanimalo ali se tvorijo proteinski agregati, smo vzorce analizirali tudi s pomočjo kromatografske metode SEC-HPLC, ki ločuje delce glede na velikost (agregati večji kot samo protitelo). Analize smo pričeli izvajati jeseni 2020. Te meritve so tudi že del implementacije samih raziskav strukturne karakterizacije proteinov v Lek d.d. (projektna prijava, delovni paket DP3, naloga N3A). Za razvoj zdravil je namreč ključnega pomena korelacija med strukturo v trdni farmacevtski obliki ter vsebnostjo agregatov protitelesa v raztopini po rekombinaciji. Implementacijo smo tako pričeli nekoliko prej, kot smo to načrtovali in bomo z njo nadaljevali konec leta 2020 in dalje. Kot komplementarno metodo SEC-HPLC bomo uporabili tudi Dinamično sipanje svetlobe (Dynamic light scattering, DLS). Te analize bomo izvajali na biotehniški fakulteti v Ljubljani (predviden pričetek konec leta 2020). Poleg tega smo pripravili nove vzorce z učinkovino mAb2, ki bodo na stabilnosti 40°C 9 mesecev. Priprava teh vzorcev bo zaključena konec leta 2020 (projektna prijava, delovni paket DP1, naloga N1B).

Poleg raziskovalnega dela smo redno izvajali tudi diseminacijo rezultatov za zagotavljanja načela splošnega razširjanja raziskovalnih rezultatov in podatkov. Zaključili smo pisanjem in urejanjem preglednega članka in pričeli s pripravo na objavo. Dr. Bolje se je udeležil predstavitev v okviru Lek in Novartis (Maj mesec 2020), kjer je predstavil sam projekt, dosedanje aktivnosti in načrte za prihodnost. Predstavitve so bile uspešne, saj se je Lek odločil dodatno finančno podpreti projekt in s tem omogočiti izvedbo nekaterih raziskav. Aljoša Bole se je aktivno udeležil simpozija EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session 2020, ki je letos potekal preko spleta. Poleg tega je izvedel predavanje na dogodku »Značaj znanosti« (Hiša eksperimentov, januar 2020), predavanje na dogodku »Dan spolov« (Hiša eksperimentov, marec 2020), obisk vrta v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Izola, oktober 2020), predavanje na seriji dogodkov » TRD Biologics & CGT PostDoc Lecture (Novartis, november 2020) in pa predavanje v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Slovenj Gradec, november 2020) in se aktivno udeležil na dogodku Znanstveni ekspres v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Ljubljana, november 2020). Napredek projektnih raziskav je proti koncu leta 2020 Dr. Aljoša Bolje predstavil še na NT odboru (Lek-Novartis).

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.