


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) Predstavitev raziskovalnega projekta (izvedba)

V sodelovanju z družbo Lek d.d. želimo v okviru prijavljenega projekta v skladu s QbD (Quality by Design) metodologijo in modernimi pristopi razviti analitske metode za strukturno karakterizacijo proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah in dobljene rezultate uporabiti za načrtovanje in optimizacijo formulacij proteinskih zdravil. Menimo, da je vplive procesa liofilizacije in različnih formulacij na spremembo kritičnih atributov proteina tekom stabilnostnih študij moč razložiti preko karakterizacije strukture proteina. Sama stabilnost proteinov v trdnem stanju pa je ključnega pomena za zagotavljanje pravilnega delovanja farmacevtikov. Razumevanje te povezave bo vodilo v ekonomično izdelavo končnega zdravila z vgrajeno kvaliteto, ki bo za paciente varno, kakovostno, učinkovito in cenovno dostopno. Slednje je ključnega pomena za razvoj biofarmaceutike oziroma biofarmaceutске proizvodnje, ki predstavlja eno izmed poglobitvenih razvojnih panog družbe Lek, d.d..

PREDSTAVITEV PROBLEMA

Biološka zdravila na osnovi proteinov so se uveljavila kot zelo pomemben razred zdravil za alternativno zdravljenje mnogih bolezni, kot so različna rakava obolenja, avtoimunske bolezni in hormonske motnje. Zaradi kompleksne strukture proteinov in njihove dovzetnosti do agregacije, fragmentacije in kemijskih modifikacij, sta uspešen razvoj in proizvodnja farmacevtskih oblik izredno zahtevna. Za večjo stabilnost se proteine vgrajuje v trdne farmacevtske oblike med katerimi so najpogostejši liofilizati (proces liofilizacija). Vsi stresni dejavniki lahko v kombinaciji z izbranimi pomožnimi snovmi, ki sestavljajo formulacijo, vplivajo na strukturo proteina v raztopini ali v končni trdni farmacevtski obliki. Porušena nativna struktura pa se lahko odraža v nestabilnem končnem izdelku, s tem pa na njegovi kakovosti, varnosti in učinkovitosti.

Razvoj proteinskih zdravil je tako osnovan na stabilnostnih študijah, kjer se kritične lastnosti formulacij s proteini vrednoti z različnimi analitskimi metodami. Nabor formulacij se tekom razvoja oži do izbora najstabilnejše formulacije za dan protein. Kljub temu, da se trdne farmacevtske oblike s proteini v razvoju vrednoti z nekaterimi za trdne oblike specifičnimi metodami, glavnina analitskih metod vrednoti kritične lastnosti formulacije in proteina v raztopini po rekonstituciji. Strukturna karakterizacija proteinov v trdnem stanju je tekom razvoja trdnih farmacevtskih oblik zaenkrat manj uveljavljena. V primeru ustrezno občutljivih metod pa bi lahko ključno vplivala na izbor formulacij in bi jih bilo zato smiselno vključiti v stabilnostne študije. Nativna struktura proteina v rekonstituiranih vzorcih trdnih farmacevtskih oblik takoj po liofilizaciji ali sorodnem procesu priprave trdne farmacevtske oblike namreč ni nujno pokazatelj ustrezne stabilizacije proteina v trdni fazi in kot takšna ne zagotavlja dolgoročne stabilnosti farmacevtske oblike.

S karakterizacijo proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah lahko ovrednotimo tako sekundarno kot terciarno strukturo proteinov tekom razvoja formulacije in v stabilnostne študije vključimo samo relevantne formulacije, ki zagotavljajo nativno strukturo proteina v trdnem stanju takoj po procesu priprave. Taki produkti se smatrajo kot najprimernejši za vstop v stabilnostne študije. Uporaba teh metod lahko usmerja razvoj trdnih farmacevtskih oblik s proteini in zmanjša tveganje izbire neustreznih formulacij za stabilnostne študije kot osnovo za izbiro končne formulacije.

V sodelovanju z družbo Lek d.d. želimo v okviru prijavljenega projekta s skrbno načrtovano in sistematično izvedeno študijo preučiti izbrane analitske metode za strukturalno karakterizacijo proteinov v trdnem in v raztopini, pri čemer bo ključnega pomena tudi priprava ustreznih vzorcev za preučevanje. Najobetavnejše analitske metode nameravamo nato dodatno razviti in jih implementirati v zgodnje faze razvoja trdnih farmacevtskih oblik s proteini. Implementacija teh metod bo dodatno usmerila zgodnji razvoj in zmanjšala tveganje izbire neustreznih formulacij za stabilnostne študije kot osnovo za izbiro končne formulacije.

CILJI PREDLAGANEGA PROJEKTA

Projekt vsebuje tri cilje za zagotavljanje uspešne izvedbe predlaganih raziskav. Prvi cilj projektnih raziskav je priprava zadostnih količin ustreznih trdnih vzorcev za vrednotenje z izbranimi analitskimi metodami. Cilj sestavljata dve nalogi: prva naloga je s procesom liofilizacije in nadalje z izpostavljanjem različnim stresnim pogojem pripraviti vzorce s proteinskimi učinkovinami, druga naloga pa je nadaljevanje priprave vzorcev, kjer bomo spreminjali razmerja in tipe pomožnih snovi v formulacijah in parametre liofilizacijskega procesa, vzorce pa bomo izpostavljali tudi različnim stresnim pogojem.

Drugi cilj raziskav je preučiti izbrane analitske metode za strukturalno karakterizacijo proteinov v trdnem. Za doseg tega cilja bomo pripravljene vzorce sprva analizirali z enostavnejšimi in pogosteje uporabljenimi analitskimi metodami kot so FTIR, UV-Vis spektroskopija, ramanska spektroskopija in cirkularni dihidrozem. Nato se bomo posvetili analizi vzorcev z novejšimi in naprednejšimi tehnikami kot so fluorescenčna spektroskopija, rentgenska difrakcija, ssNMR in v primeru izvedljivosti tudi ssHDX-MS in ssPL-MS. V nadaljevanju se bomo natančneje posvetili tistim analitskim metodam, ki bodo sposobne v

pripravljenih vzorcih zaznati čim manjše spremembe v nativni strukturi proteinov v trdnem in jih poskusili dodatno razviti z namenom uporabe v zgodnjih fazah razvoja trdnih farmacevtskih oblik.

Tretji cilj je prenos in implementacija razvitih analitskih metod za strukturno karakterizacijo proteinov v zgodnje faze razvoja trdnih farmacevtskih oblik s proteini. Implementirane metode strukturne karakterizacije proteinov v trdnem bodo usmerjale tako razvoj procesa priprave kot tudi izbiro formulacij, ki bodo vstopale v začetne stabilnostne študije in stabilnostno študijo za izbiro končne formulacije

METODE DELA

Metodika dela predlaganega projekta je razdeljena v dve enoti: priprava vzorcev in vrednotenje z analitskimi tehnikami.

Vzorci bomo pripravili s procesom liofilizacije. Izbirali bomo različne proteine za pripravo formulacij. Spreminjali bomo razmerja in tipe pomožnih snovi v formulacijah in parametre liofilizacijskega procesa, vzorce pa bomo izpostavljali različnim stresnim pogojem. Med tovrstne spremembe spadajo pH, temperatura, pufer in drugi. Glede na predhodno znanje in izkušnje iz podjetja Lek.d. bomo na ta način pripravili stabilne produkte kot tudi produkte, kjer pričakujemo nestabilen končni izdelek, kar bo predstavljalo čvrsto osnovo za nadaljnje raziskave. Priprava vzorcev bo potekala tako v Lek d.d. kot tudi na Fakulteti za farmacijo, UL.

Pripravljene vzorce bomo nato raziskali z izbranimi analitskimi tehnikami za zasledovanje in krakretizacijo strukture proteinov v trdnem. Med najpogosteje uporabljene analitske metode za strukturno karakterizacijo proteinov v trdnem uvrščamo spektroskopske metode (infrardečo, UV-Vis, fluorescenčno in ramansko spektroskopijo ter NMR v trdnem), cirkularni dihroizem, dinamično diferenčno kalorimetrijo, rentgensko difrakcijsko analizo in novejša metode kot je na primer masna spektroskopija ssHDX-MS (angl. solid state amide hydrogen/deuterium exchange mass spectroscopy). Pomembna bo tudi povezave oziroma korelacija s tvorbo agregatov. Slednje bomo raziskali s pomočjo SEC-HPLC (angl. size-exclusion high-performance liquid chromatography) in pa dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) (angl., dynamic light scattering).

RELEVANTNOST IN POTENCIALNI VPLIV REZULTATOV

Karakterizacija v trdnem stanju je zaenkrat manj uveljavljena in s tem tudi manj razvita. Glavnina analitskih metod vrednoti kritične lastnosti v raztopini, kar pa ni nujno pokazatelj ustrezne stabilizacije proteina v trdni fazi in s tem dolgoročne stabilnosti farmacevtske oblike. S karakterizacijo proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah lahko ovrednotimo tako sekundarno kot terciarno strukturo proteinov tekom razvoja formulacije in v stabilnostne študije vključimo samo formulacije, ki ohranjajo strukturo proteina v trdnem stanju. S predlaganim projektom zelimo raziskati in razviti analitske tehnike za strukturno karakterizacijo proteinov v trdnih farmacevtskih oblikah. Raziskave zelimo dalje razviti in implementirati v začetne faze razvoja zdravil ter s tem dodatno usmeriti zgodnji razvoj in zmanjšati tveganje izbire neustreznih formulacij. Uspešna izvedba predlaganega projekta bo tako vodila do razvoja učinkovitih zdravil na osnovi proteinov, ki bodo za paciente varna, kakovostna in cenovno dosegljiva.

Predlagani projekt bo ob enem pripomogel k še boljšemu sodelovanju med programsko skupino Farmaceutska kemija: načrtovanje, sinteza in vrednotenje učinkovin na Fakulteti za farmacijo, UL, raziskovalcem dr. Aljošo Bolje in družbo Lek d.d.. Sodelovanje bo vodilo v nadaljnja sodelovanja, obenem pa bo dr. Aljoša Bolje vključen v raziskovalni proces v poslovnem okolju družbe Lek d.d., kar mu bo prineslo neprecenljive izkušnje pri načrtovanju karierni poti. Uspešna izvedba projekta bo nedvomno pripomogla k povečanju globalne prepoznavnosti in konkurenčnosti tako družbe Lek d.d., kot tudi države Slovenije.

GLAVNI MEJNIKI PROJEKTA (PATENTI, ČLANKI, KONFERENCE)

ČLANKI:

Pregledni članek z naslovom »Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: An overview« je v pripravi.

KONFERENCE:

- EFMC-ISMIC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session 2020
- FEBS 2020 (preloženo na 2021)
- EFMC-ISMIC 2020 (preloženo na 2021)

PREDAVANJA:

- Predavanje v okviru Noči raziskovalcev 2019 (Koper, september 2019)
- Aktivna udeležba na dogodku Znanstveni ekspres v okviru Noči raziskovalcev 2019 (Ljubljana, september 2019)
- Intervju in predavanje v okviru projekta R.A.I.S.E. (2019)
- Predavanje na dogodku »Značaj znanosti« (Hiša eksperimentov, januar 2020)
- Predavanje na dogodku »Dan spolov« (Hiša eksperimentov, marec 2020)
- Obisk vrtca v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Izola, oktober 2020)
- Predavanje na seriji dogodkov » TRD Biologics & CGT PostDoc Lecture (Novartis, november 2020)
- Predavanje v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Slovenj Gradec, november 2020)
- Aktivna udeležba na dogodku Znanstveni ekspres v okviru Noči raziskovalcev 2020 (Ljubljana, november 2020)

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. Povezovanje med raziskovalnimi institucijami in gospodarstvom na področju razvoja zdravil je ključnega pomena, saj posamezne institucije nimajo zadostnih visoko specifičnih znanj, opreme, infrastrukture in finančnih sredstev, da bi lahko same izpeljale celoten proces od ideje do registracije in trženja zdravil. Akademsko raziskovanje mora biti tesno povezano z gospodarstvom in industrijsko politiko ter mora zagotavljati pomembno platformo za razvoj novih inovativnih pristopov na področju razvoja zdravil. Za doseganje večje mednarodne konkurenčnosti raziskav, inovacij in tehnološkega razvoja je potrebna manjša razdrobljenost znanstvenega in tehnološkega razvoja in učinkovito izkoriščanje sinergij organizacij, ki že razpolagajo z ustrezno razvojno-raziskovalno infrastrukturo in znanjem. UL FFA želi z dodatno krepitvijo sodelovanja in oblikovanja skupnih strategij z gospodarsko družbo Lek d.d. doseči boljši in hitrejši pretok in izmenjavo znanj, novih dognanj in prenos/translacijo le-tega iz bazičnih raziskovalnih laboratorijev v industrijsko okolje. Poglavitni cilj UL FFA v prihodnosti je združevanje in nadgradnja trenutno fragmentiranega raziskovalnega dela na področju

razvoja zdravil ter vzpodbujanje aktivnosti za krepitev farmacevtskih pristojnosti na področjih, povezanih z razvojem novih zdravil. V prihodnosti želimo skupaj slediti principu translacijskih raziskav v farmaciji in biotehnologiji oziroma pristopu translacijske medicine s ciljem poiskati celovite rešitve s področja farmacije. Dodatno želimo na UL FFA povezovati razvojni, inovativni in izobraževalni vidik s potrebami gospodarstva v smislu konkurenčnosti in razvoja. Dodatna razširitev sodelovanja med gospodarsko družbo Lek d.d. in UL FFA tudi na področje bazičnih raziskav bo vodila v še boljši pretok znanja ter hkrati tudi na kakovost storitev obeh partnerjev in večje razvojne možnosti v primerjavi s sedanjim stanjem.

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 razvoj bioaktivnih molekul na različnih terapevtskih področjih. Pri tem se člani programske skupine poslužujejo kombinacije različnih farmacevtsko-kemijskih pristopov, s pomočjo katerih je mogoče ustrezno usmerjati razvoj spojin z izboljšano jakostjo delovanja, selektivnostjo in želenimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Metoda dela je racionalno in računalniško podprto načrtovanje potencialno aktivnih struktur, njihova sinteza in vrednotenje njihovih bioloških učinkov na izbranih testnih sistemih. Poleg sintetskega dela je ključnega pomena tudi analitski del pripravljenih novih učinkovin. Danes programska skupina suvereno obvlada tako sintezo in analizo kot nadaljnjo funkcionalizacijo heterocikličnih sistemov. Metoda dela tako vsebuje tudi karakterizacijo in analizo čistosti ter kakovosti učinkovin z modernimi analitskimi tehnikami kot so NMR spektroskopija, IR spektroskopija, masna spektrometrija, UV-Vis spektroskopija, rentgenska difrakcijska analiza kristalnih struktur, kot tudi sklopljene tehnike, denimo LC-MS. Pomembna je seveda tudi priprava vzorcev za analitske študije stabilnosti, liofilizacija. V celotnem raziskovalnem ciklusu sta poleg učinkovite sinteze in njene optimizacije med najpomembnejšimi fazami celotnega procesa tudi karakterizacija in ugotavljanje stabilnosti učinkovine, še posebej v primeru proteinov. S tega zornega kota je prijavljen projekt komplementaren z raziskovalnimi aktivnostmi programske skupine. Razpoložljiva laboratorijska oprema omogoča delo v ekstremnih pogojih (tlak, temperatura, brezvodna topila, inertna atmosfera), izolacijo in čiščenje produktov z različnimi modernimi separacijskimi metodami ter karakterizacijo produktov z modernimi spektroskopskimi metodami. Omenjeni pristopi, izkušnje in možnosti programske skupine so dobra osnova za preučevanje stabilnosti proteinov v trdnem, opredelitev dobljenih rezultatov in optimiziranje na industrijskem nivoju v okviru prijavljenega projekta. Raziskovalna skupina je že v preteklosti uspešno optimizirala posamezne sintezne stopnje in opravila analize učinkovin (spektroskopske in spektrometrične) za različne naročnike s čemer dokazujemo, da okolje v raziskovalni skupini nudi vse potrebne pogoje za uspešno izvedbo prijavljenega projekta. Predlagani projekt študije stabilnosti proteinov v trdnem agregatnem stanju s pomočjo spektroskopskih in spektrometričnih metod za določene zdravilne učinkovine družbe Lek d.d. in ugotavljanje njenih kakovosti je povsem komplementaren z obstoječim raziskovalnim delom vrednotenja in analitike programske skupine.

ABSTRACT

Protein-based drugs have established themselves as a very important class of drugs for the alternative treatment of many diseases. For better stability, proteins are often formulated as solid pharmaceutical forms, the most common of which are lyophilizates. During the lyophilization process, proteins are exposed to various stresses that, in combination with various excipients used for formulations, can affect the structure of the protein in its final solid form. A denatured structure can be reflected in an unstable final product, and thus in its quality, safety and efficiency. The development of protein drugs is thus based on stability studies, where the critical properties of protein formulations are evaluated by various analytical methods. Characterization of protein structure in solid is currently less established, as the majority of analytical methods evaluate critical properties in solution. This is not necessarily an indication of adequate stabilization of the protein in the solid form and thus the long-term stability

of the pharmaceutical. By characterizing proteins in solid, both secondary and tertiary structure can be evaluated during formulation development, and only formulations that retain the native structure of the protein in the solid state can be then included in stability studies. The most commonly used analytical methods for structural characterization of proteins in solids include spectroscopic methods (infrared, UV-Vis, fluorescence and Raman spectroscopy, and solid-state NMR), circular dichroism, dynamic differential calorimetry, X-ray diffraction analysis, and more recent methods such as solid-state hydrogen / deuterium exchange mass spectroscopy (HDX-MS). Within this project we want to study selected analytical methods for the structural characterization of proteins in solids. In collaboration with Lek d.d. we want to further develop and implement them in the early stages of solid pharmaceutical forms development and thus reduce the risk of choosing unsuitable formulations for stability studies. If successful the proposed project will contribute greatly to the development of effective protein-based medicines that will be safe, high-quality and affordable for patients.

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 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.