



Javni razpis za spodbujanje raziskovalcev na začetku kariere 2.0

## KONČNO POROČILO

### 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:	C3330-17-529028
Operacija (e-MA št.):	OP20.01277
Vodenje računovodstva: ločeno stroškovno mesto:	223 230 ESMDR1
Naziv operacije:	Validacija imunoproteasoma kot terapevtske tarče in razvoj inhibitorjev
Obdobje izvajanja (od do):	1. 6. 2017 – 31. 5. 2020
Ime in priimek raziskovalca(ke)	dr. Eva Ogorevc
Sodelujoči gospodarski subjekt (naziv in naslov/poslovna enota)	Lek farmacevtska družba d.d., Verovškova ulica 57, 1000 Ljubljana
Kohezijska regija izvajanja:	Zahod

### 3) Vsebinsko poročilo

#### I. Opis raziskovalnega projekta

Opis predmeta raziskovalnega projekta in doseženih ciljev ter rezultatov (do 700 znakov)
Cilj 1 je bil nepremenjen in je v celoti izveden in celo razširjen. Cilja 2 in 3 pa sta bila spremenjena v soglasju z MIZŠ in uspešno izvedena. Glavni rezultati projekta so članki, objavljeni v revijah s faktorjem vpliva: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ROŽMAN Kaja, ALEXANDER Evan M., OGOREVC Eva, SOSIČ Izidor, ALDRICH Courtney C., GOBEC Stanislav. Targeting protein degradation in <i>M. tuberculosis</i>: Psoralen Derivatives as Inhibitors of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Proteasome. <i>Molecules</i>.</li> <li>- JUKIĆ Marko, HRAST Martina, PATIN Delphine, OGOREVC Eva, BARRETEAU Hélène, GOBEC</li> </ul>

Stanislav. Virtual Screening Approach and Biochemical Evaluation on MurB. *Chemical Data Collections*.

- **OGOREVC Eva**, SCHIFFRER Eva Shannon, SOSIČ Izidor, GOBEC Stanislav. A patent review of immunoproteasome inhibitors. *Expert opinion on Therapeutic Patents*, 2018.

## II. Predstavitev raziskovalnega projekta (izvedba)

Predstavitev izvedenega raziskovalnega projekta (realizacija): predstavitev doseženih rezultatov, ciljev/mejnikov skladno s prijavno vlogo, morebitna odstopanja s pojasnili (kakšni ukrepi so bili sprejeti za odpravo težav, ter kakšen vpliv ima predstavljeni na načrtovan projekt), sodelovanje z gospodarskim subjektom (potek sodelovanja, doseganje v prijavni vlogi načrtovanega obsega, pojasnila o morebitnem odstopanju), pojasnilo glede načina zagotavljanja splošnega razširjanja raziskovalnih rezultatov, skladnost s predmetom, cilji in namenom javnega razpisa.

### (ključni rezultati/mejnikи so označeni **odebeljeno**)

V prvem obdobju projekta (junij – december 2017) je delo v celoti potekalo v raziskovalni organizaciji, na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) in sicer skladno s drugim in tretjim ciljem predstavljenega projekta. Zaposlena raziskovalka se je najprej seznanila s standardnimi postopki v laboratorijih UL FFA, nato pa se je posvetila preučevanju vloge imunoproteasoma (IP) in proteasoma (CP) pri kronični limfocitni levkemiji (KLL). V ta namen je testirala izražanje IP in CP in sicer pri zdravih humanih limfoblastnih celičnih linijah LCL, pri celičnih linijah, pridobljenih iz bolnika s KLL (MEC 1 in MEC2) in tudi pri kliničnih vzorcih 50 bolnikov s KLL. Iz vzorcev smo izolirali RNA, nato sintetizirali cDNA ter nivo izražanja IP ter CP podenot ovrednotili z metodo qPCR.

**Rezultati so pokazali, da je pri bolnikih s KLL povečano izražanje imunoproteasomskih podenot  $\beta 1$  in  $\beta 2$  i v primerjavi s proteasomskimi podenotami  $\beta 1$  in  $\beta 2$ .**

V zvezi s 3. ciljem projekta smo sklepalni, da bi povečanje izražanja IP podenot pri celicah *in vitro* olajšalo analizo in validacijo IP kot tarče. Ker mislimo, da se izražanje IP pri vnetnih procesih oziroma pod vplivom vnetnih citokinov lahko poveča, nas je zanimalo ali bo tretiranje s provnetnima citokinoma Interferonom gama (IFNy) in Tumorje-nekrotizirajočim faktorjem- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vplivalo na razmerje v izražanju IP/CP podenot pri celičnih linijah MEC1 in MEC2. Celični liniji MEC1 in MEC 2 smo gojili v kulturi pri različnih koncentracijah IFNy in TNF- $\alpha$  in po treh različnih časovnih točkah najprej preverili, ali tretiranje s citokinoma vpliva na preživetje celic (test MTS), po istih časovnih točkah pa smo iz kulture tudi izolirali RNA, nato sintetizirali cDNA (PCR) in nivo izražanja IP ter CP podenot ovrednotili z metodo qPCR.

**Statistične analize dobljenih rezultatov so potrdile, da tretiranje s citokinimi, še posebej z IFN- $\gamma$ , privede do povečanja iP podenot pri celicah MEC1 in MEC2, kar nakazuje, da je tak sistem primeren za uporabo v okviru našega naslednjega cilja – testiranja selektivnih zaviralcev iP.**

Celicam MEC1 in MEC2, ki so bile pred-tretirane z IFN- $\gamma$ , smo v kulturo dodali že uveljavljena in komercialno dostopna proteasomska zaviralca bortezomib in PR-957. Bortezomib je neselektivni zaviralec CP in IP, PR-957 pa naj bi bil selektiven za IP. **Ugotovili smo, da je zaviranje IP in CP skupaj bolj učinkovito (bortezomib) kot zaviranje samo ene vrste proteasoma (PR-957).**

Januarja in februarja 2018 je delo v celoti potekalo v raziskovalni organizaciji, na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) in sicer smo se posvetili študiju patentne literature, pisanku članka, urejanju podatkov in pripravi slikovnega materiala za namen objave preglednega članka. **Po dveh mesecih intenzivnega dela je bil članek z naslovom *A patent review of immunoproteasome inhibitors* pripravljen in poslan v mednarodno revijo *Expert opinion on therapeutic patents*.**

Od marca do avgusta 2018 je delo v celoti potekalo v raziskovalni organizaciji na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) sicer v skladu s prvim ciljem predstavljenega projekta.

Nove nepeptidne zaviralce  $\beta 5$ i podenote imunoproteasoma smo načrtovali z uporabo dveh različnih a

komplementarnih pristopov, in sicer, z načrtovanjem na osnovi strukture tarče in z načrtovanjem na osnovi strukture liganda. Pri prvem pristopu smo izvedli virtualno rešetanje, pri drugem pa smo poskušali zamenjati osnovni skelet že znanega nepeptidnega zaviralca  $\beta$ 5i podenote imunoproteasoma ob ohranitvi ključnih farmakofornih elementov. V prvi iteraciji smo najprej pripravili ustrezeno knjižnico spojin, pri čemer smo se omejili na dobavljive spojine in tako pripravili začetno knjižnico s 6.400 000 kemijskih struktur. Nato smo izvedli nekaj zaporednih korakov filtriranja struktur z uporabo računalniškega orodja FILTER proizvajalca OpenEye. Osnovni parametri filtriranja so bili sledeči:  $5 \leq C \text{ atomi} \leq 35$ ;  $250 \leq MW \leq 800$ ; moderate minimum solubility parameter FILTER orodja (težko-topne spojine (lipofilne ali molekule z veliko molsko mas); eliminacija težkih kovin; dovoljeni elementi: H, C, N, O, F, S, Cl, Br, I, P in tako zagotovili pripravo kemijskega prostora, podobnega zdravilnim učinkovinam. Iz knjižnice smo dodatno odstranili eksperimentalno-določene in predvidene agregatorje, spojine z napakami v strukturi ter spojine z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami kot so acil halidi, peroksidi, sulfonil halidi, iodozo, iodiksi spojine, acil cianidi, acil hidrazidi, alfa-halo amini in alfahalo ketoni, anhidridi, azidi, aziridini, ditioacetali, hidrazidi, nitrozo spojine, N-P-S halidi ter triazini. V zadnjem koraku smo odstranili promiskuitetne spojine (PAINS - Pan-assay interference compounds). Tako smo pridobili pridobili začetno knjižnico, ki je vsebovala 3 731 096 kemijskih struktur.

Nadalje smo pripravili 3D knjižnico spojin kjer smo še za vsako strukturo v knjižnici izračunali minimizirano 3D strukturo (z uporabo OPLS3 polja sil), možnost tautomernih struktur, pripravili ali popravili ionizacijska stanja posameznih spojin (parameter pH = 7.4) ter generirali tudi optično čiste strukture ob spojinah kjer nastopajo nedefinirani kiralni centri z uporabo računalniškega orodja LigPrep proizvajalca Schrödinger. Tako smo pripravili 3D knjižnico z 8 190 951 kemijskimi strukturami. Ker smo želeli identificirati predvsem »lead-like« spojine, ki bi jih lahko v nadaljnjih korakih dodatno kemijsko modifcirali in optimizirali, smo pripravljeno knjižnico z 8 190 951 kemijskimi strukturami v končnem koraku pred izvedbo sidranja še dodatno filtrirali z uporabo računalniškega orodja FILTER proizvajalca OpenEye, ki nam je omogočil posnemanje »lead-like« kemijskega prostora. Osnovni uporabljeni parametri so bili sledeči:  $-4 \leq X\log P \leq 4$ ;  $300 \leq MW \leq 400$ . Tako pred-pripravljena knjižnica za sidranje je vsebovala 5 119 356 minimiziranih 3D struktur v formatu sdf.

Nadaljnje delo je potekalo v pripravi samega receptorja za izvedbo virtualnega rešetanja. Po analizi vseh prisotnih struktur v bazi podatkov PDB Database smo kot receptor definirali  $\beta$ 5i podenoto v kristalni strukturi s PDB identifikacijsko številko 5M2B. Specifično gre za novo-objavljeno kristalno strukturo proteasoma iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* s ključnima človeškima podenotama  $\beta$ 5i ter  $\beta$ 6i, ki tvorita aktivno mesto, v katerem je kristaliziran nekovalentni zaviralec imunoproteasoma s tiazolnim osnovnim skeletom.

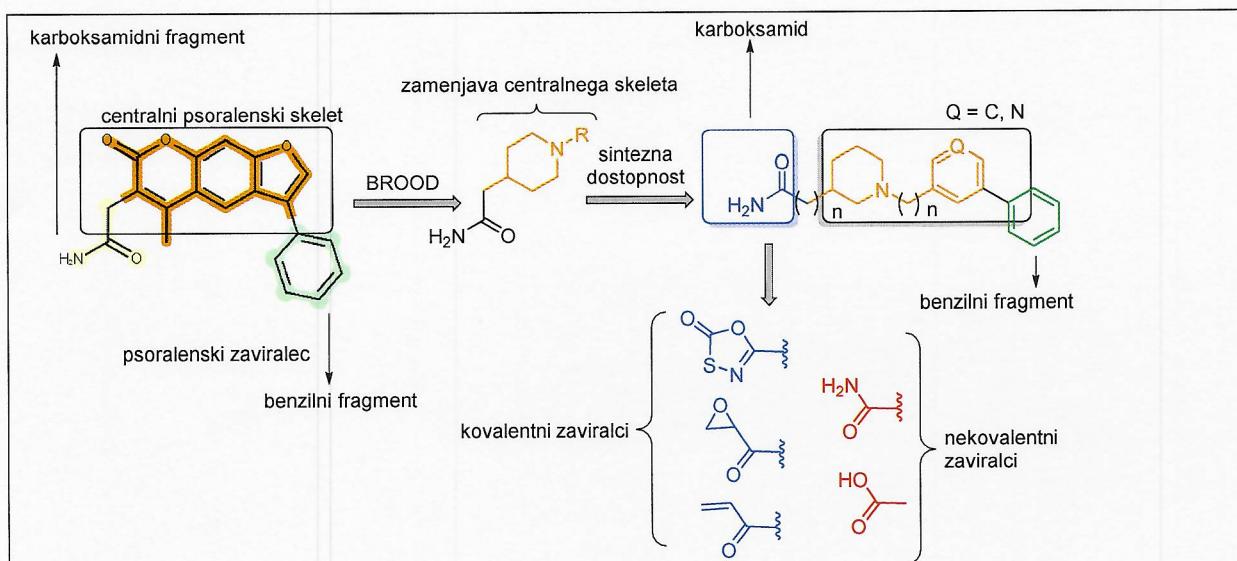
Izbrano strukturo smo nato pripravili z računalniškim orodjem Maestro proizvajalca Schrödinger. Sam receptor za izvedbo eksperimenta sidranja smo definirali kot aktivno mesto med podenotama  $\beta$ 5i in  $\beta$ 6i kjer se nahaja ključni katalitični ostanek Thr1 ( $\beta$ 5i). Z računalniškim orodjem smo odstranili malo molekulo iz aktivnega mesta, dodali manjkajoče vodike, izključili v kristalni strukturi prisotne molekule vode ter soli, izračunali oziroma popravili ionizacijo aminokislinskih ostankov (pH = 7.4) ter izvedli energijsko minimizacijo strukture z uporabo OPLS3 polja sil.

Pripravljen receptor ter knjižnico spojin smo uporabili pri izvedbi eksperimenta virtualnega rešetanja in sidrali pripravljeno knjižnico v aktivno mesto  $\beta$ 5i podenote na skupku računalnikov s 150 procesorskimi jedri. Za ocenitev vezave spojin smo uporabili cenilno funkcijo ChemPLP. Nato smo razvrstili zadetke glede na energijsko cenitev vezave posamezne molekule v aktivno mesto, izvedli analizo podobnosti posameznih zadetkov ter pripravili seznam molekul z najugodnejšo predvideno oziroma izračunano energijo vezave v  $\beta$ 5i podenoto imunoproteasoma za nadaljnji nakup pri proizvajalcih spojin.



Slika 1: Izvedba virtualnega rešetanja

Kot komplementarni pristop za izvedbo načrtovanja na osnovi strukture liganda smo najprej pripravili knjižnico in nadalje definirali izhodno malo molekulo. Uporabili smo celotno knjižnico CHEMBL20 ter knjižnico spojin DrugBank ter z računalniškim orodjem CHOMP proizvajalca OpenEye identificirali, oštrevili in pripravili knjižnico različnih molekulskih skeletov in fragmentov, ki se pojavljajo v spojinah prisotnih v prvotni knjižnici CHEMBL20 ter DrugBank knjižnici spojin. Nadalje smo si izbrali izhodni nepeptidni in nekovalentni zaviralec imunoproteasoma s psoralenskim osnovnim skeletom (Slika 2). Strukturo izhodne male molekule smo fragmentirali, pri čemer smo definirali osnovni psoralenski skelet ter karboksamidno in benzilno ročko (Slika 2). Samo identifikacijo primernih centralnih skeletov smo izvedli z orodjem Brod OpenEye Scientific Software. Po filtriranju rekonstruiranih molekul glede na primerljivo maso in ocenitvi ustreznosti fragmentov z vrednostjo ComboTanimoto orodja vBrood OpenEye Scientific Software smo izbrali najboljše zadetke ter identificirali najustreznejše molekulske skelete za nadaljnje sintezno delo. Identificirali smo psoralenu sterično in elektronsko primerljiv in ključno sintezno dostopnejši aminopiperidinski ter aminometil piperidinski centrani skelet ter sintezno pripravili usmerjeno knjižnico potencialnih kovalentnih in nekovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z modifikacijo/optimizacijo karboksamidne ročke, ki je odgovorna za interakcijo z ostankom Thr1 treoninske peptidaze β5i imunoproteasoma. Ohranitev prvotnih derivatizacijskih ročk nam je namreč omogočila pripravo tako nekovalentnih zaviralcev kot tudi vključitev elektrofilnih centrov v načrtovane molekule ob ohranitvi sterične in elektronske podobnosti z izhodnim psoralenskim zavircem.



Slika 2: Zamenjava centralnega psoralenskega skeleta z uporabo računalniškega orodja Brood in načrtovanje kovalentnih in nekovalentnih zaviralcev imunoproteasoma.

V zgoraj opisanem obdobju (marec-avgust 2018) smo torej uspešno naslovili Cilj 1 (Razvoj selektivnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP in molekulskih prob), pri čemer pa smo prišli do dodatnih in nepričakovanih rezultatov, ki kažejo, da bi inhibitorji IP, ki jih razvijamo, lahko imeli močan učinek tudi na drug tip proteasoma in sicer na mikobakterijski proteasom, ki ga najdemo pri bakteriji *Mycobacterium tuberculosis*, ta pa je glavni povzročitelj tuberkuloze na svetu.

Z molekulskega vidika sta namreč humani imunoproteasom (IP) in mikobakterijski proteasom izredno podobni tarči, zato je tudi razvoj inhibitorjev zelo podoben. V zvezi z našimi rezultati smo se posvetovali s skupino raziskovalcev z Univerze v Minnesoti, ZDA pod vodstvom Courtney-a Aldrich-a (Department of Medicinal Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis, ZDA), ki se že vrsto let ukvarja z razvojem zdravil za tuberkulozo. Naši rezultati so se jim zdeli zanimivi in ponudila se nam je priložnost sodelovanja v okviru bilateralne pogodbe med Slovenijo in ZDA.

Preusmeritev interesa s humanega imunoproteasoma na mikobakterijski proteasom se je tako izkazala kot izjemno perspektivna, tako s stališča relevantnosti rezultatov kot tud izvedbe predvidenih poskusov. Pri izvedbi cilja 3 so se namreč pojavile tudi težave in sicer pretočni citometer, ki bi bil ključen za izvedbo nalog pri tem cilju, ne bo dovolj dostopen, da bi lahko opravili zadostno število ponovitev poskusov za merodajen rezultat.

Zaradi vseh zgoraj navedenih razlogov smo se odločili, da bomo v nespremenjeni oziroma v celo bolj obsežni obliki (več različnih iteracij spojin) izvedli samo cilj 1 (Razvoj selektivnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP in molekulskih prob), pri čemer bomo dodatno razvijali tudi inhibitorje mikobakterijskega proteasoma. Cilja 2 in 3 smo v nespremenjeni obliki naslovili v obdobju od junija do decembra 2017 in takrat pridobili nekaj rezultatov. V naslednjih mesecih projekta (september 2018 - maj 2020) pa smo vsebino cilja 2 in cilja 3 spremenili v skladu s soglasjem Ministrstva RS za izobraževanje, znanost in šport (sklep številka 5442-142/2017/31) in sicer na naslednji način:

- **CILJ 2 (Vrednotenje celičnih linij kot modelov za karakterizacijo inhibitorjev iP):** namesto na humanih celičnih linijah smo naše inhibitorje testirali na mikobakterijskem proteasomu. Plazmid za izražanje MP smo dobili v dar od prej omenjene skupine z Univerze v Minnesoti, ZDA.
- **CILJ 3 (Postavitev metode za validacijo iP kot tarče):** namesto pretočne citometrije smo se za validacijo tarče poslužili uporabe encimskih testov.

Meseca septembra in oktobra 2018 je delo potekalo v raziskovalni organizaciji na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) in pa tudi na Univerzi v Minnesoti, Minneapolis, ZDA (Department of Medicinal Chemistry) in sicer v skladu s spremenjenim CILJEM 2 predstavljenega projekta.

Od raziskovalne skupine z Univerze v Minnesoti, ZDA smo v dar prejeli plazmid, ki nosi zapis za proteinski kompleks mikrobakterijski proteasom. Za izolacijo proteasoma smo sledili protokolu, opisanem v članku Lin *et al.* *Mol Microbiol.* 2006, 59(5): 1405-1416, vendar smo pri vsakem poskusu, ko smo prišli do zadnje stopnje, (gelske elektroforeze SDS page), ugotovili, da naš vzorec ni vseboval proteina prave znane velikosti in da je bila torej ekspresija proteina neuspešna. O naši težavi smo se posvetovali z raziskovalci z Univerze v Minnesoti in predlagali so nam znanstveni obisk v njihovem laboratoriju, da bi protein poskusili pridobiti tam. Tako se je zaposlena raziskovalka konec meseca septembra 2018 napotila v na Univerzo v Minnesoti, Minneapolis, ZDA, da bi tam pridobila aktiven mikrobakterijski proteasom. Izolacija proteina je bila z veliko truda in uvedbo pomembnih sprememb v protokolu v ZDA na koncu uspešna. Pomembne spremembe protokola pa so bile, da smo zadnjo fazo izražanja proteina namesto 18h, izvajali 24h. Tako smo zagotovili dovolj časa, da sta se procesirali tako a kot  $\beta$  podenota proteasoma. Poleg tega smo modificirali tudi postopek čiščenja izoliranega proteasoma (z metodo FPLC) in sicer smo namesto ene nikljeve kolone velikosti 1 ml, uporabili dve nikljevi (His-trap) koloni velikosti 5 ml. Ugotovili smo namreč, da je zaradi velikosti našega proteina (733 kDa) uporaba večjih kolon bolj primerena. Da bi se izognili še kakšnim dodatnim težavam, smo znova izolacijo izvedli transformacijo plazmida iz originalne trajne kulture (pACYC-Duet1 plasmid, Gang Lin in 2016, celična linija DH5 $\alpha$ ). Izoliranemu proteasomu smo tudi preliminarno testirali aktivnost in dobili uspešno encimsko reakcijo – prišlo je do razgradnje substrata (Suc-LLVY-AMC).

**Rezultat obiska v ZDA je bila torej uspešna izolacija proteina - pridobili smo 1200 ul mikrobakterijskega proteasoma koncentracije 4,38  $\mu$ M, ki je bil encimsko aktiven, zato smo ga za nadaljnjo uporabo poslali domov, na Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani.**

Od novembra 2018 do marca 2019 je delo v celoti potekalo na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) sicer v skladu s spremenjenim CILJEM 2 in CILJEM 3 predstavljenega projekta

Na domači ustanovi smo se takoj lotili testiranja prej pripravljenih inhibitorjev mikrobakterijskega proteasoma in sicer psoralenskih derivatov, ki so bili sprva zasnovani kot inhibitorji humanega imunoproteasoma. Spodaj je podrobno opisan postopek testiranja in pridobljeni rezultati (kasneje tudi objavljeni v reviji Molecules):

Da bi določili koncentracijo encima (v ZDA izoliranega mikrobakterijskega proteasoma), pri kateri bodo testi najbolj učinkoviti, smo najprej naredili umeritveno krivuljo, ki je zajemala koncentracije encima v testu med 5 in 100 nM. Za spremeljanje encimske aktivnosti smo tudi na naši ustanovi uporabljali čitalec mikrotitrskih plošč Biotek Synergy H4 s programsko opremo Gen5 (fluorescencija  $\lambda_{ex} = 360$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm). Ugotovili smo, da je optimalna koncentracija encima, ki jo bomo uporabili za nadaljnja testiranja, 7 nM. Nato smo se lotili biokemijskega vrednotenja spojin, za katere smo najprej pripravili založne raztopine v DMSO (10  $\mu$ M). Vrednotili smo naslednje spojine: bortezomib, PR-957 (MZ-33-2), OKK18, OKK24, OKK29, GDK-261, GAS-06, GAS-10, GTK31\_P, GJK-004, GDK-264, OZL18, OZL29, GTK06\_1, GDK-293, GTK28\_K, GDK-294, GTK33, GJK-008, ONE-38\_1, GDS17, GIS372, GAS-16, GDS13\_P, ONE-16\_1, ONE-39\_1, GAJ-08, GDK-311-3 in GIS414. Ponovno smo za testiranje uporabljali čitalec Biotek Synergy H4 (pri istih pogojih), pri čemer smo uporabili 384 mestne plošče, na katere smo nanašali 30 spojin v 10 različnih koncentracijah (0,07  $\mu$ M – 10 ali 100  $\mu$ M), po 0,1 ul na luknjico. Temu smo dodali 7,9 ul prej pridobljenega proteasoma (7 nM) in ploščo inkubirali na 37°C, 30 min. Zatem smo v reakcijsko zmes dodali po 2 ul substrata Suc-LLVY-AMC (50  $\mu$ M) in s tem začeli encimsko reakcijo, ki smo jo merili 90 minut pri 37°C. Uporabili smo tudi negativne (reakcije brez spojine, z 1% DMSO) in pozitivne kontrole (bortezomib, PR-957). Začetno hitrost reakcije spojine smo primerjali z začetno hitrostjo reakcije brez spojine (negativna kontrola) in s tem izračunali rezidualno aktivnost. Te teste smo nekajkrat ponovili in nato za vse testirane spojine določili tudi vrednosti IC<sub>50</sub>. Ugotovili smo, da pozitivni kontroli (bortezomib in PR-957) ter tesitrane spojine GAS-16, ONE16\_1, GDK294 in GDK311\_3 kažejo največji inhibitorni potencial in so zato najbolj obetavni inhibitorji mikrobakterijskega proteasoma.

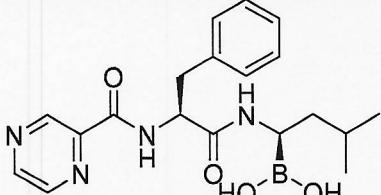
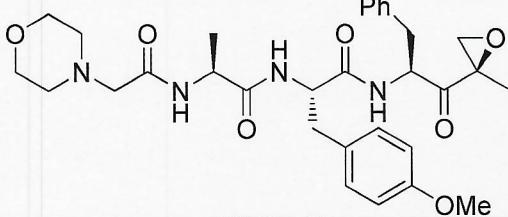
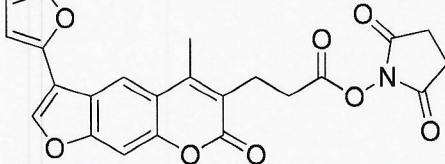
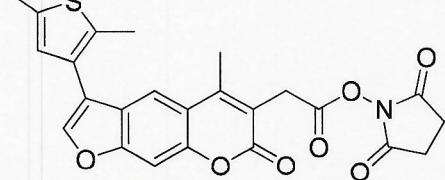
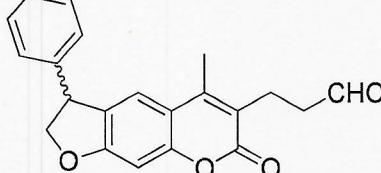
Za v prejšnjem koraku ugotovljene najbolj obetavne inhibitorje mikrobakterijskega proteasoma (bortezomib, PR-957, GAS-16, ONE16\_1, GDK294 in GDK311\_3) smo nato določili konstante K<sub>i</sub>. Te smo izmerili pod podobni pogoji kot pri prejšnjem poskusu, le da smo tokrat spremenjali tudi

konzentracije substrata Suc-LLVY-AMC v testu – uporabili smo naslednje koncentracije: 12.5, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu$ M. Za spojine PR-957, GAS-16, ONE16\_1 and GDK311\_3 smo testirali koncentracije 0, 0.56, 0.81, 1.15, 1.65, 2.35, 4.80, 9.80 in 20  $\mu$ M; za spojino GDK294 so bile testirane koncentracije 0, 1.65, 2.35, 4.80 in 9.80  $\mu$ M; za bortezomib pa 0, 0.28, 0.40, 0.58, 0.82, 1.18, 2.40, 4.90 in 10  $\mu$ M.

Podatke, ki smo jih dobili s testiranjem, smo analizirali s programsko opremo GraphPad Prism 6 za modele kompetitivne, nekompetitivne, akompetitivne in mešane encimske inhibicije.  $K_i$  vrednosti smo nato določili iz najbolj ustreznega modela, določenega s programsko opremo. Določili smo tudi konstanto  $K_m$  za substrat Suc-LLVY-AMC, ki smo jo izračunali iz začetne hitrosti encimske reakcije, pri čemer smo uporabili 10 nM mikobakterijski proteasome pri naslednjih koncentracijah substrata: 12.5, 25, 50, 100, 250 in 500  $\mu$ M.

### **Rezultati encimskih testov za najbolj obetavne spojine so prikazani v spodnji tabeli.**

Tabela 1: Rezultati encimskih testov

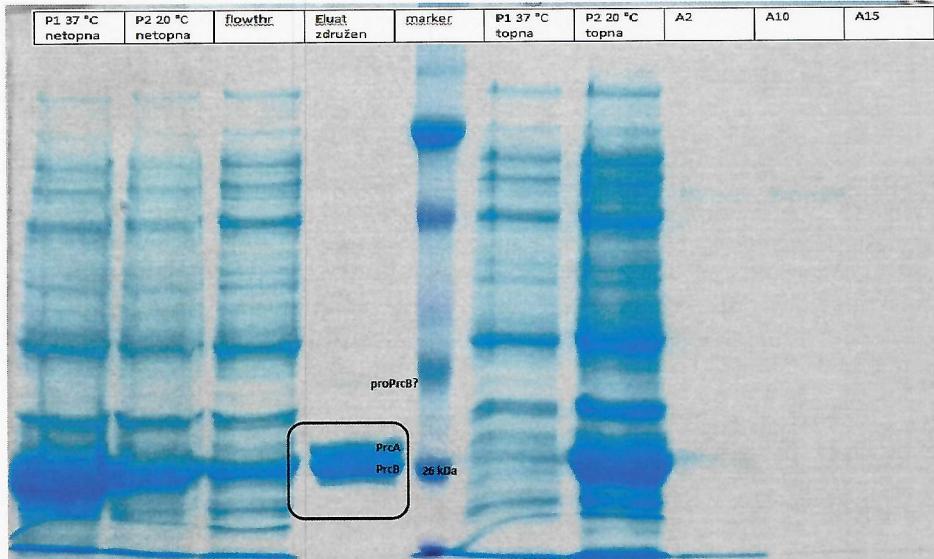
spojina	Kemijska struktura	$IC_{50}$	$K_i^*$
Bortezomib		112.5 $\pm$ 30.5 nM	$K_i = 133.4 \pm 4.9$ nM Nekompetitvena inhibicija $R^2 = 0.5451$
PR-957 (MZ-33-2)		2.25 $\pm$ 1.05 $\mu$ M	$K_i = 1.261 \pm 0.238$ nM Nekompetitvena inhibicija $R^2 = 0.8314$
GAS-16		8.8 $\pm$ 1.0 $\mu$ M	$K_i = 4.182 \pm 2.082$ $\mu$ M Mešana inhibicija $R^2 = 0.9053$
ONE-16_1		3.2 $\pm$ 0.3 $\mu$ M	$K_i = 1.117 \pm 0.971$ $\mu$ M Mešana inhibicija $R^2 = 0.5172$
GDK-311-3		5.82 $\pm$ 2.08 $\mu$ M	$K_i = 14.97 \pm 45.05$ $\mu$ M Mešana inhibicija $R^2 = 0.7668$

Iz zgornjih rezultatov smo v sodelovanju z raziskovalci z Univerze v Minnesoti, ZDA (K. Rožman, Evan Aleksander in Courtney C. Aldrich) začeli pripravljati izvirni znanstveni članek z naslovom Psoralen derivates as Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Proteasome.

Ker smo želeli tudi na domači ustanovi imeti zanesljiv sistem za nadaljnja testiranja novih inhibitorjev mikobakterijskega proteasoma, smo se od meseca februarja do aprila 2019 posvetili natančni optimizaciji metode izolacije. Sodelavci z Univerze v Minnesoti so nam še enkrat poslali plazmid z zapisom za miobakterijski proteasom in, ko smo ga prejeli, smo ga poslali na sekveniranje in restriktijsko analizo, s čimer smo potrdili, da imamo plazmid s pravilnim zapisom za mikobakterijski

proteasom. Zatem smo uspešno izvedli tudi transformacijo plazmida pACYCDuet-1 MTB v celicah NiCo 21 (DE3), s čimer smo pripravili kulturo za nadaljnje postopke ekspresije proteasoma. Iz pripravljene trajne kulture celic *E. coli* NiCo 21 (DE3) s transformiranim plazmidom z zapisom za mikobakterijski proteasom smo ponovili postopek ekspresije proteina. Ponovno smo sledili protokolu, opisanem v članku Lin et al. *Mol Microbiol.* 2006, 59(5): 1405-1416, pri čemer smo čas ekspresije proteina podaljšali na 48 ur pri 20°C. Ponovno smo za čiščenje proteina uporabili metodo FPLC in za tem preverili vsebnost dobljenih frakcij z metodo SDS page.

**Dobili smo izredno čist protein (slika spodaj):**



Slika 3: Gel SDS page. Obkrožena je frakcija s čistim proteinom – mikobakterijskim proteasomom; α podenota (26.5 kDa) in β podenota (27.3 kDa).

Preliminarno smo testirali tudi aktivnost izoliranega encima s substratom Suc-LLVY-AMC, pri čemer smo ponovno uporabili čitalec mikrotitrskih plošč Biotek Synergy H4 s programsko opremo Gen5 (fluorescencija  $\lambda_{ex} = 360$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm). Zaznali smo naraščanje fluorescence (hidrolizo substrata), kar je pomenilo, da nam je tokrat tudi na domači ustanovi uspelo pridobiti aktiven mikobakterijski proteasom, ki ga bomo lahko uporabili za nadaljnja testiranja.

Delo je meseca marca in aprila 2019 potekalo ob intenzivni pomoči članov programske skupine pospešeno z namenom nemotene izvedbe projekta zaradi odhoda raziskovalke na materinski in starševski dopust.

V prijavnih vlogih projekta je bilo predvideno delo v gospodarskem subjektu Lek d.d. v zadnji tretjini trajanja projekta, torej od 1. 6. 2019 do 31. 5. 2020, vendar se je ob zamenjavi raziskovalke zaradi materinskega in starševskega dopusta dr. Eve Ogorevc, delo v gospodarskem subjektu pričelo en mesec pred predvidenim terminom in je potekalo nepretrgoma do izteka pogodbe o zaposlitvi raziskovalke dr. Petre Zadravec (pogodba je bila sklenjena za določen čas nadomeščanja odsotne delavke od 6. 5. 2019 do 4. 4. 2020; soglasje MIZŠ z dne, 17.4.2019, številka: 5442-142/2017/39, za zamenjavo raziskovalke).

Delo je od 6.5. 2019 do marca 2020 potekalo v gospodarskem subjektu LEK in sicer v skladu z nespremenjenim CILJEM 1 ter s spremenjenim CILJEM 2 in CILJEM 3 predstavljenega projekta.

Od maja do septembra 2019 smo načrtovali nove nepeptidne in nekovalentne zaviralce mikobakterijskega proteasoma na osnovi strukture tarče.

Za izvedbo virtualnega rešetanja smo tako kot prejšnjič najprej napravili pregled dela in literature na raziskovalnem področju načrtovanja zaviralcev mikobakterijskega proteasoma ter pregled komercialno dostopnih spojin. Najprej smo pripravili ustrezno knjižnico spojin, ki smo jo sestavili iz podmnožice komercialno dostopnih spojin v bazi podatkov ZINC. Izbrali smo podmnožico Drugs now ZINC in tako

pripravili začetno knjižnico, ki je vsebovala 10.7 milijona kemijskih struktur v formatu sdf. Nato smo izvedli nekaj zaporednih korakov filtriranja struktur z uporabo računalniškega orodja FILTER proizvajalca OpenEye. Prvi filter je odstranil kovine (dovoljeni elementi: H, C, N, O, F, S, Cl, Br, I, P), spojine z molekulsko maso manjšo od 300 Daltonov in večjo od 1000 Daltonov, spojine z več kot 15 rotirajočimi vezmi, spojine z manj kot 4 in več kot 55 rigidnimi vezmi, spojine z LogP manjšim od -4.0 ter večjim od 6.85.

Iz knjižnice smo nato dodatno odstranili eksperimentalno-določene aggregatorje, spojine z napakami v strukturi ter spojine z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami kot so acil halidi, peroksidi, sulfonil halidi, iodozo, iodiksi spojine, acil cianidi, acil hidrazidi, alfa-halo amini in alfahalo ketoni, anhidridi, azidi, aziridini, ditioacetali, hidrazidi, nitrozo spojine, N-P-S halidi ter triazini (REOS filter ali angl. rapid elimination of swill). V zadnjem koraku pa smo z uporabo računaniškega orodja KNIME odstranili promiskuitetne spojine (PAINS - Pan-assay interference compounds). Tako smo pridobili pridobili začetno knjižnico, ki je vsebovala 8 107 185 kemijskih struktur.

Nadalje smo pripravili 3D knjižnico spojin kjer smo še za vsako strukturo v knjižnici izračunali ustrezeno število 3D konformacij. Taka knjižnica nam je omogočala izvedbo virtualnega rešetanja z orodjem FRED iz programskega paketa OpenEye. Ionizacijska stanja posameznih spojin smo pripravili ali popravili z orodjem QUACPAC FixPka z vhodnim parametrom pH = 7.4. ter optično čiste strukture ob spojinah kjer nastopajo nedefinirani kiralni centri definirali z uporabo računalniškega orodja Omega2 kemoinformacijskega paketa OpenEye. Za vsako spojino tako generirali konformere s programom OMEGA 3.0.0.1. in tako pred-pripravljena knjižnica za sidranje je vsebovala približno 200 milijonov 3D struktur v formatu oeb.gz.

Nadaljnje delo je bila priprava samega receptorja za izvedbo virtualnega rešetanja. Po analizi vseh prisotnih struktur v bazi podatkov PDB Database smo kot receptor definirali  $\beta$  podenoto v kristalni strukturi s PDB identifikacijsko številko PDB ID: 2FHH. Delo se je nanašalo na kristalno strukturo proteasoma iz *Mycobacterium tuberculosis* sev ATCC 25618 / H37Rv, protein je pa bil izražen v bakteriji *Escherichia coli* BL21(DE3).

Izbrano strukturo smo nato pripravili z računalniškim orodjem Maestro proizvajalca Schrödinger. Za eksperiment sidranja smo kot aktivno mesto definirali mesto med podenotama  $\beta$  – verigi P ter H kjer se nahaja ključni katalitični ostanek Thr1 ( $\beta$ , H, 301). Z računalniškim orodjem Schrödinger smo nato označili malo molekulo v aktivnem mestu, dodali manjkajoče vodike, izključili v kristalni strukturi prisotne molekule vode ter soli, izračunali oziroma popravili ionizacijo aminokislinskih ostankov (pH = 7.4) ter izvedli energijsko minimizacijo strukture z uporabo OPLS3 polja sil.

Sam receptor za izvedbo eksperimenta sidranja smo definirali z orodjem MakeReceptor 3.2.0.2 kemoinformacijskega paketa OpenEye. Verigi H in P smo definirali kot rigidni in del proteina in označili malo molekulo (m1n) boronatnega zaviralca. Prostor za izvedbo eksperimenta sidranja smo definirali kot kvader z dimenijami  $16.00 \text{ \AA} \times 20.00 \text{ \AA} \times 16.51 \text{ \AA}$ , njegova velikost pa je znašala  $6933 \text{ \AA}^3$ . Volumen vezavnega žepka je bil izračunan s parametrom balanced shape in je znašal  $1153 \text{ \AA}^3$ . Dodatnih konstruktorjev in ekskluzijskih volumnov v receptorju nismo definirali, prav tako pa nismo dodatno spremajali ionizacije v aktivnem mestu.

Pripravljen receptor ter knjižnico spojin smo uporabili pri izvedbi eksperimenta virtualnega rešetanja z uporabo sidranja z računalniškim programom FRED 3.2.0.2 računalniškega paketa OpenEye. Celotno pripravljeno knjižnico smo tako sidrali v aktivno mesto med dvema  $\beta$  podenotama. Za ocenitev vezave spojin smo uporabili cenilno funkcijo Chemgauss4. Po izvedbi molekulskega sidranja smo razvrstili zadetke glede na energijsko cenitev vezave posamezne molekule v aktivno mesto, izvedli analizo podobnosti posameznih zadetkov ter pripravili seznam molekul z najugodnejšo predvideno oziroma izračunano energijo vezave v aktivnem mestu mikrobakterijskega proteasoma, ki pa se medsebojno tudi strukturno razlikujejo. Pripravili smo obsežen seznam potencialnih nekovalentnih zaviralcev mikrobakterijskega proteasoma z novimi skeleti za nadaljnji nakup pri komercialnih dobaviteljih spojin (Tabela 2). Ko smo spojine prejeli, smo jim z metodo FPLC preverili čistost.

### Seznam spojin:

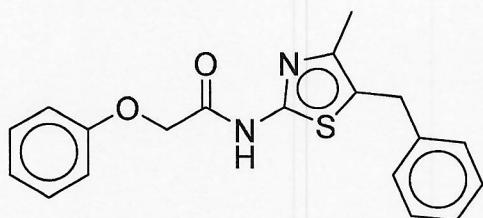
Tabela 2: Seznam potencialnih nekovalentnih zaviralcev mikobakterijskega proteasoma

spojina	SMILES formula
GMMP-1	Cc1cccc(NC(CSc(cc2)nnC2-c2cnccc2)=O)c1C
GMMP-2	Cc1cccc(NC(CN(CCC2)C[C@H]2c2nc(cccc3)c3[nH]2)=O)c1C
GMMP-3	Cc1c(Cc2cccc2)sc(NC(COc2cccc2)=O)n1
GMMP-4	CC(C)CCN1C(SCc2c(C)oc(-c3ccc(C)cc3)n2)=Nc(ccc2)c2C1=O
GMMP-5	O=C(CCN(C=Nc1c2[nH]c3c1cccc3)C2=O)Nc(cc1)ccc1Cl
GMMP-6	O=C(Cc1noc(-c(cc2)ccc2F)c1)NCCc1c[nH]c2c1cccc2
GMMP-7	O=C(Cc1cccc2cccc12)NCCN1C[C@@H](c2cccc2)OCC1
GMMP-8	O=C(CCc1cccc1)Nc1nc(CN(CC2)Cc3c2cccc3)cs1.Cl
GMMP-9	O=C(c1ccc(Cn2cncc2)cc1)NCCOc1cccc2cccnc12
GMMP-10	O=C(/C=C/c1cccc1)NCC(CC1)CCN1c1nc(cccc2)c2o1
GMMP-11	COc1cccc2c1oc(C(NCC(CC1)CCN1c1nc(cccc3)c3o1)=O)c2
GMMP-12	O=C(NCC(CC1)CCN1c1nc(cccc2)c2o1)Nc(cccc1)c1Cl
GMMP-13	O[C@@](CNC(C(Nc1cccc1)=O)=O)(CC1)Cc2c1cccc2
GMMP-14	O=C(C(C1)CN1c1ncnc(-n2cncc2)c1)NCc1nc(cccc2)c2[nH]1
GMMP-15	CN1N=C(CC[C@@H](C2)C(NCc3nc(cccc4)c4[nH]3)=O)C2=CC1=O
GMMP-16	O=C(N[C@@H](CC1)CN1c(cc1)nn2c1nnC2)OCc1cccc1
GMMP-17	O=C(NCc1cccc2cccc12)N[C@@H]1CN(Cc2ccsc2)CC1
GMMP-18	Cc(cc1)cc1N(CC[C@@H]1NC(c(cc2)cc3c2[nH]cc3)=O)C1=O
GMMP-19	Cc(cc1)N(CC[C@@H]2NC(c(cc3)cc4c3[nH]cc4)=O)C2=O)c1F
GMMP-20	COc(cc1)ccc1N(CC[C@@H]1NC(c(cc2)cc3c2[nH]cc3)=O)C1=O

Oktobra in Novembra 2019 smo z encimskim testom preverili zaviralno kapaciteto zgornjih spojin, pri čemer smo uporabili encim (mikobakterijski proteasom), pripravljen v prejšnjem obdobju poročanja (marec in april 2019). Potek testiranja je bil enak kot prejšnjič (november 2018).

Iz pridobljenih podatkov smo nato za vse spojine izračunali rezidualno aktivnost (RA). Preliminarni test zavirale kapacitete spojine smo izvedli pri treh ponovitvah in zaključili, da bomo  $IC_{50}$  vrednosti izračunali le za spojino GMMP-3, saj so meritve pokazale najbolj obetavne rezultate (ponovitve so bile znotraj intervala standardne deviacije  $\pm 10\%$ ).  $IC_{50}$  vrednost smo določili pri 7 različnih koncentracijah spojine. Pri tem smo spojino kot prejšnjič razredčili po logaritemski skali.

**Za spojino GMMP-3 smo na koncu izračunali  $IC_{50}$  med 2 in 5 uM.**



Slika 4: Struktura spojine GMMP-3:

Ker so bile v času od prejšnjega virtualnega rešetanja objavljene 3 nove kristalne strukture (PDB ID: 6OCW, 6OCZ, 6ODE) mikobakterijskega proteasoma v kompleksu z ligandi (Zhan, Wenhui, et al. "Selective Phenylimidazole-Based Inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis Proteasome." Journal of Medicinal Chemistry 62.20 (2019): 9246-9253.), smo takoj preverili načrtovanje naših inhibitorjev. Vsi trije kokristalizirani ligandi so fenylimidazolni peptidomimetiki. Nasprotno človeškemu proteasomu je pri mikobakterijah  $\beta$  podenota uniformna in aktivno mesto se tvori na stiku dveh  $\beta$  podenot. V novih kristalnih strukturah smo ohranili samo dve  $\beta$  podenoti, H in I, ter ligand, ki se nahaja med

podenotama. Strukture smo poravnali glede na aktivno mesto in jih primerjali s strukturo, ki je bila uporabljena v prejšnjem virtualnem rešetanju (PDB ID: 2FHH). Ugotovili smo, da se oblika vezavnega mesta nekoliko razlikuje v primerjavi s prejšnjo strukturo, zato smo se odločili ponoviti iteracijo virtualnega rešetanja. Površina vezavnega mesta se med novo objavljenimi strukturami bistveno ne razlikuje, za nadaljnje delo smo izbrali tisto z najvišjo resolucijo (PDB ID: 6OCW, 2.6 Å).

Izbrano strukturo smo uvozili v program Maestro (Schrödinger). Z orodjem Protein Preparation Wizard smo odstranili vse verige, razen H in I, ter vse molekule vode in citrat iz aktivnega mesta. Strukturi smo dodali vodikove atome, pri čemer smo definirali pH okolja na 7.0. Minimizirali smo položaje težkih atomov z uporabo OPLS3e polja sil. Tako pripravljeno strukturo podenot H in I ter liganda smo izvezili v program MakeReceptor 3.4.0.2 (OpenEye), kjer smo okrog liganda definirali kvader za izvedbo sidranja velikosti  $19.82 \text{ \AA} \times 18.90 \text{ \AA} \times 18.98 \text{ \AA}$  oz. volumna  $7109 \text{ \AA}^3$ . Pri tem smo pazili, da kvader vključuje ključni katalitični aminokislinski preostanek Thr1 verige H. Volumen vezavnega žepa smo določili s parametri Balanced shape in Outer contour, da je znašal  $1408 \text{ \AA}^3$ . Uporabili nismo nobenih omejitev ("constraints").

Za sidranje smo pripravili novo knjižnico komercialno dostopnih spojin. Uporabili smo že pripravljene knjižnice različnih ponudnikov, ki smo jih združili v programu KNIME in s pomočjo OpenBabel pripravili protonacijo spojin pri pH 7.4. Končna velikost knjižnice je bila 2 081 456 spojin. S programom Omega (OpenEye) smo generirali različne konformacije za vsako spojino iz knjižnice (povprečno 154 konformacij na spojino) in pripravili do 6 stereoizomerov za vsako spojino. Pripravljen receptor in knjižnico smo uporabili za sidranje s programom FRED (OpenEye). Za ocenitev vezave spojin smo uporabili cenično funkcijo Chemgauss4. Glede na kemijski prstni odtis smo pripravili 15 clustrov, iz vsakega clustra pa smo izbrali do 5 spojin, skupaj 30 spojin.

**Od tega je bilo na voljo 28 spojin, ki smo jih naročili pri ponudniku Chembridge (Tabela 3).**

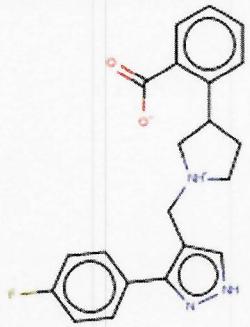
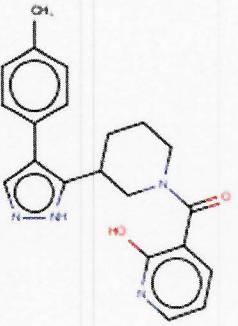
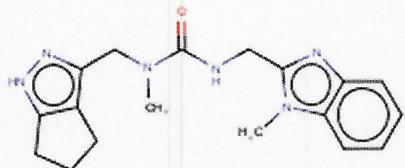
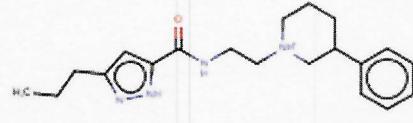
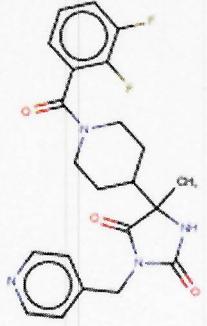
**V tem obdobju smo tudi zaključili s pripravo članka »Psoralen derivatives as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* proteasome«, ki je bil poslan v revijo *Molecules*.**

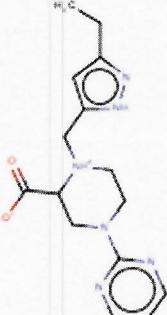
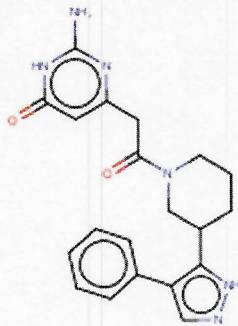
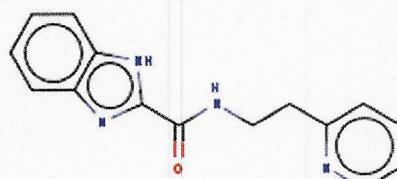
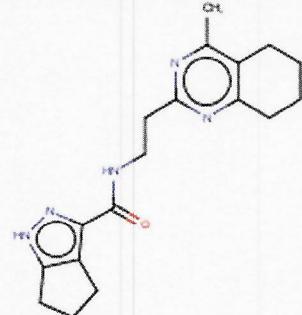
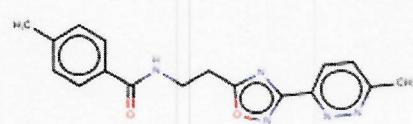
Zaviralno kapaciteto zgoraj opisanih spojin smo preverjali v obdobju od marca do maja 2020. Marca je delo potekalo v gospodarskem subjektu LEK, aprila in maja pa v raziskovalni ustanovi FFA UL. Delo je potekalo ob intenzivni pomoči članov programske skupine pospešeno z namenom nemotene izvedbe.

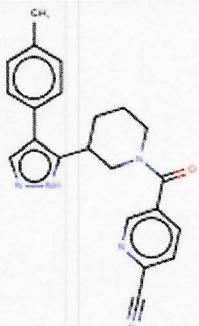
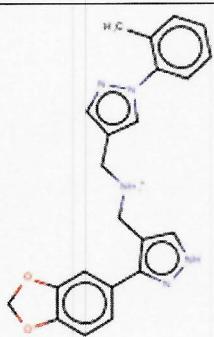
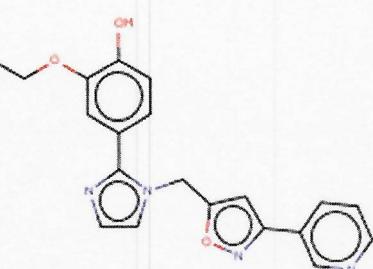
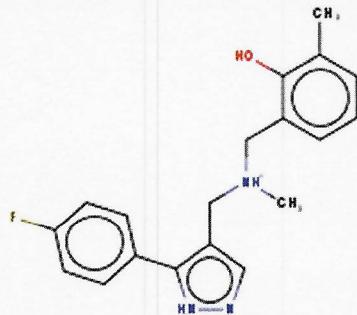
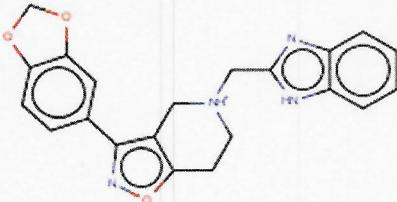
Zaviralno kapaciteto zgornjih spojin smo preverili z encimskim testom in sicer na enak način kot prejšnjič (november 2018). Uporabili smo encim (mikrobakterijsi proteasom), ki smo ga uspešno izolirali v preteklih mesecih in ga do testiranja shranili. Iz pridobljenih podatkov za vseh 28 spojin smo nato izračunali rezidualno aktivnost (RA) za posamezno spojino.

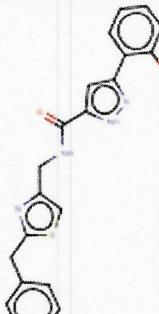
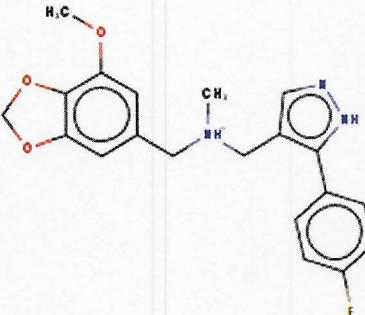
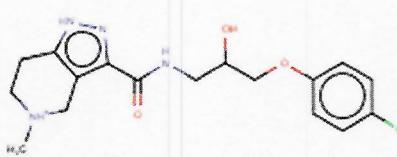
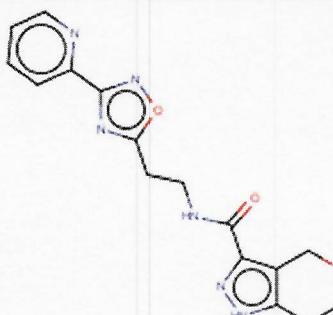
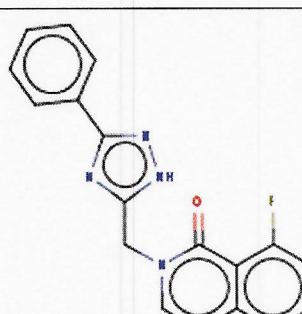
Tabela 3: Rezidualne aktivnosti encima za testirane spojine pri koncentraciji 100 µM.

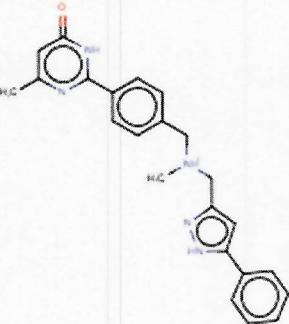
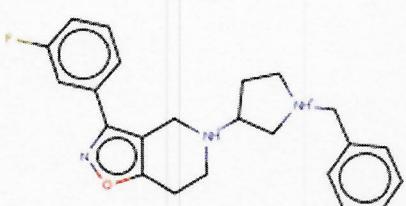
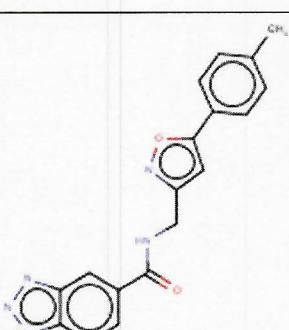
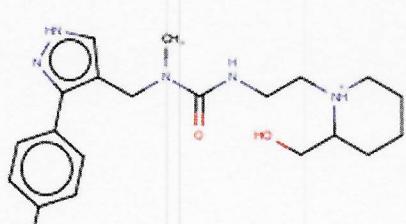
Struktura	Oznaka	RA (%) pri 100 µM
	1	50.8 <sup>a</sup>

	2	54.4 <sup>b</sup>
	3	41.0
	4	46.0 <sup>b</sup>
	5	54.8
	6	45.4

	7	44.1 <sup>a</sup>
	8	53.7
	9	92.9
	10	77.5 <sup>b</sup>
	11	47.5

	12	72.4 <sup>a</sup>
	13	37.3 <sup>a</sup>
	14	51.6
	15	90.3
	16	74.1

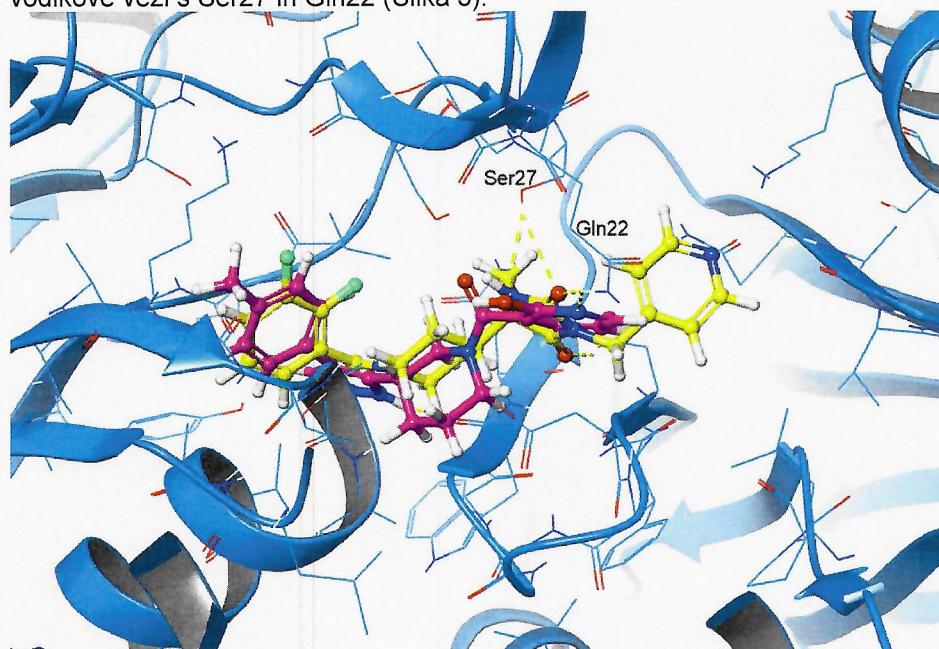
	17	85.7
	18	97.7
	19	73.6 <sup>b</sup>
	20	90.3
	21	53.6

	22	80.7 <sup>b</sup>
	23	53.3
	24	64.8
	25	155.7
	26	121.8

<chem>CC(C1=CC=C2=C1C3=C2C(=O)N(C)C3)Cc4c5ccccc5[nH]4Cc6c7ccccc7[nH]6</chem>	27	95.4
<chem>C[C@H]1Cc2c(c3ccccc3[nH]2)C(=O)N1Cc4c5ccccc5[nH]4</chem>	28	103.2

<sup>a</sup>Interferenca s testnim sistemom zaradi avtofluorescence. <sup>b</sup>Slaba topnost spojine.

Izmed testiranih spojin z zadostno topnostjo in brez povzročanja interference s testnim sistemom izstopajo tri spojine z RA nižjo od 50% – spojine **3**, **6** in **11**. Pozi, ki jih napove program za sidranje FRED, se za spojini **3** in **6** večinoma ujemata. Poleg nespecifičnih interakcij obe spojini tvorita vodikove vezi s Ser27 in Gln22 (Slika 5).



Slika 5: Napovedani pozi s programom FRED za najbolj obetavni spojini z RA nižjo od 50%, 3 (vijolična) in 6 (rumena). Protein je prikazan z modro barvo. Vodikove vezi so označene s črtko rumeno črto.

Zaključimo lahko, da spojine **3**, **6** in **11** predstavljajo pomembne spojine zadetke in izhodišče za nadaljnji razvoj inhibitorjev mikrobakterijskega proteasoma.

Raziskovalka dr. Petra Zadravec je opravila obveznosti v gospodarskem subjektu v začetku meseca marca v obsegu 80 ur, aprila 2020 pa je zaradi pandemije COVID-19 koristila izredni dopust in zato v tem mesecu ni opravljala aktivnosti v gospodarskem subjektu.

Dr. Eva Ogorevc bi morala pred začetkom dela v gospodarskem subjektu Lek d.d. opraviti daljsa interna izobraževanja, ki pa zaradi pandemije COVID-19 niso bila izvedljiva. Tako je bilo v gospodarskem subjektu opravljenih 1472 ur v enajstih mesecih (in ne 12 mesecev, kot je bilo predvideno v prijavnji vlogi).

Zaključek projekta pa je bil ob intenzivni pomoči članov programske skupine P1-0208 opravljen na Fakulteti za farmacijo skladno z nespremenjenim ciljem 1 ter s spremenjenima ciljema 2 in 3. Vse zastavljene aktivnosti je programska skupina skupaj z raziskovalko dr. Evo Ogorevc do zaključka projekta, do 31. 5. 2020, uspešno opravila.

#### 4) Kazalnik učinka operativnega programa

Kazalnik	Načrtovana vrednost	Dosežena vrednost
<b>CO24:</b> Raziskave in inovacije: Število novih raziskovalcev pri podprtih subjektih	3	3
<b>CO26:</b> Raziskave in inovacije: Število podjetij, ki sodelujejo z raziskovalnimi ustanovami	1	1
Odstopanje (obrazložitev)		odstopanj ni

Upravičenec se strinja in dovoljuje ministrstvu, da vsebino tega poročila lahko uporabi za namene poročanja o izvedbi operacije. Končno poročilo operacije ni predmet poslovne skrivnosti upravičenca.

Upravičenec izjavlja, da materialno in kazensko odgovarja za resničnost in verodostojnost navedb v tem poročilu.

Ljubljana, 7. 7. 2020

Raziskovalka  
dr. Eva Ogorevc

Ljubljana, 7. 7. 2020

Raziskovalka  
dr. Petra Zadravec

Ljubljana, 7. 7. 2020



Odgovorna oseba upravičenca  
prof. dr. Igor Papič, rektor  
po pooblastilu dekanja  
prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan