


*Javni razpis za spodbujanje raziskovalcev na začetku kariere 2.0*
**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
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

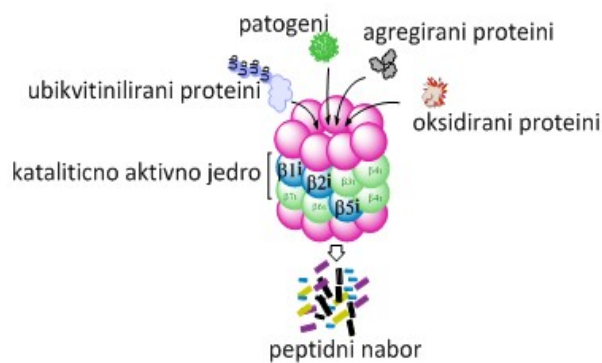
**3) Predstavitev raziskovalnega projekta (izvedba)**

Ubikvitinski proteazni sistem (UPS) je najbolj obsežen mehanizem, v katerem poteka nelizosomalno procesiranje večine citosolnih proteinov (nad 90%). V centru sistema je 26S proteasom, multikatalitična proteaza (sestavljena iz 28 podenot), ki selektivno cepi z ubikvitinom označene proteine, oksidirane in agregirane proteine ter tako uravnava številne signalne poti ter omogoča celično homeostazo (Slika 1). Proteasom obstaja v dveh glavnih oblikah: kot klasični proteasom (cP) in kot imunoproteasom (iP).<sup>1</sup> cP se nahaja v vseh vrstah celic, pri čemer katalitično aktivnost posedujejo  $\beta 1$  (kaspazna),  $\beta 2$  (tripsinska) in  $\beta 5$  (kimotripsinska) podenota.<sup>2</sup> V nasprotju s cP je iP izražen pretežno v celicah imunskega sistema, kot so limfociti in monociti. V prisotnosti nekaterih vnetnih dejavnikov, kot so interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) in tumor nekrotizirajoči faktor  $\alpha$ , lahko pride do izražanja iP tudi v drugih tkivih, kjer se  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  in  $\beta 5$  podenote zamenjajo z  $\beta 1i$  (LPM2),  $\beta 2i$  (MECL-1), in  $\beta 5i$  (LPM7) podenotami. Zaradi svoje substratne specifičnosti imata cP in iP različne fiziološke vloge in hkrati ustvarjata zelo raznolik nabor epitopov. Za slednje so pokazali, da je pomembno predvsem procesiranje, ki ga vrši iP, saj je izbitje iP v miškah vodilo v zelo okrnjeno raznovrstnost in tudi kvaliteto epitopov.<sup>3,4</sup>

Neustrezno delovanje proteasomov lahko vodi v razvoj številnih bolezni, kot so rakava, nevrodegenerativna in avtoimunska obolenja. V prejšnjem desetletju so bile na področju cP izvedene številne raziskave, ki so ga prepoznale kot potencialno terapevtsko tarčo, kar je posledično vodilo v razvoj njegovih inhibitorjev.<sup>5</sup> Danes se za zdravljenje malignih sprememb hematopoetskih celic uspešno uporabljata dva inhibitorja proteasomov: bortezomib in karfilzomib. Kljub temu, da sta obe zdravili učinkoviti, pa predstavlja velik problem razvoj rezistence in sistemske toksičnosti, kar je najverjetneje posledica obširnega izražanja cP tudi v nebolelih tkivih. Z namenom izboljšave farmakološkega pristopa so se raziskave v zadnjih letih preusmerile v **proučevanje selektivnih inhibitorjev iP**. To je privedlo do odkritja spojine PR-957, selektivnega **inhibitorja  $\beta 5i$  podenote iP**, ki je nakazal na vpletenost iP v številne bolezni.<sup>5-8</sup> V *in vitro* pogojih je uporaba PR-957 povzročila zmanjšano nastajanje interleukina (IL)-23 v aktiviranih monocitih ter zmanjšano nastajanje IFN $\gamma$  in IL-2 v celicah T.<sup>8</sup> Študije na živalskih modelih so pokazale, da zdravljenje s PR-957 izboljša znake inducirane revmatoidnega artritis, eksperimentalnega kolitisa, eritematoznega lupusa in Hashimotovega tiroiditisa. V povezavi s temi stanji

**Slika 1:** Struktura iP in substrati iP.

PR-957 vpliva na diferenciacijo in proliferacijo Th1 in Th17 celic, medtem ko na regulatorne T limfocite



so prav tako opazili znižanje celične infiltracije, izločanje citokinov in avto-protiteles. Ugotovili so, da PR-957 vpliva na diferenciacijo in proliferacijo Th1 in Th17 celic, medtem ko na regulatorne T limfocite nima vpliva. Poleg teh učinkov je z dodatkom PR-957 vidno do 50% znižanje izražanja receptorjev MHC I in odsotnost z  $\beta 5i$ -povezanih antigenov. Trenutna dognanja kažejo na to da, imajo **selektivni inhibitorji  $\beta 5i$  podenote večji terapevtski potencial** kot inhibitorji drugih podenot, predvsem za zdravljenje avtoimunskih in vnetnih obolenj.<sup>9,10</sup>

Kljub nedavnim ugotovitvam, da ima iP različne vloge v fizioloških in bolezenskih stanjih, je razumevanje njegovih funkcij in vpletenih molekularnih mehanizmov omejeno. Razlogi za to ležijo predvsem v pomanjkanju ustreznih molekularnih orodij za raziskave. Kot začetek odgovora na ta problem so bile v zadnjih letih na podlagi inhibitorjev proteasomov pripravljene fluorescentne probe, ki se vežejo v katalitično mesto različnih  $\beta$  podenot iP.<sup>11,12</sup> Izkazalo se je, da so te probe zelo primerne za funkcionalne študije in identifikacijo novih inhibitorjev, a niso komercialno dostopne. Dodatna težava večine molekularskih prob je, da se zaradi visoke strukturne homologije med iP in cP vežejo na oba proteasoma, kar posledično ovira študije njihovih **različnih funkcij**. Prav tako se večina prob trenutno uporablja v kombinaciji s SDS-PAGE tehniko, ki pa je običajno dolgotrajna in zahteva velike količine proteinskega vzorca. Iz tega je razvidno, da je potrebno razvoj nujno usmeriti v razvoj molekularskih prob, ki bodo **zelo specifične** za posamezne podenote iP (še posebej za njegovo  **$\beta 5i$  podenoto**) in se bodo lahko uporabljale tudi v kombinaciji z drugimi molekularnimi tehnikami. Tako bo omogočeno raziskovanje in pojasnitev funkcij, ki se nanašajo le na iP ali pa celo le na **eno izmed njegovih posameznih podenot**.<sup>11-14</sup>

## PREDSTAVITEV PROBLEMA

Epidemiološke študije kažejo na neprestano rast avtoimunskih obolenj v zahodnem svetu. Zaradi kompleksnosti imunskega sistema so avtoimunska obolenja izjemno heterogena in mehanizmi, ki vodijo v patološka stanja, ostajajo nepojasneni. Iz teh razlogov je postavljanje diagnoz zahtevno in časovno ter ekonomsko potratno. Še bolj težavno je zdravljenje takšnih stanj, saj terapija pogosto zajema le odpravljanje simptomov. Imunoproteasom (iP) nedvomno predstavlja ključno vlogo v oblikovanju tako

naravne kot pridobljene imunosti, zaradi česar se ponuja  **$\beta$ 5i podenota iP** kot **zanimiva tarča** in **prognostični/diagnostični označevalec**. Nadaljnji razvoj trenutno ovira pomanjkanje tako sistemskih študij, ki bi proučile delovanje iP, kot tudi orodij, ki bi omogočile analizo njegovega izražanja in aktivnosti (predvsem kadar imamo na voljo omejeno količino vzorca). Na podlagi natančnega pregleda stanja področja smo identificirali sledeče probleme:

- a. Pomanjkanje za  $\beta$ 5i podenoto iP selektivnih molekularnih prob, ki bi omogočile vrednotenje iP kot tarčo in/ali označevalec v avtoimunskih obolenjih.
- b. Pomanjkljivo znanje o molekularnih mehanizmih (pato)fizioloških stanj, pri katerih so različne podenote iP vpletene
- c. Pomanjkanje ustreznih *in vitro* celičnih modelov in metod za vrednotenje selektivnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP

Raziskovalno delo v okviru predlaganega projekta je organizirano tako, da ima **tri glavne cilje**. Vsak izmed teh ciljev je razdeljen v **dva delovna sklopa (DS)**, vsi DS skupaj pa so močno **prepleteni, interdisciplinarni** ter **medsebojno odvisni**.

## CILJI PREDLAGANEGA PROJEKTA

### CILJ 1: Razvoj selektivnih inhibitorjev $\beta$ 5i podenote iP in molekularnih prob

Kot je bilo omenjeno, je nabor selektivnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP zelo skop, hkrati pa so vsi ti inhibitorji peptidne narave. Za spojine tovrstnega strukturnega razreda je značilna **nizka biološko uporabnost** in **metabolna labilnost**. Člani programske skupine, ki je prijavitelj projekta, so nedavno identificirali prve selektivne, kovalentne in nepeptidne inhibitorje  $\beta$ 5i podenote iP, ki delujejo v nanomolarnem območju.<sup>15</sup> Za te spojine je bil podeljen tudi slovenski patent.<sup>16</sup> Ker želimo pridobiti spojine, ki bodo imele še boljšo celično permeabilnost, se bomo v tem segmentu osredotočili na iskanje inhibitorjev z ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Izpostaviti velja tudi dejstvo, da imajo prijavitelji projekta v sklopu sodelovanja s skupino iz Univerze v Leidnu na Nizozemskem dostop do najboljših peptidnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP, ki bodo v sklopu tega Cilja služili za primerjavo z razvitimi nepeptidnimi inhibitorji.

#### Virtualno reševanje in sinteza inhibitorjev

Za namen sidranja v  $\beta$ 5i podenoto bomo uporabili znani kristalni strukturi mišjega iP in humaniziranega glivnega iP.<sup>17</sup> Za virtualno reševanje visoke zmogljivosti (VHTS) bomo uporabili set spojin z 'drug-like' lastnostmi iz podatkovne baze ZINC, ki sestoji iz 13.75 milijonov spojin. Problematične spojine (slaba topnost in težnja k agregaciji) bomo izločili s pomočjo programske opreme FILTER, ki na podlagi strukturnih značilnosti posameznih spojin napove omenjene slabosti. Uporabili bomo različne programe molekularnega sidranja (LeadIT, FRED, AutoDock) in različne funkcije vrednotenja vezave v aktivno mesto (AutoDock, F-Score, LUDI, ChemScore). Spojine iz knjižnice bomo sidrali v aktivno mesto  $\beta$ 5i podenote, s čimer bomo izločili vse lege/pozicije, ki ne ustrezajo izbranim omejitvam (predvsem interakcija s Thr1). Ugodne lege sidranih spojin bomo ovrednotili s pomočjo evalvacijske funkcije Chemgauss4. Najboljše molekule bomo analizirali ter izbrali večji nabor spojin, ki jih bomo kupili ali sintetizirali. Celovita in obsežna sinteza spojin predstavlja zelo pomemben segment pri razvoju nove zdravilne učinkovine bodisi v akademskem okolju bodisi v industriji (tako se namreč ustvari **usmerjena knjižnica spojin**, ki omogoča proučevanje odnosa med strukturo in delovanjem). Glavni cilj sinteznega dela tekom predlaganega projekta bo pripraviti končne spojine v zadostnih količinah, da bodo lahko ustrezno ovrednotene v različnih farmakoloških testih.

Pri prijavi projekta *Validacija imunoproteasoma kot terapevtske tarče in razvoj inhibitorjev* smo opisali tri specifične cilje, pri čemer je CILJ 1 predviden za razvoj selektivnih inhibitorjev  $\beta$ 5i podenote iP in molekulskih prob. V tretjem obdobju projekta (marec-avgust 2018) smo se uspešno ukvarjali z nalogami, povezanimi s CILJEM 1 in med delom prišli do dodatnih in nepričakovanih rezultatov, ki kažejo, da bi inhibitorji, 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. Ena največji težav pri pojavu tuberkuloze, s katero je po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije okuženih približno 2 milijardi ljudi, je rezistenca na obstoječo terapijo z antibiotiki, zato nujno potrebujemo nova inovativna zdravila, ki bi ustavila globalno epidemijo. Znano je, da je za patogenost bakterije *Mycobacterium tuberculosis* med drugim odgovoren tudi proteasom, ki je zato zelo obetavna tarča za zdravljenje tuberkuloze.

Pri našem delu se je pokazalo, da sta mikobakterijski proteasom in humani imunoproteasom z molekulskega vidika izredno podobni tarči, zato je tudi razvoj inhibitorjev 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 tudi izvedbe predvidenih poskusov. Rezultati, pridobljeni na mikobakterijskem proteasomu bodo zaradi izredne podobnosti tarče zelo uporabni tudi v nadaljnjih raziskavah imunoproteasoma.

## METODE DELA

Predlagan projekt zajema široko znanstveno področje, zato bo pristop k reševanju problematike interdisciplinaren.

Glavne metode, ki se bodo uporabile tekom projekta, so:

Načrtovanje, sinteza in karakterizacija inhibitorjev ter molekulskih prob: nove spojine bomo pripravili z uporabo sodobnih tehnik farmacevtske kemije, ki bodo zajemale *in silico* modeliranje, na 3D strukturi proteina osnovano načrtovanje in kemijsko sintezo. Identiteto spojin bomo potrdili z ustreznimi spektroskopskimi metodami. Vezavo inhibitorjev in molekulskih prob v aktivno mesto bomo vrednotili z masno spektroskopijo. Inhibitorne sposobnosti in selektivnost/specifičnost novih spojin bomo vrednotili na izoliranem encimu cP in iP z uporabo specifičnih substratov (Suc-LLVY-AMC  $\beta$ 5c in  $\beta$ 5i, Boc-LRR-AMC  $\beta$ 2c in  $\beta$ 2i, Z-LLE-AMC za  $\beta$ 1c in Ac-PAL-AMC za  $\beta$ 1i).

*DS, ki zajemajo te metode, bodo izvedene pod vodstvom prof. dr. Stanislava Gobca, ki je član programske skupine P1-0208: Farmaceutska kemija: načrtovanje, sinteza in vrednotenje učinkovin.*

## RELEVANTNOST IN POTENCIALNI VPLIV REZULTATOV

Rezultati, ki bodo najbolj bistveno prispevali k znanosti, bo identifikacija novih inhibitorjev mikobakterijskega proteasoma.

S predlaganim projektom torej nameravamo **razviti pomembna in uporabna molekularna orodja** za vrednotenje tako (pato)fiziološke vloge mikobakterijskega proteasoma, kakor tudi njegovih inhibitorjev. Slednje je lahko ključnega pomena v razvoju novih strategij za zdravljenje tuberkuloze.

## **GLAVNI MEJNIKI PROJEKTA (PATENTI, ČLANKI, KONFERENCE)**

Rezultati bodo objavljeni v uglednih mednarodnih znanstvenih revijah z SCI faktorjem vpliva (zadnje leto projekta). Vodja projekta bo rezultate raziskav znanstveni javnosti predstavljal tudi na ustreznih konferencah, na katerih bo izsledke podal v obliki predavanj ali posterjev (drugo leto projekta). Zanimivosti, povezane s projektom, bodo predstavljene tudi širši laični javnosti, in sicer preko internetnih strani Univerze v Ljubljani, poljudnih člankov v dnevnikih, časopisih in revijah ter v obliki radijskih in televizijskih intervjujev.

## **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, infrastruktur 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 ustrežno 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 Farmaceutvska kemija: načrtovanje, sinteza in vrednotenje učinkovin' je odkrivanje novih bioaktivnih molekul, ki imajo potencial za nadaljnji razvoj do zdravilnih učinkovin 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.

Hkrati pa pomemben delovni segment programske skupine predstavlja tudi iskanje in preučevanje farmakološko pomembnih tarč, na katere lahko z optimiziranimi majhnimi molekulami delujemo in tako vplivamo na določen patološki proces. Imunoproteasom trenutno predstavlja eno izmed najbolj zanimivih tarč ne samo v akademskem okolju, temveč tudi v farmacevtski industriji. Rezultati, ki jih bomo pridobili s preučevanjem molekularnih mehanizmov, ki so kakorkoli povezani z modulacijo imunoproteasoma (kar je bistven del tega raziskovalnega projekta), lahko pomembno vplivajo na farmacevtsko-kemijske procese pri načrtovanju novih inhibitorjev.

Vzpostavljena infrastruktura torej omogoča komplementarno, kakovostno in pravilno usmerjeno delo, in sicer vse od začetnega načrtovanja inhibitorjev imunoproteasoma do razvoja novih metodologij, ki omogočajo vrednotenje pripravljenih spojin.

*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 koezijske 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.*