

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2012/34

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	L4-2188
Naslov projekta	Primerjalna genomika za ciljne izboljšave industrijskih sevov
Vodja projekta	13542 Hrvoje Petković
Tip projekta	L Aplikativni projekt
Obseg raziskovalnih ur	2780
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	2592 ACIES BIO, biotehnološke raziskave in razvoj, d.o.o.
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija 4.06.01 Tehnologija rekombinantne DNA
Družbeno-ekonomski cilj	06. Industrijska proizvodnja in tehnologija

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	2.09
- Veda	2 Tehniške in tehnološke vede
- Področje	2.09 Industrijska biotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek projekta²

SLO

FK506 je sekundarni metabolit iz skupine poliketidnih antibiotikov, ki je se uporablja kot imunosupresiv po transplantacijah organov in za zdravljenje vnetnih bolezni kože. Proizvodnja sekundarnih metabolitov se na svetovnem trgu meri v milijardah EUR letno, zato je zelo pomemben del farmacevtske industrije. Te spojine največkrat proizvajajo s pomočjo industrijskih

mikroorganizmov s povečano sposobnostjo proizvodnje ciljnih spojin. Tradicionalno so za pripravo visoko-donosnih industrijskih sevov uporabljali časovno potratne metode, ki so temeljile na ponavljajočih se ciklih naključne mutageneze in selekcije. Razvoj novih, hitrih in cenovno dostopnih metod sekvenciranja celotnih genomov predstavlja priložnost za primerjavo naravnih izolatov z dovršenimi visoko-donosnimi industrijskimi sevi. S pomočjo komparativne genomike lahko določimo število in tip mutacij ter tudi funkcijo genov, v katerih se mutacije pojavljajo.

Glavni cilj projekta je bil postaviti in preizkusiti nov pristop za razvoj izboljšanega seva *Streptomyces tsukubaensis*, ki proizvaja FK506, ki bi temeljil na analizi celotnega genoma

V začetni fazi projekta smo s pirosekvenciranjem pridobili genoma naravnega seva *S. tsukubaensis* in visokodonosnega industrijskega seva podjetja Lek/Sandoz. Zaporedni genomi sta nam omogočila identifikacijo ključnih regulatornih genov in biosinteznih poti, ki zagotavljajo osnovne gradbene enote za biosintezo FK506 ter vplivajo na donos te spojine. Identificirali smo več ključnih mutacij, ki so se nakopičile v postopkih izboljšave seva, za večje število predvidenih mutacij pa se je po re-sekvenciranju s klasično Sangerjevo metodo izkazalo, da so bile posledica napak pri metodi pirosekvenciranja.

Na podlagi genomskih podatkov smo identificirali ključne metabolnih poti, med drugimi pot za biosintezo enega od gradnikov FK506, alilmalonil-CoA. Z inaktivacijo enega od genov te metabolne poti smo razvili nov pristop za ekskluzivno biosintezo FK506 brez neželenih nečistoč, kar ima velik potencial za stroškovno učinkovitejši proizvodni postopek. Na podlagi teh rezultatov smo objavili dva znanstvena članka z visokim faktorjem vpliva, sofinancer, Lek/Sandoz pa je novi pristop zaščitil tudi s patentno prijavo (EP2272963). V sodelovanju z Univerzo v Leonu in raziskovalno skupino prof. Poklar-Urlih (Biotehniška fakulteta) smo tudi bistveno povečali razumevanje regulacije biosinteze FK506. V sodelovanju z Univerzo v Zagrebu smo v genomu identificirali genske skupine za biosintezo konkurenčnih metabolitov, ki s FK506 tekmujejo za iste gradnike. V povezavi s tem projektom je svoje raziskave izvajalo tudi več do- in podiplomskih študentov.

V okviru projekta smo testirali predložene pristope in postavili nove smernice za hitro in usmerjeno konstrukcijo novih industrijskih producentov s podporo genomike. Rezultati že imajo pomemben znanstveni vpliv in so neposredno uporabni tudi za industrijskega partnerja in sofinancerja, podjetje Lek/Sandoz.

ANG

FK506 is a secondary metabolite belonging to the class of polyketide antibiotics. It is currently used as immunosuppressant after organ transplantation and for treatment of inflammatory skin diseases. Production of secondary metabolites holds a worldwide market in billions of EUR annually and is thus of extreme importance for the pharmaceutical industry. These compounds are most often produced by industrial microorganisms with improved capabilities. Industrial high-producing strains have been obtained during intensive strain improvement programs using repeated cycles of random mutagenesis and selection. Whole genome sequencing studies represent a great research opportunity as natural progenitor strains and the industrial strains can finally be compared. Using comparative genomics, the number and type of mutations as well as the function of mutated genes can at last be efficiently identified.

The aim of this project was to set up and test a novel genome-based approach for development of an improved FK506-producing *Streptomyces tsukubaensis* strain based on the whole genome analysis.

In the initial stages of the project, the genomes of the natural and high-producing strain of *S. tsukubaensis* (property of Lek/Sandoz) were obtained by pyrosequencing. The genomic sequences allowed us to identify key regulatory genes and biosynthetic pathways, providing building blocks for FK506 biosynthesis as well as genes related to the yield of FK506.

We have identified several mutations, which have accumulated during the strain improvement program while interestingly, resequencing with the classical Sanger method also revealed that numerous predicted mutations were the consequence of pyrosequencing errors. Based on the genome data, we have identified several metabolic pathways, including the pathway for

biosynthesis of allylmalonyl-CoA, a building block of FK506. By inactivating one of the genes of this pathway we were able to develop a novel approach of exclusive biosynthesis of FK506 without impurities, with great potential for a more economical production procedure. Two articles were published in high-impact journals and the co-financer Lek/Sandoz filed a patent application (EP2272963). In addition, understanding of the regulation of FK506 biosynthesis was significantly increased in collaboration with prof. Poklar Urlih (Biotechnical faculty) and the University of Leon, and together with the University of Zagreb gene clusters for competing metabolites were identified in the genome, which use the same building blocks as FK506. Several graduate and undergraduate students have also carried out their research activities in the scope of the project.

Thus, we have used and further developed novel methods for fast and controlled design of new industrial strains using "genomics-driven metabolic engineering". The obtained results already have important scientific impact and applicable value for the co-financer, Lek/Sandoz.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

V sklopu projekta »Primerjalna genomika za ciljne izboljšave industrijskih sevov« smo testirali nove pristope za hitro in usmerjeno spreminjanje genotipov industrijskih organizmov s pomočjo »metabolnega inženiringa s podporo genomike«. Kot vzorčni primer smo izbrali bakterijo *Streptomyces tsukubaensis*, ki proizvaja FK506, enega najpomembnejših imunosupresantov, ki se uporablja po presaditvah organov. Eksperimentalni cilji projekta so bili (a) sekvenciranje genoma izhodnega seva divjega tipa in izboljšanega visoko-donosnega industrijskega seva za primerjalne genomske analize, (b) identifikacija ključnih genov in metabolnih poti, ki sodelujejo pri biosintezi FK506, (c) izvedba študije transkriptoma v omejenem obsegu, (d) analiza izražanja in funkcije genov, ki se nahajajo znotraj FK506 genske skupine in proučitev ključnih regulatornih elementov, (e) z uporabo metabolnega inženiringa optimizirati sev *Streptomyces tsukubaensis*, z namenom povečanja donosa FK506 in (f) analizirati prisotnost genskih skupin za biosintezo drugih poliketidov v genomu *S. tsukubaensis*.

V prvem letu izvajanja projekta (2009) smo pridobili sekvenco praktično celotnega genoma *S. tsukubaensis* NRRL18488, kar je bil cilj delovnega sklopa WP2. Lek/Sandoz je v okviru delovnega sklopa WP1 pridobil sekvenco genoma svojega industrijskega visokodonosnega seva *S. tsukubaensis*. Na podlagi pridobljenih podatkov smo v letu 2010 z različnimi bioinformatскими programi sistematično identificirali metabolne poti in s analizirali razlike med obema genomoma. Različne družine proteinov v genomu smo identificirali z javno dostopnima programoma Pfam in HmmSearch. Identificirali smo gene, ki kodirajo encime različnih metabolnih poti, ki vodijo do gradnikov za biosintezo FK506, na primer, biosinteza podaljševalnih enot malonil-CoA in metilmalonil-CoA, biosinteza šikimata, in biosinteza pipekolne kisline (WP4). Po preverjanju identificiranih mutacij s klasično Sangerjevo metodo sekvenciranja, smo ugotovili, da gre v določenem delu tudi za napake tehnike pirosekvenciranja. Te napake predstavljajo precejšnjo oviro pri hitri uporabi rezultatov primerjalne genomike za razumevanje razlik med naravnimi in visokodonosnimi mikrobnimi sevi. Največji uspeh projekta v letu 2010 je bila identifikacija doslej nepoznane metabolne poti za biosintezo nenavadne podaljševalne enote alilmalonil-CoA. V to biosintezno pot so vključeni geni genske podskupine »all«, ki smo jih s pomočjo sekvence genoma (WP2) identificirali na levem robu genske skupine za FK506. Odkritje smo objavili v reviji z visokim faktorjem vpliva (Goranovic et al., J Biol Chem. 2010: 285, 14292-300). V letu 2010 smo pripravili tudi kozmidno knjižnico genomske DNA (WP3).

V sodelovanju s partnerji na Univerzi v Zagrebu (skupina prof. Dr. Hranuelija) smo bistveno izboljšali kakovost genomske sekvence, ki smo jo prejeli od komercialnega ponudnika, zlasti na področjih multimodularnih genov za poliketid sintaze. Skupaj s to

skupino smo v letu 2010 tudi preverili prisotnost genskih skupin za biosintezo drugih poliketidov in cikličnih neribosomskih peptidov. Ugotovili smo, da genom *S. tsukubaensis* vsebuje poleg genske skupine za FK506 še tri genske skupine za biosintezo poliketidov in 6 genskih skupin za biosintezo neribosomskih peptidov. S programom ClustScan samo lahko predvideli strukturo dveh poliketidnih spojin. Z metodo RT-PCR smo potrdili tudi aktivno transkripcijo genov iz ene od genskih skupin, kar nakazuje, da gre za funkcionalne in aktivne genske skupine (WP5). Članek, v katerem bomo v soavtorstvu objavili rezultate tega dela projekta, je trenutno v pripravi.

Posebno pozornost smo namenili regulatornim genom FkbN, AsnC in LysR, ki regulirajo prepisovanje ostalih genov in tudi produkcijo FK506 (WP6, WP7). V sodelovanju z Univerzo v Leonu smo izvedli transkripcijsko analizo ključnih genov z real-time PCR, pri čemer smo veliko naporov vložili v razvoj gojišča, ki omogoča izolacijo mRNA, hkrati pa v njem *S. tsukubaensis* vseeno proizvaja FK506. Ti eksperimenti so bistveno izboljšali naše razumevanje regulacije biosinteze FK506, kar je tudi osnova za znanstveni članek.

Na osnovi pridobljenih informacij smo v okviru WP8 izbrali dve skupini genov (operona), za kateri smo predvideli, da bosta povečali produkcijo FK506 v sevu divjega tipa. S prvim genskim konstruktom smo čezmerno izrazili štiri gene iz *all* genske skupine in ugotovili, da se je proizvodnja FK506 povečala. Druga skupina genov, ki omogoča povečanje donosa FK506 pa je del primarnega metabolizma in je povezana z asimilacijo acetata.

Poleg povečanja donosa FK506 je ključni dejavnik izboljšanja industrijskega procesa za proizvodnjo FK506 tudi izboljšanje profila nečistoč. Hkrati s FK506 sev *S. tsukubaensis* proizvaja tudi nekaj strukturno zelo podobnih spojin, na primer FK520, katerih prisotnost v brozgi zahteva uporabo kompliciranih in dragih postopkov za izolacijo. Eden od ciljev v WP8 je bil zato tudi razvoj novih biosinteznih pristopov na podlagi genomskih podatkov, ki bi omogočili inaktivacijo biosinteze strukturnih analogov FK506. Z inaktivacijo enega od genov novoodkrite biosintezne poti za alilmalonil-CoA in dohranjevanjem sintetičnega prekursorja alilmalonil-SNAC smo razvili pristop, ki omogoča ekskluzivno biosintezo FK506 brez neželenih nečistoč. Sofinancer projekta Lek/Sandoz je pristop patentno zaščitil (EP2272963 A1), raziskovalci Acies Bio in Lek/Sandoz pa smo na podlagi teh rezultatov objavili tudi znanstveni članek v eni najuglednejših revij na področju metabolnega inženirstva z visokim faktorjem vpliva (Kosec et al., Metab Eng. 2012, 14:39-46). Ti rezultati predstavljajo velik napredek na področju razumevanja biosinteze poliketidov, hkrati pa imajo potencial za povečanje učinkovitosti biosinteznega procesa, ki poteka v slovenski farmacevtski družbi.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

V letu 2009 smo po načrtu uspešno zaključili delovna sklopa WP1 in WP2. V WP1 in WP2 smo smo predvideli sekveniranje genomov naravnega in visokodonosnega seva bakterije *Streptomyces tsukubaensis*, ki proizvaja FK506. Vzpostavili smo ustrezno bioinformacijsko podporo za analizo pridobljenih sekvenc. V letu 2010 smo pripravili kozmidno knjižnico genomske DNA, predvsem pa smo se po načrtu posvetili anotaciji metabolnih poti in primerjavi obeh genomov ter iskanju razlik med njima (WP4). V sodelovanju z Univerzo v Zagrebu smo na podlagi pridobljenih sekvenc genoma identificirali genske skupine za biosintezo sekundarnih metabolitov (WP5). Ta delovni sklop je trajal nekoliko dlje, saj je bilo treba najprej z bioinformacijskimi metodami sestaviti regije genoma, kjer se te skupine nahajajo, nato pa bioinformacijske hipoteze še potrditi s PCR in sekvenciranjem. Z metodo RT-PCR smo tudi potrdili, da se geni ene od identificiranih genskih skupin v uporabljenih laboratorijskih pogojih uspešno prepisujejo in je torej genska skupina aktivna. Na podlagi rezultatov trenutno pripravljamo znanstveni članek.

Z namenom preučevanja delovanja potencialnih regulatornih genov, ki se nahajajo v genski skupini za FK506 smo predložili smo dva pristopa (WP6 in WP7). Z upotabo pristopa WP6, pri katerem smo preučevali transkripcijo ključnih regulativnih, kot tudi biosinteznih genov iz genske skupine za biosintezo FK506, smo uspeli določiti vlogo potencialnih regulatornih genov (WP6). Pristop, ki smo ga predlagali v sklopu WP7 (izolacija proteinov potencialnih regulatornih genov in študije vezave na DNA), ni bil uspešen. V letu 2010 smo naredili tudi velik premik na transkripcijski analizi genov iz *S. tsukubaensis* z različnimi metodami. Osredotočili smo se zlasti na regulatorne gene v genski skupini FK506. Delo v sklopu WP6 smo opravili v sodelovanju z Univerzo v Leonu. Delo v sklopu WP6, v katerem smo s pomočjo reporterskega gena *rppA*, ki kodira kaskadno sintazo ovrednotili izražanje regulatornih genov in transkripcijskih analiz s pomočjo RT-PCT je v popolnosti uspelo (publikacija poslana v objavo).

Zelo uspešno smo opravili tudi aktivnosti v delovnem sklopu WP8. Na podlagi podatkov genomskih raziskav smo razvili smo nov pristop za biosintezo FK506, ki omogoča proizvodnjo te zdravilne učinkovine brez prisotnosti strukturno podobnih nečistoč. S pomočjo močnega promotorja smo tudi izrazili gene, ki glede na primerjalno genomsko analizo vplivajo na biosintezo gradnikov za FK506. Nekateri izmed teh genov so se pokazali kot zelo obetavni za povečanje donosa FK506.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Tekom izvedbe projekta ni bilo bistvenih sprememb programa raziskovalnega projekta.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3754104	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Identifikacija genov za biosintezo alilne skupine v FK506
		ANG	Origin of the Allyl group in FK506 biosynthesis
	Opis	SLO	Fk506 je sekundarni metabolit z močnimi imunosupresivno aktivnostjo in je trenutno registriran za uporabo kot imunosupresant pri presaditvi organov. Kljub temu je mehanizem njegove biosinteze ostal v veliki meri nepojasnen. V tem članku smo identificirali prej nepoznano regijo genske skupine za biosintezo FK506 iz bakterije <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488, ki vsebuje gene za zagotavljanje nenavadnih gradnikov. Ugotovili smo, da geni iz genske podskupine »all« kodirajo biosintezo podaljševalne enote, alilmalonil-CoA, ki je vir alilne skupine na ogljikovem atomu C21 spojine FK506. Za biosintezo nenavadne podaljševalne enote alilmalonil-CoA je ključen majhen neodvisen encim diketid-sintaza. Na osnovi identificirane genske podskupine so raziskovalci Acies Bio in Lek Sandoz/ pripravili patentno prijavo za vložitev pri evropskem patentnem uradu, saj je del rezultatov neposredno uporaben za izboljšanje proizvodnega postopka za FK506.
		ANG	FK506 is a secondary metabolite with a potent immunosuppressant activity, currently registered for use after organ transplantation. Nevertheless, many aspects of its biosynthesis remained unclear. In this article, we report the identification of a previously unknown region of the FK506 gene cluster from <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488 containing genes encoding provision of the unusual building blocks. We identified a group of genes, termed the "all" subcluster encoding biosynthesis of the extender unit allylmalonyl-CoA which provides the allyl group at C21 carbon atom of FK506. Interestingly, a small independent enzyme diketide synthase was identified to be involved

			in the biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit. Based on the newly identified genes researchers of Acies Bio and Lek Sandoz prepared a patent application to be filed at EPO, as a part of the work described in this research article is directly applicable for FK506 process improvement.
	Objavljeno v		American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2010; Vol. 285, no. 19; str. 14292-14300; Impact Factor: 5.328; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.787; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Goranovič Dušan, Kosec Gregor, Mrak Peter, Fujs Štefan, Horvat Jaka, Kuščer Enej, Kopitar Gregor, Petković Hrvoje
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	3988600	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nov kemobiosintezni pristop za ekskluzivno proizvodnjo FK506
		ANG	Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506
	Opis	SLO	V tej publikaciji smo opisali razvoj novega bioprocesa, ki edini omogoča ekskluzivno biosintezo/proizvodnjo imunosupresiva FK506 (takrolimus), ne da bi hkrati nastajali tudi strukturno zelo podobni spojini FK520 in dihidro-FK506. Pri tradicionalnih bioprocseh za proizvodnjo FK506 količina teh dveh nečistoč predstavlja od 10 do 20 % nastalega FK506, kar zlasti zaradi velike strukturne podobnosti spojin predstavlja velik problem pri izolaciji čistega FK506 za uporabo v farmaciji. Izolacija z industrijskim HPLC močno poveča ceno končnega izdelka in predstavlja okoljski problem zaradi velike količine uporabljenih organskih topil. Novi proces temelji na ciljani genski spremembi seva <i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488, v katerem smo prekinili oskrbo z gradbenimi enotami za poliketid sintazo. Fermentacijskim brozgam s spremenjenim sevom smo nato dodajali sintetični analog podaljševalne enote alilmalonil-CoA. Na osnovi teh rezultatov je Sandoz/Lek d.d. vložil vlogo pri evropskem patentnem uradu (EP2272963).
		ANG	In this article we report the development of a novel bioprocess which enables exclusive biosynthesis/production of the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) without simultaneous production of two structurally very similar compounds FK520 and dihydro-FK506. Traditional bioprocesses for production of FK506 result in the levels of these two by-products between 10 and 20% of the produced FK506, which due to great structural similarity of the compounds hampers the isolation of FK506 for use in pharmaceutical industry. Purification using industrial HPLC greatly increases the price of the final product as well as the environmental burden due to large amounts of organic solvents used. The novel process is based on the targeted genetic modification of the strain <i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488 in which the supply of building blocks for polyketide synthase was abolished. Fermentation broths of the modified strain were then supplemented with a synthetic analogue of the allylmalonyl-CoA extender unit. Based on these results, Sandoz/Lek d.d. filed an application at the European Patent Office (EP2272963).
	Objavljeno v		Elsevier; Metabolic engineering; 2012; Vol. 14; str. 39-46; Impact Factor: 5.512; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.772; A': 1; WoS: DB; Avtorji / Authors: Kosec Gregor, Goranovič Dušan, Mrak Peter, Fujs Štefan, Kuščer Enej, Horvat Jaka, Kopitar Gregor, Petković Hrvoje
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	3811960	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Robusten reporterski sistem na osnovi gena rppA za kalkon-sintazo iz <i>Saccharopolyspora cerzthraea</i>
		ANG	Robust reporter system based on chalcone synthase rppA gene from <i>Saccharopolyspora erythraea</i>

Opis	SLO	V tem članku je bil razvit robusten in široko uporaben reporterski sistem, pripravljen na osnovi gena rppA iz bakterije <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . Uporabnost tega reporterskega sistema je bila dokazana z izražanjem gena rppA pod kontrolo različnih heterolognih promotorjev, npr. actII-ORF4/PactI, ermE in njegove močnejše variante ermE*. Enostavnost in robustnost reporterskega sistema, celo v industrijskih pogojih, kaže na zelo velik potencial za široko uporabo v različnih gostiteljih in aplikacijah, kot tudi predstavlja novo generično gensko orodje, uporabno v širši akademski skupnosti.
		In this article was developed a robust and versatile reporter system based on the rppA gene from <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . The applicability of the reporter system has been demonstrated by expressing the rppA gene under the control of the heterologous promoters actII-ORF4/PactI, ermE and its upregulated variant ermE*. The simplicity and robustness of the system, demonstrated even in industrial settings, shows great potential for wider use in different microbial hosts and applications, and may thus represent a new generic and versatile tool useful to a wider scientific community.
	ANG	
	Objavljeno v	Elsevier; Journal of microbiological methods; 2010; Vol. 83; str. 111-119; Impact Factor: 2.018; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.177; WoS: CO, QU; Avtorji / Authors: Magdevska Vasilka, Gaber Rok, Goranovič Dušan, Kuščer Enej, Boakes Steve, Duran Alonso Maria Beatriz, Santamaría Ramon, Raspor Peter, Leadlay Peter Francis, Fujs Štefan, Petković Hrvoje
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine²

Družbenoekonomsko relevantni dosežki			
1.	COBISS ID		3888760
	Vir: COBISS.SI		
	Naslov	SLO	Razvoj novega biosinteznega pristopa za FK506
		ANG	Process for preparation of tacrolimus
	Opis	SLO	V sodelovanju s farmacevtskim podjetjem Lek/Sandoz, sofinancerjem tega projekta, smo sodelovali na razvoju novega pristopa za proizvodnjo farmacevtske generične učinkovine FK506 (takrolimus). Identifikacija genov v genski podskupini »all« je raziskovalcem Acies Bio in Lek/Sandoz pomagala pri zasnovi in razvoju izboljšanega pristopa za biosintezo FK506. Lek/Sandoz je na podlagi skupnih raziskav vložil patentno aplikacije pri Evropskem patentnem uradu.
		ANG	In the collaboration with Lek/Sandoz, the co-financer of this project, we collaborated on the development of a novel approach for production of the generic compound FK506 (takrolimus). Identification of the genes in the "all" genetic subcluster helped the researchers of Acies Bio and Lek/Sandoz in designing and developing an improved approach for FK506 biosynthesis. Based on the results of the joint research work, Lek/Sandoz filed a patent application at the EPO.
	Šifra		F.32 Mednarodni patent
2.	Objavljeno v		World Intellectual Property Organization; 2011; 6 str.; Avtorji / Authors: Petković Hrvoje, Kuščer Enej, Fujs Štefan, Kopitar Gregor, Mrak Peter
	Tipologija		2.23 Patentna prijava
	COBISS ID		3997816
	Vir: COBISS.SI		
	Naslov	SLO	Vabljen predavanje na konferenci »Biosynthetic and metabolic engineering

			in industrial drug and process development«.
		ANG	New insights into substrate supply and regulation of FK506 biosynthesis and their implications for bioprocess development and drug discovery
	Opis	SLO	Gregor Kosec je vodil industrijski projekt s podjetjem Lek/Sandoz, v okviru katerega smo pridobili znanje z velikim potencialom za industrijsko uporabo. Gregor Kosec bil zato povabljen, da rezultate na področju novega bioprocasa za proizvodnjo FK506 predstavi na Drugi letni konferenci Centra odličnosti CIPKEBIP "Biosynthetic and metabolic engineering in industrial drug and process development." Na konferenci je imel predavanje z naslovom: »New insights into substrate supply and regulation of FK506 biosynthesis and their implications for bioprocess development and drug discovery.«
		ANG	Gregor Kosec led an industrial project in collaboration with the company Lek/Sandoz which generated results with big potential for industrial use. Therefore, he was invited to present his results in the field of the novel bioprocess for production of FK506 at the Second annual conference of the CIPKEBIP centre of excellence »Biosynthetic and metabolic engineering in industrial drug and process development." At the conference he gave a lecture with the title: »New insights into substrate supply and regulation of FK506 biosynthesis and their implications for bioprocess development and drug discovery.«
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	CIPKEBIP, Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov; 2011; Avtorji / Authors: Kosec Gregor	
	Tipologija	3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Metodološki pristopi, ki so bili razviti v tem raziskovalnem projektu, se koristijo tudi v pedagoškem procesu, in sicer v okviru laboratorijskih vaj za študente 1. in 2. bolonjske stopnje študija biotehnologije. Tekom izvedbe projekta sta bili opravljeni tudi dve diplomski nalogi:

1. HORVAT, Marinka. Vloga krotonil-CoA reduktaze/karboksilaze iz primarnega metabolizma v biosintezi FK506 pri *Streptomyces tsukubaensis* : diplomsko delo = Role of crotonyl-CoA reductase/carboxylase from primary metabolism in the biosynthesis of FK506 in *Streptomyces tsukubaensis* : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 66). Ljubljana: [M. Horvat], 2011. XIII, 70 f., [7] f. pril., ilustr., preglednice. [COBISS.SI-ID 6882425]

2. JELEN, Vid. Vpliv homologov krotonil-CoA karboksilaze/reduktaze na asimilacijo acetata pri *Streptomyces tsukubaensis* : diplomsko delo = The role of crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologues upon acetate assimilation by *Streptomyces tsukubaensis* : graduation thesis, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 67). Ljubljana: [V. Jelen], 2011. XIII, 72 f., [2] f. pril., ilustr., preglednice. [COBISS.SI-ID 6882681]

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

V realizaciji projekta »Primerjalna genomika za ciljne izboljšave industrijskih sevov« so sodelovale tri različne institucije, Biotehniška fakulteta (BF) ter podjetji Acies Bio in Lek/Sandoz, ki jih združuje povečevanje znanja oziroma ekspertize v smeri razvoja novih metod, tehnologij in pristopov za izboljševanje industrijskih sevov oz. tehnologij. Poglavitni fokus raziskovalcev BF in AciesBio v sklopu tega projekta je bilo predvsem sodelovanje pri R&D aktivnostih, ki so jih izvajali raziskovalci Lek/Sandoz. Rezultati tega projekta so bili usmerjeni aplikativno, zlasti v

razvoj seva *S. tsukubaensis* in preverjanje tehnologije s pristopom primerjalne genomike. Nove izboljšane, cenovno dostopnejše in hitre metode sekvenciranja DNA so odprle nove razsežnosti na področju raziskav industrijsko pomembnih metabolitov. Tako je postal metabolni inženiring, ki temelji na podatkih pridobljenih iz primerjave celotnih genomov, realna možnost za uporabo pri izboljševanju različnih industrijsko in medicinsko pomembnih sevov. V našem projektu smo že pridobili celotni DNA zaporedji genomov divjega in visoko-donosnega industrijskega seva producenta imunosupresiva FK506, *Streptomyces tsukubaensis*. S pomočjo sekvenc genomov, ki smo ju pridobili leta 2009, smo identificirali novo biosintezno pot za podaljševalno enoto alilmalonil-CoA. Ta metabolna pot je že odprla nove možnosti na področju metabolnega in biosinteznega inženirstva in omogočila razvoj novega pristopa za biosintezo FK506 brez nečistoč. Poleg tega smo identificirali tudi nove regulatorne poti, ki vplivajo na povečan donos FK506. Identificirali smo tudi genske skupine, ki kodirajo neželene paralelne poti, ki vodijo do nastanka »konkurenčnih« spojin, ki porabljajo iste gradnike kot FK506. Na osnovi eksperimentalnih rezultatov tega projekta smo objavili dva članka z visokim faktorjem vpliva. Članek o novi biosintezni poti smo objavili v reviji *The Journal of Biological Chemistry*. Članek, ki opisuje nov pristop za biosintezo FK506 na podlagi inaktivacije enega od genov te biosintezne poti smo objavili v reviji *Metabolic Engineering*, ki je ena najuglednejših na področju metabolnega inženirstva. Predvidevamo, da bomo v letu 2012 objavili še dva članka na temo novoodkritih genskih skupin za »konkurenčne« spojine in regulatornih poti, ki vplivajo na biosintezo FK506.

ANG

“Comparative genomics for targeted industrial strain improvement” was a collaborative project of three institutions, the Biotechnical Faculty (BF) of the University of Ljubljana, Lek/Sandoz pharmaceutical company and a biotech SME Acies Bio. The three were joined in the effort to increase understanding and expertise in the field of novel methods, technologies and approaches for improvement of industrial strains and technologies. The main focus of researchers from BF and Acies Bio has been the collaboration in R&D activities carried out by Lek/Sandoz. The results of this project are aimed towards application, especially in development of the industrial bioprocess for production of FK506 strain and evaluation of the technology by comparative genomics approach.

Novel improved, economical and rapid methods for DNA sequencing have opened new horizons in the field of research of industrially important metabolites. Whole-genome-based metabolic engineering has become a realistic approach in improvement of medicinally and industrially important microbial strains. In the course of our project we have obtained whole genome sequences of wild type and industrial overproducing strain of the immunosuppressive compound FK506 producing organism *Streptomyces tsukubaensis*. Taking advantage of the genomic sequences, obtained in 2009, we have already identified a novel biosynthetic pathway for provision of allylmalonyl-CoA extender unit. This pathway opened new opportunities in the field of metabolic and biosynthetic engineering and enabled the development of a novel approach for production of FK506 without impurities. In addition, new regulatory pathways have been identified which contribute to higher yield of FK506. We have also identified gene clusters encoding undesired parallel pathways which lead to the biosynthesis of “competitive” compounds which consume the same precursors as FK506.

Based on the results of this project two (2) articles were published in high impact factor journals. The first one describes the novel biosynthetic pathway in the highly rated *Journal of Biological Chemistry* and the second one describes a novel biosynthetic approach for FK506, based on the inactivation of one of the genes of this metabolic pathway. This article was published in the journal *Metabolic engineering*. Two additional articles are expected to be published in 2012, covering the identified gene clusters for “competitive” compounds and the regulatory pathways involved in FK506 biosynthesis

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

V slovenskem okolju delujeta dve večji uspešni farmacevtski družbi s fermentacijskimi proizvodnimi kapacitetami, ki proizvajata več pomembnih zdravilnih učinkovin. Zaradi ekonomskih zahtev po povečanem donosu ter strogih zakonodajnih zahtev glede kakovosti produktov in prisotnosti nečistoč proizvodne bioprocese in seve nenehno izboljšujejo tako s postopki naključne mutageneze (kemijski mutageni ali UV-svetloba) in selekcijo kot z genskim inženirstvom. Metode klasične izboljšave sevov so se skozi leta izkazale za zelo uspešne, saj se

je pri marsikaterem sevu donos ciljnega metabolita glede na izhodni sev povečal za več stokrat. Žal pa pri klasičnem izboljševanju sevov ne dobimo nobene informacije o vzrokih za izboljšane lastnosti. V sklopu tega projekta smo s pristopom primerjalne genomike identificirali metabolne poti, ki vplivajo na povečanje donosa FK506. Identificirali smo nekaj ključnih prej nepoznatih metaboličnih poti, poleg tega pa smo razvili tudi nove pristope, ki kažejo obetaven potencial za bistveno zmanjšanje stroškov proizvodnje pri industrijskem partnerju Lek/Sandoz.

Tako klasični kot genski pristop k izboljšanju mikrobnih sevov predstavljata tudi poglobljeno dejavnost mladega biotehnološkega podjetja Acies Bio, ki deluje v Tehnološkem parku Ljubljana in v projektu sodeluje kot soizvajalec. Na podlagi rezultatov, ki so med drugim nastali tekom tega projekta so raziskovalci Acies Bio in Lek/Sandoz vložili patentno prijavo, ki zajema izboljšan proizvodni proces za FK506 (EP2272963 A1). To je še povečalo ekspertizo raziskovalcev Acies Bio in utrdilo sloves mladega podjetja kot kompetentnega partnerja pri raziskavah in razvoju. Pričakujemo, da bo imelo uspešno sodelovanje z velikim farmacevtskim podjetjem Lek/Sandoz velik vpliv na poslovanje podjetja v prihodnje.

Pri izvedbi projekta sodelujejo tudi dodiplomski in podiplomski študenti Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, ki pridobivajo dragoceno znanje o raziskavah v realnem industrijskem okolju. V prvem letu je bil velik poudarek na obdelavi podatkov, ki smo jih pridobili s sekveniranjem genoma *S. tsukubaensis*. Študenti so se pri delu seznanili s sodobnimi bioinformacijskimi metodami in programi za obdelavo celotnih genomov, ki jih raziskovalci v industriji pri svojem delu že uporabljajo. V okviru projektnih aktivnosti sta v letih 2010 in 2011 svoji diplomski nalogi izvedla in zagovarjala dva študenta Biotehniške fakultete. Trenutno so v zaključnih fazah svojega študija še dva doktorska študenta in ena dodiplomska študentka Biotehniške fakultete in ena študentka Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

ANG

Two larger and successful pharmaceutical companies with fermentation production facilities are located in Slovenia. Production bioprocesses and microbial strains are being continuously improved due to economic demands for increased yield and strict legislation on product quality and impurity profile. Classical random mutagenesis (chemical mutagens, UV-light) and selection as well as genetic engineering are being used. Classical mutagenesis has been proven to be a very successful method, as many industrial strains have had target metabolite yields increased by several hundred-fold than the corresponding wild type strain. Unfortunately, no information about the reasons for improved properties are obtained using classical approach. In the scope of this project a comparative genomics approach has been used to determine which metabolic pathways influence the increase of FK506 yield. Several previously unknown metabolic pathways have already been found to have key importance for FK506 yield increase and novel approaches have been designed that may enable significant reduction of production cost for the industrial partner Lek/Sandoz.

Classical as well as genetic approach of microbial strain improvement are also among most important activities of Acies Bio, a young biotech company located in Ljubljana Technology Park and actively participating in implementation of the project. Based also on the results of this project researchers of Acies Bio and Lek/Sandoz have filed a patent application covering the improved production process of FK506 (EP2272963 A1). This has increased the expertise of Acies Bio researchers as well as established the reputation of Acies Bio as a competent R&D partner. Successful collaboration with a big pharmaceutical company Lek/Sandoz is expected to have a big impact on the company in the future.

Undergraduate and graduate students of the Biotechnical faculty of the University of Ljubljana are also involved in some aspects of this project, and are thus able to obtain important knowledge about research in industrial environment. In the first year, they mainly focused on processing of data obtained by the sequencing of *S. tsukubaensis* genome. The students introduced themselves to modern bioinformatic methods and programs used for processing whole genomes, already used by researchers in industrial environment. In 2010 and 2011 two diploma theses have been carried out and defended by students of the Biotechnical faculty of the University of Ljubljana. Currently, two PhD students and one undergraduate student from the Biotechnical faculty and one undergraduate student from the Faculty of chemistry and chemical technology are finalizing their theses, related to the activities of this project.

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere

konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

12.Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	

G.01.03.	Drugo:						
G.02	Gospodarski razvoj						
G.02.01.	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu						
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov						
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje						
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije						
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti						
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost						
G.02.07.	Večji delež izvoza						
G.02.08.	Povečanje dobička						
G.02.09.	Nova delovna mesta						
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih						
G.02.11.	Nov investicijski zagon						
G.02.12.	Drugo:						
G.03	Tehnološki razvoj						
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti						
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti						
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij						
G.03.04.	Drugo:						
G.04	Družbeni razvoj						
G.04.01.	Dvig kvalitete življenja						
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja						
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave						
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti						
G.04.05.	Razvoj civilne družbe						
G.04.06.	Drugo:						
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete						
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj						
G.07	Razvoj družbene infrastrukture						
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura						
G.07.02.	Prometna infrastruktura						
G.07.03.	Energetska infrastruktura						
G.07.04.	Drugo:						
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva						
G.09.	Drugo:						

Komentar

--

13.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	Sofinancer		
1.	Naziv	Lek d.d.	
	Naslov	Verovškova 57, 1526 Ljubljana	
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:	36.340,01	EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:	25	%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.	Patentna prijava na Evropskem patentnem uradu z naslovom "Process for preparation of tacrolimus (EP2272963 A1) "	F.32
	2.	Znanstveni članek z naslovom "Origin of the Allyl group in FK506 biosynthesis"	A.01
	3.	Znanstveni članek z naslovom "Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506"	A.01
	4.		
	5.		
Komentar	Raziskave genomov industrijskih bakterijskih sevov za proizvodnjo sekundarnih metabolitov postajajo vse pomembnejše za hiter in učinkovit razvoj novih proizvodnih sevov in bioprosesov. Poznavanje genoma postaja eden od temeljev za načrtovanje razvojnih aktivnosti. Aplikativni projekt "Primerjalna genomika za ciljne izboljšave industrijskih sevov" je imel pomembno vlogo pri vzpostavljanju tesnega sodelovanja raziskovalcev Biotehniške fakultete in podjetja Acies Bio z raziskovalci Lek Sandoz. V okviru projekta smo pridobili zaporedji genomov naravnega seva in našega industrijskega seva <i>Streptomyces tsukubaensis</i>, ki ga v Leku uporabljamo za fermentativno proizvodnjo imunosupresiva FK506. Na podlagi poznavanja genoma so raziskovalci Lek/Sandoz in Acies Bio razvili nov inovativen pristop za kemo(biosintezo) produkcijo te učinkovine brez neželenih nečistoč oziroma analogov. Razvita rešitev ima tudi industrijski potencial, zato je Lek/Sandoz za omenjeni pristop vložil patentno prijavo na Evropskem patentnem uradu (EPO) oziroma pri Svetovni organizaciji za intelektualno lastnino (WIPO) (EP2272963 A1). Novi pristop temelji na prej nepoznanih genih in metabolnih poteh za oskrbo gradbenih enot FK506, zato smo rezultate tudi objavili v dveh znanstvenih člankih. Odkrite zakonitosti bodo pomembne tudi za prihodnji razvoj sorodnih bakterijskih sevov, ki proizvajajo biosintezo podobne zdravilne učinkovine.		
	V sklopu tega projekta smo v sodelovanju z raziskovalci Biotehniške fakultete in Acies Bio s pristopom primerjalne genomike identificirali metabolne poti, ki vplivajo na biosintezo in donos bioaktivne učinkovine FK506, ki jo proizvaja Lek/Sandoz in ima zato komercialni interes poglobiti razumevanje in izboljšati učinkovitost biosinteze učinkovine FK506. Identificirali smo tudi nove metabolne poti, ki vplivajo na biosintezo nečistoč, ki bistveno povečujejo stroške izolacije zelene spojine. Na podlagi pridobljenega znanja so raziskovalci Lek/Sandoz in		

		Acies Bio razvili nov pristop za biosintezno proizvodnjo FK506, ki rešuje problem nastajanja strukturno podobnih nečistoč. Pristop smo patentno zaščitili (EP2272963 A1).
	Ocena	Sofinanciranje projekta s strani Lek/Sandoz je spodbudilo obojestranski pretok znanja in ekspertiz med Biotehniško fakulteto, Acies Bio in Lekom na področju teh razvijajočih se disciplin, kar bo imelo v prihodnje pozitiven vpliv tako na znanja raziskovalne skupine Lek/Sandoz kot tudi na obe raziskovalni organizaciji, ki sta izvedli velik del projektnih aktivnosti.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Hrvoje Petković

ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana, 13.3.2012

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2012/34

¹ Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen, kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno ekonomsko relevantnega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2012 v1.00

F2-97-F0-34-5F-A8-C4-6F-4B-5D-97-98-6A-AA-EE-37-FD-B7-3E-F4