

# KATEDRA ZA FARMACEVTSKO BIOLOGIJO



*Člani Katedre za farmacevtsko biologijo (od leve proti desni): asist. Tanja Jakoš, doc. dr. Anja Pišlar, Mateja Matjaž, prof. dr. Janko Kos, izr. prof. dr. Nina Kočevar Glavač, doc. dr. Urša Pečar Fonovič, izr. prof. dr. Bojan Doljak, izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič (predstojnik), prof. dr. Borut Štrukelj, asist. dr. Matjaž Ravnikar, izr. prof. dr. Mojca Lunder, Krištof Bozovičar, asist. Nina Poljšak. Manjkajo: prof. dr. Samo Kreft, asist. dr. Meta Kokalj Ladan, asist. Darja Kolar, Irena Klančnik Mavec.*

Na Katedri za farmacevtsko biologijo organiziramo in izvajamo pedagoški proces na vseh študijskih programih Fakultete za farmacijo. Raziskovalno in pedagoško delujemo na področjih farmakognozije, fitokemije, celične in molekularne biologije, biokemije, farmacevtske biotehnologije in sorodnih ved. Odkrivamo, razvijamo in vrednotimo zdravila naravnega izvora (tj. rastlinske in glivne sekundarne metabolite ter biotehnoške učinkovine) in raziskujemo molekularne mehanizme bolezenskih procesov.

Na področju farmakognozije razvijamo analize metode za preverjanje istovetnosti in vrednotenje kakovosti rastlinskih drog. Iz gliv in rastlin izoliramo biološko aktivne snovi in analiziramo njihovo delovanje. Ukvarjamo se z izražanjem (gliko)proteinskih učinkovin, pridobljenih s tehnikami genskega inženirstva, in vrednotenjem njihovih fizikalno-kemijskih in bioloških lastnosti. S pomočjo bioloških kombinatoričnih knjižnic odkrivamo nove biološko aktivne peptide (zaviralce terapevtsko pomembnih encimov, ligande za afinitetno kromatografijo in peptide, ki posnemajo strukturo alergenov za imunoterapijo). Na področju celične in molekularne biologije raziskujemo mehanizme nastanka in napredovanja raka, protitumorskega imunskega odziva in nevrodegenerativnih ter nevroloških bolezni s ciljem opredeliti nova terapevtska prijemališča in diagnostične označevalce.

# SODOBNA FARMACEVTSKA BIOLOGIJA: OD TRADICIJE DO INOVATIVNIH TERAPIJ

## MODERN PHARMACEUTICAL BIOLOGY: TRADITIONAL TO INNOVATIVE THERAPIES

### AVTORJI / AUTHORS:

Izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.  
Doc. dr. Anja Pišlar, mag. farm.  
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.  
Doc. dr. Urša Pečar Fonovič, univ. dipl. biol.  
Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko biologijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

### POVZETEK

Farmacevtska biologija posega na številna področja farmacevtskih znanosti. Osredotoča se na razvoj, vrednotenje in proizvodnjo bioloških zdravil. Združuje bazične raziskave, kot so analiza patofizioloških procesov na celičnem ali molekularnem nivoju, kar privede do odkritja in validacije novih terapevtskih tarč, ter aplikativno znanost, tj. razvoj inovativnih terapevtskih pristopov, odkrivanje novih bioloških učinkovin in označevalcev bolezni za izboljšano diagnostiko. Prispevek predstavlja kratek pregled področij farmakognozije, celične in molekularne biologije (z vidika farmacevtske biologije), rekombinantnih bioterapevtikov, sinteznih peptidnih učinkovin in genskega zdravljenja, pri čemer izpostavljam izbrane raziskovalne dosežke Katedre za farmacevtsko biologijo iz zadnjega desetletja.

### KLJUČNE BESEDE:

biološka zdravila, farmacevtska biologija, inovativno zdravljenje

### ABSTRACT

Pharmaceutical biology covers a broad field of pharmaceutical sciences, focusing on development, assessment, and production of biological drugs. It combines fundamental research, such as deciphering cellular or molecular pathways perturbed in disease and consequent new drug target identification/validation, with applied science, i.e., development of innovative therapeutic approaches for untapped diseases, discovery of new biological drugs and identification of disease markers for improved diagnosis. Here, we briefly review the fields of pharmacognosy, cell and molecular biology (with relevance to pharmaceutical biology), recombinant biotherapeutics, synthetic peptide drugs and gene therapy, and highlight some of our research accomplishments in the last decade.

### KEY WORDS:

biological drugs, innovative therapies, pharmaceutical biology

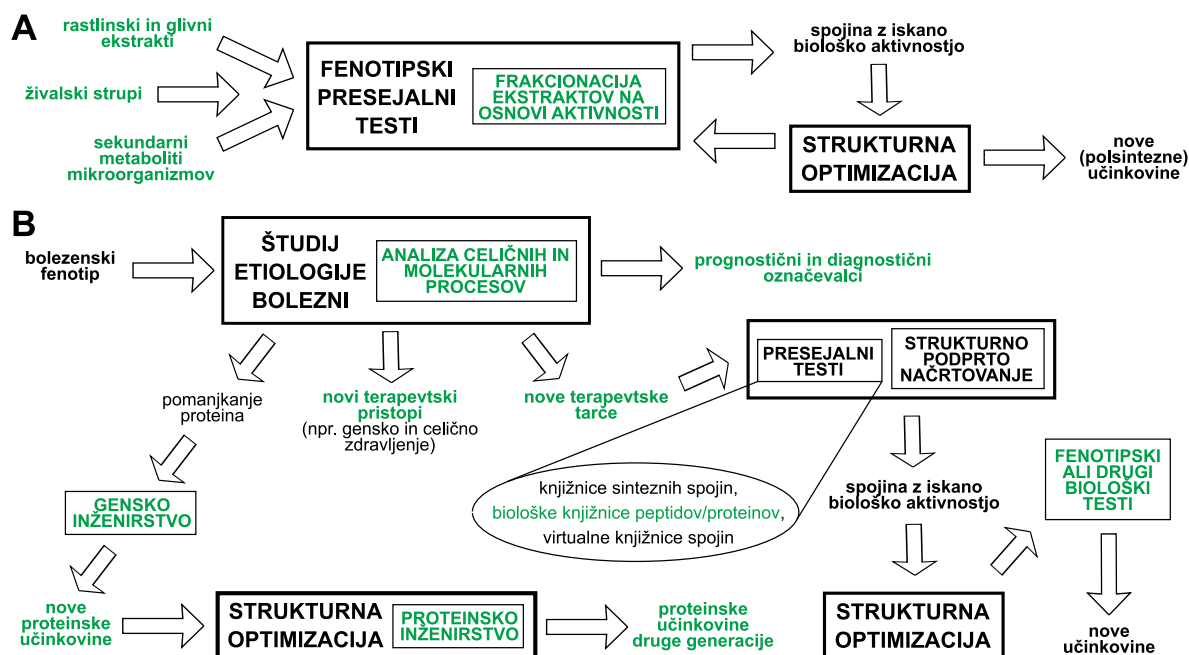


# 1 UVOD

Farmacevtska biologija je veja farmacevtskih znanosti, ki se ukvarja z razvojem, vrednotenjem in proizvodnjo bioloških zdravil, tj. zdravil, katerih učinkovine izoliramo iz ali pridobimo s pomočjo bioloških sistemov, kot so žive celice ali organizmi. V prispevku predstavniki Katedre za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) podajamo svoj pogled na razvoj tega širokega področja in dodajamo lasten kamenček v mozaik znanstvenih dosežkov farmacevtske biologije.

Katedra za farmakognozijo na Odseku za farmacijo Oddelka za kemijo Fakultete za naravoslovje in tehnologijo je bila ustanovljena v zgodnjih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, vendar se je šele sredi devetdesetih let, takrat že

v okviru samostojne Fakultete za farmacijo, preimenovala v Katedro za farmacevtsko biologijo. Že od začetka so njena pedagoška področja obsegala osnove biologije, celično biologijo, botaniko, fitokemijo in fitoterapijo ter biotehnologijo. Sodobna farmacevtska biologija (slika 1) združuje farmakognozijo, ki proučuje učinkovine iz zdravilnih rastlin in gliv ter naravna zdravila rastlinskega izvora, celično in molekularno biologijo in farmacevtsko biotehnologijo. Slednjo nadalje delimo na klasično (tudi fermentorsko), ki se ukvarja z izkoriščanjem gensko nespremenjenih organizmov, celic in mikroorganizmov za pridobivanje učinkovin (npr. antibiotikov), in moderno, ki sloni na uporabi gensko spremenjenih celic ali organizmov za razvoj in pridobivanje rekombinantnih (gliko)proteinskih, genskih in naprednih celičnih zdravil. Celična in molekularna biologija ter biokemija predstavljajo bazično znanje, iz katerega izhaja aplikativno področje farmacevtska biotehnologija. Moderna farmacevtska biologija je izrazito interdisciplinarno aplikativno



Slika 1: Shematska predstavitev procesa odkrivanja učinkovin in novih terapevtskih pristopov. A. Iskanje naravnih spojin z želeno biološko aktivnostjo. Običajno moramo strukture zadetkov presejalnih testov optimizirati, da dosežemo ustrezne farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti. B. Pristop razvoja novih zdravil, ki sloni na strategiji t. i. »reverzne farmakologije«: vpogled v patofiziološke procese na molekularnem nivoju razkrije potencialne nove terapevtske pristope in terapevtske tarče, na osnovi katerih izvajamo strukturno podprto načrtovanje učinkovin. Z zeleno barvo so označena področja v domeni farmacevtske biologije.

Figure 1: Schematic depiction of processes leading to new drugs and new therapeutic approaches. A. Screening for natural compounds with specific biological activities. The primary screening 'hits' typically undergo structural optimization in order to achieve appropriate pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. B. The so-called 'reverse pharmacology' approach to drug development: insight into pathophysiological processes at molecular level unravels potential new therapeutic approaches/targets, allowing target-based drug discovery. Areas that fall within the scope of pharmaceutical biology are labelled in green colour.

znanstveno področje, ki zahteva sodelovanje strokovnjakov različnih profilov. Tudi na Katedri za farmacevtsko biologijo se tega zavedamo, zato se povezujemo s številnimi raziskovalci doma in v tujini.

## 2 KLASIČNA FARMACEVTSKA BIOLOGIJA: FARMAKOGNOZIJA

Prve zdravilne učinkovine so ljudje izolirali iz rastlinskih, glivnih ali živalskih virov. V 19. stoletju so raziskovalci začeli spoznavati tudi strukture nekaterih enostavnih rastlinskih primarnih in sekundarnih metabolitov, kasneje, z razvojem sodobnejših analiznih in spektroskopskih metod, pa tudi zelo zapletene strukture učinkovin iz narave, kot so alkaloidi, steroidi, polifenoli, terpenoidi in ostale aktivne spojine. Obenem so spoznavali tudi njihovo farmakološko delovanje in odkrivali povezave med strukturo in učinkovanjem. Še vedno ima približno 60 % vseh zdravilnih učinkovin, ki jih uvrščamo med nizkomolekularne sintezne spojine, farmakoforne osnove v rastlinskih naravnih učinkovinah.

Velik del raziskav naravnih učinkovin na Katedri je usmerjen v analitiko, nove pristope k izolaciji in farmakološko delovanje polifenolov iz lesa bele jelke (*Abies alba* L.). Tako smo uspeli uvesti industrijsko tehnološki način izolacije polifenolov, nekatere od njih smo tudi strukturno in analizno ovrednotili in s farmakološkimi raziskavami na celicah, živalskih tkivih, modelnih živalih in v kliničnih raziskavah ugotovili, da izkazujejo polifenoli iz lesa bele jelke protivnetno (1), srčno-žilno protektivno (2) in antioksidativno delovanje. V interventni klinični raziskavi na zdravih prostovoljcih smo ugotovili, da polifenoli bele jelke zavirajo encimsko delovanje alfa glukozidaze in alfa amilaze, kar zmanjšuje metabolizem in vnos ogljikovih hidratov iz hrane, vpliva na manjšanje glikemičnega indeksa in je primerna osnova za razvoj prehranskega dopolnila oziroma naravnega rastlinskega zdravila za uravnavanje glukoze v krvi (3, 4). Na omenjenem področju sta bila podeljena tudi dva slovenska patenta. V okviru etnofarmakognostičnih raziskav smo proučevali uporabo zdravilnih rastlin v ljudski medicini na Krasu in Gorjancih (5). Drug pomemben doprinos k raziskavam s področja farmakognozije so naravne protimikrobne snovi iz endofitnih gliv (6) ter protidiabetične učinkovine (fomentariol) iz glive bukove kresilke (*Fomes fomentarius* L., (7)). S sodobnim plinskim kromatografom z masnim detektorjem (GC-MS) in s pomočjo tekočinskega kromatografa visoke ločljivosti (HPLC) analiziramo hlapne rastlinske snovi,

predvsem zmesi eteričnih olj, prav tako pa vršimo analitiko rastlinskih izvlečkov za nadaljnje farmakološke raziskave in teste.

## 3 SODOBNA FARMACEVTSKA BIOLOGIJA

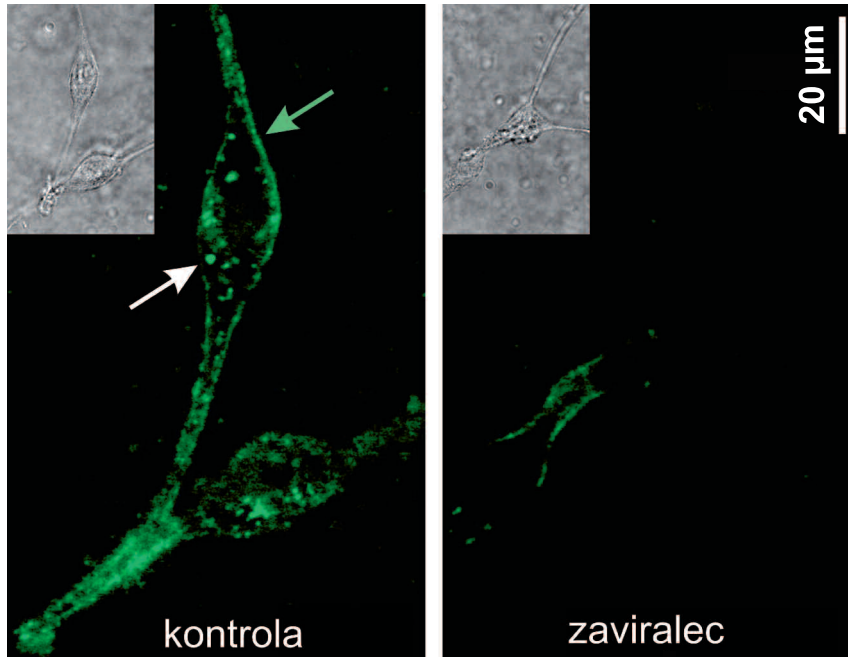
Sodobna farmacevtska biologija združuje najnovejše pristope in metode razvoja bioloških zdravil. Neločljiv del farmacevtske biologije predstavljajo molekularnobiološki pristopi v analizi funkcije genskih produktov, s čimer dobimo vpogled v mehanizme bolezni na molekularnem nivoju, ki so nam v pomoč pri odkrivanju in validaciji novih terapevtskih tarč in samih bioloških učinkovin ter inovativnih terapevtskih pristopov.

### 3.1 OD TARČE DO UČINKOVINE

Osrednja dogma molekularne biologije opisuje prenos biološke informacije iz genov, kjer je shranjena v obliki nukleotidnega zaporedja, prek informacijske RNA v aminokislinsko zaporedje proteinov. Slednje predstavlja kot glavne vršilce celičnih funkcij, molekule RNA pa zgolj kot vmesni člen med v DNA kodiranim zapisom in strukturo proteinov. Danes nekodirajočim molekulam RNA (ncRNA) pripisujemo pomembnejšo vlogo. Njihovo izražanje je spremenjeno pri več vrstah bolezni in imajo pomembno vlogo pri uravnavanju različnih celičnih procesov, zato ncRNA vse pogosteje prepoznavamo kot terapevtske tarče. Mednje sodijo tudi mikroRNA (miRNA), ki posttranskripcijsko uravnavajo izražanje številnih genov (8), in majhne nukleolarne RNA (snoRNA), ki usmerjajo posttranskripcijske modifikacije drugih vrst RNA (9). Na Katedri v sodelovanju z Inštitutom Jožef Stefan intenzivno raziskujemo zlasti snoRNA, saj so med drugim vpletene v nevrološke razvojne motnje, kot je Prader-Willijev sindrom (10). Male interferenčne RNA (siRNA) so sorodne miRNA in predstavljajo pomembno orodje za proučevanje funkcije in delovanja proteinov v celičnih procesih.

Vršitelji celičnih procesov so praviloma proteini, zato predstavljajo najpomembnejšo skupino potencialnih terapevtskih tarč. Mednje štejemo tudi proteaze oz. peptidaze, encime, ki katalizirajo razgradnjo proteinov v krajše peptide oz. popolno razgradnjo do aminokislinskih gradnikov (11). Pri človeku poznamo prek 550 genov za proteolitične encime, kar predstavlja približno 2 % vseh genov, ki kodirajo





**Slika 2:** Zaviralec katepsina B v tumorskih celicah MCF-10A neoT prepreči zunaj- in znotrajcelično razgradnjo s fluoroforom označenega substrata (DQ-kolagen IV), dodanega v umetni zunajcelični matriks (Matrigel) (desno). Na levi sliki zelena puščica označuje zunajcelično, bela pa znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena v odsotnosti zaviralca. Z razgradnjo zunajceličnega matriksa si tumorske celice utirajo pot v okoliško tkivo. Obakrat sta levo zgoraj prikazani še presevni sliki istega območja. Prirejeno po (25).

**Figure 2:** Cathepsin B inhibitor prevents intra- and extracellular degradation of fluorophore-labelled substrate (DQ-collagen IV) spiked into extracellular matrix (ECM; Matrigel) in MCF-10A neoT tumour cells (right). On the left micrograph (in absence of inhibitor), green and white arrows denote extra- and intracellular DQ-collagen hydrolysis, respectively. By degrading ECM, tumour cells migrate to adjacent tissues. Inserts in both micrographs show corresponding bright-field images. Adapted from (25).

proteine (12). Pomembno raziskovalno področje Katedre so že vrsto let cisteinski katepsini, peptidaze, ki so jim primarno pripisovali vlogo razgradnje proteinov v lizosomih, v zadnjem času pa je prepoznana tudi njihova pomembna vloga v fizioloških in patoloških procesih (13, 14). S pristopi molekularne in celične biologije smo identificirali in ovrednotili cisteinske katepsine kot potencialne terapevtske tarče pri različnih bolezenskih stanjih. Z uporabo biokemijskih in biotehnoloških metod smo s pomočjo celičnih kultur in primarnih tkiv dokazali njihovo ključno vlogo v patoloških procesih, ki se odvijajo pri nastanku in napredovanju raka ter nevrodegenerativnih boleznih. Eden od najpomembnejših tumorskih promotorjev je katepsin B, ki v tumorskem okolju izkazuje povečano endopeptidazno aktivnost, odgovorno za razgradnjo zunajceličnega matriksa (slika 2) (15). Pomembno vlogo pri patogenezi raka ima tudi katepsin X (16), ki s(m)o mu sprva pripisovali le vlogo pri uravnavanju protitumorskega imunskega odziva (13, 17, 18). Kasneje smo s proučevanjem molekularnih mehanizmov na celičnih kulturah ter *in vivo* z uporabo živalskih modelov dokazali

pomembno vlogo te peptidaze tudi v procesih nevrodegeneracije (19, 20). Pokazali smo tudi, da določene cisteinske peptidaze kažejo velik potencial kot diagnostični in/ali prognostični dejavniki pri številnih boleznih, zlasti pri različnih oblikah raka (15).

Delovanje peptidaz je strogo nadzorovano z mehanizmi, ki vključujejo regulacijo njihovega izražanja na nivoju prepisovanja in prevajanja, specifično prileganje substratov v katalitično mesto, sintezo peptidaz v obliki neaktivnih proencimov, prostorsko ločitev peptidaz od tarčnih substratov do sprostitve ob ustreznem signalu, aktivacijo z različnimi kofaktorji in reverzibilno ali ireverzibilno inaktivacijo delovanja peptidaz z zaviralci, ki preprečijo dostop substratom v katalitično mesto (15). Zaviralci peptidaz tako predstavljajo velik razvojni potencial kot učinkovine za zdravljenje bolezni, ki jih spremlja prekomerno proteolitično delovanje peptidaz (slika 2). V klinični rabi in različnih fazah testiranja so že številni zaviralci proteoliznih encimov, kot so npr. zaviralci proteaz virusa HIV, zaviralci angiotenzin konvertaze (ACE) za zniževanje povečanega krvnega tlaka in

zaviralci serinskih proteaz za zdravljenje tromboze (21). Z omejevanjem sicer prekomerne proteolitične aktivnosti encimov v patoloških procesih lahko torej uravnavamo napredovanje bolezni, zato predstavljajo nizkomolekularni sintezni zaviralci peptidaz zanimiv terapevtski pristop (15, 22). Eden izmed pristopov zaviranja prekomerne proteolitične aktivnosti je tudi nevtralizacija proteoliznih encimov, ki jo dosežemo z uporabo monoklonskih protiteles (23, 24).

### 3.2 REKOMBINANTNI PROTEINI KOT UČINKOVINE

Čeprav so proteinske učinkovine del *materiae medicae* že skoraj 100 let (vse od začetkov zdravljenja sladkorne bolezni z inzulinom, izoliranim iz trebušne slinavke goveda ali prašičev), je šele razmah genskega inženirstva v 80. letih omogočil pridobivanje človeških terapevtskih proteinov v večjem obsegu. Proteinske učinkovine so mnogo večje od konvencionalnih sinteznih, imajo neprimerno bolj zapleteno strukturo in so heterogene (obravnavamo jih kot zmes sorodnih snovi in ne kot eno samo kemijsko entiteto) (26). So kemijsko, fizikalno in encimsko nestabilne, zato proizvodni proces (izražanje v celični kulturi ali transgenem organizmu, izolacija in čiščenje ter formulacija) in shranjevanje zdravila odločilno vplivata na njihovo kakovost in posledično učinkovitost in varnost. Posttranslacijske modifikacije (tj. encimsko katalizirane spremembe v zgradbi proteinov, do katerih pride po biosintezi na ribosomih, kot je npr. glikozilacija) imajo lahko pomemben vpliv na farmakodinamski in farmakokinetični profil proteinske učinkovine. Strukturna kompleksnost proteinov, odgovorna za visoko specifičnost delovanja in sposobnost vstopanja v interakcije s tarčami, ki nizkomolekularnim učinkovinam niso dostopne, onemogoča razvoj generičnih biotehnoloških zdravil (27).

Tehnologija rekombinantne DNA je omogočila povečanje proizvodnih kapacitet bioloških zdravil in uvajanje strukturnih sprememb v proteinske učinkovine (*proteinsko inženirstvo*) s ciljem prirojanosti lastnosti, kot so podaljševanje biološkega razpolovnega časa, doseganje ciljne dostave in ustvarjanje novih funkcionalnosti terapevtskega proteina. V primerjavi z biološkimi zdravili, pridobljenimi z izolacijo iz tkiv, so rekombinantne učinkovine tudi varnejše, saj je nevarnost iatrogenega prenosa patogenov bistveno manjša. Ocenjujejo, da je danes na globalnem trgu prisotnih več kot 170 različnih rekombinantnih učinkovin (28); med najpomembnejše skupine sodijo monoklonska protitelesa, hormoni, citokini in hematopoetski rastni dejavniki ter nekateri encimi.

Pri prejemniku utegnejo proteinske učinkovine izzvati odziv imunskega sistema (29), kar lahko privede do postopnega zmanjšanja učinkovitosti zdravljenja ali (v redkih primerih) celo ogrozi bolnikovo življenje. Z namenom vrednotenja postopkov izolacije in čiščenja, ki lahko močno pripomorejo k manjši imunogenosti in posledično večji varnosti produktov, smo na Katedri v sodelovanju z Biofarmaceutiko Lek razvili platformo, ki združuje analitiko nečistot v postopku izolacije in čiščenja monoklonskega protitelesa ter celične teste za vrednotenje imunogenosti nečistot (30). Razvijamo tudi alternativne načine afinitetnega čiščenja monoklonskih protiteles na osnovi peptidnih ligandov (31, 32).

V sodelovanju z Inštitutom Jožef Stefan smo razvili in patentirali posebno platformo za površinsko izražanje peptidov in proteinov, ki omogoča njihovo dostavo do sluznic in v prebavni trakt s pomočjo mlečnokislinske bakterije (33, 34). Prehranski mikroorganizmi, kot so mlečnokislinske bakterije, so v zadnjih dvajsetih letih predmet številnih raziskav, usmerjenih v razvoj dostavnih sistemov za različne biološke molekule. Platformo smo validirali za dostavo vezavnega proteina, ki veže TNF $\alpha$ , pri mišjem modelu kolitisa (35) in za dostavo cepiva (virusnega antigena hepatitisa A (36)). Kot dostavni sistem proučujemo tudi nitaste bakterijske viruse (bakteriofage) in posamezne kapsidne proteine bakteriofaga (glejte 3.3), saj so varni in primerni za peroralno aplikacijo in aplikacijo na sluznice. Pripravili in ovrednotili smo bakteriofag, ki je na svoji površini izražal več kopij peptidnega mimetika (t. i. mimotopa) glavnega alergena mačke (37), ter mimotope glavnega alergena čebeljega strupa kot fuzijski protein s kapsidnim proteinom p3 (38).

### 3.3 PEPTIDNE UČINKOVINE

V zadnjem desetletju doživlja razvoj peptidnih učinkovin močan razcvet. Ob obujenem znanstvenem zanimanju in zanimanju farmacevtske industrije dobivajo peptidi pomembno mesto, ki dopolnjuje prostor med majhnimi spojinami in proteinskimi učinkovinami. Od leta 2000 dalje so na svetovni ravni odobrili kar 28 novih peptidnih učinkovin (39). Pregled trenutnega tržišča in razvojnih trendov pokaže, da je globalno registriranih več kot 50 peptidnih učinkovin, dodatnih 170 je v različnih fazah kliničnega vrednotenja (40).

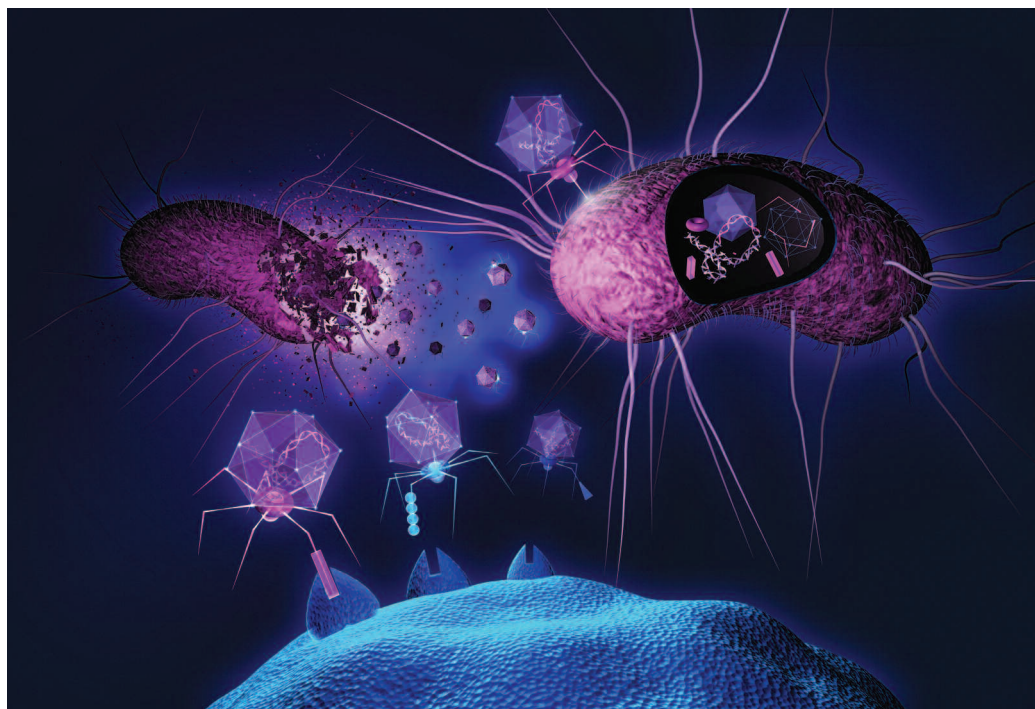
Pri tradicionalnem pristopu odkrivanja peptidnih učinkovin uporabljamo naravne hormone in signalne molekule kot spojine vodnice. S poseganjem v strukturo naravnih peptidov lahko razvijamo sintezne analoge s ciljem izboljšanja biološkega razpolovnega časa, učinkovitosti, selektivnosti



in drugih lastnosti. Posebno uspešen primer predstavlja razvoj peptidnih analogov glukagonu podobnega peptida 1 (GLP-1), kjer so z različnimi strategijami povečanja stabilnosti in podaljševanjem razpolovnega časa razvili peptidni učinkovini liraglutid in semaglutid, ki ju uporabljamo pri zdravljenju diabetesa tipa 2. Številne učinkovine, med drugimi zaviralec ACE kaptopril, antitrombotik eptifibatid, agonista receptorja za GLP-1 eksenatid in liksizenatid ter analgetični peptid zikonotid, so produkti optimizacije peptidov iz živalskih strupov, ki večinoma delujejo na ionske kanalčke in druge membranske receptorje. Zanimiv naravni vir strukturno zapletenih spojin vodnic in učinkovin so glivni in prokariotski neribosomski peptidi (41) ter lantipeptidi iz gram-

pozitivnih bakterij s protimikrobnim delovanjem in insekticidni mikroproteini ciklotidi iz rastlin (40).

Pri določenih tarčnih molekulah razvoj peptidnih učinkovin iz endogenih ligandov ni mogoč ali smiseln (nestabilen ali promiskuiteten ligand) ali pa endogenega liganda ne poznamo. Odkrivanje peptidnih ligandov *de novo* ter njihovo optimizacijo omogočajo presejanja bioloških ali kemijskih knjižnic peptidov (40, 42). Med biološkimi imajo najpomembnejšo vlogo bakteriofagne peptidne knjižnice. Neposredna povezava genotipa (kodirano peptidno zaporedje) in fenotipa (afiniteta na površini virusne ovojnice izraženega peptida do tarčne molekule) omogočajo enostavno in hitro identifikacijo ligandov (slika 3). Vse od odkritja (43) je metoda napredovala



**Slika 3:** Shematska ponazoritev procesa presejanja bakteriofagne predstavitvene knjižnice. Rekombinantna fagna DNA, ki nosi gen za fuzijski protein (poli)peptid-strukturni protein kapside, je obdana s proteinskim plaščem; na ta način sta genotip in fenotip fizično povezana.

Gostiteljski sev bakterije transformiramo s knjižnico DNA – vsak nastali klon nosi gensko informacijo za določeno različico peptida. V bakterijah se bakteriofagni proteini in DNA namnožijo in sestavijo v nove virusne delce, ki tvorijo »knjižnico«. Proces presejanja bakteriofagne predstavitvene knjižnice zajema njeno inkubacijo z imobiliziranimi tarčnimi molekulami: klone, ki se prek površinsko izraženih (poli)peptidov ne vežejo na tarčo, odstranimo s spiranjem, vezane pa zberemo v procesu elucije, posamezne klone osamimo in namnožimo ter razberemo primarno strukturo predstavljenega peptida z določanjem nukleotidnega zaporedja fagne DNA. Povzeto po (42). Avtorica slike je Stella Ivšek.

**Figure 3:** Schematic depiction of phage display library screening process. Recombinant phage DNA harbouring the fusion gene for (poly)peptide-capsid structural protein is encapsulated with a protein coat, thus providing a physical genotype-phenotype link. Host bacterial strain is transformed with a DNA library (wherein each clone harbours genetic information for a specific peptide variant). In bacteria, phage proteins and DNA are amplified and assembled into progeny virions that constitute a 'library'. The process of phage library screening is based on incubating library virions with immobilized target molecules. Unbound clones are removed by stringent washing, while those interacting with the target via surface-displayed (poly)peptides are eluted. Individual clones are amplified and the primary structures of displayed peptides are deduced by phage DNA sequencing. Reproduced from (42). Design by Stella Ivšek.

in postala nepogrešljiva tudi na področju razvoja monoklonskih protiteles (44), oba glavna pionirja (George P. Smith in sir Gregory P. Winter) pa sta leta 2018 prejela Nobelovo nagrado za kemijo. Na Katedri smo metodo sprva uporabili za identifikacijo peptidnih zaviralcev encimov, vpletenih v metabolizem maščob in ogljikovih hidratov (45–47), ter zaviralcev katepsinov (48). Identificirali in ovrednotili smo peptidne ligande z delovanjem na apetit in vnos hrane (49, 50). V zadnjem času smo se usmerili na področje imunoterapije alergij (51), kjer razvijamo kratke peptidne mimetike epitopov alergenov in vrednotimo njihov imunoterapevtski potencial (37, 38). Metodo predstavitve na bakteriofagu smo tudi dodatno razvijali in optimirali (52, 53).

Novejše sintezne metode omogočajo hitro in ekonomsko upravičeno sintezo tudi relativno dolgih peptidov (30–40 aminokislinskih ostankov) in hkrati njihovo optimizacijo (54). Pri daljših in strukturno kompleksnejših peptidih pa je smiselna uporaba tehnologije rekombinantne DNA. Prednosti peptidnih učinkovin so vsekakor njihovi visoka jakost in specifičnost ter večja varnost v primerjavi z večjimi proteini. Napredki v dostavnih sistemih in kemijskih pristopih optimizacije farmakokinetičnih lastnosti bodo še nadalje utrdili njihovo mesto na številnih terapevtskih področjih.

### 3.4 GENSKO ZDRAVLJENJE

Gensko zdravljenje je terapevtski pristop, pri katerem v bolnikove celice vnesemo genski material s ciljem nadomestiti okvarjen gen, ga spremeniti (popraviti) ali utišati njegovo izražanje oz. doseči izražanje tujega terapevtskega gena (55). Kot dostavne sisteme za terapevtske gene uporabljamo zlasti rekombinantne replikacijsko onesposobljene virusne vektorje (56). Prva klinična vrednotenja tehnologije so potekala že pred 30 leti. Kljub učinkoviti transdukciji dolgoživih (tj. matičnih) celic so le redko dosegli pričakovan terapevtski izid, saj se je prejemnikov imunski sistem odzval na virusne proteine ali na proteinski produkt terapevtskega gena, kar je vodilo do uničenja celic, ki so sprejele tujo gensko informacijo. Dokumentirali so tudi primere neoplazij zaradi insercijske mutageneze več let po aplikaciji genskih zdravil. Zadnje desetletje velja za nekakšno renesanso genskega zdravljenja. Izboljšani virusni vektorji (npr. episomalni in takšni, ki omogočajo vnos genske informacije tudi v ne-deleče se celice) ter novi terapevtski režimi (sočasna aplikacija imunosupresivnih zdravil) so omogočili razvoj učinkovitejših in varnejših genskih zdravil (55).

Gensko zdravljenje omogoča učinkovito spopadanje z recesivnimi monogenskimi boleznimi, saj je z vnosom ustreznega gena divjega tipa mogoče nadomestiti funkcijo okvar-

jenega gena. Primeri takšnih bolezni so pomanjkanje lipoprotein lipaze, huda kombinirana imunska pomanjkljivost zaradi pomanjkanja adenozin deaminaze (ADA-SCID), distrofija mrežnice zaradi bialelne mutacije v genu za retinoid izomerohidrolazo RPE65, spinalna mišična atrofija (za te bolezni že poznamo genska zdravila), hemofiliji A in B, talasemija beta in anemija srpastih celic (55, 56). Sodobna genska zdravila omogočajo tudi spopadanje s pridobljenimi poligenetskimi boleznimi, kot so rakava obolenja (levkemije in limfomi). Strategije zdravljenja pri tem temeljijo na t. i. onkolitičnih virusih (takšnih, ki se lahko pomnožujejo le v rakavih celicah in izzovejo njihovo lizo, medtem ko je replikacija v zdravih celicah onemogočena); vnosu samomorilskih genov (genov za encime, ki lokalno aktivirajo predzdravila do citotoksičnih učinkovin) v tumorsko tkivo; ali usmerjanju citotoksičnih limfocitov T k antigenom, povezanim s tumorji (transdukcija bolnikovih lastnih limfocitov T s himernimi T-celičnimi receptorji, CAR) (55, 56). Trenutno je največ pričakovanj povezanih s prenosom tehnologij za urejanje genoma v klinično prakso (56). Z uporabo sistema CRISPR/Cas9 je npr. mogoče z veliko natančnostjo izzvati najrazličnejše spremembe genoma, vključno z inaktivacijo genov z dominantnimi mutacijami, vstavljanjem genov na točno določena mesta v genomu ali zamenjavo nukleotidnih zaporedij s ciljem popravljanja napak. Širša definicija genskega zdravljenja zajema tudi spreminjanje genskih transkriptov. Primer tovrstnih genskih učinkovin so sintezni protismiselni oligonukleotidi, s katerimi je mogoče vplivati na posttranskripcijske spremembe genov, kot je alternativno povezovanje eksonov, in tako spodbuditi nastanek želenih proteinskih izooblik (57).

Nadaljnja uveljavitev genskega zdravljenja je odvisna od številnih dejavnikov. Precejšnje težave so trenutno povezane z intelektualno lastnino dostavnih sistemov in mehanizmov delovanj, z zagotavljanjem dovolj velikih skupin bolnikov za klinične raziskave, proizvodnih kapacitet virusnih vektorjev za sistemsko aplikacijo, ki so lahko eden od razlogov za zelo visoke stroške genskega zdravljenja, ter izobraževanjem strokovnjakov, ki so usposobljeni za njegovo izvajanje.

## 4 SKLEP

Klasična in sodobna farmacevtska biologija z inovativnimi, v terapijo usmerjenimi pristopi, ki jih uporabljamo in razvi-



jamo na Katedri za farmacevtsko biologijo UL FFA, ponujata realno upanje, da bo že v bližnji prihodnosti mogoče zdraviti za zdaj še neozdravljive bolezni in izboljšati kakovost življenja bolnikov z najhujšimi rakavimi, kroničnimi vnetnimi, metabolnimi in degenerativnimi boleznimi. Zaviralci imunskih stikal, kot so protitelesa ipilimumab, pembrolizumab in nivolumab, učinkovito preprečijo rakavim celicam izmikanje imunskemu sistemu in so tako pomembno spremenili način zdravljenja nekaterih rakavih obolenj (58); podobno velja za (personalizirana) cepiva proti raku (59). Gensko zdravljenje, zlasti v kombinaciji s celičnim zdravljenjem (npr. vnos terapevtskega gena v dolgožive avtologne matične celice ali odpravljanje mutacije s tehnologijami urejanja genoma *ex vivo*), bo v prihodnje gotovo pustilo močan pečat na področju spopadanja s kongenitalnimi genetskimi boleznimi in rakom. Izjemen je tudi terapevtski potencial induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC), tj. celic, ki jih z biopsijo različnih tkiv odvezamo bolniku, jih s transdukcijo s peščico genov za izbrane transkripcijske dejavnike dediferenciramo *in vitro* ter jih končno diferenciramo v najrazličnejše celične vrste, s katerimi bi nekoč lahko obnavljali tkiva in organe (60). Uspešna implementacija klasičnih, uporaba sodobnih in vrednotenje novih terapevtskih bioloških molekul in pristopov bo tudi v prihodnje naloga in cilj Katedre za farmacevtsko biologijo UL FFA.

## 5 ZAHVALA

Avtorji izrekamo zahvalo vsem aktualnim in nekdanjim članom pedagoškega in znanstveno-raziskovalnega kolektiva Katedre za farmacevtsko biologijo UL FFA za njihov prispevek k razvoju in promociji slovenske farmacevtske biologije.

## 6 VIRI

1. Strabek Zorko M, Štrukelj B, Švajger U, Kreft S, Lunder T. Efficacy of a polyphenolic extract from silver fir (*Abies alba*) bark on psoriasis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Pharmazie*. 2018;73(1):56-60.
2. Drevenšek G, Lunder M, Tavčar Benkovič E, Štrukelj B, Kreft S. Cardioprotective effects of silver fir (*Abies alba*) extract in ischemic-reperfused isolated rat hearts. *Food Nutr Res*. 2016;60:29623.
3. Lunder M, Roškar I, Hošek J, Štrukelj B. Silver fir (*Abies alba*) extracts inhibit enzymes involved in blood glucose management and protect against oxidative stress in high glucose environment. *Plant Foods Hum Nutr*. 2019;74(1):47-53.
4. Debeljak J, Ferk P, Čokolič M, Zavratnik A, Tavčar Benkovič E, Kreft S, et al. Randomised, double blind, cross-over, placebo and active controlled human pharmacodynamic study on the influence of silver fir wood extract (Belinal) on post-prandial glycaemic response. *Pharmazie*. 2016;71(10):566-9.
5. Lumpert M, Kreft S. Folk use of medicinal plants in Karst and Gorjanci, Slovenia. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2017;13(1):16.
6. Ravnikar M, Terčelj M, Janeš D, Štrukelj B, Kreft S. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifer needles. *Afr J Biotechnol*. 2015;14(19):867-71.
7. Maljurič N, Golubovič J, Ravnikar M, Žigon D, Štrukelj B, Otasevič B. Isolation and determination of fomentariol: novel potential antidiabetic drug from fungal material. *J Anal Methods Chem*. 2018;2018:2434691.
8. Bratkovič T, Glavan G, Štrukelj B, Žvin M, Rogelj B. Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy. *Biotechnol Adv*. 2012;30(3):753-65.
9. Bratkovič T, Božič J, Rogelj B. Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(4):1627-51.
10. Bratkovič T, Modic M, Camargo Ortega G, Drukker M, Rogelj B. Neuronal differentiation induces SNORD115 expression and is accompanied by post-transcriptional changes of serotonin receptor 2c mRNA. *Sci Rep*. 2018;8(1):5101.
11. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*. 2003;4(7):544-58.
12. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D343-50.
13. Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(12):1295-309.
14. Pišlar A, Perišić Nanut M, Kos J. Lysosomal cysteine peptidases - Molecules signaling tumor cell death and survival. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:168-79.
15. Kos J, Mitrovič A, Mirkovič B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med Chem*. 2014;6(11):1355-71.
16. Kos J, Vižin T, Fonovič UP, Pišlar A. Intracellular signaling by cathepsin X: molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:76-83.
17. Jevnikar Z, Obermajer N, Kos J. LFA-1 fine-tuning by cathepsin X. *IUBMB Life*. 2011;63(9):686-93.
18. Jakoš T, Pišlar A, Jewett A, Kos J. Cysteine cathepsins in tumor-associated immune cells. *Front Immunol*. 2019;10:2037.
19. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Žvin M, Schliebs R, Kos J. Neuroprotective role of gamma-enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell*. 2013;12(4):604-14.
20. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Žvin M, Kos J. Upregulation of cysteine protease cathepsin X in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:412.
21. Vozelj S, Obermajer N, Kos J. Protease in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farm Vest*. 2007;58(4):133-8.
22. Pečar Fonovič U, Mitrovič A, Knez D, Jakoš T, Pišlar A, Brus B, et al. Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Sci Rep*. 2017;7(1):11459.

23. Doljak B, Obermajer N, Jamnik P, Kos J. Monoclonal antibody to cytokeratin VKIALEVEIATY sequence motif reduces plasminogen activation in breast tumour cells. *Cancer Lett.* 2008;267(1):75-84.
24. Mirković B, Premzl A, Hodnik V, Doljak B, Jevnikar Z, Anderluh G, et al. Regulation of cathepsin B activity by 2A2 monoclonal antibody. *FEBS J.* 2009;276(17):4739-51.
25. Mitrović A, Mirković B, Sosič I, Gobec S, Kos J. Inhibition of endopeptidase and exopeptidase activity of cathepsin B impairs extracellular matrix degradation and tumour invasion. *Biol Chem.* 2016;397(2):165-74.
26. Berkowitz SA, Houde DJ. The complexity of protein structure and the challenges it poses in developing biopharmaceuticals, in *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals*, S.A. Berkowitz and D.J. Houde, Editors. 2015, Elsevier: Amsterdam. p. 1-21.
27. Štrukelj B. Varnost, kakovost in učinkovitost originalnih in podobnih bioloških zdravil. *Farm Vest.* 2015;66(3):256-9.
28. Pham PV. Medical biotechnology: techniques and applications. In: Barh D, Azevedo V, editors. *Omics technologies and bio-engineering. Towards improving quality of life.* Amsterdam: Elsevier;2017. p. 449-69.
29. Bratkovič T. Imunogenost bioloških zdravil. *Farm Vest.* 2017;68(5):345-54.
30. Ignjatović J, Švajger U, Ravnikar M, Molek P, Zadravec D, Pariš A, et al. Aggregation of recombinant monoclonal antibodies and its role in potential immunogenicity. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(4):343-56.
31. Kruljec N, Bratkovič T. Alternative affinity ligands for immunoglobulins. *Bioconjug Chem.* 2017;28(8):2009-30.
32. Kruljec N, Molek P, Hodnik V, Anderluh G, Bratkovič T. Development and characterization of peptide ligands of immunoglobulin G Fc region. *Bioconjug Chem.* 2018;29(8):2763-75.
33. Ravnikar M, Štrukelj B, Obermajer N, Lunder M, Berlec A. Engineered lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* capable of binding antibodies and tumor necrosis factor alpha. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(20):6928-32.
34. Lunder M, Ravnikar M, Štrukelj B, Berlec A, Čeh B. Modified food grade microorganism for treatment of inflammatory bowel disease. 2014: USA.
35. Berlec A, Perše M, Ravnikar M, Lunder M, Erman A, Cerar A, et al. Dextran sulphate sodium colitis in C57BL/6J mice is alleviated by *Lactococcus lactis* and worsened by the neutralization of tumor necrosis factor alpha. *Int Immunopharmacol.* 2017;43:219-26.
36. Berlec A, Malovrh T, Zadravec P, Steyer A, Ravnikar M, Sabotič J, et al. Expression of a hepatitis A virus antigen in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* and evaluation of its immunogenicity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(10):4333-42.
37. Luzar J, Molek P, Šilar M, Korošec P, Košnik M, Štrukelj B, et al. Identification and characterization of major cat allergen Fel d 1 mimotopes on filamentous phage carriers. *Mol Immunol.* 2016;71:176-83.
38. Zahirović A, Koren A, Kopač P, Štrukelj B, Korošec P, Lunder M. Identification of bee venom Api m 1 IgE epitopes and characterization of corresponding mimotopes. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(2):791-4 e795.
39. Angell Y, Holford M, Moos WH. Building on success: a bright future for peptide therapeutics. *Protein Pept Lett.* 2018;25(12):1044-50.
40. Henninot A, Collins JC, Nuss JM. The current state of peptide drug discovery: back to the future? *J Med Chem.* 2018;61(4):1382-414.
41. Radić N, Bratkovič T. Future antibiotic agents: Turning to Nature for inspiration. In: *Antimicrobial agents.* Bobbarala V, editor. Rijeka: InTech; 2012. p. 25-50.
42. Bozovičar K, Bratkovič T. Evolving a peptide: library platforms and diversification strategies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):E215.
43. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228(4705):1315-7.44. Winter G. Harnessing evolution to make medicines (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019;58(41):14438-45.
45. Lunder M, Bratkovič T, Kreft S, Štrukelj B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *J Lipid Res.* 2005;46(7):1512-6.
46. Gaser D, Štrukelj B, Bratkovič T, Kreft S, Pungercar J, Lunder M. Cross-affinity of peptide ligands selected from phage display library against pancreatic phospholipase A2 and amodytoxin C. *Acta Chim Slov.* 2009;56(3):712-7.
47. Roškar I, Molek P, Vodnik M, Štempelj M, Štrukelj B, Lunder M. Peptide modulators of alpha-glucosidase. *J Diabetes Investig.* 2015;6(6):625-31.
48. Bratkovič T, Lunder M, Popović T, Kreft S, Turk B, Štrukelj B, et al. Affinity selection to papain yields potent peptide inhibitors of cathepsins L, B, H, and K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(3):897-903.
49. Vodnik M, Molek P, Štrukelj B, Lunder M. Peptides binding to the hunger hormone ghrelin. *Horm Metab Res.* 2013;45(5):372-7.
50. Lunder M, Vodnik M, Kubale V, Grgurevič N, Majdič G, Štrukelj B. Peptide mimetic of N-terminal ghrelin enhances ghrelin-induced growth hormone secretion and c-Fos expression in mice. *J Neuroendocrinol.* 2018;30(12):e12656.
51. Luzar J, Štrukelj B, Lunder M. Phage display peptide libraries in molecular allergology: from epitope mapping to mimotope-based immunotherapy. *Allergy.* 2016;71(11):1526-32.
52. Lunder M, Bratkovič T, Urleb U, Kreft S, Štrukelj B. Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution. *Biotechniques.* 2008;44(7):893-900.
53. Vodnik M, Žager U, Štrukelj B, Lunder M. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules.* 2011;16(1):790-817.
54. Vodnik M, Štrukelj B, Lunder M. Ghrelin receptor ligands reaching clinical trials: From peptides to peptidomimetics; from agonists to antagonists. *Horm Metab Res.* 2016;48(1):1-15.
55. Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy. *Annu Rev Med.* 2019;70:273-88.
56. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science.* 2018;359(6372).
57. Bratkovič T. Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi kot terapevtska strategija. *Farm Vest.* 2019;70(1):57-68.
58. Fritz JM, Lenardo MJ. Development of immune checkpoint therapy for cancer. *J Exp Med.* 2019;216(6):1244-54.
59. Thomas S, Prendergast GC. Cancer vaccines: a brief overview. *Methods Mol Biol.* 2016;1403:755-61.
60. Braganca J, Lopes JA, Mendes-Silva L, Almeida Santos JM. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World J Stem Cells.* 2019;11(7):421-430.

