

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2014/45



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

|                                                                                                        |                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>Šifra programa</b>                                                                                  | P1-0340                                                       |
| <b>Naslov programa</b>                                                                                 | Načrtovanje in predklinični razvoj novih zdravilnih učinkovin |
| <b>Vodja programa</b>                                                                                  | 1878 Uroš Urleb                                               |
| <b>Obseg raziskovalnih ur</b>                                                                          | 28210                                                         |
| <b>Cenovni razred</b>                                                                                  | B                                                             |
| <b>Trajanje programa</b>                                                                               | 01.2009 - 12.2013                                             |
| <b>Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)</b> | 258 Lek farmacevtska družba d.d.                              |
| <b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>                                                          | 1 NARAVOSLOVJE<br>1.09 Farmacija                              |
| <b>Družbeno-ekonomski cilj</b>                                                                         | 06. Industrijska proizvodnja in tehnologija                   |
| <b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>                                                           | 3 Medicinske vede<br>3.01 Temeljna medicina                   |

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

#### 2. Povzetek raziskovalnega programa<sup>1</sup>

SLO

Rekombinantne proteine danes uspešno uporabljamo kot učinkovita biološka zdravila v terapiji mnogih bolezni. Glavne omejitve 1. generacije bioloških zdravil predstavljajo njihove suboptimalne fizikalno-kemijske in PK lastnosti, zato se v glavnem odmerjajo z injiciranjem.

V okviru programa smo se osredotočili na vzpostavitev kompleksne platforme za modifikacijo različnih proteinov za pripravo in karakterizacijo konjugatov, ki služi za izboljšanje PK lastnosti proteinov. Pripravili smo izboljšane oblike konjugatov hG-CSF, ki so dobra osnova za pripravo izboljšanih verzij znanih zdravil (t.i. biobetter) za zdravljenje nevtropenije. Z lastnimi novimi reagenti PEGSe smo uspeli pripraviti konjugate hG-CSF, ki so potencialna predzdravila. V sodelovanju s CO PoliMaT smo pripravili tudi nove, biorazgradljive PEG dendrimere za konjugacijo proteinov.

Na primeru dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF), naše ključne modelne molekule, smo skušali izrabiti in pokazati vse prednosti proteinske modifikacije, predvsem PEGilacije, od povečanja razpolovnega časa do zmanjšanja sistemske toksičnosti molekule. S kombinacijo analogov TNF in PEGilacije smo pripravili konjugate, ki so izkazovali bistveno manj izražene klinične znake (sedacija, piloerekcija, dispnea, diareja) kot nativni TNF. S tem smo potrdili našo osnovno

hipotezo, da je PEGilacija primerno orodje za načrtovanje izboljšanih molekul TNF, potencialno uporabnih v terapiji raka.

Načrtovali in pripravili smo tudi več različnih konjugatov TNF in njegovih analogov z majhnimi molekulami PEG, biotinom in maščobnimi kislinami. Zastavljen cilj, popolnoma izničeno biološko aktivnost *in vitro*, smo pri večini dosegli, prav tako je večina pripravljenih konjugatov izkazovala ustrezno inhibicijo molekule TNF v pogojih *in vitro*. To potrjuje tudi našo drugo hipotezo, da je PEGilacija lahko orodje za načrtovanje novih inhibitorjev TNF za zdravljenje bolezenskih stanj s povišano aktivnostjo TNF, ki bi delovali na principu izmenjave podenot TNF z izničeno bioaktivnostjo. Kot pomembno orodje za načrtovanje inhibitorjev smo postavili termodinamske modele za karakterizacijo TNF in njegovih inhibitorjev.

V okviru programskega sklopa razvoj alternativnih dostavnih sistemov za proteine smo vzpostavili metodologijo za vrednotenje formulacij, t.j. prehajanje preko bioloških barier (Caco-2, IVERI); biološko aktivnost *in vitro* (celični testi); konfokalno mikroskopijo; teste sproščanja nanoformulacij, proteolizne teste in farmakodinamske (PD) modele *in vivo*.

Pokazali smo, da kombinacija zaščite proteina v nanodelcih za zadržano sproščanje, konjugacija za povečano prehajanje preko mukoznih površin in pospešena gastrointestinalna absorpcija z dodatkom pospeševalcev absorpcije omogočajo zvišanje biološke uporabnosti proteinov, kar kaže na sinergistično delovanje. Najboljše kombinacije formulacij za peroralne dostavne sisteme proteinov iz testov *in vitro* smo testirali tudi na modelih *in vivo* ter dobili prve statistično značilne PD odzive.

ANG

Recombinant proteins have been successfully used as efficient drugs in treatment of many diseases. The main limitations of the 1. generation biopharmaceutics are their suboptimal physicochemical and PK properties. Consequently biopharmaceutics are mainly administrated parenterally.

During the execution of the program, we have focused on the establishment of a complex protein modification platform for the preparation and characterization of conjugates which serves to improve the PK properties of proteins. Improved forms of hG-CSF conjugates were prepared, which represent a good basis for the future development of biobetter drugs for neutropenia treatment. hG-CSF conjugates prepared with our proprietary PEGSe reagents show an interesting pro-drug behavior. In cooperation with the CE PoliMaT new, biodegradable PEG dendrimers for conjugation of proteins were prepared.

We tried to show and take all possible advantages of PEGylation, such as prolonged elimination half-life and reduced systemic toxicity of molecule on our key model molecule tumor necrosis factor alpha (TNF).

Combination of TNF analogs and PEGylation was used to prepare conjugates exhibiting *in vivo* less clinical side effects (sedation, piloerection, dyspnea, diarrhea) than native TNF. Thus, it was confirmed that PEGylation is appropriate tool for designing improved TNF molecules, potentially applicable in cancer therapy.

Several conjugates of TNF and its analogs were designed and prepared with attachment of short PEG chains, biotin and lipophilic molecules. The goal was to prepare conjugates with completely diminished bioactivity *in vitro*, yet with capability to exchange subunits with native TNF and diminish its activity *in vitro* by subunit exchange. The majority of prepared conjugates exhibited such biological properties confirming our second hypothesis that PEGylation is appropriate tool for designing TNF inhibitors for alternative approaches to the treatment of disease conditions with an elevated TNF activity. As an important supportive tool thermodynamic models for characterisation of TNF and their inhibitors were established.

Within the program work package "Development of alternative protein delivery systems", methodology for evaluating formulations, i.e. permeability through biological barriers (Caco2, IVERI); biological activity *in vitro* (cell line based test), confocal microscopy, *in vitro* nanoformulation release tests, proteolytic assay and pharmacodynamics (PD) model *in vivo* was established.

We demonstrated that combination of the protection of protein in nanoparticles for sustained release, conjugation for increased mucopermeability and enhanced intestinal absorption with addition of absorption enhancers results in an increase of bioavailability of proteins, suggesting a synergistic effect. The most promising combinations of formulations for peroral delivery systems of proteins from *in vitro* tests were tested in *in vivo* models and gave first statistically significant PD responses.

### 3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu<sup>2</sup>

SLO

V obdobju izvajanja programa (2009 – 2013) s spremenjeno vsebino, usmerjeno v raziskave bioloških zdravil, smo vzpostavili kompleksno platformo za modifikacijo proteinov (citokinov in

fragmentov protiteles), tako za pripravo konjugatov z različnimi polimeri (konjugacija in separacija), kot tudi za njihovo karakterizacijo. Poleg PEGilacije smo uvedli tudi druge metode kemijske modifikacije proteinov, konjugacijo z maščobnimi kislinami, premreženim škrobom in hialuronsko kislino ter proučevali njihov vpliv na farmakokinetiko, farmakodinamiko in biodistribucijo. Pripravili smo lastne reagente PEGSe, ki so pokazali zanimivo obnašanje v konjugatih z možnostjo uvedbe principa predzdravil. S konvencionalnimi in novimi lastnimi PEGSe reagenti smo pripravili nekaj novih PEGiliranih konjugatov hG-CSF, od katerih so se še posebej zanimivo obnašali PEGilirana dimera hG-CSF (diPEG-Fdim), PEGSe konjugat G-CSF (FC18-SeC20L) in PEGiliran konjugat analoga hG-CSF Thr134-Cys (FC134Mal-20L). Omenjeni konjugati kažejo določene prednosti pred komercialno dostopnim originatorskim PEG-GCSF (Neulasta®) in bi lahko vodili do priprave izboljšanih oblik zdravil (t.i. biobetter molekul). Rezultati omenjenih raziskav so vodili v dva zaključena doktorata (Fidler K., MR iz gospodarstva; Kunstelj M.), v en patent in zaenkrat dve objavi v obliki znanstvenih člankov, nekaj jih je še v pripravi.

V okviru sodelovanja s CO PoliMat smo uspeli pripraviti nove biorazgradljive reagente PEG na osnovi dendrimerov, ki rešujejo problem akumulacije konvencionalnih PEGov zaradi njihove nerazgradljivosti, za kar nameravamo še letos vložiti patentno prijavo.

Čeprav je eden najpomembnejših pozitivnih učinkov PEGilacije podaljšanje razpolovnega časa proteina na račun izrazitega povečanja hidrodinamskega radija molekule, se pogosto pozablja, da prinaša PEGilacija tudi vrsto drugih pozitivnih učinkov na protein, kot so izboljšanje proteolitske stabilnosti in zmanjšanje hidrofobnosti proteina. Na primeru izrazito hidrofobnega proteina interferon-beta smo preučevali vpliv pozitivnih učinkov PEGilacije na njegovo stabilnost in pokazali izrazito manjšo nagnjenost k agregaciji po pripetju PEGa. Študija je bila opravljena v okviru bolonjskega magisterija Čerkić K.: »Zaščitna vloga pegilacije pri stabilnosti zelo hidrofobnega proteina v tekoči farmacevtski obliki«. Objavo v obliki članka pa še pripravljamo.

V okviru sodelovanja s CO EN-FIST smo z NMR analizo potrdili strukturo povezovalnega člena med proteinom in verigo PEG ter reaktivne skupine na naši molekuli in originatorski molekuli. Člani programske skupine smo ključno sodelovali tudi pri NMR primerjalnih študijah naših molekul z originatorskimi molekulami, s katerimi smo pokazali podobnost primerjanih molekul. Ena od preiskovanih molekul je bila PEGiliran protein. Vpeljava tovrstnih karakterizacijskih orodij za biološko podobna zdravila predstavlja enega ključnih pristopov za dokazovanje komparabilnosti, cilj pa je zmanjšanje obsega kliničnih študij za biološko podobna zdravila, kar bo znatno pospešilo in pocenilo njihov razvoj. Pristop predstavlja pomemben prispevek k znanosti na področju NMR spektroskopije bioloških molekul.

S kombinacijo analogov TNF-alfa (TNF) in pegilacije smo pripravili konjugate, ki bi lahko bili primerni za uporabo molekule TNF v terapiji raka. Le tem smo ovrednotili biološko aktivnost *in vitro*, PK lastnosti v modelih *in vivo* ter toksičnost v modelih *in vivo*. Pripravljeni konjugati so izkazovali nizko biološko aktivnost *in vitro*, podaljšan razpolovni čas in nizko sistemsko toksičnost, izkazovali so bistveno manj izražene klinične znake (sedacija, piloerekcija, dispnea, diareja) kot nativni TNF. S tem smo potrdili našo osnovno hipotezo, da je PEGilacija primerno orodje za načrtovanje izboljšanih molekul TNF, potencialno uporabnih v terapiji raka. Del rezultatov omenjenih raziskav je vodil v zaključen doktorat MR iz gospodarstva (Škrajnar Š.). Objave v obliki člankov pa še pripravljamo.

V okviru programskega sklopa razvoj alternativnih pristopov za zdravljenja bolezenskih stanj s povišano aktivnostjo TNF smo načrtovali in pripravili več različnih konjugatov TNF in njegovih analogov z majhnimi molekulami reagentov PEG, biotinom in maščobnimi kislinami ter jih okarakterizirali z različnimi analitskimi tehnikami. Zastavljen cilj, popolnoma izničeno biološko aktivnost *in vitro*, smo pri večini dosegli, prav tako je večina pripravljenih konjugatov izkazovala ustrezno inhibicijo molekule TNF v pogojih *in vitro*, kar potrjuje tudi našo drugo hipotezo, da je PEGilacija lahko orodje za načrtovanje novih inhibitorjev TNF, ki bi delovali na principu izmenjave podenot TNF z izničeno bioaktivnostjo. Dodatno je bil namen konjugacije doseči povišanje obsega absorpcije proteina iz črevesja, kar bi bilo še posebej pomembno pri zdravljenju vnetnih bolezni prebavil (npr. Chronova bolezen), saj bi v tem primeru biološko zdravilo lahko vgradili v dostavne sisteme, ki omogočajo lokalno zdravljenje.

Sama konjugacija TNF ni povišala prehajanja preko dvosloja Caco-2 celic, ampak ga je celo zmanjšala, ko pa smo konjugatom dodali pospeševalce, so tisti s pripetimi kratkimi, razvejanimi PEG fragmenti, ter drugi konjugati, s kratkimi PEG fragmenti in lipofilnimi molekulami, prehajali Caco-2 dvosloj bolje od nativnega TNF. Predvidevamo, da bi omenjeni konjugati lahko bolje penetrirali v vneto tkivo (vneti sklepi - artritis, ali črevesje - Chronova bolezen) in na ta način pospešeno zavirali endogeni TNF. Vsekakor se zdijo pripravljene konjugate dobra alternativa obstoječim inhibitorjem TNF (adalimumab, infliximab,...), kjer je največji problem popolna blokada TNF, kar izniči tudi njegove potrebne pozitivne učinke. Ena večjih pričakovanih prednosti omenjenih konjugatov je, da delujejo preko izmenjave podenot in na ta način blokirajo zgolj topni TNFalfa, ne pa tudi membransko vezanega, ki je potreben za zaščitno delovanje. Del rezultatov teh aktivnosti, pripravljenih kot izvirni znanstveni članek »New assay for quantification of various

PEGylated proteins during the *in vitro* permeability studies» je bil poslan v objavo.

V okviru programa je zaključil doktorat Jaka Marušič (delovno mentorstvo S. Jevševar), ki je postavil termodinamske modele za karakterizacijo TNF in njegovih inhibitorjev, kar nam bo pomagalo pri načrtovanju možnih novih inhibitorjev TNF ter pri razvoju biološko podobnih inhibitorjev TNF na podlagi monoklonskih protiteles (mABs). V okviru doktorata je raziskoval model za vezavo adalimumaba na TNF, v nadaljevanju raziskav pa je razvil še kompleksnejši model za vezavo fuzijskega proteina etanercepta na TNF.

V okviru programskega sklopa razvoj alternativnih dostavnih sistemov za proteine smo vzpostavili metodologijo za vrednotenje formulacij, t.j. prehajanje preko bioloških barier (Caco-2, IVERI); biološko aktivnost "*in vitro*" (celični testi); konfokalno mikroskopijo; teste sproščanja nanoformulacij, proteolizne teste in farmakodinamske modele *in vivo*. Modele za testiranje *in vivo*, s katerimi lahko spremljamo farmakološko učinkovitost preiskovanih proteinov, smo vzpostavili v Lekovih prostorih VIVA. Najbolj uporaben model za trenutno fazo raziskav alternativnih dostavnih sistemov se nanaša na intraduodenalno aplikacijo, ki posnema dogajanje v prebavnem traktu po prehodu iz zgornjega dela prebavil. Ta model nam omogoča primerjanje učinkovitosti različno formuliranih proteinov, z njim smo ovrednotili različne formulacije in identificirali formulacijo, ki omogoča uspešno dostavo proteina preko črevesnega epitelija. Pri proteinskih molekulah je namreč poleg proteolitske nestabilnosti največji problem slabo prehajanje preko membran, čemur smo se v naših dosedanjih raziskavah prvenstveno posvečali. Končni cilj je razviti peroralno formulacijo za neinvaziven način aplikacije.

Pripravili in okarakterizirali smo konjugate z različnimi funkcionalnimi skupinami, ki so izkazovali povečano prehajanje v testu Caco-2 (20-50x višji koeficient prehajanja Papp). Identificirali in testirali smo okrog 30 biokompatibilnih pospeševalcev prehajanja, ki so pripomogli k izrazitemu povišanju prehajanja proteina (150x višji Papp za osnovno molekulo, do 300x višji Papp za konjugate, do 1000x višji Papp za kombinacije z nanodelci), kar kaže na sinergistično delovanje. Pripravili smo nanoformulacije proteina in konjugatov, ki so izkazovale zadržano sproščanje pri pH 3.5 in do 90% sproščanja pri pH 6.5, kar kaže na zaščito proteina v želodcu. Za zaščito pred proteolitsko razgradnjo pri prehodu skozi prebavni trakt smo v formulacije dodajali kazeinat in 1% proteaznih inhibitorjev, kar je v proteoliznem testu *in vitro* izkazovalo kompletno zaščito pred razgradnjo s proteazami (pepsin, tripsin, kimotripsin).

Najboljše kombinacije formulacij za peroralne dostavne sisteme proteinov iz *in vitro* testov smo testirali tudi na modelih *in vivo* ter dobili prve statistično značilne farmakodinamske odzive, s čimer smo pokazali, da zaščita proteina v nanodelcih, konjugacija za povečano prehajanje preko mukoznih površin in pospešena gastrointestinalna absorpcija omogočajo zvišanje biološke uporabnosti proteinov.

Iz te tematike smo v septembru 2013 vložili 3 patentne prijave (Konjugati s povečanim prehajanjem: Erythropoetin derivatives (konjugates) - 13183609.0; Formulacije z nanodelci in pospeševalci prehajanja): Peroral formulation of erythropoetin - 13183610.8 & Nanoformulation of G-CSF for non-parenteral delivery - 13183608.2). Poleg tega pripravljamo več objav v obliki izvirnih znanstvenih člankov.

Kot že vseskozi v preteklosti, še vedno sledimo naši usmerjenosti na področju varovanja intelektualne lastnine, saj smo v času trajanja programa dobili podeljenih 12 patentov ter vložili več mednarodnih patentnih prijav. To sicer prinaša določen zamik na področju publiciranja, vendar smo uspeli objaviti rezultate naših raziskav v revijah z visokimi faktorji vpliva. Odmevnost našega dela se kaže tudi v citiranosti naših člankov, kar kaže na znanstveno relevantno raziskovalnih aktivnosti znotraj programa.

Poleg izvirnih znanstvenih člankov, patentnih aplikacij in patentov smo objavili dva prispevka v obliki samostojnega poglavja v monografski publikaciji na temo kemijske modifikacije proteinov. Omenili bi tudi visoko citiranost našega preglednega članka o PEGilaciji proteinov (Jevševar *et al.* 2010., v štirih letih 169 citatov).

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

SLO

Načrtovali in pripravili smo analoge TNF in njihove pegilirane različice za protitumorsko delovanje in ovrednotili njihove fizikalno-kemijske (RP-HPLC, SE-HPLC, masna spektroskopija, DLS, iTC, SPR; DSC) ter biološke lastnosti (biološka aktivnost *in vitro*, PK lastnosti pri podganah, biodistribucijo ter sistemsko toksičnost). Pripravljeni konjugati so izkazovali znižano bioaktivnost in znižano sistemsko toksičnost, kar potrjuje možnost uporabe takšnih molekul v sistemski terapiji raka.

V okviru programskega sklopa razvoj alternativnih postopkov za zdravljenje bolezenskih stanj s povišano aktivnostjo TNF smo pripravili več različnih konjugatov TNF in njegovih analogov z majhnimi PEG fragmenti in maščobnimi kislinami in jih okarakterizirali z različnimi analitskimi tehnikami. Večina pripravljenih konjugatov ima nizko bioaktivnost *in vitro* in izkazuje ustrezno

inhibicijo molekule TNF v pogojih *in vitro*, kar je potrditev hipoteze, da je PEGilacijo mogoče uporabiti za načrtovanje novih oblik inhibitorjev TNF.

Ker naš interes za modifikacijo proteinov ni omejen zgolj na TNF, smo uspešno pegilirali tudi druge proteine (fragmente protiteles, druge citokine). Pripravili smo tudi konjugate z novimi lastnimi reagenti PEGSe, ki so izkazovali zanimivo obnašanje v primerjavi s klasičnimi PEG reagenti in kažejo določene prednosti pred klasičnimi konjugati. Skupaj s CO PoliMaT smo uspeli pripraviti biorazgradljive PEG dendrimere. Vzpostavili smo metodologijo za modifikacijo proteinov z različnimi biorazgradljivimi polimeri (premrežen škrob, hialuronska kislina, novi razvejani PEGi), ter maščobnimi kislinami, postavili oz. prilagodili analitiko za karakterizacijo pripravljenih konjugatov, za konjugate polimerov skonstruirali PK profile v podganah in izvedli študijo biodistribucije. Vzpostavili smo biološke teste za testiranje *in vitro* in *in vivo* drugih preiskovanih molekul (EPO, IFN, Fab), kar nam omogoča testiranje širokega nabora različnih molekul.

V okviru programskega sklopa razvoj alternativnih dostavnih sistemov za proteine smo vzpostavili metodologijo za vrednotenje formulacij, t.j. prehajanje preko bioloških barier (Caco-2, IVERI); biološka aktivnost *in vitro* (celični testi); konfokalna mikroskopija; PD model *in vivo*; teste sproščanja nanoformulacij, proteolizni testi. Pripravili smo vrsto konjugatov z različnimi funkcionalnimi skupinami, testirali različne pospeševalce prehajanja in pripravili različne nanoformulacije ter jih ovrednotili s postavljeno metodologijo. Z najboljšimi kombinacijami formulacij za peroralne dostavne sisteme proteinov na modelih *in vivo* smo dobili prve statistično značilne PD odzive, s čimer smo pokazali, da zaščita proteina v nanodelcih, konjugacija za povečano prehajanje preko mukoznih površin in pospešena intestinalna absorpcija omogočajo zvišanje biološke uporabnosti proteinov.

Ocenjujemo, da smo večino ciljev programa dosegli, na področju razvoja neinvazivnih dostavnih sistemov za proteine pa celo presegli.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine<sup>4</sup>

Program je vseskozi sledil bistvenim usmeritvam, kot so bile zastavljene v osnovnem predlogu.

Tekom izvajanja programa smo skladno z razvojno strategijo okrepili dejavnosti za vzpostavitev platform za razvoj bioloških zdravil (usmeritev v kemijsko modifikacijo proteinov), doseganje dolgoročnega cilja – novega zdravila za protitumorno ali protivnetno delovanje pa je skladno s strategijo dobilo nižjo prioriteto. Zato smo fokus raziskovalno-razvojnega dela usmerili v graditev platform, tudi za peroralno dostavo proteinov. Postavitev modelov *in vivo* smo v zadnjih dveh letih izvajanja programa usmerili predvsem na postavitve modelov *in vivo* za testiranje formulacij za peroralno dostavo proteinov in bistveno manj na protivnetno in protitumorno delovanje.

Čeprav se zdi ekonomsko vzdržna peroralna dostava proteinov pri trenutni ceni bioloških zdravil še zelo oddaljen cilj, smo z našimi raziskavami v zadnjih letih uspeli pokazati, katere kombinacije vodijo v izboljšano biološko razpoložljivost in predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje raziskave in razvoj na tem področju. Svoje rešitve smo tudi zaščitili v obliki patentnih prijav. Kljub temu, da se na področju peroralne dostave proteinov izvajajo številne raziskave in da je to nedvoumna nepokrita medicinska potreba, biološko zdravilo v takšni obliki pacientom še ni na voljo.

Tekom trajanja programa postavljena kompleksna platforma za modifikacijo proteinov je odlična osnova za odobreno nadaljevanje programa v nove molekule, konjugate protiteles s toksini za terapijo raka, kjer bomo s pridom uporabili vsa akumulirana znanja, ki smo jih pridobili tekom dosedanjega izvajanja programa, vključno s pristopom proučevanja protitumornega delovanja molekule TNF.

Tekom izvajanja programa med 2009 in 2013 programske skupine ni zapustil noben član, so se nam pa že pred 2013 pridružili štirje novi člani (V. Smilović, K. Fidler, M. Kunstelj in D. Arzenšek).

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine<sup>5</sup>

| Znanstveni dosežek |           |          |                                                                                                                                                      |
|--------------------|-----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.                 | COBISS ID | 35833349 | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                       |
|                    | Naslov    | SLO      | Prepoznavanje humanega faktorja tumorske nekroze TNFalfa s fragmentom terapevtskega protitelesa                                                      |
|                    |           | ANG      | Recognition of human tumor necrosis factor [alpha] (TNF-[alpha]) by therapeutic antibody fragment                                                    |
|                    |           |          | Za karakterizacijo TNF in njegovih inhibitorjev smo izvedli termodinamsko študijo in na podlagi dobljenih rezultatov postavili termodinamski model z |

|              |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Opis         | SLO                                                                                                                                                                                                              | namenom razumevanja molekularnih sil, ki sodelujejo pri prepoznavanju TNF s strani protiteles z inhibitornim delovanjem. Študirali smo vezavno energijo terapevtskega fragmenta protiteles (Fab) na nativno in nenativno obliko TNF z uporabo kalorimetričnih in spektroskopskih metod. Podatke smo podprli s strukturnim modeliranjem. Pokazali smo, da je visoka afiniteta vezave fragmenta Fab na TNF v glavnem posledica specifičnih nekovalentnih interakcij.<br>Rezultati študije prispevajo k boljšemu razumevanju molekularnega mehanizma regulacije aktivnosti TNF, kar nam bo pomagalo pri načrtovanju možnih inhibitorjev TNF na podlagi njegovih kemijsko modificiranih analogov. Hkrati bo omenjena študija pomagala tudi pri razvoju biološko podobnih inhibitorjev TNF na podlagi mAbs.                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|              | ANG                                                                                                                                                                                                              | For the characterization of TNF and its inhibitors we carried out thermodynamic study and generated data were used to set the thermodynamic model with the purpose to understand the molecular forces involved in the recognition of TNF by the antibody with inhibitory activity. We studied the energetics of binding of a therapeutic antibody fragment (Fab) to the native and nonnative forms of TNF $\alpha$ by employing calorimetric and spectroscopic methods. The data were supported by structural modeling. We demonstrated that the observed high affinity binding of Fab to TNF $\alpha$ is an enthalpydriven process due mainly to specific noncovalent interactions. The study results contribute to a better understanding of the molecular mechanism of regulation of TNF activity, which will help us in designing potential inhibitors of TNF based on chemically modified analogues. The study will also assist in the development of biosimilar TNF inhibitors on the basis of mAbs. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|              | Objavljeno v                                                                                                                                                                                                     | American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2012; Vol. 287, no. 11; str. 8613-8620; Impact Factor: 4.651; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.761; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Marušič Jaka, Podlipnik Črtomir, Jevševar Simona, Kuzman Drago, Vesnaver Gorazd, Lah Jurij                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|              | Tipologija                                                                                                                                                                                                       | 1.01 Izvirni znanstveni članek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
| 2.           | COBISS ID                                                                                                                                                                                                        | 1453148                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
| Opis         | Naslov                                                                                                                                                                                                           | SLO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Sprejemljive spremembe v kvaliteti glikoziliranih biofarmacevtikov                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                  | ANG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                  | SLO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | V članku so opisane zaznane spremembe nekaterih atributov kvalitete pri treh bioloških zdravilih, tako z evropskega kot tudi ameriškega trga. Vse spremembe so bile sprejete in odobrene s strani regulatornih organov (t.j. informacije o zdravilu so ostale nespremenjene). To je zelo pomemben dosežek, saj se je do sedaj o takih spremembah zgolj špekuliralo, v članku pa so znanstveni javnosti predstavljeni podatki več kot desetih analiziranih serij vsakega izmed bioloških zdravil pred in po zaznani spremembi. Na osnovi v članku predstavljenih podatkov je pričakovati enakovrednejšo obravnavo in registracijo podobnih bioloških zdravil s strani regulatornih organov. |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                  | ANG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Paper describes detected changes in selected product attributes of three marketed biologics, both from EU and US markets. All changes had been approved by regulatory agencies (i.e. information on the drugs remained unchanged). This is very important achievement, as such changes had been only speculated about so far. Data on more than ten analysed batches of each biologics before and after detected change are presented in the paper. Based on these facts more fair discussion on approval for biosimilar drugs by regulatory agencies it is expected.                                                                                                                      |  |
| Objavljeno v | Nature Biotechnology; Nature biotechnology; 2011; Vol. 29, no. 4; str. 310-312; Impact Factor: 23.268; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.822; A': 1; A': 1; WoS: DB; Avtorji / Authors: |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |

|    |              |                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |              |                                                                                                       | Schiestl Martin, Stangler Thomas, Torella Claudia, Čepeljnik Tadej, Toll Hansjörg, Grau Roger                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|    | Tipologija   | 1.01 Izvirni znanstveni članek                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 3. | COBISS ID    | 1490012                                                                                               | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|    | Naslov       | SLO                                                                                                   | Podaljšanje razpolovnega časa s PEGilacijo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|    |              | ANG                                                                                                   | Half-life extension through PEGylation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|    | Opis         | SLO                                                                                                   | Samostojno poglavje v knjigi, ki združuje različne metode podaljšanja razpolovnega časa za proteine. Naše poglavje obravnava PEGilacijo in opisuje različne aspekte, ki jih prinaša PEGilacija. Od samega podaljšanja razpolovnega časa odvisnega od različnih oblik in dolžin PEGa, do izboljšanja proteolitske stabilnosti tako modificiranih proteinov, prednosti in potencialnih slabosti PEGilacije, ki so v največji meri povezana s potencialno akumulacijo dolgih PEG verig v telesu.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|    |              | ANG                                                                                                   | A chapter in a book that combines various methods of extending the half life of proteins. Our chapter deals with PEGylation and describes various aspects achieved by PEGylation. From half-life extension dependent on various PEG shapes and lengths to the proteolytic stability improvement of modified proteins, advantages and potential disadvantages of PEGylation, which are largely related to the potential accumulation of long PEG chains in the body.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Objavljeno v | Wiley-VCH; Therapeutic proteins; 2012; Str. 39-61; Avtorji / Authors: Jevševar Simona, Kunstelj Menči |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 4. | Tipologija   | 1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | COBISS ID    | 1533276                                                                                               | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|    | Naslov       | SLO                                                                                                   | Hidroksipropil metilcelulozno medirana inhibicija sirolimusa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    |              | ANG                                                                                                   | Hydroxypropyl methylcellulose mediated precipitation inhibition of sirolimus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    | Opis         | SLO                                                                                                   | Cilj te študije je bil razviti trdno oralno obliko sirolimusa, ki vsebuje inhibitor obarjanja, kar bi pomenilo izboljšano absorpcijo sirolimusa pri ljudeh v primerjavi s formulacijo, ki vsebuje nanodelce sirolimusa brez inhibitorja obarjanja, t.j. Rapamune. Izbor inhibitorja obarjanja je temeljil na rezultatih presejalne študije, kjer smo identificirali dve možnosti: HPMC 603 (Pharmacoat 603) in Poloksamer 407. Diferenčna vrstična kalorimetrija (DSC) in infrardeča (IR) spektroskopka študija sta pokazali, da se med sirolimusom in HPMC 603 razvijejo interakcije, ki bi lahko bile odgovorne za opažen efekt inhibicije obarjanja. Farmakokinetična študija na ljudeh je pokazala, da so bili AUC in Cmax bistveno višji za formulacije obložene s HPMC 603 v primerjavi z Rapamunom. Ta rezultat je mogoče pripisati HPMC 603 (Pharmacoat 603) medirani inhibiciji obarjanja sirolimusa, ki vodi v izboljšano absorpcijo sirolimusa iz prebavnega trakta pri ljudeh.                                           |
|    |              | ANG                                                                                                   | The aim of this study was to develop a sirolimus solid oral dosage form containing a precipitation inhibitor, which would result in an improved sirolimus absorption in humans compared to the formulation containing nanosized sirolimus without a precipitation inhibitor, i.e., Rapamune. The selection of the precipitation inhibitor was based on the results of a screening campaign that identified two "hit" excipients: HPMC 603 (i.e., Pharmacoat 603) and Poloxamer 407. Differential scanning calorimetry (DSC) and an infrared (IR) spectroscopy study revealed that interactions between the sirolimus and HPMC 603 were developed that could lead to the observed precipitation inhibition effect. A human pharmacokinetic study outlined that significantly higher AUC and Cmax were obtained for formulations with HPMC 603coated sirolimus particles in comparison to Rapamune. This result could be attributed to the HPMC 603 (Pharmacoat 603) mediated sirolimus precipitation inhibition resulting in improved |

|    |              |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|--------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |              |         | sirolimus absorption from the gastrointestinal tract in humans.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | Objavljeno v |         | American Chemical Society; Molecular pharmaceuticals; 2013; Vol. 10, issue 6; str. 2299-2310; Impact Factor: 4.570; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.729; A': 1; WoS: TU; Avtorji / Authors: Petruševska Marija, Homar Miha, Petek Boštjan, Resman Aleksander, Kocjan Darko, Urleb Uroš, Peternel Luka                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|    | Tipologija   |         | 1.01 Izvirni znanstveni članek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 5. | COBISS ID    | 1534556 | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|    | Naslov       | SLO     | Cisteinsko specifična PEGilacija rhGCSF preko selenilsulfidne vezi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|    |              | ANG     | Cysteine-specific PEGylation of rhG-CSF via selenylsulfide bond                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | Opis         | SLO     | Članek opisuje pripravo in uporabo novega PEGilacijskega reagent PEGSe, ki omogoča mestno specifično pripetje PEG na proste tiolne skupine. Aktivna skupina v reagent PEGSe je diselenid, ki reagira s tioli. Reagent smo uporabili za pripravo PEGiliranega konjugata hGCSF s pripetjem PEGa na prosti Cys18. Za primerjavo smo pripravili konjugate s komercialno dostopnimi reagenti PEGMal in PEGOPSS. Očiščene monoPEGilirane konjugate rhGCSF smo karakterizirali in primerjali. Zaznali smo precejšnje razlike v aktivnosti, stabilnosti in delovanju in vivo, čeprav so bili vsi konjugati pripravljeni z enako 20 kDa dolgo verigo PEGa, pripeto na Cys18. Konjugat, pripravljen z PEGSe, je imel najvišjo biološko aktivnost in vitro, medtem ko je konjugat, pripravljen z PEGOPSS izkazoval najboljše delovanje in vivo. |
|    |              | ANG     | A new PEGylation reagent enabling selective modification of free thiol groups is described in this article. The active group of this new PEGSe reagent is a diselenide, reacting with thiols. The reagent was used for the preparation of PEGylated conjugate of hGCSF with the PEG attachment to the free Cys18. For comparison, conjugates with commercially available reagents PEGMal and PEGOPSS were prepared. Purified monoPEGylated rhGCSF conjugates were characterized and compared. Significant differences in activity, stability, and in vivo performance were observed, although all conjugates contained a 20 kDa PEG attached to the Cys18. The conjugate prepared with PEGSe had the highest in vitro biological activity, while the conjugate prepared with PEGOPSS had the best in vivo performance.               |
|    | Objavljeno v |         | American Chemical Society; Bioconjugate chemistry; 2013; Vol. 24, no. 6; str. 889-896; Impact Factor: 4.580; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.608; A': 1; WoS: CO, CQ, DY, EE; Avtorji / Authors: Kunstelj Menči, Fidler Katarina, Škrajnar Špela, Kenig Maja, Smilović Vanja, Kusterle Mateja, Caserman Simon, Zore Irena, Gaberc-Porekar Vladka, Jevševar Simona                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    | Tipologija   |         | 1.01 Izvirni znanstveni članek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine<sup>6</sup>

|    |           |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|-----------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |           |         | Družbeno-ekonomski dosežek                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 1. | COBISS ID | 1518684 | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    | Naslov    | SLO     | Vodotopni polimeri, ki vsebujejo Selen in njihovi konjugati                                                                                                                                                                                                                            |
|    |           | ANG     | Selenium-containing water-soluble polymers and their conjugates                                                                                                                                                                                                                        |
|    | Opis      | SLO     | Patent se nanaša na pripravo novih SelenoPEG reagentov za usmerjeno pegilacijo na cisteine, s katerimi je mogoče stabilizirati proteine, sama vez pa se razcepi ob dodatku majhnih količin reducenta, kar omogoča sproščanje aktivnega proteina v krvnem obtoku, ki je okolje z znatno |

|    |              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |              |                                                                                                                                                | prisotnostjo reducenta.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Patent application relates to SelenoPEG reagents for sitespecific PEGylation to cysteines. Stabilizing effect is achieved because bond is cleavable in the presence of small amounts of reducing agents enabling release of fully active protein in blood, environment with significant amount of reducing agent.                                |
|    | Šifra        | F.32 Mednarodni patent                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Objavljeno v | European Patent Office; 2012; 31 str.; A": 1;A': 1; Avtorji / Authors: Kunstelj Menči, Menart Viktor, Ambrožič Gabriela, Gaberc-Porekar Vladka |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Tipologija   | 2.24 Patent                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 2. | COBISS ID    | 4059418                                                                                                                                        | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | Naslov       | SLO                                                                                                                                            | Antibakterijska kombinacija triciklo karbapenema in antibiotika                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Antibacterial combination of a tricyclic carbapenem and an antibiotic                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | Opis         | SLO                                                                                                                                            | Opisuje farmacevtsko obliko, ki vsebuje etilenske derivate triciklo karbapenov v obliki čiste diastereoizomere in v obliki čiste geometrijske izomere ali soli, estra ali amidnega derivata ter antibiotika. Taka kombinacija se lahko uporabi kot široko spektralni antibiotik za inhibicijo betalaktamaz.                                      |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Patent application relates to pharmaceutical composition comprising an ethylene derivatives of tricyclic carbapenems in a form of pure diastereoisomers and in the form of pure geometric isomers or a salt, ester or amide derivate thereof and an antibiotic and the use of this composition as a broad band spectrum betalactamase inhibitor. |
|    | Šifra        | F.32 Mednarodni patent                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Objavljeno v | European Patent Office; 2012; 44 str.; A": 1;A': 1; Avtorji / Authors: Preželj Andrej, Urleb Uroš, Šolmajer Tomaž                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Tipologija   | 2.24 Patent                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 3. | COBISS ID    | 3015194                                                                                                                                        | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | Naslov       | SLO                                                                                                                                            | Proces za produkcijo povečanega deleža pravilno zvitega heterolognega proteina v inkluzijskih telescih                                                                                                                                                                                                                                           |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Process for the production of increased amounts of correctly folded heterologous protein in inclusion bodies                                                                                                                                                                                                                                     |
|    | Opis         | SLO                                                                                                                                            | Podeljen mednarodni patent, ki pokriva pripravo rekombinantnih proteinov v E.coli v obliki neklasičnih inkluzijskih teles z visokim deležem pravilno zvitega proteina.                                                                                                                                                                           |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Granted international patent covering preparation of recombinant proteins in E.coli in the form of nonclassical inclusion bodies with high amount of correctly folded protein.                                                                                                                                                                   |
|    | Šifra        | F.32 Mednarodni patent                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Objavljeno v | European Patent Office; 2010; 27 str.; A": 1;A': 1; Avtorji / Authors: Menart Viktor, Gaberc-Porekar Vladka, Jevševar Simona                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | Tipologija   | 2.24 Patent                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 4. | COBISS ID    |                                                                                                                                                | Vir: vpis v poročilo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|    | Naslov       | SLO                                                                                                                                            | Podpora gradnji obrata in vzpostavljanju proizvodnje za modificirane proteine v Lek, Mengeš, razvoj PEGiliranih biofarmacevtikov ter prenos procesa v proizvodnjo                                                                                                                                                                                |
|    |              | ANG                                                                                                                                            | Support to facility construction and establishing of manufacturing for modified proteins in Lek, Mengeš, development of PEGylated biopharmaceuticals and process transfer to production                                                                                                                                                          |
|    |              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|              |                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Opis         | SLO                                                                                                                                                                                                                      | Člani programske skupine smo izvedli razvoj tehnoloških postopkov za dve PEGilirani biološki zdravili, biološko podobno in originalno biološko zdravilo. Procesu smo uspešno prenesli v proizvodnjo, podpirali njuno povečavo in tudi podpirali klinično GMP proizvodnjo. Poleg tega smo podpirali tudi načrtovanje in gradnjo obrata za proizvodnjo modificiranih (PEGiliranih) proteinov v Mengešu. Začetek redne proizvodnje pričakujemo po 2015. Pomembno vlogo, ne samo s stališča ekspertnih znanj, temveč tudi z vodenjem razvojnega dela v laboratorijski fazi, je pri obeh projektih odigrala članica skupine S. Jevševar. Njen znanstveni prispevek, ki se je prenesel tudi v prakso, je bil v 2010 prepoznan s podelitvijo Novartisove globalne nagrade za raziskave VIVA (Vision/vizija, Innovation/inovacija, Values & Achievement/vrednote in dosežki), s katero odlikujejo vodilne Novartisove znanstvenike. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|              | ANG                                                                                                                                                                                                                      | Members of the program group have been performed development of technological processes for two PEGylated biopharmaceuticals, biosimilar and the innovative biologics. We have successfully transferred both processes to the large scale manufacturing and support clinical GMP manufacturing. Additionally, we supported the design and construction of a plant for the production of modified (PEGylated) proteins in Mengeš. Start of regular manufacturing is expected after 2015. A program group member S. Jevševar played a key role in all phases, not only in terms of expertise, but she also managed development work in the laboratory phase. Her role and scientific contribution, which was transferred into practice as well, was recognized in 2010 by Novartis' global award VIVA (Vision, Innovation, Values & Achievement, which is granted to Novartis leading scientists.                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|              | Šifra                                                                                                                                                                                                                    | F.17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|              | Objavljeno v                                                                                                                                                                                                             | interna dokumentacija                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|              | Tipologija                                                                                                                                                                                                               | 2.14 Projektna dokumentacija (idejni projekt, izvedbeni projekt)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
| 5.           | COBISS ID                                                                                                                                                                                                                | 1812337                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Vir: COBISS.SI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
| Opis         | Naslov                                                                                                                                                                                                                   | SLO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Gastroresistentna farmacevtska oblika, ki vsebuje N-(2-2-ftalimidoetoxiacetil)-L-alanil-D-glutaminsko kislino (LK423)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                          | ANG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Gastroresistant pharmaceutical dosage form comprising N-(2-(2-phthalimidoethoxy-acetyl)-L-alanyl-D-glutamic acid (LK-423)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                          | SLO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Izum se nanaša na farmacevtsko obliko, ki se lahko uporablja za kontrolirano in/ali ciljano dostavo aktivne učinkovine v izbrano regijo gastrointestinalnega trakta ljudi ali živali. Farmacevtska oblika v izumu v glavnem opisuje uporabo aktivne substance N-(2(2ftalimidoetoksi)acetil) L-alanil-D-glutaminske kisline (kodirana kot LK-423), čeprav se lahko opisano farmacevtsko obliko uporabi širše za druge aktivne substance. Nadaljnji aspekt izuma se nanaša na metodo in proces pridobivanja opisane farmacevtske oblike in metode tretiranja kroničnih vnetnih bolezni ljudi in/ali živali z opisano farmacevtsko obliko. |  |
|              |                                                                                                                                                                                                                          | ANG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | The present invention relates to the pharmaceutical dosage forms which enabled a controlled and/or a targeted drug delivery of an active substance to the selected regions of gastrointestinal tract of humans or animals. The pharmaceutical dosage forms preferably comprises the active substance N-(2(2phthalimidoethoxy-acetyl)-L-alanyl-D-glutamic acid (designed as LK-423).Methods of treatment of chronic inflammatory diseases of gastrointestinal tract of humans and/or animals by using the pharmaceutical dosage forms of the invention are disclosed.                                                                    |  |
|              | Šifra                                                                                                                                                                                                                    | F.32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Mednarodni patent                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |
| Objavljeno v | European Patent Office; 2010; 49 str.; A": 1;A': 1; Avtorji / Authors: Bogataj Marija, Mrhar Aleš, Lavrič Anton, Černe Manica, Tibaut Doris, Štalč Anton, Urleb Uroš, Mateović Tatjana, Cof Greta, Kerč Janez, Dreu Rok, |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |

|            |              |
|------------|--------------|
|            | Yomeda Fumio |
| Tipologija | 2.24 Patent  |

## 8. Drugi pomembni rezultati programske skupine<sup>7</sup>

### D.08 Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela

Vodenje in upravljanje raziskovalnih dejavnosti v Sandozu

Dr. Uroš Urleb, vodja programske skupine, je bil do 1.11.2012 vodja Raziskovalnih dejavnosti za celo skupino Sandoz, kjer je skrbel za implementacijo novih razvojnih iniciativ na vseh Sandozovih lokacijah.

Z 1.11.2012 je postal vodja Globalnega tehničnega razvoja Biofarmacevtike v Sandozu, odgovoren za kompleten tehnični razvoj proteinskih zdravilnih učinkovin za Sandozova biološko podobna zdravila.

### D.07 Vodenje centra/laboratorija (v Sandoz, Biofarmacevtiki Mengeš)

- Dr. Simona Jevšvar: Vodenje in upravljanje Oddelka Nove generacije proteinov. Vodenje raziskav in razvoja na področju kemijsko modificiranih proteinov, ki je osrednja aktivnost in orodje za pripravo zdravil v okviru programa P10340.

Občasne recenzije znanstvenih člankov.

- Dr. Drago Kuzman: Vodenje oddelka Proteinska biofizika in bioinformatika (od 1.1.2012). Vodenje raziskav in razvoja na področju bioinformatike in fizikalnih metod karakterizacije proteinov (DCS, ITC, DLS,...).

Dr. Drago Kuzman je za svoje izredne znanstvene dosežke v 2011 prejel Sandozovo globalno nagrado za raziskave VIVA (Vision/vizija, Innovation/inovacija, Values & Achievement/vrednote in dosežki), s katero odlikujejo vodilne Novartisove znanstvenike. Nagrajeno je bil njegovo delo na postavitvi orodja ARA za izbor ustreznih klonov pri razvoju celičnih linij za proizvodnjo monoklonskih protiteles, ki ga uporabljamo pri razvoju Sandozovih biološko podobnih zdravil na podlagi CHO platforme.

V času izvajanja programa smo člani programske skupine sodelovali pri uspešno zaključenem razvoju in tehnološkem prenosu v proizvodnjo v Avstrijo treh biološko podobnih zdravil – monoklonskih protiteles.

Dr. Simona Jevšvar, dr. Aleš Premzl in dr. Boštjan Japelj: Sodelovanje kot predstavniki industrijskega partnerja Lek d.d. v treh Centrih odličnosti, ki so uspešno kandidirali na razpisu v 2009: CO PoliMat, CO CiPKeBiP ter CO ENFIST.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

Raziskave genoma in proteomika pospešeno razkrivajo molekularne osnove mnogih bolezni in posledično tudi nove kandidate za bodoče zdravilne učinkovine, ki so v veliki meri kompleksne biološke makromolekule. Čeprav je z njimi mogoče doseči odličen terapevtski učinek, njihova krhka in občutljiva struktura, ki v telesu vodi v zelo hitro odstranjevanje iz krvnega obtoka, zelo omejuje njihov način administracije.

Kemijska modifikacija proteinov omogoča poleg povečanja biološke uporabnosti tudi izboljšanje lastnosti proteinskih molekul za manj pogosto administracijo in tudi dostavo preko alternativnih poti. Na področju raziskav za pripravo izboljšanih različic dolgo delujočega hG-CSF za zdravljenje nevtropenije smo razvili nove PEGilirane konjugate hG-CSF z izboljšanimi lastnostmi, ki lahko v prihodnosti prispevajo k razvoju boljših oblik zdravila (tudi v kombinaciji z našimi novimi biorazgradljivimi reagenti PEG). Akumulacija dolgih nerazgradljivih verig PEG je prepoznana kot ena ključnih slabosti tehnologije PEGilacije, zato predstavljajo biorazgradljivi reagenti PEG pomemben razvojni korak k izboljšani varnosti PEGiliranih bioloških zdravil, saj bi dovoljevali uporabo višjih odmerkov in uporabo za zdravljenje kroničnih bolezni, kjer je uporaba PEGiliranih proteinov zaenkrat zelo omejena.

Ker PEGilacija proteinov vodi do znižanja biološke aktivnosti proteinskih molekul in vitro, jo je

mogoče uporabiti tudi za znižanje morebitne toksičnosti molekul.

Na primeru molekule TNF-alfa, ki je ena naših ključnih modelnih molekul, smo skušali uporabiti in pokazati vse prednosti PEGilacije, od podaljšanja razpolovnega časa do zmanjšanja sistemske toksičnosti molekule ob ohranjeni delni biološki aktivnosti proteina, s čimer smo pripravili PEGilirane analoge TNF, ki kažejo potencial za uporabo v sistemske terapiji raka in predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje raziskave in razvoj na tem znanstvenem področju.

Z izničenjem biološke aktivnosti TNF z modifikacijo proteina smo uspeli pripraviti tudi potencialne inhibitorje nativnega TNF za zdravljenje bolezni kot so revmatoidni artritis, Crohnova bolezen in psoriaza, za katere pričakujemo, da bodo izkazovali manj stranskih učinkov kot jih izkazujejo trenutno dostopni terapevtiki z antiTNF delovanjem.

Z našim pristopom in rezultati programa smo pokazali širšo uporabnost tehnologije PEGilacije, ki ni omejena zgolj na podaljšanje razpolovnega časa proteinov v telesu.

Zaradi relativno nestabilne narave proteinov in peptidov, nizke absorpcije iz GIT zaradi njihovih strukturnih lastnosti, ter velikosti in hidrofilnosti molekul, ki ovirajo prehod preko črevesnega epitelijskega, se tovrstna zdravila odmerjajo na invaziven, pacientom neprijazen način z injiciranjem. Kljub temu, da se na področju peroralne dostave proteinov izvajajo številne raziskave in da je to nedvoumna nepokrita medicinska potreba, biološko zdravilo v takšni obliki pacientom še ni na voljo. Čeprav je nekaj molekul v različnih fazah kliničnega testiranja, je to še vedno izredno velik izziv za znanost, ki bo pomenil pomemben preboj. Čeprav se zdi ekonomsko vzdržna peroralna dostava proteinov pri trenutni ceni bioloških zdravil še zelo oddaljen cilj, smo z našimi raziskavami v zadnjih letih uspeli pokazati, da zaščita proteina v nanodelcih, konjugacija za povečano prehajanje preko mukoznih površin in pospešena gastrointestinalna absorpcija omogočajo zvišanje biološke uporabnosti proteinov. Omenjeni rezultati pomenijo pomemben doprinos k znanosti na področju razvoja pacientom prijaznejših dostavnih sistemov za biološka zdravila.

ANG

Genomic and proteomic research is rapidly unveiling the molecular basis of many diseases and consequently also many new candidates for therapeutics, which are complex biologics. Although their characteristics allow excellent therapeutic effect, their fragile and sensitive structure and the body's ability to rapidly remove them from the bloodstream severely limit their administration.

In addition to prolonged biological availability protein modification enables improvement of protein characteristics to such extent that not only significantly less frequent administration is possible, but also alternative drug delivery systems could be used.

In the research area for the preparation of an improved version of the long acting hG-CSF to treat neutropenia, we contributed several PEGylated hG-CSF conjugates with improved properties, which may contribute to the future development of biobetter drug variants (also in combination with our proprietary biodegradable PEG reagents). Accumulation of long non-degradable PEG chains is recognized as one of the key weaknesses of PEGylation technology, thus biodegradable PEG reagents represent important development step towards the improved safety of PEGylated biopharmaceuticals as it would allow the administration of higher doses and their use in chronic diseases treatments, where the use of PEGylated proteins is nowadays very limited.

Since PEGylation leads to reduced biological activity of protein molecules in vitro it can be used for reducing of possible toxicity of some molecules.

We tried to show and take all possible advantages of PEGylation, such as prolonged elimination half-life and reduced systemic toxicity of molecule with preserved biological activity, on our key model molecule TNF-alpha. We prepared appropriately PEGylated TNF-alpha analogs which show potential for use in the systemic anticancer therapy representing good basis for further research and development in this scientific field.

Modification or diminishing of biological activity of TNF-alpha by protein modification was explored in order to prepare candidates for inhibition of native TNF-alpha exhibiting less side effects than currently available antiTNF therapeutics for treatment of diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease and psoriasis.

Our approach and results of the program show wider applicability of PEGylation technology, not limited only to half-life extension of proteins in the body.

Poor absorption of protein from gastrointestinal tract is a consequence of the protein's structural characteristics, being physically, chemically and proteolytically unstable in the harsh conditions in the gastrointestinal tract (GIT), and too large and too hydrophilic to penetrate through the intestinal epithelium. Hence protein based medicines are administrated invasively,

patient unfriendly by injection.

Although an intensive research is going on world-wide in the field of peroral delivery of proteins and this is unambiguous unmet medical need, biopharmaceutics in such form is not yet available for the patients.

Although some candidate molecules are in various stages of clinical trials, it is still a very big challenge and will mean an important breakthrough for the science.

Although economically viable peroral delivery of proteins at the current price of biopharmaceutics seems to be a very distant goal, we have managed to demonstrate in our research that the protection of the protein in nanoparticles, conjugation for increased mucopermeability and enhanced gastrointestinal absorption result in an increase in the bioavailability of proteins.

These results represent an important contribution to science in the development field of patient-friendly delivery systems for biopharmaceutics.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Neposredni pomen programa za gospodarstvo in družbo

Ohranitev raziskovalno razvojnih kapacitet v farmacevtski industriji je nacionalna prioriteta, zabeležena v vseh strateških dokumentih RS.

Farmacevtska industrija je v Sloveniji tradicionalno ena najbolj tehnološko razvitih in družbeno ekonomsko pomembnih, kar dokazuje tudi v teh kriznih časih. Farmacevtska družba Lek je prepoznala potencialno dodano vrednost raziskav na področju zdravil za zdravljenje raka in je del sredstev, ki jih namenja raziskovalno-razvojni dejavnosti, usmerila v raziskave, vezane na postavljanje novih platform za razvoj tovrstnih zdravilnih učinkovin, kot tudi njihov konkreten razvoj.

Uspešna izvedba programa za nas pomeni vzpostavitev kompleksne znanstvene in tehnološke platforme za pripravo proteinskih zdravilnih učinkovin s pomočjo tehnologije post-produkcijske modifikacije (tako za pripravo konjugatov z različnimi polimeri kot tudi njihovo analitsko karakterizacijo) ter intenziviranje raziskav in nadaljnjo krepitev vrhunškega industrijskega raziskovanja v Leku. Vse to pa ključno prispeva k utrditvi vloge našega centra za razvoj in proizvodnjo bioloških zdravil znotraj Sandoza/Novartisa, kar prinaša dolgoročno konkurenčno prednost in zagotovitev visoko tehnoloških delovnih mest v Sloveniji. To je za Slovenijo še posebej pomembno, saj zaostajamo na področju visoko tehnoloških podjetij z lastnimi raziskavami za bolj razvitimi državami.

Realizacija programa v obdobju 2009-2013 predstavlja odlično osnovo za odobreno nadaljevanje programa v nove molekule, konjugate protiteles s toksini za ciljano terapijo raka (ADC).

V primeru, da nas raziskave podprte tudi z odobrenim nadaljevanjem predlaganega programa pripeljejo k odkritju izboljšanih novih oblik ADC-jev, bi s tem uspeli dati Sloveniji izvirno zdravilo. Glede na vedno večji pomen zdravljenja raka bi bil to izjemen raziskovalni, moralni in materialni uspeh.

Ker so Lekove raziskave ciljno usmerjene in podprte z mednarodnim sodelovanjem, so možnosti uspešnega zaključka razvoja takšne izboljšane učinkovine vsaj do stopnje kliničnega kandidata realne. Z vidika vpetosti predlaganih raziskav v trende svetovne farmacije pa je to področje izrazito obarvano s partnerskim sodelovanjem farmacevtskih multinacionalk z intenzivno inovativnimi skupinami (akadetskimi in manjšimi biotehnološkimi podjetji).

Pomen za razvoj stroke in inženirske prakse

Raziskovalni program znotraj industrije je garancija za razvoj aplikativne znanosti, ki predstavlja povečanje zaposljivosti vrhunskih domačih raziskovalcev in s tem povečuje smiselnost financiranja podiplomskega študija. Hkrati predstavlja gonilno silo za vzpostavitev novih konzorcijev med akademskimi inštitucijami in industrijo, kar se je vseskozi odražalo v našem dosedanjem delu. Poleg tega bodo funkcionalna znanja, ki smo oz. jih bomo z delom na programu razvijali, v perspektivi lahko omogočila tudi ustanovitev visokotehnoloških samostojnih podjetij. Nova znanja in uvedba novih raziskovalnih tehnologij in pristopov so pomembna za nadaljnji razvoj področja farmacije in biotehnologije v Sloveniji.

Posredni pomen za družbo

K utrjevanju nacionalne identitete bo prispevalo objavljane rezultate v uglednih znanstvenih revijah in patentiranje. Hkrati bodo prizadevanja raziskovalne skupine na področju razvoja učinkovin za zdravljenje raka gotovo prispevala k mednarodnem ugledu in prepoznavnosti naših raziskovalcev.

ANG

**Direct importance for the economy and society**

Maintenance of R&D capacities in pharmaceutical industry is a national priority stated in all strategic documents of the Republic of Slovenia, where pharmaceutical industry is traditionally one of the most developed and socially economically important industries. The pharmaceutical company Lek has recognized the potential added value of research in the field of anticancer drugs and directed part of R&D funds into research connected to the establishment of the new platforms for their development.

Successful execution of the proposed program means establishment of a complex scientific and technological platform for the preparation of protein based active pharmaceutical ingredients by applying post-production protein modification technology (i.e. preparation of conjugates with different polymers as well as their analytical characterization) and intensification of research and further enhancement of the advanced industrial research within Lek. All this will importantly contribute to strengthening of role of center for development and manufacturing of biopharmaceutics within the Sandoz/Novartis bringing long-term competitive advantage and ensure high-tech jobs in Slovenia. The later is especially important for Slovenia as we lag behind more developed countries in the field of technological enterprises with own research. Realization of program during 2009-2013 is a very good basis for the approved program proposal continuation focused on new molecules, antibody drug conjugates (ADC) for targeted anticancer therapy.

If further research supported also by approved program continuation leads to discovery of improved new forms of ADCs, we will thereby succeed in offering Slovenia an original drug. In view of the ever higher importance of treatment of cancer, this would be an extraordinary research, moral and material success.

Since R&D in Lek are goal-orientated and supported with international cooperation, the possibilities for a successful completion of development of an improved substance at least to the phase of clinical candidate are real.

Regarding involvement of the proposed research into trends of the global pharmacy this is an area with very intensive partnerships between pharmaceutical multinational corporations and highly innovative groups (academic and small biotech companies).

Importance for the development of the profession and engineering practice.

Research program group within an industry is a guaranty for applicable science. It means an increase of employment for top Slovenian researchers and thus justifies significant national investments in PhD education programs. At the same it is the driving force for academia-industry consortiums and collaborations, already proven and expressed in our work in the past. In addition the expert knowledge and skills gained during execution of the program has a great potential for high-tech spin-off companies.

New knowledge and introducing of new technological platforms are vitally important for further development of pharmacy and biotechnology in Slovenia.

**Indirect importance for the society**

Publication in the international scientific journals and the patenting of the results will contribute to the strengthening of national identity. At the same time the efforts of the research group on the development of anticancer drugs will certainly contribute to the reputation and recognition of our researchers within an international scientific community.

**10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju****1.1.2009-31.12.2013<sup>11</sup>****10.1. Diplome<sup>12</sup>**

| vrsta usposabljanja             | število diplom |
|---------------------------------|----------------|
| bolonjski program - I. stopnja  |                |
| bolonjski program - II. stopnja | 2              |
| univerzitetni (stari) program   | 7              |

**10.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti<sup>13</sup>**

|       |  |  |  |  |  |
|-------|--|--|--|--|--|
| Šifra |  |  |  |  |  |
|-------|--|--|--|--|--|

| raziskovalca | Ime in priimek     | Mag.                  | Dr.                              | MR                                  |  |
|--------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| 33367        | Zoran Ham          | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 28554        | Mihael Simčič      | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 25124        | Ivan Plantan       | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 26075        | Špela Škrajnar     | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 30615        | Katarina Fidler    | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 34714        | Zoran Bubnič       | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 0            | Marija Petruševska | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 0            | Jaka Marušič       | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 30674        | Menči Kunstelj     | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 23686        | Mateja Kusterle    | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |

Legenda:

**Mag.** - Znanstveni magisterij**Dr.** - Doktorat znanosti**MR** - mladi raziskovalec**11. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju<sup>14</sup>**

| Šifra raziskovalca | Ime in priimek  | Mag.                  | Dr.                              | Zaposlitev       |  |
|--------------------|-----------------|-----------------------|----------------------------------|------------------|--|
| 26075              | Špela Škrajnar  | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo |  |
| 30615              | Katarina Fidler | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo |  |
| 25124              | Ivan Plantan    | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo |  |
| 28554              | Mihael Simčič   | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | F - Drugo        |  |
| 23686              | Mateja Kusterle | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo |  |

Legenda zaposlitev:

**A** - visokošolski in javni raziskovalni zavodi**B** - gospodarstvo**C** - javna uprava**D** - družbene dejavnosti**E** - tujina**F** - drugo**12. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2013**

| Šifra raziskovalca | Ime in priimek | Sodelovanje v programski skupini | Število mesecev |  |
|--------------------|----------------|----------------------------------|-----------------|--|
|                    |                |                                  |                 |  |

Legenda sodelovanja v programski skupini:

**A** - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja**B** - uveljavljeni raziskovalec iz tujine**C** - študent – doktorand iz tujine**D** - podoktorand iz tujine**13. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne**

**raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2013 z vsebinsko obrazložitvijo porabe dodeljenih sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja mednarodnega sodelovanja na podlagi pozivov za EU vpetost.<sup>15</sup>**

SLO

Naše raziskave v okviru programa ARRS so mednarodno vpete interno v skupino Sandoz/Novartis kot tudi eksterno, saj se vključujemo tudi v EU projekte:

- FP6-26723 - 6OP Integrirani projekt NANOBIOPHARMACEUTICS "Nanotechnology-based Targeted Drug Delivery", 2006-2010; – člani B.Podobnik, M.Kenig, Š.Škrajnar, S.Jevševar
- ALEXANDER - Mucus Permeating Nanoparticulate Drug Delivery Systems - velik konzorcijski raziskovalni projekt znotraj 7. Okvira EU programa za raziskave in tehnološki razvoj. 1.4. 2012 – 31.3. 2016 - 14 partnerjev iz industrije in akademskega okolja je združilo moči in vodilne ekspertize s področja kemije, biokemije, farmacije, kemijskega inženirstva, farmacevtske tehnologije, molekularne fiziologije, biofarmacevtike, toksikologije, razvoja zdravil in projektnega vodenja. – člani B.Podobnik, Š. Škrajnar, V. Smilović in S.Jevševar. Intenzivno sodelujemo s strokovnjaki v Sandozu in Novartisu kot tudi s slovenskim akademskim okoljem ter na ta način tudi prenašamo znanja iz globalne farmacevtske družbe v slovensko akademsko okolje.

Na račun vpetosti v EU projekte smo dobili skupaj dodatnih 19900 EUR za materialne stroške, od tega glavnino (18706 EUR) v 2009 in 2010. Dodatna sredstva v 2009 smo usmerili v postavljanje testa CaCo2 za testiranje permeabilnosti proteinov in njihovih konjugatov. V 2009 smo najprej implementirali drag, komercialno dostopen »CaCoReady, Advancell kit«, ter vzporedno vzpostavljali še lasten test z lastnim gojenjem CaCo2 celic. V letu 2010 smo uspeli vzpostaviti lastne CaCo2 test in s tem bistveno povečali število testiranih molekul, saj cena testa ni več predstavljala glavne omejitve za izbiro molekul za testiranje prehajanja *in vitro*.

V letu 2010 smo poleg dodatnih sredstev za materialne stroške dobili na račun vpetosti v EU projekte še pokritje 488 raziskovalnih ur, ki smo jih v celoti namenili pokritju ur vključenega novega sodelavca dr. V. Smilovića, ki je skrbel za razvoj novih, bolj občutljivih ELISA testov, potrebnih za detekcijo nizkih koncentracij konjugatov v testih CaCo2. Skrbel je tudi za vse ostale aktivnosti, kjer so bili vključeni ELISA testi (detekcija različnih nekonjugiranih in konjugiranih proteinov v serumu za konstrukcijo PK profilov) in za te namene razvijal in-house ELISA teste, ki so občutno cenejši kot kupljeni kompleti. To nam je precej razširilo nabor molekul, ki smo jih lahko proučevali v naših raziskavah, saj sicer visoke cene komercialno razpoložljivih ELISA testov predstavljajo izredno visok strošek pri tovrstnih raziskavah in bi jih morali izvajati v precej manjšem obsegu.

**14.Vključenost v projekte za uporabnike, ki v so obdobju trajanja raziskovalnega programa (1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), potekali izven financiranja ARRS<sup>16</sup>**

SLO

- Strateški raziskovalno-razvojni projekt (SRRP) Razvoj biofarmacevtika druge generacije ter novih metod njegove izolacije in karakterizacije, ki je potekal v sodelovanju z Bia Separations d.o.o., in je bil sofinanciran s strani TIA - 23.01.2009-22.8.2010 – vodja Simona Jevševar.
- Intenzivno sodelujemo s strokovnjaki v Sandozu in Novartisu kot tudi s slovenskim akademskim okoljem ter na ta način tudi prenašamo znanja iz globalne farmacevtske družbe v slovensko okolje; v Sloveniji so naši partnerji: Kemijski inštitut, Biotehniška fakulteta, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Fakulteta za farmacijo ter centri odličnosti CO EN-FIST (NMR), CO PoliMat (polimeri) in CO CiPKeBiP (karakterizacija proteinov). ). Smo soustanovitelji vseh treh omenjenih CO.
- Vsi člani programske skupine smo vključeni v izvajanje internih razvojnih projektov znotraj Leka, in skupine Sandoz/Novartis, nekateri tudi v njihovo vodenje (U. Urleb vodja Globalnega tehničnega razvoja Biofarmacevtike odgovoren za vse razvojno raziskovalne projekte, S. Jevševar vodja 2 razvojnih projektov vezanih na proteinsko modifikacijo, B. Podobnik vodja platforme novih tehnologij za proteinsko modifikacijo v okviru širše skupine Novartis, D. Kuzman vodja platforme novih tehnologij za proteinsko bioinformatiko in biofiziko znotraj Sandoza; Matej Seliškar tehnični projektni vodja za razvojne projekte Sandoza (3) in širše skupine Novartis(1))
  - Razvojni projekti za skupino Sandoz na področju poznega razvoja biološko podobnih zdravil (vključno z GMP proizvodnjo) z uporabo pegilacije.
  - Razvojni projekt za skupino Novartis na področju poznega razvoja inovatorskih zdravil (vključno z GMP proizvodnjo) z uporabo tehnologije pegilacije.
  - Raziskovalno razvojni projekti za Novartis na področju zgodnjega razvoja inovatorskih zdravil z uporabo tehnologije pegilacije in druge postprodukcijske

modifikacije proteinov.

- Razvojni projekti za skupino Sandoz na področju poznega razvoja biološko podobnih zdravil na podlagi monoklonskih protiteles.

## 15. Ocena tehnološke zrelosti rezultatov programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)<sup>17</sup>

SLO

Ključna raziskovalna usmeritev našega programa je načrtovanje in predklinični razvoj novih zdravilnih učinkovin na podlagi modifikacije proteinov in dopolnitev tehnoloških platform potrebnih za njihov razvoj. Organizacijsko raziskave potekajo Sandoz Biofarmaceutiki v Mengšu (ki je del Lek d.d.), člani skupine Novartis. Smo odlično opremljen industrijski center za moderno biotehnologijo z dobrimi pogoji za implementacijo naših znanj v biološko podobna zdravila in tudi izboljšana biološko podobna zdravila ter inovatorske produkte za skupino Novartis.

Člani programske skupine smo sodelovali že pri več uspešnih prenosih znanosti v prakso, sodelovali smo pri razvoju tehnologije za biološko podobni filgrastim in njegovem prenosu v proizvodnjo, kot tudi pri prenosu tehnologije rhEPO v proizvodnjo. Oba produkta Sandoz že več let uspešno trži kot biološko podobna zdravila.

V času trajanja programa smo uspešno prenesli v GMP proizvodnjo dva pegilirana produkta, pri čemer smo ključno vlogo igrali člani programske skupine. Naše ekspertno znanje je bilo tudi ključno za izbiro Mengša kot lokacije za proizvodnjo modificiranih proteinov. To nedvomno dokazuje, da znanje, generirano znotraj raziskovalnega programa v največji mogoči meri prenašamo v prakso in pri tem sledimo jasnim raziskovalnim in strateškim ciljem. Hkrati tesno sodelujemo z akademskim okoljem v Sloveniji, kar nam omogoča gradnjo skupnih tehnoloških platform, ki so pomembne za dolgoročni razvoj Slovenije kot tudi za generiranje novih tehnološko zahtevnih delovnih mest v Sloveniji.

Tekom trajanja programa postavljena kompleksna platforma za modifikacijo proteinov je odlična osnova za odobreno nadaljevanje programa v nove molekule, konjugate protiteles s toksini za terapijo raka.

## 16. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšen finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali

|                                                       |                                                              |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| možnost ustanovitve spin-off podjetja                 | <input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE |
| potrebni finančni vložek                              |                                                              |
| ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>18</sup> |                                                              |

## 17. Izjemni dosežek v 2013<sup>19</sup>

### 17.1. Izjemni znanstveni dosežek

V 2013 smo termodinamsko analizo TNF in njegovih inhibitorjev, ki smo jo za vezavo adalimumaba na TNF izvedli že v preteklosti (Marušič in sod. 2012), dopolnili s postavitvijo termodinamskega modela za vezavo etanercepta na TNF. Čeprav se etanercept že dolgo uporablja v terapiji bolezni s povišanimi stanji TNF, v literaturi ni mogoče najti zanesljivih podatkov karakterizacije kinetike vezave etanercepta na TNF. Modeliranje in karakterizacija vezavnih ravnotežij TNF-TNF inhibitor je zahtevna zaradi troštevne osi TNF molekule s 3 vezavnimi mesti za inhibitorje, kar vodi do tvorbe zelo raznolikih kompleksov pri vezavi. Z našo predpostavko o obstoju dodatnega kompleksa TNF-etanercept (2:3), ki ni opisan v literaturi, smo izvedli termodinamsko analizo vseh vezavnih stopenj (ravnotežij), ki nastopajo pri vezavi etanercepta in TNF, in postavili ustrezen model (publikacija v pripravi).

### 17.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

V 2013 smo dobili rezultate kliničnih študij faze III za PEGilirano podobno biološko zdravilo, ki potrjujejo enako kakovost, varnost in učinkovitost našega produkta referenčnemu,

originatorskemu produktu. Posledično zdaj člani programske skupine intenzivno sodelujemo pri pripravi kompletne registracijske dokumentacije za vlogo na ameriško agencijo za hrano in zdravila (FDA), potrebno za odobritev našega produkta na ameriški trgu. Za ta namen smo v letu 2013 člani programske skupine igrali ključno vlogo pri pripravi nekaj novih, ključnih dokumentov, ki jih zahteva nova regulativa, in potrjujejo uporabo principov t.i. QbD pristopa (pristopa vgrajene kakovosti) v vseh razvojnih stopnjah produkta. Hkrati smo se začeli pripravljati na proizvodnjo serij za lansiranje, kjer bomo s svojim razvojnim znanjem podpirali proizvodnjo.

## 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 in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v papirnati obliki
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba JRO  
in/ali RO s koncesijo:*

in

*vodja raziskovalnega programa:*

Lek farmacevtska družba d.d.

Uroš Urleb

**ŽIG**

Kraj in datum: 

|           |          |
|-----------|----------|
| Ljubljana | 9.4.2014 |
|-----------|----------|

### Oznaka prijave: ARRS-RPROG-ZP-2014/45

<sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa (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](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa (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'.

Družbeno-ekonomski 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-ekonomskega 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. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen program, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Vpišite število opravljenih diplom v času trajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času trajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite MR. [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1. 1. 2009 do 31. 12. 2013), ustrezno označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Navedite naslove projektov in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Točko izpolnijo tudi izvajalci raziskovalnega programa, prejemniki sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja raziskovalnega programa zaradi mednarodnega sodelovanja (sodelovanja v projektih okvirnih programov Evropske unije). Izvajalec, ki je na podlagi pogodbe prejel sredstva iz navedenega naslova, vsebinsko opiše porabo prejetih sredstev za financiranje stroškov blaga in storitev ter amortizacije, nastalih pri izvajanju tega raziskovalnega programa. V primeru, da so bili v okviru raziskovalnega programa prejemniki sredstev različni izvajalci, vsak pripravi vsebinsko poročilo za svoj delež pogodbenih sredstev. Vodja raziskovalnega programa poskrbi, da je vsebinsko poročilo, ločeno za vsakega izvajalca, vključeno v navedeno točko poročila. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>16</sup> Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>17</sup> Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma tržne niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>18</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>19</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROG-ZP/2014 v1.00a

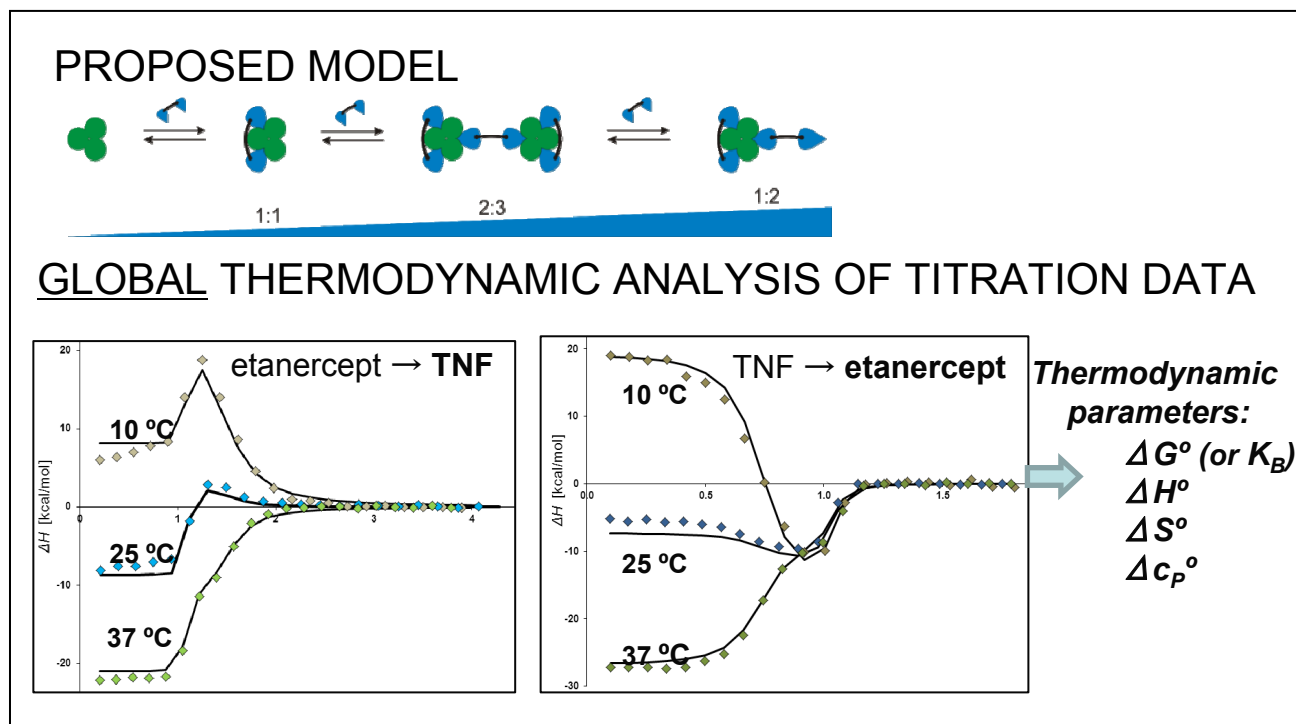
EB-BE-29-55-28-E9-C8-29-7B-79-55-35-A5-8A-F2-81-4E-E3-96-2F

## **Priloga 1**

# 1 NARAVOSLOVJE

## Področje: 1.09 Farmacija

### Termodinamski model za vezavo etanercepta (TNFR1-Fc) na TNF TNF znanstveni, Vir: publikacija v pripravi



Čeprav se etanercept že dolgo uporablja v terapiji bolezni s povišanimi stanji TNF, v literaturi ni mogoče najti zanesljivih podatkov karakterizacije kinetike vezave etanercepta na TNF. Modeliranje in karakterizacija vezavnih ravnotežij TNF-TNF inhibitor je zahtevna zaradi troštevne osi TNF molekule s 3 vezavnimi mesti za inhibitorje, kar vodi do tvorbe zelo raznolikih kompleksov pri vezavi. V 2013 smo uspeli zaključiti termodinamsko analizo vseh vezavnih stopenj (ravnotežij), ki nastopajo pri vezavi etanercepta in TNF in postaviti ustrezen model (publikacija v pripravi).

V primeru etanercepta smo vezavne krivulje posnete z ITC poskusili modelirati na osnovi objavljenih struktur kompleksov TNF-etanercept. Šele z uporabo naše predpostavke o obstoju dodatnega kompleksa TNF-etanercept (2:3) je bilo mogoče opisati vezavne krivulje globalno (z enotnim naborim termodinamskih parametrov opišemo vezavne krivulje posnete pri različnih temperaturah). Rezultat je nabor termodinamskih parametrov, ki opisujejo vezavo etanercepta na TNF. S termodinamsko analizo teh parametrov podprto s strukturnimi podatki smo prišli do informacij o temeljnih silah, ki vodijo vezavo etanercepta na TNF.

Ker razvita metodologija zelo natančno opiše interakcije med fuzijskim proteinom receptorja TNFR1 z regijo Fc, jo je mogoče uporabiti za karakterizacijo in razvoj izboljšanih verzij inhibitorjev TNF, kot tudi za dokazovanje podobnosti podobnih bioloških zdravil z originalnimi.