

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE**

REPOZICIONIRANJE TERAPEVTSKIH UČINKOVIN KOT INTERDISCIPLINARNI PRISTOP K OBRAVNAVI IN ZDRAVLJENJU HER-2 POZITIVNEGA RAKA DOJK

Raziskovalno delo

Področje: BIOTEHNOLOGIJA

MENTOR:

strok. sod Marko Jeran

Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo

Institut »Jožef Stefan«

AVTORICI:

Nuša Gorišek in Stela Maček

dijakinji 4. letnika tehniške gimnazije,

Biotehniški izobraževalni center,

Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

SOMENTORJI:

strok. sod. Luka Irenej Pečan, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta in Università degli Studi di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita

Doc. dr. Minja Zorc, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo

asist. Anja Tanšek, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo

Lidja Zavasnik, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Ljubljana, 2025

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentorju, strok. sod. **Marku Jeranu** z Oddelka za anorgansko kemijo in tehnologijo na Institutu "Jožef Stefan", za njegovo strokovno podporo, potrpežljivost, prijaznost ter dragocene usmeritve pri izvedbi najine prve raziskovalne naloge. Hvaležni sva za priložnost, da sva lahko raziskovalno delo opravljali izven šolskega okolja, ter za njegovo nesebično vodenje in spremstvo na vsakem koraku.

Posebno sva hvaležni tudi za njegove pozne večerne odgovore na vsa vprašanja, ki so se nama porajala med raziskovanjem, in za neizmerno potrpežljivost pri usmerjanju skozi vse izzive, ki so se pojavili na poti. Zahvaljujema se za vso pomoč, s katero sva pridobili neprecenljive izkušnje, nova znanja ter vpogled v proces izdelave pravega raziskovalnega projekta. Njegova strokovnost, spodbuda in pozitivna energija so nama olajšale vsak korak in naju z navdušenjem popeljale v svet znanosti. Hvala !

Prav tako sva izjemno hvaležni so-mentorju, strok. sod. **Luki Ireneju Pečanu**. Luka je izjemen so-mentor, ki s svojo strokovnostjo, potrpežljivostjo in podporo resnično pomaga pri razvoju idej in uspešni izvedbi projekta. Njegovi nasveti so bili neprecenljivi, saj so nama pomagali bolje razumeti tematiko in najti najboljše rešitve za izzive, s katerimi sva se srečevali. S svojo pozitivno energijo in zavzetostjo je vedno spodbujal kreativnost, naju motiviral, da sva dali vse od sebe in nama hitro priskočil na pomoč, ko sva to najbolj potrebovali. Ceniva njegovo pripravljenost, zavzetost in njegovo usmerjanje skozi celoten proces dela. Brez njegove podpore in znanja bi bilo najino delo veliko težje, zato sva mu iz srca hvaležni.

Hvala lepa tudi doc. dr. **Minji Zorc** in asist. raz. **Anji Tanšek** z Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Minja in Anja sta bili izjemno prijazni, potrpežljivi in strokovni, kar nama je zelo pomagalo pri bioinformacijski analizi. Z veliko mero razumevanja sta nama vse natančno razložili in nama tako olajšali delo na področju, ki se nama je sprva zdelo precej zahtevno. Vedno sta bili dostopni za vprašanja in sta nama s svojim znanjem in izkušnjami omogočili, da sva se veliko novega naučili in naju s tem res navdušili za tematiko. Iskreno sva hvaležni za njuno pomoč, saj je bilo delo zaradi njiju veliko bolj prijetno in učinkovito.

Zahvaljujema se tudi Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete za topel sprejem v njegovih prostorih ter za to, da nam je bila posojena v uporabo oprema s katero sva lahko učinkovito izvedli bioinformacijsko analizo.

Zahvaljujema se tudi **Lidiji Zasavnik** za podporo, razumevanje in odprtost.

Zahvala gre tudi najinima družinama, ki sta nama stali ob strani, naju spodbujali, motivirali in pomagali.

In še zadnjič najlepša hvala vsem, ki so na kakršen koli način pomagali pri lažji izvedbi celotne projektne naloge in nama omogočili to enkratno, nepozabno izkušnjo.

HVALA VSEM!

3.4.4.1.	Mutacije v genu HER2.....	24
3.4.4.2.	Aktivacija alternativnih signalnih poti.....	24
3.4.4.3.	Estrogenski receptor (ER) in hormonska signalizacija.....	25
3.4.4.4.	Aktivacija ciklina D1 in CDK 4/6	25
3.4.4.5.	Spremembe v signalni poti PI3K/AKT/mTOR.....	25
3.4.4.6.	Aktivacija drugih onkogenih poti	25
3.5.	POMEN PERSONALIZIRANE MEDICINE IN FARMAKOGENOMIKE PRI OPTIMIZACIJ TERAPIJ.....	26
4.	FARMAKOGENOMSKI VPOGLEDI V PERSONALIZIRANO MEDICINO ZA HER2-POZITIVNI RAK	28
4.1.	PREGLED FARMAKOGENOMSKIH MARKERJEV ZA HER2-POZITIVNI RAK DOJK.....	28
4.2.	GENETSKE VARIACIJE, KI VPLIVAJO NA UČINKOVITOST IN TOKSIČNOST TERAPIJ ZA HER2-POZITIVNI RAK	28
4.3.	POVEZOVANJE REPOZICIONIRANIH ZDRAVIL Z GENETSKIMI PROFILI HER2-POZITIVNIH PACIENTOV	29
4.4.	STRATIFIKACIJA PACIENTOV ZA PERSONALIZIRANE NAČRTE ZDRAVLJENJA	29
4.5.	OVIRE IN PRILOŽNOSTI ZA IMPLEMENTACIJO FARMAKOGENOMIKE V ZDRAVLJENJU HER2-POZITIVNEGA RAKA	30
5.	KLINIČNA ANOTACIJA IN FARMAKOGENOMSKA IDENTIFIKACIJA TERAPEVTSKIH TARČ PRI HER 2 POZITIVNEM RAKU	30
5.1.	KLINIČNI POMEN HER2-STATUSA PRI STRATIFIKACIJI PACIENTOV.....	31
5.1.1.	Metode za določanje HER2-statusa	31
5.1.2.	Stratifikacija pacientov glede na HER2-status	31
5.1.3.	Klinični pomen HER2-statusa pri zdravljenju.....	32
6.	CILJI DELA IN HIPOTEZE.....	32
6.1.	CILJI	32
6.1.1.	Bioinformacijska analiza	32
6.1.2.	Ekonomska analiza	33
6.2.	HIPOTEZE.....	33
6.2.1.	Bioinformacijska analiza	33
6.2.2.	Ekonomska analiza	33
7.	BIOINFORMACIJSKA ANALIZA KANDIDATOV ZA REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL.....	33

7.1. METODOLOGIJA ZA IDENTIFIKACIJO IN VALIDACIJO INTERAKCIJ MED ZDRAVILI IN HER2-TARČAMI	33
7.2. MATERIALI IN METODE	35
7.2.1. Identifikacija strukturno podobnih spojin lapatinibu in gefitinibu	35
7.2.2. Kristalografska struktura receptorja HER2.....	36
7.2.3. Molekulsko sidranje.....	36
7.3. REZULTATI.....	41
7.3.1. Strukturno podobne spojine učinkovinam lapatinib in gefitinib.....	41
7.4. REZULTATI MOLEKULSKEGA SIDRANJA LIGANDOV NA RECEPTOR HER2 41	
7.5. DISKUSIJA	51
7.6. EKONOMSKA ANALIZA REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL ZA HER2- POZITIVNI RAK.....	53
7.7. METODE IN MATERIALI.....	54
7.8. EPIDEMIOLOGIJA RAKA, JAVNOZDRAVSTVENO BREME IN PRILOŽNOSTI ZA REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL	54
7.9. STROŠKOVNA UČINKOVITOST REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL V PRIMERJAVI S STANDARDNIMI TERAPIJAMI.....	55
7.10. ANALIZA PRIHRANKOV PRI RAZVOJU ZDRAVIL IN DOSTOPNOSTI REPOZICIONIRANIH ZDRAVIL.....	59
7.11. REZULTATI.....	63
7.12. INTELEKTUALNA LASTNINA IN DOBIČKONOSNOST PRI REPOZICIONIRANJU ZDRAVIL	63
7.13. DISKUSIJA	64
8. ZAKLJUČEK	68
9. VIRI.....	70

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aminokisliline v interakciji z ligandom, njihove koordinate in izračun centra vezavnega žepa (Berman, 2000).	39
Preglednica 2: Strukturno podobne učinkovine lapatinibu in gefitinibu, ki smo jih pridobili s pomočjo zbirke DrugBank Online	41
Preglednica 3: Rezultati molekulskega sidranja ligandov na HER2(struktura 3PP0).	42
Preglednica 4: Delež stroškov, ki ga predstavlja posamična faza pri razvoju novega zdravila (Sertkaya A & Franz C, 2022).....	57
Preglednica 5: Gibanje vloženih sredstev po letih v primerjavi s prihodki od prodaje zdravil.	62
Preglednica 6: Primerjava ključnih parametrov med standardnim razvojem in repozicioniranjem zdravil	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Postopek repozicioniranja. Narejeno z https://BioRender.com	3
Slika 2: Običajen postopek razvoja novega zdravila. Narejeno z https://BioRender.com	3
Slika 3: Priložnosti in možnosti repozicioniranja zdravil v onkologiji. Narejeno z https://BioRender.com	4
Slika 4: Metode repozicioniranja terapevtskih učinkovin	6
Slika 5: Skeletna formula leflunomida	11
Slika 6: Skeletna formula disulfirama.....	12
Slika 7: Najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri ženskah.....	12
Slika 8: Družina receptorjev tirozin-kinaz HER.....	15
Slika 9: Mehanizmi odpornosti raka dojk na terapijo, usmerjeno proti HER.....	22
Slika 10: Shematski prikaz poteka dela	35
Slika 11: Kristalografska struktura receptorja HER2 v neaktivni obliki (3PP0).....	36
Slika 12: Uporabniški vmesnik spletnega programa CB-Dock2 (Liu idr., 2022).....	37
Slika 13: : Prikaz odseka datoteke “pdb” za model 3PP0, ki vsebuje atomske koordinate proteina HER2	40
Slika 14: Vezava afatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.....	43
Slika 15: Vezave alfuzosina v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.....	43
Slika 16: Vezave abelumosudila v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.	44
Slika 17: Vezava dacomitiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.	44
Slika 18: Vezava doxazosina v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.....	45
Slika 19: Vezava erlotiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.	45
Slika 20: Vezava gefitiniba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.....	46
Slika 21: Vezava inavolisiba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.....	46
Slika 22: Vezava lapatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.	47
Slika 23: Vezava prazosina v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.	48

Slika 24: Vezava terazosina v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.....	48
Slika 25: Vezava trimetrexate v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.	49
Slika 26:: Vezava tucatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina. ...	49
Slika 27: Vezava vendatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina. .	50
Slika 28: Uspešne vezave vseh ligandov v žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.	51
Slika 29:: Vezava lapatiniba (zelena) z afiniteto -11.0 v primerjavi z vezavo belumosudila (rumena) z afiniteto -9.8. Vezava pridobljena s programom AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX.	52
Slika 30: Vezava tucatiniba (roza) z afiniteto -10.5 v primerjavi z vezavo belumosudila (rumena) z afiniteto -9.8. Vezava pridobljena s programom AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX.	53
Slika 31: Opis faze razvoja novega zdravila in njihovo trajanje.	58
Slika 32: Primerjava časovnic standardnega razvoja zdravil in repozicioniranja zdravil. Povzeto po (Low idr., 2020) narejeno z https://BioRender.com	59
Slika 33: Primerjava stroškov, časa in uspešnosti standardnega razvoja zdravil in repozicioniranja zdravil	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

HER 2- človeški epidermalni rastni faktor 2

QSAR- kvantitativne študije razmerja med strukturo in aktivnostjo

reDO- Repurposing Drugs in Oncology

NSAID- nesteroidna protivnetna zdravila

COX- ciklooksigenaza

EGFR-epidermalni rastni faktor

miRNA-mikro RNA

SERM-selektivni modulator estrogenskih receptorjev

MORE- Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation

FDA-Food and Drug Administration

STAR- študija tamoksifena in raloksifena

ROS-reaktivne kisikove zvrsti

DHODH- dihidroorotat dehidrogenazo

CHK1- zaviralci kontrolne kinaze

DSF-Disulfiram

IHC- imunohistokemično

FISH- fluorescenčna hibridizacija in situ

RTK- receptorske tirozin kinaze

IGF-1R- receptor za inzulinu podoben rastni faktor I

ER- estrogenski receptor

PR- progesteronski receptor

CŽS-centralni živčni sistem

DCIS- duktalni karcinom in situ

ADC – konjugati protitelo-zdravilo

TKI – zaviralci tirozin kinaze

T-DM1 – trastuzumab emtanzin

CTC – krožeče tumorske celice

T – trastuzumab

MoAb – monoklonsko protitelo

NK – celice ubijalke

APC – antigen predstavljajoče celice

ADCC – od protiteles odvisna citotoksičnost

CDC – od komplementa odvisna citotoksičnost

L – lapatinib

MUC4 – mucin 4

PFS – preživetje brez nadaljevanja bolezni

CDK2 – ciklinsko odvisna kinaza 2

HGF – rastni faktor hepaticov

ET – endokrinska terapija

FASN – sinteza maščobnih kislin

HRG – heregulin

NRG1 – neuregulin-1

NCCN – Celovite nacionalne mreže za zdravljenje raka

SERM – selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev

AI – zaviralci aromataze

NER – Named Entity Recognition

ROK – rho-associated coiled-coil-containing

GVHT – graft-versus-host disease

EMA – European Medicines Agency

POVZETEK

HER2-pozitivni rak dojk je agresivna in invazivna oblika raka, za katero je značilna hitra rast tumorja in povečana možnost metastaziranja. Čeprav že obstajajo ciljno usmerjene terapije, kot so trastuzumab in lapatinib, se zaradi razvoja odpornosti tumorjev nenehno iščejo nove terapevtske strategije.

Ena izmed inovativnih metod izboljšanja zdravljenja je repozicioniranje zdravil, pri katerem že odobrena zdravila, prvotno namenjena zdravljenju drugih bolezni, uporabimo za zdravljenje HER2-pozitivnega raka. Ta pristop omogoča hitrejši vstop zdravil v klinično uporabo, saj so njihovi varnostni profili in farmakološke lastnosti že dobro poznani, kar znatno skrajša čas razvoja in zmanjša stroške v primerjavi z razvojem novih zdravil.

V raziskovalnem delu so predstavljeni biološko ozadje HER2-pozitivnega raka dojk, klinični izzivi zdravljenja ter potencial repozicioniranja zdravil kot rešitve. Opravljena je bila bioinformacijska analiza za identifikacijo novih kandidatov za repozicioniranje, prav tako pa je bila izvedena ekonomska analiza, ki ocenjuje stroškovno učinkovitost tega pristopa v primerjavi s tradicionalnimi metodami razvoja zdravil.

Repozicioniranje zdravil se tako kaže kot obetavna strategija, ki lahko pripomore k izboljšanju terapij, povečanju dostopnosti zdravljenja in premagovanju odpornosti tumorjev, kar bi lahko dolgoročno izboljšalo izide zdravljenja bolnic s HER2-pozitivnim rakom dojk.

KLJUČNE BESEDE: HER2 pozitiven rak dojk, repozicioniranje zdravil, bioinformacijska analiza, ekonomska analiza, konvencionalni razvoj zdravil

ABSTRACT

HER2-positive breast cancer is an aggressive and invasive form of cancer, characterised by rapid tumour growth and an increased risk of metastasis. Although targeted therapies such as trastuzumab and lapatinib already exist, new therapeutic strategies are continuously being sought due to the development of tumour resistance.

One innovative method to improve treatment is drug repositioning, where already approved drugs originally intended for the treatment of other diseases are used to treat HER2-positive cancer. This approach allows drugs to enter clinical use more quickly as their safety profiles and pharmacological properties are already well known, significantly reducing development time and costs compared to the development of new drugs.

The biological background of HER2-positive breast cancer, clinical treatment challenges and the potential of drug repositioning as a solution are presented in this research. A bioinformatics analysis was performed to identify new candidates for repositioning and an economic analysis was performed to assess the cost-effectiveness of this approach compared to traditional drug development methods.

Drug repositioning thus appears to be a promising strategy that may help to improve therapies, increase access to treatment and overcome tumour resistance, which could improve long-term treatment outcomes for patients with HER2-positive breast cancer.

KEYWORDS: HER2 positive breast cancer, drug repositioning, bioinformatic analysis, economic analysis, conventional drug development

1. UVOD

Rak ostaja eden izmed vodilnih vzrokov smrti po vsem svetu in predstavlja veliko breme za javno zdravje. K njegovi visoki incidenci prispevajo različni dejavniki, vključno z genetskimi mutacijami, vplivi okolja, življenjskim slogom ter nezdravimi navadami, kot so kajenje, nezdrava prehrana in uživanje alkohola. Kljub napredku v diagnostiki in zdravljenju rakavih obolenj, konvencionalne terapije, kot so kemoterapija, radioterapija in kirurški posegi, pogosto povzročajo resne stranske učinke ter ne zagotavljajo vedno dolgotrajne učinkovitosti. (Xia idr., 2024). Posebej pomembno področje raziskav predstavlja HER2-pozitivni rak dojke, agresivna oblika raka, pri kateri je izražen receptor človeškega epidermalnega rastnega faktorja 2 (HER2), ki spodbuja rast tumorskih celic (Al-Taie idr., 2021).

HER2-pozitivni rak dojke predstavlja pomemben klinični izziv, saj je povezan s hitrejšo rastjo tumorja, večjo verjetnostjo metastaziranja in slabšim odzivom na nekatere standardne terapije. Razvoj ciljno usmerjenih terapij, kot so monoklonska protitelesa (npr. trastuzumab), majhni inhibitorji kinaz in druge inovativne terapije, je bistveno izboljšal prognozo bolnic s HER2-pozitivnim rakom dojke. Kljub temu lahko dolgotrajna uporaba teh zdravil privede do razvoja odpornosti tumorja na zdravljenje, kar poudarja potrebo po iskanju novih terapevtskih pristopov.

V zadnjih letih je strategija repozicioniranja zdravil (angl. drug repurposing) pritegnila veliko pozornosti kot potencialno učinkovita metoda za razvoj novih terapij za rakava obolenja, vključno s HER2-pozitivnim rakom dojke (Balbuena-Rebolledo idr., 2021).

Ta pristop temelji na ponovni uporabi že odobrenih zdravil za zdravljenje bolezni, za katere niso bila prvotno namenjena. Prednost repozicioniranja zdravil je predvsem v tem, da so varnostni profili, odmerjanje in farmakokinetične lastnosti teh spojin že dobro poznani, kar omogoča hitrejši prehod v klinično uporabo in znatno znižuje stroške razvoja v primerjavi s tradicionalnim odkrivanjem novih zdravil (Zhang idr., 2020).

Uspešni primeri repozicioniranja zdravil na področju onkologije vključujejo spojine, kot so talidomid, ki se danes uporablja za zdravljenje multiplega mieloma, in arzenov trioksid, ki je postal del terapije akutne promielocitne levkemije. Prav tako so bila nekatera kemoterapevtska sredstva prvotno razvita za povsem druge namene, a so se kasneje izkazala za učinkovita pri zdravljenju različnih vrst raka. V primeru HER2-pozitivnega raka dojke repozicioniranje obstoječih zdravil predstavlja obetavno strategijo za izboljšanje terapije, saj lahko odpre nove možnosti za premagovanje odpornosti tumorjev na standardna zdravljenja in izboljšanje izidov pri obravnavanih pacientih (Xia idr., 2024; Zhang idr., 2020).

2. REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL ZA HER2-POZITIVNI RAK DOJK

2.1. NAČELA IN METODOLOGIJE REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL

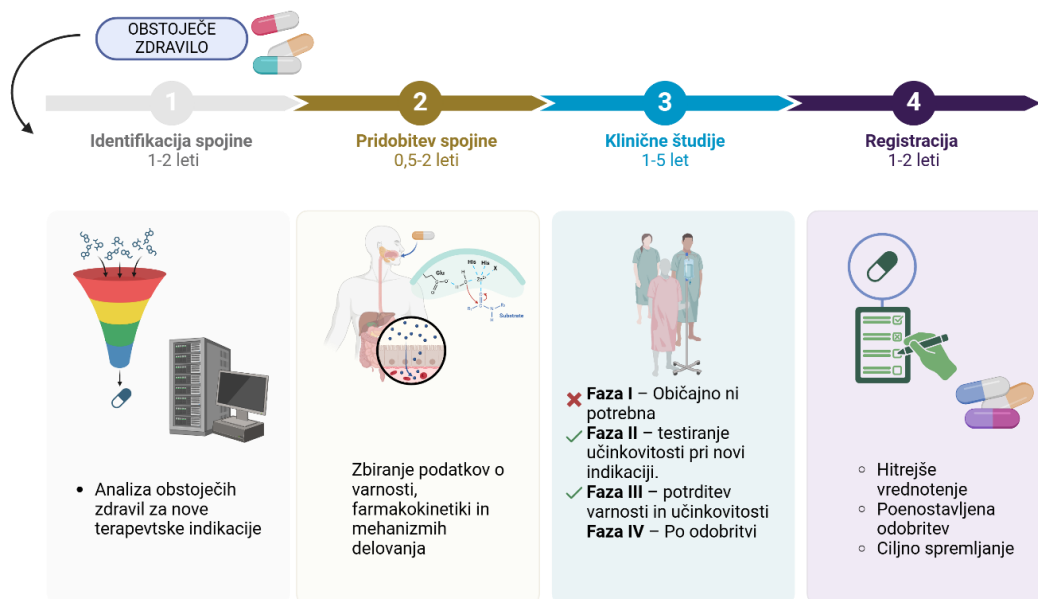
Repozicioniranje zdravil (**Slika 1**), znano tudi kot preprofiliranje ali ponovna uporaba je postopek, pri katerem se že znano zdravilo ali spojina uporablja za novo indikacijo (Toumi & Rémuzat, 2017).

Uporaba tega pristopa na področju zdravljenja raka sega nazaj do prvih kemoterapevtikov, ki so izhajali iz raziskav o opaženem protitumorskem učinku Iperita ali gorčičnega plina, bojnega plina iz družine mehurjevcev, na kožnega raka (Adair & Bagg, 1931; Weth idr., 2024).

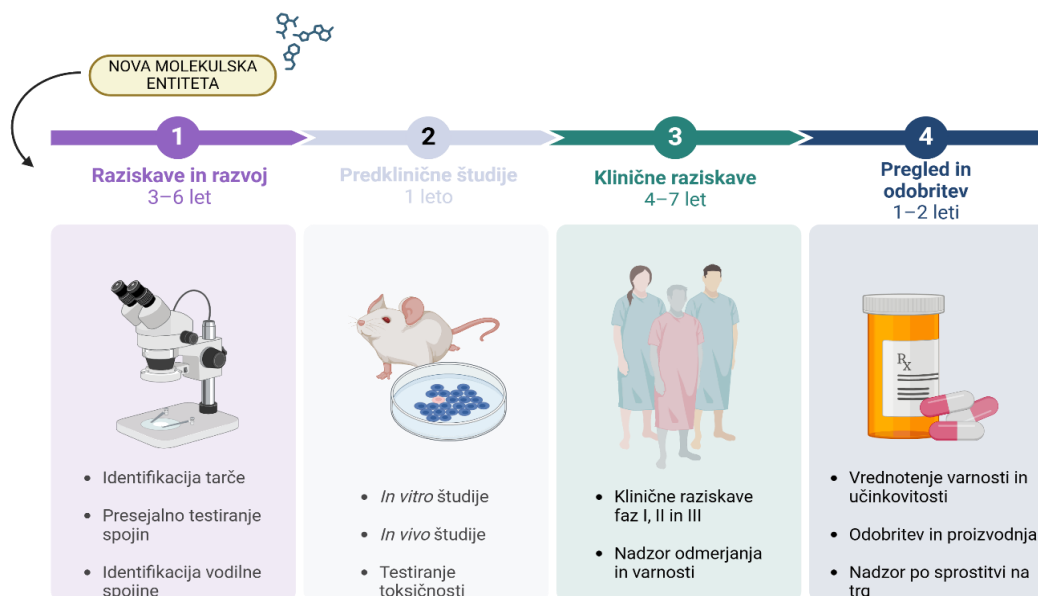
Razvoj novih zdravil je kompleksen, dolgotrajen in finančno zahteven proces, ki vključuje več stopenj – od identifikacije tarčnih molekul do kliničnih testiranj in končne regulativne odobritve (**Slika 2**). Tradicionalni pristopi k odkrivanju zdravil temeljijo na oblikovanju novih spojin, ki ciljajo specifične biokemijske tarče, ali na sistematičnem testiranju obstoječih spojin za odkrivanje njihove terapevtske učinkovitosti. Pri tem se uporabljajo metode, kot so kvantitativne študije razmerja med strukturo in aktivnostjo (QSAR), molekularno modeliranje ali sidranje (docking), identifikacija in validacija tarč ter optimizacija proučevanih spojin (Weth idr., 2024).

Ker postopek razvoja novih zdravil traja od 10 do 15 let in zahteva finančne vložke v višini od 1 do 2 milijard dolarjev, predstavlja repozicioniranje zdravil privlačno alternativo. Gre za iskanje novih terapevtskih uporab že obstoječih in odobrenih zdravil, kar skrajša čas razvoja in zmanjša stroške. Številna zdravila namreč ne dosežejo trga, čeprav so varna, a neučinkovita pri prvotni indikaciji. Namesto da bi ostala neizkoriščena, jih je mogoče preučiti za druge medicinske namene, s čimer se preprečijo velike finančne izgube farmacevtskih podjetij in pridobijo nove terapevtske možnosti (Zhang idr., 2020).

Poleg ekonomskih koristi ima repozicioniranje širše družbene koristi, saj omogoča razvoj zdravljenj za redke in zanemarjene bolezni, izboljšuje odziv na pandemije ter pomaga reševati težave, kot je odpornost na zdravila. Zaradi teh prednosti postaja repozicioniranje zdravil vse pomembnejša strategija v farmacevtski industriji in zdravstveni oskrbi (Xia idr., 2024).



Slika 1: Postopek repozicioniranja. Narejeno z <https://BioRender.com>

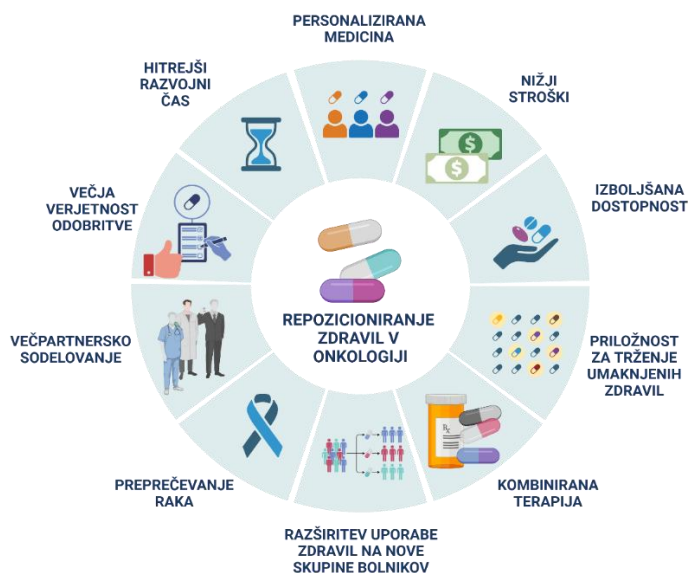


Slika 2: Običajen postopek razvoja novega zdravila. Narejeno z <https://BioRender.com>

2.2. REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL V ONKOLOGIJI

Rak je heterogena bolezen z zapletenimi biološkimi signalnimi mrežami in povratnimi zankami, zaradi česar pogosto ni dovolj inhibicija posamezne tarče. Zaradi visoke stopnje neuspeha, enormnih stroškov in dolgotrajnega razvoja novih onkoloških zdravil narašča zanimanje za repozicioniranje „starih“ zdravil za zdravljenje raka. Ta pristop ponuja hitrejšo in stroškovno učinkovitejšo pot do novih terapij, saj so varnostni, odmerni in toksični profili teh zdravil že znani. Kombinatorni pristopi, ki ciljajo na večplasten onkogenetski signalni sistem, imajo velik potencial za izboljšanje terapevtskih izidov (Balbuena-Rebolledo idr., 2021).

V onkologiji so repozicionirana zdravila pokazala obetavne rezultate, saj lahko vplivajo na molekularne mehanizme raka in tumorskega mikrookolja. Zgodovinski primeri vključujejo klorambucil in bufulfon, ki sta bila prvotno razvita kot alkilirajoči sredstva na osnovi bojnih strupov, kasneje pa sta se izkazala za učinkovita pri zdravljenju levkemij. Podobno je talidomid, kljub svoji zloglasni zgodovini, dobil novo vlogo pri zdravljenju gobavosti in multiplega mieloma. Med drugimi primeri sta tudi arzenov trioksid in all-trans retinojska kislina, ki sta bila leta 2000 odobrena za zdravljenje akutne promielocitne levkemije. Repozicioniranje zdravil v onkologiji tako omogoča večjo možnost odobritve zdravil zaradi že poznanih različnih profilov zdravil, kombinirano terapijo, napredek personalizirane medicine, zniža stroške in čas razvoja zdravil, ponudi priložnost za trženje zdravilom, ki so bila opuščena in s tem razširi uporabo le teh na nove skupine bolnikov, izboljša dostop do zdravljenja in spodbudi sodelovanje več partnerjev (Slika 3)(Weth idr., 2024).



Slika 3: Priložnosti in možnosti repozicioniranja zdravil v onkologiji. Narejeno z <https://BioRender.com>

2.3. KLJUČNE FAZE REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL V ONKOLOGIJI

Repozicioniranje zdravil poteka v treh glavnih fazah. Prvi korak je identifikacija ključnih tarč bolezni (generiranje hipoteze), kjer se določijo biološki mehanizmi, ki so povezani z boleznijo. Ta faza je ključnega pomena, saj pravilno oblikovana hipoteza predstavlja temelj za uspešno preusmeritev zdravila na novo indikacijo. V onkologiji je bilo repozicioniranje pogosto rezultat boljšega razumevanja bolezenskih poti ali naključnih odkritij. Načrtovanje novih strategij za ujemanje obstoječih zdravil z novimi terapevtskimi področji lahko pomembno izboljša uspešnost tega pristopa (Xia idr., 2024).

Druga faza vključuje preverjanje učinkovitosti zdravila z uporabo in vitro in in vivo modelov. Pri eksperimentalnih metodah se uporabljajo različna orodja, kot so modeli induciranih pluripotentnih matičnih celic in fenotipski presejalni testi. Hkrati se lahko uporabijo računalniški pristopi, ki temeljijo na analizah bioloških poti, specifičnih mehanizmov delovanja in prepoznavanju molekulskih podpisov bolezni. Pogosto se ti dve metodi uporabljata skupaj, saj sinergija eksperimentalnih in računalniških tehnik omogoča natančnejšo identifikacijo potencialnih kandidatov za repozicioniranje (Xia idr., 2024).

V zadnji fazi se zdravilo premakne v klinična testiranja, pri čemer se pogosto preskoči prva faza kliničnih preizkusov, če so že na voljo zadostni podatki o varnosti zdravila. Zdravilo tako hitreje vstopi v drugo fazo kliničnih raziskav, kjer se preverja njegova učinkovitost pri novi indikaciji. Napredni računalniški modeli danes omogočajo hitro in natančno izbiro potencialnih kandidatov za repozicioniranje, saj lahko analizirajo interakcije zdravilnih učinkovin, predvidijo njihove učinke na bolezen in iz množice spojin izločijo tiste z največjim terapevtskim potencialom (Xia idr., 2024).

Čeprav je koncept repozicioniranja zdravil znan že dolgo, so šele nedavne tehnološke inovacije omogočile razvoj sodobnih strategij, ki omogočajo hitrejšo in bolj ciljno usmerjeno identifikacijo novih terapevtskih možnosti za obstoječa zdravila. Repozicioniranje tako postaja pomembno orodje za razvoj novih zdravljenj, zlasti na področju onkologije (Xia idr., 2024).

2.4. PRISTOPI K REPOZICIONIRANJU

Ena izmed glavnih načel repozicioniranja zdravil za HER2- pozitivnega raka dojk je izraba že obstoječih varnostnih podatkov (**Slika 4**). Obstoječa zdravila so že odobrena za druge indikacije, zato so njihovi farmakokinetični in varnostni profili znani, kar zmanjša čas in stroške razvoja. Mnoge učinkovine imajo več ciljev (multi-targeting), kar omogoča njihovo uporabo za drugačne mehanizme, kot so sprva načrtovani. Na primer, nekatera protivnetna zdravila lahko vplivajo na rast tumorjev. HER2-pozitivni rak je odvisen od specifičnih signalnih poti (kot so PI3K/AKT/mTOR ali MAPK). Zdravila, ki zavirajo te poti pri drugih boleznih, so lahko učinkovita tudi pri HER2-pozitivnem raku. Ker gre za zdravila, ki so že odobrena, je možno preskočiti zgodnje faze kliničnih preskušanj (faze I), kar pomeni hitrejšo implementacijo.



Slika 4: Metode repozicioniranja terapevtskih učinkovin.

Te metode lahko vključujejo *in vitro* ali *in vivo* študije ter temeljijo na fenotipskem presejanju zdravil ali visokozmogljivih testih, usmerjenih na določeno tarčo. Alternativno se lahko izvede računalniško ali virtualno presejanje (*in silico*), ki vključuje ujemanje molekularnih podpisov (angl. *signature matching*) z uporabo omskih podatkov, umetno inteligenco ali strojno in globoko učenje, študije GWAS (angl. *genome-wide association studies*) ter raziskave povezav med boleznimi in tarčami. Prav tako se lahko uporablja analiza kemijske podobnosti in simulacije molekulskega sidranja (Weth idr., 2024).

2.4.1. Računalniški pristopi pri repozicioniranju zdravil

Računalniške metode so postale ključna orodja pri repozicioniranju zdravil. Napredek na področju tehnologij »omics«, analize velikih podatkov, strojnega učenja in računalniških algoritmov je močno izboljšal razumevanje mehanizmov delovanja zdravil v onkologiji. Ti pristopi omogočajo dostop do obsežnih podatkovnih baz, ki združujejo informacije o boleznih in obstoječih zdravilih, kar odpira nove možnosti za identifikacijo terapij za različne vrste raka (Xia idr., 2024).

Med pomembne računalniške metode sodijo molekulske sidranje (angl. *molecular docking*), analiza bioloških omrežij, rudarjenje podatkov, analiza podobnosti spojin, strojno učenje in analiza transkripcijskih podpisov. Te tehnike raziskovalcem omogočajo, da natančneje določijo potencialno protitumorsko delovanje repozicioniranih zdravil ter povežejo podatke o boleznih in zdravilih na sistemski ravni (Xia idr., 2024).

Uporaba računalniških metod omogoča tudi identifikacijo zdravil, ki zavirajo ključne onkogene poti, kar predstavlja učinkovito strategijo pri repozicioniranju. Raziskovalci lahko analizirajo bioinformacijske podatke iz različnih podatkovnih zbirk, kar izboljšuje razumevanje mehanizmov delovanja zdravil in optimizira izbiro kandidatov za nadaljnje klinične študije. Poleg tega sistemsko-biološki pristopi omogočajo identifikacijo novih terapevtskih strategij, ki ne le izboljšajo učinkovitost kemoterapije, temveč tudi zmanjšajo tveganje za razvoj odpornosti na zdravljenje in omogočajo bolj prilagojene terapije za posamezne bolnike (Xia idr., 2024).

2.4.1.1. Računalniško molekulsko sidranje pri iskanju novih terapevtskih možnosti

Molekulsko sidranje (*angl.* molecular docking) je pomembna računalniška metoda, ki omogoča napovedovanje interakcij med zdravilom (ligandom) in biološko tarčo (npr. receptorjem ali encimom). Če je že znana določena tarčna beljakovina, ki igra vlogo pri bolezni, lahko s konvencionalnim sidranjem testiramo, kako se nanjo vežejo različna zdravila. Pri inverznem sidranju pa lahko preučujemo učinke enega zdravila na več različnih bioloških tarč, kar odpira možnosti za identifikacijo nepričakovanih terapevtskih učinkov (Pushpakom idr., 2019).

Visokozmogljivi računalniški pristopi omogočajo hitro in obsežno analizo velikega števila zdravil ter njihovih potencialnih interakcij. Takšni pristopi močno pospešujejo odkrivanje novih terapevtskih indikacij za že obstoječa zdravila (Pushpakom idr., 2019).

Kljub številnim prednostim ima molekulsko sidranje tudi nekatere omejitve. Ena večjih težav je pomanjkanje kakovostnih tridimenzionalnih struktur nekaterih tarčnih beljakovin, še posebej membranskih receptorjev, kot so z G-proteini povezani receptorji (GPCR). Čeprav se kristalografski modeli teh proteinov izboljšujejo, ostaja kristalografija vedno izziv. Prav tako je dostopnost natančnih podatkovnih baz o makromolekulskih tarčah omejena, kar lahko vpliva na zanesljivost analiz. Poleg tega algoritmi za napovedovanje afinitete vezave niso popolni – različni programski paketi lahko dajejo različne rezultate, še posebej pri napovedovanju vezavnih načinov. Kljub tem izzivom molekulsko sidranje ostaja izjemno koristno orodje za identifikacijo novih terapevtskih priložnosti v okviru repozicioniranja zdravil (Pushpakom idr., 2019).

2.5. IZZIVI IN PRIHODNOST REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL ZA RAKA

Ideja o ponovni uporabi zdravil, ki si prizadeva stare spojine uporabiti za nove indikacije, je že široko uveljavljena v terapiji raka. Kljub temu je le malo ponovno uporabljenih zdravil uradno vključenih v objavljene klinične smernice za zdravljenje raka. Čeprav imajo takšna zdravila prednosti, kot so dokazane farmakokinetične lastnosti ter sprejemljiva varnost in prenosljivost pri ljudeh, še vedno obstaja možnost neuspeha v poznejših fazah kliničnih preskušanj – podobno kot pri vsakem razvoju zdravil – zaradi konkurence uspešnega razvoja novih zdravil. Druge ovire vključujejo pravne in regulativne izzive, kot so vprašanja, povezana s patenti, in neenakimi stroški predpisovanja (Zhang idr., 2020).

Večstransko sodelovanje med farmacevtsko industrijo, akademskimi institucijami in nevladnimi organizacijami igra ključno vlogo pri premagovanju teh izzivov. Organizacije, kot so The National Center for Advancing Translational Sciences, The Wellcome Trust Health Innovation Challenge Fund in Repurposing Drugs in Oncology (reDO), spodbujajo razvoj

zdravil z nudenjem finančne in infrastrukturne podpore (Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021).

Prihodnost repozicioniranja zdravil za raka bo v veliki meri odvisna od napredkov v umetni inteligenci, bioinformatiki in sistemski biologiji, ki omogočajo hitrejšo identifikacijo potencialnih kandidatov za nove indikacije. Z združevanjem naprednih analiz in sodelovalnih modelov lahko repozicioniranje zdravil prispeva k razvoju učinkovitih, dostopnih in inovativnih rešitev za zdravljenje raka (Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021).

2.6. OBSTOJEČA ZDRAVILA Z MOŽNOSTJO REPOZICIONIRANJA ZA HER2-POZITIVNI RAK

2.6.1. Protivnetna zdravila in njihovi učinki na HER2 poti

Nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID) so skupina zdravil, ki se pogosto uporabljajo za lajšanje bolečine, vnetja in zvišano telesno temperaturo. Njihov glavni mehanizem delovanja temelji na inhibiciji encima ciklooksigenaze (COX), ki je ključnega pomena za sintezo prostaglandinov – molekul, ki sodelujejo pri vnetju, bolečini in drugih fizioloških procesih. COX-2, ena od izoform tega encima, igra pomembno vlogo pri razvoju tumorjev, saj spodbuja angiogenezo (nastanek novih krvnih žil), proliferacijo rakavih celic in zavira apoptozo (programirano celično smrt). Zaradi teh učinkov so NSAID postali zanimivi kot potencialna protitumorska terapija (Li & Mansmann, 2013).

Raziskave so pokazale, da zaviranje COX-2 lahko zmanjša rast tumorjev, vključno z rakom dojke. Kljub temu je rak dojke bolj odporen na terapije, ki temeljijo zgolj na COX-2 inhibiciji, kot nekateri drugi raki, kot sta rak debelega črevesa in pljuč. Kombinirana terapija, ki vključuje inhibicijo tako COX-2 kot tudi receptorjev tirozin kinaz, ima močnejši učinek, saj zmanjšuje angiogenezo bolj učinkovito kot samo zaviranje COX-2. Vendar pa pri raku dojke ostajajo aktivne tudi druge signalne poti, kot so Hedgehog, EGFR (epidermalni rastni faktor), JAK/STAT in WNT, ki lahko prispevajo k odpornosti na zdravljenje (Li & Mansmann, 2013).

Poleg tega imajo določeni tumorski supresorski mikroRNA (miRNA), kot so mir-10b, mir-101 in mir-205, pomembno vlogo pri regulaciji COX-poti in vplivajo na odzivnost tumorjev na NSAID terapije. Ker dolgotrajna uporaba NSAID povzroča stranske učinke, kot so gastrointestinalne težave in kardiovaskularna tveganja, je prilagajanje njihove uporabe ključnega pomena za razvoj personalizirane medicine. Sistemskobiološki model NSAID, ki vključuje analizo genskih in signalnih poti ter vpliv miRNA, lahko pomaga pri napovedovanju odzivnosti tumorjev in razvoju bolj ciljno usmerjenih terapevtskih strategij za zdravljenje raka dojke (Li & Mansmann, 2013).

2.6.1.1. Raloksifen

Raloksifen je selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM), ki se uporablja za preprečevanje in zdravljenje osteoporoze pri ženskah po menopavzi. Njegova vloga pri preprečevanju raka dojke je bila prvič izpostavljena v študiji Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) leta 1999. Čeprav zmanjšanje tveganja za raka dojke ni bil primarni cilj študije, so rezultati pokazali 76-odstotno zmanjšanje tveganja za invazivni rak dojke pri ženskah po menopavzi z osteoporozo, ki so prejemale raloksifen tri leta. Kasnejše študije so potrdile te ugotovitve, kar je privedlo do odobritve raloksifena s strani FDA (Food and Drug Administration) za preprečevanje invazivnega raka dojke leta 2007 (Cummings idr., 1999).

V primerjalni študiji tamoksifena in raloksifena (STAR) so raziskovalci preučevali učinkovitost obeh zdravil pri zmanjševanju incidence raka dojke pri ženskah z večjim tveganjem. Študija je pokazala, da je raloksifen povzročil manj stranskih učinkov in manj primerov endometrijskega raka v primerjavi s tamoksifenom. Raloksifen se je izkazal za učinkovitejšega pri preprečevanju neinvazivnega raka dojke, medtem ko je bil tamoksifen bolj učinkovit pri preprečevanju invazivnega raka dojke (Cummings idr., 1999).

2.6.1.2. Zoledronska kislina

Zoledronska kislina je bisfosfonat, ki se uporablja za zdravljenje osteoporoze in preprečevanje skeletnih dogodkov pri bolnikih z napredovalimi malignimi obolenji, ki prizadenejo kosti. Poleg tega so raziskave pokazale, da ima zoledronska kislina neposreden antitumorski učinek in lahko sinergistično poveča učinke drugih antitumorskih zdravil pri osteosarkomu. V študiji ABCSG-12, ki je vključevala 1803 predmenopavzalne ženske z zgodnjim hormonsko odzivnim rakom dojke, so ugotovili povečanje preživetja brez bolezni pri bolnicah, ki so prejemale anastrozol v kombinaciji z zoledronsko kislino. Meta-analiza je pokazala, da lahko uporaba zoledronske kisline zmanjša ponovitev bolezni pri bolnicah, ki prejemajo zaviralce aromataze. (Coleman idr., 2020).

2.6.2. UPORABA ANTIHELMINTIKOV

Antihelmintiki, zdravila prvotno namenjena zdravljenju parazitskih okužb, so v zadnjih letih vzbudili veliko zanimanja zaradi njihovega potencialnega protitumorskega delovanja. Med najpogosteje preučevanimi antihelmintiki v kontekstu onkologije so klorokin, ivermektin, mebendazol, flubendazol in albendazol. Ti učinkujejo na različne signalne poti, vključno s Wnt/ β -katenin, NF- κ B in signalnimi proteini STAT (signal transducer and activator of transcription), ki igrajo ključno vlogo pri preživetju rakavih celic, njihovi proliferaciji in invazivnosti (Al Khzem idr., 2024).

2.6.2.1. Vloga HER2 pri zdravljenju raka s flubendazolom

Ena izmed najbolj zanimivih tarč flubendazola pri zdravljenju raka je človeški epidermalni rastni faktor receptor 2 (HER2), ki igra ključno vlogo pri agresivnih oblikah raka, zlasti raka dojk. Flubendazol je pokazal sposobnost regulacije izražanja HER2, kar ima poseben pomen pri HER2-pozitivnem raku dojk, kjer lahko deluje kot dopolnilno ali alternativno zdravljenje v primerjavi z obstoječimi terapijami, kot sta trastuzumab in pertuzumab (Al Khzem idr., 2024).

Poleg vpliva na HER2 je flubendazol učinkovit tudi pri inhibiciji tumorske rasti pri različnih vrstah raka, kot so nevroblastom, multipli mielom, levkemija in pljučni rak. Njegovo protitumorsko delovanje temelji na več mehanizmih:

- Indukcija apoptoze s povečano tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kar povzroči aktivacijo kaspaz 3 in 7 ter posledično celično smrt.
- Inhibicija angiogeneze, s čimer zmanjša rast novih krvnih žil, ki oskrbujejo tumor, kar je bilo dokazano pri raku pljuč, jeter in dojk.
- Specifično ciljanje rakavih celic brez večje toksičnosti za zdrave celice, kar je ena od prednosti flubendazola v primerjavi z nekaterimi konvencionalnimi kemoterapevtiki.

Kljub obetavnim rezultatom predkliničnih študij je klinična uporaba antihelmintikov v onkologiji še vedno v fazi raziskav. Večina podatkov o njihovem protitumorskem učinku izhaja iz in vitro študij in živalskih modelov, medtem ko je število kliničnih preskušanj še vedno omejeno. Nekateri ključne omejitve vključujejo:

- **Farmakokinetične lastnosti:** Slaba topnost flubendazola in nizka biološka razpoložljivost omejujeta njegovo sistemsko učinkovitost, zato se proučujejo različne formulacije, ki bi omogočile boljšo absorpcijo in razporeditev v telesu.
- **Odmerjanje in toksičnost:** Kljub nizki toksičnosti pri standardnih odmerkih, ki se uporabljajo pri zdravljenju parazitskih okužb, ostaja odprto vprašanje varnosti dolgotrajne uporabe antihelmintikov pri rakavih bolnikih.
- **Interakcije z drugimi zdravili:** Ker se antihelmintiki pogosto presnavljajo preko jetrnih encimov, obstaja možnost interakcij z drugimi onkološkimi zdravili, kar zahteva dodatne raziskave.

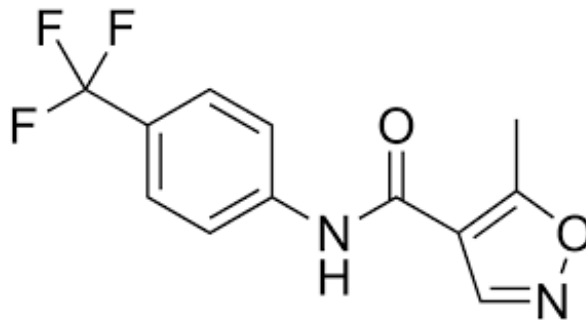
Kljub temu bo potrebno več kliničnih raziskav za potrditev njihove učinkovitosti in varnosti pri onkoloških bolnikih. V prihodnosti bi lahko razvoj izboljšanih formulacij in kombinacijskih terapij z obstoječimi kemoterapevtiki povečal njihovo terapevtsko vrednost in omogočil vključitev v standardne protokole zdravljenja raka (Al Khzem idr., 2024).

2.6.3. LEFLUNOMID

Leflunomid, zdravilo, ki se primarno uporablja za zdravljenje revmatoidnega in psoriatičnega artritisa, je v zadnjem času pritegnilo pozornost raziskovalcev zaradi svojih potencialnih

protirakavih učinkov. Njegov aktivni presnovek, A77 1726, zavira encim dihidroorotat dehidrogenazo (DHODH), kar vpliva na presnovo celic (Xia idr., 2024).

Raziskave so pokazale, da leflunomid (**Slika 5**) deluje tudi na rakave celice, zlasti pri raku dojke. Njegovo delovanje na DHODH zavira sintezo pirimidinov, kar vodi do pomanjkanja nukleotidov in posledično povzroči celično smrt. Posebej učinkovit se je izkazal pri rakavih celicah, ki nimajo funkcionalnega tumor-supresorskega gena P53. Študije so pokazale, da kombinacija leflunomida z zaviralci kontrolne kinaze 1 (CHK1) močno okrepi učinek zdravljenja, saj pospeši apoptozo celic in zmanjša rast tumorjev, ki so P53-negativni (Xia idr., 2024).



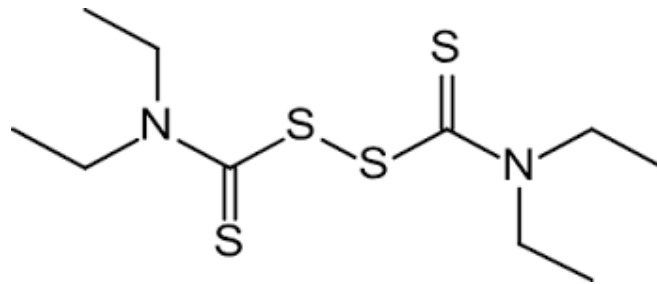
Slika 5: Skeletna formula leflunomida (Martindale & Sweetman, 2009).

2.6.4. DISULFIRAM (DSF)

Disulfiram (DSF), pod komercialnim imenom Antabuse, je bil prvotno uporabljen za zdravljenje alkoholizma, vendar so njegove protirakave lastnosti odkrili že leta 1977 pri zaviranju kostnih metastaz raka dojke (**Slika 6**). Kasnejše raziskave, vključno z analizami danskih zdravstvenih registrov, so pokazale nižjo umrljivost pri bolnikih z rakom dojke, ki so nadaljevali z uporabo DSF (Xia idr., 2024).

Disulfiram deluje protirakavo predvsem s spremembo celične presnove. V prisotnosti bakra zavira glikolizo rakavih celic in zmanjšuje izražanje ključnih molekul, kot so S6K1, MYC, GLUT1, PKM2 in LDHA, ki so pomembne za celično rast in metabolizem. Poleg tega povečuje nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kar sproži apoptozo v rakavih celicah (Xia idr., 2024).

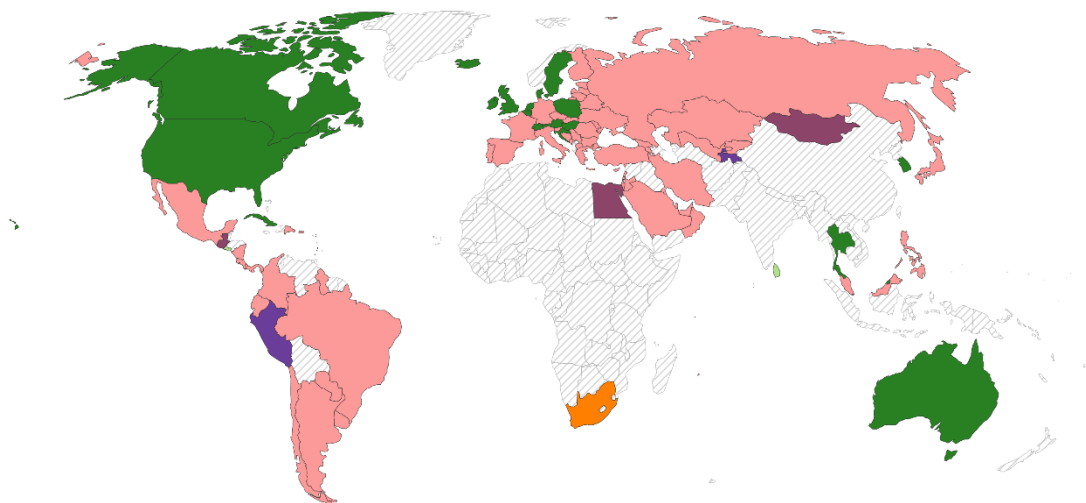
Zaradi teh učinkov je DSF obetavno zdravilo za kombinacijsko terapijo raka dojke, še posebej v strategijah ponovne uporabe že odobrenih zdravil (Xia idr., 2024).



Slika 6: Skeletna formula disulfirama (M.violante, 2007).

2.7. BIOLOŠKO OZADJE IN POMEN HER2-POZITIVNEGA RAKA DOJK

Rak dojke je najpogostejša maligna bolezen pri ženskah in predstavlja heterogeno skupino tumorjev, ki jih delimo na različne podtipove (Slika 7). Ti se med seboj razlikujejo glede na klinični potek, ki ga določajo predvsem biološki dejavniki. Nekateri podtipi so hormonsko odvisni, drugi ne, kar pomembno vpliva na izbiro in uspešnost zdravljenja (Matos, 2008).



Slika 7: Najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri ženskah

Podatki temelječi na osnovnem vzroku, navedenem v mrliškem listu. Legenda: rak dojke (roza), pljučni rak (temno zelena), slabo-definirani kožni rak (svetlo zelena), rak materničnega vratu (oranžna), rak na jetrih (temno vijolična), rak na želodcu (vijolična)(WHO Mortality Database – with minor processing by Our World in Data, 2024).

Na površini tumorskih celic in v njihovi notranjosti se nahajajo različni proteini, ki sodelujejo v signalnih poteh in s tem uravnavajo celično rast ter razmnoževanje. Med ključnimi regulatorji teh procesov so receptorji za epidermalni rastni faktor (HER1, HER2, HER3 in HER4). Ti receptorji sprožajo znotrajcelično tirozin kinazno aktivnost, ki nadzoruje esencialne celične procese in pomembno vpliva na razvoj in napredovanje bolezni (Matos, 2008).

Receptor HER2 je pritegnil posebno pozornost, saj aktivira ključne signalne poti, ki spodbujajo rast, proliferacijo, diferenciacijo, migracijo in adhezijo rakavih celic, hkrati pa vplivajo na angiogenezo in apoptozo. Ko je HER2 prekomerno izražen, govorimo o HER2-pozitivnem raku dojke. Medtem ko normalna celica izraža približno 20.000 receptorjev HER2, jih lahko rakava celica izraža kar 1–2 milijona. Ta podtip raka predstavlja približno 15–20 % vseh primerov raka dojke, pri čemer so ti tumorji agresivnejši in rastejo hitreje. Značilna je prekomerna ekspresija proteina HER2, ki je najpogosteje posledica amplifikacije gena HER2, lociranega na kromosomu 17 (Matos, 2012).

Ob diagnozi so HER2-pozitivni tumorji običajno večji kot HER2-negativni in slabše diferencirani. Pogosto so že ob odkritju prizadete regionalne bezgavke, kar povečuje tveganje za ponovitev bolezni in smrtnost. Status HER2 določamo imunohistokemično (IHC), kjer ocenjujemo izraženost proteina HER2 v celični membrani, ali s fluorescenčno hibridizacijo in situ (FISH), s katero ugotavljamo amplifikacijo gena HER2 (Ribnikar idr., 2008).

Pri zdravljenju raka dojke se uporabljajo kemoterapija, hormonska terapija in tarčna terapija. Kemoterapija deluje nespecifično in prizadene vse hitro deleče se celice, medtem ko je za uporabo tarčne terapije potrebna prisotnost specifične molekularne tarče, kot je receptor HER2. Razvoj tarčnih terapij, namenjenih zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojke, je bistveno izboljšal prognozo bolnic. Prednost tarčne terapije je njena usmerjenost na specifične procese v rakavih celicah, kar ji omogoča večjo učinkovitost v primerjavi s kemoterapijo, hkrati pa povzroča manj neželenih učinkov. (NOVARTIS, 2022).

Danes je na voljo več vrst anti-HER2 zdravil, ki delujejo na podobne, a vseeno različne mehanizme. To omogoča prilagoditev zdravljenja v primeru napredovanja bolezni. Med anti-HER2 terapijami najdemo monoklonska protitelesa, ki se aplicirajo intravensko ali podkožno v intervalih treh tednov, ter peroralna zdravila, ki so na voljo v obliki tablet. Odkritje receptorja HER2 in razvoj tarčnih zdravil predstavljata eno ključnih prelomnic v zdravljenju raka dojke, saj sta bistveno izboljšala preživetje in kakovost življenja bolnic s HER2-pozitivno obliko bolezni (Vernieri idr., 2019).

3. BIOLOŠKI PREGLED HER2-POZITIVNEGA RAKA DOJK

3.1. MOLEKULARNA IN GENETSKA OSNOVA HER2-POZITIVNEGA RAKA DOJK

Protoonkogeni so skupina genov, ki imajo ključno vlogo pri regulaciji celične rasti in diferenciacije. Njihova aktivacija lahko prispeva k razvoju številnih malignih obolenj pri vretenčarjih, vključno s človekom (Pegram idr., 2000).

Gen *HER2/neu* spada v družino receptorskih tirozin kinaz tipa I (RTK), ki predstavljajo podskupino protoonkogenov (Slika 8). Kodira transmembranski receptorski protein s molekulsko maso 185 kDa, ki sodeluje pri signalnih poteh, povezanih z rastjo in preživetjem celic. Ta gen je lokaliziran na kromosomu 17q21.1 in se izraža v številnih tkivih, med drugim v koži, ustni sluznici, dojkah, jajčnikih, endometriju, pljučih, jetrih, trebušni slinavki, tankem

in debelem črevesu, ledvicah, mehurju, centralnem živčnem sistemu ter nekaterih vezivnih tkivih (Pegram idr., 2000).

Njegovo prekomerno izražanje ali amplifikacija je povezana z razvojem in napredovanjem določenih vrst raka, zlasti raka dojk in želodca, kar ga uvršča med pomembne tarče ciljnih terapij (Pegram idr., 2000).

Pot HER2 je v kontekstu systemske biologije opisana kot kompleksno biološko omrežje, sestavljeno iz treh ključnih plasti:

1. Vhodna plast: membranski receptorji in njihovi ligandi, ki sprožijo signal iz zunajceličnega prostora.
2. Osrednja plast: sistem proteinskih kinaz, ki prenašajo signal proti jedru.
3. Izhodna plast: transkripcijski faktorji, ki uravnavajo izražanje genov in s tem vplivajo na različne celične funkcije.

Poleg tega so identificirani geni in proteinski produkti, ki regulirajo aktivnost te signalne poti (Gutierrez & Schiff, 2011).

Vhodni sistem sestavljajo štirje receptorski tirozin kinazni (RTK) receptorji: HER1, HER2, HER3 in HER4, skupaj z njihovimi ligandi (vsaj 11 različnih ligandov). Pri raku dojk je HER2 dominantni receptor, ki je amplificiran v približno 20 % primerov (Gutierrez & Schiff, 2011).

Po vezavi liganda na zunajcelične domene receptorjev HER proteini dimerizirajo in sprožijo transfosforilacijo svojih intracelularnih domen. HER2 sam nima znanega liganda, zato se za aktivacijo zanaša na heterodimerizacijo z drugim članom družine ali homodimerizacijo, kadar je izražen v zelo visokih ravneh. Fosforilirani ostanki tirozina nato delujejo kot vezavna mesta za številne znotrajcelične signalne molekule, kar vodi do aktivacije sekundarnih signalnih poti ter krosstalka z drugimi signalnimi mehanizmi na membrani (Gutierrez & Schiff, 2011).

Aktivacija HER2 vodi do signalizacije preko več poti, ki uravnavajo ključne celične funkcije, vključno z:

- celično proliferacijo,
- preživetjem celic,
- diferenciacijo,
- angiogenezo,
- invazijo in metastazami.

HER2 ima najmočnejšo katalitično kinazno aktivnost v svoji družini, dimeri, ki vsebujejo HER2, pa sprožijo najmočnejšo signalizacijo. HER2 je strukturno v odprti konformaciji, kar omogoča njegovo preferenčno dimerizacijo z drugimi člani družine (Gutierrez & Schiff, 2011).

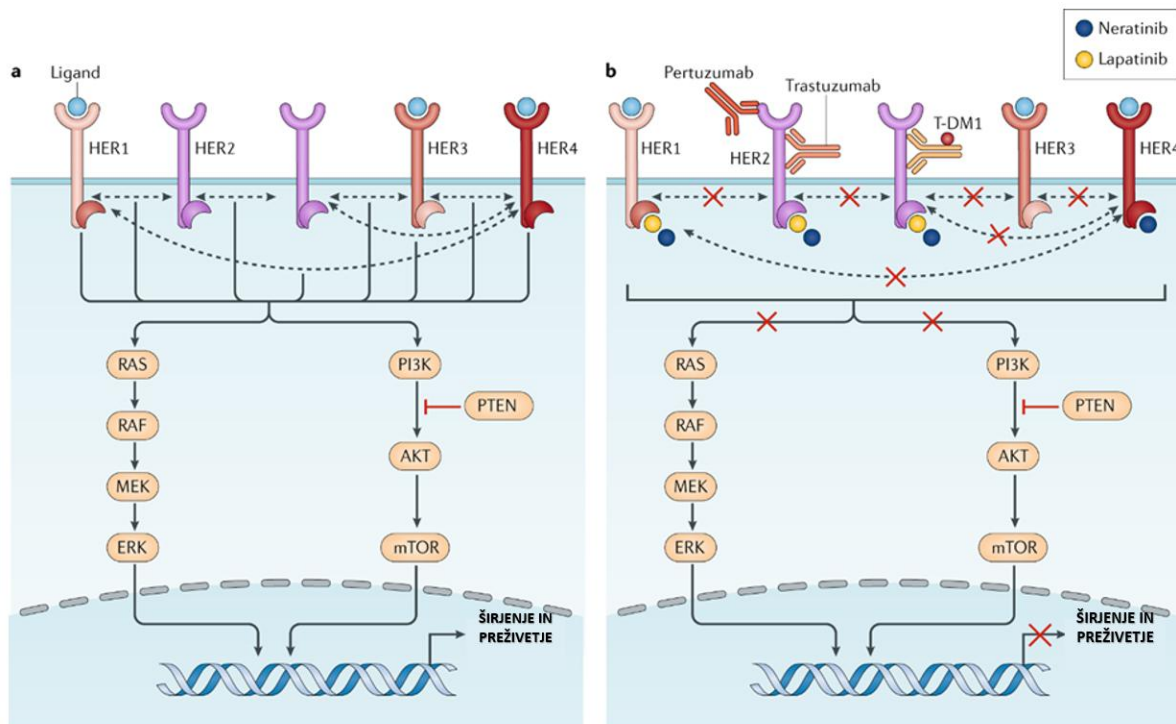
HER3, ki se aktivira z vezavo heregulina, nima lastne tirozin-kinazne aktivnosti. Zato za aktivacijo potrebuje vezavo na druge družinske člane, pri čemer v kombinaciji s HER2

predstavlja najmočnejši stimulator anti-apoptotske poti PI3K/AKT, saj vsebuje več vezavnih mest za PI3K (Gutierrez & Schiff, 2011).

Poleg tega se HER2 lahko aktivira s tvorbo kompleksov z drugimi membranskimi receptorji, kot je receptor za inzulinu podoben rastni faktor I (IGF-1R). Prav tako je bilo dokazano, da lahko tudi estrogen, preko negenomske aktivnosti estrogenskega receptorja (ER) zunaj jedra, aktivira signalizacijo HER2 (Gutierrez & Schiff, 2011).

Pri nekaterih oblikah raka dojke je prisotna aberantna oblika HER2, imenovana p95, ki nima zunajcelične domene. Ker zunanja domena HER2 običajno deluje kot zaviralec receptorja, dokler ni vezan ligand, je p95 konstitutivno aktiven (Gutierrez & Schiff, 2011).

p95 predstavlja izziv pri zdravljenju z zdravilom trastuzumab, ki je monoklonsko protitelo, usmerjeno proti zunanji domeni HER2. Ker p95 te domene nima, trastuzumab nanj ne deluje, kar lahko vodi v odpornost na terapijo. Zaradi odsotnosti zunajcelične domene p95 tudi ni zaznan s protitelesi, ki ciljajo na zunajcelični del HER2 (Gutierrez & Schiff, 2011).



Slika 8: Družina receptorjev tirozin-kinaz HER

a) Družina receptorjev tirozin-kinaz HER vključuje štiri receptorje: HER1 (EGFR), HER2, HER3 in HER4. Aktivacija signalizacije pri vseh razen HER2 poteka z vezavo liganda, kar vodi v konformacijske spremembe in nastanek homo- ali heterodimerov. HER2 nima znanih ligandov, vendar lahko tvori dimere s preostalimi člani družine, medtem ko ima HER3 nizko kinazno aktivnost, a močno signalizira prek heterodimerizacije. Dimerizacija povzroči transfosforilacijo tirozinskih ostankov in aktivacijo poti PI3K-AKT ter MAPK (ERK), ki uravnavajo preživetje in proliferacijo celic (Goutsouliak idr., 2020).

b) Za zdravljenje HER2+ raka dojke je trenutno odobrenih pet terapij: monoklonska protitelesa (trastuzumab, pertuzumab), majhne molekule zaviralcev tirozin-kinaz (lapatinib, neratinib) in konjugati protiteles z zdravili (trastuzumab emtansin – T-DMI). Trastuzumab in pertuzumab se vežeta na zunajcelični del HER2 in se pogosto

uporabljata skupaj ali zaporedno za učinkovitejše zaviranje signalizacije in preprečevanje odpornosti na terapijo (Goutsouliak idr., 2020).

Signalna pot HER2 je tako ključna v patogenezi raka dojke, še posebej pri HER2-pozitivnem raku, kjer je pomnožitev in aktivacija receptorja povezana z agresivno rastjo tumorja. Kompleksnost te poti in možnosti interakcij z drugimi signalnimi mehanizmi predstavljajo izzive in priložnosti za razvoj tarčnih terapij, ki lahko izboljšajo izid zdravljenja (Gutierrez & Schiff, 2011).

Normalna tkiva izražajo nizke ravni membranskega proteina HER2. Vendar pa je prekomerna ekspresija HER2 opažena pri približno 20 % primerov raka dojke ter pri nekaterih vrstah raka jajčnikov in želodca. To vodi v agresivnejše biološko obnašanje tumorja in je povezano s slabšo prognozo pri raku dojke (Gutierrez & Schiff, 2011). Pri HER2-pozitivnem raku dojke lahko tumorske celice vsebujejo do 25–50 kopij gena HER2 in proizvajajo 40–100-krat več HER2 proteina v primerjavi z normalnimi celicami. To vodi do izražanja približno 2 milijonov receptorjev HER2 na površini posamezne tumorske celice (Pegram idr., 2000).

Razlika v izražanju HER2 med normalnimi tkivi in tumorji omogoča, da je HER2 učinkovita tarča tarčnih terapij. Trastuzumab (Herceptin), prvo terapevtsko protitelo, ki specifično cilja na HER2, se je izkazalo za učinkovito in relativno netoksično. Bolniki ga dobro prenašajo, saj so njegovi učinki pretežno omejeni na rakave celice, ki prekomerno izražajo HER2 (Gutierrez & Schiff, 2011).

HER2-pozitivni tumorji imajo specifične molekularne in klinične značilnosti, ki jih ločijo od drugih podtipov raka dojke. Za njih je značilna povečana stopnja proliferacije in hitrorastoča tumorska masa. Tumorji imajo višjo histološko in jedrsko stopnjo malignega potenciala, kar pomeni večjo agresivnost in slabšo odzivnost na standardne terapije. Poleg tega je pri HER2-pozitivnih tumorjih pogosto opažena nizka raven estrogenskega (ER) in progesteronskega (PR) receptorja, kar pomeni, da so pogosto odporni na hormonsko terapijo. Tumorji so tudi genetsko nestabilni, kar se kaže v večji aneuploidiji. Klinično pomembna značilnost HER2-pozitivnega raka dojke je tudi nagnjenost k metastaziranju v centralni živčni sistem (CŽS) in notranje organe (Gutierrez & Schiff, 2011).

V primerjavi z normalnimi celicami imajo HER2-pozitivni tumorji povečano celično rast in proliferacijo, kar vodi v hitrejši razvoj bolezni. Poleg tega so ti tumorji izrazito bolj tumorigeni in imajo povečano sposobnost metastaziranja, kar pomembno vpliva na klinični potek bolezni (Pegram idr., 2000).

Te značilnosti poudarjajo agresivnost HER2-pozitivnega raka dojke, hkrati pa potrjujejo klinično relevantnost HER2 kot terapevtske tarče. Razvoj HER2-ciljanih terapij, kot je trastuzumab, je bistveno izboljšal prognozo bolnikov s HER2-pozitivnim rakom dojke in ostaja eno ključnih področij onkoloških raziskav (Gutierrez & Schiff, 2011).

3.2. VLOGA HER2 (HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2) PRI TUMORIGENEZI IN NAPREDOVANJU BOLEZNI

Pomnoževanje HER2 je relativno zgodnji dogodek v tumorigenezi raka dojke, saj je prisotno pri skoraj 50 % primerov duktalnega karcinoma *in situ* (DCIS). Status HER2 se pogosto ohranja skozi napredovanje bolezni, vključno s preходом iz neinvazivnih v invazivne oblike raka dojke ter v nodalne in oddaljene metastaze (Gutierrez & Schiff, 2011).

Kljub temu, da je pomnoževanje HER2 pogosto v zgodnjih fazah bolezni, se HER2-amplifikacija pojavi le pri približno 20 % invazivnih rakov dojke. To nakazuje, da vsi primeri DCIS s pomnoženim HER2 ne napredujejo v invazivno obliko bolezni. HER2-pozitivni rak dojke je opredeljen kot molekularno in klinično specifičen podtip, ki ohranja edinstven genski izrazni profil med tumorigenezo in metastatskim širjenjem (Gutierrez & Schiff, 2011).

Pomemben vidik napredovanja bolezni predstavlja sprememba izražanja HER2 v odzivu na terapijo. Pri nekaterih tumorjih po zdravljenju trastuzumabom pride do izgube izražanja HER2, kar je lahko posledica selekcije HER2-negativnih klonov, ki niso bili občutljivi na terapijo. Po drugi strani lahko HER2-izraz negativni tumorji sčasoma postanejo HER2-pozitivni, zlasti po endokrini terapiji, ki cilja na estrogenski receptor (ER) (Gutierrez & Schiff, 2011).

Med HER2 in ER obstaja recipročna regulacija: HER2 negativno vpliva na izražanje ER, medtem ko ER zavira izražanje HER2. To pomeni, da lahko blokada ER vodi v povečano izražanje HER2, medtem ko lahko inhibicija HER2 vpliva na regulacijo ER. To odkritje je klinično pomembno, saj pojasnjuje možne mehanizme odpornosti na terapije, usmerjene proti HER2 ali ER, in poudarja potrebo po kombiniranih terapevtskih strategijah, ki ciljajo na oba receptorja (Gutierrez & Schiff, 2011).

3.3. KLINIČNI IZZIVI PRI ZDRAVLJENJU HER2-POZITIVNIH PACIENTOV

Bolnice s HER2-pozitivnim rakom dojke se večinoma zdravijo s tarčno terapijo, ki se pogosto kombinira s hormonskim zdravljenjem, kadar je tumor hkrati hormonsko odvisen. Učinkovitost in izbira terapije sta odvisni od več dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši stopnja razvitosti raka, predhodna zdravljenja in status menopavze. Pri predmenopavzalnih bolnicah je namreč treba upoštevati specifične terapevtske pristope, kar predstavlja dodaten izziv pri določanju optimalnega zaporedja ali kombinacije anti-HER2 zdravil (Vernieri idr., 2019).

Kljub napredku tarčnih terapij ostaja razvoj odpornosti velik izziv, zlasti pri metastatskih oblikah bolezni. Mehanizmi odpornosti vključujejo:

- **Oslabljen** vezavo zdravila na tarčo,
- **Aktivacijo alternativnih signalnih poti**, ki omogočajo preživetje tumorja kljub terapiji,

- **Izogibanje imunskemu sistemu**, kar zmanjša učinkovitost zdravljenja.

Trenutne raziskave so osredotočene na razumevanje teh mehanizmov, da bi razvili strategije za odložitev ali premagovanje odpornosti. Med obetavnimi pristopi so:

- **Dvojna blokada HER2** s kombinacijo različnih anti-HER2 zdravil,
- **Konjugati protitelo-zdravilo (ADC)**, ki omogočajo ciljno dostavo kemoterapevtika v rakave celice,
- **Zaviralci tirozin kinaze (TKI)**, ki delujejo na znotrajcelične signalne poti HER2 in s tem zavirajo rast tumorja.

Napredek na področju novih terapij ponuja nove možnosti zdravljenja in izboljšuje prognozo bolnic s HER2-pozitivnim rakom, zlasti pri napredovalih oblikah bolezni (Vernieri idr., 2019).

Učinkovitost posameznih anti-HER2 terapij je pogosto omejena, zlasti pri bolnicah, pri katerih se bolezen ponovi po predhodnem (neo)adjuvantnem zdravljenju s trastuzumabom. Pri teh bolnicah je mediana preživetja brez napredovanja bolezni približno 1 leto ali celo manj, še posebej pri zdravljenju v prvi ali drugi liniji (Vernieri idr., 2019).

Medtem ko je primarna odpornost proti anti-HER2 zdravilom možna, večina terapevtskih neuspehov izhaja iz pridobljene odpornosti. Ta nastane zaradi selektivnega pritiska zdravljenja, ki postopoma vodi do izbora odpornih podklonov tumorskih celic. Identificiranih je bilo več možnih mehanizmov primarne in sekundarne odpornosti, pri čemer večina vključuje genetske ali epigenetske spremembe, ki povzročijo:

- **Prekomerno izražanje ali konstitutivno aktivacijo** receptorjev HER2, HER3, HER4 ali drugih **plazemskih kinaz**, kot so **MET** in **FGFR1**,
- **Aktivacijo signalne poti PI3K/AKT/mTOR**, ki je ključna za vzdrževanje odpornosti na terapije usmerjene proti HER2,
- **Motnje v lizosomski funkciji in procesih internalizacije**, kar lahko prispeva k odpornosti na **T-DM1 (trastuzumab emtanzin)**.

Predklinične študije so identificirale več mehanizmov odpornosti, nekateri pa so bili že testirani v kliničnih preskušanjih. Kljub temu njihova klinična uporabnost ostaja nejasna, kar pomeni, da odpornost na anti-HER2 terapije še vedno predstavlja velik izziv (Vernieri idr., 2019).

Razumevanje tumorske heterogenosti in sprememb v signalnih poteh HER2 je ključno za razvoj novih terapevtskih strategij. Večina identificiranih mehanizmov odpornosti je teoretično ciljnih z že obstoječimi spojinami, kot so zaviralci PIK3CA/mTOR ali FGFR1. Vendar je treba pri kombiniranju teh učinkovin s standardnimi anti-HER2 terapijami pretehtati njihovo terapevtsko prednost v primerjavi s tveganjem za toksičnost (Vernieri idr., 2019).

Poleg tega lahko soobstoj več različnih mehanizmov odpornosti zaradi intralezijske in interlezijske heterogenosti omeji možnost hkratnega ciljanja na vse odporne tumorske klone, kar je bilo že opaženo tudi pri drugih vrstah novotvorb. Zato je optimizacija metod za natančno

in sočasno odkrivanje odpornih celičnih klonov ključnega pomena za personalizirano zdravljenje. Med perspektivnimi pristopi sta analiza krožeče tumorske DNK (ctDNA) in krožečih tumorskih celic (CTC), ki omogočata boljše razumevanje bioloških značilnosti tumorja in lahko prispevata k izbiri najbolj učinkovite terapije za posameznega bolnika (Vernieri idr., 2019).

3.4. MEHANIZMI ODPORNOSTI NA OBSTOJEČE TERAPIJE, KOT SO TRASTUZUMAB IN LAPATINIB

Terapija s trastuzumabom (T) je revolucionirala zdravljenje HER2-pozitivnega raka dojk in predstavlja temeljno terapijo za bolnike s to boleznijo. Trastuzumab je humanizirano mišje monoklonsko protitelo (MoAb), ki z visoko afiniteto in specifičnostjo veže zunajcelično domeno IV receptorja HER2. Njegovo protitumorsko delovanje temelji na več mehanizmi, ki jih lahko razdelimo na znotrajcelične in zunajcelične (Vernieri idr., 2019).

Med znotrajcelične mehanizme delovanja trastuzumaba spada vezava na zunajcelično domeno HER2, kar spodbuja internalizacijo in razgradnjo receptorja. Prav tako preprečuje nastanek homodimerov HER2-HER2 in heterodimerov HER2-HER3 ter zavira izločanje ektodomene HER2, kar posledično zmanjša izražanje njegove izoforme p95-HER2. Končni učinek teh bioloških aktivnosti je inhibicija signalnih poti MAPK in PI3K/AKT/mTOR, ki se nahajajo nižje v signalni kaskadi HER2 (Vernieri idr., 2019).

Zunajcelični mehanizmi vključujejo aktivacijo prirojenega imunskega sistema. Trastuzumab, vezan na HER2, prepoznajo receptorji Fc γ na celicah prirojenega imunskega sistema, kot so naravne celice ubijalke (NK), celice, ki predstavljajo antigen (APC), in druge efektorske imunske celice. To vodi do odstranjevanja rakavih celic s pomočjo protitelesno odvisne celične citotoksičnosti (ADCC) in od komplementa odvisne citotoksičnosti (CDC) (Vernieri idr., 2019).

Kljub izjemnemu kliničnemu uspehu trastuzumaba približno 75 % bolnikov z metastatskim HER2-pozitivnim rakom dojk v enem letu razvije odpornost na zdravljenje. Predklinične in klinične študije so identificirale različne mehanizme, odgovorne za primarno (de novo) in pridobljeno (sekundarno) odpornost na trastuzumab (Vernieri idr., 2019).

Eden od ključnih dejavnikov odpornosti so različice receptorja HER2. Nekatere različice spajanja HER2 lahko zmanjšajo sposobnost trastuzumaba za vezavo na receptor. Najbolj raziskana je izoforma p95-HER2, aktivni karboksi-terminalni fragment HER2, ki nastane zaradi cepitve ektodomene s proteazo ADAM10. Ker mu manjka zunajcelična domena, ne more vezati trastuzumaba. Študije so pokazale, da je p95-HER2 povezan z odpornostjo na trastuzumab, medtem ko na lapatinib (L), ki veže intracelularni del receptorja, ta varianta ne vpliva (Vernieri idr., 2019).

Dodatno so študije na celičnih linijah raka dojk odkrile varianto *HER2* brez eksona 16 (*HER2 Δ 16*), ki tvori stabilne dimere HER2 v odvisnosti od aktivacije SRC. Ta varianta je v in vitro modelih korelirala z odpornostjo na trastuzumab, medtem ko so transgene miši z

izraženim HER2 Δ 16 pokazale večjo občutljivost na zdravljenje s trastuzumabom v primerjavi z izražanjem HER2 divjega tipa. Zaradi teh nasprotujočih si rezultatov ostaja vpliv variant HER2 na odpornost proti trastuzumabu še vedno nejasen. Možno je, da se učinek posameznih variant razlikuje glede na stadij bolezni, vrsto terapije ali biološke značilnosti tumorja (Vernieri idr., 2019).

Poleg sprememb na HER2 lahko na odpornost vpliva tudi izražanje mucina 4 (*MUC4*), ki ga izražajo tumorske celice ali celice v mikrookolju. *MUC4* lahko fizično prekrije mesto vezave trastuzumaba na HER2, s čimer prepreči njegovo vezavo in posledično zaviranje signalizacije HER2. Čeprav so prvi podatki pokazali, da lahko *MUC4* igra vlogo pri odpornosti na trastuzumab, je ta mehanizem še vedno premalo raziskan in zahteva nadaljnje preučevanje (Vernieri idr., 2019).

Eden ključnih mehanizmov delovanja trastuzumaba (T) je inhibicija signalne poti PI3K/AKT/mTOR, ki igra pomembno vlogo pri rasti in preživetju rakavih celic. Vendar pa lahko konstitutivna aktivacija te signalne osi obide zaviralni učinek trastuzumaba. V predkliničnih študijah sta mutaciji E545K in H1047R v katalitski podenoti α PI3K (PIK3CA) aktivirali to signalno pot in bili povezani z odpornostjo na trastuzumab pri modelih HER2-pozitivnega raka dojke. Podobni učinki so bili ugotovljeni pri tumorjih z nizko ekspresijo PTEN, tumorske supresorske fosfataze, ki sicer zavira PI3K-inducirano fosforilacijo inozitidnih lipidov (Vernieri idr., 2019).

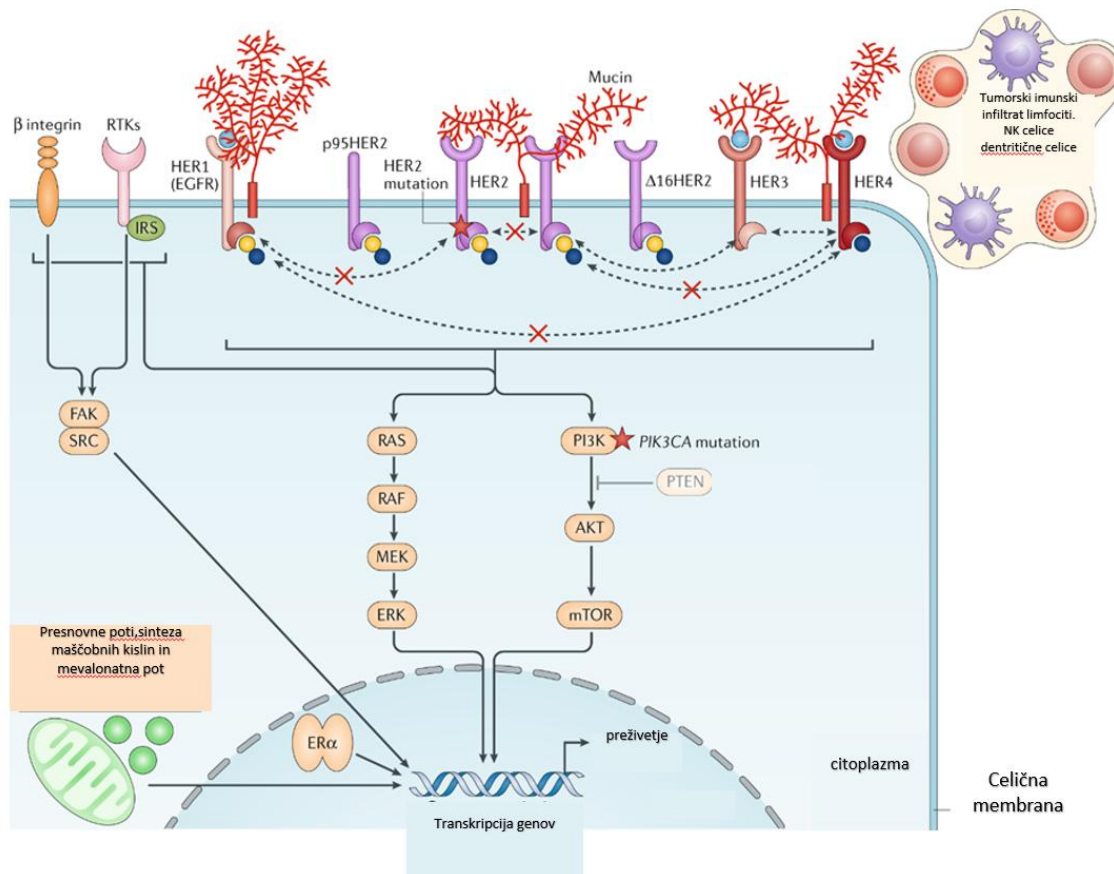
V skladu s temi ugotovitvami so farmakološki zaviralci PIK3CA (kopanlisib, alpelisib) ali mTOR (everolimus) pokazali sposobnost ponovne senzibilizacije rakavih celičnih linij na trastuzumab. Približno 30 % HER2-pozitivnih rakov dojke nosi somatske spremembe v genih, povezanih s potjo PI3K/AKT/mTOR, pri čemer so mutacije PIK3CA prisotne v 20–23 % primarnih tumorjev. Klinične raziskave, kot sta faza III študij BOLERO-1 in BOLERO-3, so preučevale dodajanje everolimusa k paklitakselu-trastuzumabu ali vinorelbinu-trastuzumabu pri HER2-pozitivnem metastatskem raku dojke. Čeprav everolimus ni izboljšal celotnega preživetja brez napredovanja bolezni (PFS) pri vseh bolnikih, so mutacije PIK3CA napovedovale boljši odziv na zdravljenje z everolimusom (Vernieri idr., 2019).

Poleg signalne poti PI3K/AKT/mTOR so pri odpornosti na trastuzumab lahko vpleteni tudi drugi intracelularni mehanizmi. Ena od možnosti je nenormalna aktivacija tirozin kinaze SRC, ki deluje kot signalni mediator za več receptorjev tirozin kinaz, vključno s HER2. Inhibicija SRC je v predkliničnih modelih obnovila občutljivost rakavih celic na trastuzumab. Drug pomemben dejavnik odpornosti je prekomerna ekspresija ciklina E, regulatorja celičnega cikla, ki aktivira ciklinsko odvisno kinazo 2 (CDK2) in pospešuje prehod celic iz faze G1 v S. Približno 20 % HER2-pozitivnih tumorjev izraža visoke ravni ciklina E, kar je povezano s slabšo prognozo. Zato zaviralci CDK2 predstavljajo potencialno strategijo za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja proti HER2 (Vernieri idr., 2019).

3.4.1. Navzkrižna signalizacija HER2

Trastuzumab pri terapevtskih koncentracijah zavira homodimerizacijo HER2 in s tem signalizacijo, ki jo sproži HER2. Kljub temu lahko različni receptorji tirozin kinaz (RTK) tvorijo heterodimere s HER2 in aktivirajo signalne poti na podoben način kot HER2 homodimeri. Prekomerna ekspresija epitelijskih rastnih faktorjev HER1 (EGFR) in HER3 spodbuja nastanek HER2-EGFR in HER2-HER3 heterodimerov, kar omogoča tumorskim celicam, da izkoristijo še nevezane molekule HER2 za ponovno aktivacijo signalizacije. Poleg tega lahko HER2 dimerizira tudi z receptorjem za insulinu podoben rastni faktor 1 in 2 (IGFR1/2), receptorjem c-MET za rastni faktor hepatocitov (HGF) in receptorjem EphA2, kar še dodatno poveča možnosti za obvod trastuzumaba (Vernieri idr., 2019).

Približno 50 % HER2-pozitivnih rakov dojk hkrati izraža estrogenski receptor (ER) in se klasificira kot HER2-pozitivni, ER-pozitivni (HER2+ ER+). Ti tumorji se klinično razlikujejo od HER2-pozitivnih, ER-negativnih (HER2+ ER-) tumorjev, ki slabše odgovarjajo na endokrino terapijo (ET) ali trastuzumab, kadar se uporablja samostojno. Ta slabši odziv je posledica dvosmernega delovanja med signalnimi potmi ER in HER2. Vendar pa je kombinacija endokrine terapije z anti-HER2 terapijo v kliničnih študijah izboljšala rezultate zdravljenja pri bolnicah s HER2+ ER+ rakom dojk, kar potrjuje potrebo po sočasnem zaviranju obeh signalnih poti za optimalen terapevtski učinek (Vernieri idr., 2019).



Slika 9: Mehanizmi odpornosti raka dojke na terapijo, usmerjeno proti HER.

Ena glavnih težav pri odpornosti raka dojke na terapijo, usmerjeno proti HER2, je dejstvo, da vse tumorske celice pri bolniku niso v celoti odvisne od signalizacije HER2 za preživetje (Slika 9). Ta pojav je povezan z intratumorsko heterogenostjo HER2, kjer v klinično HER2-pozitivnem (HER+) tumorju sočasno obstajajo tako HER2-ojačane kot tudi ne-ojačane tumorske celice. Medtem ko lahko HER2-ojačane in na HER2 odvisne celice učinkovito uničimo z biološkimi anti-HER2 terapijami, vključno s konjugati protiteles z zdravili, bodo ne-HER2-ojačane celice preživele, kar lahko vodi v odpornost na zdravljenje. Zato je pri tumorjih s heterogeno amplifikacijo HER2 potrebna nadaljnja kemoterapija v kombinaciji z anti-HER2 terapijo, dokler ne identificiramo alternativnih molekularnih dejavnikov, ki spodbujajo rast tumorja.

Pri tumorjih s homogeno amplifikacijo HER2 pa lahko do odpornosti pride zaradi sprememb v sami HER signalni poti ali aktivacije alternativnih signalnih poti, ki podpirajo preživetje in proliferacijo celic. Mutacije v genu HER2, kot je aktivirajoča mutacija L755S, lahko povzročijo odpornost na terapijo. Prav tako lahko mutacije v kinazi PI3K (gen PIK3CA) in nizke ravni PTEN omogočijo ponovni zagon preživetvene signalizacije HER. Poleg tega se lahko razvijejo alternativne oblike HER2, kot sta p95HER2 in Δ 16HER2 (izrezna različica), ki lahko povzročita odpornost zaradi izgube epitopov, na katere ciljajo terapevtska protitelesa, ali pa s spodbujanjem dimerizacije in s tem konstitutivne signalizacije.

Poleg neposrednih sprememb v HER2 signalizaciji lahko odpornost na terapijo povzroči tudi aktivacija različnih genomskih in adaptivnih mehanizmov "izogibanja" terapiji. Eden takšnih mehanizmov je kros-povezava s transkripcijskimi faktorji, kot je estrogenski receptor α (ER α), ki lahko omogoči preživetje tumorskih celic kljub inhibiciji HER2. Drug pomemben mehanizem odpornosti vključuje aktivacijo drugih receptorjev na celični površini, vključno z drugimi tirozinskimi kinazami (RTK) ali β -integrini, ki lahko prevzamejo signalizacijsko funkcijo HER2 in s tem omogočijo tumorju nadaljnjo rast. Odpornost lahko povzročijo tudi spremembe v sestavnih delih signalnih poti, kot sta proteina SRC in FAK, ki lahko reaktivirata proliferativno signalizacijo in omogočita nadaljnjo rast tumorskih celic kljub inhibiciji HER2.

Pomembno vlogo pri razvoju odpornosti igra tudi tumorsko mikrookolje in metabolizem celic. Povečana ekspresija membranskih mucinov lahko interagira s kompleksi HER2–HER3 ali prikrije zunajcelične domene HER2, kar zmanjša dostopnost receptorja za terapevtska protitelesa. Poleg tega lahko metabolne poti, kot sta sinteza maščobnih kislin in mevalonatna pot, podpirajo celično preživetje in odpornost proti terapiji s HER2.

Nazadnje ima pri odpornosti na HER2 terapijo pomembno vlogo tudi imunski sistem. Tumorski imunski infiltrati, vključno z limfociti, naravnimi celicami ubijalkami (NK) in dendritičnimi celicami, lahko modulirajo odziv na terapijo in prispevajo k razvoju odpornosti. Njihova interakcija s tumorskim mikrookoljem lahko vpliva na učinkovitost anti-HER2 zdravljenja in vodi v prilagoditev tumorskih celic na terapijo (Goutsouliak idr., 2020).

3.4.2. Aktivacija osi ciklin D1–CDK4/6 in odpornost na trastuzumab

Pri HER2-pozitivnem raku dojk ima os ciklin D1–ciklin-odvisna kinaza 4/6 (CDK4/6) pomembno vlogo pri celični proliferaciji. Prekomerna aktivacija te signalne poti lahko prispeva k odpornosti na trastuzumab (T) in druge anti-HER2 terapije (Vernieri idr., 2019).

Neoplastične celice sintetizirajo lipide iz acetyl-CoA, pri čemer ključno vlogo igra encim sintaza maščobnih kislin (FASN). FASN je pogosto prekomerno izražen pri HER2-pozitivnem raku dojk in je povezan s slabšo prognozo. Obstaja dvosmerna regulacija med HER2 in FASN – HER2 spodbuja ekspresijo in aktivacijo FASN, medtem ko FASN olajša lokalizacijo HER2 v lipidnih raftih plazemske membrane, kar okrepi signalizacijo HER2. Študije so pokazale, da prekomerna ekspresija FASN vodi do odpornosti na trastuzumab, medtem ko njegova farmakološka inhibicija v kombinaciji s trastuzumabom zavira rast rakavih celic. Trenutno poteka klinična faza II, ki preučuje učinkovitost selektivnega zaviralca FASN (TVB-2640) pri bolnikih z metastatskim HER2-pozitivnim rakom dojk, odpornim na trastuzumab (Vernieri idr., 2019).

3.4.3. Izboljšanje ADCC za premagovanje odpornosti

Trastuzumab deluje tudi prek protitelesno odvisne celične citotoksičnosti, ki jo posreduje vezava Fc dela trastuzumaba na receptorje imunskih celic. Aktivacija receptorja CD16A (Fc γ RIII) na mieloidnih celicah okrepi ADCC (*angl. Antibody-Dependent Cellular*

Cytotoxicity) in poveča eliminacijo tumorskih celic, medtem ko vezava na inhibitorni receptor CD32B (FcγRIIB) zavira ta proces (Vernieri idr., 2019).

Pri miših brez CD16A je ADCC močno zmanjšana, kar vodi v odpornost HER2-pozitivnih tumorjev na trastuzumab. V iskanju bolj učinkovitega terapijskega pristopa je bil razvit monoklonski protitelesni analog margetuksimab (MGAH22), ki ima modificiran Fc del. Ta protitelo se močneje veže na CD16A in šibkeje na CD32B, kar poveča ADCC proti trastuzumab-odpornim rakavim celicam. Klinična faza I je pokazala, da je margetuksimab učinkovit pri 100 % bolnic z metastatskim HER2-pozitivnim rakom dojk, odpornim na trastuzumab, ter inducira ADCC učinkoviteje kot trastuzumab (Vernieri idr., 2019).

Razvoj novih terapijskih strategij, kot so zaviralci FASN (*angl. Fatty Acid Synthase*) in izboljšane oblike monoklonskih protiteles, ponuja obetavne rešitve za premagovanje odpornosti na trastuzumab pri HER2-pozitivnem raku dojk (Vernieri idr., 2019).

3.4.4. MEHANIZMI ODPORNOSTI NA LAPATINIB PRI HER2+ RAKU DOJK

Lapatinib (L) je peroralni zaviralec tirozin kinaz (TKI), ki zavira HER2 in EGFR z vezavo na ATP-mesto kinazne domene, kar preprečuje njihovo fosforilacijo in aktivacijo. Uporablja se predvsem v kombinaciji s kapecitabinom pri zdravljenju metastatskega HER2-pozitivnega raka dojk pri bolnicah, ki so že prejele trastuzumab (T). Kljub začetnemu uspehu zdravljenja nekateri tumorji že od začetka ne odzivajo na L, pri drugih pa se odpornost razvije v povprečju po šestih mesecih (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.1. Mutacije v genu HER2

Določene mutacije v HER2 lahko zmanjšajo učinkovitost L, saj spremenijo konformacijo kinazne domene in zmanjšajo vezavno afiniteto za zdravilo. Med najbolj znanimi so mutacije L755S in T798I, ki povzročata visoko stopnjo odpornosti (Vernieri idr., 2019).

Pri teh mutacijah se lahko uporabijo alternativni zaviralci, kot sta EXEL-7647, ki se veže na HER2 v njegovi aktivni in neaktivni obliki, ter neratinib, ki je ireverzibilni pan-HER TKI. Neratinib je pokazal aktivnost proti metastatskemu HER2+ raku dojk z mutacijami v kinazni domeni HER2, neodvisno od ravni izražanja HER2 (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.2. Aktivacija alternativnih signalnih poti

Tumorske celice lahko razvijejo odpornost na L s preusmeritvijo signalizacije preko vzporednih receptorjev tirozin kinaz (RTK) in njihovih ligandov (Vernieri idr., 2019).

Povečana prisotnost heregulina (HRG) in neuregulina-1 (NRG1), ligandov za HER3, lahko aktivira signalno pot EGFR-HER3-PI3K-PDK1, ki omogoči preživetje celic kljub inhibiciji HER2/EGFR. Klinično je bilo opaženo, da visoke ravni HRG pri bolnicah s HER2+ rakom dojk korelirajo s slabšim odzivom na terapijo in slabšo prognozo (Vernieri idr., 2019).

Drug pomemben mehanizem je aktivacija receptorja MET, ki ob vezavi hepatocitnega rastnega faktorja (HGF) ponovno aktivira PI3K/AKT/mTOR signalno pot, kljub prisotnosti L (Vernieri idr., 2019). Poleg tega lahko L povzroči povečano izražanje HER3, kar vodi do njegovega dimeriziranja s HER2 in posledično ponovne aktivacije preživetvenih signalnih poti (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.3. Estrogenski receptor (ER) in hormonska signalizacija

Zdravljenje z L lahko sproži povečano izražanje estrogenskega receptorja (ER), progesteronskega receptorja (PR) in Bcl-2, kar vodi v hormonsko odvisno rast tumorja in odpornost na L. Klinične raziskave so pokazale, da pri nekaterih bolnicah, ki so bile sprva ER-negativne, tumorji po zdravljenju postanejo ER-pozitivni (Vernieri idr., 2019).

V predkliničnih modelih je zaviranje ER z fulvestrantom obnovilo občutljivost tumorjev na L. To kaže na možnost kombiniranega zdravljenja s hormonsko terapijo pri bolnicah, pri katerih je HER2+ rak dojk razvil odpornost na L zaradi povečane izraženosti ER (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.4. Aktivacija ciklina D1 in CDK 4/6

Podobno kot pri trastuzumabu je odpornost na L povezana tudi s povečano aktivacijo osi Ciklin D1-CDK 4/6, ki je ključna za celični cikel in preživetje celic (Vernieri idr., 2019).

Predklinične študije so pokazale, da zaviralci CDK 4/6, kot je abemaciclib, lahko obnovijo občutljivost celic na zdravljenje in premagajo odpornost. Ti podatki nakazujejo, da bi bila kombinacija anti-HER2 terapij z zaviralci CDK 4/6 lahko učinkovita strategija za premaganje odpornosti (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.5. Spremembe v signalni poti PI3K/AKT/mTOR

Nenormalna aktivacija PI3K/AKT/mTOR signalne poti je eden najpogostejših mehanizmov odpornosti na L. Mutacije v PIK3CA (npr. E545K, H1047R), izguba PTEN ali hiperaktivacija AKT omogočajo tumorjem, da kljub zaviranju HER2 nadaljujejo z neovirano rastjo (Vernieri idr., 2019).

Poleg tega lahko tudi neodvisna aktivacija mTOR, preko povečane aktivacije p70S6K1, povzroči odpornost na L. Klinični podatki kažejo, da bi zaviralci PI3K ali mTOR lahko povrnili občutljivost tumorjev na zdravljenje (Vernieri idr., 2019).

Drugi pomemben dejavnik je prekomerna ekspresija receptorja AXL, ki posreduje signalizacijo PI3K in omogoča tumorjem obvod HER2-inhibicije. AXL je povezan s slabšo prognozo pri HER2+ ER+ raku dojk (Vernieri idr., 2019).

3.4.4.6. Aktivacija drugih onkogenih poti

Poleg klasičnih signalnih poti lahko odpornost na L povzroči tudi aktivacija drugih onkogenov in tumorskih supresorskih genov (Vernieri idr., 2019).

Povečana aktivnost SRC kinaze je povezana z odpornostjo na L, saj se SRC signalno povezuje z EGFR. Zaviranje SRC (npr. s saracatinibom) ali EGFR (npr. s cetuksimabom) je v predkliničnih študijah ponovno vzpostavilo občutljivost tumorjev na L (Vernieri idr., 2019).

Študije so prav tako pokazale, da je prekomerna ekspresija NIK- in IKK2-vezavnega proteina (NIBP) povezana z odpornostjo na HER2 terapije. Ciljanje na NF- κ B signalizacijo, ki je povezana z NIBP, bi lahko predstavljalo novo terapevtsko možnost v kombinaciji z L (Vernieri idr., 2019).

Odpornost na lapatinib se razvije preko več različnih mehanizmov, vključno z mutacijami HER2, aktivacijo vzporednih signalnih poti, hormonsko signalizacijo, aktivacijo CDK 4/6, spremembami v PI3K/AKT/mTOR signalni poti ter aktivacijo drugih onkogenov (Vernieri idr., 2019).

Razumevanje teh mehanizmov odpornosti omogoča razvoj kombiniranih terapevtskih pristopov, kot so zaviralci PI3K, CDK 4/6, ER in SRC, ki lahko izboljšajo dolgoročno učinkovitost zdravljenja metastatskega HER2+ raka dojke. V prihodnje bodo klinične raziskave ključne za razvoj optimiziranih strategij, ki bodo premagale odpornost in izboljšale prognozo bolnic (Vernieri idr., 2019).

3.5. POMEN PERSONALIZIRANE MEDICINE IN FARMAKOGENOMIKE PRI OPTIMIZACIJ TERAPIJ

Napredek v zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojke je bistveno spremenil naravni potek te bolezni. Številne klinične študije so bile osredotočene na izboljšanje učinkovitosti kemoterapije in trastuzumaba z dodatnimi HER2-ciljanimi zdravili, da bi dosegli še boljše izide za bolnike. Kljub temu pa večina bolnic od teh dodatnih terapij pridobi le omejene koristi, medtem ko se povečuje tveganje za dodatne zdravstvene in finančne obremenitve (Goutsouliak idr., 2020).

Z naraščajočim razumevanjem genetskih značilnosti ter molekularne in mutacijske evolucije HER2+ raka dojke se področje zdravljenja vse bolj premika v smeri personalizirane medicine. Ključnega pomena je razločiti bolnice, ki bodo dejansko imele koristi od dodatnih terapij, od tistih, ki lahko dosežejo enake rezultate z manj agresivnim zdravljenjem. Tako bi se izognili enotnemu pristopu k zdravljenju te izjemno heterogene bolezni. Pomembno pa je, da morebitna opustitev kemoterapije ne poslabša ugodnih izidov, doseženih s trenutno odobrenimi režimi zdravljenja, niti ne omeji dostopa do novih, učinkovitejših HER2-ciljanih terapij, ki jih lahko prinese prihodnost (Goutsouliak idr., 2020).

Dosedanji podatki kažejo, da časovni raspored sistemske terapije glede na kirurški poseg ne vpliva bistveno na končni izid zdravljenja. Trenutne smernice Nacionalne celovite mreže za zdravljenje raka (NCCN) in St. Gallenske mednarodne ekspertne skupine priporočajo uporabo neoadjuvantne terapije za bolnice s klinično stadijsko II–III HER2+ rakom dojke. Odziv na neoadjuvantno terapijo prinaša dragocene informacije o biologiji tumorja, omogoča natančnejšo oceno tveganja ponovitve bolezni in pomaga prilagoditi adjuvantno terapijo. Poleg

tega lahko neoadjuvantno zdravljenje zmanjša obseg aksilarne kirurgije ter posledične pooperativne zaplete (Goutsouliak idr., 2020).

Za razliko od bolnic z ER-pozitivnimi tumorji, pri katerih so na voljo multigenški testi za oceno tveganja ponovitve, je pri bolnicah s HER2-pozitivnim rakom dojke tveganje ponovitve večinoma določeno s klinično-patološkimi značilnostmi, kot sta velikost tumorja in prisotnost prizadetih bezgavk. Za natančnejšo stratifikacijo bolnic in optimizacijo terapij bi bilo potrebno upoštevati tudi dodatne dejavnike, kot so stopnja HER2-odvisnosti tumorja, genomska in molekularna sestava, intratumorska heterogenost in imunsko okolje. Ti dejavniki lahko pomagajo določiti, ali bo bolnica imela korist od okrepljene terapije, standardne HER2-ciljane terapije v kombinaciji s kemoterapijo ali le od ciljane terapije brez kemoterapije. Še vedno pa ostaja odprto vprašanje, ali bi lahko kombinacija molekularnih označevalcev in konvencionalnih klinično-patoloških značilnosti omogočila še bolj natančno stratifikacijo bolnic, kar bo potrebno potrditi v prihodnjih kliničnih študijah (Goutsouliak idr., 2020).

Prav tako pridobivajo na pomenu nove tehnologije, kot sta analiza krožečih tumorskih celic in prostocelične tumorske DNA, ki bi lahko v prihodnosti igrale ključno vlogo pri spremljanju terapije in prognozi po neoadjuvantnem zdravljenju in operaciji (Goutsouliak idr., 2020).

Uporaba terapij brez kemoterapije v rutinski klinični praksi zahteva validirane napovedne biomarkerje, zato ta pristop ostaja predvsem raziskovalen. Kljub temu pa so bili doseženi pomembni premiki k njegovi klinični implementaciji, kar nakazuje obetavno prihodnost te strategije. Raziskave biomarkerjev so že prinesle dragocene vpoglede v molekularne značilnosti, prognozo in terapevtsko občutljivost podtipov HER2+ raka dojke. Nadaljnja optimizacija in validacija napovednih in prognostičnih biomarkerjev bo omogočila natančnejšo identifikacijo bolnic, tako ER– kot ER+, ki bodo imele korist le od ciljane terapije. Končni cilj je zmanjšanje ali celo popolna opustitev kemoterapije pri večjem deležu bolnic, kar bi jim prihranilo številne neželene in dolgotrajne stranske učinke (Goutsouliak idr., 2020).

V prihodnosti bodo ključne prospektivne klinične študije, ki bodo preizkusile biomarkerje in personalizirane pristope k zdravljenju HER2+ raka dojke. Tako bo mogoče uveljaviti natančnejšo, stratificirano terapijo, ki bo optimizirala izide zdravljenja ob hkratnem zmanjšanju nepotrebnih toksičnih učinkov terapije (Goutsouliak idr., 2020).

4. FARMAKOGENOMSKI VPOGLEDI V PERSONALIZIRANO MEDICINO ZA HER2-POZITIVNI RAK

4.1. PREGLED FARMAKOGENOMSKIH MARKERJEV ZA HER2-POZITIVNI RAK DOJK

Pri raku dojk velik delež tumorjev izraža estrogenski receptor (ER), ki služi kot pomemben prognostični biomarker. Njegova prisotnost je povezana z ugodnejšo prognozo bolezni, hkrati pa deluje kot napovedni biomarker za izbiro hormonske terapije, ki zavira signalizacijo estrogena. Farmakološka sredstva, kot so selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM), vključno s tamoksifenom in raloksifenom, ter zaviralci aromataze (AI), kot so eksemestan, letrozol in anastrozol, so ključni pri zdravljenju te oblike raka (Sacco & Grech, 2015).

Farmakokinetične lastnosti teh zdravil se razlikujejo glede na presnovo, distribucijo in poti izločanja, pri čemer igrajo pomembno vlogo genetske variacije metabolizatorjev in transportnih beljakovin. Genetske razlike lahko služijo kot dragoceni napovedni biomarkerji, ki omogočajo prilagoditev terapije posameznemu bolniku z namenom povečanja terapevtskega učinka in zmanjšanja tveganja za neželene učinke (Sacco & Grech, 2015).

4.2. GENETSKE VARIACIJE, KI VPLIVAJO NA UČINKOVITOST IN TOKSIČNOST TERAPIJ ZA HER2-POZITIVNI RAK

HER2-pozitivni rak dojk se pogosto zdravi s ciljanimi zdravili, kot sta trastuzumab in pertuzumab, ki delujeta na receptor HER2 in zavirata rast rakavih celic. Genetske variacije lahko pomembno vplivajo na njihovo učinkovitost in varnost. Na primer, razlike v genu FCGR3A vplivajo na učinkovitost imunskega sistema pri odstranjevanju rakavih celic po zdravljenju s trastuzumabom (Al-Taie idr., 2021).

Poleg tega lahko variacije v genih DPYD in UGT1A1 povečajo tveganje za resne stranske učinke, vključno s srčnimi poškodbami in prebavnimi motnjami. Mutacije v PIK3CA in PTEN lahko zmanjšajo odzivnost rakavih celic na zaviralce HER2, kar vodi do odpornosti na terapijo. Personalizirana medicina postaja ključna pri obvladovanju teh genetskih razlik, saj omogoča prilagajanje terapije posameznim pacientom in zmanjšanje tveganja za neučinkovito zdravljenje ter resne stranske učinke (Al-Taie idr., 2021).

4.3. POVEZOVANJE REPOZICIONIRANIH ZDRAVIL Z GENETSKIMI PROFILI HER2-POZITIVNIH PACIENTOV

Repozicioniranje zdravil, tj. ponovna uporaba že odobrenih zdravil za nove indikacije, predstavlja obetavno strategijo za izboljšanje zdravljenja HER2-pozitivnega raka. Prilagoditev zdravljenja na podlagi genetskih profilov omogoča bolj ciljno usmerjene terapije, ki temeljijo na specifičnih mutacijah in genetskih variacijah bolnika (Al-Taie idr., 2021).

Na primer, inhibitorji signalne poti PI3K/AKT/mTOR lahko pomagajo premagati odpornost na standardno zdravljenje pri bolnikih z mutacijami v *PIK3CA* ali *PTEN*. Prav tako lahko imunsko modulacijska zdravila povečajo učinkovitost terapije pri bolnikih z variacijami v *FCGR3A*, ki vplivajo na imunski odziv na trastuzumab. Takšen pristop odpira nove možnosti za učinkovitejšo in bolj prilagojene strategije zdravljenja HER2-pozitivnega raka (Al-Taie idr., 2021).

4.4. STRATIFIKACIJA PACIENTOV ZA PERSONALIZIRANE NAČRTE ZDRAVLJENJA

Da bi izboljšali učinkovitost terapij, se bolnike stratificira v podskupine na podlagi molekularnih in genetskih značilnosti. Ključni dejavniki, ki vplivajo na stratifikacijo, vključujejo:

- **Genetske mutacije** – prisotnost mutacij v genih, kot so *PIK3CA*, *PTEN* in *TP53*, lahko vpliva na izbiro dodatnih tarčnih terapij.
- **Imunski odziv** – variacije v genu *FCGR3A* določajo, kako učinkovito bo trastuzumab aktiviral imunski sistem proti rakavim celicam.
- **Mikrookolje tumorja** – izražanje PD-L1 in drugih imunskih markerjev lahko nakaže koristnost kombinacije HER2-ciljanih terapij z imunoterapijo.
- **Predhodna odpornost na zdravljenje** – bolniki, pri katerih je standardna terapija neučinkovita, se lahko zdravijo z repozicioniranimi ali eksperimentalnimi zdravili.

Takšen pristop omogoča bolj individualizirane načrte zdravljenja, ki povečajo verjetnost uspešnega zdravljenja in zmanjšajo tveganje za neučinkovite ali prekomerno toksične terapije (Al-Taie idr., 2021).

4.5. OVIRE IN PRILOŽNOSTI ZA IMPLEMENTACIJO FARMAKOGENOMIKE V ZDRAVLJENJU HER2-POZITIVNEGA RAKA

Farmakogenomika predstavlja pomemben napredek v personalizirani medicini, saj omogoča prepoznavanje pacientov, ki bodo najverjetneje dobro odzvali na terapijo s trastuzumabom, in tistih, pri katerih je njegova učinkovitost manjša. Genetska analiza omogoča bolj precizno določitev primernosti posameznega bolnika za določeno terapijo, s čimer se poveča učinkovitost zdravljenja in zmanjša tveganje za resne stranske učinke (Al-Taie idr., 2021).

Kljub obetavnim prednostim pa vpeljava farmakogenomike v klinično prakso prinaša več izzivov:

- **Pomanjkanje obsežne klinične validacije** – potrebne so dodatne raziskave za potrditev dolgoročnih koristi in varnosti genetskih testiranj.
- **Visoki stroški testiranj** – farmakogenomske analize so lahko drage, kar omejuje njihovo dostopnost, zlasti v manj razvitih zdravstvenih sistemih.
- **Etična vprašanja** – uporaba genetskih podatkov odpira dileme glede zasebnosti in morebitne diskriminacije.
- **Meddisciplinarno sodelovanje** – za optimalno implementacijo farmakogenomike je nujno sodelovanje med genetiki, onkologi in farmacevti.

S širšo implementacijo farmakogenomskih testiranj bi bilo možno izboljšati personalizirano zdravljenje HER2-pozitivnega raka, povečati učinkovitost terapij, zmanjšati pojavnost stranskih učinkov ter optimizirati porabo zdravstvenih virov (Al-Taie idr., 2021).

5. KLINIČNA ANOTACIJA IN FARMAKOGENOMSKA IDENTIFIKACIJA TERAPEVTSKIH TARČ PRI HER 2 POZITIVNEM RAKU

Identifikacija terapevtskih tarč pri zdravljenju HER2-pozitivnega raka temelji na klinični anotaciji, ki omogoča sistematično organizacijo in interpretacijo podatkov. S kombinacijo umetne inteligence in strokovnjakov s področja medicine se nestrukturirani podatki preoblikujejo v strukturirane zapise, kar omogoča lažji pregled, analizo in interpretacijo terapevtskih možnosti. Klinična anotacija iz obstoječih podatkovnih baz izpisuje urejene informacije o mehanizmu delovanja določene zdravilne učinkovine, njenih nezaželenih učinkih ter specifičnih opombah, relevantnih za onkologijo. Eden od primerov uporabe klinične anotacije v onkologiji je metoda prepoznavanja poimenovanih entitet (Named Entity Recognition – NER), ki omogoča identifikacijo in kategorizacijo ključnih medicinskih informacij iz besedilnih virov (shaip, 2024).

Podrobnejša klinična anotacija se lahko izvede z uporabo platforme PharmGKB, ki ponuja podatke o interakcijah med specifičnimi genskimi variacijami in zdravili. Ta baza podatkov vsebuje informacije o parih varianta-zdravilo, vključno s smernicami za predpisovanje, ki so specifične za posamezne genetske variacije. Poleg tega vsebuje informacije o regulativnih oznakah, ki jih je odobrila FDA, če so na voljo. Strokovnjaki klinične anotacije ročno pregledujejo podatke in ustvarjajo povzetke o genotipu in njegovem fenotipskem vplivu. To omogoča razumevanje, kako različni genotipi vplivajo na odziv na določeno zdravilo, kje obstajajo povečana tveganja za nezaželene učinke ter katera kombinacija genetskih označevalcev in terapij lahko izboljša izid zdravljenja (Whirl-Carrillo idr., 2021).

Pri zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojk sta bili identificirani dve pomembni klinični anotaciji za genetsko varianto rs1136201 gena ERBB2. Ta varianta vpliva na odziv bolnikov na terapijo z trastuzumabom, pri čemer se lahko pojavi povišano tveganje za toksičnost. Fenotipsko se to lahko izraža kot povečano tveganje za neoplazmo dojk ali toksične učinke pri sočasnem zdravljenju z drugimi zdravili. Poleg tega imajo bolniki s to varianto, ki se zdravijo s karboplatinom, docetakselom ali trastuzumabom, spremenjen odziv na terapijo, kar vpliva na celotno učinkovitost zdravljenja. Natančnejše poznavanje teh farmakogenetskih interakcij omogoča personalizirano medicino, ki izboljša terapevtske izide in zmanjša tveganje za nezaželene učinke (Whirl-Carrillo idr., 2021).

5.1. KLINIČNI POMEN HER2-STATUSA PRI STRATIFIKACIJI PACIENTOV

Določanje HER2-statusa pri bolnicah z rakom dojke je ključno za izbiro najučinkovitejšega terapevtskega pristopa. HER2 (epidermalni rastni faktor receptor 2) je biomarker, ki omogoča stratifikacijo pacientov v različne prognostične in terapevtske skupine, s čimer se izboljšuje personalizacija zdravljenja in optimizira uporaba ciljnih terapij (Wang idr., 2023).

5.1.1. Metode za določanje HER2-statusa

HER2-status se ocenjuje s kombinacijo histoloških in molekularnih metod. Tkivo tumorja se najprej obarva s hematoksilinom in eozinom (H+E), da se vizualno oceni morfolologija. Nadaljnja analiza vključuje imunohistokemijo (IHC), ki omogoča določitev stopnje izražanja HER2-proteinov, in fluorescentno in situ hibridizacijo (FISH), ki preverja prisotnost amplifikacije gena HER2. Pri dvoumnih IHC rezultatih (stopnja 2+) je FISH ključna za natančno določitev HER2-statusa (Wang idr., 2023).

5.1.2. Stratifikacija pacientov glede na HER2-status

Na podlagi smernic Ameriškega združenja za klinično onkologijo in Združenja ameriških patologov (ASCO/CAP) se HER2-status deli na štiri kategorije:

- **HER2 0 in 1+:** Tumorji s temi stopnjami izražanja se štejejo za HER2-negativne (HER2-). To pomeni, da receptor ni izražen ali je izražen v zelo nizkih količinah, zato

ti bolniki niso kandidati za anti-HER2 ciljno zdravljenje, kot sta trastuzumab ali pertuzumab. Do nedavnega se je domnevalo, da pri teh bolnikih usmerjene terapije ne bi bile učinkovite, vendar nove raziskave kažejo, da lahko določene podskupine HER2 1+ tumorjev vseeno koristijo od določenih oblik terapije.

- **HER2 2+:** Ta stopnja izražanja se šteje za mejno (equivocal), saj IHC analiza ne daje jasnega odgovora glede HER2-pozitivnosti. Pri teh tumorjih je potrebno dodatno testiranje z metodo FISH za določitev prisotnosti amplifikacije gena HER2. Če je amplifikacija prisotna, se tumor klasificira kot HER2-pozitiven, sicer ostane v HER2-negativni skupini. Natančna določitev te skupine je klinično izjemno pomembna, saj omogoča selekcijo pacientov, ki bi imeli korist od terapij, usmerjenih proti HER2.
- **HER2 3+:** Bolniki s tumorji, ki kažejo močno izražanje HER2 (HER2-pozitivni, HER2+), predstavljajo ključno skupino za ciljno zdravljenje. HER2-pozitivni tumorji so agresivnejši, vendar so močno občutljivi na terapijo z monoklonskimi protitelesi, kot sta trastuzumab in pertuzumab, ki specifično ciljata na HER2. Dodatno se lahko uporabijo tudi druga tarčna zdravila, vključno z zdravili na osnovi konjugiranih protiteles (ADC), kot je trastuzumab derukstekan.

5.1.3. Klinični pomen HER2-statusa pri zdravljenju

HER2-status igra osrednjo vlogo pri odločanju o zdravljenju in je eden izmed glavnih dejavnikov pri izbiri terapevtskega protokola. HER2-pozitivni tumorji se pogosto zdravijo s kombinacijo kemoterapije in tarčnih terapij, kot sta trastuzumab in pertuzumab, ki znatno izboljšata preživetje pacientov. V primeru HER2-negativnih tumorjev se HER2 usmerjena terapija ne uporablja, razen pri določenih primerih HER2-low (1+), kjer se preučujejo novi terapevtski pristopi.

Določitev HER2-statusa je zato bistven korak pri stratifikaciji pacientov, saj omogoča personalizirano zdravljenje, ki izboljšuje klinične izide, zmanjšuje tveganje za prekomerno ali neustrezno terapijo in pripomore k boljšemu razumevanju biološke heterogenosti raka dojke (Wang idr., 2023).

6. CILJI DELA IN HIPOTEZE

6.1. CILJI

6.1.1. Bioinformacijska analiza

- Izvesti molekulsko sidranje in analizirati afiniteto izbranih ligandov za HER2 receptor z uporabo programov AutoDock Vina in CB-Dock 2.
- Identificirati potencialne kandidate za repozicioniranje na podlagi vezavne afinitete v primerjavi z že uveljavljenimi zdravili, kot sta lapatinib in gefitinib.

- Oceniti strukturo ligandov in razloge za neuspešno vezavo določenih spojin v vezavni žep HER2 receptorja.

6.1.2. Ekonomska analiza

- Oceniti stroškovno učinkovitost repozicioniranja zdravil v primerjavi s konvencionalnim razvojem novih zdravil.
- Analizirati regulatorne zahteve in vpliv na časovni potek razvoja ter tržni potencial repozicioniranih zdravil.
- Oceniti vpliv intelektualne lastnine na ekonomsko izvedljivost repozicioniranja zdravil.

6.2. HIPOTEZE

6.2.1. Bioinformacijska analiza

1. Med izbranimi ligandi obstajajo spojine, ki bodo imele primerljivo ali boljšo vezavno afiniteto kot lapatinib (-11) in gefitinib (-8), zaradi česar bodo primerne za nadaljnjo preučitev v kontekstu repozicioniranja.
2. Ligandi, ki se ne umestijo v vezavni žep HER2 receptorja, so bodisi preveliki ali ne tvorijo zadostnega števila interakcij z aminokislinami v žepu, kar omejuje njihov terapevtski potencial.

6.2.2. Ekonomska analiza

3. Repozicioniranje zdravil je stroškovno učinkovitejše kot konvencionalni razvoj novih zdravil, saj omogoča preskok zgodnjih kliničnih faz in skrajšanje razvojnega cikla za več let.
4. Tržni potencial repozicioniranih zdravil bo nižji od novo razvitih zdravil, saj že obstaja konkurenca na trgu, hkrati pa bodo regulatorne zahteve in intelektualna lastnina vplivale na njihovo dolgoročno profitabilnost.

7. BIOINFORMACIJSKA ANALIZA KANDIDATOV ZA REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL

7.1. METODOLOGIJA ZA IDENTIFIKACIJO IN VALIDACIJO INTERAKCIJ MED ZDRAVILI IN HER2-TARČAMI

Bioinformacijska analiza za ponovno uporabo zdravil pri raku dojke uporablja računalniške metode za prepoznavanje novih terapevtskih možnosti za obstoječa zdravila. Ta stroškovno

učinkovita in hitra alternativa tradicionalnemu razvoju zdravil združuje več virov podatkov in računalniških tehnik za napovedovanje možnih povezav med zdravili in boleznimi, zlasti pri kompleksnih boleznih, kot je rak dojke.

Eden od pristopov se zanaša na računalniške metode, ki temeljijo na mrežah, pri čemer se konstruirajo mreže interakcij protein-protein (PPI) in vključujejo podatke o miRNA za oceno razmerij med zdravili in boleznimi. Ti modeli so obetavni pri odkrivanju znanih in novih povezav med zdravili. Na primer, metoda miTS, ki izkorišča podatke o miRNA in specifičnost tkiv, je pokazala visoko natančnost pri napovedovanju možnih zdravljenj raka dojke (Ye idr., 2023; L. Yu idr., 2018). Takšni mrežno osnovani pristopi omogočajo sistemsko razumevanje mehanizmov bolezni in terapevtskih posegov.

Druga strategija je integracija podatkov in računalniško modeliranje, kjer se kombinirajo različni biološki nabori podatkov, vključno s profili ekspresije genov in transkripcijskimi podpisi, ki jih inducirajo zdravila, za identifikacijo potencialnih kandidatov za zdravljenje. Metode, kot sta matrična trifaktorizacija in algoritmi na osnovi grafov, pomagajo modelirati terapevtske učinke in izbrati obetavne cilje zdravil, zlasti pri agresivnih podtipih, kot je trojno negativni rak dojke (TNBC) (Al-Taie idr., 2021; H. Lee idr., 2016; Vitali idr., 2016). Ti integrativni pristopi izboljšujejo odkrivanje zdravil z izkoriščanjem multi-omskih podatkov in računalniškega sklepanja.

Strojno učenje in računalniška orodja so prav tako pospešila prizadevanja za ponovno uporabo zdravil z uporabo naprednih informacijskih tehnik, kot sta ujemanje transkriptomskih podpisov in skeniranje na osnovi genskih povezav. Modeli strojnega učenja, vključno z nevronske filtriranje, analizirajo lokalizirane mreže zdravilo-bolezen za napovedovanje novih povezav, kar izboljšuje učinkovitost in natančnost prizadevanj za ponovno uporabo zdravil (Alam idr., 2022; Meng idr., 2022; Zhou idr., 2023). Ti pristopi razkrivajo prej neznanе terapevtske potenciale in znatno širijo obseg raziskav ponovne uporabe zdravil.

Raziskave na področju ponovne uporabe zdravil so identificirale več obetavnih kandidatov za zdravljenje raka dojke. Na primer, zdravilo regorafenib se je izkazal kot možen terapevtski agent zaradi močne korelacije s ključnimi potmi (L. Yu idr., 2018). Prav tako so bila prepoznana zdravila, kot je fulvestrant, ki lahko prepreči odpornost na zdravila v različnih podtipih raka dojke (K. Yu idr., 2023). Poleg tega se ponovno uporabljena zdravila pogosto usmerjajo v specifične mehanizme delovanja, kot je inhibicija signalne poti mTOR z zdravilom masitinib, ki je bila potrjena kot učinkovita terapevtska strategija (Alam idr., 2022). Nedavne ugotovitve kažejo tudi, da imata mehanizma ferroptaza in antioksidativni učinki pomembno vlogo pri odzivih na zdravljenje v različnih skupinah bolnikov (Al-Taie idr., 2021).

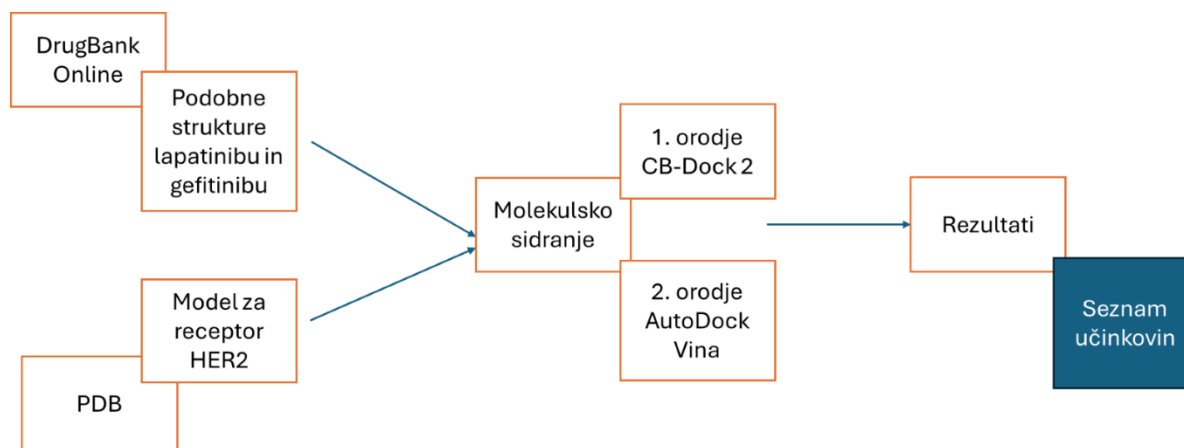
Pomemben poudarek bioinformacijsko podprte ponovne uporabe zdravil je razvoj terapij, specifičnih za posamezne podtipe. Ker TNBC nima ciljnih molekularnih terapij, stratifikacija pacientov glede na njihove genske profile omogoča personalizirane pristope k zdravljenju in izboljšanje rezultatov zdravljenja (Al-Taie idr., 2021; Zhao idr., 2013). Ta pristop precizne

medicine prilagaja terapevtske posege značilnostim tumorja posameznega bolnika, kar povečuje učinkovitost zdravljenja in zmanjšuje neželene učinke.

Kljub obetavnim odkritjem ostajajo izzivi pri prenosu računalniških napovedi v klinično prakso. Eksperimentalna validacija s pomočjo in vitro in in vivo študij je ključna za potrditev učinkovitosti ponovno uporabljenih zdravil, preden se ta lahko prenesejo v klinična preskušanja, kjer se ocenjuje varnost in učinkovitost pri bolnikih (Meng idr., 2022; Zhao idr., 2013). Poleg tega ostaja izboljšanje napovednih modelov ključno področje prihodnjih raziskav. Povečanje natančnosti in zanesljivosti računalniških metod z vključevanjem raznolikih vrst podatkov, kot so proteomski in metabolomski podatki, bi lahko dodatno izboljšalo strategije ponovne uporabe zdravil (Alam idr., 2022; Zhou idr., 2023).

7.2. MATERIALI IN METODEDE

Iskanje novih kandidatov za repozicioniranje pri zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojke smo izvedli z bioinformatično analizo (**Slika 10**), pri čemer smo se oprli na metodo molekulskega sidranja, ki je bila že uspešno uporabljena za podobne namene (Balbuena-Rebolledo idr., 2021). Zdravili lapatinib in gefitinib, ki sta liganda na receptor HER2, smo uporabili kot izhodišče za iskanje strukturno podobnih spojin. Z metodo molekulskega sidranja smo ocenili njihovo sposobnost vezave na rigidno strukturo receptorja HER2.



Slika 10: Shematski prikaz poteka dela.

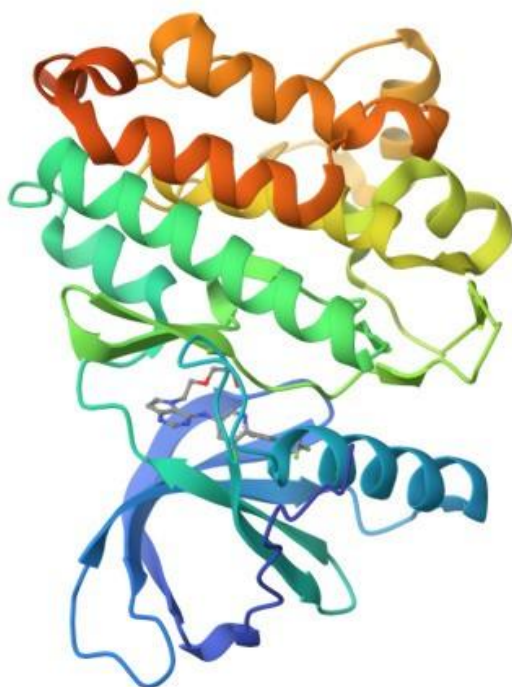
7.2.1. Identifikacija strukturno podobnih spojin lapatinibu in gefitinibu

V zbirki DrugBank Online (Knox idr., 2024) smo poiskali zapisa kemijskih struktur lapatiniba in gefitiniba v obliki SMILES (angl. Simplified Molecular Input Line Entry System). V iskalnik zbirke DrugBank (Knox idr., 2024) smo vnesli zapis molekule, za mejo strukturne podobnosti iskanih molekul smo določili 0,5 in iskanje omejili na odobrene učinkovine. Vsako od identificiranih učinkovin, podobnih lapatinibu in gefitinibu, smo nato vnesli v zbirko

PubChem (Kim idr., 2025) in poiskali njihove 3D strukture, zapisane v datotekah s končnico "sdf". Za nekatere od molekul 3D strukture niso bile dostopne, saj jih PubChem ne generira, kadar so molekule prevelike ali preveč gibljive.

7.2.2. Kristalografska struktura receptorja HER2

Kristalografsko strukturo receptorja HER2 smo poiskali v zbirki PDB (Protein Data Bank) (Berman, 2000). Izmed 112 možnih struktur receptorja HER2 smo izbrali model v neaktivni obliki, z ločljivostjo 2.80 Å, z oznako 3PP0 (Aertgeerts idr., 2011) (Slika 11) in ga shranili v datoteki s končnico "pdb".



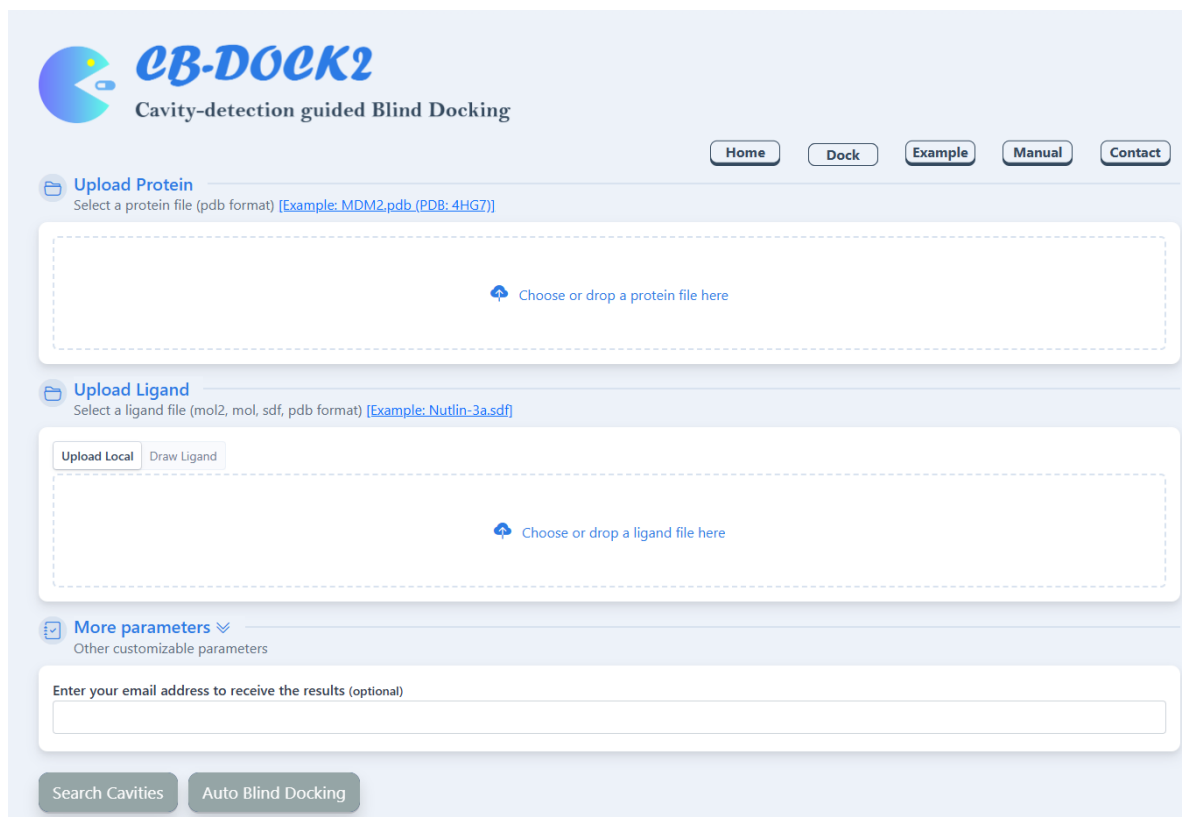
Slika 11: Kristalografska struktura receptorja HER2 v neaktivni obliki (3PP0) (Berman, 2000).

7.2.3. Molekulsko sidranje

Molekulsko sidranje (angl. molecular docking) smo izvedli z dvema programoma, CB-Dock 2 (Liu idr., 2022) in Autodock Vina (Eberhardt idr., 2021) ter primerjali rezultate obeh analiz. Za molekulsko sidranje smo vhodne podatke, ki predstavljajo model receptorja in liganda, ustrezno pripravili.

CB-Dock 2 je spletno orodje (Slika 12), ki kot vhodne podatke prejme datoteke s končnicami "pdb" za receptor in "sdf" za ligand. Model receptorja smo pred uvozom v program za molekulsko sidranje pripravili s pomočjo programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2025. Receptorju smo odstranili odvečne verige (dve verigi B in eno od dveh verig A). Verigi A, ki

je ostala v modelu, smo odstranili vse molekule vode in ligande. Spremenjeno datoteko “pdb” za receptor in datoteko “sdf” za ligand posebej smo uvozili v aplikacijo CB-Dock2 in pognali molekulska sidranja. Rezultate sidranja za vsak ligand smo pregledali in izmed ponujenih možnosti sidranja izbrali tisto, ki predstavlja vezavo liganda v žep, tako kot se vežeta učinkovini lapatinib oziroma gefitinib.



Slika 12: Uporabniški vmesnik spletnega programa CB-Dock2 (Liu idr., 2022).

Autodock Vina je odprtokodni program, ki ga naložimo na računalnik. Program podpira vhodne podatke, ki predstavljajo receptor in ligand v obliki “pdbqt”. Ligande smo pretvorili v format “pdbqt” s programom Open Babel GUI 3.0.1. (O’Boyle idr., 2011; Eberhardt idr., 2021).

Model receptorja HER2 smo modificirali s pomočjo programa AutoDock Tools (Morris idr., 2009). V program smo vstavili “pdb” datoteko receptorja, pobrisali odvečne verige, vodo in heteroatome, ki niso del receptorja. S programom smo avtomatično dodali manjkajoče atome v strukturi, spremenili vodike na histidinu, dodali polarne vodike in dodali Kollmanov naboj ter preverili, ali so se naboji enakomerno razporedili. Datoteko receptorja smo nato shranili v obliki “pdbqt”. Za molekulska sidranja z Autodock Vina je bilo potrebno določiti še mesto vezave liganda.

V predhodni študiji vezave ligandov na HER2 (Balbuena-Rebolledo idr., 2021) smo poiskali aminokislino, ki so v interakciji z ligandom (**Preglednica 1**). Navedene aminokislino smo poiskali v datoteki “pdb”, ki smo jo odprli v beležnici. Za vsako aminokislino smo poiskali

zadnji atom ter zabeležili koordinate x, y in z, tako smo dobili koordinate za center območja vezave liganda. V programu AutoDock Tools smo nastavili center območja vezave liganda dimenzij $70 \times 70 \times 70$. Rezultate molekulskega sidranja smo pregledali in izbrali le tiste z vezavo v žep, kot pri ligandih lapatinib oziroma gefitinib. Izključili smo 14 ligandov (bosutinib, elagolix, fedratinib, fostamatinib, infigratinib, irinotecan, linzagolix, mobocertinib, neratinib, osimertinib, relugolix, sotorasib, topotecan in trametinib), ki se niso vezali v žep.

Preglednica 1: Aminokislina v interakciji z ligandom, njihove koordinate in izračun centra vezavnega žepa (Berman, 2000).

ak iz članka (zadnji atom)	x	y	z
L726	17,450	6,938	27,336
G727	11,614	10,162	23,955
F731	3,349	21,428	21,582
T733	11,474	9,570	20,086
V734	13,997	13,627	24,097
A751	20,078	12,681	25,235
K753	11,850	18,749	23,512
M774	17,959	27,188	26,952
S783	19,540	20,303	29,096
L785	21,622	23,620	20,948
L796	17,970	21,289	18,710
V797	22,866	15,955	18,566
T798	21,121	16,227	25,811
L800	23,676	7,893	27,749
M801	24,576	14,731	31,736
P802	24,521	10,051	33,015
Y803	25,121	6,459	39,489
G804	17,389	11,318	34,626
C805	12,039	11,409	33,927
L852	16,584	13,946	31,737
T862	15,773	17,663	30,375
D863	11,695	17,803	26,236
F864	17,241	24,072	29,633
VSOTA	399,505	353,082	624,409
POVPREČJE	17,370	15,351	27,148

ATOM	819	CD	GLU	A	812	14.853	3.119	38.725	1.00	80.61		C
ANISOU	819	CD	GLU	A	812	11701	8769	10159	441	409	426	C
ATOM	820	OE1	GLU	A	812	16.083	3.365	38.730	1.00	83.18		O
ANISOU	820	OE1	GLU	A	812	11965	9190	10448	642	390	444	O
ATOM	821	OE2	GLU	A	812	14.364	2.110	38.159	1.00	81.35		O
ANISOU	821	OE2	GLU	A	812	12002	8670	10239	346	476	405	O
ATOM	822	N	ASN	A	813	13.493	4.945	42.986	1.00	53.16		N
ANISOU	822	N	ASN	A	813	7866	5636	6698	416	355	589	N
ATOM	823	CA	ASN	A	813	14.381	4.960	44.150	1.00	54.20		C
ANISOU	823	CA	ASN	A	813	7987	5849	6757	621	359	662	C
ATOM	824	C	ASN	A	813	13.640	5.380	45.410	1.00	54.21		C
ANISOU	824	C	ASN	A	813	7926	5916	6754	570	363	705	C
ATOM	825	O	ASN	A	813	14.251	5.718	46.425	1.00	53.10		O
ANISOU	825	O	ASN	A	813	7729	5891	6558	714	341	749	O
ATOM	826	CB	ASN	A	813	15.601	5.842	43.907	1.00	53.35		C
ANISOU	826	CB	ASN	A	813	7712	5923	6637	758	275	628	C
ATOM	827	CG	ASN	A	813	16.524	5.270	42.856	1.00	57.59		C
ANISOU	827	CG	ASN	A	813	8325	6404	7152	862	290	605	C
ATOM	828	OD1	ASN	A	813	17.431	4.497	43.168	1.00	62.39		O
ANISOU	828	OD1	ASN	A	813	9036	6989	7681	1064	332	659	O
ATOM	829	ND2	ASN	A	813	16.292	5.633	41.600	1.00	58.11		N
ANISOU	829	ND2	ASN	A	813	8349	6452	7279	739	260	528	N
ATOM	830	N	ARG	A	814	12.311	5.322	45.332	1.00	55.63		N
ANISOU	830	N	ARG	A	814	8118	6032	6988	364	395	688	N
ATOM	831	CA	ARG	A	814	11.423	5.700	46.420	1.00	57.65		C
ANISOU	831	CA	ARG	A	814	8312	6346	7246	291	413	723	C
ATOM	832	C	ARG	A	814	11.984	5.257	47.769	1.00	62.16		C
ANISOU	832	C	ARG	A	814	8978	6916	7725	466	461	818	C
ATOM	833	O	ARG	A	814	12.117	6.068	48.691	1.00	65.19		O
ANISOU	833	O	ARG	A	814	9240	7446	8082	531	417	836	O
ATOM	834	CB	ARG	A	814	10.024	5.106	46.186	1.00	59.15		C
ANISOU	834	CB	ARG	A	814	8575	6421	7477	64	484	712	C
ATOM	835	CG	ARG	A	814	8.970	5.598	47.154	1.00	63.66		C
ANISOU	835	CG	ARG	A	814	9049	7078	8061	-34	505	737	C
ATOM	836	CD	ARG	A	814	7.583	5.068	46.836	1.00	71.04		C
ANISOU	836	CD	ARG	A	814	10014	7940	9038	-278	571	712	C
ATOM	837	NE	ARG	A	814	6.656	5.376	47.928	1.00	77.90		N
ANISOU	837	NE	ARG	A	814	10809	8887	9901	-345	616	753	N
ATOM	838	CZ	ARG	A	814	5.691	6.294	47.881	1.00	81.72		C
ANISOU	838	CZ	ARG	A	814	11092	9523	10434	-455	574	711	C
ATOM	839	NH1	ARG	A	814	5.482	7.009	46.780	1.00	81.95		N
ANISOU	839	NH1	ARG	A	814	10978	9639	10518	-512	481	628	N
ATOM	840	NH2	ARG	A	814	4.917	6.490	48.942	1.00	81.36		N
ANISOU	840	NH2	ARG	A	814	10995	9545	10372	-495	630	755	N
ATOM	841	N	GLY	A	815	12.338	3.978	47.866	1.00	62.93		N
ANISOU	841	N	GLY	A	815	9306	6846	7760	554	551	879	N
ATOM	842	CA	GLY	A	815	12.761	3.385	49.126	1.00	62.41		C
ANISOU	842	CA	GLY	A	815	9372	6752	7590	728	613	982	C
ATOM	843	C	GLY	A	815	14.125	3.798	49.646	1.00	61.58		C
ANISOU	843	C	GLY	A	815	9182	6811	7406	987	539	1006	C
ATOM	844	O	GLY	A	815	14.425	3.552	50.814	1.00	62.64		O
ANISOU	844	O	GLY	A	815	9379	6976	7444	1136	567	1087	O
ATOM	845	N	ARG	A	816	14.950	4.426	48.801	1.00	59.03		N
ANISOU	845	N	ARG	A	816	8712	6603	7113	1036	448	936	N

Slika 13: Prikaz odseka datoteke "pdb" za model 3PP0, ki vsebuje atomske koordinate proteina HER2.

Vsaka vrstica prikazuje informacije o atomu, vključno z njegovo identifikacijsko številko, kemijski simbol elementa s pozicijo atoma v aminokislini, tričrkovne okrajšave aminokislin katerih del so, verigo v kateri se nahajajo, zaporedno številko aminokislina v verigi, koordinatami (x, y, z), zasedenostjo atoma, temperaturnim faktorjem in kemijskim elementom atoma. Podatke smo uporabili za identifikacijo vezavnega žepa proteina (Berman, 2000).

7.3. REZULTATI

7.3.1. Strukturno podobne spojine učinkovinam lapatinib in gefitinib

Identificirali smo spojine, ki so strukturno podobne lapatinibu (30 učinkovin) in gefitinibu (27 učinkovin) (**Preglednica 2**).

Preglednica 2: Strukturno podobne učinkovine lapatinibu in gefitinibu, ki smo jih pridobili s pomočjo zbirke DrugBank Online

<p>Strukturno podobne učinkovine lapatinibu</p>	<p>mecobalamin, lenacapavir, hydroxocobalamin, gefitinib, vinflunine, vinblastine, vandetanib, vinorelbine, vincristine, lurbinectedin, irinotecan, afatinib, sotorasib, linzagolix, telavancin, vindesine, rifaximin, relugolix, simeprevir, oritavancin, teicoplanin, elbasvir, cyanocobalamin, pafolacianine, inavolisib, rifabutin, neratinib, vepatasvir, topotecan</p>
<p>Strukturno podobne učinkovine gefitinibu</p>	<p>dacomitinib, afatinib, vandetanib, erlotinib, belumosudil, lapatinib, bosutinib, tucatinib, doxazosin, alfuzosin, terazosin, fedratinib, neratinib, prazosin, trametinib, rifaximin, fostamatinib, linzagolix, elagolix, infigratinib, mobocertinib, trimetrexate, osimertinib</p>

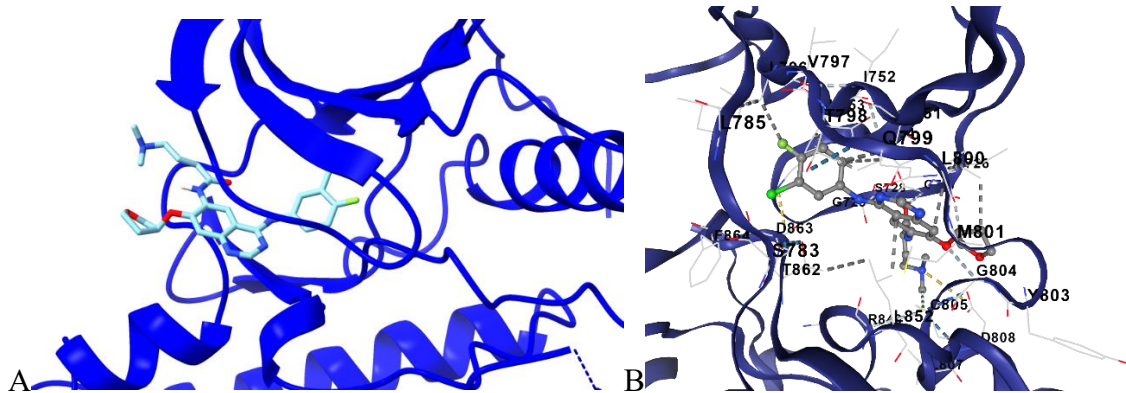
7.4. REZULTATI MOLEKULSKEGA SIDRANJA LIGANDOV NA RECEPTOR HER2

S pomočjo orodij CB-Dock2 in AutoDock Vina smo izvedli molekulsko sidranje receptorja HER2 in strukturno podobnih učinkovin lapatinibu in gefitinibu (**Preglednica 3**). Od 28 testiranih vezav ligandov se jih 14 ni umestilo v žep.

Preglednica 3: Rezultati molekulskega sidranja ligandov na HER2 (struktura 3PP0).

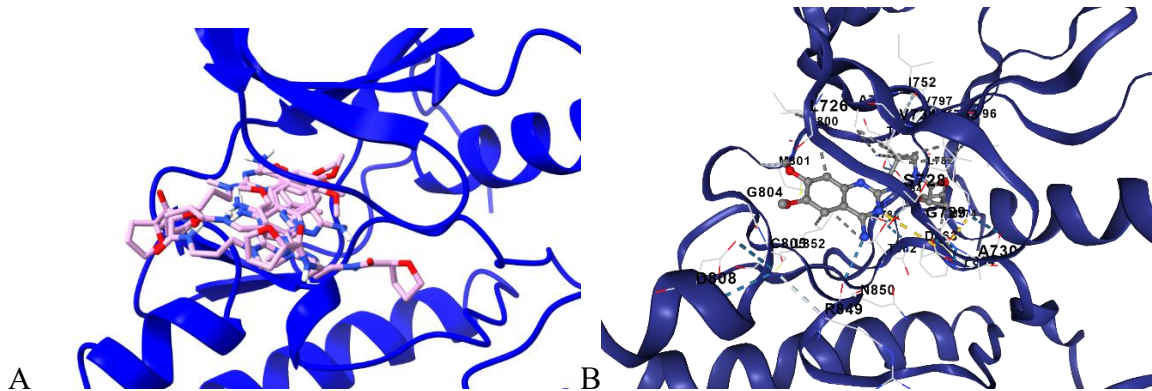
Ligand	Afiniteta vezave liganda pri AutoDock Vina [kcal/mol]	Afiniteta vezave liganda pri CB-Dock2 [kcal/mol]
Afatinib	-8,1	-8,4
Alfuzosin	-7,9, -7,4, -6,9, -6,8, -6,1	-8,1
Belumosudil	-9,8, -9,1, -8,8, -8,4, -8,3	-10
Bosutinib	ni se umestil v žep	-7
Dacomitinib	-9,5, -7,8, -7,8	-10
Doxazosin	-9,6	-9,3
Elagolix	ni se umestil v žep	-8,3
Erlotinib	-6,6, -6,5, -6,1	-8,2
Fedratinib	ni se umestil v žep	-9,3
Fostamatinib	ni se umestil v žep	-8,9
Gefitinib	-8, -7,3	-8,1
Inavolisib	-9,9, -8,9, -8,6, -8,5, -8,4, -7,9, -7,2	-9,7
Infigratinib	ni se umestil v žep	-8,8
Irinotecan	ni se umestil v žep	-11,4
Lapatinib	-11, -10,8, -10,7, -10,1, -9,6, -9,3, -9,1, -8,9, -8,9, -8,7	-9
Linzagolix	ni se umestil v žep	-7,9
Mobocertinib	ni se umestil v žep	-7,7
Neratinib	ni se umestil v žep	-7,4
Osimertinib	ni se umestil v žep	-8
Prazosin	-8,2, -6,1	-9,1
Relugolix	ni se umestil v žep	-9,1
Sotorasib	ni se umestil v žep	-7,4
Terazosin	-8,4	-9,3
Topotecan	ni se umestil v žep	-9,8
Trametinib	ni se umestil v žep	-7,9
Trimetrexate	-8, -7,5, -7,3	-8,3
Tucatinib	-10,5, -8,4	-8,7
Vandetanib	-6,8	-9,6

Ligand afatinib se vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afiniteto -8,1 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -8,4 kcal/mol v programu CB-Dock 2 (Slika 14).



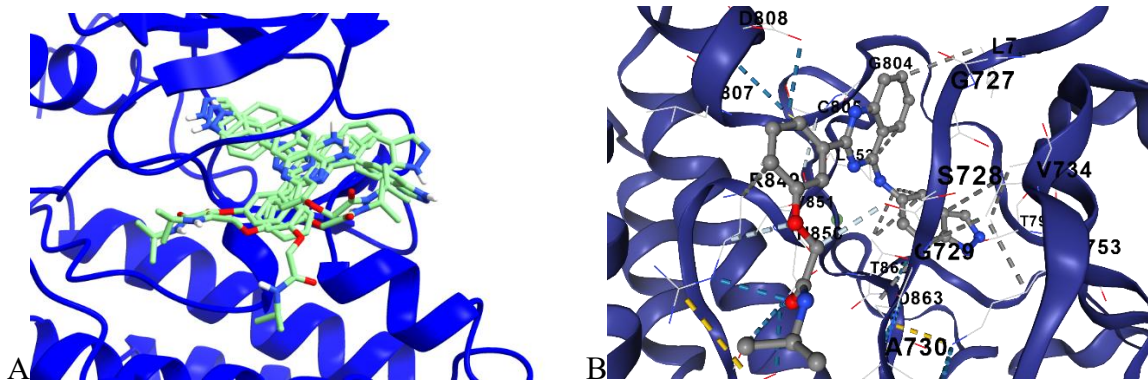
Slika 14: Vezava afatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand alfuzosin se je vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -7,9 kcal/mol; -7,4 kcal/mol; -6,9 kcal/mol; -6,8 kcal/mol in -6,1 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -8,1 v programu CB-Dock 2 (Slika 15).



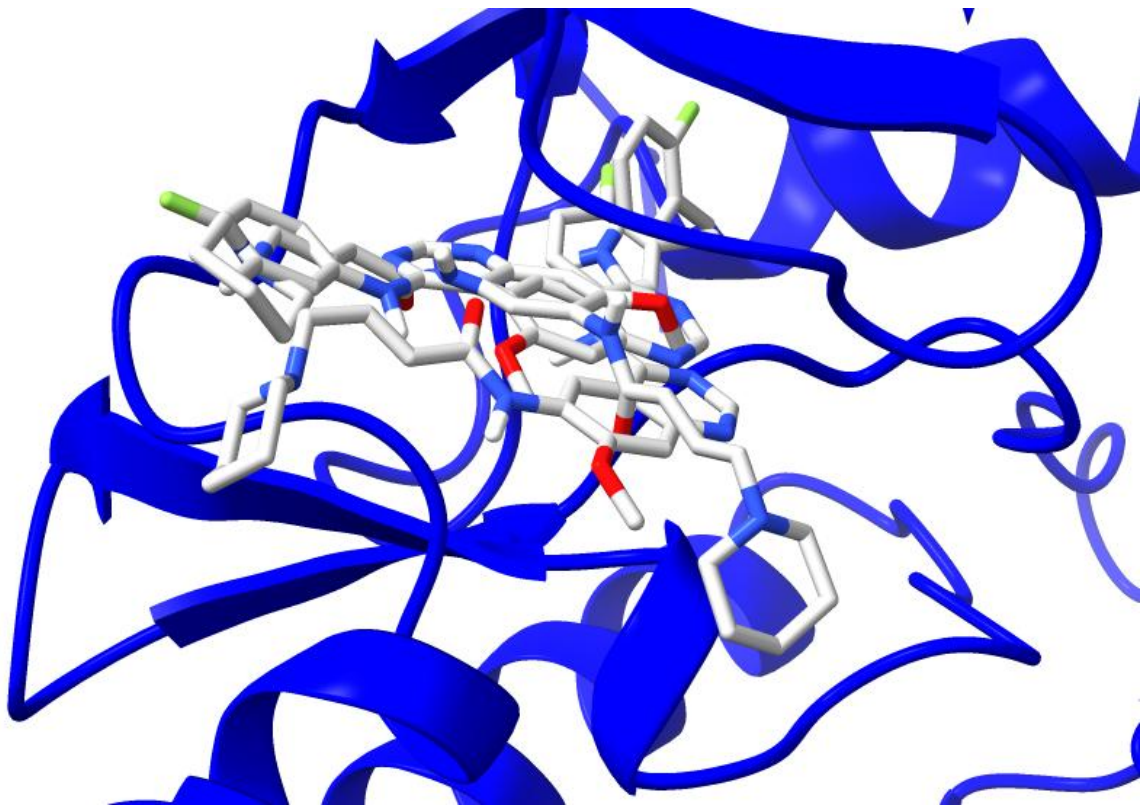
Slika 15: Vezave alfuzosina v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand belumosudil se je vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -9,8 kcal/mol; -9,1 kcal/mol; -8,8 kcal/mol; -8,4 kcal/mol in -8,3 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -10,0 kcal/mol v programu CB-Dock 2 (Slika 16).



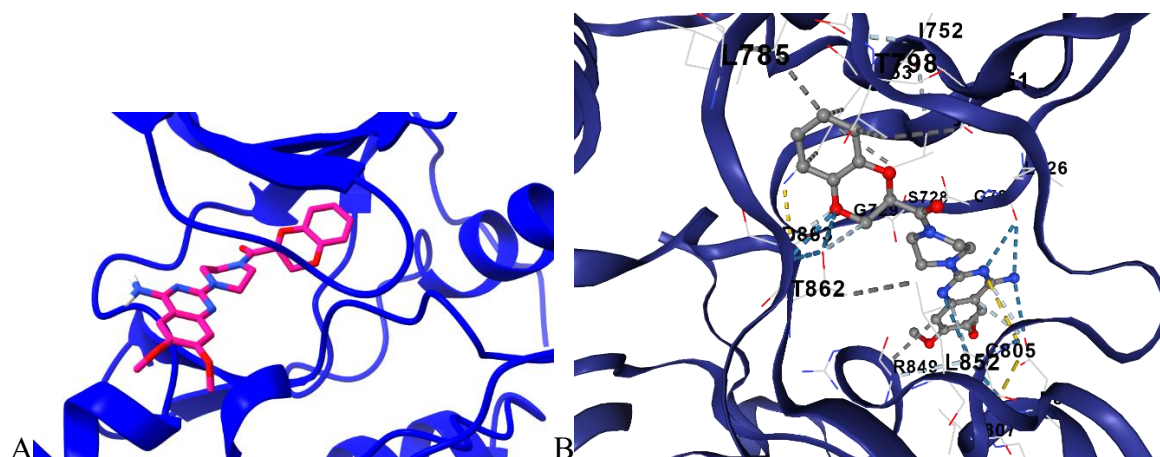
Slika 16: Vezava abelmosudila v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand dacomitinib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -9,5 kcal/mol; -7,8 kcal/mol in -7,8 kcal/mol v programu AutoDock Vina (Slika 17).



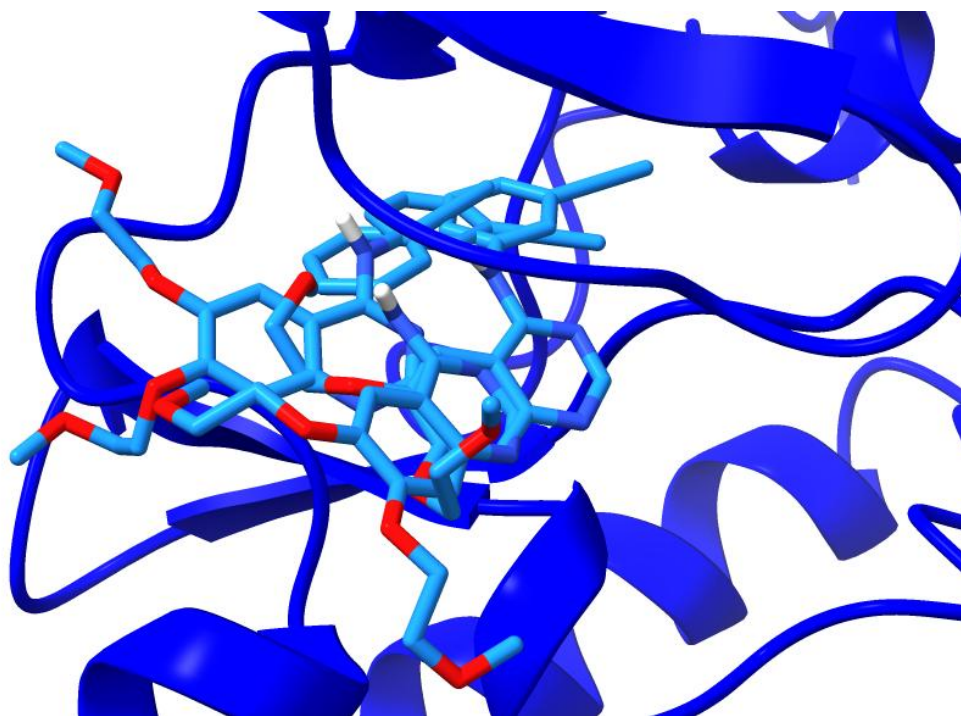
Slika 17: Vezava dacomitiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand doxazosin se je vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afiniteto -9,6 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -9,3 kcal/mol v programu CB-Dock 2 (Slika 18).



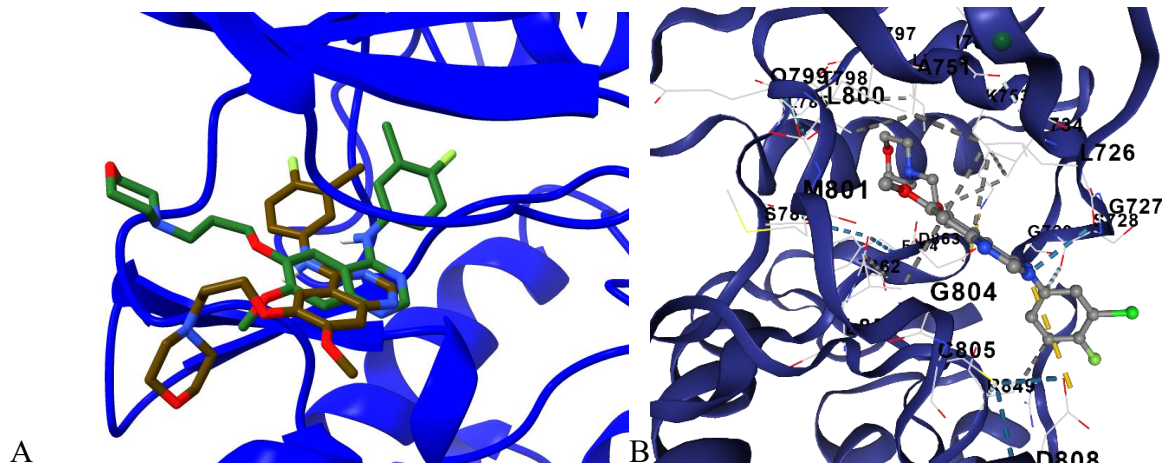
Slika 18: Vezava doxazosina v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand erlotinib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -6,6 kcal/mol; -6,5 kcal/mol in -6,1 kcal/mol v programu AutoDock Vina (Slika 19).



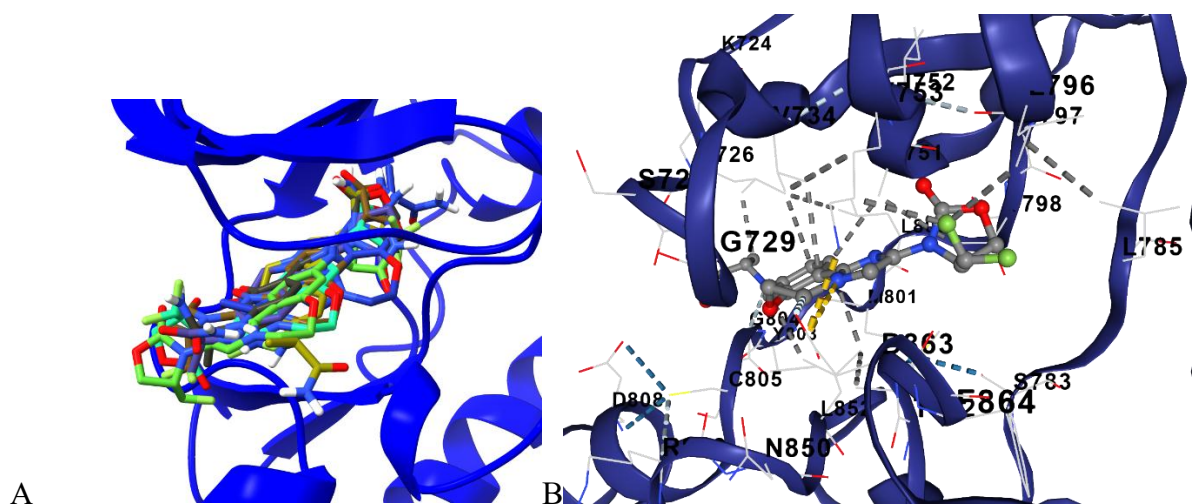
Slika 19: Vezava erlotiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand gefitinib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetama -8,0 kcal/mol in -7,3 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -8,1 kcal/mol v programu Cb-Dock 2 (Slika 20).



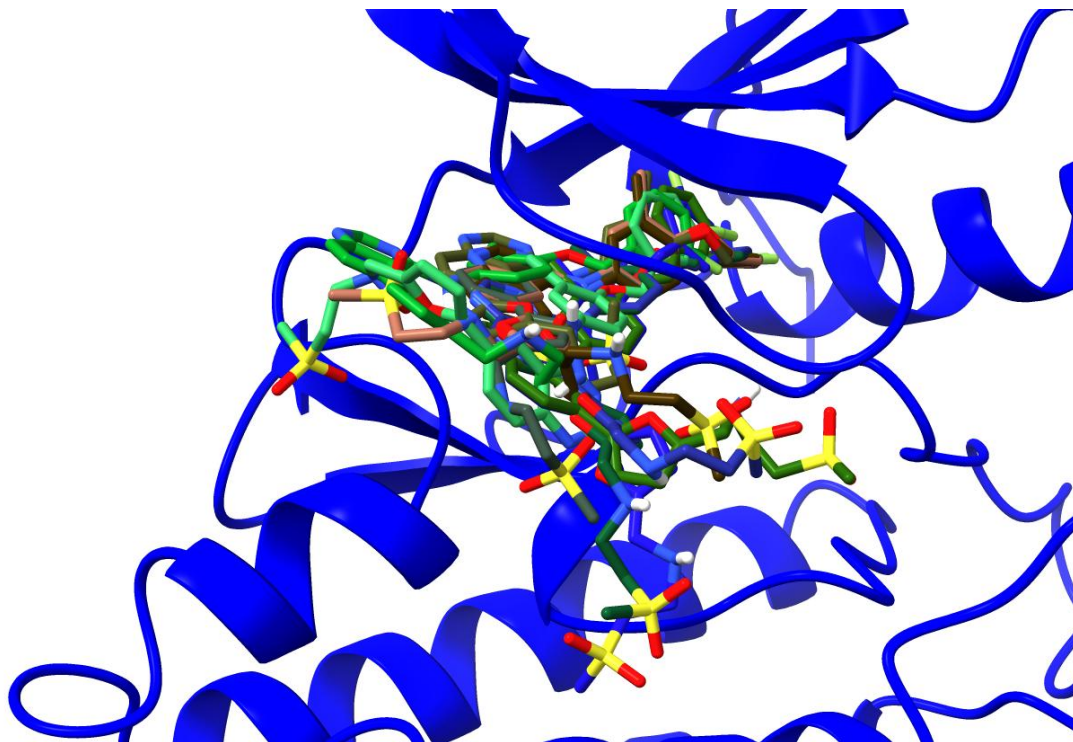
Slika 20: Vežava gefitiniba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand inavolisib se je vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -9,9 kcal/mol; -8,9 kcal/mol; -8,6 kcal/mol; -8,5 kcal/mol; -8,4 kcal/mol; -7,9 kcal/mol in -7,2 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -9,7 kcal/mol v programu CB-Dock 2 (Slika 21).



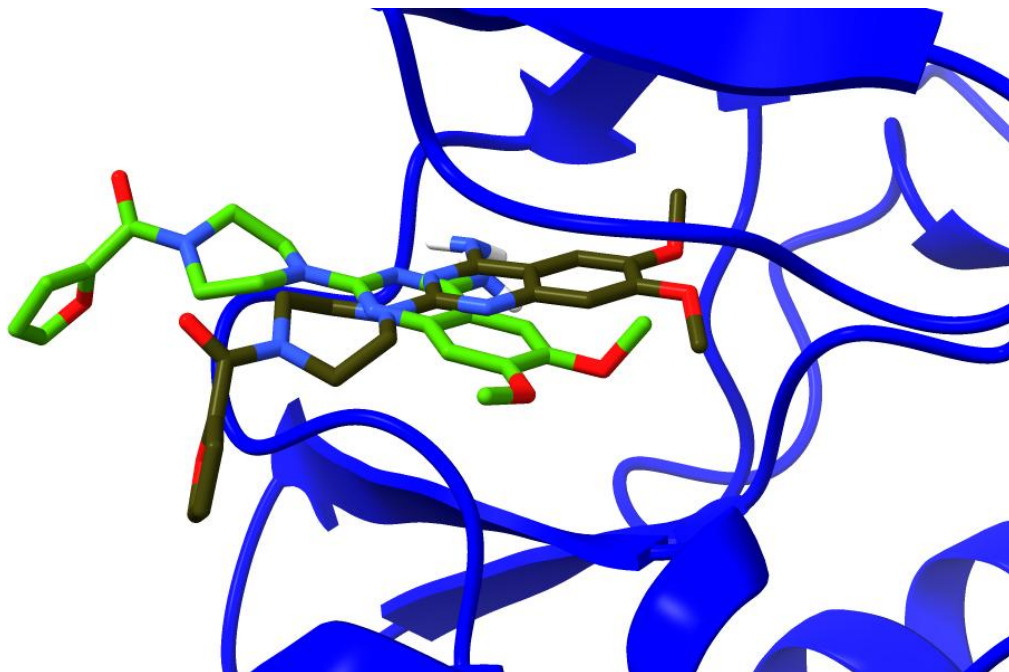
Slika 21: Vežava inavolisiba v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand lapatinib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -11,0 kcal/mol; -10,8 kcal/mol; -10,7 kcal/mol; -10,1 kcal/mol; -9,6 kcal/mol; -9,3 kcal/mol; -9,1 kcal/mol; -8,9 kcal/mol; -8,9 kcal/mol in -8,7 kcal/mol v programu AutoDock Vina (**Slika 22**).



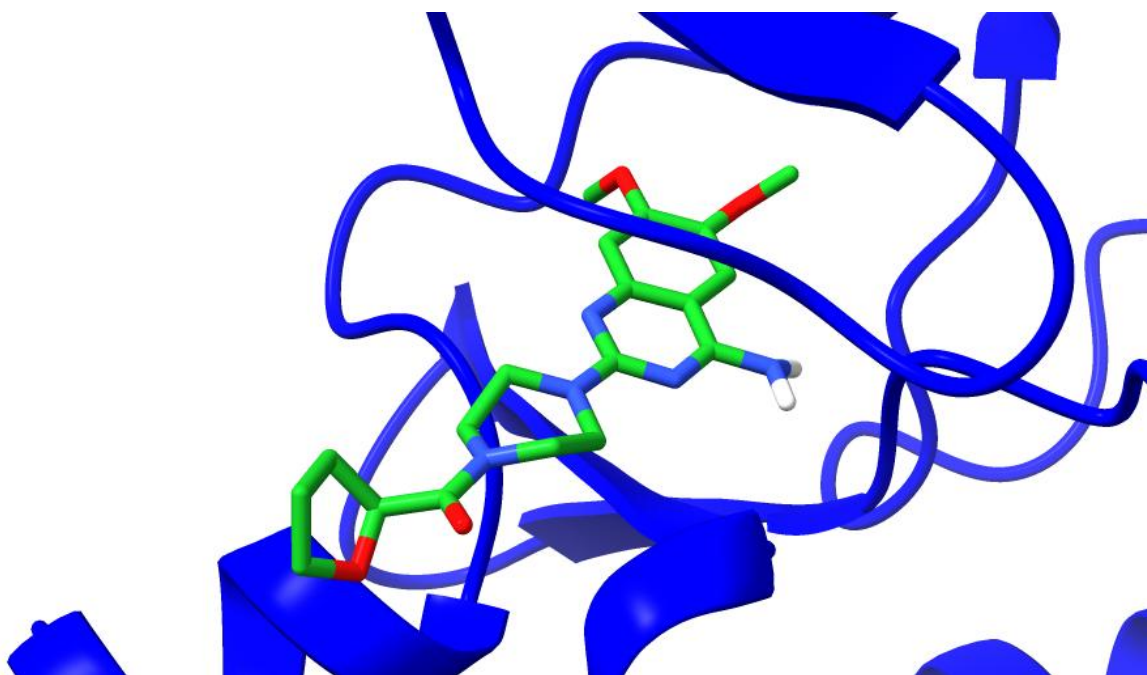
Slika 22: Vezava lapatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand prazosin je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetama -8,2 kcal/mol in -6,1 kcal/mol v programu AutoDock Vina (**Slika 23**).



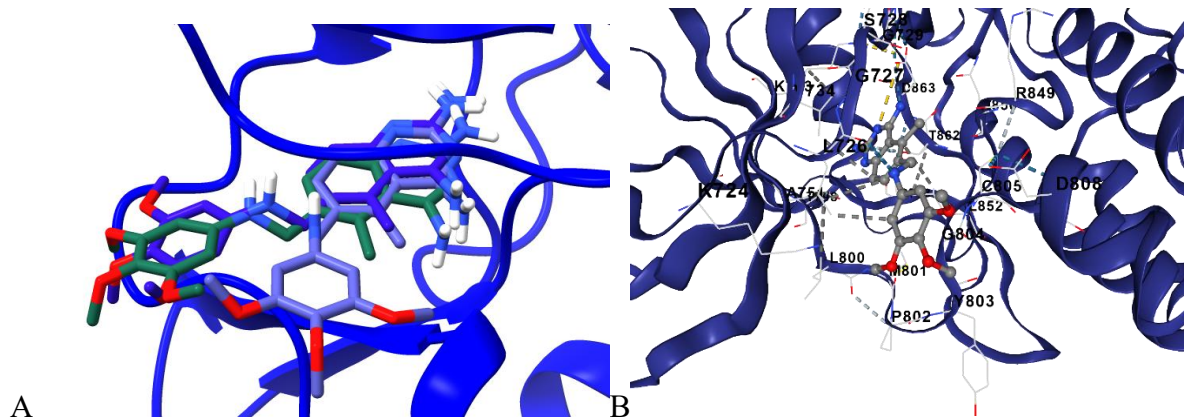
Slika 23: Vezava prazosina v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand terazosin je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetam $-8,4$ kcal/mol v programu AutoDock Vina (Slika 24).



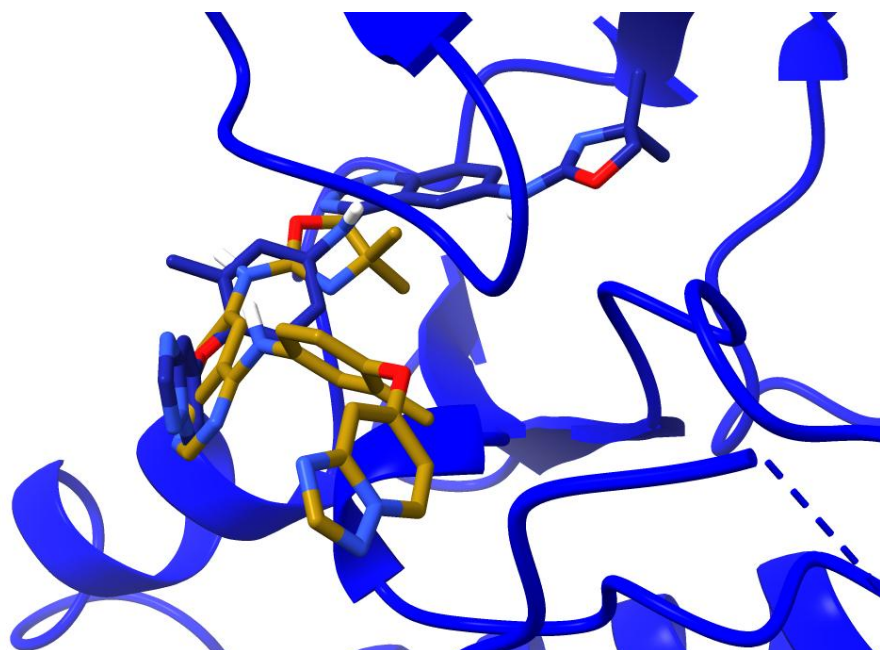
Slika 24: Vezava terazosina v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand trimetrexate se je vezal v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetami -8,0 kcal/mol; -7,5 kcal/mol in -7,3 kcal/mol v programu AutoDock Vina in -8,3 kcal/mol v programu CB-Dock 2 (Slika 25).



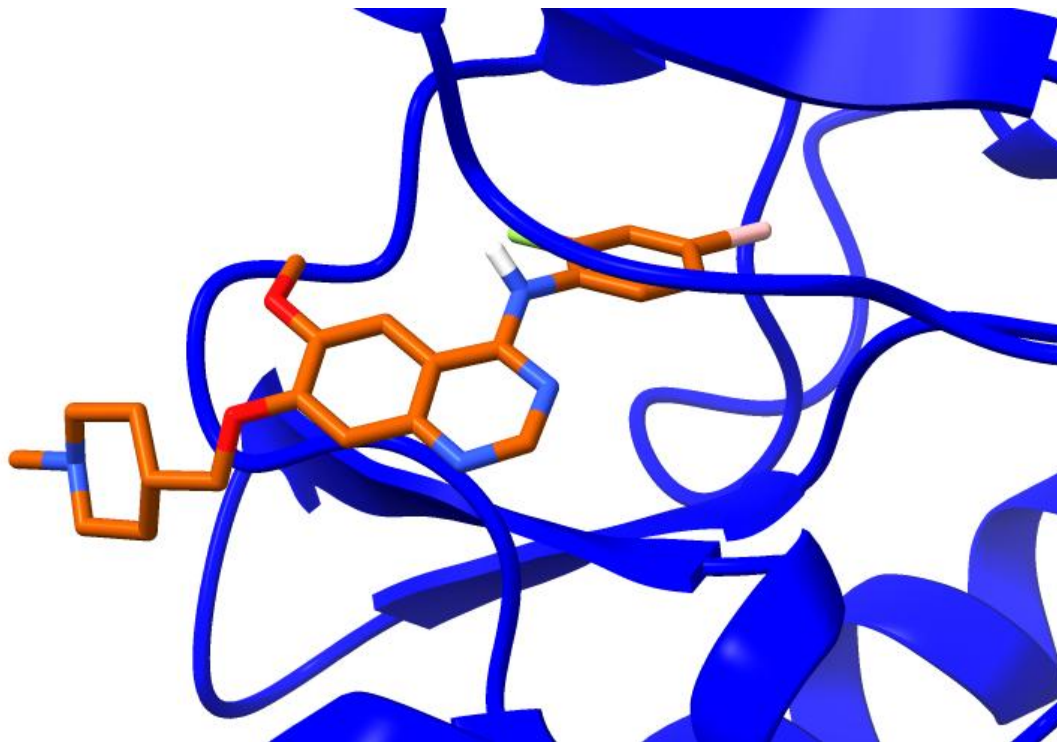
Slika 25: Vezava trimetrexate v vezavni žep receptorja 3PP0; A) v programu AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX, B) v programu CB-Dock2.

Ligand tucatinib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afinitetama -10,5 kcal/mol in -8,4 kcal/mol v programu AutoDock Vina (Slika 26).



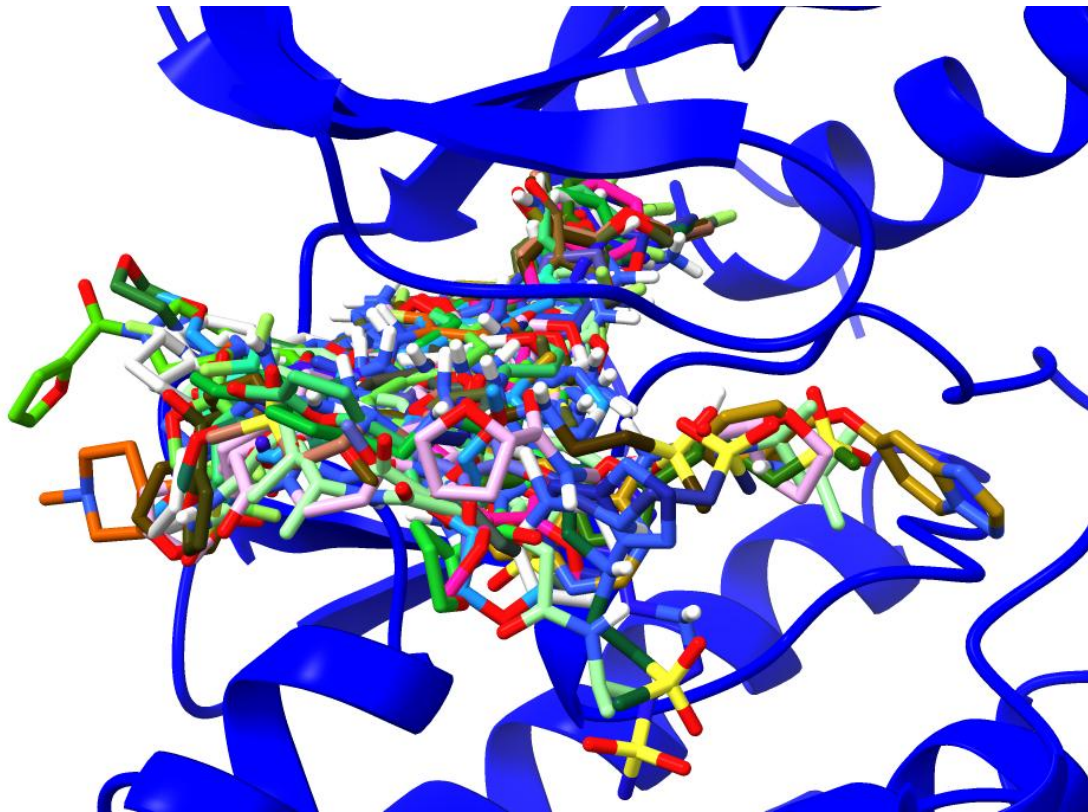
Slika 26: Vezava tucatiniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Ligand vedetanib je vezan v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 z afiniteto -6,8 kcal/mol v programu AutoDock Vina (**Slika 27**).



Slika 27: Vezava vedetaniba v vezavni žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

Uspešne vezave vseh ligandov v vezavni žep strukture receptorja 3PP0 so predstavljene na **Sliki 28**.



Slika 28: Uspešne vezave vseh ligandov v žep receptorja 3PP0, v programu AutoDock Vina.

7.5. DISKUSIJA

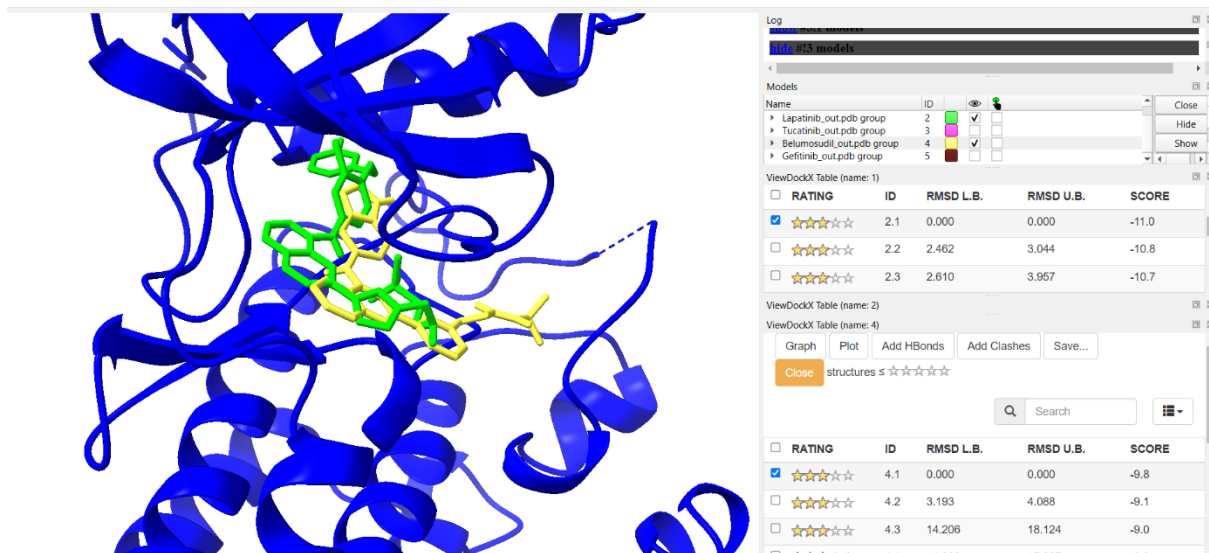
Med 57 učinkovinami podobnimi lapatinibu ali gefitinibu, smo za 28 učinkovin uspeli pridobiti njihove 3D strukture. Z metodo molekulskega sidranja smo raziskali afiniteto njihove vezave na receptor HER2. Molekularno sidranje smo izvedli s pomočjo dveh programov, AutoDock Vina in CB-Dock 2. Program AutoDock Vina je naprednejši in zanesljivejši, medtem ko je CB-Dock 2 uporabniku prijaznejši.

Rezultati, pridobljeni s programom AutoDock Vina, so bolj zanesljivi, saj gre za naprednejše in natančnejše orodje. Zato smo se pri analizi osredotočili predvsem nanje, medtem ko so bili rezultati CB-Dock 2 uporabljeni zgolj za okvirno primerjavo. Ligand z najboljšo afiniteto je bil lapatinib in sicer -11, ligand z najslabšo pa erlotinib in sicer -6,6. Afiniteta našega drugega že uporabljenega liganda na trgu, gefitiniba pa je bila -8. Izmed 28 testiranih ligandov se jih 14 ni uvrstilo v žep. Razlog za to bi lahko bil, da so ligandi preveliki ali pa da niso zmožni vzpostaviti vezi z aminokislinami v vezavnem žepu. To so bili bosutinib, elagolix, fedratinib, fostamatinib, infigratinib, irinotecan, linzagolix, mobocertinib, neratinib, osimertinib, relugolix, sotorasib, topotecan in trametinib. Kljub temu so se vsi razen fosfamatiniaba in topotecana pri CB-Dock 2 uvrstili v žep, vendar ti rezultati niso tako zanesljivi kot tisti iz AutoDock Vina..

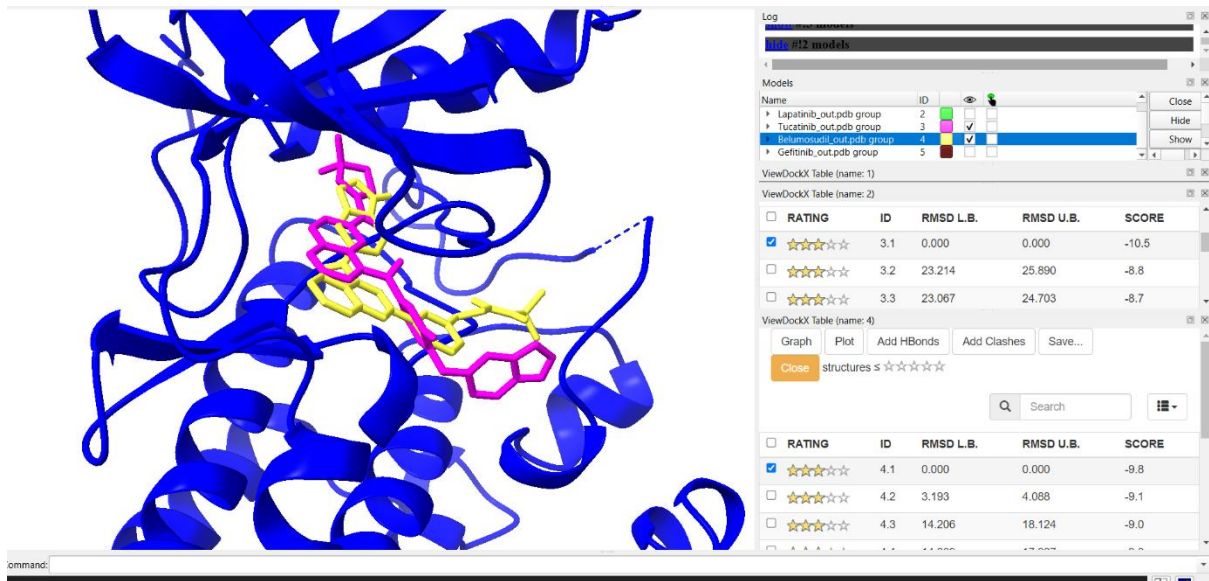
Preostalih 14 ligandov se je vezalo na pravo mesto, njihove afinitete so naslednje: lapatinib -11 kcal/mol; tucatinib -10,5 kcal/mol; inavolisib -9,9 kcal/mol; belumosudil -9,8 kcal/mol;

doxazosin -9,6 kcal/mol; dacomitinib -9,5 kcal/mol; terazosin -8,4 kcal/mol; prazosin -8,2 kcal/mol; afatinib -8,1 kcal/mol; gefitinib -8 kcal/mol; trimetrexate -8 kcal/mol; alfuzosin -7,9 kcal/mol; vandetanib -6,8 kcal/mol; erlotinib -6,6 kcal/mol. Pri Cb-Dock 2 smo za nekatere dobili podobne rezultate in sicer: afatinib -8,4 kcal/mol; alfuzosin -8,1 kcal/mol; belumosudil -10 kcal/mol; doxazosin -9,3 kcal/mol; gefitinib -8,1 kcal/mol, inavolisib -9,7 kcal/mol in trimetrexate -8,3 kcal/mol. Iz danih podatkov sklepamo, da so potencialni kandidati za nadaljnja testiranja, torej vsi ligandi katerih afiniteta je med afiniteto lapatiniba, torej -11 in afiniteto gefitiniba, torej -8, saj sta to že dve delujoči učinkovini, ki sta na trgu. To so: tucatinib, inavolisib, belumosudil, doxazosin, dacomitinib, terazosin, prazosin, afatinib in trimetrexate.

Najbolj obetaven je ligand tucatinib, pomembno pa je omeniti tudi ligand belumosudil, ki je inhibitor ROCK (anlg. rho-associated coiled-coil-containing) proteinske kinaze in se uporablja za zdravljenje GVHD (graft-versus-host disease) (Knox idr., 2024) (Slika 29 in Slika 30).



Slika 29: Vezava lapatiniba (zelena) z afiniteto -11.0 v primerjavi z vezavo belumosudila (rumena) z afiniteto -9.8. Vezava pridobljena s programom AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX.



Slika 30: Vezava tucatiniba (roza) z afiniteto -10.5 v primerjavi z vezavo belumosudila (rumena) z afiniteto -9.8. Vezava pridobljena s programom AutoDock Vina, prikazano s programom ChimeraX.

7.6. EKONOMSKA ANALIZA REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL ZA HER2-POZITIVNI RAK

Inovacije so ključnega pomena za farmacevtsko industrijo, saj predstavljajo glavni vir dobička, s prihodom novih zdravil na trg. Kljub nenehnim vlaganjem v raziskave in razvoj pa se že več desetletij soočamo z izrazitim upadom produktivnosti (Kodrič idr., 2024).

V preteklosti so farmacevtska podjetja delovala po zaprtem modelu inovacij, v katerem so samostojno razvijala in tržila zdravila. Ta pristop jim je omogočil, da so patentirala številna nova zdravila in si s tem zagotovila visoke prihodke. V devetdesetih letih prejšnjega stoletja je bilo vsako leto odobrenih več kot trideset novih zdravil, kar je predstavljalo vrhunec inovativnosti v farmacevtski industriji. S prehodom v novo tisočletje se je trend obrnil, kljub temu da so podjetja povečevala vlaganja v raziskave in razvoj. Število odobrenih zdravil se je zmanjšalo, stroški razvoja pa so se močno povečali. Ta pojav je dobro znan in pomeni, da farmacevtska industrija kljub tehnološkemu napredku in večjim finančnim sredstvom ne dosega več enakega obsega inovacij kot nekoč. Razlogov za upad produktivnosti je več. Razvoj novih zdravil postaja vedno bolj kompleksen in zahteva uporabo naprednih tehnologij, kar povečuje stroške. Prav tako so enostavne terapevtske tarče že izčrpane, zaradi česar se industrija premika k bolj tveganim raziskovalnim področjem, kjer je uspeh manj predvidljiv. Hkrati se regulatorni standardi nenehno zaostrojujejo, kar podaljšuje klinična testiranja in povečuje tveganja za farmacevtska podjetja. Dodatno oviro predstavlja tudi usmerjenost podjetij v iskanje izjemno donosnih zdravil, zaradi česar se manj sredstev usmerja v raziskave za manjše terapevtske segmente. To vpliva na celoten ekosistem inovacij, saj je vse več raziskav ustavljenih že v zgodnjih fazah, preden sploh dosežejo klinično testiranje. Posledično se povečuje potreba po novih strategijah, ki bi lahko zmanjšale stroške in čas razvoja ter povečale učinkovitost industrije (Kodrič idr., 2024).

Glede na vse navedene izzive se postavlja vprašanje, kako lahko farmacevtska industrija ponovno poveča svojo produktivnost in ohrani inovativnost. Ena izmed možnih rešitev, ki se vedno bolj uveljavlja, je iskanje novih terapevtskih indikacij za že obstoječa zdravila. V nadaljevanju bomo podrobneje preučili ekonomske vidike te strategije ter analizirali, kako lahko pripomore k večji učinkovitosti in vzdržnosti farmacevtskega sektorja (Weth idr., 2024).

7.7. METODE IN MATERIALI

Za izvedbo ekonomske analize smo uporabili metodo sistematičnega pregleda znanstvene in strokovne literature ter sekundarne analize podatkov. Pri tem smo zbirali, primerjali in interpretirali informacije iz različnih virov, pri čemer smo upoštevali metodološko relevantnost ter zanesljivost podatkov. Pregledana literatura je vključevala ameriške, evropske in slovenske znanstvene članke, poročila ter podatkovne zbirke.

Ameriške vire smo primarno uporabili za analizo inovacijskih procesov in regulatornih okvirov pri razvoju novih zdravil, pri čemer smo se osredotočili na finančne vložke v raziskave in razvoj (R&D) ter časovne okvire kliničnih preskušanj. Te podatke smo nato primerjali z evropskim kontekstom, s čimer smo dobili vpogled v razlike med farmacevtskimi trgi in pristopi k inovacijam. Poleg tega smo vključili slovenske podatke, s posebnim poudarkom na dostopnosti zdravil, tržni dinamiki ter sistemu cenovne regulacije in povračil stroškov zdravljenja.

Dostop do znanstvenih člankov in podatkovnih virov ni zahteval uporabe specializirane programske opreme, saj je bila večina literature dostopna prek odprtokodnih platform, institucionalnih naročnin ali nacionalnih raziskovalnih infrastrukturnih sistemov. V procesu zbiranja podatkov smo uporabljali akademske podatkovne baze, kot so PubMed, Scopus in Web of Science, ter uradne regulatorne in farmakoekonomske vire, kar nam je omogočilo pridobitev visokokakovostnih informacij za analizo.

Pridobljeni podatki so bili nato sistematično obdelani in analizirani z uporabo ustreznih metod ekonomske evaluacije, pri čemer smo posebno pozornost namenili primerljivosti virov, časovnim okvirom objav in zanesljivosti podatkov.

7.8. EPIDEMIOLOGIJA RAKA, JAVNOZDRAVSTVENO BREME IN PRILOŽNOSTI ZA REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL

Pojavnost raka narašča, prav tako pa tudi ekonomsko breme zdravljenja raka za zdravstvene sisteme držav. Med letoma 1990 in 2013 se je število primerov raka po svetu povečalo za 75,6 %, pri čemer je 35 % tega porasta mogoče pripisati rasti prebivalstva, 35,6 % staranju prebivalstva in 5 % spremembi stopnje pojavnosti bolezni (Weth idr., 2024). Poleg naraščajočega povpraševanja po zdravljenju raka se stalno povečuje tudi strošek zdravljenja posameznega pacienta, tako da izdatki za zdravljenje raka presegajo sam porast pojavnosti bolezni. Srednji strošek zdravljenja raka ob odobritvi s strani Ameriške agencije za hrano in

zdravila (FDA) ali Evropske agencije za zdravila se je v devetdesetih letih povečal z manj kot 100 USD na mesec na približno 10.000 USD na mesec v letu 2011 (Weth idr., 2024). Ko so cene prilagojene inflaciji in pričakovanim zdravstvenim koristim, se povprečna cena protirakavih zdravil ob lansiranju na trg povečuje za 10 % letno, kar pomeni povprečno zvišanje za 8.500 USD na leto (Weth idr., 2024).

Podoben trend se odraža tudi v Evropi, kjer so se skupni izdatki za zdravljenje raka povečali za 98 %, s 52 milijard eurov leta 1995 na 103 milijarde eurov leta 2018 (Weth idr., 2024). Stroški za zdravila za zdravljenje raka so se več kot potrojili, saj so se povečali z 10 milijard eurov v letu 2005 na 32 milijard eurov leta 2018. V ZDA so stroški zdravljenja raka še višji, s srednjim stroškom zdravljenja, ki je 2,31-krat višji kot v Evropi. V ZDA večji del finančnega bremena nosijo posamezniki in zasebna zdravstvena zavarovanja, medtem ko v večini evropskih držav to breme prevzame država (Weth idr., 2024).

Verjetnost odobritve (LOA) zdravil proti raku v prvi fazi kliničnih preskušanj je le 6,7 %, kar je najnižja vrednost med vsemi vrstami zdravil in skoraj polovico nižja od drugih zdravil. Kljub znanstvenemu napredku v zadnjih desetletjih se število na novo odobrenih zdravil na milijardo vloženih ameriških dolarjev v raziskave in razvoj (R&R) vsakih devet let prepolovi, kar je pojav, znan kot Eroomov zakon. Glavni razlogi za ta trend vključujejo strožje regulatorne zahteve, potrebo po pomembnem izboljšanju zdravstvenih izidov, osredotočenost podjetij na čim hitrejšo lansiranje novih zdravil in morebitne neustrezne prakse v raziskavah in razvoju (Weth idr., 2024).

Ena od rešitev za naraščajoče stroške in nizko uspešnost razvoja novih zdravil je repozicioniranje oziroma ponovna uporaba že obstoječih zdravil za nove indikacije pri zdravljenju raka. To vključuje uporabo generičnih (zunajpatentnih) zdravil, patentiranih zdravil (tudi tistih v kliničnih preskušanjih) ter zdravil, ki niso uspela pri prvotni indikaciji. Ponovna uporaba zdravil je cenejša in hitrejša od razvoja povsem novega zdravila, saj predklinične in zgodnje faze kliničnih preskušanj, ki potrjujejo varnost in toleranco, že obstajajo. Medtem ko razvoj novega zdravila traja povprečno 13 do 15 let in stane približno 2–3 milijarde USD, ponovna uporaba zdravila traja le 6,5 leta in stane približno 300 milijonov USD. Poleg tega so takšna zdravila manj verjetno neuspešna v primerjavi z razvojem povsem novih zdravil (Weth idr., 2024).

7.9. STROŠKOVNA UČINKOVITOST REPOZICIONIRANJA ZDRAVIL V PRIMERJAVI S STANDARDNIMI TERAPIJAMI

Preden zdravilo uporabimo za zdravljenje pacientov je potrebno z njim opraviti osnovne pred klinične raziskave. Izmed mnogo potencialnih molekul oz. kandidatov je potrebno odkriti pravega, ki vpliva na samo tarčo bolezni in tako vpliva nanjo in na njene simptome. Razvije se njegov farmakološki profil in odriva njegovo toksičnost, kar v povprečju traja okoli šest let. Stroški tega postopka segajo od 14,5 do 97 milijonov evrov, kar okvirno predstavlja 29 % celotnih stroškov (preglednica 4), večinoma zaradi laboratorijskih študij in testiranja na živalih (Roden, 2023). Tem raziskavam sledijo klinična testiranja, ki preverjajo kakšna je učinkovitost

zdravila in njegova varnost. Zdravilo je potrebno prijaviti FDA, ki začne s kliničnim postopkom in ga testira na dejanskih pacientih, z namenom pridobivanja dokazov za FDA odobritev. Celoten postopek je sestavljen iz več dolgotrajnih faz I-III, po odobritvi pa sledi še IV. faza, in je najdražji del samega razvoja (PhRMA, 2023).

Faza I je raziskovalni proces, ki običajno traja 12-18 mesecev (Boyd idr., 2010). V njej se kandidati testirajo pri zdravih človeških prostovoljcih, da bi ocenili varnost. Te preizkušnje vključujejo majhno število udeležencev (do 100), pri katerih te spremljajo presnovne in farmakološke učinke zdravila. V tej fazi razvoja se spremlja in raziskuje, kaj se zgodi s kemično spojino, ko je ta v telesu, raziskuje odziv na povečanje odmerka zdravil in spremljanje stranskih učinkov (Boyd idr., 2010). V povprečju stane okoli 25 milijonov evrov, kar predstavlja okvirno 15% celotnih stroškov (**Preglednica 4**) (Roden, 2023).

Sledi faza II. Eksperimentalna zdravila so ocenjena v populaciji bolnikov, za katero je bilo zdravilo zasnovano. Dolžina teh preizkušanj je tako odvisna od bolezni in se najpogosteje izvaja do dveh let, s poudarkom na učinkovitosti zdravila proti bolezni in njeni varnosti. Odmerki in predhodni podatki o učinkovitosti se zbirajo še iz večjega števila bolnikov, po navadi več sto. Ta faza kliničnega preizkušanja je natančno nadzorovana, da se lahko določi morebitne kratkoročne stranske učinke in tveganja za populacijo bolnikov. Farmakodinamično modeliranje se lahko izvaja že v tej fazi, da bi pomagalo pri odločitvi, ali zdravilo nadaljuje v fazo III ali pa pride do prekinitve razvoja (Boyd idr., 2010). stroški te faze lahko široko nihajo, a v povprečju znašajo okoli 60 milijonov evrov, ki predstavljajo 22% vseh stroškov (**Preglednica 4**) (Roden, 2023).

Ko sta v fazah I in II raziskana varnost in učinkovitost novega zdravila, se začnejo preizkušnje v fazi III, ki potekajo na širši populaciji bolnikov (približno tisoč), z namenom potrditve varnosti in učinkovitosti zdravila. Te preizkušnje so običajno naključne nadzorovane študije, ki se izvajajo na različnih lokacijah. Glavni poudarek je na oceni razmerja med tveganjem in koristjo zdravila ter na oceni morebitnih dolgoročnih učinkov (Boyd idr., 2010). Faza III v povprečju traja od enega leta do več, njeni stroški pa so najvišji med vsemi fazami, saj znašajo približno 350 milijonov evrov, lahko pa se povzpnejo tudi do milijarde evrov. To predstavlja približno 31 % stroškov, potrebnih za razvoj zdravila (**Preglednica 4**).

Zdravila, ki uspešno prestanejo oceno v fazi III, so predložena regulativnim organom za registracijo in licenciranje. Regulativa za razvoj zdravil zahteva celovit in dolgotrajen postopek, ki vključuje prijavo zdravila pri FDA ali EMA, kar stane približno 2 do 3 milijone evrov (Roden, 2023), kar predstavlja 3 % celotnih stroškov (**Preglednica 4**). Ko je zdravilo odobreno in pripravljeno za trg, se izvede končna faza ocenjevanja, ki se običajno osredotoča na določanje optimalne uporabe in dolgoročnih vplivov. V primeru, da se izvajajo študije faze IV, te vključujejo preskušanje ali bolj pogosto opazovalne študije, ki zajemajo na tisoče udeležencev skozi daljše časovno obdobje, da se razvije varnostni profil zdravila in raziskujejo dolgoročni učinki na obolevnost in umrljivost. Ta razvojni proces pomaga zmanjšati negotovost glede varnosti in učinkovitosti zdravila. Vsako klinično preizkušanje je zasnovano tako, da odgovori na specifična raziskovalna vprašanja, ki omogočajo odločitve o tem, katera zdravila niso primerna in jih je treba zavreči, ter tista, ki obetajo in jih je treba nadaljevati v

razvoju (Boyd idr., 2010). Spremljanje zdravila po sprostitvi lahko stane od 20 do 300 milijonov evrov, odvisno od narave zdravila in trajanja nadzora (Roden, 2023).

Preglednica 4: Delež stroškov, ki ga predstavlja posamična faza pri razvoju novega zdravila (Sertkaya A & Franz C, 2022).

Faza	Delež stroškov [%]
Odkrivanje	19
Pred klinične raziskave	10
Faza 1	15
Faza 2	22
Faza 3	31
Odobritev	3
SKUPNO	100

Razvoj zdravila je na splošno dolgotrajen, kompleksen in drag proces. Že samo oblikovanje ideje in predklinično testiranje trajata več let. Ko je ideja izpopolnjena, se začnejo začetne raziskave, ki trajajo nekaj mesecev, nato pa sledijo obsežnejša testiranja, ki trajajo več let. Če združimo vse te faze skupaj z nujnimi raziskavami, celoten proces v povprečju traja od 10 do 15 let, stroški pa znašajo približno 2,5 milijarde evrov (PhRMA, 2023). Kljub visokim stroškom ima zdravilo velik tržni potencial, zlasti če cilja na neizpolnjene medicinske potrebe. Vendar pa so tudi po uvedbi na trg stroški visoki, saj je potrebno dolgoročno spremljanje učinkov in varnosti, ki še vedno nista popolnoma znana (PhRMA, 2023).

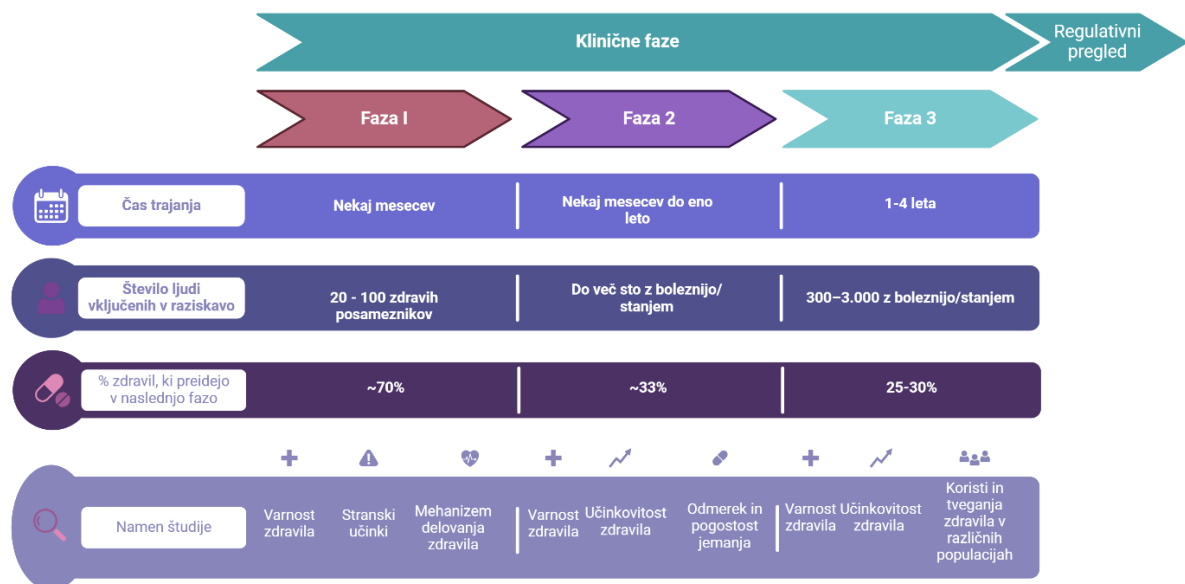
Pri razvoju zdravil je pomembno upoštevati tudi njihovo uspešnost. Na splošno FDA odobri le približno 12 % zdravil, ki vstopijo v klinične raziskave (PhRMA, 2023). Če analiziramo podatke o devetih različnih vrstah raka, odkritih med letoma 1998 in 2020, ugotovimo, da 1366 razvitih zdravil ni uspelo pridobiti odobritve FDA, medtem ko jih je bilo odobrenih le 115. To potrjuje, da je razvoj zdravil izjemno drag, dolgotrajen in kompleksen proces (PhRMA, 2023).

Vendar pa obstajajo tudi hitrejše, stroškovno učinkovitejše alternative, kot je repozicioniranje zdravil. Gre za napredno metodo, ki vključuje ponovno uporabo že odobrenih farmacevtskih učinkovin, ki so že prestale ključne faze razvoja in so na voljo na trgu. Ta pristop ponuja potencialne rešitve za bolnike z omejenimi možnostmi zdravljenja, hkrati pa prihrani čas in finančna sredstva. Prav tako pospešuje iskanje novih terapevtskih možnosti za redke bolezni in nezdravljena medicinska stanja. Repozicioniranje temelji na konceptu, da lahko različne bolezni delijo podobne molekularne poti. Raziskave kažejo, da kar 90 % repozicioniranih zdravil strateško revitalizira opuščene ali zastarele terapevtske možnosti z uporabo inovativnih tehnologij in metodologij, vključno z računalniškimi in eksperimentalnimi pristopi (PhRMA, 2023).

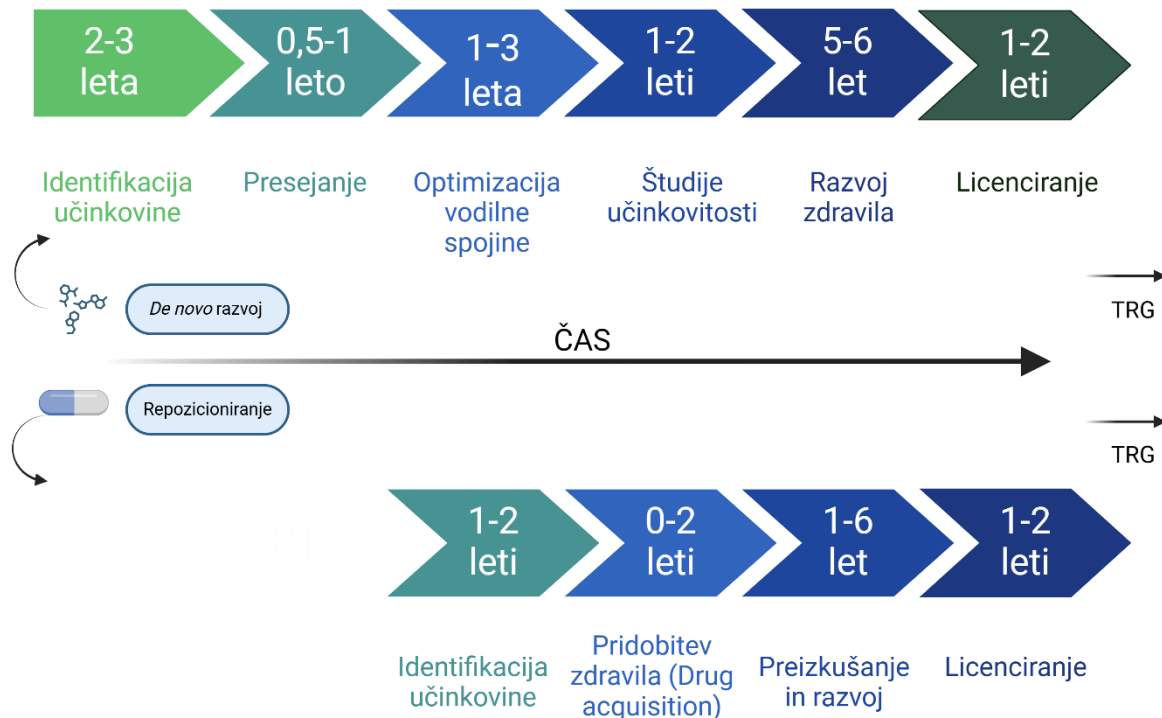
Podobno kot standardni razvoj zdravil je tudi repozicioniranje sestavljeno iz več faz. Prva faza vključuje identifikacijo potencialnih spojin, pri čemer se izbere kandidat, ki bo ciljalo na določeno tarčo v človeškem telesu (Chella idr., 2024). To identifikacijo je mogoče izvesti z

računalniškimi ali eksperimentalnimi metodami. Eksperimentalni pristop vključuje orodja, kot so inducirani modeli pluripotentnih matičnih celic (organoidi) in fenotipski presejalni pregledi, medtem ko računalniške metode združujejo podatke o učinkih zdravil in značilnostih bolezni ter ustvarjajo modele, ki te interakcije ponazarjajo. Predvsem presejalni pregledi z uporabo naprednih modelov omogočajo identifikacijo spojin, ki lahko ublažijo simptome bolezni, tudi brez predhodnega poznavanja interakcij med zdravilom in tarčo. Ta faza običajno traja od enega do dveh let (Xia idr., 2024).

V drugi fazi je treba identificiranega kandidata registrirati in pridobiti licenco za novo indikacijo, kar v povprečju traja do dve leti. Tretja faza, ki se lahko začne že med predkliničnimi raziskavami, fazo I ali fazo II standardnega razvoja zdravil, vključuje temeljito analizo razpoložljivih podatkov za zagotovitev varnosti in učinkovitosti novega zdravila. Ta proces lahko traja do pet let. Kot zadnji korak sledi postmarketinški nadzor, ki ga izvajata FDA ali EMA, da spremljata varnost zdravil in medicinskih pripomočkov po njihovi uvedbi na trg (Chella idr., 2024).



Slika 31: Opis faze razvoja novega zdravila in njihovo trajanje.



Slika 32: Primerjava časovnic standardnega razvoja zdravil in repozicioniranja zdravil. Povzeto po (Low idr., 2020), narejeno z <https://BioRender.com>

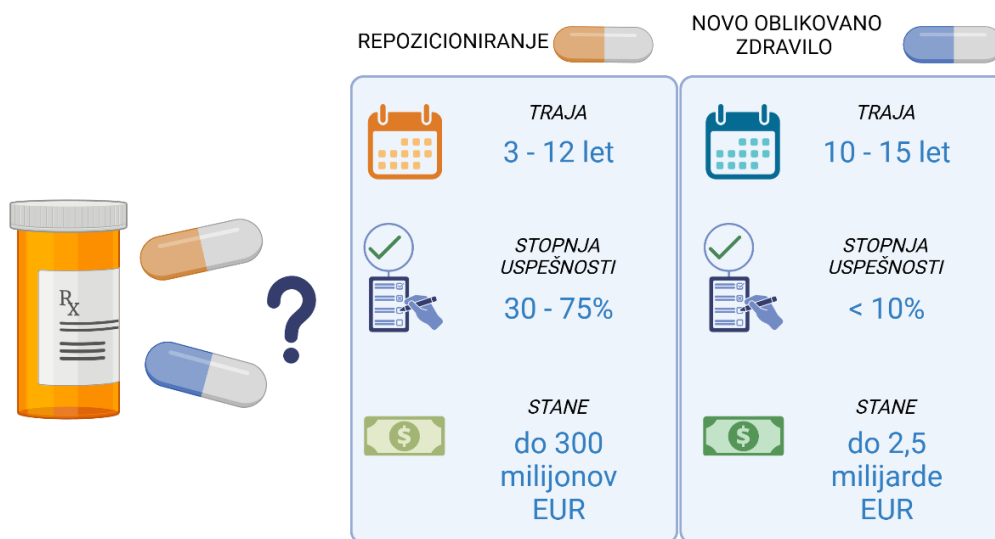
7.10. ANALIZA PRIHRANKOV PRI RAZVOJU ZDRAVIL IN DOSTOPNOSTI REPOZICIONIRANIH ZDRAVIL

Pri oceni prihrankov pri razvoju zdravil je ključno primerjati ključne parametre standardnega razvoja in repozicioniranja zdravil. Kot že omenjeno, repozicioniranje bistveno zmanjša stroške in čas razvoja. Povprečni strošek razvoja novega zdravila znaša približno 2,5 milijarde evrov, celoten proces pa traja od 10 do 15 let (PhRMA, 2023). V nasprotju s tem razvoj repozicioniranih zdravil stane povprečno od 300 milijonov do 1,5 milijarde evrov, pri čemer traja med 3 in 12 let (Chella idr., 2024). Ta razlika izhaja iz dejstva, da repozicionirana zdravila preskočijo zgodnje faze razvoja (od začetnih raziskav do faze II), pri čemer se raziskave osredotočajo predvsem na preizkušanje njihovega delovanja na nove tarče ali bolezni. S tem se prihrani znaten delež stroškov in do 10 let razvojnega časa.

Na podlagi teh podatkov je mogoče sklepati, da je repozicioniranje hitrejši in stroškovno učinkovitejši postopek, saj omogoča preskok več kot polovice standardnega razvojnega procesa (PhRMA, 2023). Poleg časa in stroškov je pomembna tudi uspešnost razvoja zdravil. Pri standardnem razvoju le približno 10 % zdravil preide iz faze I do končne odobritve (PhRMA, 2023). V nasprotju s tem imajo repozicionirana zdravila znatno višjo stopnjo uspešnosti, ki se giblje med 30 % in 75 %, saj so njihovi varnostni profili že znani (Chella idr., 2024). Kljub temu uspešnost ni zagotovljena, saj lahko učinkovitost in varnost zdravila

varirata glede na specifične pogoje njegove uporabe. Vendar pa neuspeh pri repozicioniranju pomeni bistveno nižje stroške v primerjavi z neuspelim razvojem novega zdravila (Slika 33).

Dodatne omejitve repozicioniranja (Slika 33) so povezane s patentno zaščito in finančnimi motivacijami farmacevtskih podjetij, ki niso vedno pripravljena vlagati sredstev v razvoj zdravil, za katera je zaščita intelektualne lastnine omejena (Chella idr., 2024). Poleg tega ima pomembno vlogo regulatorni okvir. Standardni razvoj zdravil zahteva celovito in pogosto dolgotrajno regulativno presojo, saj zdravilo prvič vstopa na trg in mora izpolnjevati vse zahteve zakonodajalca (v Evropi EMA, v Sloveniji JAZMP). Po drugi strani pa so za repozicionirana zdravila na voljo pospešeni regulatorni postopki, kot je 505(b)(2) v ZDA ali decentralizirani postopki v EU, ki omogočajo hitrejšo pot do trga (Chella idr., 2024).



Slika 33: Primerjava stroškov, časa in uspešnosti standardnega razvoja zdravil in repozicioniranja zdravil.

Povzeto po (Parisi idr., 2020) in narejeno z <https://BioRender.com>

Tržni potencial novih zdravil je visok, zlasti kadar ciljajo na neizpolnjene medicinske potrebe. V primerjavi s tem ima repozicioniranje nižji tržni potencial, vendar omogoča hitrejši prihod na trg in ustvarjanje prihodkov. Standardni razvoj zdravil je povezan z visokim tveganjem, saj varnost in učinkovitost novih spojin pogosto ostajata neznani. Po drugi strani je pri repozicioniranju tveganje manjše, saj so osnovni varnostni podatki že znani, vendar še vedno obstajajo regulatorna in tržna tveganja, povezana s spremembami odmerkov ali drugačno potjo uporabe (Chella idr., 2024).

Stroški po uvedbi na trg so pri standardnem razvoju zdravil višji, saj je potrebno njihovo dolgoročno spremljanje za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti. Pri repozicioniranju so ti stroški razmeroma nižji, saj so številni stranski učinki in tveganja že dokumentirani. Kljub temu imajo nova zdravila dolgotrajno ekskluzivnost, ki jo podpirajo osnovni patenti in dodatna zaščita trga. Nasprotno pa je ekskluzivnost repozicioniranih zdravil pogosto omejena in vezana zgolj na nove indikacije ali formulacije (Kodrič idr., 2024).

Vsako leto se v razvoj zdravil vlaga več finančnih sredstev, vendar njihova učinkovitost kljub temu upada, kar je posledica več dejavnikov. Znanstvena kompleksnost se povečuje, prav tako se razvojna cena viša zaradi uporabe naprednih tehnologij in sofisticirane opreme. Sčasoma je bilo treba usmeriti razvoj na terapevtska področja z večjimi zahtevami po inovacijah, ki so hkrati tudi bolj tvegana. Poleg tega se vse več začetnih projektov ustavi že v kliničnih testiranjih ali pa teh faz sploh ne doseže. To je posledica vse strožjih kriterijev za odobritev zdravil s strani regulatornih organov.

Eden od razlogov za zaostrovanje kriterijev je tudi dejstvo, da že obstoječa zdravila na trgu zmanjšujejo tržno vrednost še nerazvitih zdravil in s tem dvigujejo zahteve za njihovo odobritev. Posledično izkupiček prodaje vsakega uspešnega zdravila pogosto ne pokrije le lastnih razvojnih stroškov, temveč mora nadomestiti tudi stroške številnih neuspešnih učinkovin, ki so bile predčasno umaknjene iz kliničnih študij (**Preglednica 5**). To vodi v stalno rast stroškov razvoja novih zdravil (Kodrič idr., 2024). Na ta trend vplivajo tudi inflacija, vse bolj zapleteni razvojni načrti ter naraščajoči stroški kliničnih preizkušanj. Poleg tega se industrija vedno bolj osredotoča na kronične in degenerativne bolezni, ki so kompleksnejše in zahtevajo dolgotrajnejše raziskave ter večjo natančnost pri razvoju terapij.

Preglednica 5: Gibanje vloženi sredstev po letih v primerjavi s prihodki od prodaje zdravil.

Leto(n)	Vložena sredstva v R&R	Indeks povečanja n/1999	Prihodki od prodaje	Indeks povečanja n/1999
2022	95.769,42 €	424	502.556,89 €	346
2021	86.487,19 €	383	408.242,41 €	281
2020	79.781,39 €	353	372.052,18 €	256
2019	74.101,21 €	328	383.359,18 €	264
2018	67.460,00 €	299	345.226,36 €	238
2017	63.202,09 €	280	296.007,61 €	204
2016	59.208,87 €	262	290.774,32 €	200
2015	53.756,11 €	238	272.540,15 €	188
2014	40.085,21 €	177	215.343,55 €	148
2013	38.862,74 €	172	212.815,07 €	146
2012	38.595,58 €	171	222.692,56 €	153
2011	34.946,12 €	155	219.115,80 €	151
2010	38.251,34 €	169	219.697,90 €	151
2009	33.296,24 €	147	198.078,08 €	136
2008	32.215,87 €	143	194.458,53 €	134
2007	34.953,01 €	155	199.505,73 €	137
2006	32.629,84 €	144	193.323,01 €	133
2005	33.786,47 €	150	200.081,80 €	138
2004	27.177,23 €	120	169.266,50 €	117
2003	27.278,94 €	121	165.441,81 €	114
2002	29.572,04 €	131	183.878,90 €	127
2001	33.782,71 €	150	202.658,35 €	139
2000	27.975,07 €	124	173.112,63 €	119
1999	22.586,80 €	100	145.290,07 €	100

Da lahko zdravilo po zaključenih fazah kliničnega preizkušanja pride na trg in postane dostopno pacientom v Evropi, mora pridobiti dovoljenje za promet. Za zaščito javnega zdravja ter zagotavljanje dostopa do visokokakovostnih, varnih in učinkovitih zdravil je nujno, da se zdravilo pred tem registrira. Ta postopek ureja evropski regulativni sistem za zdravila, ki ga sestavljajo Evropska komisija, Evropska agencija za zdravila (EMA) ter 50 nacionalnih regulativnih organov iz evropskega prostora.

Vlogo za dovoljenje za promet mora vložiti proizvajalec ali sponzor novega zdravila, ki s tem zaprosi za uradno odobritev njegovega trženja. V Evropi obstajajo štiri različni postopki za pridobitev dovoljenja za promet: centralizirani postopek, decentralizirani postopek, nacionalni postopek in postopek z medsebojnim priznavanjem. Kljub razlikam med njimi so osnovna pravila in zahteve za zdravila v evropskem prostoru enaka, pri čemer mora Evropska komisija na koncu odobriti ali registrirati zdravilo.

Ko Evropska komisija izda dovoljenje za promet, se zdravilo lahko začne tržiti v državah članicah Evropske unije in Evropskega gospodarskega prostora. Enak postopek velja tudi za

repozicionirana zdravila, pri čemer ta običajno pridobijo dovoljenje za promet prek decentraliziranega postopka. Ta postopek se uporablja za zdravila, ki ne sodijo v centralizirani postopek, še niso bila odobrena v EU in bodo dostopna na trgu v več kot eni državi članici (Fras, 2022).

7.11. REZULTATI

Preglednica 6: Primerjava ključnih parametrov med standardnim razvojem in repozicioniranjem zdravil

(Chella idr., 2024; Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021).

Parameter	Standardni razvoj	Repozicioniranje
Stroški raziskav in razvoja	2,5 milijarde	300 mio.- 1,5 milijarde
Čas do lansiranja na trg	10–15 let	3-12 let
Uspešnost	10%	30 – 75%
Regulatorna zahtevnost	visoka	nižja
Tržni potencial	visok	nižji
Stroški kliničnih preizkusov	zelo visoki, faza 1 (2–6 milijonov), faza 2 (10–25 milijonov), faza 3 (100–300 milijonov), faza 4 (več milijonov letno)	nižji, ni faze 1 in/ali faze 2
Tveganje in negotovost	visoko	nižje
Stroški po uvedbi na trg	višji	nižji
Intelektualna lastnina	dolga ekskluzivnost	omejena

7.12. INTELEKTUALNA LASTNINA IN DOBIČKONOSNOST PRI REPOZICIONIRANJU ZDRAVIL

Kljub potencialnim prednostim, repozicioniranje zdravil ni doseglo večjega razmaha, predvsem zaradi finančnih ovir. Farmacevtska podjetja svojo dobičkonosnost gradijo na tržni ekskluzivnosti novih zdravil, ki jim omogoča prodajo po visokih cenah brez konkurence. FDA odobrena zdravila lahko pridobijo ekskluzivnost prek patentne zaščite ali zakonske in regulativne tržne ekskluzivnosti (Cha idr., 2018).

Ker repozicionirana zdravila niso nove kemične entitete, zanje ni mogoče vložiti novih patentov na sestavo, temveč le šibkejšje "use" patente za novo indikacijo. Ti patenti so težje uveljavljivi in ne preprečujejo predpisovanja generičnih različic zdravila za enako indikacijo (off-label uporaba), kar zmanjšuje potencialni dobiček. Poleg patentov podjetja iščejo druge oblike tržne ekskluzivnosti – za nova zdravila ta traja pet let, za zdravila s statusom sirote sedem let, za nove indikacije pa le tri leta. Z uvedbo daljše ekskluzivnosti za zdravila sirote

leta 1983 je število odobrenih terapij naraslo z 38 na več kot 350. Podobne spodbude bi lahko povečale interes za repozicioniranje zdravil (Murphy idr., 2012; Radley idr., 2006; Verbaanderd idr., 2017; Weth idr., 2024).

Glavna težava ostaja financiranje kliničnih preizkušanj faz II in III, ki so ključna za regulativno odobritev novih indikacij. Namesto tržne ekskluzivnosti in davčnih olajšav, bi lahko večje vlaganje v ta preizkušanja spodbudilo raziskave repozicioniranja (Mueller-Langer, 2013; Weth idr., 2024).

Verjetnost FDA odobritve za novo indikacijo je najvišja v prvih dveh letih po začetni registraciji zdravila, preden se pojavijo generiki. Farmacevtskim podjetjem je zato bolj smiselno vlagati v repozicioniranje lastnih patentiranih ali neuspešnih zdravil. Akademске in neprofitne organizacije, pa so bolj primerne za raziskave generičnih zdravil, saj že obstajajo podatki o njihovi učinkovitosti in varnosti (Cha idr., 2018; Weth idr., 2024; Wieder & Adam, 2022).

Čeprav farmacevtska industrija igra ključno vlogo pri razvoju zdravil, so raziskave uporabe off-patent zdravil pri raku večinoma izvedli v akademskih krogih. Vendar akademske ustanove pogosto nimajo znanja in virov za zagotavljanje tržne ekskluzivnosti. Zato postajajo sodelovanja med akademskimi raziskovalci in farmacevtskimi podjetji vedno pomembnejša, saj združujejo znanje o razvoju zdravil in premagujejo omejitve poslovnega modela industrije. Leta 2014 je britanski Medicinski raziskovalni svet omogočil dostop do 70 neuspešnih zdravil za repozicioniranje, v ZDA pa je podobno partnerstvo zagotovilo akademikom dostop do 58 spojin. Kljub pravnim in administrativnim izzivom takšna sodelovanja postajajo vse pogostejša, zlasti v obdobju po pandemiji COVID-19, kjer se spodbuja odprti dostop do podatkov (Krishnamurthy idr., 2022; Lee & Haupt, 2021; Radley idr., 2006; Weth idr., 2024).

Za razvoj zdravil za redke ali zanemarljive bolezni obstajajo tudi druge rešitve, kot so patentni skladi, odprte licence in vključevanje akademskih institucij v patentno lastništvo. Novi finančni modeli, ki vključujejo javno financiranje, tvegan kapital in neprofitne organizacije, lahko spodbudijo razvoj terapij za redke bolezni, kjer repozicioniranje igra ključno vlogo (Fetro, 2023; Roessler idr., 2021; Van Den Berg idr., 2021; Weth idr., 2024).

7.13. DISKUSIJA

Ko smo primerjali podatke iz več člankov, smo ugotovili, da se med seboj le malo razlikujejo in so v splošnem precej podobni. Repozicioniranje zdravil se izkazuje kot učinkovit pristop za pospeševanje razvoja zdravil, saj olajša številne korake v procesu.

Iz podatkov v **Preglednici 6** je razvidno, da je repozicioniranje stroškovno učinkovitejše v fazah do lansiranja na trg. Stroški repozicioniranja znašajo med 300 milijoni in 1,5 milijarde evrov, medtem ko konvencionalni razvoj zdravila stane v povprečju 2,5 milijarde evrov. To je predvsem zato, ker repozicionirana zdravila preskočijo prve ali celo druge klinične faze, kar pomeni znaten prihranek finančnih sredstev – v povprečju do dve milijardi evrov. Klinične faze namreč predstavljajo 44–66 % vseh stroškov razvoja zdravila (**Preglednica 4**).

Poleg stroškov je tudi čas do lansiranja zdravila na trg bistveno krajši pri repozicioniranju. Medtem ko razvoj novega zdravila traja v povprečju 10–15 let, lahko repozicioniranje skrajša

ta čas na 3 do 12 let, odvisno od specifične bolezni. Prav tako je uspešnost razvoja novih zdravil nizka – le 10 % novo razvitih zdravil uspešno prestane regulatorne zahteve in dejansko pride na trg.

Konvencionalni razvoj zdravil zajema vse faze razvoja. Najprej je treba identificirati potencialne kandidate in jih optimizirati za doseg najboljših rezultatov. Nato sledijo klinične faze I–III, kjer se zdravilo postopoma testira na vse večji populaciji. Po uspešno zaključenih kliničnih fazah sledita postopka farmakovigilance in avtorizacije, skozi katere uspešno prestane le 10 % novo razvitih zdravil. Ko je zdravilo že na trgu, se izvaja še IV. faza kliničnih preizkušanj, v kateri se nadalje spremlja njegovo varnost in učinkovitost pri široki uporabi.

Regulatorna zahtevnost je tako pri repozicioniranih zdravilih nižja, saj z njimi preskočimo nekatere korake razvoja. Ta grejo večinoma samo čez klinično fazo III (nekatera tudi fazo II). Prav tako sta njihova avtorizacija in farmakovigilanca precej manj zahtevni, saj je bilo zdravilo že avtorizirano, njegovi stranski učinki že pregledani in se zato preverjajo samo spremembe do katerih bi lahko prišlo zaradi drugačne doze zdravila. Ravno tako temu sledi faza IV, ko je repozicionirano zdravilo že na trgu in v uporabi. Tako se pri teh zdravilih ravno zaradi tega, ker nipotrebno opraviti vseh korakov kot pri novo razvitih zdravilih, tako prihrani stroške in čas.

Uspešnost že znanih zdravil je praviloma višja, saj so njihovi varnostni profili dobro dokumentirani, regulatorne zahteve pa manj stroge. Ko zdravilo enkrat doseže trg, pa se situacija nekoliko spremeni.

Tržni potencial novo razvitih zdravil je visok, saj delujejo na nove tarče in zdravijo bolezni, za katere še ni učinkovitih terapij, kar pomeni, da na trgu nimajo neposredne konkurence. Nasprotno pa je tržni potencial repozicioniranih zdravil običajno nižji, saj že obstajajo podobna zdravila, ki ciljajo na iste bolezni. Posledično je povpraševanje po teh zdravilih manjše (čeprav še vedno pomembno), saj so namenjena zdravljenju že dobro poznanih bolezenskih stanj.

To vpliva tudi na zaščito intelektualne lastnine. Nova zdravila imajo zaradi svoje inovativnosti patentno zaščito, ki podjetjem zagotavlja določeno obdobje tržne ekskluzivnosti brez konkurence (*REGULATORNA ZAŠČITA PODATKOV: Premostitev naložbene vrzeli na področju R&R med Evropo in drugimi regijami sveta*, b. d.).

Pridobitev patenta za repozicionirana zdravila je pogosto zahtevnejša, saj ni nujno, da lahko ta zdravila pridobijo novo patentno zaščito. Če je patent za določeno zdravilo že potekel, to ne predstavlja večjih težav, saj je zdravilo v javni domeni. Če pa je zdravilo še vedno zaščiteno s patentom, je za njegovo repozicioniranje potrebna odobritev podjetja, ki ima lastniške pravice, kar lahko vključuje podaljšanje obstoječega patenta ali pridobitev novega. Zaradi teh omejitev je intelektualna lastnina repozicioniranih zdravil pogosto manj trdna in lahko predstavlja regulatorne ter pravne izzive (Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021).

Repozicioniranje zdravil se je izkazalo kot stroškovno učinkovitejša alternativa konvencionalnemu razvoju novih zdravil. Glavna prednost tega pristopa je možnost preskoka zgodnjih faz razvoja, vključno s predkliničnimi študijami in pogosto tudi kliničnimi fazami I in II. Ta skrajšan razvojni cikel omogoča znatno zmanjšanje stroškov – v povprečju se lahko

stroški zmanjšajo za do dve milijardi evrov, prav tako pa se celoten razvojni čas skrajša za več let. Medtem ko razvoj novega zdravila običajno traja 10–15 let, lahko repozicioniranje skrajša ta proces na 3 do 12 let, odvisno od specifične bolezni in regulatornih zahtev. Regulatorni postopki so pri repozicioniranih zdravilih običajno manj zahtevni, saj je njihov varnostni profil že potrjen, kar zmanjšuje obseg potrebnih kliničnih testiranj. Poleg tega imajo repozicionirana zdravila višjo stopnjo uspešnosti, saj se izognejo zgodnjim fazam razvoja, kjer odpade največ kandidatov za nova zdravila.

Na podlagi analize dostopnih podatkov lahko potrdimo hipotezo, da je repozicioniranje zdravil stroškovno učinkovitejše od konvencionalnega razvoja. Podatki jasno kažejo, da preskok zgodnjih kliničnih faz znatno skrajša razvojni cikel in zmanjša stroške. Prav tako je stopnja uspešnosti repozicioniranih zdravil višja, saj so varnostni profili že znani, regulatorne zahteve pa manj obsežne. Zaradi teh prednosti lahko podjetja hitreje in z nižjimi stroški pripeljejo zdravila na trg, kar jim omogoča konkurenčno prednost.

Kljub prednostim v fazi razvoja pa repozicionirana zdravila pogosto dosegajo nižji tržni potencial v primerjavi z novo razvitimi zdravili. Eden ključnih razlogov za to je dejstvo, da so ta zdravila namenjena zdravljenju že znanih bolezni, kjer na trgu že obstaja konkurenca. Nasprotno pa nova zdravila ciljajo na nove terapevtske tarče brez obstoječih alternativ, kar jim omogoča večjo tržno ekskluzivnost.

Poleg konkurence je pomemben dejavnik tudi patentna zaščita. Nova zdravila imajo zaradi svoje inovativnosti močno patentno zaščito, ki podjetjem omogoča tržno ekskluzivnost in posledično večjo donosnost. V Evropi patentna zaščita za biološka zdravila in male molekule traja 11 let, kar podjetjem omogoča dolgoročno zaščito pred konkurenco. Pri repozicioniranih zdravilih pa je patentna zaščita pogosto problematična – če je zdravilo že izgubilo patent, je izjemno težko pridobiti novo zaščito. To omogoča konkurenci, da hitro razvije generične različice, kar zmanjšuje profitabilnost repozicioniranega zdravila. Če pa je zdravilo še vedno zaščiteno s patentom, je za njegovo repozicioniranje potrebna odobritev lastnika patenta, kar lahko predstavlja dodatne pravne in finančne izzive.

Drugo hipotezo, da je tržni potencial repozicioniranih zdravil nižji v primerjavi z novo razvitimi zdravili ter da nanj vplivajo regulatorne zahteve in intelektualna lastnina, lahko delno potrdimo. Res je, da repozicionirana zdravila pogosto ciljajo na indikacije, kjer že obstaja konkurenca, kar zmanjšuje njihovo tržno vrednost. Prav tako je intelektualna lastnina teh zdravil pogosto šibkejša, saj patentna zaščita bodisi ni možna bodisi zahteva dodatne pravne postopke.

Kljub tem omejitvam pa repozicionirana zdravila še vedno predstavljajo pomembno tržno priložnost, predvsem na specifičnih področjih, kot so zdravljenje redkih bolezni (orphan drugs). Na teh področjih je konkurenca omejena, medicinske potrebe pa pogosto niso izpolnjene, kar lahko pomeni visoko tržno vrednost in daljšo ekskluzivnost. V teh primerih lahko repozicioniranje omogoči hitrejši dostop do novih terapevtskih rešitev, kar prinaša tako ekonomske kot družbene koristi.

Vendar pa dolgoročna profitabilnost repositioniranih zdravil ostaja vprašljiva, saj je močno odvisna od regulatornih, tržnih in intelektualnih dejavnikov. Zaradi tega morajo podjetja pred odločitvijo o repositioniranju temeljito analizirati tako regulatorne zahteve kot ekonomske dejavnike, da bi zagotovila trajnostni poslovni model in dolgoročno uspešnost zdravila (Weth idr., 2024, 2024; Xia idr., 2024).

8. ZAKLJUČEK

Rak ostaja eden izmed vodilnih vzrokov smrti po vsem svetu, pri čemer stroški zdravljenja naraščajo do izredno visokih ravni. Povprečni strošek letnega zdravljenja lahko presega 100.000 EUR, kar predstavlja veliko finančno obremenitev za zdravstvene sisteme, zavarovalnice in bolnike. Kljub visokim stroškom pa številne nove terapije prinašajo zgolj marginalne izboljšave v preživetju, kar postavlja pod vprašaj njihovo stroškovno učinkovitost. Zato se pojavlja vse večje zanimanje za repozicioniranje zdravil, ki lahko pomeni racionalno in stroškovno učinkovito strategijo za izboljšanje dostopnosti in učinkovitosti zdravljenja raka.

Repozicioniranje zdravil se osredotoča na ponovno uporabo obstoječih, že odobrenih zdravil za nove indikacije, v tem primeru za zdravljenje raka. Ključne prednosti tega pristopa vključujejo:

- **Hitrejši razvoj:** Ker so ta zdravila že prešla klinična preskušanja za varnost, lahko hitreje dosežejo fazo klinične uporabe za nove indikacije.
- **Zmanjšana toksičnost:** Več zdravil ima znane varnostne profile, kar zmanjšuje tveganje za resne neželene učinke v primerjavi z novo sintetiziranimi učinkovinami.
- **Povečana učinkovitost:** Uporaba repozicioniranih zdravil v kombinacijah lahko izboljša terapevtske rezultate, zmanjša odmerke in cilja na več signalnih poti hkrati.
- **Boj proti odpornosti na terapije:** Kombinacije repozicioniranih zdravil s kemoterapevtiki lahko pomagajo pri premagovanju mehanizmov odpornosti.

Usmeritev v ciljanje ključnih mutiranih ali regulativnih proteinov in signalnih poti v rakavih celicah je racionalen pristop k optimizaciji zdravljenja. Hkrati pa kombiniranje repozicioniranih zdravil z obstoječimi kemoterapevtiki omogoča sinergijske učinke, ki lahko zmanjšajo pojavnost odpornosti na terapijo. Kljub temu trenutni raziskovalni sistem ni optimalno naravnana za podporo raziskavam kombinacij zdravil, kar zahteva spremembe v kliničnem raziskovalnem modelu.

Za financiranje raziskav na področju repozicioniranja zdravil so ključnega pomena sodelovanja med akademskimi institucijami, farmacevtsko industrijo, vladnimi organizacijami, neprofitnimi skladi in filantropskimi organizacijami. Ena izmed glavnih ovir pri repozicioniranju zdravil so patentne omejitve in regulativne ovire, saj se farmacevtska podjetja pogosto izogibajo vlaganju v zdravila, ki ne prinašajo visokih donosov na investicijo. Zato je nujno vzpostaviti mehanizme financiranja in podporne sisteme za izvedbo kliničnih raziskav, ki bodo omogočili večjo dostopnost repozicioniranih zdravil.

Napredne bioinformatične metode, umetna inteligenca in analiza velikih podatkov omogočajo sistematično iskanje novih terapevtskih indikacij za že obstoječa zdravila ali učinkovine. Prav tako lahko sodobne dostavne tehnologije povečajo učinkovitost in selektivnost repozicioniranih zdravil ter zmanjšajo njihovo toksičnost. Kljub obetavnim prednostim pa je bilo le malo repozicioniranih zdravil dejansko uvedenih v onkološko zdravljenje, kar nakazuje potrebo po boljših strategijah kliničnega preizkušanja.

Čeprav repozicioniranje zdravil ne bo nadomestilo potrebe po razvoju novih zdravil, predstavlja izjemno pomemben dodatek k obstoječim strategijam zdravljenja raka. S pravilnim usmerjanjem raziskav, financiranja in regulativnih prilagoditev lahko postane eden ključnih načinov za izboljšanje terapevtskih izidov, zmanjšanje stroškov zdravljenja in povečanje dostopnosti inovativnih onkoloških terapij za širši krog bolnikov (Weth idr., 2024, 2024; Xia idr., 2024).

9. VIRI

- Adair, F. E., & Bagg, H. J. (1931). Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichlorethylsulphide (mustard gas): *Annals of Surgery*, 93(1), 190–199. <https://doi.org/10.1097/00000658-193101000-00026>
- Aertgeerts, K., Skene, R., Yano, J., Sang, B.-C., Zou, H., Snell, G., Jennings, A., Iwamoto, K., Habuka, N., Hirokawa, A., Ishikawa, T., Tanaka, T., Miki, H., Ohta, Y., & Sogabe, S. (2011). Structural Analysis of the Mechanism of Inhibition and Allosteric Activation of the Kinase Domain of HER2 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18756–18765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.206193>
- Al Khzem, A. H., Gomaa, M. S., Alturki, M. S., Tawfeeq, N., Sarafroz, M., Alonaizi, S. M., Al Faran, A., Alrumaihi, L. A., Alansari, F. A., & Alghamdi, A. A. (2024). Drug Repurposing for Cancer Treatment: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12441. <https://doi.org/10.3390/ijms252212441>
- Alam, M. S., Sultana, A., Sun, H., Wu, J., Guo, F., Li, Q., Ren, H., Hao, Z., Zhang, Y., & Wang, G. (2022). Bioinformatics and network-based screening and discovery of potential molecular targets and small molecular drugs for breast cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 942126. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.942126>
- Al-Taie, Z., Hannink, M., Mitchem, J., Papageorgiou, C., & Shyu, C.-R. (2021). Drug Repositioning and Subgroup Discovery for Precision Medicine Implementation in Triple Negative Breast Cancer. *Cancers*, 13(24), 6278. <https://doi.org/10.3390/cancers13246278>
- Balbuena-Rebolledo, I., Padilla-Martínez, I. I., Rosales-Hernández, M. C., & Bello, M. (2021). Repurposing FDA Drug Compounds against Breast Cancer by Targeting EGFR/HER2. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(8), 791. <https://doi.org/10.3390/ph14080791>
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Boyd, K. A., Fenwick, E., & Briggs, A. (2010). Using an iterative approach to economic evaluation in the drug development process. *Drug Development Research*, 71(8), 470–477. <https://doi.org/10.1002/ddr.20421>
- Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I. J., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko, R., Zeskind, B., Risso, S., Kagan, E., Papapetropoulos, S., Grossman, I., & Laifenfeld, D. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British Journal of Pharmacology*, 175(2), 168–180. <https://doi.org/10.1111/bph.13798>
- Chella, N., Ranjan, O. P., & Alexander, A. (Ur.). (2024). *Drug Repurposing: Innovative Approaches to Drug Discovery and Development*. Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-97-5016-0>
- Coleman, R., Hadji, P., Body, J.-J., Santini, D., Chow, E., Terpos, E., Oudard, S., Bruland, Ø., Flamen, P., Kurth, A., Van Poznak, C., Aapro, M., & Jordan, K. (2020). Bone health in cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*, 31(12), 1650–1663. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.019>

- Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. (2021). *Repurposing of medicines – the underrated champion of sustainable innovation. Policy brief*. IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>
- Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K. A., Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J. A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N. H., Morrow, M., Lippman, M. E., Black, D., Glusman, J. E., Costa, A., & Jordan, V. C. (1999). The Effect of Raloxifene on Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women: Results From the MORE Randomized Trial. *JAMA*, *281*(23), 2189. <https://doi.org/10.1001/jama.281.23.2189>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- Fetro, C. (2023). Connecting academia and industry for innovative drug repurposing in rare diseases: It is worth a try. *Rare Disease and Orphan Drugs Journal*, *2*(2), 7. <https://doi.org/10.20517/rdodj.2023.06>
- Goutsouliak, K., Veeraraghavan, J., Sethunath, V., De Angelis, C., Osborne, C. K., Rimawi, M. F., & Schiff, R. (2020). Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *17*(4), 233–250. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0299-9>
- Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *135*(1), 55–62. <https://doi.org/10.5858/2010-0454-RAR.1>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2025). PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Research*, *53*(D1), D1516–D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>
- Knox, C., Wilson, M., Klinger, C. M., Franklin, M., Oler, E., Wilson, A., Pon, A., Cox, J., Chin, N. E. (Lucy), Strawbridge, S. A., Garcia-Patino, M., Kruger, R., Sivakumaran, A., Sanford, S., Doshi, R., Khetarpal, N., Fatokun, O., Doucet, D., Zubkowski, A., ... Wishart, D. S. (2024). DrugBank 6.0: The DrugBank Knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Research*, *52*(D1), D1265–D1275. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad976>
- Kodrič, M., Novljan, J., Pregelj, D., Rebselj, J., Rihtaršič, M., & Časar, Z. (2024). Licenciranje v farmacevtski industriji: Trendi in strategije. *Anali PAZU HD*, *10*(1–2), 47–87. <https://doi.org/10.18690/analipazuhd.10.1-2.47-87.2024>
- Krishnamurthy, N., Grimshaw, A. A., Axson, S. A., Choe, S. H., & Miller, J. E. (2022). Drug repurposing: A systematic review on root causes, barriers and facilitators. *BMC Health Services Research*, *22*(1), 970. <https://doi.org/10.1186/s12913-022-08272-z>
- Lee, H., Kang, S., & Kim, W. (2016). Drug Repositioning for Cancer Therapy Based on Large-Scale Drug-Induced Transcriptional Signatures. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150460>
- Lee, J. J., & Haupt, J. P. (2021). Scientific globalism during a global crisis: Research collaboration and open access publications on COVID-19. *Higher Education*, *81*(5), 949–966. <https://doi.org/10.1007/s10734-020-00589-0>

- Li, J., & Mansmann, U. R. (2013). Modeling of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Effect within Signaling Pathways and miRNA-Regulation Pathways. *PLoS ONE*, 8(8), e72477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072477>
- Liu, Y., Yang, X., Gan, J., Chen, S., Xiao, Z.-X., & Cao, Y. (2022). CB-Dock2: Improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W159–W164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>
- Martindale, W., & Sweetman, S. C. (Ur.). (2009). *Martindale: The complete drug reference* (36. ed). Pharmaceuticale Press, PhP.
- Matos, E. (2008). Novosti v dopolnilnem zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojke. *Onkologija (Ljubljana), letnik 12(številka 1)*, 57–60.
- Meng, Y., Lu, C., Jin, M., Xu, J., Zeng, X., & Yang, J. (2022). A weighted bilinear neural collaborative filtering approach for drug repositioning. *Briefings in Bioinformatics*, 23(2), bbab581. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab581>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mueller-Langer, F. (2013). Neglected infectious diseases: Are push and pull incentive mechanisms suitable for promoting drug development research? *Health Economics, Policy and Law*, 8(2), 185–208. <https://doi.org/10.1017/S1744133112000321>
- Murphy, S. M., Puwanant, A., Griggs, R. C., & the Consortium for Clinical Investigations of Neurological Channelopathies (CINCH) and Inherited Neuropathies Consortium (INC) Consortia of the Rare Disease Clinical Research Network. (2012). Unintended effects of orphan product designation for rare neurological diseases. *Annals of Neurology*, 72(4), 481–490. <https://doi.org/10.1002/ana.23672>
- M.violante. (2007). [Graphic].
- NOVARTIS. (2022). *Izvid-metastatski-HER2+ rak dojke*.
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Parisi, D., Adasme, M. F., Sveshnikova, A., Bolz, S. N., Moreau, Y., & Schroeder, M. (2020). Drug repositioning or target repositioning: A structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1043–1055. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.004>
- Pegram, M. D., Konecny, G., & Slamon, D. J. (2000). The Molecular and Cellular Biology of HER2/neu Gene Amplification/Overexpression and the Clinical Development of Herceptin (Trastuzumab) Therapy for Breast Cancer. V W. J. Gradishar & W. C. Wood (Ur.), *Advances in Breast Cancer Management* (Let. 103, str. 57–75). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3147-7_4
- PhRMA. (2023, julij). *Emerging Value in Oncology HOW ONGOING RESEARCH EXPANDS THE BENEFITS OF ONCOLOGY MEDICINES*.

- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Radley, D. C., Finkelstein, S. N., & Stafford, R. S. (2006). Off-label Prescribing Among Office-Based Physicians. *Archives of Internal Medicine*, 166(9), 1021. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.9.1021>
- REGULATORNA ZAŠČITA PODATKOV: Premostitev naložbene vrzeli na področju R&R med Evropo in drugimi regijami sveta. (b. d.). https://www.farmaforum.si/sites/43/files/files/Fokus/Intelektualna%20lastnina/RDP_infographic_SL.pdf
- Ribnikar, D., Fink, Š., Frković-Grazio, S., Lešničar, H., Sadikov, A., & Čufer, T. (2008). Potek bolezni pri bolnicah s HER-2 pozitivnim rakom dojk. *Onkologija (Ljubljana), letnik 12*(številka 2), 94–98.
- Roessler, H. I., Knoers, N. V. A. M., Van Haelst, M. M., & Van Haaften, G. (2021). Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(4), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.01.003>
- Sacco, K., & Grech, G. (2015). Actionable pharmacogenetic markers for prediction and prognosis in breast cancer. *EPMA Journal*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13167-015-0037-z>
- Sertkaya A & Franz C. (2022). *Antimicrobial Drugs Market Returns Analysis: Final Report*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK603192/>
- shaip. (2024). *Anotacija medicinskih podatkov*. <https://sl.shaip.com/solutions/medical-data-annotation/>
- Toumi, M., & Rémuzat, C. (2017). Value added medicines: What value repurposed medicines might bring to society? *Journal of Market Access & Health Policy*, 5(1), 1264717. <https://doi.org/10.1080/20016689.2017.1264717>
- Van Den Berg, S., De Visser, S., Leufkens, H. G. M., & Hollak, C. E. M. (2021). Drug Repurposing for Rare Diseases: A Role for Academia. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 746987. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.746987>
- Verbaanderd, C., Meheus, L., Huys, I., & Pantziarka, P. (2017). Repurposing Drugs in Oncology: Next Steps. *Trends in Cancer*, 3(8), 543–546. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.007>
- Vernieri, C., Milano, M., Brambilla, M., Mennitto, A., Maggi, C., Cona, M. S., Prisciandaro, M., Fabbroni, C., Celio, L., Mariani, G., Bianchi, G. V., Capri, G., & De Braud, F. (2019). Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 139, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.05.001>
- Vitali, F., Cohen, L. D., Demartini, A., Amato, A., Eterno, V., Zambelli, A., & Bellazzi, R. (2016). A Network-Based Data Integration Approach to Support Drug Repurposing and Multi-Target Therapies in Triple Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, 11(9), e0162407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162407>

- Wang, J., Zhu, X., Chen, K., Hao, L., & Liu, Y. (2023). HAHNet: A convolutional neural network for HER2 status classification of breast cancer. *BMC Bioinformatics*, 24(1), 353. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05474-y>
- Weth, F. R., Hoggarth, G. B., Weth, A. F., Paterson, E., White, M. P. J., Tan, S. T., Peng, L., & Gray, C. (2024). Unlocking hidden potential: Advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 130(5), 703–715. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02502-9>
- Whirl-Carrillo, M., Huddart, R., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Whaley, R., & Klein, T. E. (2021). An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 110(3), 563–572. <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>
- WHO Mortality Database – with minor processing by Our World in Data. (2024). *Data Page: Leading cancer types causing death in women*.
- Wieder, R., & Adam, N. (2022). Drug repositioning for cancer in the era of AI, big omics, and real-world data. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 175, 103730. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103730>
- Xia, Y., Sun, M., Huang, H., & Jin, W.-L. (2024). Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01808-1>
- Ye, Q., Raese, R. A., Luo, D., Feng, J., Xin, W., Dong, C., Qian, Y., & Guo, N. L. (2023). MicroRNA-Based Discovery of Biomarkers, Therapeutic Targets, and Repositioning Drugs for Breast Cancer. *Cells*, 12(14), 1917. <https://doi.org/10.3390/cells12141917>
- Yu, K., Basu, A., Yau, C., Wolf, D. M., Goodarzi, H., Bandyopadhyay, S., Korkola, J. E., Hirst, G. L., Asare, S., DeMichele, A., Hylton, N., Yee, D., Esserman, L., Van 'T Veer, L., & Sirota, M. (2023). Computational drug repositioning for the identification of new agents to sensitize drug-resistant breast tumors across treatments and receptor subtypes. *Frontiers in Oncology*, 13, 1192208. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1192208>
- Yu, L., Zhao, J., & Gao, L. (2018). Predicting Potential Drugs for Breast Cancer based on miRNA and Tissue Specificity. *International Journal of Biological Sciences*, 14(8), 971–982. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23350>
- Zhang, Z., Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., Zhang, T., Cui, Y., & Huang, C. (2020). Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00213-8>
- Zhao, H., Jin, G., Cui, K., Ren, D., Liu, T., Chen, P., Wong, S., Li, F., Fan, Y., Rodriguez, A., Chang, J., & Wong, S. T. (2013). Novel Modeling of Cancer Cell Signaling Pathways Enables Systematic Drug Repositioning for Distinct Breast Cancer Metastases. *Cancer Research*, 73(20), 6149–6163. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4617>
- Zhou, H., Liu, H., Yu, Y., Yuan, X., & Xiao, L. (2023). Informatics on Drug Repurposing for Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 17, 1933–1943. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S417563>