

INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE PRI ODKRIVANJU IN VREDNOTENJU ZDRAVILNIH UČINKOVIN

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN DRUG DISCOVERY

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Jaka Rotman Primec, mag. farm.
Zala Krajšek

asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: dunja.urbancic@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Inducirane pluripotentne matične celice so v zadnjih letih postale pomembno orodje za odkrivanje zdravilnih učinkovin, saj ponujajo bistvene prednosti pred tradicionalnimi modeli, kot so primarne celice, rakave celične linije in živalski modeli. Pridobimo jih z reprogramiranjem somatskih celic v pluripotentno stanje, kar omogoča njihovo diferenciacijo v različne tipe celic ob ohranjanju dedne informacije posameznika. Pri uporabi induciranih pluripotentnih matičnih celic za odkrivanje zdravilnih učinkovin je na voljo več modelov, vključno z dvodimenzionalnimi kulturami, enostavnejšimi tridimenzionalnimi modeli in naprednejšimi modeli – organi na čipu. Tovrstni modeli omogočajo natančnejšo oceno toksičnosti in učinkovitosti zdravilnih učinkovin, njihovih medsebojnih interakcij ter proučevanje mehanizmov bolezni. Izzivi, s katerimi se soočamo ob uporabi induciranih pluripotentnih matičnih celic, so: njihova nezadostna zrelost, variabilnost med pridobljenimi celičnimi linijami in visoki stroški, kar trenutno omejuje njihovo širšo uporabo v farmaciji. Kljub tem omejitvam imajo inducirane pluripotentne matične celice velik potencial za razvoj personaliziranih oblik zdravljenja in odkrivanje novih terapevtskih pristopov.

KLJUČNE BESEDE:

celični modeli *in vitro*, inducirane pluripotentne matične celice, odkrivanje novih zdravilnih učinkovin, predklinične študije

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells have become an important tool for drug discovery in recent years, offering significant advantages over traditional models, such as primary cells, cancer cell lines, and animal models. These cells are derived by reprogramming somatic cells into a pluripotent state, allowing differentiation into various cell types while retaining the genetic information of the individual. In drug discovery, models from induced pluripotent stem cells encompass two-dimensional cultures, three-dimensional models, and more sophisticated organs-on-a-chip. These advanced models enable more accurate assessment of drug toxicity and efficacy, compound interactions, as well as detailed studies of disease mechanisms. However, challenges in application of induced pluripotent



stem cells remain, including limited cellular maturity, variability across obtained cell lines, and high costs, which currently restrict their broader use in the pharmaceutical field. Despite these limitations, induced pluripotent stem cells hold great promise for the development of personalised therapies and the discovery of novel therapeutic approaches.

KEY WORDS:

drug discovery, induced pluripotent stem cells, *in vitro* cell models, preclinical studies

1 UVOD

Pot odkrivanja novih zdravilnih učinkovin od optimizacije spojine vodnice do pridobivanja dovoljenja za promet je dolga in kompleksna. Že v fazi predkliničnega preskušanja od 1.000 testiranih spojin le ena vstopi v klinične študije. Od tistih, ki pridejo v fazo I kliničnih preskušanj, jih manj kot 10 % zaključi celoten proces (1). Glavni razlogi za neuspeh v kliničnih študijah so nezadostna učinkovitost (40–50 %), visoka toksičnost (30 %) in slabe fizikalno-kemijske lastnosti spojin (10–15 %) ter preslabo poznavanje potreb na trgu (10 %) (2). Predvsem prva dva vzroka sta v veliki meri posledica bodisi neuporabe ali nedostopnosti ustreznih celičnih ali živalskih modelov v predkliničnih preskušanjih oziroma izbire takih, ki ne posnemajo dovolj natančno (pato)fizioloških procesov v človeškem telesu (3).

Predklinični celični in živalski modeli so namenjeni določanju molekularnih mehanizmov bolezni, odkrivanju tarč zdravilnih učinkovin in razvoju novih terapevtskih pristopov (4). V ta namen se največ uporabljajo živalski modeli, kulture primarnih celic in celične linije, ki so bodisi imortalizirane ali pridobljene iz tumorjev. Vsak izmed teh modelov ima svoje prednosti in slabosti:

- Živalski modeli predstavljajo mnogocelični, kompleksen organizem, na katerem lahko v pogojih *in vivo* proučujemo sistemski odziv na spojino. Predstavljajo sicer zlati standard za izvajanje testiranj, vendar lahko, v primerjavi s človeškim telesom, modelne živali izkazujejo velike razlike v fiziologiji (npr. imunski odziv), metabolizmu, signalnih poteh in genetiki. Te razlike lahko vodijo v zmotno sklepanje o varnosti in učinkovitosti proučevanih spojin v človeškem organizmu, kar je lahko vzrok za nadaljnja neuspešna klinična preskušanja. Poleg tega v prizadevanjih

po zmanjšanju števila poskusnih živali stremimo k uveljavljanju načela 3R (angl. *replacement, reduction, refinement*), s katerim želimo v predkliničnih študijah nadomestiti živalske modele, zmanjšati število poskusnih živali in/ali izboljšati eksperimentalne pogoje za živali (4–6).

- Primarne celice, ki jih uporabljamo za testiranje potencialnih novih učinkovin, predstavljajo dober model v smislu opazovanja inter-individualnih razlik v odzivu na učinkovino med bolniki. Te celice namreč lahko pridobimo neposredno od različnih bolnikov, pri čemer niso podvržene transformacijam ali genskim modifikacijam. Slaba stran tovrstnih modelov je predvsem oteženo vzdrževanje celičnih kultur, saj imajo primarne celice omejeno število delitev preden senescirajo. Poleg tega je številne med njimi, npr. nevrone in kardiomiocite, težko pridobiti oz. izolirati v za raziskavo relevantnem stadiju bolezni (4–6).
- Celične kulture rakavih celic se v monokulturah tradicionalno uporabljajo bodisi za določanje toksičnosti spojin ali učinkovitosti citostatikov pri rakavih obolenjih. Ker so naravno ali spodbujeno imortalizirane, se lahko v pogojih *in vitro* neomejeno delijo. Čeprav so pomembne za določanje osnovnih značilnosti odziva patološko spremenjenega biološkega sistema na učinkovine, številne tumorske celične linije vsebujejo neželene genetske in kromosomske spremembe, ki lahko močno vplivajo na predvidljivost odziva preskušanih učinkovin v pogojih *in vivo* (4–6).

V zadnjih 15 letih so se razmahnile tehnologije, ki so spodbudile razvoj in povečale kompleksnost sistemov za testiranje potencialnih zdravilnih učinkovin. Eno od pomembnejših odkritij je nedvomno reprogramiranje somatskih celic v pluripotentne matične celice, ki jih nato lahko s pomočjo ustreznih protokolov *in vitro* diferenciramo v skoraj vse vrste celic odraslega organizma. Tovrstne celice imenujemo inducirane pluripotentne matične celice (angl. *induced pluripotent stem cells*; iPSC). Z njihovo uporabo presežemo marsikatero težavo drugih testnih modelov, saj iPSC ohranjajo genetske značilnosti posameznika, se v nediferencirani obliki lahko neomejeno delijo, lahko jih diferenciramo v različne vrste celic in oblikujemo v organoidne sisteme, izkazujejo pa tudi zelo podobne odzive na zdravilne učinkovine, kot jih celice v pogojih *in vivo* (7).

2 MATIČNE CELICE IN INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE

Matične celice so celice, ki imajo edinstveno zmožnost, da se delijo in diferencirajo v različne tipe somatskih celic.

Preglednica 1: Osnovna delitev matičnih celic glede na zmožnosti njihove diferenciacije (9).

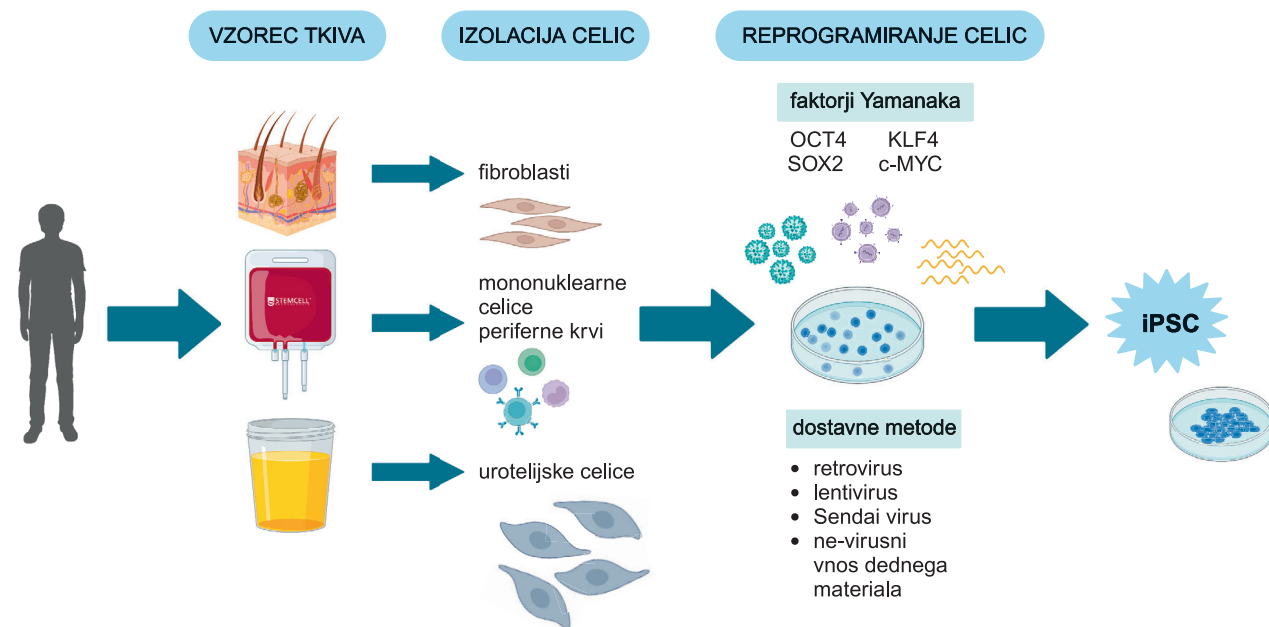
Table 1: Basic classification of stem cells according to their differentiation potential (9).

Totipotentne celice:	imajo največji potencial za diferenciacijo, iz njih lahko nastane nov organizem v celoti.
Pluripotentne celice:	se lahko diferencirajo do skoraj vseh vrst somatskih celic razen embrionalnih in tako tvorijo vse tri tipe tkiv (ektoderm, mezoderm in endoderm).
Multipotentne celice:	imajo omejeno zmožnost diferenciacije in se lahko razvijejo le do specifičnih vrst celic (npr. krvotvorne matične celice).

Slednjo sposobnost imenujemo potentnost oz. plastičnost (preglednica 1). Verjetno najbolj znane matične celice so embrionalne matične celice (angl. *embryonic stem cells*; ESC), ki izvirajo iz zgodnjih faz razvoja zarodka in so bodisi toti- (vsaka od celic po delitvah zigote do morule) ali pluripotentne (notranja celična masa blastociste), torej se lahko razvijejo v vse vrste celic, tkiv in organov. Nekatere celice tekom nadaljnjega razvoja organizma ostanejo ves čas multipotentne zaradi posebnih okoliških signalov in regulacije genov, ki preprečujejo njihovo dokončno specializacijo. Te somatske matične celice so v telesu odgovorne za

obnavljanje in popravilo celic in tkiv tako v otroštvu kot tudi v odrasli dobi, saj se lahko ob določenih okoliščinah diferencirajo v zrele somatske celice določenega tkiva ali organa (krvne celice, kožne epiteljske celice, mišične celice itn.). Potentnost matične celice ohranjajo z aktivacijo specifičnih signalnih poti in z izražanjem transkripcijskih dejavnikov, ki omogočajo, da celice obdržijo nezrelo stanje in sposobnost diferenciacije (8).

Leta 2006 je japonski znanstvenik Shinya Yamanaka odkril, da lahko iz zrelih, dokončno diferenciranih somatskih celic, pridobimo pluripotentne celice, ki jih lahko nadalje pretvo-

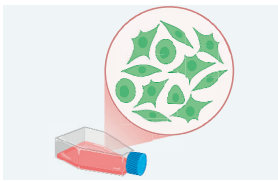
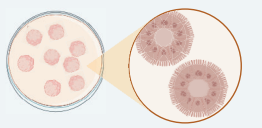


Slika 1: Shematska predstavitev poteka pridobivanja iPSC (iPSC - inducirane pluripotentne matične celice, OCT4 – oktamer vezoči transkripcijski dejavnik 4, SOX2 – z zaporedjem SRY povezan transkripcijski dejavnik, KLF4 – Krüppel podoben dejavnik 4, c-MYC – protoonkogen transkripcijski dejavnik s strukturnim motivom bazična vijačnica-zanka-vijačnica). Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/r86y164>) (12).

Figure 1: Schematic presentation of the iPSCs generation process (iPSCs – induced pluripotent stem cells, OCT4 – octamer-binding transcription factor 4, SOX2 – sex determining region Y-box2 transcription factor, KLF4 – Krüppel-like factor 4, c-MYC – proto-oncogene basic helix-loop-helix transcription factor). Created in Biorender (<https://BioRender.com/r86y164>) (12).

rimo oz. diferenciramo v katerokoli drugo vrsto celic (10). Dokazal je, da lahko to storimo z reaktivacijo 4 specifičnih genov, in sicer *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* in *c-MYC*, ki jih danes poznamo pod imenom faktorji Yamanaka (angl. *Yamanaka factors*) oz. faktorji OSKM. Yamanaka je faktorje OSKM z retrovirusno transdukcijo najprej dostavil v mišje fibroblaste, leto kasneje pa je z enako metodo uspešno pretvoril oz. reprogramiral tudi človeške fibroblaste in tako pridobil prve človeške iPSC (10, 11). Danes poznamo številne metode, s katerimi lahko pridobivamo iPSC (slika 1). Poleg retrovirusov, se kot vektorji za vnos transkripcijskih dejavnikov uporabljajo še lenti in sendai virusi. Za reprogramiranje z nevirusnim vnosom pa so v uporabi episomalni vektorji ali molekule mRNA, ki kodirajo faktorje OSKM in jih v somatske celice vnesemo z elektroporacijo, nukleofekcijo ali lipofekcijo (12). V zadnjem času razvijajo tudi postopke reprogramiranja z malimi molekulami, proteini in nekodirajočimi RNA (12, 13). Za reprogramiranje v iPSC lahko uporabimo katerekoli somatske celice, a se zaradi enostavnega pridobivanja najpogosteje odločamo za kožne fibroblaste, mononuklearne

celice periferne krvi ali urotelijske celice iz urina (12). Za ohranjanje pluripotentnosti gojimo iPSC v prisotnosti t. i. hranilnih celic (angl. *feeder cells*), ki to omogočajo z izločanjem ključnih signalnih molekul in vzpostavitev ustreznega zunajceličnega mikrokolja, lahko pa uporabimo tudi posebno gojišča za iPSC z dodanimi zaviralci diferenciacije in aktivatorji celičnih samo-obnovitvenih poti (14). Po reprogramiranju imajo iPSC sposobnost diferenciacije v katerokoli vrsto celic, ki v telesu sestavljajo ektoderm, mezoderm ali endoderm. Da se diferencirajo v želeni tip celic, je ključno, da jim zagotovimo ustrezno mikrokolje *in vitro*, ki posnema tistega, ki so mu celice izpostavljene v organizmu *in vivo*. Prilagajamo ga glede na različne faze diferenciacije in na želeno vrsto končno diferenciranih celic. Za uspešno diferenciacijo moramo iPSC gojiti na ustreznem zunajceličnem matriksu ter jim dodajati indukcijske ali rastne dejavnike, ki so specifični za želeno vrsto diferenciranih celic. Rast in diferenciacijo iPSC danes usmerjamo predvsem z dodajanjem malih molekul, rastnih dejavnikov ali z gensko manipulacijo (15–17).

	2D	3D	
		sferoidi in organoidi 	organi na čipu 
PREDNOSTI	• preprostejši modeli • nižja cena izvedbe • možna uporaba visoko zmogljivega testiranja	• izboljšano zorenje celic • več interakcij med celicami • primerljivejša struktura	• vzpostavljena perfuzija, ki oponaša vaskularizacijo • natančnejši nadzor pogojev
SLABOSTI	• slabša primerljivost fiziološkim tkivom • slabše posnemanje medceličnih povezav	• variabilnost med organoidi • slaba perfuzija gojišča • počasnejša proizvodnja	• visoka cena izvedbe • težko tehnično dostopni

Slika 2: Prednosti in slabosti 2D- in 3D-modelov *in vitro*, izdelanih iz induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC). Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/a65g304>) (19, 20).
Figure 2: Advantages and disadvantages of 2D- and 3D- *in vitro* models made from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Created in Biorender (<https://BioRender.com/a65g304>) (19, 20).

Uporaba iPSC ima številne prednosti pred drugimi matičnimi celicami. Tako v nasprotju z ESC iPSC ne sprožajo resnih etičnih vprašanj, saj so pridobljene iz odraslih somatskih tkiv. Za razliko od drugih matičnih celic, ki jih lahko izoliramo iz človeškega telesa, količine iPSC niso tako omejene. V primerjavi s homolognimi oz. alogenskimi presaditvami tkiv, predstavlja uporaba iPSC v regenerativni medicini minimalno tveganje za zavrnitev presadka, saj izvirajo iz samega bolnika in so zato popolnoma histokompatibilne. Tovrstne celice so tudi primernejše za modeliranje monogenetskih bolezni, ker omogočajo njihovo proučevanje na celicah oz. tkivih, ki imajo enak genetski profil kot bolnik, iz katerega izvirajo, obenem pa tudi primerjavo z ustreznim kontrolnim vzorcem, pripravljenim z gensko manipulacijo (npr. CRISPR-Cas9) bolnikovih iPSC. V tem smislu so uporabne tudi pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin in napovedovanju njihove toksičnosti, še posebej v kombinaciji z visoko zmogljivimi metodami rešetanja (5, 18). Največ raziskav so doslej opravili z iPSC, diferenciranimi v nevroblaste in nevrone, kardiomiocite, hepatocite, celice trebušne slinavke in epitelijske celice.

3 TESTNI SISTEMI, IZDELANI IZ iPSC, ZA VREDNOTENJE UČINKOVIN

Modelni sistemi v razvoju zdravilnih učinkovin zapolnjujejo vrzel med bazičnimi raziskavami in kliničnim preskušanjem, raziskovalcem pa omogočajo proučevanje kompleksnih bioloških procesov v nadzorovanem okolju *in vitro*. Iz iPSC lahko izdelamo različne vrste testnih sistemov, pri čemer želimo čim natančneje posnemati proučevano tkivo. Tako lahko iz iPSC pripravimo preprostejše dvodimenzionalne (2D) celične kulture, naprednejše tridimenzionalne (3D) modele ter najkompleksnejše organe na čipu, ki pomembno izboljšujejo naše zmožnosti posnemanja delovanja človeških tkiv in organov v pogojih *in vitro*, s tem pa zagotavljajo uspešnost terapevtskih pristopov v nadaljnjih kliničnih raziskavah (slika 2) (19, 20).

3.1 DVODIMENZIONALNE KULTURE iPSC

Diferencirane celice, pridobljene iz iPSC, lahko najenostavneje gojimo v dvodimenzionalnih (2D) celičnih kulturah. Najpreprostejše so monocelične, ki vsebujejo eno samo vrsto diferenciranih celic. Tradicionalni 2D-modeli so kljub možnosti izdelave naprednejših še vedno prva izbira in naj-

pogostejše v uporabi predvsem zaradi enostavne priprave in rokovanja, lažjega nadzorovanja pogojev, razmeroma stroškovno ugodne izvedbe ter možnosti uporabe visoko zmogljivih metod testiranja učinkovin, npr. vsegenomskih, transkriptomskih, metabolomskih in naprednih slikovnih tehnik (19).

Naprednejšo obliko 2D-modelov predstavljajo ko-kulture več vrst celic, ki jih pridobimo z dodajanjem ostalih celic k že diferenciranim celicam iPSC. Tovrstni večcelični testni sistemi omogočajo natančnejše proučevanje interakcij med različnimi vrstami celic ter hkrati spodbujajo zorenje celic (19, 20). Z dodatkom mezenhimskih matičnih/stromalnih celic, ki izločajo topne rastne dejavnike za spodbujanje zorenja celic, so izboljšali zrelost in funkcijo kardiomiocitov, pridobljenih iz iPSC, povečali količino njihovih zalog energije ter zmanjšali nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (21). Poleg tega so s sočasnim gojenjem nevroblastov iz iPSC z astrociti izboljšali uspešnost njihove diferenciacije, vzpostavljanje nevronske povezave in farmakološki odziv celic na antagoniste receptorjev GABA_A, npr. bikukulina (22, 23).

Kljub številnim prednostim 2D-modelov, so ti premalo kompleksni, predvsem v kontekstu medceličnih povezav ter interakcij med celicami in zunajceličnim ogrođjem (20, 24, 25). Prav zaradi pomanjkanja teh interakcij so celice v 2D-modelih, pripravljenih iz iPSC, pogosto manj zrele, saj so vzorci njihovega izražanja genov in njihov metabolom v določeni meri še vedno podobni tistim, ki so značilni za ESC (24).

3.2 SFEROIDI IN ORGANOIDI KOT OSNOVNI 3D-CELIČNI MODELI

Celice v 3D-modelih so prostorsko razporejene, kar omogoča enakomernejšo porazdelitev receptorjev na njihovih površinah in s tem kompleksnejše interakcije med njimi samimi, kakor tudi med celicami in zunajceličnim ogrođjem (26, 27). Ker so določene strukturne značilnosti tkiv ključne za proučevanje bolezni (npr. mikroencefalija, elektrofiziologija srca), je glavna prednost 3D- pred 2D-modeli natančnejše posnemanje dejanskih človeških tkiv. Modele 3D lahko izdelamo s pomočjo biokompatibilnega ogrođja ali brez njega. V slednjem primeru celice rastejo združene v 3D-skupkih in same proizvedejo zunajcelično ogrođje. Kadar pa pripravljamo 3D-celične modele s pomočjo naravnih ali sintetičnih trdnih ali tekočih ogrođij, pa celice nasadimo vanje. Pogosto v ta namen uporabljamo hidrogele (npr. iz kolagena ali fibrina) ali pa ekstrakte iz celic in tkiv (npr. Matrigel®) (24, 25, 28, 29). V zadnjem času 3D-celične modele



izdelujejo tudi s pomočjo biološkega tiskanja, kjer z injiciranjem, laserskimi pulzi ali mehanično silo npr. iz hidrogela oblikujejo želeno 3D-strukturo, v katero nasadijo celice (30). V skupino 3D-celičnih modelov uvrščamo sferoide in organoide, inženirsko pripravljena tkiva in tudi organe na čipu. Sferoidi so tipično sestavljeni iz ene vrste celic, ki samostojno tvorijo 3D-skupke, medtem ko so organoidi kompleksnejši, saj so zgrajeni iz več tipov celic, značilnih za določen organ, ki skupaj tvorijo zanj specifične strukture (24, 28, 29).

Uporabo 3D-modelov, izdelanih s pomočjo iPSC, omejujejo številni izzivi. V primerjavi z 2D-testnimi sistemi je zaradi zahtevnejših postopkov njihovega vzdrževanja *in vitro* ponovljivost rezultatov v 3D okolju slabša (25). Izziv predstavlja predvsem nekonsistentna diferenciacija iPSC, do katere pride zaradi samoorganizacije celic, in je vzrok za variabilnost med posameznimi organoidi. Če pogoji *in vitro* niso dovolj podobni tistim *in vivo*, lahko pride do nepopolnega zorenja iPSC ali do nastajanja neželenih tipov celic v kulturi. Pogosta težava je vaskularizacija, ki v organoidih ni ustrezno vzpostavljena, zato prihaja do neenakomerne porazdelitve hranil in kisika med celicami, kar lahko posledično vodi do celične nekroze predvsem v notranjosti sferoidov ali organoidov (prevelike difuzijske razdalje) (20, 24).

3.3 ORGANI NA ČIPU KOT NAJNAPREDNEJŠI TESTNI MODELI 3D

Razvoj biološkega sistema in napredovanje bolezni sta dinamična procesa, tekom katerih se aktivnosti na celični in tkivni ravni spreminjajo tako prostorsko kot časovno. S trenutnimi 3D-sistemi dosegamo predvsem prostorsko modeliranje, ne omogočajo pa časovnega obravnavanja dogodkov in ne upoštevajo nekaterih ključnih biofizikalnih procesov, kot so strižne sile in pretoki. Tako prostorska kot časovna komponenta sta pomembni za procese razvoja in staranja organizma, celjenje in regeneracijo tkiv ter izmenjavo metabolitov (31). Tehnologija, ki ji uspeva vzpostavljati tako prostorsko kot časovno dinamiko v modelu *in vitro*, je tehnologija izdelave organov na čipu.

Organi na čipu so mikrofluidni sistemi v obliki majhne 3D-naprave, ki omogoča natančen nadzor nad sestavo in delovanjem tkiva *in vitro*. So edini modeli do sedaj z vzpostavljeno perfuzijo, ki oponaša vaskularizacijo. To jim omogoča boljše in enakomernjšo porazdelitev kisika, hranil in drugih nujnih komponent za vzdrževanje celic v delujočem stanju *in vitro* (24, 31, 32). Leta 2010 so izdelali pljuča na čipu z namenom rekonstrukcije funkcionalnega alveolarno-kapilarnega vmesnika. Temu je sledil hiter nadaljnji razvoj,

pri čemer so s tehnologijo organov na čipu pripravili še ledvice, jetra, možgane, srce in številne druge organe (32). V dinamičen sistem organa na čipu lahko vključimo različne 3D-konstrukte, izdelane iz iPSC, ki so tako izpostavljeni stalnemu pretoku gojišča, kar posnema sistemske interakcije (24). Danes te visoko tehnološke izdelke uporabljamo za modeliranje bolezni ter iskanje in preskušanje novih zdravilnih učinkovin (32). V kolikor vanje vključimo več organskih sistemov, jih lahko uporabimo celo za proučevanje procesov absorpcije, porazdelitve, metabolizma in eliminacije zdravilnih učinkovin (32).

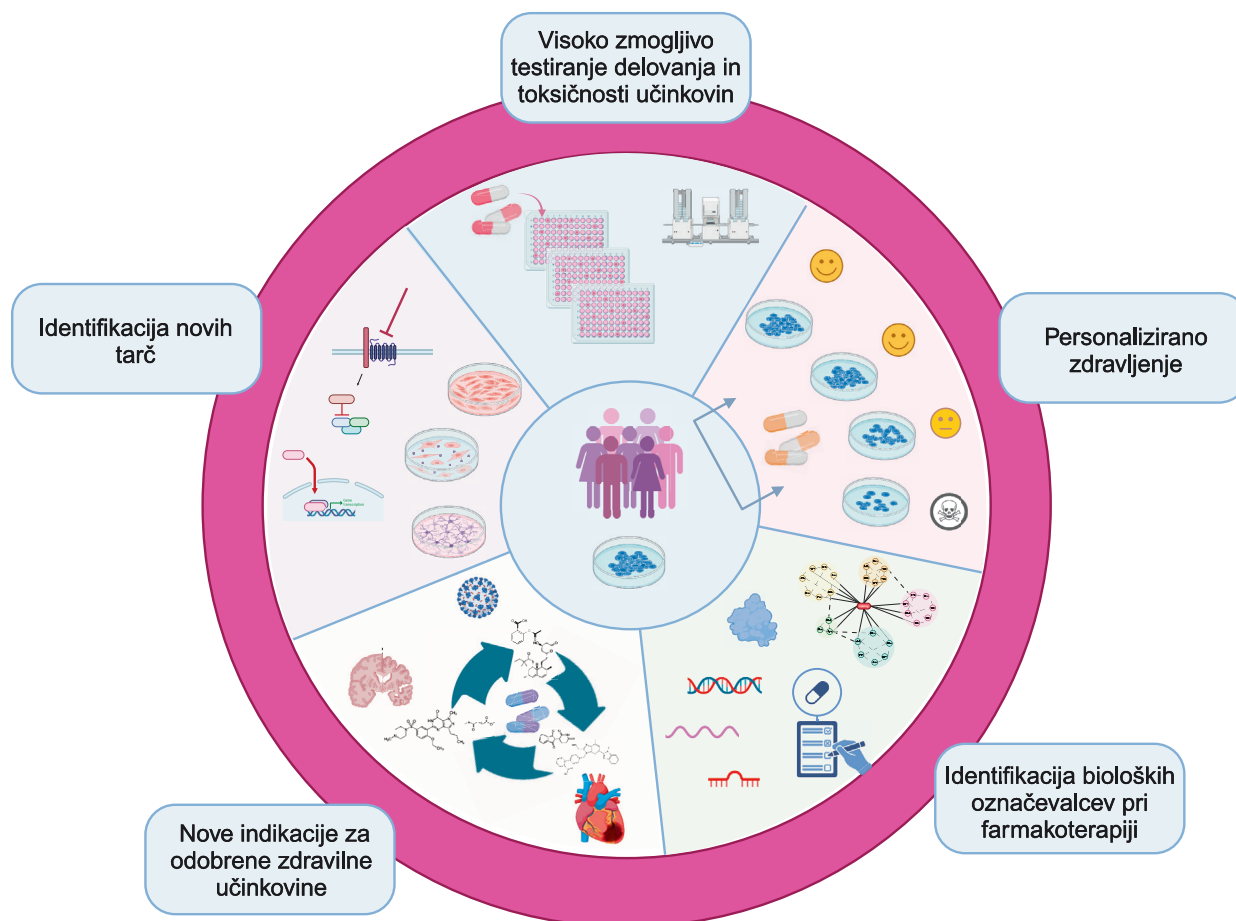
Kljub večji dozorelosti celic v modelih organov na čipu in njihovi kompleksnosti se pri uporabi teh sistemov ravno zaradi slednjega soočamo z veliko variabilnostjo pridobljenih podatkov in slabo ponovljivostjo poskusov ter tudi z njihovo oteženo dostopnostjo zaradi tehnološke zahtevnosti njihove priprave (24).

4 UPORABA iPSC ZA VREDNOTENJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Celični modeli, izdelani s pomočjo iPSC, se najpogosteje uporabljajo za proučevanje bolezni in pri testiranju učinkovin na področjih kardiovaskularnega sistema, živčevja in jeter. To potrjujejo klinične študije na portalu clinicaltrials.gov, kjer je trenutno prijavljenih več kot 30 študij z uporabo iPSC, v okviru katerih raziskujejo delovanje učinkovin (33). Uporaba iPSC pri odkrivanju zdravilnih učinkovin in razvoju farmakoloških pristopov vključuje več ključnih področij (slika 3) (33):

- testiranje novih malih molekul za zdravljenje tarčnih bolezni z uporabo visoko zmogljivih metod rešetanja;
- testiranje že odobrenih zdravilnih učinkovin za odkrivanje novih indikacij (angl. *drug repurposing*);
- proučevanje toksičnih odzivov posameznikov na zdravilne učinkovine z namenom razvoja personaliziranega zdravljenja;
- identifikacija farmakogenetskih in drugih bioloških označevalcev, pomembnih za farmakoterapijo;
- modeliranje razvoja bolezni, specifičnih za posameznike, ter iskanje novih tarč za načrtovanje novih učinkovin.

Testni modeli na osnovi iPSC omogočajo torej inovativne rešitve, ki bi lahko prispevale k posamezniku usmerjenem in učinkovitejšem zdravljenju. V nadaljevanju opisujemo nekaj primerov raziskav zdravilnih učinkovin z uporabo iPSC.



Slika 3: Možnosti uporabe induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC) za odkrivanje in vrednotenje zdravilnih učinkovin in vitro. Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/q98z512>).

Figure 3: Possible applications of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for in vitro discovery and evaluation of drugs. Created in Biorender (<https://BioRender.com/q98z512>).

4.1 PROUČEVANJE KARDIOTOKSIČNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN IN NJIHOVEGA VPLIVA NA KONTRAKTILNOST SRČNE MIŠICE

Bolnikove iPSC z genetskimi predispozicijami za določeno patologijo lahko diferenciramo v kardiomiocyte, celice srčne mišice, in jih nato uporabimo za testiranje kardiotoksičnosti. Slednjo pogosto povzročajo protirakave učinkovine, vključno z zaviralci tirozin kinaz. Rezultati so že v 2D-celičnih modelih, izdelanih iz iPSC, pokazali dobro ujemanje s kliničnimi patološkimi fenotipi (34). Na področju kardiova-

skularnih raziskav so nato razvili različne 3D-modele od preprostejših sferoidov do kompleksnejših inženirsko ustvarjenih srčnih tkiv in organoidov. Vse tri vrste modelov danes uporabljajo za proučevanje kardiotoksičnih učinkov protirakavih in drugih zdravilnih učinkovin ter okoljskih toksinov, kar omogoča boljše razumevanje mehanizmov njihovega delovanja in posledično personalizirano napovedovanje kardiotoksičnih zapletov (35). Zlasti kompleksnejši 3D-modeli omogočajo celo modeliranje aritmij, srčnega popuščanja in celjenja srčnega tkiva po ishemični poškodbi (10). Tovrstni sistemi zagotavljajo natančnejše funkcijsko testiranje učinkovin glede njihovega vpliva na kontraktibilnost miokarda, kar lahko dolgoročno zmanjša potrebe po upo-

rabi živalskih modelov. Vpliv zdravilnih učinkovin na srčne kontrakcije namreč pogosto merijo s spremljanjem tlaka v levem ventriklu pri zavestnih živalih (36, 37).

4.2 NEVROLOŠKE IN NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI

V številnih študijah so iPSC uporabili za vzpostavitev 2D-modela, namenjenega identifikaciji novih učinkovin za zdravljenje Alzheimerjeve in drugih nevrodegenerativnih bolezni (38). Celice iPSC bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo so npr. izpostavili različnim spojinam in tako identificirali zaviralce sekretaze γ , ki je kandidatna proteinska molekula za razvoj učinkovin za zdravljenje tega patološkega stanja (39). Podobno so z uporabo iPSC bolnikov z amiotrofično lateralno sklerozo (ALS), ki so jih diferencirali v motorične nevrone, dokazali *in vitro*, da digoksin in nekatere druge majhne molekule modulirajo nastanek za ALS značilnih agregatov (40). Na ta način so identificirali tudi nove genske dejavnike, kar je spodbudilo razvoj genskih terapij za to bolezen (41).

Nevralni 3D-modeli iz iPSC se pogosto uporabljajo kot sistemi *in vitro* za odkrivanje zdravilnih učinkovin. Tako so npr. s pomočjo nevronskih 3D-modelov, ki so jih pripravili z iPSC bolnikov z DiGeorge-ovim sindromom (delecija 22q11.2), identificirali antipsihotike, ki preprečujejo spontano aktivacijo nevronov in izboljšujejo njihovo funkcijo z uravnavanjem nivoja kalcija (42). V času epidemije virusa Zika pa so z uporabo nevronskih organoidov testirali preko 1000 že odobrenih zdravilnih učinkovin in odkrili, da hipaestrinjev bromid učinkovito preprečuje okužbo ter popravi poškodbe v rasti in diferenciaciji nevronov (43).

5 OMEJITVE PRI UPORABI iPSC

Celični modeli *in vitro*, izdelani iz iPSC, torej nudijo velike možnosti pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin, vendar pa imajo tudi določene omejitve, ki ovirajo njihovo širšo uporabo. Kljub temu, da pogosto bolje oponašajo fiziološke pogoje od ostalih predkliničnih modelov, vseeno ne omogočajo posnemanja kompleksnih medceličnih in znotraj-celičnih interakcij, ki so značilne za različne bolezni. Pomankljivi so tudi pri modeliranju bolezni, katerih patofiziologija vključuje več genov in signalnih poti. Določen delež celic, diferenciranih iz iPSC, pogosto ostane nezrel,

kar seveda omejuje njihovo funkcionalnost. S tovrstnimi modeli tudi težje posnemamo bolezni, ki se pojavijo v kasnejšem življenjskem obdobju posameznika. Poleg tega pa tem testnim modelom manjkata robustnost in ponovljivost. Variabilnosti v protokolih reprogramiranja somatskih celic v iPSC in njihove nadaljnje diferenciacije povzročajo fenotipsko heterogenost med različnimi posamezniki. Zato je za potrjevanje testnih ugotovitev potreben večji nabor linij iPSC, to pa povečuje kompleksnost in stroške raziskav. Tudi uporaba visoko zmogljivih metod testiranja učinkovin je pri testiranju v celičnih modelih iz iPSC lahko omejena, in sicer zaradi razmeroma dolgotrajnega in dragega procesa priprave iPSC. Pri klinični uporabi iPSC v regenerativni medicini pa ostajajo nerešeni pomisleki povezani s tumorogenezo in imunskimi zavrnitvami. Trenutno so v teku pobude za vzpostavitev nadzora linij iPSC ter postavitve smernic za standardizacijo postopkov njihovega pridobivanja in diferenciacije, v kar smo vključeni tudi raziskovalci Fakultete za farmacijo (COST, Haplo-iPS). To bi omogočilo, da bi tekom testiranja lahko ločili normalno celično fenotipsko variabilnost od fenotipov, specifičnih za bolezen, s tem pa premagali marsikatero oviro pri uporabi iPSC (3, 5, 44).

6 SKLEP

Odkritje iPSC je omogočilo velik napredek ne samo v regenerativni medicini, ampak tudi pri razvoju zdravilnih učinkovin, saj v primerjavi z obstoječimi celičnimi in živalskimi sistemi testni modeli, izdelani iz iPSC, natančneje posnemajo (patofiziološko stanje človeških tkiv in organov ter omogočajo varnejše testiranje z manj etičnih zadržkov. Celice iPSC trenutno predstavljajo ključno orodje za modeliranje bolezni in razvoj personalizirane medicine, s čimer lahko terapije prilagodimo posameznim bolnikom. Kljub temu, da iPSC ponujajo realno možnost za nadomestitev živalskih modelov v predkliničnih študijah, pa se pri njihovi uporabi srečujemo s pomembnimi izzivi, kot so: nezadostna zrelost celic, variabilnost celičnih linij, kompleksnost diferenciranja ter visoki stroški proizvodnje, gojenja in diferenciacije. Za širšo uporabo iPSC v farmaciji bi bilo zato potrebno optimizirati predvsem postopke njihove diferenciacije, izboljšati ponovljivost testnih rezultatov ter vpeljati visokozmogljive sisteme za povečanje uporabnosti teh modelov pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin. Kljub temu pa se z nenehnim napredkom na tem področju bližamo

času, ko bodo iPSC postali nepogrešljivi v farmaciji in omogočili hitrejšo in natančnejše razvijanje učinkovitejših in varnejših farmakoterapevtskih pristopov za širok spekter bolezni.

7 LITERATURA

1. *Clinical Development Success Rates and Contributing Factors 2011-2020* | BIO [Internet]. [cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.bio.org/clinical-development-success-rates-and-contributing-factors-2011-2020>
2. Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm Sin B*. 2022 Jul;12(7):3049–62.
3. Doss MX, Sachinidis A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*. 2019 Apr 30;8(5):403.
4. Loewa A, Feng JJ, Hedtrich S. Human disease models in drug development. *Nat Rev Bioeng*. 2023 Aug;1(8):545–59.
5. Nicholson MW, Ting CY, Chan DZH, Cheng YC, Lee YC, Hsu CC, et al. Utility of iPSC-Derived Cells for Disease Modeling, Drug Development, and Cell Therapy. *Cells*. 2022 Jun 6;11(11):1853.
6. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research*. 2014 Apr 30;74(9):2377–84.
7. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Feb;16(2):115–30.
8. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019 Feb 26;10(1):68.
9. Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N, Chandra R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol*. 2016 Nov; 134(4):1–18.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
12. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb;16(1):3–32.
13. Qin H, Zhao A, Fu X. Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2017 Jul 11;74(19):3553.
14. Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H, Yatani H, Egusa H. Feeder Cell Sources and Feeder-Free Methods for Human iPS Cell Culture. In: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N, editors. *Interface Oral Health Science 2014*. Tokyo: Springer Japan; 2015. p. 145–59.
15. Burrige PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):855–60.
16. Yasui R, Sekine K, Taniguchi H. Clever Experimental Designs: Shortcuts for Better iPSC Differentiation. *Cells*. 2021 Dec;10(12):3540.
17. Li Y, Li L, Chen ZN, Gao G, Yao R, Sun W. Engineering-derived approaches for iPSC preparation, expansion, differentiation and applications. *Biofabrication*. 2017 Jul 31;9(3):032001.
18. Omole AE, Fakoya AOJ. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*. 2018 May 11;6:e4370.
19. Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Sig Transduct Target Ther*. 2024 Apr 26;9(1):1–26.
20. Sharma A, Sances S, Workman MJ, Svendsen CN. Multi-lineage Human iPSC-Derived Platforms for Disease Modeling and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*. 2020 Mar 5;26(3):309–29.
21. Yoshida S, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiwara N, Ohashi F, et al. Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells. *Mol Ther*. 2018 Nov 7;26(11):2681–95.
22. Fernandopulle MS, Prestil R, Grunseich C, Wang C, Gan L, Ward ME. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol*. 2018 Jun;79(1):e51.
23. Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014 Jan 24;443(4):1176–81.
24. Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, Wu JC. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*. 2018 Mar 8;145(5):dev156166.
25. Centeno EGZ, Cimarosti H, Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*. 2018 May 22;13(1):27.
26. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013 Sep;501(7467):373–9.
27. Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, et al. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jul 31;109(31):12770–5.
28. Qian L, Tcw J. Human iPSC-Based Modeling of Central Nerve System Disorders for Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(3):1203.
29. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013 Mar;18(5–6):240–9.
30. Ma X, Qu X, Zhu W, Li YS, Yuan S, Zhang H, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Feb 23;113(8):2206–11.
31. Ingber DE. Developmentally inspired human 'organs on chips.' *Development (Cambridge, England)*. 2018 May 18;145(16):dev156125.
32. Low LA, Sutherland M, Lumelsky N, Selimovic S, Lundberg MS, Tagle DA. Organs-on-a-Chip (2020). In: Oliveira JM, Reis RL, editors. *Biomaterials- and Microfluidics-Based Tissue Engineered 3D Models* [Internet]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1230. Springer, Cham.



33. Home | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 Dec 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
34. Sharma A, Burridge PW, McKeithan WL, Serrano R, Shukla P, Sayed N, et al. High-Throughput Screening of Tyrosine Kinase Inhibitor Cardiotoxicity with Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Science translational medicine*. 2017 Feb 15;9(377):eaaf2584.
35. Lyra-Leite DM, Burridge PW. Pluripotent Stem Cell Modeling of Anticancer Therapy-Induced Cardiotoxicity. *Curr Cardiol Rep*. 2020 Jun 19;22(8):56.
36. Mills RJ, Parker BL, Quaife-Ryan GA, Voges HK, Needham EJ, Bornot A, et al. Drug Screening in Human PSC-Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway. *Cell Stem Cell*. 2019 Jun 6;24(6):895-907.e6.
37. Neves LAA, Šarenac O, Gralinski MR. In Vivo Methods in Cardiovascular Safety Pharmacology (2022). In: Hock FJ, Gralinski MR, Pugsley MK, editors. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 1–26.
38. Beghini DG, Kasai-Brunswick TH, Henriques-Pons A. Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Discovery and Neurodegenerative Disease Modelling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Jan;25(4):2392.
39. Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530–9.
40. Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Sep;56:355–64.
41. Meijboom KE, Abdallah A, Fordham NP, Nagase H, Rodriguez T, Kraus C, et al. CRISPR/Cas9-mediated excision of ALS/FTD-causing hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 rescues major disease mechanisms in vivo and in vitro. *Nat Commun*. 2022 Oct 21;13(1):6286.
42. Khan TA, Revah O, Gordon A, Yoon SJ, Krawisz AK, Goold C, et al. Neuronal defects in a human cellular model of 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Med*. 2020 Dec;26(12):1888–98.
43. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan Y, Hartley BJ, Mukherjee S, et al. High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell*. 2017 Aug 3;21(2):274-283.e5.
44. Paik DT, Chandy M, Wu JC. Patient and Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Discovery of Personalized Cardiovascular Drugs and Therapeutics. *Pharmacological Reviews*. 2020 Jan;72(1):320.