

Genomika a její
uplatnění ve farmacii

Vývoj léčiv

Personalizovaná medicína

Genomika

- **Studium genomů**
- mapování (počet chromozomů, polohy genů, jejich pořadí a vzdálenost, sekvenování genomu)
- anotace genomů (proces identifikace umístění genů a všech kódujících oblastí v genomu a určení toho, co tyto geny dělají. Identifikace nekódující RNA)
- bioinformatické nástroje
- konstrukce genových map
- analýza genové exprese
- působení genů, mechanismy genových interakcí
- komunikace mezi jaderným a organelárními genomy
- cílené umlčování genů (např. RNAi)
- fenotypové profilování

Genomika

- **Strukturní** – výzkum struktury genů a především celých genomů
- **Funkční genomika** – anotace genomů, hledání genů a určování jejich funkce
- **Komparativní** – porovnávání genomů různých organismů
- **Populační** – porovnávání genomů v rámci populace (výzkum vlivu konkrétních podmínek)
- **Výpočetní** – práce s genomickými daty pomocí bioinformatických výpočetních metod
- **Personální** – sekvenace genomů a analýza, snaha lékařům do budoucna poskytnout přesné informace o genetických predispozicích pacienta

Genomika ve farmacii

- **Farmaceutická praxe**
- Potřeba nových léčiv
- Výzkum a vývoj léčiv
- Personalizovaná medicína (správné léčivo pro správného pacienta)



- analýza genové exprese
 - profilování (DNA, RNA a proteinové čipy)
-
- pokročilé biotechnologie (GMO organismy)
 - produkce terapeuticky využitelných látek (biofarmaceutika)

Farmakogenomika

- vztah variability genomu a **reakce na léčiva**
- snaží se vysvětlit variabilitu lékové odpovědi a hledat příčinu v rozdílech na úrovni **genomu**
- uplatnění:
- využití farmakogenomických dat pro objasnění mechanismu účinku nového léku v podmínkách *in vivo*
- sledování efektu podané látky na globální expresi genetické informace na úrovni transkriptomu, proteomu či metabolomu
- použití metod genomiky pro objevování nových léčiv a bližší charakterizaci těch známých

Farmakogenomika

- co je důležité si uvědomit:
- dynamická povaha genomu!!!
- mezi sekvencí nukleotidů a expresí genu neexistuje žádný mechanistický vztah
- uplatňuje se zde řada regulačních pochodů a úprav na všech úrovních:
- posttranskripční úpravy
- posttranslační úpravy
- regulace exprese závislá na RNA (RNAi)

Vysvětlení pojmů

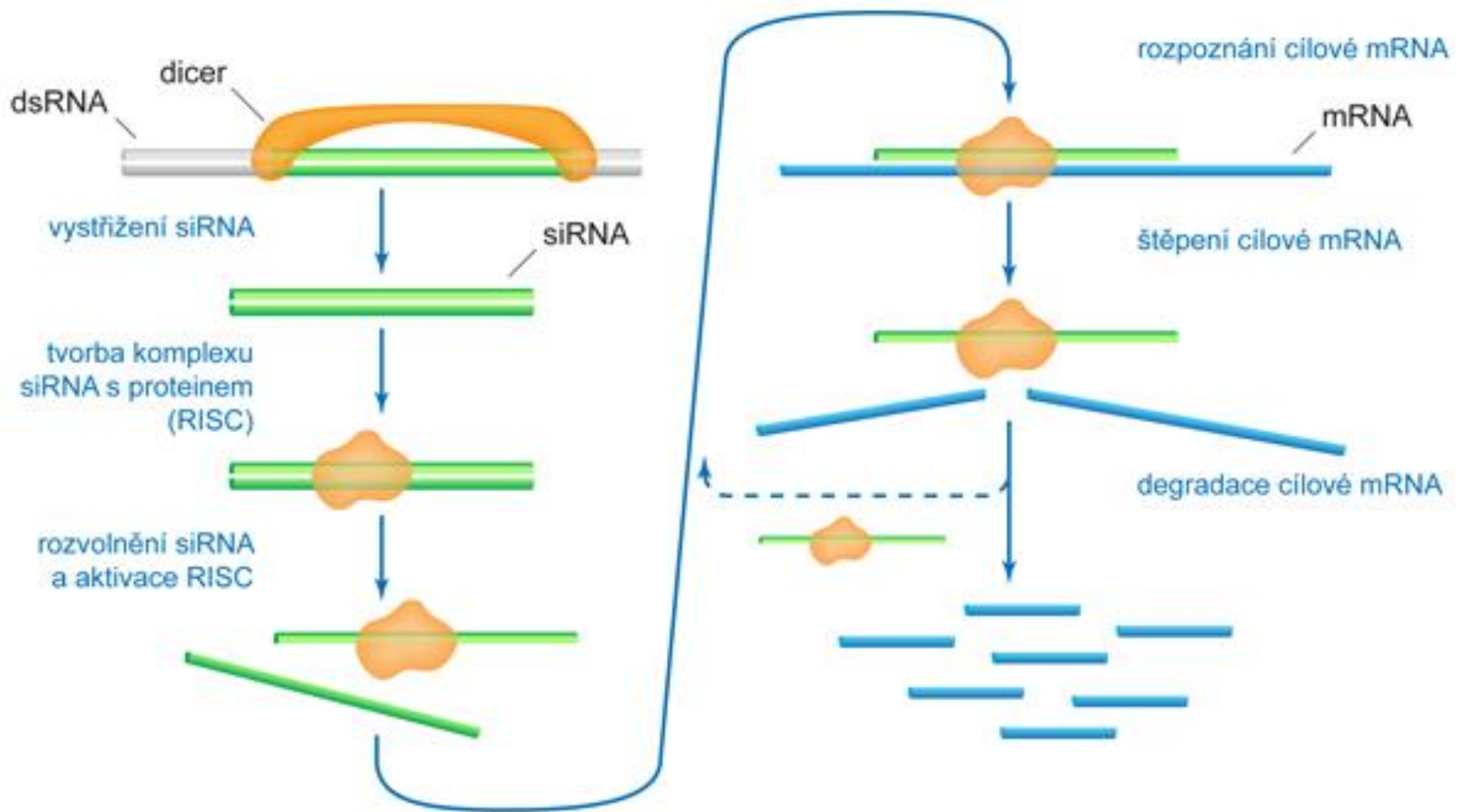
- **Posttranskripční úpravy**
- primární transkript (pre-RNA) vzniklý přepisem podléhá dalším posttranskripčním úpravám
- hlavním regulační krok exprese genetické informace
- připojení čepičky (napojení metylguaninového nukleotidu na 5' konec a chrání RNA řetězec před štěpením exonukleáz)
- sestřih pre-mRNA - *splicing* (strukturní geny eukaryotů obsahují nekódující sekvence, introny, které jsou vyštěpeny a vzniká tak řetězec RNA tvořený pouze s exony)
- polyadenylace 3' konce mRNA (enzymem poly A polymerázou je na konci RNA připojeno asi 250 adenosin nukleotidů, který chrání RNA řetězec před štěpením exonukleáz)

Vysvětlení pojmů

- **Posttranslační úpravy**
- proteinů po jejich nasyntetizování ribozomem
- proteiny mohou být modifikovány kdykoliv během doby jejich existence a dokonce i během jejich syntézy.
- odstranění prvního Met z N-konce polypeptidu
- odstranění tzv. signálního peptidu z N-konce
- modifikace postranních řetězců aminokyselinových zbytků (oxidace cysteinových zbytků, fosforylace, hydroxylace, ...)

Vysvětlení pojmů

- **RNAi**
- mechanismus, jímž jsou v buňkách likvidovány dvouřetězcové molekuly RNA (**d**ouble-**s**tranded **R**NA, dsRNA)
- mechanismus vznikl jako obrana buněk proti infekci virovou dsRNA
- v současnosti se RNAi hojně využívá v genovém inženýrství k cílenému útlumu exprese studovaných genů (tzv. gene knockdown, gene silencing nebo RNA silencing)
- řetězec RNA, který je komplementární k mRNA s ní může vytvořit dsRNA, mRNA je pak mechanismem RNAi likvidována a nemůže vstoupit do procesu translace



FarmakoGENETIKA

vs.

FarmakoGENOMIKA

- oba pojmy zaměřovány
- farmakogenetika
- rozdílné účinky léčiva na různé pacienty
- genetická variabilita pacientů (polymorfismus)
- individualizace farmakoterapie

- farmakogenomika
- rozdílné účinky léčiv na genovou expresi
- expresní profil
- použití metod genomiky pro objevování nových léčiv a bližší charakterizaci těch známých

?	farmako GENETIKA	farmako GENOMIKA
kdy se objevila	1957	1997
co zkoumá	několik genů	celý genom
co sleduje	změny v genech	genovou expresi
co chce ověřit	bezpečnost léčiva	účinnost léčiva
využití	individualizace farmakoterapie vysvětlení nežádoucích účinků	výzkum a vývoj léčiv cíle pro nová léčiva

Genová exprese

- buněčná úroveň - analýza a integrace signálů přicházejících z vnitřního i vnějšího prostředí



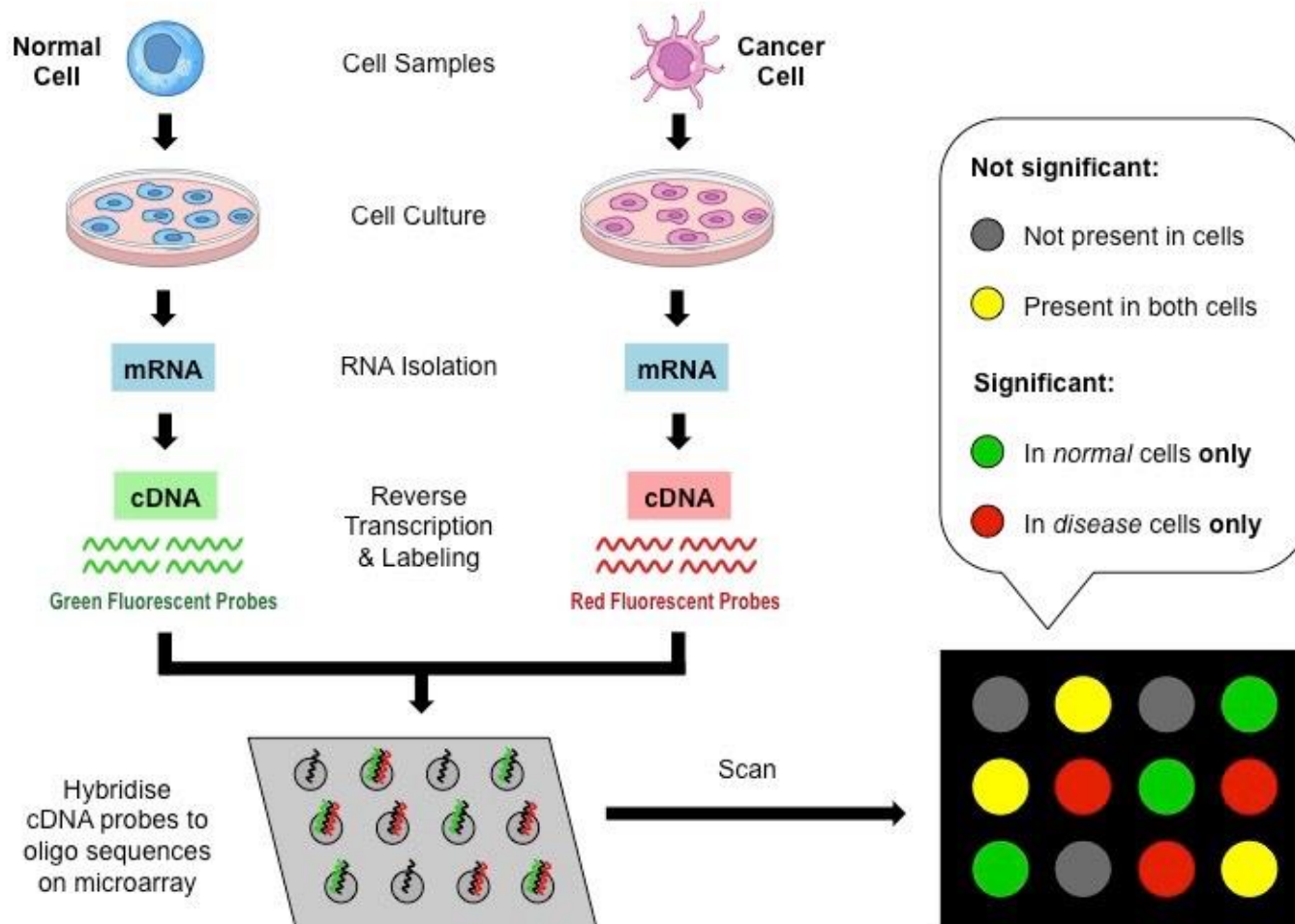
- specifická odpověď v čase a prostoru
- změny exprese vybrané sady genů
- po podání farmaka dochází k adaptivnímu posunu v expresi stovek až tisíců genů
- úroveň transkriptomu - cRNA a cDNA expresní čipy (microarrays)

Analýza genové exprese

- profilování genové exprese je analýza aktivity (exprese) tisíců genů, samostatně nebo najednou, za účelem vytvoření globálního obrazu biologických funkcí
- měření aktivity celého genomu současně v konkrétní buňce nebo tkáni nebo dokonce orgánu
- profilování genové exprese je v poslední době v popředí pokroku v personalizované medicíně (zejména v oblasti rakoviny a transplantací)
- na úrovni transkriptomu: cRNA a cDNA expresní čipy (microarrays)

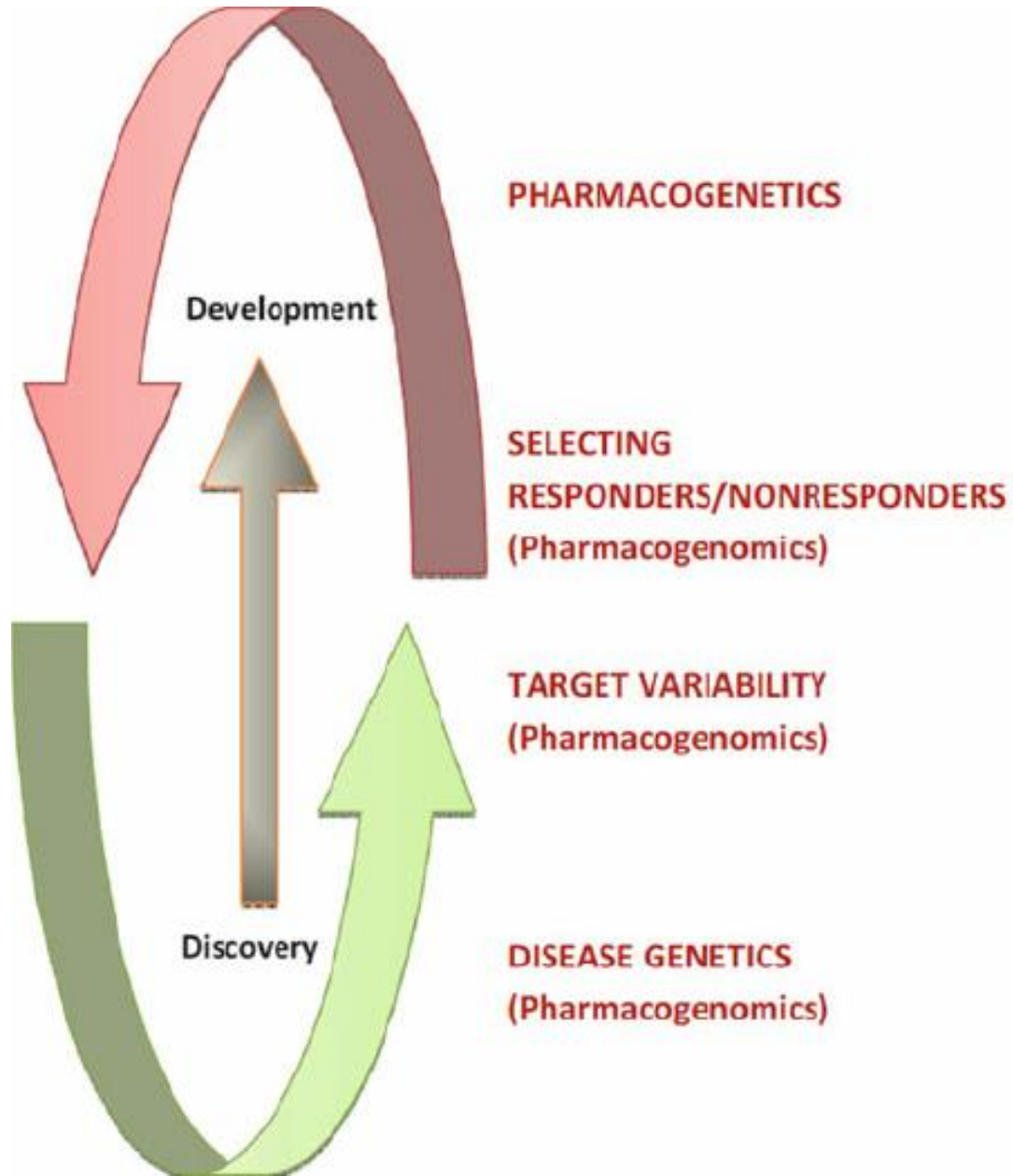
Analýza genové exprese

- cDNA expresní čipy (microarrays)



Výzkum a vývoj léčiv

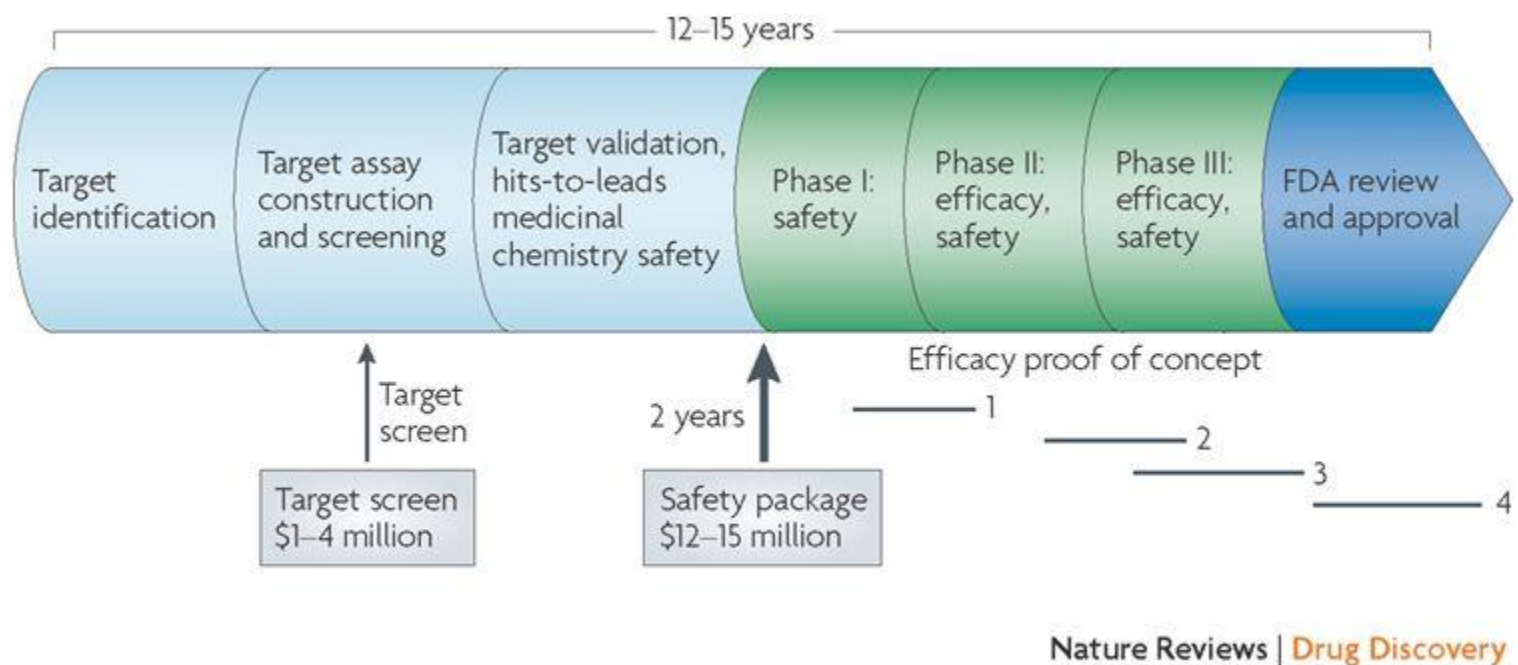
- farmaceutický průmysl čelí řadě výzev, včetně relativně nízké produktivity a úspěchu při uvádění nových léků na trh
- důvody, proč farmaceutické společnosti investují do farmakogenomiky:
 - nový nástroj pro objev a vývoj léčiv, marketing nových léků
 - jednodušší a rychlejší klinické testy na definovaných skupinách
 - oživení starých vyřazených léčiv
 - farmakogenomická charakterizace, použití neinvazivních metod
 - individuální preskripční protokol s menšími vedlejšími účinky a lepší účinností (personalizovaná medicína)



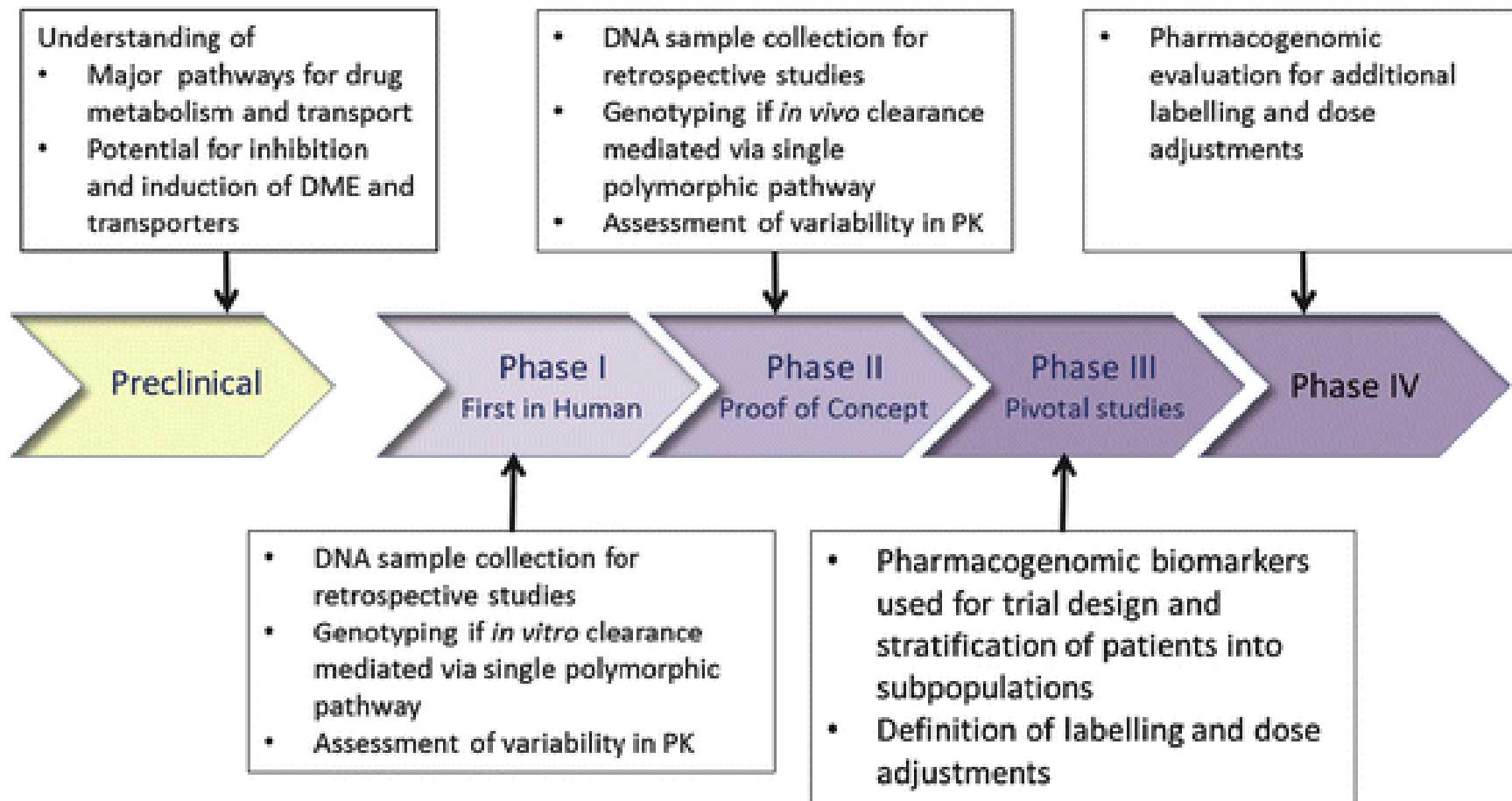
Výzkum a vývoj léčiv

- primární fáze klinického testování léčiv (nejednoznačné výsledky v porovnání s placebem a možné výhody genotypizace probandů)
- farmaceutické společnosti také používají farmakogenomiku k vývoji a prodeji léčivých přípravků pro lidi se specifickými genetickými profily
- studiem léku pouze u lidí, u nichž je pravděpodobné, že z toho budou mít prospěch, mohou farmaceutické společnosti být schopny urychlit vývoj léku a maximalizovat jeho terapeutický přínos
- pokud dokážeme identifikovat geny, které způsobují závažné vedlejší účinky, preskripce pouze vybrané skupině pacientů, kteří tyto geny nemají
- to by umožnilo některým jednotlivcům dostávat potenciálně život zachraňující léky, které by jinak mohly být zakázány, protože představují riziko pro ostatní pacienty

Možnosti využití farmakogenomiky



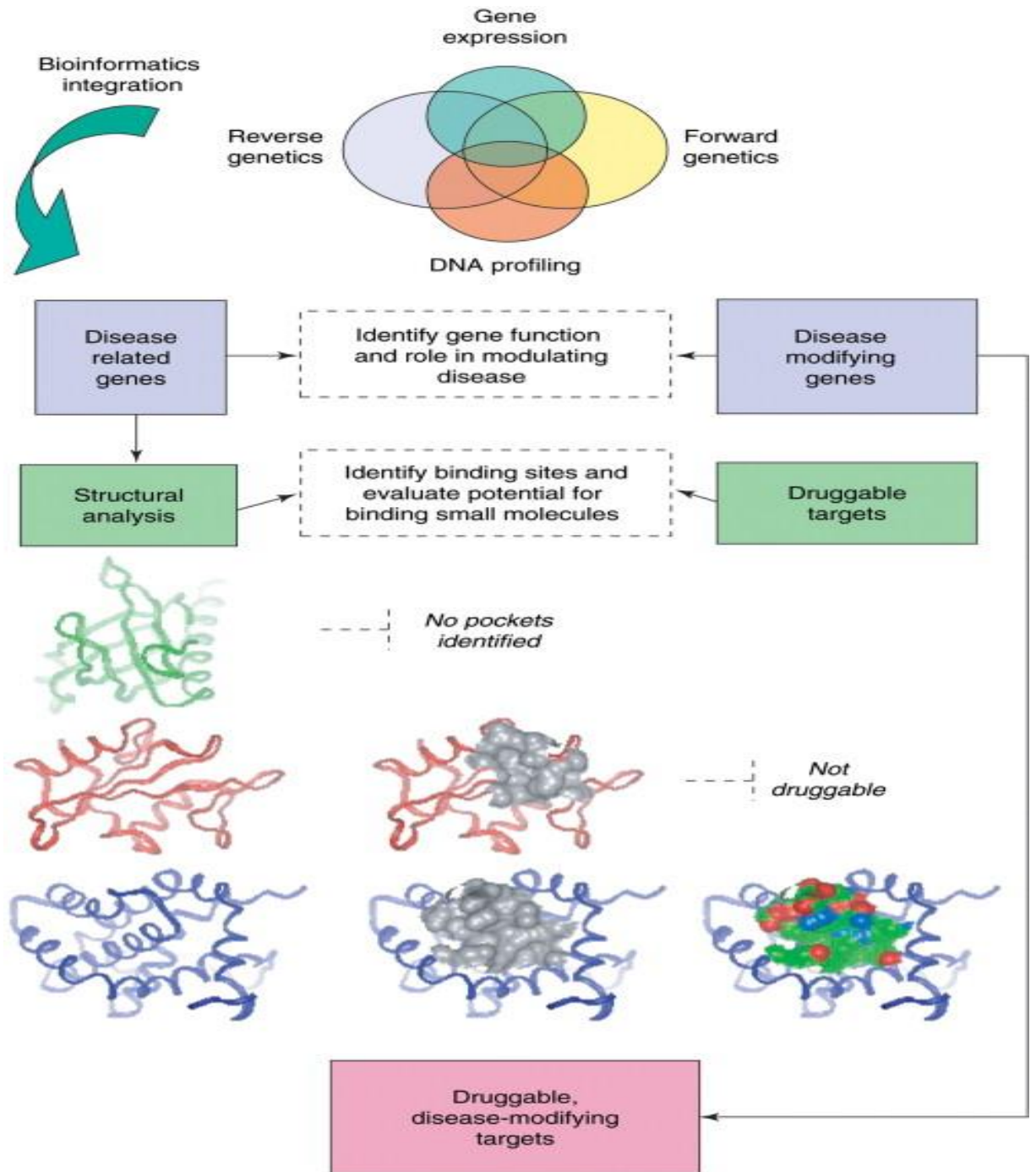
Možnosti využití farmakogenomiky



Drug targets

- úspěch mnoha projektů v oblasti navrhování léků je zásadně omezen povahou cíle - „**druggable targets**“
- schopnost cíle být modulován malými molekulami (které jsou často vhodné pro orální podání)
- navrhování sloučenin s vhodnými biofarmaceutickými vlastnostmi, které jsou stále schopné vázat se na své cíle s příslušnou afinitou
- ne všechny malé molekuly mohou být léky a ne všechny proteiny mohou být cíle
- protein musí obsahovat vazebné místo, které je komplementární

- druggable targets



Klasická vs. reverzní genetika

- **klasická genetika (forward genetics)**
- hledáním genů, které jsou zodpovědné za určitý známý projev, fenotyp
- začíná se u známého projevu a hledá se neznámá sekvence DNA
- vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle vnějšího fenotypu, metabolického profilu, exprese genů zájmu
- identifikace mutovaného lokusu (plasmid rescue, inverzní PCR)
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice: fragmentační analýza a poziční klonování

Klasická vs. reverzní genetika

- **reverzní genetika (reverse genetics)**
- známe sekvenci genu, ale neznáme (přesně) jeho úlohu
- jaký fenotyp bude způsoben mutací tohoto konkrétního genu?



- **cílená mutageneze** (pozmění se sekvence genu - například ho mutací úplně vypneme) a budeme sledovat projev této mutace
- analýzy sekvenčně specifických mutantů
- analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
- umlčování genů pomocí RNAi (mechanismus účinku RNAi, příprava konstruktů pro umlčování genů pomocí RNAi)

Klasická genetika

„Forward Genetics“



fenotyp



který gen?

Reverzní genetika

„Reverse Genetics“

doména modelových organismů

?

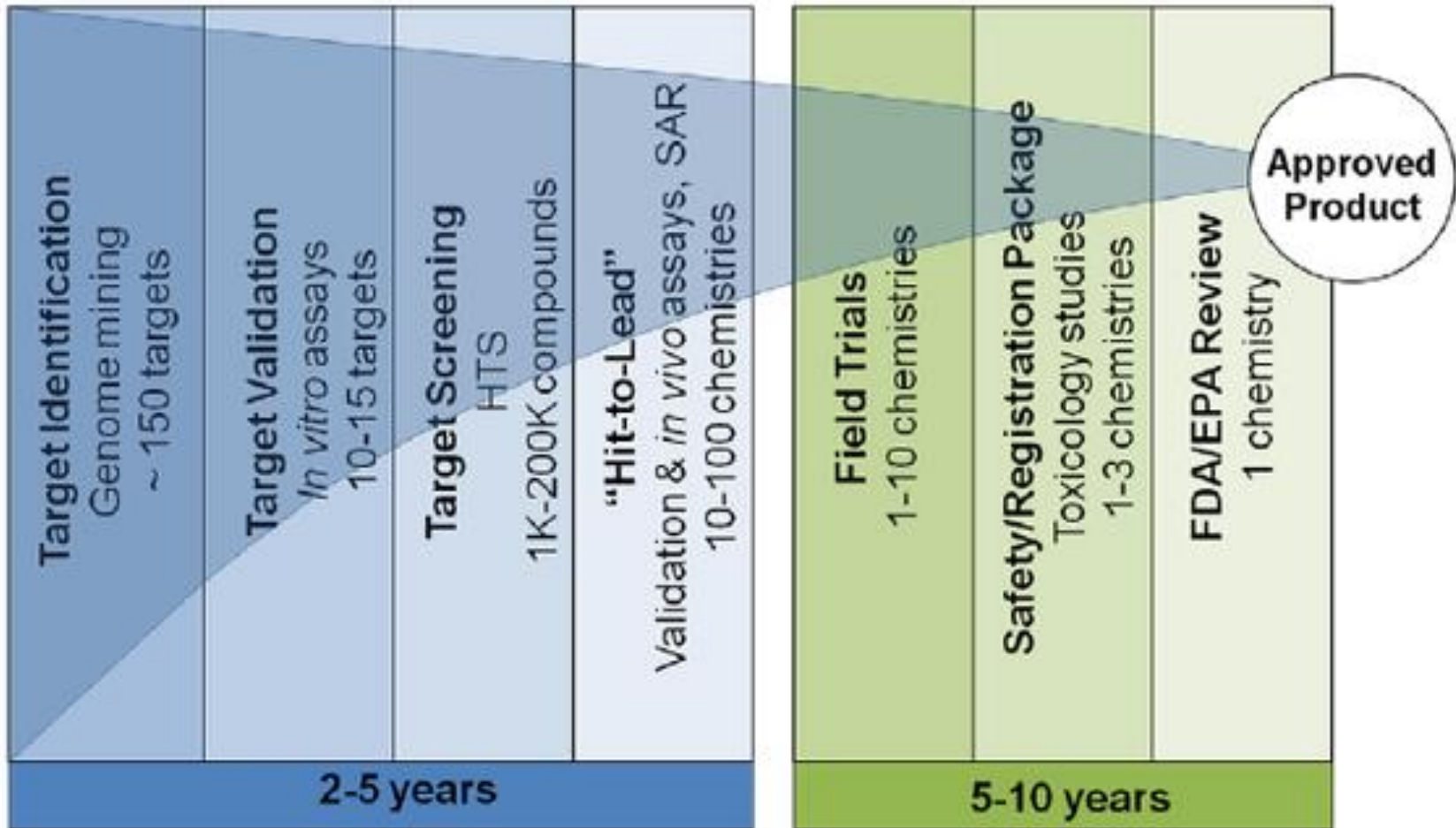
fenotyp



známe gen

A Drug Discovery Phase
"Genome-to-Lead"

Registration Phase
"Lead-to-Product"



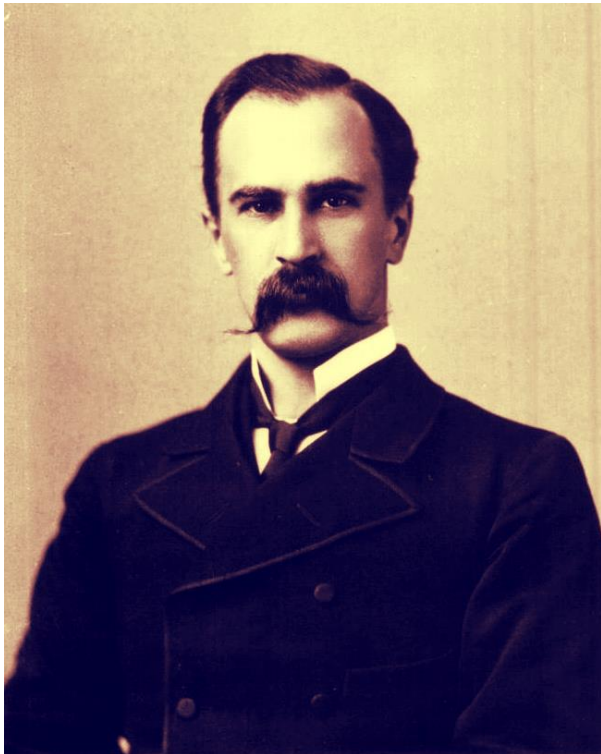
Individualizace farmakoterapie

- všeobecný trend
- přizpůsobení léčby na míru určitému pacientovi
- konec 19. stol. – sir W. Osler
- „Neptej se, jakou nemoc má pacient, ale raději jaký pacient nemoc má.“



Sir William Osler

- kanadský lékař
- jeden ze čtyř zakládajících profesorů nemocnice Johns Hopkins (Baltimore, Maryland)

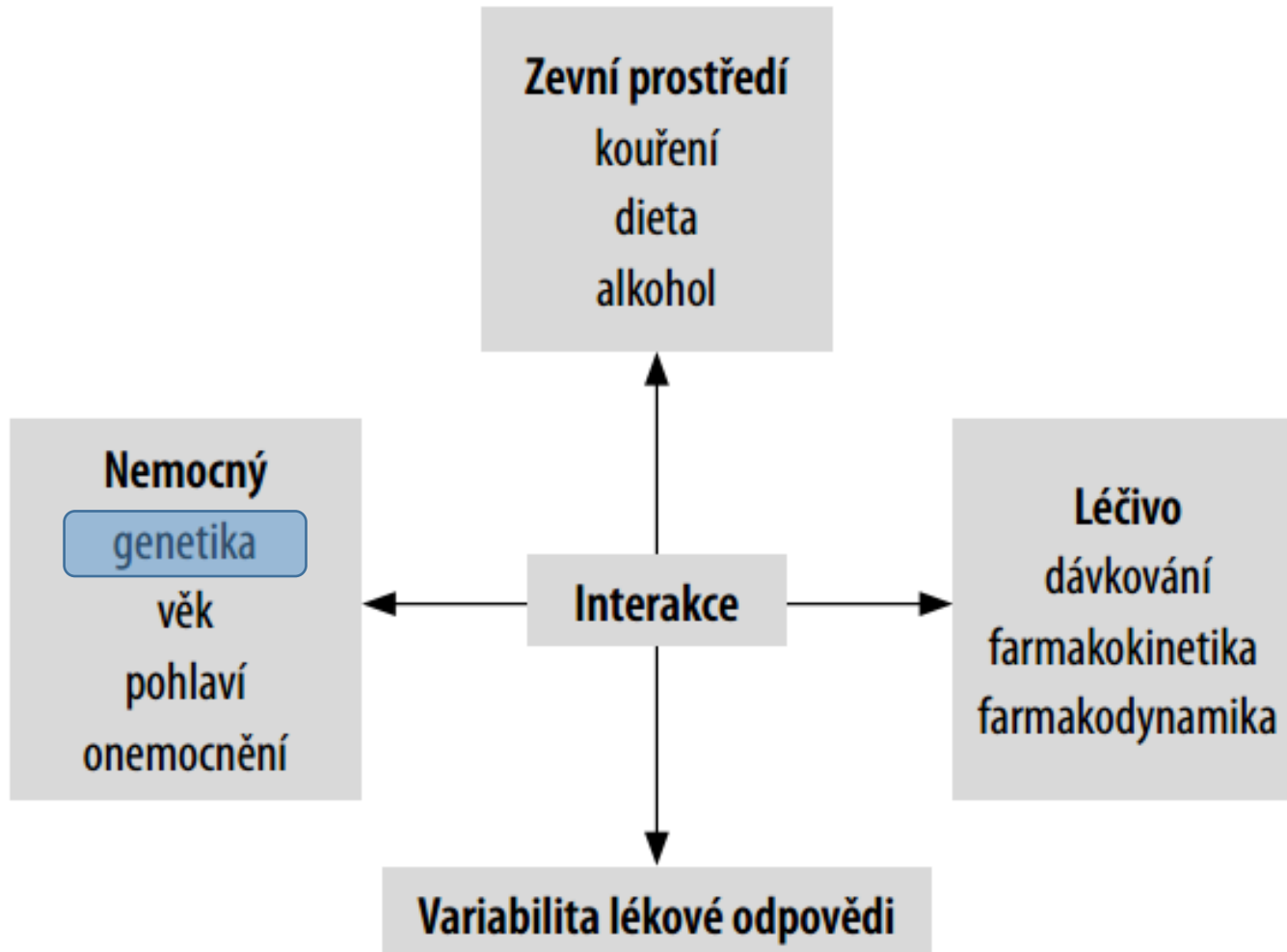


Individualizace farmakoterapie

- velké množství léčiv
- farmakologické účinky, nežádoucí účinky, lékové interakce
- snaha o racionální výběr léčiva (zvyšování efektivity léčby, dosažení max. účinku a minimalizace toxicity)
- klinické studie, **medicína založená na důkazech**

- **jenže:**
 - působení každého léčiva je dáno souhrou farmakodynamických a farmakokinetických vlastností v závislosti na **charakteristice nemocného** a aktuálním **patologickým procesu**
 - pro každého nemocného je to jedinečný soubor faktorů, které mohou modifikovat očekávaný efekt podaného léčiva
 - optimalizace léčebného účinku tak může být narušena odlišnou **individuální reakcí** nemocného

Variabilita lékové odpovědi



Major Drugs Ineffective For Many

Hypertension Drugs 10-30%
ACE Inhibitors



Heart Failure Drugs 15-25%
Beta Blockers



Anti Depressants 20-50%



Cholesterol Drugs 30-70%
Statins



Asthma Drugs 40-70%
Beta-2-agonists



Personální genomika

- odvětví genomiky, které se zabývá sekvenováním a analýzou genomu jednotlivců
- genotypy jednotlivců jsou identifikovány pomocí částečného nebo úplného sekvenování genomu (next gen sequencing metody)
- důležitá pro identifikaci genetické predispozice jedince k běžným onemocněním
- k účinnosti a nežádoucích účinků na běžné léky



- eliminuje se nepředvídatelná odezva na léky v důsledku genetických polymorfismů, které ovlivňují metabolismus, clearance a toleranci

Genotypizace

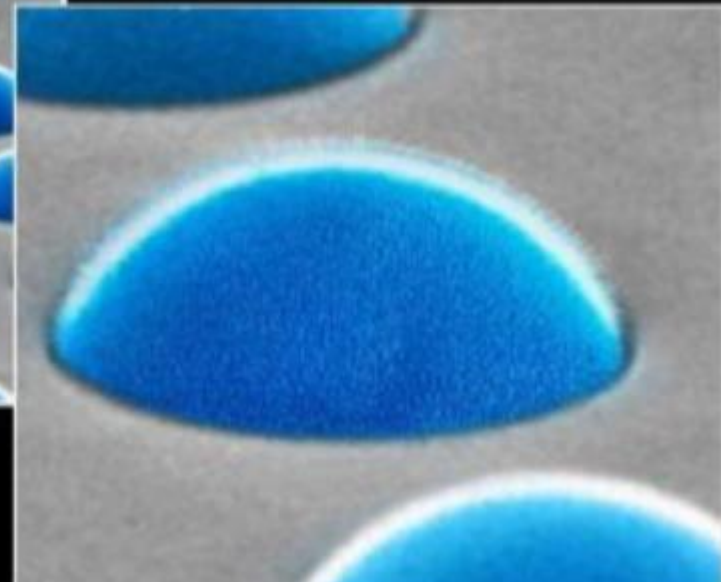
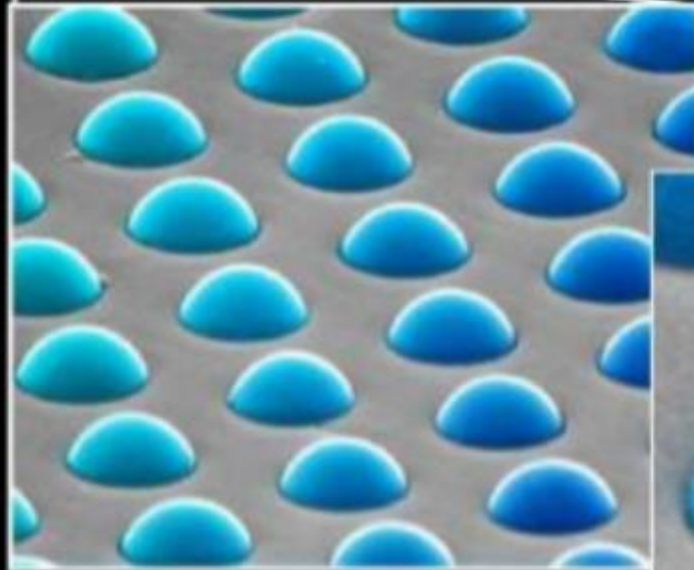
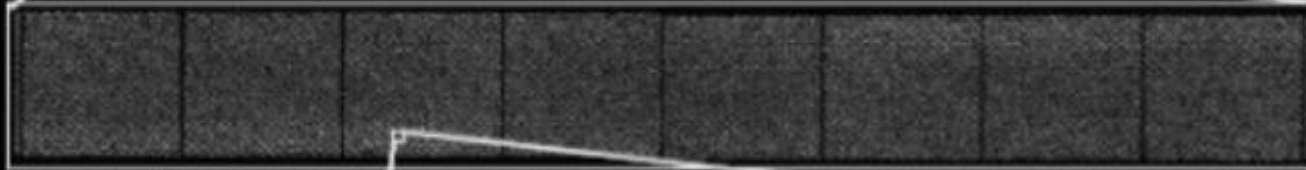
- Př:
- mutace v genu cytochromu P450 CYP2D6 vedou k pomalým, středním, extenzivním a ultrarychlým metabolizátorům
- každá z těchto fenotypových podskupin má různé reakce na léky, které jsou značně metabolizovány cestou CYP2D6 (od těžké toxicity po úplný nedostatek účinnosti)
- existuje několik příkladů, kdy by bylo možné použít prospektivní genotypizaci k zajištění toho, aby byla terapie cílena na odpovídající fenotypy s odpovídajícím metabolismem a účinností

Gene	Drug	Responder Genotype or Phenotype	Nonresponder Genotype or Phenotype
TPMT	Thioguanine, azathioprine, mercaptopurine	Extensive Metaboliser	Poor Metaboliser
CETP	Pravastatin	B1	B2
ACE	Enalapril	Insertion (I)	Deletion (D)
5-HTT	Fluvoxamine	Long (l)	Short (s)
CYP2C9	Warfarin	Extensive Metaboliser	Poor Metaboliser
CYP2D6	Desipramine	Extensive Metaboliser	Poor Metaboliser
HER2	Trastuzumab	HER2neu positive	HER2neu negative

Table 1 Examples of genes that have well-established responder or non-responder genotypes and phenotypes

Individualizace farmakoterapie

- **screening** již známých polymorfismů nám pomůže stanovit nejefektivnější terapii
- stanovení genů nebo proteinů z odebrané tělesné tekutiny (krev, moč, sliny, mozkomíšní mok, atd.)
- chipy

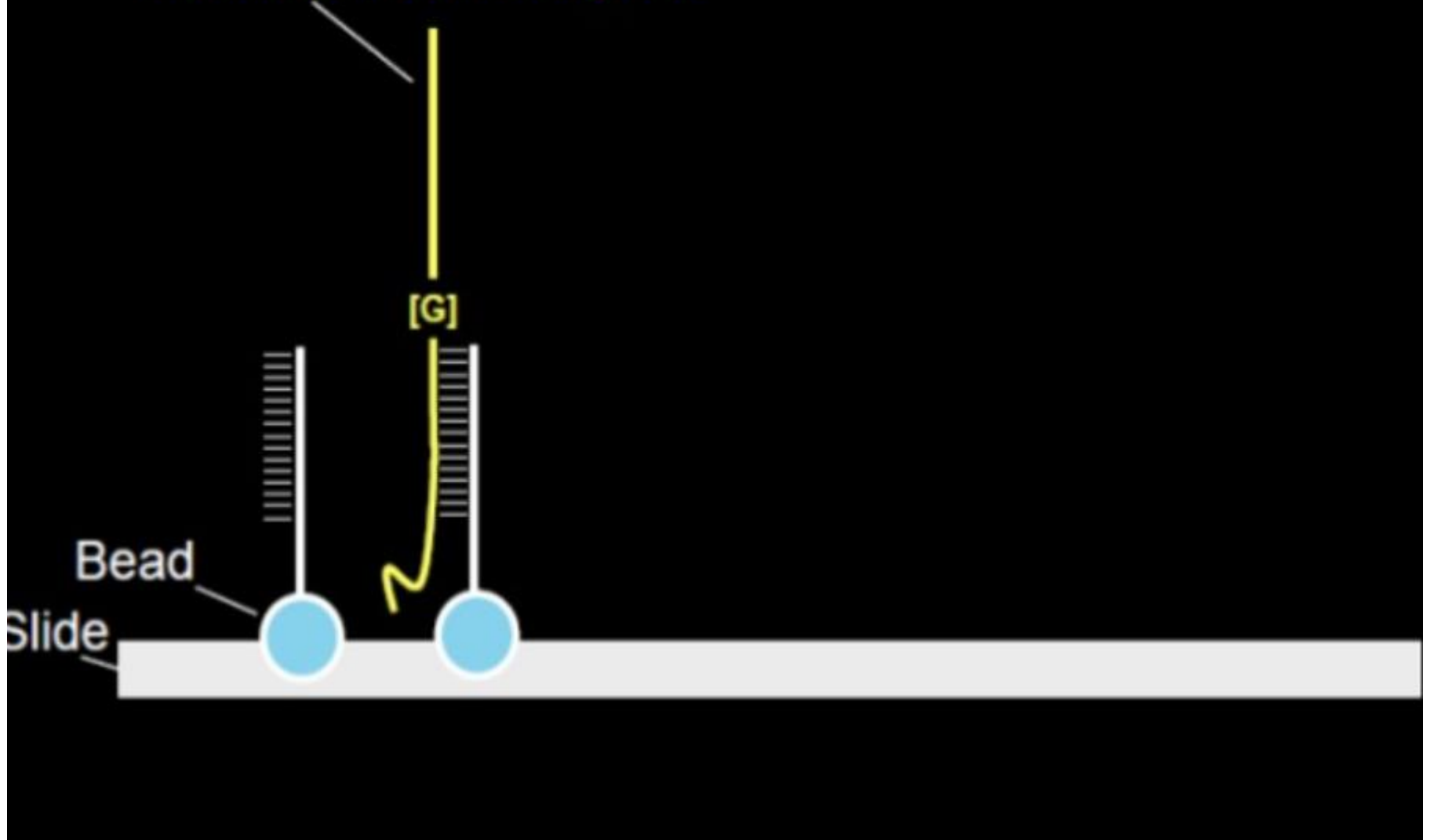


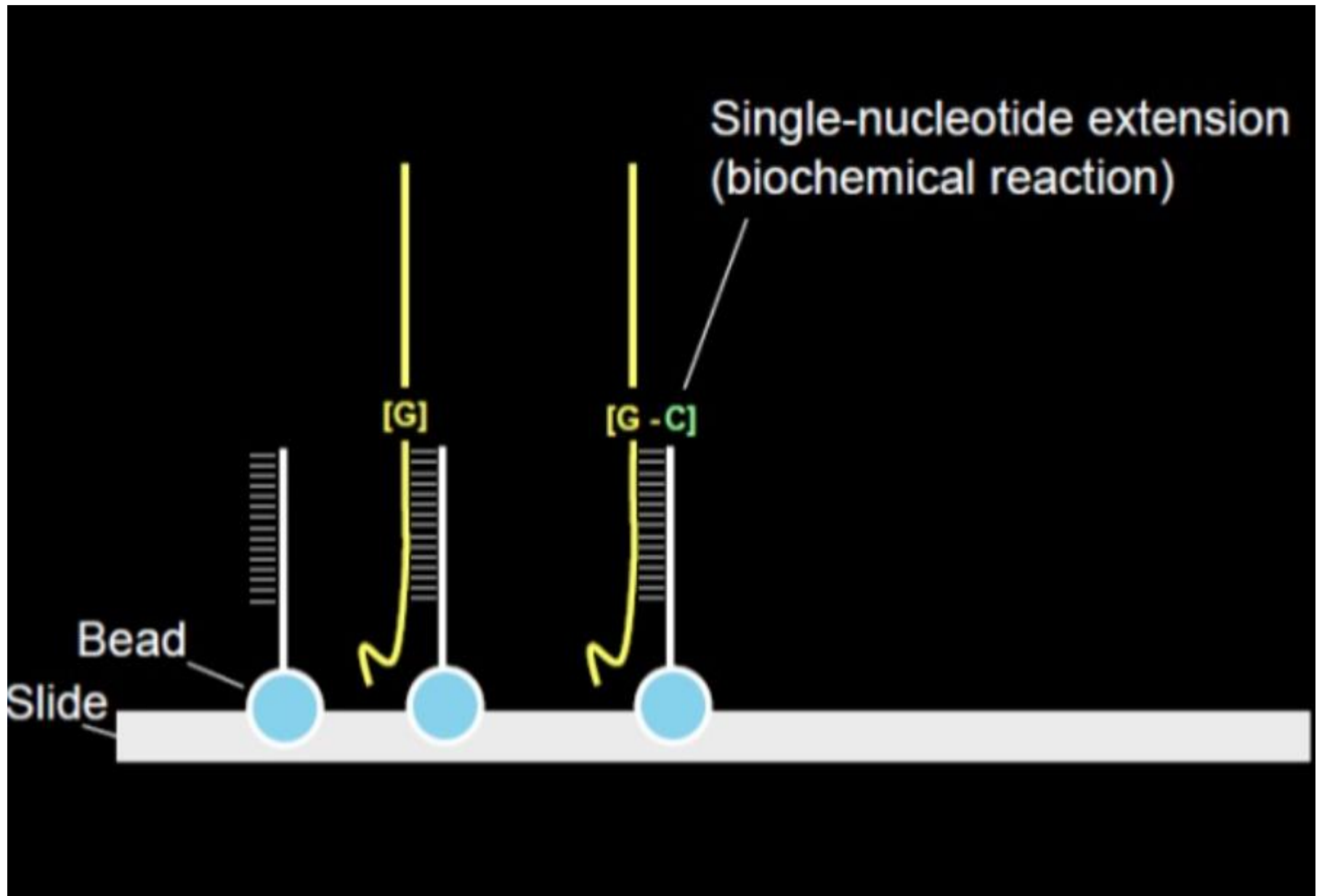
20 million beads on one slide

DNA target capture probe
affixed to bead:
**50 bp complementary to
SNP region**

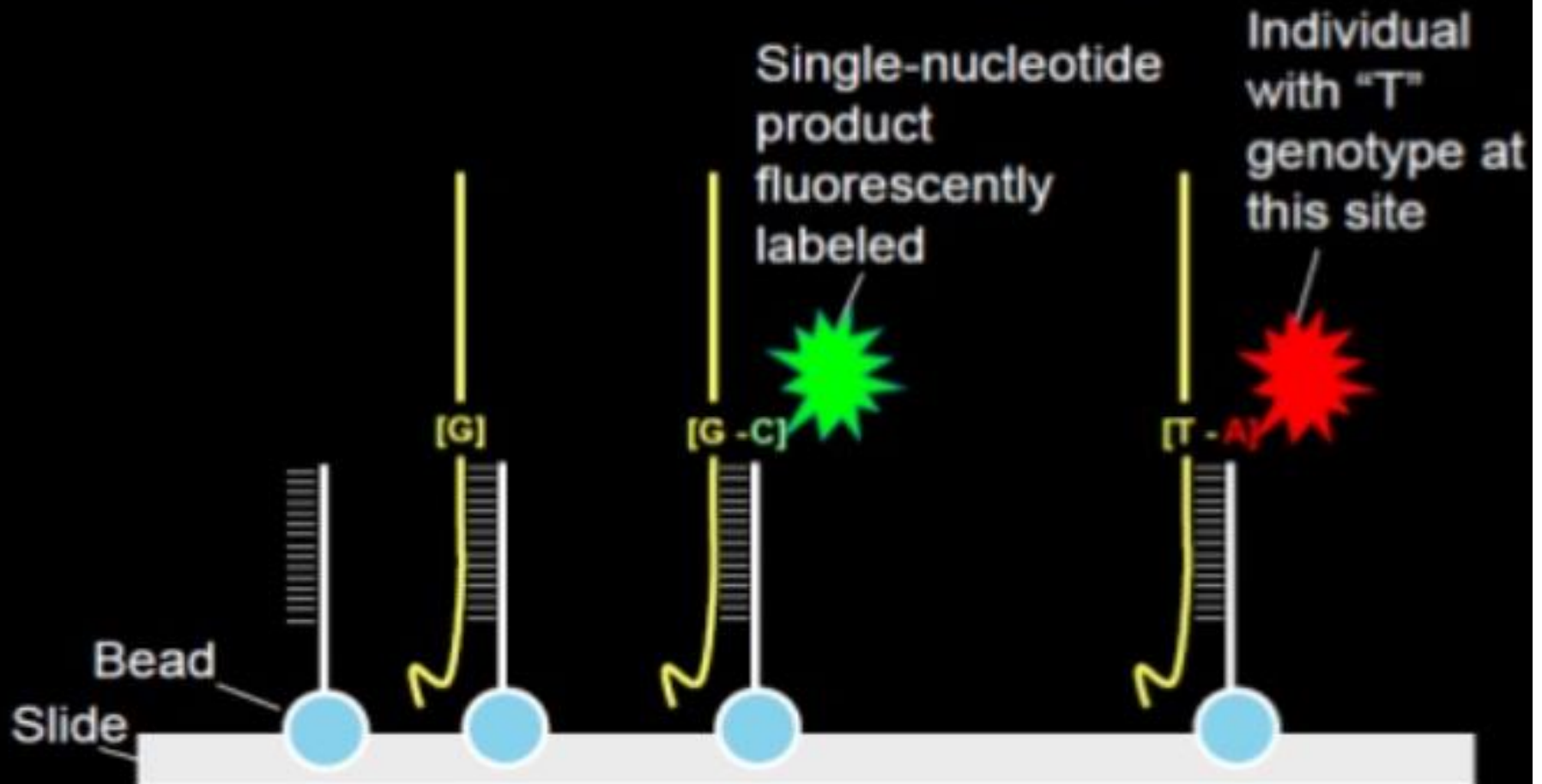


Complementary DNA from
Patient DNA bound to probe

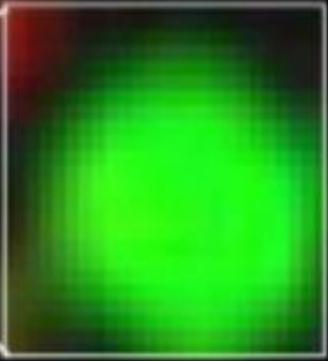
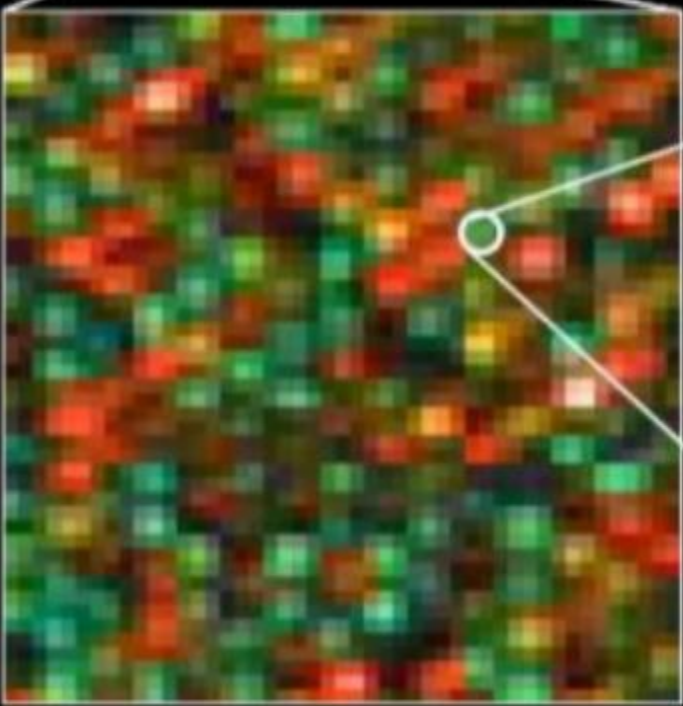
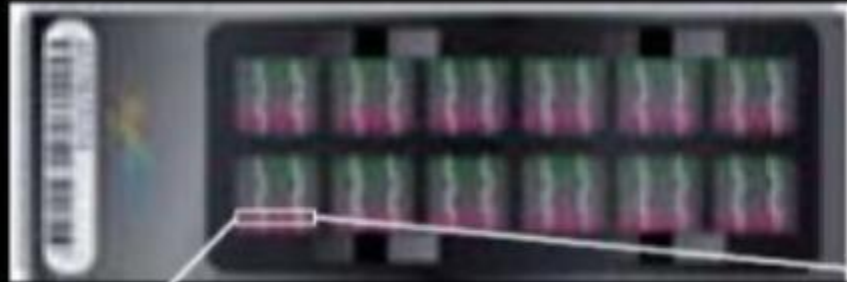




Illumina SNP Genotyping



1.2M Chip (1.2 million SNPs)
2 Samples/Chip

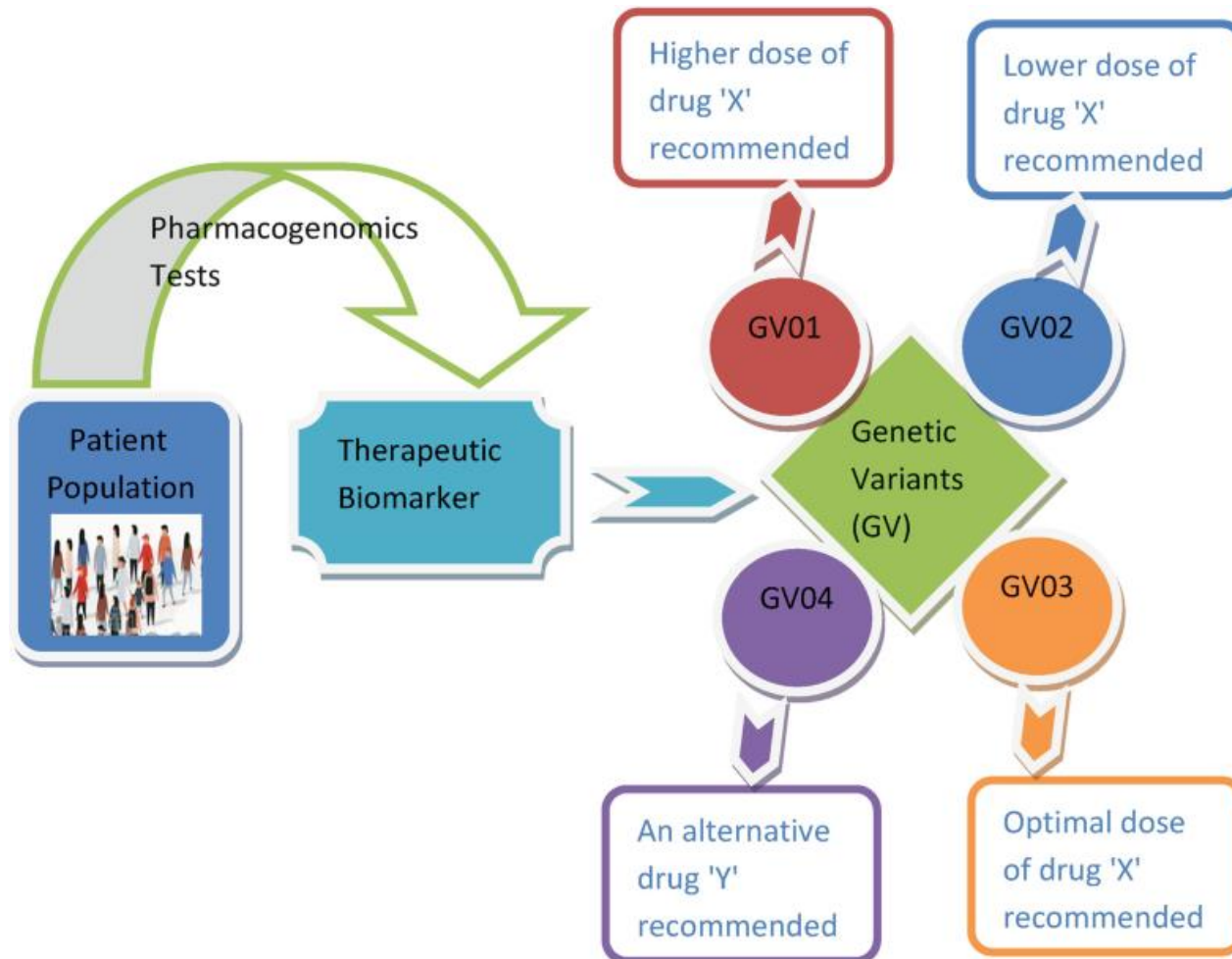


[T/T]

[T/G]

[G/G]

Individualizace farmakoterapie



Individualizace farmakoterapie

- **výhody:**

- maximální účinnost léčby
- minimalizace nežádoucích účinků
- zvýšení bezpečnosti terapie
- snížení finančních nákladů

- **limity:**

- identifikace kauzálních polymorfismů (dlouhodobý výzkum)
- variabilita lékové odpovědi je obvykle **multigenní**
- nakládání se získanými daty

Klinická praxe

- screeningové vyšetřování před zahájením terapie u všech pacientů
- identifikace pacientů s nepřiměřeně vysokým rizikem při standardním způsobu použití léčiva
- indikační omezeních nově registrovaných léků

Léčivo	Biomarker
Cetuximab	EGFR, KRAS
Dasatinib	Ph+ CML
Erlotinib	EGFR
Gefitinib	EGFR-TK
Imatinib	Ph+ CML
Maravirok	CCR5
Nisotinib	Ph+ CML
Panitumumab	EGFR, KRAS
Rasburikaza	G6PDH
Trastuzumab	HER2

Klinická praxe

- nebo ve skupině starších léků, kde byl farmakogenetický výzkum iniciován až během běžného používání léku
- farmakogenetická vyšetření, která se provádějí před začátkem léčby:

Léčivo	Gen
Azathioprin	TPMT
6-merkaptopurin	
6-thioguanin	
Abakavir	HLA-B*5701
Karbamazepin, fenytoin (asijské populace)	HLA-B*1502
Klopidogrel	CYP2C19
Irinotekan	UGT1A1
Warfarin	CYP2C9, VKORC1
5-fluorouracil	DPD