

# C7188 Úvod do molekulární medicíny 8/10



## **MOLEKULÁRNÍ FARMAKOLOGIE II** **GENOVÁ TERAPIE** **PREIMPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKA**

**Ondřej Slabý, Ph.D.**

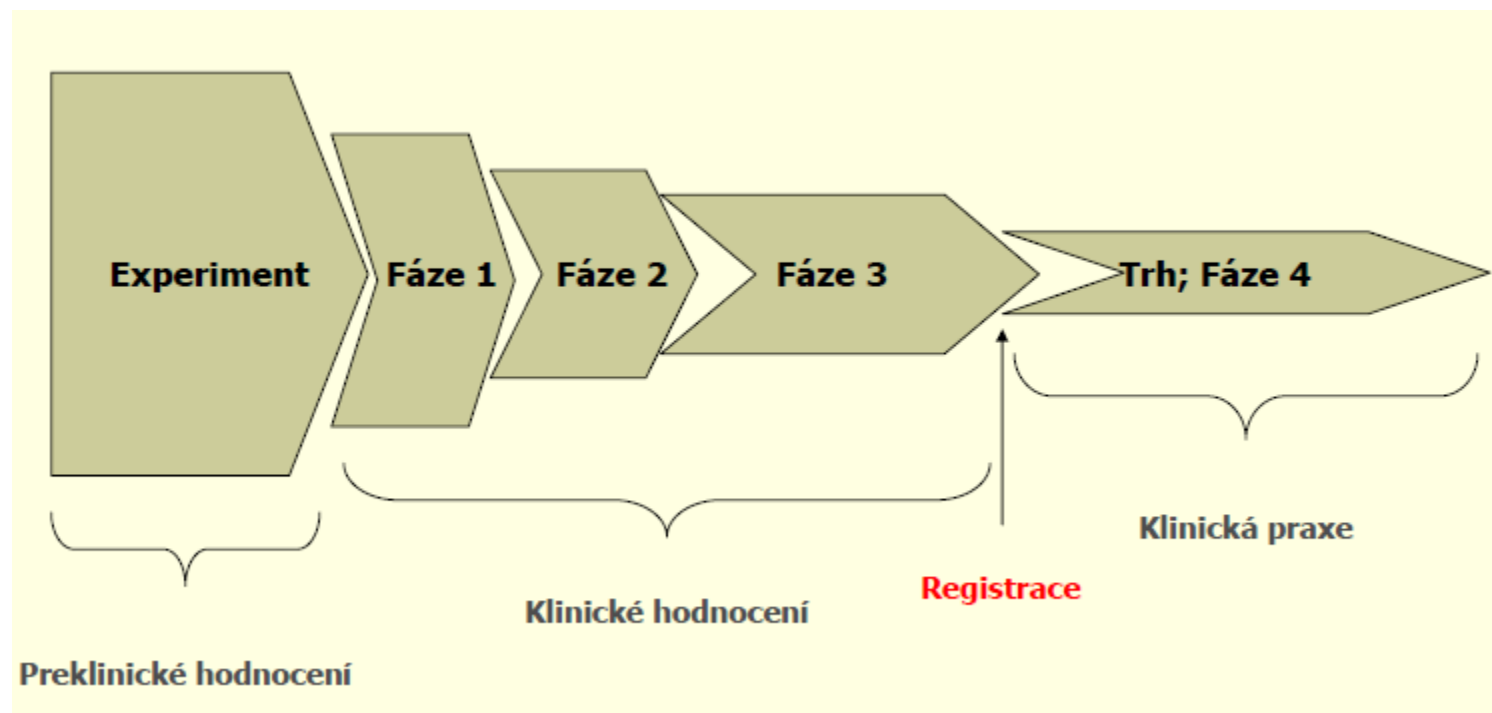
*Masarykův onkologický ústav*

*Univerzitní centrum buněčné imunoterapie*

*Lékařská fakulta Masarykovy univerzity*



## Klinické hodnocení nových léčiv



# Klinické hodnocení nových léčiv

## I. fáze klinického hodnocení

- \* První podání lidským subjektů
- \* Prioritou je hodnocení bezpečnosti
- \* Hlavním cílem je stanovení tzv. **MAXIMÁLNÍ TOLEROVATELNÉ DÁVKY (MTD)**
- \* Stanovují se optimální dávkovací režimy pro další fáze klinického zkoušení
- \* Dalším cílem je popis tzv. **BEZPEČNOSTNÍHO PROFILU PŘÍPRAVKU**
- \* Farmakokinetické analýzy
- \* Charakteristické je zařazování zdravých dobrovolníků  
(*v případě vysoce toxických látek=cytostatika pacienti*)
- \* Počet zařazených subjektů 10-20
- \* Pro design je typické navyšování dávky obvykle ve skupinách 3 pacientů

# Klinické hodnocení nových léčiv

## II. fáze klinického hodnocení

- **Prioritou je hodnocení účinnosti léčby**
- **Hlavním cílem této fáze je tedy neukončit je v případě slibné účinnosti a naopak ukončit je v případě průkazu účinnosti nedostatečné**
- **Hodnocení bezpečnosti a tolerance**
- **Výsledky této fáze jsou rozhodovacím bodem žadatele o registraci léčivého přípravku pro jeho testování v dalších fázích**
- **Experimenty jednoramenné a dvojramenné**
- **Zařazování jsou pacienti splňující vstupní kritéria (diagnóza, pokročilost onem.)**
- **Počet subjektů 20-200**
- **Léčivo je podáno soubrou a vyhodnocen podíl respondérů, pokud neodpovídá předpokladu je studie ukončena, v opačném případě zařazení další**

# Klinické hodnocení nových léčiv

## III. fáze klinického hodnocení

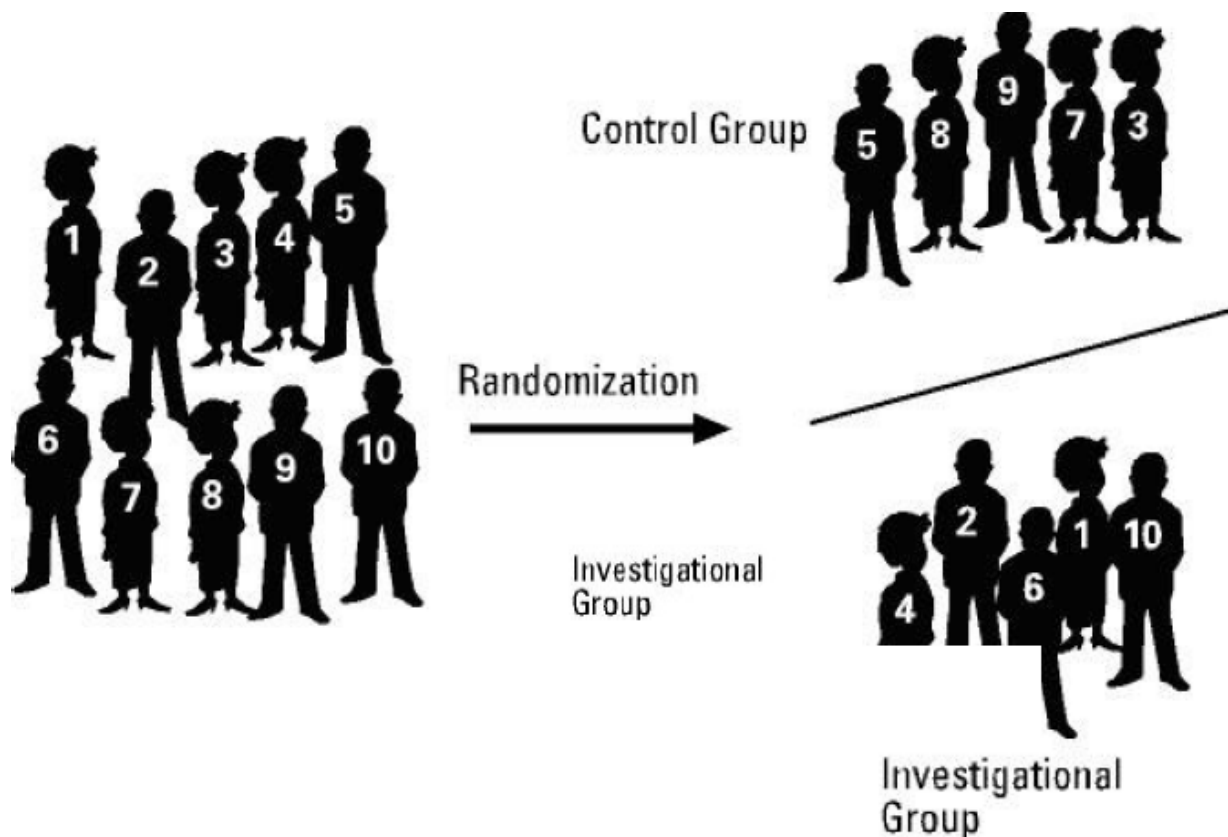
- Z předchozích fází máme informace o bezpečnosti, dávkování a účinnosti
- Cílem této fáze je prostřednictvím řízeného experimentu přímé srovnání bezpečnosti a účinnosti hodnoceného přípravku s kontrolou, kterou může být placebo nebo aktuálně používaná nejlepší léčba.
- Hlavním cílem je přinést data prokazující, že účinnosti a bezpečnost léčivého přípravku jsou stejné nebo lepší než u dosud používaných přípravků
- Zařazování jsou pacienti splňující vstupní kritéria (diagnóza, pokročilost onem.)
- Počet subjektů 100-1000
- Randomizace, paralelní, cross-over uspořádání

## IV. fáze klinického hodnocení

- Hodnocení prováděna až po registraci daného přípravku a zahájení jeho používání v běžné léčebné praxi
- Hlavní cíl ověřit vlastnosti léčivého přípravku v reálném prostředí v reálných populacích pacientů

## Klinické hodnocení nových léčiv

**Randomizace** je proces náhodného rozdělování subjektů do srovnávacích ramen klinického hodnocení (kompletní, bloková, stratifikovaná).



## **Klinické hodnocení nových léčiv**

### **INTERIM ANALÝZA –**

plánované jednorázové nebo opakované statistické zpracování dat klinického hodnocení s předem jasně definovanými kritérii pro případné ukončení nebo pokračování experimentu v závislosti na vlastních výsledcích interim analýzy.

### **ETICKÉ A EKONOMICKÉ DŮVODY**

### **ZASLEPENÍ –**

single blinding – zaslepena je pouze jedna strana subjekt hodnocení nebo investigátor

double blinding – zaslepeni jsou subjekty hodnocení i investigátor

triple blinding – zaslepen je i personál spravující data experimentu

Zaslepení je prvek designu významně zvyšující jeho objektivitu.

### **METANALÝZA –**

je metodika sofistikovaného zobecnění výsledků dvou a více nezávisle

Provedených experimentů.

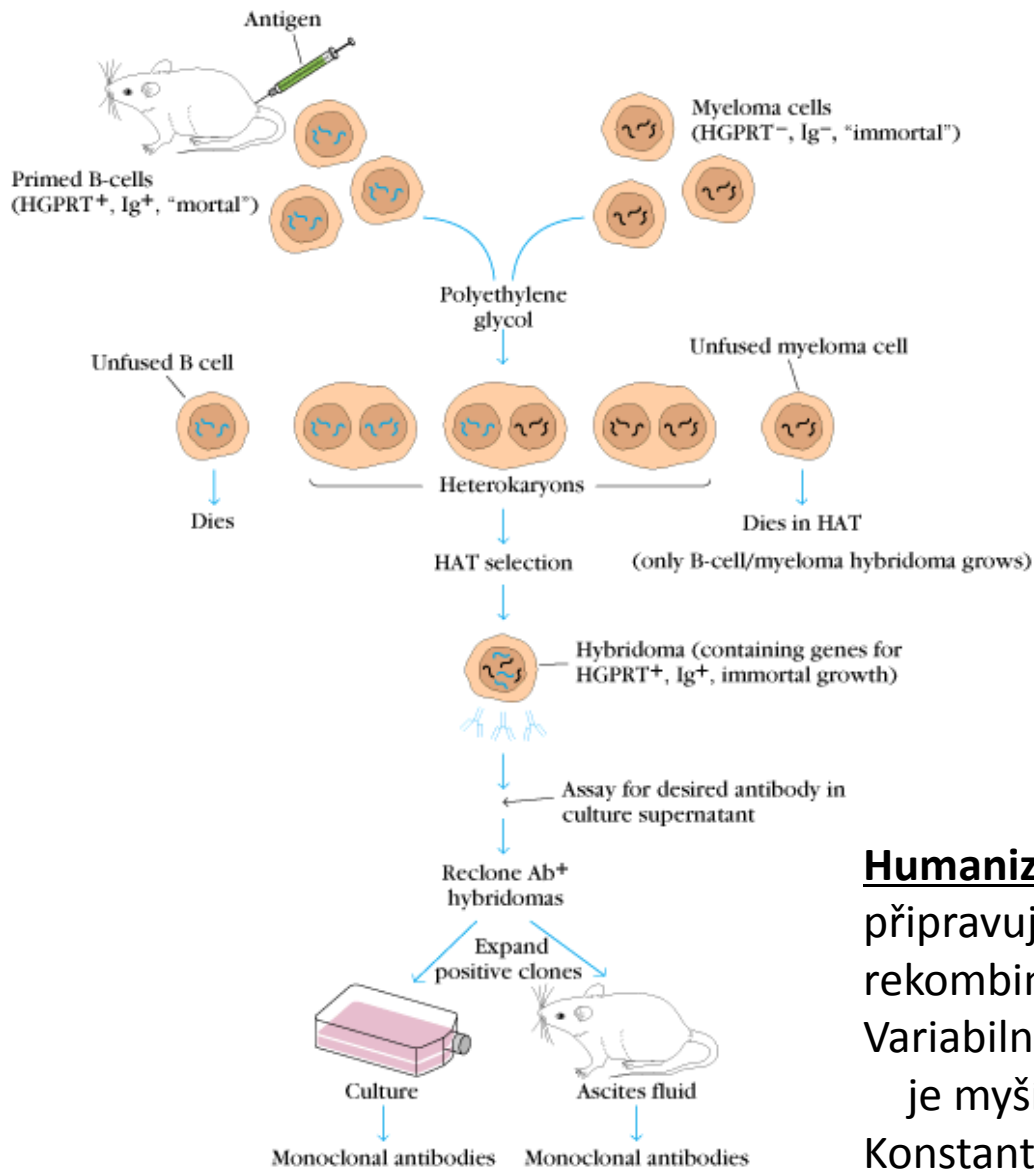
## Monoklonální protilátky

- Emil von Behring – objev protilátek, terapeutický význam coby „magických střel či otrávených šípů“
- Paul Ehrlich zavedl pojem imunoterapie
- 1975 C.Milstein a G.F.Kohler popsali technologii tvorby MP

V jedné hybridní linii spojili biologické vlastnosti B-lymfocyту tvořícího protilátky a nádorové buňky myelomové řady (tzv. hybridomová technologie)







## Příprava monoklonálních protilátek

### Nemodifikované myší mAb –

pro lidský organismus jsou cizorodé a vyvolávají imunitní odpověď  
tj. tvorbu antimyších protilátek (tzv. HAMA),  
které vedou až k anafylaxi  
či sérové nemoci

### Humanizované mAb (chimerické humánní/myší) –

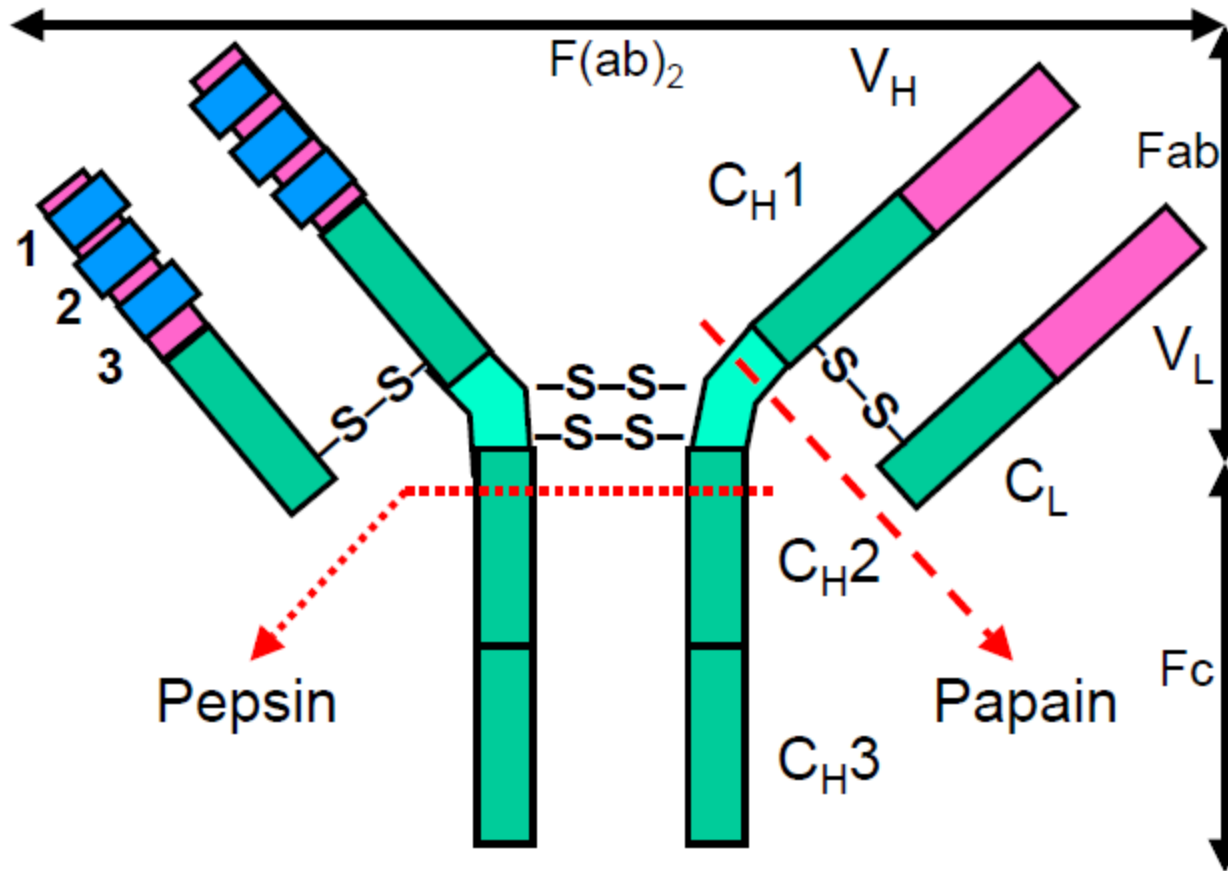
připravují se spojením hybridomové a DNA rekombinantní technologie  
Variabilní úsek MP kódující antigenní specifitu  
je myší

Konstantní úsek MP je z lidského imunoglobulinu

## Practical steps in monoclonal antibody production:

- 1) Immunize animal
- 2) Isolate spleen cells (containing antibody-producing B cells)
- 3) Fuse spleen cells with myeloma cells (e.g. using PEG - polyethylene glycol)
- 4) Allow unfused B cells to die
- 5) Add aminopterin to culture to kill unfused myeloma cells
- 6) Clone remaining cells (place 1 cell/well and allow each cell to grow into a clone of cells)
- 7) Screen supernatant of each clone for presence of the desired antibody.
- 8) Grow the chosen clone of cells in tissue culture indefinitely.
- 9) Harvest antibody from the culture supernatant.
- 10) (If you're a biotech company) charge about \$1,000-\$2,000 per mg.

## Struktura imunoglobulinu



**V** = variabilní doména (antigenní variabilita)

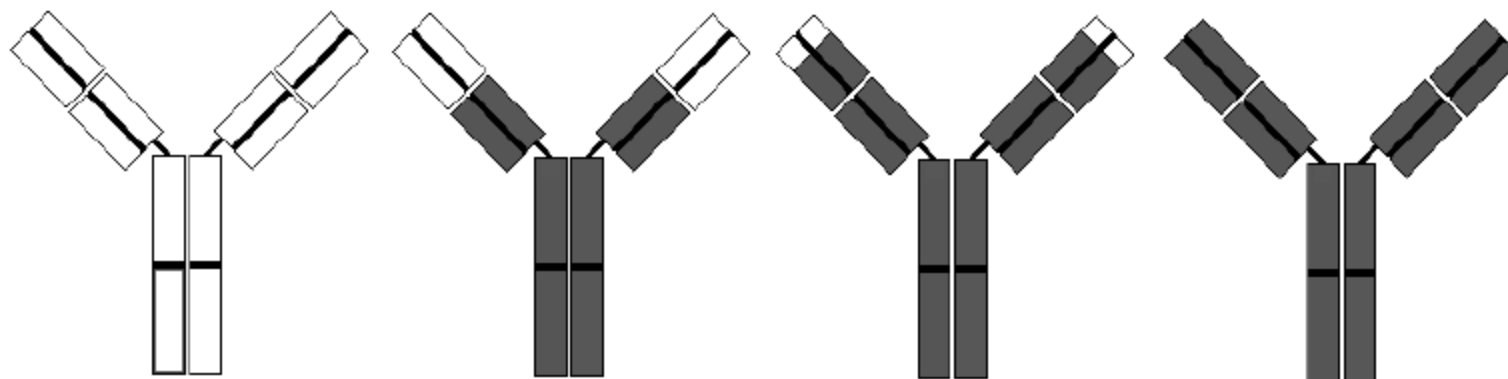
**C** = konstantní doména (vazba komplementu, vazba na Fc receptor imunokompetentních buněk ...)

1-3 – hyper-variabilní oddíl (antigenní specifita)

$V_L$ - $V_H$  = Fv (vazba antigenu)

$\mu, \delta, \alpha, \gamma, \epsilon$  = izotypy těžkých řetězců (IgM, IgD, IgA, IgG, IgE)

## Typy monoklonálních protilátek



### Myší MAb

100% myší

- Hypersensitivita
- **Vysoké hladiny neutralizujících protilátek (nepoužívají se)**

### Chimerické MAb

34% myší

- Hypersensitivita
- Nízké hladiny neutralizujících protilátek  
**(rituximab)**

### Humanizované MAb 5-10% myší

- Hypersensitivita
- Nízké hladiny neutralizujících protilátek  
**(trastuzumab)**

### Humánní MAb

100% lidské

- Hypersensitivita
- **Nízké hladiny neutralizujících protilátek (panitumumab)**

## Typy monoklonálních protilátek

### Protilátky nekonjugované (klasické / bispecifické – trifunkční)

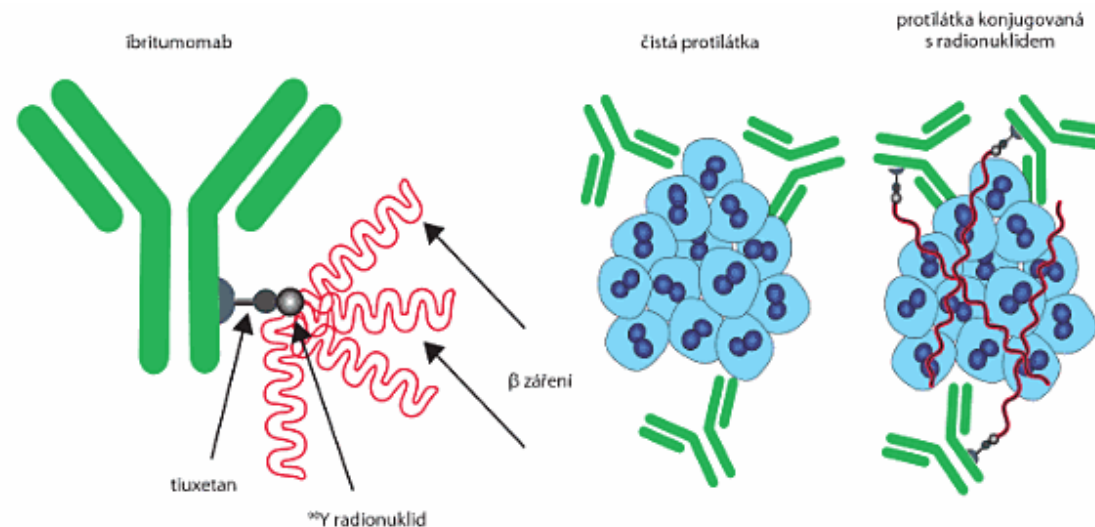
### Protilátky konjugované

Konjugované s imunotoxiny

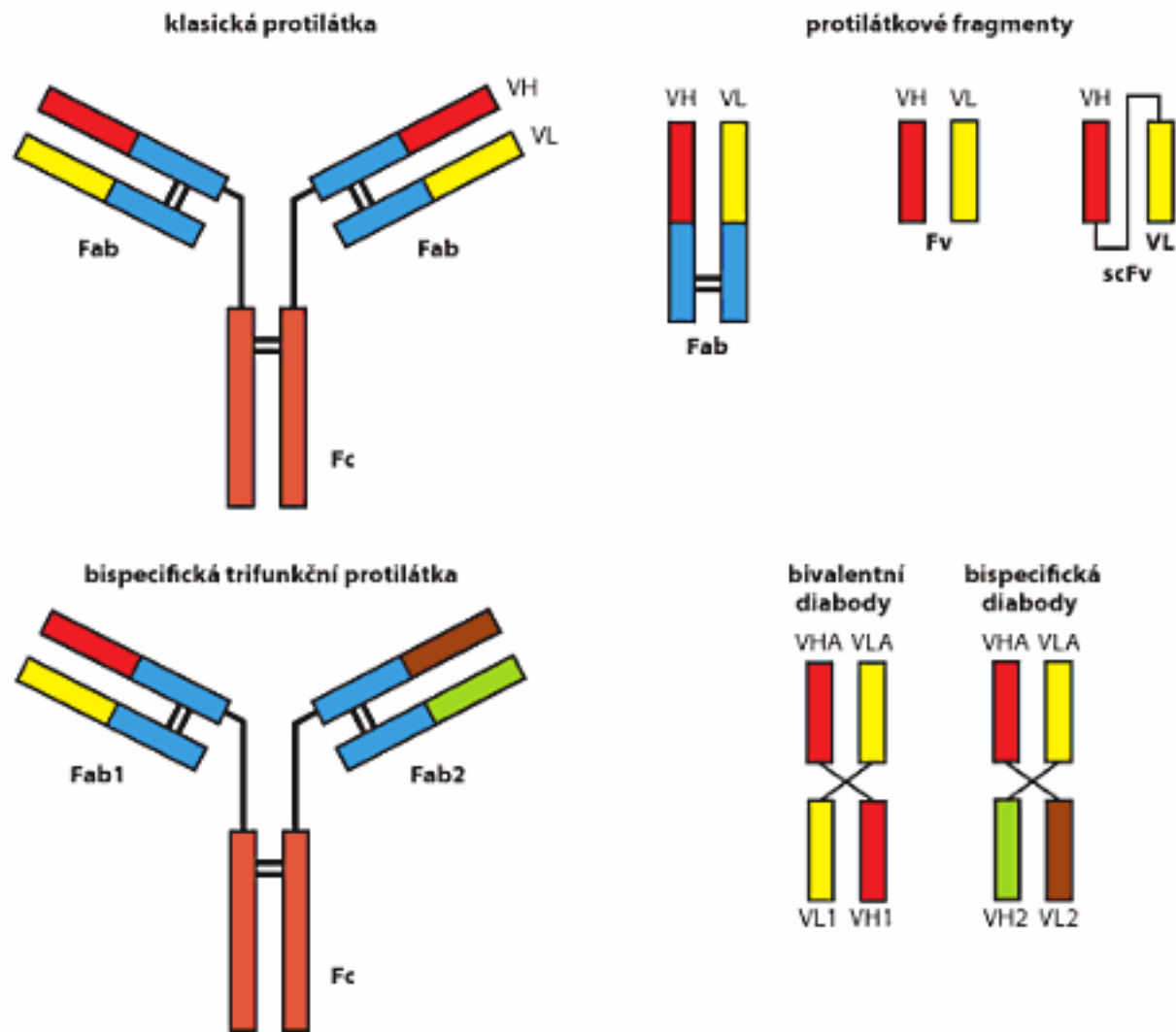
Konjugované s radionuklidem

Konjugované s cytokiny

Konjugované s cytostatiky



Obr. 34 Znárodnění účinku protilátky konjugované s radionuklidem



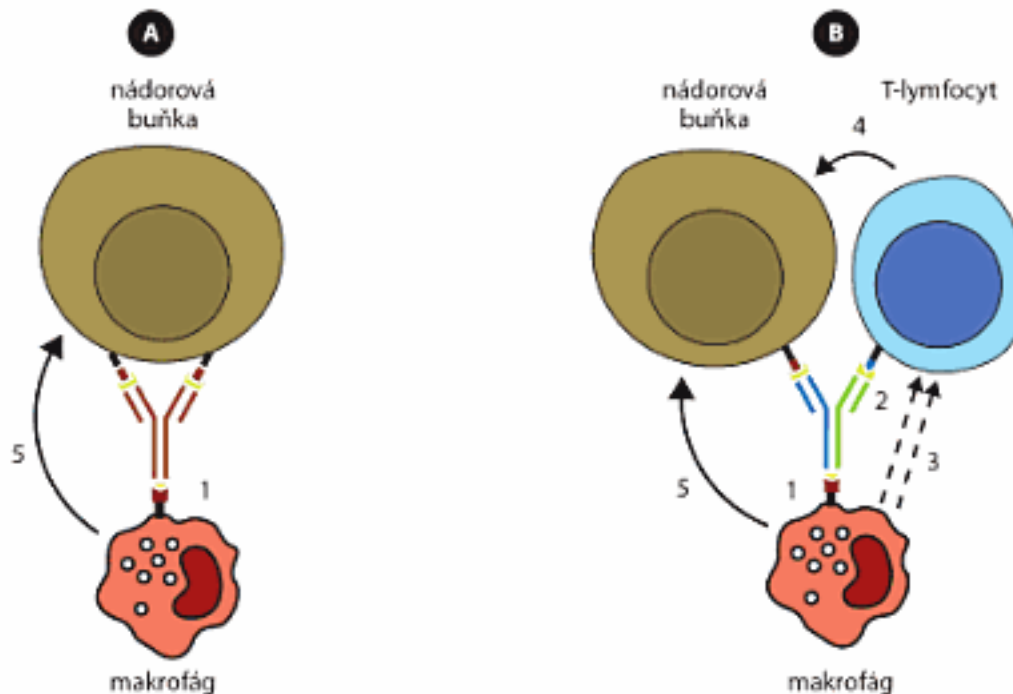
**Obr. 36** Porovnání klasické (bivalentní monospecifické) protilátky, bispecifické/trifunkční protilátky a protilátkových fragmentů

## Biologické účinky navozené mAb

Přímý účinek (indukce apoptózy, interference s receptorem a ligandem, ovlivnění účinnosti klasických cytostatik, dle charakteru antigenu)

Účinek zprostředkovaný cytotoxickými buňkami (ADCC)

Účinek zprostředkovaný komplementem



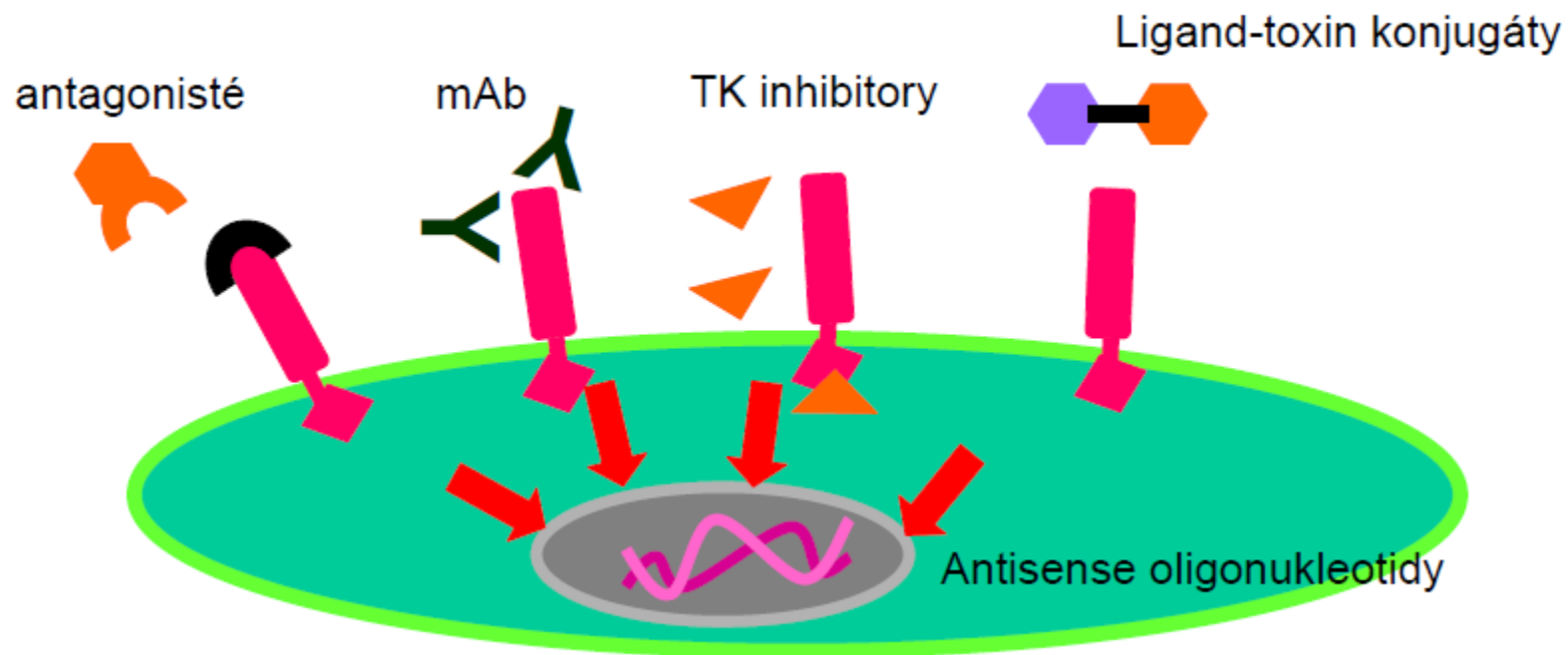
**Obr. 35** Rozdíly mezi (A) monospecifickou a (B) bispecifickou/trifunkční monoklonální protilátkou  
 (1) Mechanismus ADCC. (2) Atrakce T-lymfocytu. (3) Indukce kostimulačních molekul. (4) Specifická protinádorová imunita.  
 (5) Nespecifická protinádorová imunita.

## Přehled mAb používaných v terapii nádorových onemocnění

generický název	obchodní přípravek	cílová struktura	použití
trastuzumab	Herceptin	HER-2-neu	Ca prsu
cetuximab	Erbitux	EGFr	NSCLC, ORL
bevacizumab	Avastin	VEGF	různé nádory
rituximab	Mabthera	CD-20	NHL, B-CLL
ibritumomab	Zevalin	( <sup>90</sup> Yt) CD-20	NHL
tositumomab	Bexxar ( <sup>131</sup> I)	( <sup>131</sup> I) CD-20	NHL
epratuzumab		CD-22 human.	NHL
apolizumab		HLA-DR	NHL
alemtuzumab	MabCampath	CD-52	B-CLL
gemtuzumab	Mylotarg	CD-33	AML
oregovomab	Ovarex	CA-125	Ca ovaria
edrecolomab	Panorex	CO-17-1A	Ca kolorekta
panitumomab		EGFr	Ca ledvin (RCC)



## Strategie cílené léčby



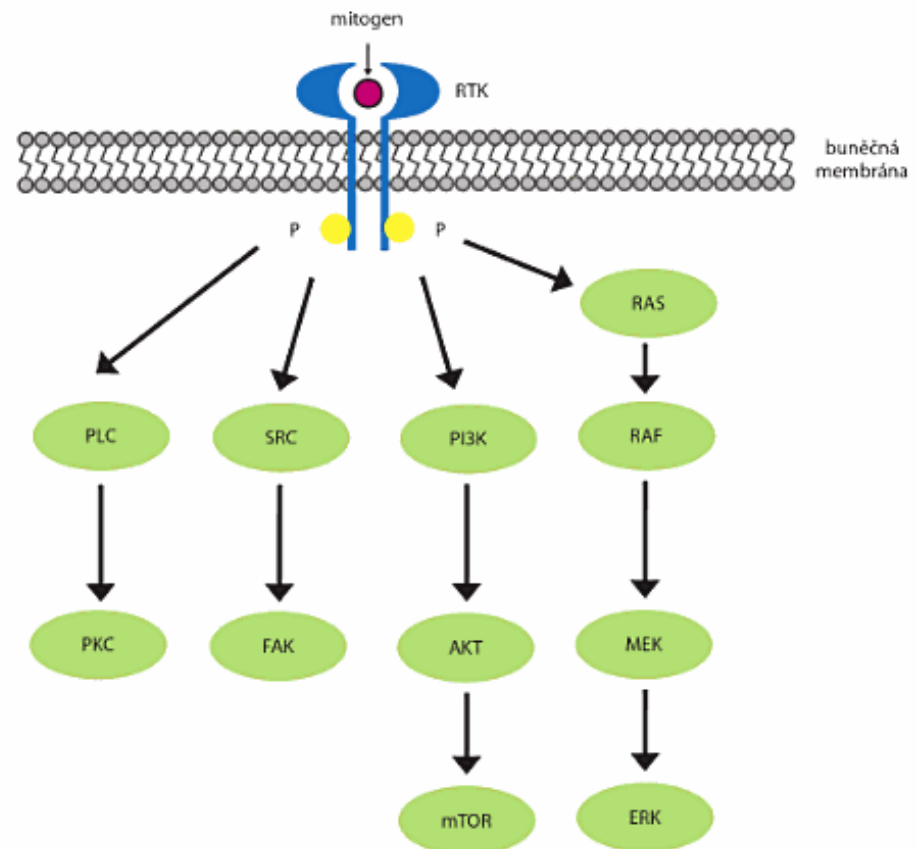
# Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

## Inhibice receptorových tyrozinkináz (RTK)

RTK představují klíčové receptorové struktury extracelulárních mitogenních signálů (růstových faktorů)

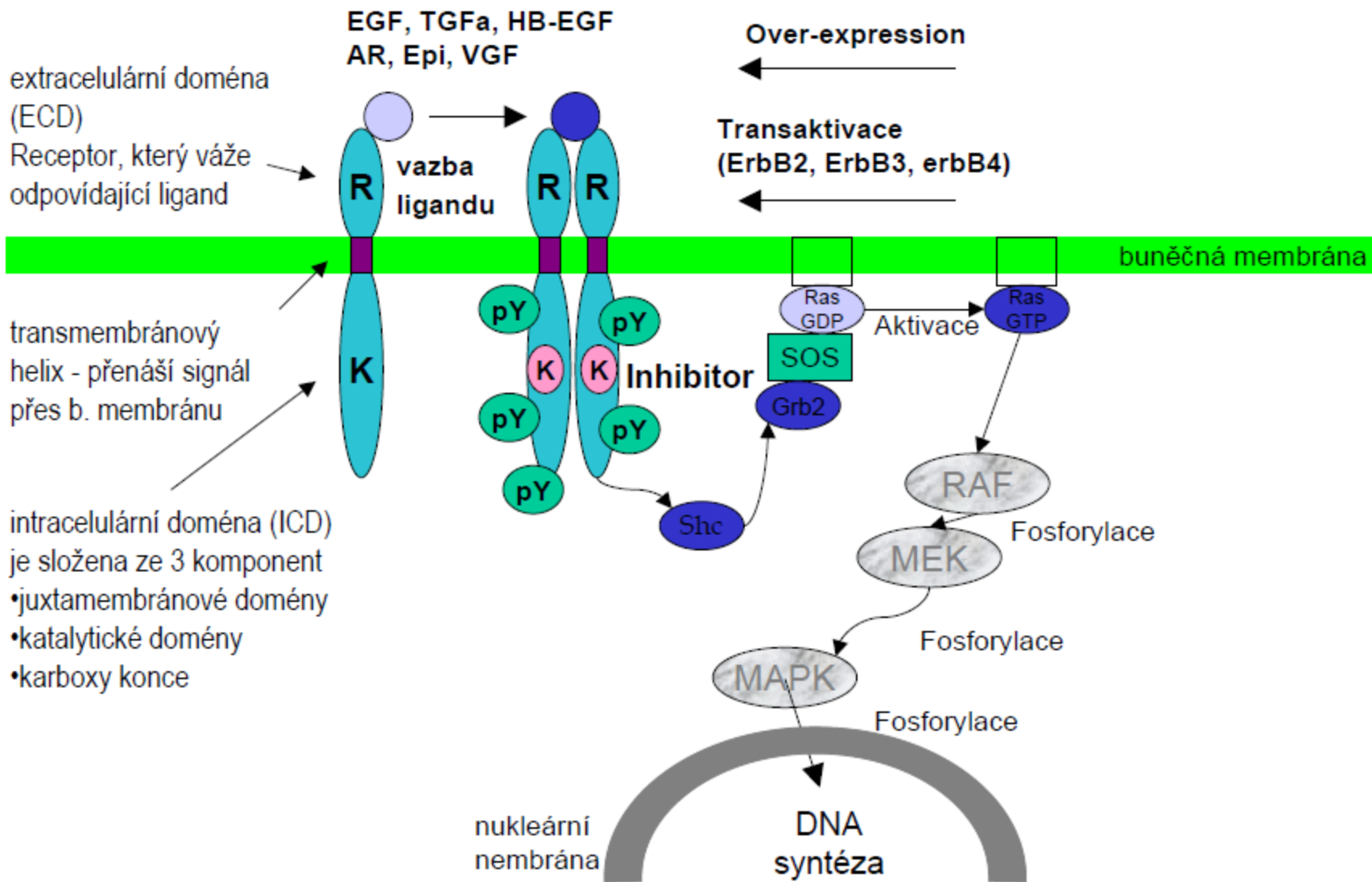
**Monoklonální protilátky** jsou zacílené na extracelulární receptorovou část RTK.

**Nízkomolekulární tyrozinkinázové Inhibitory (TKI)** blokují intracelulární tyrozinkinázovou doménu RTK.



Obr. 38 Signální dráhy aktivované receptorovými tyrozinkinázami (RTK)

# Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace



# Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

Tab. 7 Přehled vybraných receptorových tyrozinkináz

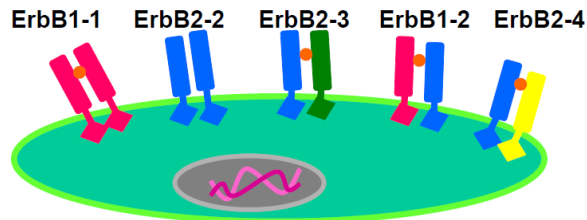
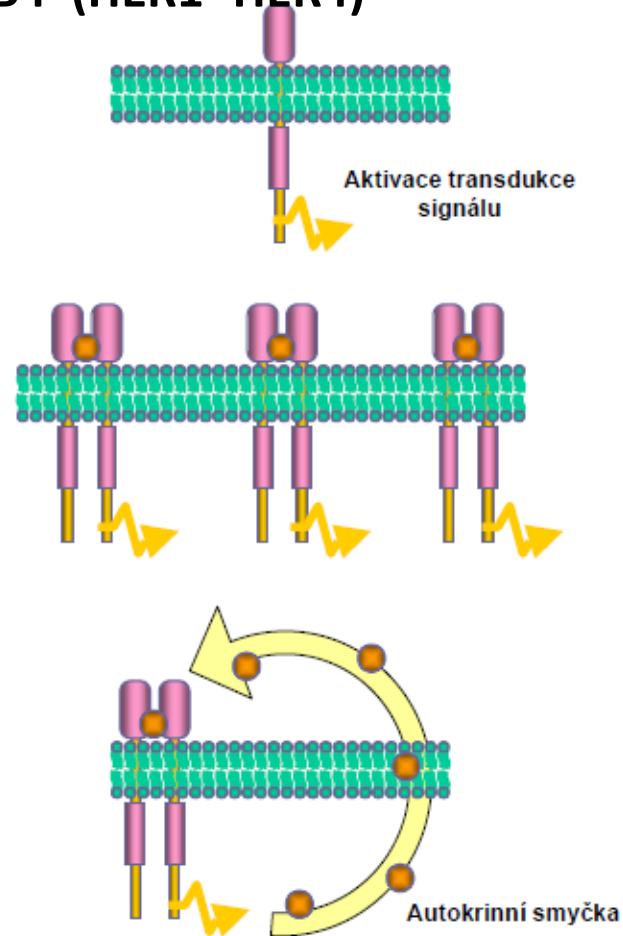
RTK		ligand		malignity s prokázanou deregulací RTK (overexpres, mutace)
EGFR/ ERBB1/ HER1	<i>epidermal growth factor receptor /avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog/human epidermal growth factor receptor</i>	EGF	<i>epidermal growth factor</i>	karcinom tlustého střeva, plic
ERBB2/ HER2/ NEU	<i>neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog</i>	neváže ligand	vytvádí heterodimery s EGFR/ERBB1/HER1	karcinom prsu, ovaria
MET	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>	HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>	karcinom žaludku, ledvin
IGF1R	<i>insulin-like growth factor receptor</i>	IGF	<i>insuline-like growth factor</i>	karcinom prostaty, plic, ledvin, mnohočetný myelom
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>	PDGR	<i>platelet-derived growth factor</i>	AML, karcinom prsu, sarkomy
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	karcinom plic, prsu, ovaria, endometria, žaludku, prostaty, močového měchýře
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>	FLT3 ligand		AML
KIT/SCFR CD117	<i>stem cell factor receptor</i>	SCF/KITL/ MGF	<i>stem cell factor/mast cell growth factor</i>	AML, mastocytóza, GIST
FLT1/ VEGFR1	<i>FMS-like tyrosine kinase/vascular endothelial growth factor receptor</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	nádorové cévy
KDR/ VEGFR2/ FLK1	<i>kinase insert domain receptor/fetal liver kinase</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	nádorové cévy
CSF1R/ c-FMS CD115	<i>colony stimulating factor 1 receptor /feline McDonough sarcoma viral (v-FMS) oncogene homolog</i>	CSF1 / M-CSF	<i>colony stimulating factor 1/ macrophage-colony stimulating factor</i>	karcinom prsu, ovaria, endometria, plic, prostaty, pankreatu, ledvin

Klener, 2010

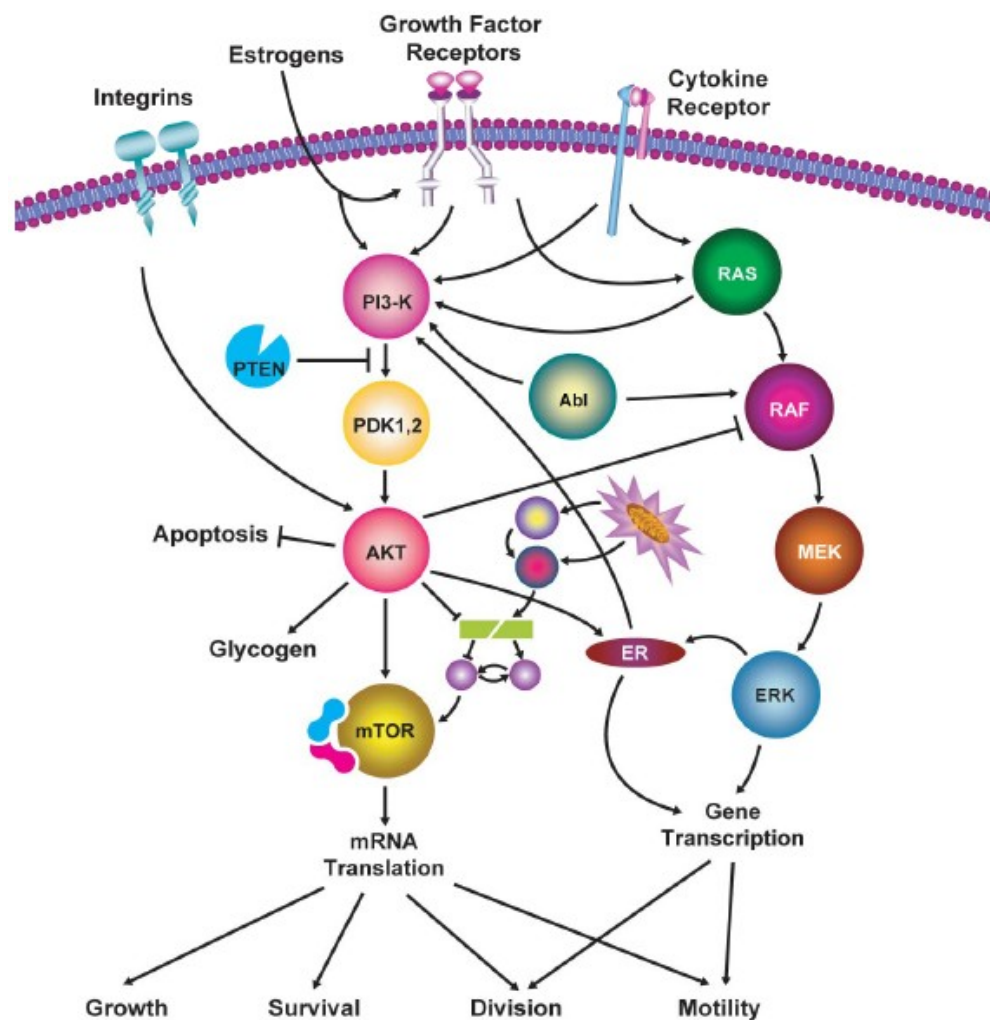
## Receptorová rodina ErbB a nádorová onemocnění

ErbB jsou receptory typu 1 tyrozinkinázové rodiny, představují 4 transmembránové glykoproteiny ErbB1 -ErbB4 (HER1 -HER4)

- Mutace proteinu (např. EGFRvIII— konstitutivně aktivní delece mutce nemá většinu z extracelulární domény – ECD)
- Genetické změny jejichž výsledkem je overexprese buď normálních nebo konstitutivně aktivních receptorů
- Produkce EGF nebo TGF- $\alpha$  nádorovou buňkou: vznik autokrinní smyčky vedoucí ke konstitutivní aktivaci ErbB-1



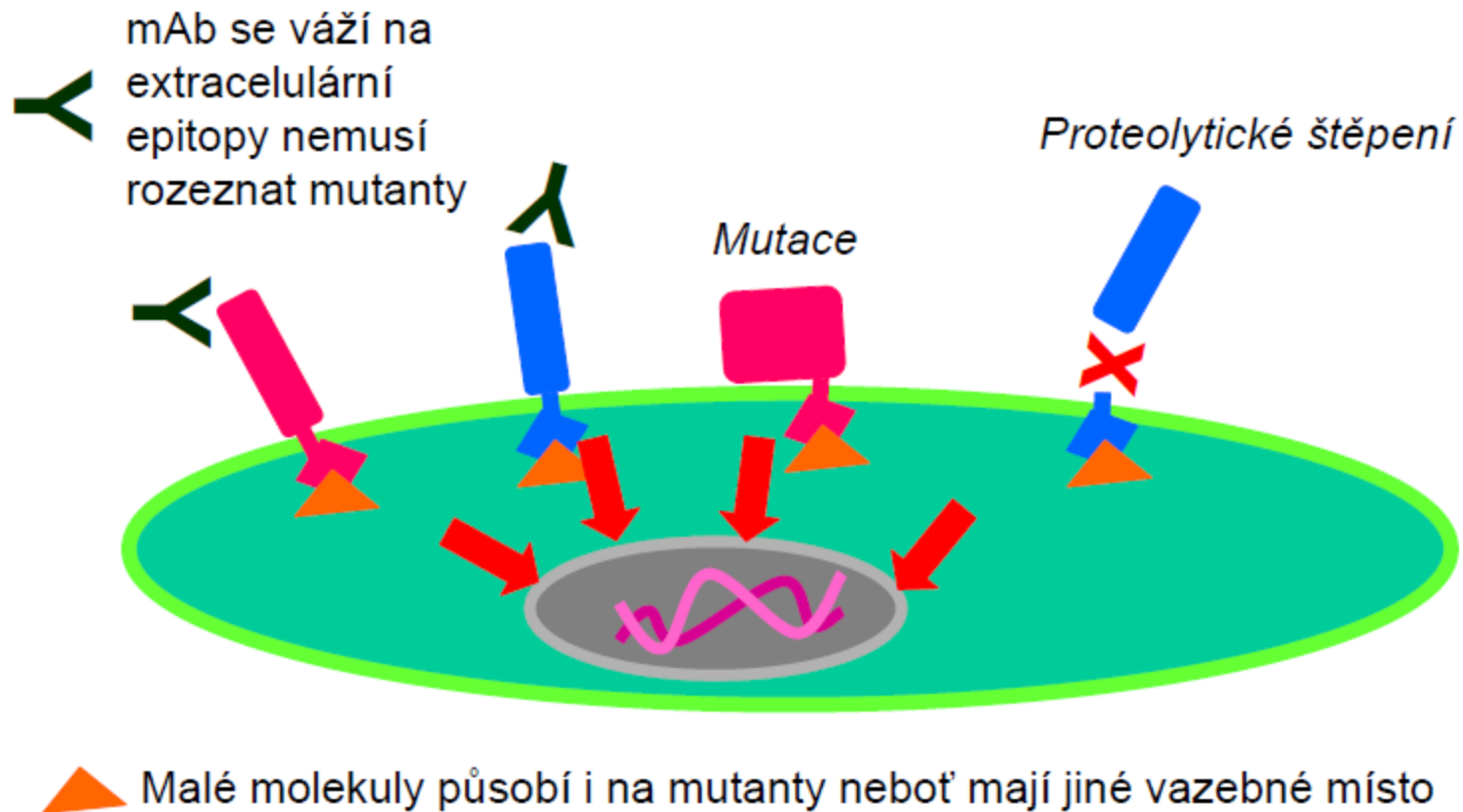
## Cross-talk s dalšími onkogenními signálními drahami



## Receptorová rodina ErbB a nádorová onemocnění

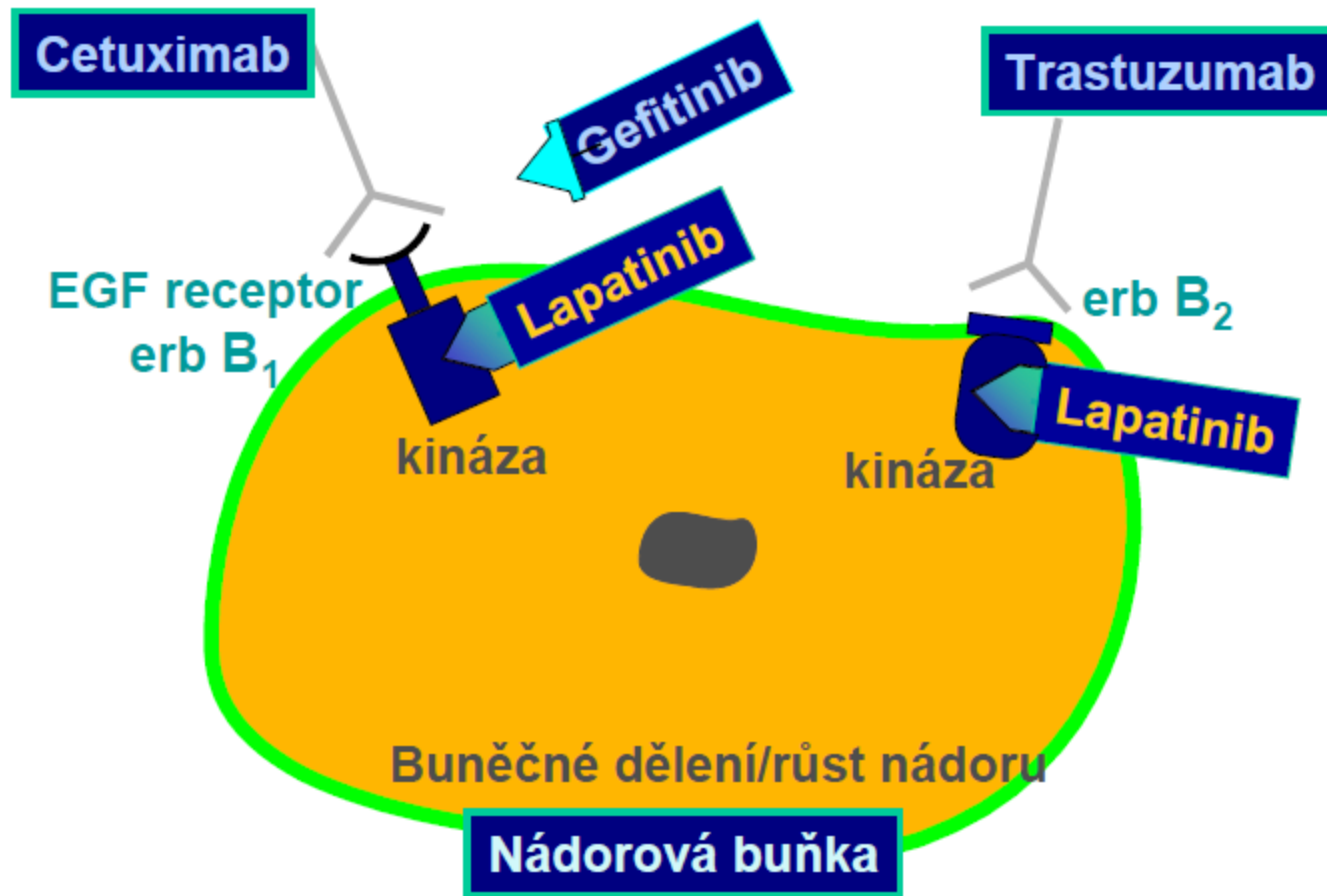
Tumor	ErbB1 %	ErbB2 %
Moč. měchýř	31 – 48	7 – 36
<b>Ca prsu</b>	<b>14 – 91</b>	<b>10 – 37</b>
Kolorektální Ca	25 – 77	7
Jícen	71	13 – 73
Gliom	45 – 50	–
NSCLC	40 – 80	3 – 56
Ovarium	35 – 70	20 – 32
Pankreas	30 – 50	–
<b>Ledviny</b>	<b>50 – 90</b>	<b>24 – 40</b>
Žaludek	–	5 – 55

## Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace





## Duální inhibice kináz



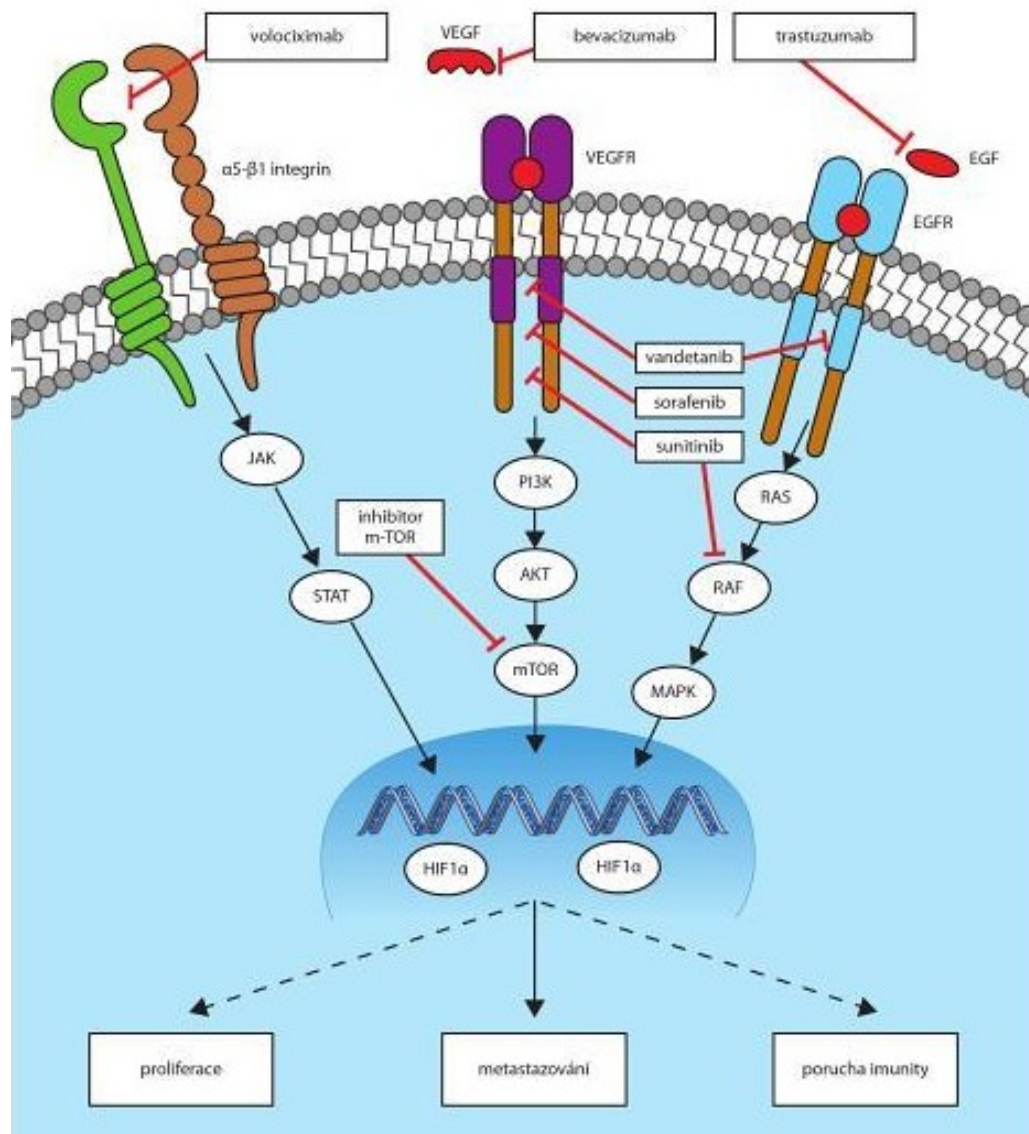
# Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

**Tab. 8** Přehled inhibitorů RTK a PTK

<b>inhibitory s převážným účinkem na EGFR/ERBB/HER</b>		
gefitinib	Iressa	EGFR/ERBB1/HER1
erlotinib	Tarceva	EGFR/ERBB1/HER1
lapatinib	Tyverb	EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2/NEU, ERK1, ERK2, AKT
BIBW-2992	Tovok	EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2/NEU
canertinib	–	pan-ERBB
neratinib	–	ERBB2/HER2/NEU
vandetanib	Zactima	EGFR/ERBB1/HER1, VEGFR
<b>Inhibitory s převážným účinkem na VEGFR jsou uvedeny v kapitole 11.1.2.</b>		
<b>multikinázové inhibitory</b>		
imatinib	Glivec	BCR-ABL, KIT
dasatinib	Sprycel	BCR-ABL, KIT, PDGFR
nilotinib	Tasigna	BCR-ABL, KIT, PDGFR
bosutinib	–	BCR-ABL, SRC
sunitinib	Sutent	VEGFR1–3, PDGFRA/B, KIT, RET, CSF1R
sorafenib	Nexavar	VEGFR1–3, PDGFRB, RAF (CRAF, BRAF, včetně mutovaných BRAF), KIT, RET, FLT3
lestaurtinib	–	FLT3, JAK2, NTRK1/TRKA, NTRK3/TRKC
tandutinib	–	FLT3, PDGFR, KIT

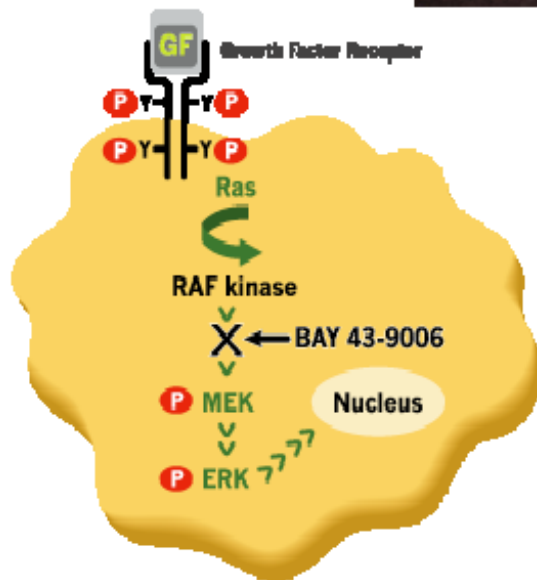
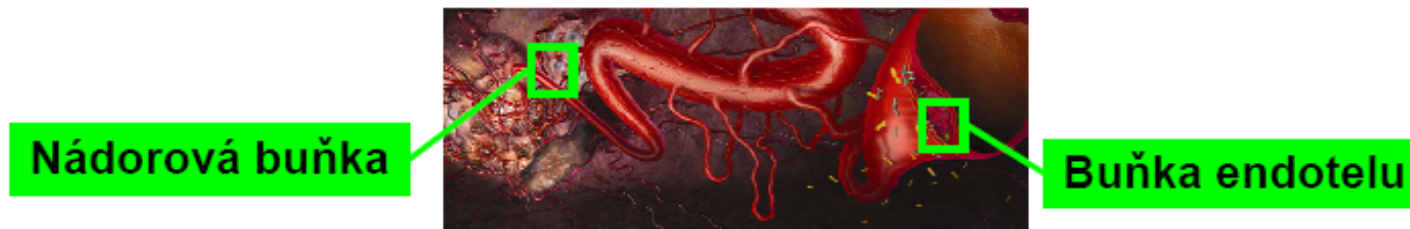
*Klener, 2010*

# Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice angiogeneze

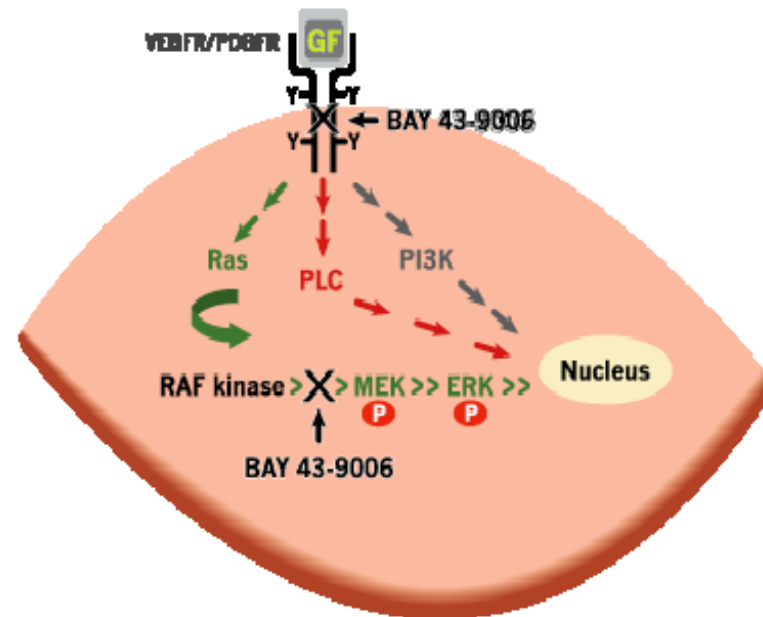


Klener, 2010

# Sorafenib – duální inhibitor RAF kinázy a VEGFR\*

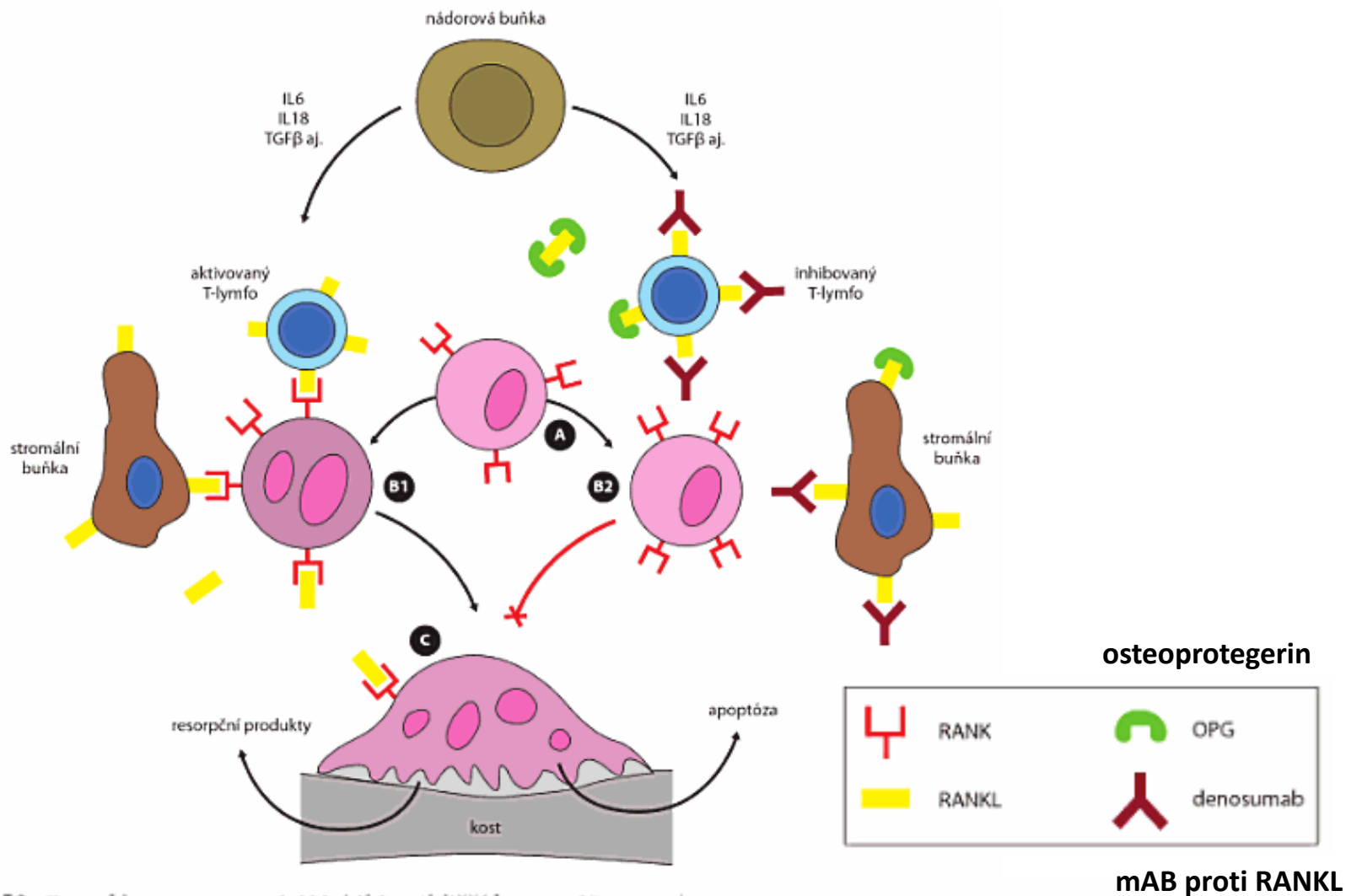


BAY 43-9006 inhibuje proliferaci nádorových buněk působením na RAF/MEK/ERK signální cestu na úrovni RAF kinázy.



BAY 43-9006 prokázal antiangiogenní efekt působením na tyrosin kinázový receptor VEGFR-2 a PDGFR a jejich signální kaskádu.

# Cílená léčba: antiresorpční léčba kostních metastáz

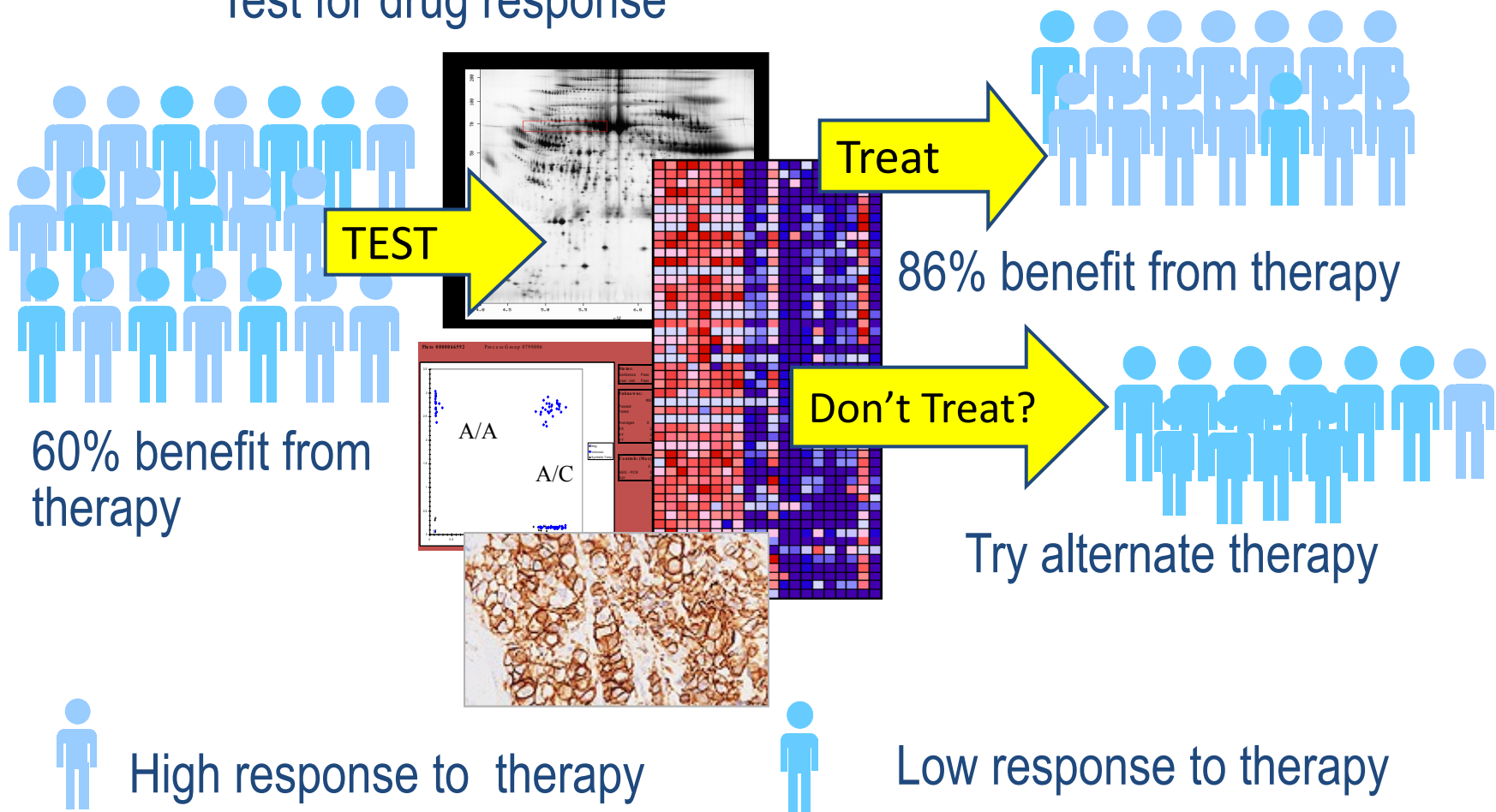


Obr. 53 Osteoklastogeneze a její inhibice (bližší komentář v textu)

A – prekursor osteoklastu, B1 – osteoklast aktivovaný RANKLem, B2 – inhibovaný osteoklast, C – zralý osteoklast

# Cílená léčba: prediktivní onkologie: individualizace léčby

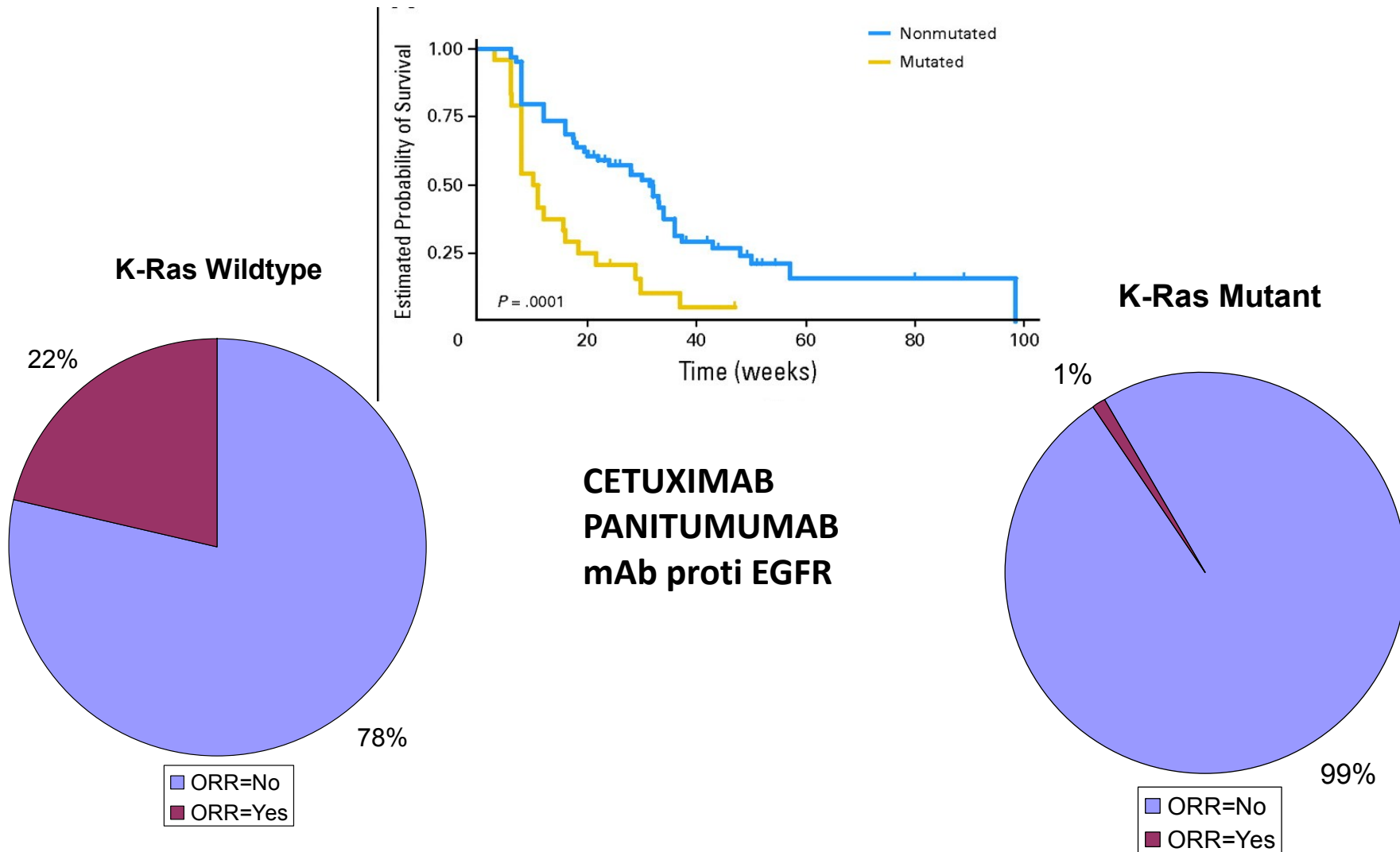
Test for drug response\*



\* Specific blood, tissue or imaging marker that can be used to prospectively identify patients for efficacy, safety and/or dose

# Cílená léčba: prediktivní onkologie: individualizace léčby

## Results: *K-Ras* Mutation and OVERALL RESPONSE RATE







**"Here's my  
sequence..."**



## Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice

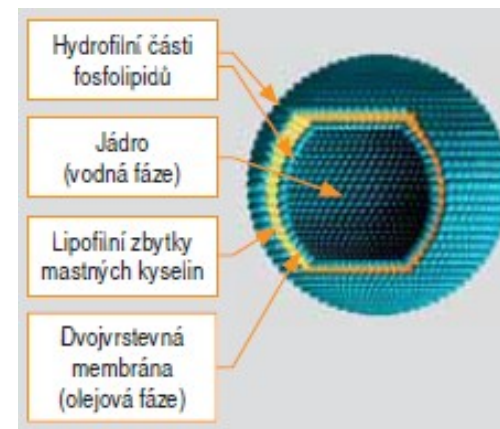
Ideální nano- transportní systém zajistí, že konjugát léčiva a transportního systému doručí léčivo do specifického místa účinku.

Lipozomy a nanočástice jsou účinné technologie pro racionální transport cytostatik v terapii nádorových onemocnění.

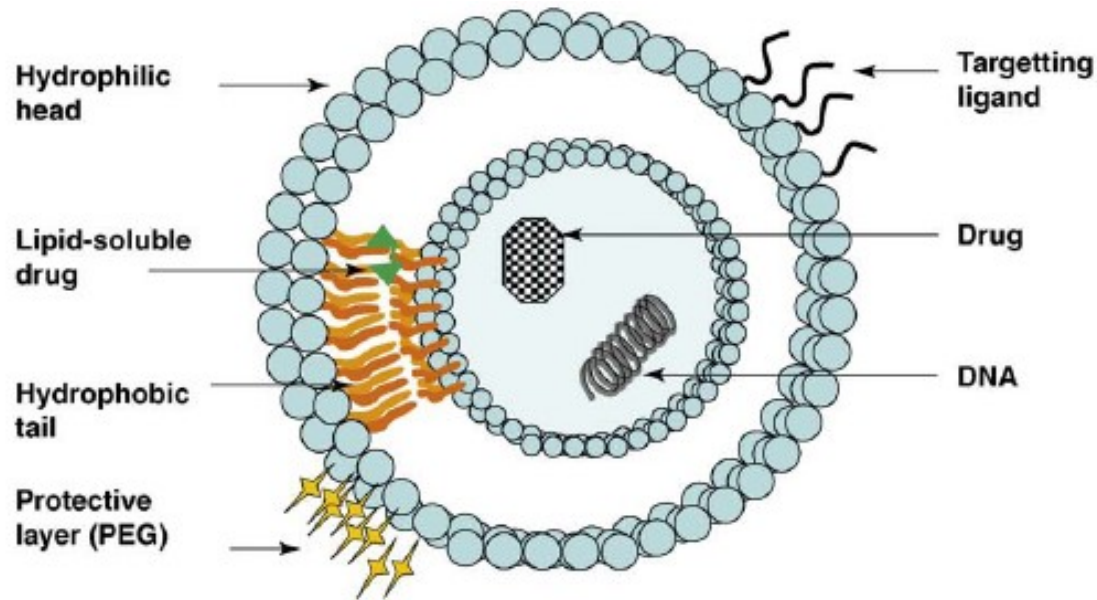
Jejich užití zlepšuje farmakokinetické vlastnosti, kontrolované a prodloužené Uvolňování léčiva a především nižší systémovou toxicitu.

Do praxe zaveden **lipozomální Doxil** (doxorubicine), nanočásticový na albumin vázaný Paclitaxel – **nab Abraxane**

**Lipozomy** jsou to částice tvořené fosfolipidy o velikosti 0,6–2  $\mu\text{m}$  s tloušťkou membrány 5 nm. Jádru i povrchu lipozomu je hydrofilní, vnitřek membrány tvoří lipofilní zbytky mastných kyselin fosfolipidů. Léčivo je možné umístit podle jeho povahy do jádra nebo do membrány lipozomu



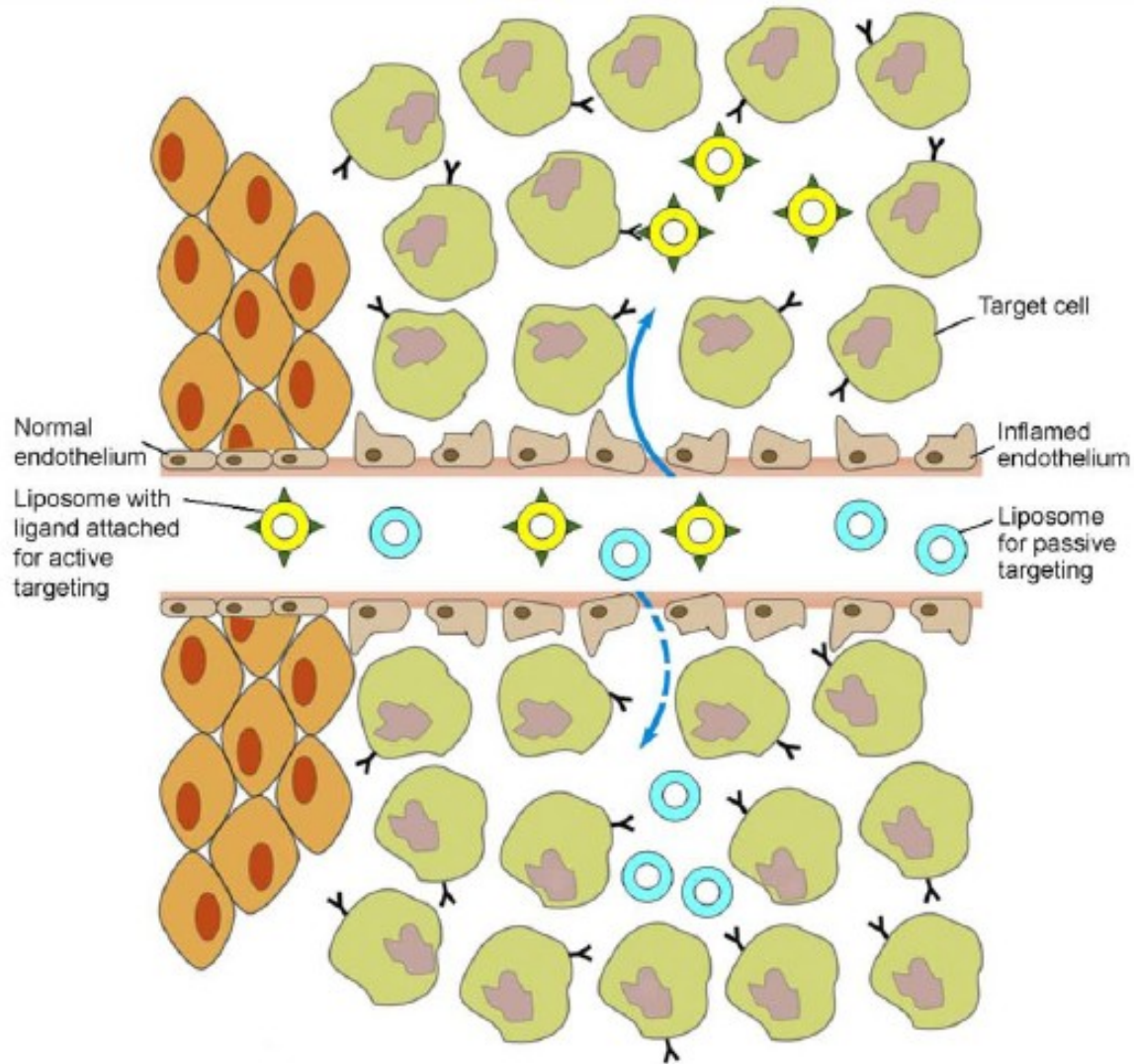
## Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice



*TRENDS in Pharmacological Sciences*

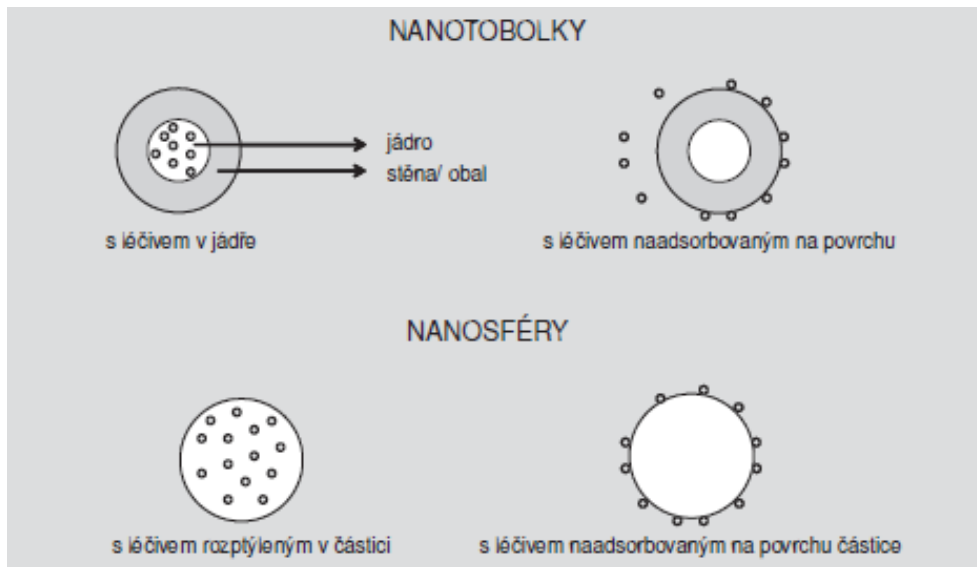
Úpravou povrchu lipozomů, např. **polyethylenglykolem (PEG)**, se **prodloužila jejich cirkulace v krevní plazmě** a částečně se vyřešil problém s jejich vychytáváním jako cizorodých částic retikuloendoteliárním systémem. V praxi se používají léky s obsahem daunorubicinu a doxorubicinu jako parenteralia ve farmakoterapii Kaposiho sarkomu, s amfotericinem B při léčbě invazivních plísňových infekcí, s obsahem virionů inaktivované hepatitidy A jako očkovačí látka proti hepatitidě A, při terapii syndromu dechové nedostatečnosti u předčasně narozených dětí s obsahem lyofilizátu z hovězích plic, s ekonazolem při lokálním ošetření plísňových kožních chorob.

## Lipozomy: aktivní a pasivní transport



## Nanočástice

V současnosti je největší pozornost věnována nanočásticím. Svou velikostí 60–300 nm leží nanočástice na subcelulární úrovni a mohou se proto jako lékové mininosiče cíleně usměrnit do orgánů, tkání, buněk a nemocných částí těla, které zůstávají jiným lékovým formám nedostupné. Jsou určeny pro cílené uvolňování a působení léčiva při perorálním, parenterálním i lokálním podání, pro aplikaci do oka i nosu. Volbou metody přípravy a aktivizací povrchu nanočástic je možné je nasměřovat na různé cíle. Očekává se od nich využití při cíleném transportu cytostatik, specifickém doručení antibiotik a antiparazitik, v perorálních lékových transportních systémech pro inzulín, proteiny, geny, pro vakcíny i při topické aplikaci.



### Solid lipids nanočástice

### Polymerové nanočástice

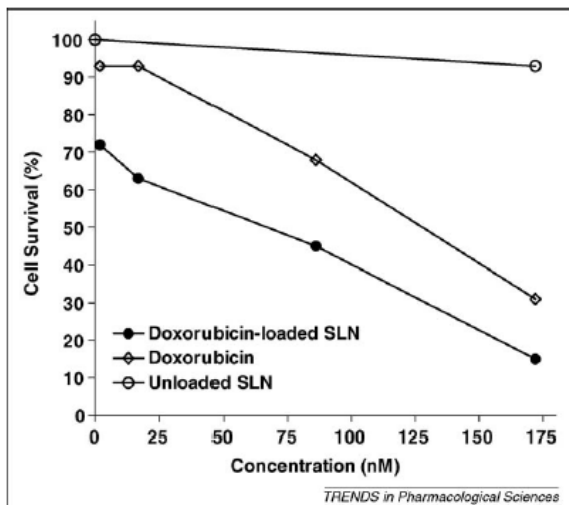
PLA - polylactid

PLGA - poly(D,L-lactide-co-glycolide)

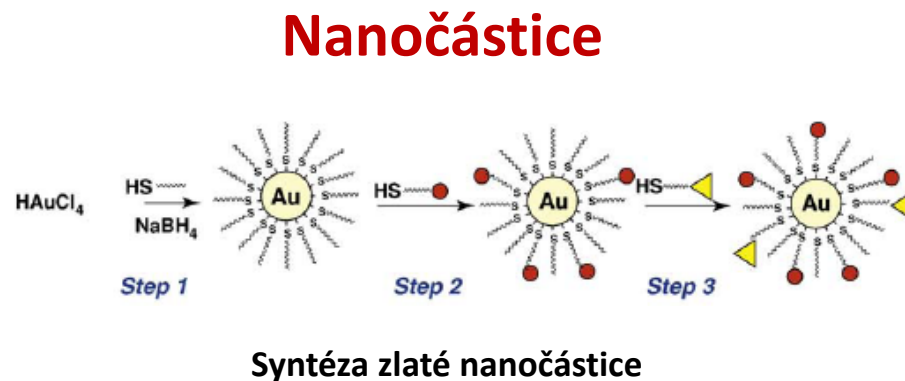
PEG - polyethylenglykol

### Zlaté nanočástice

### Albuminové nanočástice



**Figure 3.** Benefits of SLNs in doxorubicin delivery. The cytotoxicity of free doxorubicin, doxorubicin-loaded SLNs and unloaded SLNs at different concentrations towards HT-29 colorectal cancer cells after 72-h exposure is shown. Doxorubicin-loaded SLNs showed the highest toxicity, offering more potent treatment than conventional free doxorubicin. Unloaded SLNs did not induce any significant toxicity, which confirms that they are a safe carrier *in vitro* [19].



**Table 2. Representative examples of studies using drug-carrying nanoparticles<sup>a</sup>**

NP polymer	Drug	Study findings
PLGA [55]	Doxorubicin	A single intravenous injection of doxorubicin conjugated to PLGA NP exhibited tumour suppression comparable to that by daily injection of free doxorubicin over 12 days; thus, the NP formulation was much more potent and longer-lasting than conventional free doxorubicin
PLGA [51]	Dexamethasone	A single administration produced at least 14 days of sustained drug release; clinical application in suppressing glial cell proliferation on implanted electrodes for neurophysiological investigations into neural activity
PLA [56]	Thyrotropin-releasing hormone	Intranasal delivery through olfactory neurons to reach the brain; tested for an anticonvulsant in an animal seizure model; clinical application of peptide delivery to the brain without crossing the blood-brain barrier
PLA-TPGS/MMT NP [57]	Docetaxel	Much greater cytotoxic potency to cancer cells than Taxotere <sup>®</sup> (current clinical form of docetaxel)

<sup>a</sup>NP, nanoparticle; PLA-TPGS/MMT NP, poly(lactide)-D- $\alpha$ -tocopheryl poly(ethylene glycol) 1000 succinate copolymer incorporated in montmorillonite medical clay.



## Nanočástice

**Box 2. Potential therapeutic opportunities for nanoscale drug delivery in diseases other than cancer**

Nanocarrier	Drug	Disease	Advantages
SLNs [60]	Insulin	Diabetes mellitus	Pulmonary administration possible; an inhaler or nebulizer replaces a daily regimen of subcutaneous injections, increasing patient satisfaction and compliance
Liposomes [61]	Vasoactive intestinal peptide (VIP)	Hypertension	Potential new treatment for hypertension using VIP, which is limited by rapid degradation in blood by first-pass hepatic circulation
Liposomes (Ambisome®) [62]	Amphotericin B	Fungal infections	Reduced renal toxicity and greater efficacy in treating fungal infections; also used to treat other parasitic infections
Gold nanoparticles [63]	Ciprofloxacin	Bacterial infections such as urinary tract infections, cystitis, sinusitis and respiratory tract infections	Sustained release over a number of hours and greater local concentrations of the free drug at sites of pathology because of the permeation and retention effect
PLGA nanoparticles [64]	Rifampicin	Tuberculosis	Sustained release over a period of days, increasing patient compliance because medication can be taken weekly instead of daily over a period of 6 months
PLGA nanoparticles [65]	Benzocaine	Pain relief	Parental administration possible; only a single dose is required for a prolonged effect
SLNs [66]	Clozapine	Schizophrenia	Higher clozapine concentrations across the blood-brain barrier compared to clozapine solution

*Malam et al., Trends in Pharmacological Sciences, 2009*

## Albuminové nanočástice

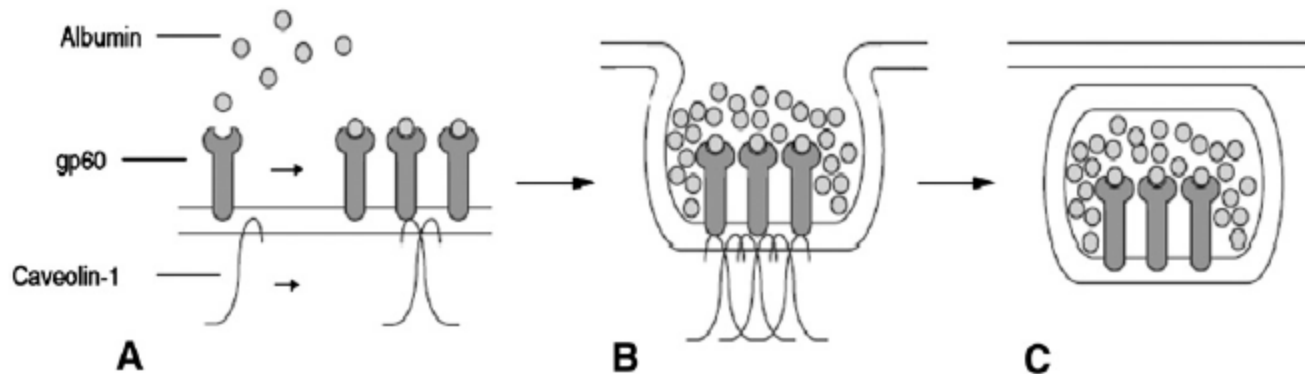


Fig. 1. Albumin receptor-mediated uptake of intravascular constituents and transcytosis across the vascular endothelium. A) Albumin receptor (gp60) binds albumin which in turn results in binding the induction of caveolin-1; B) caveolin-1 induces membrane budding and internalization, trapping free and protein-bound plasma constituents; C) formation of caveolae, leading to transcytosis and extravascular deposition of the caveolae contents.

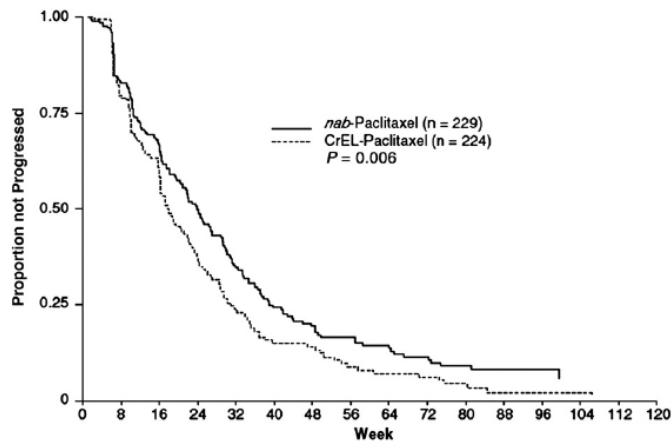


Fig. 5. Time to disease progression in a phase III trial of nab-paclitaxel versus CrEL-paclitaxel.

Abraxane je první léčivo založené na nanočásticovém transportu vazbou na albumin (nab). nab Paclitaxel má proti volnému paclitaxelu delší poločas a proti rozpuštěnému Cremophor EL, ve kterém je paclitaxel podáván nezpůsobuje hypersenzitivitu.

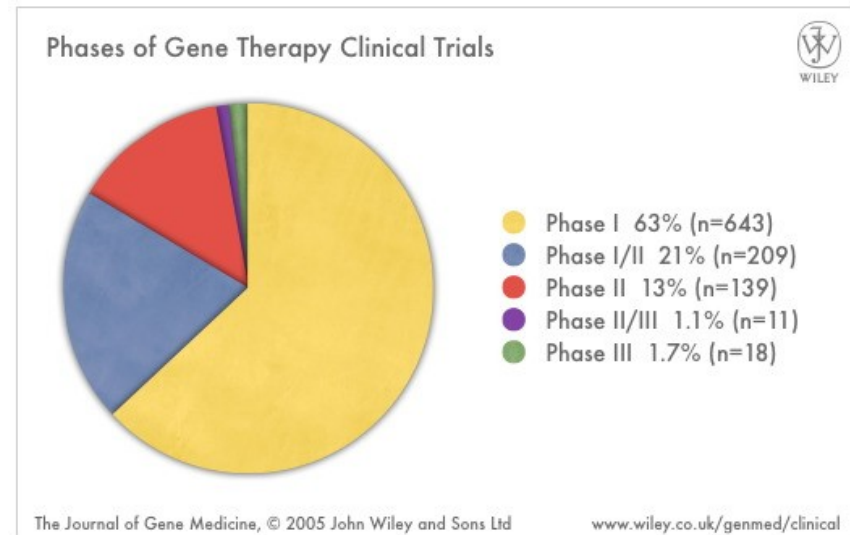
# Genová terapie

- většina chorob člověka je způsobena genetickou predispozicí spojenou s environmentálními vlivy. (*nature and nurture*)
- terapie zpravidla pouze modifikuje symptomy nemoci, či dává tělu možnost se uzdravit samo
- genová terapie: efektivní a kauzální léčba by změnila samotnou genetickou podstatu nemoci, nikoli jenom symptomy
- Pokud by se zdařila excize „špatné“ alely a její nahrazení „správnou“, otevřely by se dveře pro „**genetickou chirurgii**“
- Obavy z „**genetického dopingu**“ již i na OH v Turíně
- Otázky „**plastické genetiky**“

## Somatic-cell gene therapy

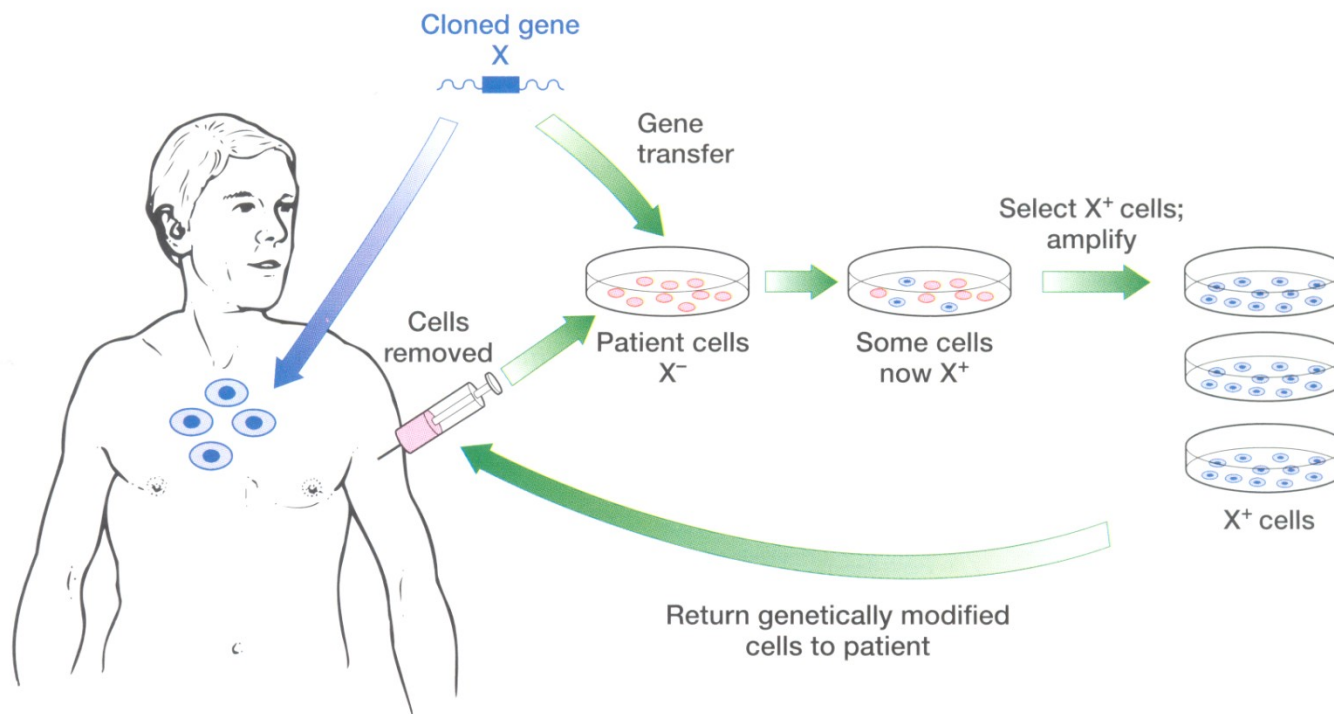
(= změna genetické informace pouze u somatických buněk)

## Germ-line gene therapy





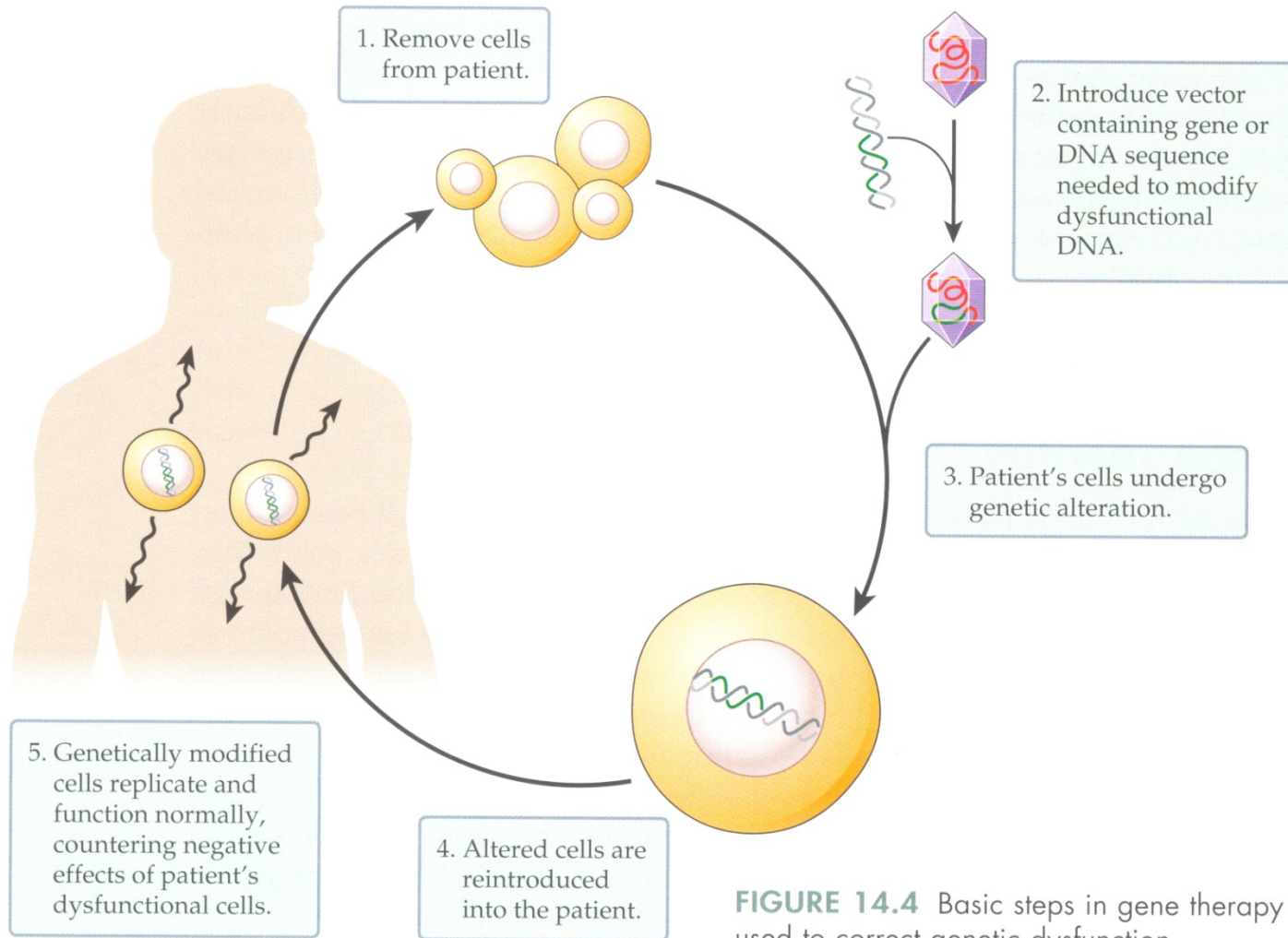
# In vivo a ex vivo genová terapie



**Figure 21.6: *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.**

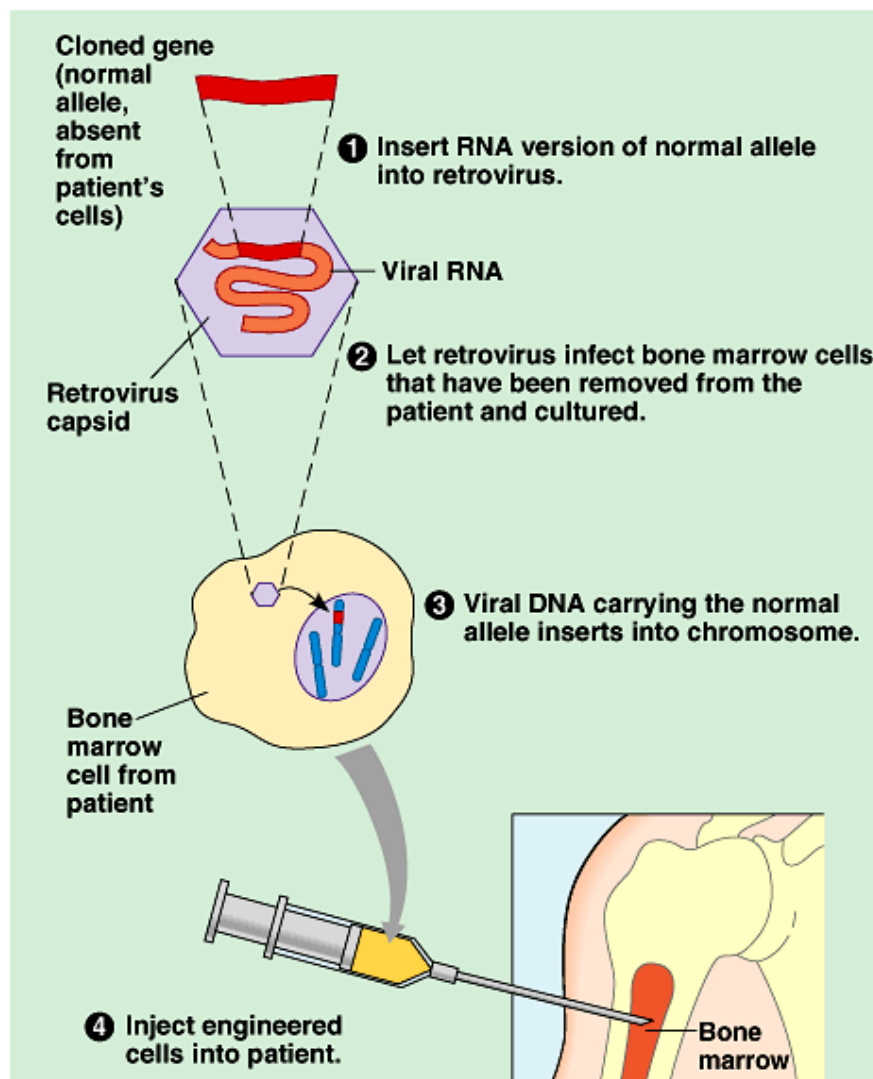
Where possible, cells are removed from the patient, modified in the laboratory and returned to the patient (*ex vivo* gene therapy; green arrows). This allows just the appropriate cells to be treated, and the cells can be checked before they are replaced to make sure that the desired change has been achieved. For many tissues this is not possible and the cells must be modified within the patient's body (*in vivo* gene therapy; blue arrow).

## Ex vivo genová terapie

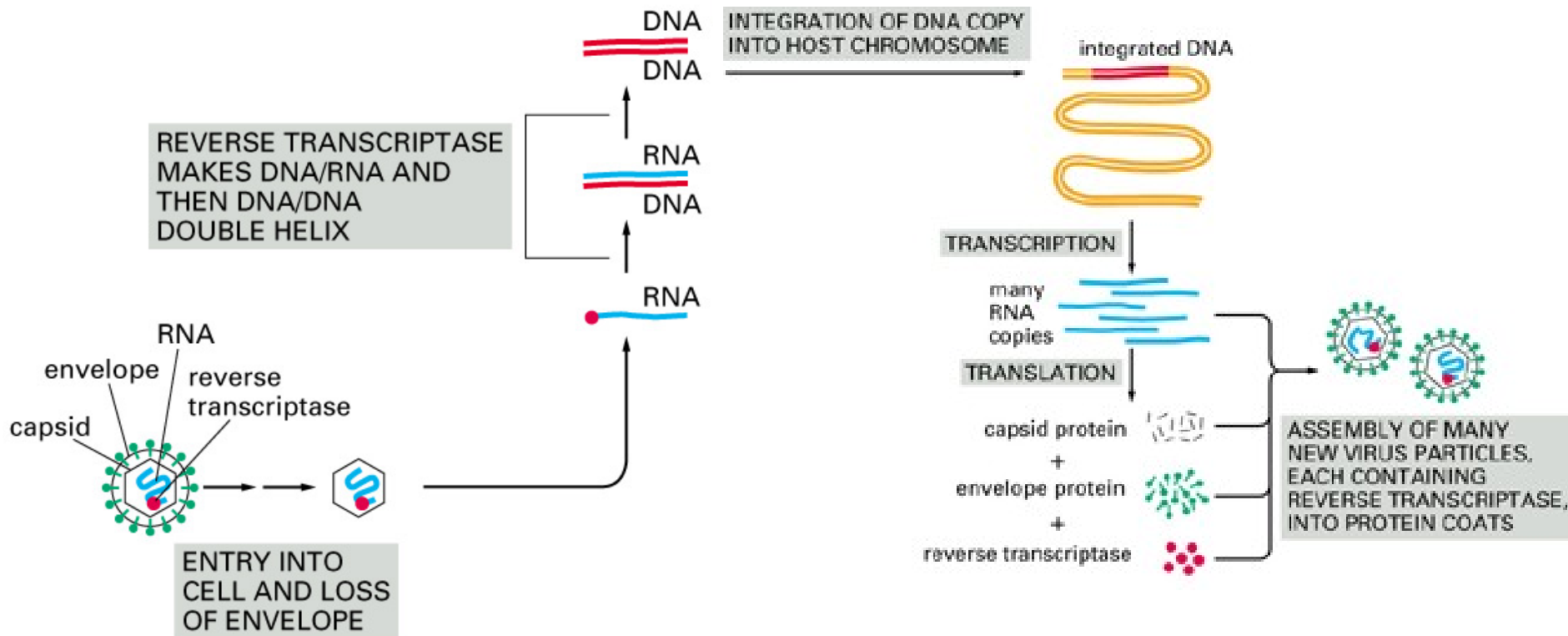


**FIGURE 14.4** Basic steps in gene therapy used to correct genetic dysfunction.

## Ex vivo genová terapie



# Životní cyklus retroviru

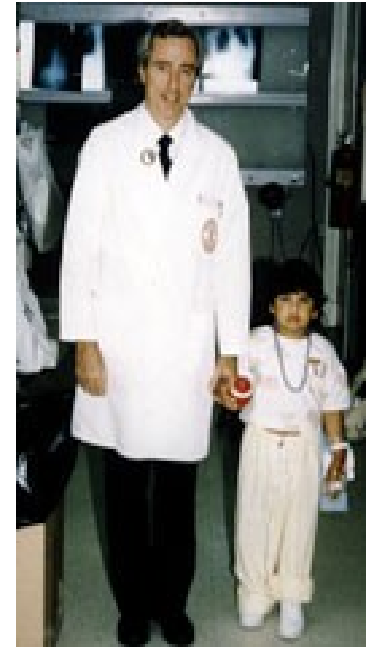
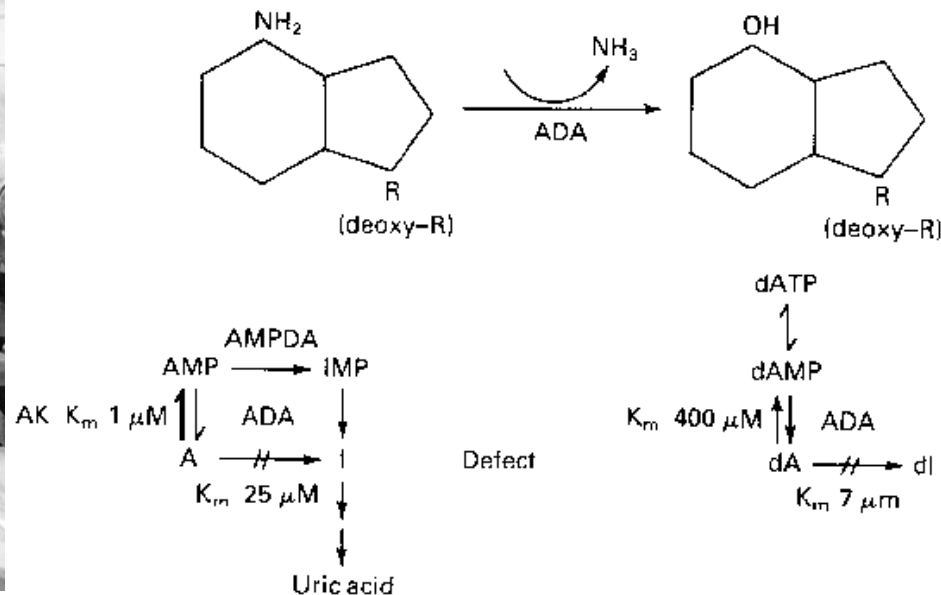


## metody doručení genu do tkáně

vektor	kapa- cita	snadnost produkce	integrace do genomu	trvání exprese	transdukce nedělicích se buněk	existující imunita	bezpečnost	přeno s do potom stva
nevirální	bez limitu	+++	zřídka	dočasná	++	ne	+++	ne
onko- retroviry	8 kb	++	ano	stabilní	-	ne	inserční mutagenese aktivace onkogenů	může
lentiviry	8 kb	+	ano	stabilní	++	ne	inserční mutagenese aktivace onkogenů	může
adenoviry	30 kb	+	ne	dočasná	+++	ano	hyperimunitní odpověď	ne
adeno asociated virus AAV	4.6 kb	+	možná	dlouho- trvající	++	slabá	+++	může
Herpes viry	150 kb	+	ne	dočasná	++	ano	hyperimunitní odpověď	ne

# Genová terapie

První úspěšná genová terapie byla provedena 24. září 1990 v NIH v Marylandu



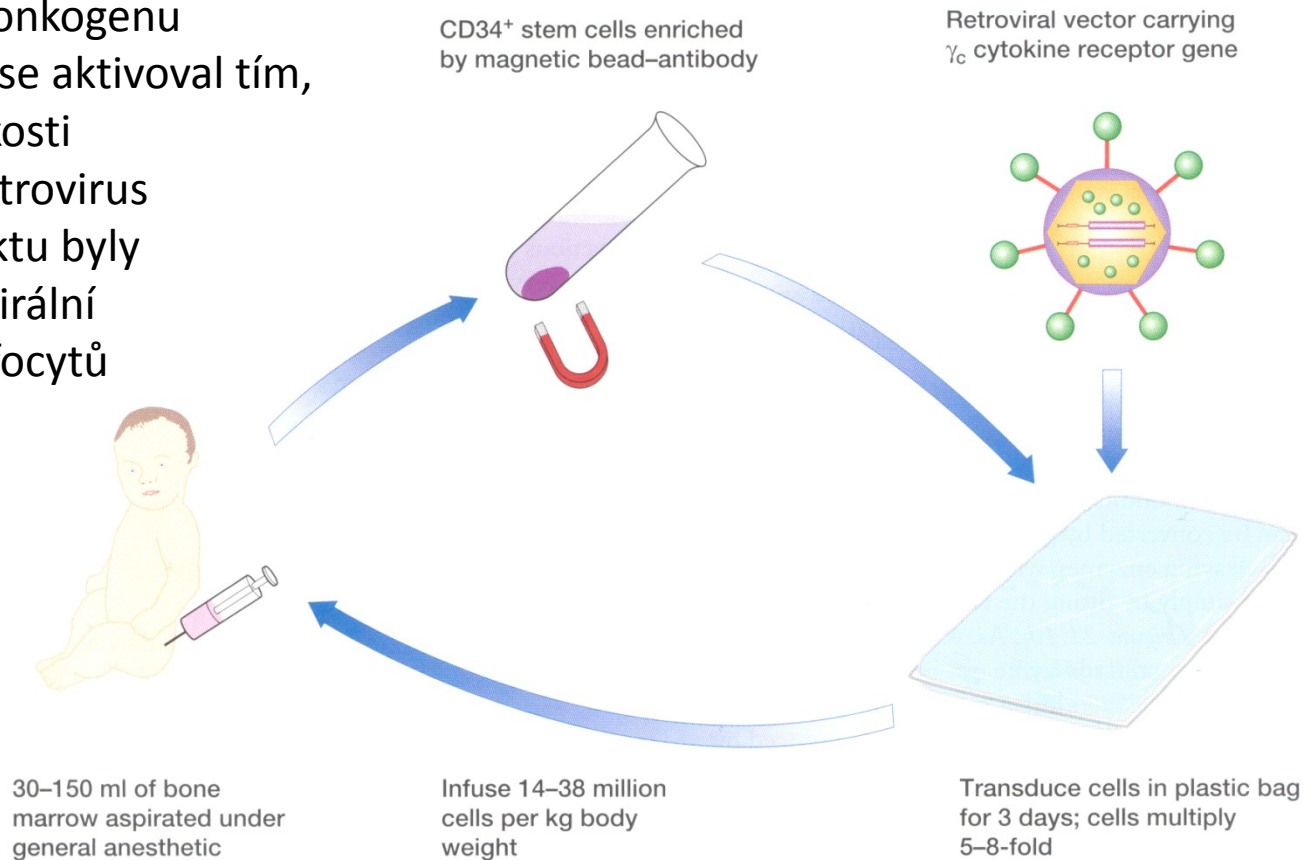
- čtyřleté děvčátko trpělo nemocí zvanou ADA (adenozin deaminázová deficiencie) „bublinové děti“
- při léčbě do ní byly vloženy její vlastní buňky imunitního systému (zejména T-lymfocyty), které byly upraveny tak, že do nich byla ex vivo vložena normální kopie ADA genu
- několik týdnů po té, co genová terapie začala, došlo k zlepšení práce imunitního systému a po několika měsících začala pacientka žít „relativně normální život“

## První evidentní úspěchy genové terapie: X-SCID

- případ z roku 1990 získal mnoho publicity
- později bylo opakováno s dalšími pacienty (na jednoho pacienta 10 – 12 treatments)
  - u některých z nich došlo k dramatickému zlepšení
  - všichni pacienti ale byli zároveň léčeni enzymovými preparáty, takže není jisté, co stojí za tímto úspěchem
- první jednoznačný a jasný úspěch genové terapie se projevil na příbuzné nemoci, na **X-linked SCID**
- opět šlo o léčbu ex vivo
- byl užit retrovirus ve kterém byl obsažen gen IL2R, který kóduje  $\gamma$ c cytokinový receptor
- kmenové buňky kostní dřeně, exprimující CD34 (=což dělají pouze hematopoietické buňky kostní dřeně) byly inkubovány 3 dny v přítomnosti retrovirového vektoru
  - během tohoto času se buňky rozdělily 5-8x
- tyto buňky byly později vráceny do pacientů
- u 9 z 11 pacientů došlo k pronikavému zlepšení a tito pacienti mohli vést normální život



U dvou z těchto vyléčených chlapců došlo později k vzniku leukémie, skoro jistě díky aktivaci LMO2 onkogenu tento onkogen se aktivoval tím, že do jeho blízkosti se inzertoval retrovirus díky tomuto faktu byly pokusy s retrovirální transdukcí lymfocytů pozastaveny



**Figure 21.11: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID).**

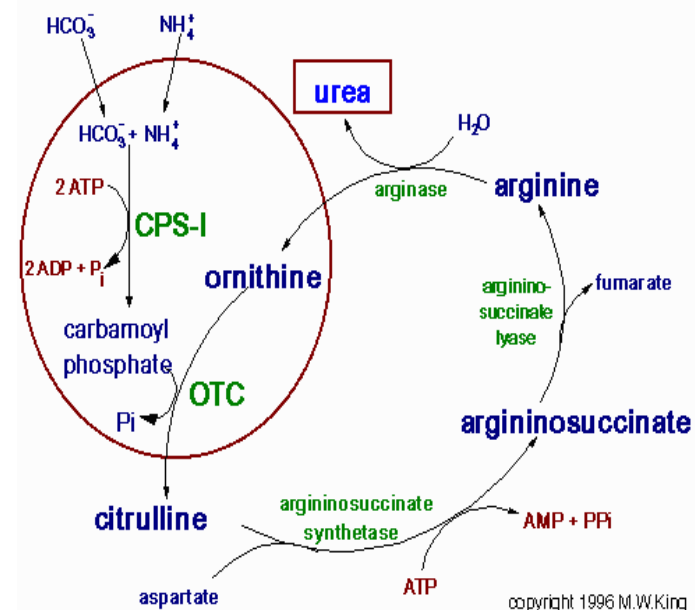
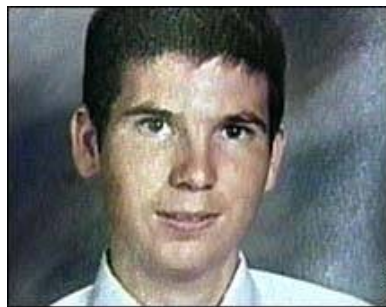
This is the first clear success of gene therapy. Of 11 boys aged 1–11 months treated at the Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, nine were cured. See Hacein-Bey-Abini *et al.* (2002). Two of the nine unfortunately later developed a form of leukemia, almost certainly as a result of activation of the *LMO2* oncogene by nearby insertion of the retroviral vector.





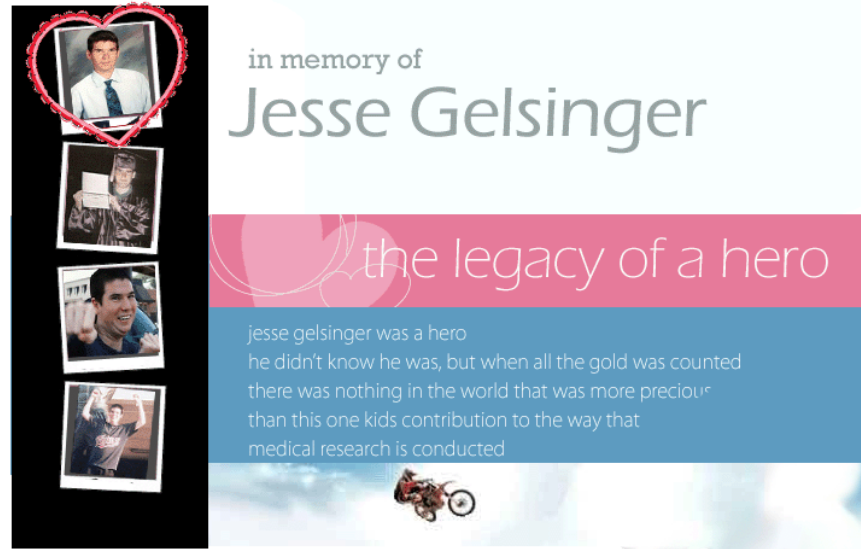
# Jesse Gelsinger

- narozen 18/06 1981
- první příznaky nemoci 2 roky a osm měsíců
  - eratické chování, po dietě bohaté na proteiny, následuje prudké zhoršení stavu, upadá do komatu
- diagnostikován OTC (ornithine transcarbamylase deficiency syndrome), vzácná metabolická choroba – 50 % dětí s touto chorobou umírá do 1 měsíce po porodu
  - JG má nemoc ovšem pouze v mírné formě, léčitelné medikamenty a dietou
  - pokud je potrava bohatší na proteiny,
  - v krvi se objevuje množství amoniaku
- v roce 1990 bere JG padesát
- pilulek denně



# Jesse Gelsinger

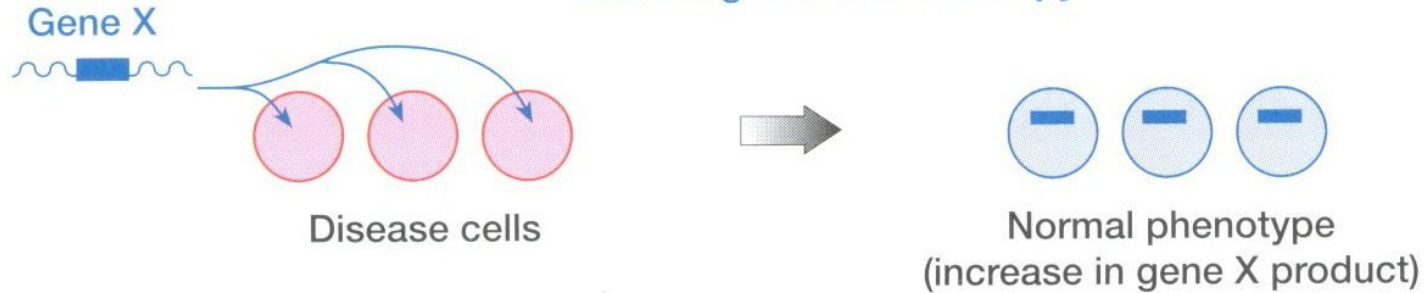
- čeká na den svých 18. narozenin, aby mohl poskytnout informovaný souhlas s léčbou
  - 13. září 1999 dostává genovou terapii, večer je mu špatně, další den odpoledne upadá do kómatu
  - 17. září 1999 umírá
  - smrt nastává evidentně a jasně následkem terapie
  - případ vyvolal zděšení mezi vědeckou komunitou a zaplnil přední stránky novin
  - celá kauza rozvířila řadu otázek ohledně kvality informovaného souhlasu
    - řada důležitých informací totiž podléhala různým obchodním tajemstvím.
- Paul Gelsinger (otec) nyní obviňuje nemocnici ze zamlčení důležitých informací a z úmyslného riskování života jeho syna



# Strategie genové terapie

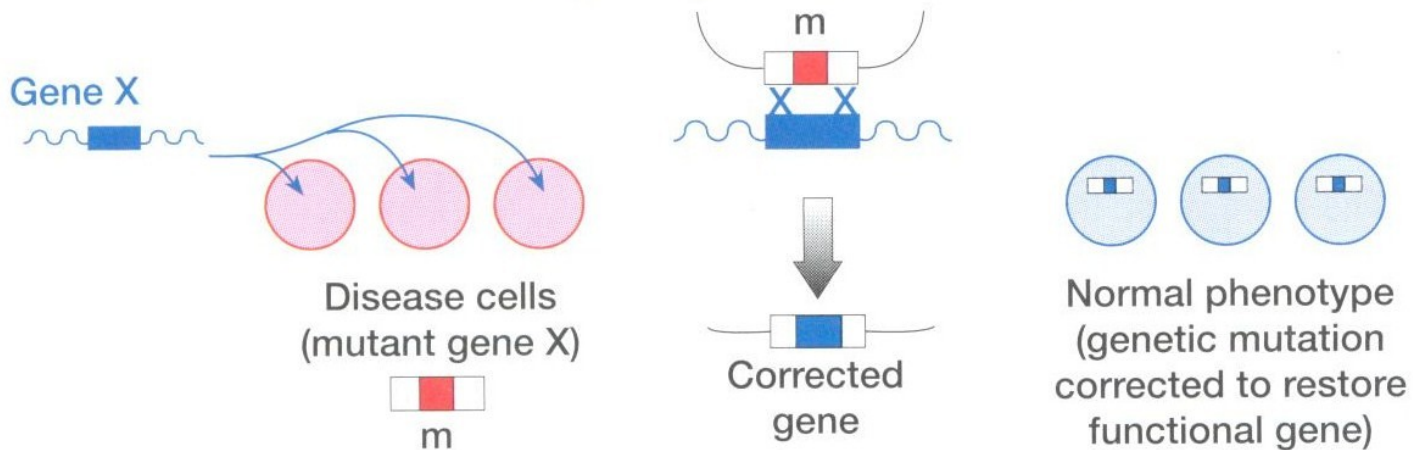
A)

## Gene augmentation therapy



B)

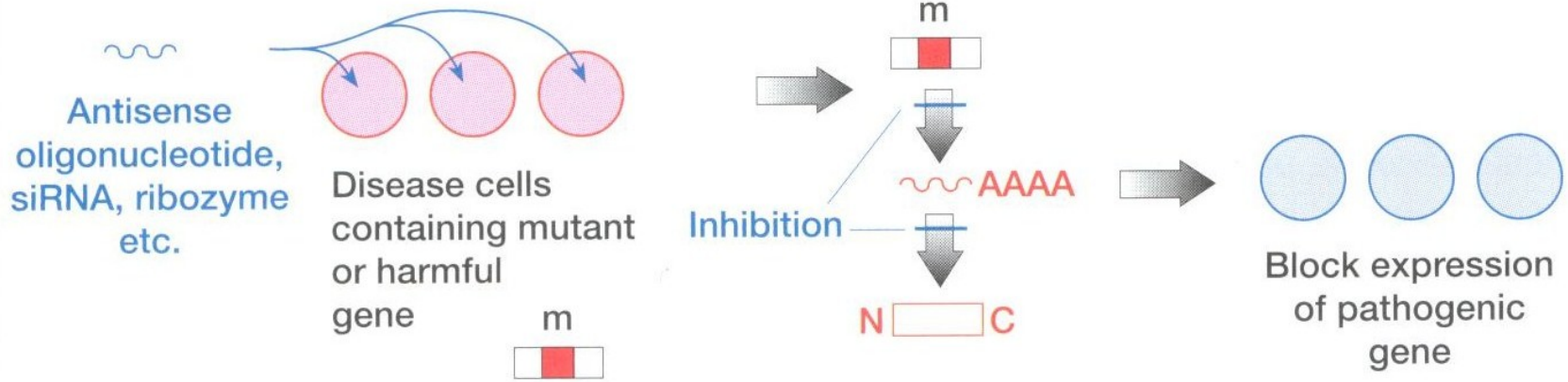
## Targeted gene mutation correction



# Strategie genové terapie

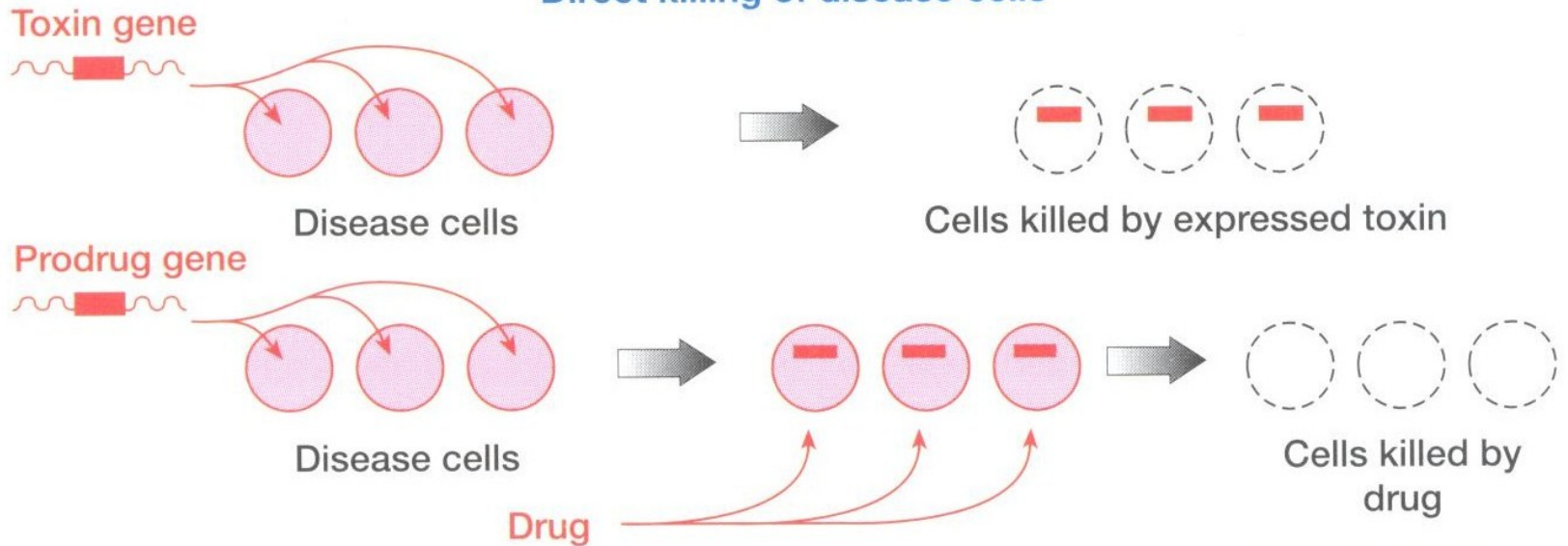
C)

## Targeted inhibition of gene expression



D)

## Direct killing of disease cells

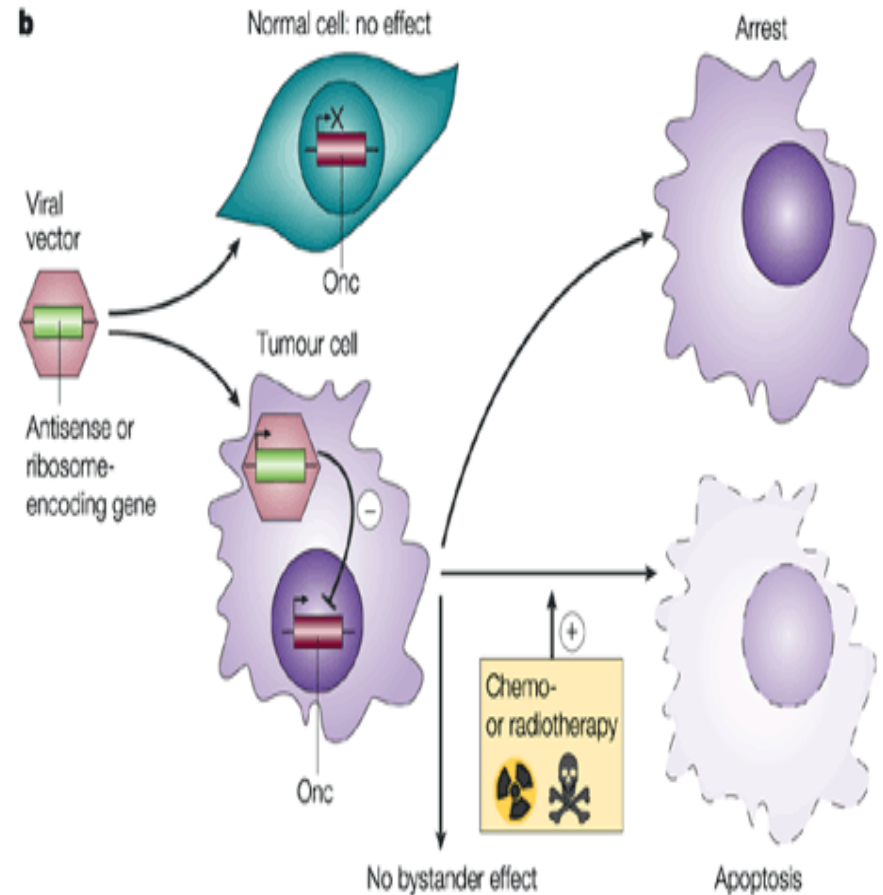
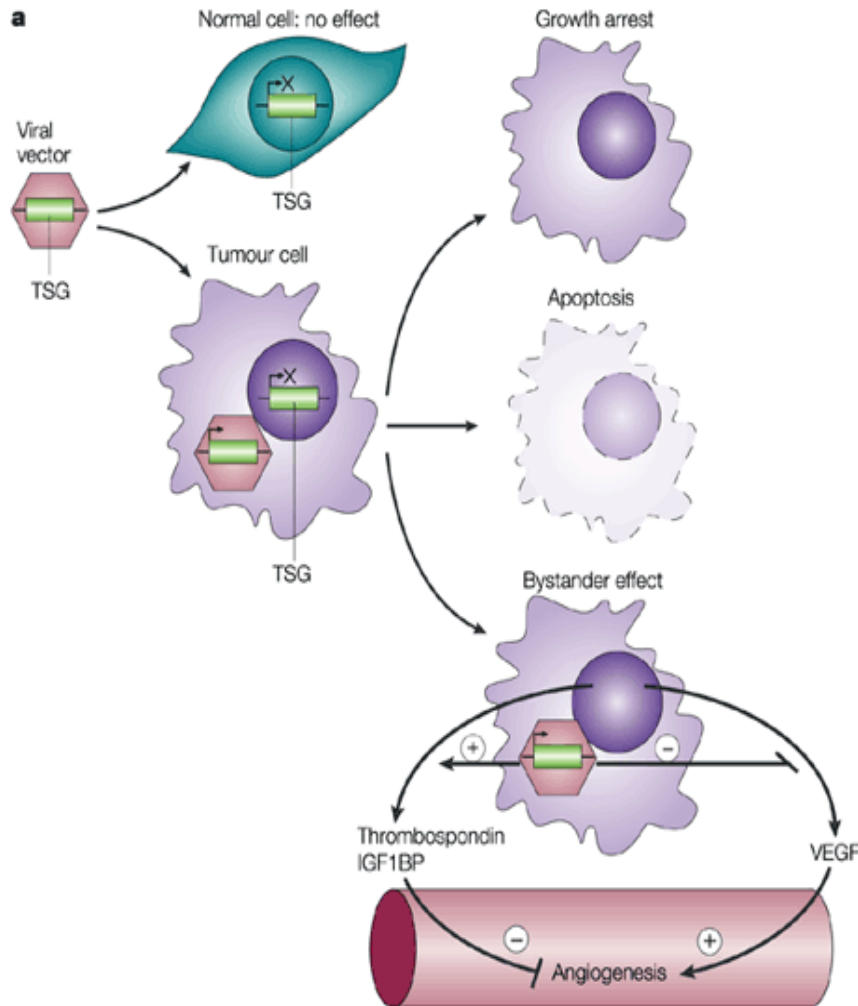


# principy genové terapie rakoviny

využití onkoretrovirálních vektorů

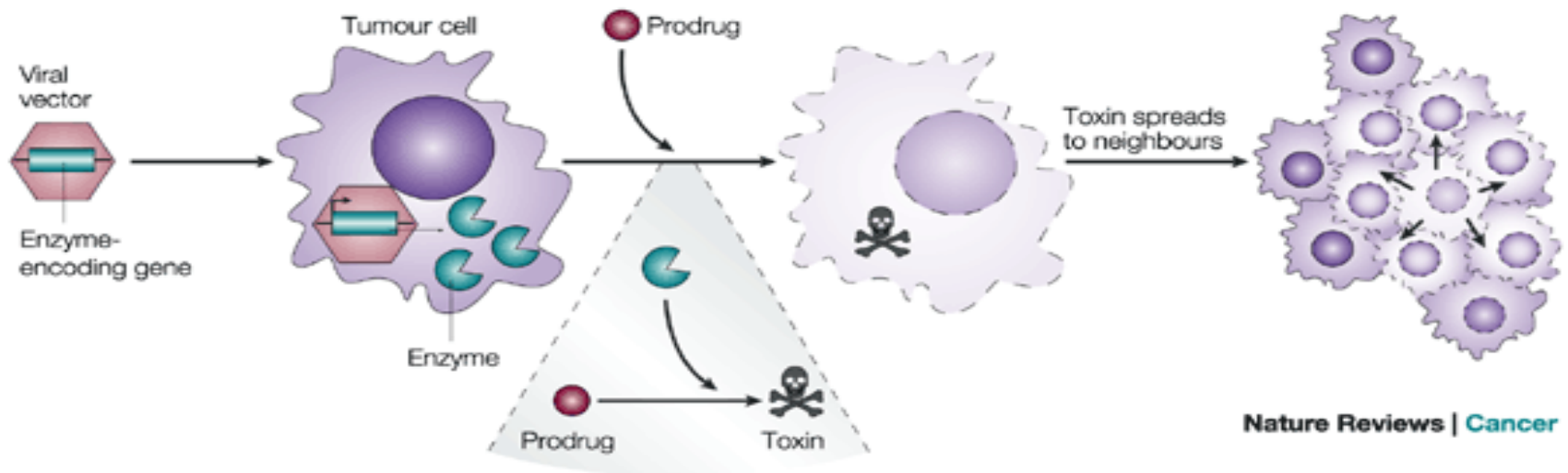
doručení nemutovaného supresorového genu p53

doručení konstruktů zajišťující zastavení exprese onkogenu (**antisense konstrukt**)



# principy genové terapie nádorů

doručení sebevražedného genu přeměňující pro-drug na toxin





# principy genové terapie nádorů

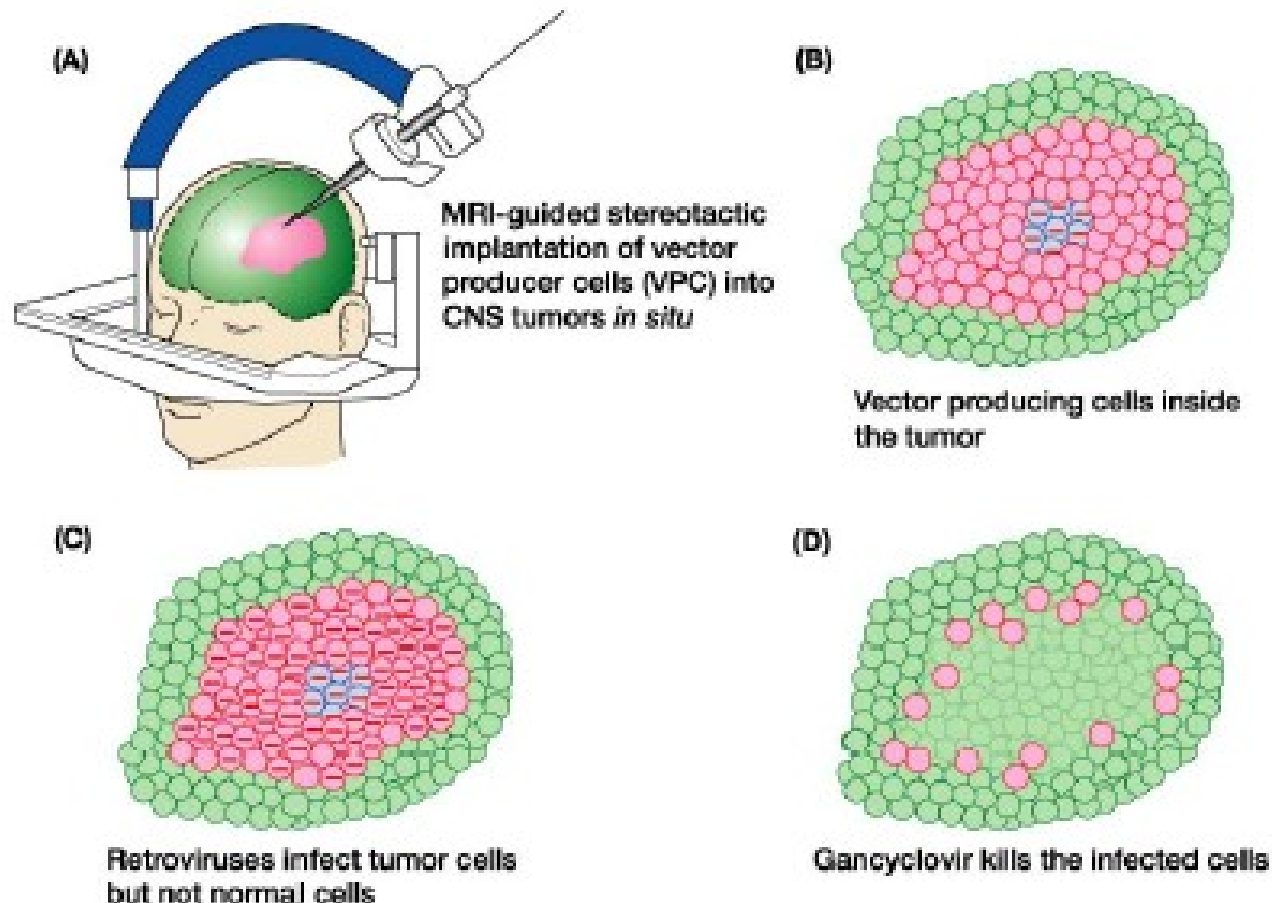
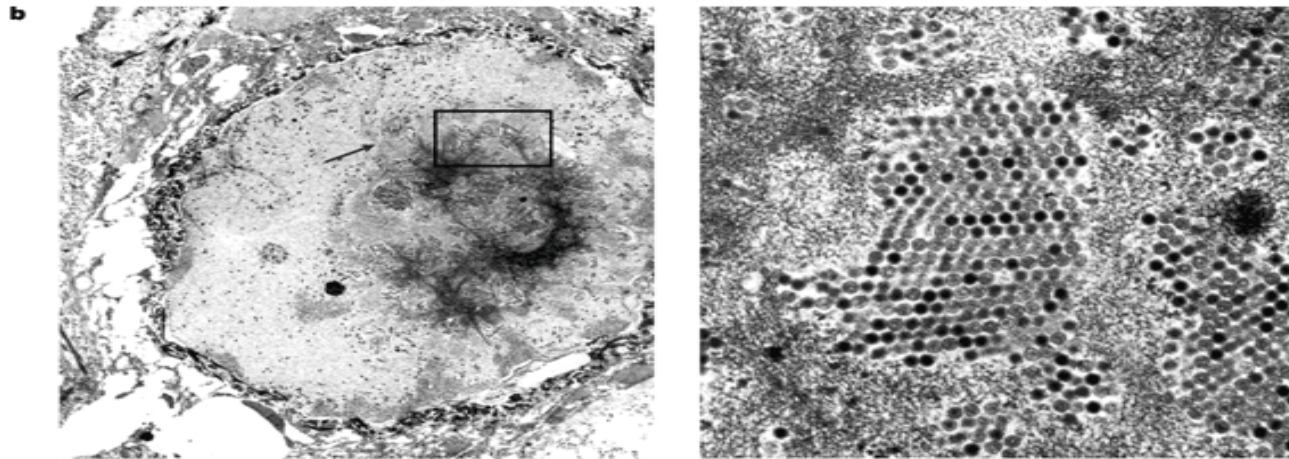
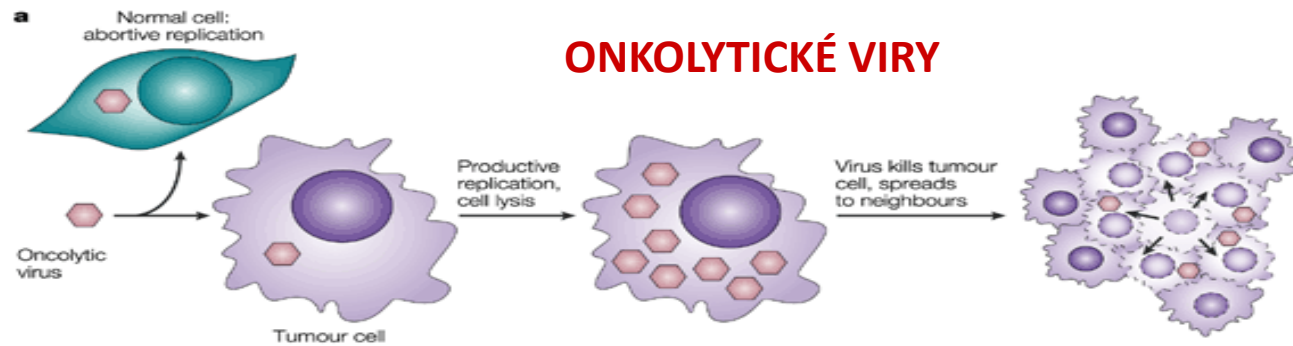


Figure 21-12 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

transdukce virovým vektorem obsahujícím gen pro thymidinkinázu viru herpes simplex lze dosáhnout zvýšení senzitivity nádorových buněk např. ke gancykloviru)

# principy genové terapie nádorů



Nature Reviews | Cancer

- nádorové buňky jsou cíleně ničeny lytickými viry
- 1956 bylo pozorováno že nádor ustupuje po virové infekci
- první klinicky testovaný virus byl defektní **herpesvirus G207**, který měl defektní vlastní ribonukleotid reduktázu a mohl se tudíž replikovat pouze v dělicích se buňkách, měl delecí v genu způsobující virulenci ICP35.4 a tím byl oslaben a proto bezpečný
- proběhla I a II fáze klinického testování



# Preimplantační genetická diagnostika

Při riziku genetické vady je možno se pokusit o zjištění, zda zárodek vzniklý technikou asistované reprodukce (ART má žádoucí – nerizikovou- kombinaci genů ještě před přenosem do dělohy.

I když PGD nemůže zcela nahradit genetické vyšetření plodu v pozdějších stadiích těhotenství, významně sníží riziko genetického postižení plodu.

Umožňuje genetickým vyšetřením 1 - 2 buněk (blastomer) odebraných z vyvíjejícího se embrya odhalit specifické genetické abnormality budoucího plodu.



The MicroSort® Gender-Selection Program at GIVF

### Do You Want To Choose the Gender Of Your Next Baby?



If you want to choose — or need to choose — whether your next baby is a girl or a boy, you may qualify for the MicroSort® gender selection procedure at the Genetics & IVF Institute (GIVF).

Prospective parents come from all over the world to GIVF in suburban Washington, DC. They choose this exclusive scientifically-based sperm sorting gender selection procedure, currently in an FDA clinical trial, for several important reasons:

- For prevention of genetic diseases
- For family balancing
- Results so far show 90% success rate for achieving girls and 75% for boys.
- FREE MicroSort for qualifying patients who use Donor Egg or Preimplantation Genetic Diagnosis at GIVF
- For sensitive, personal attention from a caring staff of professionals, dedicated to the success of your family.

Couples also choose the Genetics & IVF Institute because we are the world's largest integrated provider of infertility and genetic services. Our expertise in the diagnosis and treatment of complex genetic and reproductive disorders is second to none.

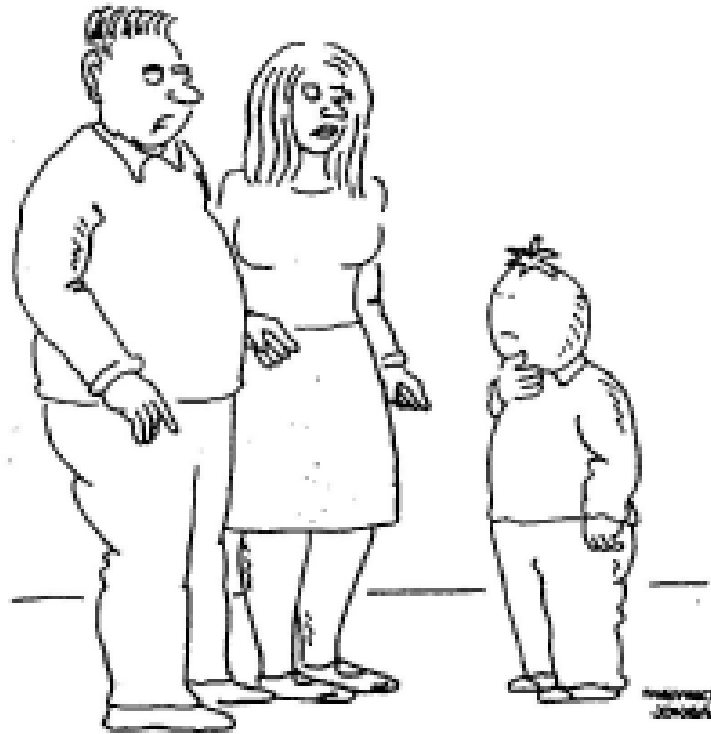
To learn more about the Genetics & IVF Institute, and how the MicroSort® technology may help you select the gender of your next child — please visit us at:

[www.givf.com](http://www.givf.com)  
or call us at  
**1-800-277-6607**

Now available in New York and other metropolitan areas through collaborating physicians. Call for details.

**Caution:** This procedure uses an investigational device limited by Federal law to investigational use.

GENETICS & IVF INSTITUTE



*"We're not your real parents – actually you're a genetically modified tomato"*

Private Eye (UK)

## Take home

Fáze klinického hodnocení léčiv  
Randomizace, zaslepení, interim analýza, metanalýzy  
Monoklonální protilátky - typy  
Příprava monoklonálních protilátek  
Biologické účinky monoklonálních protilátek  
Cílená léčba protinádorových onemocnění: obecná strategie  
Cílená léčba protinádorových onemocnění: inhibice RTK  
Cílená léčba protinádorových onemocnění: inhibice angiogeneze  
Cílená léčba protinádorových onemocnění: léčba kostních metastáz  
Individualizace léčby: příklad anti-EGFR terapie  
Moderní transportní systémy  
Moderní transportní systémy-lipozomy  
Moderní transportní systémy-nanočástice  
Genová terapie – definice, obecné strategie  
Ex vivo a in vivo genová terapie  
Metody doručení genu do tkáň  
Příklady genové terapie u monogenních dědičných chorob ADA, X-SCID  
Principy genové terapie nádorových onemocnění  
Preimplantační genetická diagnostika

## Náplň příští přednášky VÁNOCE!!!!!! HEZKÉ SVÁTKY!!!



## Dotazy?

