

C7188 Úvod do molekulární medicíny 8/10

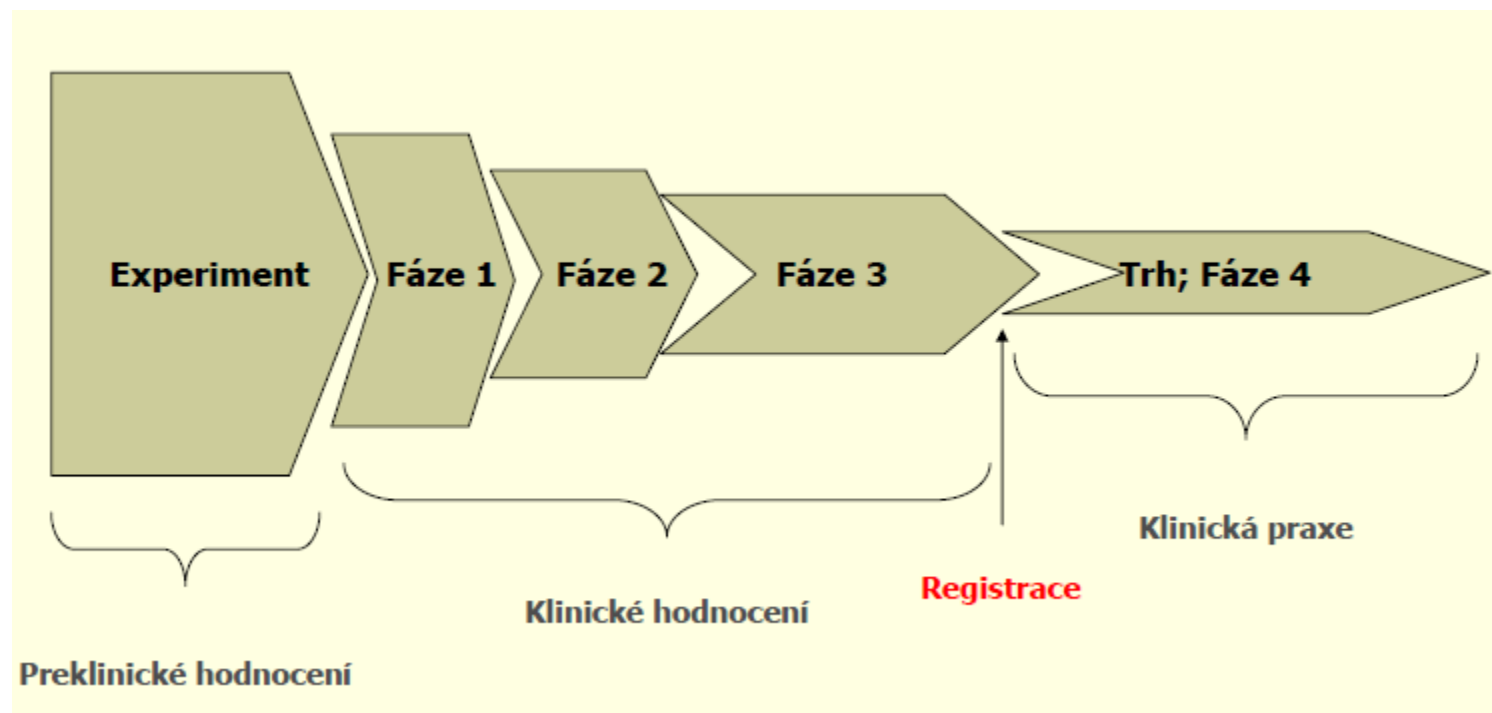


MOLEKULÁRNÍ FARMAKOLOGIE II **GENOVÁ TERAPIE** **PREIMPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKA**

Ondřej Slabý, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
CEITEC
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

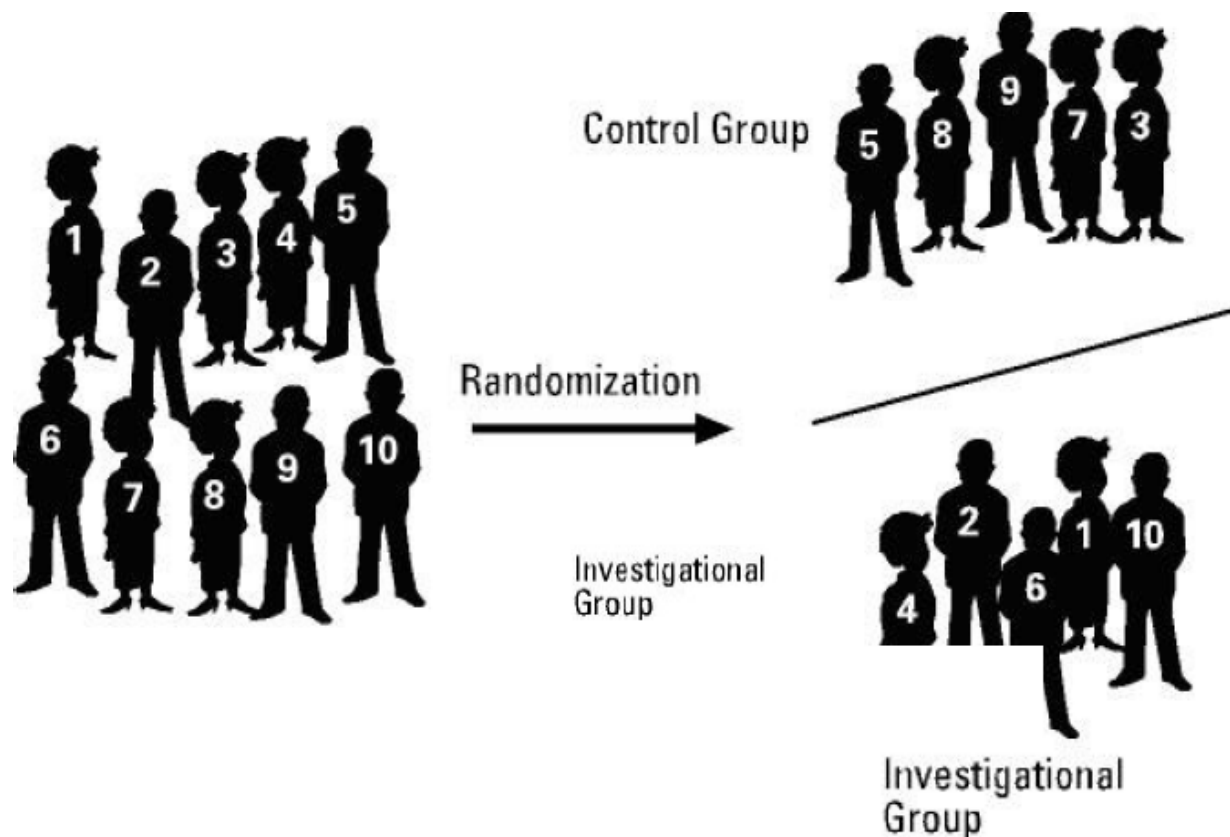
- Z předchozích fází máme informace o bezpečnosti, dávkování a účinnosti
- Cílem této fáze je prostřednictvím řízeného experimentu přímé srovnání bezpečnosti a účinnosti hodnoceného přípravku s kontrolou, kterou může být placebo nebo aktuálně používaná nejlepší léčba.
- Hlavním cílem je přinést data prokazující, že účinnosti a bezpečnosti 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.

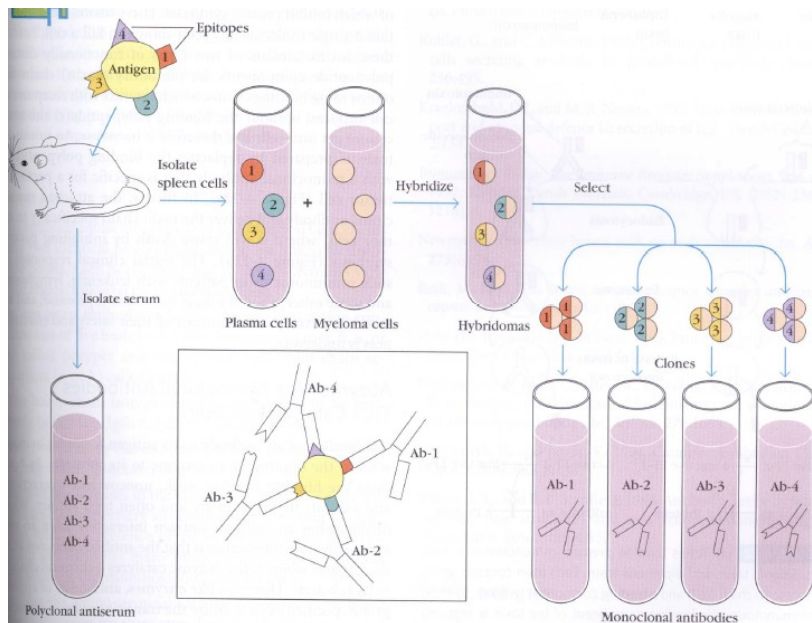
METANALÝZA –

je metodika sofistikovaného zobecnění výsledků dvou a více nezávisle

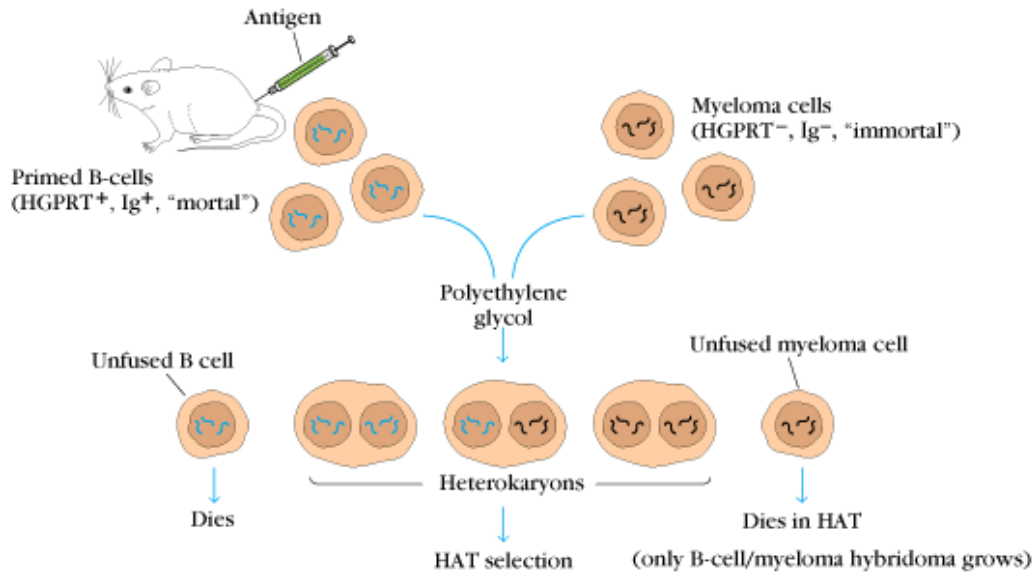
Provedených experimentů.

Monoklonální protilátky

- Emil von Behring – objev protilátek, terapeutický význam coby „magických střel či otrávených šípů“
 - Paul Ehrlich zavedl pojem imunita, antigen, protilátky, imunoterapie
 - 1975 C.Milstein a G.F.Kohler popsali technologii tvorby MP (1984-Nobelova cena)
- V jedné hybridní linii spojili biologické vlastnosti B-lymfocyty tvořícího protilátky a nádorové buňky myelomové řady (tzv. hybridomová technologie)



Příprava monoklonálních protilátek



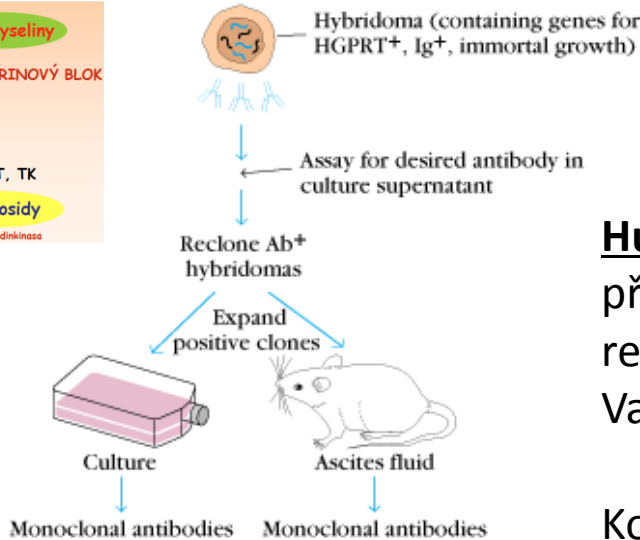
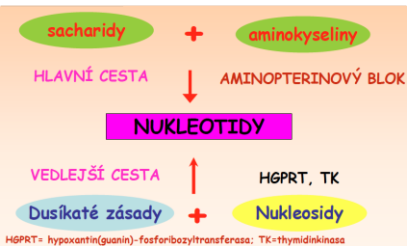
Nemodifikované myší mAb –

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

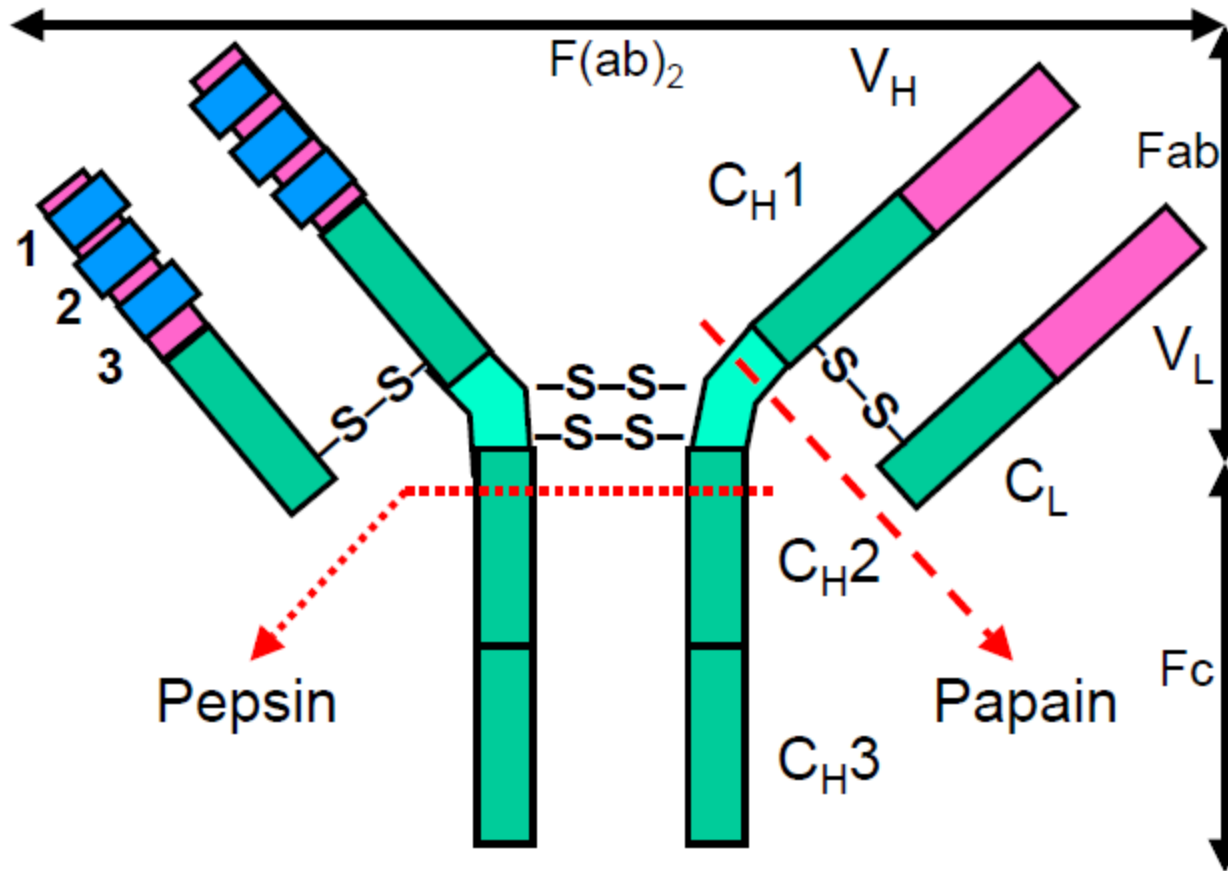
Konstantní úsek MP je z lidského imunoglobulinu



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)

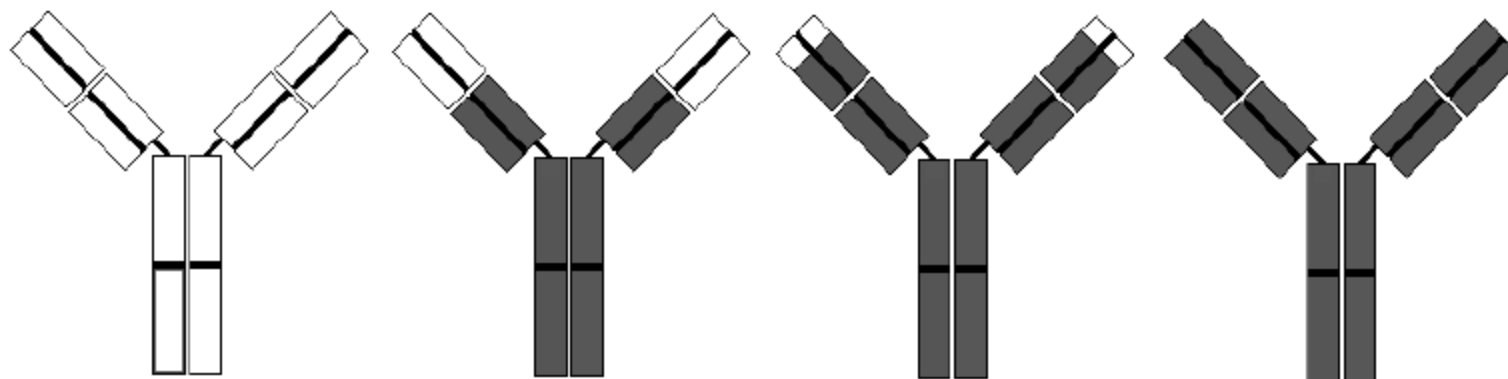
C = konstantní doména (vazba komplementu, vazba na Fc receptor imunokompetentních buněk ...)

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

$V_L-V_H = F_v$ (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)

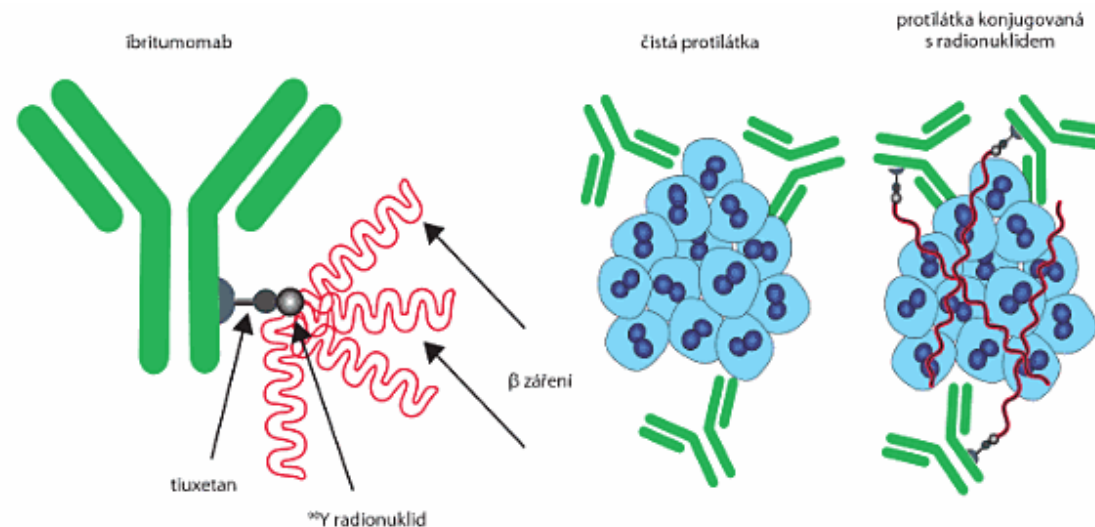
Protilátky konjugované

Konjugované s imunotoxiny

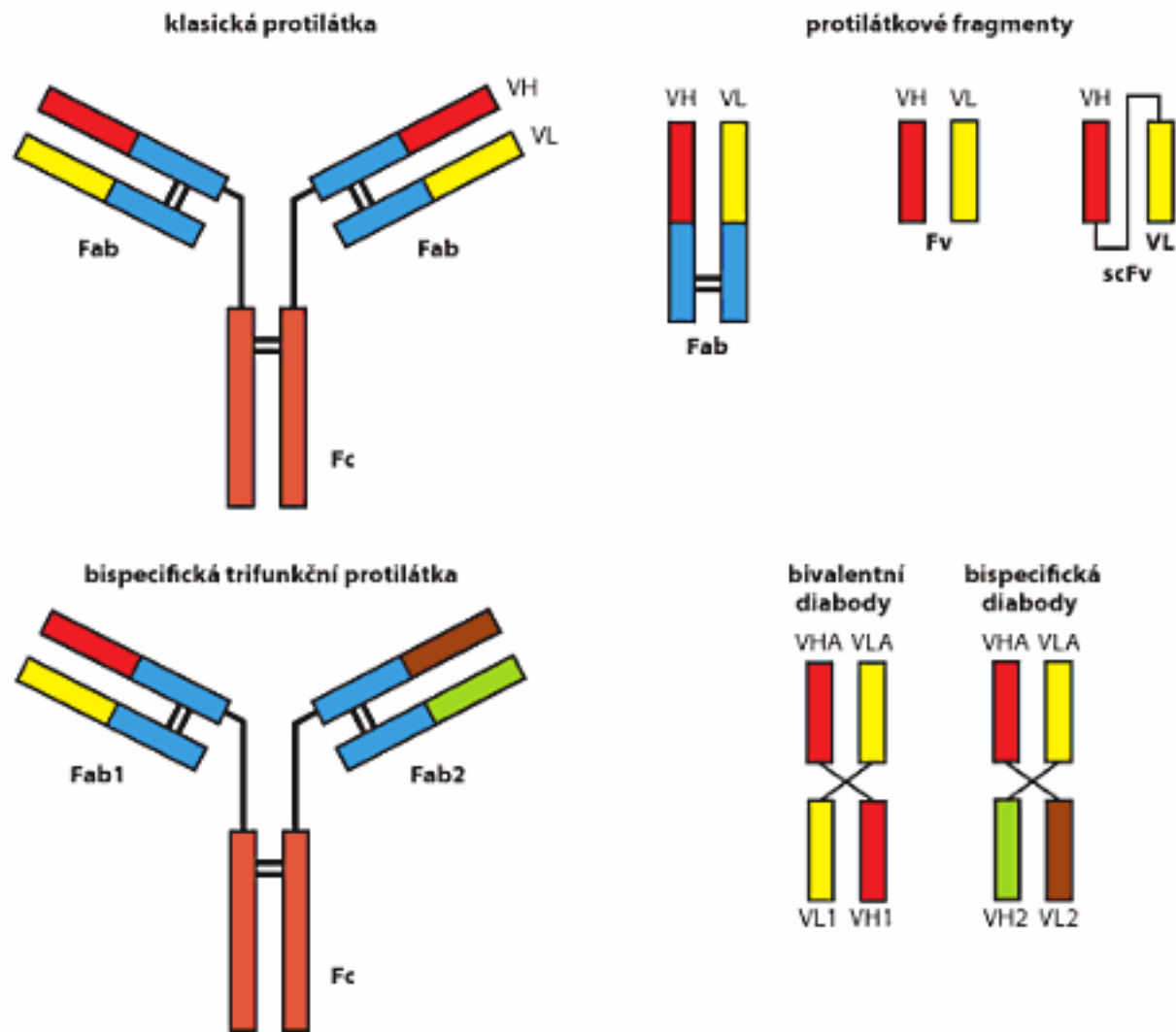
Konjugované s radionuklidem

Konjugované s cytokiny

Konjugované s cytostatiky



Obr. 34 Znárodnění účinku protilátky konjugované s radionuklidem



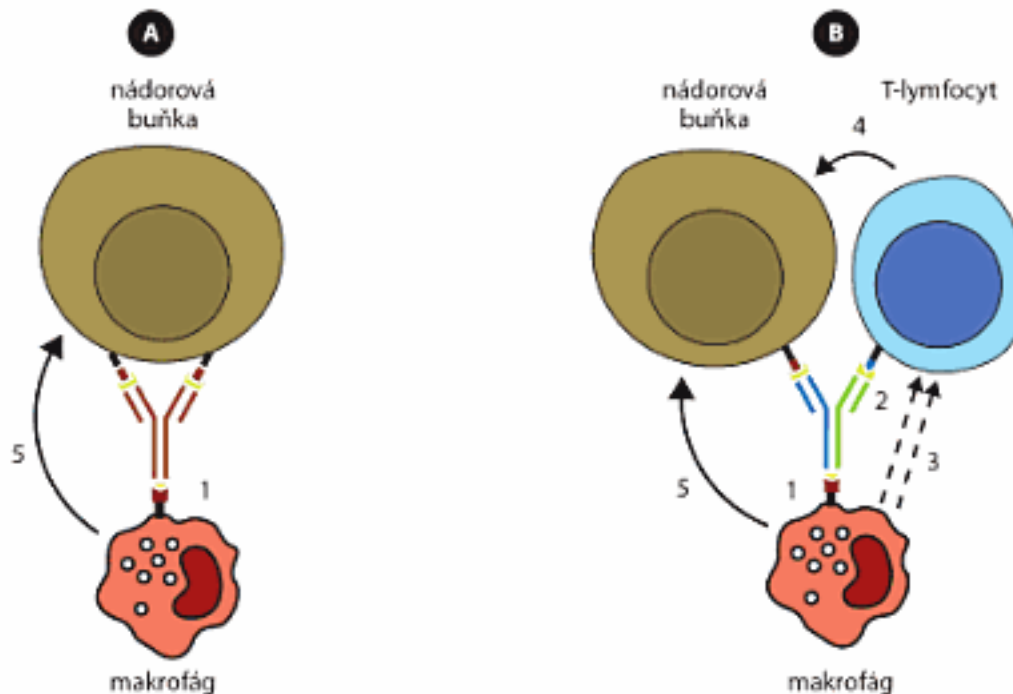
Obr. 36 Porovnání klasické (bivalentní monospecifické) protilátky, bispecifické/trifunkční protilátky a protilátkových fragmentů

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

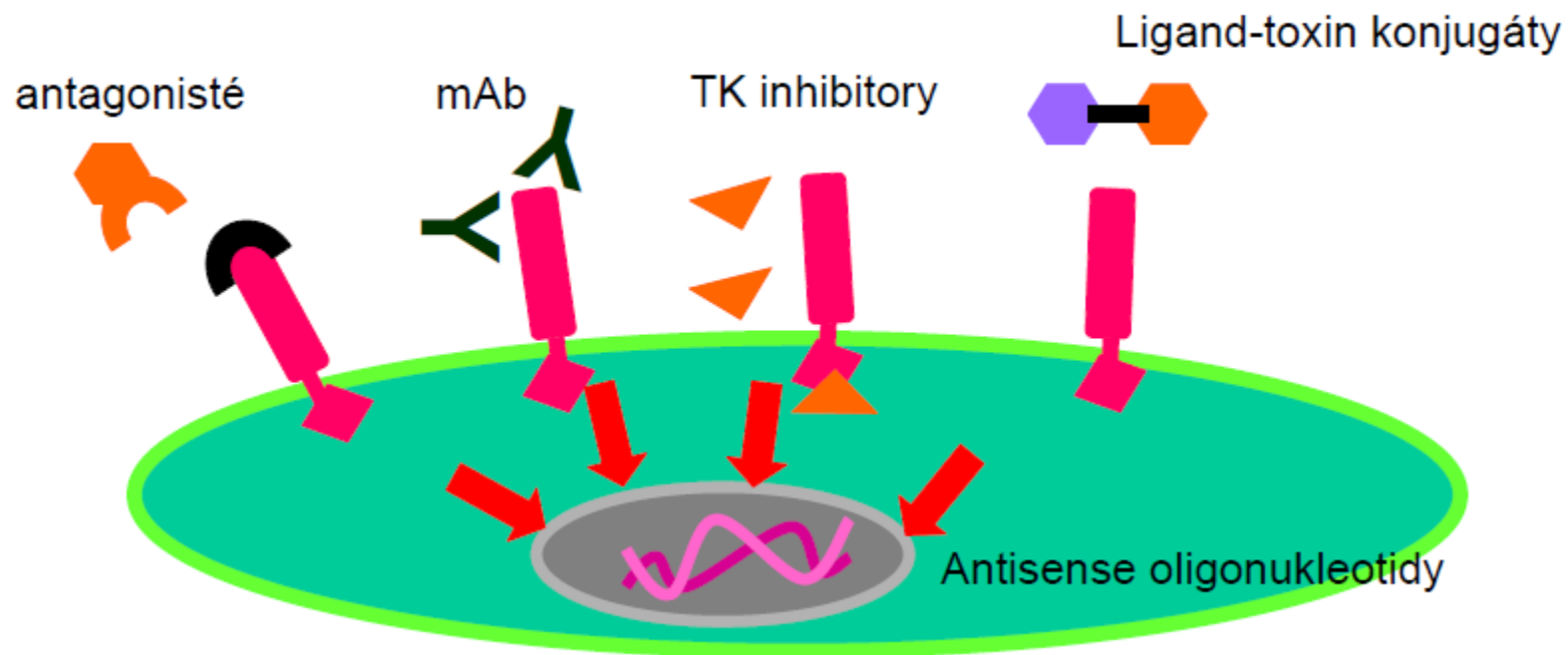


Obr. 35 Rozdíly mezi (A) monospecifickou a (B) bispecifickou/trifunkční monoklonální protilátkou
 (1) Mechanismus ADCC. (2) Atrakce T-lymfocytu. (3) Indukce kostimulačních molekul. (4) Specifická protinádorová imunita.
 (5) Nespecifická protinádorová imunita.

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 | (⁹⁰ Yt) CD-20 | NHL |
| tositumomab | Bexxar (¹³¹ I) | (¹³¹ 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



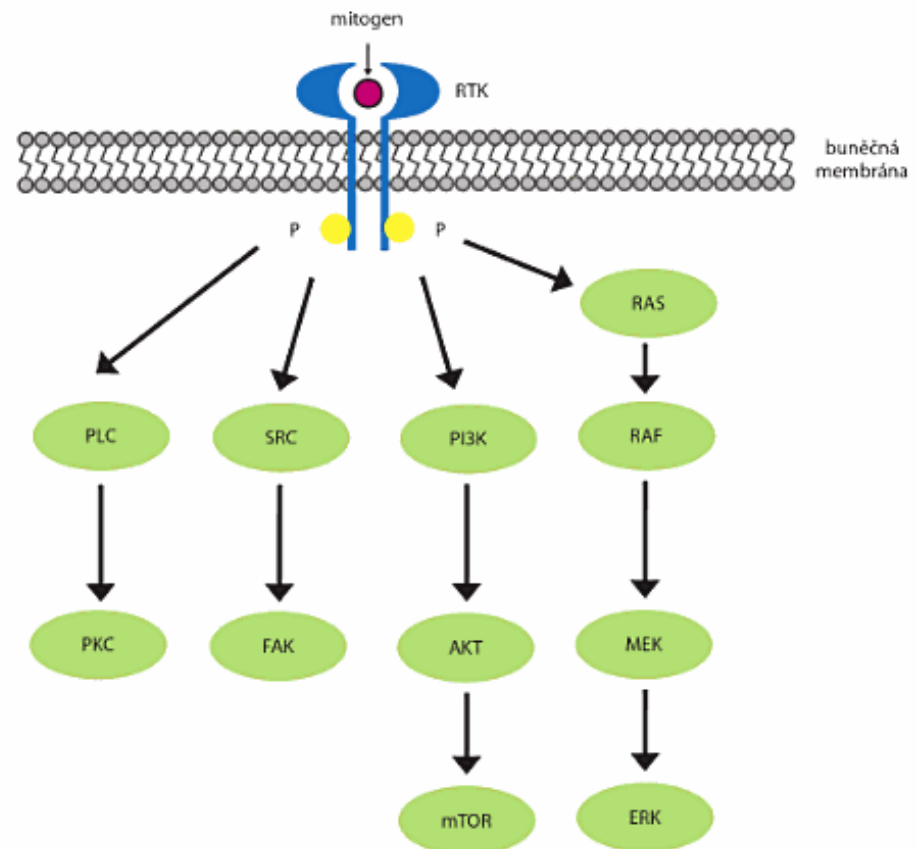
Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

Inhibice receptorových tyrozinkináz (RTK)

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

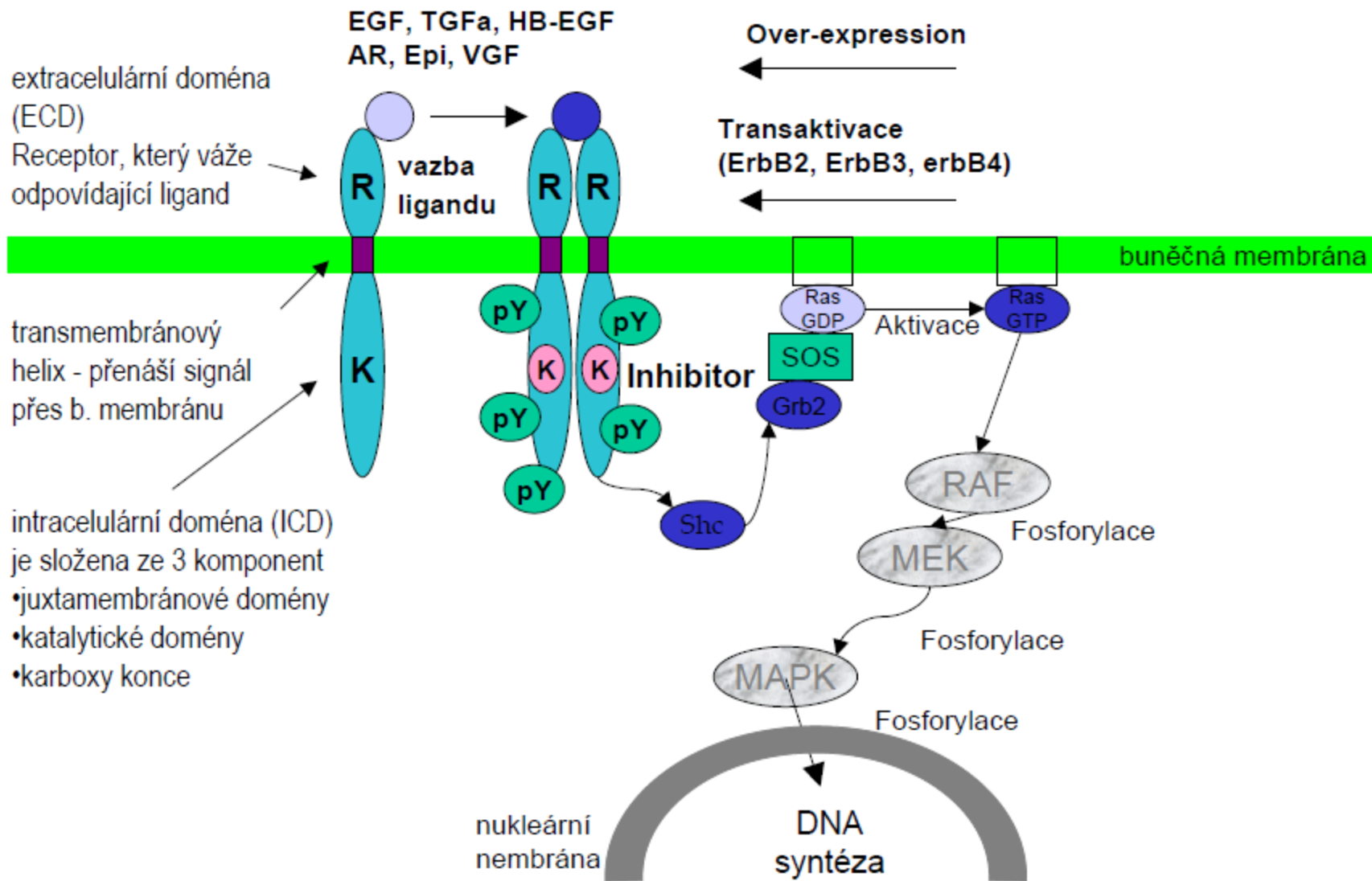
Monoklonální protilátky jsou zacílené na extracelulární receptorovou část RTK.

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

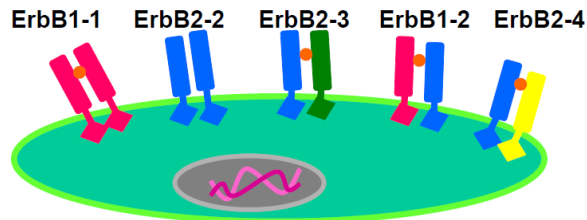
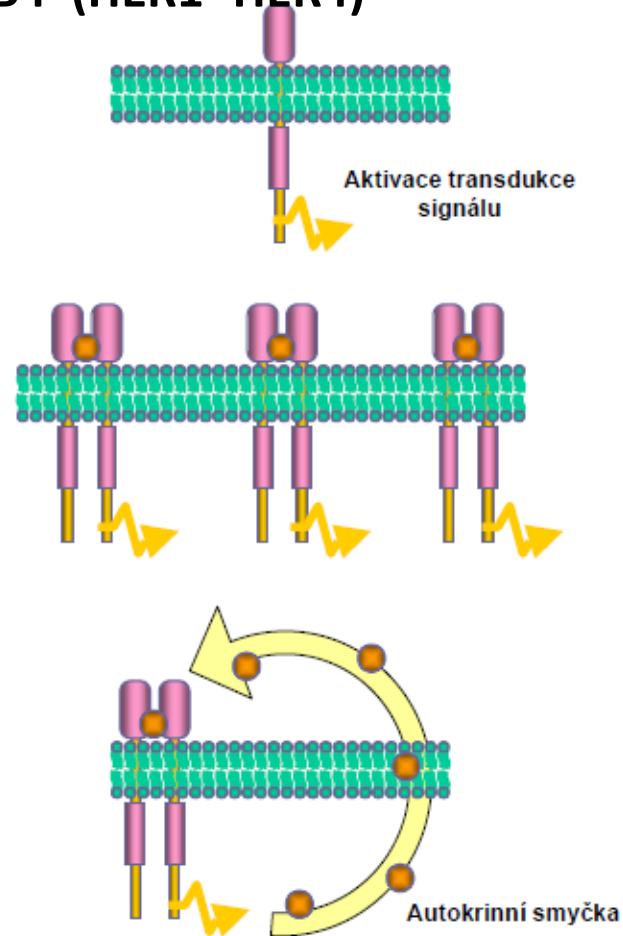
| RTK | | ligand | | malignity s prokázanou deregulací RTK (overexpres, mutace) |
|--------------------------|--|------------------|--|--|
| EGFR/ ERBB1/ HER1 | <i>epidermal growth factor receptor /avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog/human epidermal growth factor receptor</i> | EGF | <i>epidermal growth factor</i> | karcinom tlustého střeva, plic |
| ERBB2/ HER2/ NEU | <i>neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog</i> | neváže ligand | vytváří 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

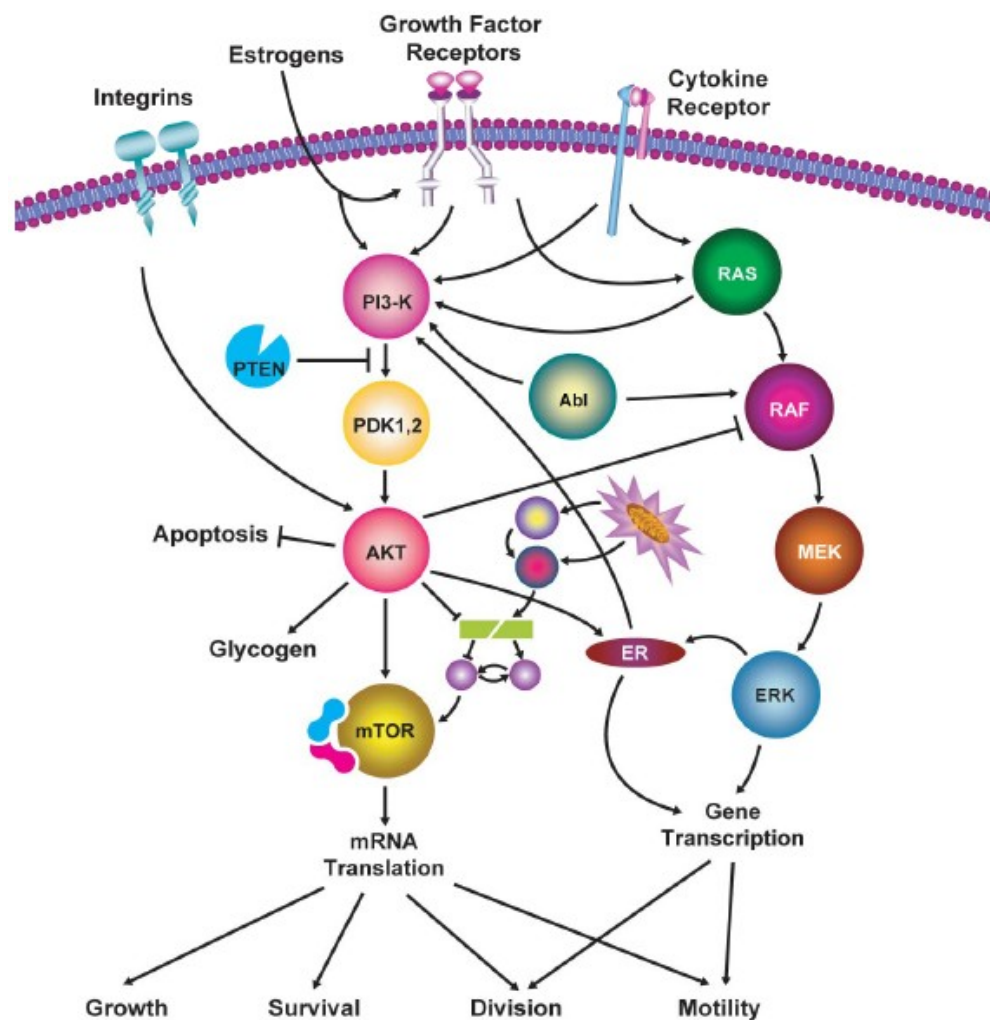
Receptorová rodina ErbB a nádorová onemocnění

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- α nádorovou buňkou: vznik autokrinní smyčky vedoucí ke konstitutivní aktivaci ErbB-1



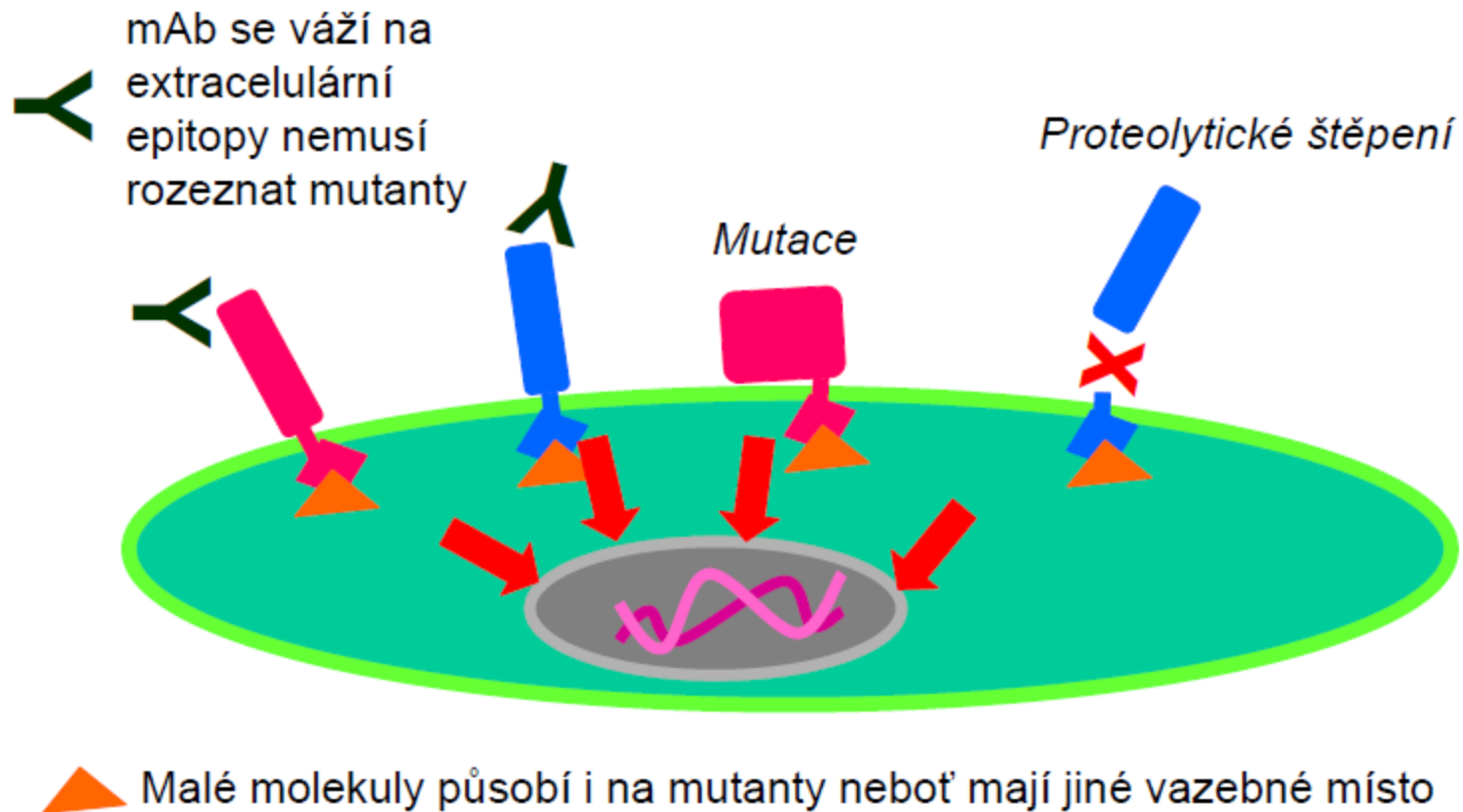
Cross-talk s dalšími onkogenními signálními drahami



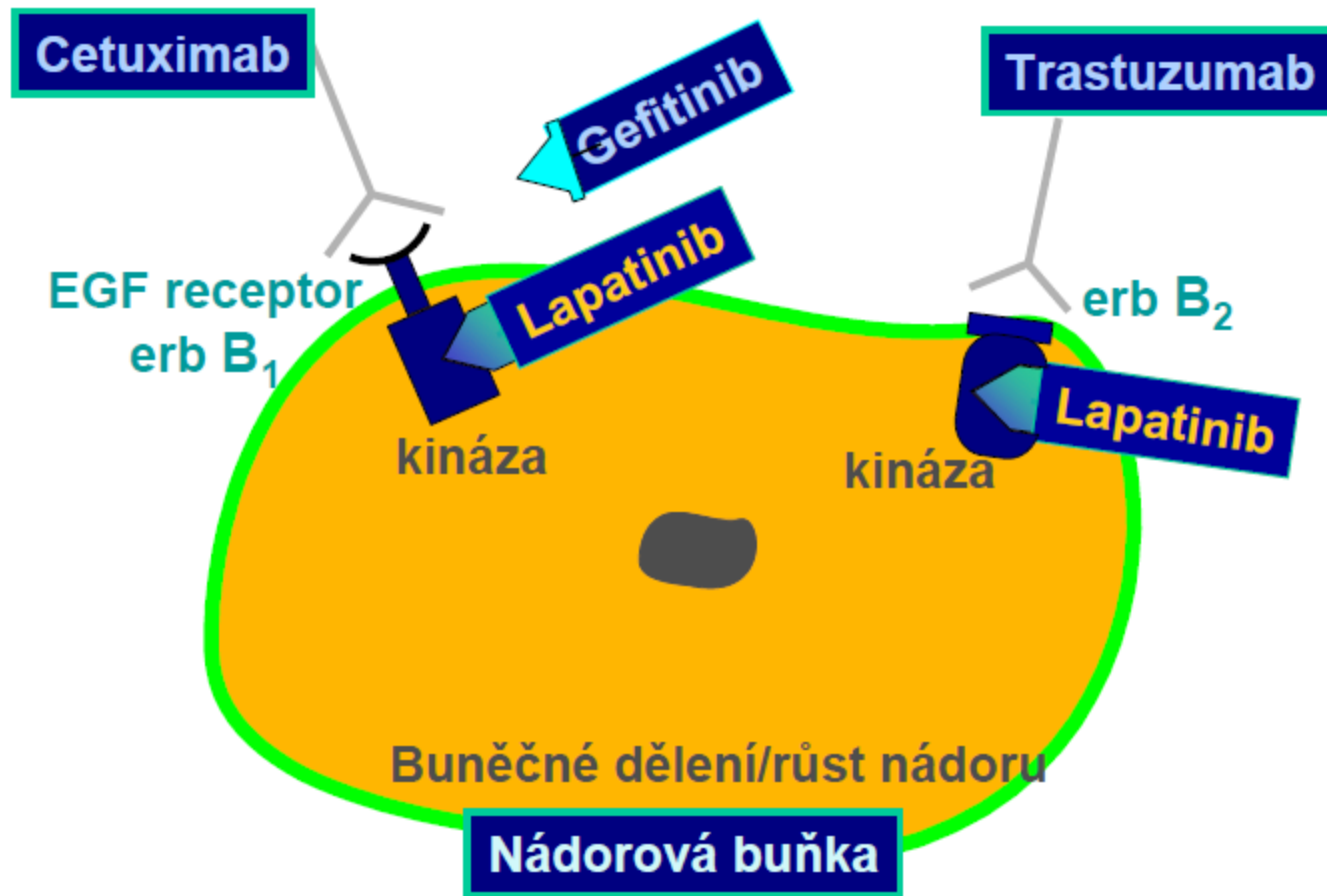
Receptorová rodina ErbB a nádorová onemocnění

| Tumor | ErbB1 % | ErbB2 % |
|-----------------|----------------|----------------|
| Moč. měchýř | 31 – 48 | 7 – 36 |
| Ca prsu | 14 – 91 | 10 – 37 |
| 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 | – |
| Ledviny | 50 – 90 | 24 – 40 |
| Žaludek | – | 5 – 55 |

Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace



Duální inhibice kináz



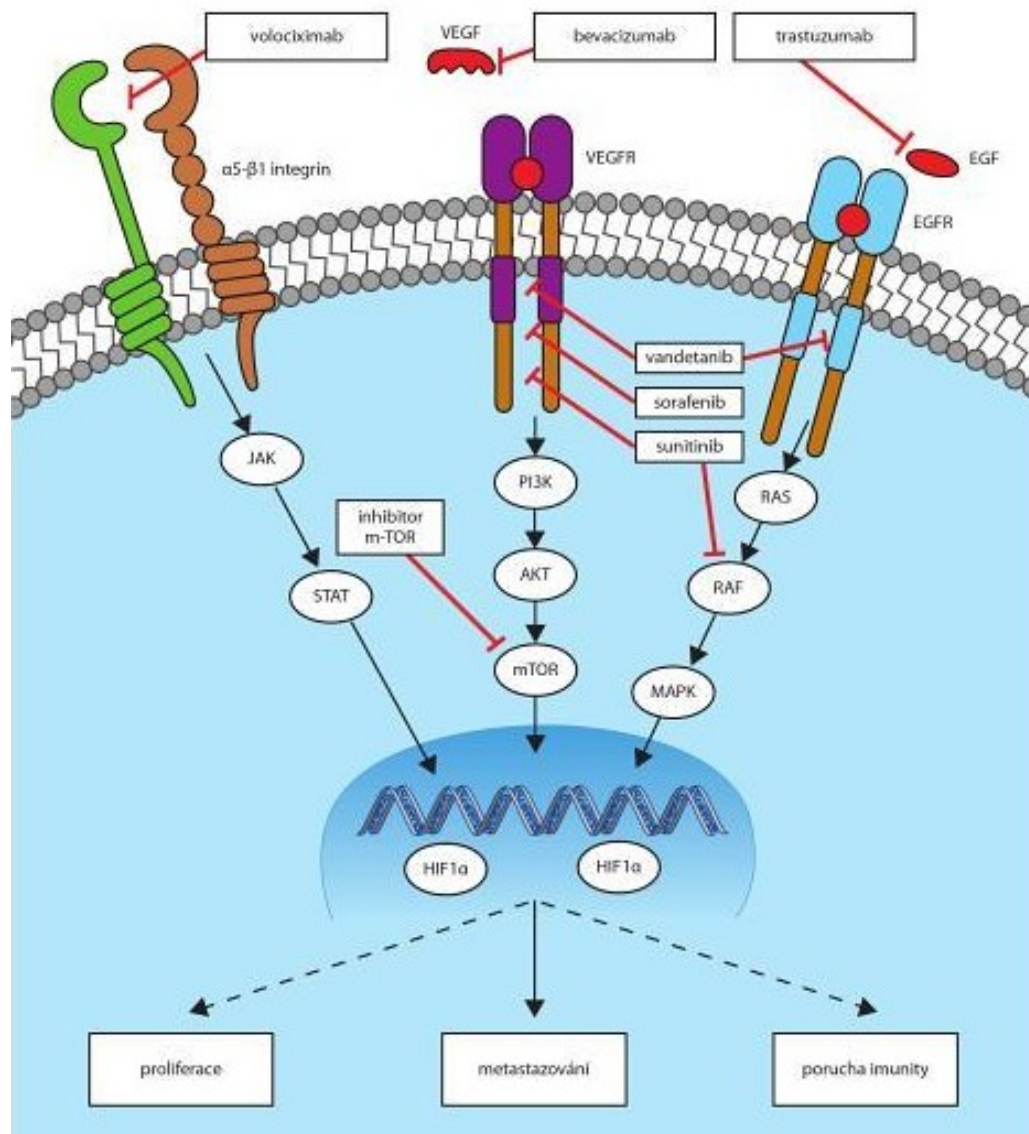
Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

Tab. 8 Přehled inhibitorů RTK a PTK

| inhibitory s převážným účinkem na EGFR/ERBB/HER | | |
|--|---------|--|
| 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 |
| Inhibitory s převážným účinkem na VEGFR jsou uvedeny v kapitole 11.1.2. | | |
| multikinázové inhibitory | | |
| 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 |

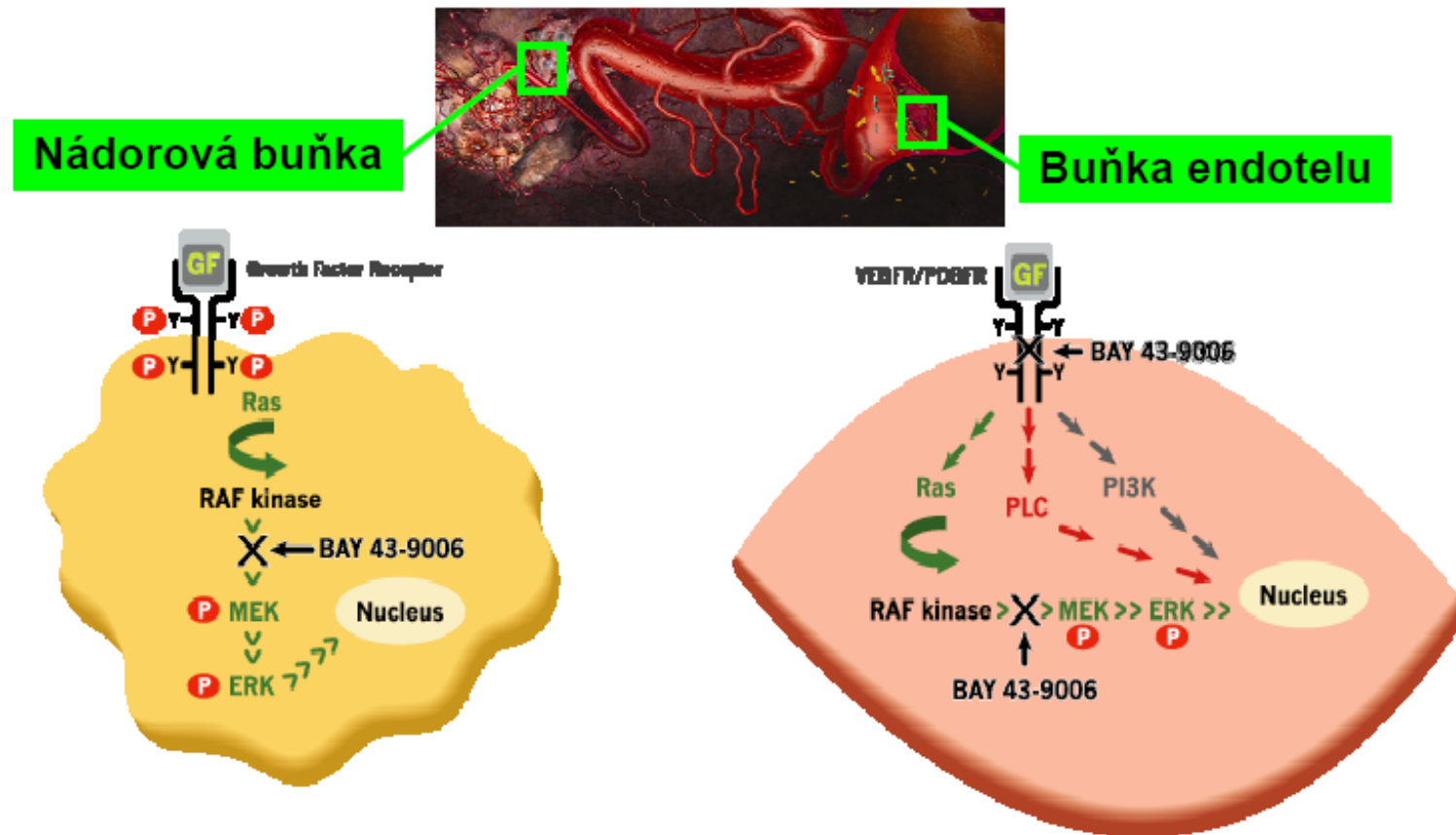
Klener, 2010

Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice angiogeneze



Klener, 2010

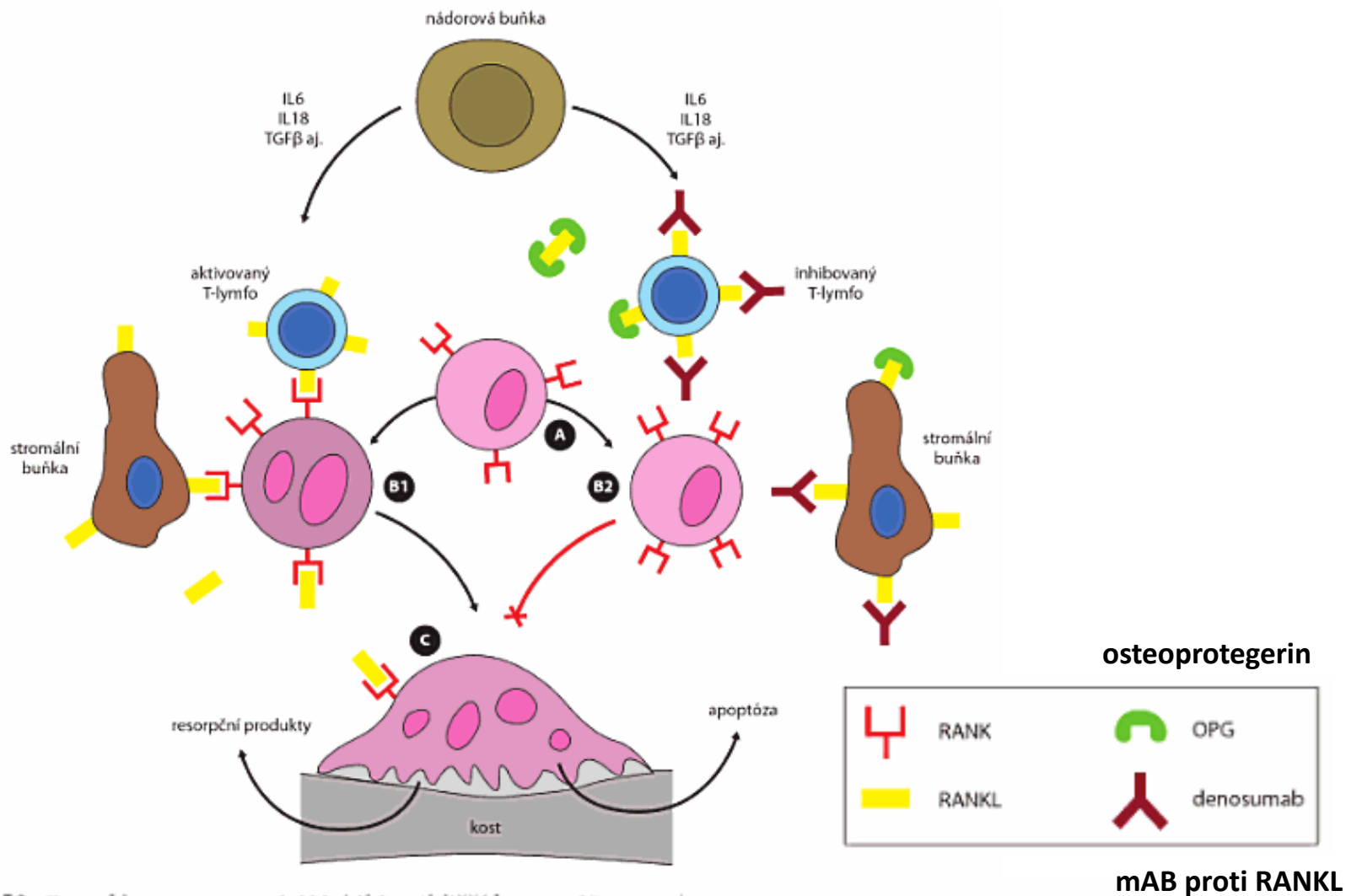
Sorafenib – duální inhibitor RAF kinázy a VEGFR*



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

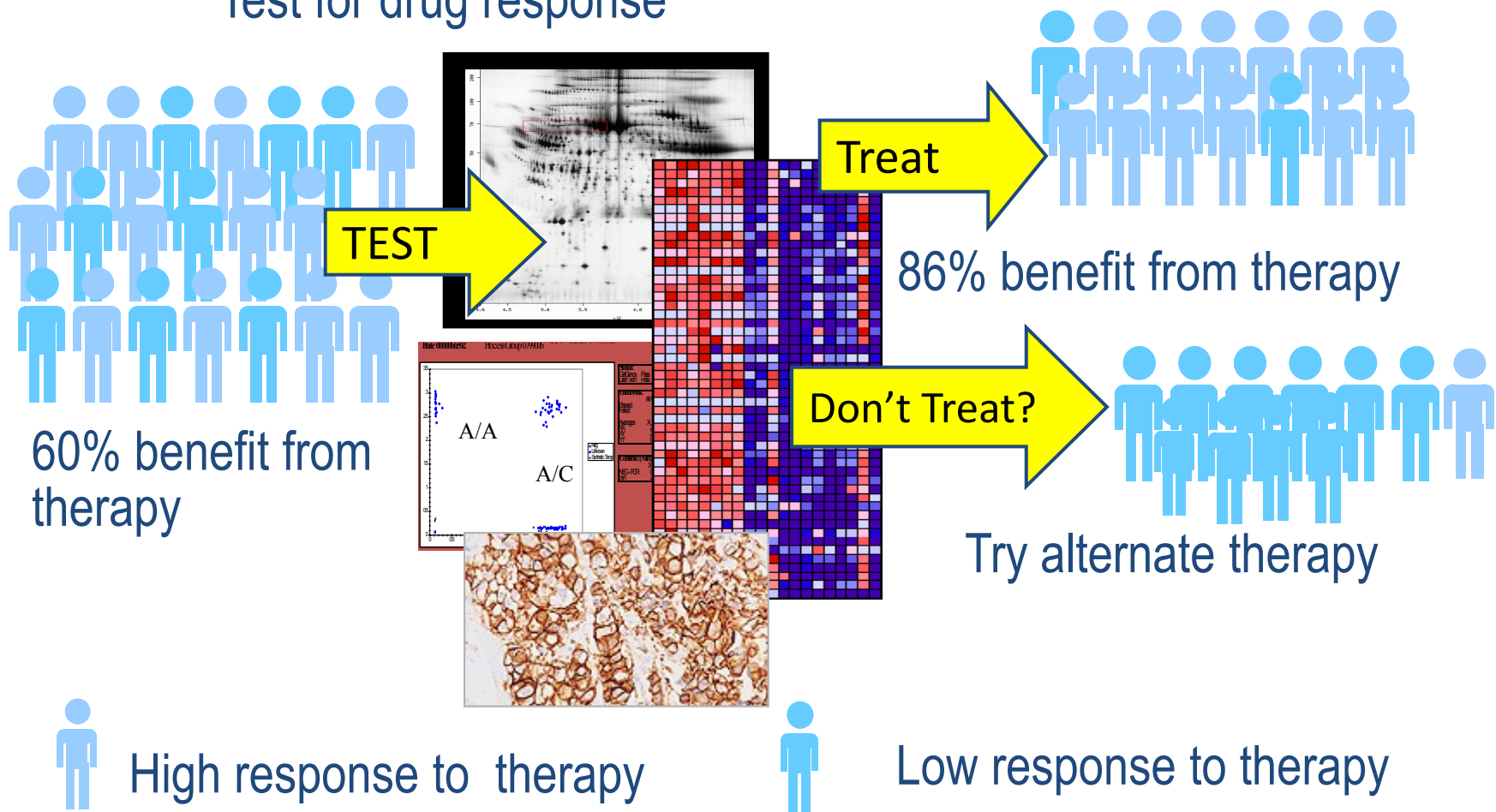


Obr. 53 Osteoklastogeneze a její inhibice (bližší komentář v textu)

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

Cílená léčba: prediktivní onkologie: individualizace léčby

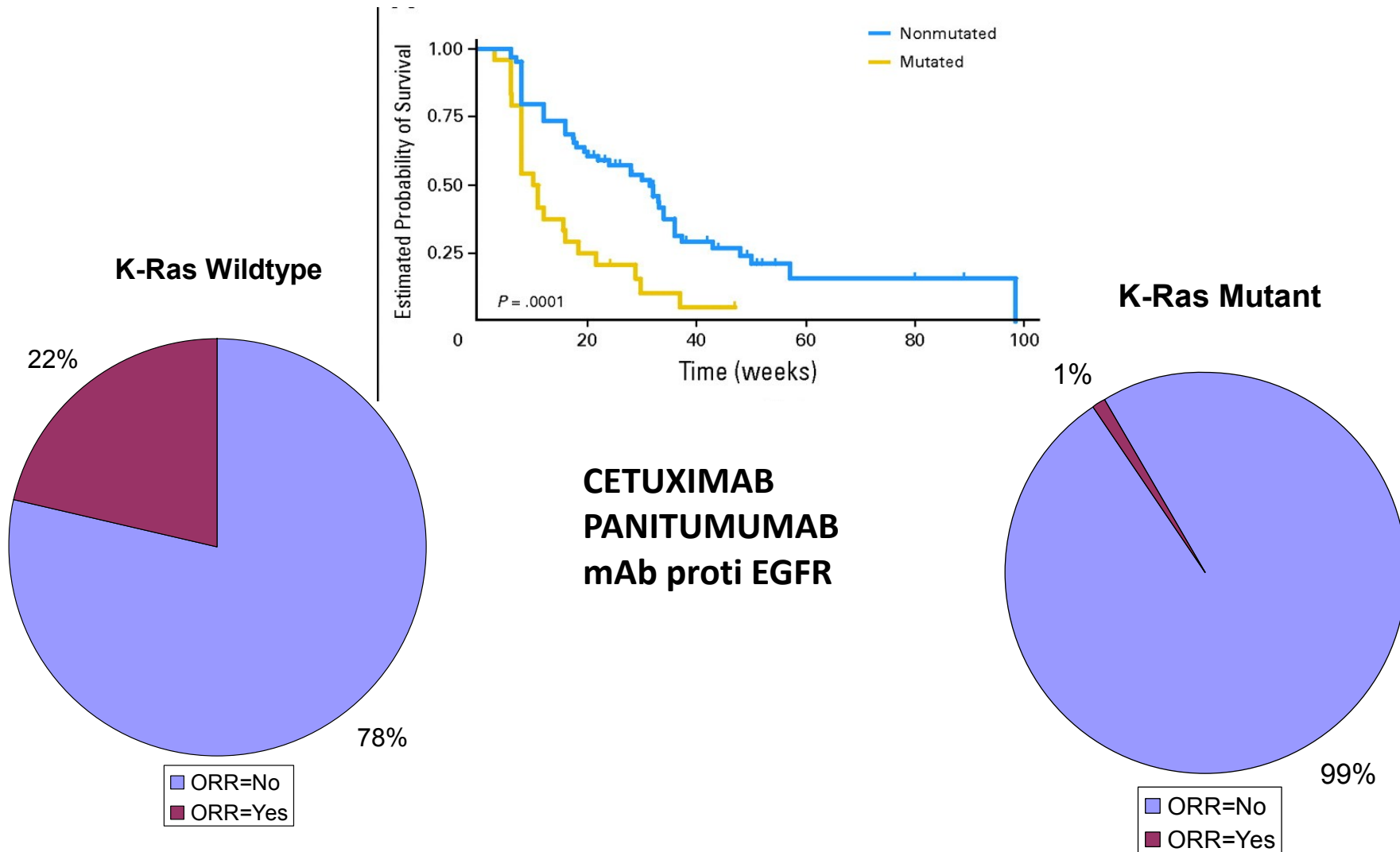
Test for drug response*



* 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 1
sequence**

Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice

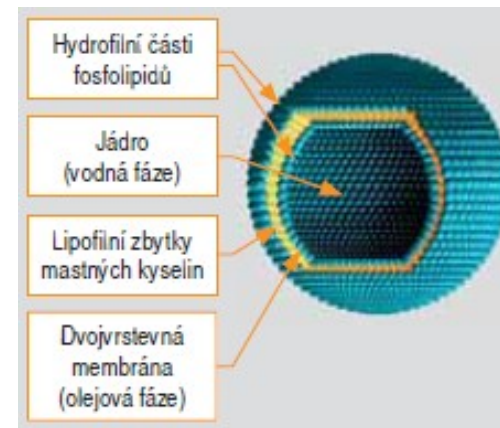
Ideální nano-transportní systém zajistí, že konjugát léčiva a transportního systému doručí léčivo do specifického místa účinku.

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

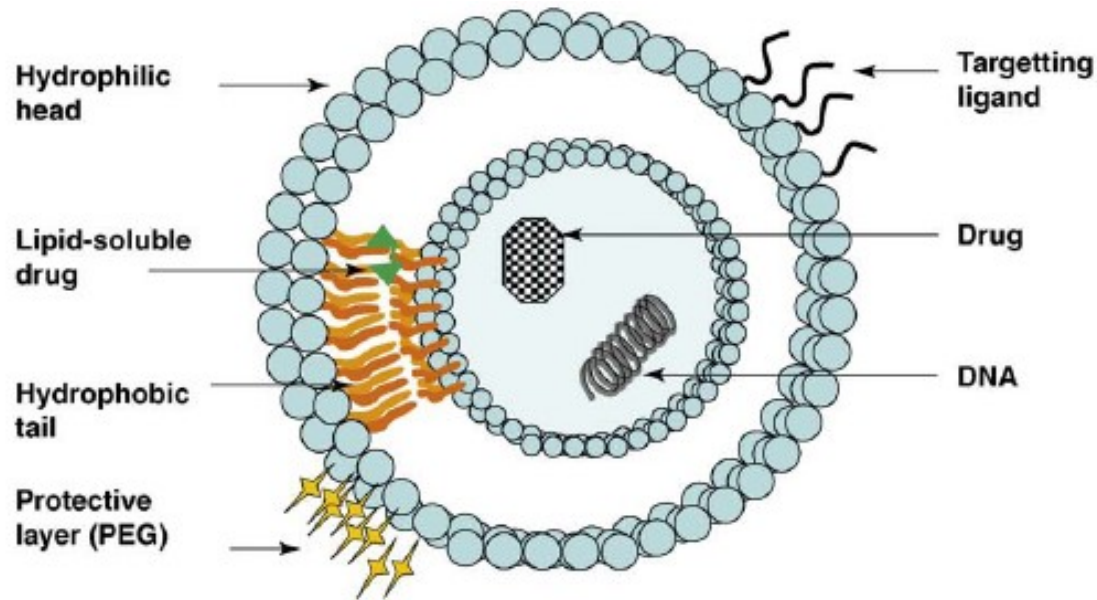
Jejich užití zlepšuje farmakokinetické vlastnosti, kontrolované a prodloužené Uvolňování léčiva a především nižší systémovou toxicitu.

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

Lipozomy jsou to částice tvořené fosfolipidy o velikosti 0,6–2 μm s tloušťkou membrány 5 nm. Jádro i povrch lipozomu je hydrofilní, vnitřek membrány tvoří lipofilní zbytky mastných kyselin fosfolipidů. Léčivo je možné umístit podle jeho povahy do jádra nebo do membrány lipozomu



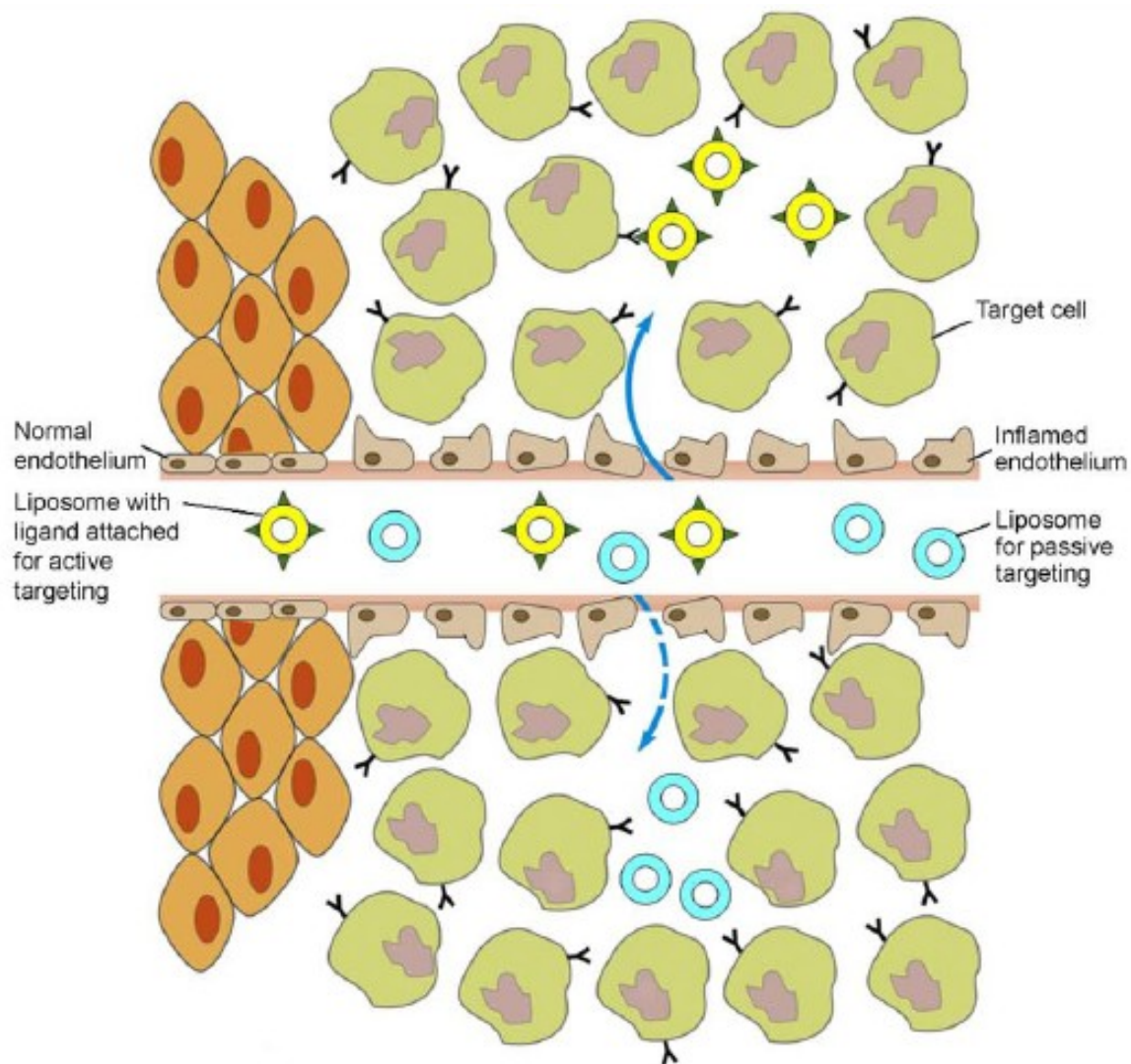
Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice



TRENDS in Pharmacological Sciences

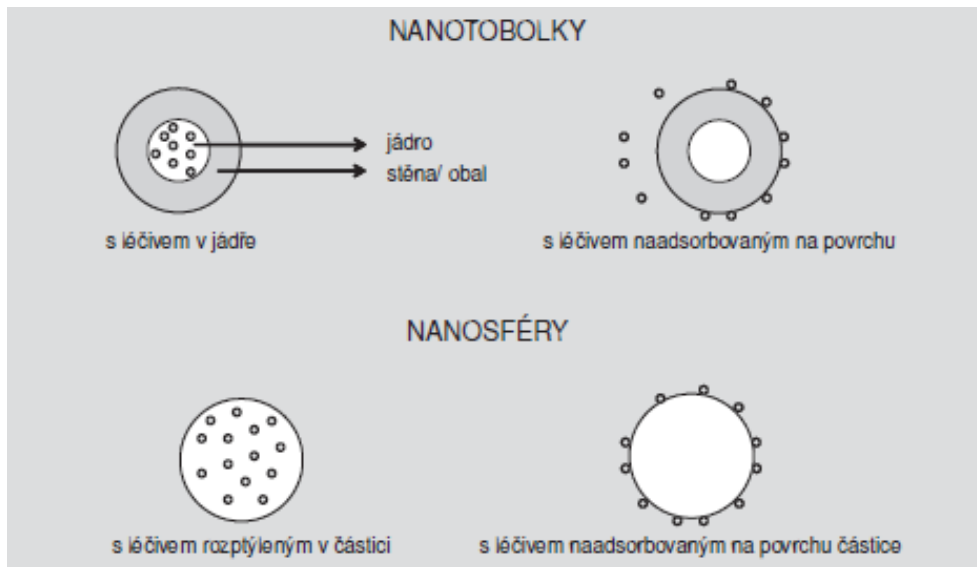
Úpravou povrchu lipozomů, např. **polyethylenglykolem (PEG)**, se **prodloužila jejich cirkulace v krevní plazmě** a částečně se vyřešil problém s jejich vychytáváním jako cizorodých částic retikuloendoteliárním systémem. V praxi se používají léky s obsahem daunorubicinu a doxorubicinu jako parenteralia 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

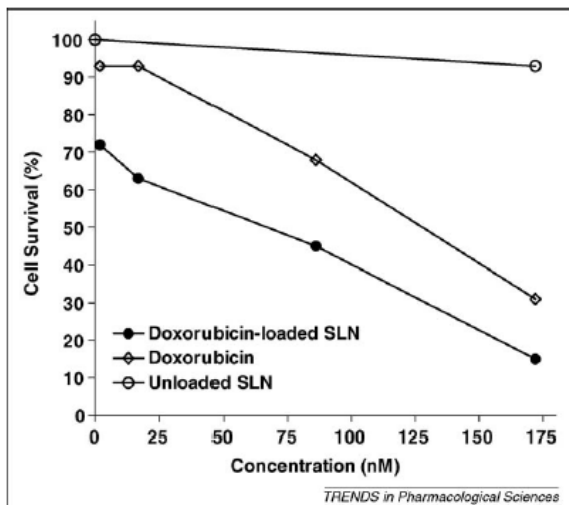
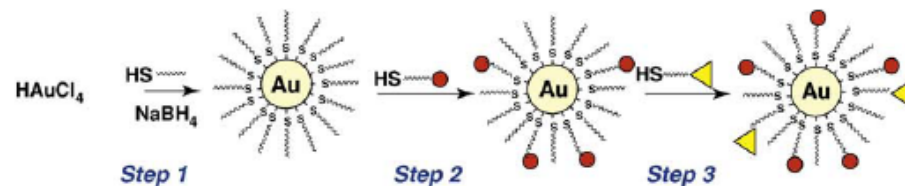


Figure 3. Benefits of SLNs in doxorubicin delivery. The cytotoxicity of free doxorubicin, doxorubicin-loaded SLNs and unloaded SLNs at different concentrations towards HT-29 colorectal cancer cells after 72-h exposure is shown. Doxorubicin-loaded SLNs showed the highest toxicity, offering more potent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

Nanočástice



Syntéza zlaté nanočástice

Table 2. Representative examples of studies using drug-carrying nanoparticles^a

| 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 [®] (current clinical form of docetaxel) |

^aNP, nanoparticle; PLA-TPGS/MMT NP, poly(lactide)-D- α -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

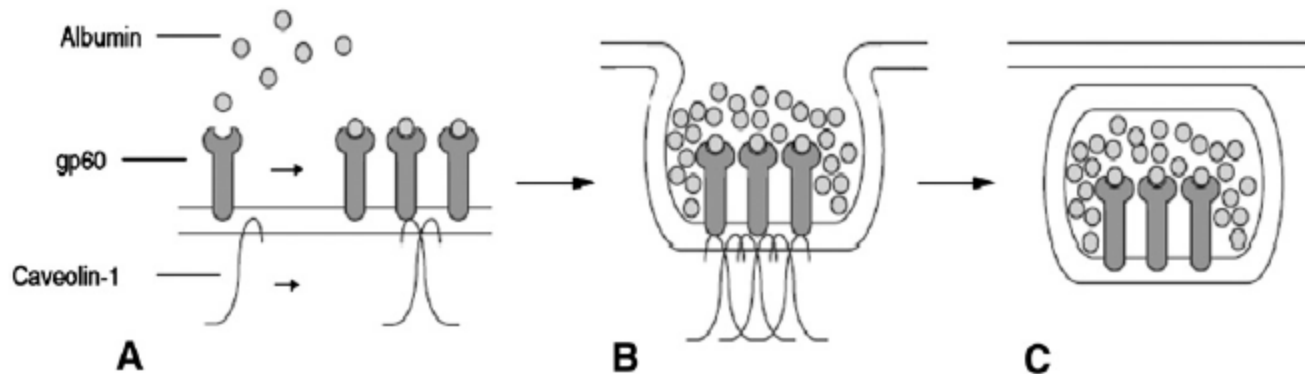


Fig. 1. Albumin receptor-mediated uptake of intravascular constituents and transcytosis across the vascular endothelium. A) Albumin receptor (gp60) binds albumin which in turn results in binding the induction of caveolin-1; B) caveolin-1 induces membrane budding and internalization, trapping free and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

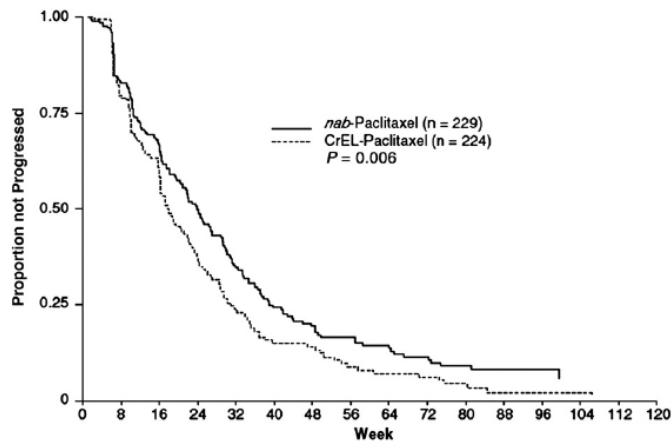


Fig. 5. Time to disease progression in a phase III trial of nab-paclitaxel versus CrEL-paclitaxel.

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.

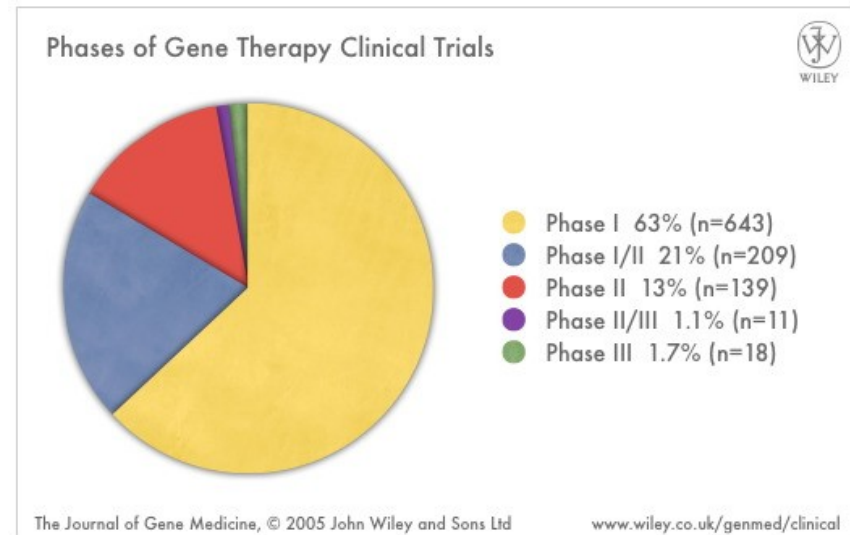
Genová terapie

- 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

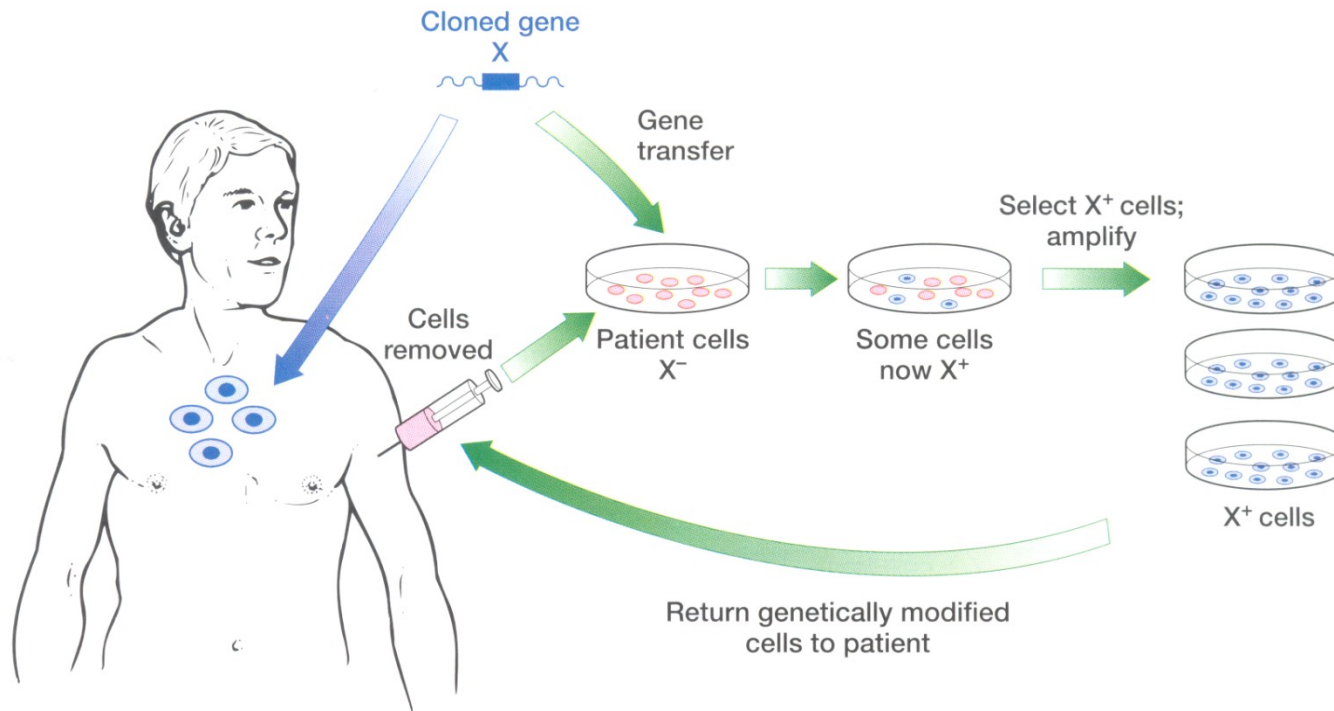


Figure 21.6: *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.

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

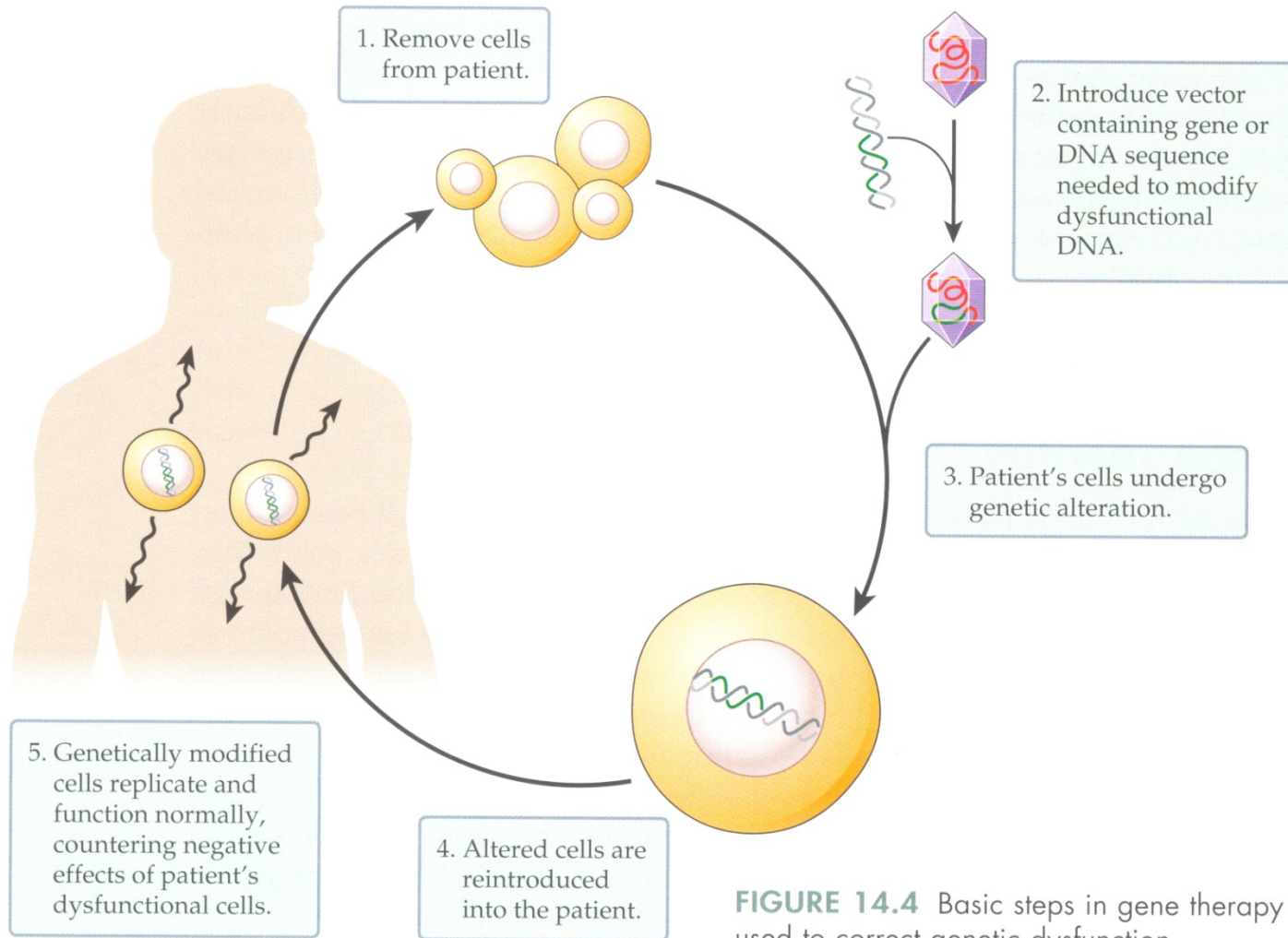
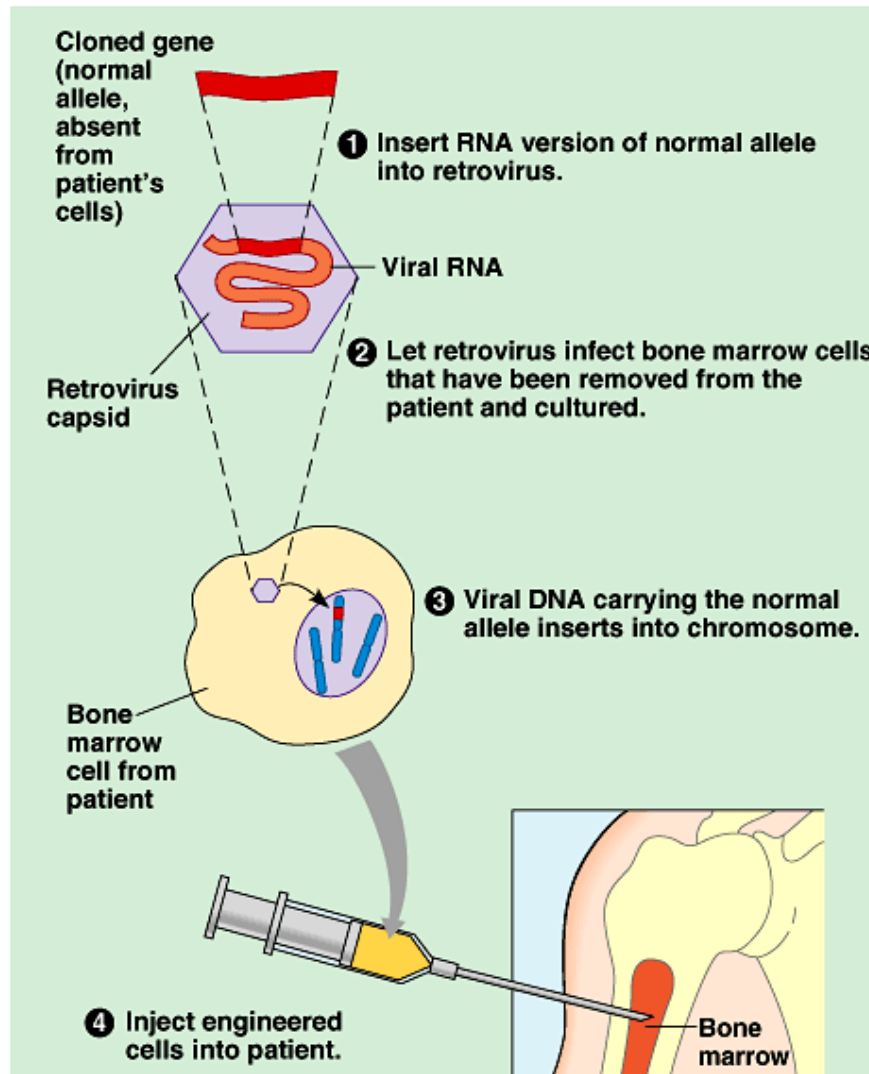
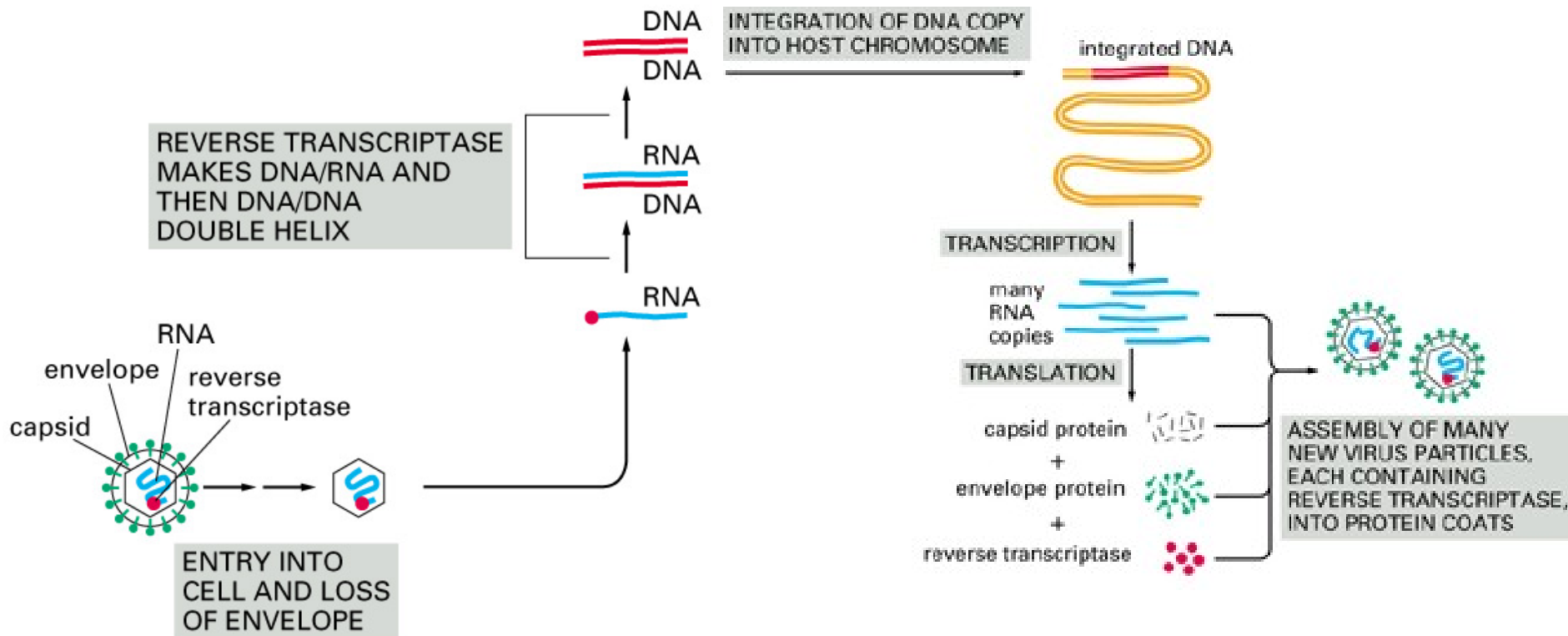


FIGURE 14.4 Basic steps in gene therapy used to correct genetic dysfunction.

Ex vivo genová terapie



Životní cyklus retroviru

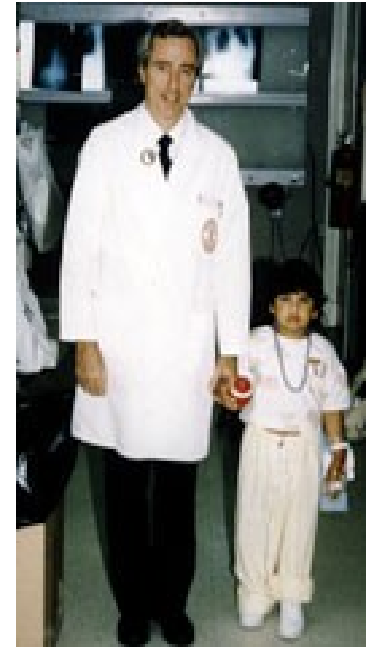
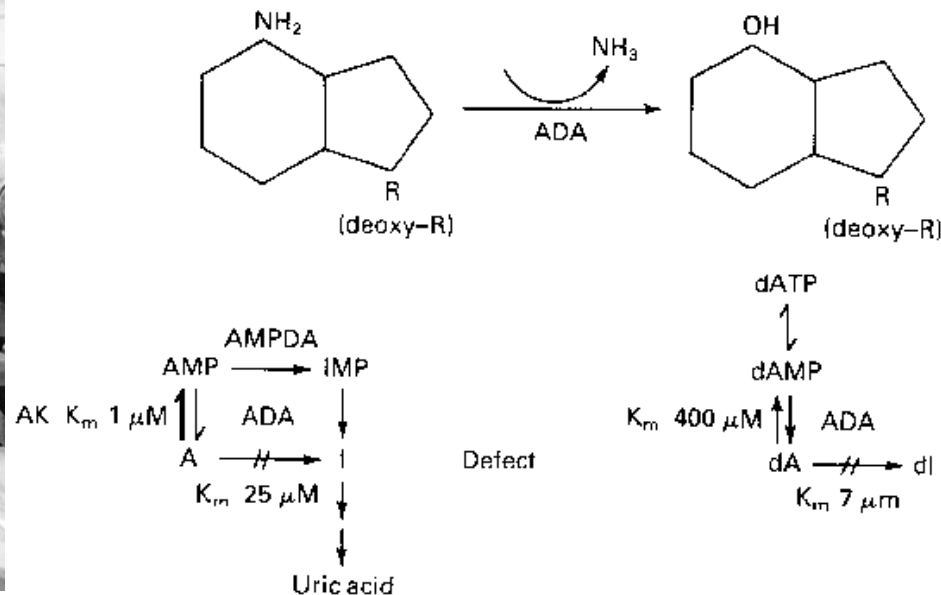


metody doručení genu do tkáně

| 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 γ c
 - 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

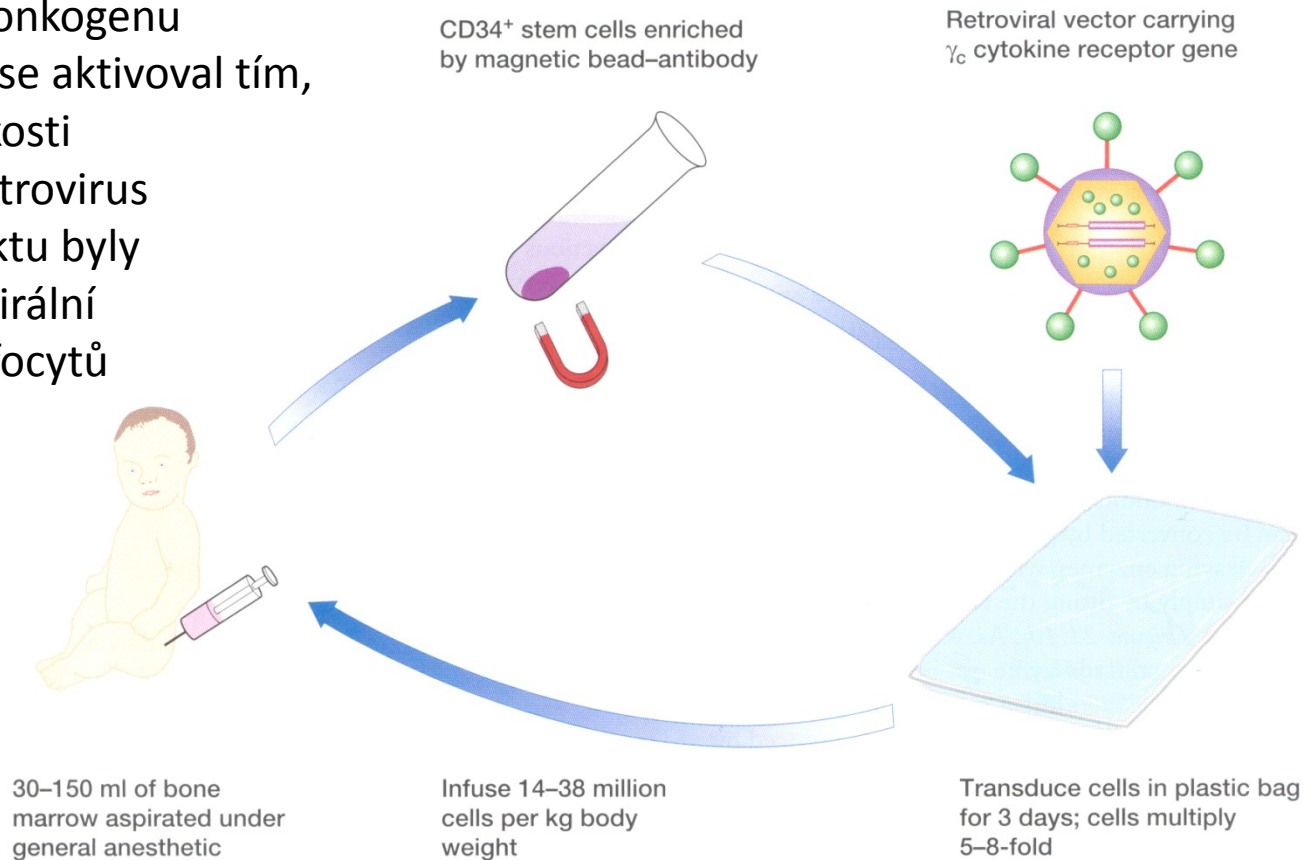


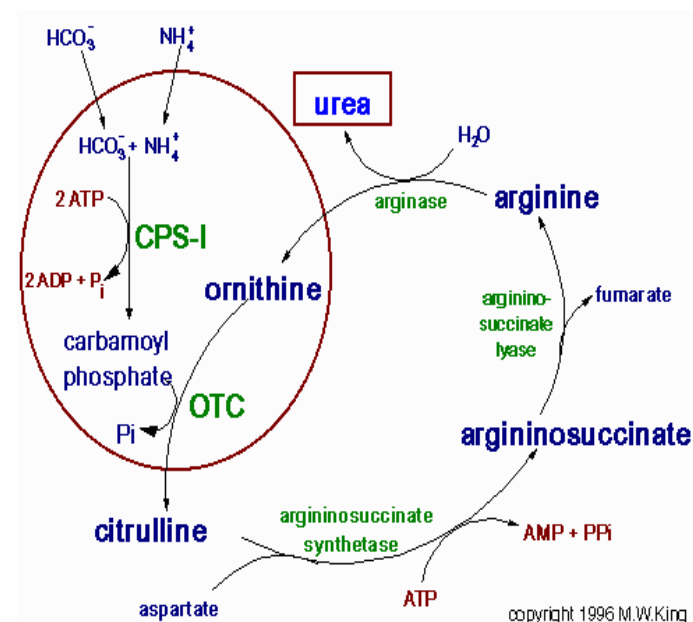
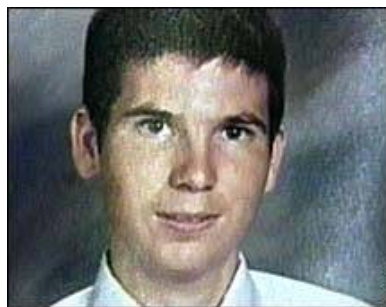
Figure 21.11: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID).

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.



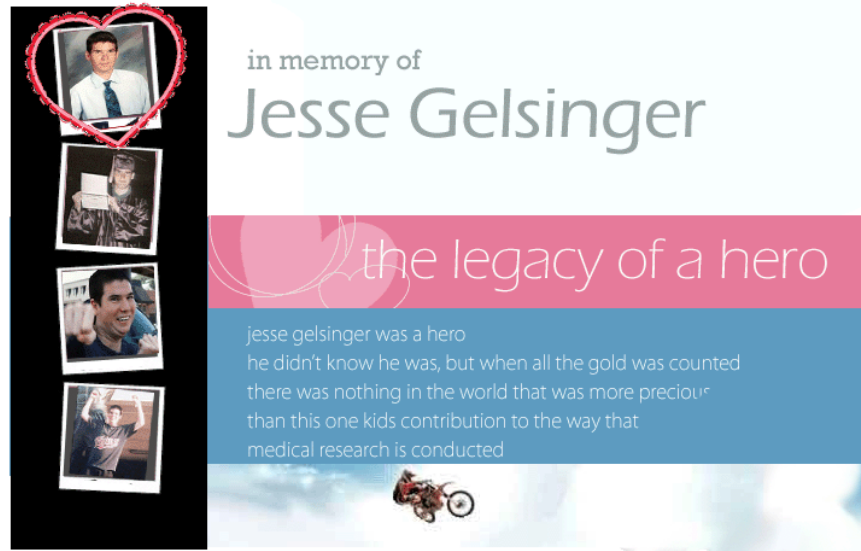
Jesse Gelsinger

- 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

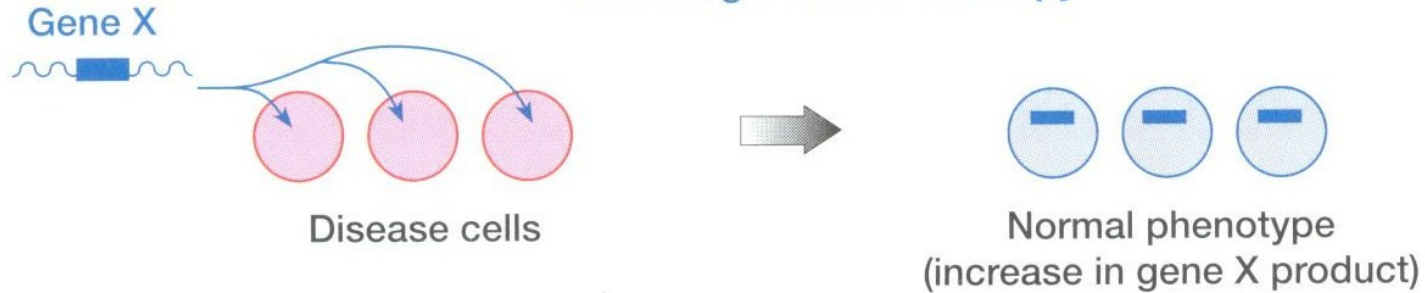
- čeká na den svých 18. narozenin, aby mohl poskytnout informovaný souhlas s léčbou
 - 13. září 1999 dostává genovou terapii, večer je mu špatně, další den odpoledne upadá do kómatu
 - 17. září 1999 umírá
 - smrt nastává evidentně a jasně následkem terapie
 - případ vyvolal zděšení mezi vědeckou komunitou 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

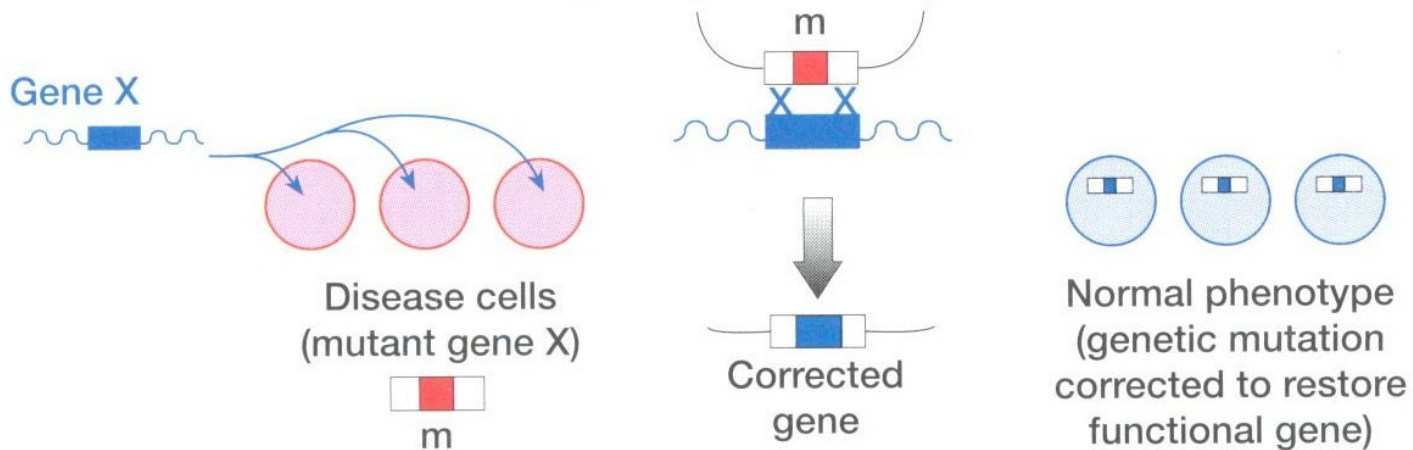
A)

Gene augmentation therapy



B)

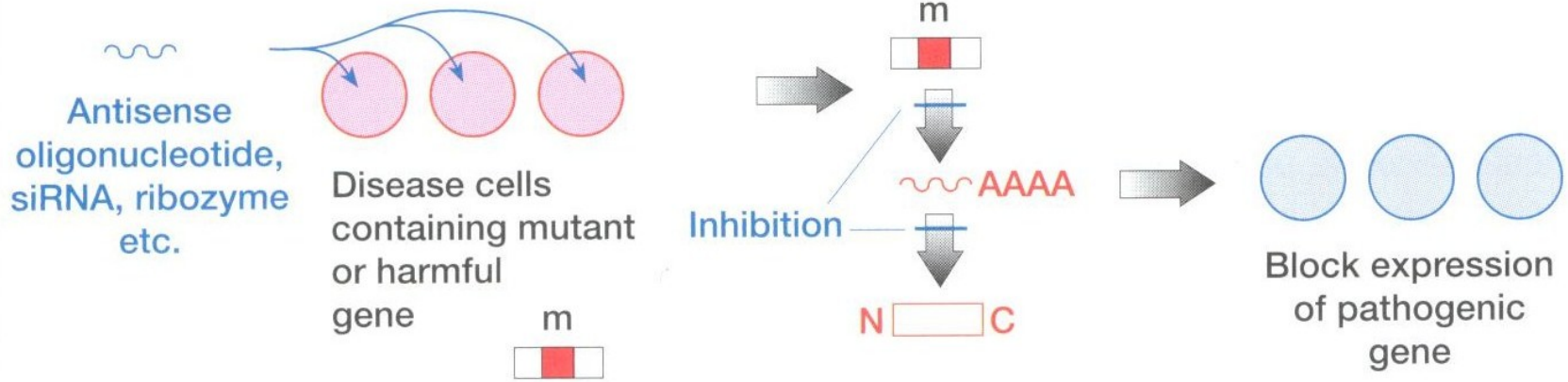
Targeted gene mutation correction



Strategie genové terapie

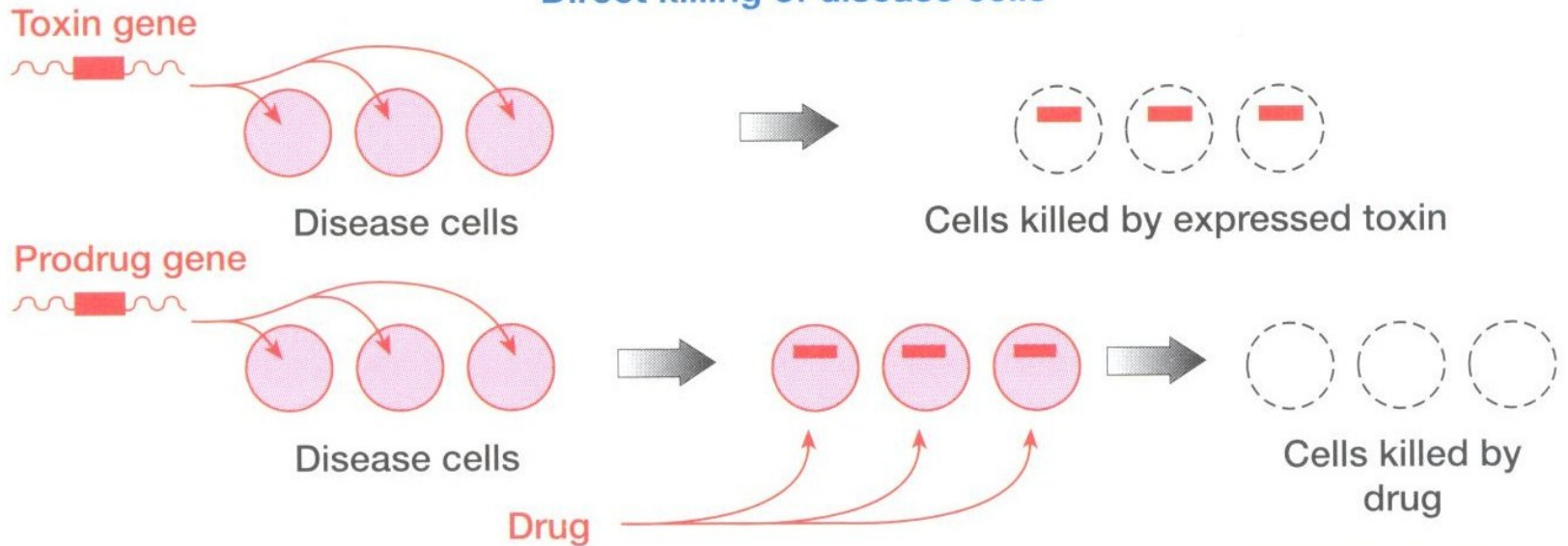
C)

Targeted inhibition of gene expression



D)

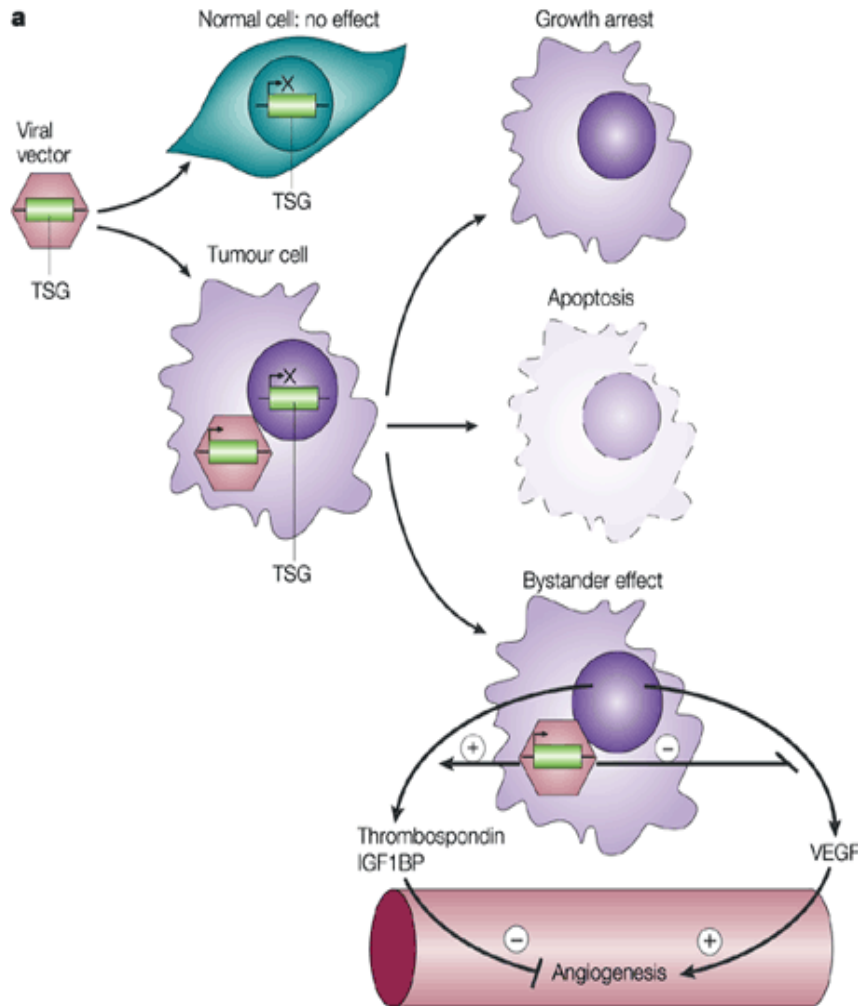
Direct killing of disease cells



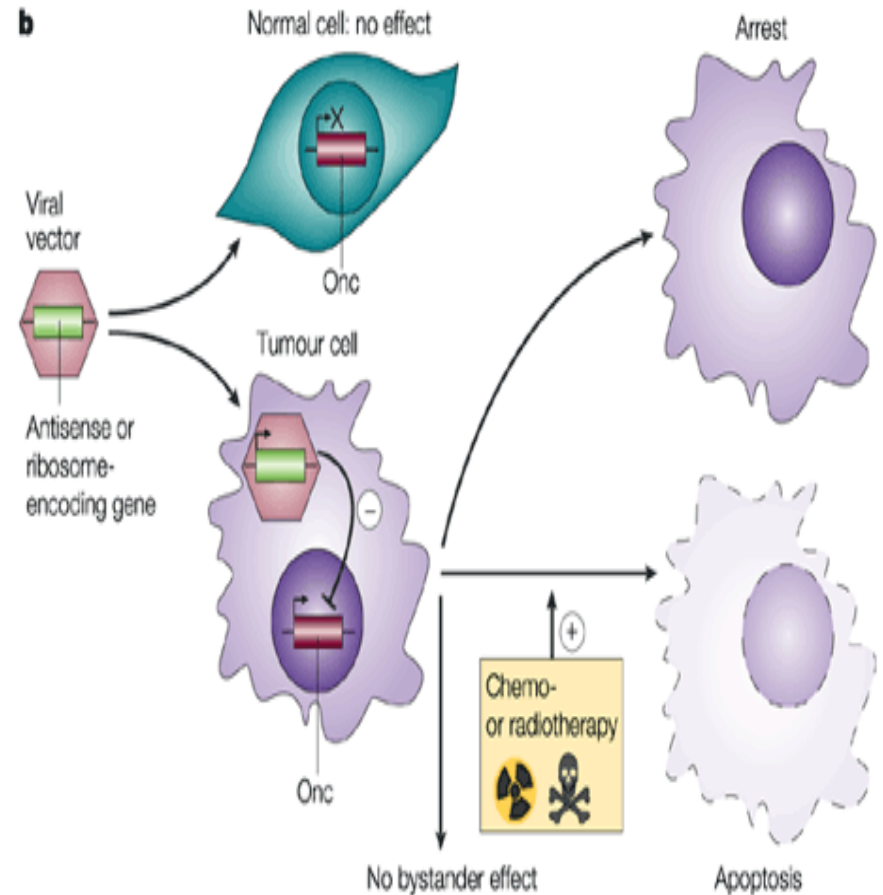
principy genové terapie nádorů

využití onkoretrovirálních vektorů

doručení nemutovaného supresorového genu p53

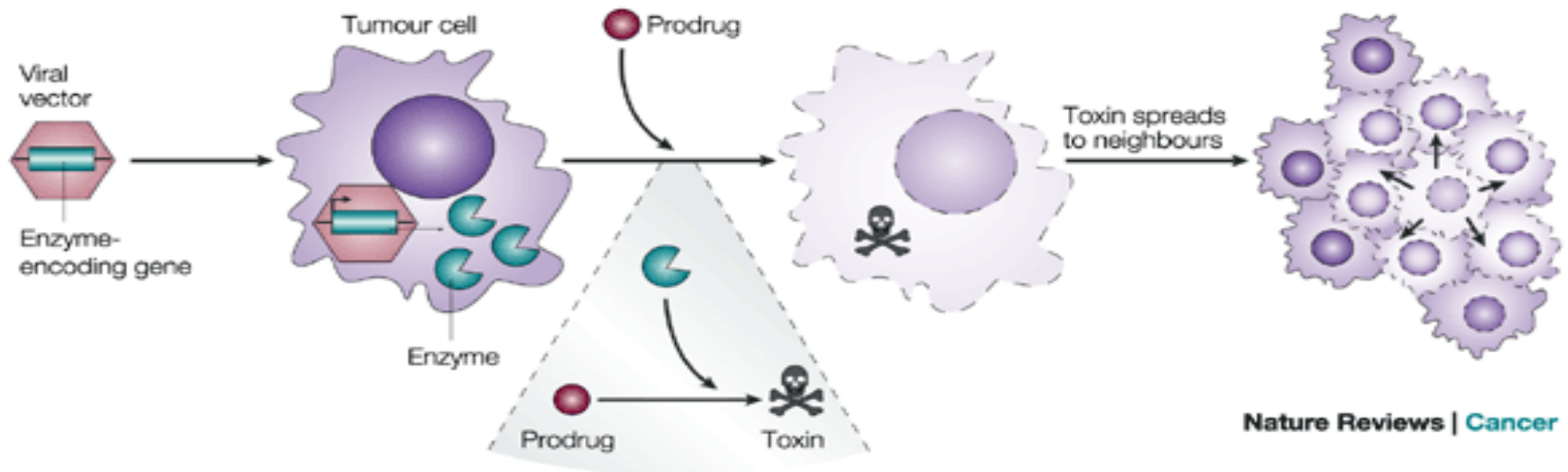


doručení konstruktů zajišťující zastavení exprese onkogenu (**antisense konstrukt**)



principy genové terapie nádorů

doručení sebevražedného genu přeměňující pro-drug na toxin



principy genové terapie nádorů

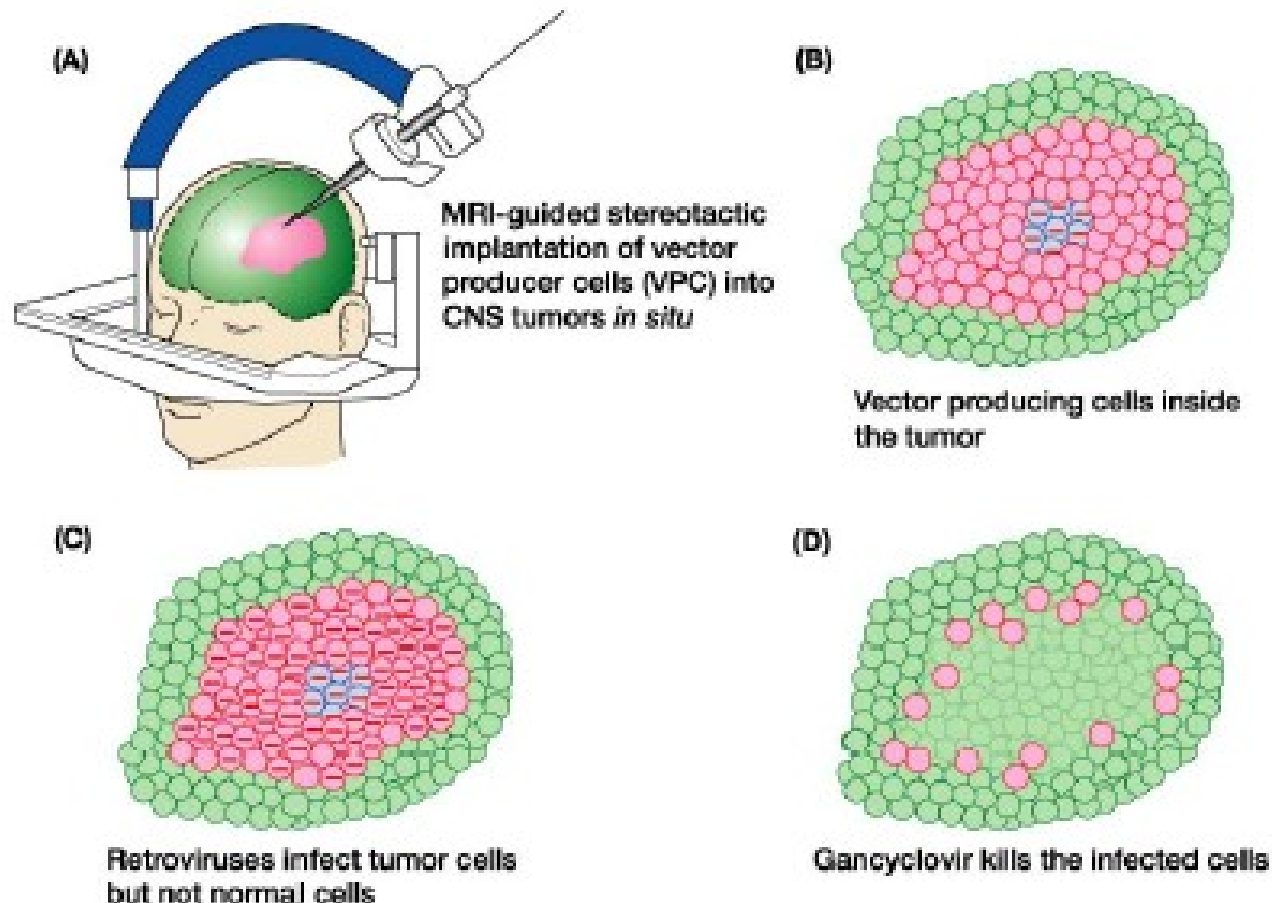
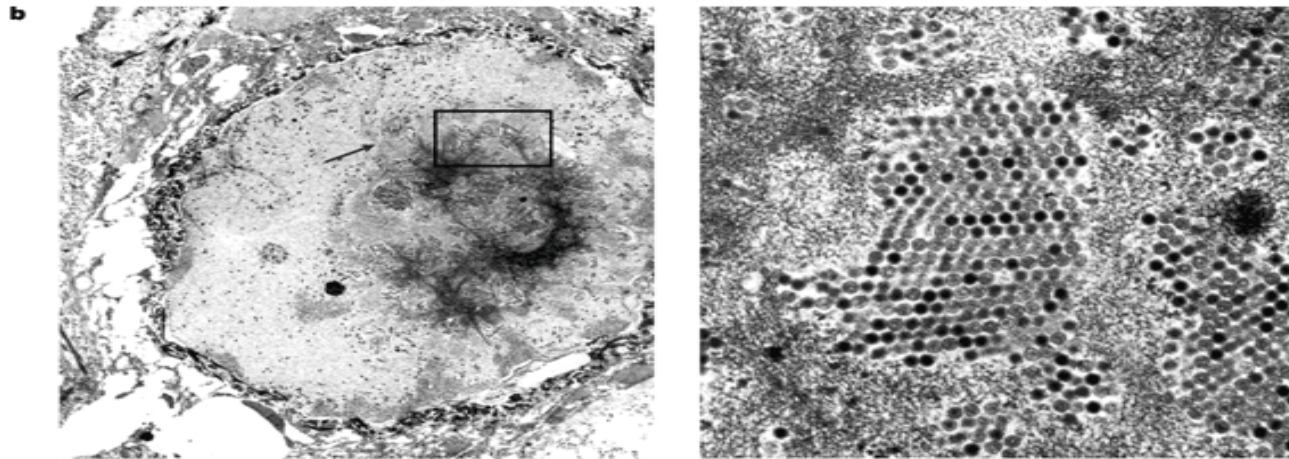
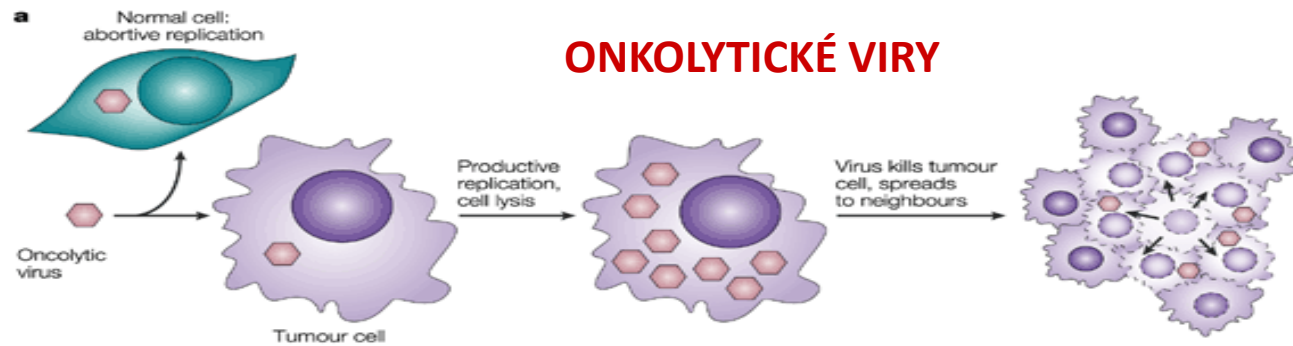


Figure 21-12 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

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

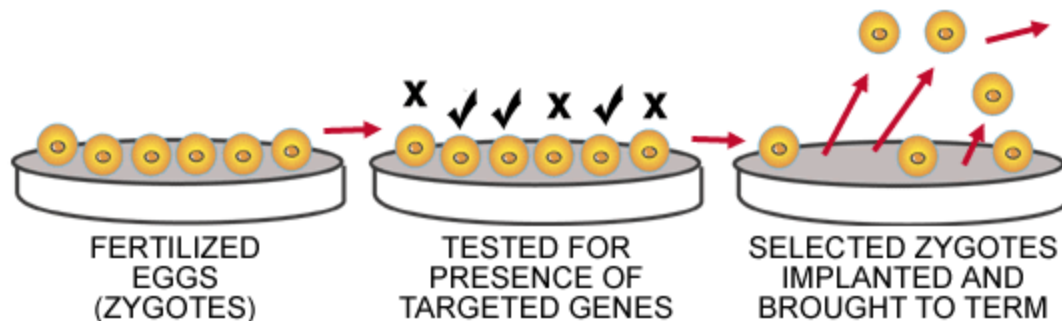
- nádorové buňky jsou cíleně ničeny lytickými viry
- 1956 bylo pozorováno že nádor ustupuje po virové infekci
- první klinicky testovaný virus byl defektní **herpesvirus G207**, který měl defektní vlastní ribonukleotid reduktázu a mohl se tudíž replikovat pouze v dělicích se buňkách, měl delecí v genu 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.

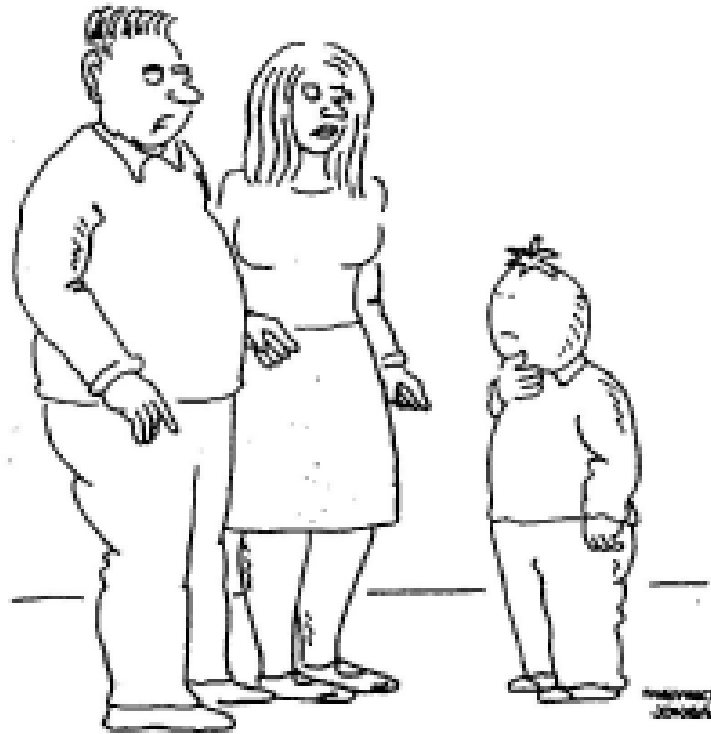
To learn more about the Genetics & IVF Institute, and how the MicroSort® technology may help you select the gender of your next child — please visit us at:

www.givf.com
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?

