

C7188 Úvod do molekulární medicíny 8/10

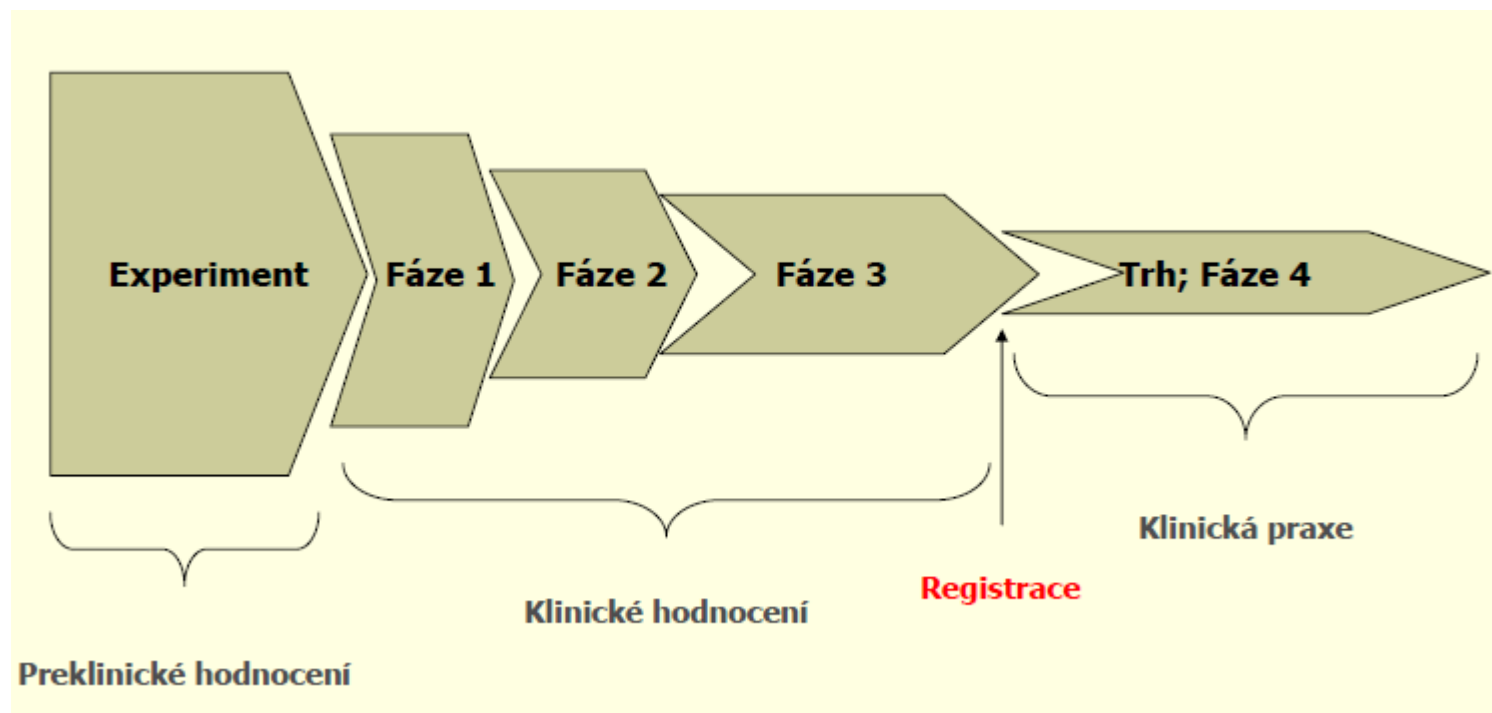


MOLEKULÁRNÍ FARMAKOLOGIE II GENOVÁ TERAPIE PREIMPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKA

Ondřej Slabý, Ph.D.
*Masarykův onkologický ústav
CEITEC
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity*



Klinické hodnocení nových léčiv



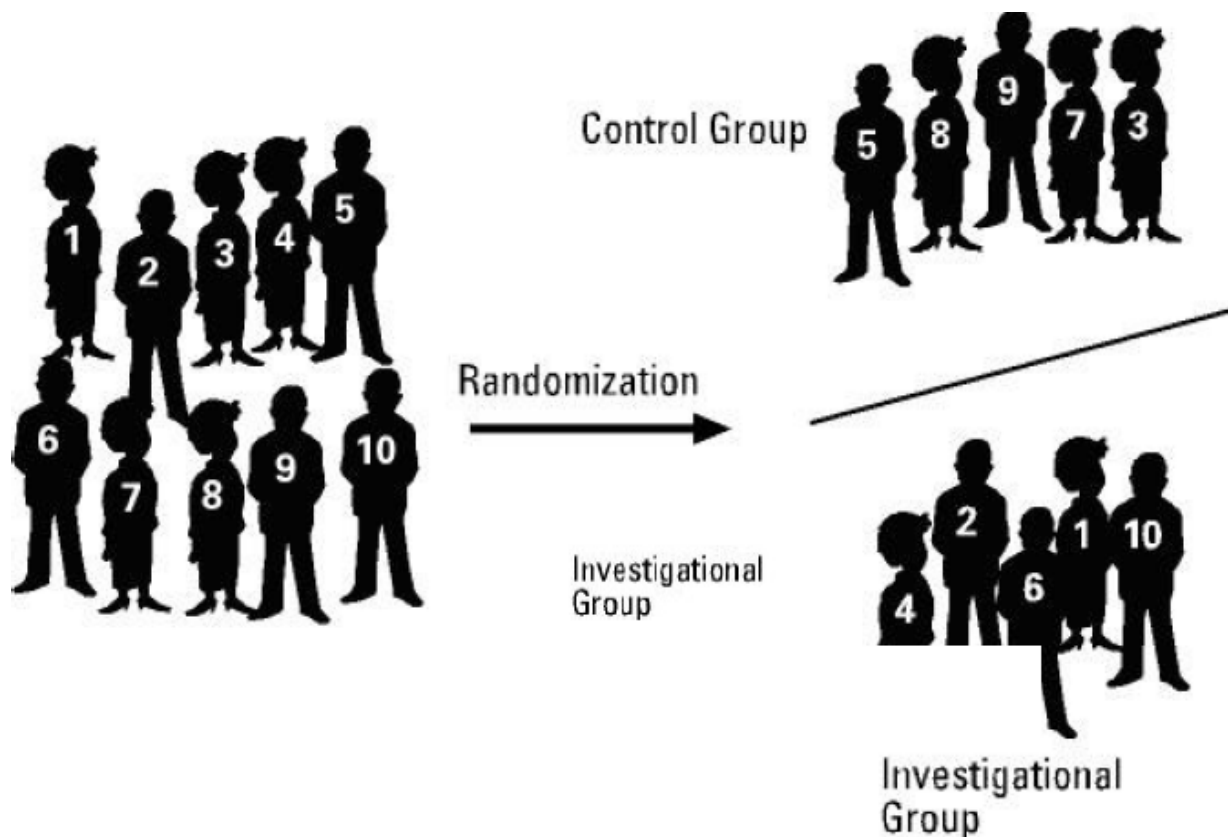
Klinické hodnocení nových léčiv

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

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



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

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

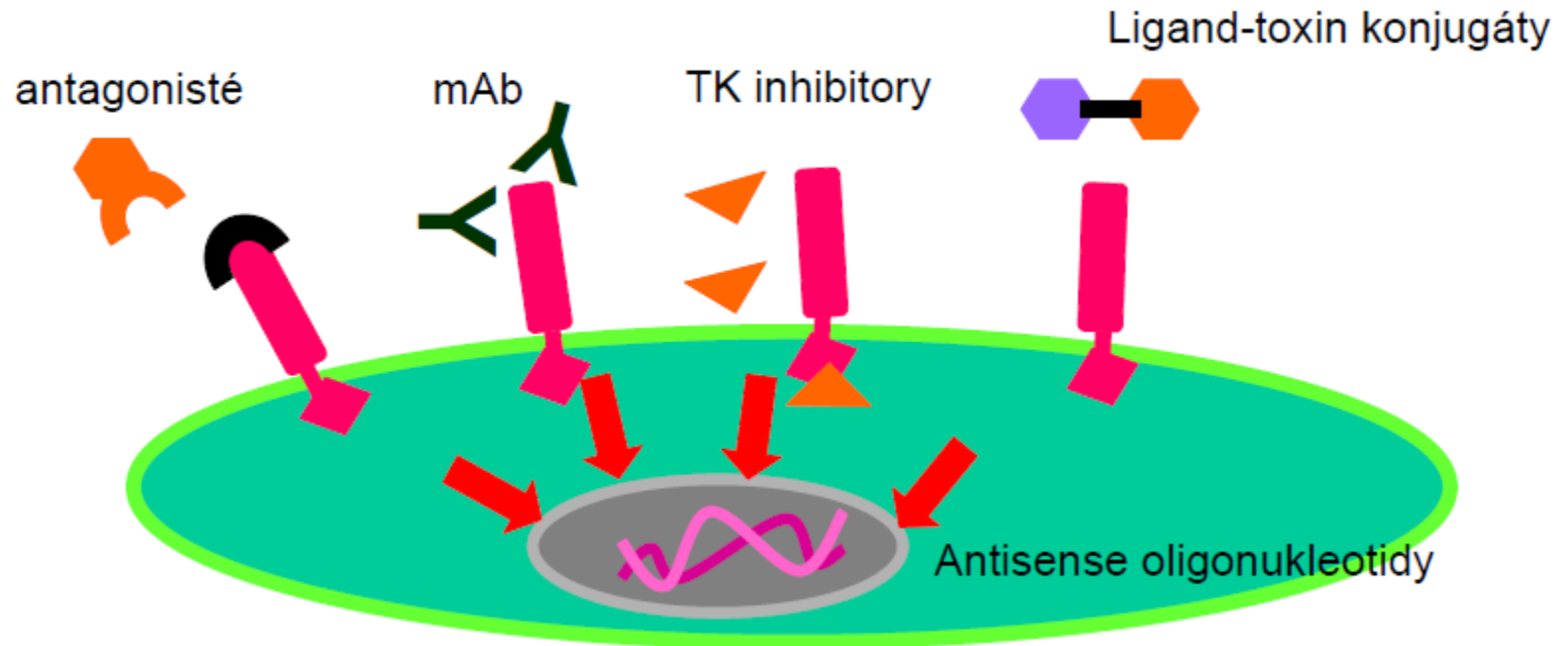
Zaslepení je prvek designu významně zvyšující jeho objektivitu.

METANALÝZA –

je metodika sofistikovaného zobecnění výsledků dvou a více nezávisle

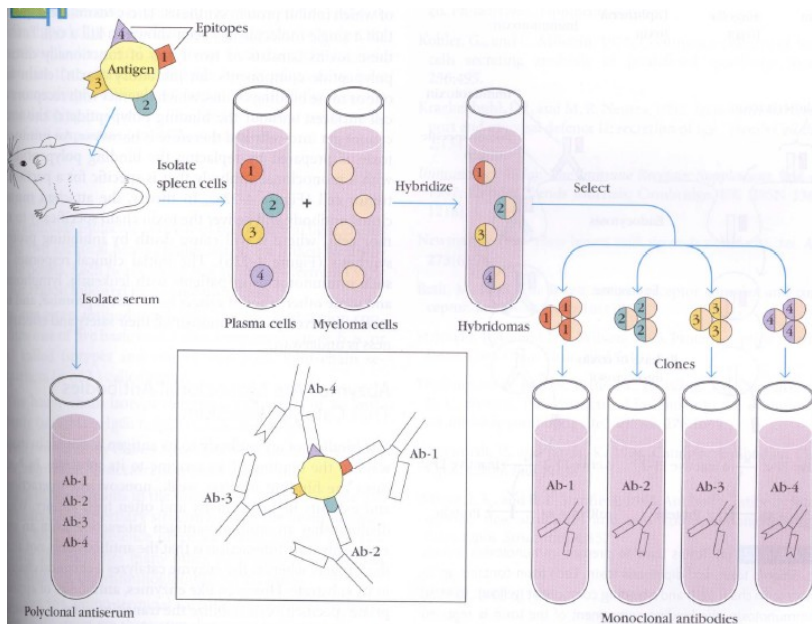
Provedených experimentů.

Strategie cílené léčby

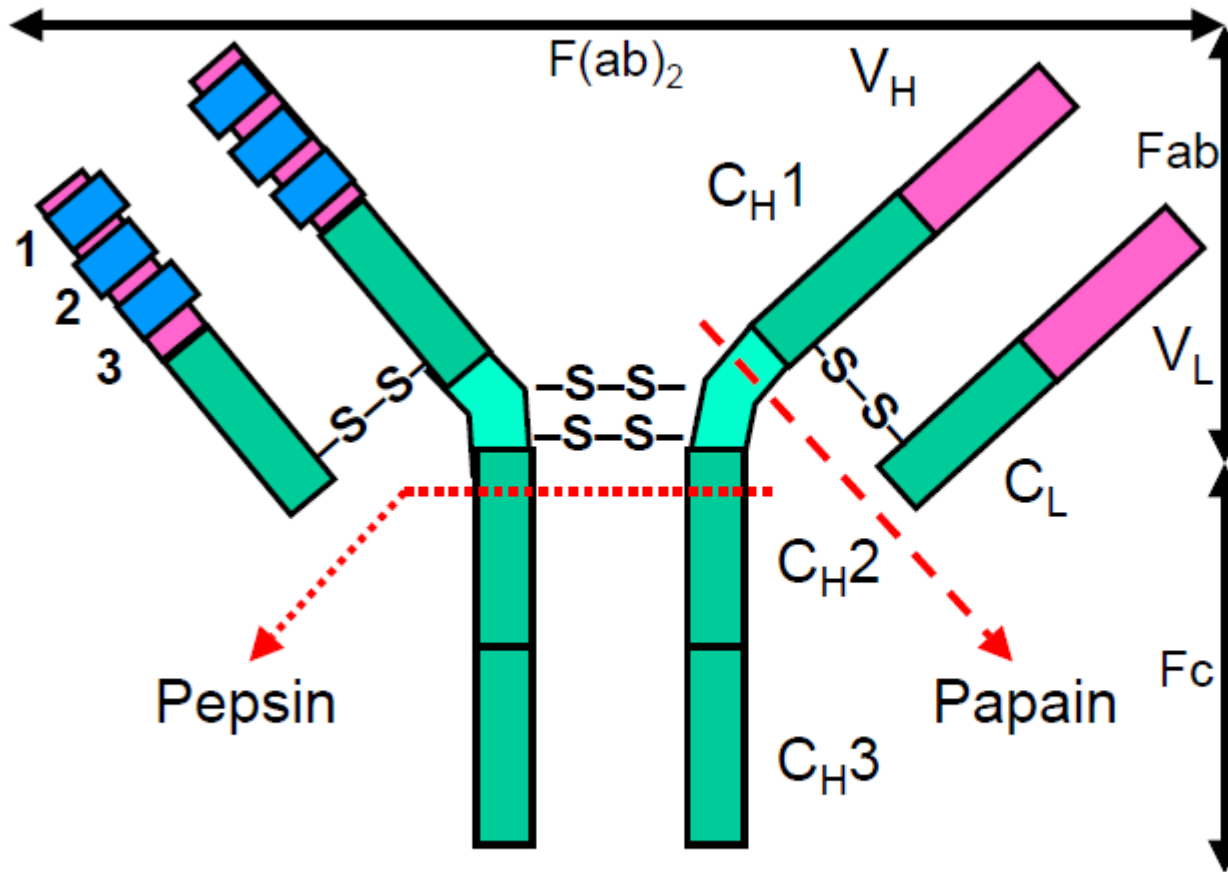


Terapeutické protilátky

- Emil von Behring – objev protilátek, terapeutický význam coby „magických střel či otrávených šípů“ - polyklonální
 - 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) - monoklonální



Struktura protilátky - imunoglobulinu



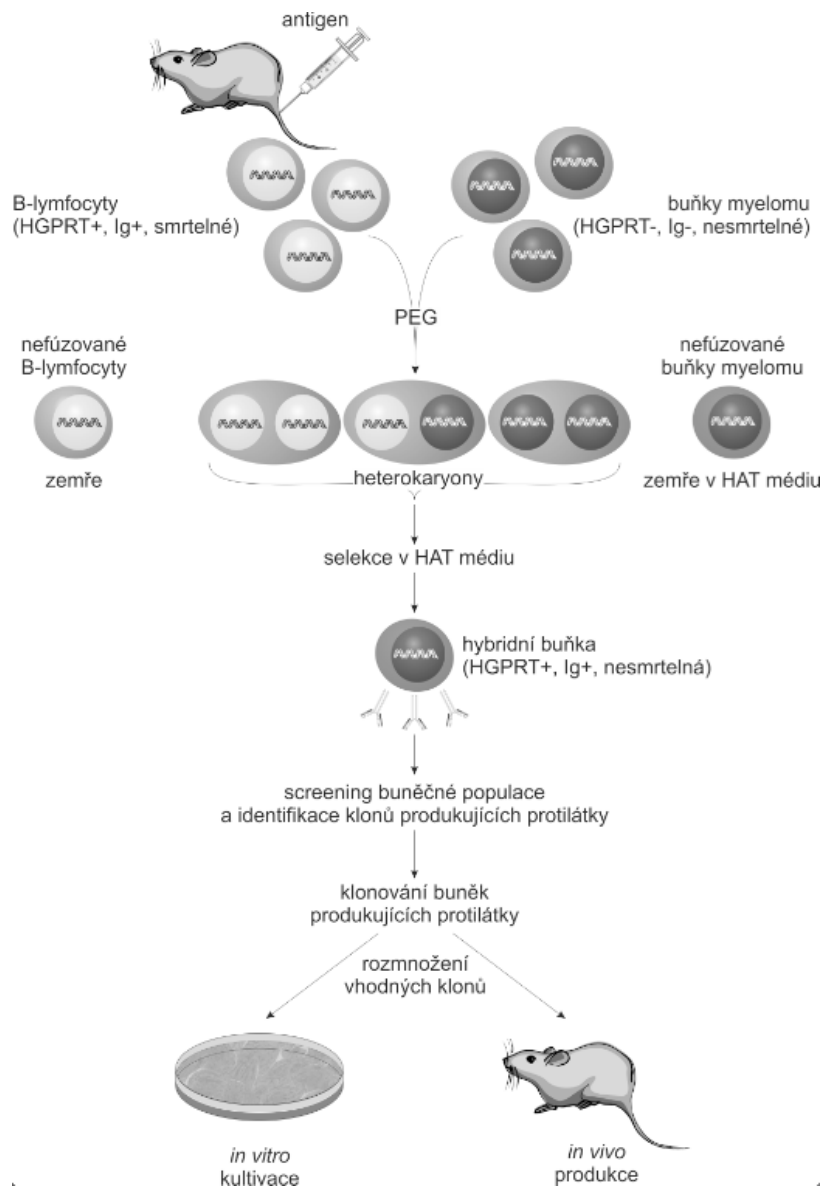
V = variabilní doména (antigenní variabilita)

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)

μ, δ, α, γ, ε = izotypy těžkých řetězců (IgM, IgD, IgA, IgG, IgE)

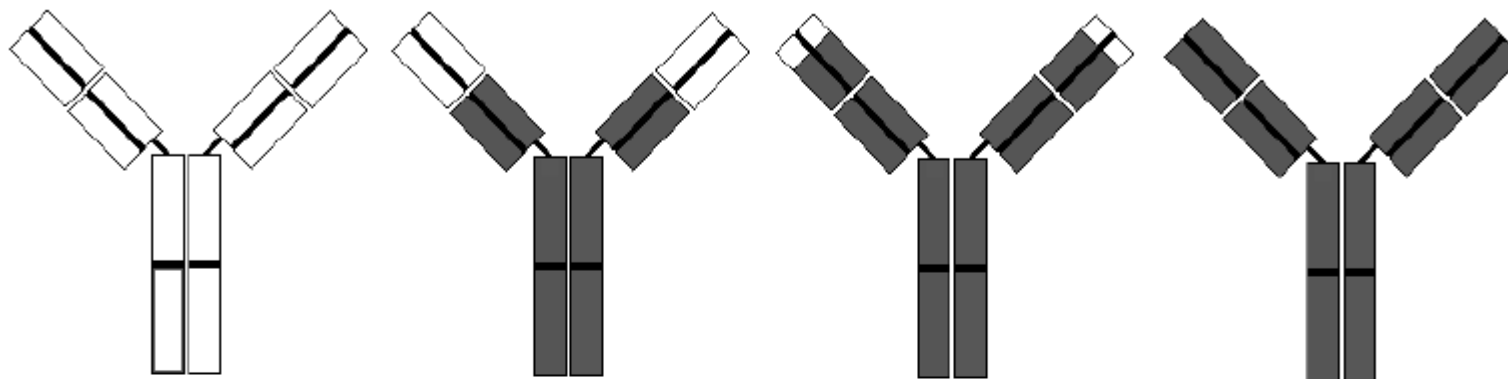


Příprava monoklonálních protilátek

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

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

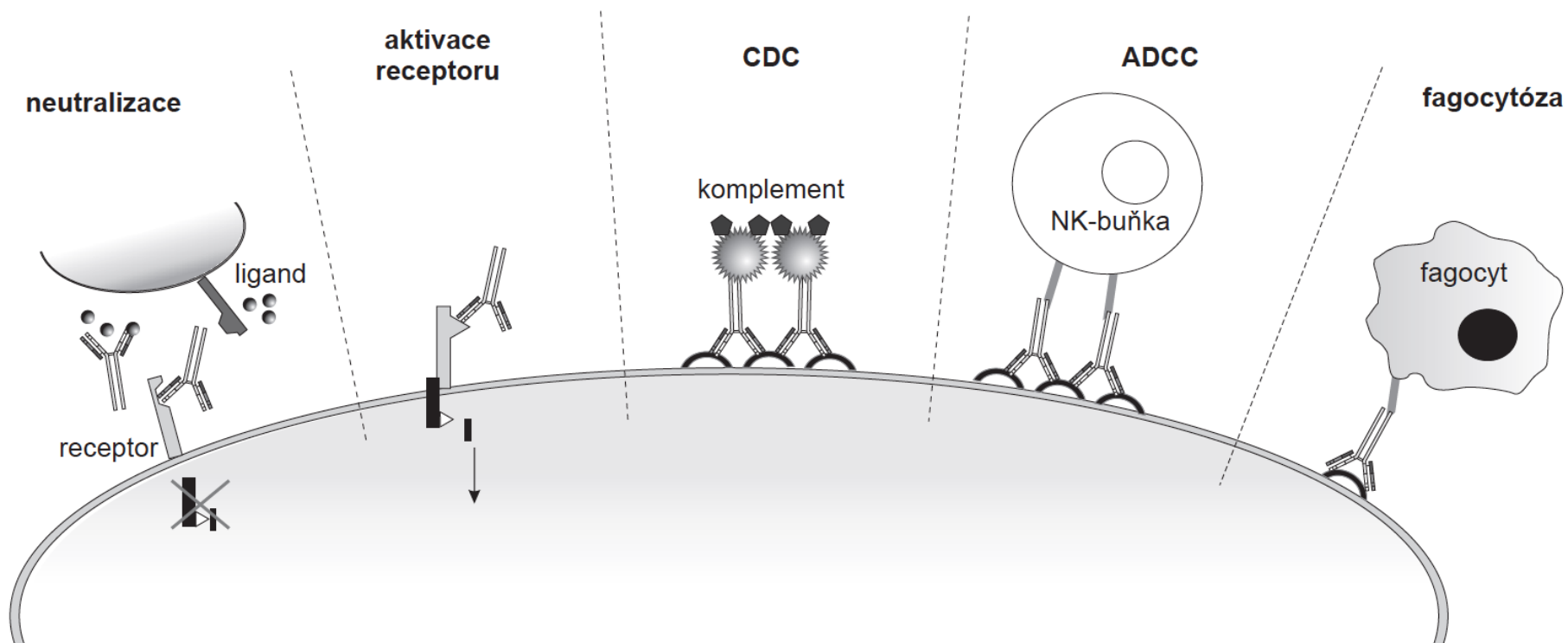
- Hypersensitivita
- Nízké hladiny neutralizujících protilátek
(trastuzumab)

Humánní MAb

100% lidské

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

Biologické účinky navozené mAb



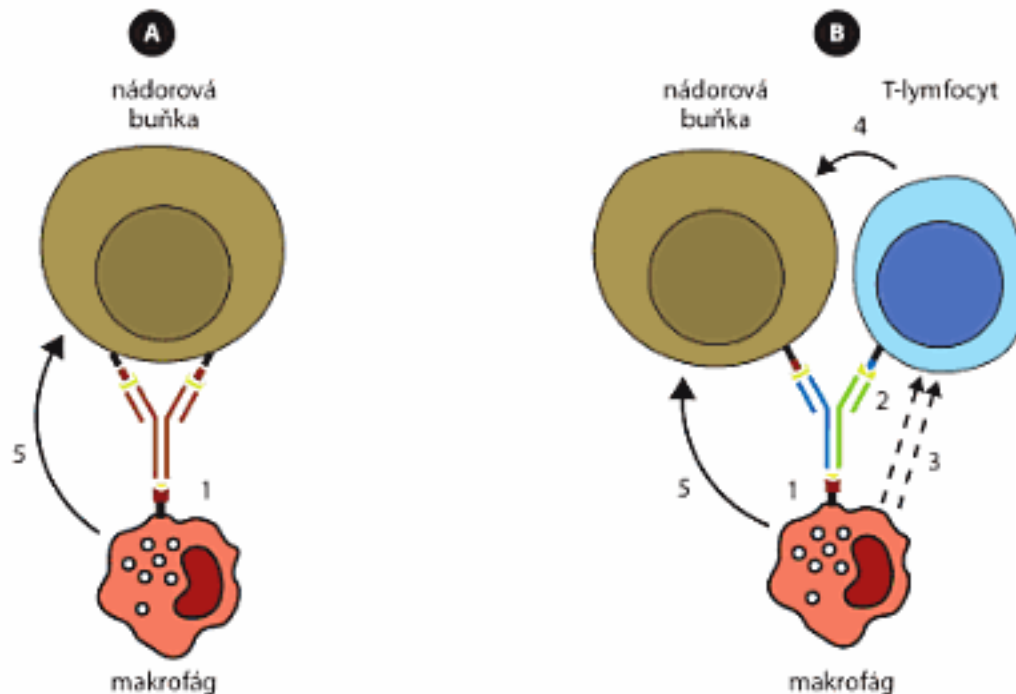
Obr. 11.5.2. Mechanizmy účinku monoklonálních protilátek. Protilátky působí buď specificky přímou vazbou na cílovou strukturu (neutralizace ligandu nebo receptoru, aktivace receptoru), nebo prostřednictvím efektorových buněk imunitního systému (fagocytóza, ADCC, CDC).

Biologické účinky navozené mAb/typy monoklonálních protilátek

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

Účinek zprostředkovaný cytotoxickými buňkami (ADCC)

Účinek zprostředkovaný komplementem

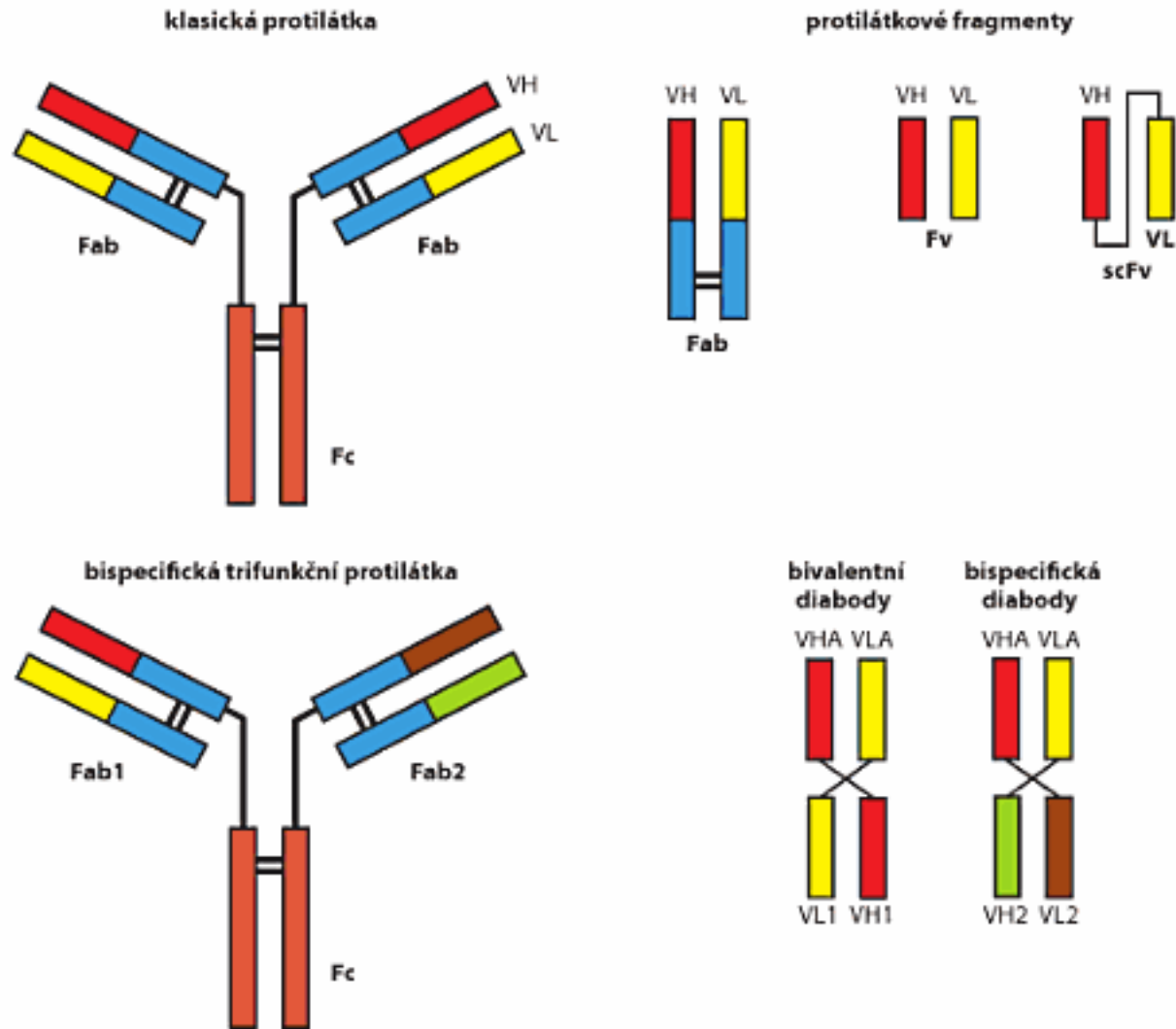


**Protilátky
klasické-monospecifické
-bifunkční
a bispecifické – trifunkční**

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.



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

Typy monoklonálních protilátek

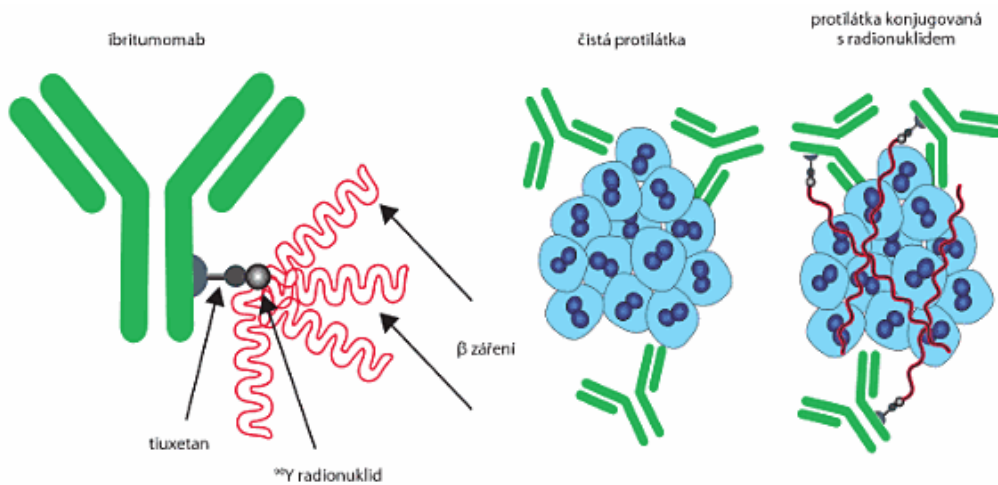
Protilátky konjugované

Konjugované s imunotoxiny

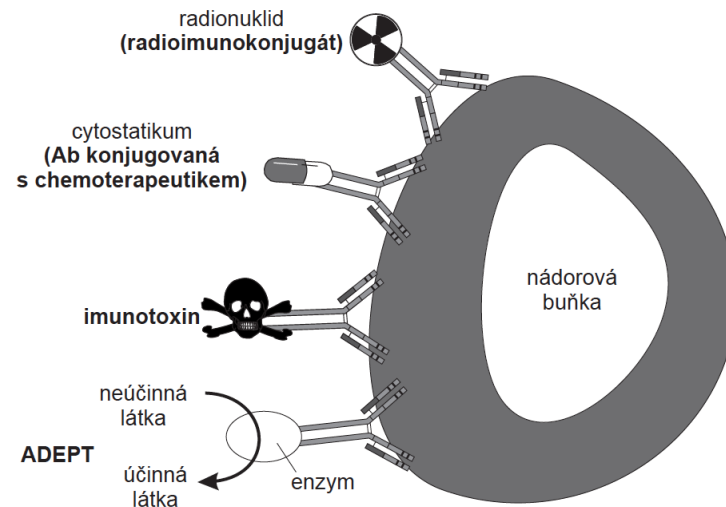
Konjugované s radionuklidem

Konjugované s cytokiny

Konjugované s cytostatiky



Obr. 34 Znáznornění účinku protilátky konjugované s radionuklidem

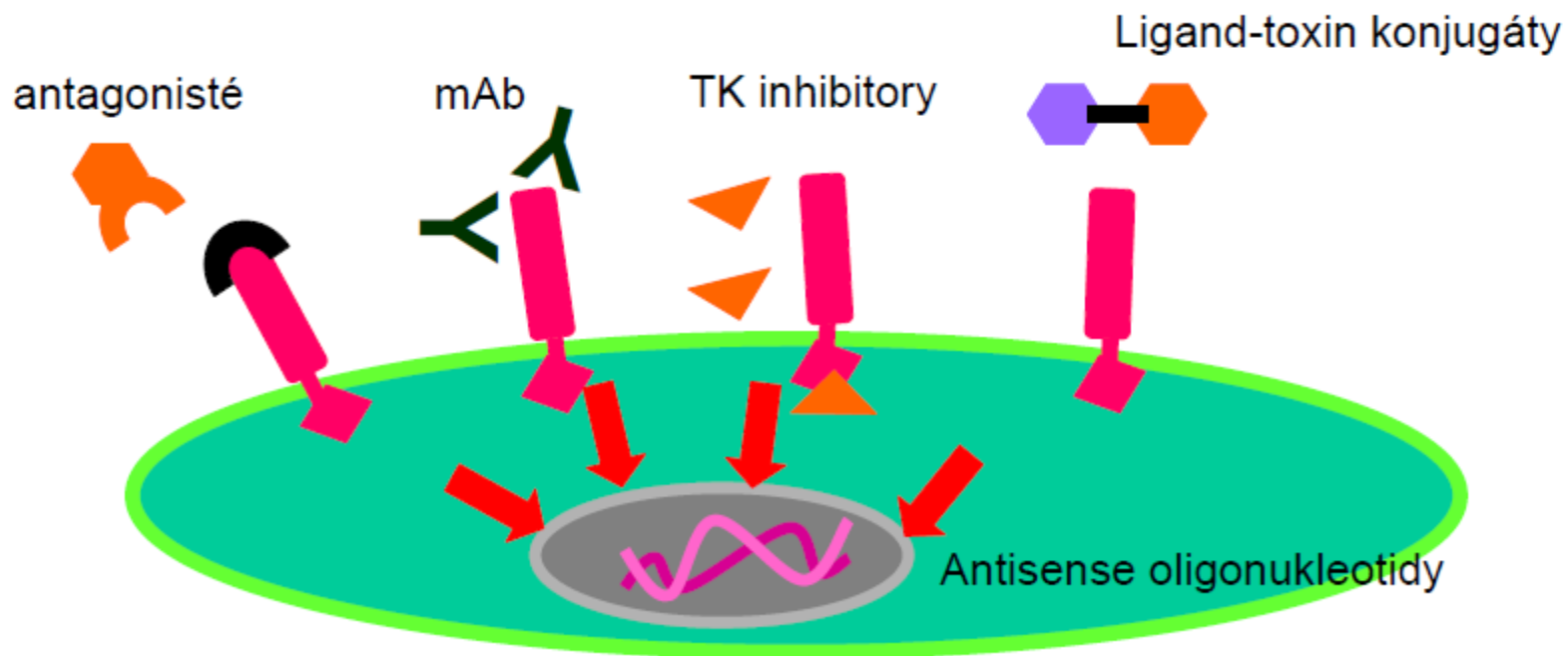


Obr. 11.5.9. Konjugované protilátky. Terapeutická účinnost monoklonálních protilátek může být umocněna konjugací s radionuklidy, chemoterapeutiky, toxiny či enzymy, které lokálně v místě tumoru katalyzují přeměnu netoxického substrátu na toxický produkt.

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



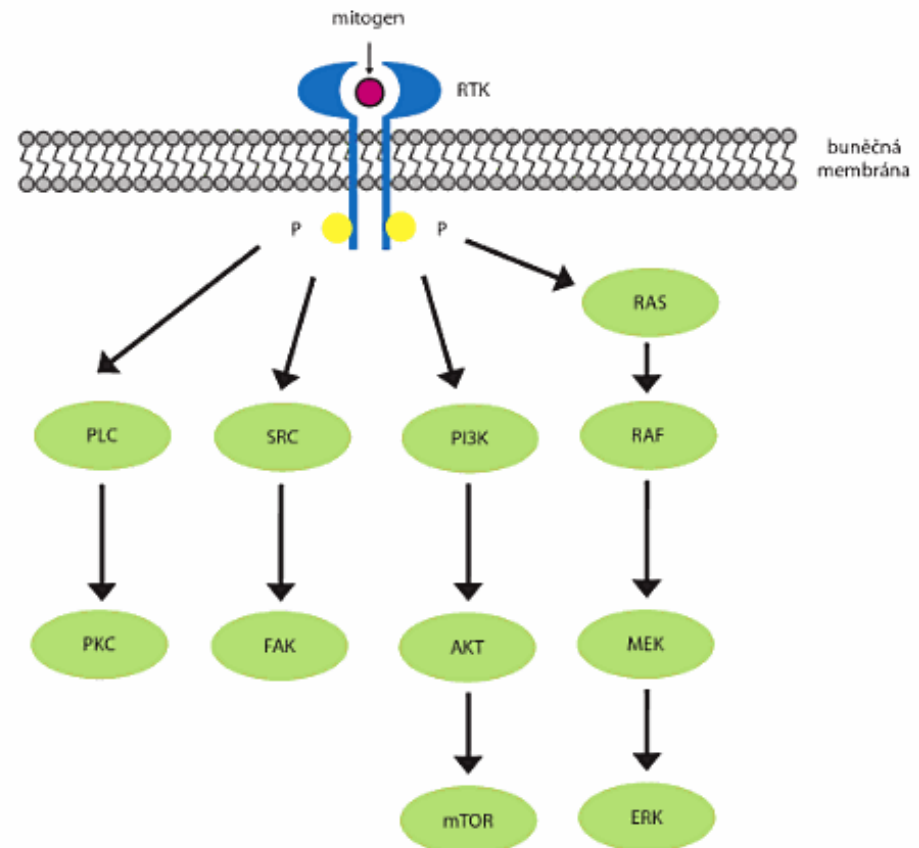
Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

Inhibice receptorových tyrozinkináz (RTK)

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

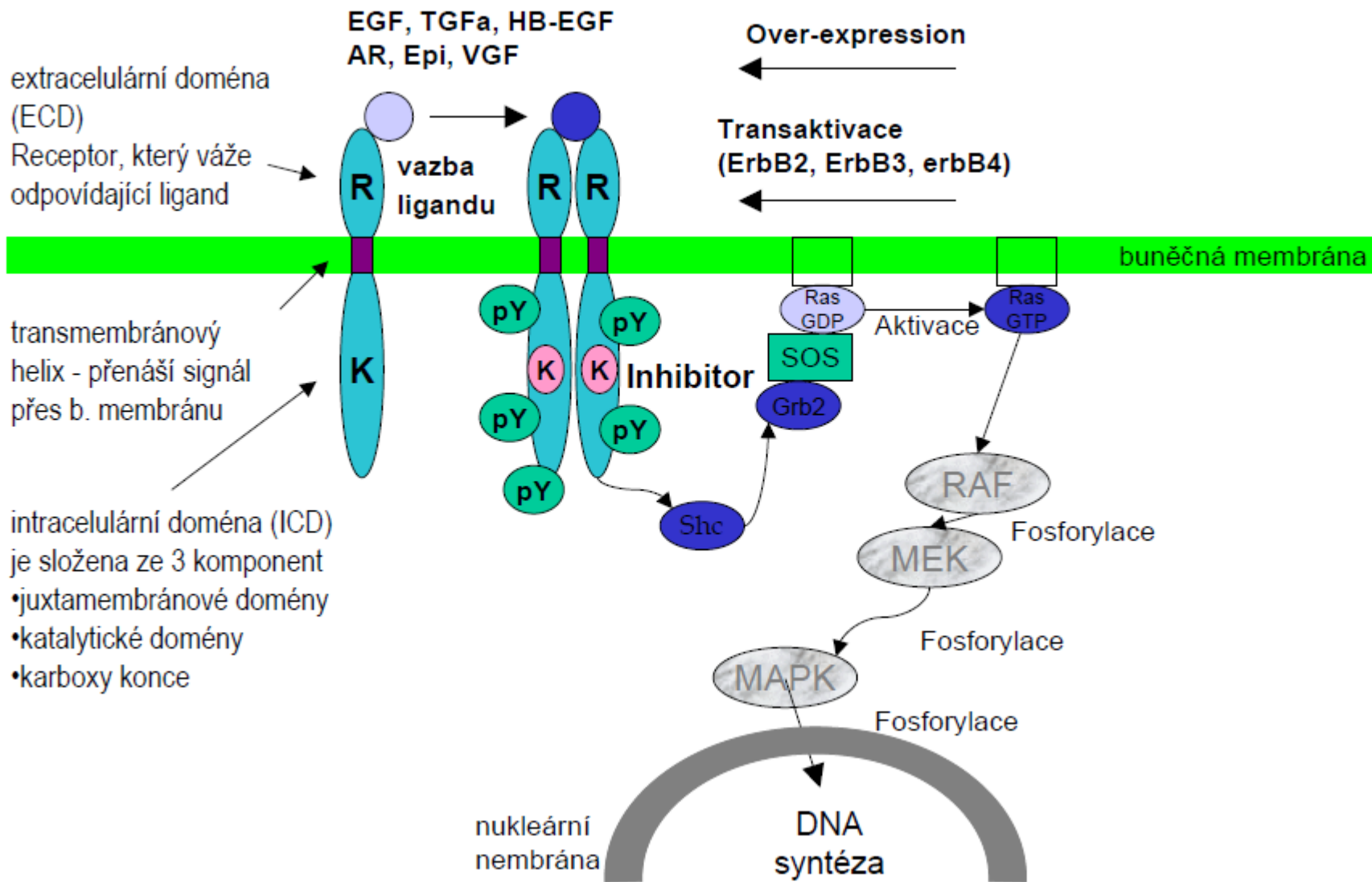
Monoklonální protilátky jsou zacílené na extracelulární receptorovou část RTK.

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



Obr. 38 Signální dráhy aktivované receptorovými tyrozinkinázami (RTK)

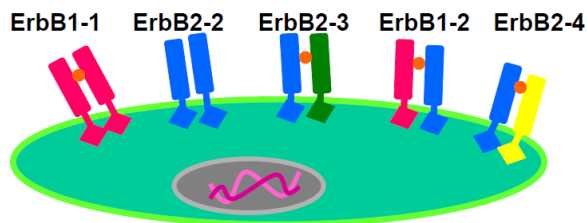
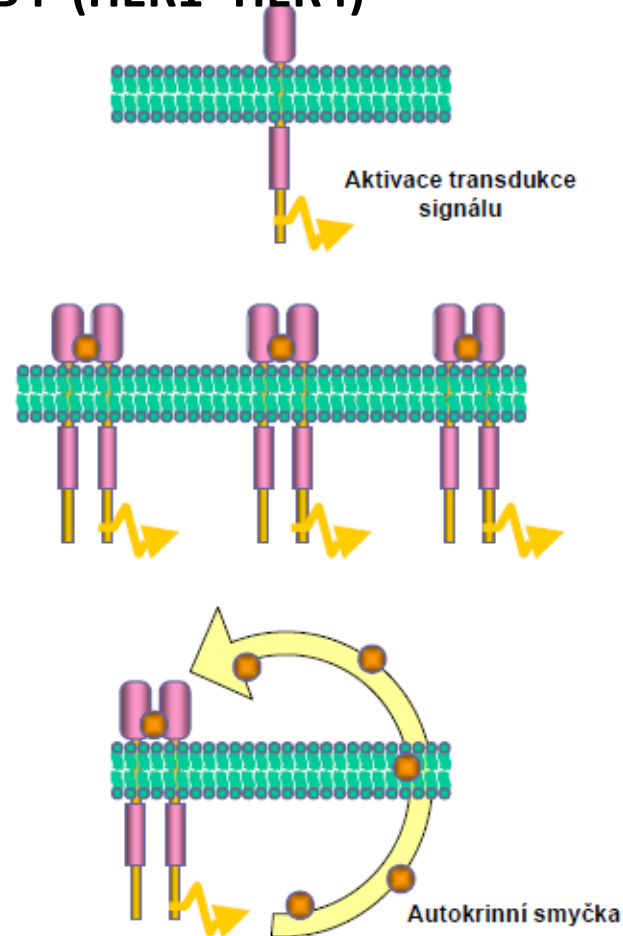
Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace



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



Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

Tab. 7 Přehled vybraných receptorových tyrozinkináz

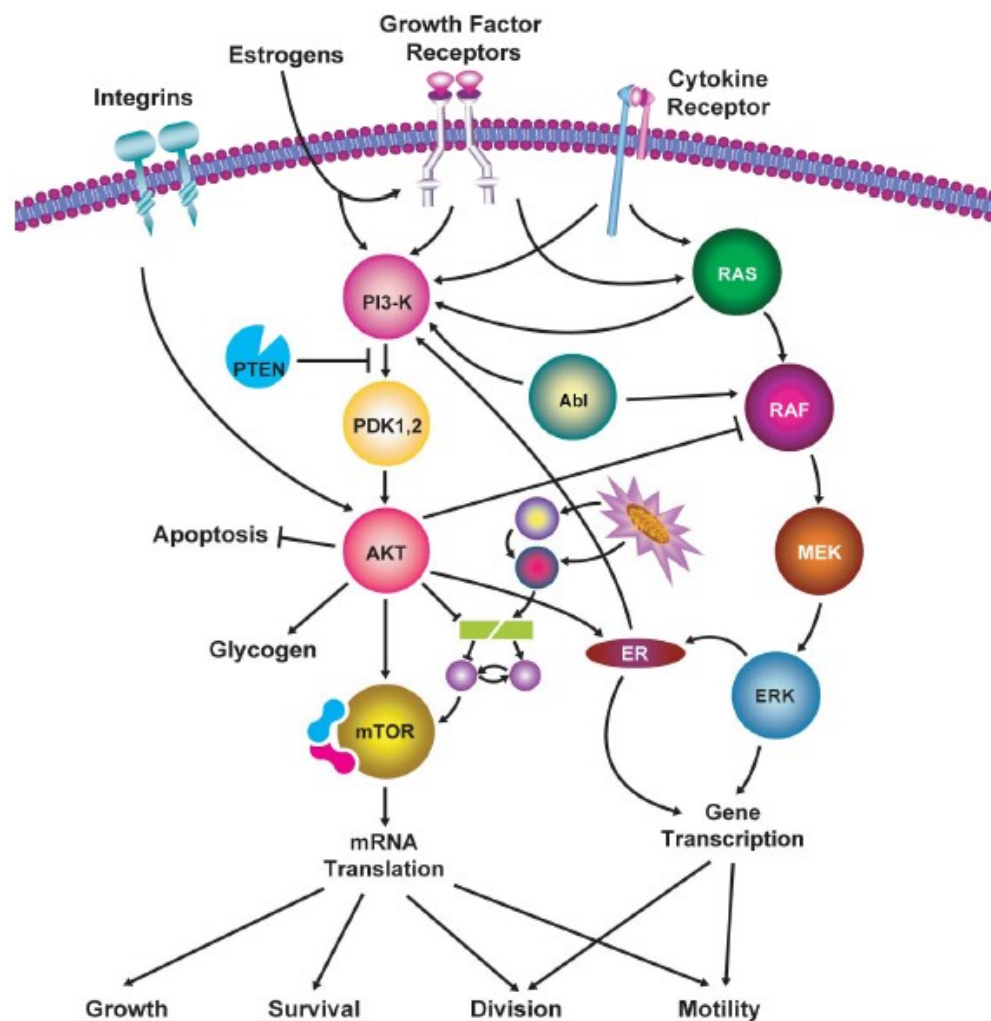
RTK		ligand		malignity s prokázanou deregulací RTK (overexprese, mutace)
EGFR/ ERBB1/ HER1	<i>epidermal growth factor receptor /avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog/human epidermal growth factor receptor</i>	EGF		
ERBB2/ HER2/ NEU	<i>neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog</i>	nev liga		
MET	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>	HGF		
IGF1R	<i>insulin-like growth factor receptor</i>	IGF		
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>	PD		
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>	FGF		
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>	FLT liga		
KIT/SCFR CD117	<i>stem cell factor receptor</i>	SCF MG		
FLT1/ VEGFR1	<i>FMS-like tyrosine kinase/vascular endothelial growth factor receptor</i>	VEG		
KDR/ VEGFR2/ FLK1	<i>kinase insert domain receptor/fetal liver kinase</i>	VEG		
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

Tab. 10.3.4. Frekvence exprese EGFR1 v lidských nádorech.

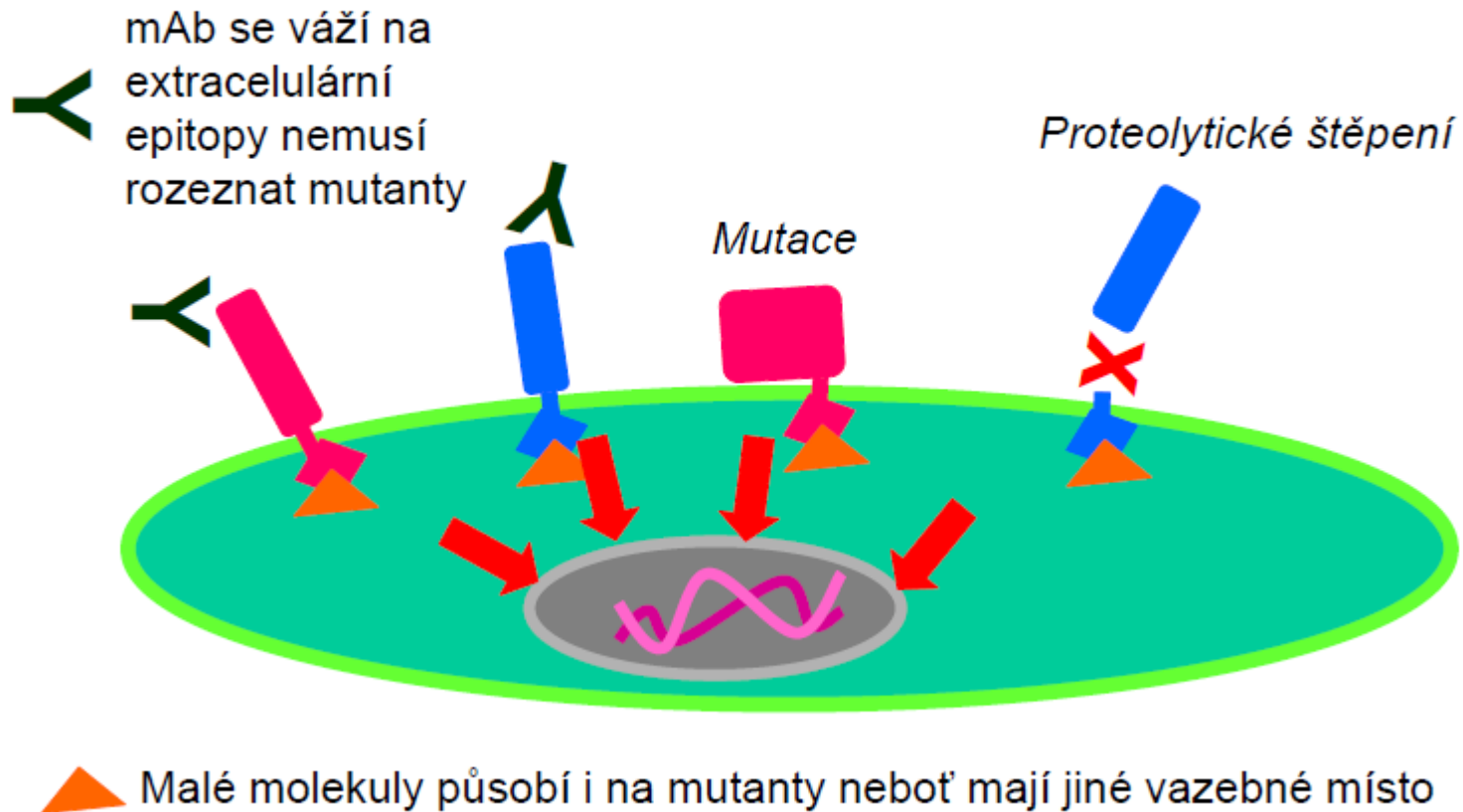
Lokalizace tumoru	% tumorů exprimujících EGFR1
hlava a krk	80–100
prsa	14–91
ledviny	50–90
plíce	40–80
tlusté střevo	25–77
ovarium	35–70
prostata	39–47
gliomy	40–63
pankreas	30–50
močový měchýř	31–48

Klener, 2010

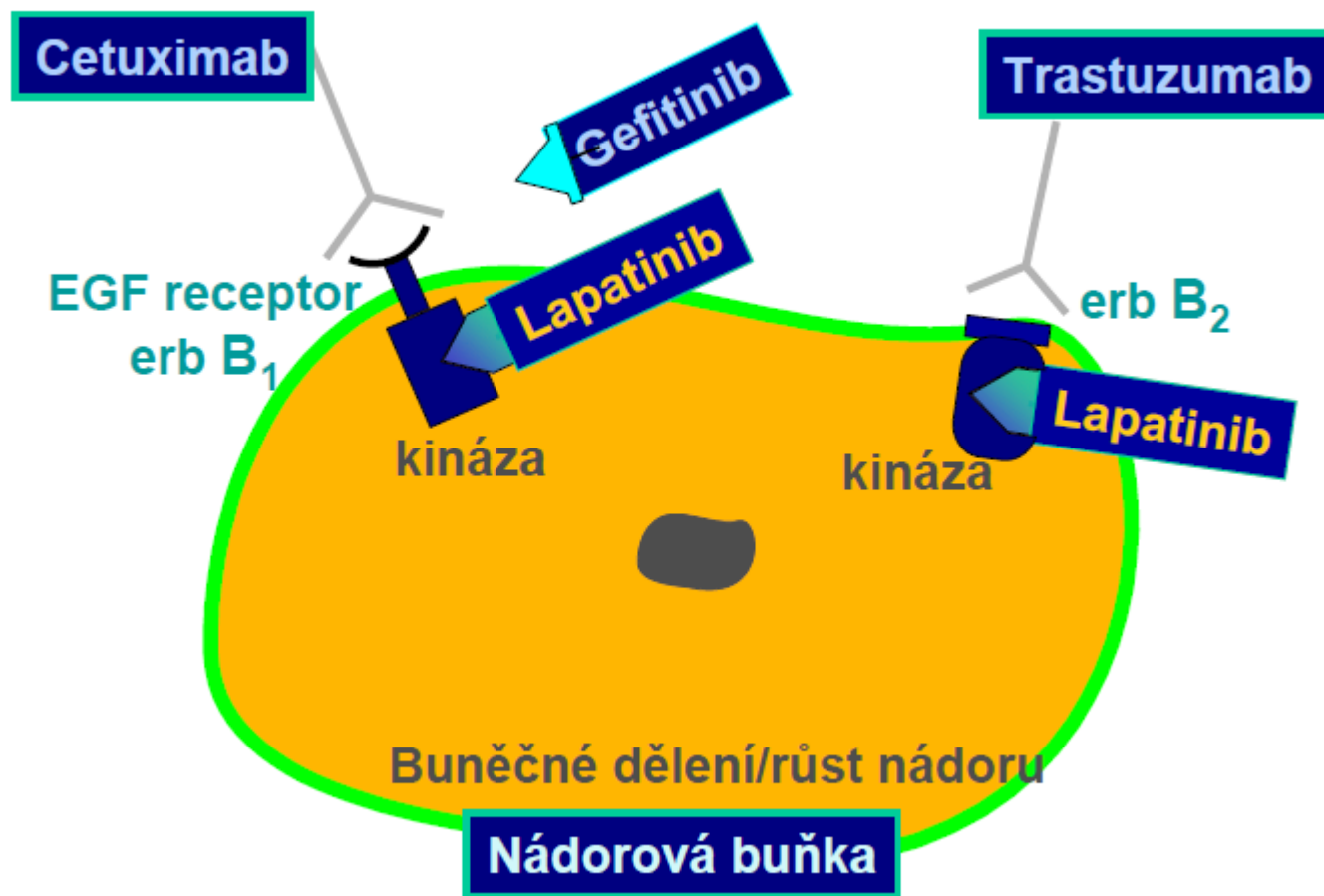
Cross-talk s dalšími onkogenními signálními drahami



Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace



Duální inhibice kináz



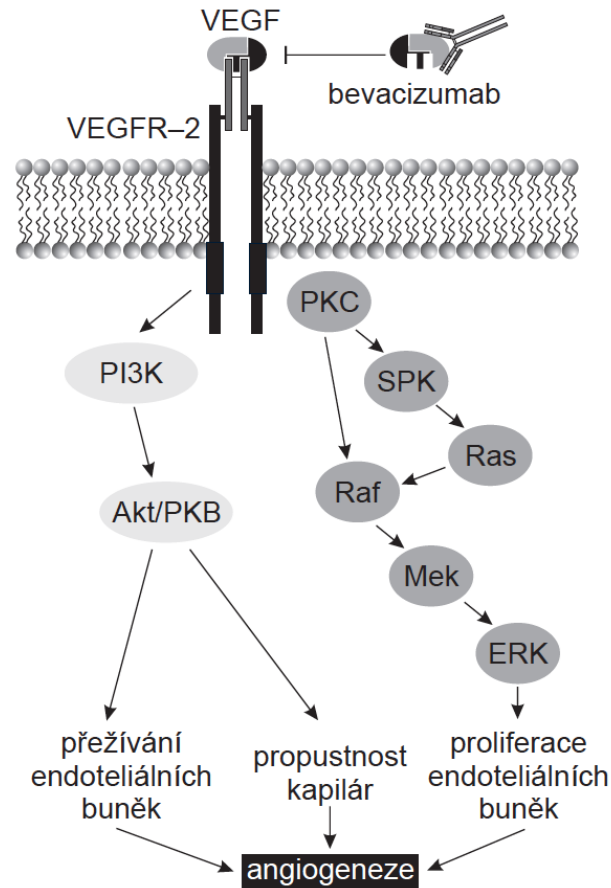
Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice proliferace

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

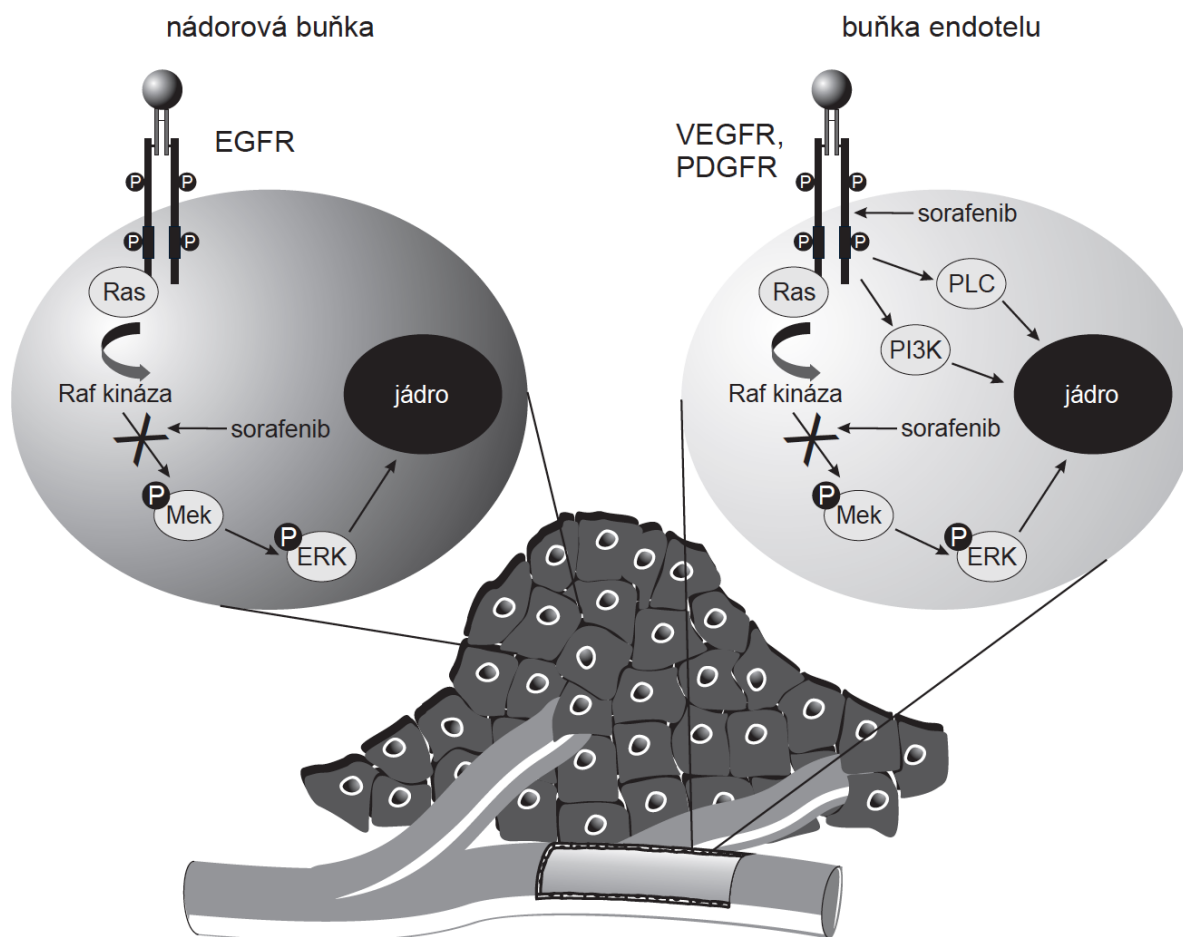
Klener, 2010

Cílená léčba: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice angiogeneze



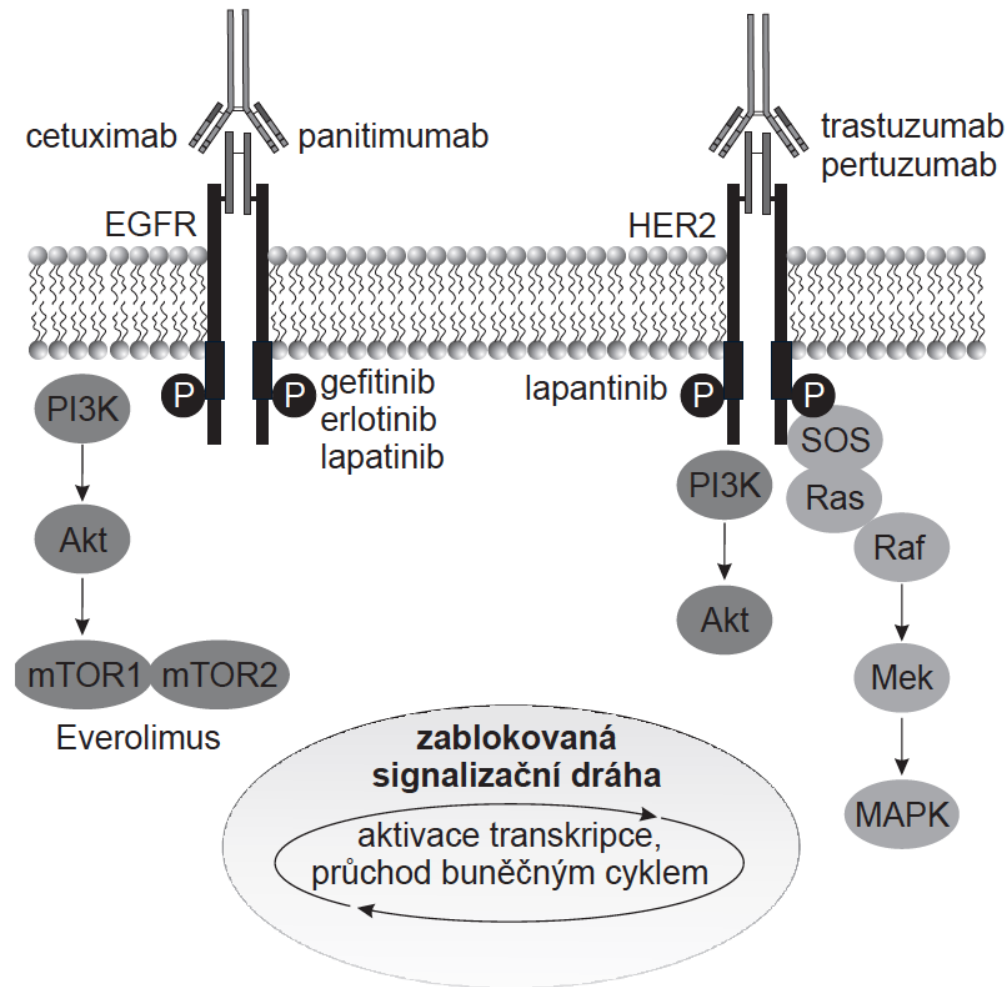
Obr. 11.5.8. Mechanismus účinku monoklonální protilátky bevacizumab. Bevacizumab váže VEGF, čímž zamezuje jeho interakci s příslušným receptorem a komplexně inhibuje neoangiogenezi v nádorové tkáni.

Sorafenib – duální inhibitor RAF kinázy a VEGFR*



Obr. 11.5.13. Mechanismus účinku duálního inhibitoru sorafenibu. Sorafenib specificky inhibuje tyrozinkinázové domény receptorů pro angiogenní faktory (VEGFR, PDGFR, FGFR2) nacházející se na podpůrných endotelových buňkách. Zároveň v rámci signálních drah aktivovaných onkoproteinem Ras blokuje zástupce kinázové rodiny Raf, kteří přenášejí důležité mitogenní signály v nádorových buňkách. Jejich inhibicí je pozastavena proliferace a buňka je nasměrována do apoptózy.

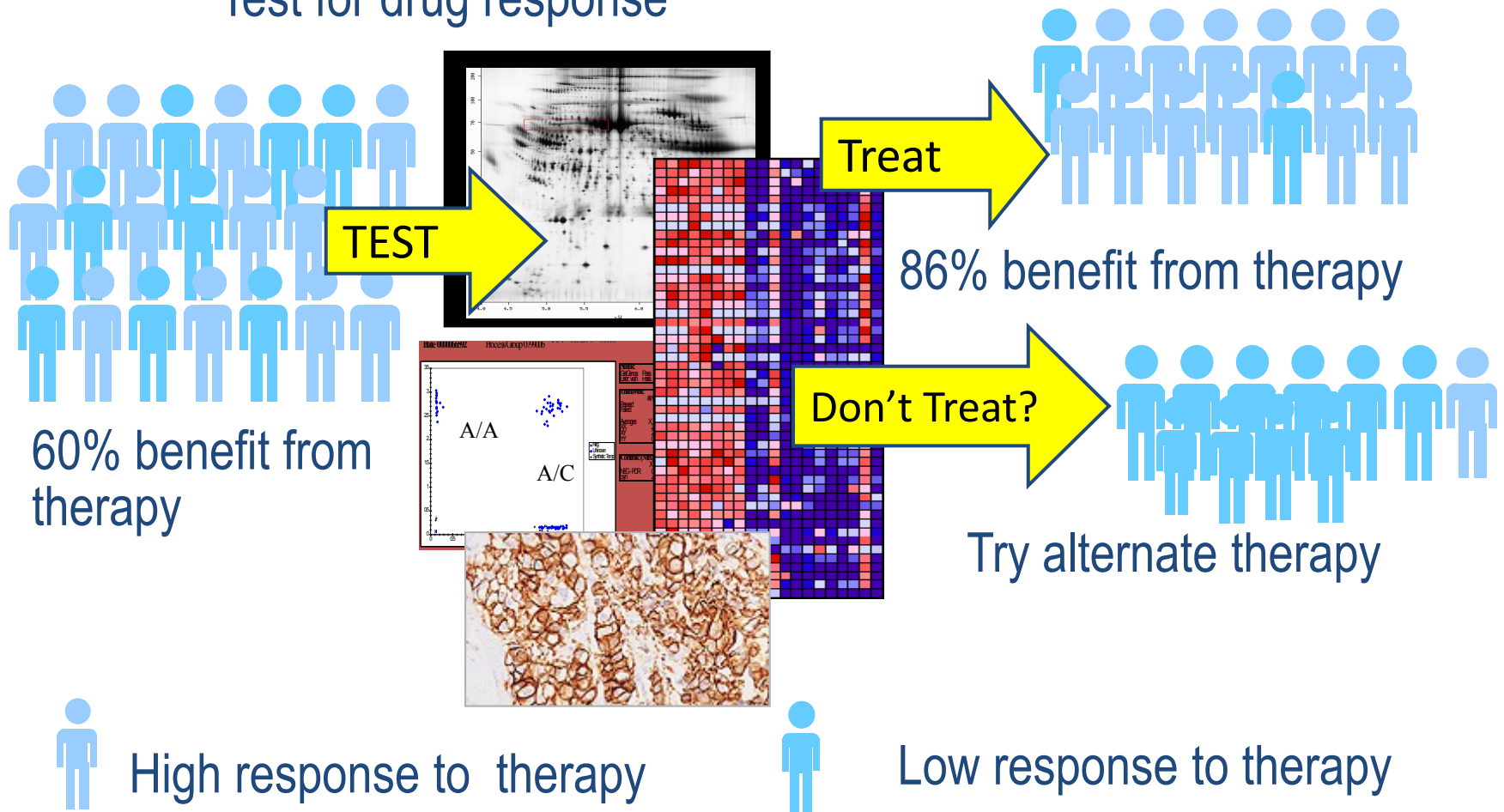
Schematické znázornění strategií cílené léčby



Obr. 11.5.12. Strategie cílené terapie v rámci EGFR a Her2 signální dráhy. Extracelulární doména receptorových tyrozin kináz je inhibována účinkem monoklonálních protilátek. V případě aktivační mutace intracelulární tyrozin kinázové domény receptorů jsou účinné pouze nízkomolekulární inhibitory.

Cílená léčba: prediktivní onkologie: individualizace léčby

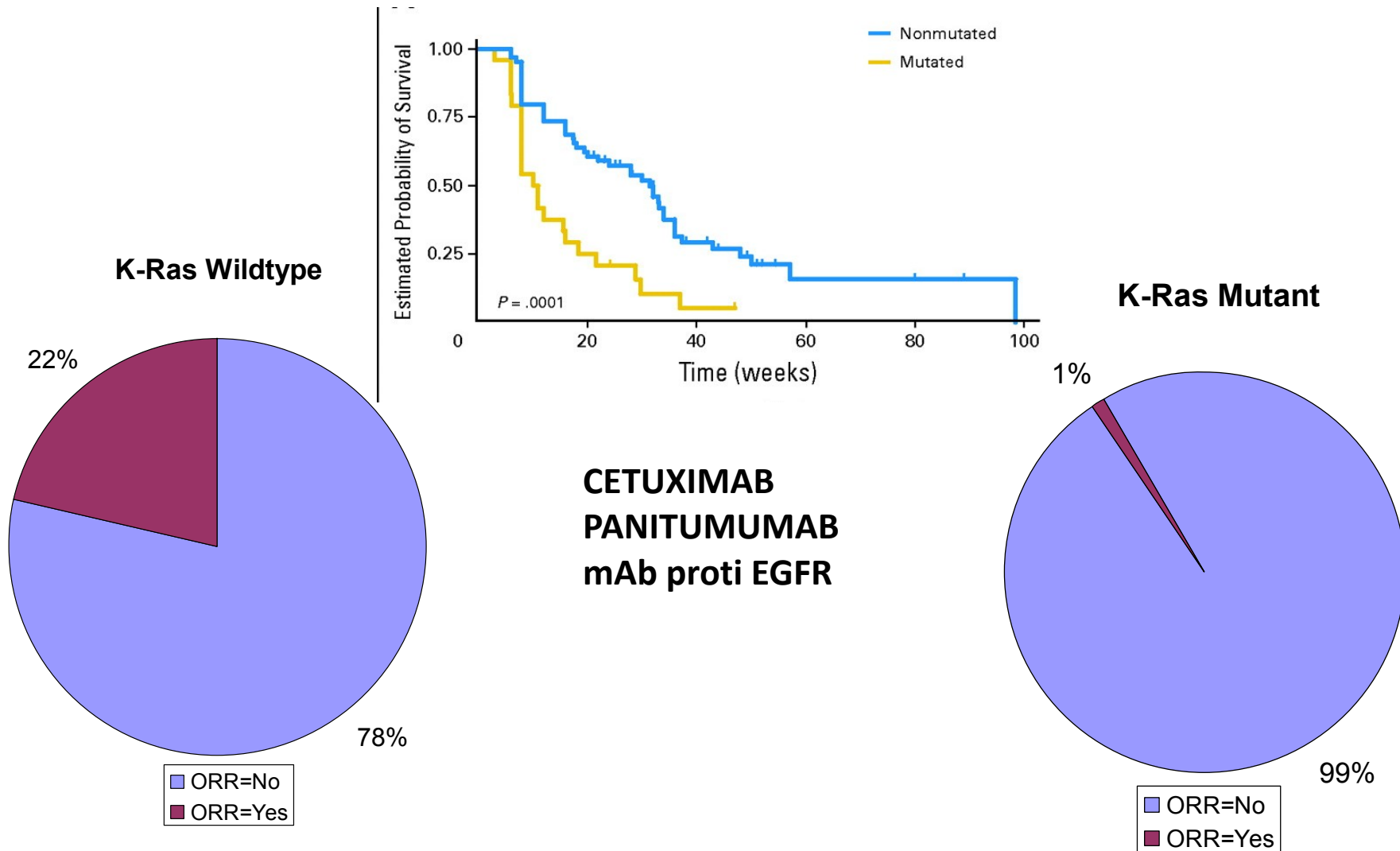
Test for drug response*



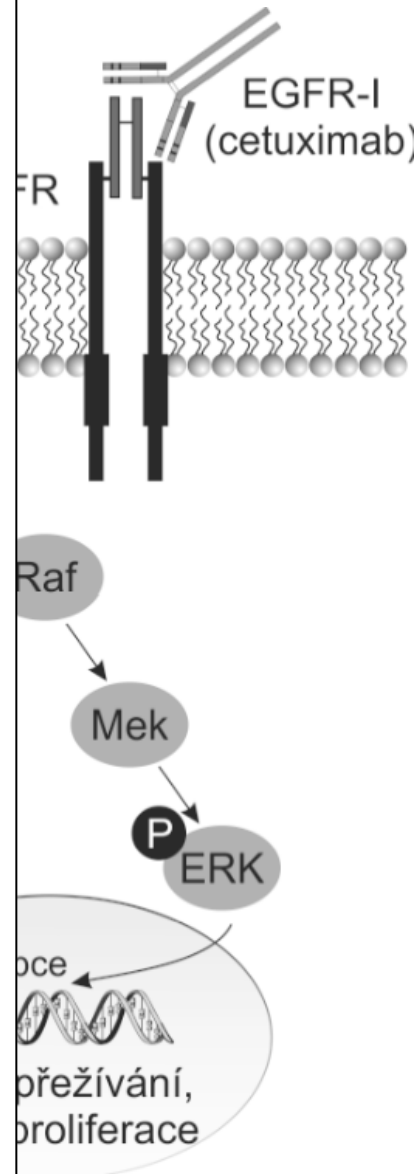
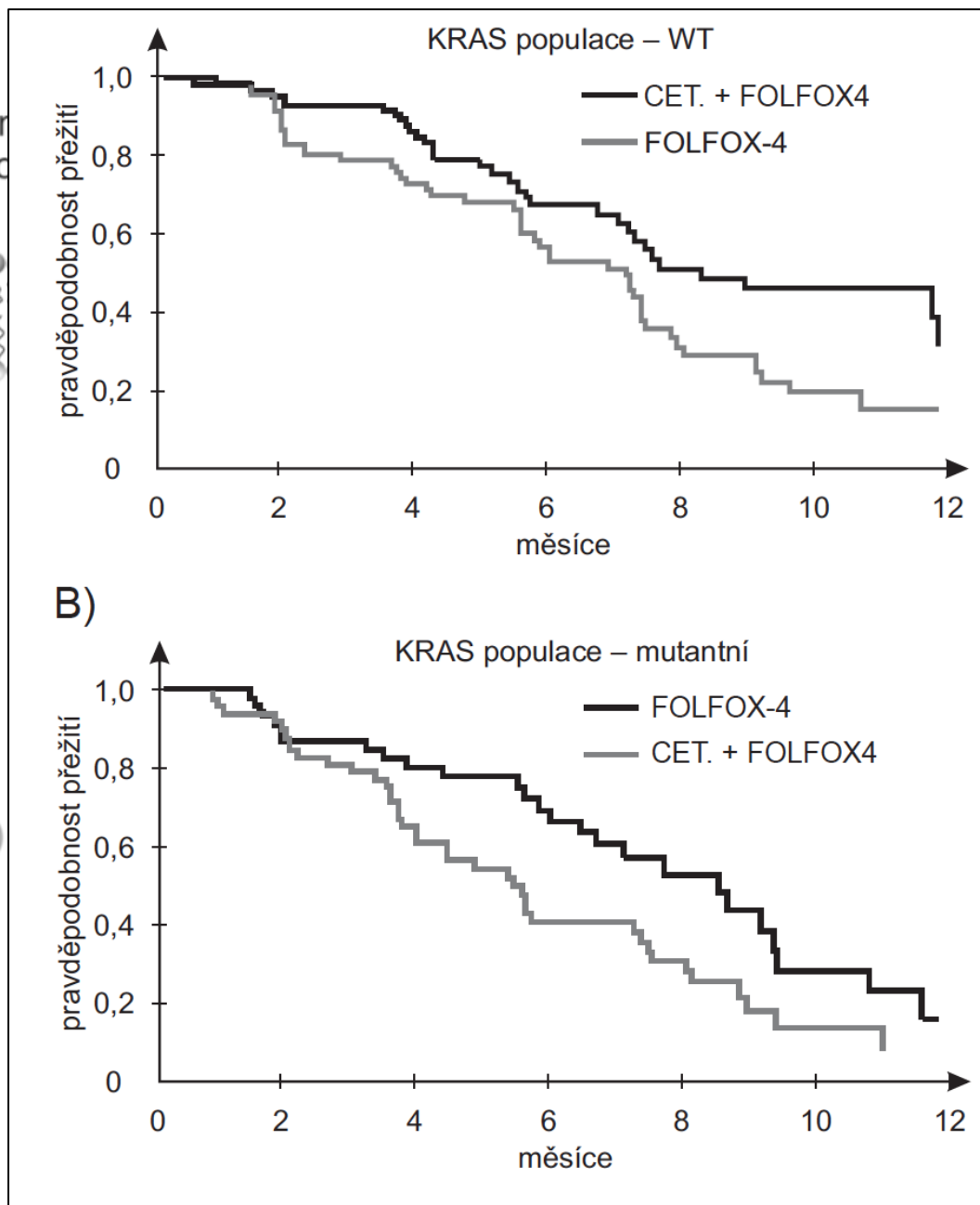
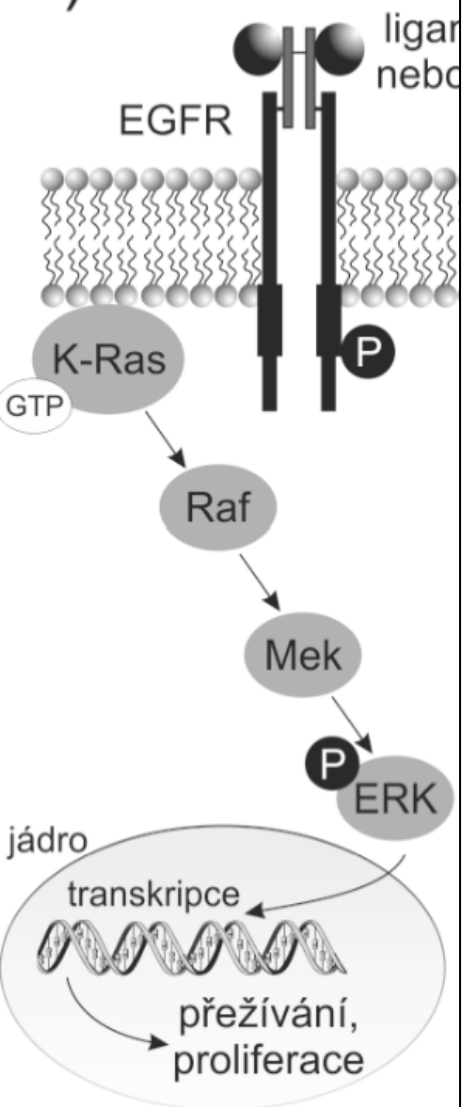
* Specific blood, tissue or imaging marker that can be used to prospectively identify patients for efficacy, safety and/or dose

Cílená léčba: prediktivní onkologie: individualizace léčby

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



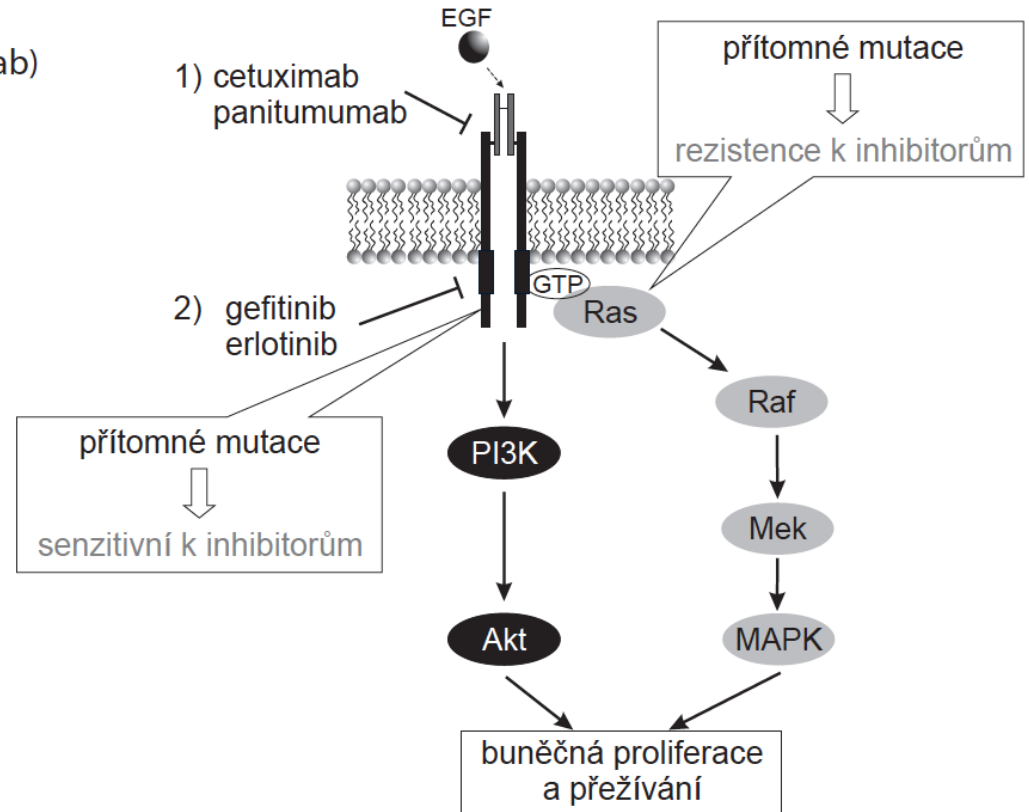
A)



Další příklady prediktivních biomarkerů – companion diagnostics

Obr. 10.3.30. Způsoby terapeutické inhibice EGFR.

- 1) Monoklonální protilátky (cetuximab, panitumumab) používané v terapii kolorektálního karcinomu.
- 2) Nízkomolekulární inhibitory (gefitinib, erlotinib) aplikované u nemalobuněčného karcinomu plic.



Nemalobuněčný karcinom plic a mutace EGFR – erlotinib, gefitinib
Maligní melanom a mutace V600E genu BRAF – vemurafenib
GIST a mutace KIT a PDGFRA – imatinib a sunitinib



**"Here's 1
sequence**

Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice

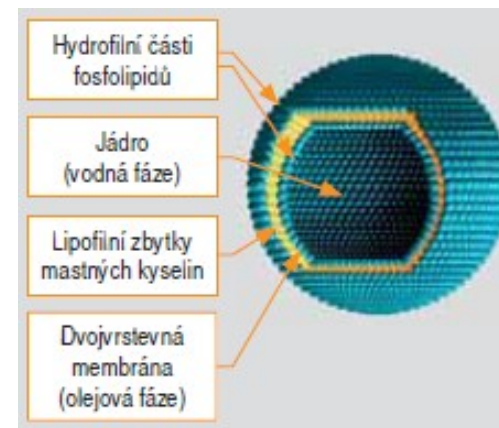
Ideální nano- transportní systém zajistí, že konjugát léčiva a transportního systému doručí léčivo do specifického místa účinku.

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

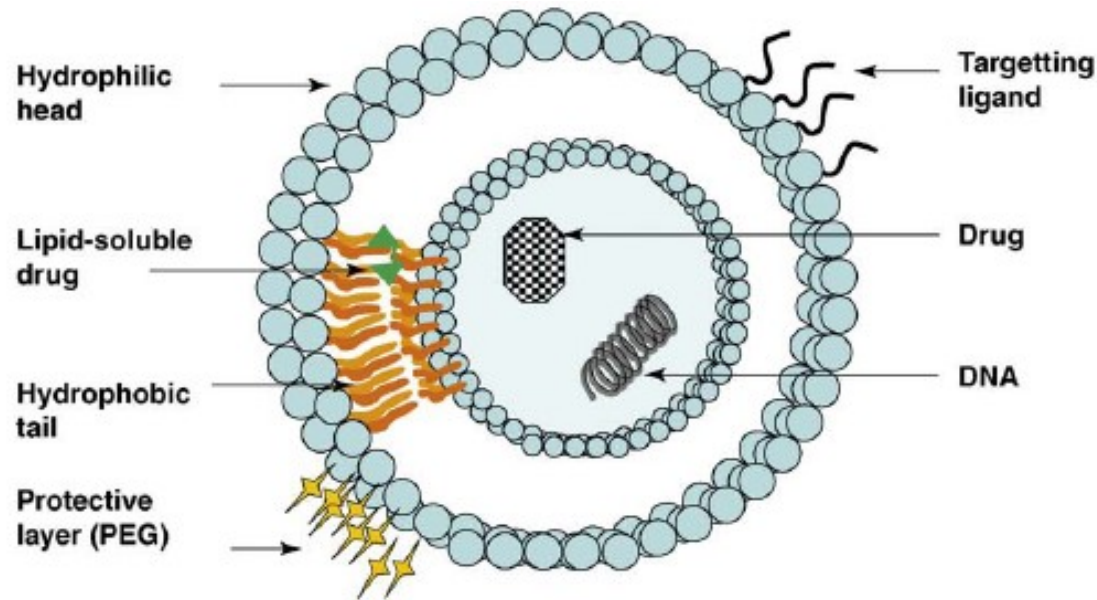
Jejich užití zlepšuje farmakokinetické vlastnosti, kontrolované a prodloužené Uvolňování léčiva a především nižší systémovou toxicitu.

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. 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



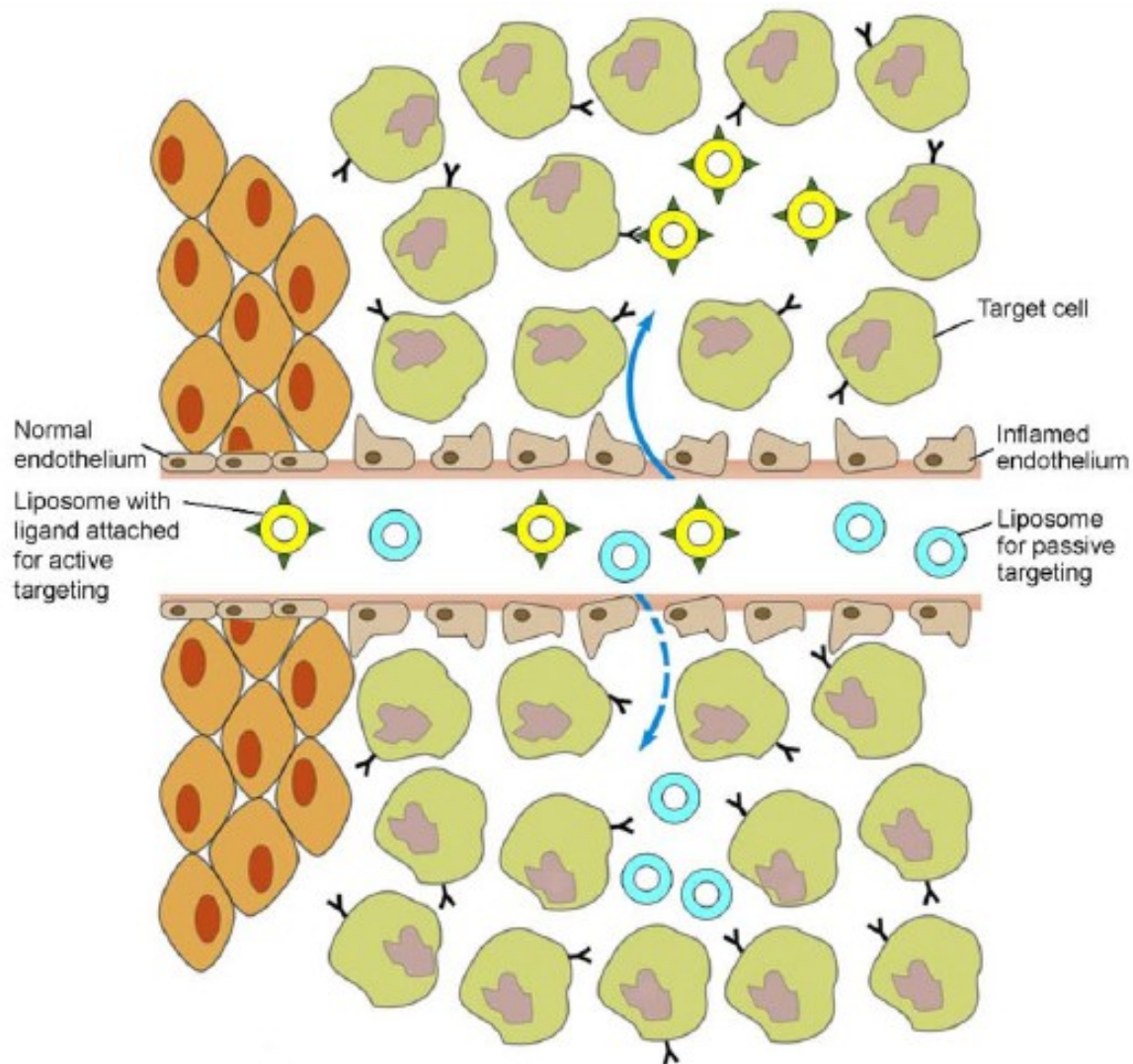
Moderní transportní systémy léčiv: lipozomy a nanočástice



TRENDS in Pharmacological Sciences

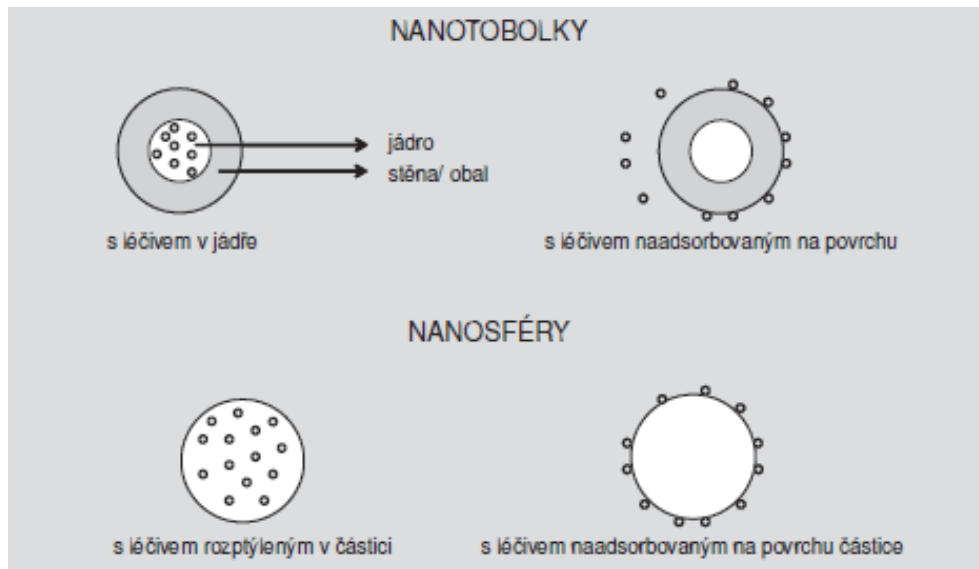
Úpravou povrchu lipozomů, např. **polyethylenglykolem (PEG)**, se **prodloužila jejich cirkulace v krevní plazmě** a částečně se vyřešil problém s jejich vychytáváním jako cizorodých částic retikuloendoteliárním systémem. V praxi se používají léky s obsahem daunorubicinu a doxorubicinu jako parenteralia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

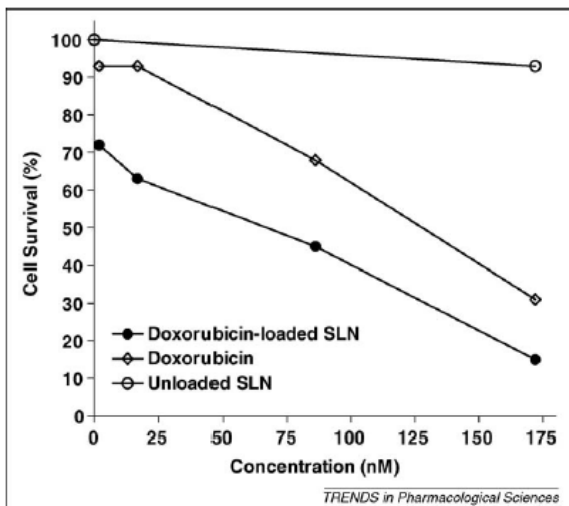


Figure 3. Benefits of SLNs in doxorubicin delivery. The cytotoxicity of free doxorubicin, doxorubicin-loaded SLNs and unloaded SLNs at different concentrations towards HT-29 colorectal cancer cells after 72-h exposure is shown. Doxorubicin-loaded SLNs showed the highest toxicity, offering more potent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

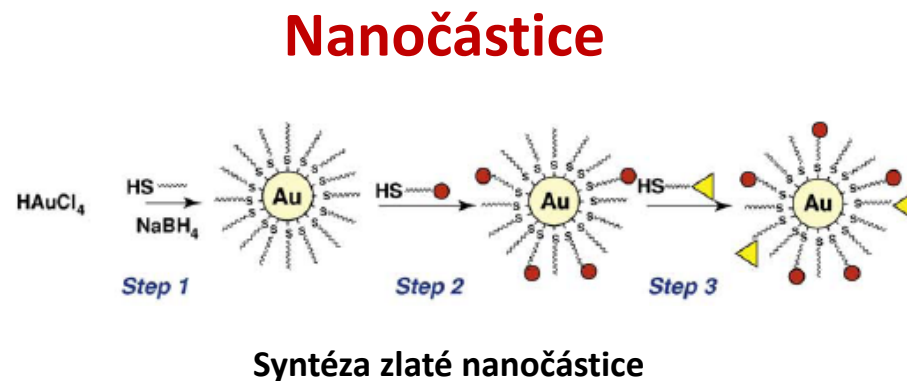


Table 2. Representative examples of studies using drug-carrying nanoparticles^a

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

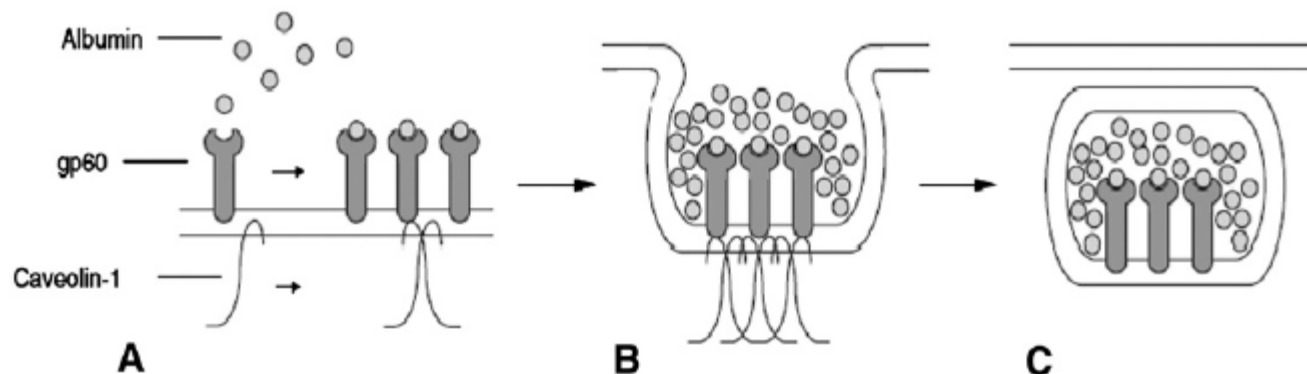


Fig. 1. Albumin receptor-mediated uptake of intravascular constituents and transcytosis across the vascular endothelium. A) Albumin receptor (gp60) binds albumin which in turn results in binding the induction of caveolin-1; B) caveolin-1 induces membrane budding and internalization, trapping free and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

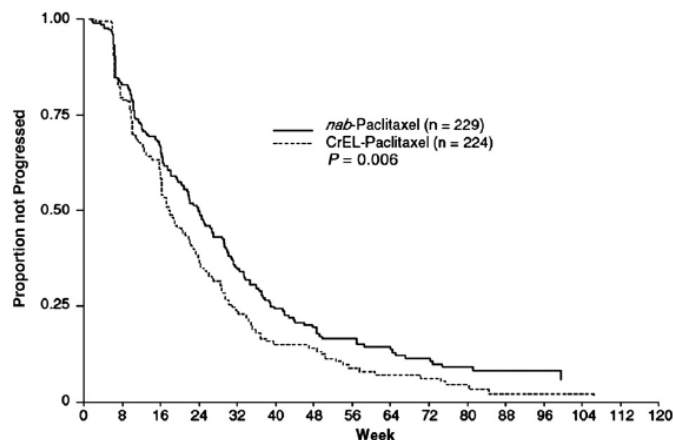


Fig. 5. Time to disease progression in a phase III trial of nab-paclitaxel versus CrEL-paclitaxel.

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.

IMUNOTERAPIE

Imunoterapie představuje takový způsob léčby, kdy k navození léčebného účinku využíváme buňky nebo molekuly imunitního systému.

Mezi imunoterapii můžeme řadit také léčebnou vakcinaci, která navozuje specifickou imunitní odpověď vůči onemocnění, které propuklo již před začátkem vakcinace.

Naopak preventivní vakcinaci, kdy očkování provádíme před propuknutím onemocnění, mezi imunoterapii neřadíme.

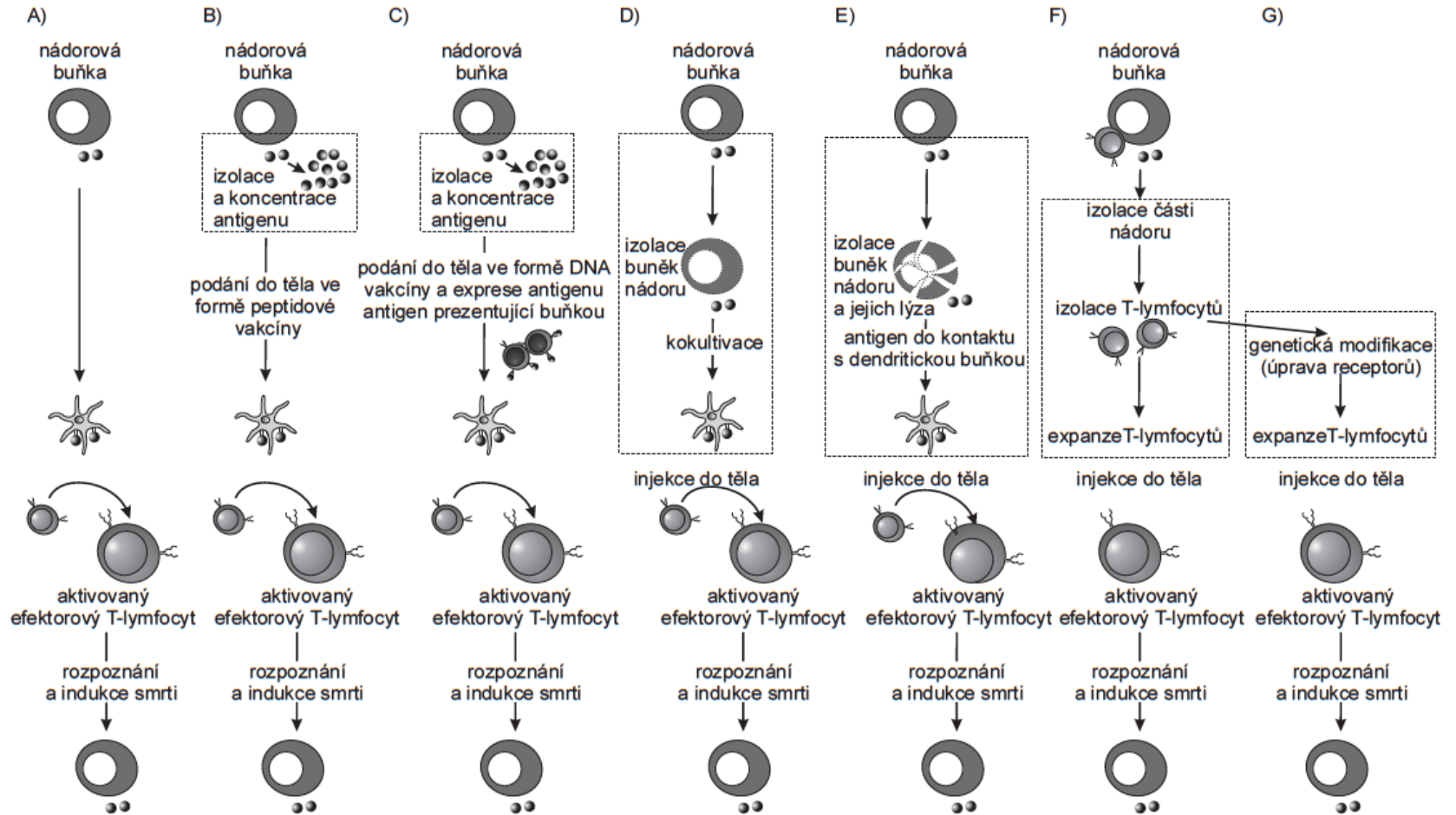
Pasivní imunoterapie

Pasivní imunoterapie znamená podání již hotových složek imunitního systému, které jsou schopny plnit svou funkci bez jejich další aktivace. Mezi pasivní imunoterapeutické postupy řadíme např. podání směsného koncentrátu imunoglobulinů získaných z krevní plazmy zdravých dárců krve.

Aktivní imunoterapie

Aktivní imunoterapie znamená, že podáním látek nebo buněk dojde nejprve k aktivaci imunitního systému, která následně zabezpečí léčebný efekt. Vlastní podané látky nebo buňky přitom zpravidla nemají přímý léčebný efekt. Ten je dosahován teprve specifickou nebo nespecifickou aktivací imunitního systému.

IMUNOTERAPIE - přehled



Tab. 11.7.1. Přehled důležitých antigenních struktur, které byly cílem aplikace terapeutických peptidových vakcín ve významných klinických studiích nádorových a infekčních onemocnění v posledních deseti letech. PAP – prostatic acid phosphatase, HbsAG – hepatitis B virus infection.

Cílový antigen (název vakcíny)	Onemocnění	Studie	Počet pacientů	Fáze klinického testování	Začátek studie
HER2	karcinom prsu	NCT01152398	20	I	2010
HER2	karcinom prsu	Benavides (2011)*	182	II	2007
PAP (Sipuleucel-T®)	karcinom prostaty	NCT01306890	512	III	2011
CTP37-DT	metastazující karcinom tlustého střeva	Moulton (2002)**	144	II	2002
HSPPC-96 (vitespen)	renální karcinom	Jonasch (2008)***	728	III	1999
MUC1	karcinom pankreatu	NCT00008099	20	I	1998
Bcr-Abl	chronická myeloidní leukemie	Cathcart (2004)****	14	II	2001
gp100	melanom	Schwartzentruber (2009) [§]	185	III	1999
MUC1	pokročilý kolorektální adenom	NCT00773097	46	II	2008
MUC1	nemalobuněčný plicní karcinom	NCT00409188 (studie SART)	1514	III	2006
MART-1	melanom	NCT00303836	58	II	2005
Ras	karcinom pankreatu, tlustého střeva a nemalobuněčný plicní karcinom	NCT00019006	33	I	1995
HSsAG	hepatitida B	NCT00277576	48	I	2006
gp120 (REMUNE®)	AIDS	NCT00005758	472	III	2005

Kódy studií dle www.clinicaltrials.gov.

Odkazy:

* Mittendorf EA1, Clifton GT, Holmes JP et al. Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* 2011; 118: 2594–2602.

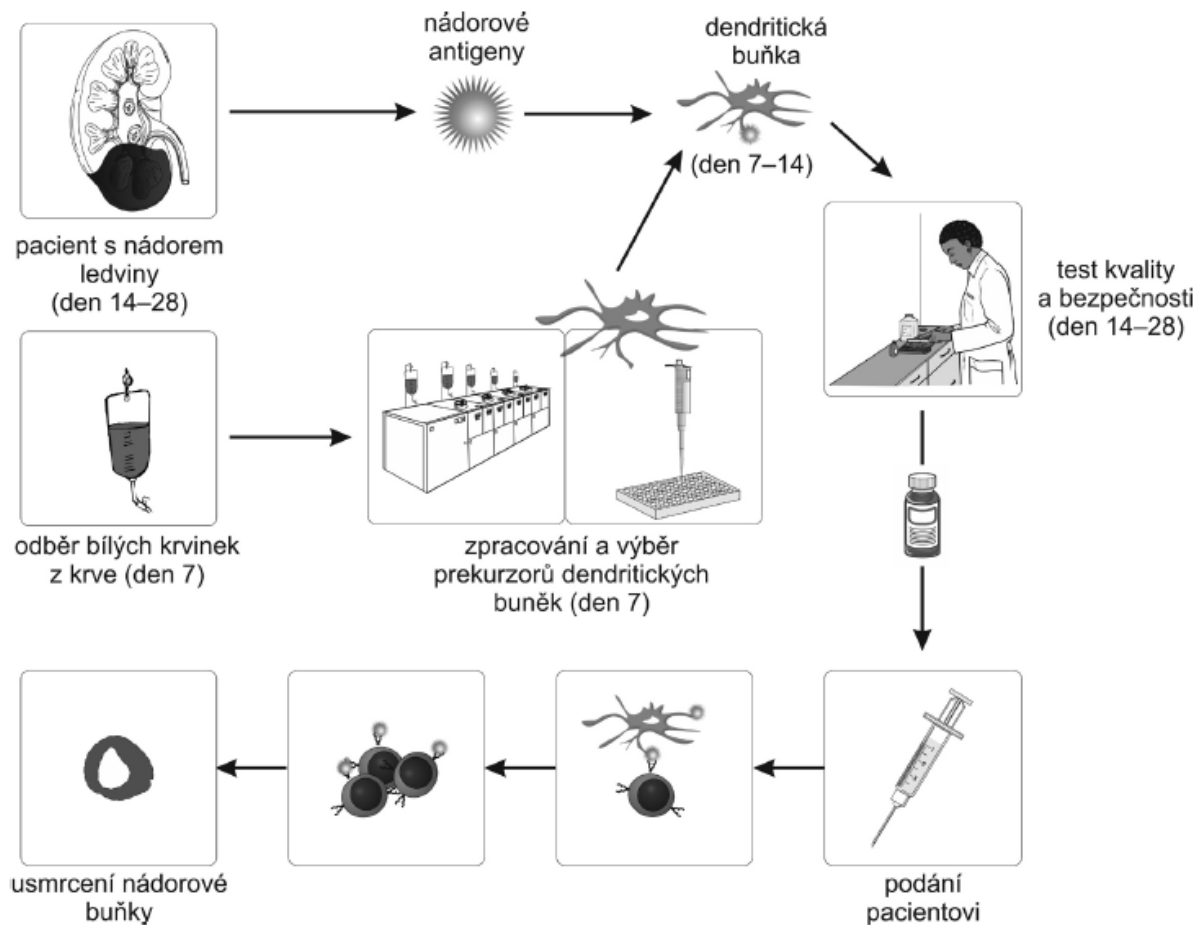
** Moulton HM, Yoshihara PH, Mason DH. Active specific immunotherapy with a beta-human chorionic gonadotropin peptide vaccine in patients with metastatic colorectal cancer: antibody response is associated with improved survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7): 2044–2051.

*** Jonasch E, Wood C, Tamboli P. Vaccination of metastatic renal cell carcinoma patients with autologous tumour-derived vitespen vaccine: clinical findings. *Br J Cancer* 2008; 98(8): 1336–1341.

**** Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103(3): 1037–1042.

[§] Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(22): 2119–2127.

IMUNOTERAPIE – Dendritické buňky



Obr. 11.7.2. Schéma přípravy protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk.

IMUNOTERAPIE – Dendritické buňky

Kazuistika: 21letá dívka diagnostikovaná s alveolárním rhabdomyosarkomem levého předloktí s postižením axilárních (podpažních) lymfatických uzlin. Molekulárně biologicky zjištěna mutace v genu PAX3/FKHR, který je spojen s extrémně nepříznivou prognózou a mediánem přežití 12–14 měsíců.

Sled událostí v měsících od stanovení diagnózy (měsíc 0):

měsíc 0–6 – standardní chemoterapie (2. linie)

měsíc 12 – lokální recidiva

měsíc 12–17 – chemoterapie 3. linie – bez klinické odpovědi

měsíc 18 – operace a zahájení přípravy vakcíny z DC a autologního nádorového lyzátu

měsíc 19 – lokální radioterapie

měsíc 20–23 – podávání DC vakcíny společně s metronomickou chemoterapií

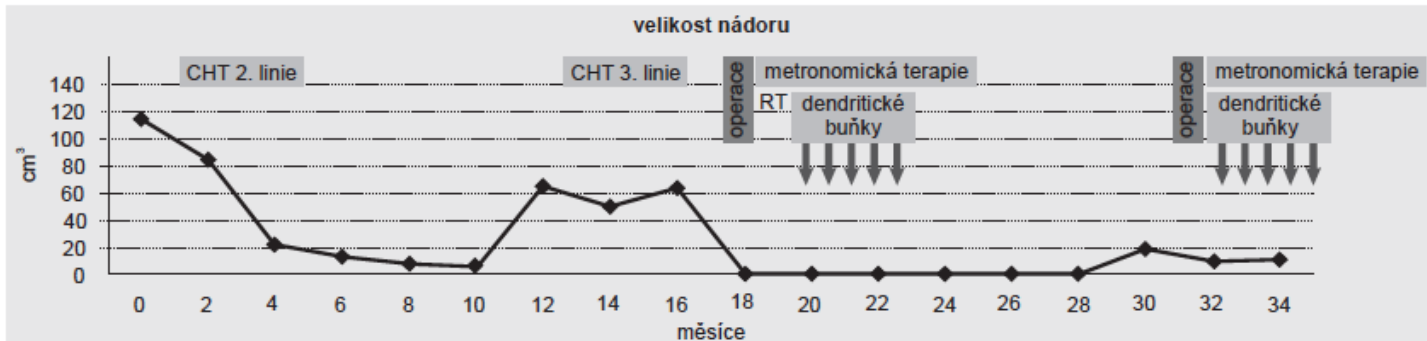
(metronomická = nízkodávkovaná s cílem potlačení nežádoucích regulačních T-lymfocytů)

měsíc 30 – recidiva lokálně a v kostní dřeni

měsíc 31 – operace a příprava DC vakcíny

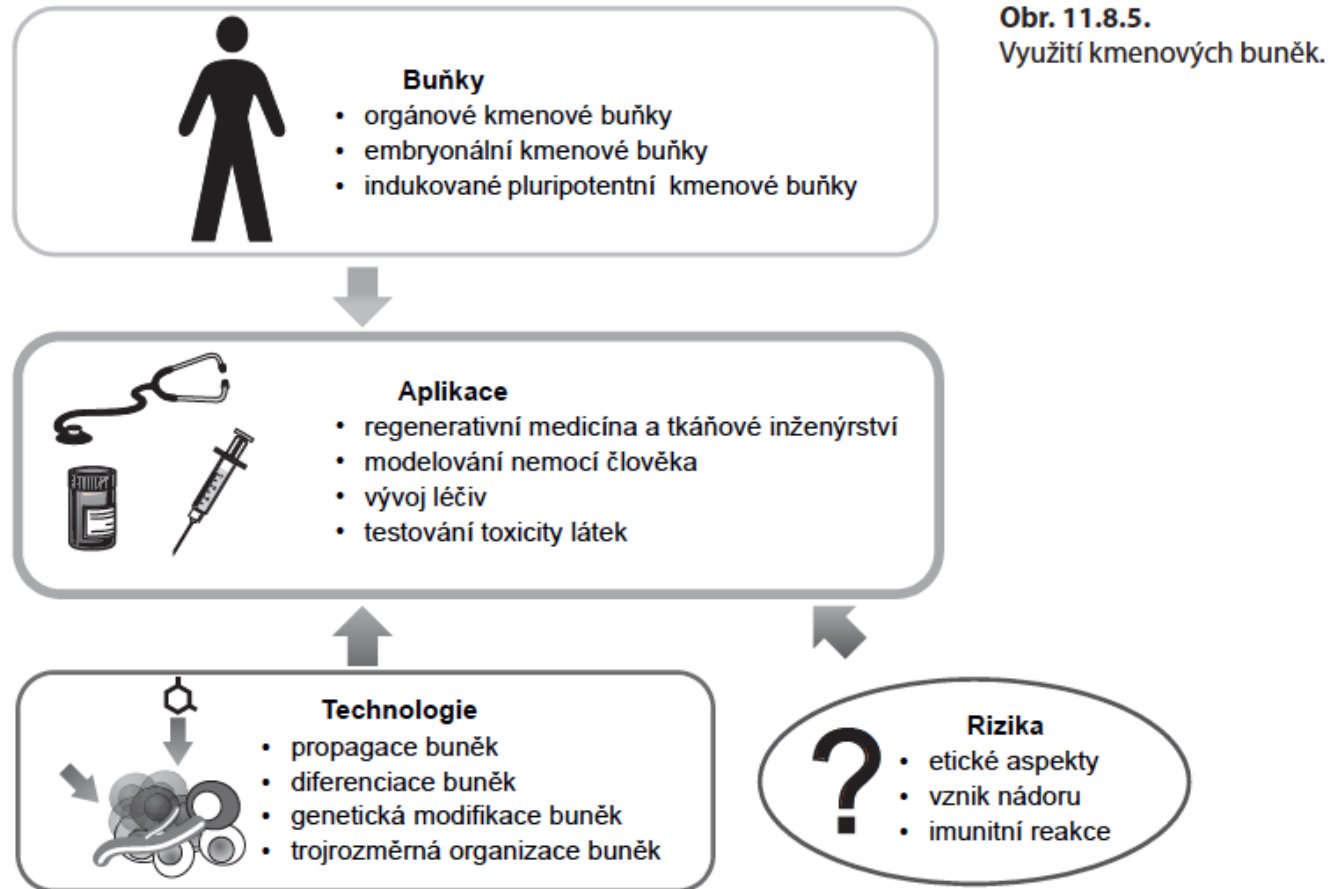
měsíc 32–34 – podávání DC vakcíny společně s metronomickou chemoterapií

měsíc 38 – pacientka žije plnohodnotný život ve stabilizované chorobě



Obr. 11.7.3. Kazuistika pacientky s rhabdomyosarkomem léčené dendritickými buňkami.

Terapeutické využití kmenových buněk



Obr. 11.8.5.
Využití kmenových buněk.

Genová terapie

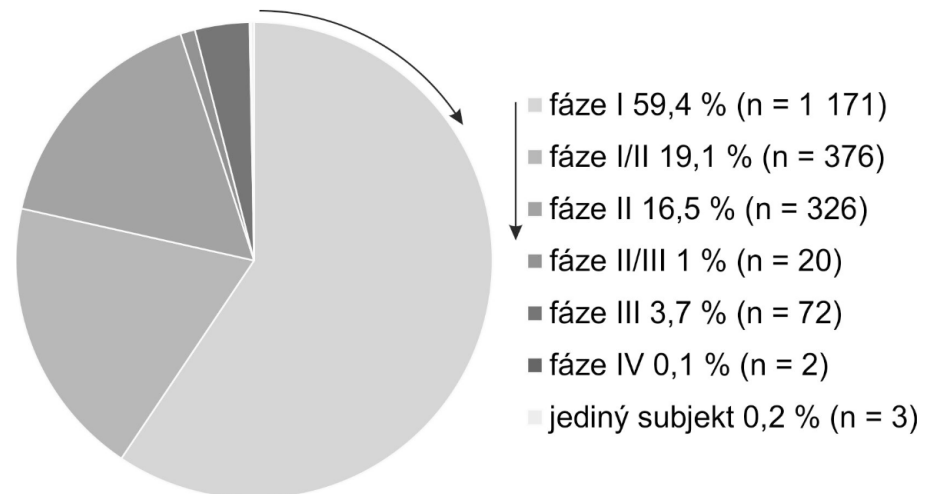
- většina chorob člověka je způsobena genetickou predispozicí spojenou s environmentálními vlivy. (*nature and nurture*)
- terapie zpravidla pouze modifikuje symptomy nemoci, či dává tělu možnost se uzdravit samo
- genová terapie: efektivní a kauzální léčba by změnila samotnou genetickou podstatu nemoci, 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

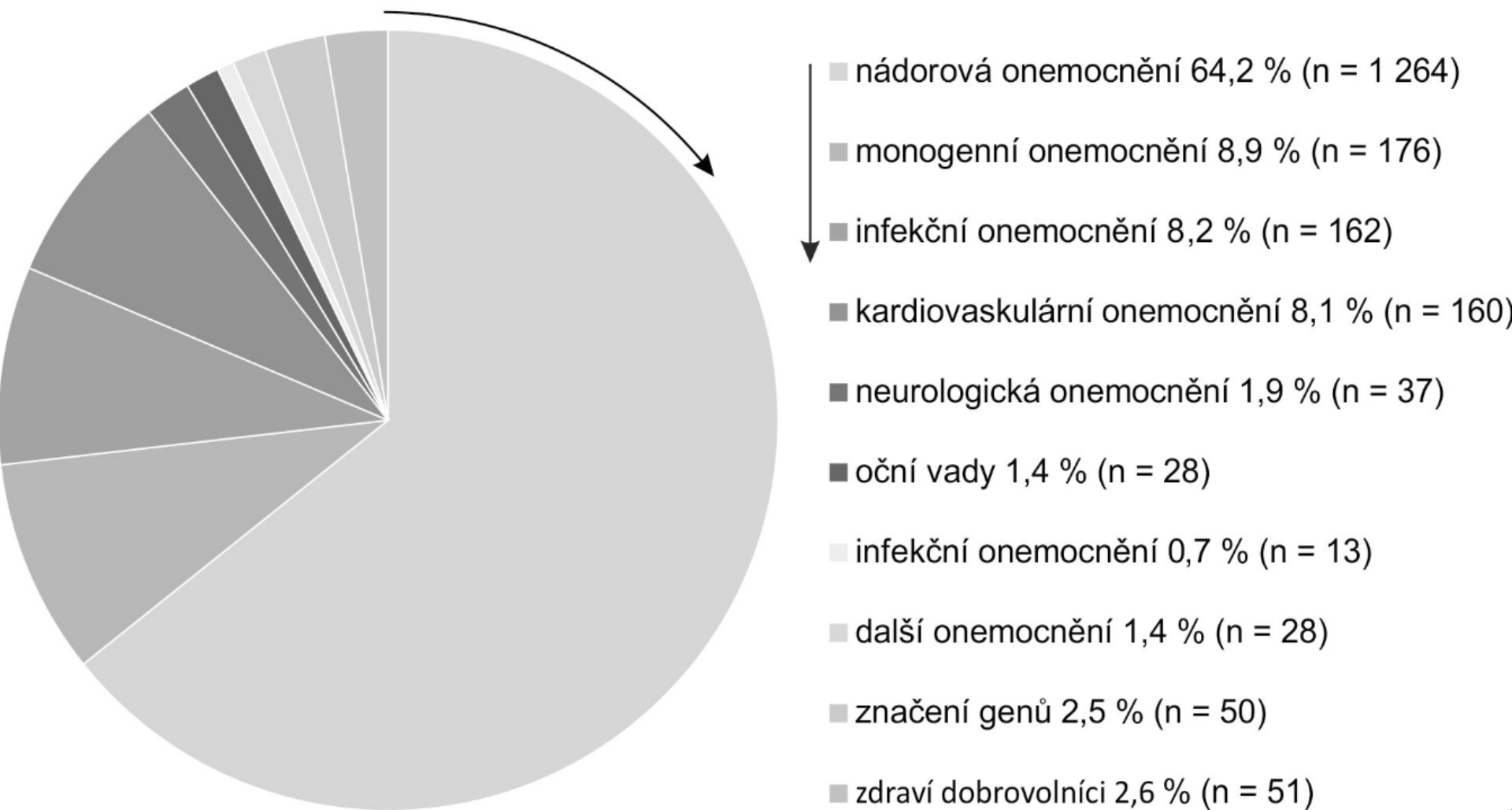
(= změna genetické informace pouze u somatických buněk)

Germ-line gene therapy

Fáze klinického testování genové terapie



Onemocnění léčená genovou terapií v rámci klinického testování



metody doručení genu do tkáně

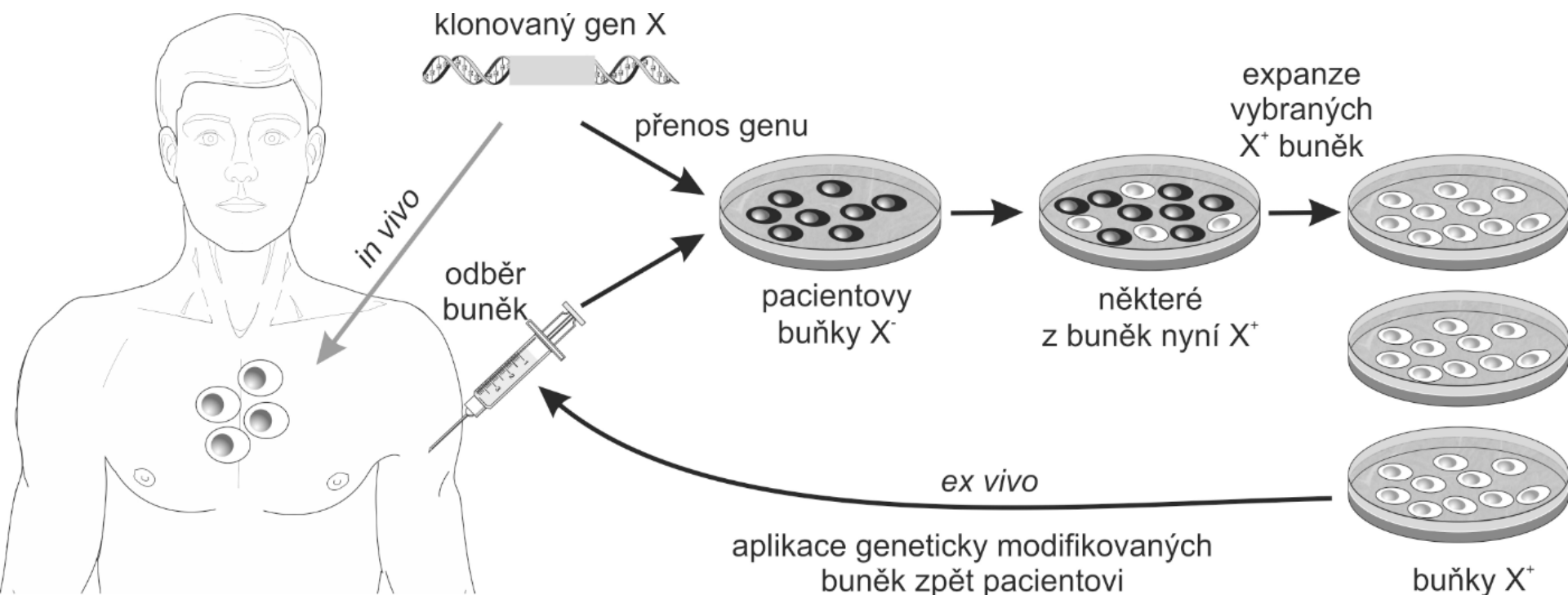
Tab. 11.6.2. Srovnání různých virových vektorů využívaných v genové terapii.

Typ vektoru	Kapacita [kb]	Snadnost produkce	Integrace do genomu	Trvání exprese	Transdukce nedělicích se buněk	Imunitní reakce	Bezpečnost	Přenos na potomstvo
neviroví	neomezená	+++	zřídka	dočasná	++	ne	+++	ne

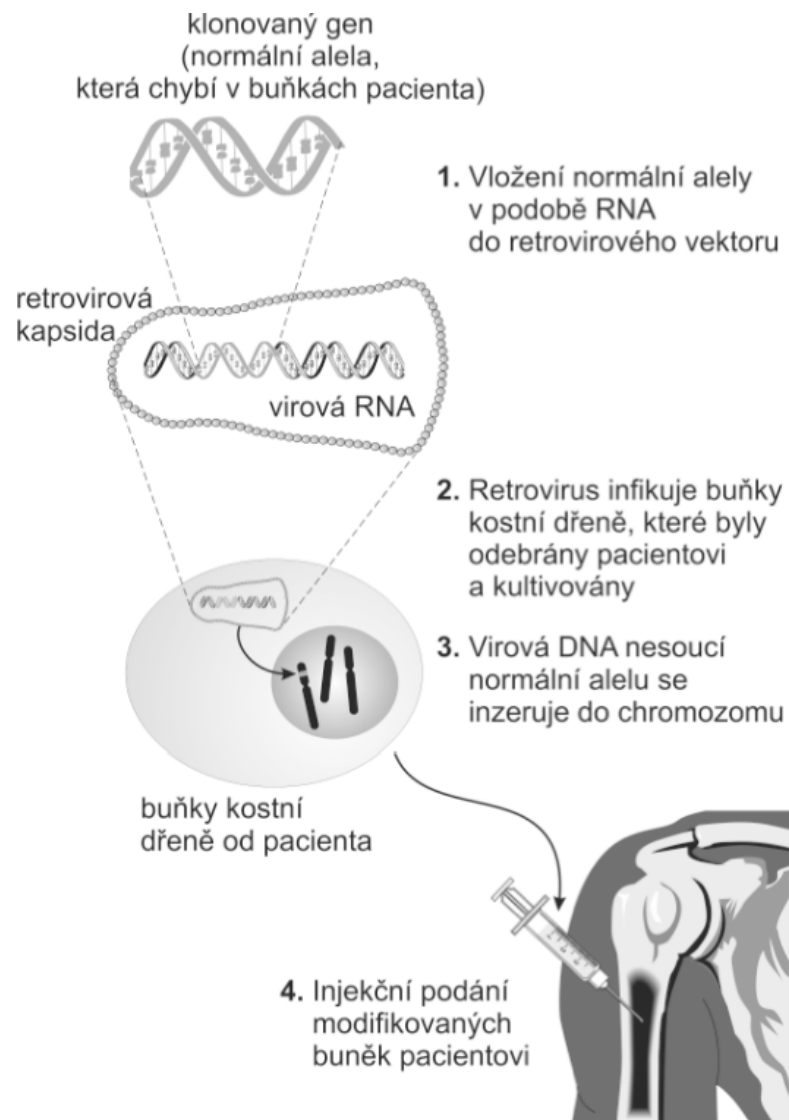
Tab. 11.6.1. Srovnání nevirálních strategií a metod genové terapie. Plazmidová DNA obsahující transgen bývá aplikována injekčně, pomocí fyzikálních metod (elektroporace, sonoporace), nebo metodami chemickými.

Strategie	Metoda	Výhody	Nevýhody
nahá DNA	injekční podání <i>in vivo</i>	snadné použití	malá efektivita
		možné použití pro genetické vakcíny	dočasný efekt
			internalizace jen do svalových a srdečních myocytů a antigen prezentujících buněk
fyzikální metody	elektroporace	snadná aplikace do kosterního svalstva a kůže, invazivní i do ostatních orgánů	malá efektivita
			dočasný efekt
			limitované spektrum aplikací
	sonoporace	neinvazivní aplikace	malá efektivita
			dočasný efekt
chemické metody	lipozomy	snadná aplikace	malá efektivita
	kationtové lipidy	snadné použití	dočasný efekt
	kationtové polymery		

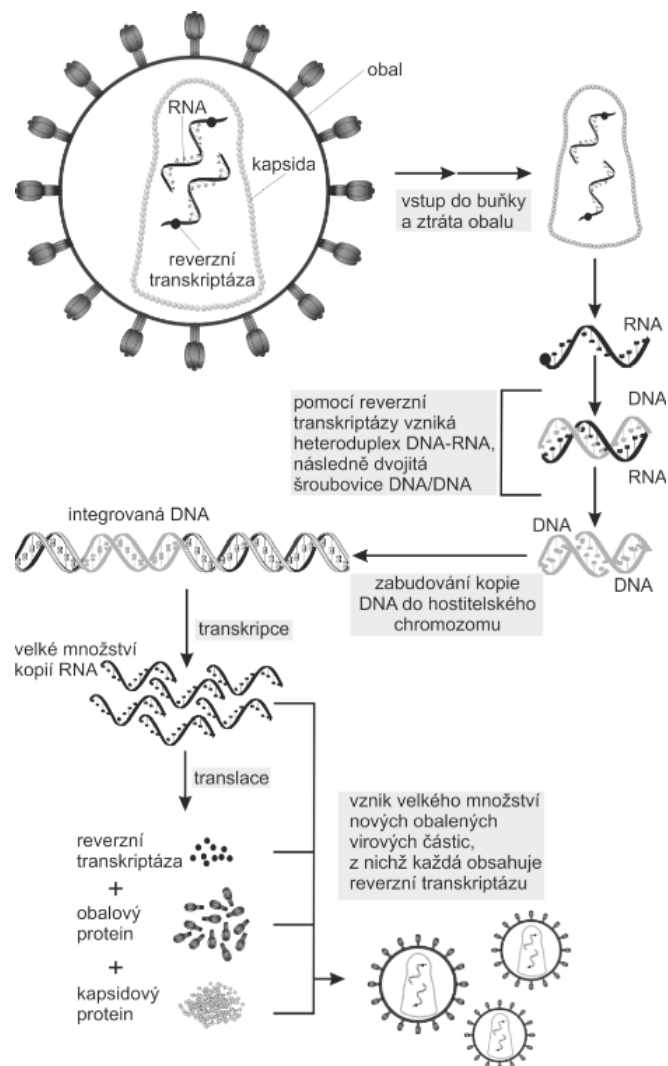
In vivo a ex vivo genová terapie



Ex vivo genová terapie

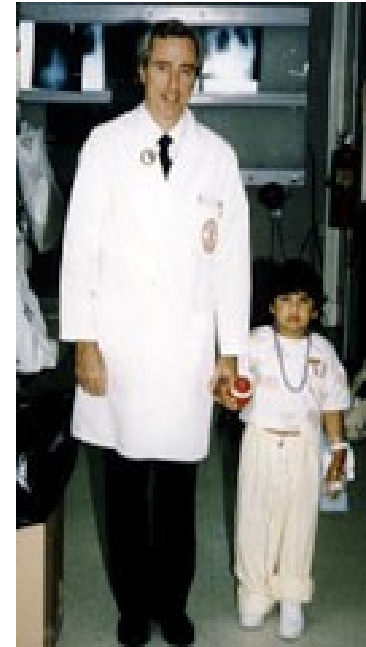
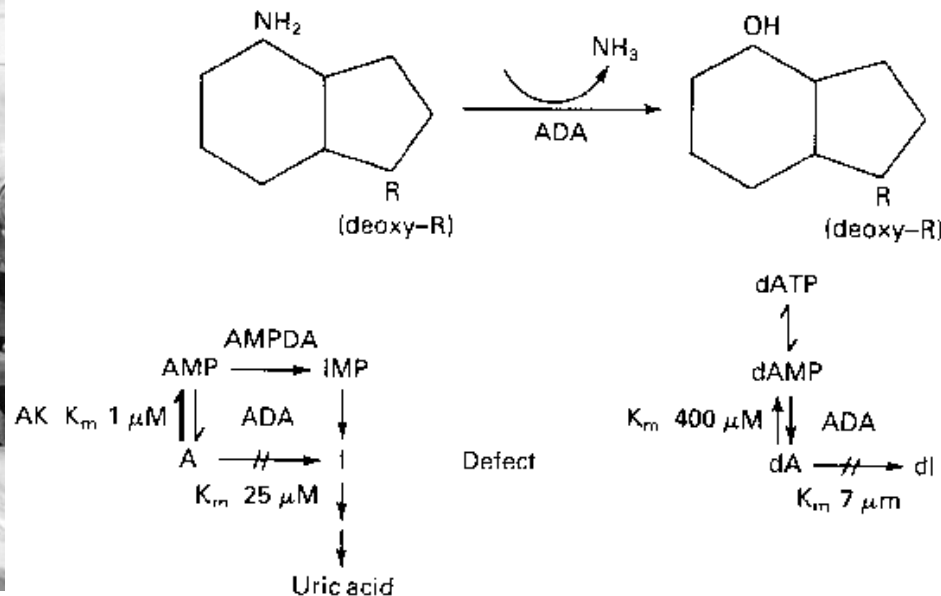


Životní cyklus retroviru



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

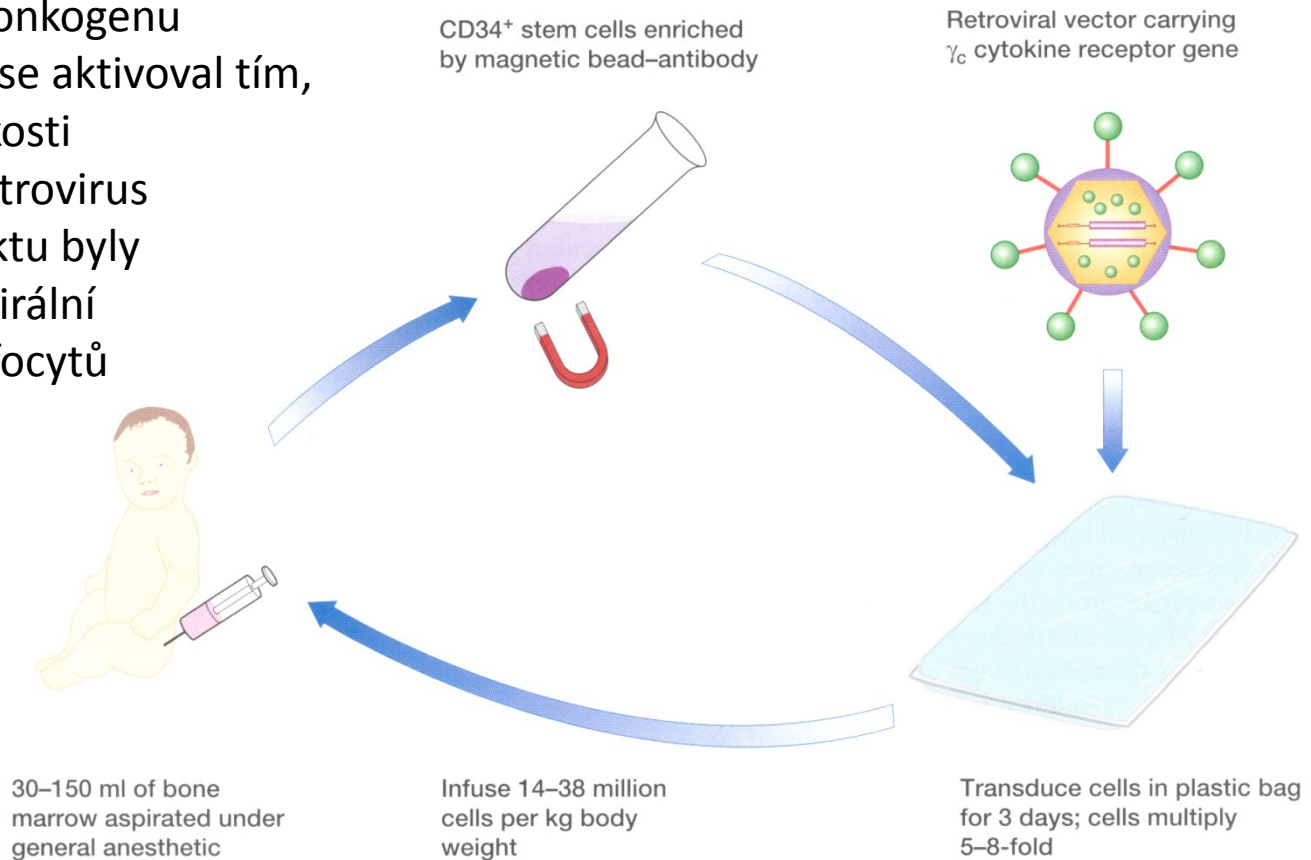


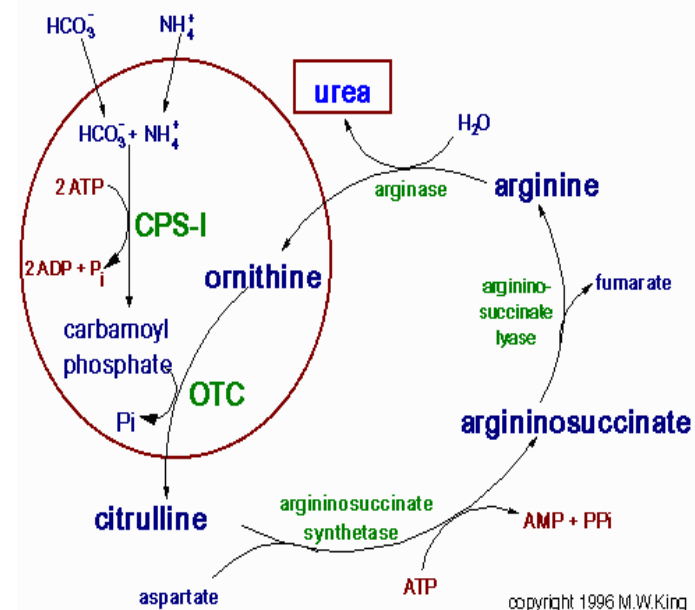
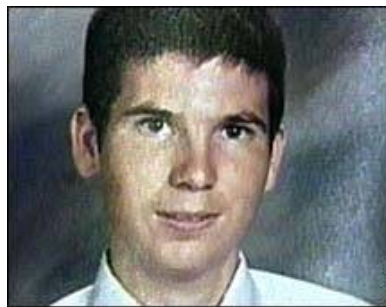
Figure 21.11: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID).

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.



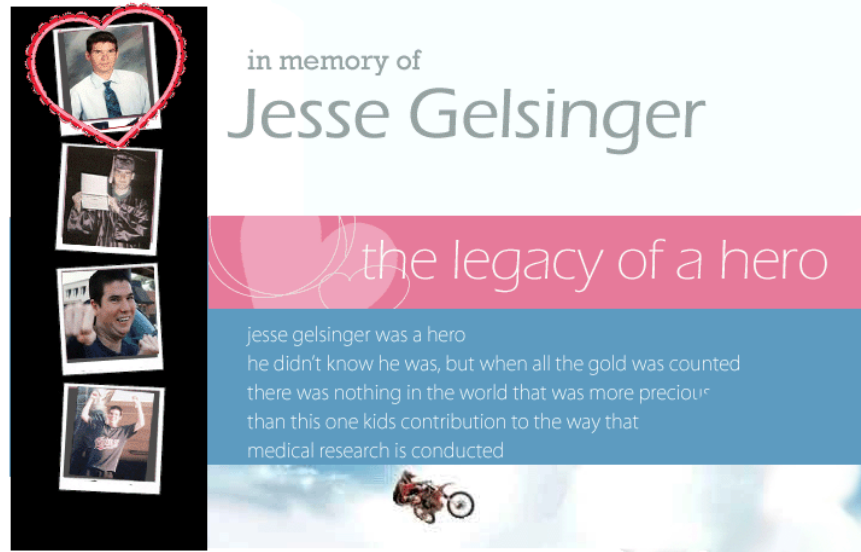
Jesse Gelsinger

- 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

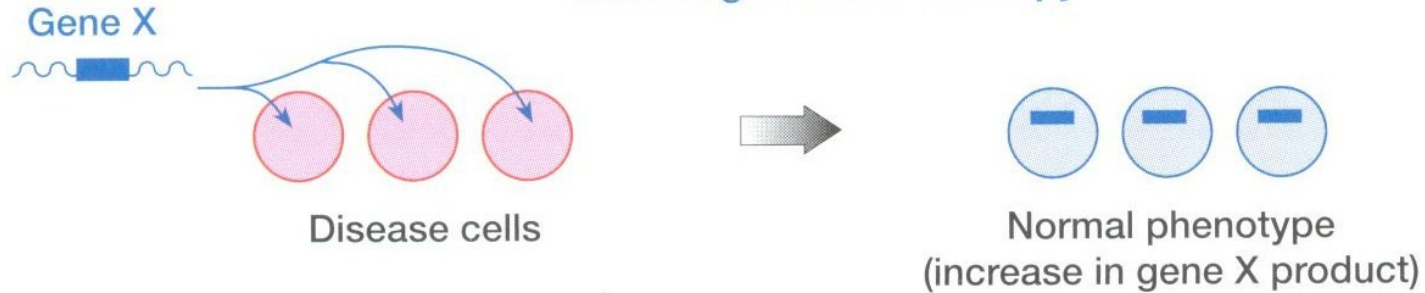
- čeká na den svých 18. narozenin, aby mohl poskytnout informovaný souhlas s léčbou
 - 13. září 1999 dostává genovou terapii, večer je mu špatně, další den odpoledne upadá do kómatu
 - 17. září 1999 umírá
 - smrt nastává evidentně a jasně následkem terapie
 - případ vyvolal zděšení mezi vědeckou komunitou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

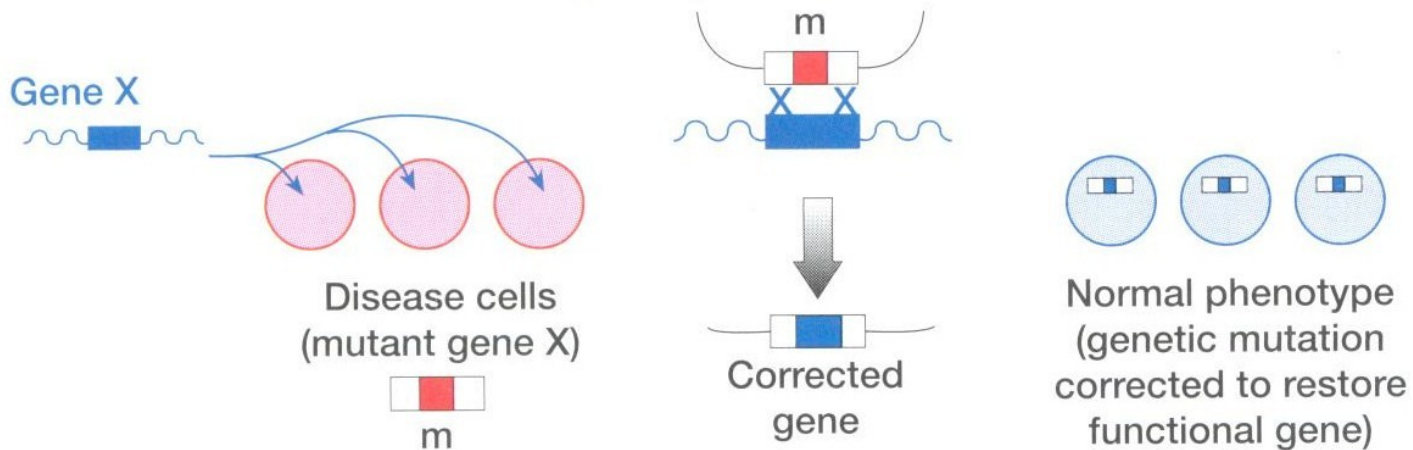
A)

Gene augmentation therapy



B)

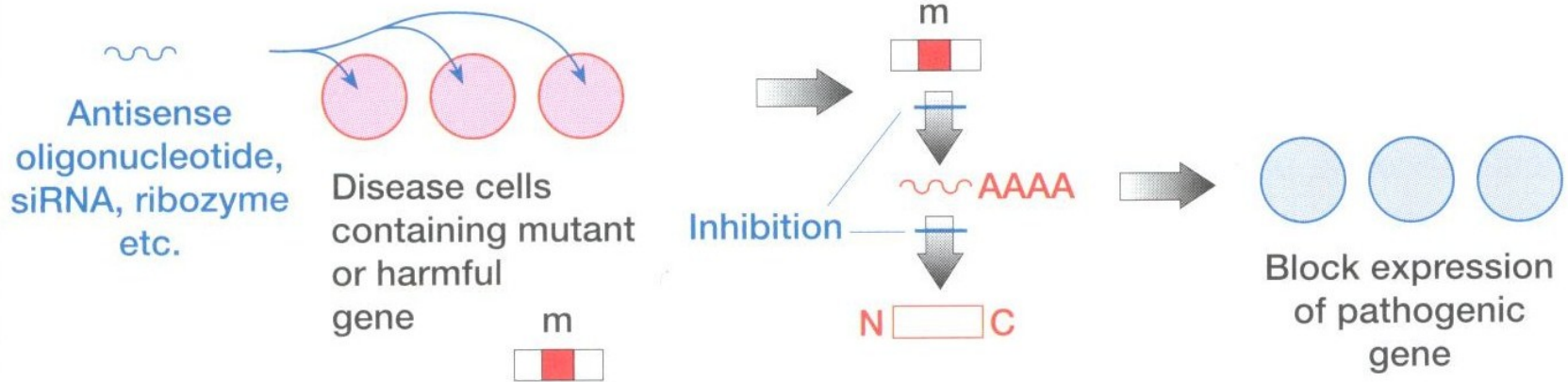
Targeted gene mutation correction



Strategie genové terapie

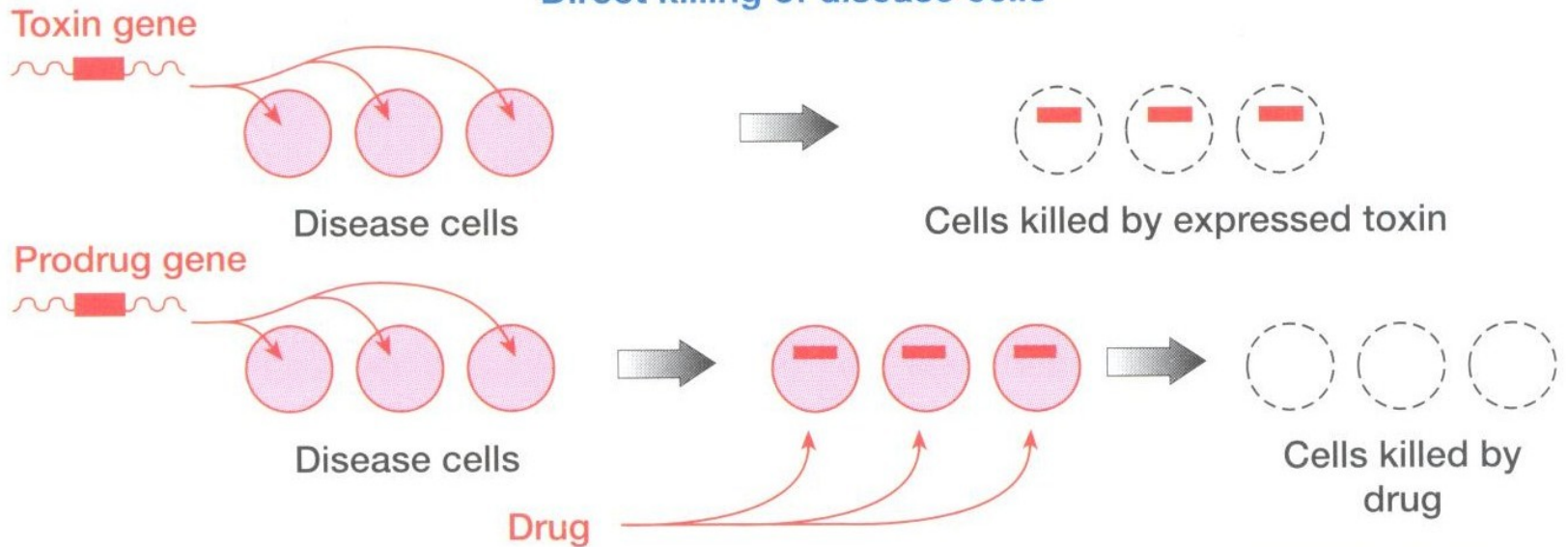
C)

Targeted inhibition of gene expression



D)

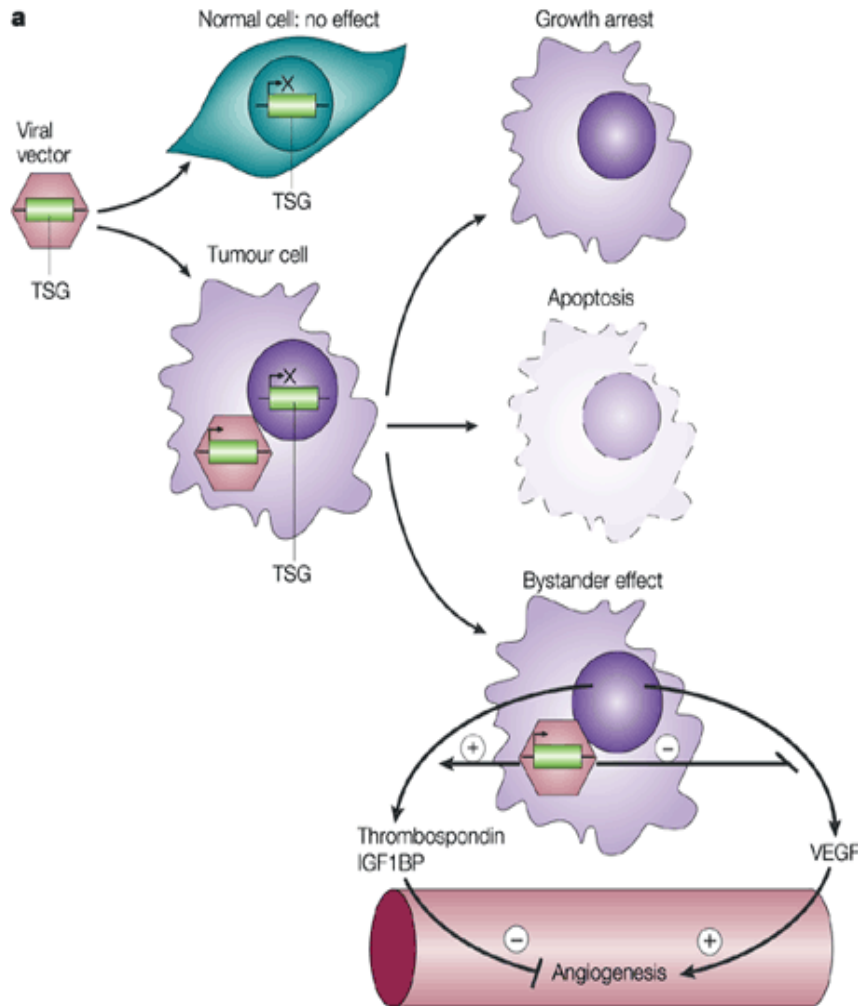
Direct killing of disease cells



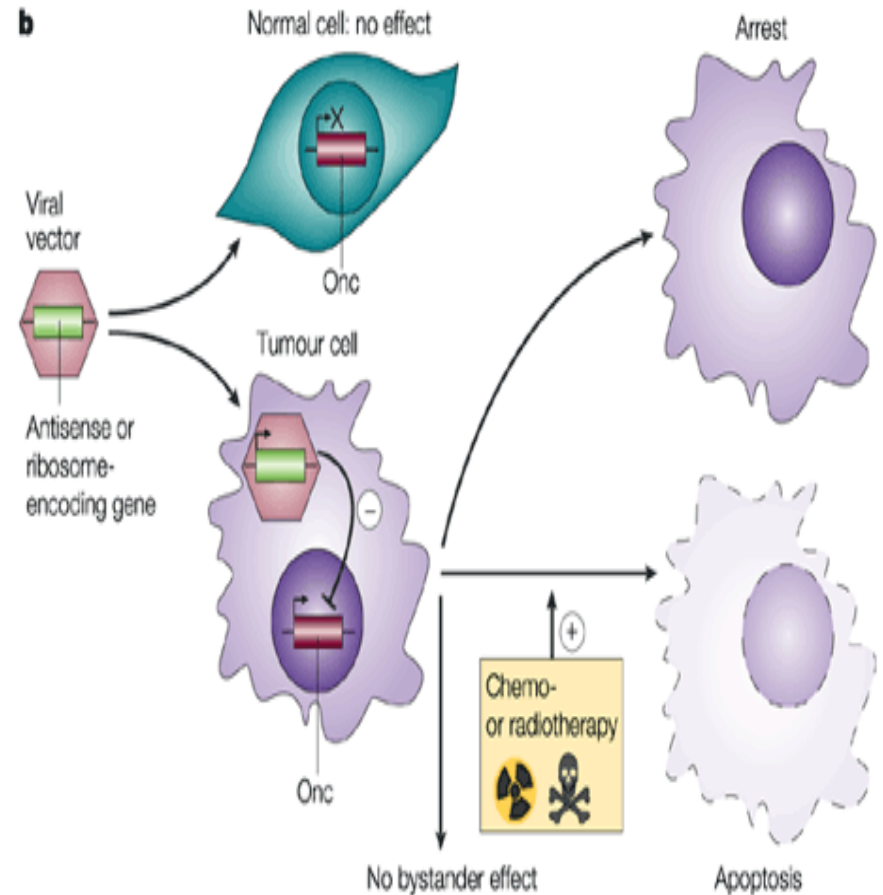
principy genové terapie nádorů

využití onkoretrovirálních vektorů

doručení nemutovaného supresorového genu p53

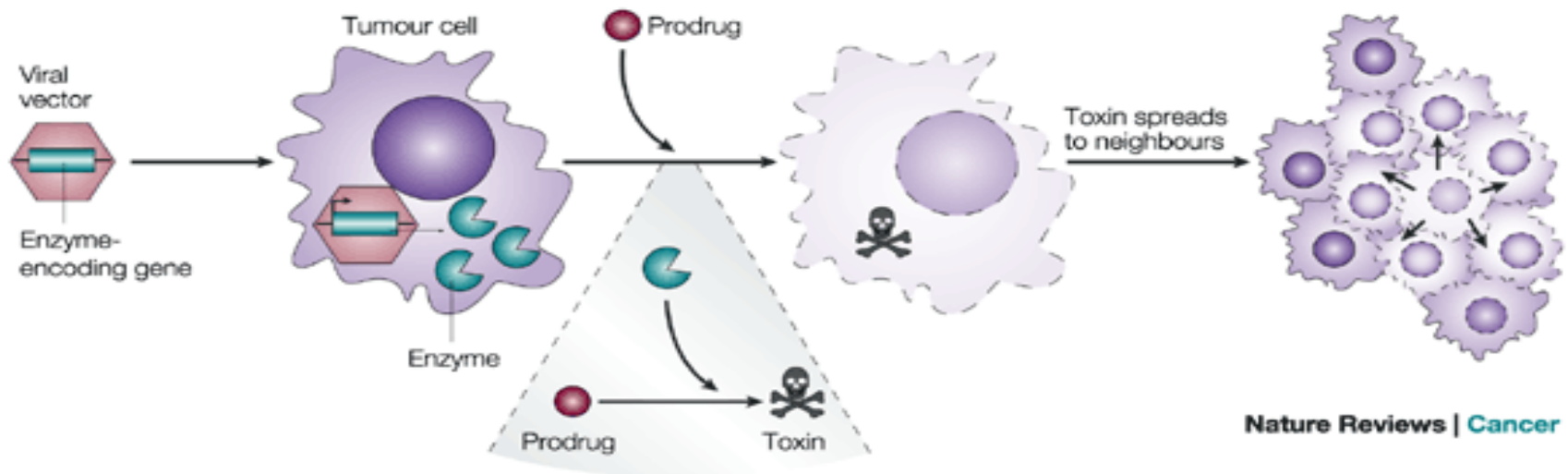


doručení konstruktů zajišťující zastavení exprese onkogenu (**antisense konstrukt**)



principy genové terapie nádorů

doručení sebevražedného genu přeměňující pro-drug na toxin



principy genové terapie nádorů

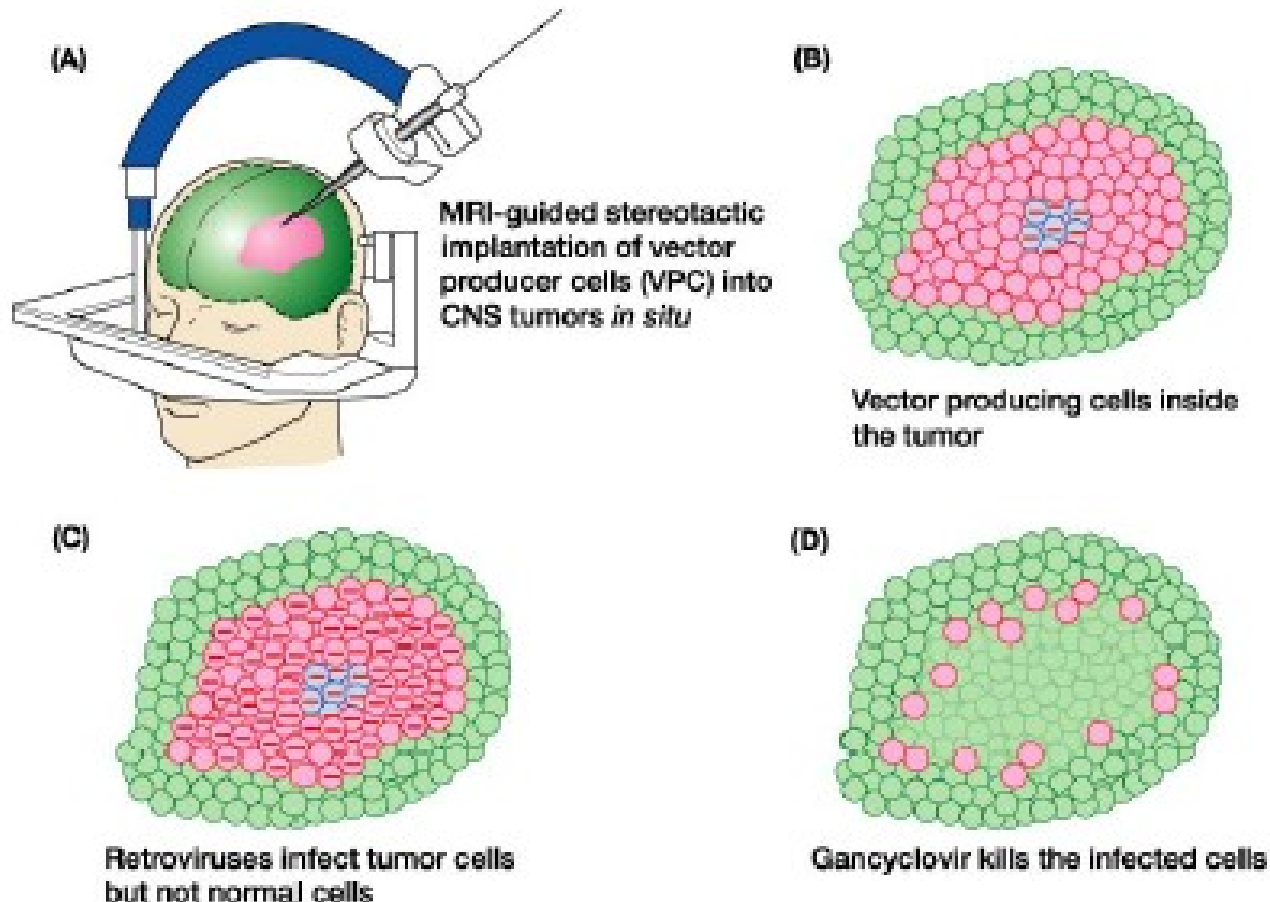
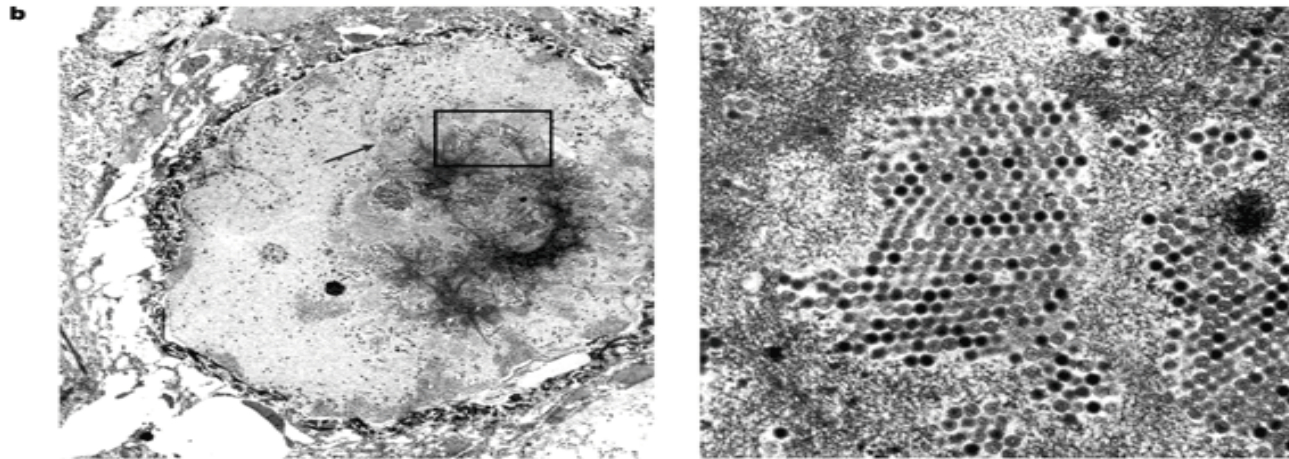
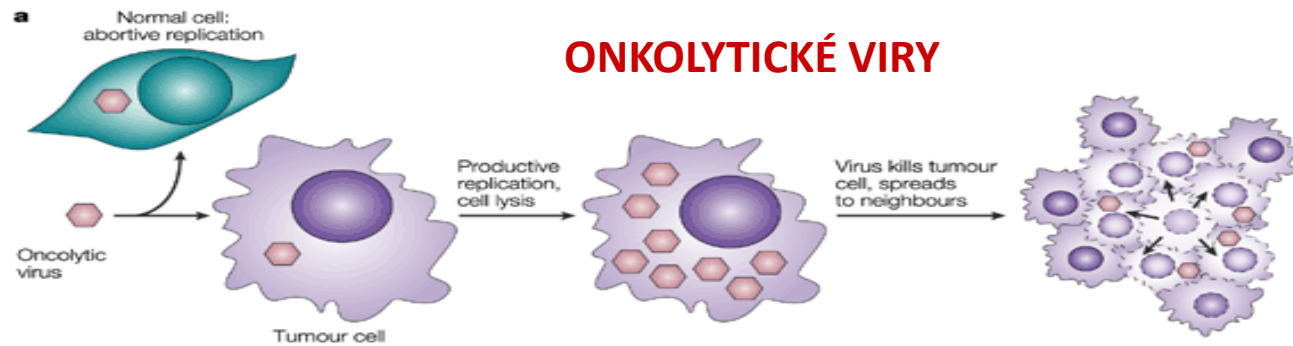


Figure 21-12 Human Molecular Genetics, 3/e. © Garland Science 2004

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

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

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?

