

# Genová terapie a farmakogenetika

doc. RNDr. Monika Pávková Goldbergová, Ph.D.

# Farmakogenetika

- Na základě interdisciplinárního integrace znalostí farmakologie a genetiky popsat vliv dědičnosti na odpověď organismu na různé léky.

- Farmakogenomika

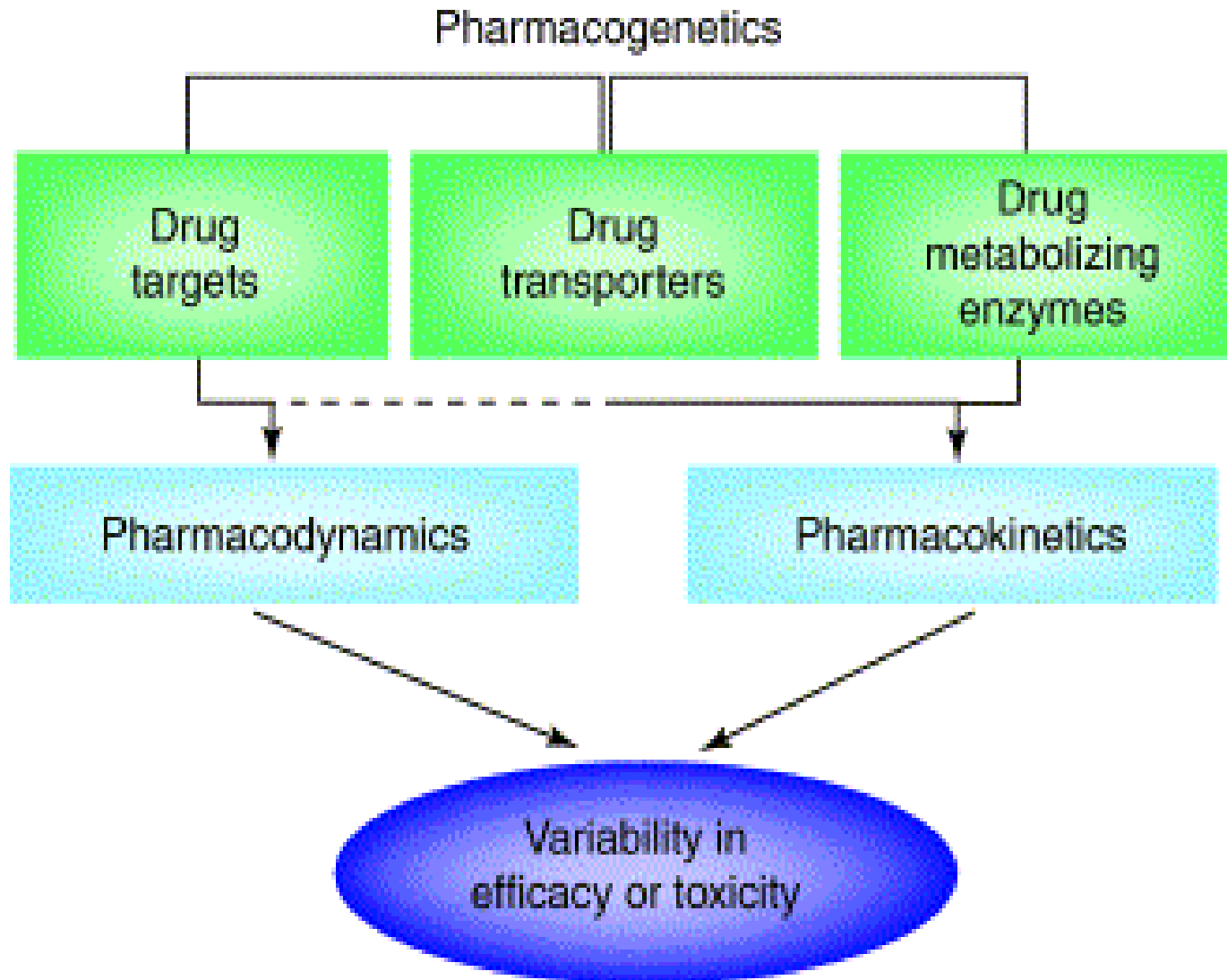
- ✓ **Farmakodynamika:** popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus

(lék → organismus)

- ✓ **Farmakokinetika:** se zabývá hladinami léků a jeho metabolitů v různých tkáních a vstřebáváním léků, jejich distribucí, metabolismem a eliminací

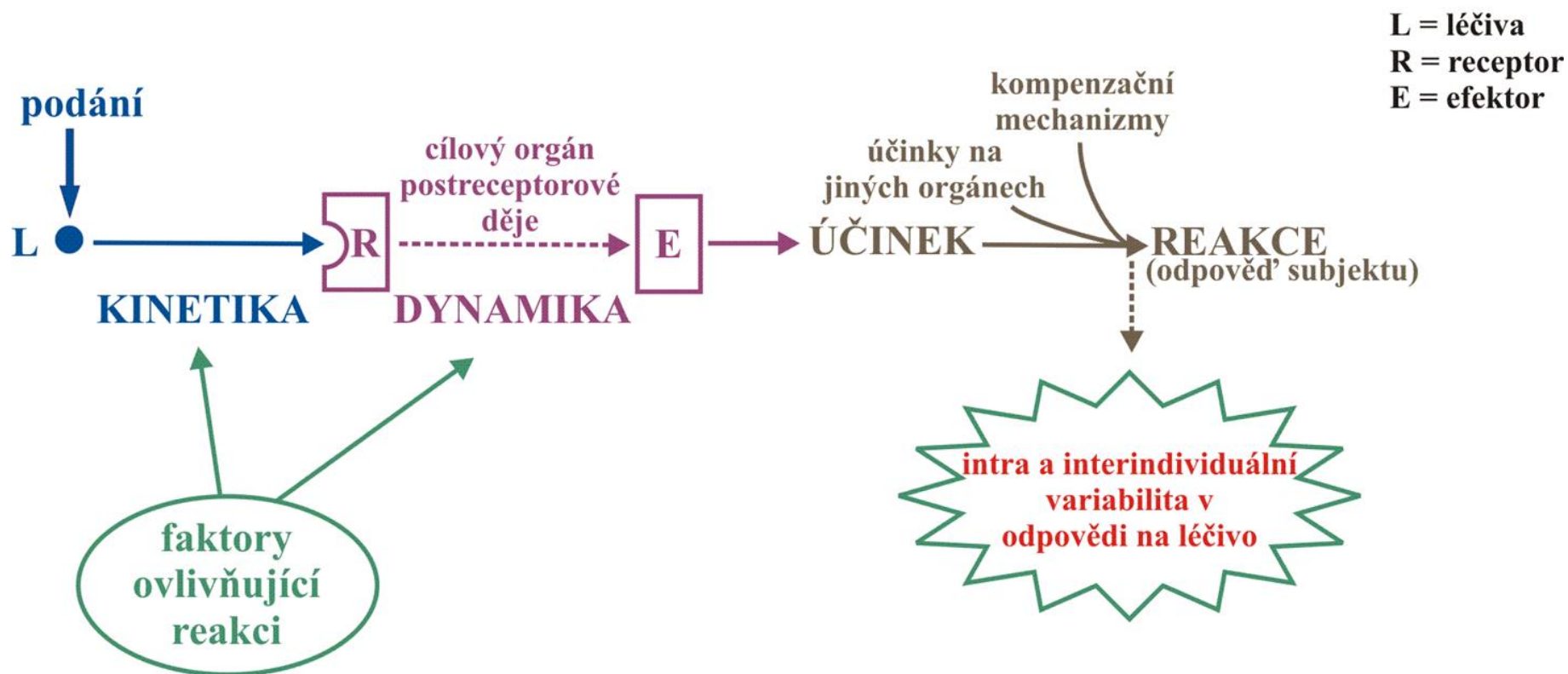
(organismus → lék)

# Klíčové složky farmakogenetiky



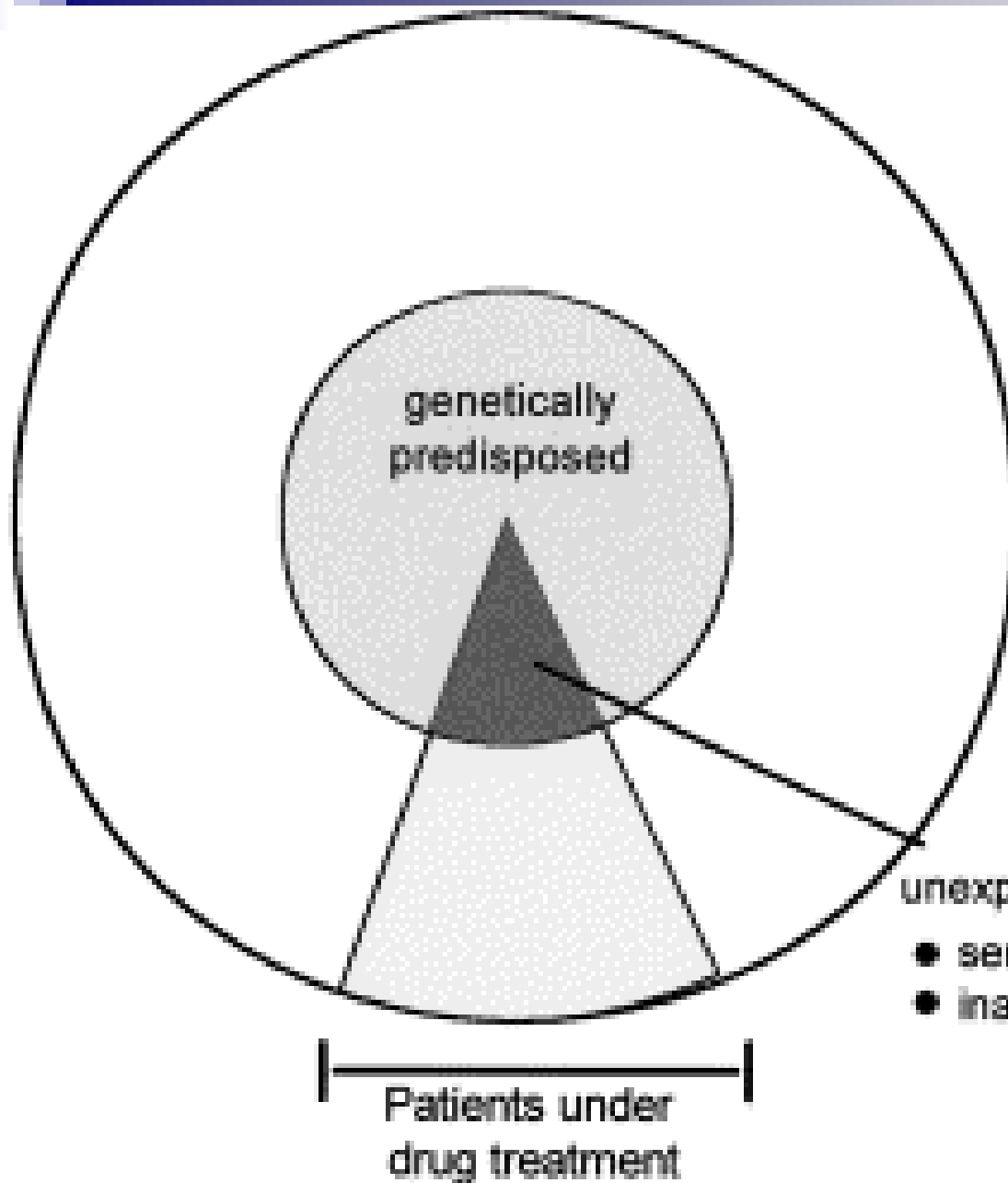


## Fáze a faktory rozhodující o reakci subjektu na léčivo



# Vztah ke genům

- **Téměř každá dráha metabolismu léku, jeho transportu nebo aktivace je ovlivněna genetickou variabilitou.**
  - **Klinická variabilita v odpovědi**
  - **Riziko vedlejších účinků**
  - **Genotypově specifické dávkování**
  - **Polymorfní cíle léku**



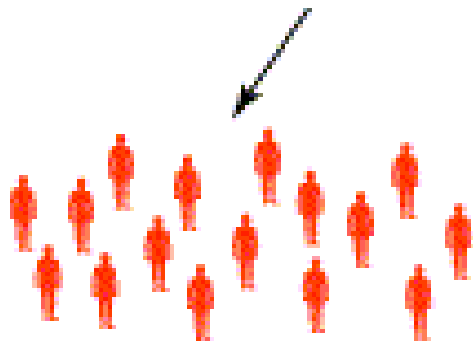
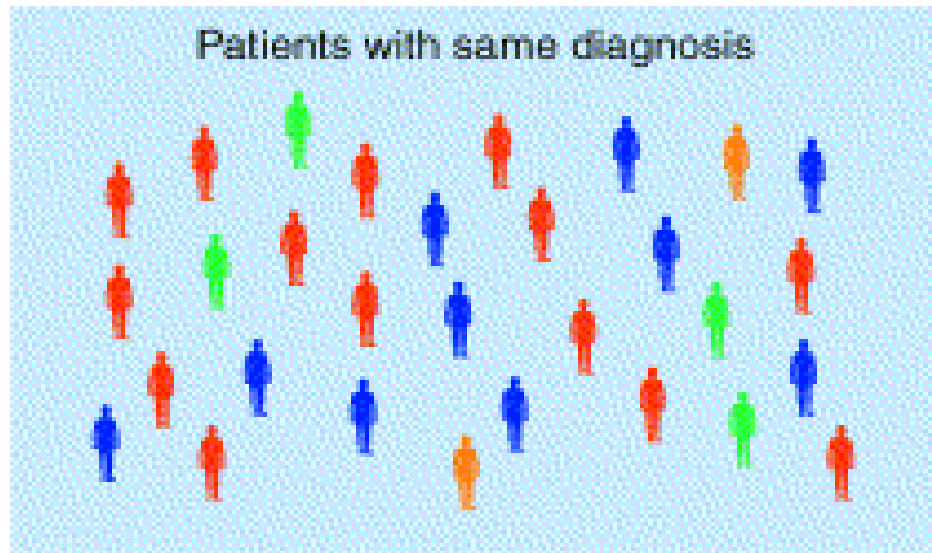
**20-90% individuální  
odpovídavosti na  
předepsanou léčbu souvisí  
s genetickou variabilitou.**

**59% z 27 nejčastěji  
citovaných léků s ohledem  
na nežádoucí účinky -  
genetické varianty se  
sníženou funkcí nebo  
nefunkčností proteinů.**

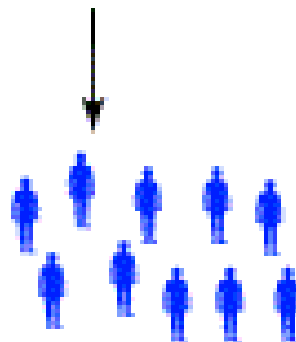
unexpected outcome:

- serious side effects
- inadequate response

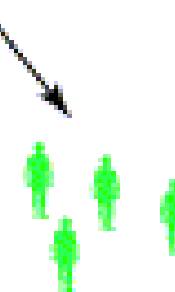
# Klinický potenciál farmakogenetiky



Predicted good  
response to  
tested drug



Predicted poor  
or non response  
**Use different drug**



Predicted increased  
toxicity risk  
**Decrease dose or  
use different drug**


*TRENDS in Genetics*

# Výhody „Genomické medicíny“ – klinický potenciál

- Odhalení onemocnění v raném stádiu, kdy je snadnější účinně léčit;
- Usnadnění výběru optimální léčby a omezit léčbu pokus-chyba;
- Snížení výskytu nežádoucích účinků;
- Zvýšení odpovědávosti pacienta na léčbou;
- Zlepšení výběru cílů ve vývoji léků a snížit čas, náklady a selhání klinických zkoušek;
- Důraz na prevenci;
- Snížení celkových nákladů na zdravotní péči.

Kolik lidských genů představuje cíle současných léků?

- 1) ~500 (5% celkového genomu)**
- 2) ~1,000 (10%)**
- 3) ~5,000 (25%)**
- 4) ~10,000 (50%)**
- 5) ~ 15,000 (75%)**
- 6) ~20,000 (100%)**

- 
- Nutnost přesné diagnózy (k fenotypicky podobným stavům mohou vést různé patobiochemické mechanismy).
  - Individuální odpověď jedince na terapii může záležet na genech, vstupujících do interakce s metabolismem léku nebo jeho působením.

# Problemy vyznamu genetickych faktorů u multigenních nemocí- 10 otázek

- ✓ Jak důležité jsou genetické vlivy i nejčastějších forem multigenních nemocí?
- ✓ Jaký je vliv prostředí na vznik nemoci?
- ✓ Které jsou nejslibnější přístupy k determinaci genetických faktorů pro nemoc?
- ✓ Které geny již byly vybrány jako vnímavé?
- ✓ Které cesty přispívají ke genetické vnímavosti pro danou nemoc?
- ✓ Jak mnoho genů se podílí na vnímavosti k nemoci účastní?
- ✓ Jsou nejčastější formy multigenní nemoci asociovány s častou nebo vzácnou genetickou variabilitou v populaci? (hypotéza častá variace/častá nemoc vs. genetický heterogenní model)
- ✓ Proč alely, které jsou asociovány s nemocí, nebyly z populace eliminovány?
- ✓ Jako důležité jsou pro danou nemoc interakce geny-prostředí a geny-geny?
- ✓ Jaké jsou důsledky pro farmakogenetiku?



# Kandidátní geny - asociace

- s intermediálním fenotypem
- s klinickou manifestací nemoci
- s klinickou závažností nemoci
- s odpovídavostí nemoci na léčbu

# Typy genetických studií

- Linkage
- Asociační
- Case-control („susceptibility genes“)
- Case-case
- Genotyp-fenotyp („genes modulators“)

# Klinicky relevantní genetické polymorfismy ve vztahu k vedlejším účinkům léků

Gene <sup>a</sup>	Polymorphism	Minor allele frequency <sup>b</sup>	Drug(s)	Genetic association	Refs
<b>Drug metabolizing enzymes</b>					
<i>TPMT</i>	Multiple	0,3% of Caucasian population carry two nonfunctional alleles	Thiopurines	Hematological toxicities	[19–22]
<i>CYP2D6</i>	Multiple	1–2% of Asians and African descent and 6–8% of Caucasians carry two nonfunctional alleles	Numerous cardiovascular drugs, antidepressants, antipsychotics, Codeine	Enhanced drug effect and increased toxicity	[19,23–25]
<i>CYP2C9</i>	*2 (Arg144Cys)	0.02–0.10	Warfarin	Decreased drug efficacy Increased bleeding risk, decreased dose requirements	[26,27] [28–30]
<i>CYP2C9</i>	*3 (Ile359Leu)	0.02–0.08			
<b>Drug Transporter</b> <i>ABCB1</i>	3435C→T (Ile1145Ile)	0.10–0.50	Numerous, including anticonvulsants, protease inhibitors, digoxin and others	Differences in plasma drug concentration and efficacy	[3,31–34]
<b>Drug-targets or pharmacological response proteins</b>					
<i>ADRB1</i>	Ser49Gly	0.15–0.30	β-blockers	Blood pressure lowering by β-blockers	[35,36]
<i>ADRB2</i>	Arg389Gly Arg16Gly	0.25–0.47 0.41–0.54	β-agonists	Bronchodilation and cardiovascular responses to β-agonists	[37,38]
<i>DRD3</i>	Gln27Glu Ser9Gly	0.07–0.35 0.30–0.70	Antipsychotics	Differential antipsychotic efficacy, antipsychotic-induced tardive dyskinesia and acute akathisia	[39–41]
<i>ADD1</i>	Gly460Trp	0.06–0.60	Diuretics	Differential antihypertensive response and differences in degree of reduction in risk for myocardial infarction and stroke in hypertensives	[42–44]
<i>GNB3</i>	C825T (creates splice variant)	0.32–0.76	Diuretics, antidepressants	Differential drug efficacy	[45,46]
<i>APOE</i>	ε2 Cys130 and Cys176 ε3 Cys130 and Arg176 ε4 Arg130 and Arg176	0.04–0.16 0.60–0.85 0.09–0.25	Tacrine, statins	Differential drug efficacy	[47–49]
<i>F5</i>	Arg506Gln (Factor V Leiden)	Absent to 0.04	Estrogen, oral contraceptives	Increased venous thromboembolism risk	[50,51]

# Klinicky relevantní genetické polymorfismy ve vztahu k účinnosti léků

Disease	Treatment	Comment	Reference
M3-AML	all <i>trans</i> -retinoic acid	Patients with PLZF/RARA fusion are not responsive to retinoids.	[4]
Glioma	carmustine, BCNU	Only tumors with CpG methylation of the promoter of the <i>O</i> <sup>6</sup> -methylguanine-DNA-methyltransferase gene respond to treatment with alkylating substances.	[22]
Asthma	5-lipoxygenase inhibitors	ALOX5 promoter genotype influences response to treatment; individuals with two non-wild type alleles show no response to 5-LOH inhibitors.	[23]
	$\beta_2$ adrenergic agents	Gly16-allele of $\beta_2$ adrenergic receptor is associated with much stronger bronchodilator desensitisation than Arg16.	[24]
Depression	imipramine	Fast metabolisers do not reach therapeutic drug levels with normal dosage.	[19]

# Cytochrom P<sub>450</sub>2C9 (CYP2C9)

- dvě alelické varianty genu CYP2C9<sup>1, 2</sup>
  - CYP2C9\*2
    - záměna C<sup>430</sup>T v exonu 3 vede k substituci Arg<sup>144</sup>Cys
  - CYP2C9\*3
    - záměna A<sup>1075</sup>C v exonu 7 vede k substituci Ile<sup>359</sup>Leu
- in vitro má CYP2C9\*1 normální, zatímco varianta CYP2C9\*2 vykazuje menší a CYP2C9\*3 podstatně menší enzymatickou aktivitu<sup>3, 4</sup>
- fenotypickým projevem je snížení clearance léků závislých na CYP2C9

1. Stubbins MJ et al: Pharmacogenetics 1996; 6:429-329

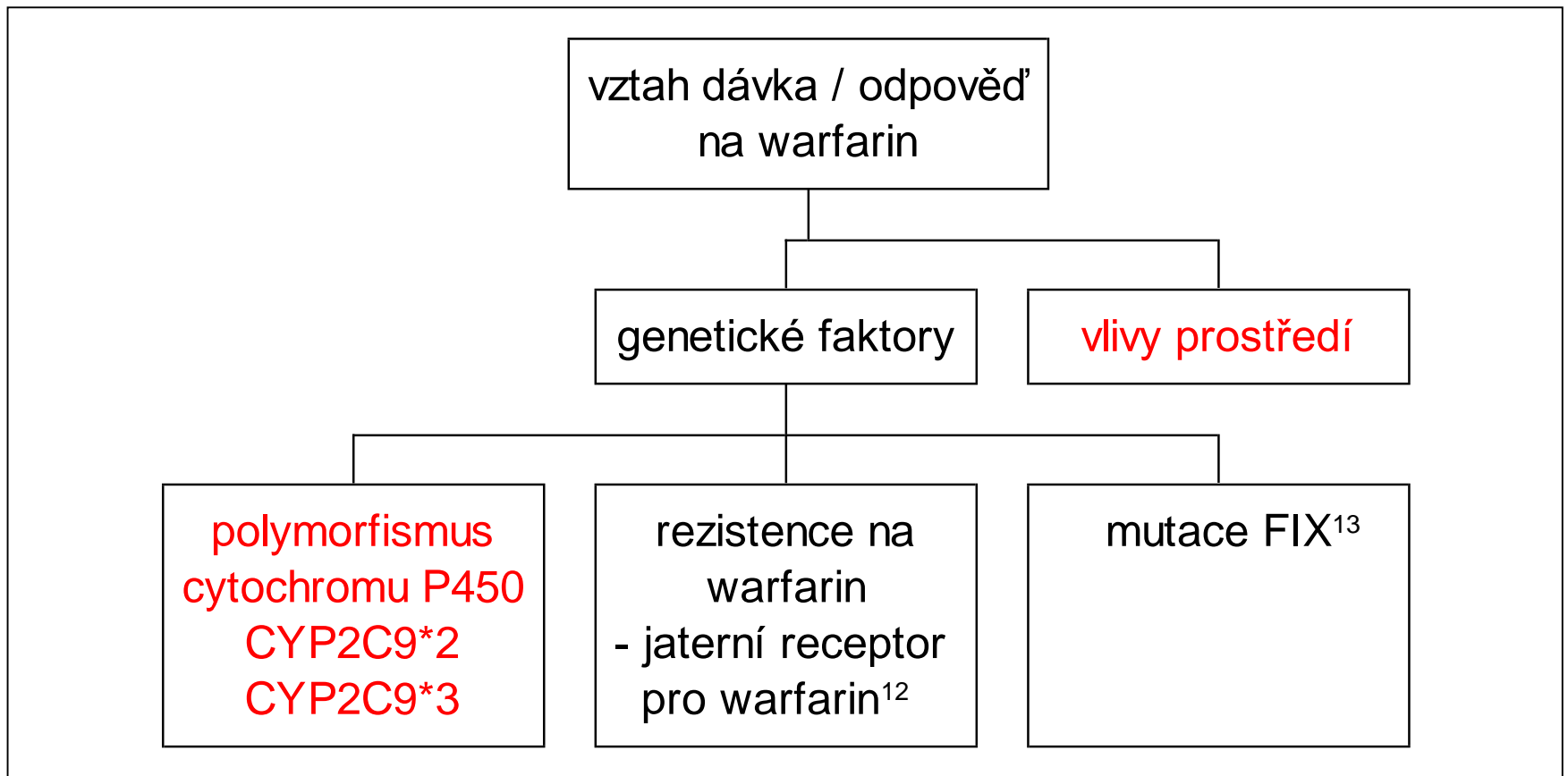
2. Veronese ME et al: Biochem J 1993; 289:533-8

3. Rettie AE et al: Pharmacogenetics 1994; 4:39-42

4. Haining RL et al: Arch Biochem Biophys 1996; 333:447-58

- CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků
- CYP2D6 – 20%
- CYP2C9 + CYP2C19- 15 %
- CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní
- Např. ovlivňuje metabolismus warfarinu, acenocoumarolu a dalších léků (phenytoin, tolbutamid, glipizide a další perorální antidiabetika typu sulfonylurey).

# Dávka / antikoagulační efekt warfarinu



12. Alving BM et al: Arch Intern Med 1985; 145:499-501

13. Oldenburg J et al: Br J Hematology 1997; 98:240-4

# CYP2C9 ACTIVITA

<u>Warfarin Dose*</u>	<u>Genotype</u>
5.63 (2.56)	*1/*1
4.88 (2.57)	*1/*2
3.32 (0.94)	*1/*3
4.07 (1.48)	*2/*2
2.34 (0.35)	*2/*3
1.60 (0.81)	*3/*3

From: Higashi MK, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 287:1690-1698, 2002.



# Klinické projevy polymorfismu CYP2C9

- předávkování při zahájení antikoagulace standardními režimy <sup>14, 16, 17, 18, 19</sup>
- nižší udržovací dávka nutná k dosažení a udržení terapeutického rozmezí <sup>11, 15, 16, 18, 19</sup>
- vyšší riziko předávkování dané interakcemi s léky metabolizovanými a/nebo reagujícími s CYP2C9 <sup>17, 21</sup>
- nestabilita antikoagulační terapie <sup>15, 16</sup>
- delší přetrvávání antikoagulačního efektu po přerušení léčby nebo snížení dávky warfarinu

14. Aithal GP et al: Lancet 1999; 353:717-9

15. Taube J et al: Blood 2000; 96:1816-9

16. Higashi HK et al: JAMA 2002; 287:1690-8

17. Verstuyft C et al: Eur J Clin Pharmacol 2003; 58:739-45

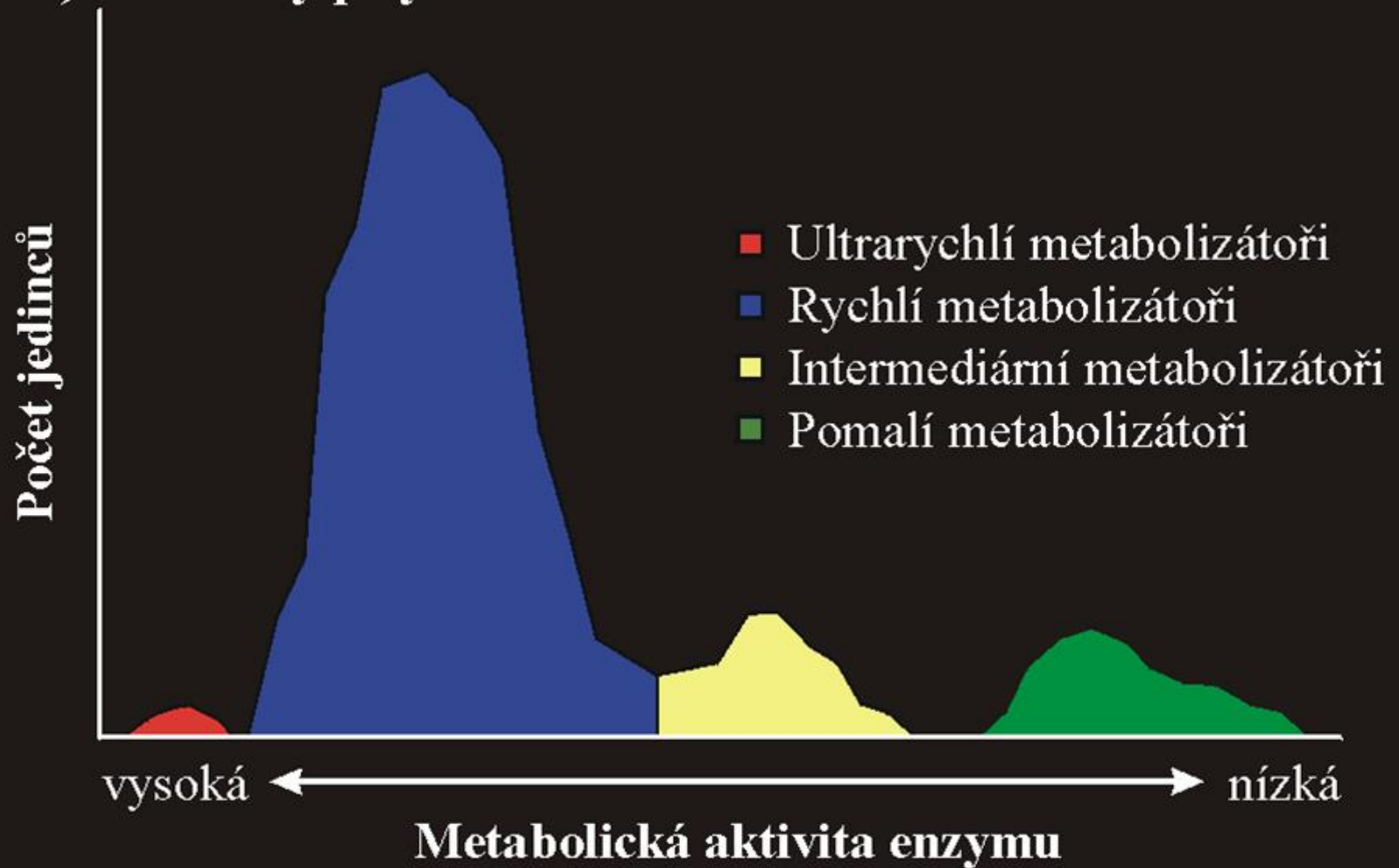
# Interakce s léky metabolizovanými a/nebo reagujícími s CYP2C9<sup>7,20,21</sup>

Soutěž o substrát	Enzymový induktor	Enzymový inhibitor
ASA a většina <u>NSAID</u>	rifampicin	fluvoxamin (ostatní SSRI slabí)
fenobarbital, fenytoin	fenobarbital, fenytoin	<u>omeprazol</u>
S-warfarin	<u>karbamazepin</u>	<u>inhibitory HMG-CoA reductázy</u>
losartan		tolbutamid
tolbutamid		cimetidin (slabý)
sulfonamidy, dapson		<u>azolová antimykotika</u> (slabá)
<u>diazepam</u> , tenazepam		ritonavir
fluoxetin, moclobemid		<b>desethylamiodaron</b>
zidovudin		

20. Topinková E et al: Postgrad Med 2002; 5:477-82

21. Naganuma M et al: J Cardiovasc Pharmacol Ther 2001; 6:636-7

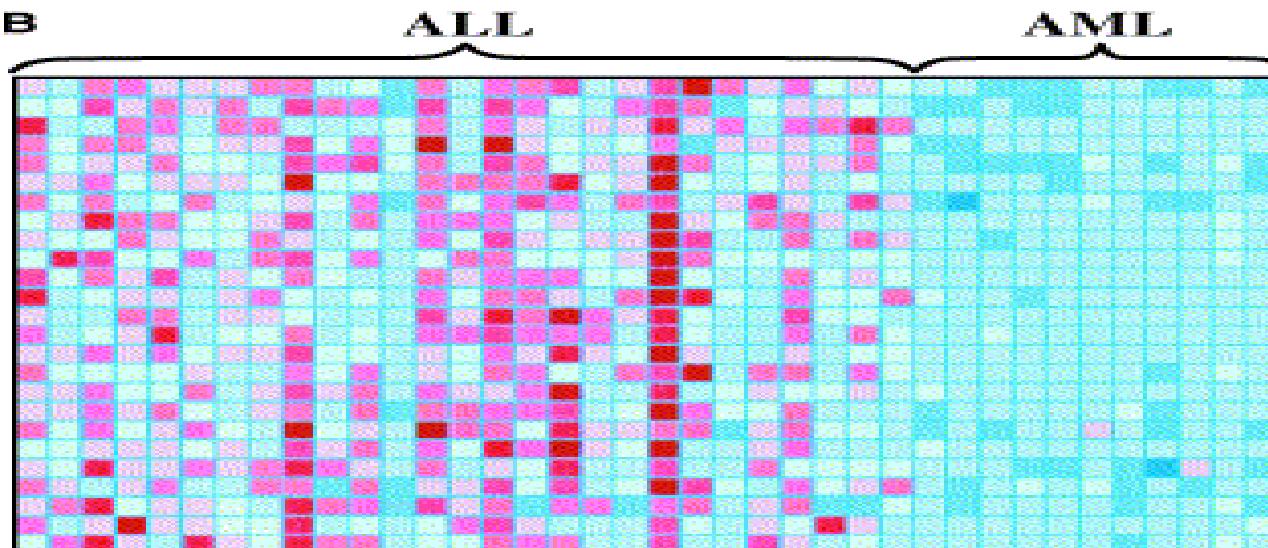
## b) Genetický polymorfizmus



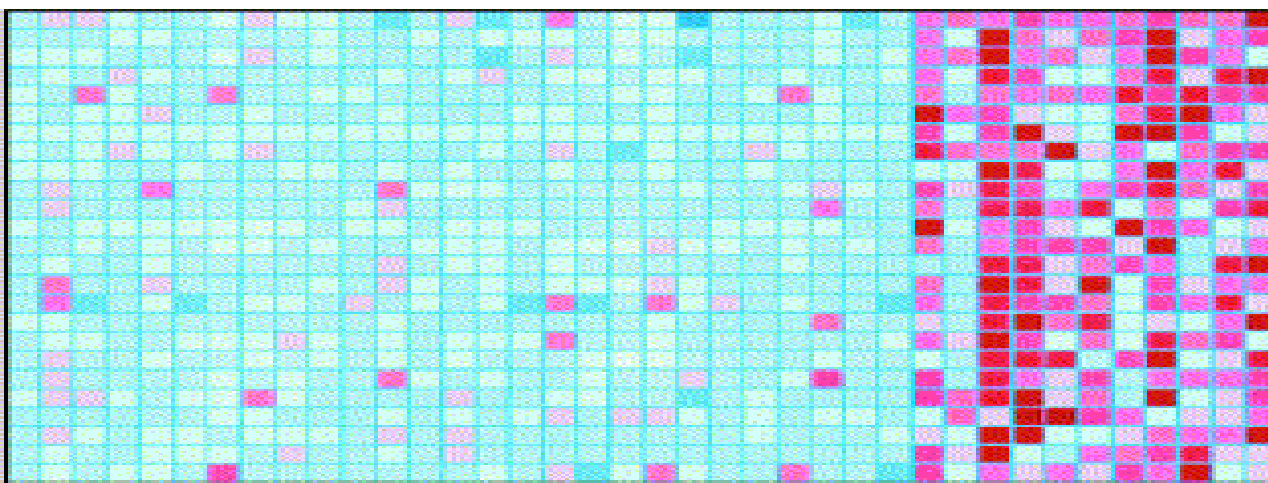
# Rychlost metabolismu

- Dle aktivity enzymu může být populace rozdělena do čtyř hlavních skupin - pomalí **metabolizátoři (PM)**, **intermediární metabolizátoři (IM)**, **efektivní metabolizátoři (EM)** a **ultrarychlí metabolizátoři (UM)**.
- Většina jedinců bílé populace patří mezi tzv. extenzivní metabolizátory (EM), u nichž jsou léčiva metabolizována předpokládanou rychlostí.
- 5-10 % jedinců je geneticky determinováno jako pomalí metabolizátoři (PM), kteří mají zpomalené odbourávání látek metabolizovaných a jsou ohroženi vyšším výskytem nežádoucích účinků léčby.
- Intermediární metabolizátoři (IM) jsou zastoupeni v 10-15 % a při dlouhodobé léčbě jsou svými reakcemi na léčbu srovnatelní se skupinou PM.
- U ultrarychlých metabolizátorů (UM) probíhá metabolizace intenzivněji a klinicky nereagují na běžné dávky léků a je zastoupena v 5-10 %.

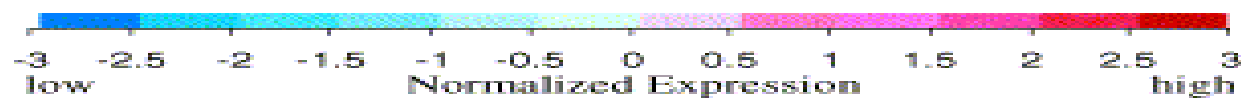
# Geny odlišující ALL od AML



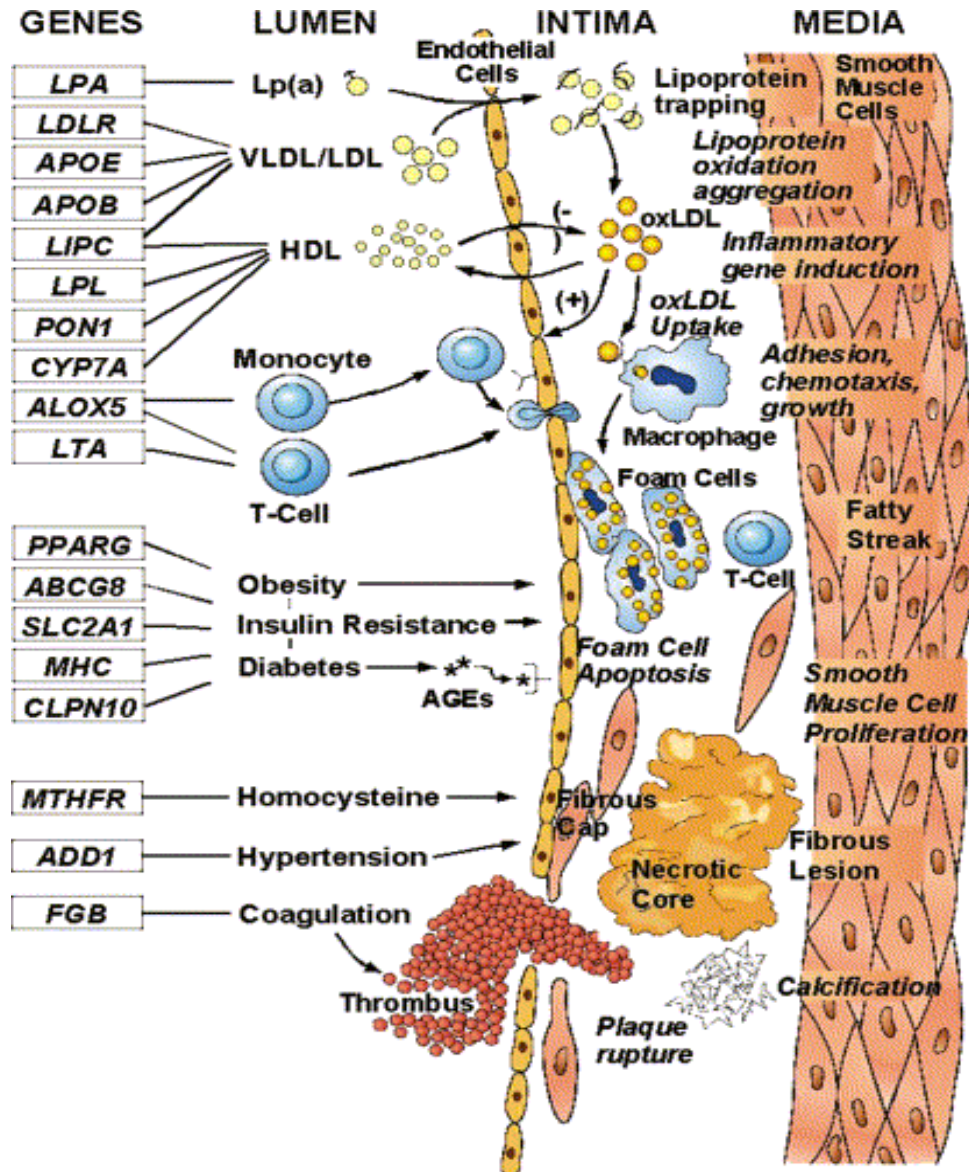
- C-myc (U22376)
- Proteasome Iota (X59417)
- Myb-1 (U05239)
- Cyelin D3 (M92287)
- Myosin light chain (M31211)
- RbAp48 (X74262)
- SNF2 (D26156)
- Hdr1-1 (S50223)
- E2A (M31523)
- Inducible protein (L47738)
- Dynein light chain (U32944)
- Topoisomerase II  $\beta$  (Z15115)
- IRF2 (X15949)
- TTHF $\beta$  (X63469)
- Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (M91432)
- SNF2 (U29175)
- (Ca<sup>2+</sup>)-ATPase (Z69881)
- SRP9 (U20998)
- MCM3 (D38073)
- Decoxyhypsine synthase (U26266)
- Op 18 (M31303)
- Rabaptin-5 (Y08612)
- Heterochromatin protein p25 (U35451)
- IL-7 receptor (M29696)
- Adenosine deaminase (M13792)



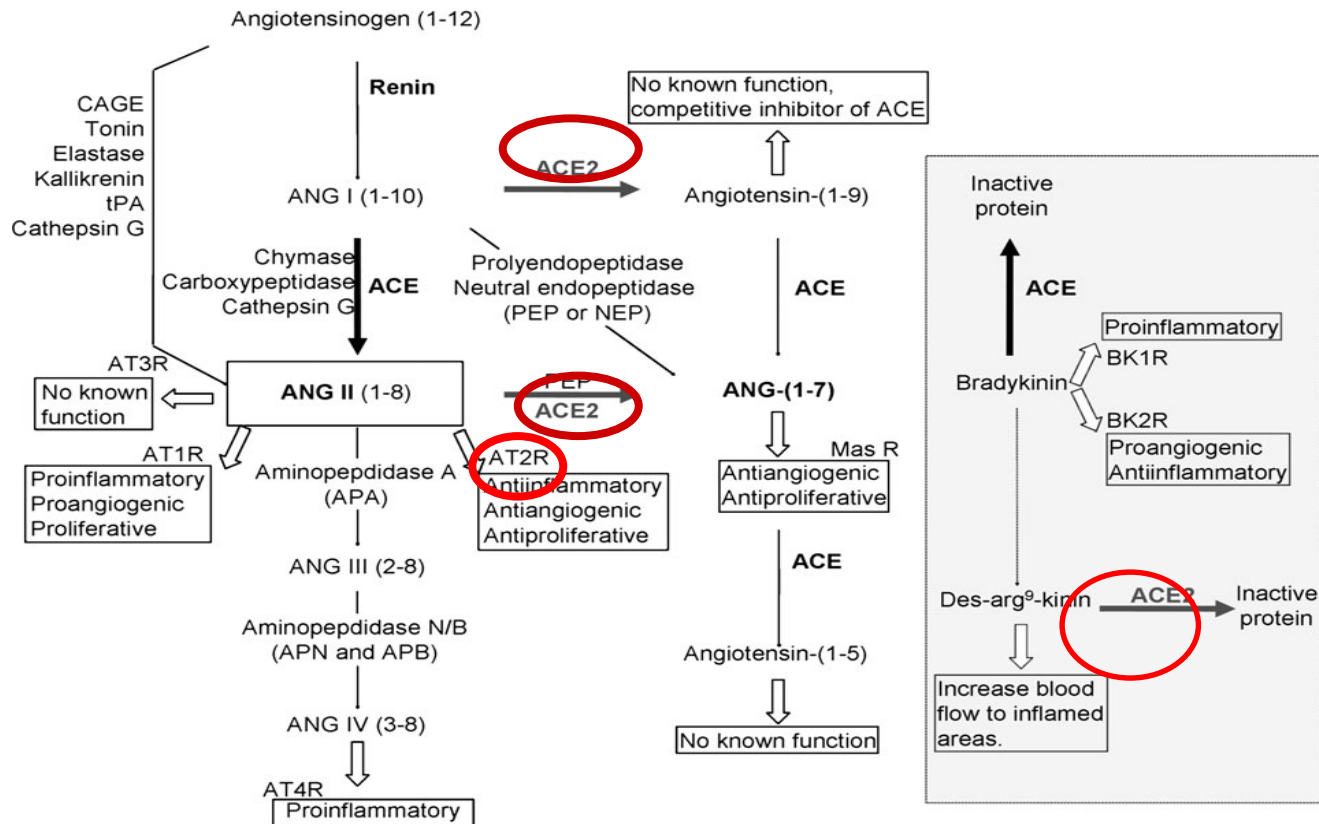
- Fumarylacetoacetate (M55150)
- Zyxin (X95738)
- LPC4 synthase (U50136)
- LYN (M16038)
- HoxA9 (U82759)
- CD33 (M23197)
- Adipsin (M84526)
- Leptin receptor (Y12670)
- Cystatin C (M27891)
- Proteoglycan 1 (X17042)
- IL-8 precursor (Y00787)
- Azurocidin (M96326)
- p62 (U46751)
- CyP3 (M80254)
- MCL1 (L08246)
- ATPase (M62762)
- IL-8 (M28130)
- Cathepsin D (M63138)
- Lectin (M57710)
- MIAD-3 (M69043)
- CD11c (M81695)
- Ebp72 (X85116)
- Lysozyme (M19045)
- Properdin (M83652)
- Catalase (X04085)



# Geny přispívající k vnímavosti ke kardiovaskulárním nemocem



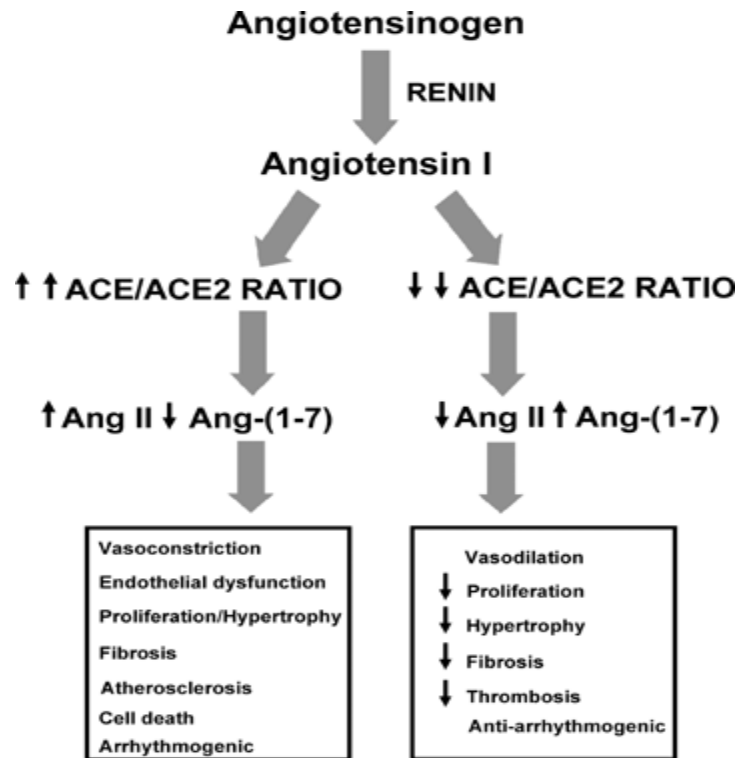
# RAS



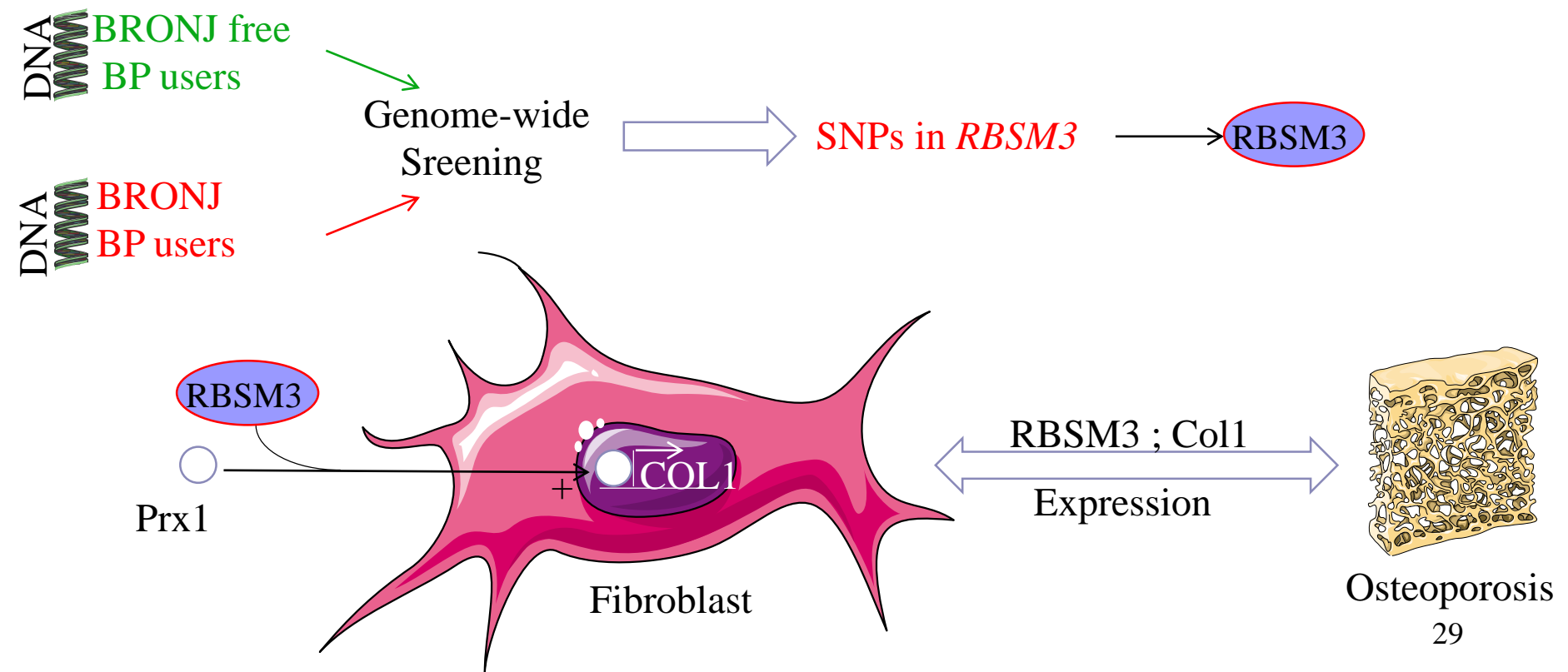
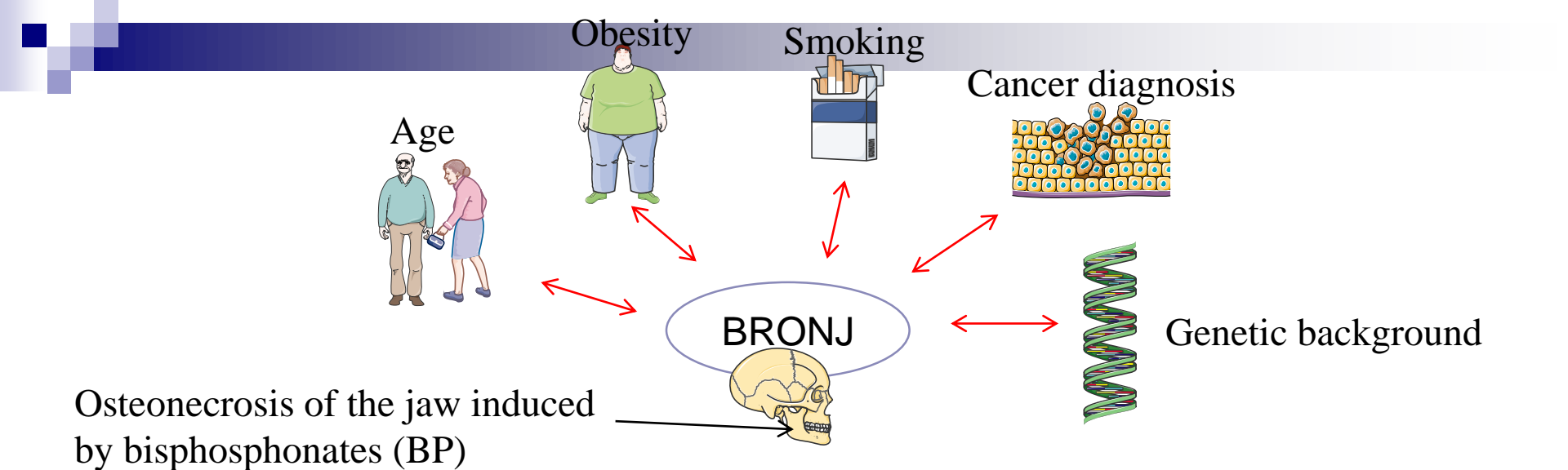
Geny v červeném oválu leží na X chromosomu (muži mají jen jednu alelu); významný rozdíl ve fyziologii mezi muži a ženami

The vasoconstrictor/proliferative and the vasodilator/antiproliferative actions of the RAS mediated by Ang II and Ang(1-7), respectively, depend on the ACE/ACE2 ratio balance

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; and Ang, angiotensinogen .

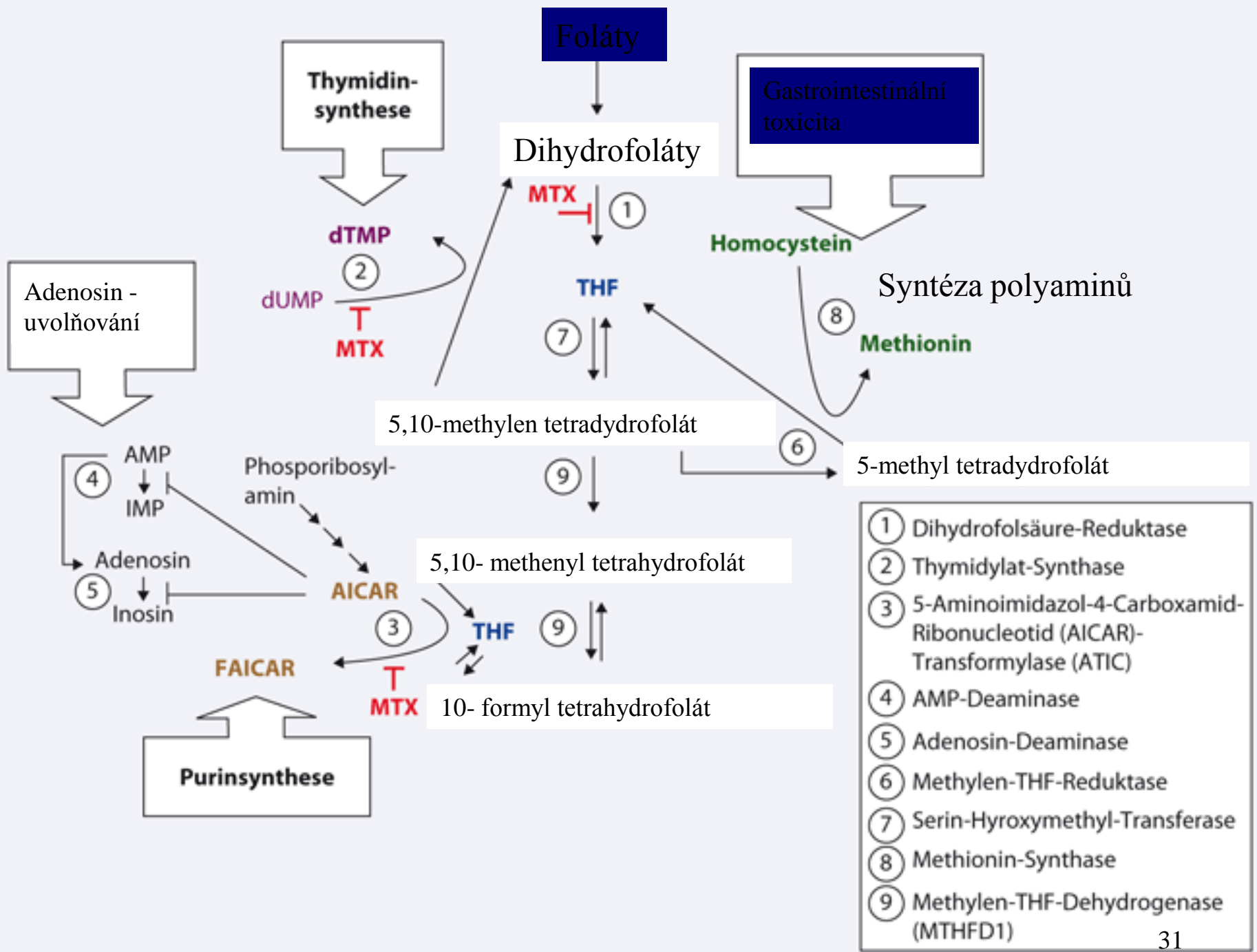






# Metotrexát u RA

- Efektivita léčby revmatoidní artritidy (RA) metotrexátem (MTX) 46% - 65 % (ACR 20)
- Při léčbě MTX se mohou vyskytnout nežádoucí účinky. Alespoň jeden u 72,9% pacientů, závažné až u 30% pacientů.
  - gastrointestinální toxicita (nevolnost, zvracení, průjem, 20% - 65%)
  - hepatotoxicita 10% - 43%
  - orální ulcerace 37%
  - alopecie až 4%
  - pulmonální toxicita 2,1% - 8%
  - útlum kostní dřeně lehký 12%
  - pancytopenie 0.8%



- ① Dihydrofolsäure-Reduktase
- ② Thymidylat-Synthase
- ③ 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleotid (AICAR)-Transformylase (ATIC)
- ④ AMP-Deaminase
- ⑤ Adenosin-Deaminase
- ⑥ Metylen-THF-Reduktase
- ⑦ Serin-Hydroxymethyl-Transferase
- ⑧ Methionin-Synthase
- ⑨ Metylen-THF-Dehydrogenase (MTHFD1)

# Účinek MTX v buňce – cíle pro SNPs

- **MTXPG přímo inhibuje enzymy** důležité pro syntézu purinů a pyrimidinů – thymidylát syntázu (**TYMS**) a dihydrofolát reduktázu (**DHFR**). DHFR se účastní na konverzi homocysteinu na methionin a tím pro **syntézu polyaminů**.

## Metabolismus adenosinu

- Ovlivnění metabolismu adenosinu patří k nejdůležitějším mechanismům protizánětlivého působení metotrexátu.
- **MTXPG inhubuje** 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza (ATIC), tím zprostředkovává vliv na **metabolismus adenosinu** (imunopresivní účinek).

# Nitrobuněčný metabolismus MTX

## – cíle pro SNPs

- **Vstup do buněk** pro foláty a antifoláty
- přenašeč **SLC19A1** nebo *reduced folate carrier* (RCF-1)
- folátové receptory (FR- $\alpha$  a FR- $\beta$ ), endocytóza - nižší afinita MTX k receptorům než foláty (malý význam metabolické cesty)
- **Transport MTX z buňky** - efluxní transportéry z rodiny ABC (ATP-binding cassette) např. (**ABCC1-4 a ABCG2**).
- **Intracelulární metabolismus** – přidání 2 až 5 glutamátových skupin  $\rightarrow$  aktivní metabolit, polyglutamát metotrexátu (**MTXPG**), v buňce se hromadí. Tento proces je katalyzován **folylpolyglutamát syntetázou (FPGS)** a je reverzibilní prostřednictvím **gamaglutamyl hydrolázy (GGH)**

# Methotrexát

Table 1. Pharmacogenetics of MTX transporters\*

Gene	Polymorphism	Amino acid substitution in enzyme	Biochemical effects	Clinical effects	Reference
RFC-1	G80A	Histidine to arginine at codon 27	May affect transcriptional activity of RFC1 gene and MTX entry into cell	May affect response to MTX	48, 72
ABCB1	C3435T	No amino acid substitution	May affect MTX entry into cell	May affect response to MTX	55

\* MTX = methotrexate; RFC-1 = reduced folate carrier 1; ABCB1 = ATP binding cassette transporter B1.

Table 2. Pharmacogenetics of MTHFR\*

Gene	Polymorphism	Amino acid substitution in enzyme	Biochemical effects	Clinical effects (ref.)
MTHFR	C677T	Alanine to valine	Thermolabile MTHFR with decreased activity; increased plasma homocysteine	May increase the following: GI toxicity (60); hepatic and GI toxicity, alopecia, stomatitis, and rash (62,63); headache, lethargy (74). No effect on toxicity (62); no effect on efficacy or toxicity (71)
MTHFR	A1298C	Glutamine to alanine	May decrease MTHFR activity and increase plasma homocysteine	May affect MTX efficacy (63); may increase susceptibility to RA and decrease MTX toxicity (62). No effect on efficacy or toxicity (71)

\* MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase; GI = gastrointestinal; MTX = methotrexate; RA = rheumatoid arthritis.

# Methotrexát

**Table 3.** MTX pathway pharmacogenetics

Gene	Role in MTX pathway	Polymorphism	Effects on gene product/enzyme	Clinical effects	Reference
ATIC	Conversion of AICAR to 10-formyl-AICAR; target of MTX	C347G	May decrease ATIC activity and affect AICAR accumulation and adenosine release	May affect MTX efficacy and toxicity	72, 74
TYMS	Conversion of dUMP to dTMP; target of MTX	5'-UTR 28-bp repeat	May increase TYMS enzyme activity	May affect MTX efficacy and toxicity	71, 74
		3'-UTR 6-bp deletion	May decrease TYMS mRNA stability and expression	May affect MTX efficacy	71

\* MTX = methotrexate; ATIC = aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase; AICAR = aminoimidazole carboxamide ribonucleotide; TYMS = thymidylate synthase; 5'-UTR = 5'-untranslated region.

**Table 4.** Other genes with potential pharmacogenetic implications in the MTX pathway\*

Gene	Role in MTX pathway	Polymorphism	Effects on gene product/enzyme	Postulated clinical effects	Reference
GGH	Conversion of long-chain MTXPGs to short-chain MTXPGs by removal of glutamates	C452T	Decreased binding affinity of GGH for MTXPGs	May affect MTX efficacy	76
		C401T	Affects MTXPG levels	–	47
DHFR	Reduction of DHF to THF; target of MTX	3'-UTR T721A and C829T	May increase DHFR expression	May affect MTX efficacy	77
MS	Methylation of homocysteine to methionine	A2756G	May decrease MS activity; increase homocysteine levels	May affect MTX toxicity	79, 80
MTRR	Methylation of cobalamin cofactor required for the action of MS	A66G	May decrease MTRR activity; increase homocysteine levels	May affect MTX toxicity	81, 82

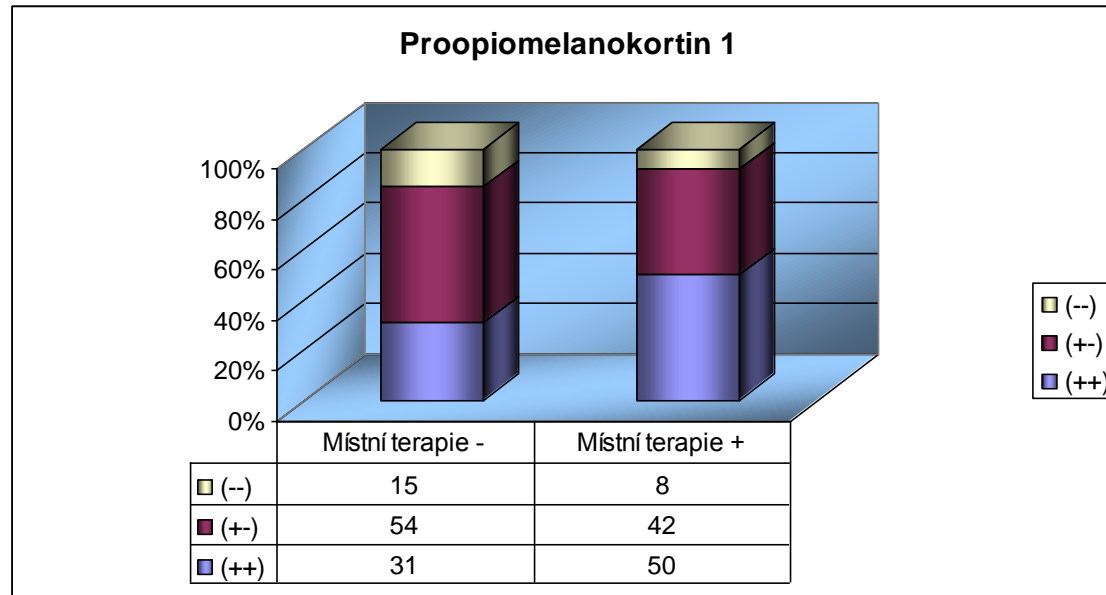
\* MTX = methotrexate; GGH =  $\gamma$ -glutamyl hydrolase; MTXPGs = methotrexate polyglutamates; DHFR = dihydrofolate reductase; DHF = dihydrofolate; THF = tetrahydrofolate; 3'-UTR = 3'-untranslated region; MS = methionine synthase; MTRR = methionine synthase reductase.

# MDR1


- MDR1 (ATP-binding cassette B1/multidrug resistance 1) is an efflux pump that transports toxic endogenous substances, drugs and xenobiotics out of cells.
- It is known to affect susceptibility to many hematopoietic malignancies.
- ABCB1/MDR1 polymorphisms may either change the protein expression or alter its function, suggesting a possible association between ABCB1/MDR1 single nucleotide polymorphisms (SNP) and clinical aspects of T-cell lymphoma.
- Therefore, association of two polymorphisms in the gene with clinical staging and therapy was evaluated.



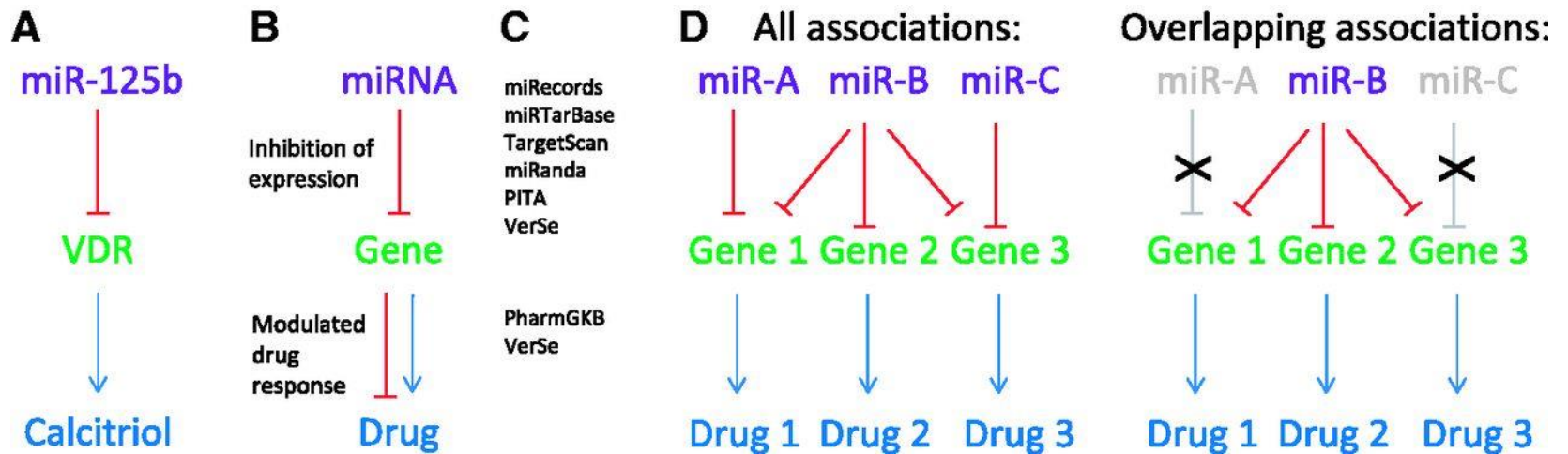
# CTCL – kožní T-lymfomy



OR pro genotypy -- a +- u pacientů bez místní terapie oproti pacientům s místní terapií je 2,20, 95% CI 1,19-4,07; P=0,008, senzitivita 0,687, specificita 0,500, síla testu 0,666.

- 
- MicroRNA (miRNA) – regulace genů důležitých pro funkci léků.
  - Interakce miR-gen–lék prostřednictvím degradace farmakologicky relevantního cíle.

(A) An example of an experimentally verified miRNA pharmacogenomic set. miR-125 b inhibits vitamin D receptor (VDR) expression.

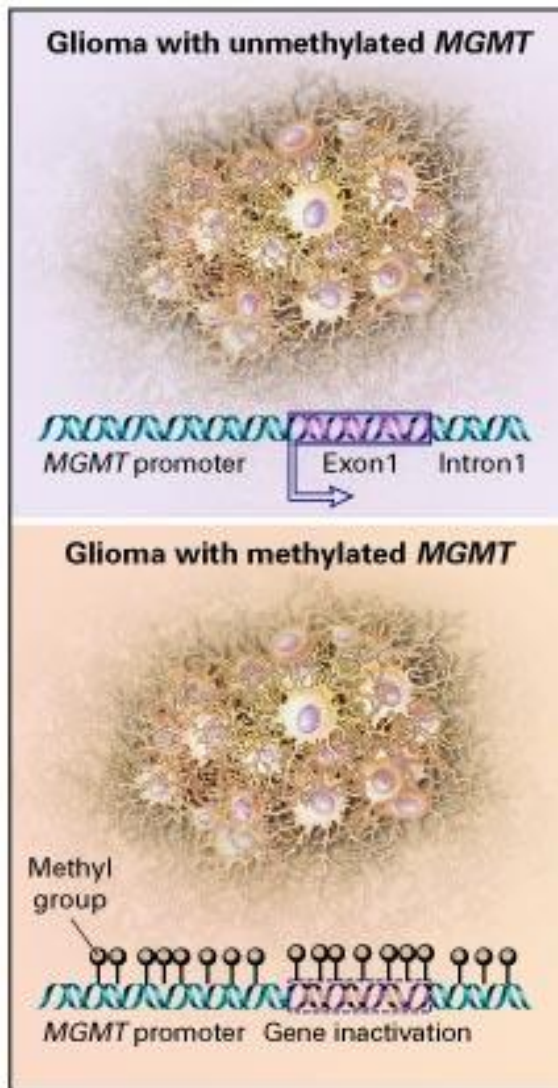


Rukov J L et al. Brief Bioinform 2013;bib.bbs082

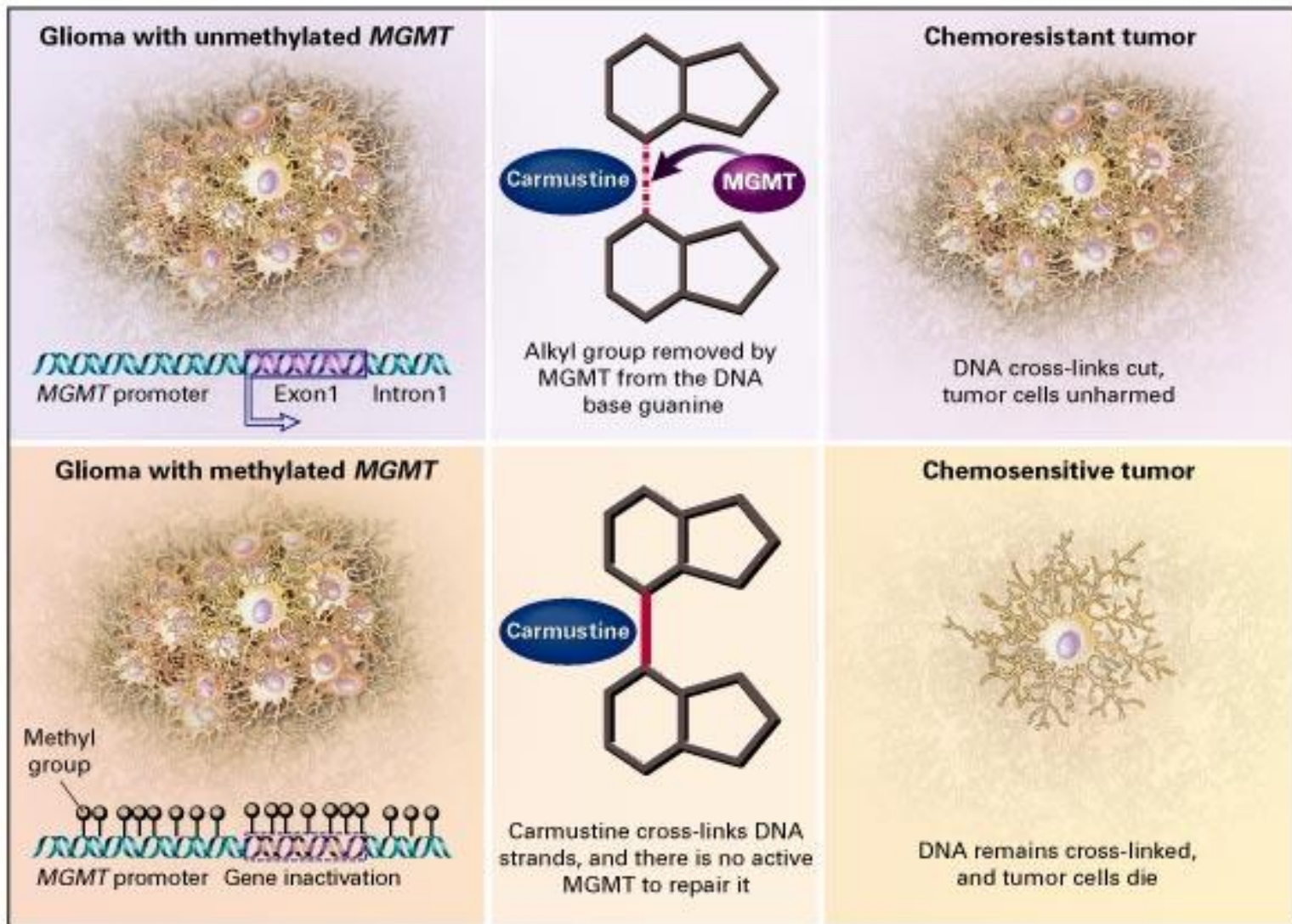
# Epigenetika

MGMT – methylguanine-DNA  
methyltransferase

Metilatilace promotoru MGMT  
silencing genu

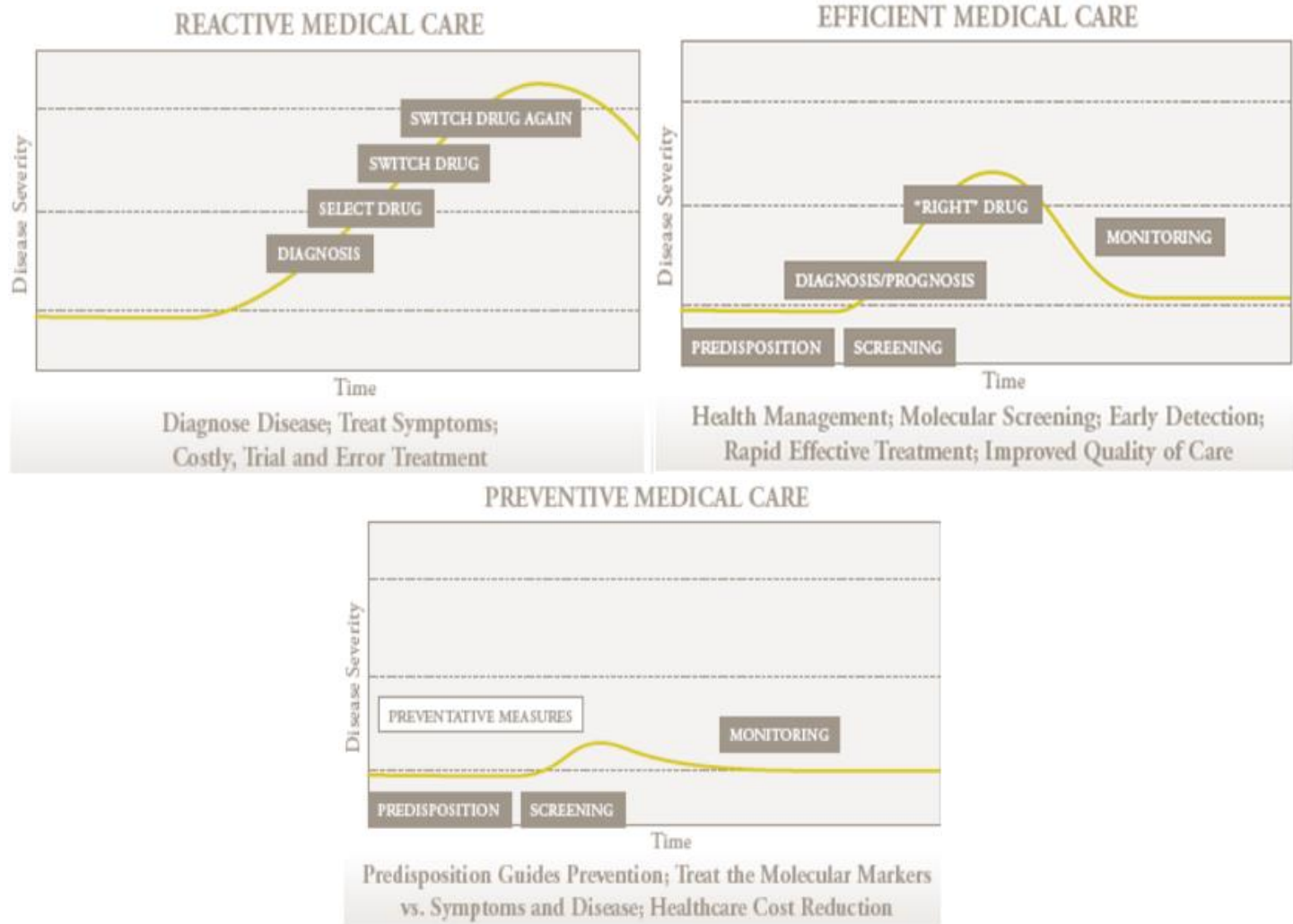


From: Esteller M, et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM* 243:1350-1354, 2000.



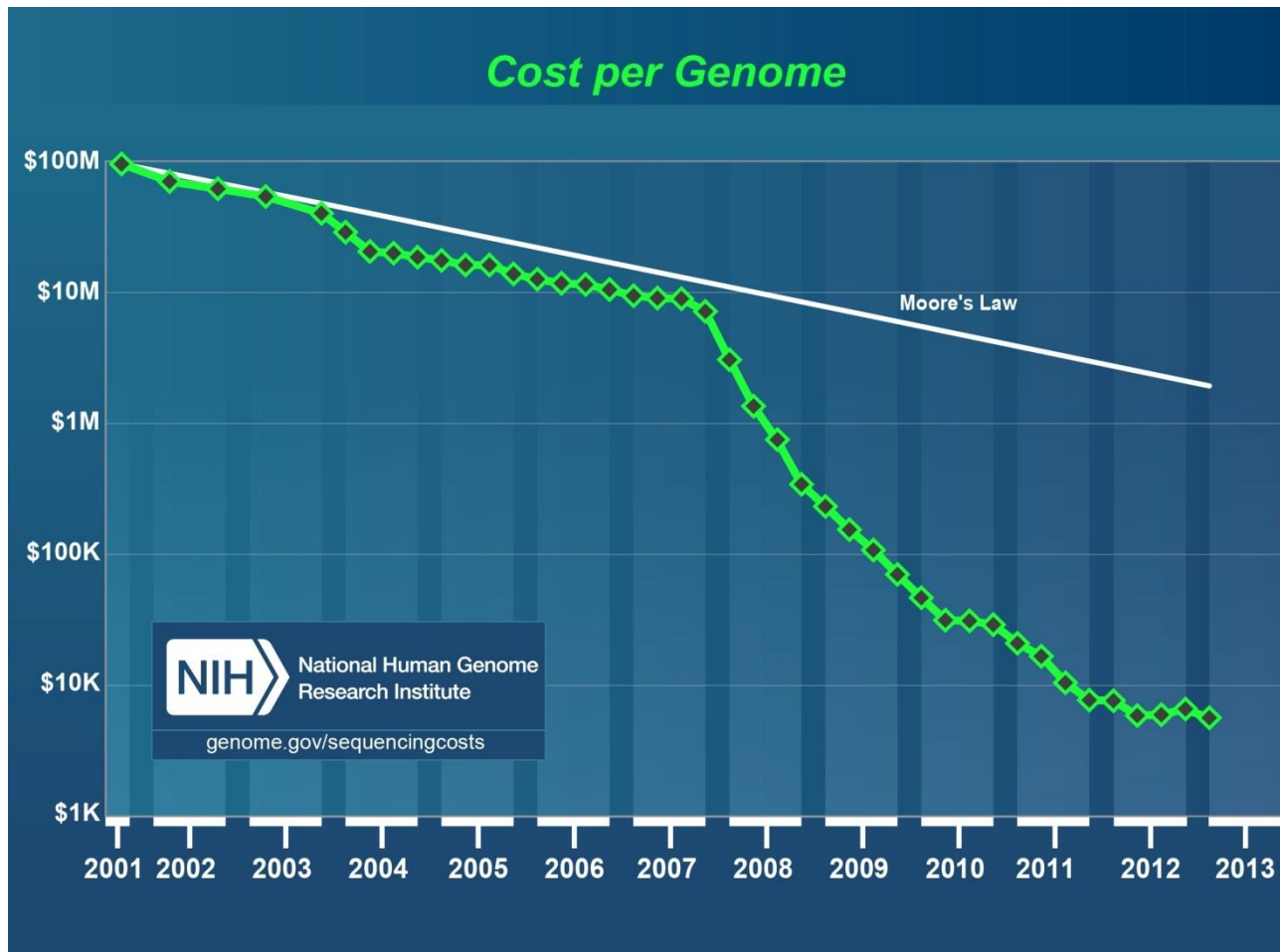
From: Esteller M, et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM* 243:1350-1354, 2000.

# Perzonalizovaná medicína





# Náklady





gene therapy



# Genová terapie: typy nemocí

- Infekční nemoci
- Rakoviny
- Vrozené nemoci
- Nemoci imunitního systému

# Genová terapie

- Zahrnuje jakoukoliv proceduru, určenou k léčení nemoci **genetickou modifikací buněk pacienta**.
- Do buněk se **transferují**: geny, jejich části nebo oligonukleotidy.
- Genová terapie *in vivo*: transfer přímo do buněk pacienta
- Genová terapie *in vitro*: genové modifikace probíhají mimo organismus
- Genová terapie *ex vivo*: modifikované buňky se vracejí do organismu

# Genová terapie

- ***Klasická genetická terapie*** (dopřít geny do vhodných cílových buněk, aby bylo dosaženo optimální exprese vnesených genů) s cílem:
  - 1. zajistit produkci látky, která chybí
  - 2. aktivovat buňky imunitního systému ve snaze pomoci odstranit nemocné buňky

# Neklasická genová terapie

- Inhibice exprese genů asociovaných s patogenezi
- Korekce genetického defektu a obnovení normální genové exprese
- Současná genová terapie se omezuje na terapii **somatických** mutací.
- Etické problémy s potenciální terapií **zárodečných** mutací.

# Rekombinantní léky je možno produkovat expresním klonováním v mikroorganismech nebo v transgenních zvířatech

## V mikroorganismech:

- ✓ Výhody: dostatečná množství produkovaných látek
- ✓ Nevýhody:
- ✓ Pozměněné produkty v důsledku odlišných posttranslačních úprav bílkovin se stejnou primární strukturou (glykosylace)
- ✓ problémy s purifikací

## V transgenních zvířatech:

- ✓ možnost navodit podobné posttranslační systémy jako u člověka

# „Genetically engineered“ protilátky a vakcíny

Uměle produkované terapeutické protilátky jsou navrženy jako monospecifické (poznají jen jeden typ antigenního místa), které poznají specifické antigeny asociované s nemocí, což vede k zabití nemocných buněk

Typy nemocí:

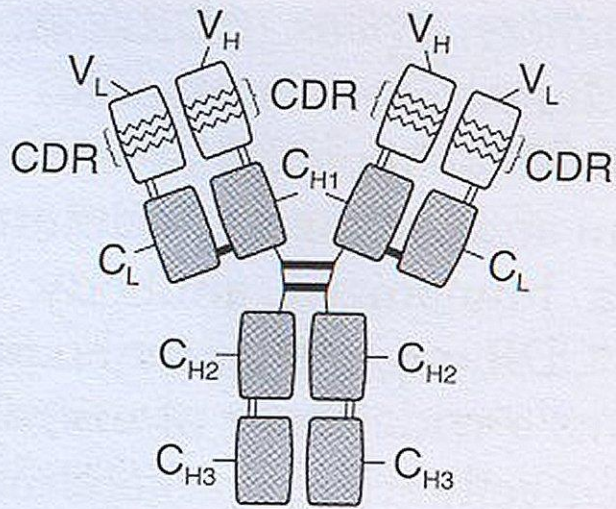
- Lymfomy, leukemie, infekční nemoci, autoimunitní nemoci.

Hybridomy = heterogenní směs hybridních buněk (vzniklých fúzí), které jsou schopny produkovat specifické protilátky (B lymfocyty imunizovaného zvířete) a přitom se v kultuře neomezeně dělit (nesmrtelný myší B-lymfocytární tumor).

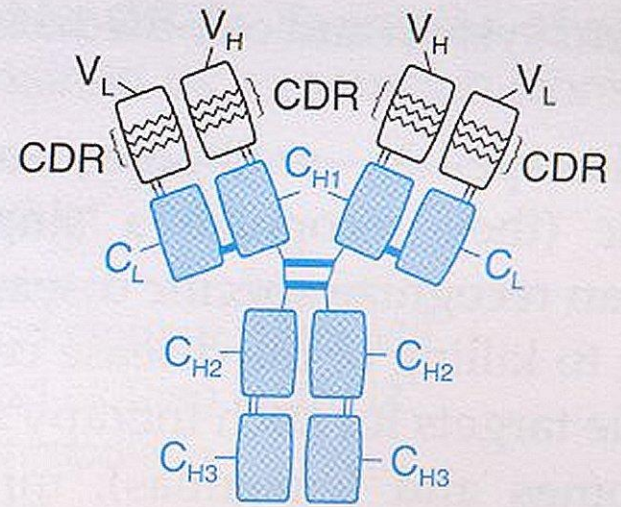
# Chimerické a humanizované protilátky

- Rekombinantní protilátky humánní-hlodavčí
- Humanizace hlodavčích mAb umožňuje získat velké množství protilátek a zároveň zabránit imunitní odpovědi lidského příjemce:
  - chimerické V/C protilátky)
  - CDR (complementarity determining regions) graft protilátky
- Infekční patogeny a antigeny nádorových buněk

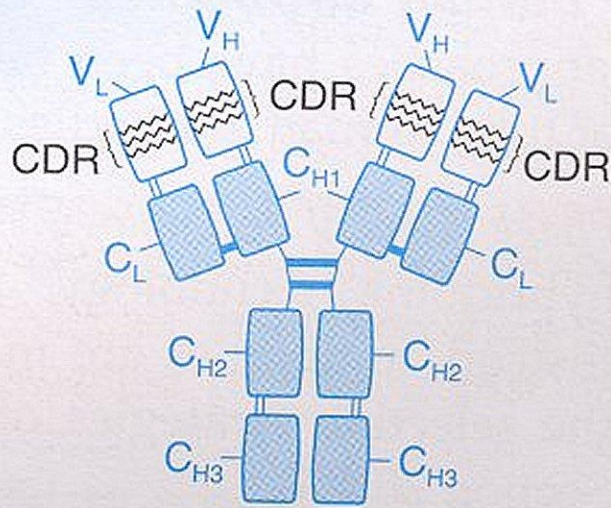




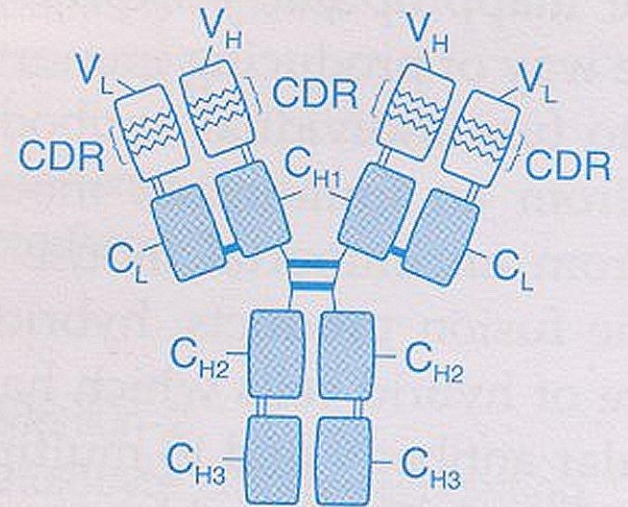
All-rodent antibody



Chimeric (V/C) antibody



Humanized antibody



Fully human antibody



**Table 22.2:** Examples of the clinical potential of humanized antibodies

Target	Clinical potential
CDw52	Lymphomas, systemic vasculitis, rheumatoid arthritis
CD3	Organ transplantation
CD4	Organ transplants, rheumatoid arthritis, Crohn's disease
IL-2 receptor	Leukemias and lymphomas, organ transplants, graft-versus-host disease
TNF- $\alpha$	Septic shock
HIV	AIDS
RSV	Respiratory syncytial virus infection
HSV	Neonatal, ocular and genital herpes infection
Lewis-Y	Cancer
p185 <sup>HER2</sup>	Cancer
PLAP	Cancer
CEA	Cancer

# Plně lidské protilátky

- **Technologie fágového displaye:** protilátky jsou tvořeny in vitro napodobováním selekční strategie imunitního systému
- **Transgenní myši:** Transfer kvasinkových umělých chromozomů s velkými segmenty lidských těžkých a lehkých Ig řetězců do myších embryonálních buněk. Narozené myši obsahují velmi pozoruhodnou porci lidských V genetických segmentů a jsou schopny tvořit lidské protilátky

# „Geneticky enginnered“ vakcíny

- Pomocí rekombinantní technologie:
- Vakcíny nukleových kyselin:
- bakteriální plasmidy s geny pro patogeny nebo tumorové antigeny, podávané i.m. v solném roztoku. Obsahují silný virový promotor.
- „gene gun“ - zlaté perly, do nichž byla precipitována DNA

# „Geneticky enginnered“ vakcíny

- Genetická modifikace antigenu – např. fúze cytokinu s antigenem ke zvýšení antigenicity
- Genetická modifikace virů- virové vektory
- Genetické modifikace mikroorganismů, které způsobí:
  - odstranění genů nutných pro patogenezu
  - expresi exogenního genu v bakteriích nebo parazitech po jeho inzerci do těchto organismů

# Technologie klasické genetické terapie

- Jedná se o zacílení buněk nemocné tkáně
  - Geny mohou inzertovány do buněk pacienta přímo a nepřímo
  - Inzertované geny se mohou
    - ✓ Integrovat do chromozomů
    - ✓ Zůstat extrachromozomálně (epizomy)

# Genetický transfer

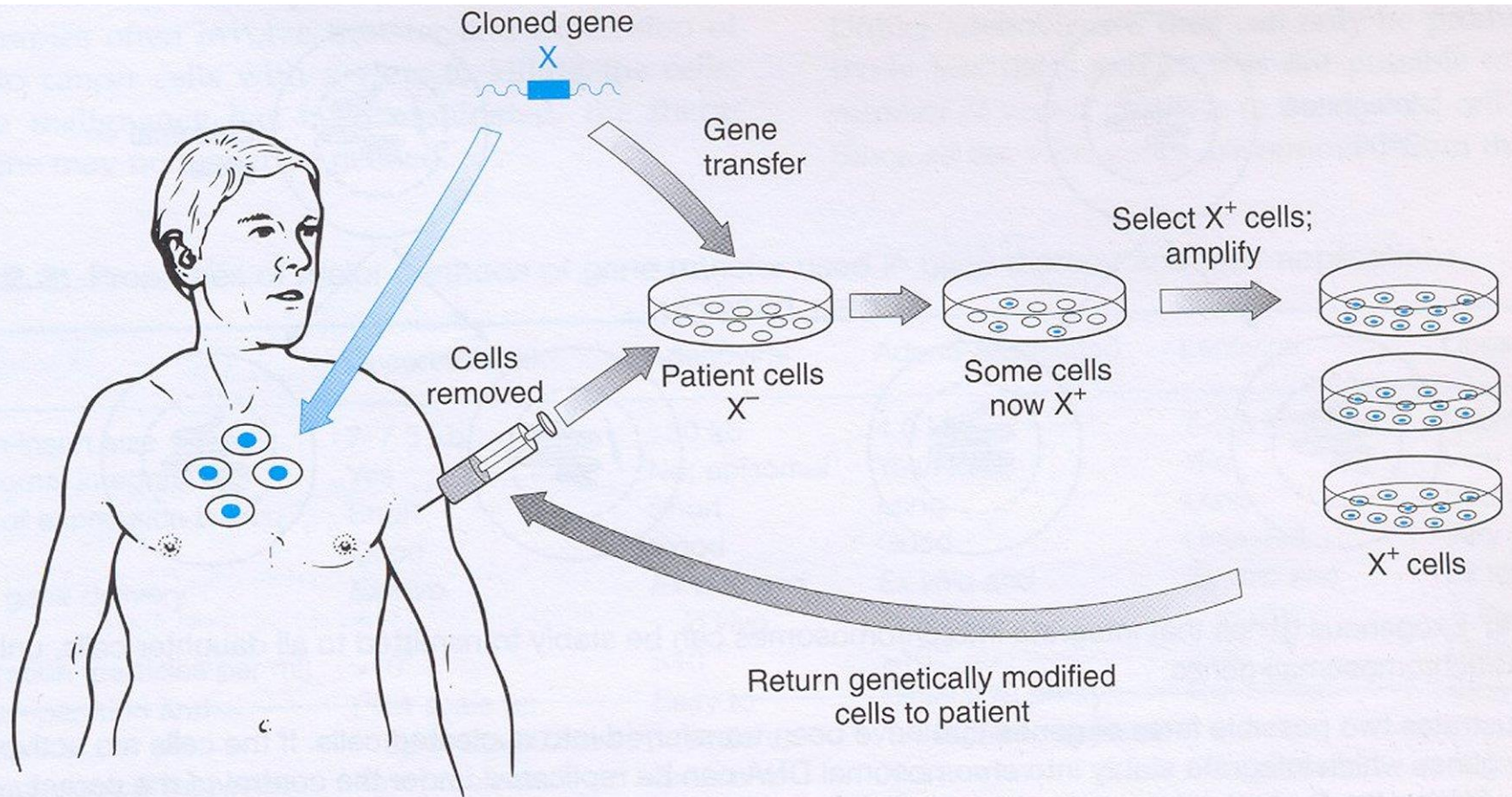
## ➤ *Ex vivo*

- ✓ Transfer klonovaných genů do buněk v kultuře (transplantace autologních geneticky modifikovaných buněk)

## ➤ *In vivo*

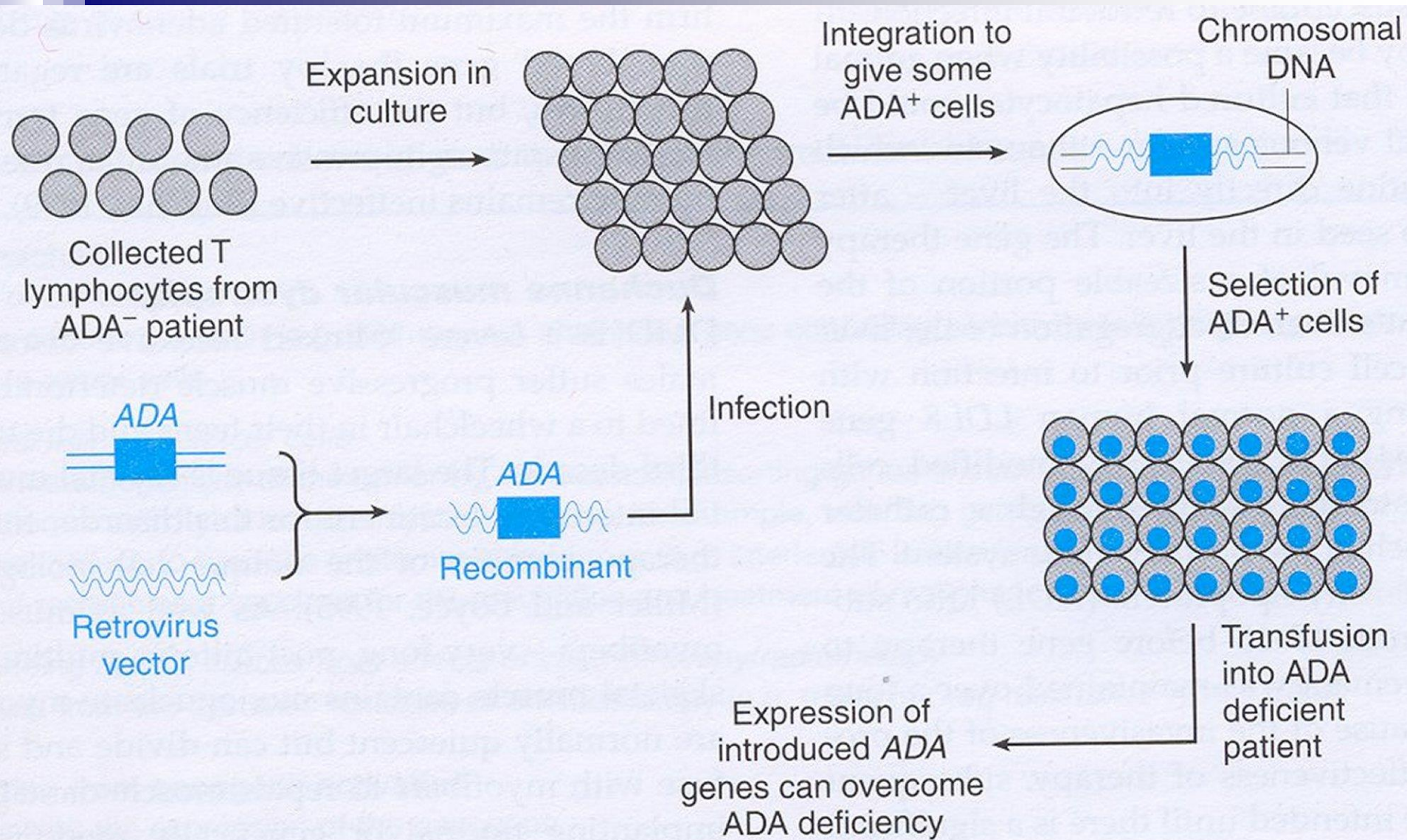
- ✓ Transfer se děje přímo do tkáně pacienta. Pomocí liposomů nebo virových vektorů.





**Figure 22.3:** *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.



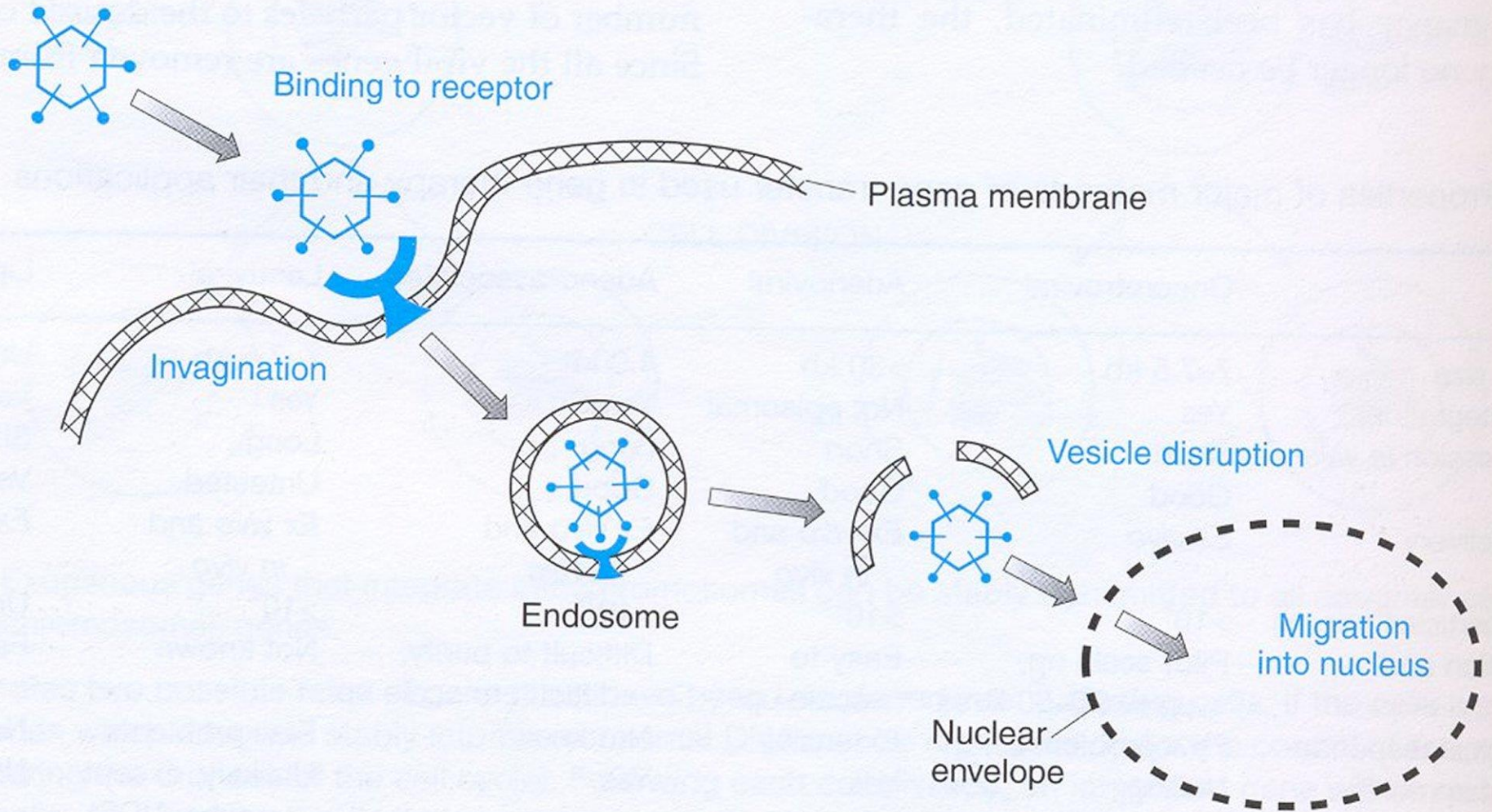


**1:** *Ex vivo* gene augmentation therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency.



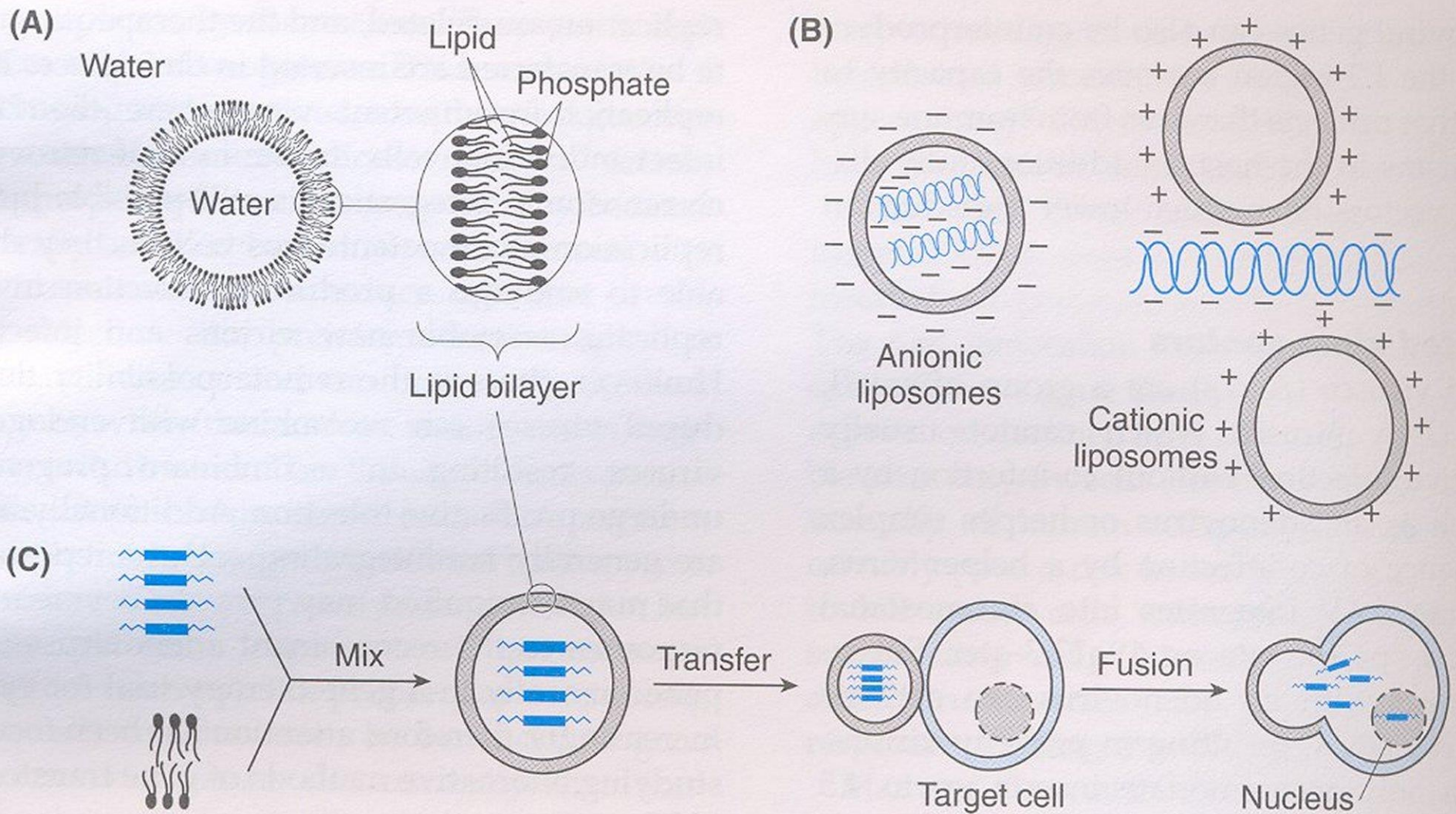
# Principy genetického transferu

- cDNA s kompletní DNA kódující sekvencí je modifikována k zajištění vysoké hladiny exprese, např. pomocí silného virového vektoru. Následná inserce genu se děje
  - **A) do chromozomu**
    - gen se bude rozšiřovat do dalších buněk
    - zajištěna vysoká úroveň exprese (kmenové buňky)
    - náhodná inserce-různá lokalizace –různá úroveň exprese-smrt jednotlivé buňky-rakovina (aaktivace onkogenu, deaktivace supresorového nebo apoptického genu-výhoda transferu ex vivo.
  - **B) extrachromozomálně** – nevýhoda nejistého dlouhodobého účinku



Adenoviruses enter cells by receptor-mediated endocytosis.





*In vivo liposome gene delivery.*



**Table 22.5:** Examples of gene therapy trials for inherited disorders

Disorder	Cells altered	Gene therapy strategy
ADA deficiency	T cells and hemopoietic stem cells	<i>Ex vivo</i> GAT using recombinant retroviruses containing an <i>ADA</i> gene
Cystic fibrosis	Respiratory epithelium	<i>In vivo</i> GAT using recombinant adenoviruses or liposomes to deliver the <i>CFTR</i> gene
Familial hypercholesterolemia	Liver cells	<i>Ex vivo</i> GAT using retrovirus to deliver the LDL receptor gene ( <i>LDLR</i> )
Gaucher's disease glucocerebrosidase	Hemopoietic stem cells	<i>Ex vivo</i> GAT using retroviruses to deliver the gene ( <i>GBA</i> )

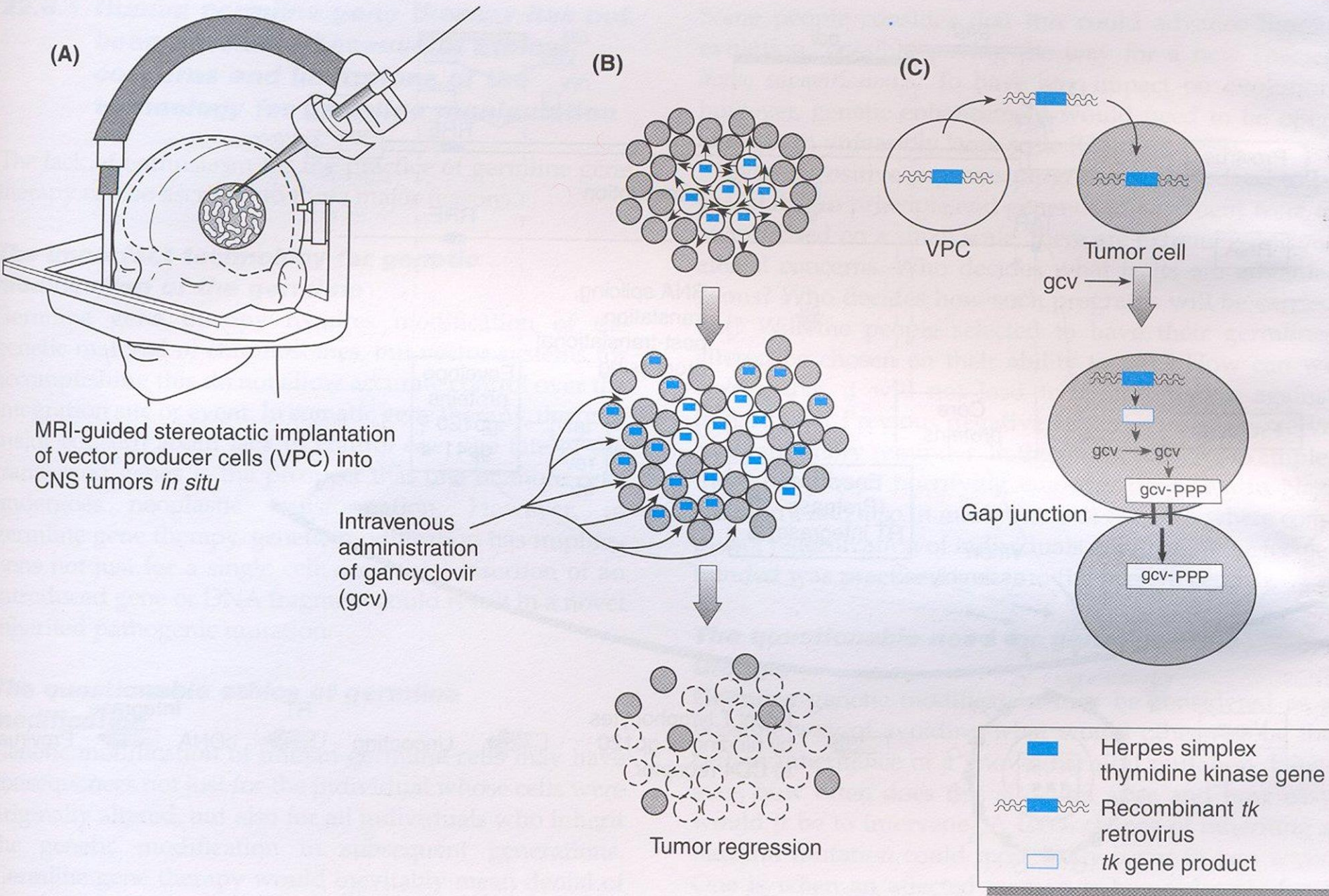
GAT, gene augmentation therapy.



**Table 22.7:** Examples of cancer gene therapy trials

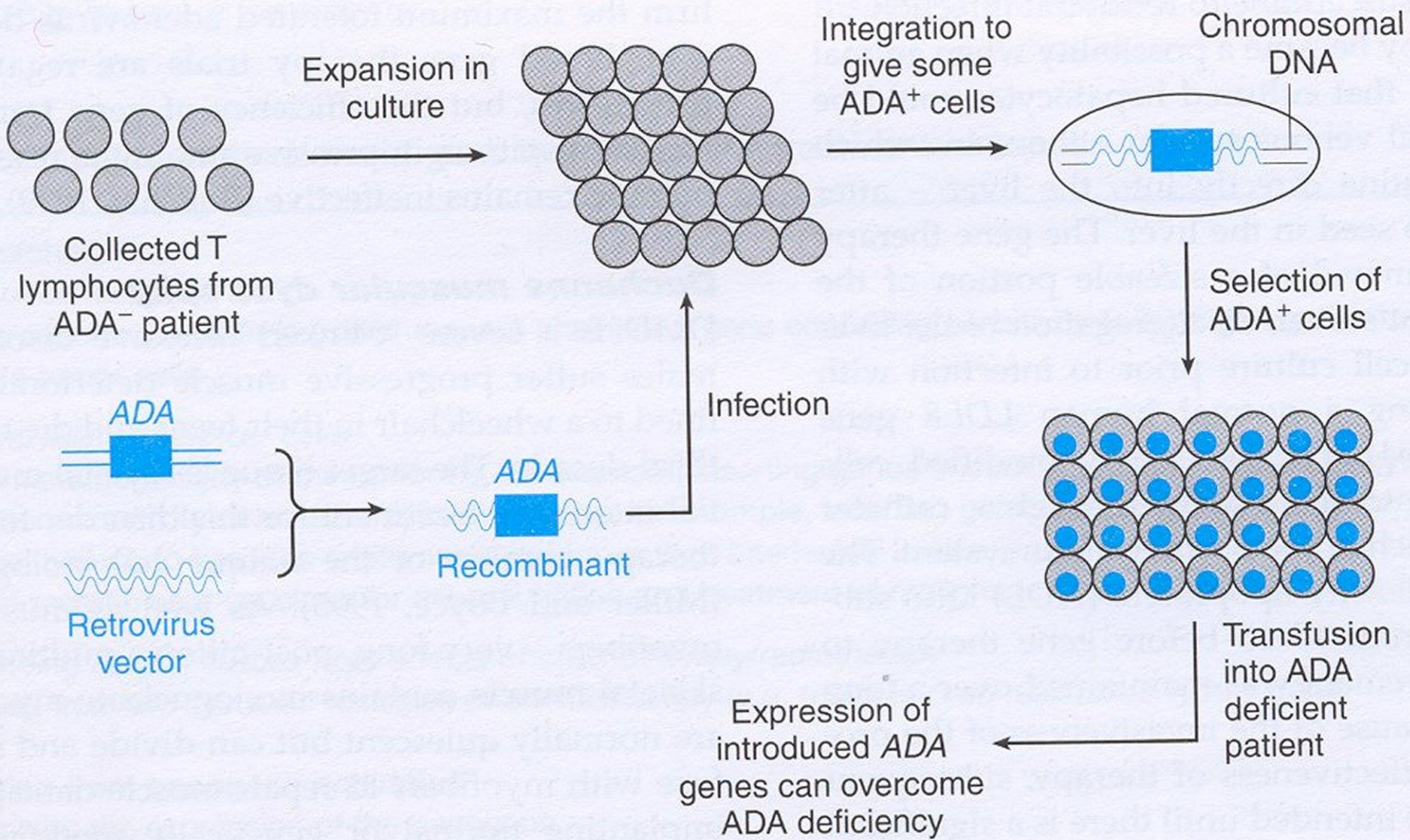
Disorder	Cells altered	Gene therapy strategy
Brain tumors	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i> Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Implanting of murine fibroblasts containing recombinant retroviruses to infect brain cells and ultimately deliver HSV-tk gene DNA transfection to deliver antisense <i>IGF1</i>
Breast cancer	Fibroblasts <i>ex vivo</i> Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Colorectal cancer	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin
Malignant melanoma	Fibroblasts <i>ex vivo</i> Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i> Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>IL4</i> genes Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin Retroviruses to deliver <i>IL2</i> gene
Myelogenous leukemia	T cells/tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Neuroblastoma	Tumor cells	Retroviruses to deliver <i>TNFA</i> gene
Non-small cell lung cancer	Tumor cells Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver HSV-tk gene Retroviruses to deliver antisense <i>KRAS</i>
Ovarian cancer	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver wild-type TP53 gene Retroviruses to deliver HSV-tk gene
Renal cell carcinoma	Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or TNF genes
Small cell lung cancer	Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Solid tumors	Tumor cells <i>ex vivo</i> Tumor cells <i>in vivo</i>	DNA transfection to deliver <i>IL2</i> gene Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin





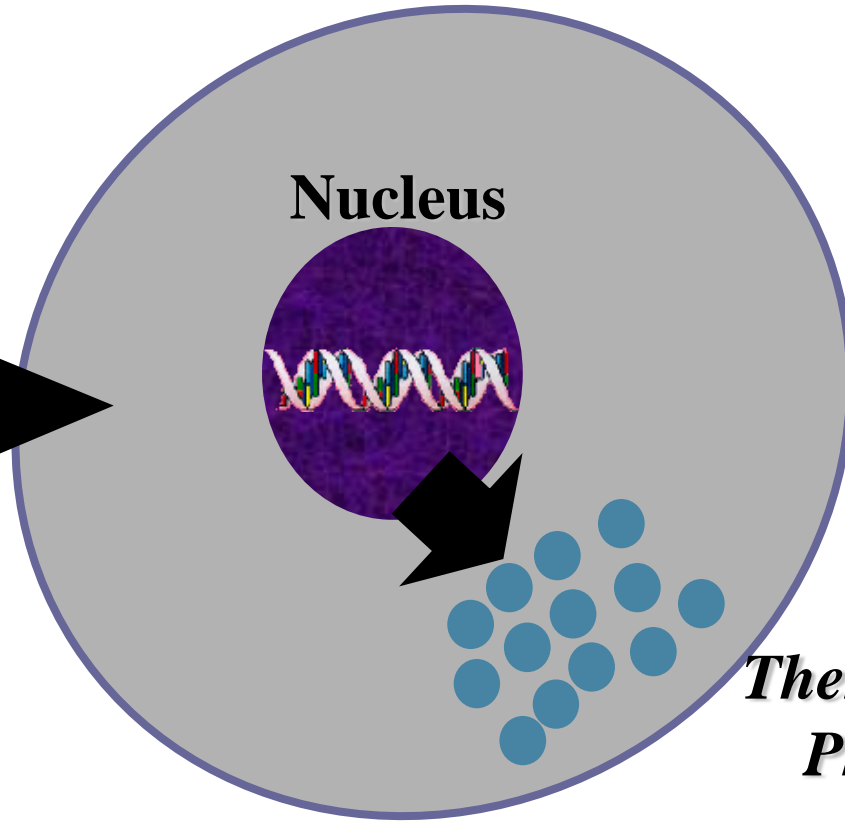
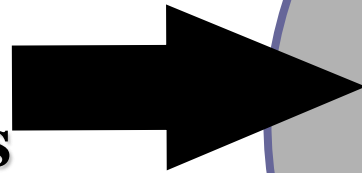
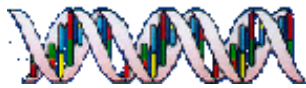
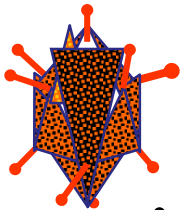
**Figure 22.13:** *In vivo* gene therapy for brain tumors.





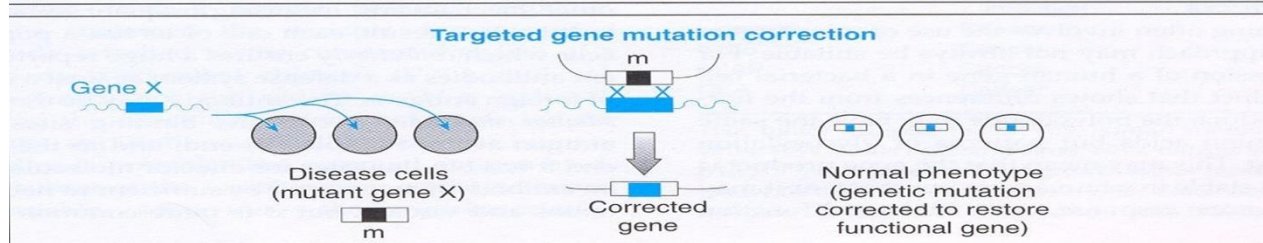
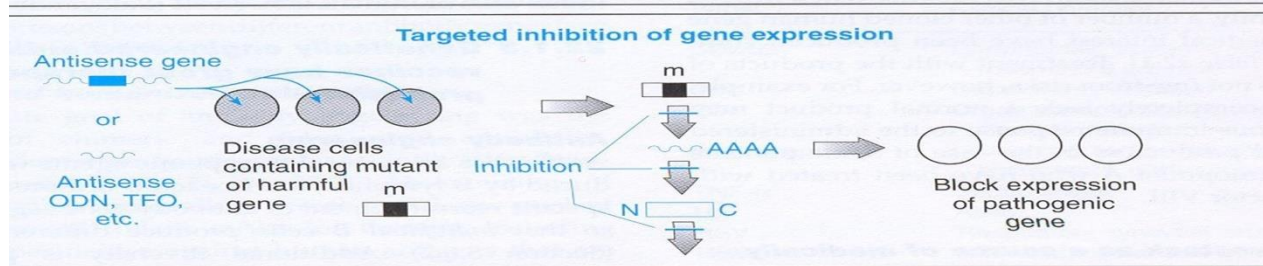
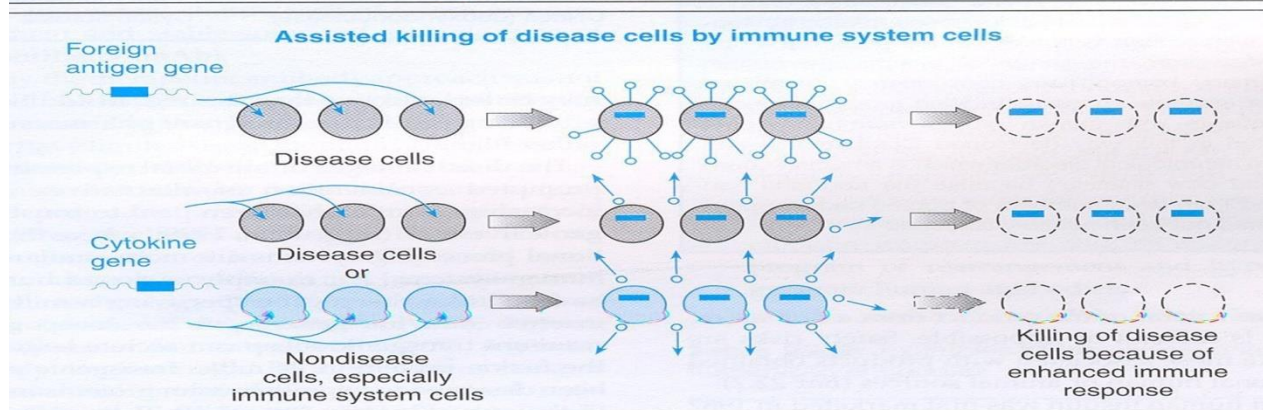
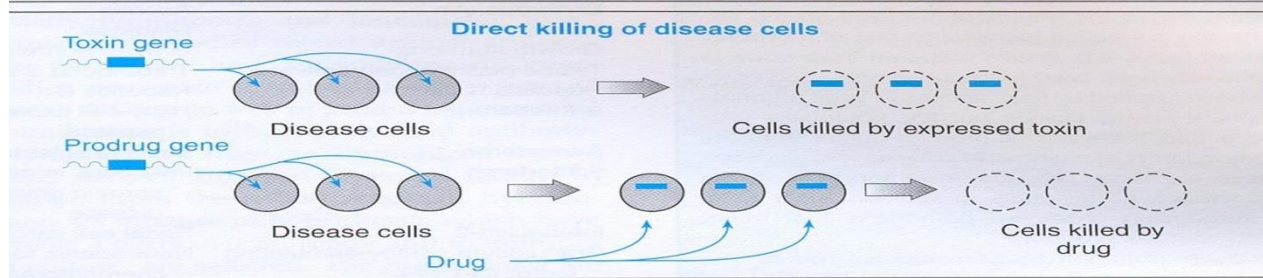
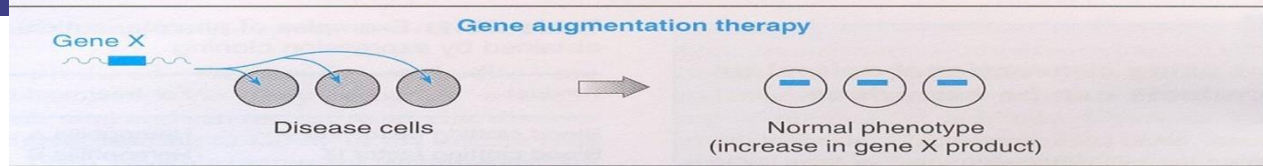
1: Ex vivo gene augmentation therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency.

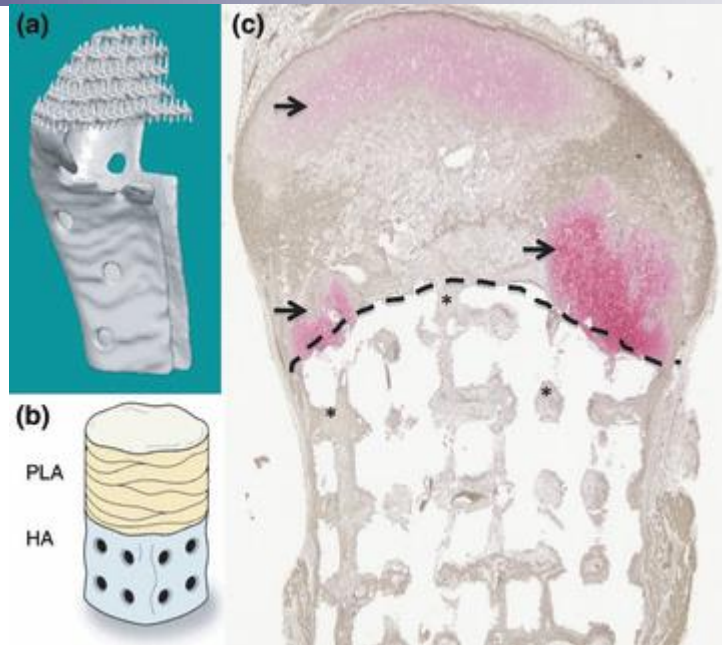
# Principy genové terapie



Target Cell







Tissue Engineering v praxi: - temporomandibulární kloub.

(a) design teoretického, místně specifického implantátu temporomandibulárního kloubu pomocí pevné výroby bez formy

(b) Kompozitní konstrukce z PLLA s **diferencovanými prasečími chondrocyty a hydroxyapatitem (HA)**.

(c) Implantát za 4 týdny po implantaci.

#### Review Article

Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation

E. L. SCHELLER\*, P. H. KREBSBACH\* & D. H. KOHN\*,† \*Department of Biologic and Materials Sciences, School of Dentistry, J Oral Rehabil. 2009 Feb 17. [Epub ahead of print -**doporučuji přečíst!!!**]

# 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

# Animal Models are Useful to Study Potential Gene Transfer Vectors

## Animal Model

MRL/*lpr* mice

W/W<sup>v</sup> mice

Wobbler mice

db/db mice

*spf* mouse

*mdx* mice

*cftr*-KO mouse

Watanabe rabbit

hemophilic dogs

various MPS defects (dog, cat, rat)  
storage

## Disease

Lupus

Fanconi's anemia

ALS

Diabetes

OTC deficiency

Muscular dystrophy

Cystic fibrosis

Hypercholesterolemia

Hemophilias A/B

Lysosomal

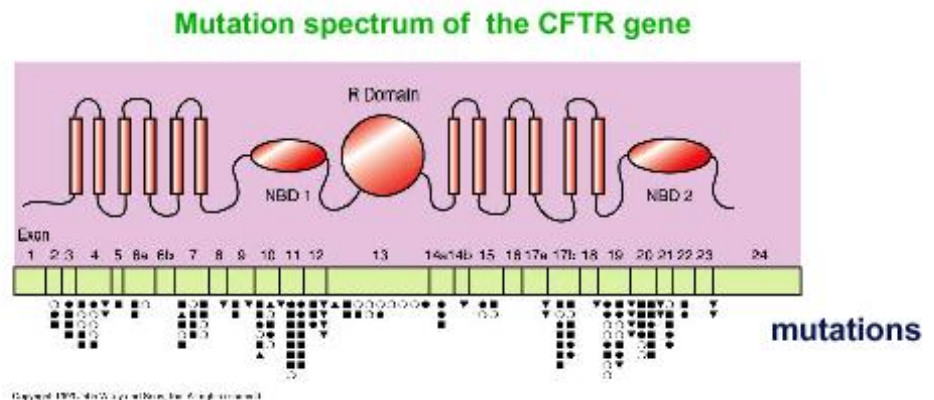
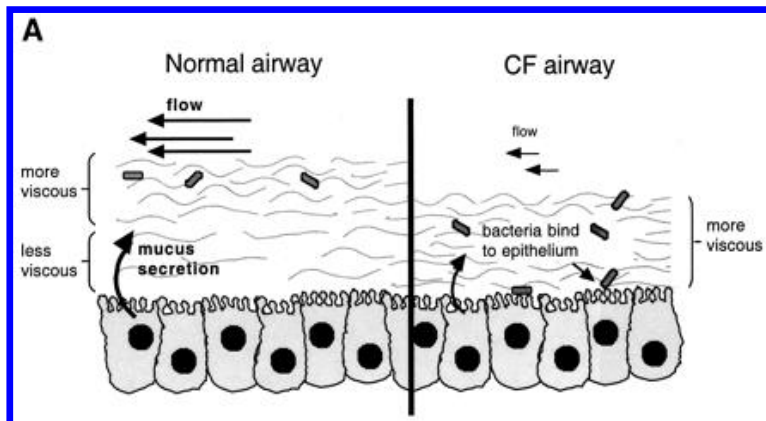
# Nemoci v současnosti léčené genovou terapií - př. ve fázi klinického testování

<b>nemoc</b>	<b>defekt</b>	<b>cílové buňky</b>	<b>četnost</b>
<b>těžká imunodeficience</b> (SCID)	adenin deaminasa	buňky kostní dřeně T-lymfocyty	1/1.000.000
<b>hemofilie</b> muži	krevní faktor VIII a IX	játra, svaly	1/1.000.000
<b>Cystická fibrosa</b>	CF	plicní alveoly	1/2.500
<b>Deficience</b> <b>alfa-1-antitrypsinu</b>	emfyzém	plicní alveoly	1/3.500
<b>rakovina</b>	nespecifické		1/4
<b>Neurodegenerativní nemoci</b> Parkinson, Alzheimer	degradace neuronů	neurony v mozku	1/250
<b>infekční nemoci</b> AIDS, hepatitis B		T-lymfocyty, makrofágy	



# Cystická fibróza

- mutace v iontovém přenašeči CFTR transmembrane conductance regulator
- nejvíce postihuje plicní alveoly, střevní epitel a pankreas – zvýšená produkce hlenu, citlivost k plicním infekcím.
- výhodou pro terapii je že stačí pouze několik molekul proteinu na buňku aby se jí vrátila normální funkčnost.
- úspěšné pokusy v kulturách a na myších transformovaných pomocí liposomů
- u lidí se zavedla jako pomocná léčba sprejování adenoviru nesoucího transgen CFTR do nosu, účinné v plicích, nepůsobí na slinivku

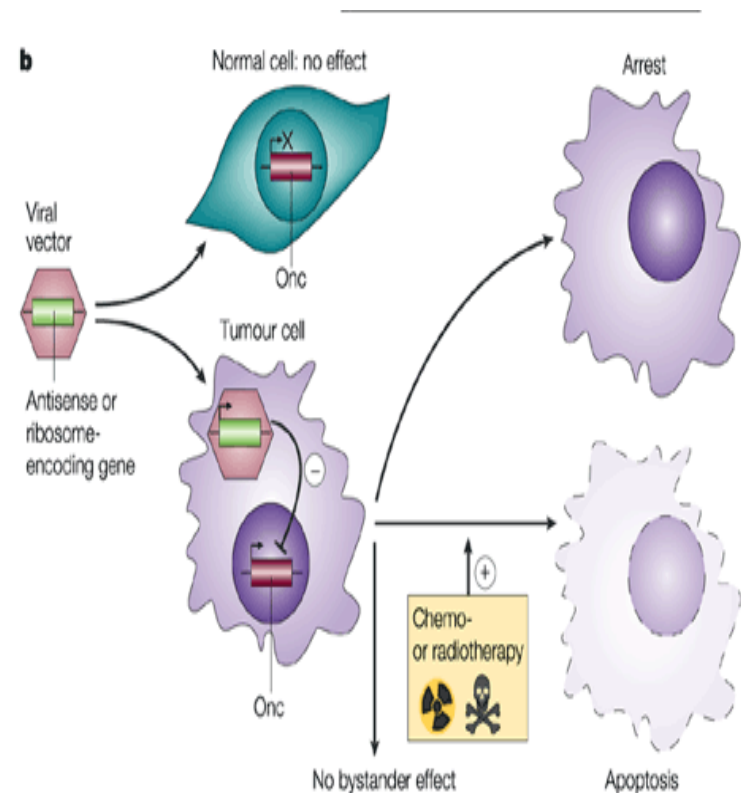
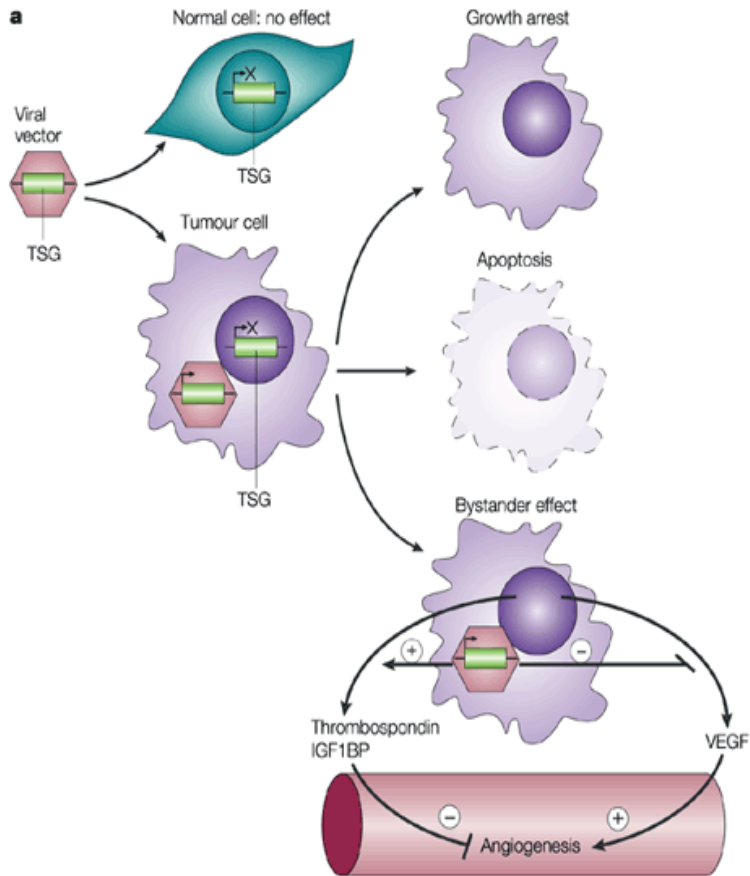


# principy genové terapie rakoviny

využití onkoretrovirálních vektorů

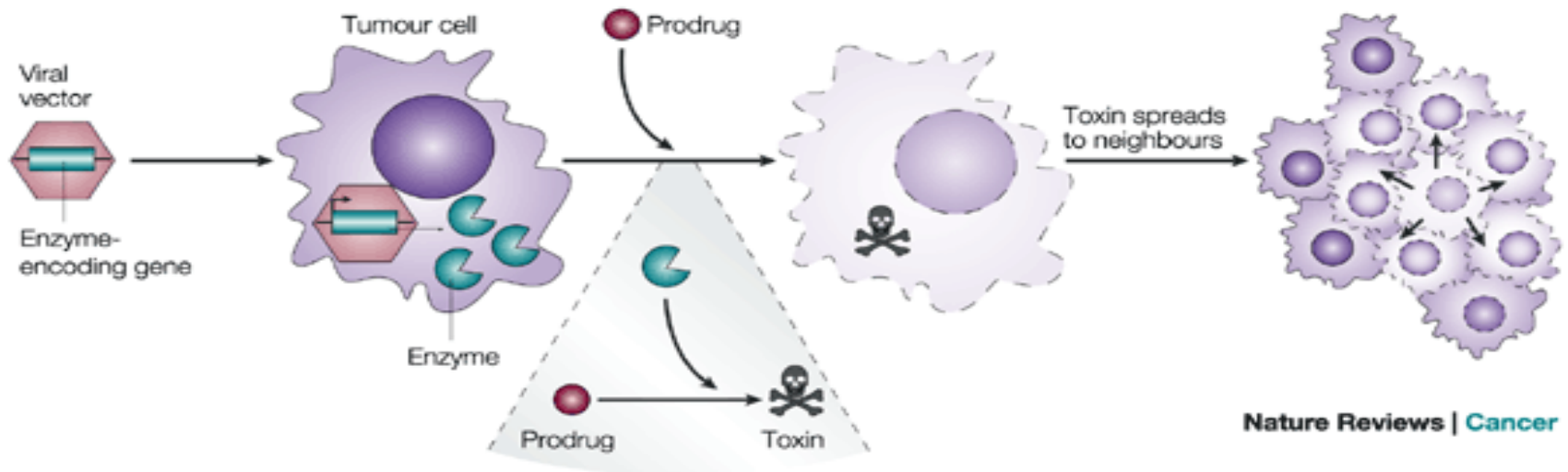
doručení nemutovaného supresorového genu p53

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



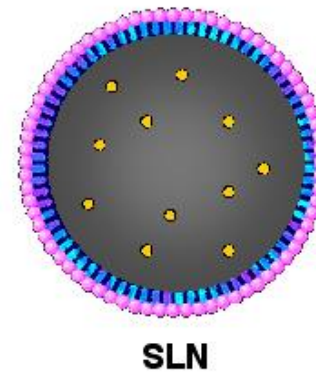
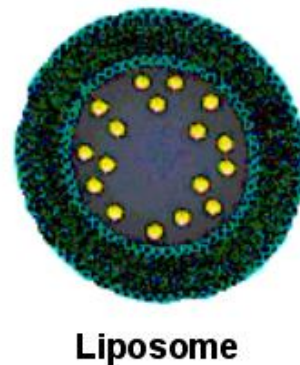
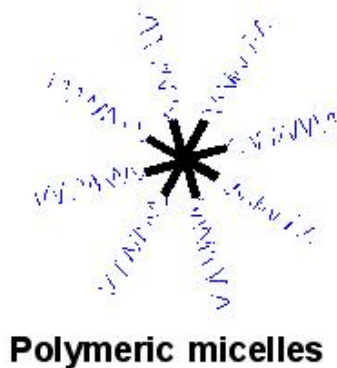
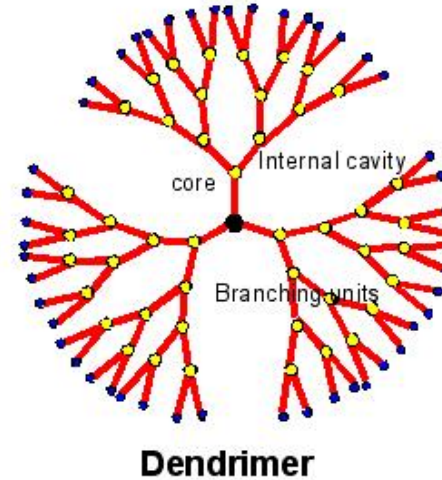
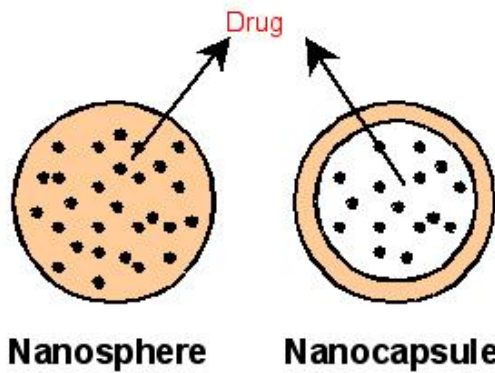
# principy genové terapie rakoviny

doručení sebevražedného genu přeměňující pro-drug na toxin





# Nanotechnology Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy



Schematics - Reproduced from Sahoo and Labhasetwar, 2003 with kind permission from Drug Discovery Today.

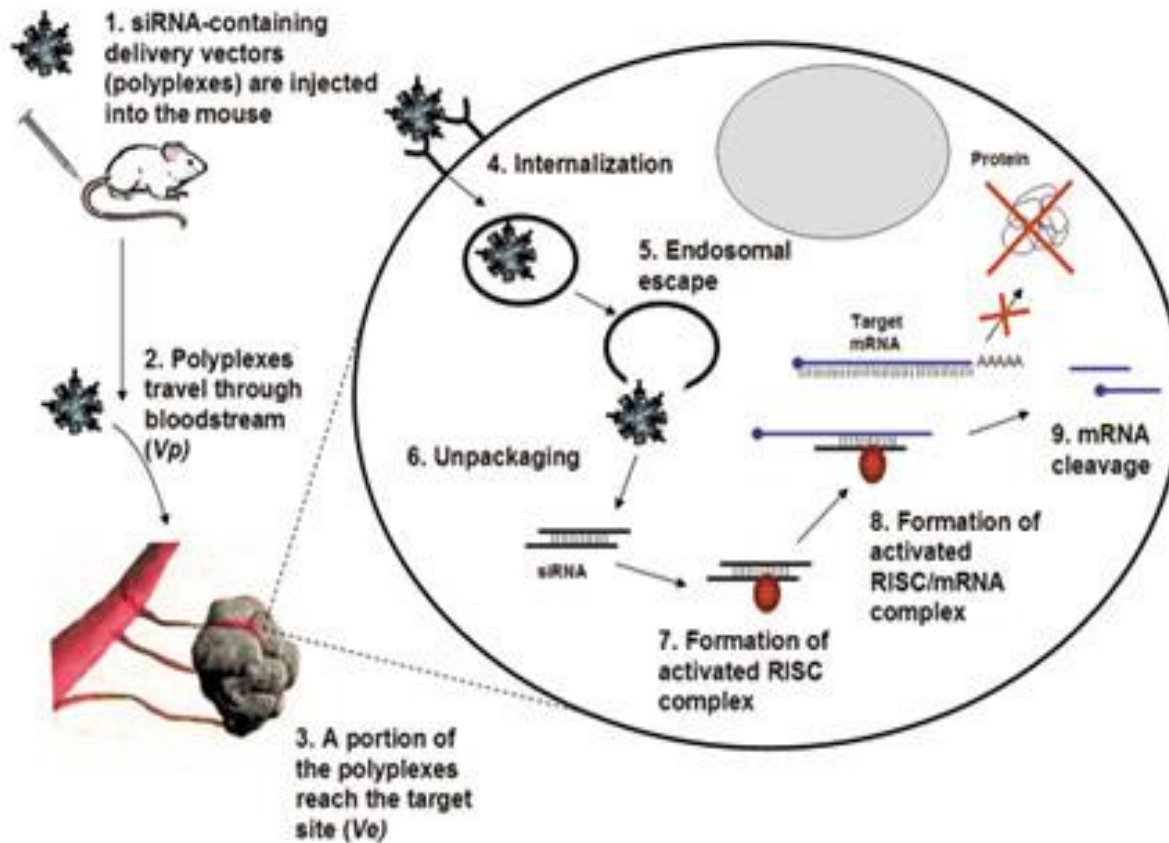
<http://www.cancer-therapy.org/CT3A/HTML/13.%20Orive%20et%20al,%20131-138%20.html> 2005

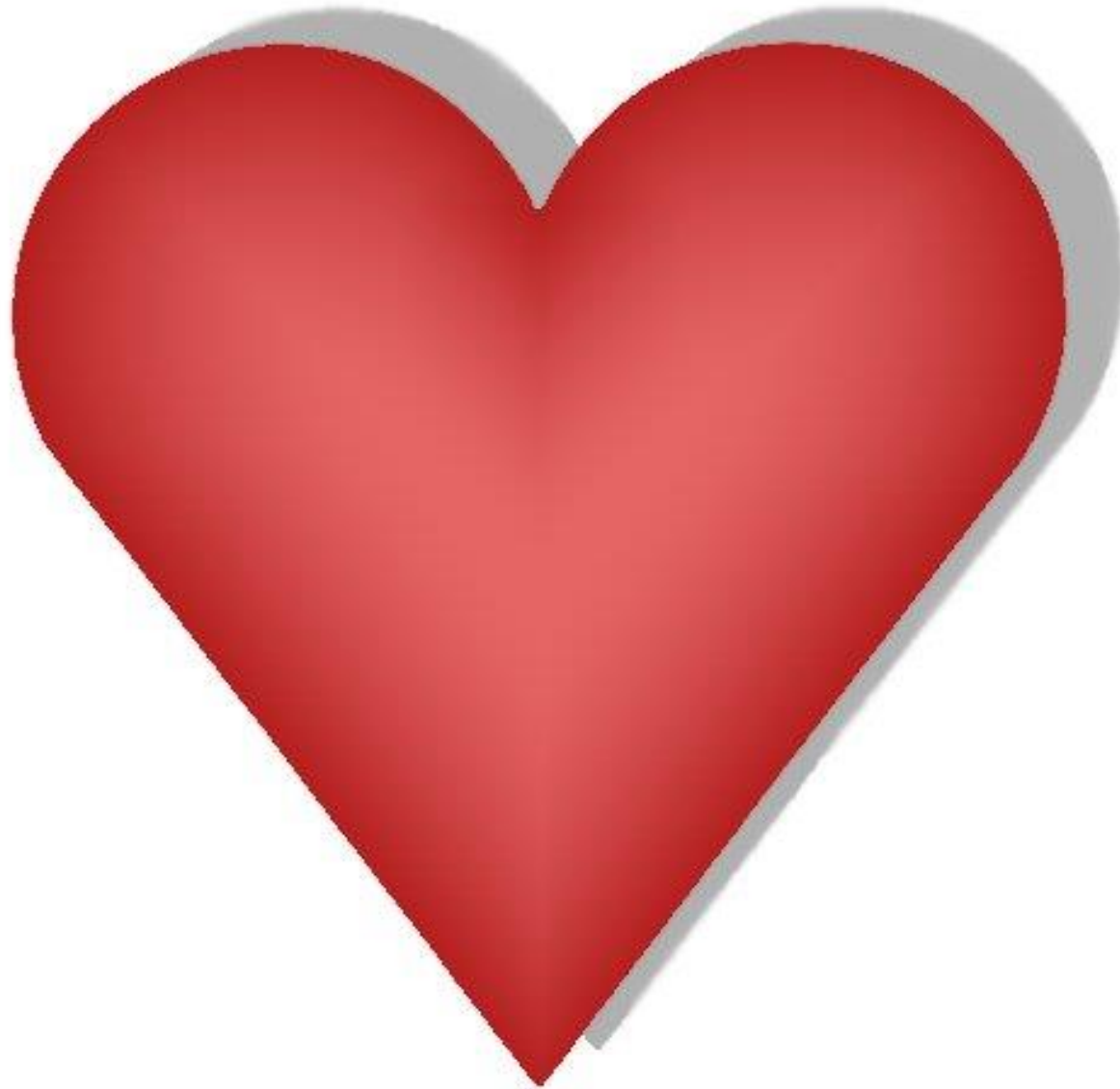
# p53

- **Nanotechnology in clinical trials to restore normal gene function to cancer cells** - Loss of normal p53 function results in malignant cell growth and has been linked to resistance to radiotherapy and chemotherapy in a number of cancers. Ester Chang, Georgetown Univ. delivered group delivered functional p53 genes to tumor cells and tumor metastases in 16 different types of cancer in animal models. When the job of reinstating a normal p53 suppressor gene is done, the nanoparticle, essentially a little fat droplet wrapped around the gene, simply melts away, unlike non-biodegradable delivery systems. Phase 1 human trials are underway at Baylor Univ - Dallas. <sup>1</sup> Apr09
- **Nanotechnology therapy for brain cancer** - Argonne National Laboratory show the first evidence of successful bioconjugated nanoparticles targeting toward cancer and away from normal brain cells. Uses 5 nm TiO<sub>2</sub> nanoparticles that are covalently conjugated with an antibody that specifically targets certain tumors, including GBM. A naturally occurring metabolite of dopamin, DOPAC, is used as a linker molecule to tether the antibody to the nanoparticles. The TiO<sub>2</sub> absorb energy from light, which is then transferred to molecular oxygen, producing cytotoxic reactive oxygen species (ROS). ROS damages the cell membrane and induces programmed death of the cancer cell. <sup>2</sup> Oct 09

<sup>1</sup> <http://www.foresight.org/nanodot/?p=3018>

<sup>2</sup> <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=12962.php>





Děkuji vám za pozornost😊