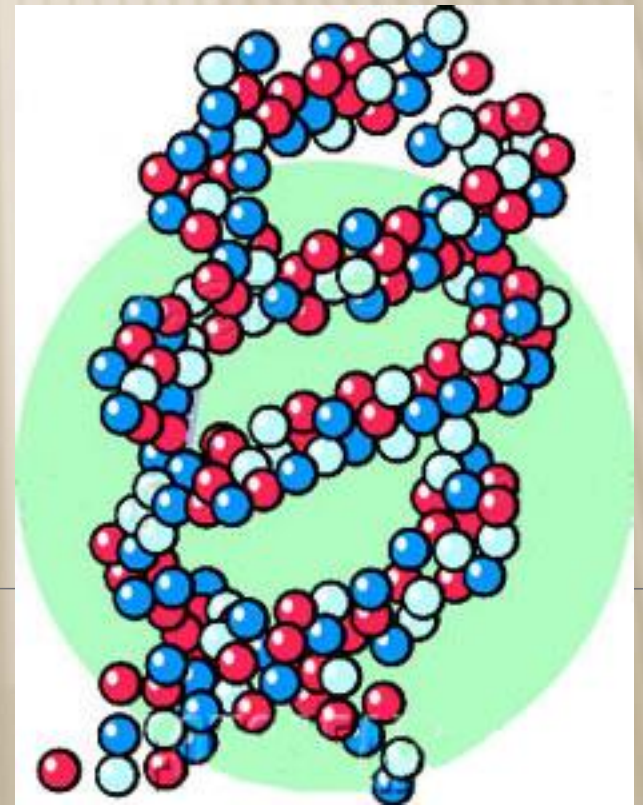


# DNA DIAGNOSTIKA FARMAKOGENETIKA A PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

30. 11. 2017

NTP 2017



# GENETICKÉ STUDIE

---

- × Dalším významným momentem je výběr statistické metodologie, která zhodnotí sílu asociace genů s chorobami. Možnosti jsou v zásadě dvě: linkage (vazebná) analýza a asociační studie. K detekci specifických genetických oblastí a genů, které se účastní v transmisi nemoci, je v principu možné použít obě metody.
- × Linkage (vazebná) analýza testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině. Čili marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu.

# GENETICKÉ STUDIE

---

Asociační studie vyšetřují souvýskyt markeru a nemoci na populační úrovni, tj. u nepříbuzných jedinců, obvykle srovnáním frekvencí markerů u nepříbuzných nemocných a kontrolních subjektů (studie case-control). Statistickou sílu asociace je možno dále zvýšit obohacením o další kritéria, jako jsou klinické subtypy nemoci (studie case-case), závažnost nemoci, časný začátek nemoci, rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví a vhodné biologické znaky (např. plasmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfismů v cytokinových genech; studie genotyp-fenotyp).

# DNA MARKERY

---

- × U komplexních nemocí se ukazuje, že je možno asociovat alely mnohých polymorfismů s výskytem komplexní nemoci nebo některými intermedialními znaky onemocnění (hladiny proteinů, rodinná anamnéza aj.) *statisticky* asociovat, čili přinejmenším najít genetický marker, s touto nemocí asociovaný.
- × Určitý genotyp nebo alela daného polymorfismu tak představuje vyšší (nižší) riziko pro nemoc.



Odds ratio (OR):

$$\frac{\text{Počet nemocných s riz. genotypem} \times \text{počet zdravých bez riz. genotypu}}{\text{Počet nemocných bez riz. genotypu} \times \text{počet zdravých s riz. genotypem}}$$

Senzitivita, specifita (nad 80%) a síla testu (nad 80%).

# PŘÍKLAD:

---

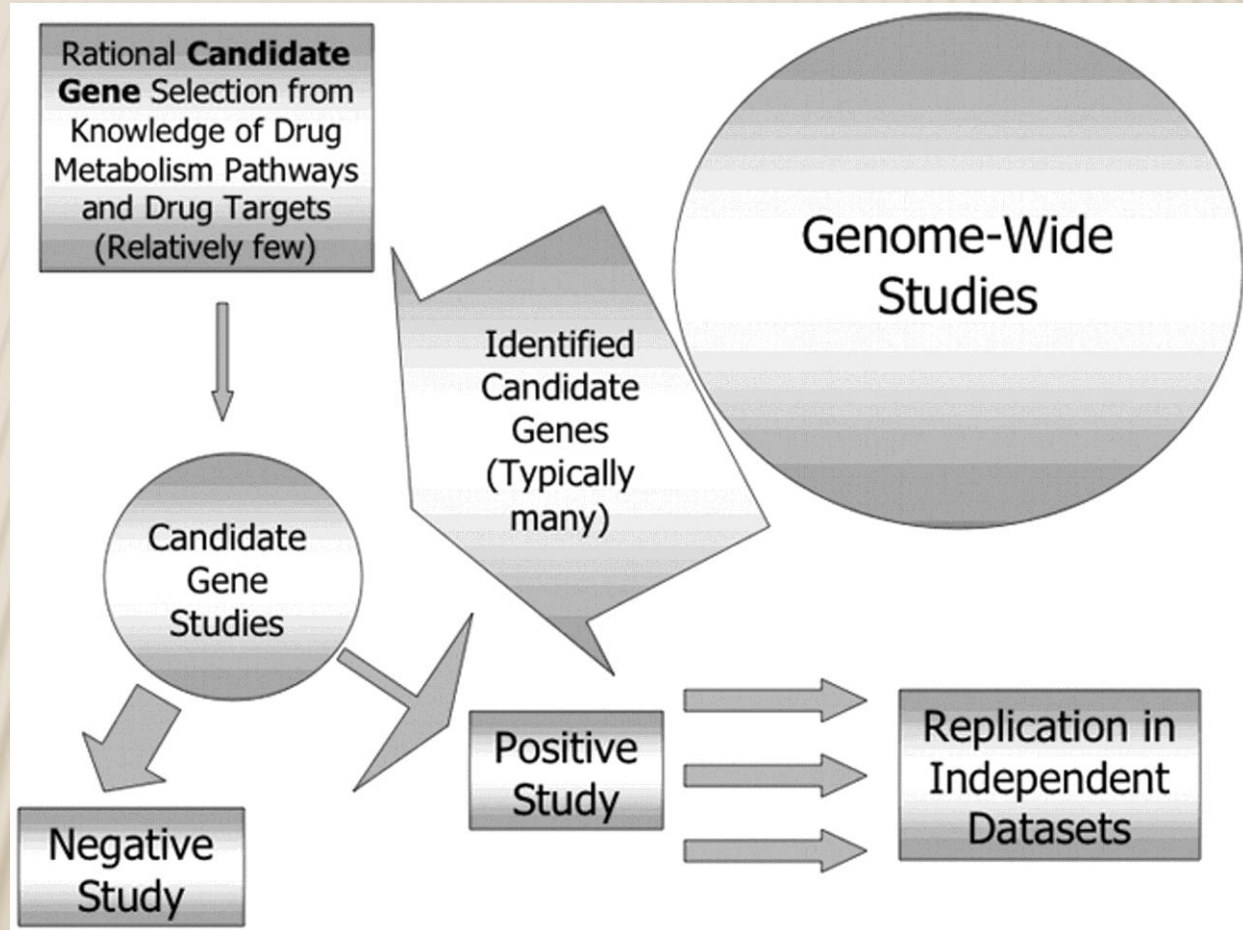
Group	TNF $\beta$ -B1B1	TNF $\beta$ -B2B2	TNF $\beta$ -B1B2	B1-allele frequency	$P_g$	$P_\alpha$
00	12	73	76	0.311		
01	1	28	11	0.163	0.02	0.008
All	13	101	87	201		

1.Group 00: patients without a family history of psoriasis.

2.Group 01: patients with a family history of psoriasis in second- and third-degree relatives.

3.OR for B2 allele in patients with psoriasis who had second- and third-degree relatives with psoriasis = 4.5 (0.56–36.12),  $P_{\text{corr}} = 0.02$ , sensitivity 0.834, specificity 0.311, power test 0.732.

**Figure 2. Relationship between genome-wide and candidate gene pharmacogenetic studies**



**Davies, S. M. Hematology 2006;2006:111-117**

# SROVNÁNÍ STRATEGIÍ GENETICKÉHO VÝZKUMU: KANDIDÁTNÍ GENY VS. „GENOME-WIDE „ STUDIE

---

## × Studie kandidátních genů

- Racionální (patofyziologická) selekce genů bez možnosti objevit nové (je možno ovšem objevit nové klinicky validní markery uvnitř genu)
- Limitovaný počet genů snižuje riziko falešné positivity výsledků
- Redukované náklady, pokud je tento přístup úspěšný (vede k signifikantním výsledkům=klinicky validním markerům).
- Je možno se dopracovat statisticky adekvátně velkým souborům vyšetřených osob

# SROVNÁNÍ STRATEGIÍ GENETICKÉHO VÝZKUMU: KANDIDÁTNÍ GENY VS. „GENOME-WIDE „ STUDIE

---

- × Studie „genome-wide“
  - Analýza celých genomů může vést k identifikaci dosud neznámých genetických souvislostí
  - Zvyšuje se riziko nepravdivého výsledku
  - Zvýšené náklady, také na základě zvýšeného počtu signifikantních výsledků
  - Statisticky adekvátně četných souborů je možno dosáhnout jen obtížně

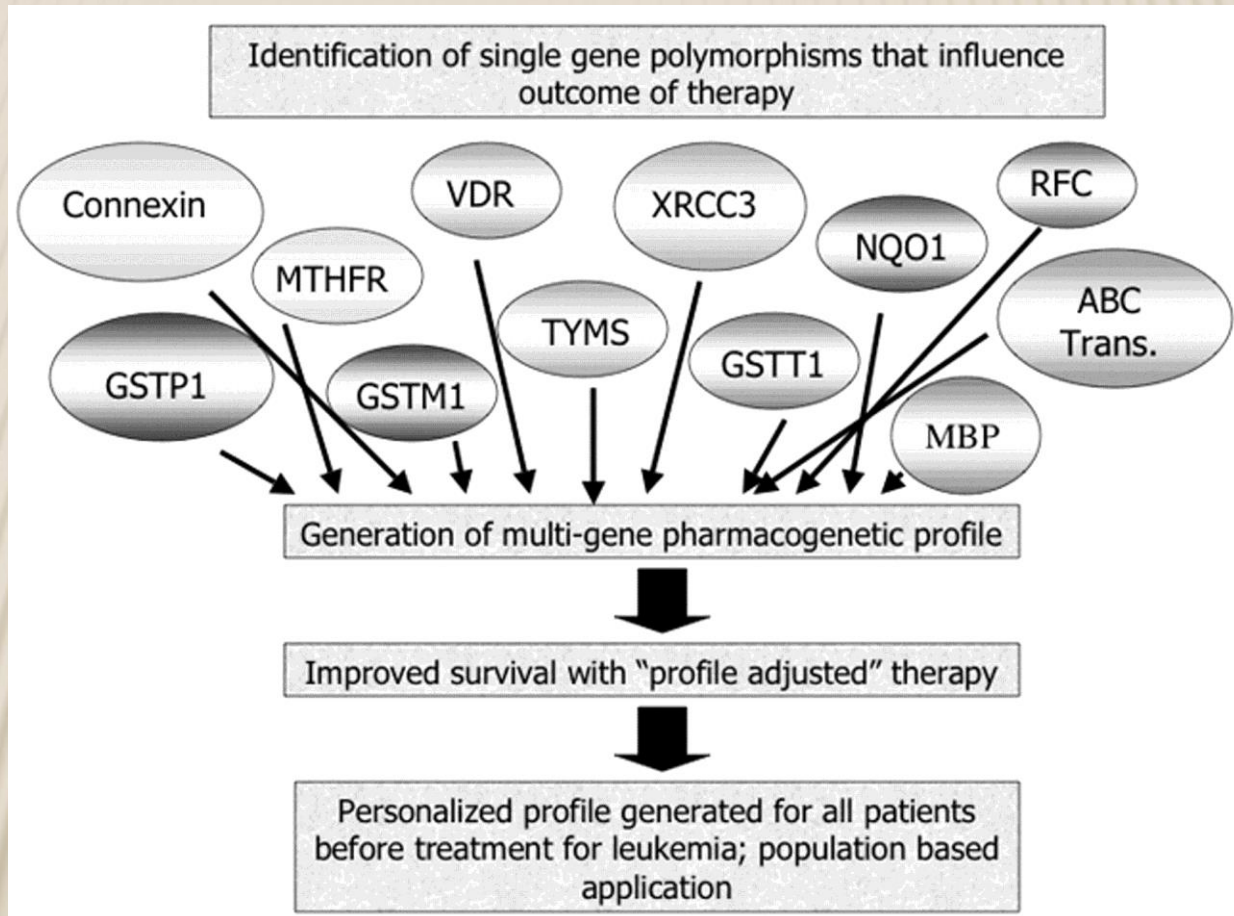


# PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

---

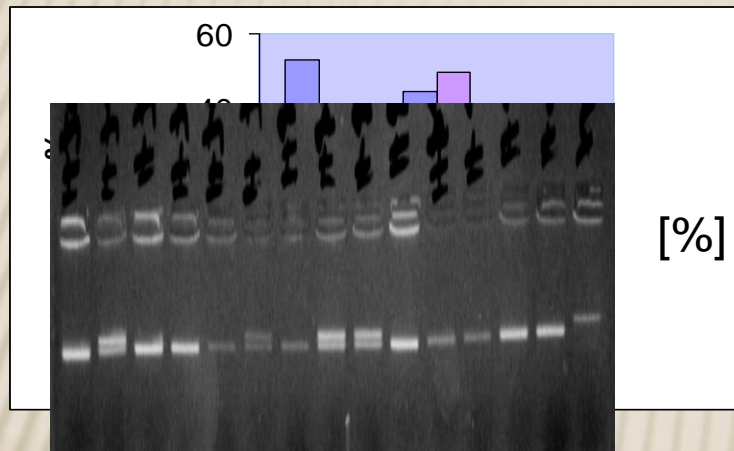
- × Umožňuje zlepšovat účinnost terapie na základě vysokého respektu k interindividuální variabilitě pacienta
- × Zdroje:
- × Klinicky relevantní znalost genetického podkladu nemocí
- × Buněčná terapie
- × Genová terapie
- × Farmakogenetika
- × Farmakoeconomické aspekty

**Figure 1. The hoped-for pathway of development of personalized medicine for the treatment of leukemia**



**Davies, S. M. Hematology 2006;2006:111-117**

# ZDRAVÍ ČEŠTÍ DOBROVOLNÍCI STŘEDNÍHO VĚKU (41-50 LET) POLYMORFISMUS -3A/-4A V GENU PRO ENDOTELIN-1 (EDN1) KOUŘENÍ

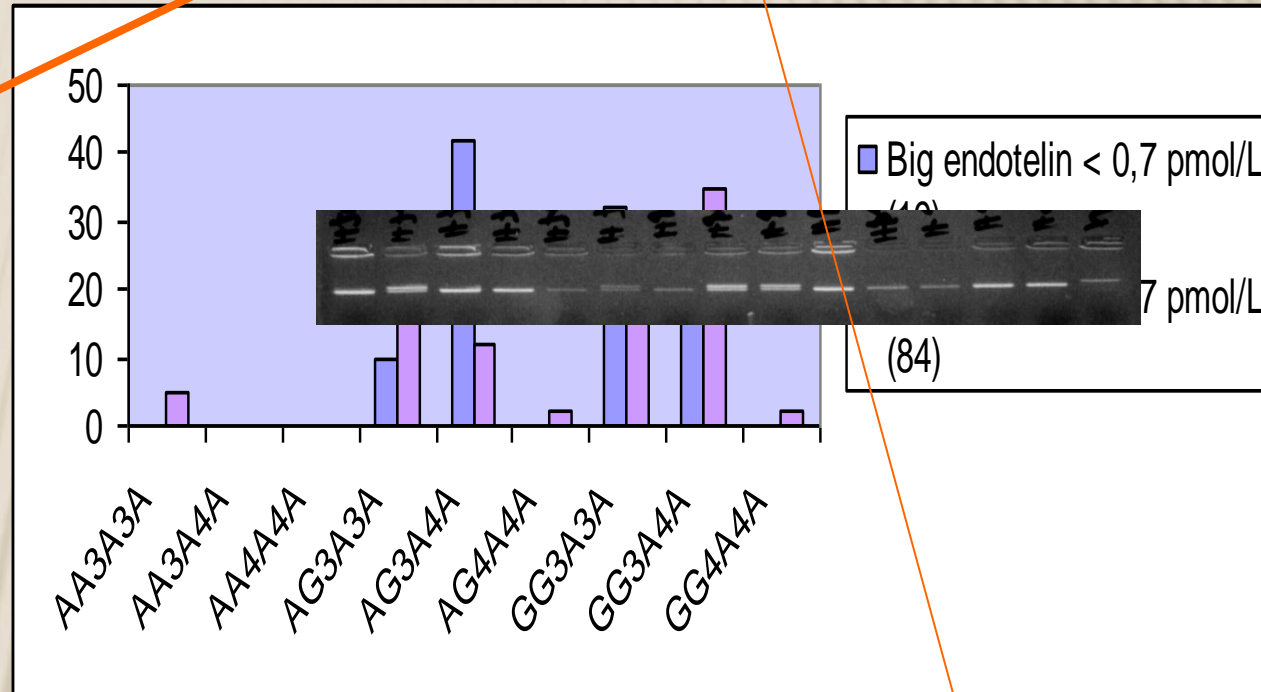
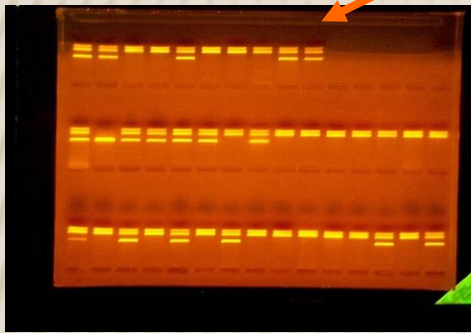


$P_g=0,003$

$P_a=0,003$

Genotypy 3A3A a 3A4A jsou častější u zdravých mužů kuřáků oproti mužům nekuřákům ( $OR = 7,69$ ,  $95\% KI 1,67-35,38$ ,  $P=0,002$ ).

# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ ASOCIOVANÝ GENOTYP 8002 G/A A -3A/-4A EDN-1 BIG ENDOTELIN



Asociovaný genotyp AG3A4A nese 5x vyšší OR pro chronické srdeční selhání ve skupině s nízkou hladinou big endothelinu oproti skupině pacientů s vysokou hladinou:

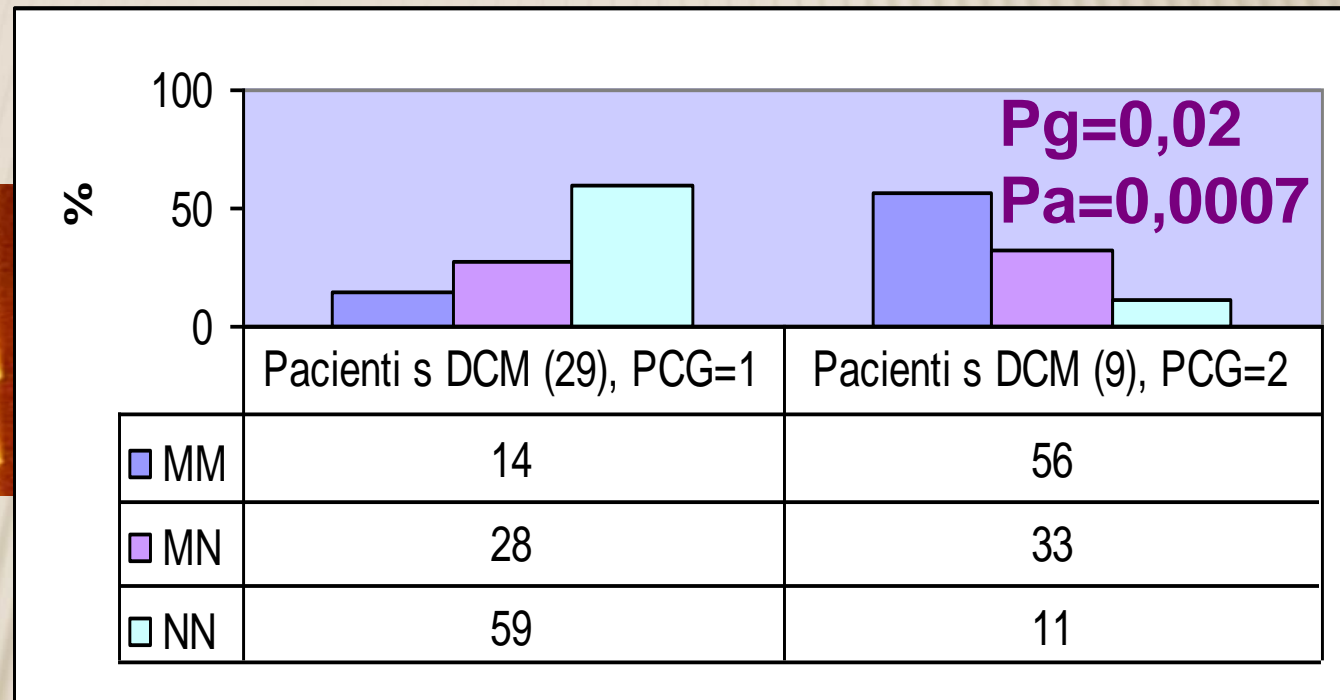
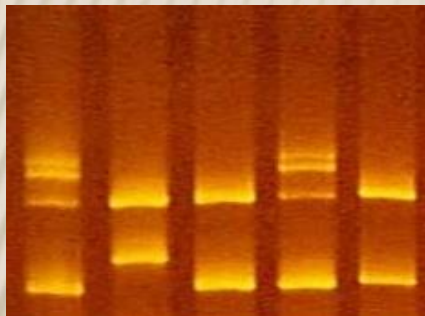
**OR = 5,38;**

**95% KI = 1,75-16,58;**

**P= 0,005**

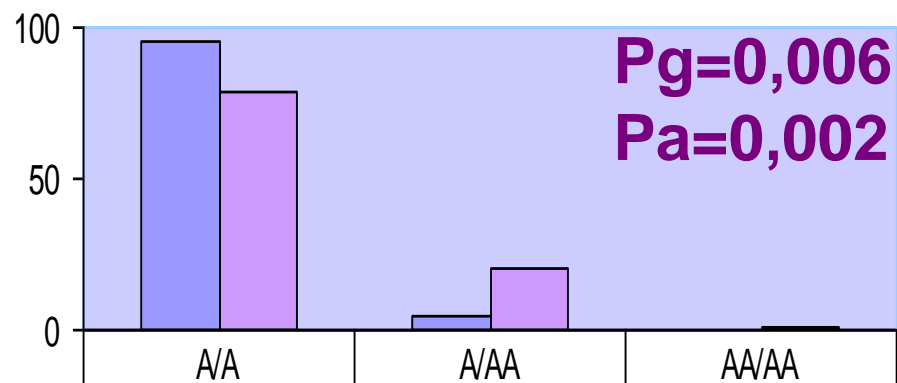
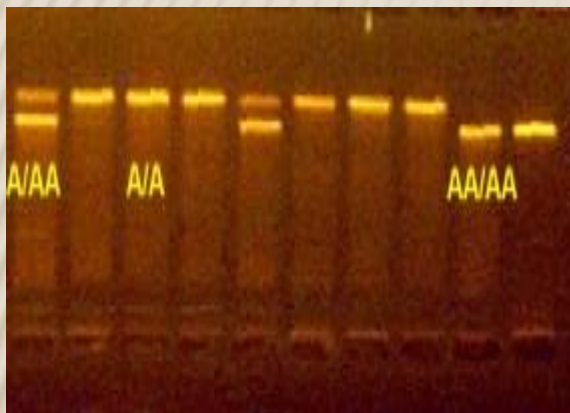
# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ DILATAČNÍ KARDIOMYOPATIE (DCM), PLICNÍ MĚŠTNÁNÍ (PCG)

## 3' TACE



Genotyp MM nese **8x vyšší OR** pro DCM s PCG=2 oproti DCM s PCG=1: **OR=7,81, 95% KI = 1,45-42,17, P=0,02**

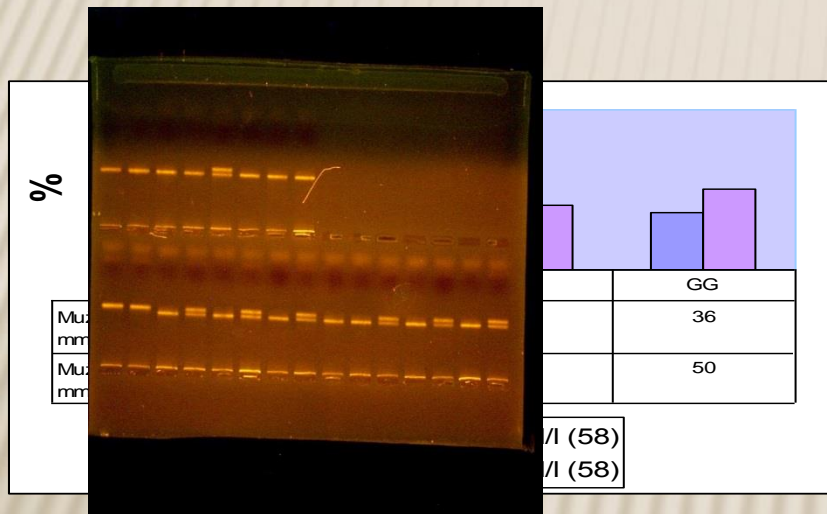
# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ POLYMORFISMUS RXR $\alpha$ 39526 A/AA KREVNÍ SKUPINY ABO



	A/A	A/AA	AA/AA
Pacienti s CHF - KS A (84)	95	5	0
Pacienti s CHF - KS nonA (117)	79	20	1

Alela AA přináší **5x vyšší OR** pro pacienty s CHF a krevní skupinou nonA (B+AB+O): **OR=5,16; 95%KI 1,72-15,50; P=0,0009**

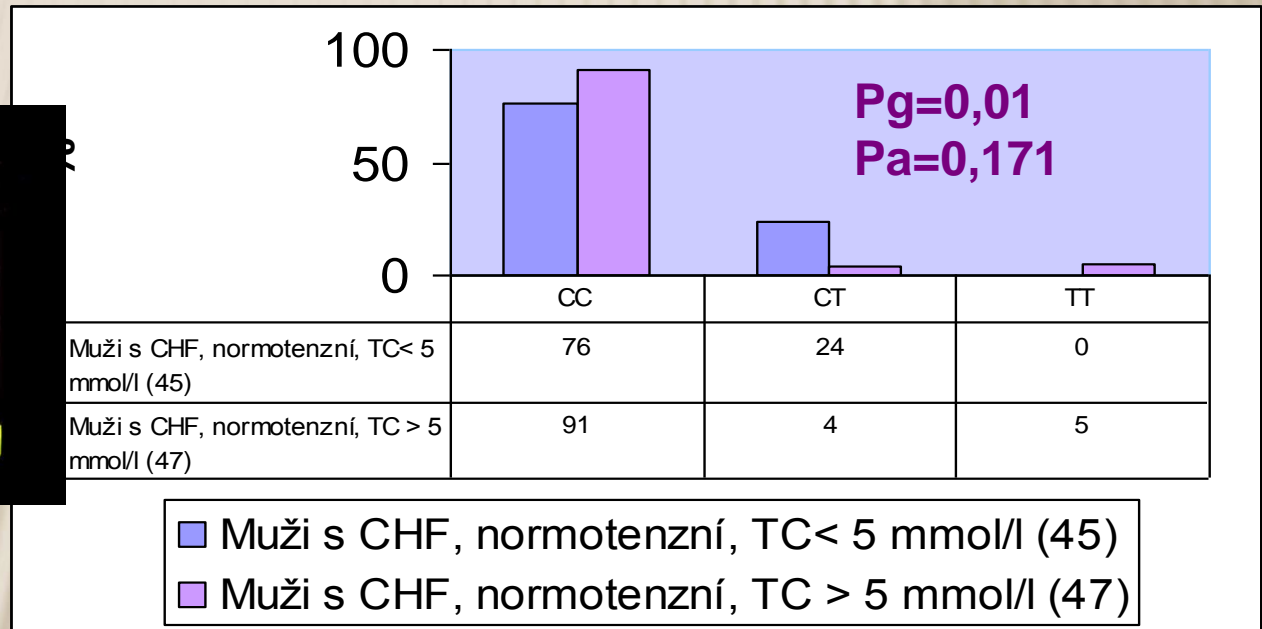
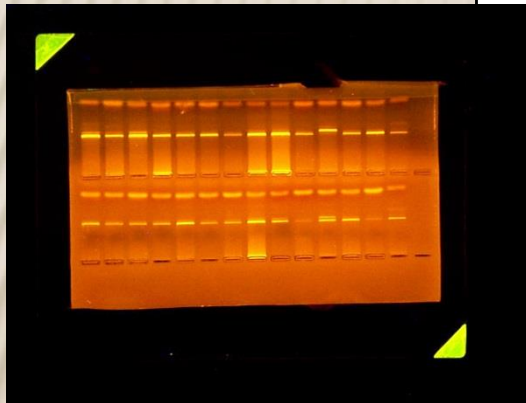
# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ POLYMORFISMUS -790T/G V GENU PRO MMP-2 CELKOVÝ CHOLESTEROL



$P_g=0,03$   
 $P_a=0,01$

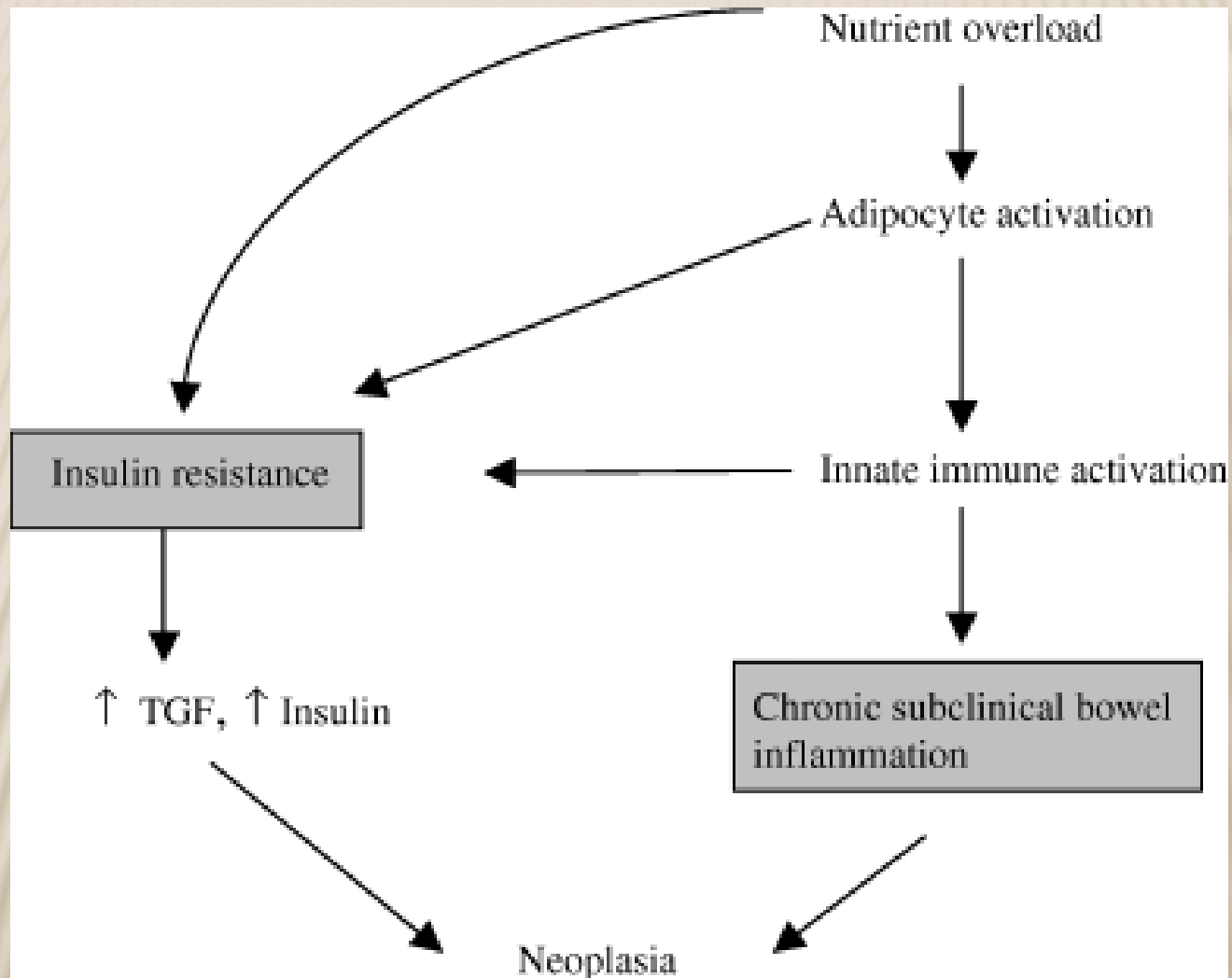
Genotypy TG + GG přinášejí **3,59x vyšší OR** pro muže s CHF a vyšší hladinou celkového cholesterolu: **OR=3,59; 95% KI 1,30-9,93; P=0,009**

# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ POLYMORFISMUS -735C/T V GENU PRO MMP-2 HYPERTENZE CELKOVÝ CHOLESTEROL



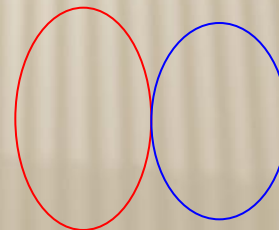
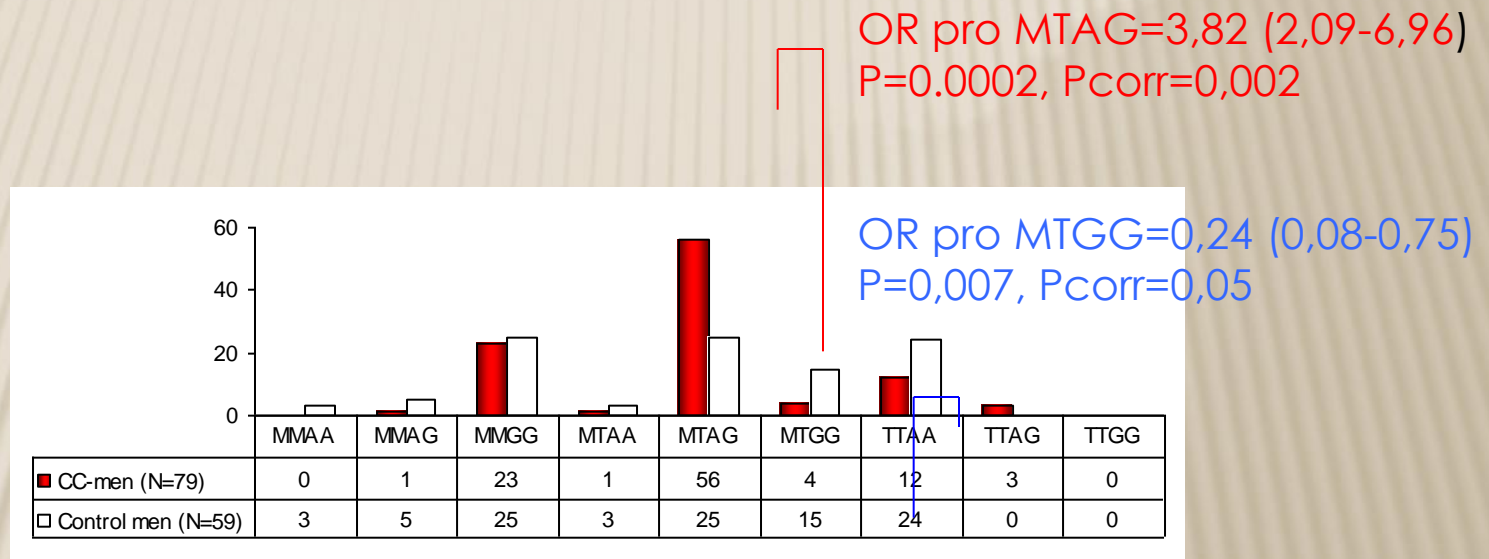
Genotyp CT přináší **7,28 x vyšší OR** pro muže s CHF, normotenzí a vyšší hladině celkového cholesterolu: **OR=7,28; 95% KI 1,51-35,03; P=0,006**





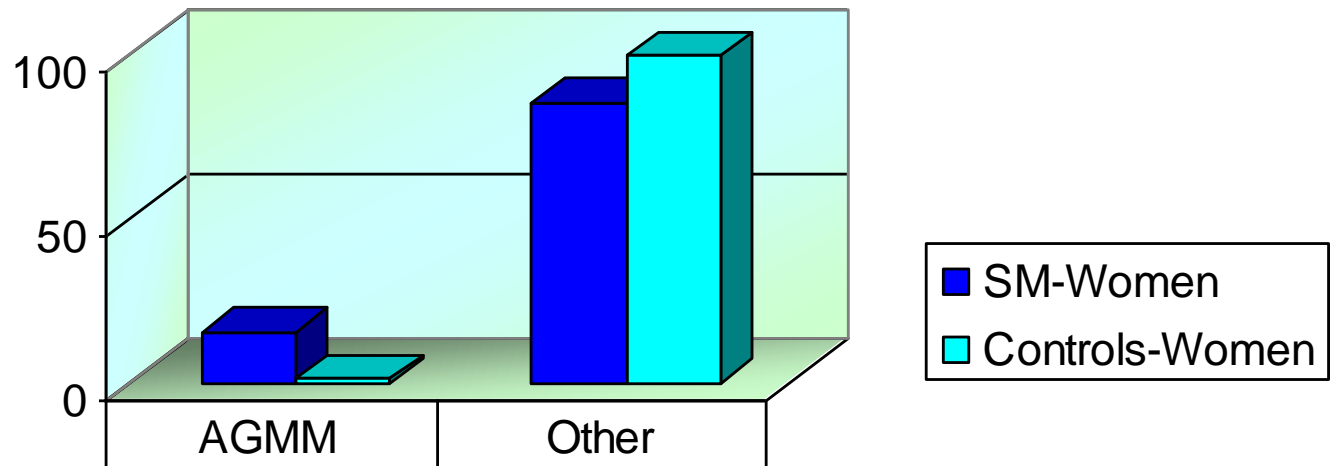
Patofyziologický mechanismu vztahu mezi obezitou a rakovinami v GIT.

# PACIENTI S RAKOVINOU KOLOREKTA VS. KONTROLY DVOJNÁSOBNÝ GENOTYP V GENU PRO ATG (-6A/G A M235T ATG)



Pacientky s roztroušenou sklerózou vs. kontroly  
Dvojnásobný genotyp v genu pro ATG (-6A/G a M235T ATG)

## Rozdíly v četnosti genotypu AGMM v genu pro angiotensinogen mezi ženami s RS a kontrolami



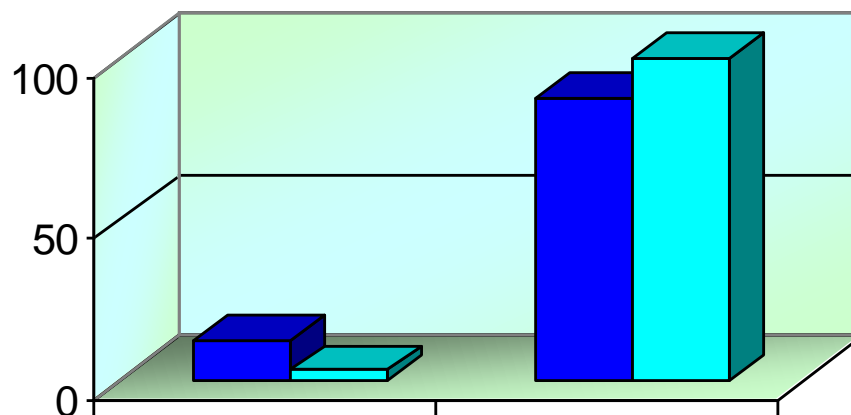
■ SM-Women	15	85
■ Controls-Women	1	99

OR=17,65 (95% konfidenční interval 2,31-134,71; P=0,00009, Pcorr=0,0006

Pacientky s roztroušenou sklerózou vs. kontroly

Dvojnásobný genotyp v genu pro ATG (-6A/G a M235T ATG)

### Rozdíly v četnosti genotypu AGTT v genu pro angiotensinogen mezi ženami s RS a kontrolami



■ SM-Women  
■ Controls-Women

■ SM-Women	12	88
■ Controls-Women	3	100

OR=4,67 (95% konfidenční interval 1,31-16,63); P=0,008, Pcorr=0,04

# FARMAKOGENETIKA - CÍLE

- × Popsat vliv dědičnosti na odpověď organismu na různé látky s využitím interdisciplinárního přístupu

## Farmakogenomika se znalostí celého genomu

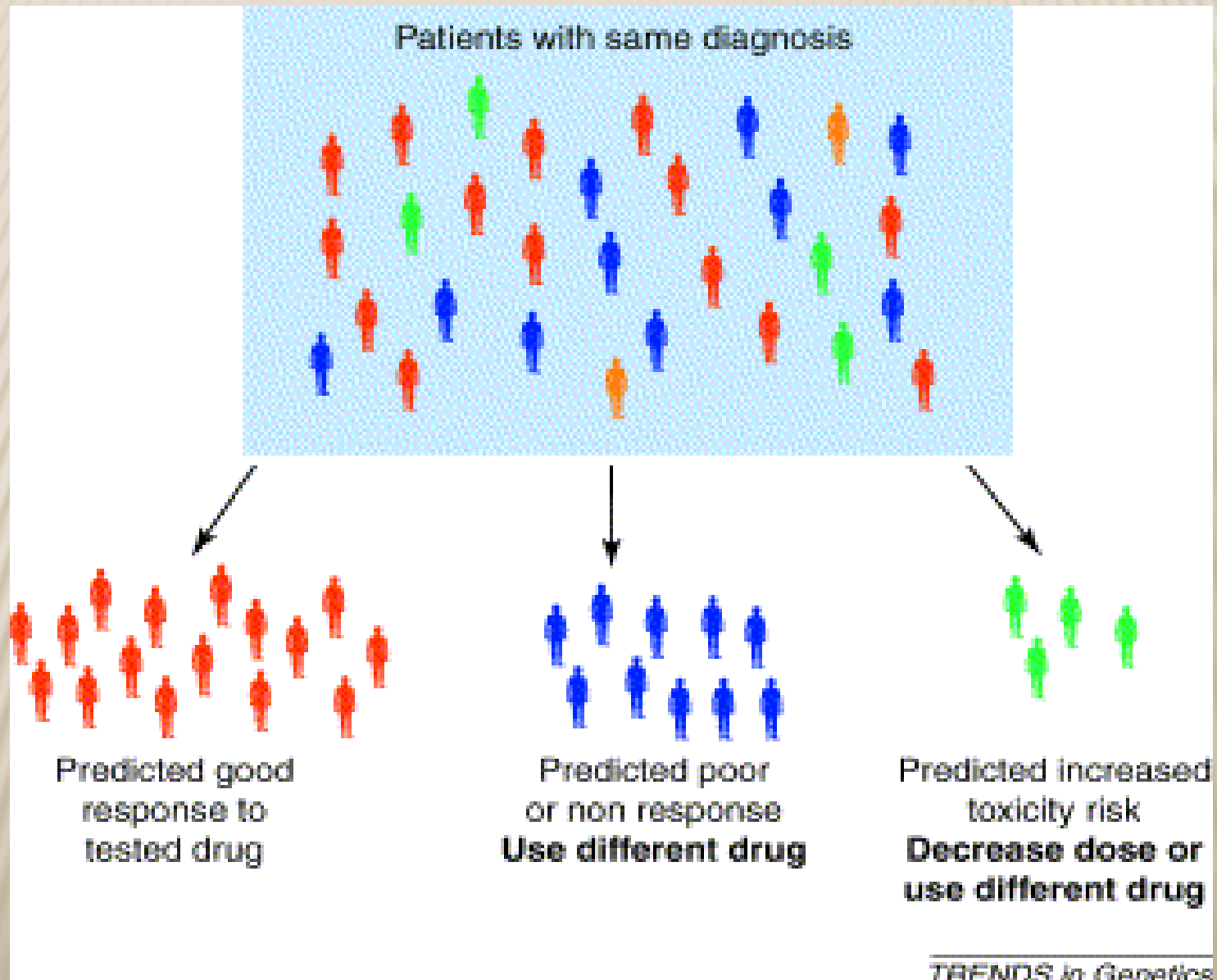
- × **Farmakodynamika:** popisuje žádoucí či nežádoucí účinky léků na organismus

(lék → organismus)

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

(organismus → lék)

# Klinický potenciál farmakogenetiky



# FARMAKOKINETIKA

---

- × **Absorpce** (GIT, motilita?, pH žaludeční sekrece?, intestinální flóra?, místo absorpce)
- × **Distribuce** (frakce léčiva vázaná na bílkoviny séra, afinita jednotlivých léčiv k BS – fenylbutazon-warfarin)
- × **Metabolismus** (indukce, inhibice metabolizujících enzymů... rifampicin-orální kontraceptiva)
- × **Eliminace** (pH moči, lithium-thiazidy)

# FARMAKOKINETIKA X FARMAKOGENOMIKA

- × Rozdílné hladiny léku v séru pacientů téže skupiny, váhy, atd. po podání stejné dávky
- × Rychlejší x pomalejší nástup účinku
- × Různá doba eliminace léčiva z organismu
- × Interakce (alkohol, tabák, barbituráty)



# FARMAKODYNAMIKA X FARMAKOGENOMIKA

---

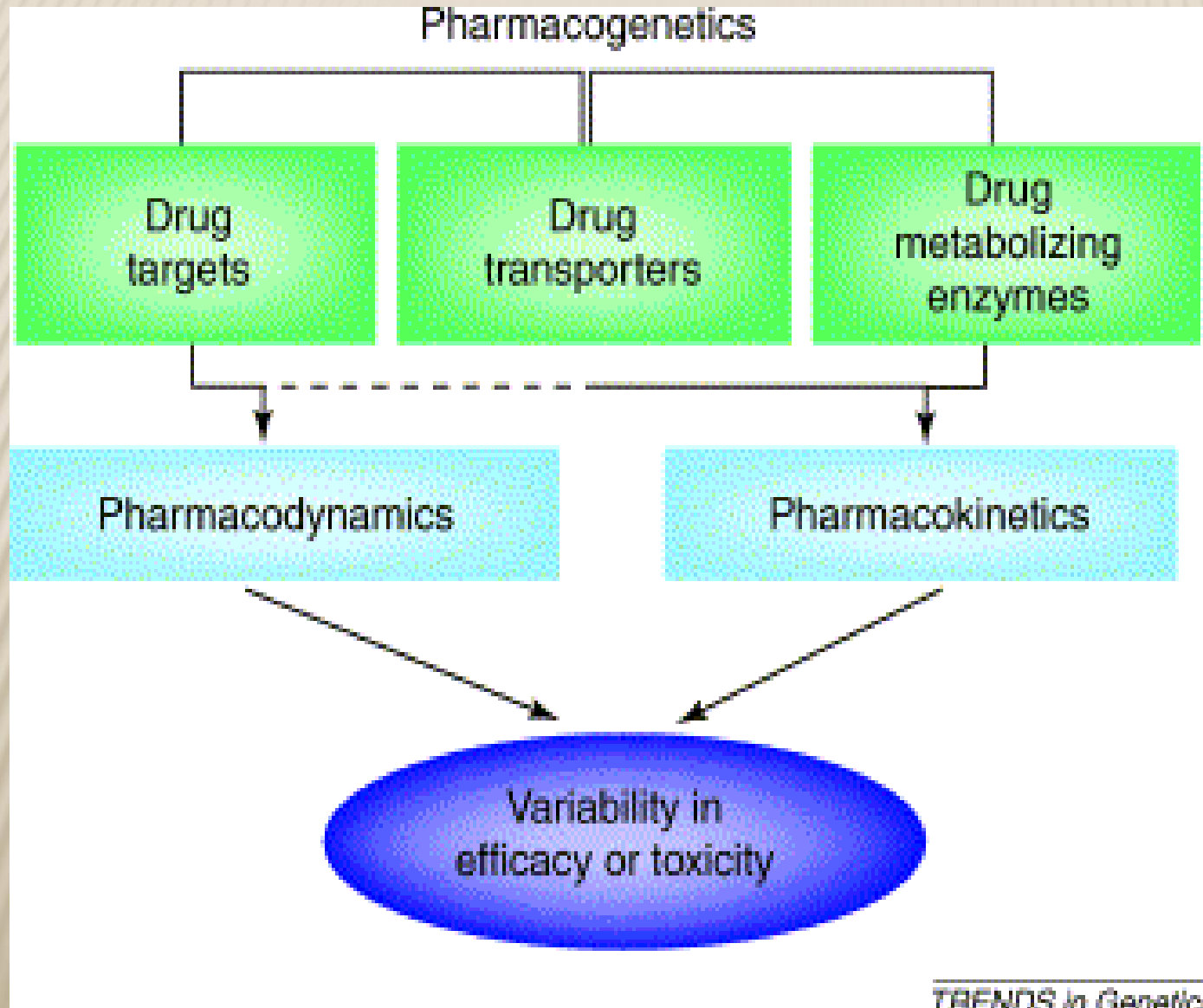
- × Různá odpověď pacientů téže populační skupiny na tentýž lék
- × Různá odpověď pacientů na kombinace těchto léků
- × Geneticky determinovaná přecitlivělost na danou látku

# FARMAKOGENETIKA A VÝVOJ LÉKŮ

---

- × 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.
- × Polovina všech dosud používaných léků je metabolizována enzymy P450.

# Klíčové složky farmakogenetiky

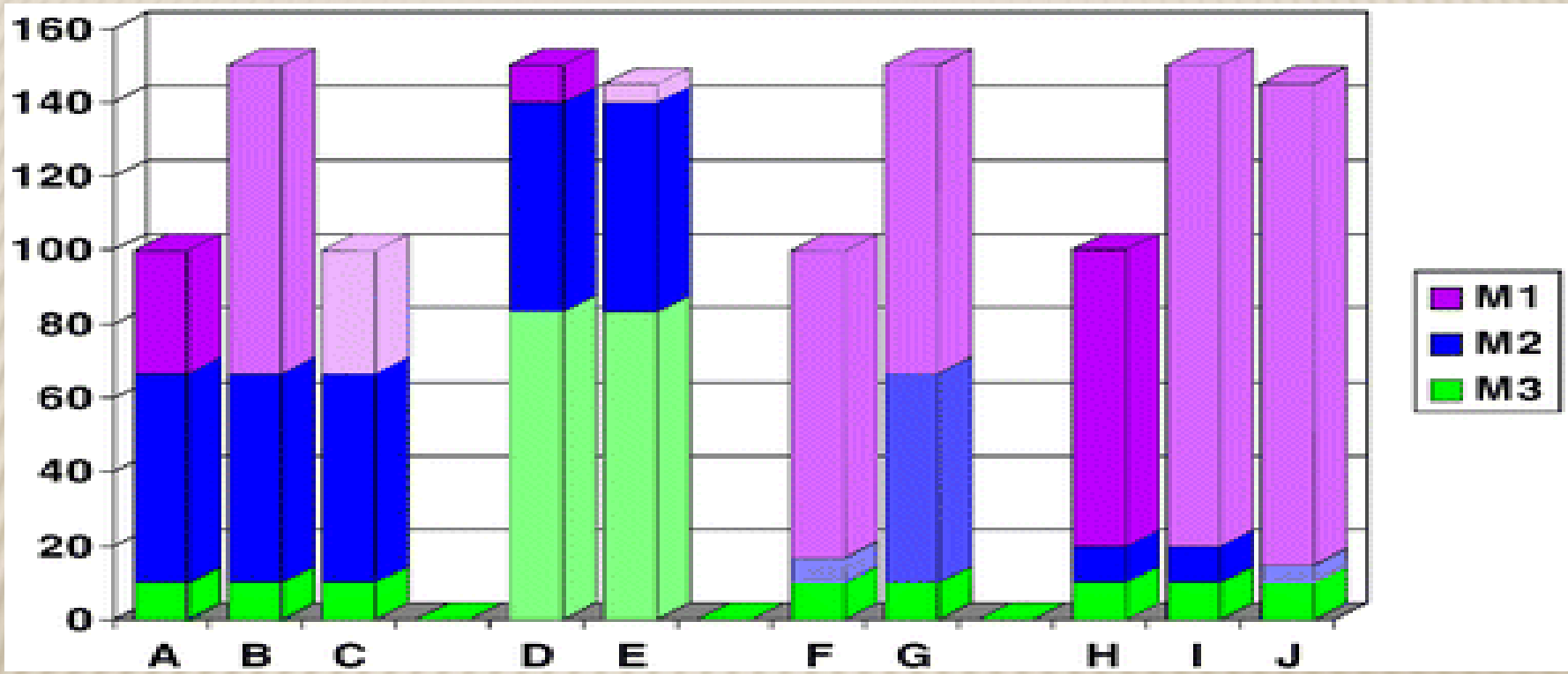


# P450

---

- × CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků
- × CYP2D6 – 20%
- × CYP2D9 + CYP2D19- 15 %
- × CYP2D6, CYP2D9, CYP2D19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní

# MODEL TERAPIE HYPERTENZE (PODLE LINDPAINTNERA, BŘEZEN 2003)



**A**=fyziologický stav: tři molekulární mechanismy (M1, M2, M3) se podílejí na determinaci znaku (TK), **B**=hypertenze D1: selhání M1 (příčina/účast)  
**C**=hypertenze D1: kauzální terapie T1 (cílená na M1), **D**= hypertenze D3: selhání M3 (příčina účast), **E**=hypertenze D3, léčení T1: terapie není kauzální,  
**F**=hypertenze D1, paliativní terapie T2, cílená na M2, **G**=hypertenze D1, terapie T2; refrakterní varianta na T2 v M2, **H**= fyziologický stav: odlišný podíl M1 a M2 na normálním znaku, **I** = varianta hypertenze D1: selhání M1; **J** =varianta hypertenze D1: terapie T2

# FARMAKOGENETICKÁ STUDIE

Cílem studie bylo porovnat 3 skupiny pacientů s biologiky v klinických a genetických parametrech

- × **Skupina A:** 11 pacientů s psoriázou s adalimumabem, u nichž byla léčba tímto biologikem ukončena
- × **Skupina B:** 14 pacientů s psoriázou, u nichž léčba adalimumabem úspěšně probíhá
- × **Skupina C:** 12 pacientů s jinou diagnózou, u nichž v průběhu léčby biologiky došlo k výsevu psoriázy (1 případ hidradenitis suppurativa, 4 případy m. Crohn, 3 případy ulcerativní kolitidy, 3 případy ankylozující spondylitidy, 1 případ revmatoidní artritidy).

# MATERIÁL A METODY

---

- × U všech pacientů jsme vyšetřili několik genetických polymorfismů v genech participujících na rozvoji zánětu (TNF alfa, TNF beta, TACE, IL-6, MMP-2, MMP-9, TIMP-2, ACE, CD147) a v genu potenciálně ovlivňujícím farmakokinetiku, příp. farmakodynamiku biologika (MDR1).

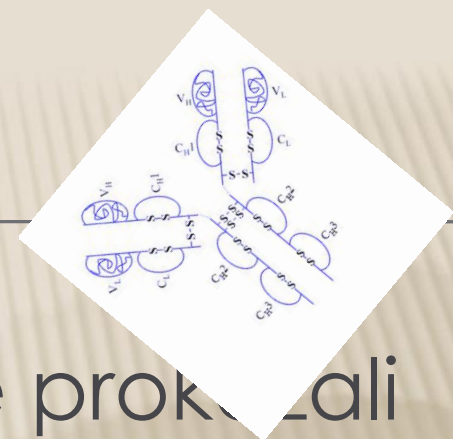
Dg. Psoriáza	Skupina A léčba A ukončena	Skupina B léčba A pokračuje	P
Rok narození (median, rozsah)	1953 (1928-1991)	1969 (1943-1992)	NS
Pohlaví M/Ž	4/7	12/2	0,02 (OR=10)
PASI před (median, rozsah)	14,5 (6,3-28,2)	12,9 (10,40-40,00)	NS
BSA před (median, rozsah)	25 (5-60)	25,5 (8-75)	NS
<b>Efekt léčby za 3 měsíce</b>	6/5 (55%)	14/0 (100%)	0,009 (OR=11)
Současný stav - zlepšení	10/1 (91%)	14/0 (100%)	NS
Onset psoriázy (median, rozsah, roky)	21,5 (0-60)	21,0 (7-53)	NS
Pozdní onset psoriázy (nad 40 let věku)	20%	8%	NS



	<b>Skupina A</b>	<b>Skupina B</b>	
<b>Pozitivní rodinná anamnéza psoriázy</b>	40%	38%	NS
<b>Pozitivní rodinná anamnéza R/S/D</b>	30%	8%	NS
<b>Pozitivní rodinná anamnéza jiní než R/S/D</b>	0%	31%	NS
<b>+ RA KV nemocí</b>	70%	85%	NS
<b>+ RA DM</b>	30%	62%	NS
<b>+ RA tumorů</b>	30%	8%	NS
<b>+ RA alergií</b>	40%	23%	NS

<b>Dg. Psoriáza- Komorbidity</b>	<b>Skupina A léčba A ukončena</b>	<b>Skupina B léčba A pokračuje</b>	<b>P</b>
<b>Komorbidity - počet</b>	90%	60%	NS
<b>Kardiovaskulární nemoci</b>	50%	38%	NS
<b>Diabetes mellitus</b>	20%	0%	NS
<b>Tumory</b>	30%	8%	NS
<b>Alergie</b>	40%	8%	NS
<b>Angíny v dětství/ tonsilektomie</b>	20%	31%	NS

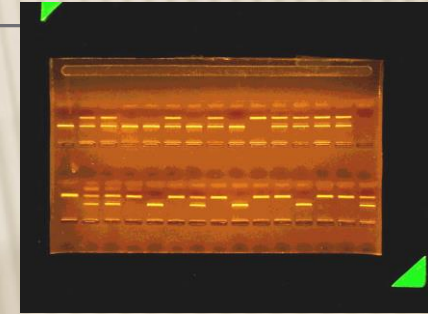
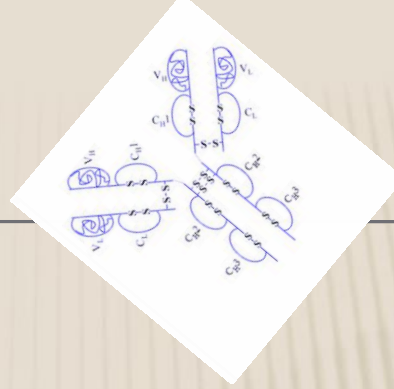
# VÝSLEDKY



- × Mezi pacienty skupin A a B jsme prokázali signifikantně nižší efekt léčby adalimumabem za 3 měsíce od počátku ( $P=0,009$ ), častěji u žen.

<b>Efekt léčby za 3 měsíce A/N</b>	<b>6/5 (55%)</b>	<b>14/0 (100%)</b>	<b>0,009 (OR=11)</b>
------------------------------------	------------------	--------------------	----------------------

# VÝSLEDKY



- × **Ve skupině A** je signifikantně asociován
  - genotyp v I/D ACE s hodnotou PASI a BSA před začátkem terapie biologiky a
  - rodinná anamnéza psoriázy v 1. linii (rodiče, děti, sourozenci) s genotypem v MMP-9.

# Skupina A – adalimumab – studie ukončena

I/D ACE 3	PASI před průměr	PASI před N	PASI před Minimum	PASI před Maximum	PASI před medián
ID+DD	12,5	8	6,3	24,5	9,1
II	25,3	3	22,5	28,2	25,3
Vš.skup.	16	11	6,3	28,	14,5

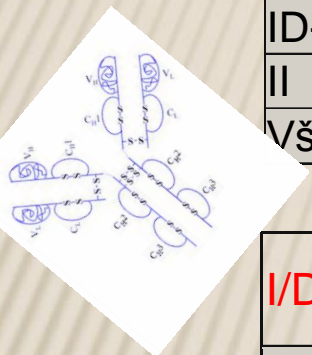
P=0,02

I/D ACE3	BSA před průměr	BSA před N	BSA před Minimum	BSA před Maximum	BSA před medián
ID+DD	19,9	8	5	40	15,5
II	49,3	3	38	60	50,0
Vš.skup.	27,9	11	5	60	25,0

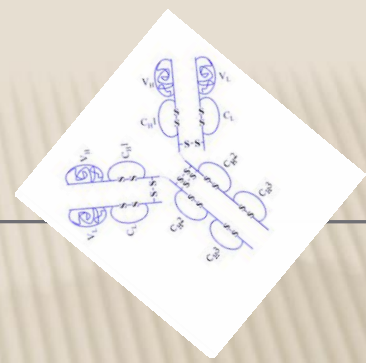
P=0,03

MMP9-1575	Rodiče/ sourozenci/ děti nemají psoriázu	Rodiče/ sourozenci/ děti mají psoriázu	Řádk. součty
CT	1 (14%)	3 (100%)	4
CC	6 (86%)	0 (0%)	6
Vš.skup.	7	3	10

P=0,03



# VÝSLEDKY



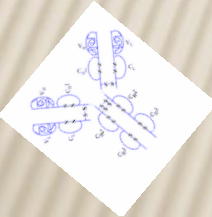
**Ve skupině B** jsme prokázali

- delší léčbu biologiky u genotypu GG v polymorfismu TNFalfa – 308 A/G ( $P=0,03$ ),
- lepší efekt léčby biologikem u genotypu TT ( $P=0,04$ ) polymorfismu v MMP-2 -790T/G a u genotypu CC polymorfismu MMP- 9 -1575 T/C.

# SKUPINA B – ADALIMUMAB – STUDIE PROBÍHÁ

TNF ALFA -308 A/G	Délka léčby (M) průměr	Délka léčby (M) N	Délka léčby (M) Minimum	Délka léčby (M) Maximum	Délka léčby (M) medián
GG	15,9	8	2	30	14,5
GA	47,2	6	17	87	35,0
Vš.skup.	29,3	14	2	87	26,5

P=0,03



MMP-2 -790T/G	Efekt léčby 3M Ano	Efekt léčby 3M Ne	Řádk. součty
TT	3 (30%)	4 (100%)	7
TG	7 (70%)	0 (0%)	7
Vš.skup.	10	4	14

P=0,04

MMP9-1575 C/T	Efekt léčby 3M Ano	Efekt léčby 3M Ne	Řádk. součty
CT	6 (60%)	0 (0%)	6
CC	4 (40%)	4 (100%)	8
Vš.skup.	10	4	14

P=0,07

## Skupina C: pacienti léčení biologiky se vznikem psoriázy

Rok narození	Pohlaví	Dg	Biologikum	Délka pod. biologika	Rozvoj psoriázy od začátku léčby B (M)
1962	Muž	Hidradenitis suppurativa	adalimumab	3	1
1985	Muž	Ankyl spondilitis	adalimumab	22	5
1957	Muž	Ankyl. Spondilitis	golimumab	5	5
1970	Muž	Ankyl.spondilitis	adalimumab	3	3
1962	Žena	Iridocyklitis, m.Crohn	adalimumab	12	8
1976	Žena	m. Crohn	adalimumab	10	
1976	Žena	m.Crohn	infliximab	45	34
1985	Žena	m.Crohn	infliximab	42	
1970	Muž	Ulcerózní kolitis	infliximab	3	2
1952	Žena	Ulcerózní kolitis	infliximab	38	21
1976	Žena	Ulcerózní kolitis	infliximab	91	49
1964	Muž	RA	certolizumab	66	66

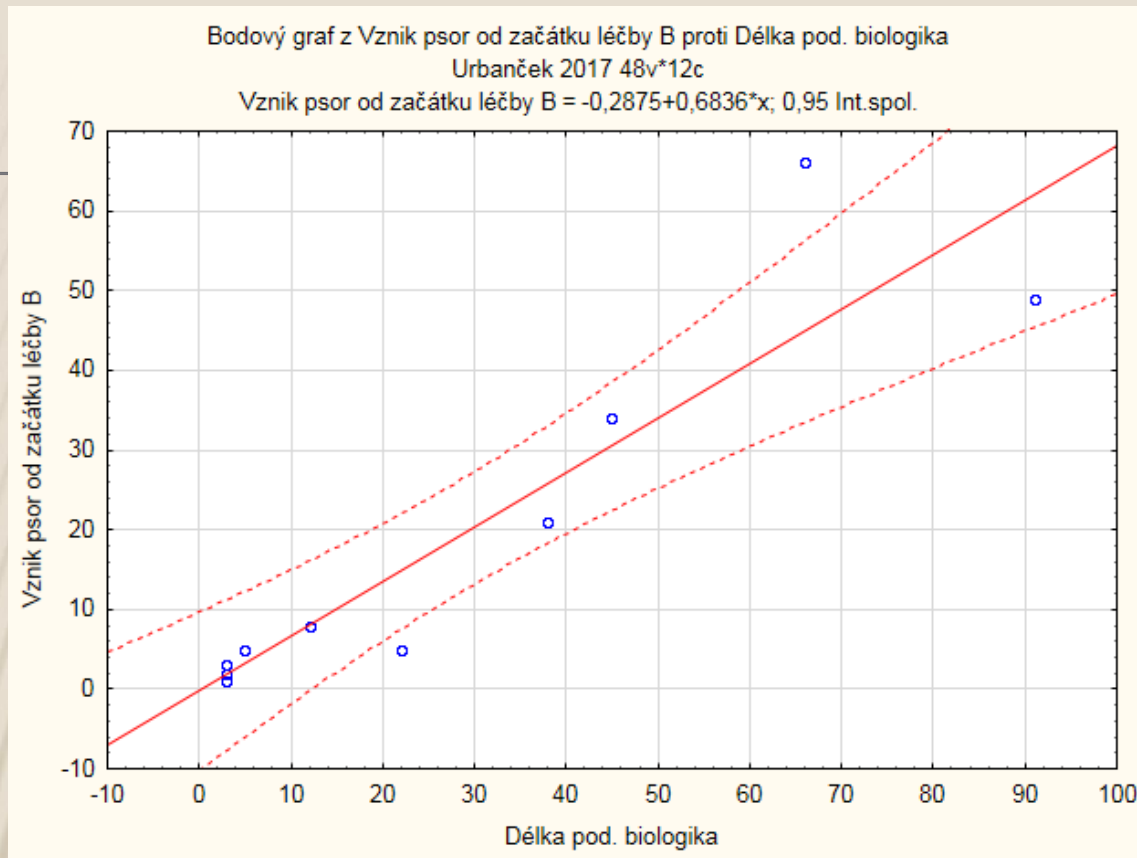


Rok narození	Pohlaví	Dg	Managem nt PR	Další léčba	Protilátky proti biologiku	HLA
1962	Muž	<b>Hidradenitis suppurativa</b>	B+ LL	0	ne	0
1985	Muž	<b>Ankyl spondilitis</b>	B+LL	0	ne	0
1957	Muž	<b>Ankyl. Spondilitis</b>	Enbrel	SS	ne	B27
1970	Muž	<b>Ankyl.spondilitis</b>	Enbrel	NSAID	ne	B27
1962	Žena	<b>Iridocyklitis, m.Crohn</b>	B+SL	0	ne	B27
1976	Žena	<b>m. Crohn</b>	B+SL, ustekinumab	ARP, kortikoidy	ano	0
1976	Žena	<b>m.Crohn</b>	B+SL, adalimumab	ATP	ano	0
1985	Žena	<b>m.Crohn</b>	B+LL	0	ano	0
1970	Muž	<b>Ulcerózní kolitis</b>	0	0	ano	0
1952	Žena	<b>Ulcerózní kolitis</b>	B+SL	Mesalazin, ATP	ne	0
1976	Žena	<b>Ulcerózní kolitis</b>	B+LL	0	ne	0
1964	Muž	<b>RA</b>	B+LL	MTX	ne	0

# VÝSLEDKY

---

- Délka podávání biologika vysoce signifikantně korelovala ve skupině C s dobou vzniku psoriázy od začátku léčby ( $P=0,00002$ ).
- Délka podávání biologika byla signifikantně asociována s genotypem v polymorfismu C3435T genu pro MDR1 ( $P=0,02$ ).
- Podávání další léčby v případě neúspěšnosti léčby biologické bylo asociováno s genotypem v polymorfismu MMP-2 -790 T/G ( $P=0,03$ ).



P=0,00002

MDR1-C3435T	Délka pod. biologika N	Délka pod. biologika Minimum	Délka pod. biologika Maximum	Délka pod. biologika medián
TT	4	3	38	3
CT	7	5	66	22
CC	1	91	91	91
Vš.skup.	12	3	91	17

P=0,02

MMP-2-790	Další léčba II Ano	Další léčba II Ne	Řádk. součty
GT	0 (0%)	4 (66%)	4
TT	6 (100%)	2 (33%)	8
Vš.skup.	6	6	12

P=0,03

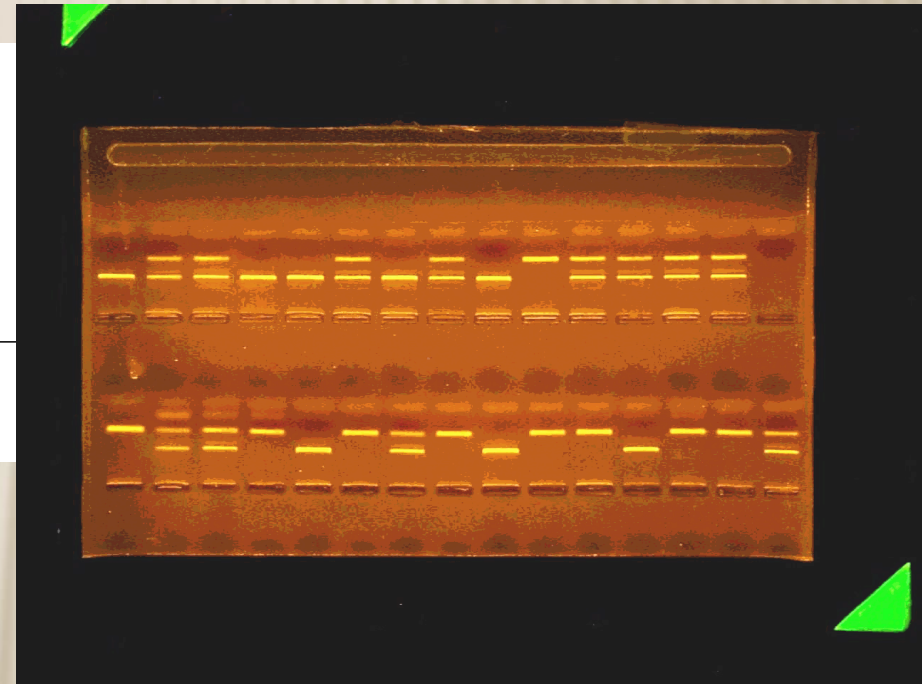
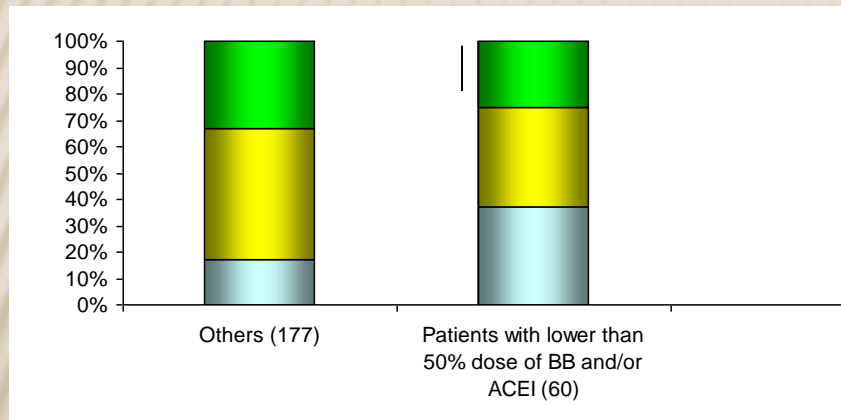
# ZÁVĚR

---

- × Závěrem je tedy možno konstatovat, že úspěch biologické léčby souvisí s některými vrozenými genotypy v prozánětlivých genech.
- × Rozvoj psoriázy u pacientů s biologickou léčbou zřejmě souvisí s genotypy v polymorfismech v MDR1. Produkt tohoto genu je schopen snižovat hladiny xenobiotik v buňkách.
- ×

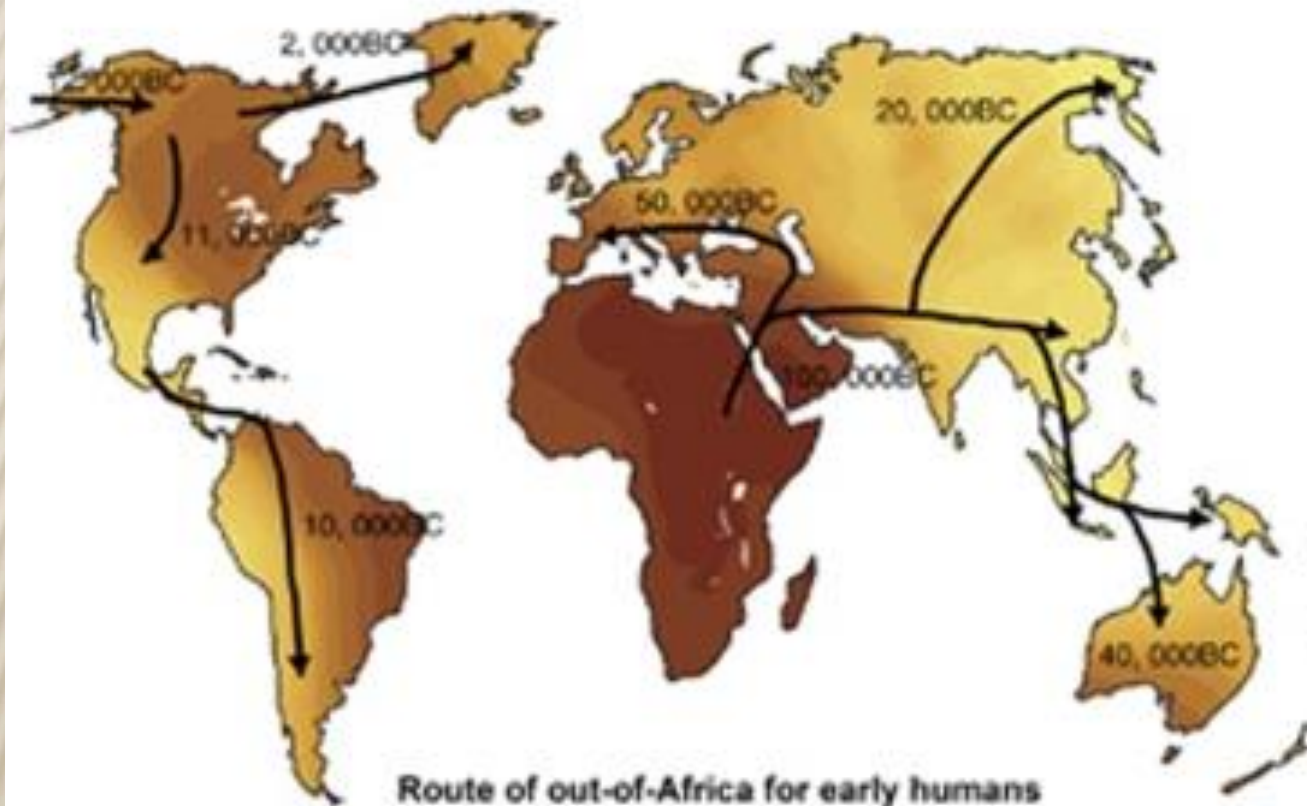
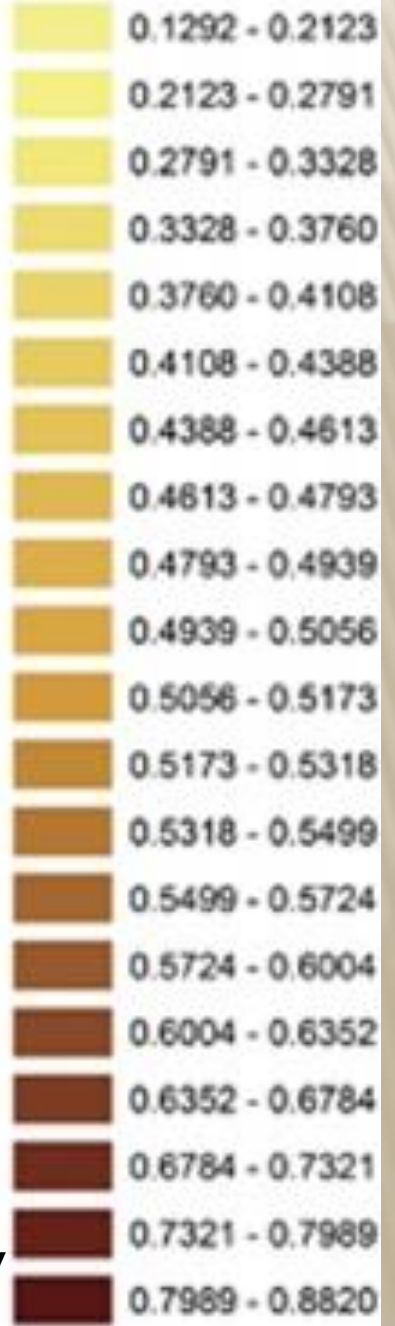
# CHRONICKÉ SRDEČNÍ SELHÁNÍ FARMAKOGENETICKÉ ROZDÍLY V DÁVKOVÁNÍ BETA BLOKÁTORŮ A ACEI- I/D ACE

Pacienti s nižší než 50% dávkou z doporučené dávky BB+ACEI mají  
**2,84 x častěji genotyp II,**  
**P=0,002**



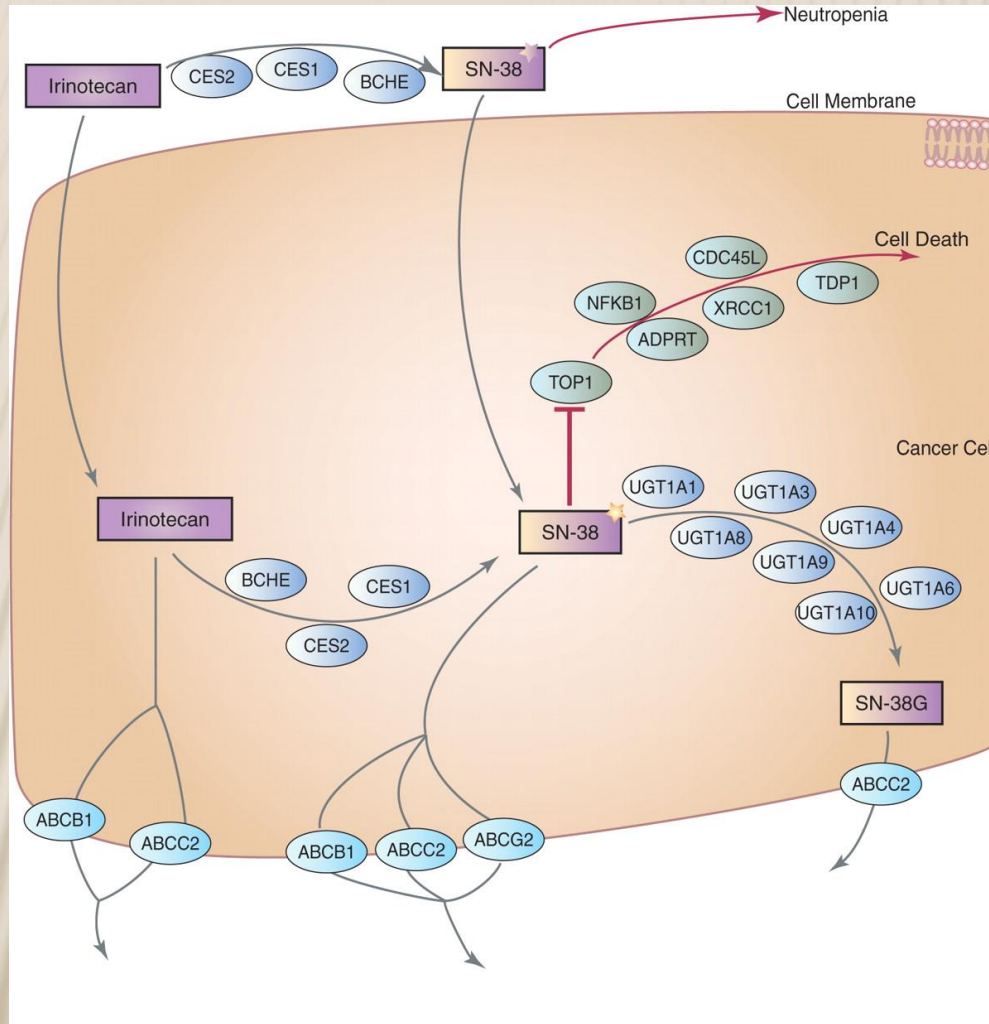
**Pg=0,006, Pa=0,009**

### Frequency of D allele



→ route

# PharmGKB Irinotecan Pathway



PharmGKB Copyright 2004

Hernandez-Boussard, T. et al. Nucl. Acids Res. 2007 0:gkm1009v1-1009;  
doi:10.1093/nar/gkm1009

Nucleic Acids Research



# TO THE PREVIOUS PICTURE:

---

- × Irinotekan pathway. Model of human liver with blood, bile and intestine compartments.
- × Drug-purple frames
- × Genes-transporters-turquoise ovals
- × Metabolic enzymes-blue ovals
- × Interactive pathway
- × (see [www.pharmgkb.org/search/pathway/irinotecan/liver/jsp](http://www.pharmgkb.org/search/pathway/irinotecan/liver/jsp)).

# 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: TYPY NEMOCÍ

---

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

# GENOVÁ TERAPIE

---

- × Virové a nevirové vektory.
- × Různé terapeutické strategie:
- × „**gene-based**“ (tumor suppressor genes, suicide genes, antiangiogenic genes, cytokine a oxidative stress-based genes)
- × „**RNA-based**“ (antisense oligonucleotides and RNA interference) přístupy.
- × „**immune response-based**“ strategies (dendritic cell- and T cell-based therapy) se rozvíjejí v terapii tumorů.

# GENOVÁ TERAPIE

---

- **Klasická genetická terapie** (dopřavit 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

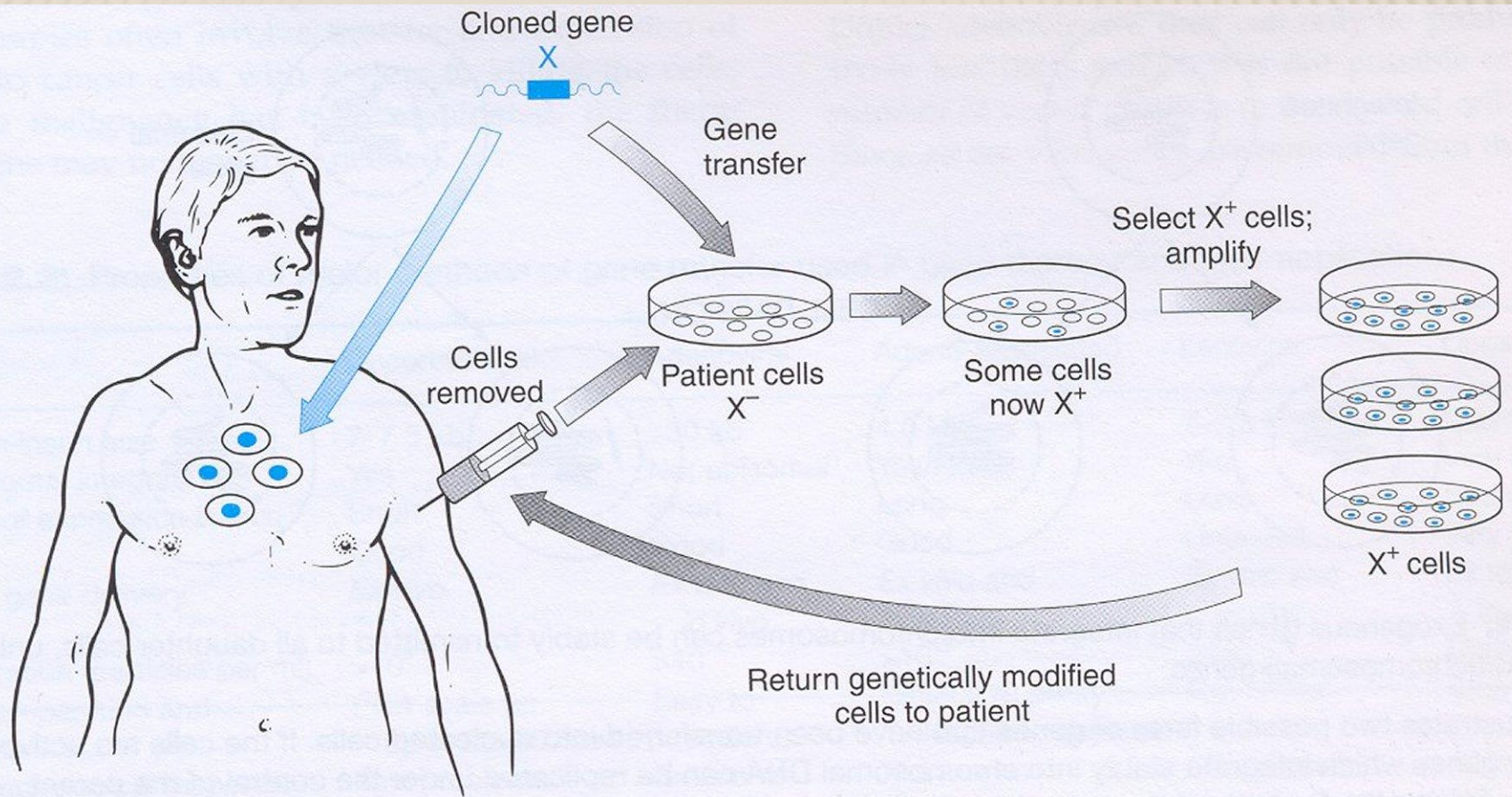
# TECHNOLOGIE KLASICKÉ GENETICKÉ TERAPIE

- ✘ 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)

# PRINCIPY GENETICKÉHO TRANSFERU

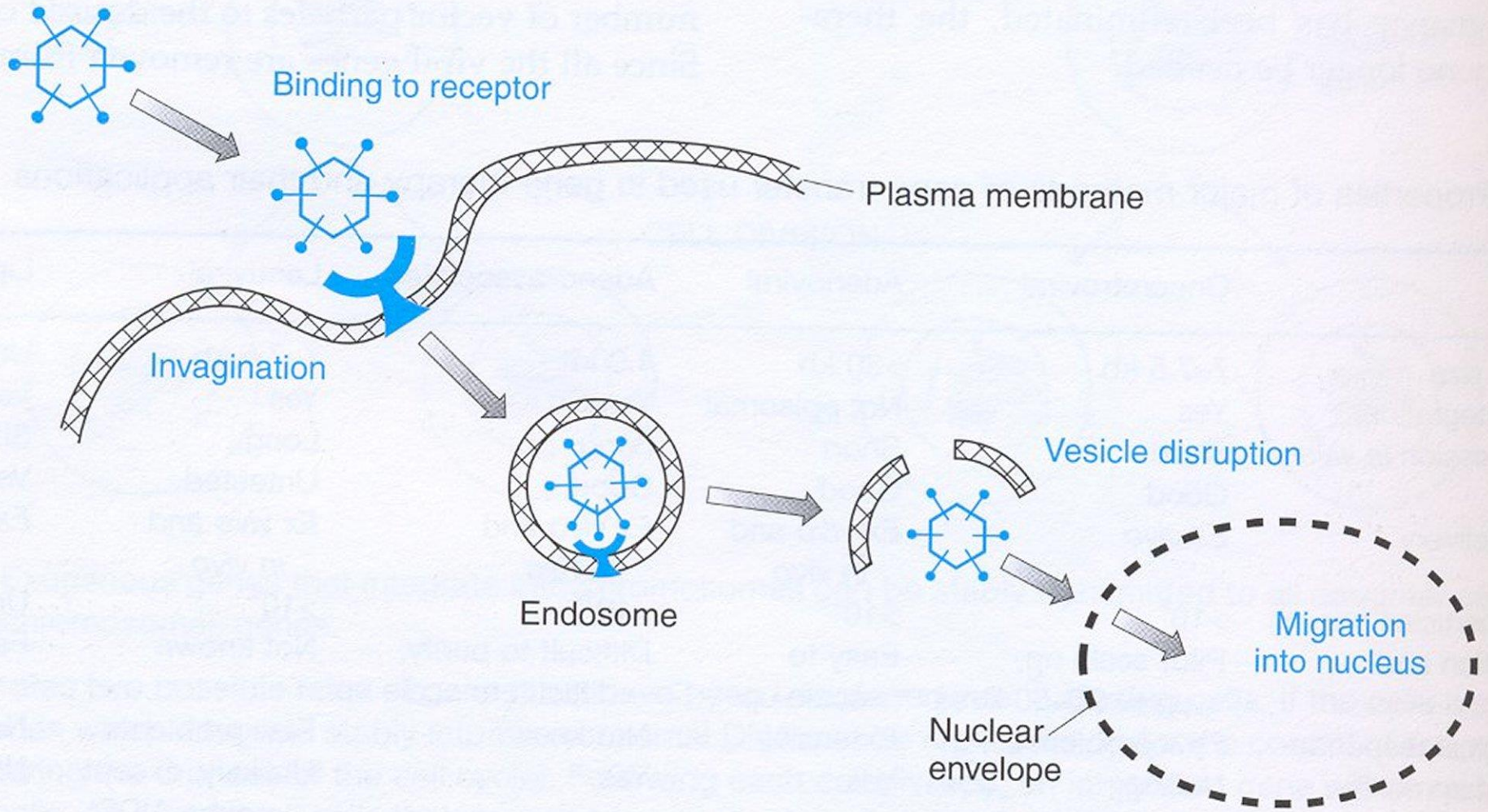
---

- 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 apoptotického genu-výhoda transferu ex vivo.
  - **B) extrachromozomálně** – nevýhoda nejistého dlouhodobého účinku



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





Adenoviruses enter cells by receptor-mediated endocytosis.

# 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.

## GENOVÁ TERAPIE A JINÉ TERAPEUTICKÉ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ PŘÍSTUPY

- Rekombinantní proteiny a „genetically engineered“ vakcíny
- Expresním klonováním produktů normálního genu (klonované geny jsou exprimovány v mikroorganismech nebo transgenních organismech), které slouží k tvorbě velkých množství medicínsky cenných produktů
- Produkci geneticky „engineering“ protilátek (geny pro protilátky jsou manipulovány k tvorbě nových částečně nebo plně humanizovaných protilátek) pro terapeutické použití
- Produkci „genetically engineered“ vakcín-především proti tumorům a infekčním agens.

# REKOMBINANTNÍ BÍLKOVINY 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

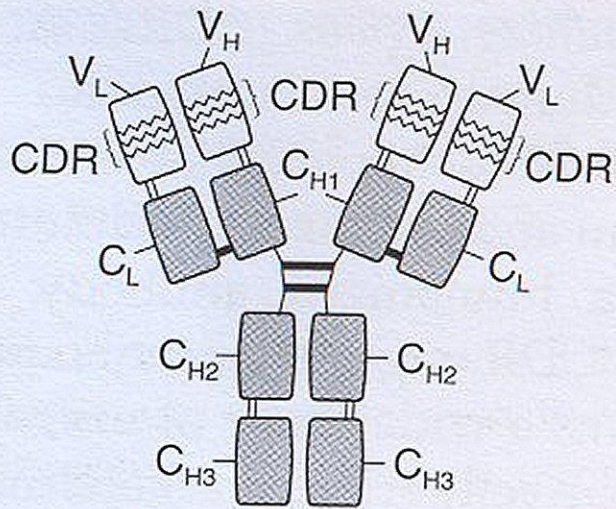
## **V transgenních zvířatech:**

- možnost navodit podobné posttranslační systémy jako u člověka

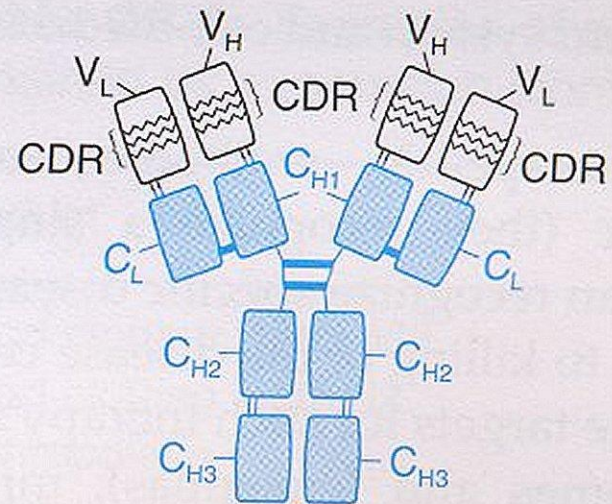
# CHIMERICKÉ A HUMANIZOVANÉ PROTILÁTKY

---

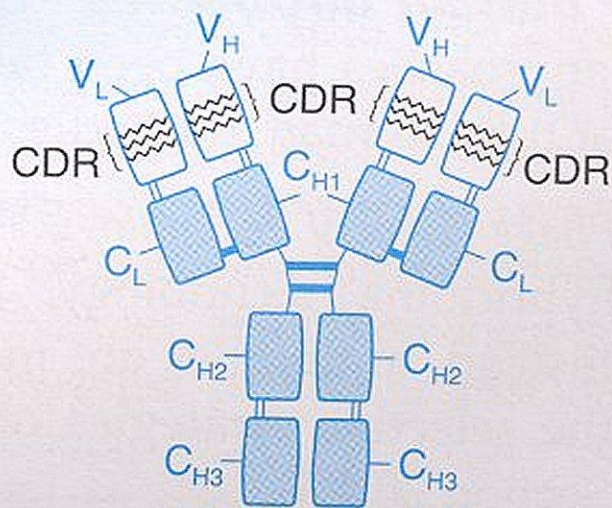
- Rekombinantní protilátky humánní-hlodavčí
- Humanizace hlodavčích mAb umožňuje získat velké množství protilátek a zároveň zabránit imunitní odpovědi lidského příjemce:
  - chimerické V/C protilátky)
  - CDR (complementarity determining regions) graft protilátky
  - Infekční patogeny a antigeny nádorových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



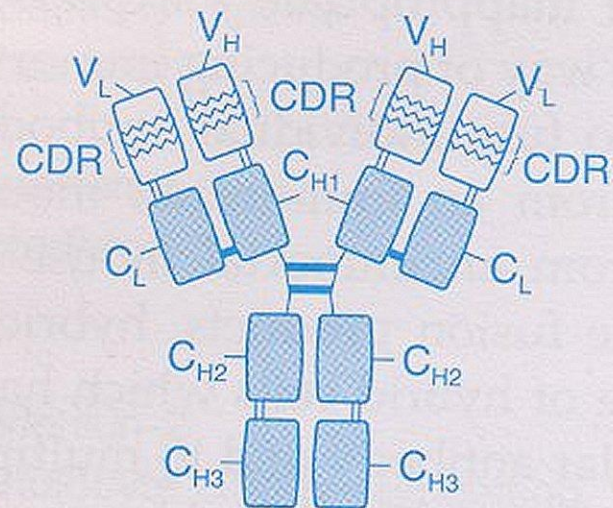
All-rodent antibody



Chimeric (V/C) antibody



Humanized antibody



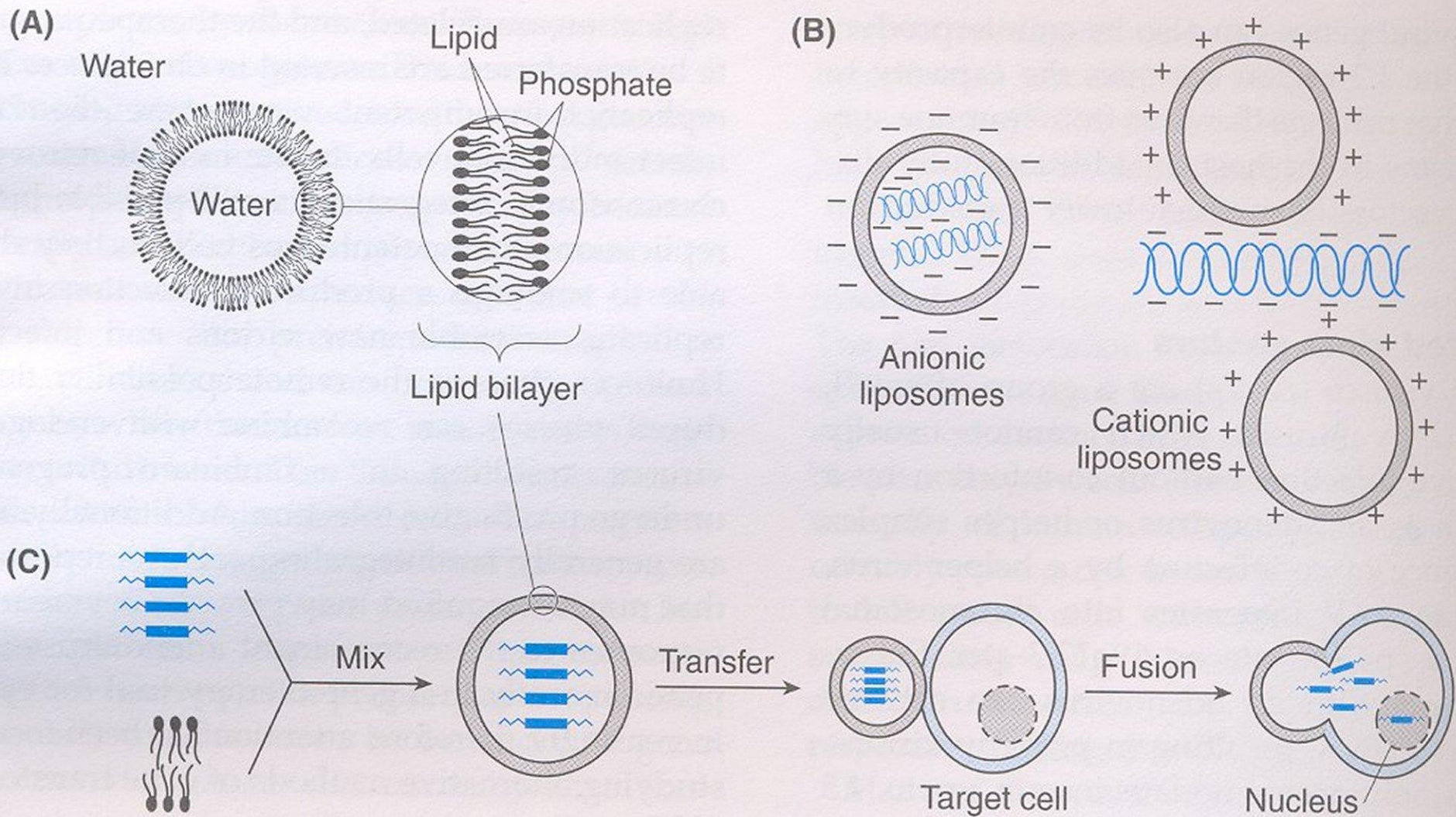
Fully human antibody

Genetically engineered antibodies.

# „GENETICKY ENGINEERED“ 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



**6:** *In vivo* liposome gene delivery.



# DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

