

Protinádorová léčiva IV

FarmChem10

„Biologická“ léčba

Cytokiny a nespecifické imunostimulátory

Protilátky

Alternativy ke standardním protilátkám

Protinádorové vakciny

Blokování přenosu genetické informace

Komplementární oligonukleotidy

RNA interference

Genová terapie

Viroterapie, bakterioterapie

Perspektivy protinádorové terapie

„Biofarmaka“ léčiva charakteru biopolymerů

- **Nejrychleji se rozvíjející skupina léčiv**
 - povolených biofarmak již přes 200
 - nárůsty prodejů biofarmak jsou dvouciferné
přibližně 60% nárůst v průběhu posledních 5 let, v žebříčcích prodejů nyní převládají
 - ve vývoji 1.500 biofarmak, z toho asi 1/3 pro protinádorovou terapii
biofarmaka jsou nyní zastoupena téměř ze 75% mezi protinádorovými léčivy
v registračním řízení nebo v pokročilých fázích klinického zkoušení → i organičtí
chemici zabývající se o farmakochemii by proto měli mít alespoň základní informace o
„biologických“ léčivech a onkologické imunoterapii, genové a buněčné terapii
- **Problémy**
 - mimořádně vysoké ceny („finanční toxicita“)
 - složitý vývoj a výroba
 - dosud trvající patentová ochrana většiny úspěšných biofarmak
patent chránící rituximab, první monoklonální protilátku pro onkologickou terapii,
proexpiroval v Evropě v r. 2014, v USA ochrana skončila až v září 2016
 - obtížné napodobování úspěšných biofarmak
je krajně nesnadné připravit látky zcela shodné s originálním „biologickým“ léčivem
(např. rituximab: $C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$, mol. hmotnost 143.860), výsledkem proto
nejsou ekvivalentní „biogenerika“, ale „bionapodobeniny“ (biosimilars)
 - ⇒ požadován větší rozsah klinických zkoušek prokazujících bioekvivalenci
 - ⇒ menší počet povolených bionapodobenin - Evropě 58, v USA jen 26

Cytokiny a další „biologické“ imunostimulátory

(ATC skupina L03)

Cytokiny - signální polypeptidy imunitního systému

dříve připravovány izolací, dnes převážně biotechnologickými postupy

L03AA - Růstové faktory indukující růst kolonií krevních buněk

hemopoetické faktory zvyšující odolnost vůči infekcím – potlačují neutropenii (snížení počtu určitého druhu bílých krvinek – neutrofilních granulocytů, které mají velký význam pro imunitní obranu organismu) způsobenou cytostatiky

G-CSF (filgrastim, lenograstim), GM-CSF (molgramostim, sagramostim)

epoetiny (B03 – antianemika) – podporuje tvorbu červených krvinek

L03AB - Interferony (α , β , γ) – původně obrana proti virům, aktivace imunitního systému, cytotoxický účinek na nádorové buňky

INF α a β – léčba melanomu, leukemií a lymfomů, INF γ – některé hematologické malignity

L03AC – Interleukiny – přirozené aktivátory buněk imunitního systému

IL2 (aldesleukin) – léčba melanomu, nádorů ledvin, AML,

směs leukocytárních cytokinů – Multikine (IL2, IL1, INF α , TNF, G-CSF, další interleukiny...)

IL 11 (oprelvekin) – léčba trombocytémie provázející chemoterapii

IL12 + IL15 + IL18 – „interleukinový koktejl“

Denileukin diftitox – fúzní protein (IL2 + záškrťový toxin) – léčba kožního T-lymfocytárního lymfomu

(TNF α) – tumory nekrotizující faktor (faktor nekrózy nádorů)

může vyvolat apoptózu nádorových buněk, ale v protinádorové terapii nepoužíván – je odpovědný za kachexii, je mediátor zánětů a septického šoku a příčinou řady autoimunitní onemocnění

Nespecifické biopolymerní imunostimulanty – L03AX

Vakcína BCG – oslabené živé bakterie *Mycobacterium bovis* (primární použití – očkování proti TBC)

Urocidin – lyzát *Mycobacterium phlei* (složky buněčných stěn + bakteriální DNA)

Transfer faktor“ – purifikovaný bezbuněčný lyzát bílých krvinek (Imunor, předtím Immodin)

Protinádorové vakcíny

Protilátky

Protilátky (imunoglobuliny, antibodies) jsou glykosylované bílkoviny rozpoznávající a specificky interagující s antigeny (tj. biomakromolekulárními determinantami bakterií, virů, infikovaných buněk, ale také nádorových buněk a některých buněk imunitního systému).

Protilátky jsou produkovány lymfocyty (bílymi krvinkami typu B) po imunizaci antigenem. Získávají mohou být „polyklonální“ protilátky vytvářené různými klony lymfocytů, tedy vlastně směs protilátek s různou afinitou k určitému antigenu. Specifickými postupy lze připravovat „monoklonální“ protilátky, což jsou individuální protilátky vyznačující se vysokou afinitou a specificitou k antigenu.

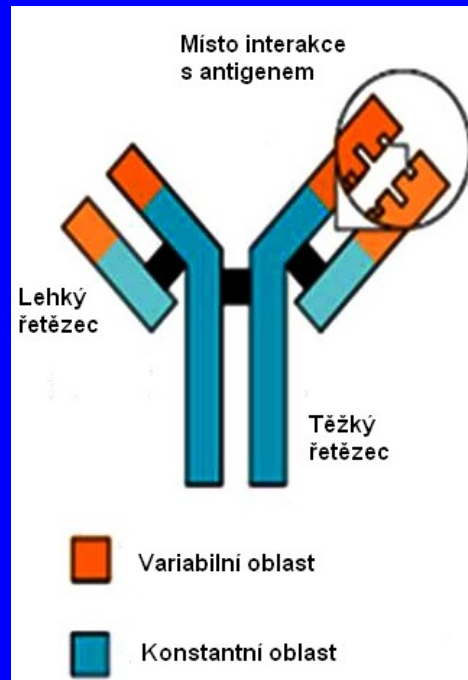
Specifické interakce protilátek s antigeny se využívají v diagnostice pro imunochemické stanovení různých látek (včetně nádorových antigenů a biomarkerů) nebo v terapii.

Interakce protilátky s antigenem může nositele antigenu zneškodnit buď jeho neutralizací (zabráněním patogenu, aby proniknul do buňky), nebo aktivací buněk imunitní obrany organismu.

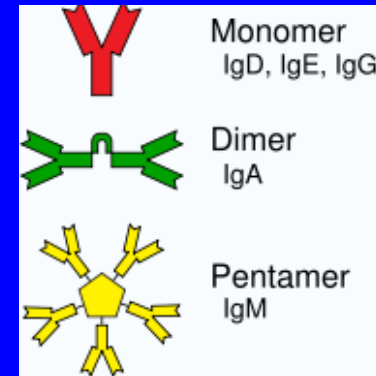
Molekuly protilátek mají tvar písmene Y a jsou tvořeny „lehkými“ a „těžkými“ řetězci aminokyselin, které jsou propojeny disulfidickými můstky. Podle typu těžkého řetězce se rozlišuje 5 tříd protilátek – monomerními protilátkami jsou IgD, IgE a IgG, dimerní je IgA a pentamerní IgM

Protilátky

Struktura

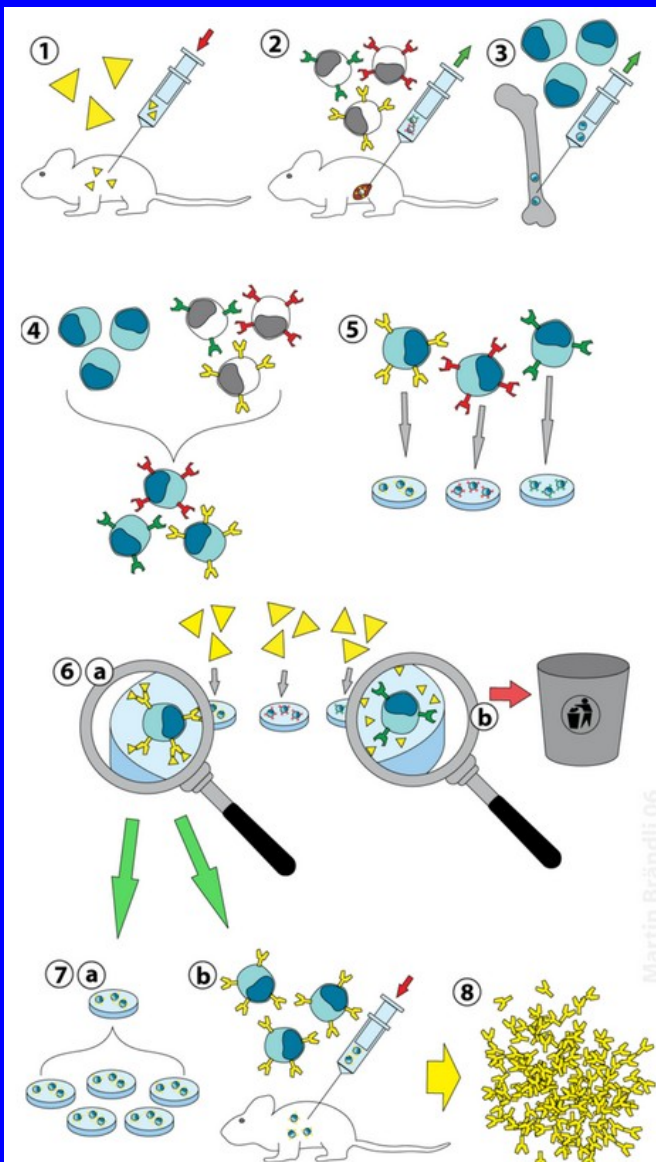


Třídy protilátek



V terapii a diagnostice se využívají imunoglobuliny třídy G (IgG), což jsou protilátky s nejčastějším výskytem v krvi a tkáňové tekutině

Myší monoklonální protilátka – produkce pomocí hybridomů



1. Imunizace myši podáním antigenu. Lymfocyty B začínají produkovat protilátky proti antigenu
2. Odběr lymfocytů B ze sleziny
3. Izolace nesmrtelných nádorových (myelomových) buněk z kostní dřeně
4. Vznik hybridomů fúzí lymfocytů B a myelomových buněk pomocí propylenglykolu
5. Kultivace v HAT médiu (obsahujícím hypoxanthin, aminopterin a thymidin) – přežijí jen buňky hybridomů, které od myelomových buněk získaly nesmrtelnost a od lymfocytů hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferasu (HGPRT). Nefúzované B-lymfocyty a myelomové buňky přitom zahynou.
6. Kultivace hybridomů a výběr klonů produkujících protilátky s nejvyšší afinitou k antigenu
7. Kultivace vybraného hybridomu
 - *in vitro* v tkáňových kulturách (a) nebo
 - *in vivo* po injikování hybridomů do břišní dutiny pokusného zvířete – myši (b)
8. Izolace a purifikace produkované monoklonální protilátky (při kultivaci *in vivo* z odebrané ascitické tekutiny)

Monoklonální protilátky – použití v terapii

Výhody

- ☞ jsou vysoce selektivní
- ☞ lze využívat různé mechanismy účinku

přímé použití

- neutralizace růstových faktorů a jejich receptorů
- aktivace buněk imunitního systému

nepřímé použití – směrování terapeutik na nádorové buňky

- konjugáty protilátek s cytostatiky, toxiny, radioizotopy

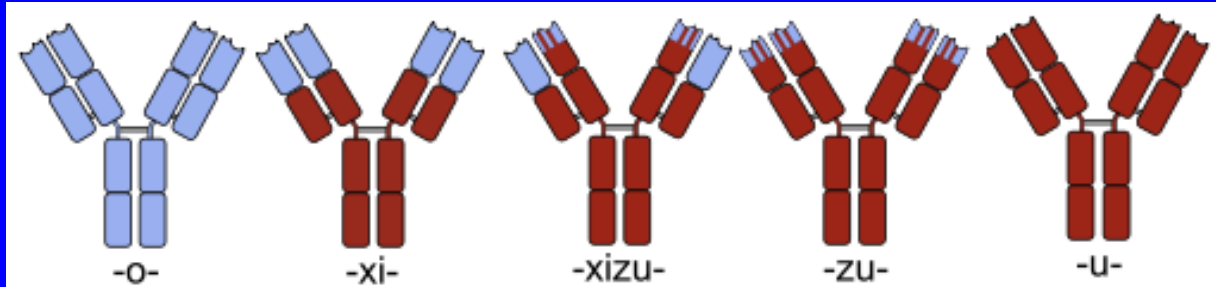
Problémy

- ☞ imunogenicitá
 - organismus může považovat protilátky za cizorodé bílkoviny, které mohou vyvolat nežádoucí reakci jeho imunitního systému
 - imunogenicitá: zvířecí (hlavně myši) protilátky > „humanizované“ > lidské protilátky
 - ☞ náročný a nákladný VaV i výroba ⇒ vysoké ceny
 - značná poptávka, poměrně malá konkurence
 - omezené možnosti snížení ceny
- bionapodobeniny, nanoprottilátky, prottilátková mimetika, aptamery, monolátky

Typy monoklonálních protilátek

Označování: koncovka – mab (monoclonal antibody)

před -mab hlásky/slabiky označující typ, protinádorové protilátky mohou mít navíc –tu-



Myší protilátky (-omab) – vyvolávají imunitní odezvu ⇒ použití v humánní terapii

omezené (nevhodné pro opakované podání) – diagnostika, konjugáty (směrování)
oregovomab, blinatumomab ...tositumomab-¹³¹I, ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y, -¹¹¹In; moxetumomab pasudotox...

Chimérické protilátky (-ximab) – lidské těžké řetězce, myší lehké řetězce
rituximab, cetuximab, bavituximab, girentuximab, oblituximab, siltuximab, ...brentuximab vedotin...

Humanizované protilátky (-xizumab, -zumab) – z 90-95% lidské, jen variabilní část lehkého řetězce rozeznávající antigen zůstává myší

trastuzumab, pertuzumab, nimotuzumab, mogamulizumab, bevacizumab, obinutuzumab, okaratuzumab, veltuzumab, epratuzumab, alemtuzumab, farletuzumab, pidilizumab, lambrolizumab, elotuzumab, onartuzumab ... trastuzumab emtansin, gemtuzumab ozogamycin, lorvotuzumab mertansin...

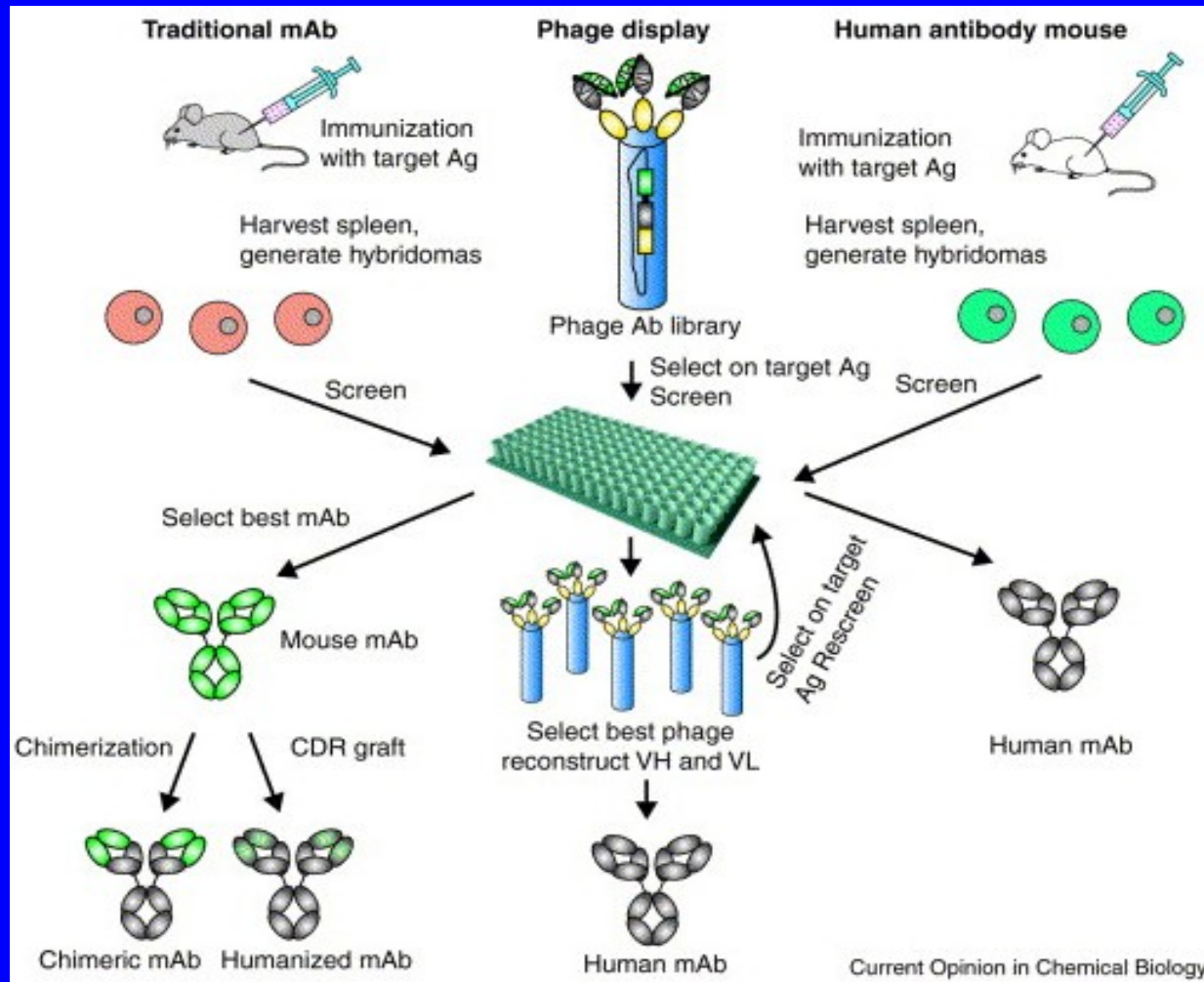
Lidské protilátky (-umab) – minimální imunogenita, možnost opakovaného použití

panitumumab, ipilimumab, zalutumumab, mapatumumab, tremelimumab, ofatumumab, necitumumab, ramucirumab, denosumab, epratuzumab, nivolumab, daratumumab, cixutumumab, zanolimumab,

...

glembatumumab vedotin, enfortumab vedotin...

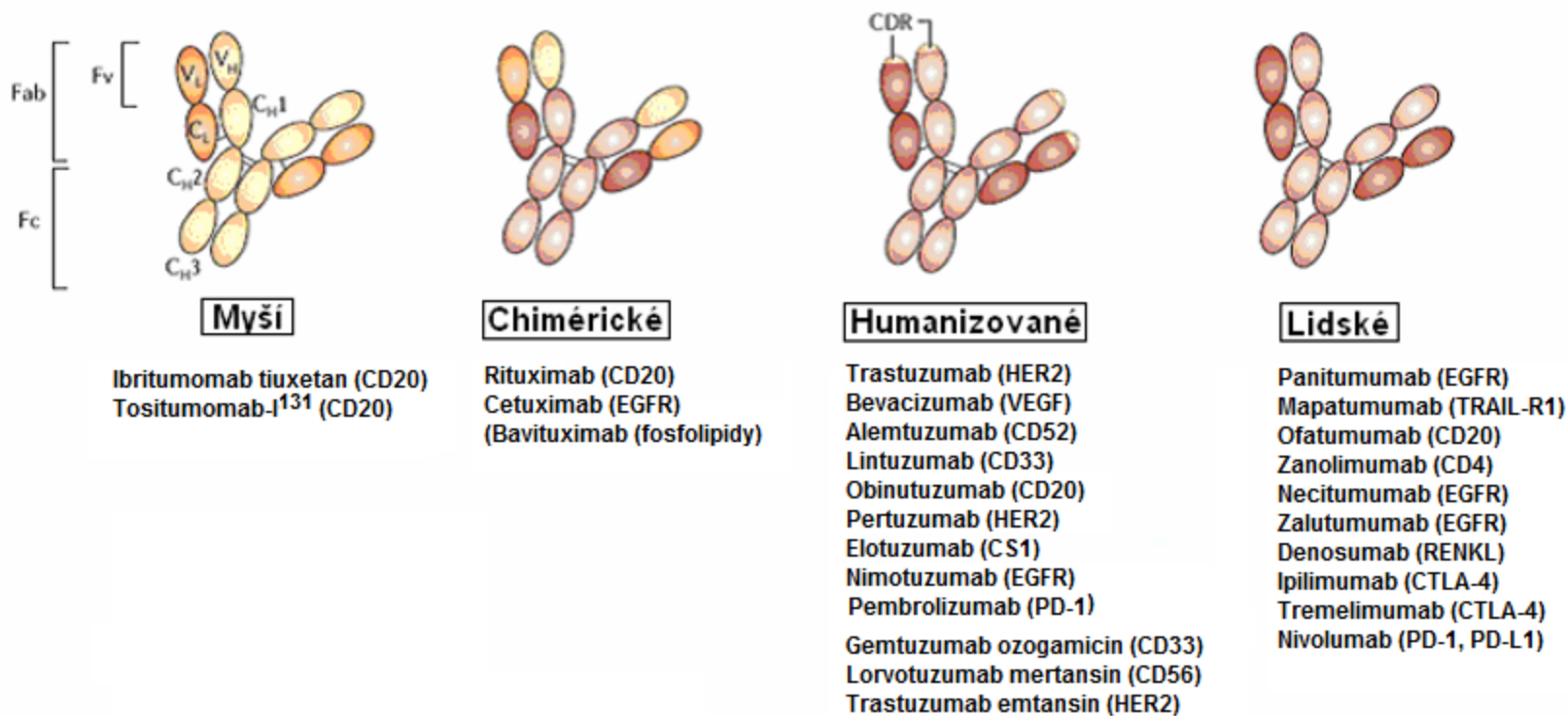
Humanizované a lidské protilátky



Video ilustrující fágovou prezentaci: <https://www.youtube.com/watch?v=AqQDZxoCGqE>
Kromě fágů lze využít k prezentaci lidských protilátek i bakterie, kvasinky nebo živočišné buňky s modifikovaným genomem, popř. technik cDNA, ribosomální nebo mRNA prezentace

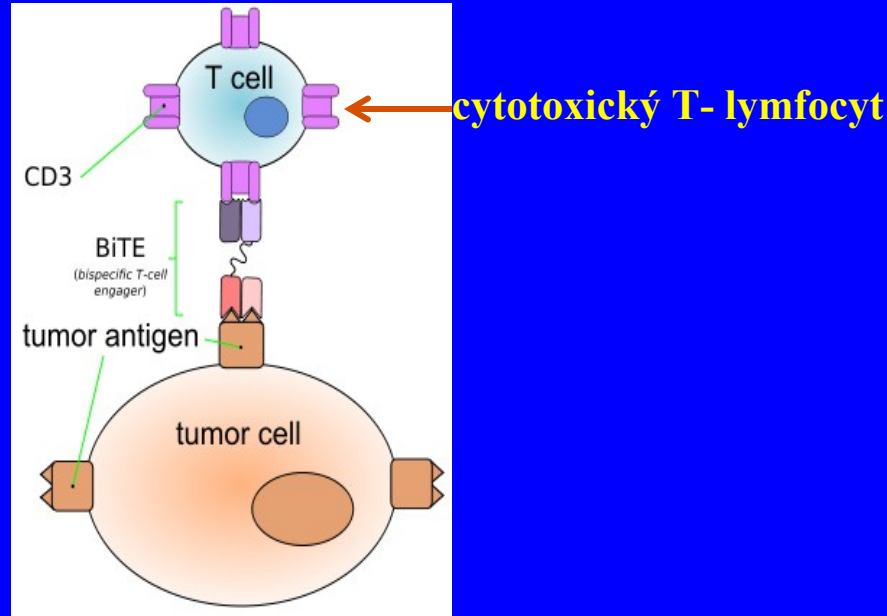
Monoklonální protilátky používané nebo zkoušené v protinádorové terapii

Typy monoklonálních protilátek



Bi- a trispecifické protilátky

Propojení nádorových buněk s cytotoxickými buňkami imunitního systému



**Blinatumomab (Blincyto) – bispecifická myší protilátka
proti antigenům CD19 (leukemické buňky) + CD3**

**Katumaxomab (Removab) – trispecifická myší/potkaní protilátka
proti EpCAM (adhesivní molekule epiteliálních buněk) + CD3 + Fc receptoru
makrofágů nebo dendritických buněk nebo buněk „přirozených zabíječů“ (NKC)**

**Girentuximab (RencaRex) – chimérická bispecifická protilátka
proti anhydrase kyseliny uhličitě IX (na buňkách nádorů ledvin) + Fc receptor
„přirozených zabíječů“ (na ten se protilátka váže svojí konstantní částí)**

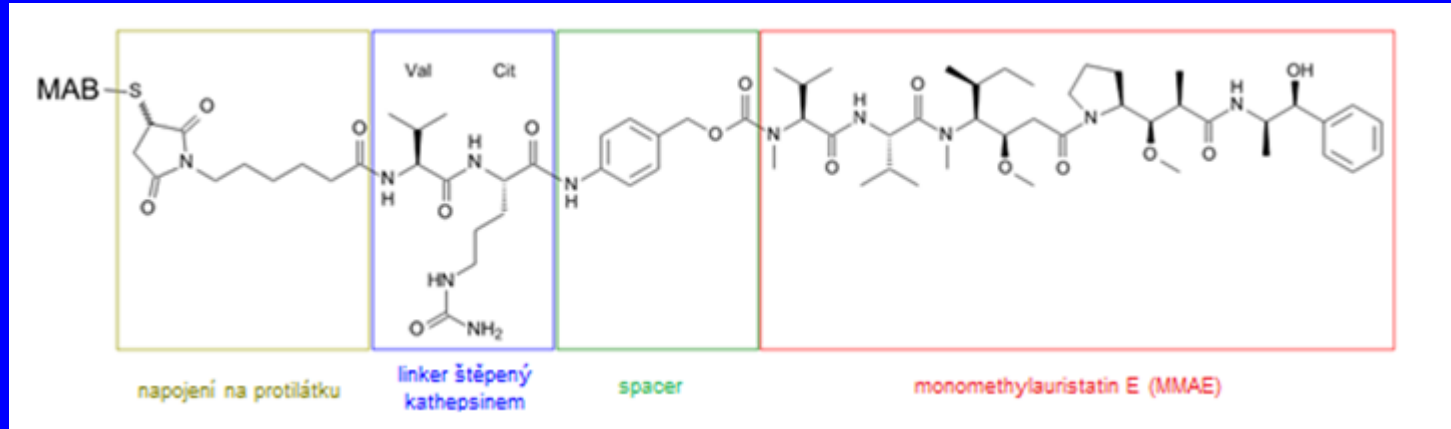
Monoklonální protilátky pro onkologii

- **protilátky a fúzní proteiny proti růstovým faktorům (imunoadhesiny)**
 - VEGF: bevacizumab; aflibercept (= VEGF Trap, fúzní protein – konstantní část lidského IgG1 + extracelulární fragmenty VEGFR1 a VEGFR2), dalantercept (blokáda TGF)
- **protilátky proti buněčným receptorům pro růstové faktory**
 - EGFR: trastuzumab (HER-2; 1998), cetuximab, nimotuzumab, zalutumumab, panitumumab
 - VEGFR: ramucirumab
 - receptory pro další růstové faktory: cixutumumab, olaratumumab, onartuzumab, ...
- **protilátky proti nádorovým antigenům CD20, CD22, CD38, CD52, CS1...)**
 - rituximab (první protilátka povolena v protinádorové terapii – 1997), alemtuzumab, atumumab, bavituximab, daratumumab, dinutuximab, elotuzumab, epratuzumab, farletuzumab, mogamulizumab, obinutuzumab, ofatuzumab, okaratuzumab, okrelizumab, ublituximab, veltuzumab, ...
 - BiTE protilátky – bispecifické (bifunkční protilátky proti nádorovým antigenům a antigenům na povrchu buněk imunitního systému – propojují nádorové buňky s T-lymfocyty, které pak nádorové buňky zlikvidují) - blinatumomab, ertumaxomab, katumaxomab, girentuximab, solitomab, flotetuzumab, ...
- **protilátky proti prozánětlivému cytokinu IL-6: siltuximab, tocilizumab**
- **konjugáty protilátek:**
 - protilátky s radioisotopy – ibritumomab tiuxetan (⁹⁰Y, ¹¹¹In), tositumomab ¹³¹I, ¹³¹I-Cotara...
 - protilátky s navázanými cytostatiky (nevhodné pro přímé podání pro vysokou toxicitu): brentuximab vedotin, gemtuzumab ozogamycin, inotuzumab ozogamycin, trastuzumab emtansin a další
 - „polymerní léčiva“ (ÚMCh + MBÚ AV ČR) – protilátka + polyHPMA-peptid-doxorubicin
 - metoda ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy) – konjugáty protilátky a fosfatasy štěpící současně podávaná fosforylovaná profarmaka (fludarabin fosfát apod.)
- **protilátky aktivující imunitní systém**

Imunotoxiny – konjugáty protilátek s vysoce cytotoxickými látkami

Protilátka zajišťuje nasměrování toxinu přednostně na nádorové buňky

Příklad: Struktura jednoho imunotoxinu (brentuximab vedotin) – konjugát MMAE



Další imunotoxiny určené pro onkologii:

Konjugáty MMAE: glembatumumab vedotin, enfortumab vedotin, lifastuzumab vedotin

Konjugáty s deriváty maytansinu: trastuzumab emtansin, bivatuzumab mertansin, kantuzumab mertansin, lorvotuzumab mertansin, anatumab ravtansin, mirvetuximab soravtansin

Konjugáty kalicheamycinu: gemtuzumab ozogamycin, inotuzumab ozogamycin

Konjugáty SN-38: sacitumumab govitekan, labetuzumab govitekan

Ostatní: rovalpituzumab tesirin (konjugát dimeru pyrrolobenzodiazepinu), trastuzumab deruxtekan

Mezi imunotoxiny řazeny nejen konjugáty protilátek a jejich fragmentů, ale i jiných bílkovin se zvýšenou aktivitou vůči nádorovým buňkám : moxetumomab pasudotox (fragment protilátky proti nádorovému antigenu CD22 + pseudomonádový exotoxin), Proxinium (fragment protilátky proti antigenu buněk epitelu EpCAM + pseudomonádový exotoxin), cintredekin besudotox (IL13 + pseudomonádový exotoxin), TransMID 107 (transferrin + záškrťový toxin)

Alternativy k terapeutickým protilátkám

„Bionapodobeniny“ (biosimilars) – nejde o (bio)generika

- trastuzumab: $C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$, mol. hmotnost: 145531,5 g/mol
- naprostá shoda zcela nepravděpodobná, shodné mohou být jen základní rysy
- pro průkaz bioekvivalence požadován větší rozsah klinického zkoušení než u nízkomolekulárních generik

Nanoprotilátky – protilátky velbloudů, lam a některých ryb

- asi 10 x menší jednoduchá molekula, ale plně funkční
- výzkum a vývoj zatím příliš nepokročil (pro použití v onkologii zahájen v r. 2011)
- riziko přenosu virů (MERS)

Protilátková mimetika

- imunoadesiny – rekombinantní fúzní proteiny s konstantní částí lidského imunoglobulinu IgG1 a fragmenty receptorů pro růstové faktory (VEGFR) - ziv-aflibercept (Zaltrap), dalanercept
- „plastické“ protilátky - nanočástice syntetických biopolymerů s terciární strukturou získanou „molekulárním otiskem“ antigenu obsaženým v polymerační směsi

Aptamery – oligonukleotidy nebo oligopeptidy rozeznávající určité struktury

- oligonukleotidické aptamery – snazší příprava, ale málo stabilní, uplatnění hlavně v diagnostice
- oligopeptidické aptamery – DARPiny s opakující se strukturou oligopepidu ankyrinu

Monolátky – vazebné oligopeptidy tvořené ~ 90 aminokyselinami

- selektované oligopeptidy založené na obměnách smyček molekuly fibronektinu III napodobujících místa protilátek pro rozpoznávání antigenů (CDR)

Protinádorová imunoterapie

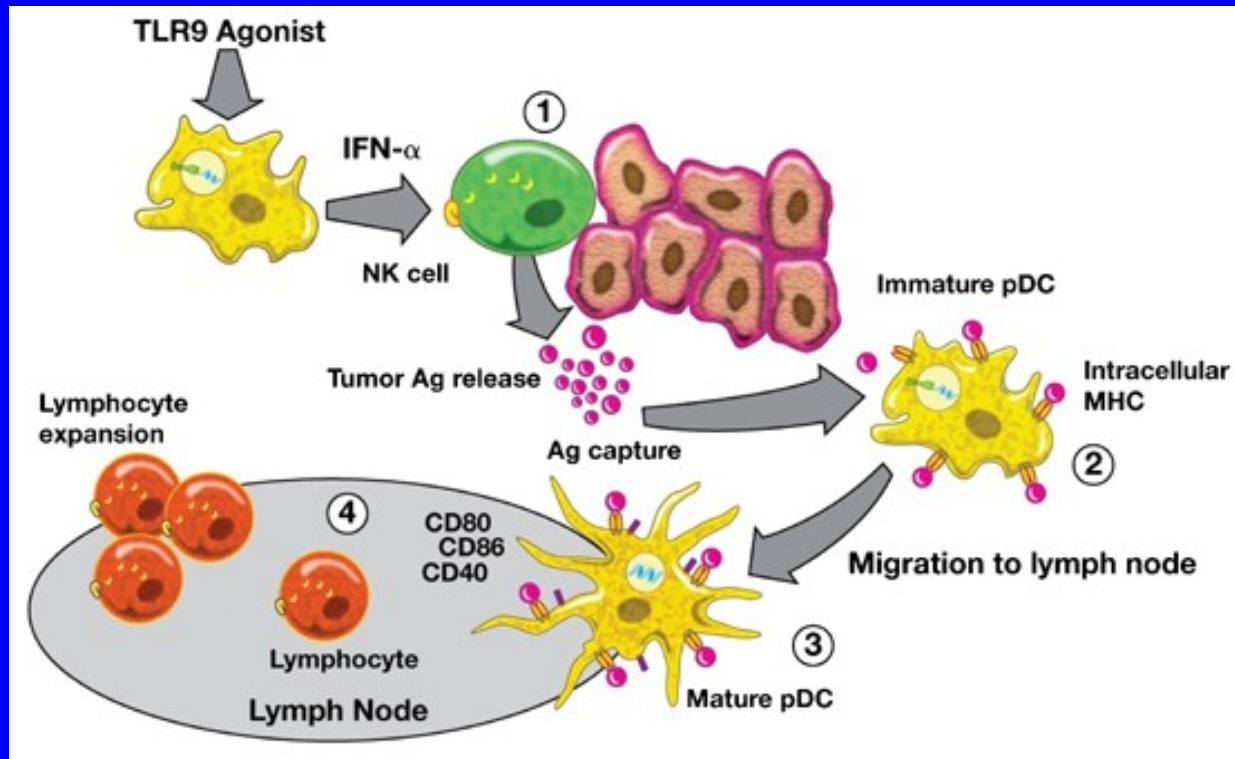
Protinádorová imunoterapie je založena na zvýšení aktivity imunitního systému pacienta vůči jeho nádorovým buňkám. Zatímco chemoterapeutické přístupy jsou založeny na usmrcení nádorových buněk, imunoterapie na instrukci organismu, aby se s nádorovými buňkami vypořádal sám.

Zkoušky různých postupů protinádorové imunoterapie přinesly značné úspěchy v léčbě některých pacientů.

Protinádorová imunoterapie je však velmi náročná na provedení (nemůže být použita kdekoliv a kýmkoliv a pro kohokoliv) a také je mimořádně nákladná.

V r. 2013 byla protinádorová imunoterapie označena časopisem *Science* za průlom roku.

Přirozená imunitní obrana proti nádorovým buňkám



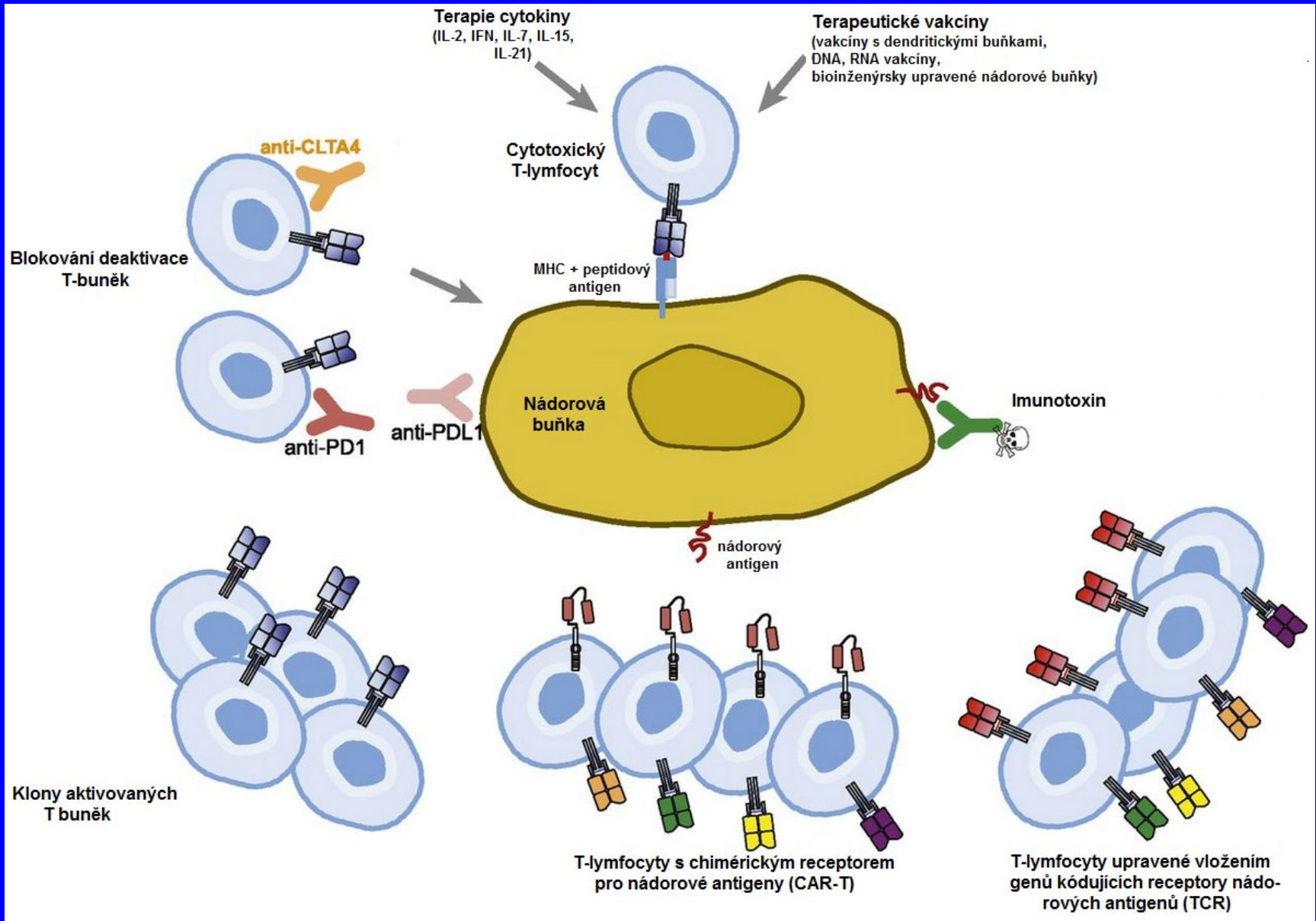
A.M. Krieg, *Oncogene*, 27, 161-7, (2008)

Agonisté receptoru TLR9 (člen rodiny receptorů podobajících se proteinu Toll objevenému u *Drosophily*) aktivují nezralé plasmacytické dendritické buňky, které pak sekretují interferon α . Tím jsou aktivovány buňky imunitního systému nazývané „přirození zabíječi“ (natural killer cells), které nádorovou buňku lyzují a tím z ní uvolní nádorové antigeny. Dendritické buňky je zachytí, migrují s nimi do lymfatických žláz, kde je prezentují cytotoxickým T-lymfocytům. Tím naučí T-lymfocyty rozpoznávat nádorové buňky. V mízních uzlinách se pak T-lymfocyty pomnoží a poté začnou nádorové buňky likvidovat

Postupy protinádorové imunoterapie – způsoby posílení imunitního systému

- **Vakcinace chránící proti infekcím patogenními viry, které mohou přecházet v nádorové onemocnění – preventivní vakcíny**
- **Aktivace T-lymfocytů prezentací nádorových antigenů – terapeutické vakcíny**
- **Aktivace T-lymfocytů pro likvidaci nádorových buněk protilátkami proti receptorům na lymfocytech nebo jejich ligandům tlumícím imunitní odezvu**
- **Adoptivní imunoterapie aktivovanými T-lymfocyty. Jde o způsob léčby nádorových onemocnění injekcemi lymfocytů získaných z periferní krve pacienta a namnožených v tkáňové kultuře v přítomnosti IL2 (a případně i určitých lektinů). T-lymfocyty se přitom stávají silně cytotoxickými a začínají likvidovat pacientův nádor (LAK cells – lymphokine activated killer cells)**
- **Výběr T-lymfocytů s receptory silně reagující na nádorové antigeny, izolace genů, které je kódují, jejich vnesení do T-lymfocytů pacienta, pomnožení modifikovaných lymfocytů v tkáňové kultuře a podání pacientovi (TCR)**
- **Modifikace T-lymfocytů pacienta zavádějící na jejich povrch „chimérické“ antigenní receptory silně interagující s nádorovými antigeny, namnožení takto modifikovaných lymfocytů a podání pacientovi (CAR-T)**

Postupy protinádorové imunoterapie



Imunitní obrana organismu – vakcíny pro protinádorovou prevenci

Vakcíny proti infekcím předcházejícím vzniku nádorů

▪ Papilloma viry

Infekce lidskými papiloma viry (HPV) může vyvolat vznik nádorů děložního čípku, děložního hrdla, vulvy, penisu a jícnu

Známo na 100 typů HPV, z toho asi 15 může způsobit vznik nádorů

Bivalentní vakcína Cervarix (GSK) – chrání proti HPV 16 a 18 (příčina až 70% nádorů genitálií)

Tetraivalentní vakcína Gardasil (Merck) – chrání proti HPV 16 a 18 a navíc i HPV 6 a 11 (způsobují vznik neškodných nádorů – „genitálních bradavic“)

Gardasil 9 – povolená na konci r. 2014 – chrání i proti dalším onkogenním virům: kromě HPV 16 a 18 i HPV31, 33, 45, 52 a 58 a kromě toho i proti HPV 6 a 11

▪ Viry žloutenky typu B a C

Nádory jater?

Imunitní obrana organismu – terapeutické vakcíny

Vakcíny proti nádorovým buňkám – léčí již vzniklé onemocnění

= polyklonální protilátky proti nádorovým antigenům s adjuvanty

(PSA – prostatický specifický antigen, CEA – karcinoembryonální antigen, MAA – antigen asociovaný s melanomem, HSP – protein tepelného šoku, celé nádorové buňky pacienta, syntetické antigeny – polysacharid Globo H)

Problém: malé rozdíly mezi antigeny na nádorových a normálních buňkách

⇒ nedostatečná imunitní odezva, autoimunitní reakce, vyvolání imunitní tolerance

Typy vakcín:

s dendritickými buňkami (buňky prezentující antigeny)

DNA vakcíny, mRNA vakcíny

DNA/mRNA kódující nádorové antigeny nebo antigeny podílející se na imunitní obraně organismu

Vakcíny ve vývoji:

proti melanomu (Oncophage, Canvaxin, Melacin)

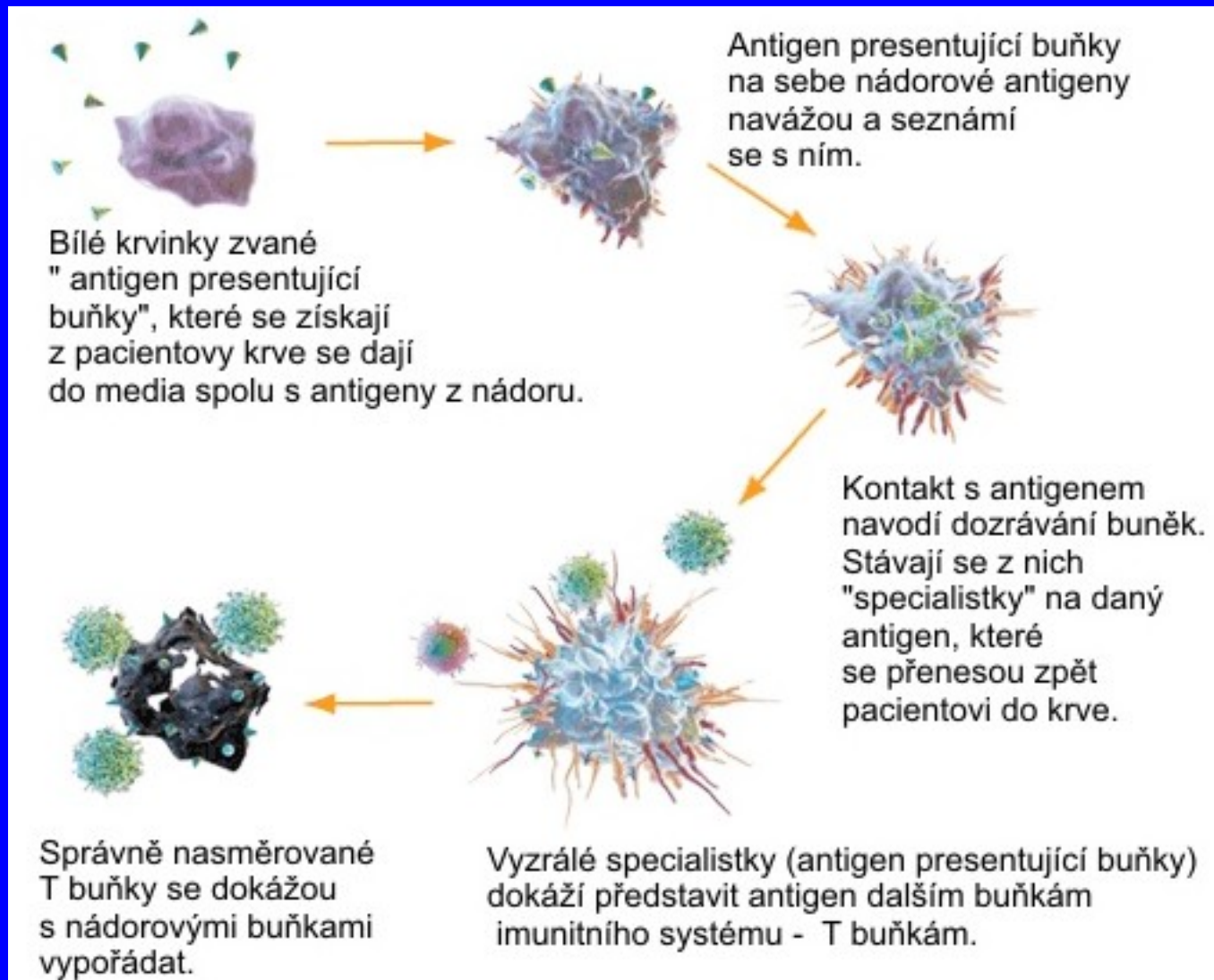
proti nádorům prostaty (Provenge – sipuleucel T – již povolená, kontroverzní – vysoká cena, Prostavac, GVAX, CVax Prostate, SynCon (DNA vakcína), DCVAC/PCa (vakcína vyvíjená Sotio + FN Praha)

proti mnohočetnému myelomu (BiovaxID – heterohybridomy, dendritické buňky a imunoglobuliny, ...vakcína proti myelomu vyvíjena ve FN Brno)

proti dalším typům nádorů (HSPPC-96, ICT107, NeuVax, TriVax HPV, belagenpumatucel L, tecemotid, GVAX Pancreas, Prophage G-100...)

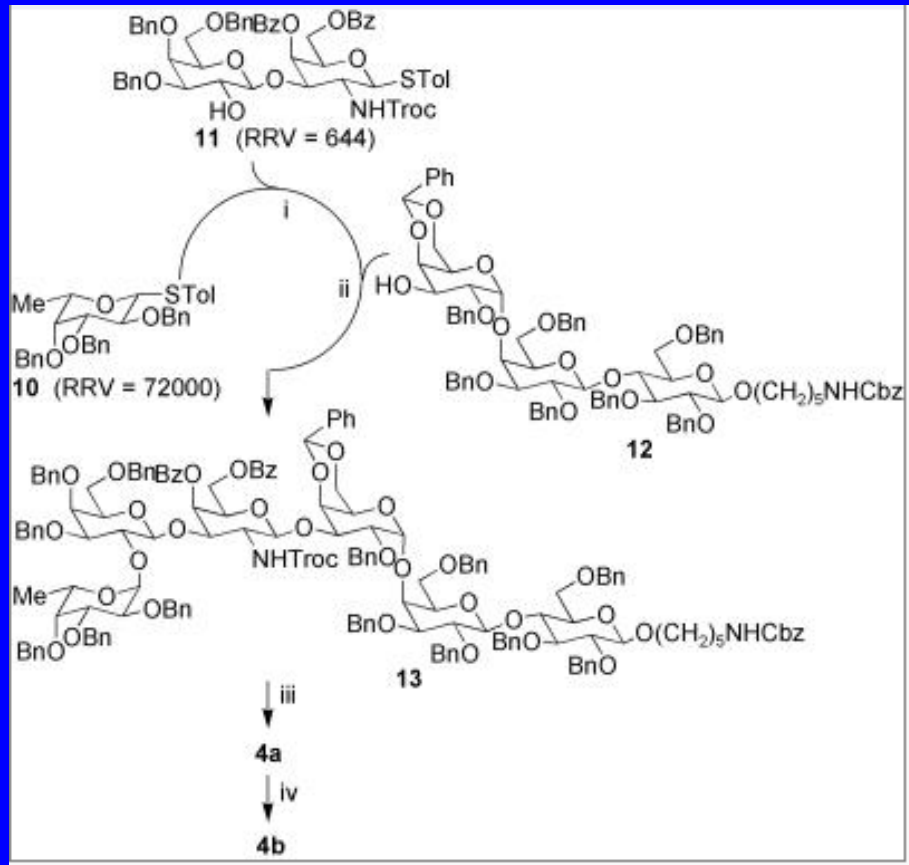
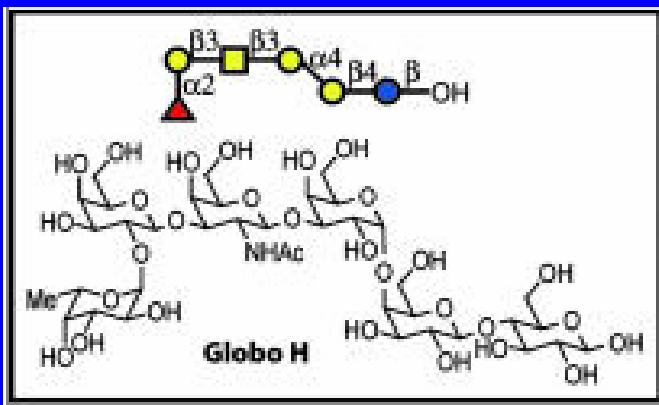
vakcína proti telomerase

Protinádorové vakcíny s dendritickými buňkami



Syntetické antigeny

Nádorový antigen Globo H – hexasacharid na povrchu buněk nádorů prsu, vaječníků a prostaty



Protilátky proti receptorům deaktivujícím imunitní systém a jejich ligandům

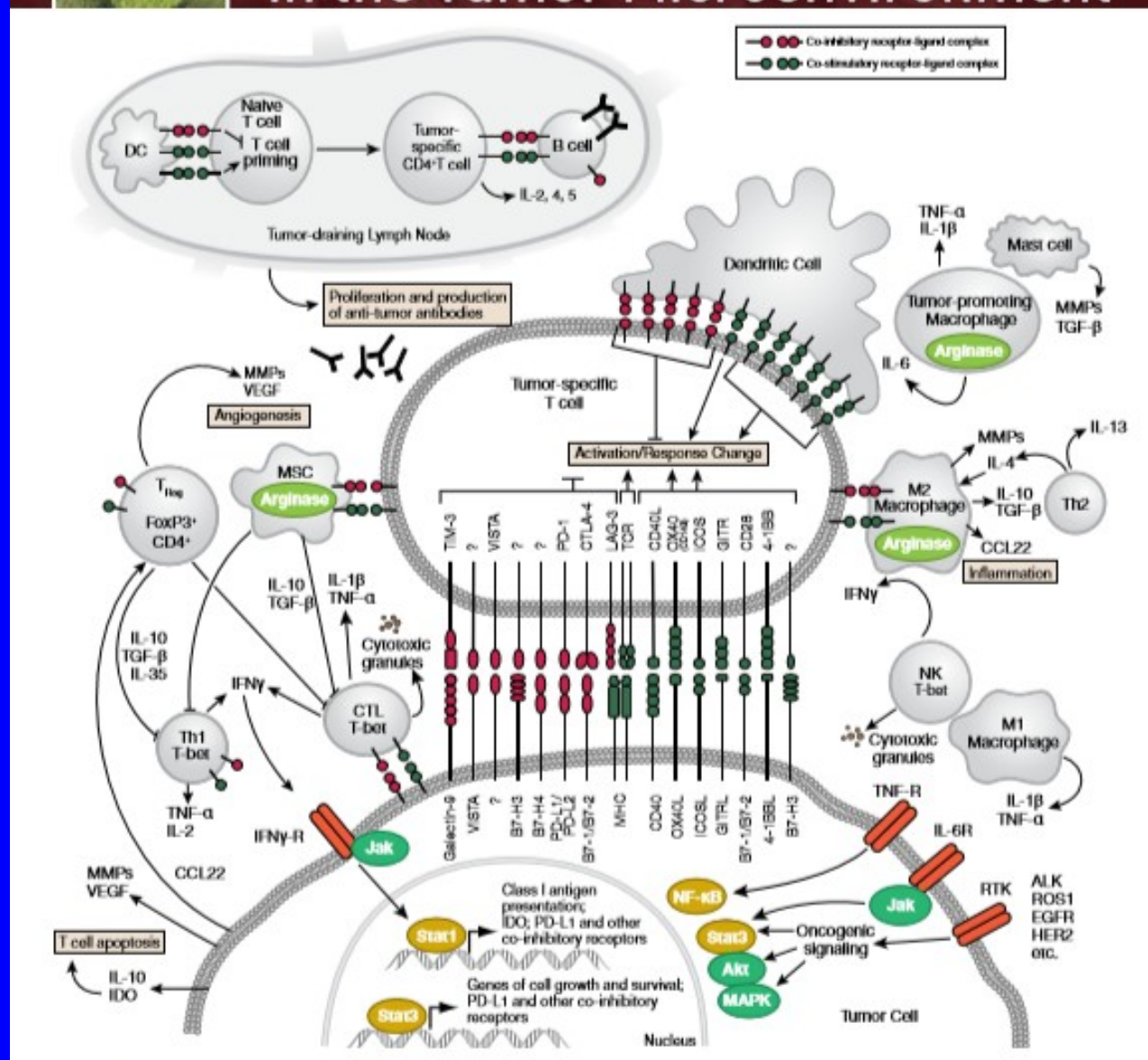
Cytotoxické T-lymfocyty jsou aktivovány pro likvidaci nemocných buněk interakcemi svých receptorů s rozpoznávanými antigeny na jejich povrchu.

Jejich aktivace může být potlačena inhibujícími signály zprostředkovanými interakcemi receptorů (PD-1, CTLA-4, LAG3 a TIM-3, VISTA) s jejich ligandy (PD-L1, PD-L2, galektin 9) produkovanými okolními buňkami. Organismus se tím chrání proti napadení vlastních zdravých buněk imunitním systémem. Deaktivaci T-lymfocytů ale využívají i nádorové buňky. Ty pod selekčním tlakem vyvolávaným protinádorovými léky sekretují postupně rostoucí množství deaktivujících ligandů. T-buňky se přitom „vyčerpávají“ – vytváří více deaktivujících receptorů, přestávají produkovat cytokiny, nemnoží se a ztrácejí schopnost nádorové buňky likvidovat.

Protilátky proti deaktivujícím receptorům nebo jejich ligandům obnovují aktivitu imunitního systému.

Protinádorová imunoterapie založená na reaktivaci cytotoxických T lymfocytů přinesla řadu mimořádných výsledků, ale lze jí zatím vyléčit jen 20-40% pacientů. Důvody, proč u většiny pacientů selhává a možnosti zvýšení úspěšnosti léčby jsou intenzivně studovány

Immune Checkpoint Signaling in the Tumor Microenvironment



Protilátky aktivující imunitní systém

Proti receptorům deaktivujícím T lymfocyty a jejich ligandům

- PD-1 (programmed cell death receptor)
nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, lambrolizumab, cemiplimab, STI-A1110, LY3300054
- CTLA-4 (protein 4 asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty)
ipilimumab, tremelimumab
- PD-L1 – (ligand receptoru PD1)
atezolizumab, durvalumab, avelumab
- LAG3 – (produkt aktivačního genu lymfocytů)
relatlimab, IMP321
- TIM-3 (receptorová molekula 3 obsahující imunoglobulin T-buněk a mucinovou doménu)
TSR-022, MBG453, LY3321367
- VISTA (V doména Ig supresoru aktivace T-buněk)
JNJ-61610588

Protilátky aktivující „zabíječské“ buňky imunitního systému

NK buňky (natural killer cells) = specifické lymfocyty likvidující nemocné buňky

lirilumab, 1-7F9 (blokuji receptor KIR = Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)

OvaRex, oregovomab (BíTE protilátky propojující nádorové buňky s CD125 a NK buňky)

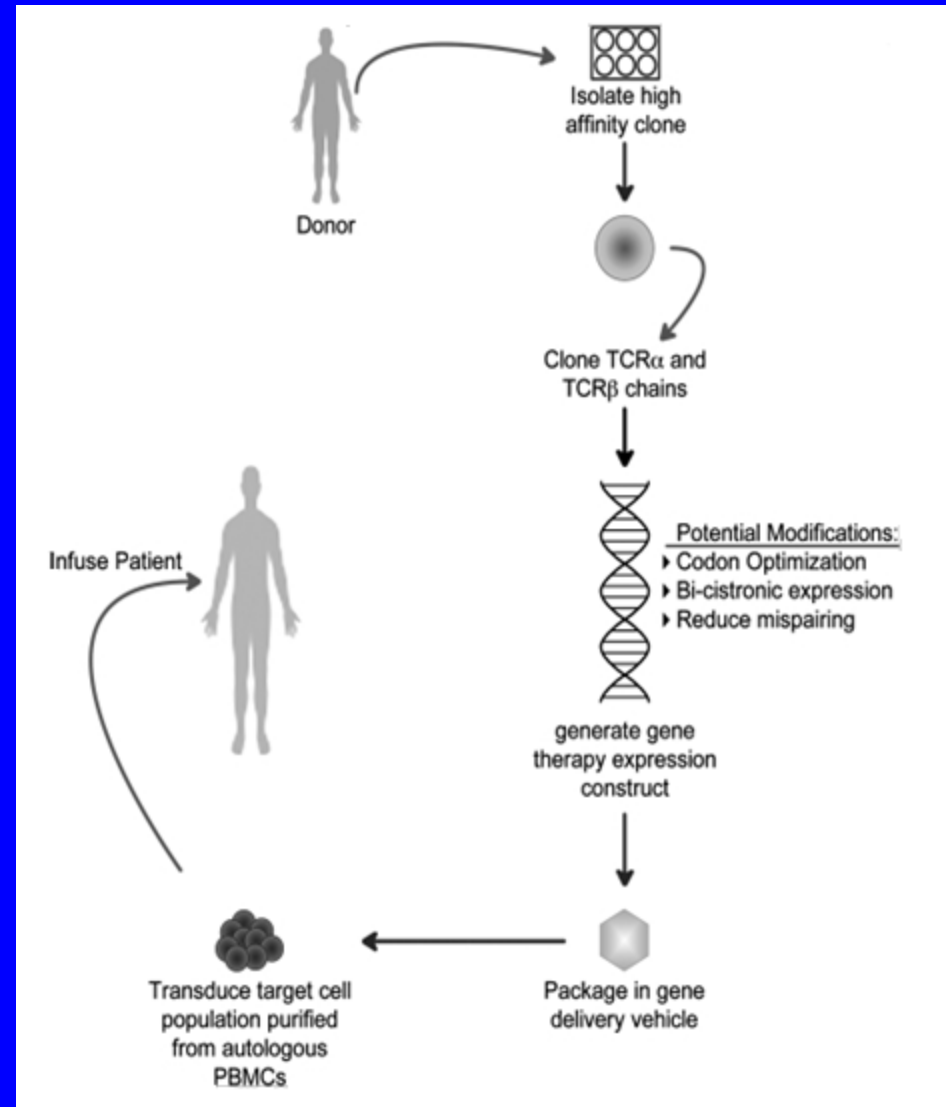
VX-G250 (BíTE protilátka proti anhydrase kyseliny uhličitě IX vyskytující se na 95% buněk nádorů ledvin ale ne na zdravých buňkách, která současně interaguje s NK buňkami)

Postupy protinádorové imunoterapie – TCR

TCR (T-Cell Receptor):

Přístup založený na výběru dárců lymfocytů s receptory silně interagujícími s určitým nádorovým antigenem. Z vybraných lymfocytů se izolují geny kódující příslušné receptory, které se pak po případné další modifikaci vnesou pomocí vhodného vektoru (např. nepatogenního retroviru) do lymfocytů izolovaných z buněk periferní pacientovy krve (PBMC).

Po pomnožení v tkáňové kultuře se takto genově upravené T-lymfocyty se silně interagujícími receptory (TCR) vpraví infuzí pacientovi, v jehož organismu se dále množí a likvidují jeho nádor.



Postupy protinádorové imunoterapie – CAR-T

CAR-T = T-lymfocyty s chimérickým antigenním receptorem

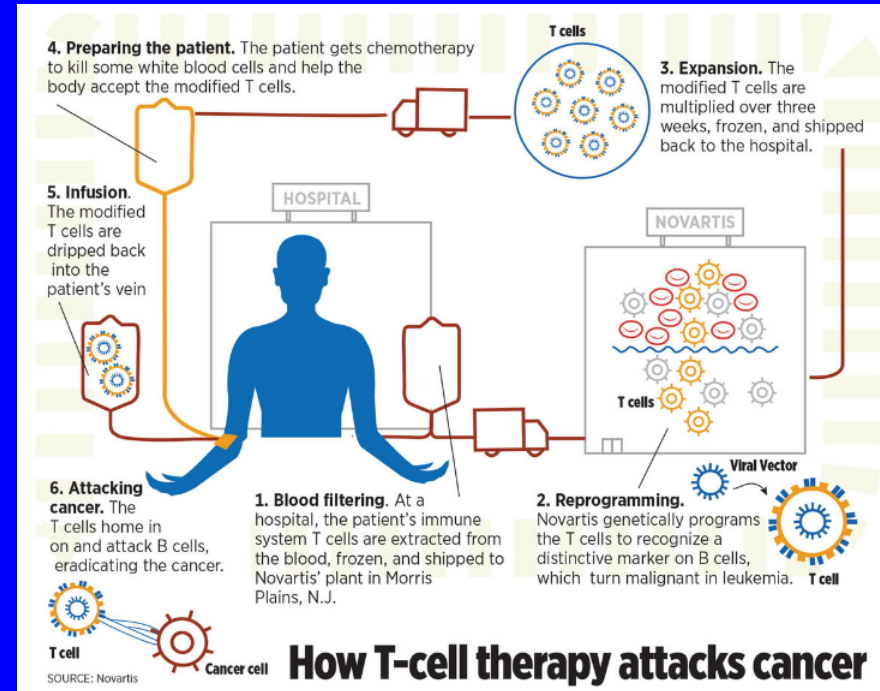
T-lymfocyty izolované z krve pacienta jsou modifikovány metodami genetického inženýrství, aby na povrchu měly „chimérický antigenní receptor“, který jim umožní rozpoznávat určitý nádorový antigen (např. CD19, který se vyskytuje na leukemických a lymfomových buňkách) a pak likvidovat buňky s tímto antigenem. Modifikované buňky se v tkáňové kultuře namnoží, pak infuzí vpraví zpět do organismu pacienta, kde se dále množí a zabíjí nádorové buňky.

Nákladný postup je realizován na zakázku (do 22 dnů po odběru krve pacienta).

Povoleny tisagenlecleucel a abcicabtagen ciloleucel v obou případech zaměřené na CD19

Cena léčebné kúry: 475 tis. \$

Vedlejší účinky – syndrom uvolnění velkého množství prozánětlivých cytokinů (hlavně IL6 ale i dalších) – „cytokinová bouře“ vyvolávající vysoké horečky a pokles krevního tlaku (neprojevuje se u všech pacientů). Při ohrožení pacienta ji lze zvládat podáním tocilizumabu (protilátky proti IL6)



Další možnosti biologické protinádorové terapie

Genová terapie

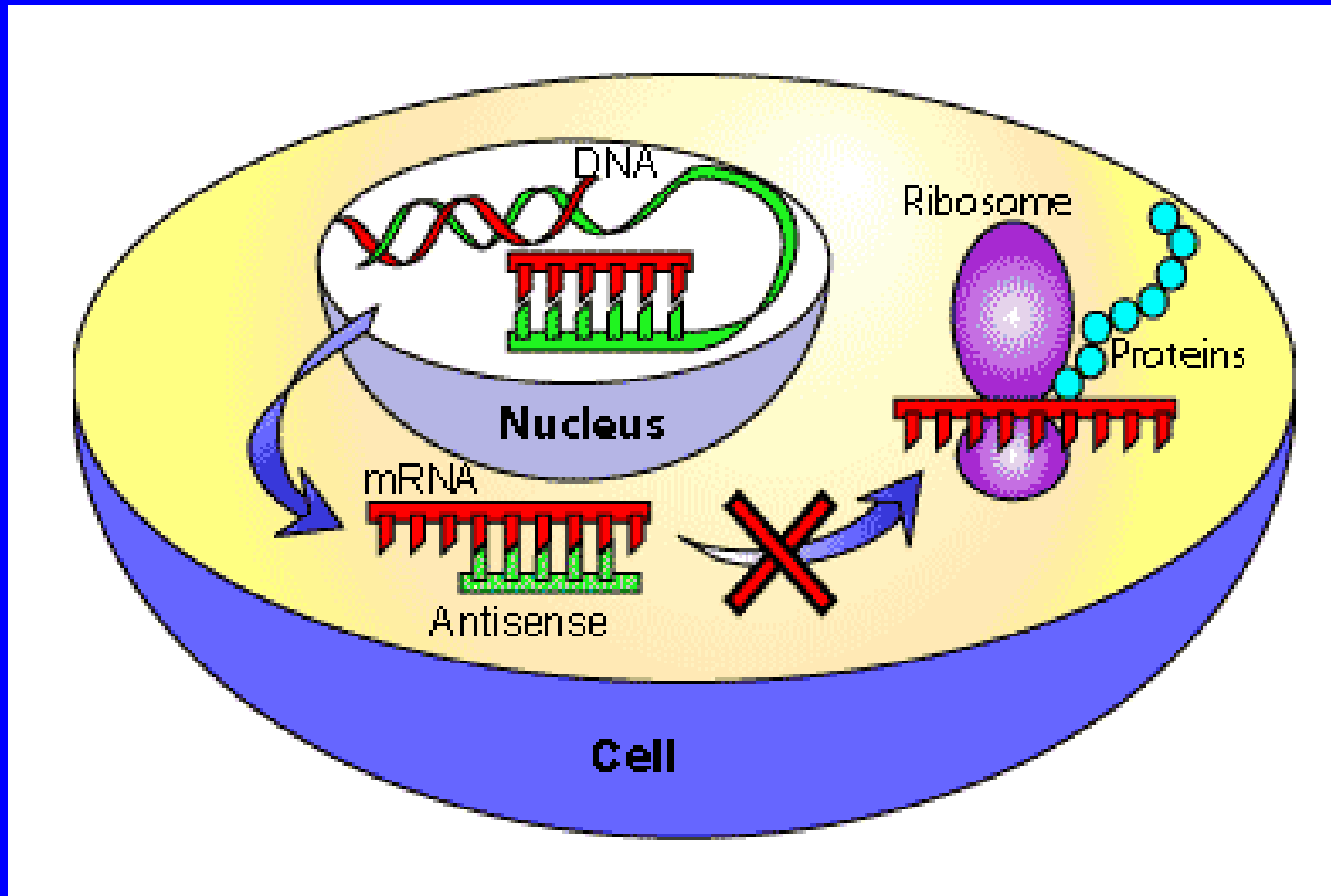
- vnášení funkčních tumorsupresorových nebo i dalších genů do nádorových buněk
- rizika genové terapie:
 - používání virů jako nosičů genů (vektorů) – adenoviry
 - nekontrolovaná inkorporace do genomu – aktivace nežádoucích genů (po r. 2013 možnost vložení genů na žádané místo zlepšena využitím systému CRISPR/Cas)
- Příklady:
 - Gendicin (SiBiono, povolen v r. 2004 v Číně) - funkční gen *p53*
 - Contusgene ladenovec (Advexin, Introgen Therapeutics) - gen *p53*, modifikovaný adenovirus, promotor CMV
 - INGN-241 (Introgen Therapeutics) – gen pro IL24 (tumorsupresor, cytokin)
 - TNF erade (Biologic) – adenovirus nesoucí gen pro TNF α
 - Velimogene aliplasmid (Allovectin 7, Vical) – komplex plasmid/lipid s DNA kódující antigen MHC-I zvyšuje imunitní odezvu organismu vůči nádorovým buňkám (v podstatě jde o DNA vakcínu)
 - Sitimagene ceradenovec (Cerepro, Ark Therapeutics) – „sebevražedný“ gen (pro thymidinkinasu - TK), adenovirový vektor – aplikace do dutiny po chirurgickém odstranění nádoru z mozku. Kombinuje se s podáváním gancykloviru: TK aktivuje gancyklovir (9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanin) převedením na trifosfát, který blokuje replikaci DNA. Buňky bez TK nejsou gancyklovirem zasaženy.
 - T-VEC (talimogen paherparevek, Amgen) – herpetický virus s genem pro GM-CSF – vyvolává nekrózu nádorových buněk a aktivuje imunitní systém organismu
 - Řada dalších přípravků – vnášení genů pro induktor apoptózy TRAIL, interleukiny, GM-CSF, genů kódujících prekurzory MHC-I, bakteriální toxiny atd.

Terapie pomocí virů a bakterií s upraveným genomem

- Viry selektivně poškozující jen v buňky s nefunkčními tumorsupresorovými geny (zejména *p53*) adenoviry ONYX -015 a CG-0070, herpetický virus HSV1716, virus planých neštovic JX-594, reoviry, parvoviry, respirační syncytiální virus atd.
- mutovaná forma bakterie *Salmonella typhimurium* - množí se jen v buňkách s nefunkčním *p53*

Blokování přenosu genetické informace

Komplementární oligonukleotidy – zábrana translace

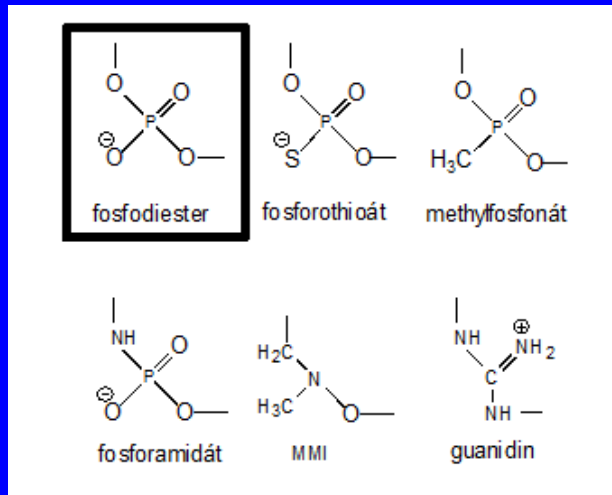


Blokování přenosu genetické informace

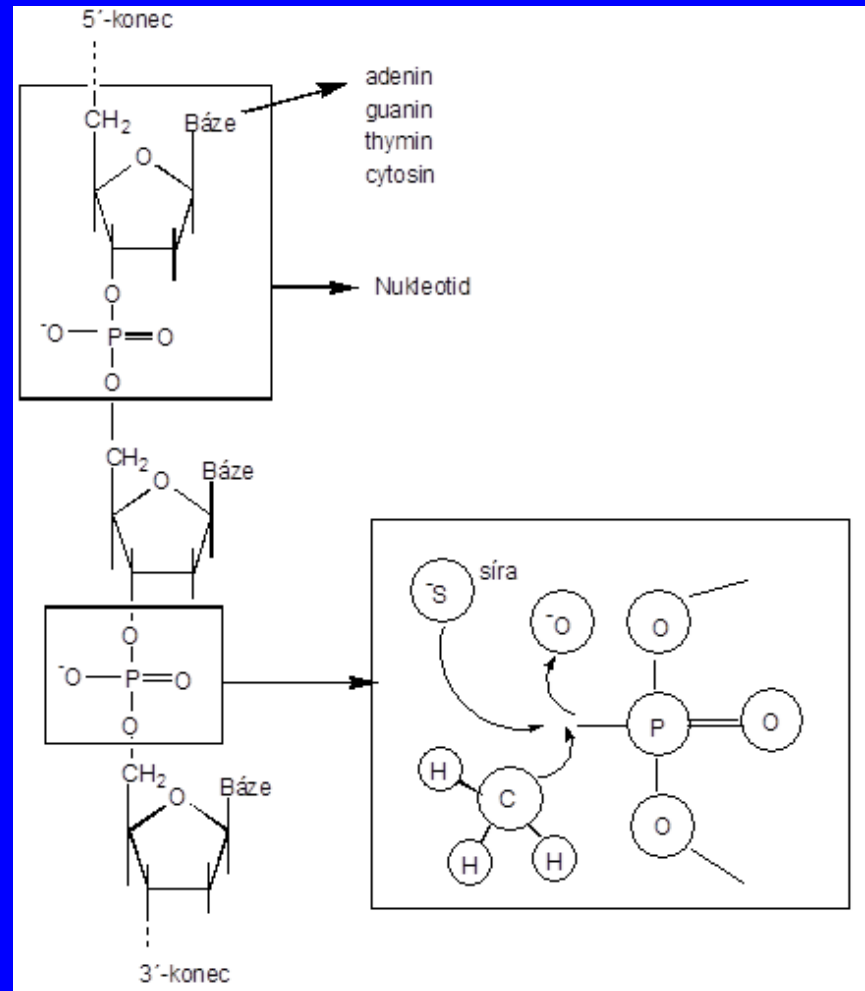
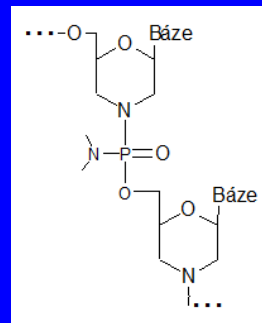
Komplementární oligonukleotidy

- ☞ Problémy – malá biologická dostupnost (obtížný průnik do buněk)
- nedostatečná stabilita (hydrolytické štěpení nukleasami)

Zvýšení stability oligonukleotidů:
 modifikace nebo náhrada fosfodiesterové vazby mezi nukleosidy



náhrada deoxyribosy deriváty morfolinu (příprava „morfolin“ jako analog oligonukleotidů)



Komplementární oligonukleotidy

klinicky zkoušené, ale zatím žádný nebyl zaveden do onkologické terapie:

Oblimersen - blokuje expresi genu *Bcl2* kódujícího inhibitor apoptózy
zkoušen při léčbě chronické myeloidní leukemie a melanomu

Trabedersen - blokuje tvorbu transformujícího růstového faktoru TGFβ2
zkoušen při léčbě nádorů mozku

Custirsen - blokuje tvorbu klusterinu, který může inhibovat apoptózu,
zkoušen při léčbě nádorů prostaty, ale i nádorů plic

Cenersen - brání tvorbě neúčinné varianty p53
zkoušen při léčbě akutní myeloidní terapie v kombinaci s chemoterapeutiky

Apatorsen (OGX-427), Archexin, ISIS-EIF4E_{Rx}, SIS-STAT3_{Rx}, LOR-2040, AP 12009...

Imetelstat - inhibitor telomerasy (FarmChem 09)

Aptamery - oligonukleotidy s vysokou afinitou vůči některým biomolekulám (alternativa k protilátkám?)

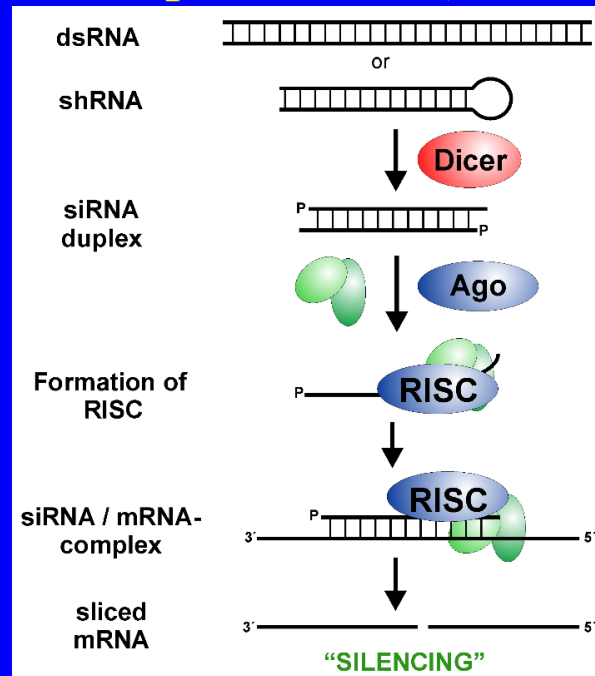
**Ribozymy – RNA s charakterem hydrolytických enzymů
specificky štěpí určité mRNA, klinicky byly zkoušené**

Herzyme - štěpí mRNA kódující receptor HER2 pro epidermální růstový faktor
klinicky zkoušen při léčbě nádorů prsu a vaječníků

Angiozyme - inaktivuje mRNA kódující VEGFR
klinické zkoušení skončilo neúspěchem

Umlčování genů – RNA interference – blokování translace

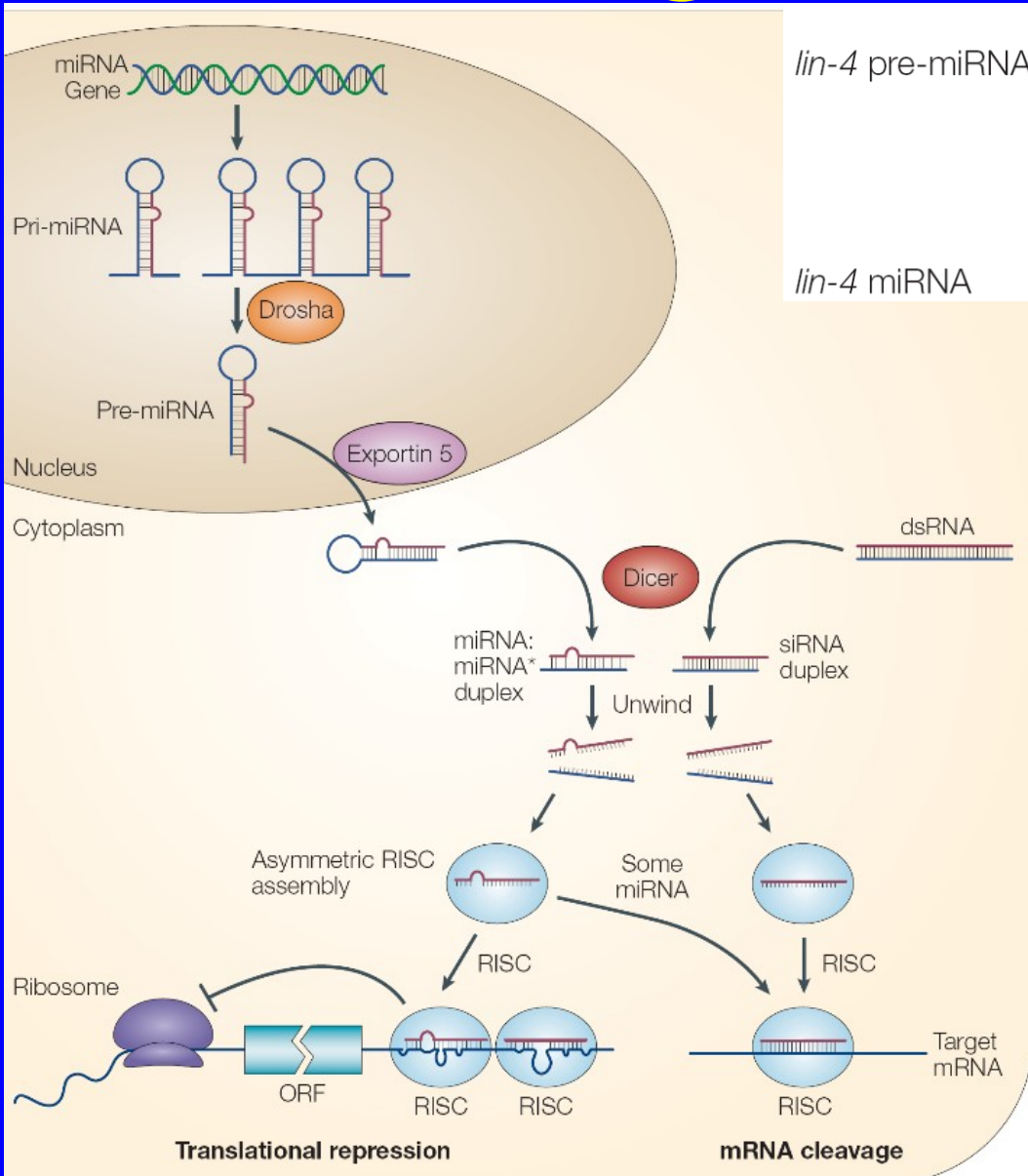
Malé interferující RNA (small interfering RNA - siRNA) - blokují translaci štěpením mRNA pomocí komplexu RISC (RNA-induced silencing complex)



Jiné malé regulační RNA – mikroRNA (miRNA) také blokují translaci, ale nemusí přitom m-RNA štěpit

Na regulaci exprese genů se mohou podílet i dlouhé nekódující RNA (lncRNA), které mají nukleotidový řetězec 10 x delší než siRNA a miRNA

Umlčování genů - miRNA a siRNA



lin-4 pre-miRNA



lin-4 miRNA

UCCCUGAGACCUCAAGUGUGA

Komplementarita

značná u siRNA, malá u miRNA
(stačí několik bází na 5'-konci)

- ⇒ jedna miRNA umlčí více genů
- ⇒ blokáda jedné miRNA může ovlivnit expresi několika genů

Dvojitý účinek miRNA

pozitivní:

umlčení onkogenů

- ⇒ vnášení miRNA do nádorových buněk

negativní:

umlčení tumorsupresorových genů

- ⇒ blokování tvorby nebo účinku miRNA
- antagomiry

Využití RNA interferencev onkologii

- **Nežádoucí miRNA (výskyt v nádorech, onkomiry)**
 - Onkomiry = miRNA blokující tumorsupresorové geny
 - **Blokování nežádoucích miRNA:**
 - Antagomiry = oligonukleotidy komplementární s miRNA blokují miRNA a tím zabraňují „umlčení“ cílové mRNA nebo nukleotidické aptamery blokující vznik miRNA zatím se v onkologické terapii neuplatnily, jsou ale preklinicky zkoušeny (AS1411)
 - Vnášení genů kódujících „miRNA houby“
miRNA houba – bílkovina nebo oligonukleotid, které na sebe váží několik molekul miRNA
- **miRNA s protinádorovým účinkem (antionkomiry)**
 - vnášení miRNA blokujících onkogeny do buněk
 - miR-192, miR-194 a miR-215 – potlačují expresi genu pro MDM2
 - let-7 – potlačuje expresi onkogenu *RAS*
 - miR-145/147, miR-200,
- **Blokování exprese onkogenů pomocí siRNA**
 - klinicky zkoušené siRNA:
 - TKM-PLK1, ALN-VSP02, Atu027
 - CALAA-01 (systém RONDEL)
 - vnášení prekurzorů siRNA do buněk:
 - pbi-shRNA STMN1 Lipoplex, pbi-shRNA PDX1™
- **lncRNA – dlouhé nekódující RNA (> 200 nukleotidů)**
 - ovlivnění transkripce a exprese genů
 - zkoušen komplementární oligonukleotid blokující lncRNA nazvanou MALAT1 (= Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1)

Komplikace využití oligonukleotidů v terapii (syntetické oligonukleotidy, RNAi)

Problém: Kromě hydrolytického štěpení i malá biologická dostupnost v důsledku silně polárního charakteru

Překonávání:

- **Liposomy**
- **SNALP - (Stable Nucleic Acid Lipid Particle)**
částice s lipidickou dvojvrstvou schopné fúze s nádorovými buňkami
- **Nanočástice biokompatibilního polymeru s kladnými náboji**
Systém RONDEL - (RNA/Oligonucleotide Nanoparticle DELivery)
- **Vnášení polyribonukleotidů v obalu z kationoidního polymeru**
Polynukleotid je tvořen řadou segmentů siRNA/miRNA propojených vhodnou spojkou
Kationoidní polymer usnadňuje pohlcení částice buňkou
V buňce se z částice uvolní prekurzorová RNA, kterou DICER rozseká na interferující oligonukleotidy (20-24-mery)
- **Vnášení pomocí funkcionalizovaných nanočástic zlata**
Aminoalkylthioly (vazba Au-S-), polyethylenimin ⇒ kationoidní povrch váže oligonukleotidy
Au nanočástice pokryté thiolovými deriváty oligonukleotidů jsou překvapivě rychle vstřebávány, přitom je u nich asi 6 x zpomalena hydrolýza nukleasami

Perspektivy protinádorové (chemo)terapie

- **Protinádorová léčiva se dostala do popředí zájmu farmaceutických firem**
 - přinášejí nezanedbatelný zisk
 - zlepšují obraz firem
 - široká paleta možných přístupů (návaznost na úspěchy molekulární biologie)
 - omezené možnosti konkurence („bionapodobeniny“?)
- **Roste počet publikací (a patentů) – nárůst 40%**
- **Nové zaměření – „biologická“ léčiva**
- **„Finanční toxicita“ – příliš vysoké náklady léčby**
 - nové léky (zejména „biologické“) jsou velmi drahé
 - náklady zvyšuje růst počtu pacientů při stárnutí populace
- **Přínosy nových léčiv**
 - úplné vyléčení rakoviny stále ještě málo pravděpodobné, ale: je velká šance na přeměnu ze smrtelného onemocnění na chronické