

Genová terapie a farmakogenetika

1. 6. 2006

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 vrací do organismu

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.

Genová terapie

- **Klasická genetická terapie** (dopravit 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 produkováné 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

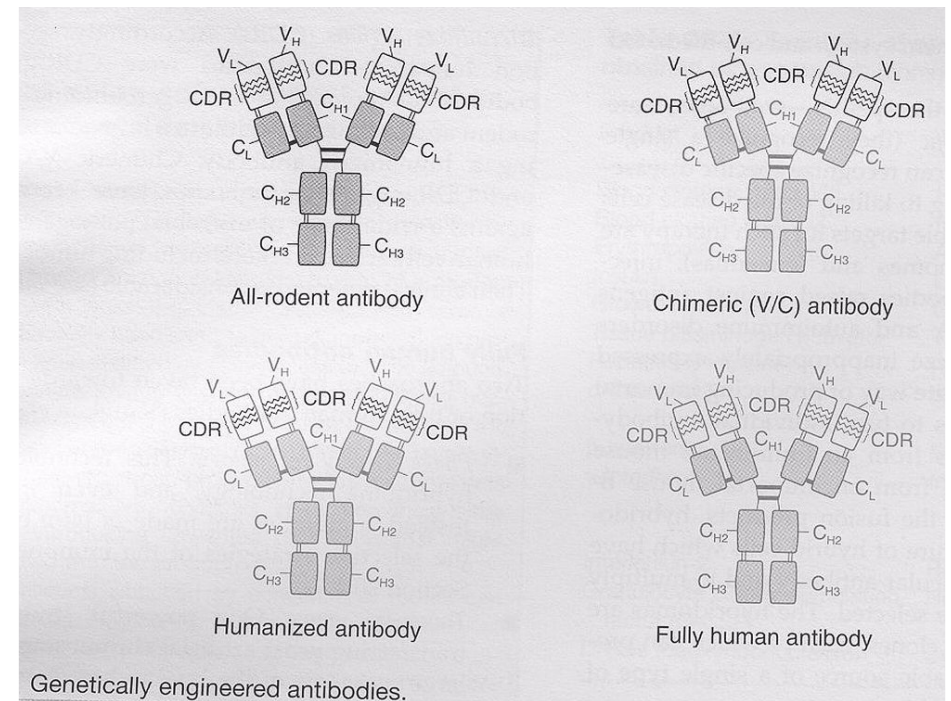


Table 22.2: Examples of the clinical potential of humanized antibodies

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- α	Septic shock
HIV	AIDS
RSV	Respiratory syncytial virus infection
HSV	Neonatal, ocular and genital herpes infection
Lewis-Y	Cancer
p185 ^{HER2}	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 engineered“ 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 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

Technologie klasické genetické terapie

- Jedná se o zacílení buněk nemocné tkáně
- Geny mohou inzerťovány do buněk pacienta přímo a nepřímo
- Inzerťované 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.

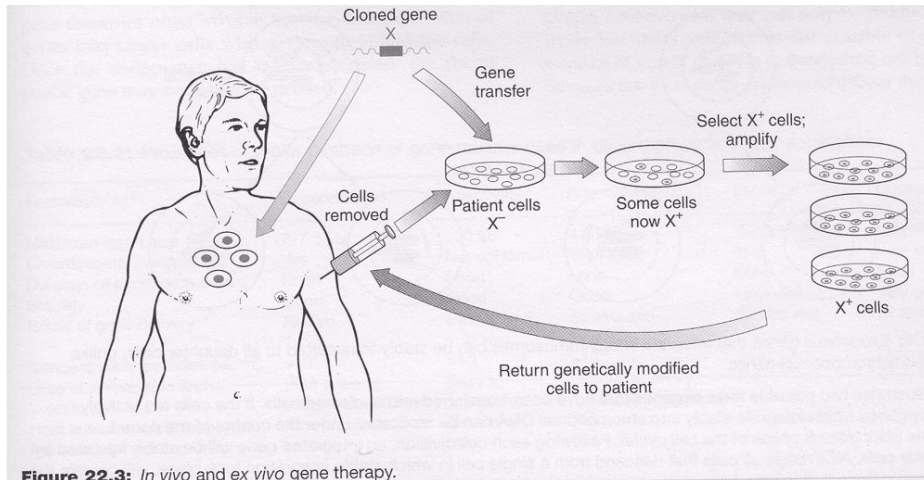
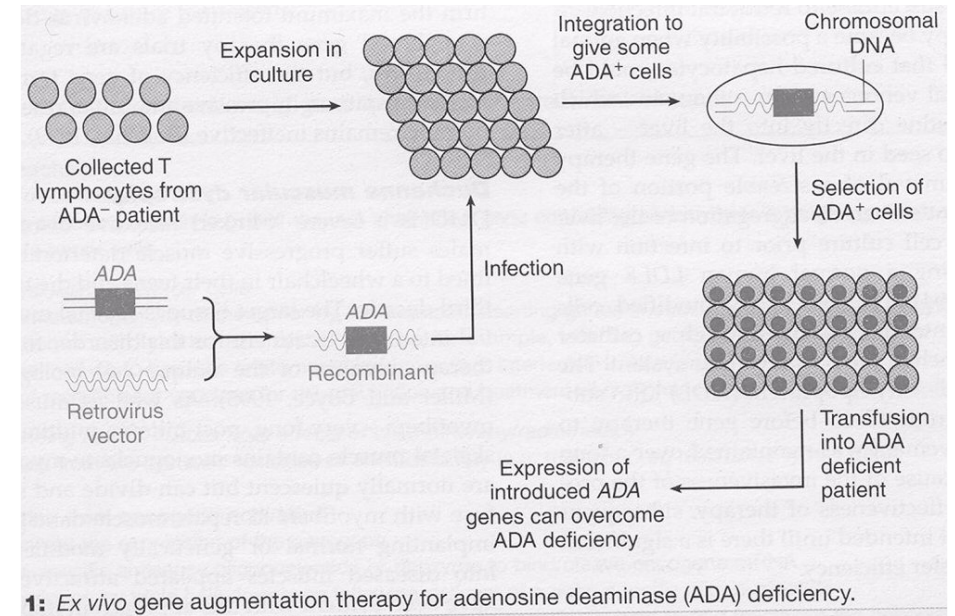


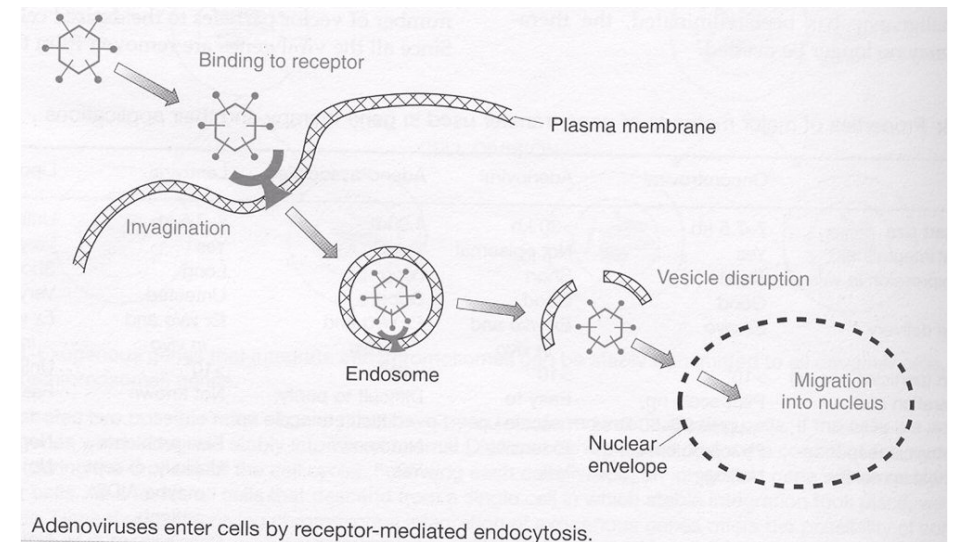
Figure 22.3: *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.



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

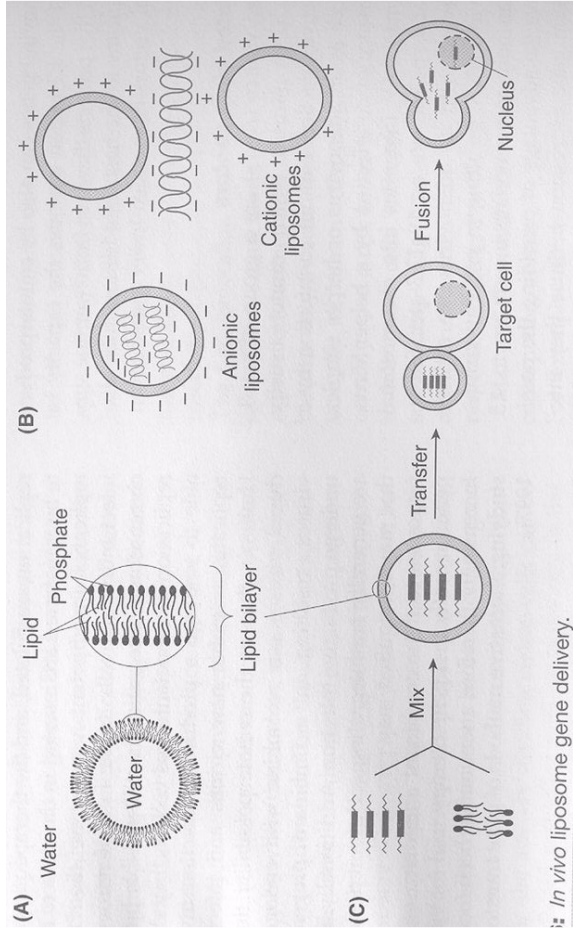
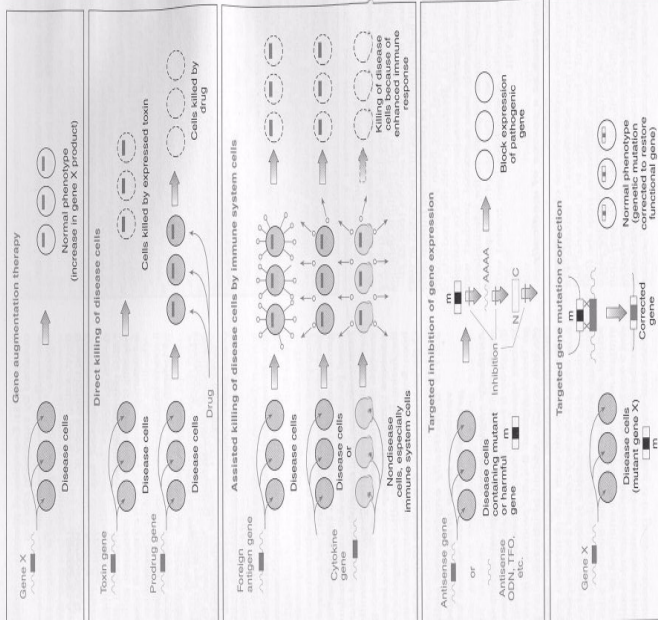
Principy genetického transferu

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



Adenoviruses enter cells by receptor-mediated endocytosis.

22.1 Principles of molecular genetic-based therapies and treatment



In vivo liposome gene delivery.

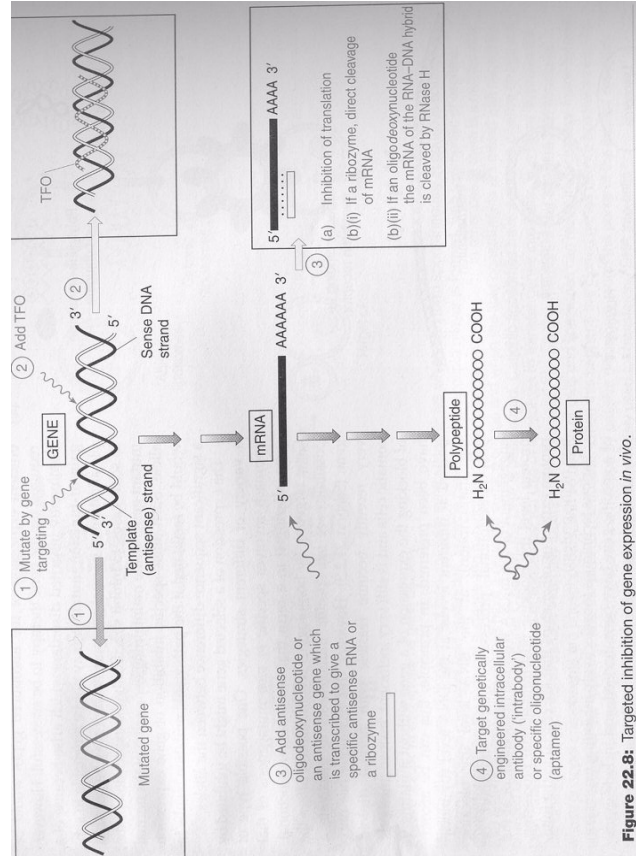


Figure 22.8: Targeted inhibition of gene expression *in vivo*.

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	Ex vivo GAT using recombinant retroviruses containing an ADA gene
Cystic fibrosis	Respiratory epithelium	In vivo GAT using recombinant adenoviruses or liposomes to deliver the CFTR gene
Familial hypercholesterolemia	Liver cells	Ex vivo GAT using retrovirus to deliver the LDL receptor gene (LDLR)
Gaucher's disease glucocerebrosidase	Hemopoietic stem cells	Ex vivo GAT using retroviruses to deliver the gene (GGA)
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>	Implanting of murine fibroblasts containing recombinant retroviruses to infect brain cells and ultimately deliver HSV-tk gene
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	DNA transfection to deliver antisense <i>GF1</i>
	Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Breast cancer	Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene
	Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Colorectal cancer	Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin
Malignant melanoma	Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> gene
	Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>IL4</i> genes
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin
Myelogenous leukemia	Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> gene
	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
	Tumor cells	Retroviruses to deliver <i>HSV-tk</i> gene
Non-small cell lung cancer	Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver antisense <i>KRAS</i>
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver wild-type TP53 gene
Ovarian cancer	Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver HSV-tk gene
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene
Renal cell carcinoma	Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> genes
	Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Small cell lung cancer	Fibroblasts <i>ex vivo</i>	DNA transfection to deliver <i>IL2</i> gene
	Tumor cells <i>in vivo</i>	Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin
Solid tumors	Tumor cells <i>in vivo</i>	Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin

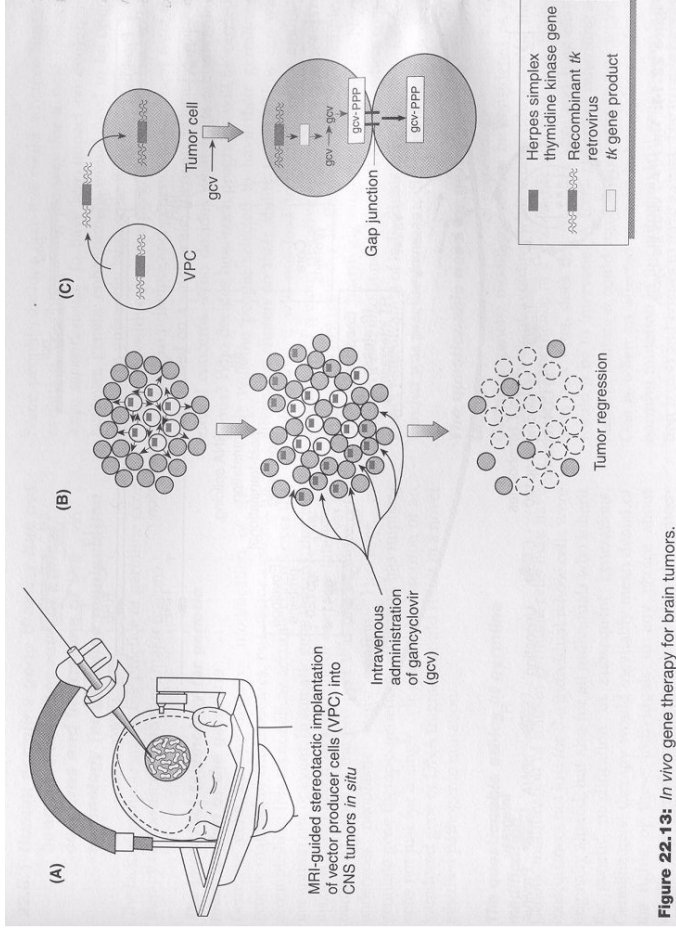


Figure 22.13: In vivo gene therapy for brain tumors.

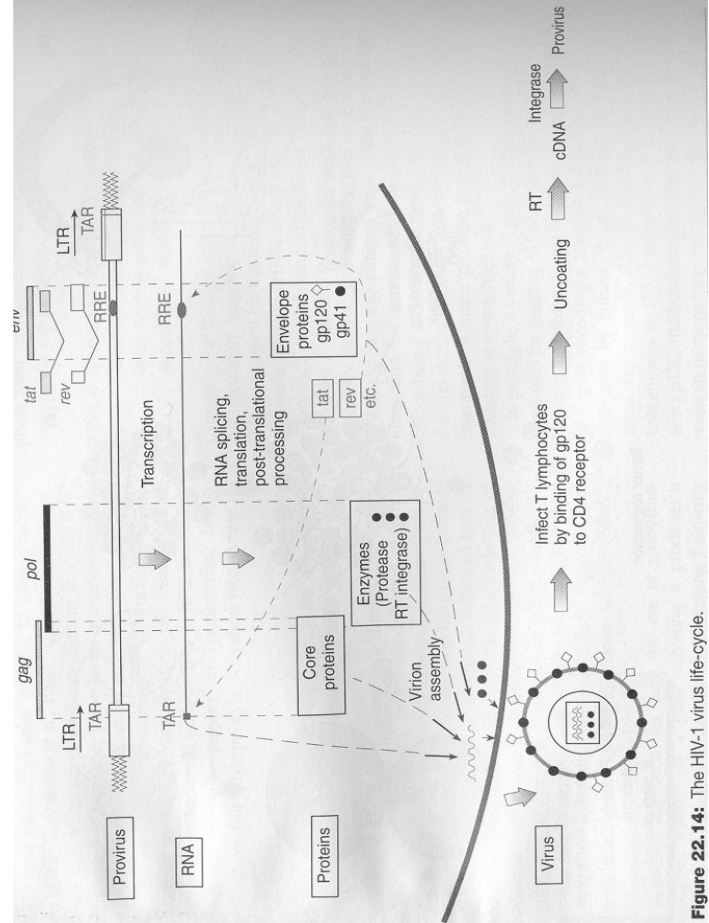
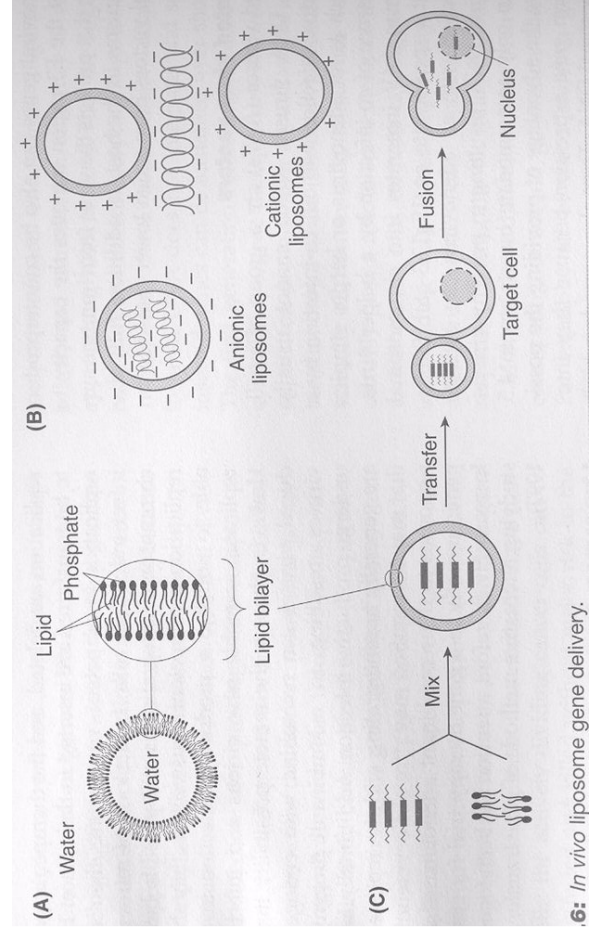
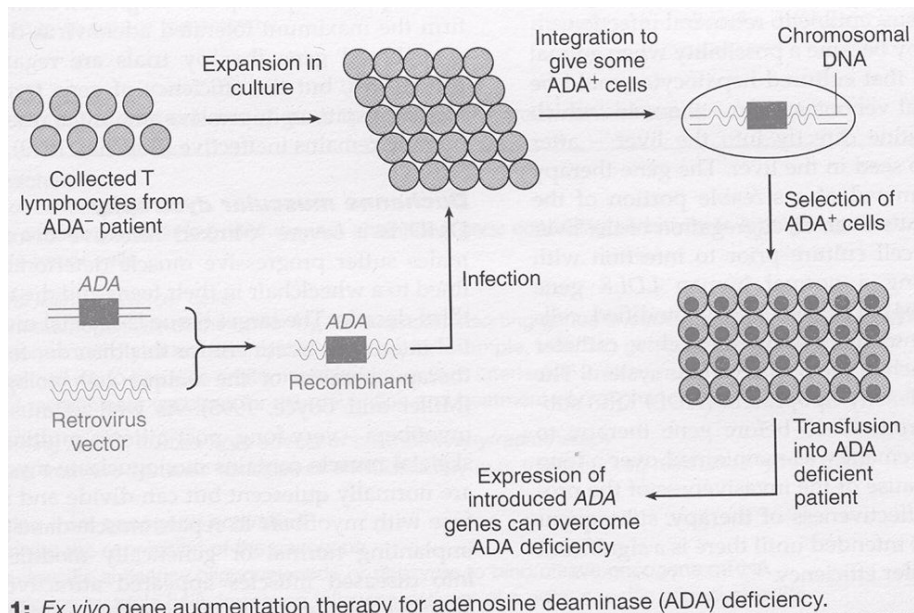


Figure 22.14: The HIV-1 virus life-cycle.



6: In vivo liposome gene delivery.

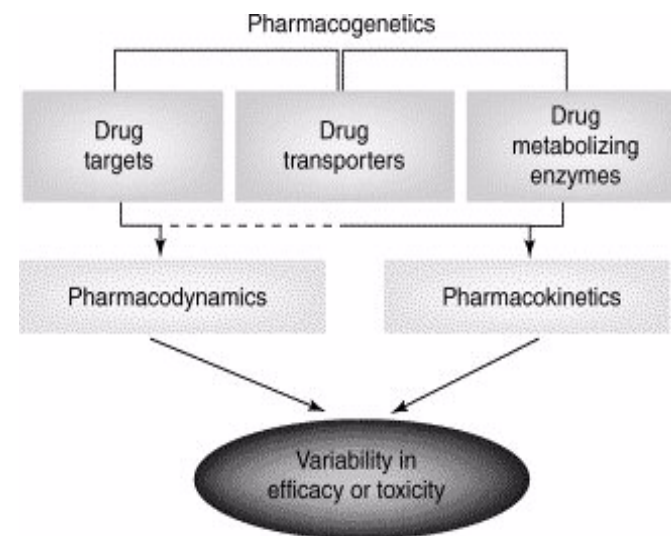


Farmakogenetika

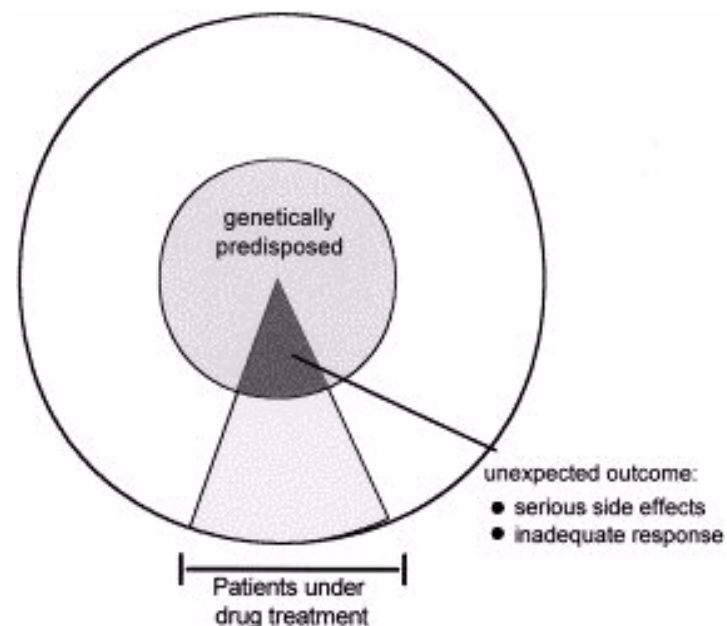
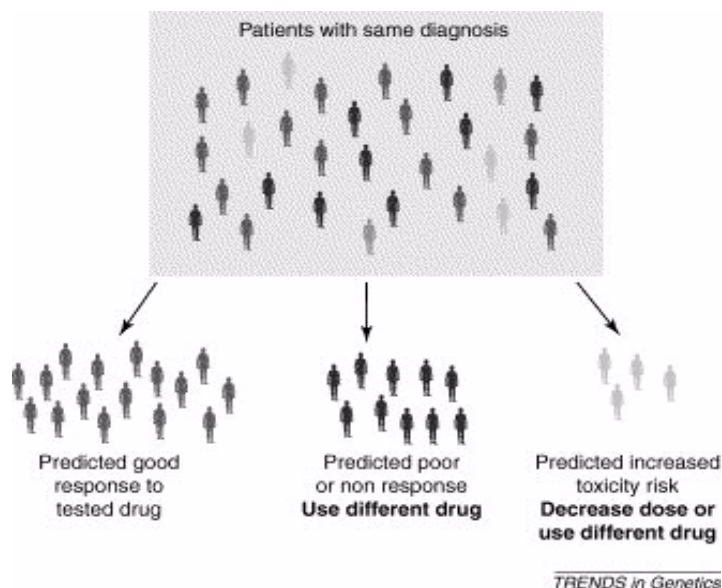
Cíl

- 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



Klinický potenciál farmakogenetiky



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.

P450

- CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků
- CYP2D6 – 20%
- CYP2C9 + CYP2C19- 15 %
- CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfni

Receptory signálních molekul účastnících se v patofyziologii nemoci

- G-protein coupled receptors:
- β -1 a β -2 adrenergí receptory
- Receptor pro cholecystokinín 2 (CCK2)
- Mu opioidní receptor
- U těchto receptorů byly prokázány polymorfismy, které ovlivňují afinitu ligandu. Je tedy možno navrhovat podle potřeb takové ligandy, které respektují (individuální terapie) nebo naopak nerespektují (univerzální použití léku) tuto variabilitu.
- Je také možné navrhovat takové ligandy, které se vážou pouze na mutované varianty genu a inaktivují je (genová terapie)

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 O ⁶ -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]
	β_2 adrenergic agents	Gly16-allele of β_2 adrenergic receptor is associated with much stronger bronchodilator desensitization than Arg16.	[24]
Depression	imipramine	Fast metabolisers do not reach therapeutic drug levels with normal dosage.	[19]

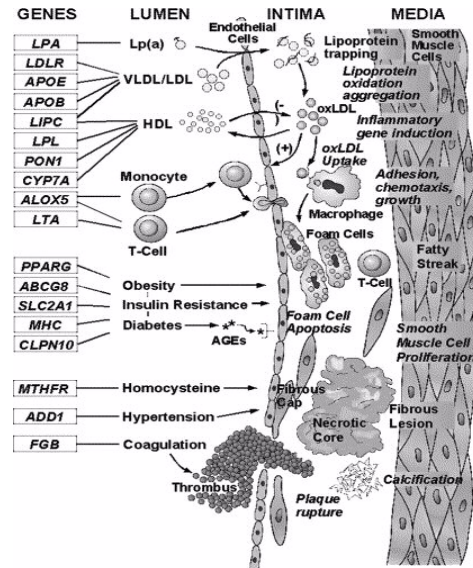
Klinicky relevantní genetické polymorfismy ve vztahu k vedlejším účinkům léků

Gene*	Polymorphism	Minor allele frequency ^b	Drug(s)	Genetic association	Refs
Drug metabolizing enzymes					
<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, increased dose requirements	[26,27] [28-30]
<i>Drug Transporter ABCB1</i>	*3 (Gc359Leu)	0.02-0.08			
	3635C>T (Rc1145Le)	0.10-0.50	Numerous, including anticancer agents, protease inhibitors, digoxin and others	Differences in plasma drug concentration and efficacy	[3,31-34]
Drug targets or pharmacological response proteins					
<i>ADRB1</i>	Sec49Gly	0.15-0.30	β -blockers	Blunted pressorelowering by β -blockers	[35,36]
<i>ADRB2</i>	Arg389Gly Arg165Gly	0.25-0.47 0.41-0.54	β -agonists	Bronchodilation and cardiovascular responses to β -agonists	[37,38]
<i>DRD3</i>	Gln273Gln Ser93Gly	0.07-0.35 0.30-0.70	Antipsychotics	Differential antipsychotic efficacy; antipsychotic-induced tardive dyskinesia and acute akathisia	[39-41]
<i>ADDI</i>	Gly463Tyr	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>GNB1</i>	C825T (exon 5 splice variant)	0.32-0.76	Diuretics, antidepressants	Differential drug efficacy	[45,46]
<i>APOE</i>	ϵ 2 Cys150 and Cys176 ϵ 3 Cys149 and Arg176 ϵ 4 Arg133 and Arg176	0.04-0.16 0.60-0.85 0.06-0.25	Tacrine, statins	Differential drug efficacy	[47-49]
<i>F2</i>	Arg506Gln (Factor V Leiden)	Absent in 0.9%	Estrogen, oral contraceptives	Increased venous thromboembolism risk	[50,51]

Hodnocení významu genetických faktorů u multigenních nemocí- 10 otázek

- ✓ Jak důležité jsou genetické vlivy i nejčastějších forem multigenních nemocí?
- ✓ Jaký je vliv prostředí na vznik nemocí?
- ✓ Které jsou nejslibnější přístupy k determinaci genetických faktorů pro nemoc?
- ✓ Které geny již byly vybrány jako významové?
- ✓ Které cesty přispívají ke genetické významosti pro danou nemoc?
- ✓ Jak mnoho genů se podílí na významosti 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 genu-prostředí a genu-genu?
- ✓ Jaké jsou důsledky pro farmakogenetiku?

Geny přispívající k vnímavosti ke kardiovaskulárním nemocem



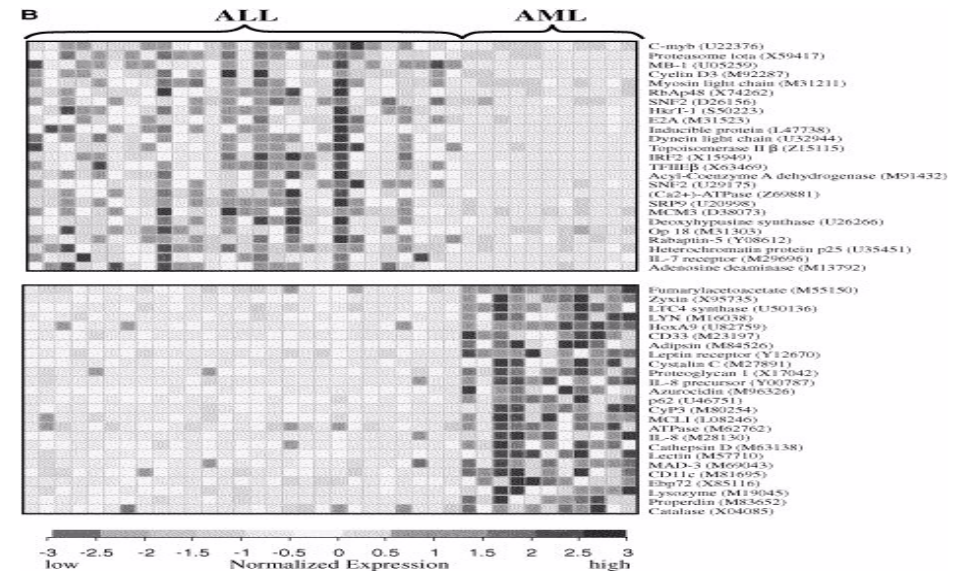
Genetické a environmentální rizikové faktory pro nemoc koronárních tepen

Risk factors with a significant genetic component (heritability ¹)
Myocardial infarction (25%–60%)
Total cholesterol (40%–60%)
High-density lipoprotein cholesterol (45%–75%)
Total triglycerides (40%–80%)
Body mass index (25%–60%)
Systolic blood pressure (50%–70%)
Diastolic blood pressure (50%–65%)
Lipoprotein [a] levels (90%)
Homocysteine levels (45%)
Type 2 diabetes (40%–80%)
Fibrinogen (20%–50%)
C-reactive protein
Gender
Age
Environmental risk factors
Smoking
Diet
Exercise
Infection
Fetal environment

Kandidátní geny - asociace

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

Geny odlišující ALL od AML



Metody k analýze farmakologicky relevantních znaků

Pharmacologic	Pharmacokinetic studies	True assessment of drug and/or metabolite concentration; not feasible in routine clinical setting.
	Clinical studies	Overall assessment of efficacy and toxicity; usually necessary to evaluate relevance of genetic polymorphisms; not suited for individual patients.
Biochemical	Enzyme activity, receptor function, or transporter function determinations	Direct assessment of function of the gene product.
Genetic	SNP analysis	Fast and simple analysis; interpretation requires knowledge of the functional effects of SNP; may miss mutations with effect on gene function (i.e. potentially low sensitivity).
	Sequence analysis	Provides information on the complete exonic sequence and splice junctions; time consuming; may detect irrelevant polymorphisms (i.e. low specificity).
	Expression profiling	Potentially provides information on genetic predispositions; currently no data base available; probably most relevant for target genes and subsequent signal cascades; may permit a direct assessment of drug effects.

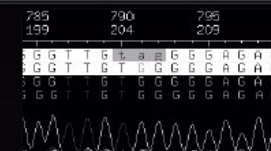
Validita enzymové aktivity ve srovnání s genetickým vyšetřením

	Enzyme activity	Gene test (detection of the most common mutations)
Advantages	Potentially detects all defects (i.e. 100% sensitivity).	Fast and simple.
Disadvantages	Time consuming (RBC preparation, enzyme reaction, product detection); currently not automated; requires experience; false negative result after blood transfusion.	Sensitivity limited (approximately 75%); analysis of the complete gene is time consuming and expensive.

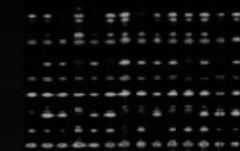
Analýza SNP

- Hmotnostní spektrometrie
- Fluorescenční metody

High-throughput tools for studying gene variation in human populations



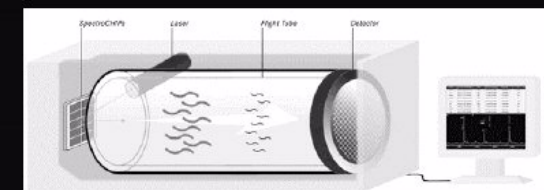
Automated capillary DNA sequencers



Multiplex SBE



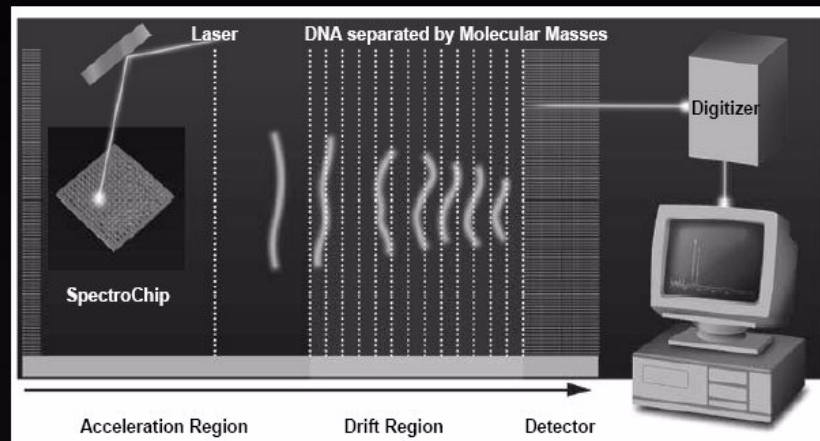
DNA chips



MALDI-TOF Mass Spectrometry

MALDI-TOF MS

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry)



Analyza SNP pomocí fluorescenčních metod

Category	Method	Comment	Reference	
Restriction digest	MADGE	Can only be used at SNP sites that are part of restriction sites; not practicable for real large scale; no specific instrumentation available.	[36]	
Homogeneous	TaqMan	Use of FRET to detect amplification; allele specific probes (hydrolysis probes, hybridization probes, molecular beacons, scorpions) are used for genotyping; TaqMan suited for high throughput analysis (>10 ⁶ genotypes/week).	[37,38]	
Hybridization Mismatch distinction by polymerases and ligases	LightCycler Oligonucleotide assay (OLA)	ligation	Not easy to automate; variant protocol using FRET (DOL) available.	[39,40]
Array hybridization assays	e.g. Affymetrix		Capable of high throughput analysis,	[41]
Minisequencing	various methods		Basically simple protocol with many variations including homogeneous detection; automatable,	[42,43]
Rolling circle signal amplification			DNA polymerase-driven reaction enabling replication of circularized oligonucleotides under isothermal conditions; RCA has been adopted to solid phase arrays for mutation detection (RCA-CACHET) with PCR products being used as targets.	[44]