

Molekularne podstawy ONKOLOGII



Lek. mgr Mirosława Püsküllüođlu

Klinika Onkologii UJ CM

Terapia celowana

- Leki ukierunkowane na szlaki sygnałowania i procesy, które są specyficznje zakłócone w komórkach nowotworowych
- Cele tej terapii nie są aż tak oczywiste i wyraźne
- Duża **różnorodność** w działaniu i budowie tej grupy leków



Wykład 4

Terapia genowa

Terapia genowa- definicja

Technika wprowadzania materiału genetycznego (DNA lub RNA) do komórek w celu wywołania efektu terapeutycznego lub prewencji wystąpienia choroby

Celem jest zabicie jak największej liczby komórek nowotworowych bez uszkodzenia komórek prawidłowych

Komórkami docelowymi są zarówno komórki nowotworowe jak i prawidłowe

Terapia genowa

```
graph TD; A[Terapia genowa] --> B[Komórki somatyczne]; A --> C[Komórki germinalne ?];
```

Komórki
somatyczne

Komórki
germinalne ?

Terapia genowa chorób nowotworowych

- Cele:
 - Poprawić naturalną zdolność organizmu do walki z chorobą
 - Sprawić by komórki nowotworowe były bardziej podatne na terapię

Terapia genowa chorób nowotworowych

- Terapia działająca na komórki nowotworowe
 - Hamowanie aktywności onkogenów
 - Przenoszenie genów supresorowych (np. p53)
 - Geny-samobójcy
 - Wirusy onkolityczne
- Wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw komórkom nowotworowym (patrz wykład 3)
- Chemoprotekcja

Terapia genowa

```
graph TD; A[Terapia genowa] --> B[Wprowadzanie genu]; A --> C[Hamowanie ekspresji genu];
```

Wprowadzanie
genu

(np.: uprzednio
zmutowanego)

Hamowanie
ekspresji genu

Immunoterapia

- Wykorzystanie układu odpornościowego i jego mechanizmów do eliminacji komórek nowotworowych
- **Nieswoista**, **bierna** (p/ciała), **czynna** (szczepionki)
- **Przeciwciała monoklonalne**- patrz dalsza cz wykładu
- Transfer genów:
 - IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-12, TNF, TGF- β , IFN, Antygeny (gp100, CEA, PSA, HLA-B7/ β 2-microglobulin) Receptory (B7-1)

Immunoterapia- co zawierają szczepionki?

Komórki
nowotworowe

HSP

Białka

Komórki
dendrytyczne

Wektory
wirusowe

Kwasy
nukleinowe

Antygeny

Immunoterapia

- Immunoterapia nieswoista:
 - **Interleukina 2** - terapia raka nerki, czerniaka; także w szczepionkach
 - **Interferon α** – terapia raka nerki, czerniaka, białaczek, szpiczaka, mięsaków
- Szczepionki:
 - DNA
 - Z antygenów
 - Z komórek dendrytycznych

Immunoterapia

- Szczepionki **DNA**:
 - Często dają krótkotrwały efekt (komórki produkują antygeny przez krótki okres czasu)
- Szczepionki **z antygenów**:
 - Często niespecyficzne, możliwość użycia markerów nowotworowych
- Szczepionki **z komórek dendrytycznych**:
 - Izolacja z krwi pacjenta → ekspozycja na antygen → modyfikacja genetyczna → zaszczepienie pacjenta

Przenoszenie genów supresorowych

- Dostarczenie do komórek prawidłowo działającej kopii genu supresorowego
- Przykłady:
 - P53
 - BRCA I- np. rak jajnika
 - P16- np. rak prostaty

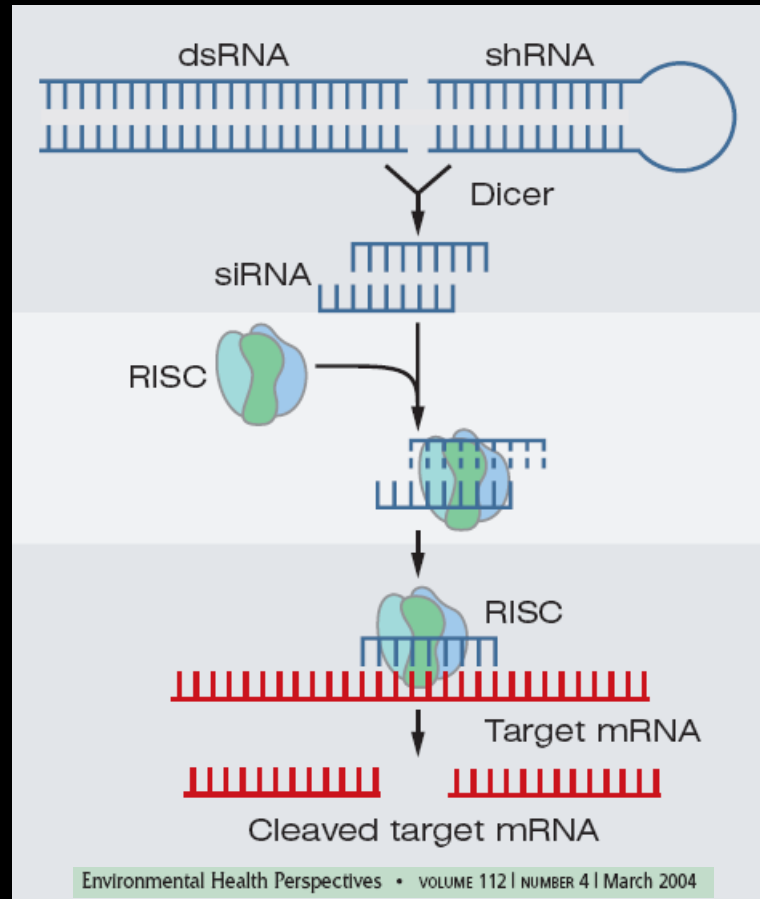
Zespół Li-Fraumeni

- Występowanie wielu nowotworów, m.in.: **mięsaków, raka sutka, białaczek, raka kory nadnerczy, guzów mózgu**
- U połowy osób, które odziedziczyły gen ryzyka, choroba nowotworowa ujawnia się **przed 40.** rokiem życia
- W nowotworach sporadycznych również spotyka się mutacje genu P53 (w ponad **połowie** ludzkich nowotworów)
- **ADVEXIN** (ladenovec) zawiera prawidłową kopię genu P53
 - Kopia genu p53 z promotorem CMV przenoszona poprzez wektor- adenowirus (nieintegrujący, niereplikujący)
 - Używany w monoterapii lub w połączeniu z chemio- lub radioterapią
 - Badany w licznych nowotworach: NDRP, nowotwory głowy i szyi, rak wątrobowokółkowy, rak piersi, jelita grubego i in.
 - Pierwsza zatwierdzona terapia genowa na świecie

Hamowanie aktywności onkogenów

- Wyciszenie aktywności onkogenu:
 - Oligonukleotydy antysensowne
 - Pułapki oligonukleotydowe
 - Rybozomy
 - siRNA
 - Aptamery- nukleotydy lub białka (dalsza część wykładu)
- Przykłady:
 - C-myc- w terapii przerzutowego raka piersi
- Ten kierunek badań nie dał jak dotąd spodziewanych wyników

Interferencja RNA



Andrew Fire i Craig Mello 2006

Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii

Wyciszenie genu

```
graph TD; A[Wyciszenie genu] --> B[RYBOZYMY]; A --> C[OLIGONUKLEOTYDY ANTYSSENSOWNE]; A --> D[PUŁAPKI OLIGONUKLEOTYDOWE];
```

RYBOZYMY

Molekuły zbudowane z krótkich fragmentów RNA zdolne do katalizowania reakcji

Używane do niszczenia genów na poziomie mRNA

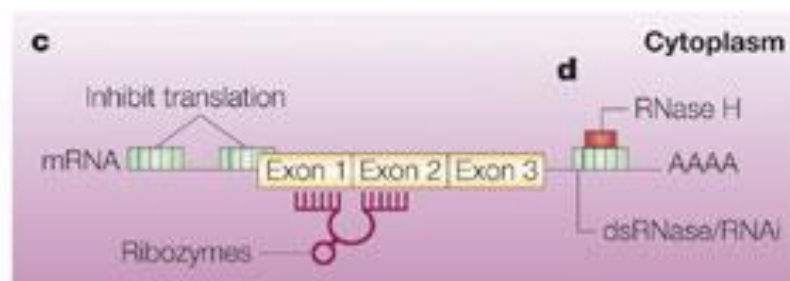
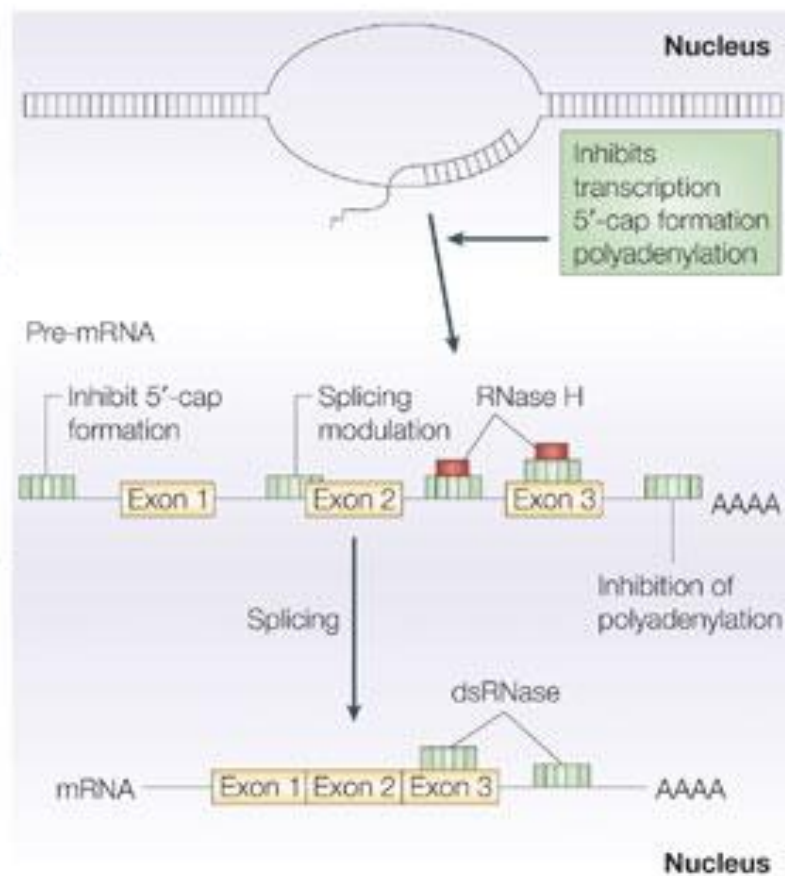
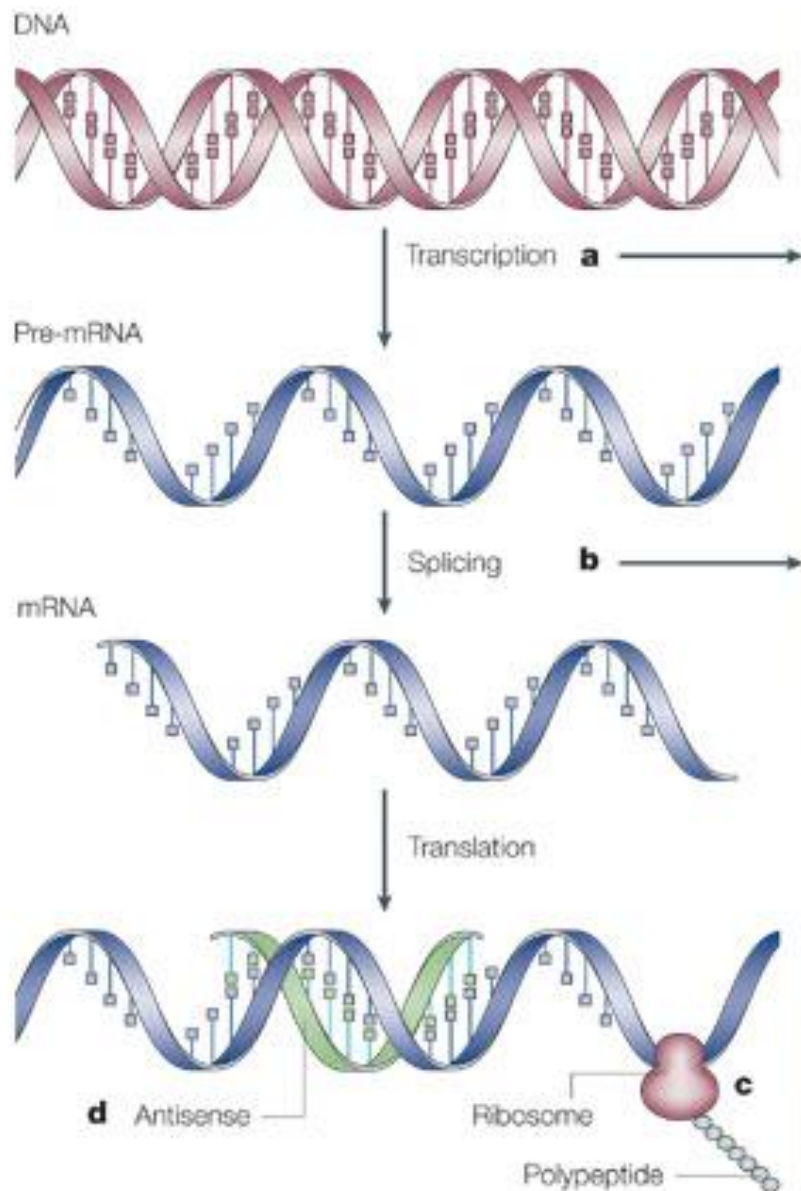
OLIGONUKLEOTYDY ANTYSSENSOWNE

Jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA. Wiążą się do komplementarnych fragmentów mRNA zapobiegając translacji. Kompleks może być niszczone przez RNAzę H

PUŁAPKI OLIGONUKLEOTYDOWE

Dwuniciowe sekwencje DNA

Wiążą czynniki transkrypcyjne uniemożliwiając transkrypcję genów



Geny samobójcy

- Dostarczanie do komórek nowotworowych genów, które **po aktywacji** mogą niszczyć komórkę
- Geny te kodują **toksyny** lub **enzymy** przekształcające **prolek w aktywną** postać leku
- Przykład: gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki, gen deaminazy cytozynowej Escherischia coli, geny cytochromu P450
- Przykład: gen- karboxypeptydaza G2, prolek: doxorubicyna.

Wirusy onkolityczne

- Wprowadzane do komórek nowotworowych- powodują lizę komórki
- Czemu są **selektywne**?
 - selektywna droga wejścia do komórki (receptory)
 - selektywna ekspresja genów wirusa niezbędnych do replikacji (tkankowo-specyficzne promotory)
 - selektywna replikacja zależna od ścieżek nieprawidłowo funkcjonujących w komórkach nowotworowych (mutacje p53, Rb)
 - Replikacja genów wirusa blokowana w normalnych komórkach
- Przykład: **Onyx-015**- adenowirus niszczący komórki nowotworowe ze zmutowanym p53 (nowotwory głowy i szyi)
- Może rozprzestrzeniać się na sąsiednie komórki nowotworowe

Chemoprotekcja

- Wprowadzenie genu **MDR** (multidrug resistant gene) do komórek macierzystych (podanie ex vivo)
- Dzięki temu komórki macierzyste są **oporne** na niszczące działanie cytostatyków → możliwość podania wyższych dawek
- **MDR**- główny mechanizm poprzez który komórki nowotworowe nabywają oporność na leczenie
 - **Pompa** aktywnie wypompowująca lek
- Transportery MDR należą do konserwatywnej grupy białek ABC (ATP binding cassette) i przenoszą szeroką gamę leków.

```
graph TD; A[Terapia genowa] --> B[in vivo]; A --> C[ex vivo];
```

Terapia genowa

in vivo

ex vivo

Terapia genowa- gdzie dostarczyć gen?

- **In vivo:**

- Gen dostarczany bezpośrednio do gospodarza
- Zwykle metody in vivo obejmują użycie wektorów wirusowych (najbardziej wydajne)

- **Ex vivo:**

- Gen dostarczany jest do komórek poza organizmem, następnie komórki są dostarczane do gospodarza
- Użycie wektorów wirusowych i metod niewirusowych

Jak dostarczyć gen?

Nowe geny są dostarczane do organizmu (do komórek) za pomocą **WEKTORÓW**

Najczęściej używanymi wektorami są **WIRUSY**

Alternatywą dla wektorów wirusowych są różne metody chemiczne i fizyczne np.: kompleksy kwasów nukleinowych z lipidowo-białkowymi kapsułkami.

Wykład 4

Wektory

Metody Dostarczenia Materiału genetycznego

Niewirusowe

Wirusowe

Sztuczny chromosom

„Nagie” DNA
Plazmidy

Chemiczne reagenty

Elektroporacja

Metody mechaniczne

Pociski genowe

Mikroiniekcje

Wektory - definicje

■ **Transfekcja**

- wprowadzanie do komórki obcego materiału genetycznego,
- może być stała lub przejściowa (w zależności od tego, czy wprowadzony materiał- najczęściej w postaci **plazmidu**- integruje się z genomem gospodarza)

■ **Transdukcja**

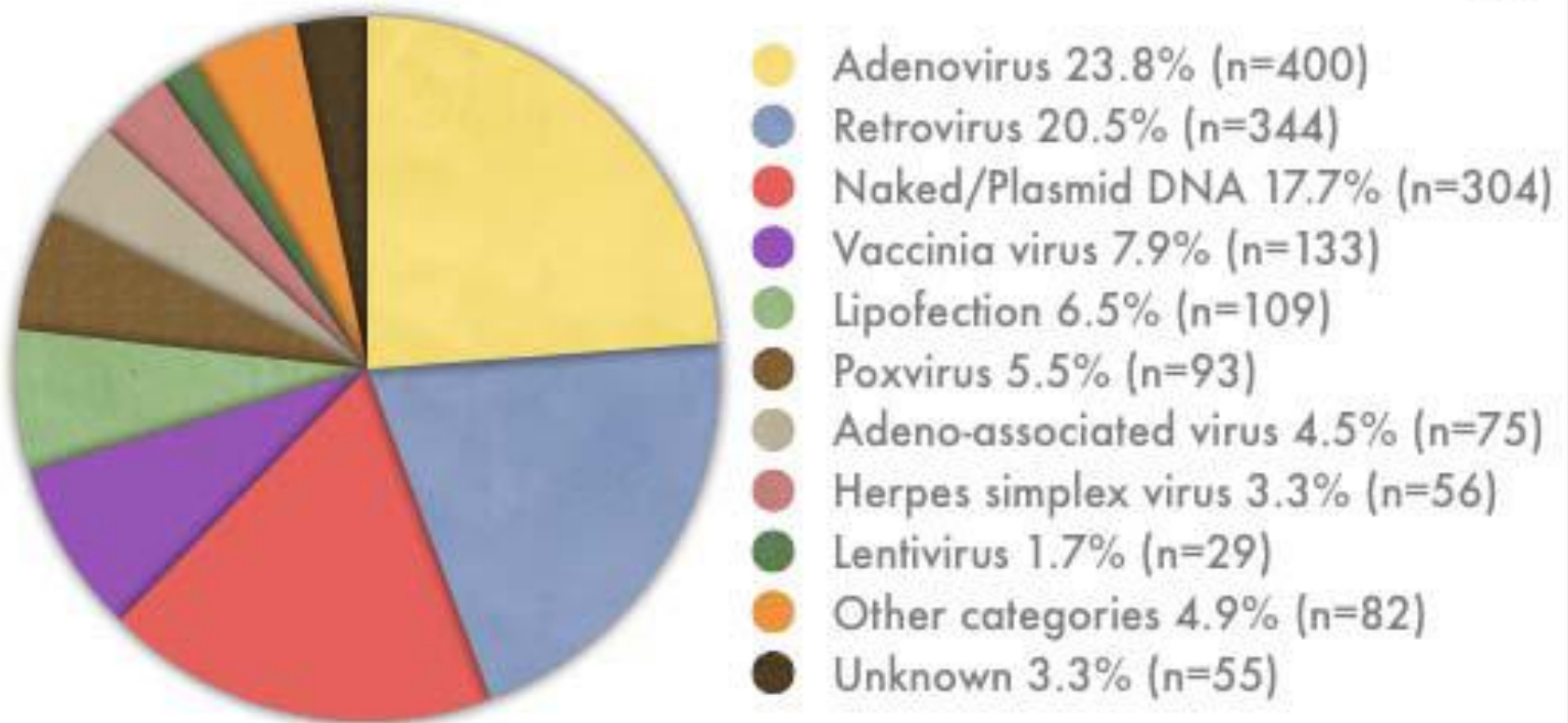
- wprowadzanie do komórki obcego materiału genetycznego **za pomocą wirusa** (1952 Lederberg i Zinder- badania nad bakteriofagami)

Plazmidy

- Koliste cząsteczki DNA
- Nie są częścią chromosomu
- Podlegają niezależnej replikacji (dzięki *ori*)
- Mogą kodować wiele genów
- **Zmodyfikowane** plazmidy bakteryjne są jednym z podstawowych narzędzi do przenoszenia genów w inżynierii genetycznej

Wektory - typy

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



Sztuczny chromosom

- Wprowadzenie materiału genetycznego wraz z **dotatkowym chromosomem**
- 47my chromosom nie wpływałby na funkcję pozostałych
- B. **pojemny** wektor, mała immunogenność
- Zawiera wszystkie **sekwencje regulatorowe**
- Pierwszy: **YAC** w 1983 (A.Murray i J.Szostak) → obecnie YAC z „wstawkami” 21go chromosomu ludzkiego
- Problemy: nie znamy wszystkich miejsc regulatorowych, odpowiedni ciąg sekwencji do budowy centromeru, odpowiednia struktura przestrzenna
- **HAC**- 1997r- ma syntetyczny centromer, przekazywany podczas podziałów, nie nadaje się jak dotąd do terapii genowej
- Obecnie badania nad **HAEC**

Wektory niewirusowe- chemiczne reagenty

- Nośniki kationowe
- Sole wapniowe
- Lipofekcja

Wektory niewirusowe- nanocząsteczki

- Stabilne **kompleksy** z DNA, siRNA
- Transport genów **do komórek nowotworowych** (transfekcja, badania na myszach)
- Gen ulega ekspresji **tylko** w komórkach nowotworowych (np. poprzez aktywację enzymatyczną możliwą w środowisku komórki nowotworowej)
- Początek badań klinicznych 2011

Wektory niewirusowe- **plusy**

- Bez ryzyka infekcji wirusowej
 - Mniejsze koszty niż metody wirusowe
 - Mniejsza immunogenność
 - Mniejsze ryzyko powstania mutacji
-
- **MINUS:** mniejsza wydajność

Wykład 4

Wektory wirusowe

Wektory wirusowe

- Zakażają komórki z dużą **swoistością**
- Przenoszą wklonowany materiał genetyczny (geny)
- Bardzo **wydajne**
- Wirusy są odpowiednio **zmodyfikowane**, tak by nie zagrażać gospodarzowi (wycięcie genów odpowiedzialnych za replikację genomu wirusa)
- Wirusy odgrywają rolę jako **wektory** i **szczepionki**
- RNA: retro- i lentiwirusy
- DNA: adenowirusy, AAV i Herpes

Wektory wirusowe

Table 3 - Main viral vector systems.

Viral vector	Description	Advantages	Limitations	Applications
Adenovirus (Ad)	Icosahedric, non- enveloped, genome of 36 kb, non-integrative	Easy propagation in high titers, infection of most cell types; insertion of large DNA fragments	High immunogenicity, inducing important cellular and humoral immune responses that can be fatal	Therapies that require transient gene expression: cancer therapy, angiogenesis induction and DNA vaccine production (due to its inflammatory and immunogenic properties)
Retroviruses (Retrovirus and Lentivirus)	Integrative in proliferative (retrovirus and lentivirus) and quiescent (lentivirus) cells	Low immunogenicity, possibility of insertion of large DNA fragments (up to 8 kb)	Insertional mutagenesis	Genetic diseases of T cells and hematological diseases (Retrovirus), HIV/AIDS
Adeno-associated virus (AAV)	Icosahedric, non- enveloped, single-stranded DNA, genome of 4.7 kb, integrative	Low immunogenicity, easy propagation in high titers, infection of most of cell types, long-term gene expression	Limited capacity for insertion of DNA fragments	Genetic diseases, tumors, neurological, ocular and cardiovascular diseases, others

Coura i Nardi A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genet. Mol. Biol.* 2008, 31: 1-11.

Wektory wirusowe- problemy

- Transdukcja **niewłaściwych komórek** (w tym: komórek germinalnych- ryzyko dziedziczenia)
- Insercja genu w **niepożądanym lokalizacji** genomu
- Większość wektorów wirusowych nie może przenieść całej sekwencji genu wraz z elementami niekodującymi- użycie cDNA (utrata możliwości regulacji)
- **Nieprzewidywalny stopień ekspresji genu** (podstawienie promotora, insercja w pobliżu DNA różnej metylacji), nadekspresja genu (toksyczność dla organizmu, reakcje immunologiczne)
- Badania kliniczne z udziałem niewielu pacjentów/ tylko badania wczesnej fazy
- Duże **koszty**
- Ryzyko przeniesienia wirusa na inne osoby

Wektory wirusowe- wyzwania

- Większa **specyficzność** dostarczenia materiału genetycznego
 - Docelowe **komórki**
 - Docelowa **lokalizacja** w genomie
- Większy stopień **integracji** materiału genetycznego z genomem
- Większy stopień **kontroli** (przez fizjologiczne mechanizmy) nad dostarczonym materiałem genetycznym

Wykład 4

Terapia molekularna na poziomie białka

Aptamery

TKI

**Terapia
molekularna
na poziomie
białka**

Rozpuszczalne
receptory

mAbs

Aptamery

- Oligonukleotydy lub peptydy
- Wielkość 10-20 aminokwasów
- Zalety: małe cząsteczki, stabilne, nie wywołują odpowiedzi immunologicznej
- Wiązanie („łapanie”) różnych białek

Rozpuszczalne receptory

- Użycie **rozpuszczalnych zewnątrzkomórkowych domen** receptorów (lub cząstek o właściwościach tych receptorów) w celu wychwytywania krążących **ligandów** w celu **zmniejszenia ich stężenia**
- Działanie oparte częściowo na zasadach mAb

Drobnocząsteczkowe TKI

- U ludzi około 90 kinaz tyrozynowych
- Większość TKI to mimetyki ATP
- Miejsca wiązania ATP przez kinazy tyrozynowe są wysoce **konserwatywne** → dlatego TKI działają najczęściej na wiele kinaz

Przeciwciała monoklonalne

- **Monoklonalne**- wiążą identyczny antygen z podobnym powinowactwem
- Otrzymane z **jednego klonu** limfocytów B
- Fragmenty Fab (fragment-antigen binding site) – ramiona Y
- Fragment Fc (fragment crystallizable) – ogonek Y

Przeciwciała monoklonalne

-**Mab** przeciwciało monoklonalne

-**Tu(m)**- przeciw guzom

-**Mo**- mysie

-**U**- ludzkie

-**Xi**- chimeryczne

-**Zu**- humanizowane

■ **Ce- tu- xi- mab**

■ **Pani- tum- u- mab**

■ **Tras- tu- zu- mab**

Przeciwciała monoklonalne

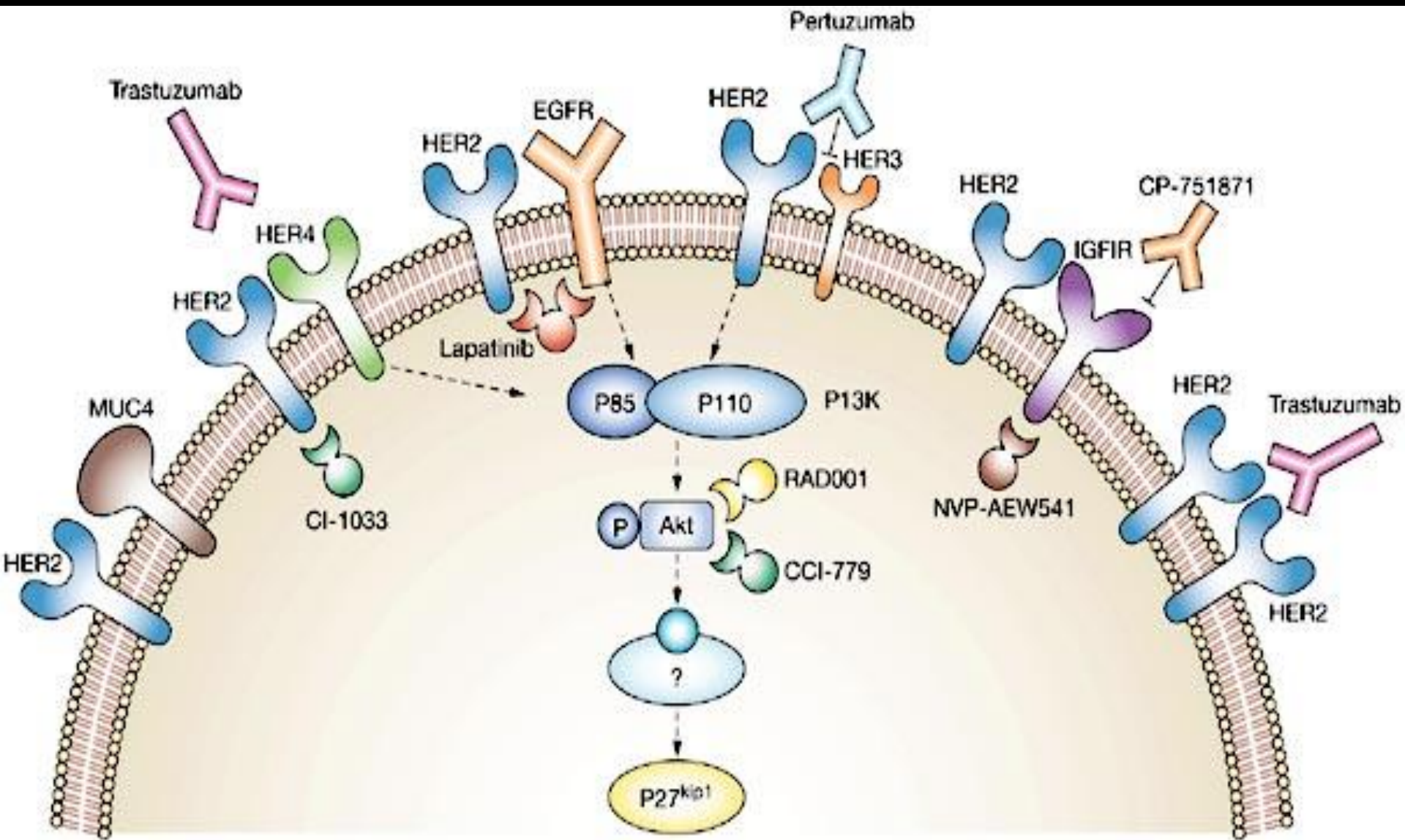
- **Bezpośrednie wiązanie** mAb do antygenów specyficznych dla kom. nowotworowej (hamowanie sygnałów wzrostowych, wywołanie apoptozy)
- mAb zmodyfikowane by dostarczyć **aktywne koniugaty** (toksyny, leki, radioizotopy i in)
- mAb o podwójnej swoistości wiążące przez Fab antygen i koniugat lub **komórkę efektorową**

Wykład 4

HER2

HER2

- Human Epidermal growth factor Receptor 2
 - CD340, erbB2, HER2/neu
 - Onkoproteina przezbłonowa
 - Należy do rodziny receptorów EGF
 - Sierocy receptor
 - Działa jako **dimer**



Trastuzumab

- **Herceptyna**
 - Humanizowane rekombinowane przeciwciało monoklonalne przeciwko **HER2**
 - Łączy się z domeną zewnątrzkomórkową HER2
 - W 95% ludzkie w 5% mysie
 - Pierwsza rejestracja: rak piersi
-
- **Pertuzumab**: blokuje dimeryzację receptora HER2

Lapatinib

- **Tykerb, Tyverb**
- **Inhibitor wewnątrzcząsteczkowej kinazy tyrozynowej: dla EGFR i HER2**
 - zapobiega autofosforylacji i aktywacji ścieżek sygnałowania
- **Doniesienia: zmniejsza ilość komórek macierzystych raka piersi**

Wykład 4

EGFR

Cetuximab (Cetuksymab)

- Erbitux
- Chimeryczne (mysio-ludzkie) przeciwciało monoklonalne IgG przeciw EGFR
- Rak jelita grubego/ nowotwory głowy i szyi

Panitumumab

- Vectibix
- Ludzkie przeciwciało monoklonalne przeciw EGFR
- Rak jelita grubego

mAb przeciw EGFR

Konieczne oznaczenie

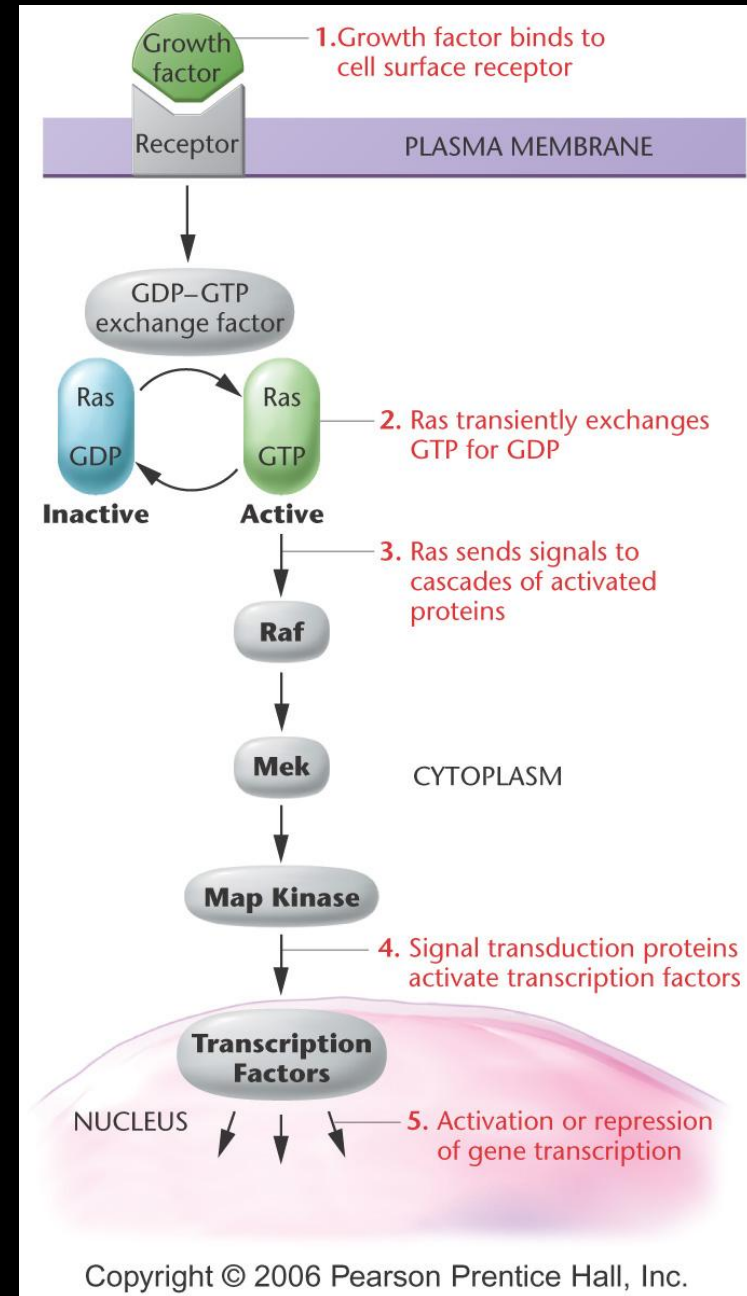
Ekspresji
EGFR

Mutacji
KRAS

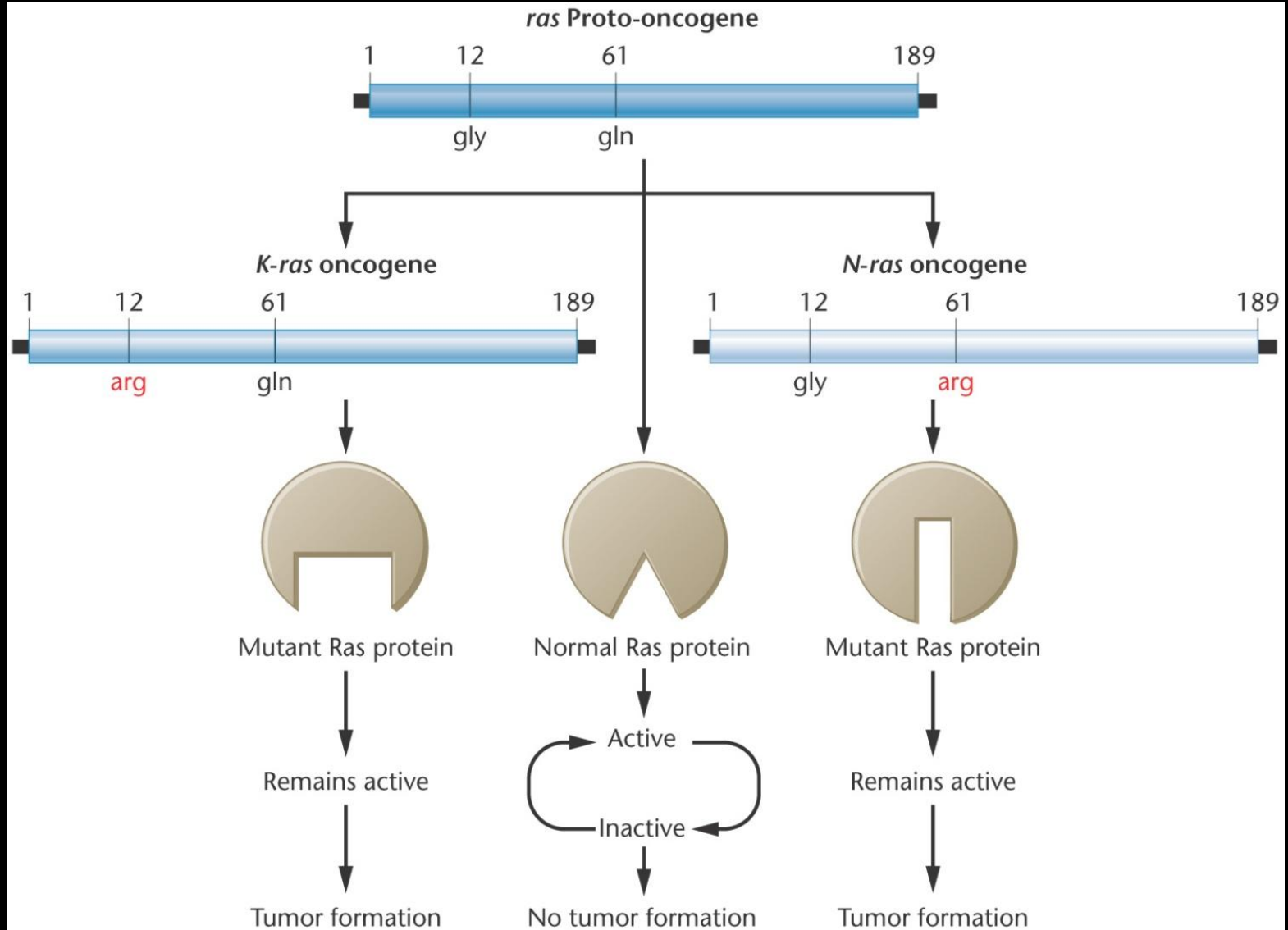
Mutacji
BRAF??

Ras

- Rodzina białek zaangażowanych w transdukcję sygnałów
- Mutacja obecna w ok. 20-40% nowotworów, zazwyczaj prowadzi do permanentnej aktywności białka nawet przy nieobecności czynników stymulujących
- Ras → Raf → Mek → MAP kinazy lub ścieżka AKT → czynniki transkrypcyjne → aktywność wielu genów odpowiedzialnych za wzrost różnicowanie komórkowe, przeżycie
- Członkowie to m.in.: H-, K- i N-Ras
- **Salirasib**- inhibitor Ras (badania np. w raku płuca, guzach mózgu)



Ras



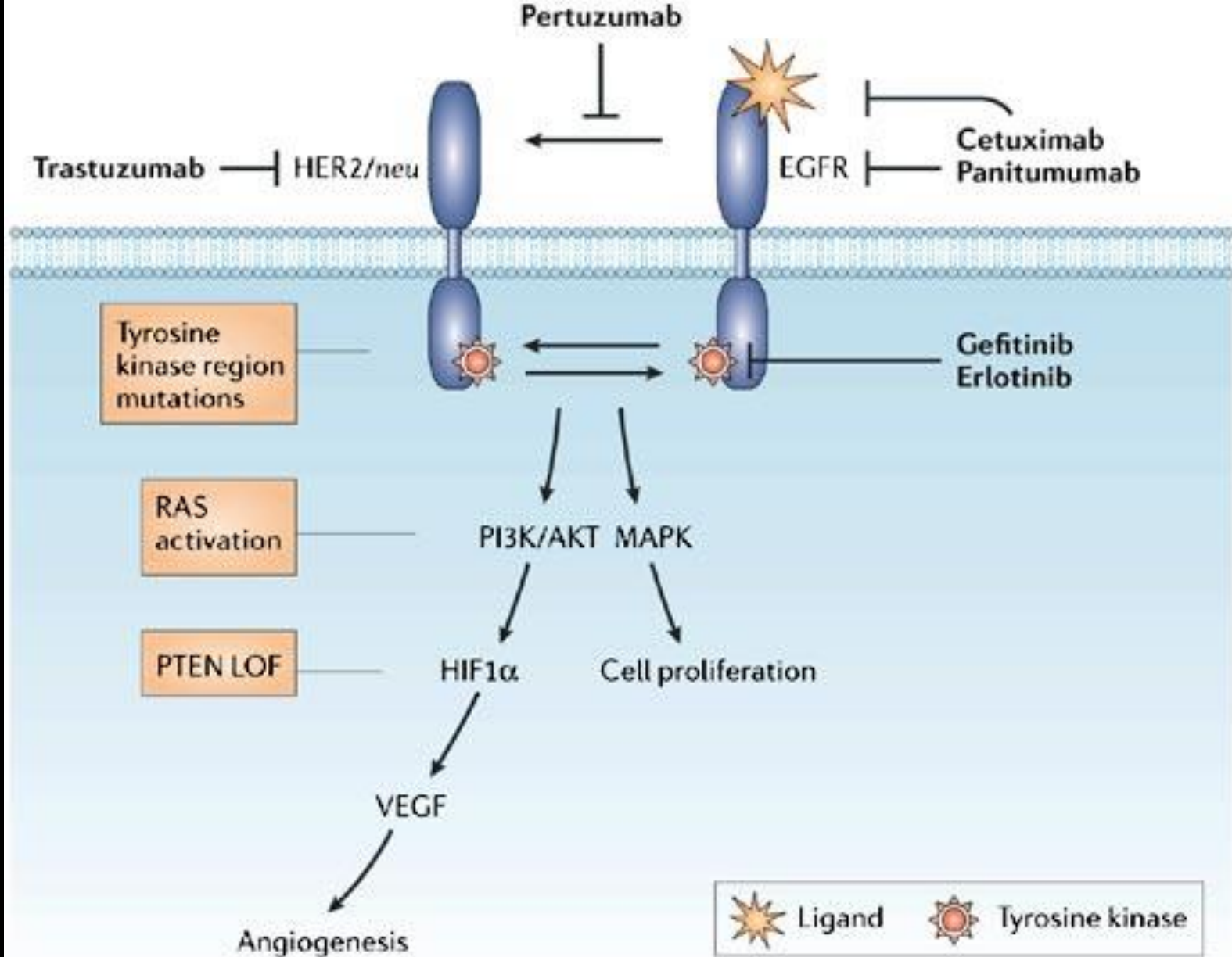
Gefitinib

- **Iressa**
- Pierwszy selektywny TKI (wewnątrzcząsteczkowa domena EGFR)
- Blokuje autofosforylację
- NDRP, przy obecności mutacji EGFR

Erlotinib

- **Tarceva**
- Selektywny, odwracalny TKI (wewnątrzcząsteczkowa domena EGFR)
- Oporność na leczenie: mutacje MET, mutacje IGF1 receptora (tworzy aktywny heterodimer z EGFR)

Paninhibitory?



Wykład 4

Inhibitory
wielokinazowe

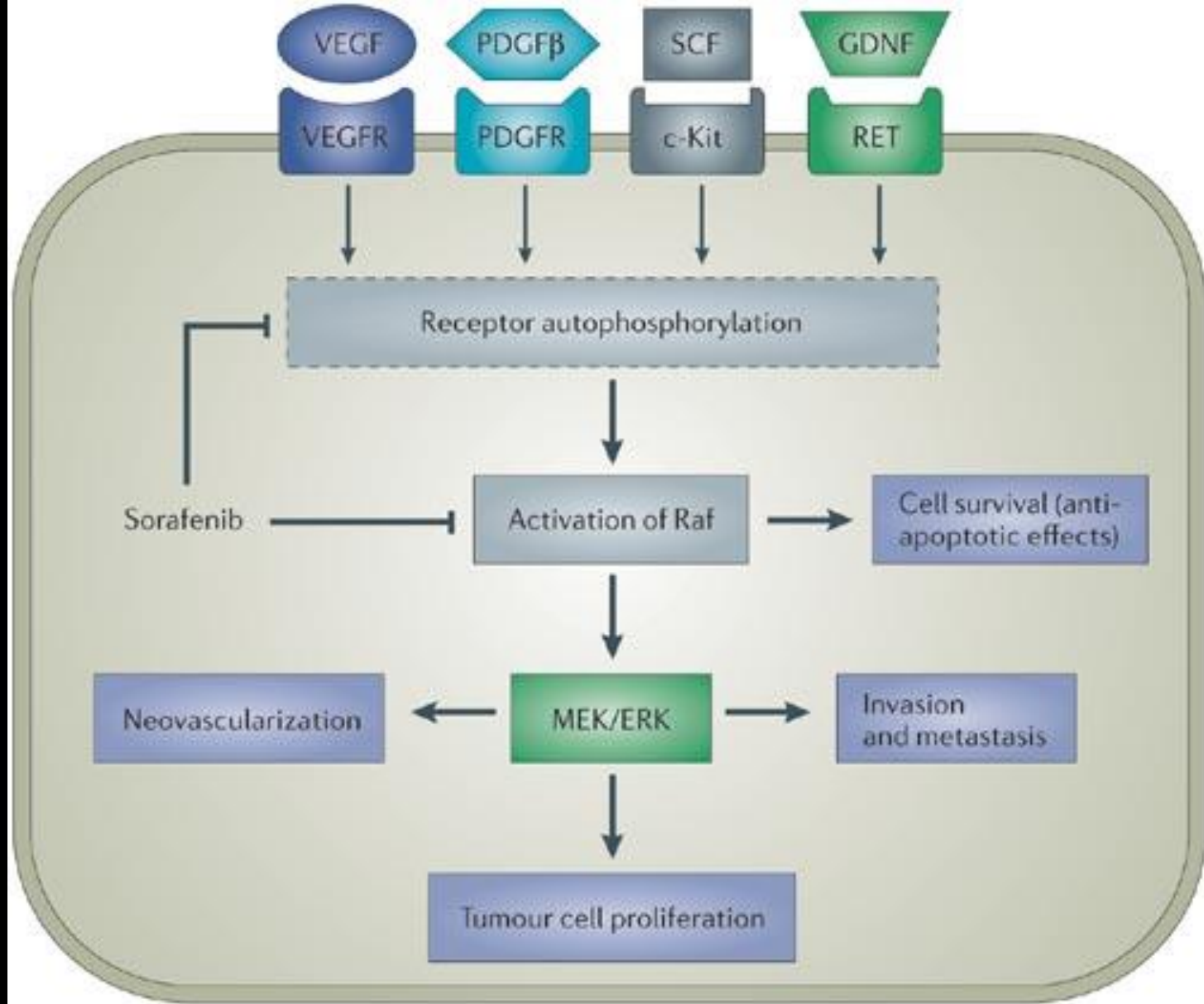
Imatinib

- **Gleevec**
- Inhibitor kinaz tyrozynowych
 - Bcr-Abl
 - PDGFR
 - c-KIT

- Hamuje proliferację, promuje apoptozę
- CML z chromosomem Filadelfia, ALL, GIST

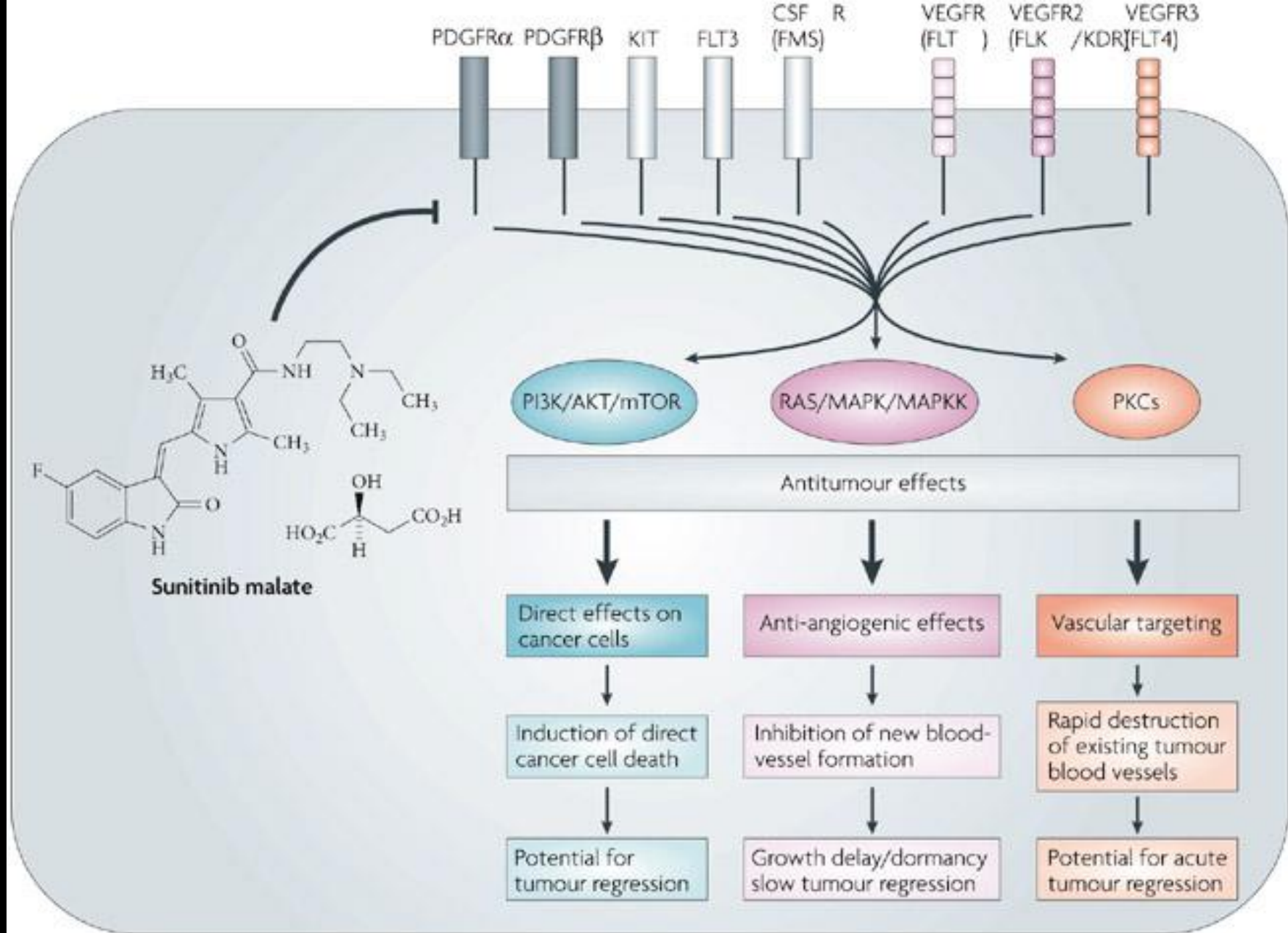
Sorafenib

- **Nexavar**
- Inhibitor wielokinazowy:
 - VEGF R
 - Flt-3
 - c-KIT (receptor dla czynnika wzrostu kom. macierzystych)
 - RET
 - Raf
 - PDGFR β
- Hamuje liczne szlaki sygnałowania (w tym szlak kinazy MAP)
- Rak nerki



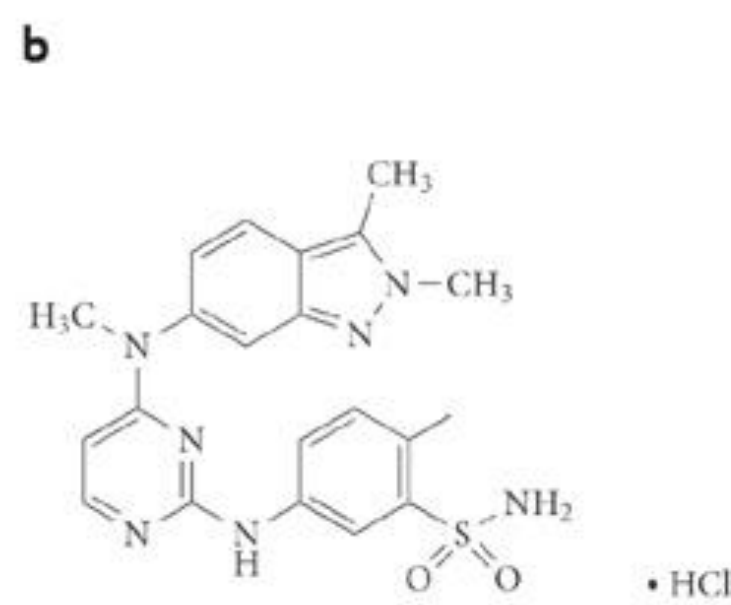
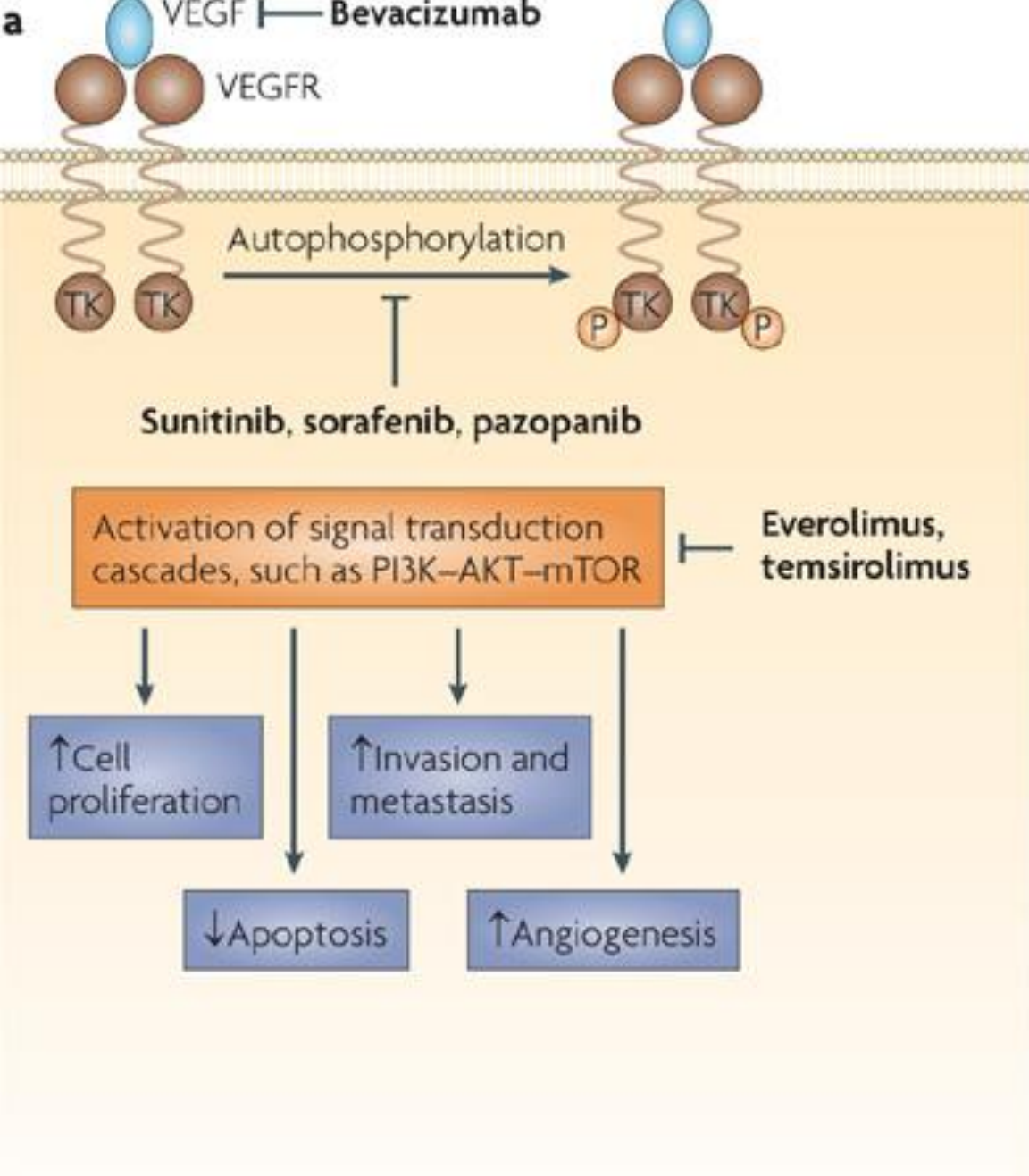
Sunitinib

- **Sutent**
- Inhibitor wielokinazowy:
 - VEGF R
 - PDGFR
 - c-KIT
 - RET
 - Flt-3
 - CSF-1R
- Hamuje liczne szlaki sygnałowania
- Rak nerki, GIST



Pazopanib

- **Votrient**
- Inhibitor wielokinazowy:
 - VEGF R
 - PDGFR α i β
 - c-KIT
- Mniej skutków ubocznych ?
- Rak nerki, mięsaki tkanek miękkich



Pazopanib hydrochloride

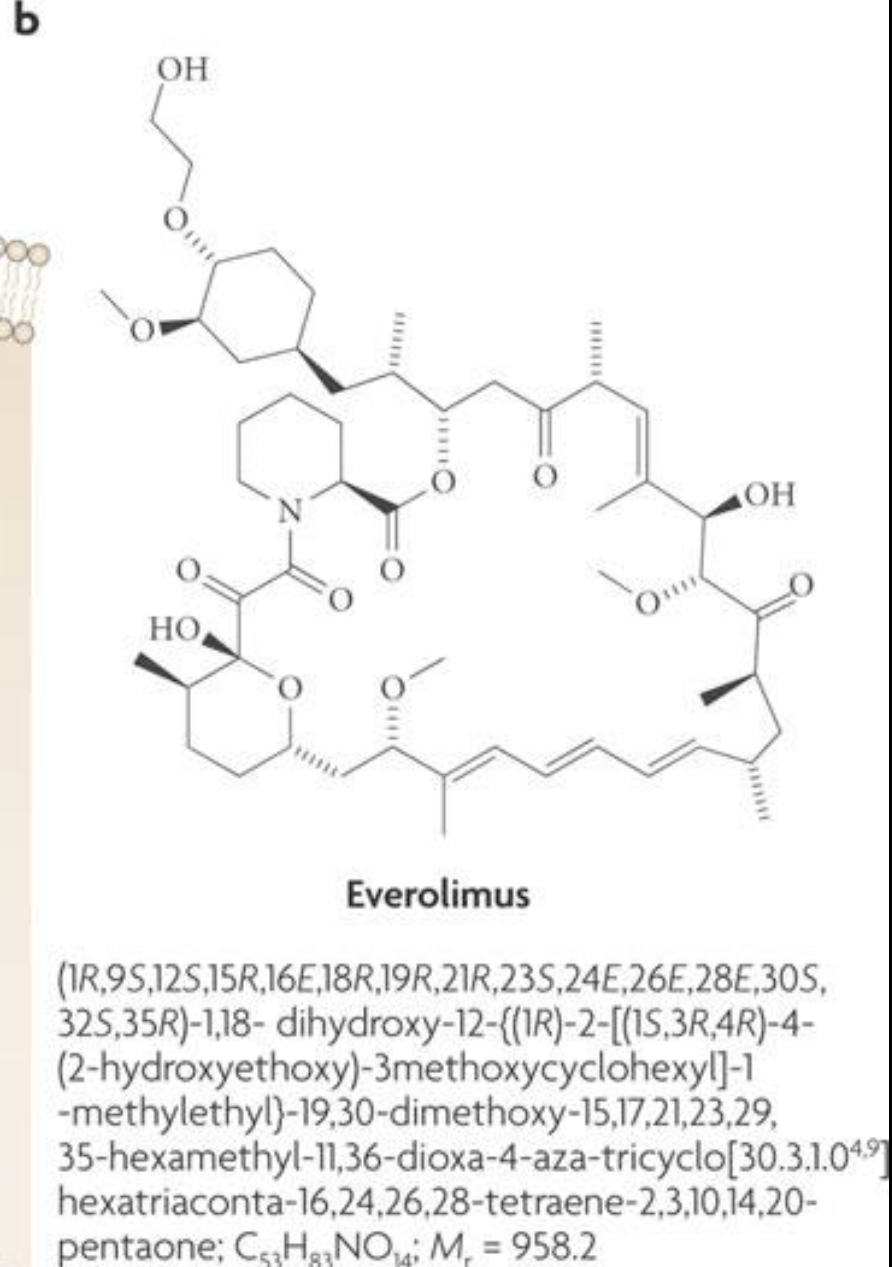
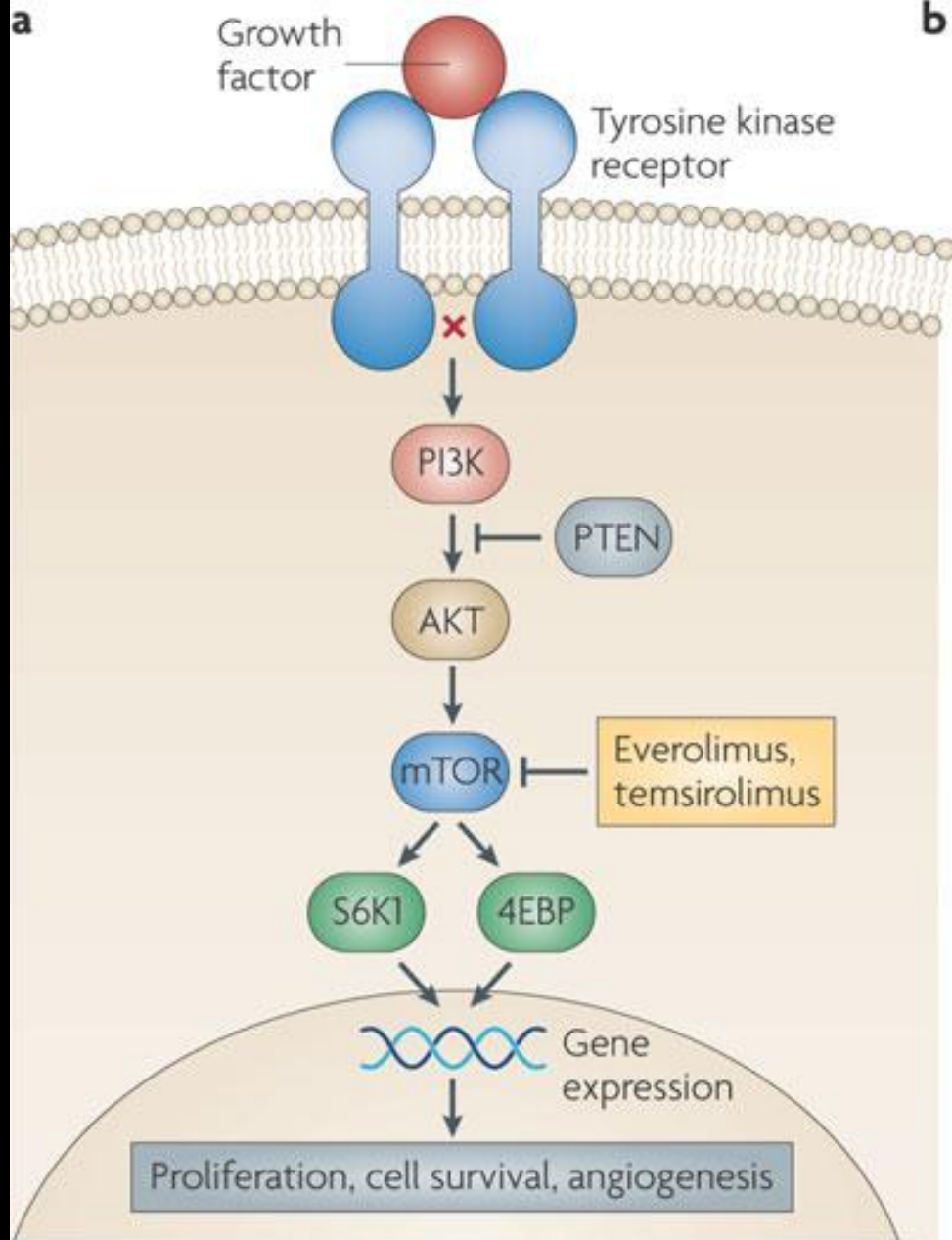
5-[[4-[(2,3-dimethyl-2H-indazol-6-yl) methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methylbenzenesulphonamide monohydrochloride; $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}\bullet\text{HCl}$; $M_r = 473.99$

Wykład 4

mTOR

Everolimus

- **Afinitor**
- Pochodna rapamycyny (sirolimusu)
- **Inhibitor kinazy mTOR (wew/kom kinaza tyrozynowa)**- szlak mTOR jest b. często aktywowany w wielu nowotworach
- Zatrzymanie **prolifracji** (zatrzymanie komórek w fazie G1)
- Inhibicja angiogenezy
- Wzmocnienie efektów chemioterapii (np. pochodnymi platyny)
- Zmniejszenie poboru składników odżywczych przez komórki nowotworowe
- Temsirolimus- **Torisel**



Dziękuję