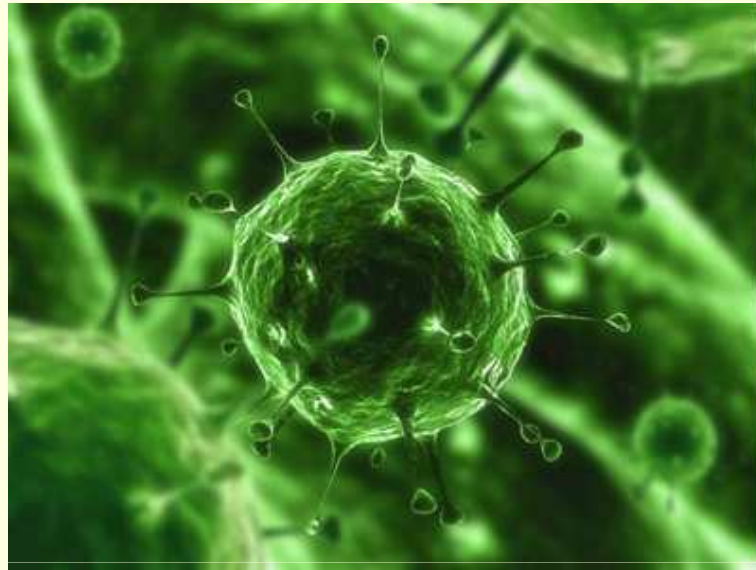

Biotechnológia az antivirális és daganatellenes terápiában

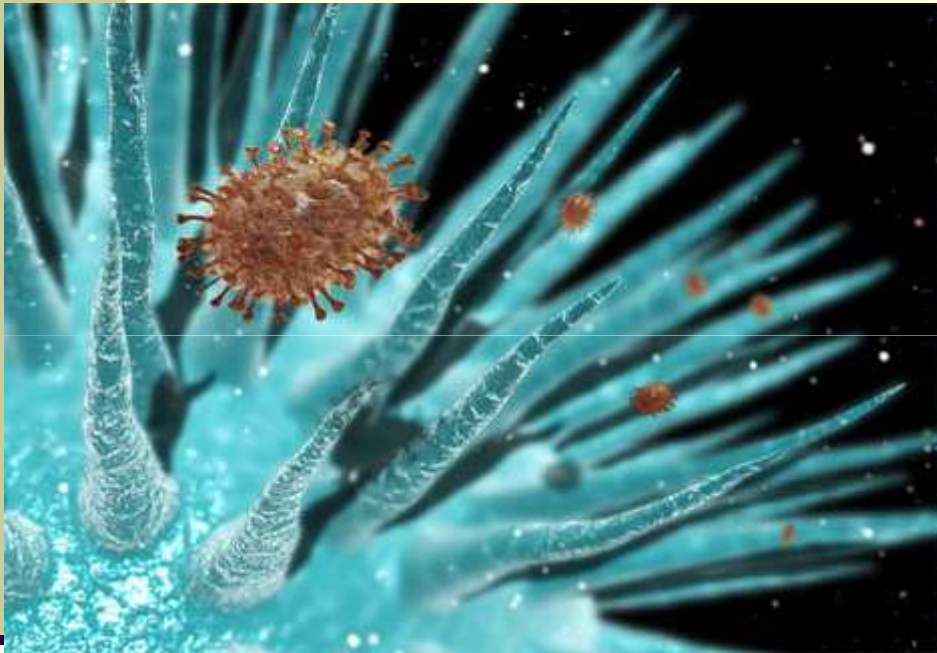
Bartis Domokos
PTE-ÁOK

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



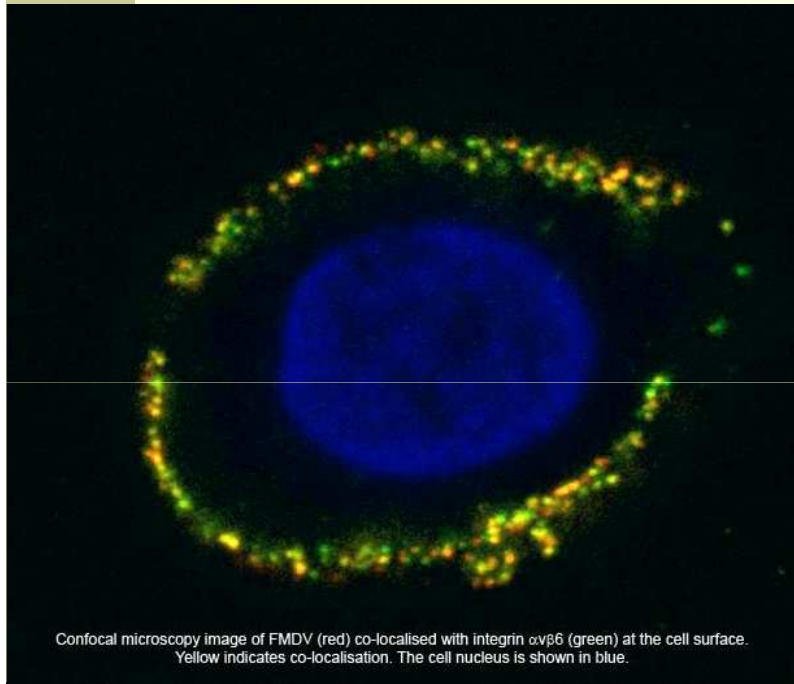
Antivirális terápia

Beavatkozási lehetőségek a vírusfertőzés lezajlásába



1. Kötődés a gazdasejt felszínéhez
2. Behatolás a gazdasejtbe (fúzió)
3. Nukleinsav szintézis
4. Strukturális fehérjék szintézise
5. Érett virionok összeszerelődése
6. Kiszabadulás a gazdasejtből (budding)

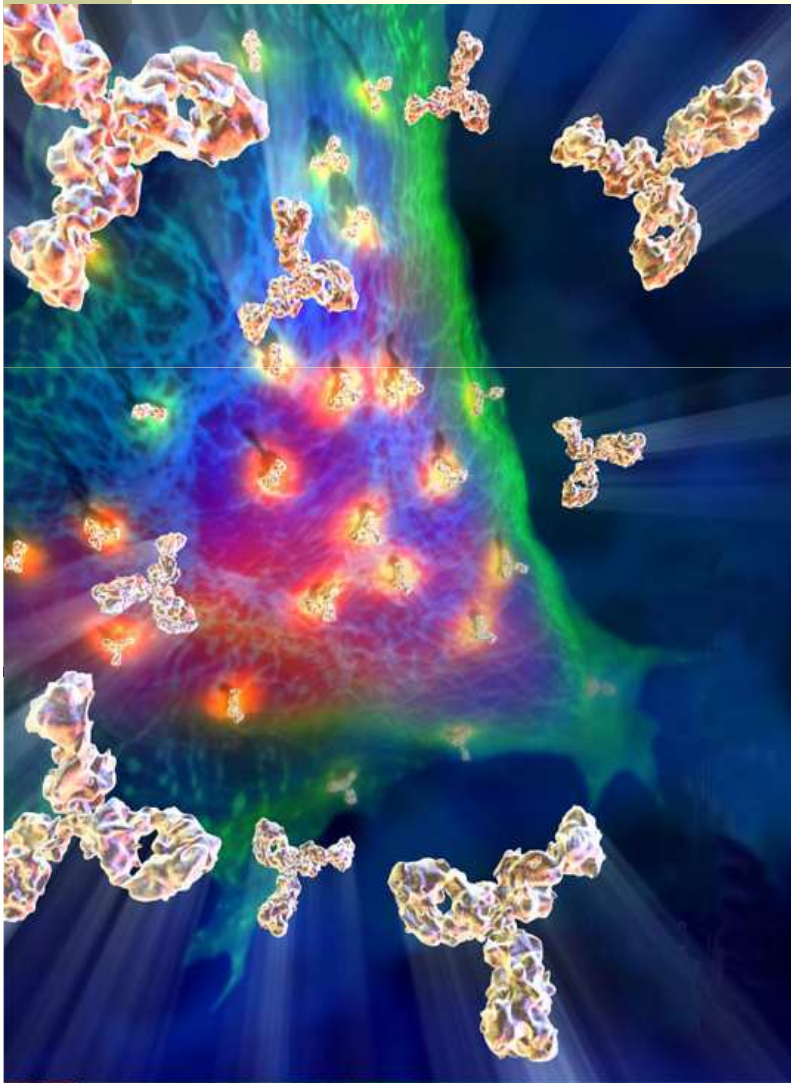
Virion kötődésének gátlása a gazdasejt felszínéhez



FMDV (száj –és körömfájás vírus, vörös) kötődése az $\alpha 5 \beta 6$ integrinhez (zöld)

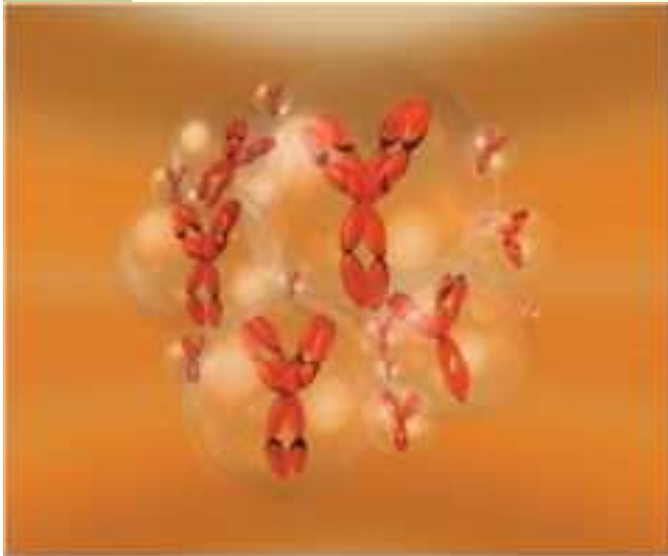
- Virus Associated Protein (VAP) kötődik valamilyen sejtfelszíni strukturához, receptorhoz
- Terápiás közbeavatkozási lehetőségek:
 - Monoklonális antitest
 - VAP ellen
 - Sejtfelszíni receptor ellen
 - A receptor természetes ligandja gátolja a VAP kötődést a receptorhoz
 - A receptorhoz hasonlító ágens, ami a VAP-hoz kötődik gátolja a receptor-VAP interakciót

Virion kötődésének gátlása a gazdasejt felszínéhez



- **Palivizumab-SYNAGIS®**
- Az első monoklonális antitest fertőző betegség ellen
- Respiratory Syncytial Virus (RSV) fertőzés a vezető oka a súlyos alsó légúti fertőzéseknek csecsemőkben
- A palivizumab humanizált antitest, amelyet a RSV F kapszid fehérjéje ellen fejlesztettek ki
- Hatékonyan neutralizálja az RSV-t és gátolja a virion fúzióját a gazdasejttel
- A humanizált mAb jól tolerálható és szignifikánsan csökkentette az RSV-eredetű halálozást

Intravénás Ig készítmények (IVIG)



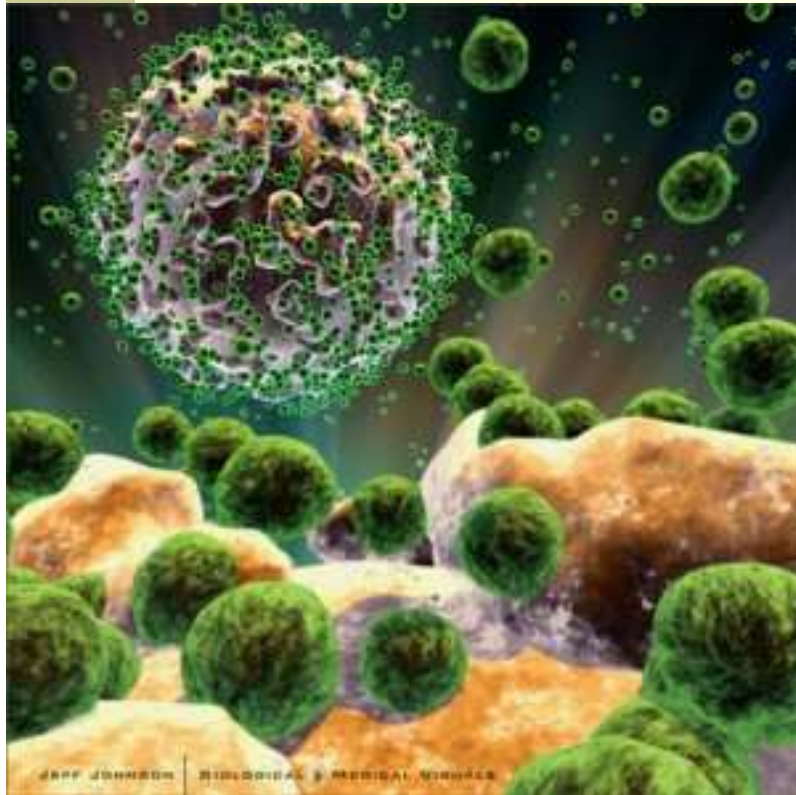
- **IVIG:** pool-ozott humán poliklonális IgG. Passzív immunizáció, de lehet profilaktikus célra is hypogammaglobulinemiában.
- Használatos súlyos vírusinfekciók esetén is immunszupprimáltakban és gyermekekben, csecsemőkben. Nem pontosan definiált vírusfertőzés esetén!
- Immunmodulációs hatás például Tx rejekció esetén, a hatásmechanizmus vitatott.
- **Hyperimmun globulin:** passzív immunizáció ismert vírusfertőzésben olyan poliklonális humán IgG-vel, ami magas titerben tartalmaz antitestet az ismert kórokozók ellen. HBV, RSV, Vaccinia, Varicella zoster, CMV

Aktív vakcináció-inaktivált vakcinák

- Az inaktivált vakcinák humorális immunválaszt indukálnak
- A védettséget a megfelelő titerben jelenlevő neutralizáló antitestek nyújtják
- Jelenleg forgalomban levő inaktivált vakcinák vírusbetegségek ellen: IPV, HBV, HPV
- Hátrány: inaktivált vakcinák kevésbé stimulálják a celluláris immunválaszt
- Aktív fertőzés ellen nem hatékony

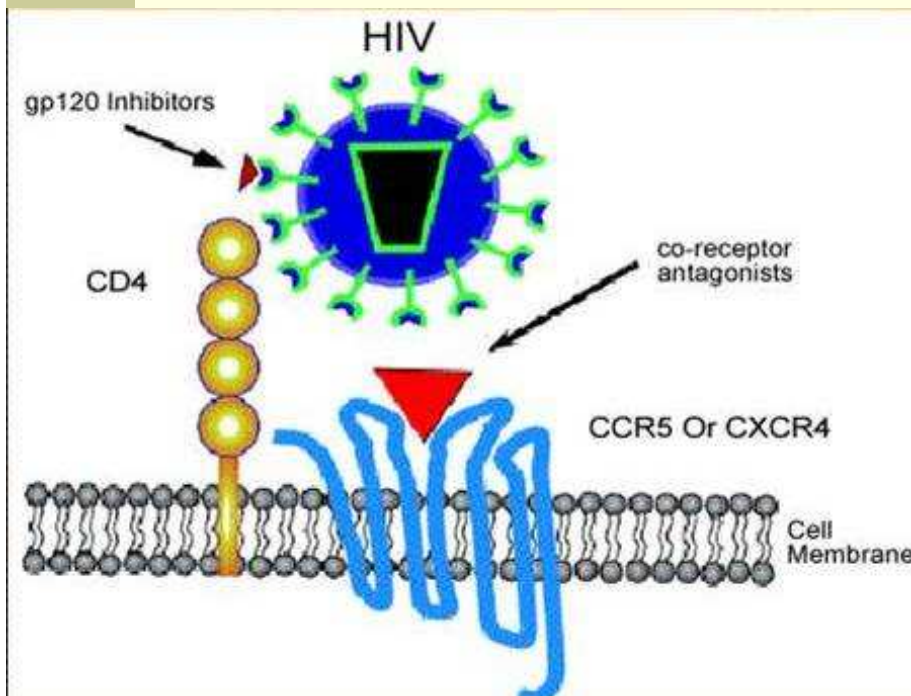


Virion fúzió gátlása a gazdasejttel



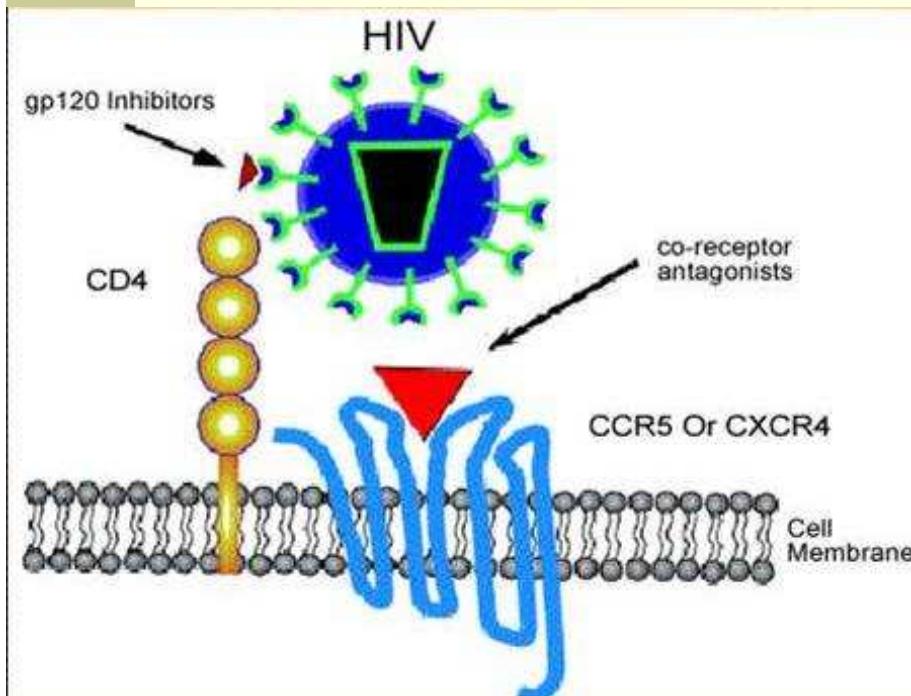
- **Enfuvirtide – Fuzeon®** (Roche)
- HIV therápiában engedélyezett gyógyszer
- Első fúzió-gátló gyógyszer a piacon
- 37as hosszúságú polipeptid, sc. adagolás
- A gp41-hez kötődve gátolja a virális fúziót
- Csak HIV-1 ellen hatásos
- Igen drága a kezelés, csak multirezisztens törzsek ellen használják „salvage” gyógyszerként
- Mellékhatások lehetnek: erythema, bőrkiütés, viszketés, perifériás neuropáthia, insomnia, máj és vesetoxicitás

Virion fúzió gátlása a gazdasejttel



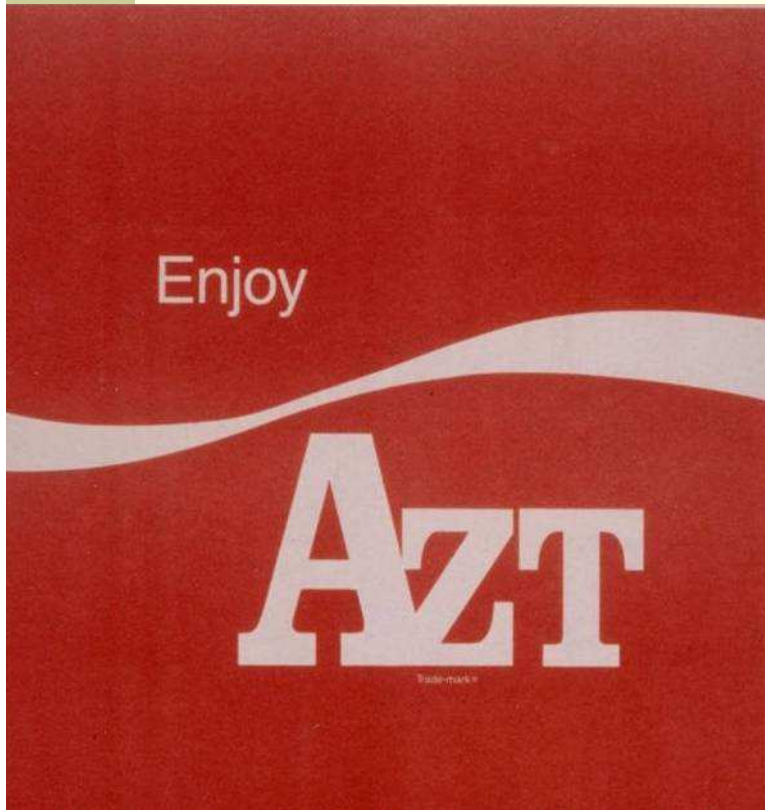
- **Maraviroc** – CCR5 antagonist
- 2007 szeptemberben engedélyezte az FDA
- A CCR5 az egyik ko-receptor, ami a HIV gazdasejt fúzióhoz szükséges (lehet)
- HIV fertőzés kezelésében használható
- Hepatotoxicitása miatt betiltották egyik rokonvegyületét 2005-ben
- A CCR5 tropikus HIV törzsek egyébként kevésbé gyors és súlyos lefolyású betegséget okoznak általában

Virion fúzió gátlása a gazdasejttel



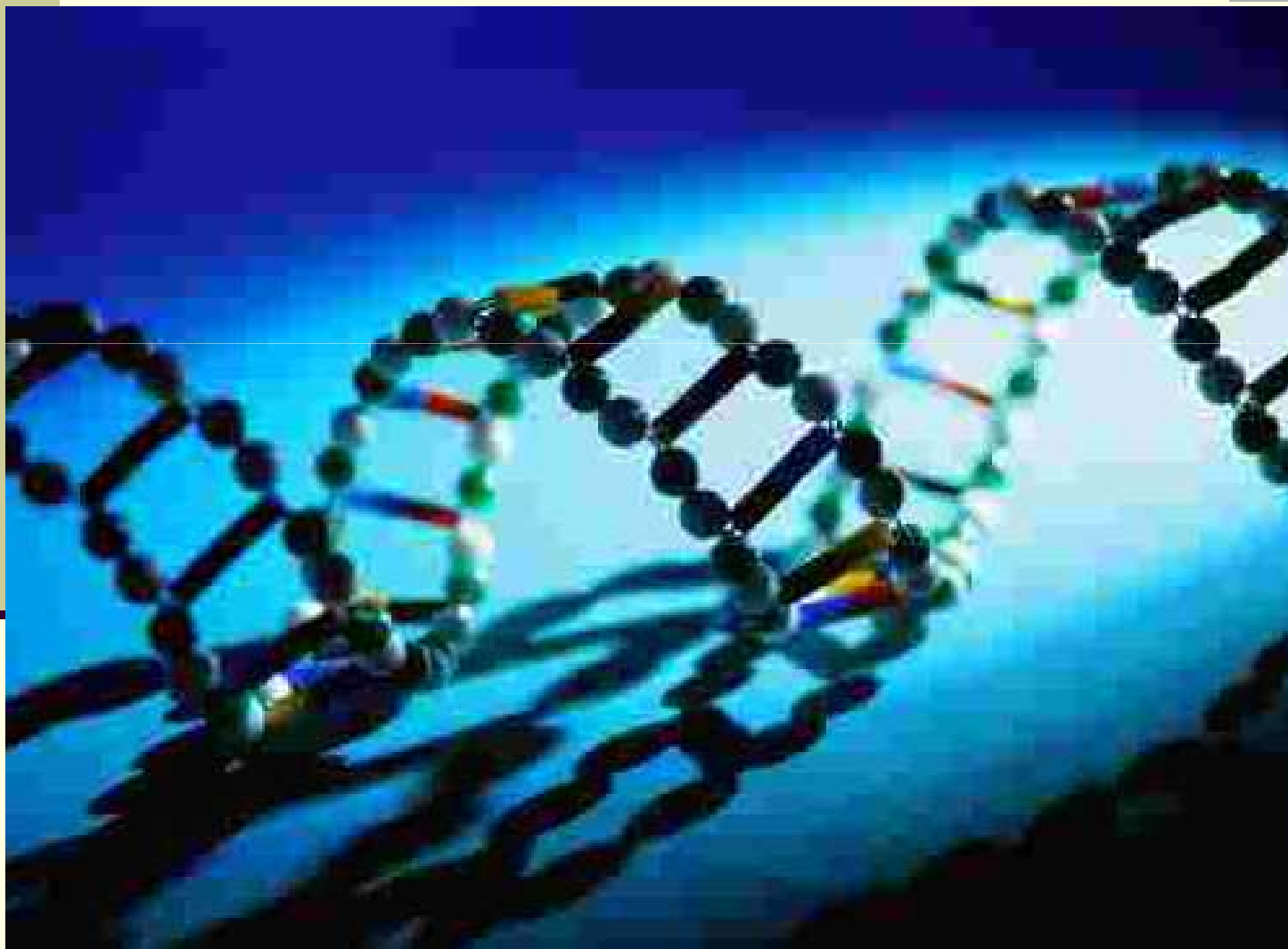
- **Plerixafor** – CXCR4 antagonist
- Makrociklikus kémiai szerkezet
- Az ún. X4-tropikus HIV törzsek ellen fejlesztették ki
- Potens inhibitora a CXCR4 chemokin receptornak, amely sok haemopoetikus sejten expresszálódik
- Antivirális aktivitása alacsony
- Jól használható őssejt-mobilizációhoz!

Virális nukleinsav szintézis/funkció zavarás



- Fontos tulajdonságai az itt ható szereknek:
 - Metabolikus stabilitás
 - A gazdaszervezet funkcióit ne zavarják
- Ide tartozó antivirális szerek:
 - Nukleozid analógok (pl. Acyclovir, Gancyclovir, stb.)
 - RT gátlók (pl. Zidovudine/AZT, Lamivudine)
 - RNaseH gátlók (kísérleti stádiumban)
 - Integrase gátlók (Raltegravir – FDA engedély 2007 október!)

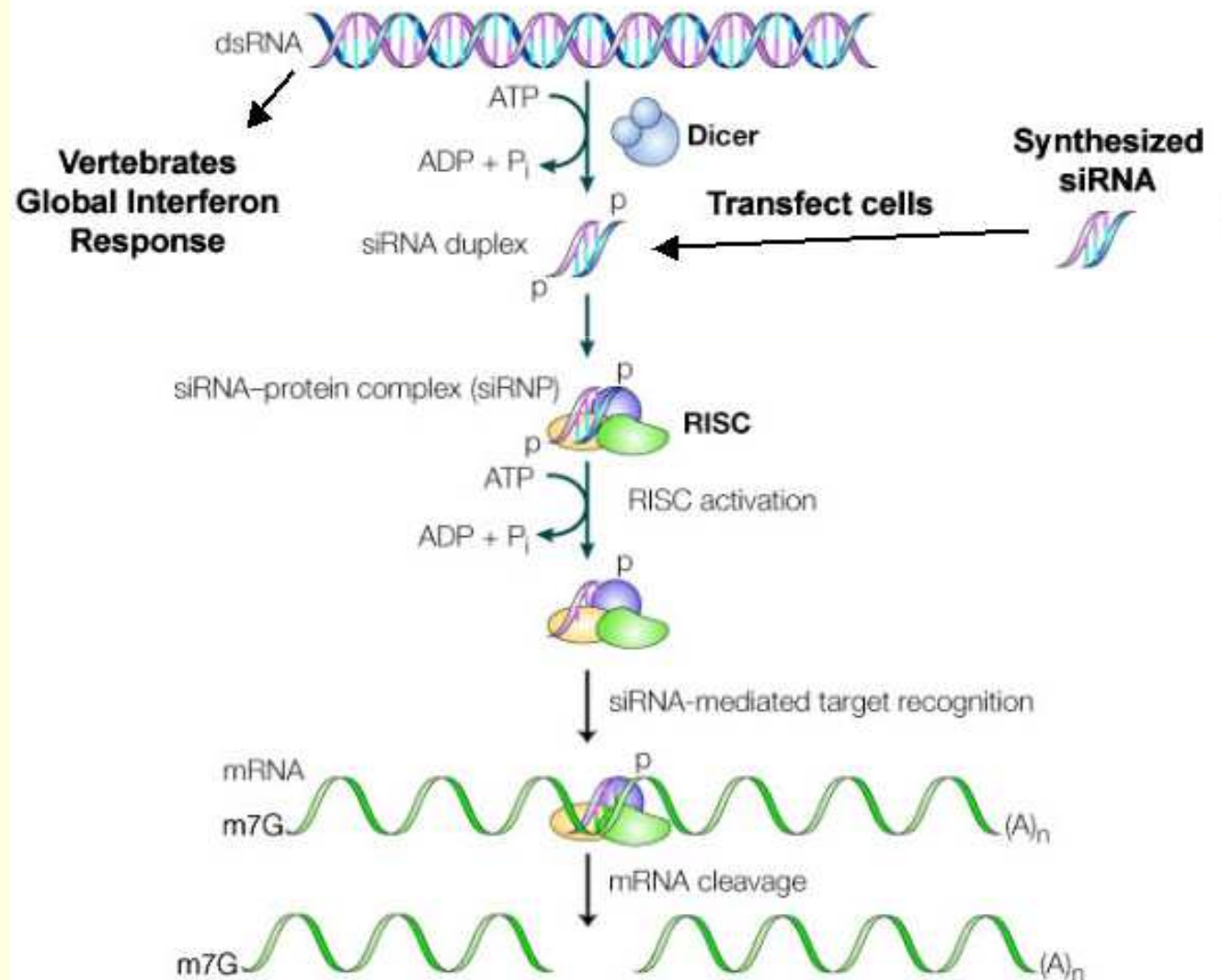
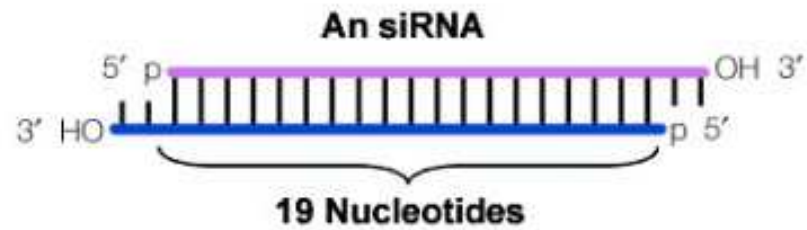
RNAi terápia



RNAi terápia lehetőségei

Kis molekulájú hatóanyagok	Fehérjék és antitestek	RNAi
Antagonista vagy agonista	Antagonista vagy agonista	Csak antagonista
EC és IC target	EC target	Legszélesebb targetspektrum
Nem minden targetcsoportot lehet szelektíven modulálni	Magas szelektivitás, hatékony moduláció	Magas szelektivitás, hatékony moduláció
Azonosítás és optimalizálás lassú és költséges	Azonosítás és optimalizálás lassú és költséges	Gyors és olcsó azonosítás és optimalizálás
Egyszerű szintézis	Nehézkes szintézis	Egyszerű szintézis

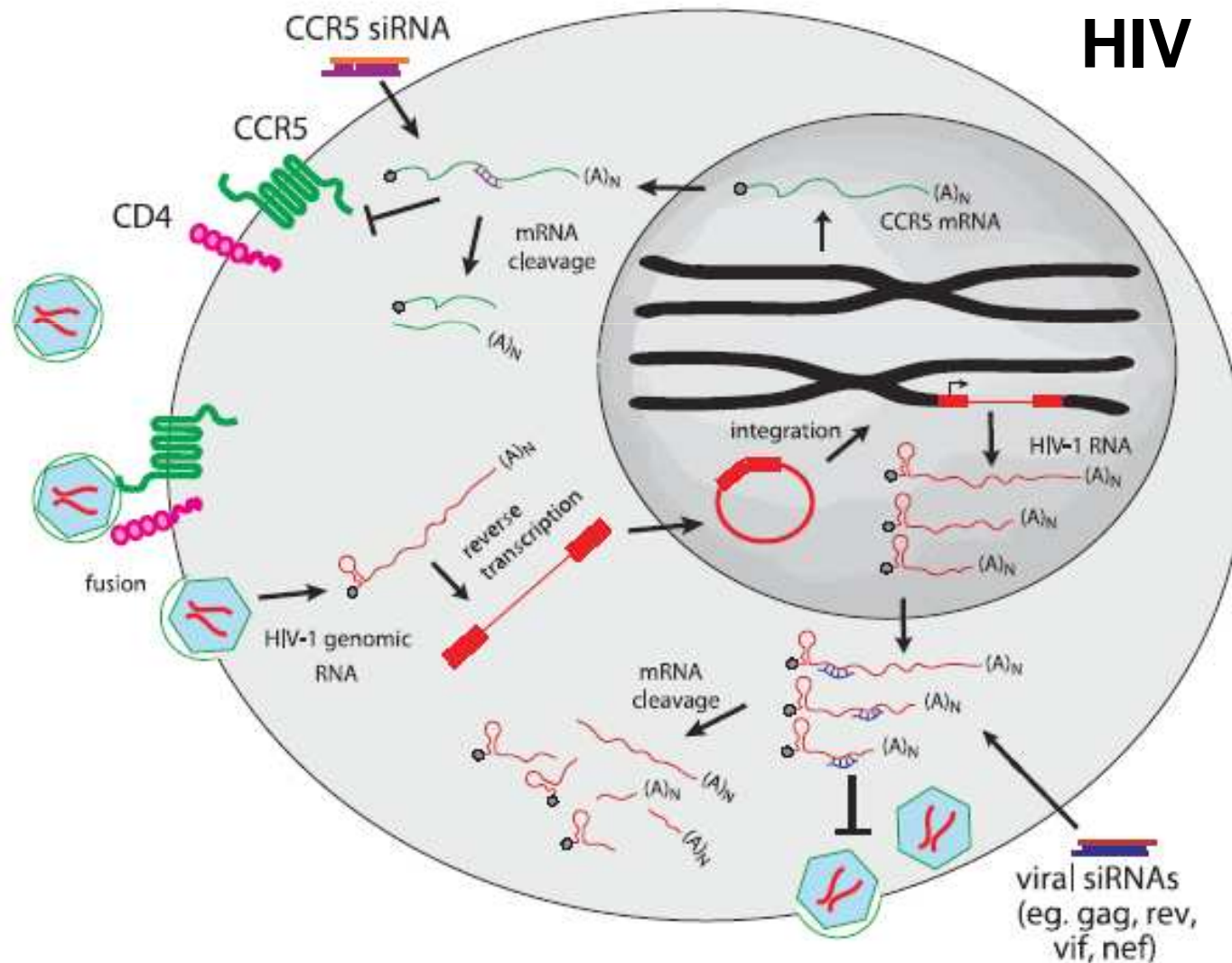
siRNA



Virális protein szintézis gátlás

- **RNAi** (RNS interferencia)
- endogén mechanizmus a proteinszintézis szabályozására az RNAi
- exogén siRNA bejuttatása:
 - mesterséges génexpresszió knock-down
- intracelluláris enzimek lebontják a dsRNS-t (Dicer és Agronaute endonukleáz családok)
- minden eukarióta sejtben jelen van ez a mechanizmus

Virális protein szintézis gátlás



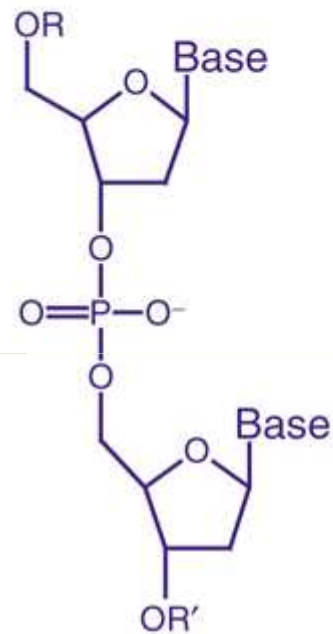
Virális protein szintézis gátlás

- Fontos a megfelelő szekvencia kiválasztása!
- Gazdaszervezet eredetű fehérje knock-down esetén:
 - lehetőleg specifikus legyen a megfertőzött sejtre
 - semmiképpen ne legyen létfontosságú fehérje
- Virális eredetű gén esetén:
 - létfontosságú virális fehérje
 - konzervált, minimális varianciát mutató fehérje

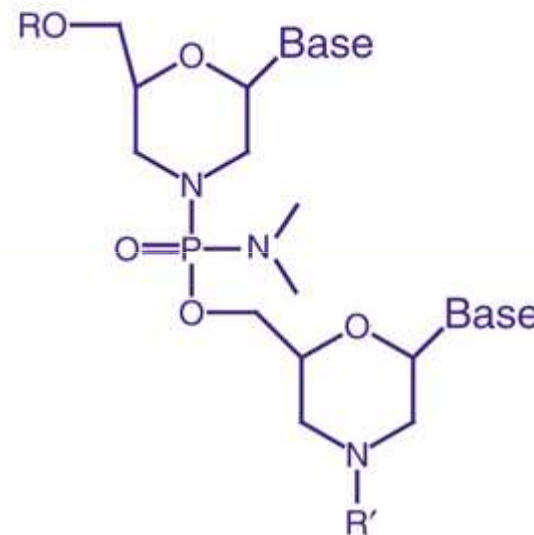
Virális protein szintézis gátlás

- RNAi terapia klinikai bevezetése
- siRNA szisztémás alkalmazása nehézséget jelent:
 - A legtöbb sejt nem veszi föl
 - elbomlik a szérumban
 - vese kiválasztja
- siRNA bejuttatás könnyű a mukózális membránokon – sikeres állatkísérletek
- Felső légutak és a női genitális traktus
- Jelenleg Fázis I. klinikai tesztek folynak RSV specifikus siRNA-val

Virális protein szintézis gátlás



Phosphodiester
DNA

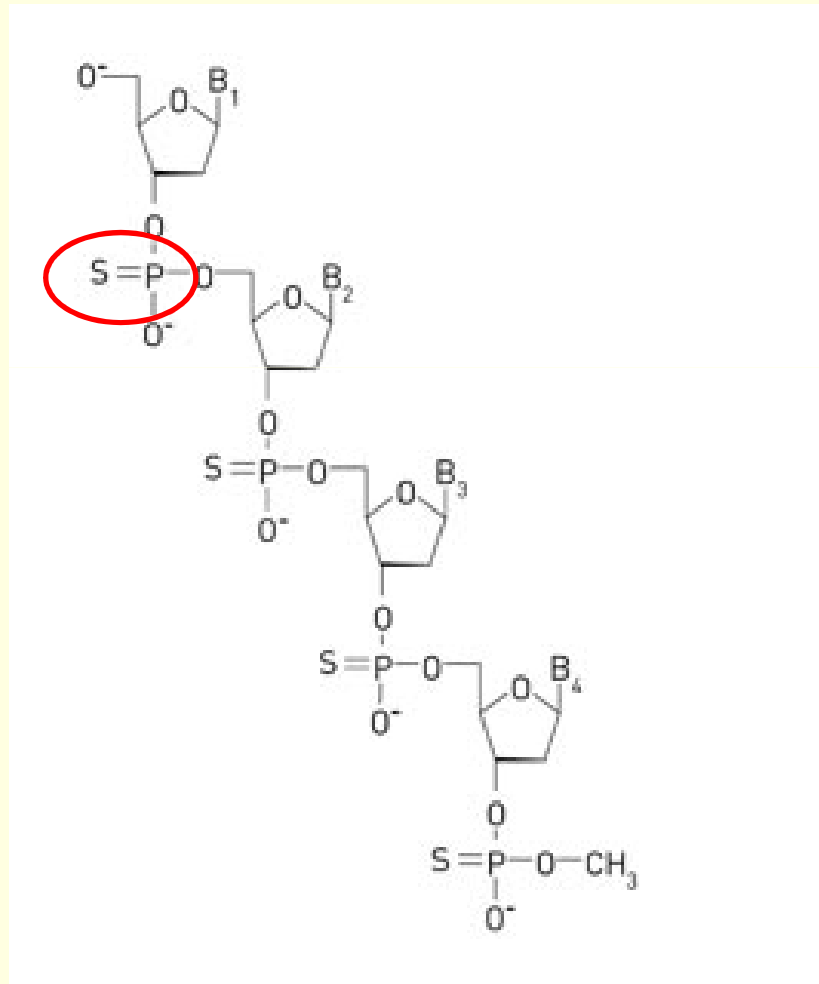


Morpholino



- **Morpholino gyűrűs oligonukleotidok**
- Dezoxiribose helyett morpholino gyűrű
- Anionos foszfát helyett nem-ionos foszforodiamidát csoport
- Sztérikus gátlás révén hatnak, RNS nem degradálódik

Virális protein szintézis gátlás

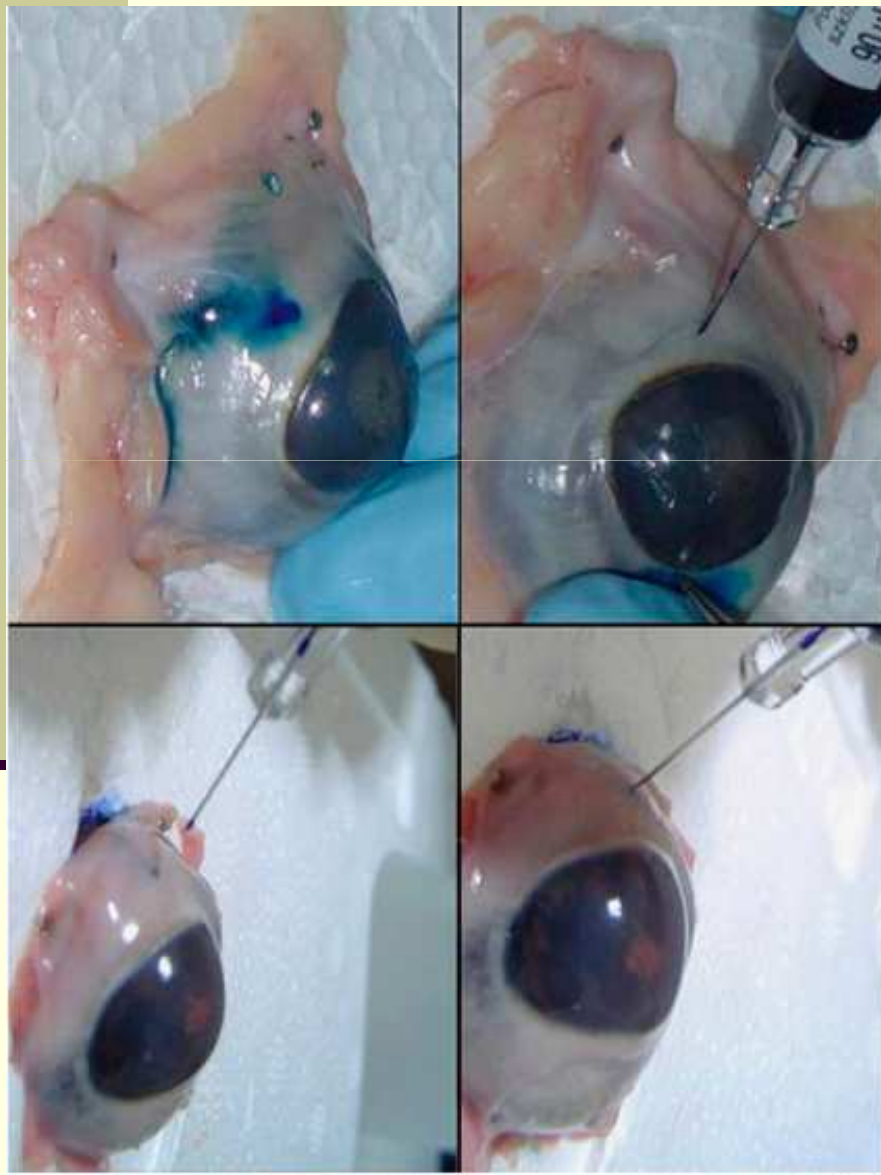


- **Foszforotiolát oligonukleotidok**
- RNase rezisztencia
- A foszforotiolát geinc nem módosítja az ilyen oligok affinitását a komplementer szekvenciákhoz
- Már van ilyen technológiával készült engedélyezett gyógyszer (Fomivisen)

Virális protein szintézis gátlás

- **RNase rezisztens oligonukleotidok**
- Pre-mRNS splicing gátlása: exon és intron határhoz hibridizál
- Ribosomal entry site gátlása: transzláció iniciáció, start kodon helyére hibridizál
- **Morpholino és Foszforotiolát oligok előnyei**
 - Nukleáz rezisztencia
 - TLR nem ismeri fel, nincs danger szignál
- Problémák:
 - Jelenleg problémás a sejtekbe való bejuttatás
 - Szisztémás alkalmazás még nem megoldott
- Mikroinjekció, elektroporáció
- CPP konjugáció: megoldás lehet a problémára

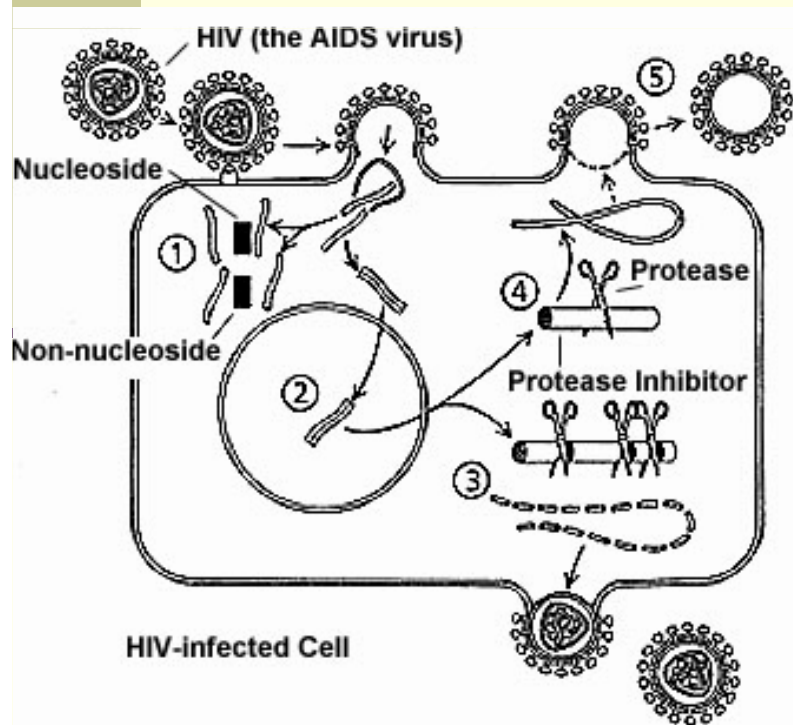
Virális protein szintézis gátlás



- **Fomivisen** - Vitravene®
- Az első engedélyezett antisense oligonukleotid gyógyszer
- Phosphorothiolate gerinc a nukleázokkal szemben rezisztenciát biztosít
- Intravitreális injekció formuláció
- CMV retinitis helyi kezelésére használatos
- Általában immunszuppresszált betegekben
- A CMV egy nélkülözhetetlen strukturális fehérjéjének a szintézisét specifikusan gátolja
- A hatóanyag 21 nukleotid hosszúságú komplementer szakasz a virális mRNS-el

Virion összeszerelődés gátlása

- **Proteáz inhibitorok** – antiretrovirális szerek
- Jelenleg 10 proteáz inhibitor engedélyezett a HIV terápiájában
- HCV terápiában tesztelés alatt állnak hasonló hatásmechanizmusú gyógyszerek
- Hatásmechanizmus:



- a provirusról az mRNS átíródik. Az Env mRNS-nek nincsen további splicingje
- Az Env mRNS egyben transzlálódik a riboszómán. Az így keletkezett „polyproteint” virális/celluláris **PROTEÁZOK** hasítják
- így keletkeznek a nélkülözhetetlen strukturális fehérjék
- A PI-k ezeknek a strukturális fehérje prekurzoroknak a hasítását gátolják

Virion „budding” gátlása

- **Osteltamivir, Peramivir, Zanamivir**
- Neuraminidáz inhibitorok: Influenza A és B ellen is hatékonyak
- A neuraminidáz az egyik fő felszíni fehérje az influenzavíruson
- A neuraminidáz aktivitás szükséges a virion kiszabadulásához
- A gátlásával az érett vírusok nem tudnak kiszabadulni a gazdasejtéből

Egyéb antivirális szerek

- **Interferon terápia**
- Rekombináns interferon α és β
- A gazdaszervezet védekezőmechanizmusainak aktiválásával, modulálásával hat
- Sok mellékhatás, a hatékonyság nem meggyőző
- Antivirális terápia mellett tumorokban és autoimmun megbetegedésekben is használatosak



Daganatellenes terápia

Jelenlegi tumorterápiás lehetőségek



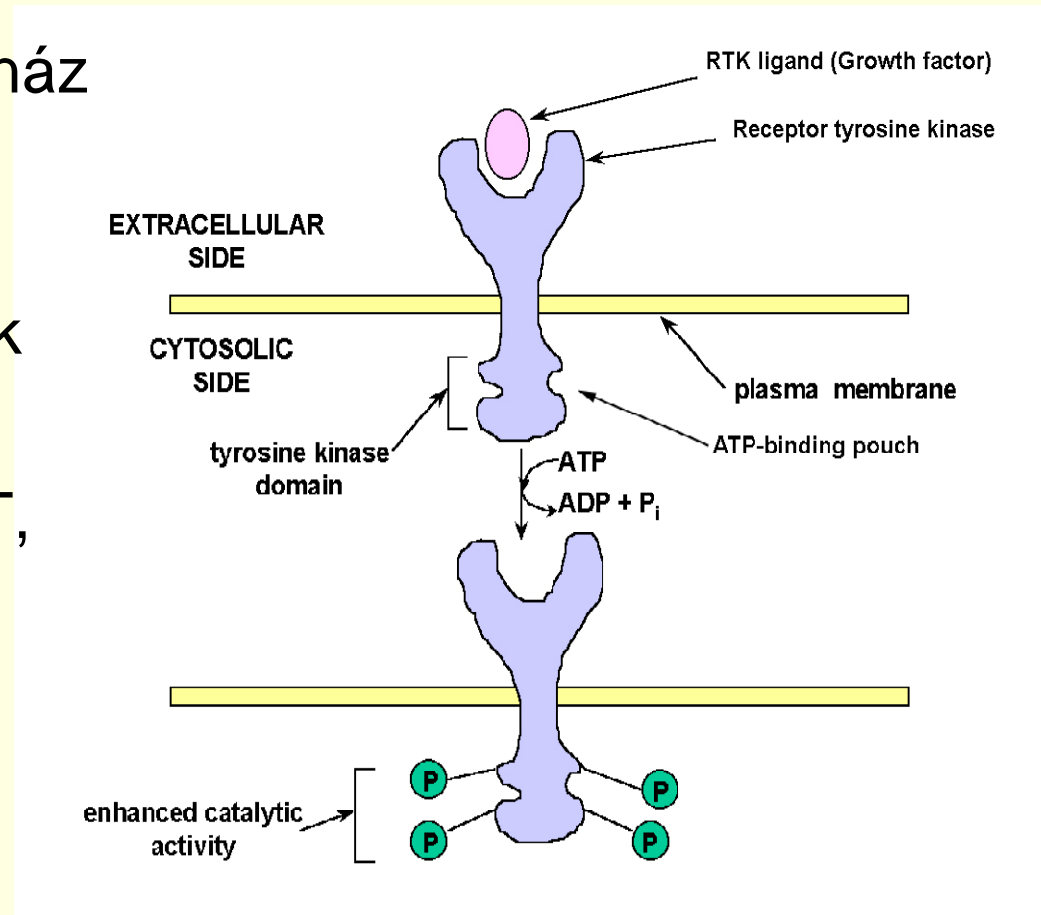
- Hagyományos terápiák:
 - Sebészeti terápia
 - Radioterápia
 - Chemoterápia
- Célzott terápiák:
 - Monoklonális antitest terápia
 - Kismolekulájú RTK gátlók
 - Immunoterápia (vakcinák)

Tumorellenes antitest-terápia

Alemtuzumab (Campath, 2001)	humanizált	CD52	Krónikus lymphoid leukémia
Bevacizumab (Avastin, 2004)	humanizált	VEGF	Colorectalis carcinoma
Cetuximab (Erbix, 2004)	kiméra	EGF-R	Colorectalis carcinoma
Rituximab (Rituxan, Mabthera, 1997)	kiméra	CD20	Non-Hodgkin lymphoma
Trastuzumab (Herceptin, 1998)	humanizált	ErbB2	Emlőcarcinoma

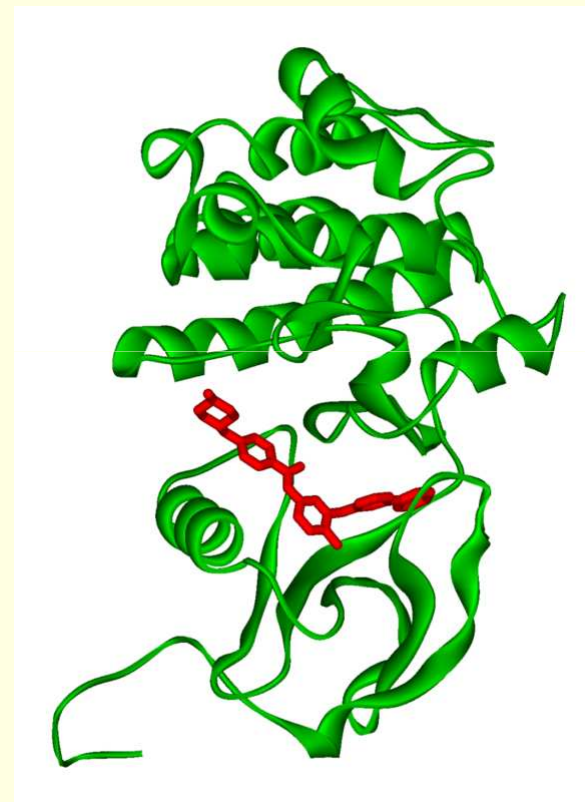
Kismolekulájú RTK gátlók

- Receptor Tirozin Kináz
- Transzmembrán molekulák
- Növekedési faktorok
- Dimerizáció
- EGFR, PDGFR, KIT, HER-2, VEGFR
- ATP kompetíció



Imatinib (Glivec, Gleevec)

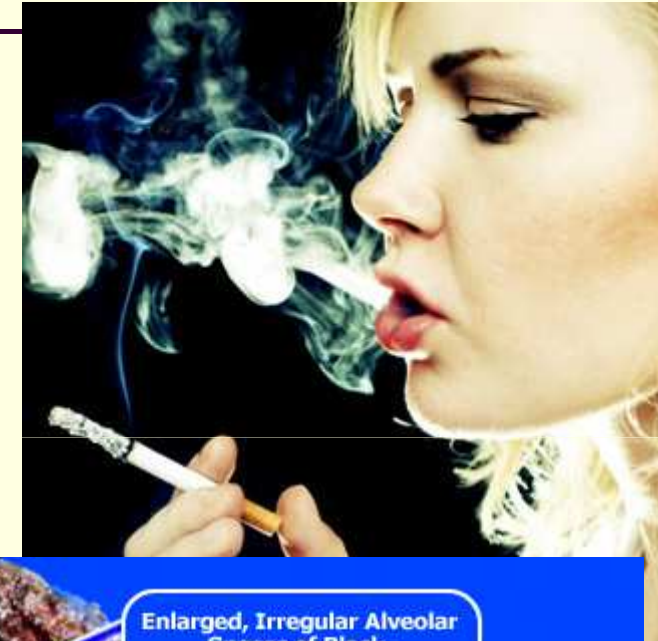
- Imatinib (2001)
- Philadelphia kromoszóma pozitív CML célzott kezelése (Bcr-Abl gátlás)
- Inoperábilis GIST célzott kezelése (KIT és PDGF gátlás)
- A malignus transzformációért felelős molekula direkt gátlása !



Imatinib kötődés a Bcr-Abl kináz-hoz

Erlotinib (Tarceva)

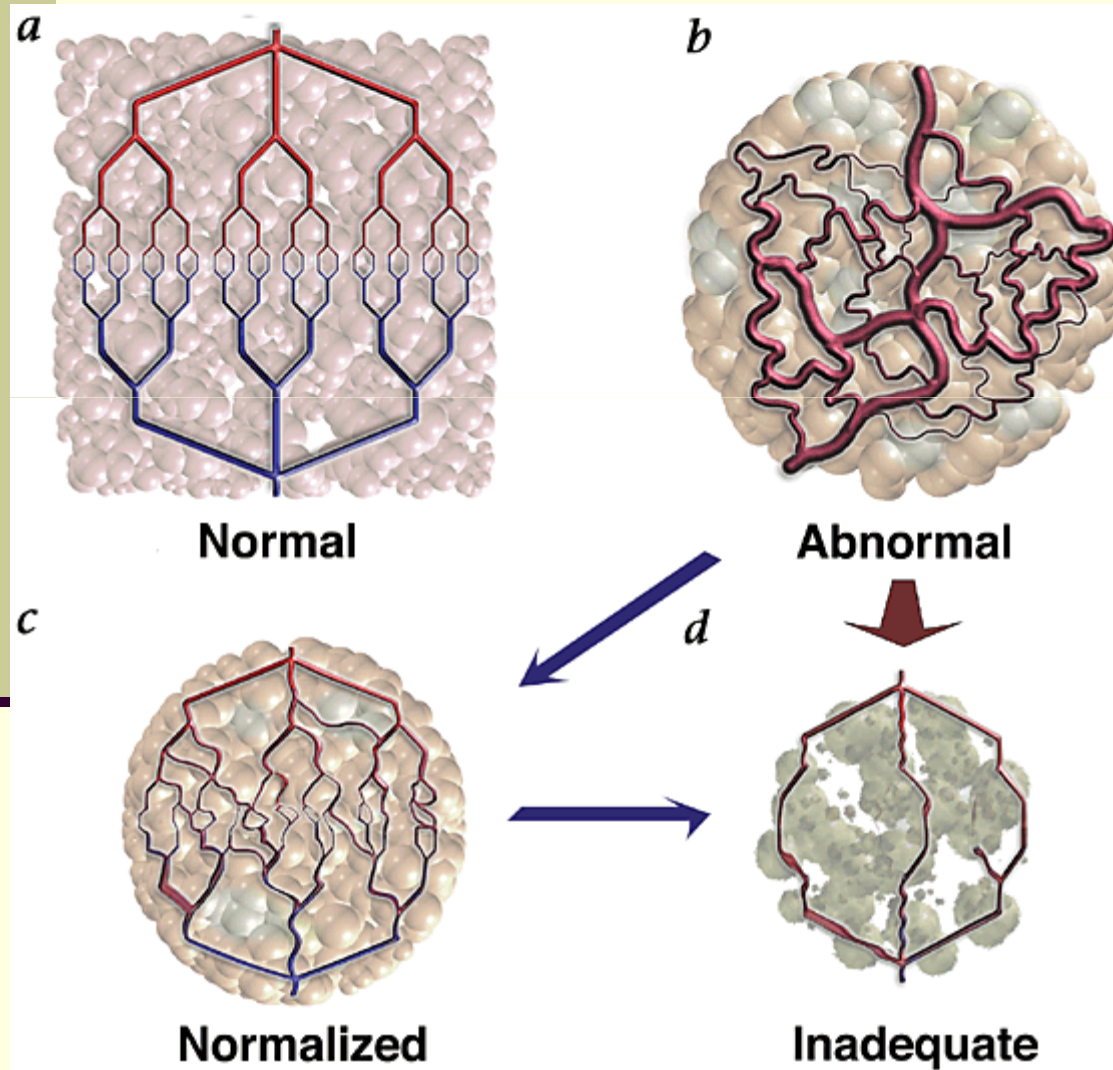
- Molekuláris célpont: EGFR
- NSCLC másodvonalbeli terápiája
- Metasztatikus hasnyálmirigy-carcinoma terápiája
- A carcinomák proliferációjában, túlélésében fontos szerepet játszik az EGFR jelátvitel



Angiogenezis gátlás

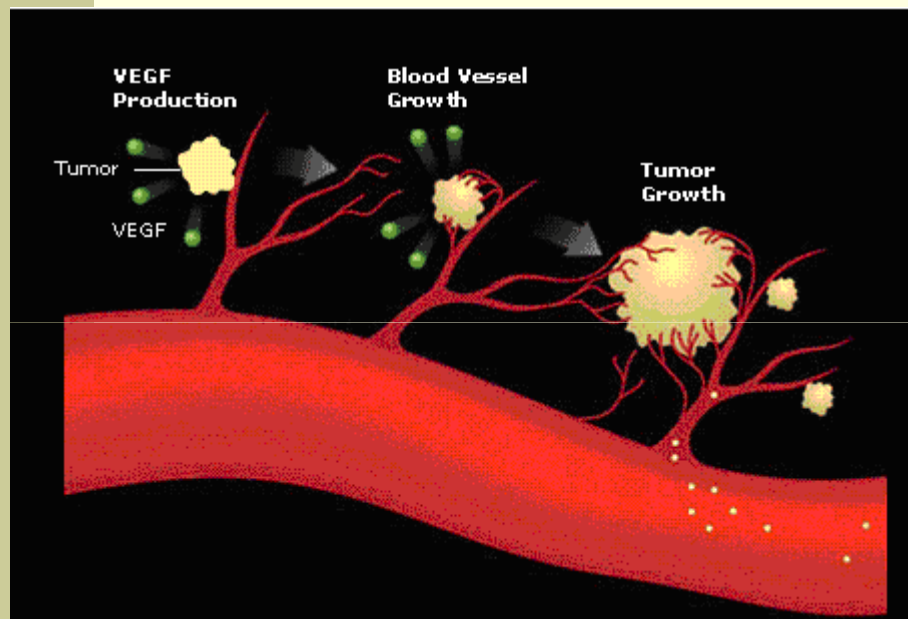
- Tumor erezete:
 - kaotikus hálózat
 - megnövekedett permeabilitás
 - lassú áramlás
 - endothel abnormális szerkezetű
- Következmények:
 - Hypoxiás környezet,
 - ischaemia, nekrozis
- Tumor erezetének a metasztázisképzésben is szerepük van

Angiogenezis gátlás



- Tumorok erezete abnormális
- Normalizálás: kombinációs kemoterápia jobban hat a proliferáló sejtekre
- Inadekvált tápanyagellátás: tumor növekedés gátolt, nekrozis

Bevacizumab (Avastin)



- humanizált anti-huVEGF mAb
- 2004 óta colorectalis carcinomák kezelésére engedélyezték
- VEGF antagonistá hatása van
- Gátolja a daganatot ellátó erek növekedését ezáltal a tumor növekedését
- CRC, Emlő, NSCLC, RCC kezelése
- Nem malignus javallat: időskori maculadegeneráció

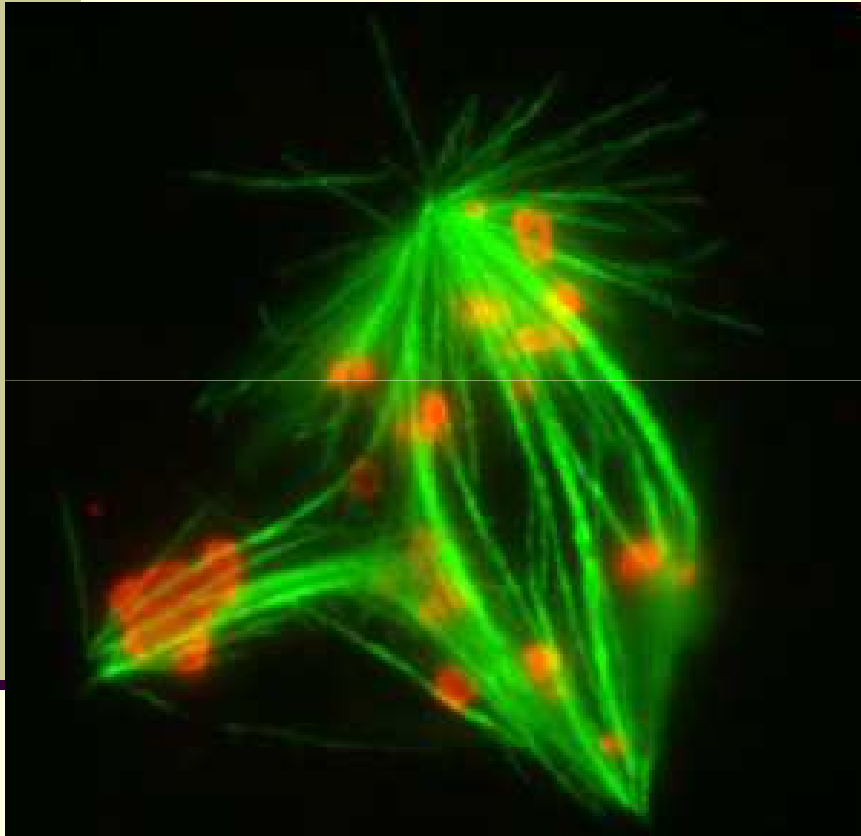
A bevacizumab az angiogenezis-gátló terápia „arany standardjává” vált.

Angiogenezis gátlás



- **Thalidomide, Lenalidomide**
- jelenleg mindkettő Myeloma multiplex kezelésére van törzskönyvezve
- Angiogenezist gátló hatásuk is van
- Hatásmechanizmus jelenleg ismeretlen
- Mellékhatásprofil: neuropáthia, véralvadási zavarok, hepatotoxicitás
- Erős teratogén hatás!

Angiogenezis gátlás



- **Taxánok és *Vinca* alkaloidák**
- MT gátló szerek: új alkalmazási koncepció
- A tumort ellátó erek nem malignusak, genetikailag stabilak és csak lassan proliferálnak
- A MT gátló szerek alacsony dózisban, naponta adagolva a tumort ellátó erek növekedését gátolják
- Indirekt módszer a tumoros növekedés gátlására

Angiogenezis gátlás – több célpontú RTK-gátlás

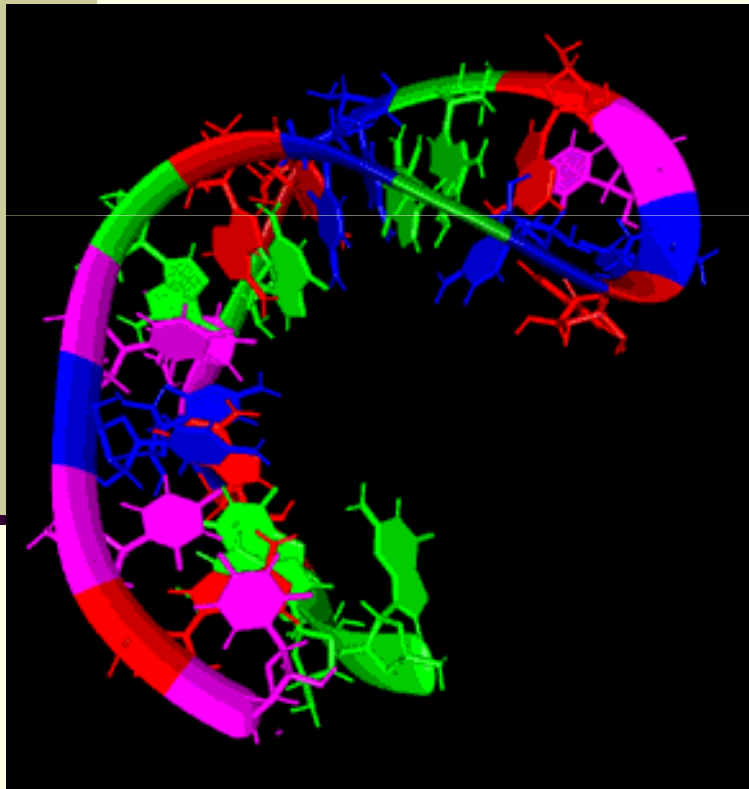
- **Sunitinib (Sutent), Soferanib (Nexavar)**
- Kis molekulájú RTK inhibitorok
- Nem monospecifikus hatóanyagok
- A fontos célmolekulák:
VEGFR, PDGFR, KIT, Ras/Raf/Erk
- VEGFR: endothelsejtek proliferációja
- PDGFR: periciták rekrutációja és differenciációja
- KIT, Ras/Raf/Erk : daganatsejt növekedés
- Terápia előnyök: EGYIDEJŰ CÉLZOTT angiogenezis gátlás
ÉS tumorsejt-növekedés gátlás
- Sunitinib: RCC és GIST
- Soferanib: HCC és RCC

Immunoterápia



- BCG instilláció
hólyagcarcinómában (Th1 shift)
- Immunmoduláció: citokinek
 - rhIL-2
 - rhIFN- α
 - rhEPO, rhG-CSF, rhGM-CSF
- Adoptív T-sejt transzfer
- Tumor vakcinák
 - tumorantigének
 - tumorsejtek (autogén vagy allogén)
 - dendritikus sejt vakcinák

RNAi terápiás lehetőségek tumorokban



- **Oblimersen** (Genasense®)-Fázis II/III stádiumban
- Bcl-2 antisense oligo
- A Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje, sok tumorban overexpresszált. (CLL, MM, NHL, stb.)
- A Bcl-2 csendesítése fogékonyá teheti a tumorsejteket az apoptózisra
- Más kemoterápiás szerekkel vagy mAb-al kombinációban adják
- Jelenleg Fázis III kísérletek:
 - CLL: fludarabin és cyclophosphamid kombináció
 - NHL: rituximab kombináció

