



Genová terapie

- **nejvýznamnější výstup molekulární biologie a genového inženýrství v medicíně**
- **nejnadějnější směr moderní medicíny**
- **vědecky a technicky nejnáročnější**
- **nejvíce kontroverzní**

Terapeutické zásahy při léčbě chorob

1. na úrovni fenotypu

- **standartní typy lékařských zásahů včetně chirurgických**

2. na úrovni abnormálních metabolitů

- **omezení přívodu substrátu, který není dále metabolizován v důsledku enzymatického bloku normální cestou, ale vzniká toxický produkt (fenylketonurie)**
- **náhrada chybějících produktů – spolupůsobících faktorů, hormonů, posílení alternativní metabolické cesty a tím snížení koncentrace škodlivého metabolitu, farmkologická inhibice enzymů**

Terapeutické zásahy při léčbě chorob

3. na úrovni mutantního proteinu

- posílení zbývající slabé aktivity
- úplná náhrada špatně fungujícího proteinu (př. faktor VIII, enzymy, celé strukturální proteiny – inzulin)
- orgánové trnsplantace (náhrada poškozeného orgánu, ale i náhrada dysfunkčního proteinu)

4. na úrovni abnormální mRNA

5. na úrovni samotného defektního genu

genová terapie



Genová terapie

**Její metodologie uplatnitelná všude tam,
kde je známa podstata patologických dějů na molekulární úrovni**

Využití při léčbě

- vrozených chorob - kauzální terapie
- získaných chorob - symptomatická terapie
 - ✓ zhoubné nádory
 - ✓ kardiovaskulární nemoci
 - ✓ neurologické nemoci
 - ✓ metabolické nemoci
 - ✓ infekční nemoci
- akutní choroby
 - ✓ plicní edém
 - ✓ septické stavy
 - ✓ transplantační medicína

Genová terapie

Její metodologie uplatnitelná všude tam,
kde je známa podstata patologických dějů na molekulární úrovni

Zahrnuje všechny postupy,
které využívají přenosu genetického materiálu k léčebným účelům

Dochází k

- náhradě
- opravě
- vyřazení z funkce



vadného genu

- dodání



nového, plně funkčního genu

Problémy GT



- **technické** – týkají se přenašečů genů, tzv. vektorů
- **metodické** – hledání optimálních strategií k dosažení žádaného účinku
- **etické**

GT - problém vektorů

Vektory nevirové

nahá DNA spojená s dalšími substancemi,
které usnadňují vstup do buňky

Vektory virové

virové částice, v nichž byla část genomu nahrazena genem našeho zájmu

Účinnější

- snadný vstup do buňky
- bezproblémová exprese vnesených genů
- vnesený gen se poměrně snadno integruje do buněčného genomu, což zajišťuje trvalou expresi cizích genů v potomstvu genově pozměněné buňky

Ideální vektor

**Dosud neexistuje vektor, který by splňoval všechny uvedené podmínky
Nedokonalost vektorů zodpovídá za dosavadní malé úspěchy GT**

- **Pronikání do velkého počtu cílových buněk, pro které nesmí být toxický**
- **Musí přenášet gen v transkripčně aktivním stavu**
- **Schopnost přenášet i velké geny, případně i několik genů současně**
- **Zajistit dostatečně velkou expresi k dosažení žádoucího účinku**
- **Musí být málo imunogenní**
- **Nesmí mít nežádoucí vedlejší účinky**
- **Nesmí ohrozit osoby ve styku s pacientem**

GT - problémy metodické

A dramatic landscape at night with a lightning storm over a body of water. The sky is dark with a bright, glowing area where the lightning is striking. The lightning bolts are bright white and yellow, branching out across the sky. The water in the foreground is dark, with the lightning reflecting on its surface. The background shows dark silhouettes of trees and hills.

Optimální strategie se liší podle

- **typu nemoci**
- **jejího klinického průběhu**
- **předchozí léčby atd.**

GT - problémy etické

Každý návrh klinické studie

- musí být velmi bedlivě posouzen z hlediska existujících zákonů
- musí odpovídat nejnovějším poznatkům lékařské vědy

GT

- pečlivě zvažována tam, kde existuje účinná alternativní léčba
- preparát určený k humánnímu použití musí být připraven podle tzv. Správné výrobní praxe
- pacient musí být důkladně a poctivě poučen jak o možném přínosu, tak i o rizicích GT
- způsob informování pacienta musí respektovat jeho vzdělání a inteligenci
- do studie nesmí být zahrnuti pacienti, kteří nesplňují předem daná kritéria
- příslušný protokol musí být přísně dodržován
- každá nečekaná reakce musí být hlášena a bedlivě analyzována
- každá studie musí být pod trvalým dohledem kontrolního orgánu dané instituce



Současná situace GT v ČR

V ČR chybí

- **zákon, který by umožnil použít v humanní medicíně preparáty založené na nejnovějších biotechnologiích**
- **pracoviště, které by je dokázalo připravit podle Správné výrobní praxe**
- **pracovní skupina ve Státním ústavu kontroly léčiv, která by mohla kvalifikovaně provést jejich kontrolu**

Současná situace GT v ČR

GT na experimentálních modelech se intenzivně studuje

- Oddělení nádorové imunologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR
- Oddělení experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfuze
- Oddělení buněčné biologie Ústavu hematologie a krevní transfuze
- Ústav lékařské biologie a genetiky LF UK v Hradci Králové
- Vyzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně
- Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, FN Brno

GT – využití při léčbě

•vrozené choroby

např.
Hemofilie A,B
DMD

předmětem zájmu jsou genetická onemocnění,
kde opravené buňky mají v těle pacientů selektivní výhodu
oproti buňkám s defektním genem

onemocnění s defekty enzymů purinového metabolismu

deficience enzymů adenozyndeaminázy (ADA)

- dědičnost AR
- enzymatický defekt vede k poškození buněčného dělení
zejména T-lymfocytů

závažná kombinovaná imunodeficience
postihující B i T imunitu

GT – intravenózní infuze vlastních T-lymfocytů,
do kterých byl pomocí retrovirových vektorů vnesen
normální gen ADA

GT – využití při léčbě

• získané choroby

GT u zhoubných nádorů

- stačí krátkodobá exprese vneseného genu
- teoretická rizika spojená se změnou biologie buňky mají u onkologických pacientů menší význam

zahrnuje rozdílné postupy:

- ✓ umlčení genů, jejichž produkty zodpovídají za nádorový fenotyp buňky
- ✓ selektivní ničení nádorových buněk
- ✓ pozměnění nádorových i nenádorových buněk tak, aby umožnily vznik protinádorové imunity aby se vyrovnaly s účinky protinádorové terapie jiného typu
- ✓ vývoj genetických protinádorových vakcín

GT – využití při léčbě

• získané choroby

GT u kardiovaskulárních chorob

Zaměřuje se na

Novotvorbu cév – terapeutická angiogeneze

uplatňuje se u těžkých ischemických postižení myokardu
s refrakterní anginou pectoris a
s nemožností provést úplnou revaskularizaci chirurgickou nebo katetrizační cestou
podávání plasmidu DNA kódujícího růstový faktor cévního endotelu

Srdeční selhání

zvýšení kontraktility cestou modulace homeostázy kalcia
ovlivnění beta-adrenergických receptorů
zvýšení rezistence kardiomyocytů k apoptóze

Prevenci reokluze po perkutánních koronárních intervencích

přenos genu pro NO-syntetázu, s jejímiž hladinami a jejím substrátem L-argininem
může souviset rozvoj restenózy

GT – využití při léčbě

- získané choroby

GT v léčbě diabetes mellitus

zaměřuje

se na přípravu obnovitelných zdrojů

inzulín produkující tkáně, která by mohla být použita jako substituce
zničených nebo selhávajících beta-buněk pankreatu

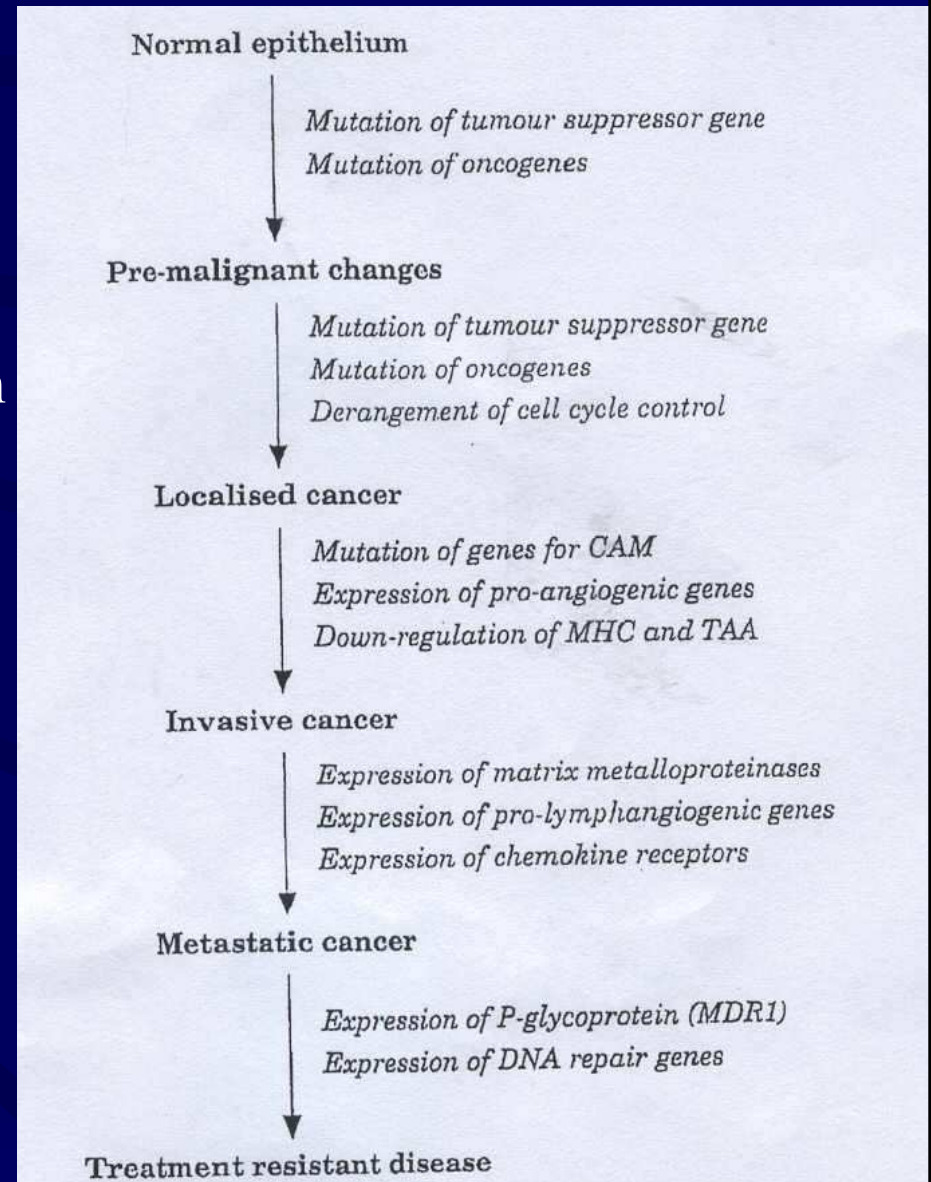
Experimentální přístupy:

- Stimulace embryonálních i dospělých kmenových buněk k proliferaci a diferenciaci směrem k fenotypu beta-buněk
- Indukce proliferace stávajících beta-buněk
- Transdiferenciaci neinzulárních buněk v glukozo-senzitivní inzulín produkující buňky
- Příprava vhodné zvířecí tkáně pro xenotransplantaci

Molekulární biologie nádorů

patogeneze nádoru: „multi-step“ proces postupná akumulace genetických defektů

- **mutace tumor supresorových genů a onkogenů**
 - výhoda růstu a přežití
 - **nezávislost buňky** na růstových faktorech a anti-growth signálech
 - **zvětšující se nádor** utlačuje okolní tkáň: akumulace dalších mutací → vznik vlastního krevního zásobení
 - **ztráta kontaktu** se sousedními buňkami
- změny související s **down-regulací** exprese buněčných markerů (MHC+TAA)
- proces metastáz : degradace extracelulární matrix, buněčnou migraci, tvorbu nových lymfatických cest a expresi receptorů pro chemikiny → „homing ve specifických tkáních“



Genová terapie nádorů

- Vývoj choroby odolávající léčbě
 - výsledek overexprese určitých genů, které redukují akumulaci cytotoxické chemoterapie
 - nebo výsledek zvýšené schopnosti buňky k opravě DNA poškození
- Výzkum : identifikovat další geny , které jsou zahrnuty do vývoje, progresu, šíření a rezistence k léčbě nádoru
- Každá z těchto abnormalit, odlišujících nádorovou buňku od normální reprezentuje možný cíl genové terapie

Strategie „cancer gene therapy“ (CGT)

- korektivní genová terapie:
 - obnoví normální funkci deletovaného nebo mutovaného genu (obvykle tumor suppressor gene)
 - ruší efekt mutovaného onkogenu
- cytoreduktivní genová terapie
 - vloží exogenní gen , který navodí buněčnou smrt buď:
 - toxickou látkou (produkt metabolismu) suicide gene therapy
 - indukci apoptózy
 - anti-angiogenní aktivitou
 - posílením účinků lokální radioterapie
- imunomodulátorová genová terapie
 - vložený gen zvýší schopnost imunitního systému k efektivní cytotoxické odpovědi

Korektivní genová terapie

- obnova normální funkce tumor suppressor genů
- geny, kontrolující buněčný cyklus
- suprese funkce onkogenů
 - antisense oligonukleotidy
 - katalytické ribozymy

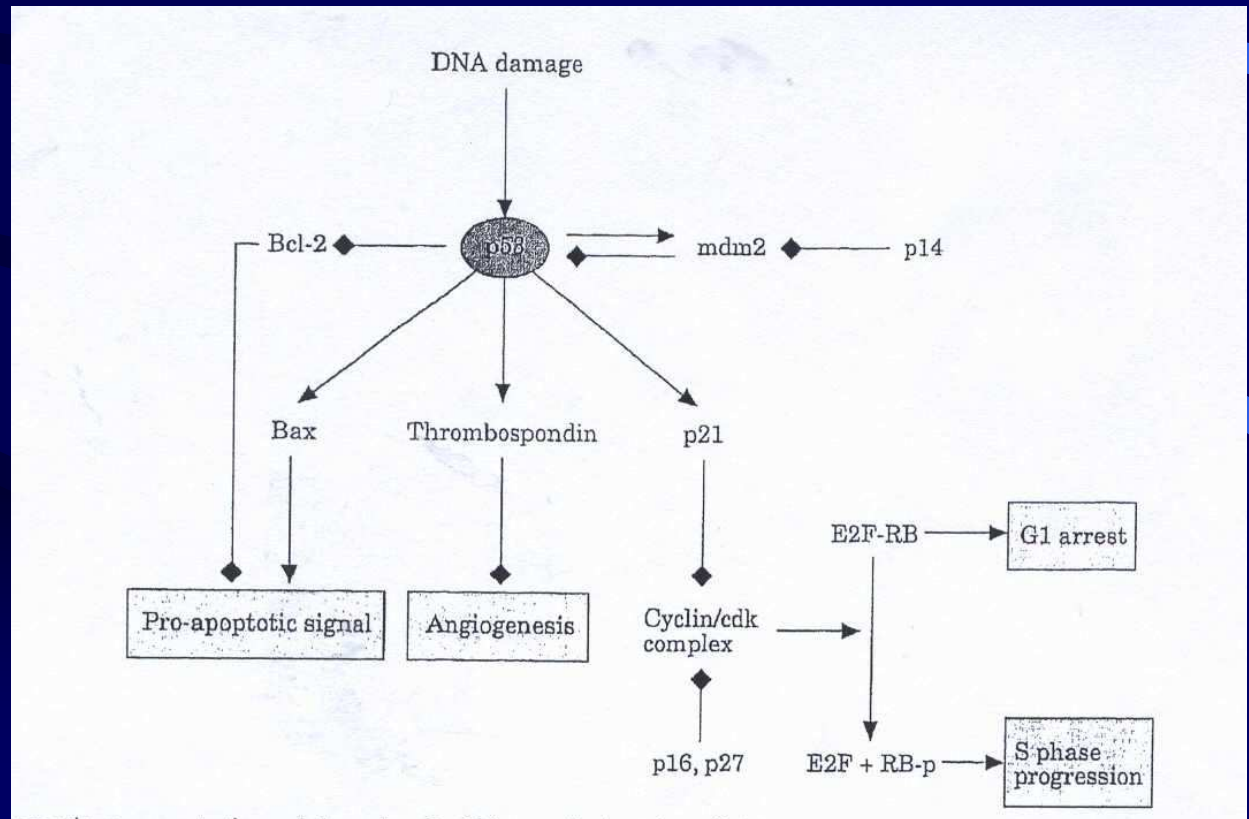
Obnova funkce tumor suppressorových genů

- **p53**
 - jaderný fosfoprotein
 - centrální role v mnoha procesech, které chrání buňku proti genotoxickému stresu
 - DNA poškození → p53protein zprostředkuje G1/S buněčný „arrest“ (DNA reparace)
 - poškození přesahuje kapacitu DNA opravy → apoptóza
- **exprese v mnoha nádorových tkáních**

- plíce, tkáň prsu,
kolorektal, prostata,
pankreas, vaječník

- **mutantní p53:**
 - špatná prognóza
- dodání p53 genu do nádorových buněk prokázalo zvýšenou citlivost nádorových buněk k účinku

radioterapie a chemoterapie

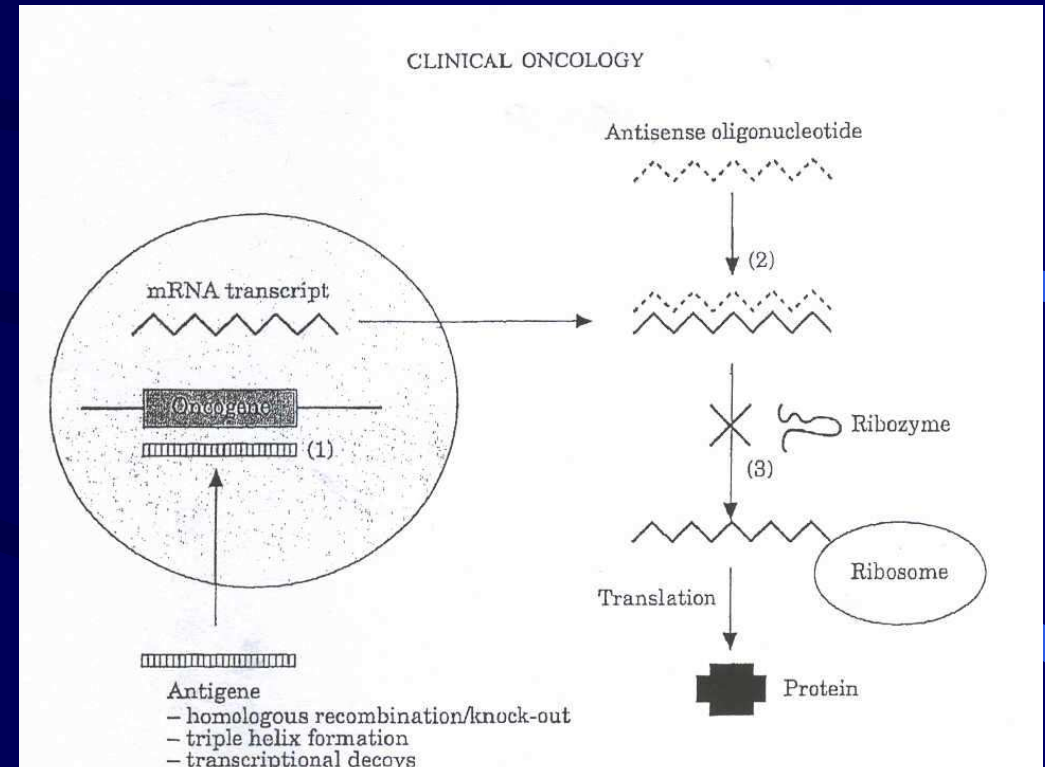


Geny, kontrolující buněčný cyklus

- **buněčný cyklus** normálních buněk je velmi přísně kontrolován
 - G1,S,G2,M
 - přechod G1 do S fáze : „**checkpoint**“
 - nádorové buňky: kontrola **G1/S „checkpointu** narušena
 - proces je regulován 3 tumor suppressor genovými rodinami: Rb, Cip/Kip (p21,p27) a Ink4 (p16 a p14)
 - mutace v cdki a aberantní exprese Rb vede k nekontrolovatelnému růstu nádorových buněk

Suprese funkce onkogenů

- nejčastěji mutované onkogeny v nádorových buňkách: ras, myc, erbB2 a bcl-2
- strategie CGT: negovat aktivitu mutovaných genů zaměřením na: transkripční/translační mechanismus
 - interferovat s transkripcí (antisense oligonukleotidy)
 - zabránit mRNA v translaci (AO, katalytické ribozymy)



Cytoreduktivní genová terapie

- cílem je vpravit geny, které navodí buněčnou smrt
 - přímo : zvýší citlivost k účinkům léků nebo radiace
 - nepřímo: deprivace zásobení krví v nád. buňce
- **gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)**
- **genetická indukce apoptózy**
- **anti-angiogenní genová terapie**
- **genetická radioizotopová terapie**

Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)

- vpravení genu , kódujícího enzym, který je schopen selektivně v nádorových buňkách konvertovat relativně neškodnou látku na toxicky aktivní
- **zabrání** systémové toxicitě a **zajistí** tvorbu cytotoxického agens ve vysokých koncentracích pouze v nádorových buňkách

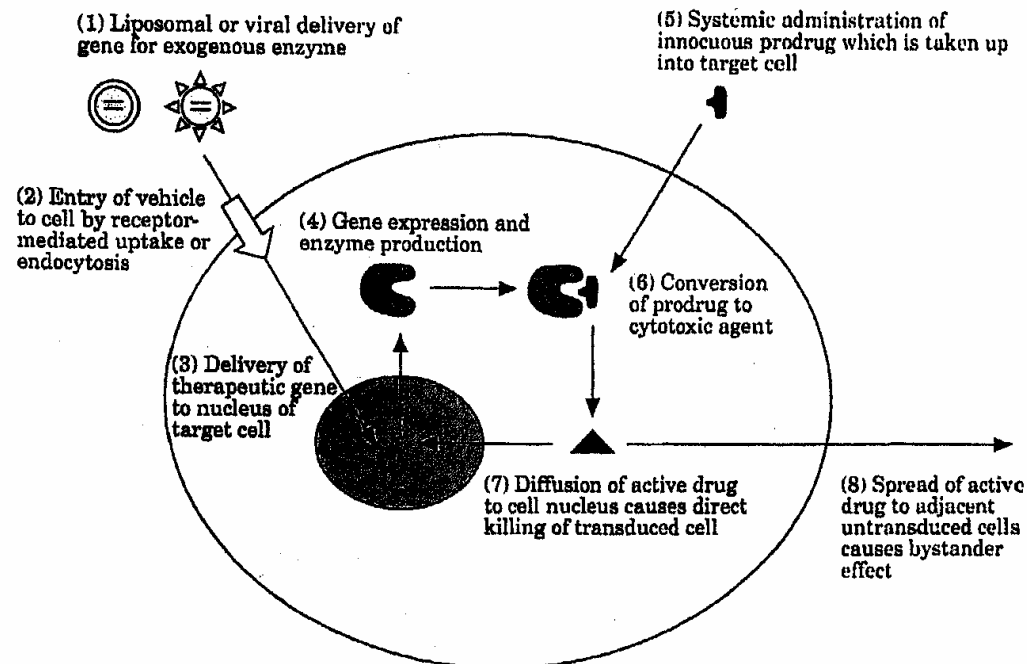


Fig. 4 – Diagrammatic representation of the key components of gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT).

Imunomodulační genová terapie

- intratumoural delivery MHC, cytokine gene
 - liposomy
 - rekombinantní vakcíny
 - retrovirové a adenovirové vektory
- nádorové vakcíny s geneticky modifikovanými buňkami : nádorové + normální buňky
 - od jednoho pacienta (autologní přenos)
 - od jiného pacienta (allogenní přenos)
 - jiného druhu (xenogenní přenos)

Imunomodulační genová terapie

- mnoho nádorů projevuje na svém povrchu **tumor - associated antigens (TAA)**
 - rozpoznávány imunitním systémem
 - mnoho nádorů dokáže obejít imunitní odpověď, buď:
 - redukcí vlastní imunogenicity
 - inhibicí účinné odpovědi imunitního systému
- **Výhody:**
 - specifická imunitní odpověď
 - malý imunogenní signál stimuluje kapacitu imunitní odpovědi ke spuštění velké odpovědi
 - anti-tumor imunita přetrvává v generacích paměťových buněk → prevence opětovného nástupu choroby

Princip imunomodulační GT

- **aktivovat specifické CD8+CTL, které rozpoznávají TAA na povrchu nádorových buněk a zabíjí je.**

