



GENOVÁ TERAPIE DĚDIČNÝCH
ONEMOCNĚNÍ SÍTNICE A ZRAKOVÉHO
NERVU: SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

ŠÁRKA SKORKOVSKÁ

LF MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

GENOVÁ TERAPIE

- Přenos plně funkční kopie genu s cílem nahradit sníženou či nulovou funkci proteinu kódovaného mutovaným genem a/nebo na regeneraci či stabilizaci narušené struktury sítnice
- Oko ideální cílový orgán pro genové terapie – snadná dostupnost, malý rozměr, imunologické privilegium a možnost kontralaterální kontroly
- Léčebný postup přenosu genetického materiálu do genomu jako náhradu nebo ovlivnění exprese proteinu účastnícího se patogeneze onemocnění
- Stále jen léčba experimentální

Genová terapie

- Nutná znalost příčiny geneticky podmíněné choroby na molekulární úrovni = určit gen odpovědný za nemoc
- Určení konkrétní mutace způsobující patologický proces
- Poznatky o genetických příčinách v databázi OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) „<http://www.omim.org>“ nyní obsahuje více než 5000 záznamů
- Hodnocení účinků aplikace genové terapie podle vymizení nebo zmírnění nemoci
- Nesmí mít negativní vliv na životně důležité funkce organismu

Genová terapie

- *In vivo* cílové buňky po celou dobu léčby součástí organismu
- *In vitro* cílové bb. z organismu odebrány a po provedení léčby vráceny zpět
- První krok – zjištění příčiny nemoci na molekulárně genetické úrovni
- Genetická informace přenesena do cílových bb. pomocí nosičů – vektorů
- Transdukovaná buňka = buňka s vneseným genem podmiňujícím funkční expresi (vyjádření genetické informace)
- Ideální vektor=průnik do velkého počtu cílových bb.

Genová terapie

- Vektory –virové, nevirové
 - virové (adenovirové, retrovirové)- odstraněna patogenita viru, nahrazena expresní kazetou obsahující přepsanou informaci, která má nahradit patologickou informaci
- Nevýhody virových vektorů
 - náhodné vložení genetické informace → narušení sekvence jiného genu → spuštění maligní transformace buňky
- Nestabilní exprese genu – opakovaná aplikace již není účinná v léčbě
- Problematické stanovení léčebné dávky a počtu aplikací

Genová terapie

- Způsoby aplikace vektorů
- Onemocnění sítnice – intravitreální nebo subretinální injekce
- Intravitreální-méně invazivní, méně účinná, neproniká do hloubky sítnice, účinkuje jen ve vnitřní vrstvě sítnice
- Subretinální-průnik do fotoreceptorů a RPE, účinnost 5-10x vyšší než u intravitreální inj., riziko odchlípení sítnice

Způsoby aplikace vektorů

Způsob podání	Cílové buňky	výhody	nevýhody
intravenózní	Vnitřní vrstvy sítnice	Žádné oční nežádoucí účinky	Fagocytóza částic, transfekce jiných tkání
periokulární	Fotoreceptory, RPE	Neinvazivní pro sítnici	Nízká transfekce sítnice a RPE
intravitreální	Vnitřní vrstvy sítnice	Zřídka oční nežádoucí účinky	Riziko endoftalmitidy a odchlípení sítnice
subretinální	Fotoreceptory, RPE	Nejvyšší účinek transfekce	Invazivní, amoce sítnice vede k buněčné smrti
suprachoroidální	Fotoreceptory, RPE	Nedochází k elevaci neuroretiny	Vyšší rychlost eliminace

Genová terapie-stádium klinických zkoušek

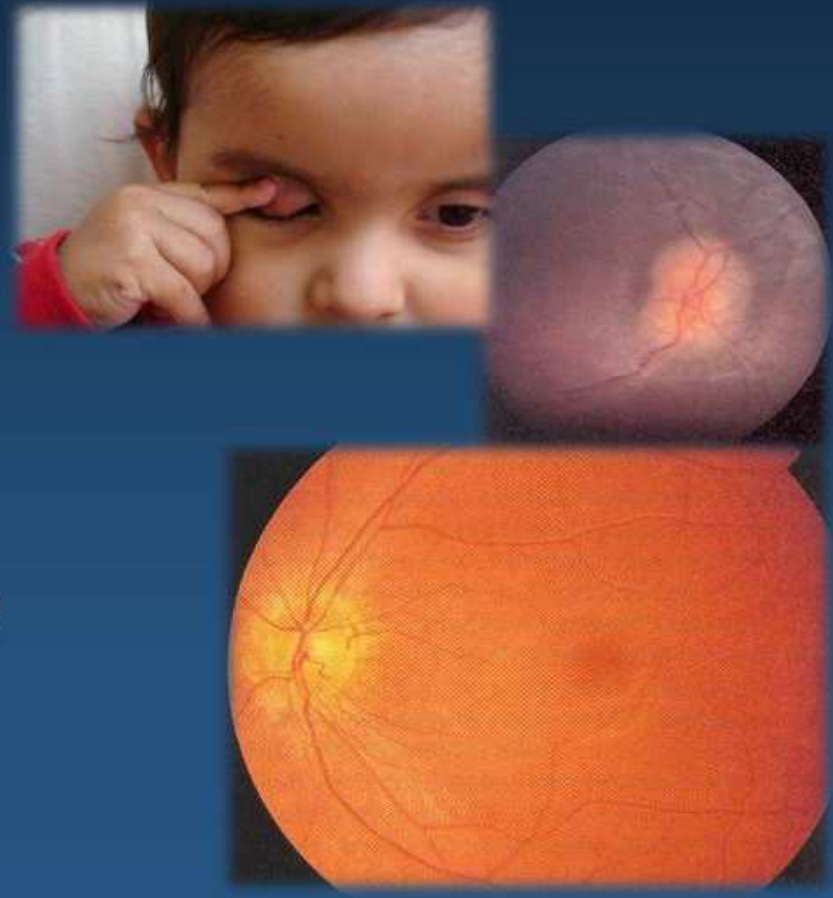
- Fáze I – stanovení maximální tolerované dávky a bezpečnosti na nerandomizované skupině dobrovolníků
- Fáze II – zjištění účinné dávky léku (nerandomizovaná studie)
- Fáze III – porovnání účinnosti nového léku se standardní terapií (jedna skupina léčena běžně, druhá skupina novým lékem, dvojitě zaslepená studie), podle výsledku pak registrace léku
- Fáze IV – sledování nežádoucích účinků léku po registraci v dlouhodobém užívání

Leberova kongenitální amauroza 2 (LCA)

- Geneticky heterogenní skupina nemocí daná mutací nejméně 22 genů, výskyt v populaci méně než 1 na 1000000 narozených dětí
- LCA – autosomálně recesivní, mutace v genu RPE65, gen exprimován v RPE, podílí se na recyklaci opsinu a rodopsinu (konvertuje *all-trans*-retinoidy na 11-*cis* retinal)
- Absence nebo nedostatečná funkce RPE65 → hromadění *trans*-retinyl esterů → degenerace fotoreceptorů
- LCA2 navržena pro genovou terapii (časná manifestace a dlouho zachovaná struktura sítnice)

Leber Congenital Amaurosis

- Theodore Leber, 1869
- 5% of all retinal dystrophies
- 10-18% of childhood blindness
- Sensory nystagmus
- Very poor vision – 20/200 or worse
- Oculodigital sign of Franceschetti (shown here)
- Associated ocular findings: keratoconus, cataracts, high hyperopia



Leberova kongenitální amauroza 2 (LCA)

- 2007 první klinické zkoušky, do 5/2015 zařazeno 39 pac. S LCA2
- Akutálně fáze III se subretinální aplikací upraveného adeno-asociovaného viru (AAV2)
- Zlepšení ZO v rozdílné míře, zlepšení citlivosti sítnice po 1-2 měsících, po 12 měsících opět pokles, zlepšení ZP
- Degenerativní procesy fotoreceptorů se po genové terapii nezastavily a progredovaly
- V.s. účinek léčby závislý na množství podaného vektoru → nízké dávky

Retinitis pigmentosa 38 (RP)

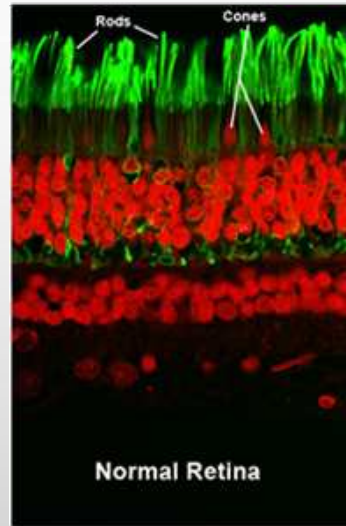
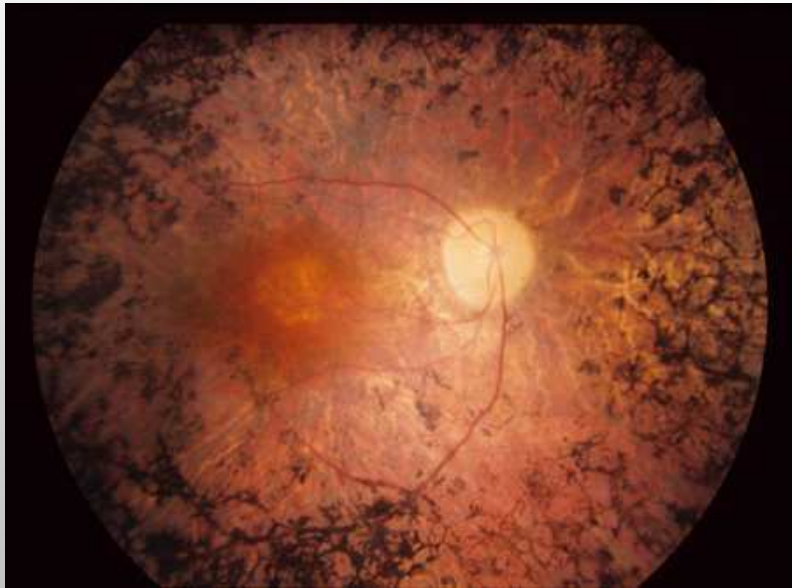
- Nesyndromová RP - heterogenní skupina progresivních nemocí sítnice, mutace v nejméně 50 genech
- RP38 – vzácná autosomál. recesivní forma RP, mutace v genu MERTK (Mer proto-oncogene, tyrosine kinase) - enzym potřebný k fagocytóze odloučených zevních segmentů fotoreceptorů RPE
- Ztráta enzymu MERTK → porucha fagocytózy → akumulace metabolitů rhodopsinu → apoptóza a degenerace sítnice
- Příznaky – šeroslepost v 1. dekadě věku, postižení čípků, atrofie makuly



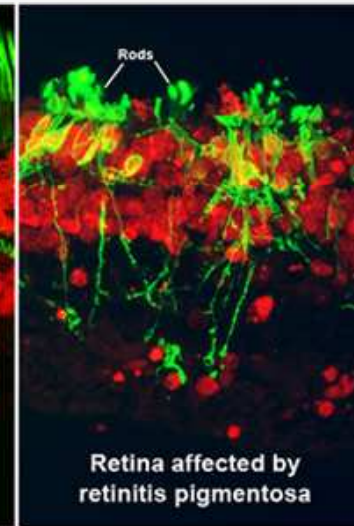
Normal Vision



Vision with Retinitis Pigmentosa



Normal Retina



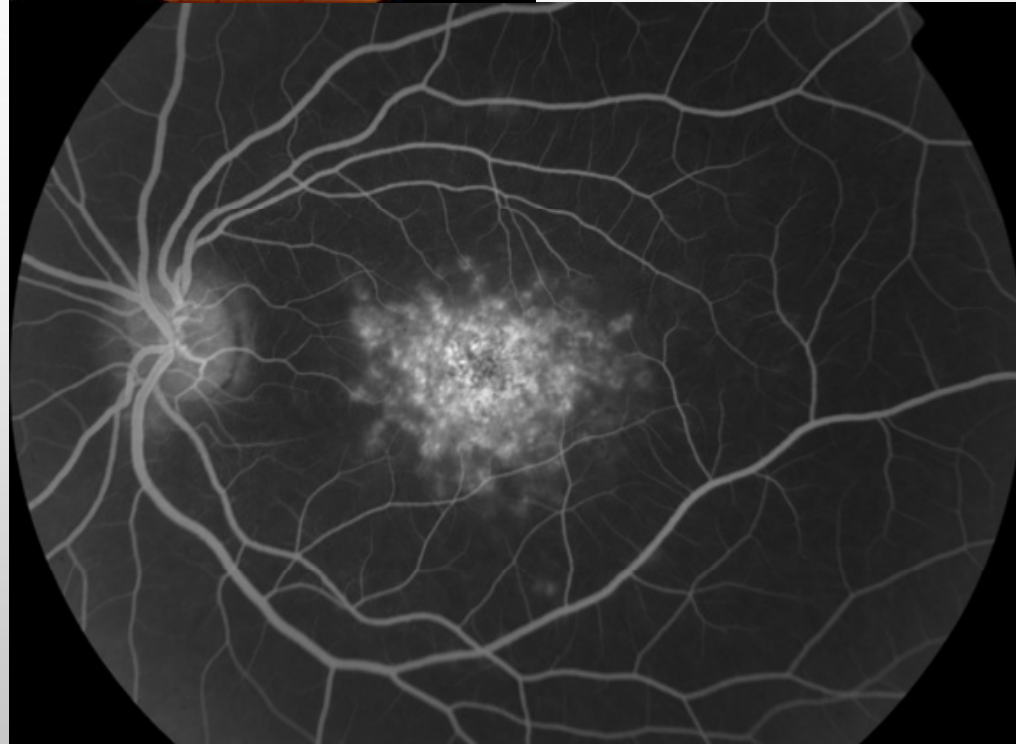
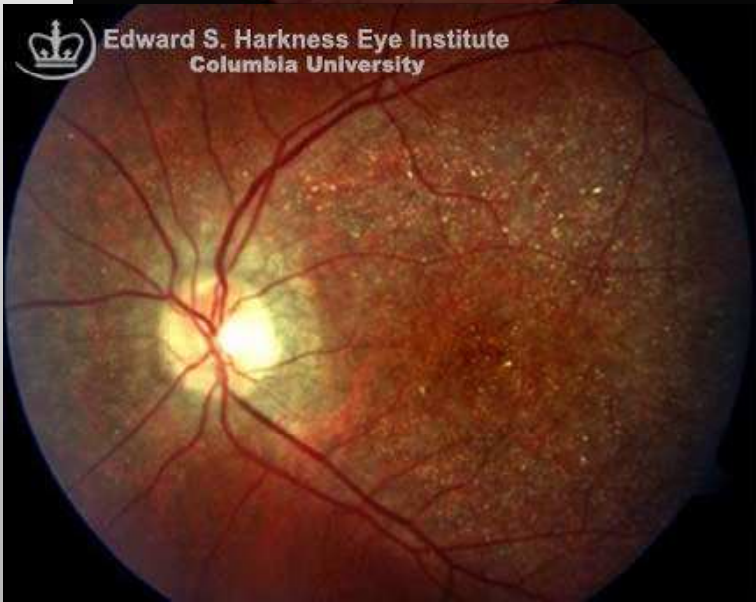
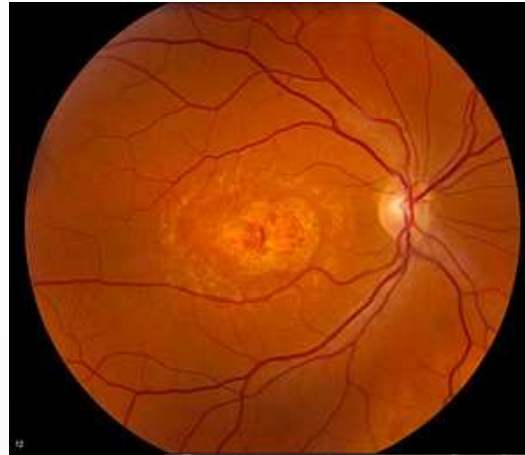
Retina affected by retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa 38 (RP)

- Preklinická studie – krysí model – pomocí lentivirových vektorů vneseny funkční kopie genu MERTK → částečné obnovění funkcí sítnice
- Klinická studie fáze I (2011) – 3 pac. subretinálně aplikován AAV2 vektor obnovující funkci MERTK bez nežádoucích účinků

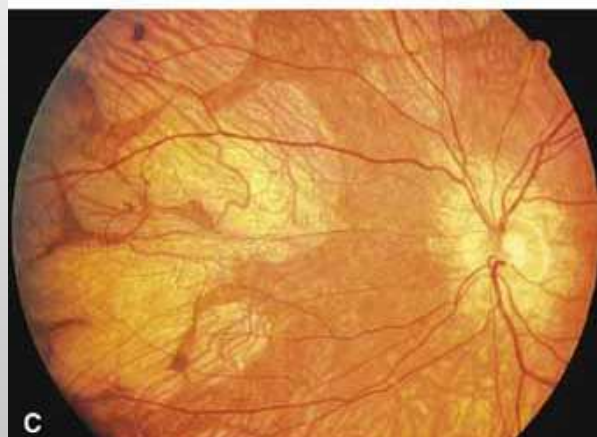
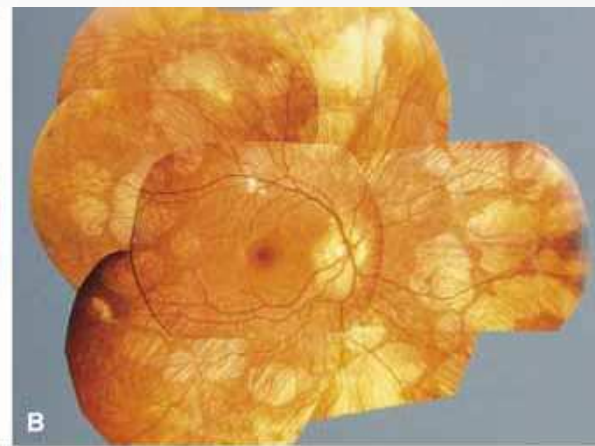
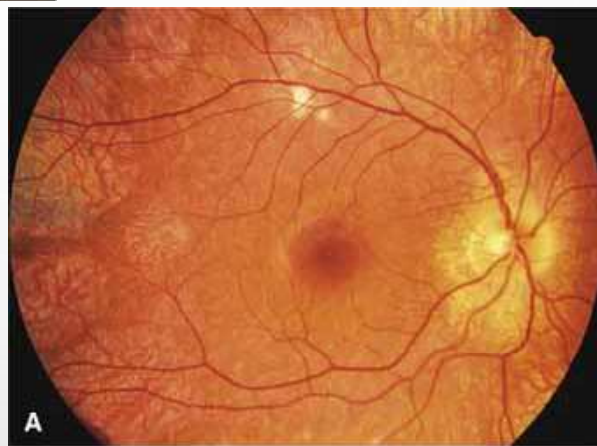
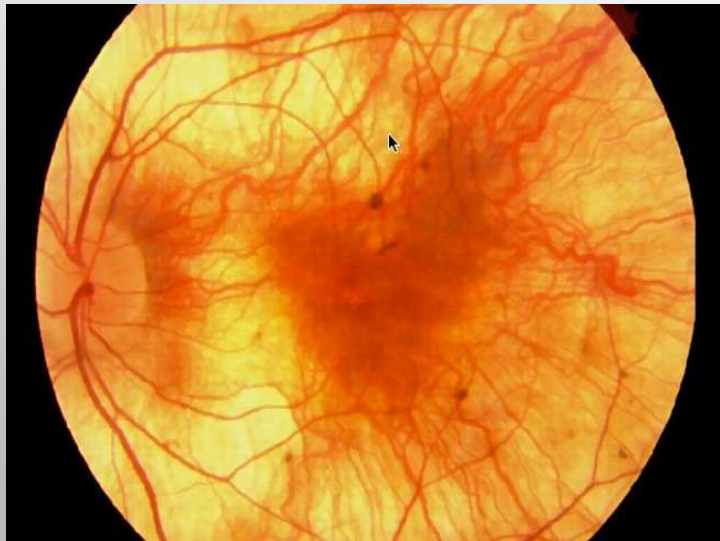
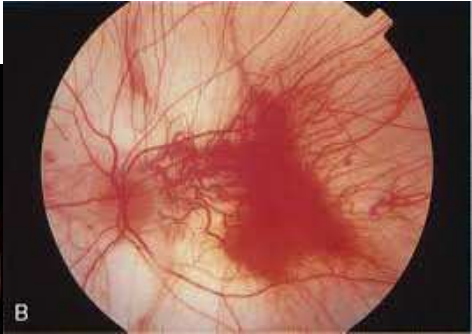
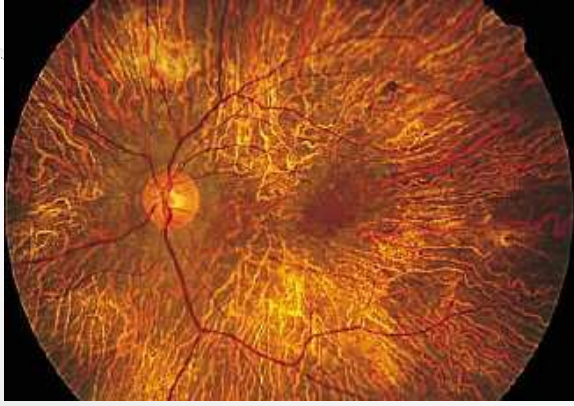
Stargardtova makulární degenerace

- Výskyt 1 na 10000, ztenčování sítnice v makule, vznik jizvy s depozity lipofuscinu
- Mutace ve 3 genech, nejčastější autosom. recesivní typ (STGD1) mutace v genu *ABCA4* (kódování proteinu transportu části fotoreceptorů do RPE)
- Vliv mutace na zpracování vit. A → akumulace toxického bisretinoidu A2E → apoptóza bb RPE a fotoreceptorů
- 2011 klin.studie fáze I/II s lékem StarGen, výsledky dosud nepublikovány
- 2012 myší model – přenos funkční kopie *ABCA4* → perzistentní exprese genu, zlepšení adaptace na tmu a ↓ ukládání lipofuscinu, zatím neregistrováno pro klin.studii



Chorioideremie

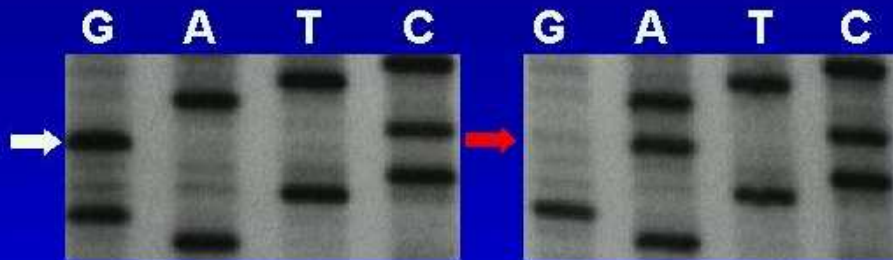
- Dědičnost vázána na X chromozom, mutace genu *CHM* – regulace transportu vezikul při endo- a exocytóze → porucha transportu opsinu do zev. segmentů fotoreceptorů, porucha migrace melanosomů v RPE a ↓ fagocytózy zev. segmentů fotoreceptorů bb. RPE → degenerace choriokapilaris, RPE a fotoreceptorů
- 2011 klin. studie – 6 pac. aplikována funkční kopie *CHM* pomocí AAV vektoru → zvýšení citlivosti sítnice (mikroperimetrie), zlepšení ZO



Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)

- Nejčastější mitochondriální onemocnění s oboustrannou akutní nebo subakutní ztrátou zraku degenerací gangliových buněk a atrofií ZN
- V 90% případů jedna ze tří mutací genu *MT-ND1*, *MT-ND4* a *MT-ND6*, chybné uspořádání respiračního řetězce v mitochondriích → ovlivnění tvorby ATP a vznik nežádoucích reaktivních O₂ radikálů
- Klin. studie fáze III s intravitreální aplikací AAV vektoru s genem *MT-ND4* u 9 pac. zlepšení ZO a citlivosti sítnice v ZP, RNFL se nezvýšila

LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY



NORMAL

MUTANT

MITOCHONDRIAL GENOME nt11778 G > A

© CELTEK CORPORATION

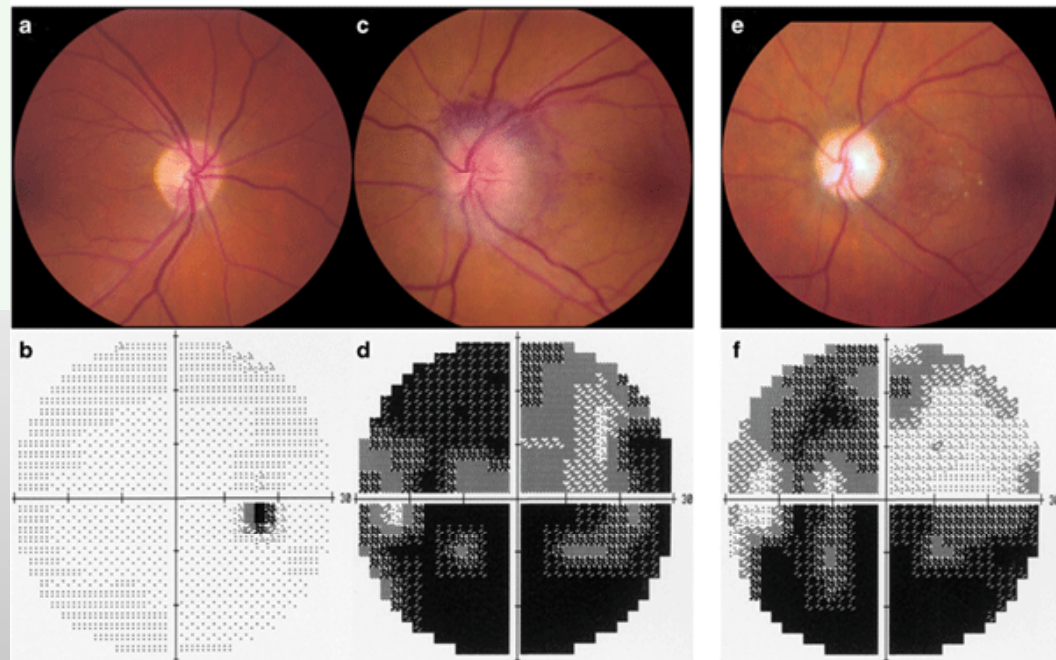
Medscape®

www.medscape.com

Right Eye (at onset)

Left Eye (at onset)

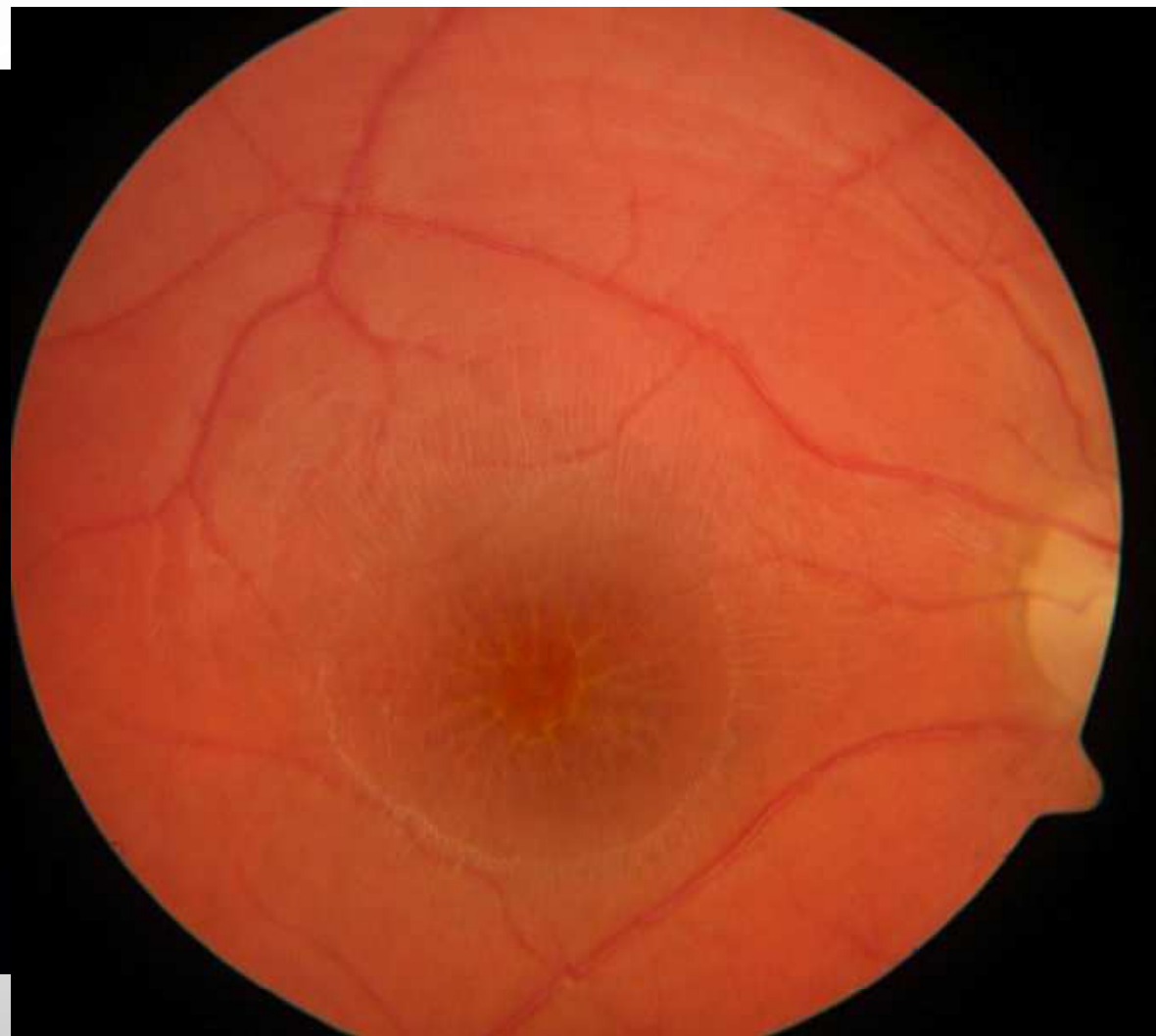
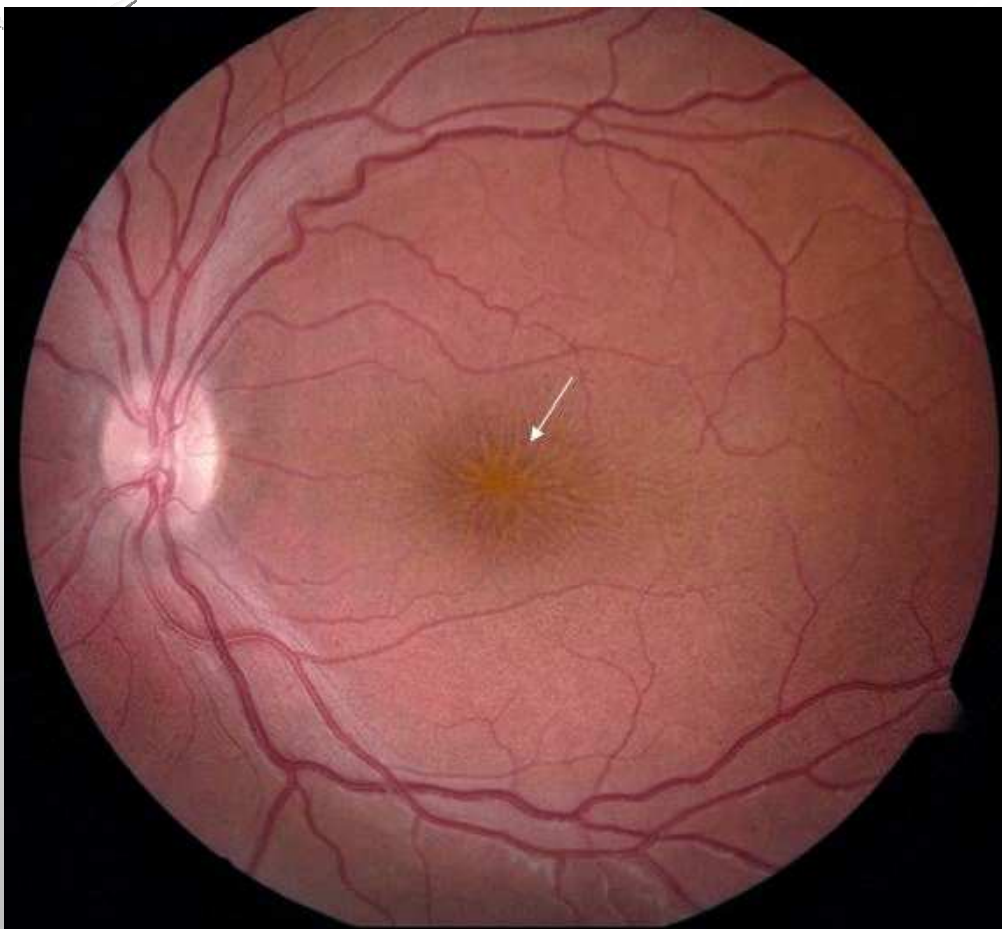
Left Eye (at 3 months)



Source: Int J Impot Res © 2008 Nature Publishing Group

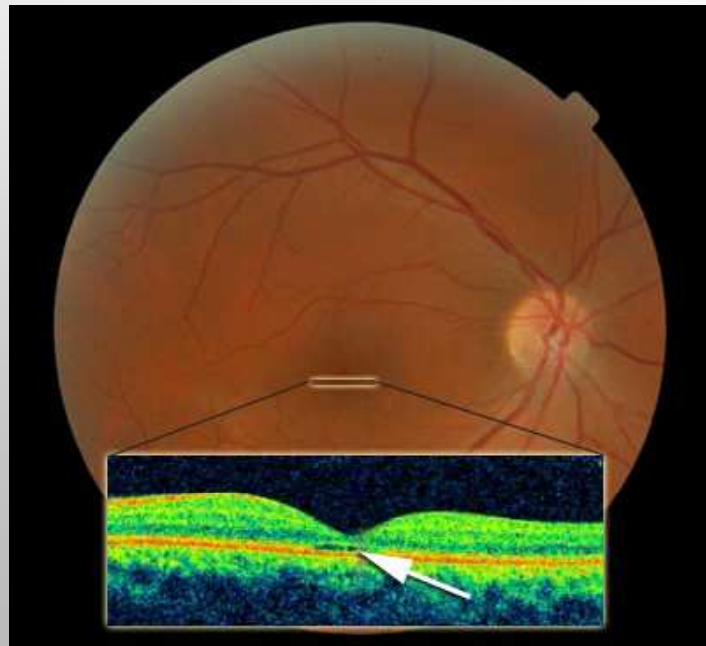
X-vázaná retinoschíza (XLRS)

- Monogenně podmíněná, manifestace v 1. dekádě, prevalence 1 na 5-25000
- Mutace genu *RS1* (retinoschisin 1) rozštěp vnitřních vrstev sítnice v makule, produkt genu exprimován ve fotoreceptorech a bipolárních bb. s podílem na adhezi těchto bb.
- 2015 2 studie fáze I a II s intravitreální aplikací AAV sérotypu 2 a 8



Achromatopsie

- Porucha funkce čípků, prevalence 1 na 30000
- Popsána mutace 5 genů, 50% případů mutace v genu *CNGB3* (cyclic nucleotide gated channel beta 3)
- Narušení tvorby CNG kanálů→vstup kationů do buněk→apoptóza bb., tyčinky neporušeny
- 2015 klin. studie fáze I a II se subretinální aplikací AAV vektorů



Závěr

- Genové terapie = nadějný přístup v léčbě zvláště u chorob sítnice, kde chybí léky či léčebné metody
- V ČR neprobíhá žádná klinická studie genové terapie
- Důvody: chybí legislativa pro klinické studie genové terapie, nedostatek odborníků a nízká informovanost odborné i laické veřejnosti

Využití kmenových buněk v léčbě očních onemocnění

- Kmenové buňky dospělého organismu –mezenchymální kmenové bb. (MSC)
- Transplantace bez genetické modifikace, schopnost migrace a diferenciace, nejčastěji s kostní dřeně nebo tukové tkáně
- MSC v léčbě onemocnění sítnice – po subretinální aplikaci MSC→diferenciace na bb. se znaky RPE a fotoreceptorů → retinitis pigmentosa, Stargardtova makulární degenerace
- ischemická onemocnění sítnice – DR – i.v. aplikace MSC→diferenciace na astrocyty a bb. exprimující rodopsin, obnova funkčnosti hemoretinální bariéry
- VPMD – subretinální aplikace MSC→náhrada RPE a obnova integrity vrstev sítnice

Otázky studentů

- Krátkozrakost –těhotenství, sport, změny ve stáří, korekce, léčba
- Není indikací pro s.c., lze rodit spontánně
- Nevhodné sporty – kontaktní sporty, skoky do vody, bungee jumping, sporty spojené s rizikem kontuze bulbu
- Korekce – brýle, kontaktní čočky, refrakční zákroky
- Patologie oka – vitium maculae lutae myopicum, riziko trhlin sítnice a odchlípení sítnice, sklerální stafylom, glaukom
- Dědičnost

Otázky studentů

- Onkologie v oftalmologii
- Retinoblastom, uveální melanomy, metastatické nitrooční nádory
- Léčba: enukleace bulbu, brachyterapie, protonová terapie, choroidektomie, iridocyklektomie

Otázky studentů

- 3D tisk v oftalmologii – zcela na začátku, snad individuální modely glaukomových drenážních implantátů, umělé nitrooční čočky
- Osteo-odontokeratoprotéza - <https://www.youtube.com/watch?v=JQ2uJ8Lg9Hw>

Změna barvy duhovky

- Stroma Medical - ma procedure-laserový zákrok k odstranění pigmentu v duhovce
- BrightOcular and NewcolorIris –implantace barevného disku před duhovku rohovkovou ranou
- Komplikace: ↓ vidění a slepota, ↑ NT → glaukom, katarakta, ztráta transparence rohovky, uveitidy

