



# Biotechnologie léčiv – Genové terapie

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.  
hosek@mail.muni.cz

Ústav molekulární farmacie  
FaF MU

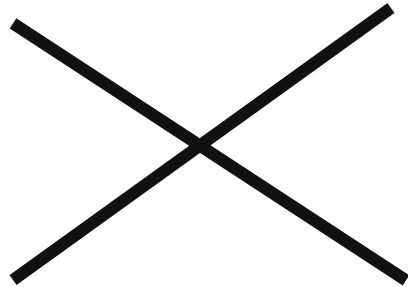
# Co je to genová terapie?

Léčebný postup nebo postup zmírňující projev **genetické poruchy** pomocí geneticky modifikovaných buněk pacienta s terapeutickým přínosem pro pacienta



# Genová terapie × symptomatická léčba

**Symptomatická léčba geneticky podmíněných chorob neléčí podstatu, ačkoli je známa příčina onemocnění**



**Genová terapie léčí příčinu onemocnění**

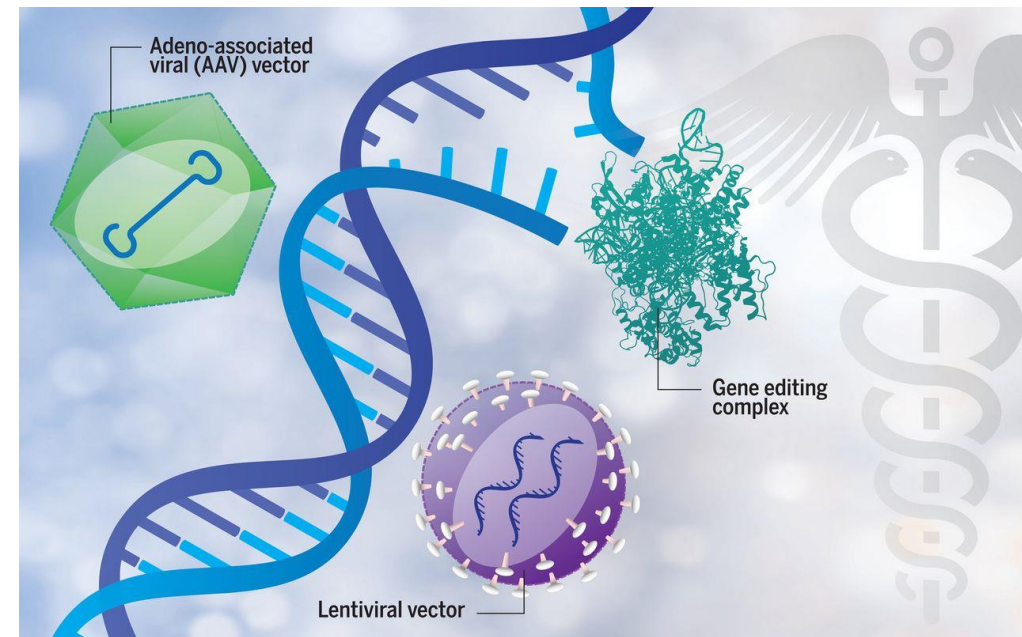
# Symptomatická léčba

- **Dodání chybějícího enzymu u enzymopatií**
- **Dodání jiných chybějících látek (substrátů, proteinů...)**
- **Vyvarování se substrátu, který nelze správně metabolizovat (speciální diety)**
- **Chirurgické zákroky**
- **Farmakologické ovlivnění narušených fyziologických procesů**
- **Farmakologické zlepšení kvality života**
- **Jiné ovlivnění fyziologických procesů nebo kvality života (přístroje, pomůcky)**
- **Transplantace chorobou poškozeného orgánu**



# Genová terapie

- Zahrnuje jakoukoliv proceduru, určenou k léčení nemoci genetickou modifikací buněk pacienta
- Do buněk se transferují: geny, jejich části nebo oligonukleotidy

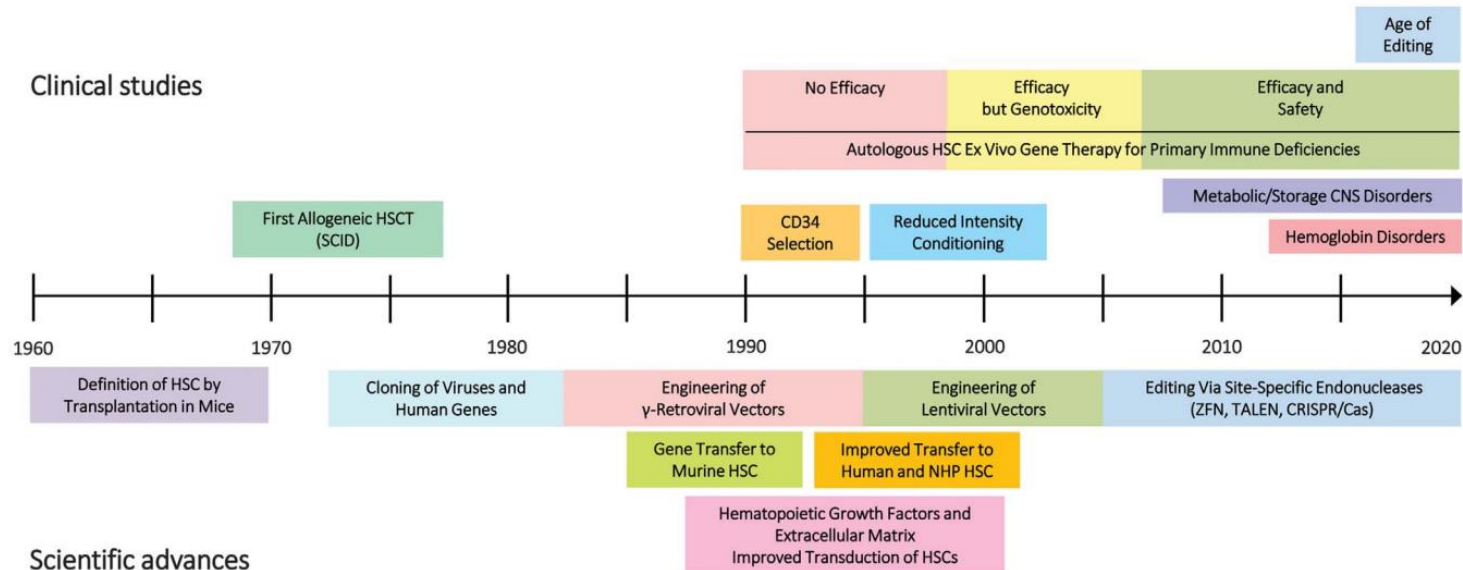


# Počátky genové terapie

Sahají do roku 1990 - provedeny první klinické studie při léčbě deficiencie adenosin-deaminázy (adenosine deaminase deficiency, ADA). V této studii byly transformovány lymfocyty periferní krve ADA deficientních pacientů retrovirovým vektorem, který exprimoval funkční adenosin-deaminázu.

Ještě 10 let po tomto zásahu lymfocyty jednoho pacienta exprimovaly funkční enzym, což znamená, že genová terapie může mít dlouhodobý účinek.

U jiného pacienta se vyvinula imunitní reakce k transportnímu systému, a proto se u něj terapeutický gen neexprimoval, což už tehdy poukázalo na problémy, které jsou s genovou terapií spojeny.

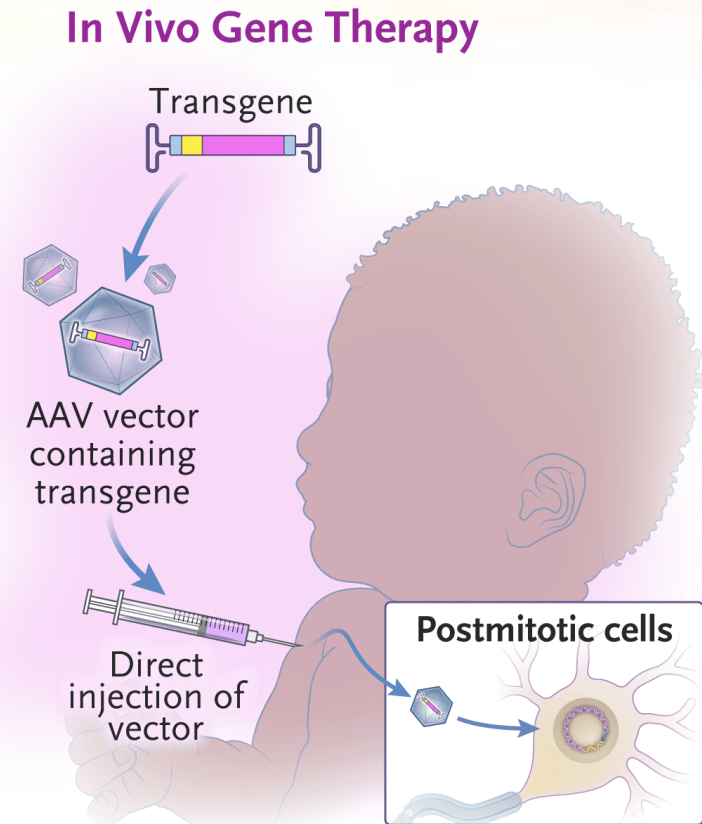
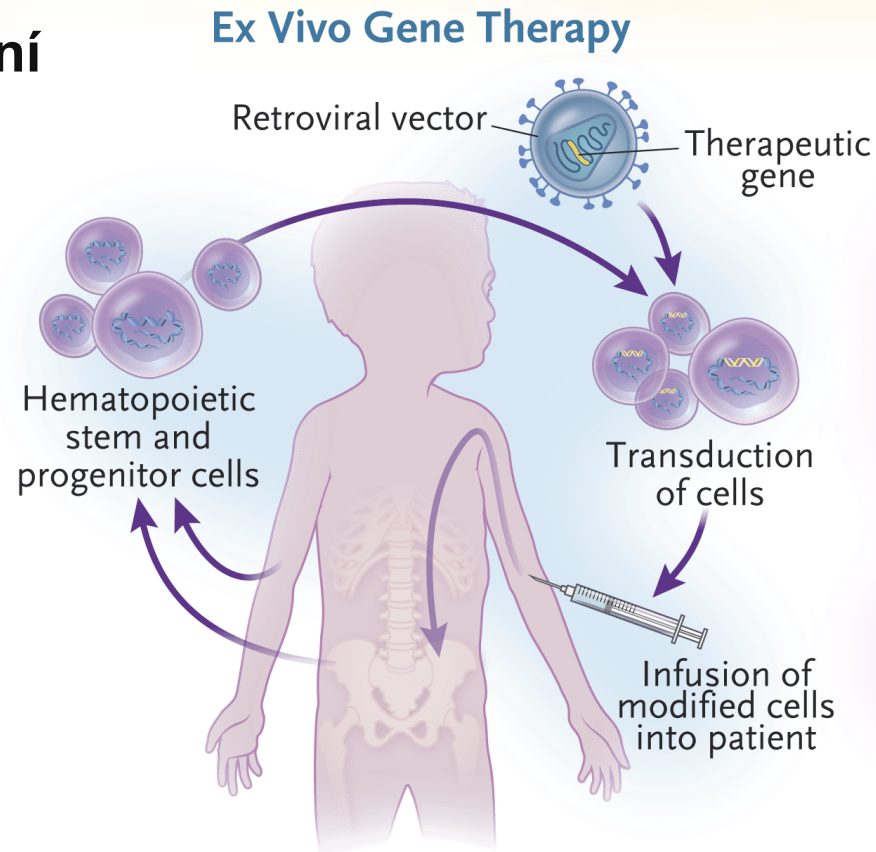


**Fig. 1. Historical overview of HSC gene therapy.** HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; HSC: Hematopoietic stem cell; SCID: severe combined immunodeficiency; NHP: nonhuman primate; ZFN: zinc finger

nuclease; TALEN: transcription activator-like effector nuclease; CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-CRISPR-associated 9 (Cas9) nucleases.

# Techniky genové terapie

- Genová terapie ***in vitro (ex vivo)***: odběr buněk, provedení genové modifikace mimo organismus, návrat buněk zpět
- Genová terapie ***in vivo***: intravenózní transformace přímo genovým konstruktem
- Genová terapie ***in situ***: (modifikace *in vivo*) genový konstrukt je injikován do postižené tkáně nebo její blízkosti



N Engl J Med 2019;381:455-64.



# Co lze léčit genovou terapií?

- **Vrozené poruchy (genetická deficience genového produktu, nepřiměřená exprese genu)**
- **Nádorová onemocnění (poruchy biologické funkce protoonkogenů, nádorových supresorových, apoptotických a reparačních genů)**
- **Nemoci imunitního systému (alergie, záněty a autoimunní choroby)**
- **Infekční nemoci (virový nebo bakteriální patogen)**



# Kdy lze použít genovou terapii?

- Musíme **znát přesnou příčinu** genetické choroby – tzn. **gen**, jeho umístění, povahu produktu a hlavně mechanismus patolo-gického účinku
- Správně **vytvořenou strategii** genové terapie
- Součástí strategie je i volba vhodného **vektoru** a vytipování **cílových buněk** genové terapie
- S ohledem na jistou kontroverznost této terapie je třeba provádět genovou terapii pouze pokud je úspěšně **otestována** a **schválena** k použití

# Další otázky pro použití GT - 1

- **Je cílem genové terapie opravit dědičnou genetickou poruchu nebo vnést do recipientních buněk novou funkci?** Pokud půjde např. o léčbu cystické fibrózy, pak se jedná o nápravu defektního stavu. Naopak v případě léčby AIDS se můžeme pokusit o transformaci buněk genem s novou funkcí; např. genem, jehož produkt bude interferovat s replikací viru HIV.
- **Má být terapeutický gen fungovat po dlouhou nebo krátkou dobu?** Většinou půjde o požadavek, aby gen fungoval dlouhou dobu, ale v případě léčby nádorového bujení nebo požadavku vnesení DNA vakcíny může jít i o účinek relativně krátkodobý.

# Další otázky pro použití GT - 2

- U většiny aplikací je zapotřebí kontinuální exprese terapeutického genu. V některých případech je zapotřebí **expresi regulovat**, například při léčbě *diabetes mellitus*.

# Další otázky pro použití GT - 3

## ➤ Výběr cílových buněk

Podle charakteru postižení; například v případě familiární hypercholesterolémie je zapotřebí vnést do hepatocytů gen kódující receptor pro LDL (low density lipoprotein).

Při saturaci nízkých hladin srážecích faktorů (vede k hemofilii), je třeba zacílit specifickou populaci buněk; zde je třeba vnést gen produkující uvedené srážecí faktory do takových buněk, které je budou schopny přivést do místa účinku, tedy do krevního řečiště. V případě faktoru IX se povedla transformace myoblastů, které tento srážecí faktor secernovaly v krvi.

Výběr cílových buněk je také závislý na dostupných technikách manipulace s konkrétními buňkami.



# Provedení genové terapie zahrnuje

- 1) **Vytvoření genetické informace** (metodami rekombinantní DNA), která je určena pro transport do buněk
- 2) **Vytipování buněk**, do kterých bude upravená genetická informace vnesena
- 3) **Výběr vhodného vektoru**
- 4) Po provedení genové terapie je třeba pacientův stav pečlivě **monitorovat** a všímat si jak zlepšování zdravotního stavu, tak i nástupu případných komplikací

# Základní strategie

- **Reparace genů *in situ* - terapie genů**
  
- **Ektopická reparace – terapie geny**

# Strategie genové terapie

## KLASICKÁ

- **Optimální exprese vloženého genu**
- **Tvorba chybějícího produktu**
- **Přímá likvidace nemocných buněk**
- **Aktivace imunitního systému**

## NEKLASICKÁ

- **Inhibice exprese patogenního genu**
- **Restaurace normální exprese**
- **siRNA**

# Genová terapie „klasická“

Jejím cílem je dopravit geny do vhodných cílových buněk tak, aby bylo dosaženo optimální exprese vnesených genů a

- **Zajistit produkci** látky, která chybí
- **Aktivovat buňky imunitního systému** ve snaze pomoci odstranit nemocné buňky



# Genová terapie „neklasická“

- **Inhibice** exprese genů asociovaných s patogenezi
- **Korekce** genetického defektu a obnovení normální genové exprese

# Genová terapie podle typu buněk

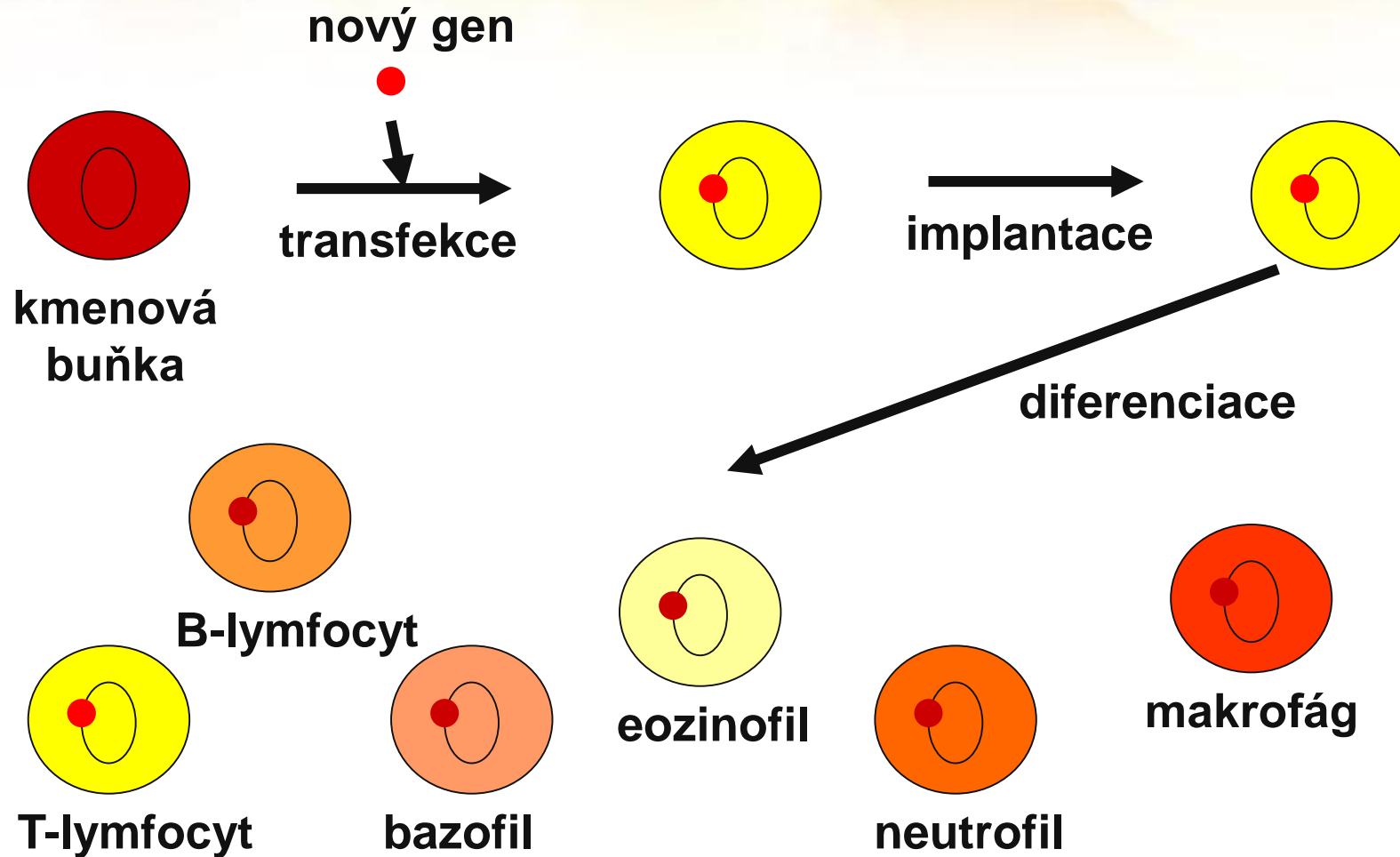
## Zárodečné buňky

- Do oplodněného vajíčka se dodá kopie správné verze příslušného genu a vajíčko se implantuje zpět do těla matky
- Gen je zpravidla přítomný ve všech buňkách nového jedince
- Provádí se mikroinjekcí DNA do vajíčka
- Teoreticky použitelná k léčení jakékoli dědičné choroby

## Somatické buňky

- Manipulace s buňkami, které lze z těla odebrat, transfekovat a vrátit zpět do těla
- Nadějná pro léčbu dědičných onemocnění krevních buněk
- Vnášejí se geny do kmenových buněk kostní dřeně
- Jako vektory slouží viry – retroviry, adenoviry
- **Problém s dominantními znaky**

# GT kmenových buněk



**Všechny zralé buňky obsahují nový gen**

# Somatické nebo zárodečné buňky?

- Současná genová terapie se omezuje na terapii **somatických** mutací

- ~~Etické problémy s potenciální terapií **zárodečných** mutací~~







## Příliš předčasný hazard

- Čínský vědec Che Ťien-kchuej odsouzen za „nelegální a neetické medicínské praktiky“.
- Cílem jeho výzkumu bylo zbavit děti HIV pozitivních rodičů potenciální infekci virem HIV.
- Pomocí metody CRISPR upravil genom embryí dvojčat. Provedl mutaci receptoru CCR5, který je využíván virem HIV pro infiltraci lidských buněk
- Světová zdravotnická organizace (WHO) připravuje globální registry pro sledování výzkumu úpravy lidského genomu

# Provedení genové terapie zahrnuje

- **Vytvoření** genetické informace (metodami rekombinantní DNA), která je určena pro transport do buněk
- **Vytipování** buněk, do kterých bude upravená genetická informace vnesena (*in vivo*, *in vitro*)
- **Výběr** vhodného vektoru
- Po provedení genové terapie je třeba pacientův stav pečlivě **monitorovat** a všímat si jak zlepšování zdravotního stavu, tak i nástupu případných komplikací

# Genetický transfer

## *Ex vivo (in vitro)*

- Transfer klonovaných genů do buněk v kultuře (transplantace autologních geneticky modifikovaných buněk)

## *In vivo (in vivo, in situ)*

- Transfer se děje přímo do tkáně pacienta pomocí liposomů nebo virových vektorů

# Principy genetického transferu

cDNA s kompletní DNA kódující sekvencí je modifikována k zajištění vysoké hladiny exprese, např. pomocí silného virového vektoru

## Následná inserce genu se děje

- do chromozómu
- extrachromozomálně



# Inzerce do chromozómu

- gen se bude rozšiřovat do dalších buněk
  - vysoká úroveň exprese (kmenové buňky)
  - náhodná inzerce - různá lokalizace
    - různá úroveň exprese
    - smrt jednotlivé buňky
    - nádorové zvrhnutí (aktivace onkogenu, deaktivace supresorového nebo apoptotického genu)
- (výhoda transferu ex vivo)**



# Inzerce extrachromozomálně

- **Nejistý dlouhodobý účinek**
- **Gen je exprimován po dobu života buňky**

# Důsledky genové terapie

- 1) Zvýšení genové exprese – efekt genové dávky**
- 2) Usmrcení „nemocných“ buněk**
- 3) Usmrcení buněk za asistence imunitního systému**
- 4) Cílená inhibice genové exprese**
- 5) Cílená oprava mutace**

# Princip ex vivo genové terapie

## ADA-Deficient Severe Combined Immunodeficiency

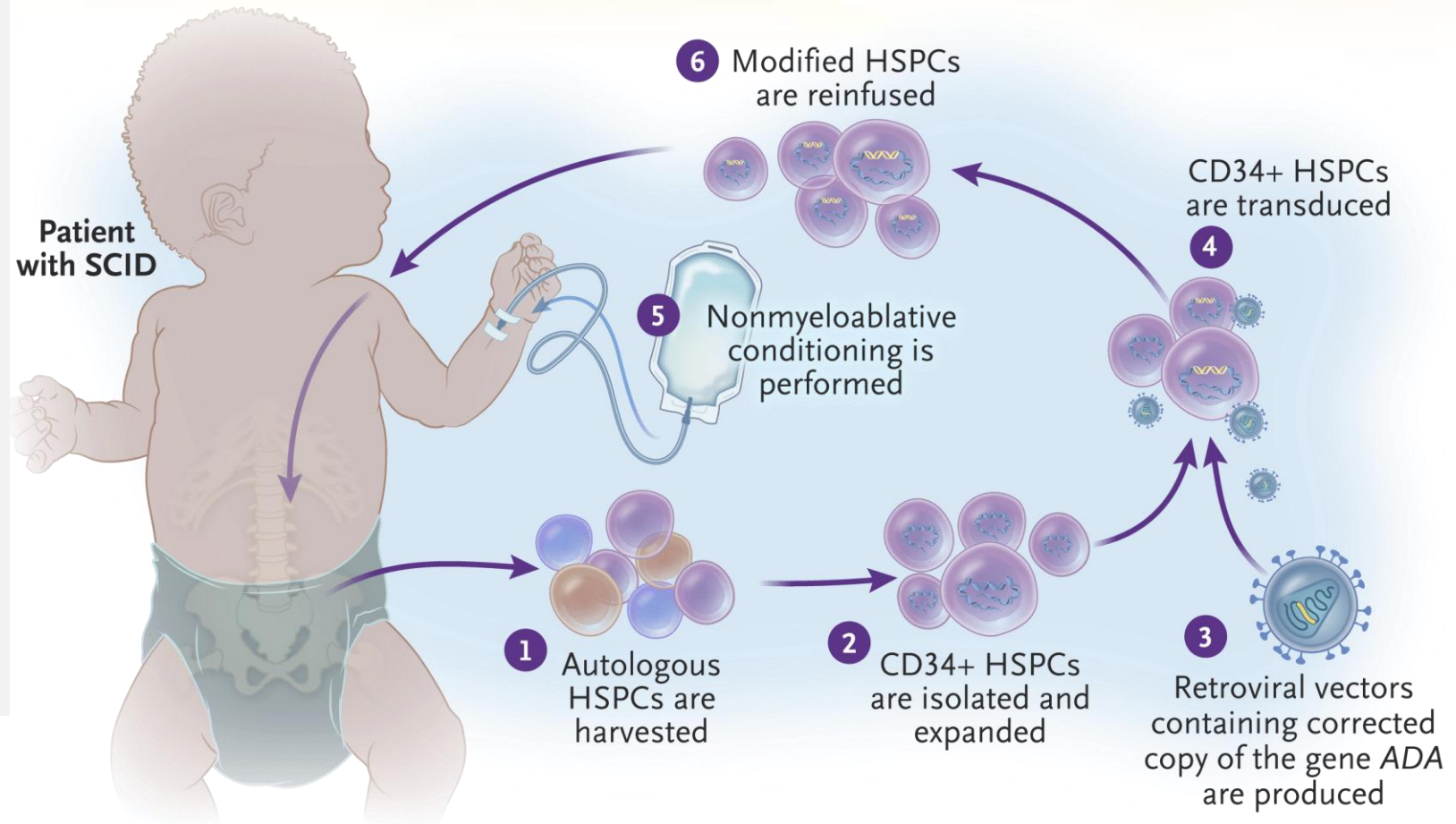
Adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID) is a rare, autosomal recessive, and fatal disease of early childhood. ADA deficiency leads to toxic levels of adenosine and adenine deoxyribonucleotides. Affected children fail to thrive, have impaired immune responses, and have recurrent infections.

There are three approaches to treating ADA-deficient SCID:

- Ex vivo gene therapy
- Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation
- Enzyme-replacement therapy

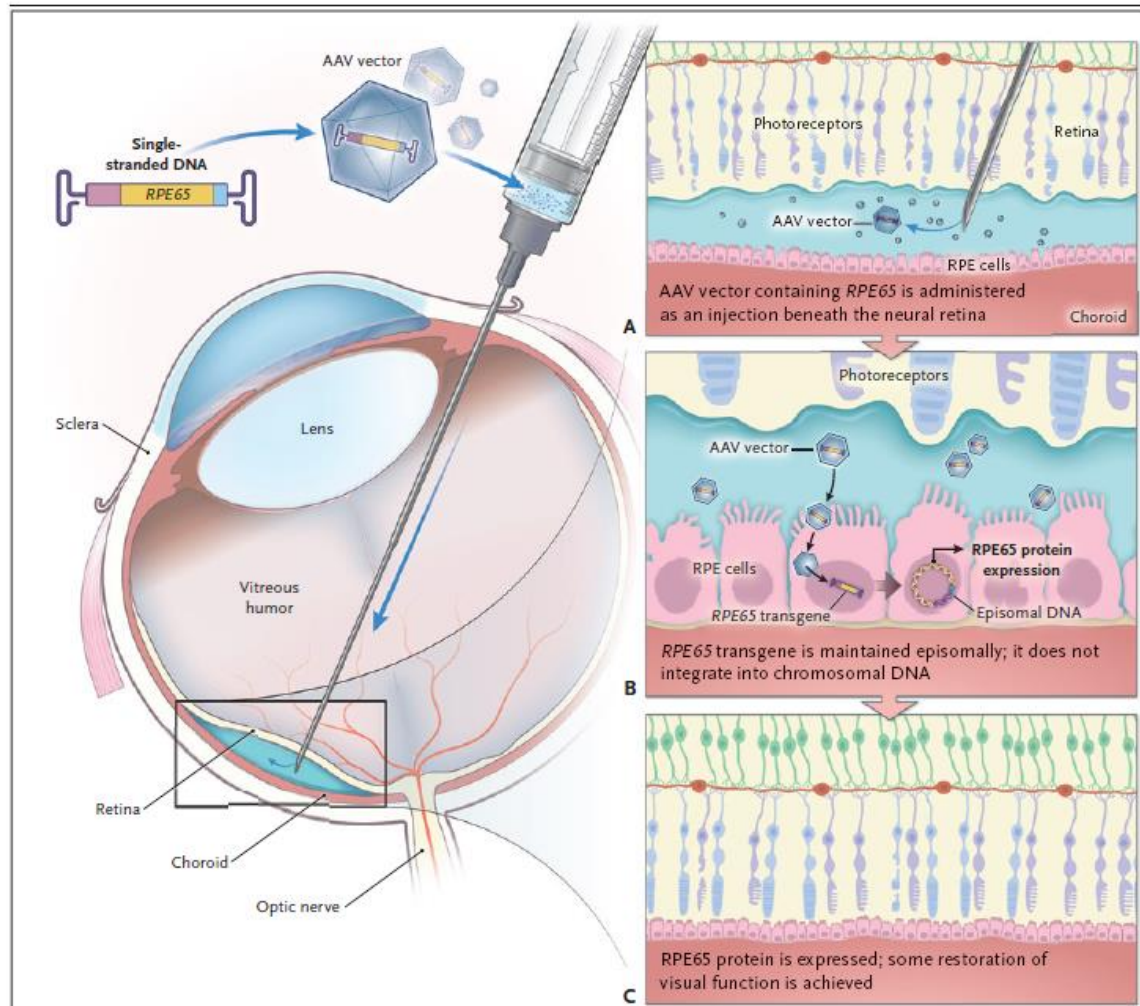
## Treatment of ADA-SCID — Ex Vivo Gene Therapy

Ex vivo gene therapy has proved successful in treating this disease. First, autologous bone marrow is harvested from the patient. CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) are isolated and transduced with the retroviral vector carrying the gene ADA.



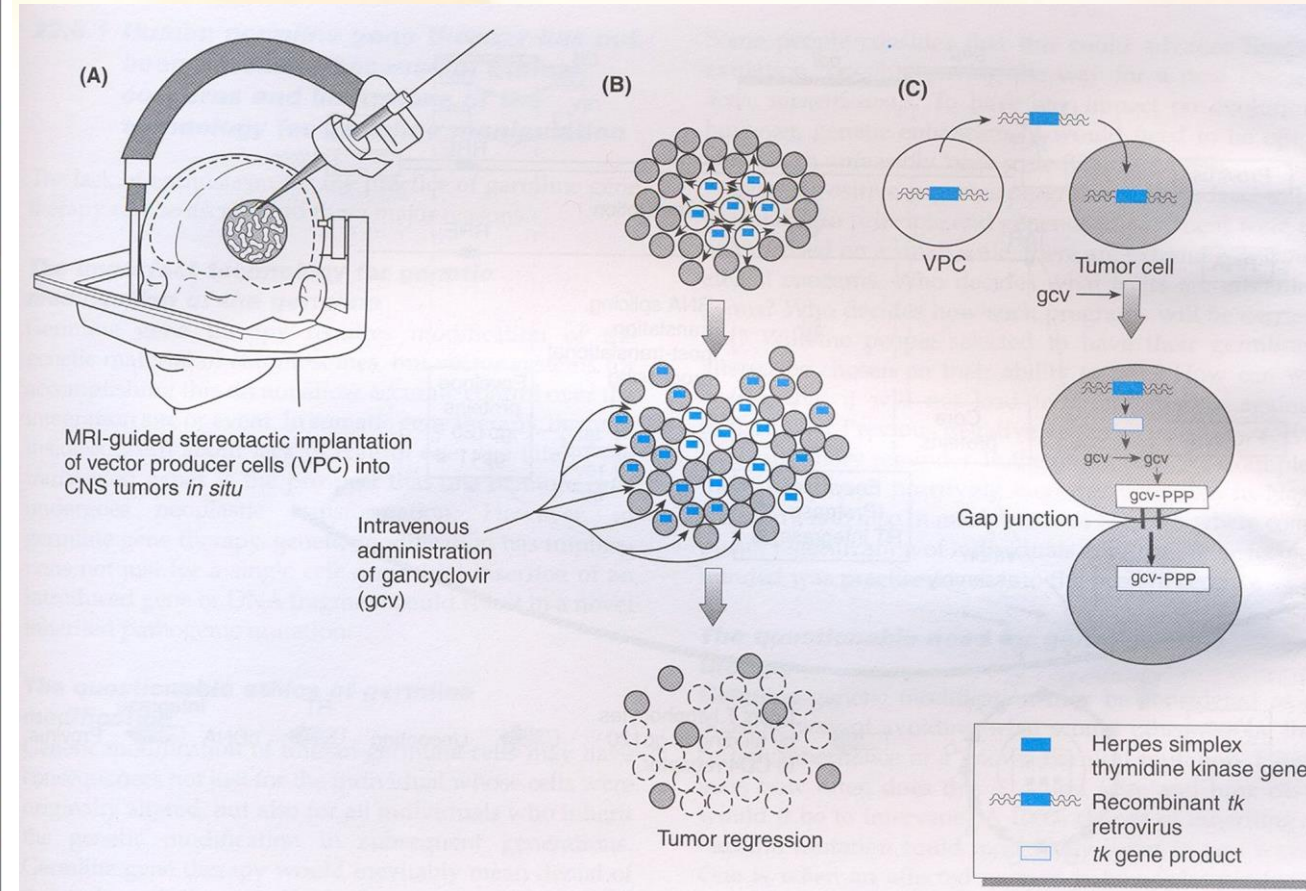


# Princip *in situ* / *in vivo* genové terapie



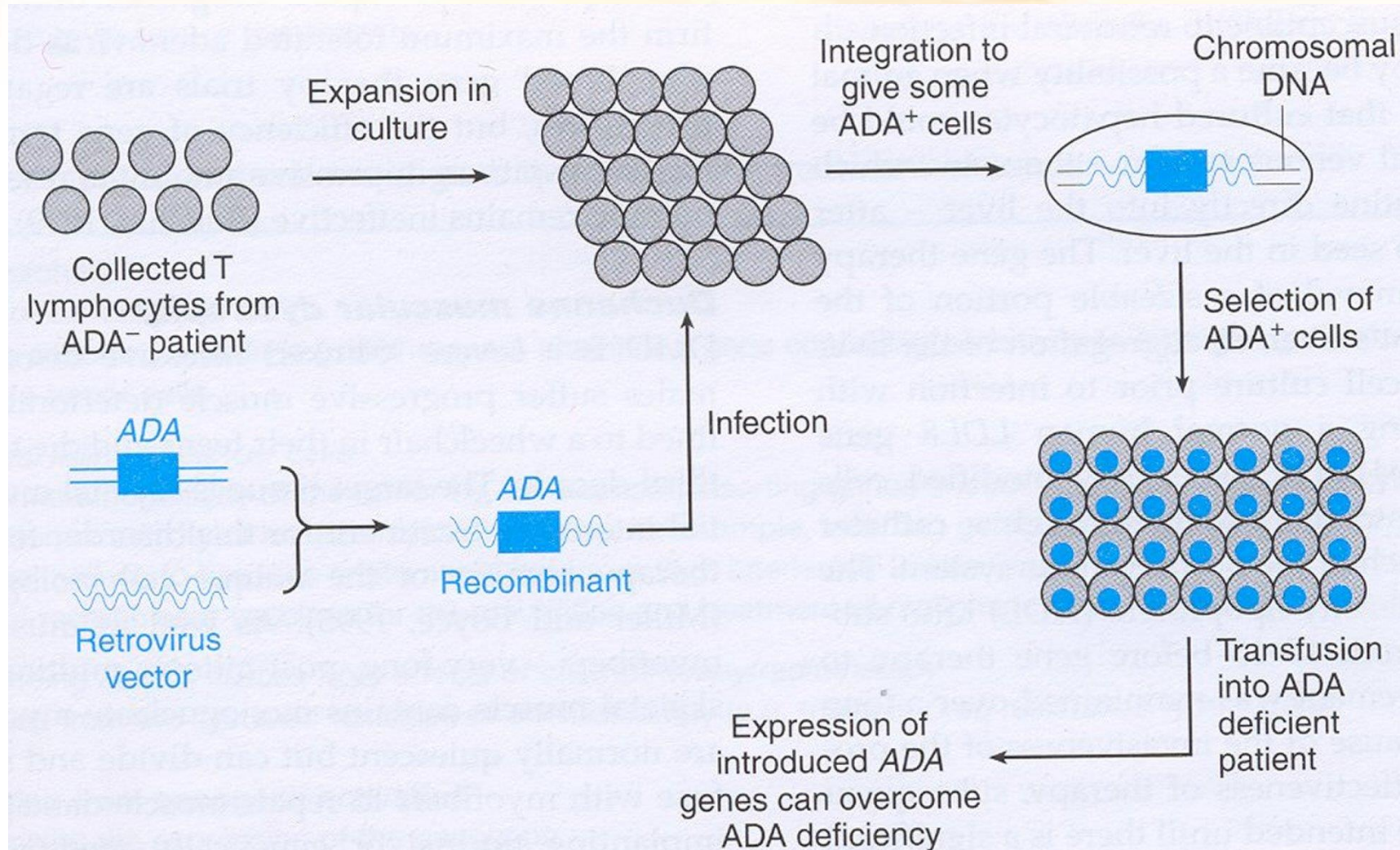
**Figure 2. In Vivo Delivery of Gene Therapy.**

An example of *in vivo* gene therapy is the treatment of vision loss caused by loss-of-function variants in *RPE65*, which encodes an enzyme that converts all-trans-retinyl ester to 11-cis-retinol, part of the visual cycle that takes place in the retinal pigment epithelium. The gene is delivered within an adeno-associated viral (AAV) vector by injection beneath the neural retina, through vitrectomy followed by direct injection in an operative procedure. A false space ("bleb") under the retina is created by injecting vector suspended in fluid, whereupon the vector transduces retinal pigment epithelial (RPE) cells. The transgene remains episomal; it does not integrate into the DNA of the cell.





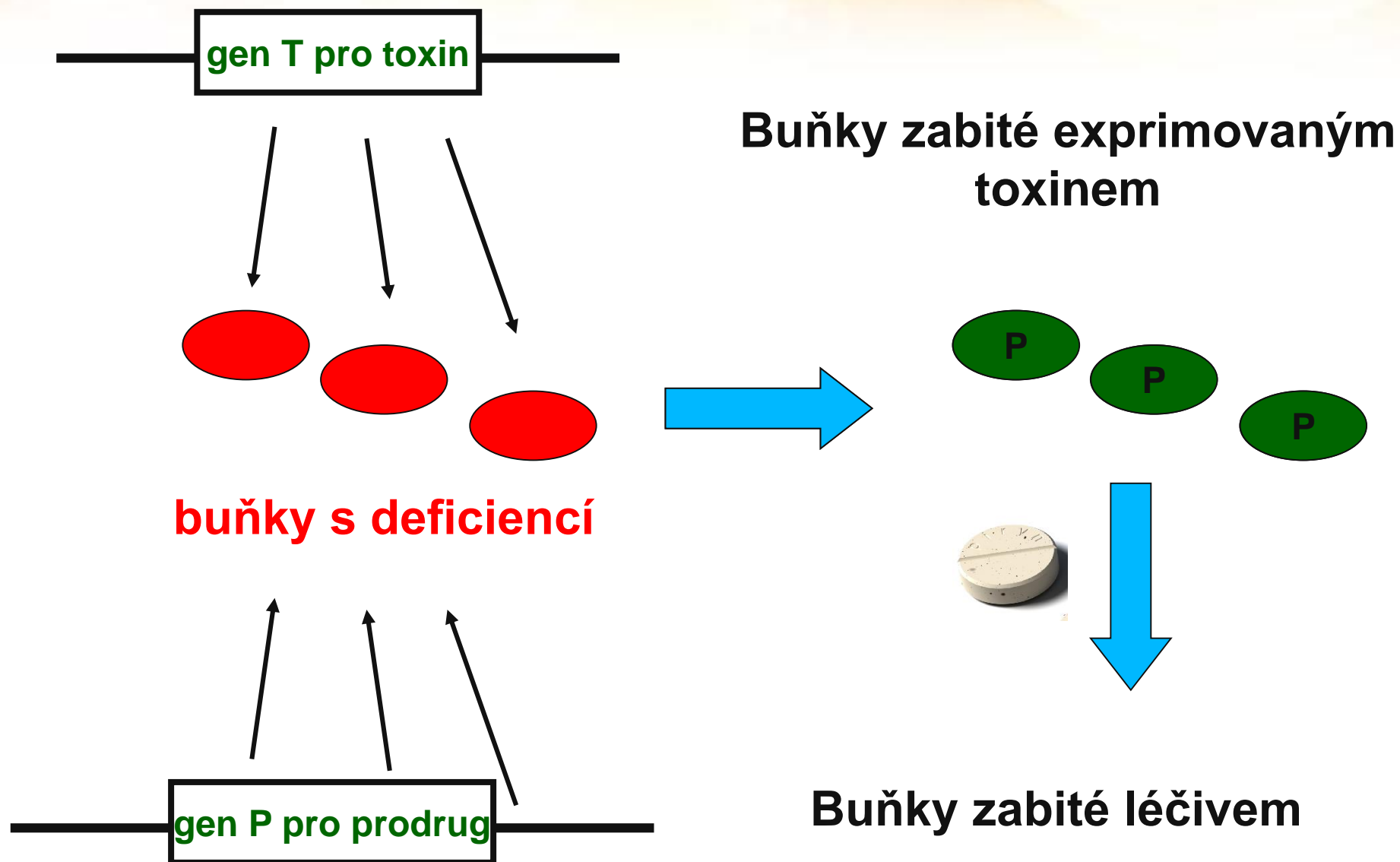
# Příklad I. – vnesení funkčního genu



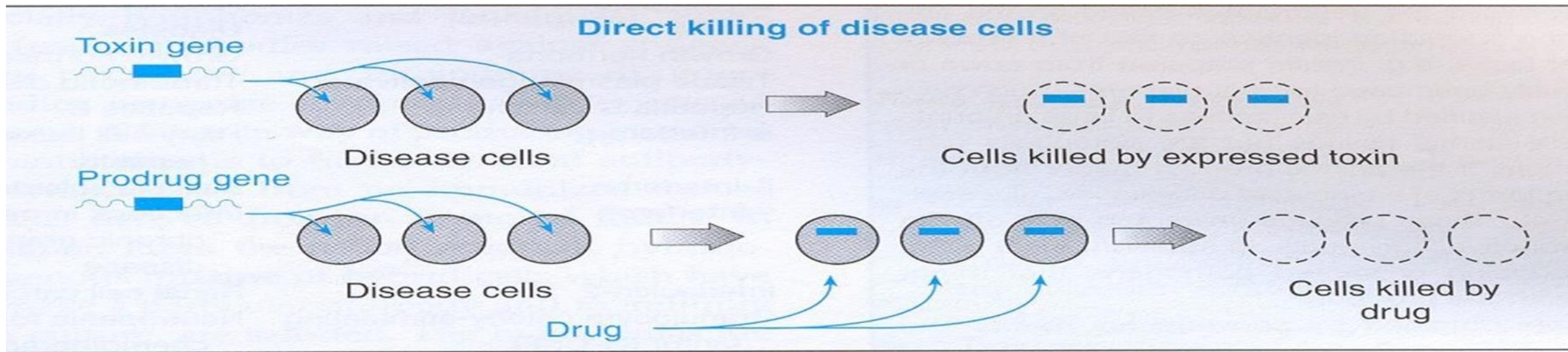
1: Ex vivo gene augmentation therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency.



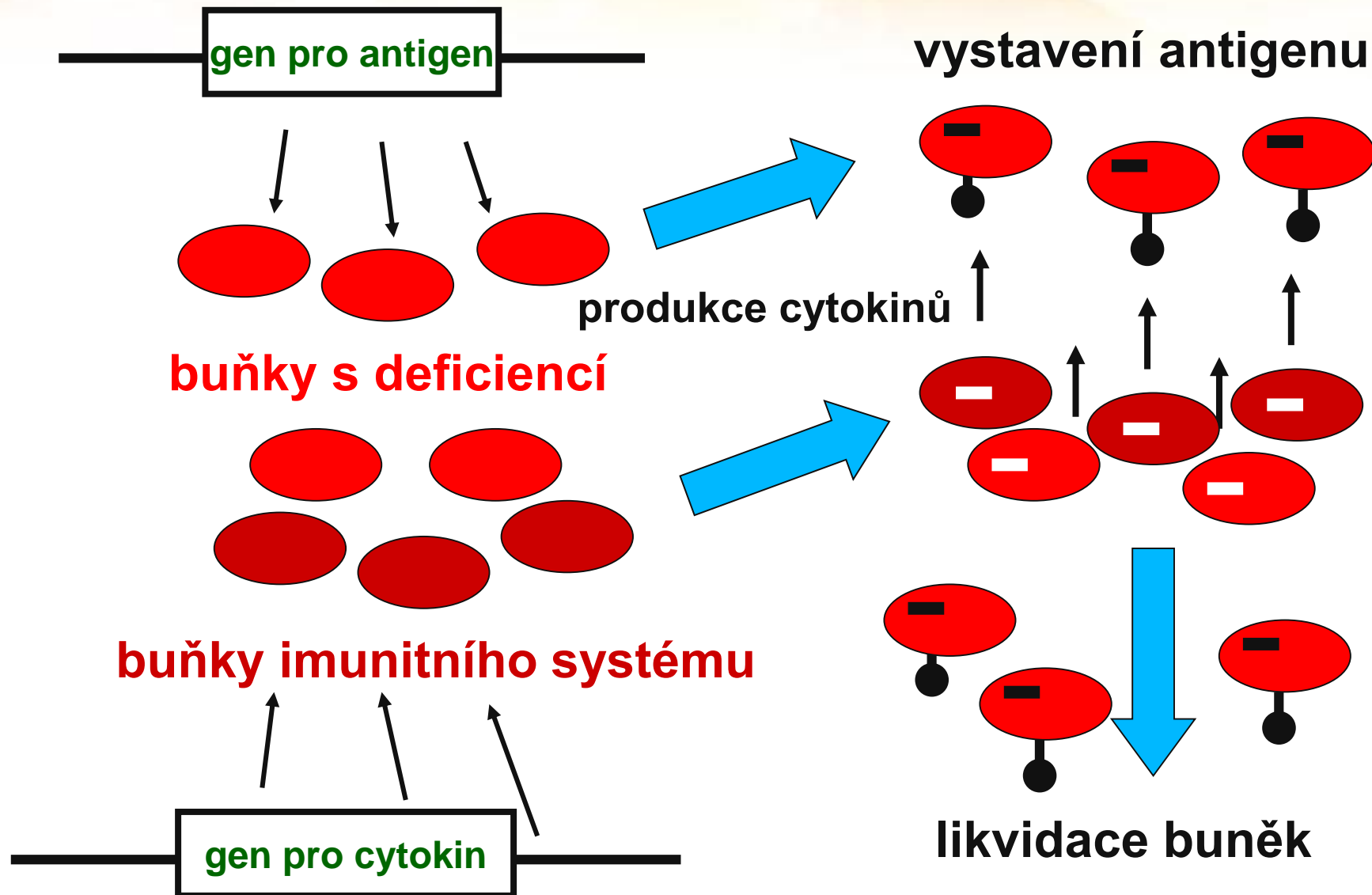
# Příklad II. – cílené zabití buněk



# Příklad II.



# Příklad III. - Usmrcení buněk za účasti imunitního systému

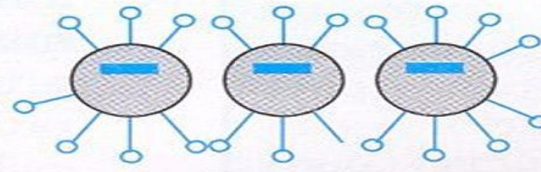
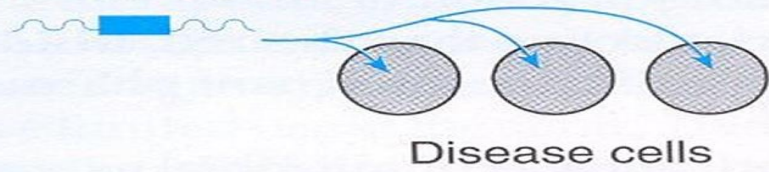




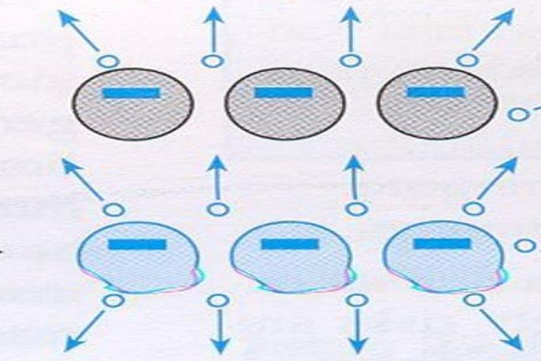
# Příklad III.

## Assisted killing of disease cells by immune system cells

Foreign antigen gene

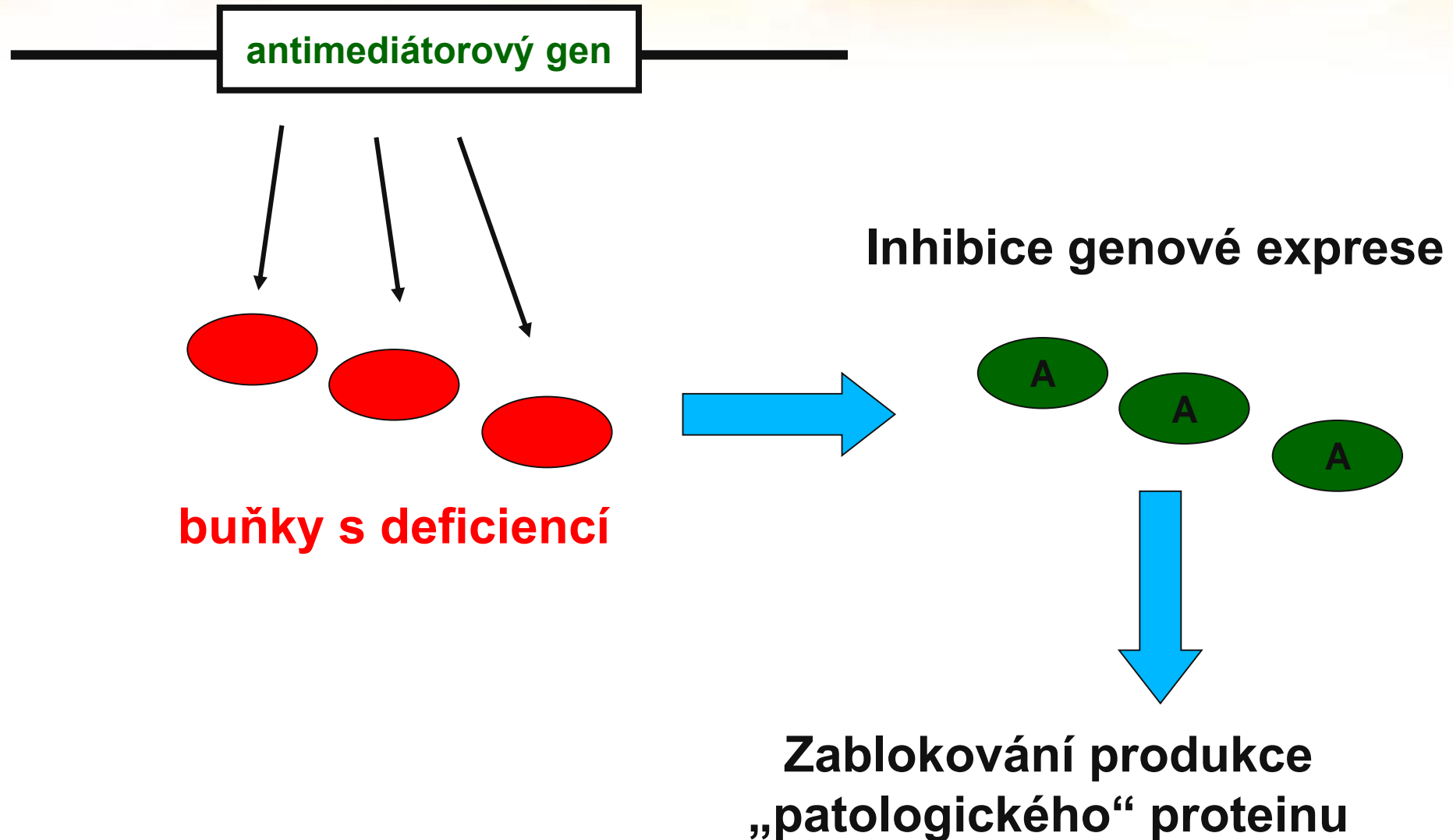


Cytokine gene



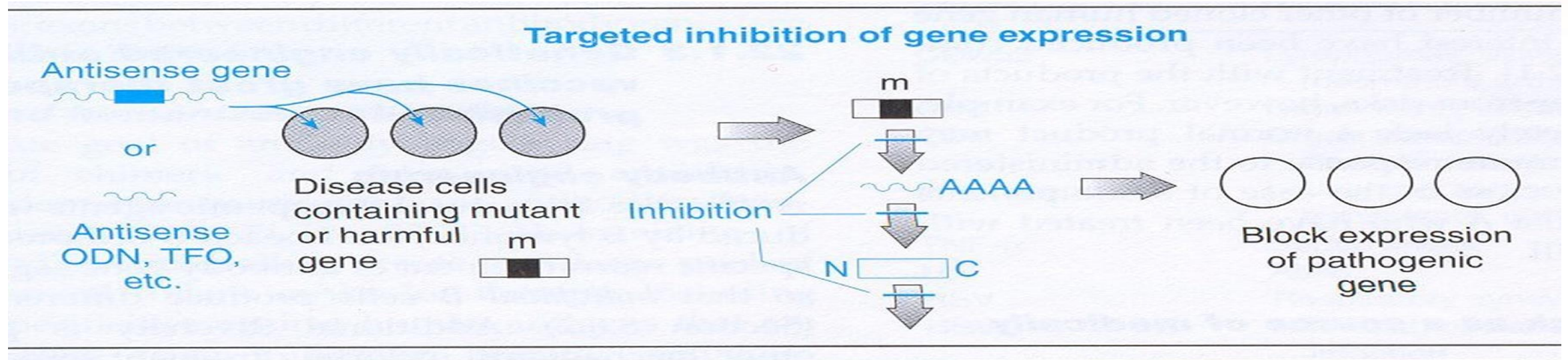
Killing of disease cells because of enhanced immune response

# Příklad IV. - Cílená inhibice genové exprese

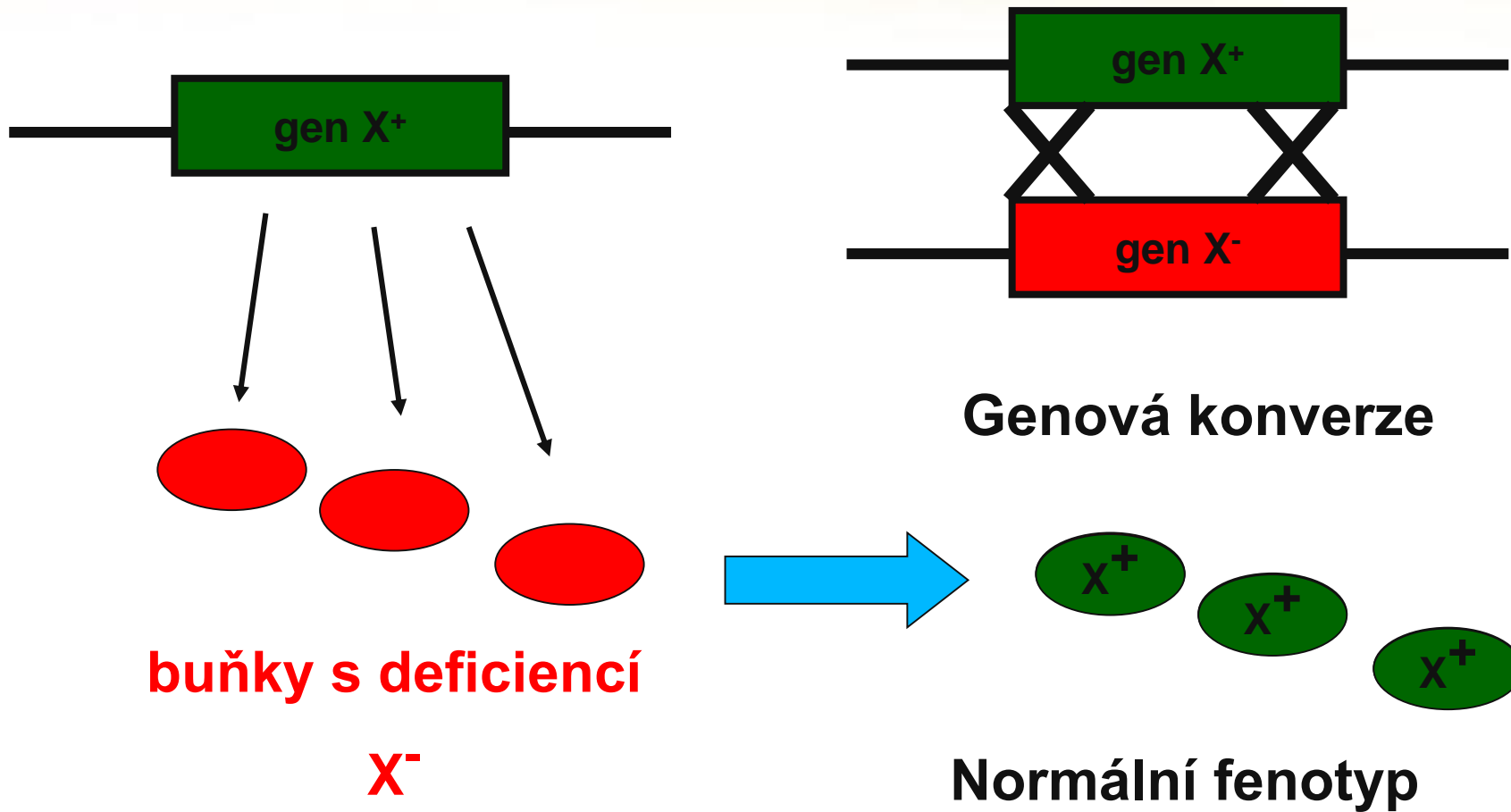




# Příklad IV.

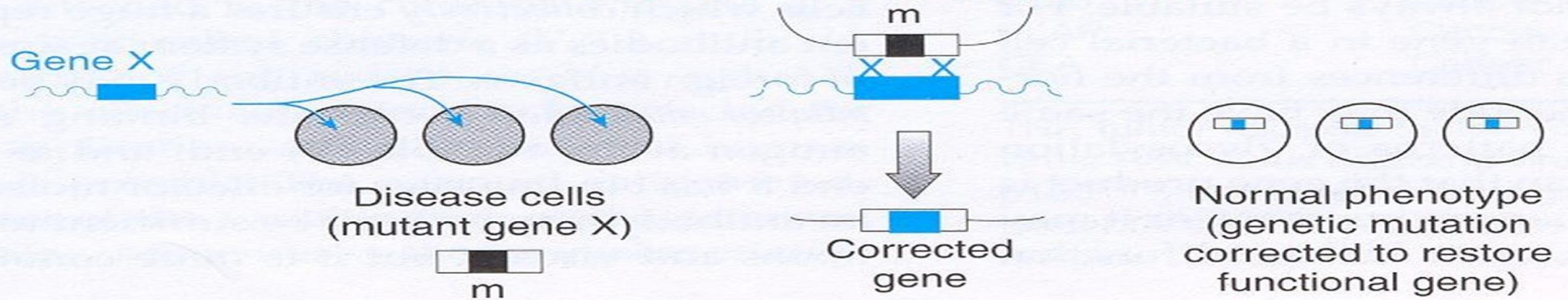


# Příklad V. - Cílená oprava mutace

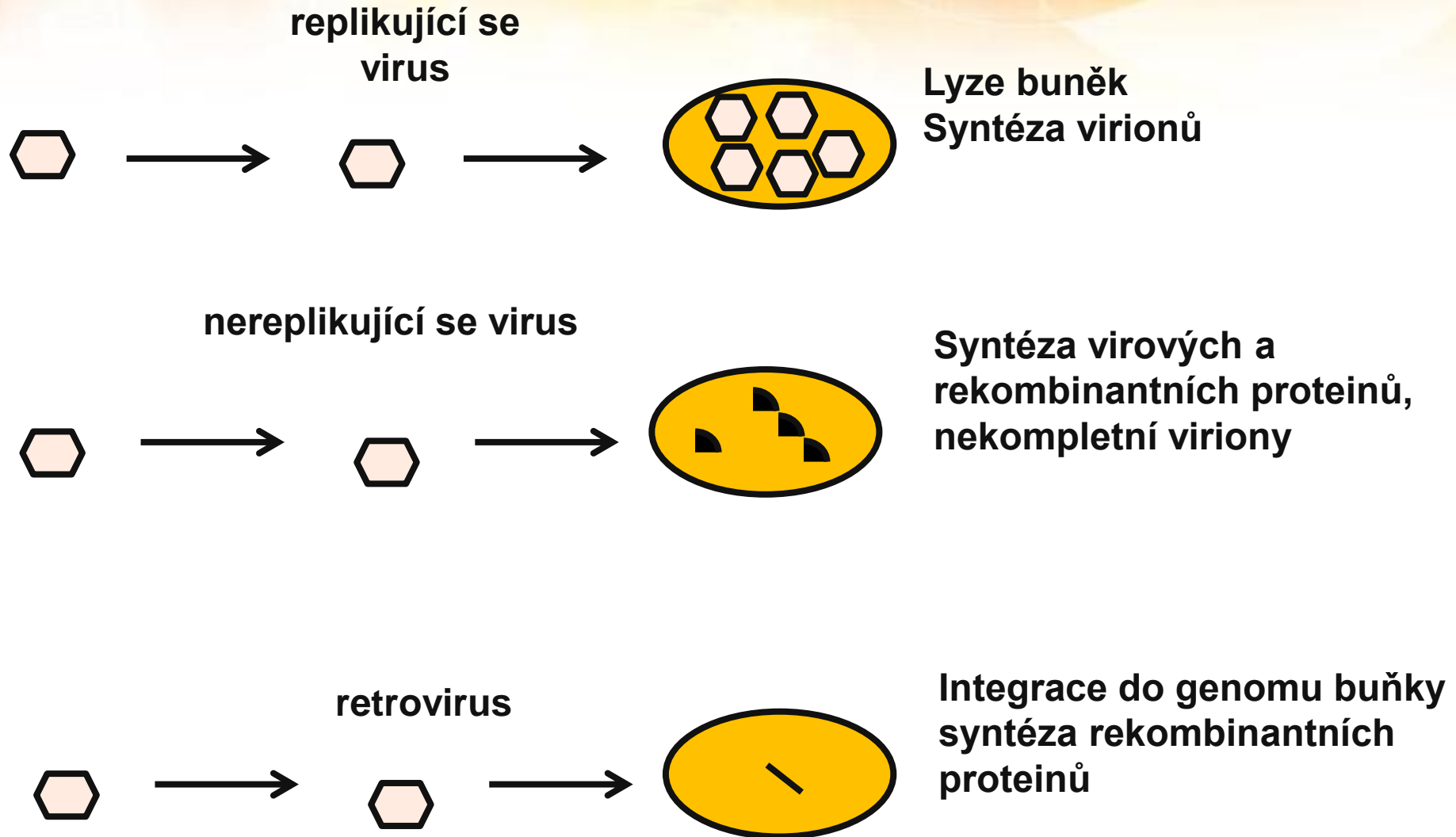


# Příklad V.

## Targeted gene mutation correction



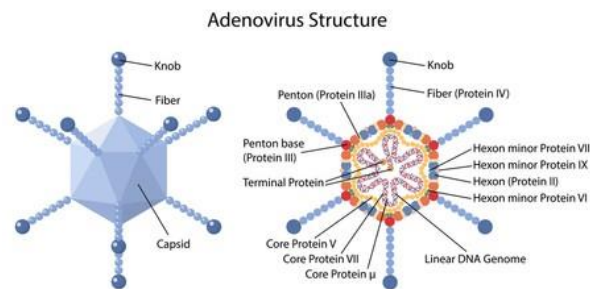
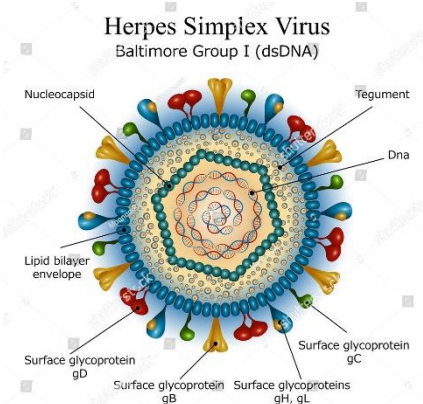
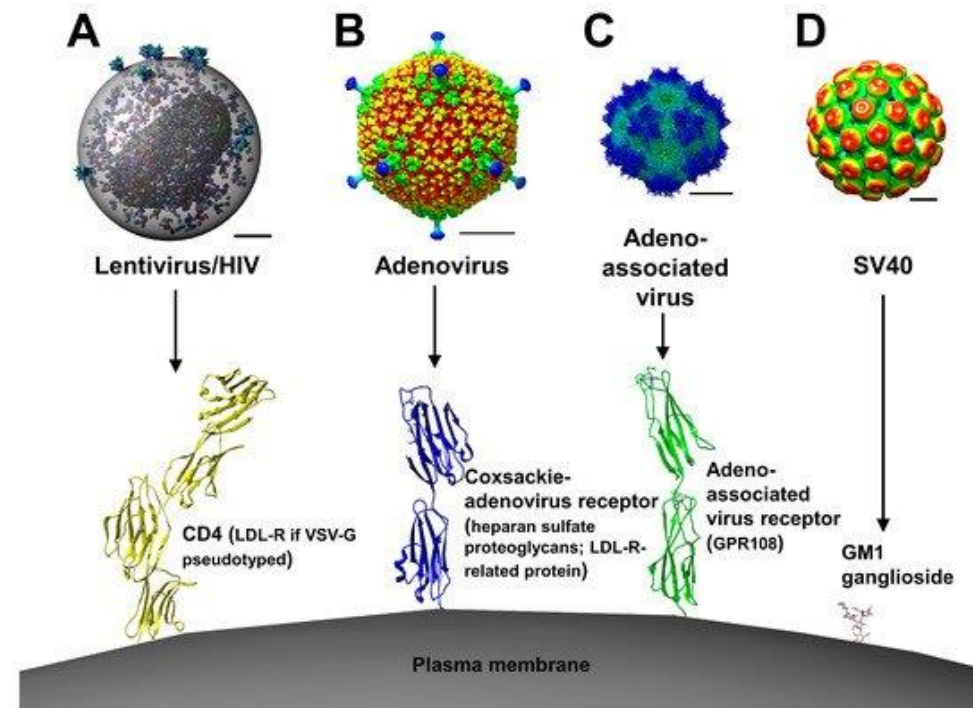
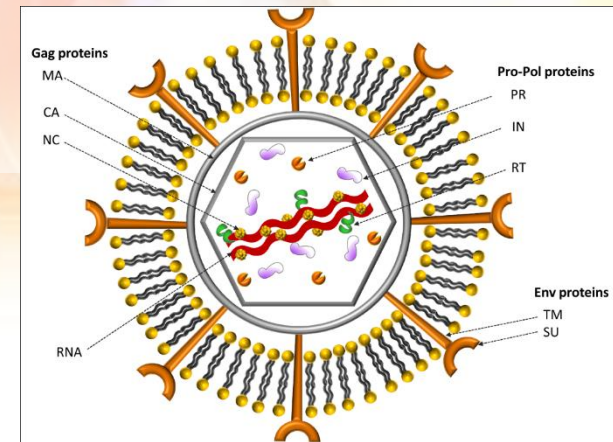
# Virový transfer





# Savčí virové vektory

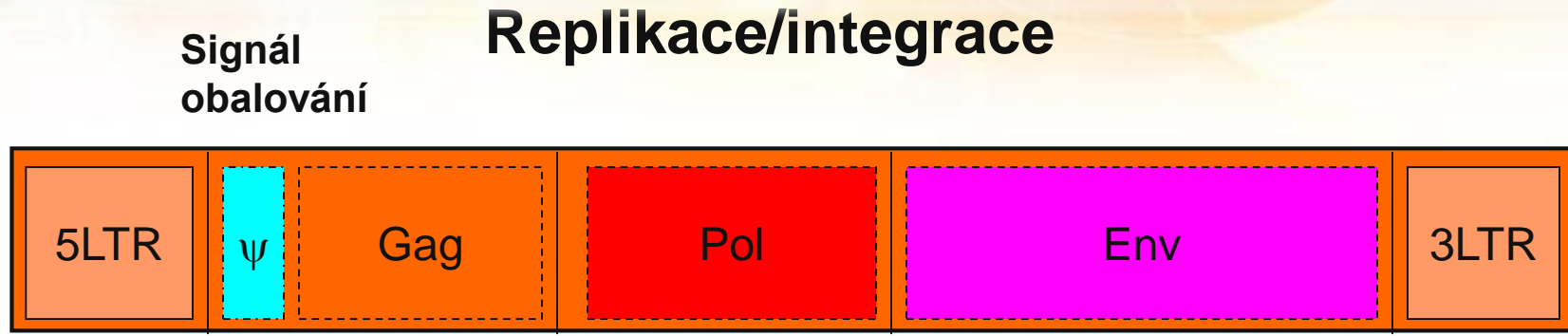
- Retrovirové vektory
- Lentivirové vektory
- Vektory adeno-asociovaného viru
- Adenovirové vektory
- Vektory viru herpes simplex



shutterstock.com · 1736109233

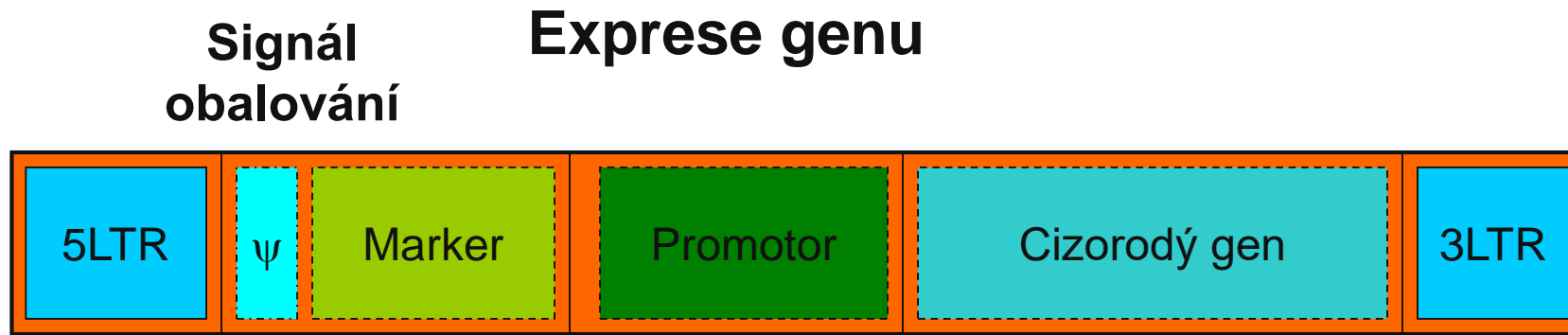


# Retrovirus



**Proteiny core**

**Obalové proteiny**

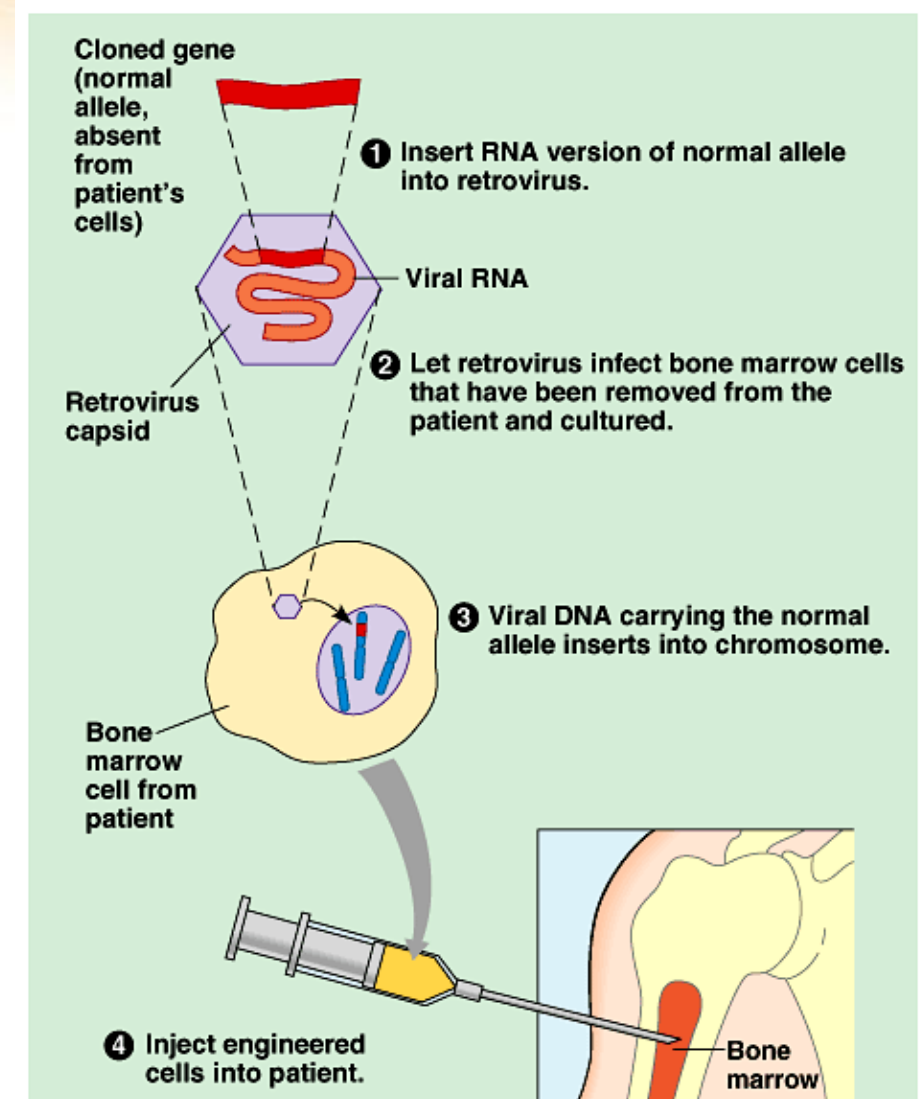
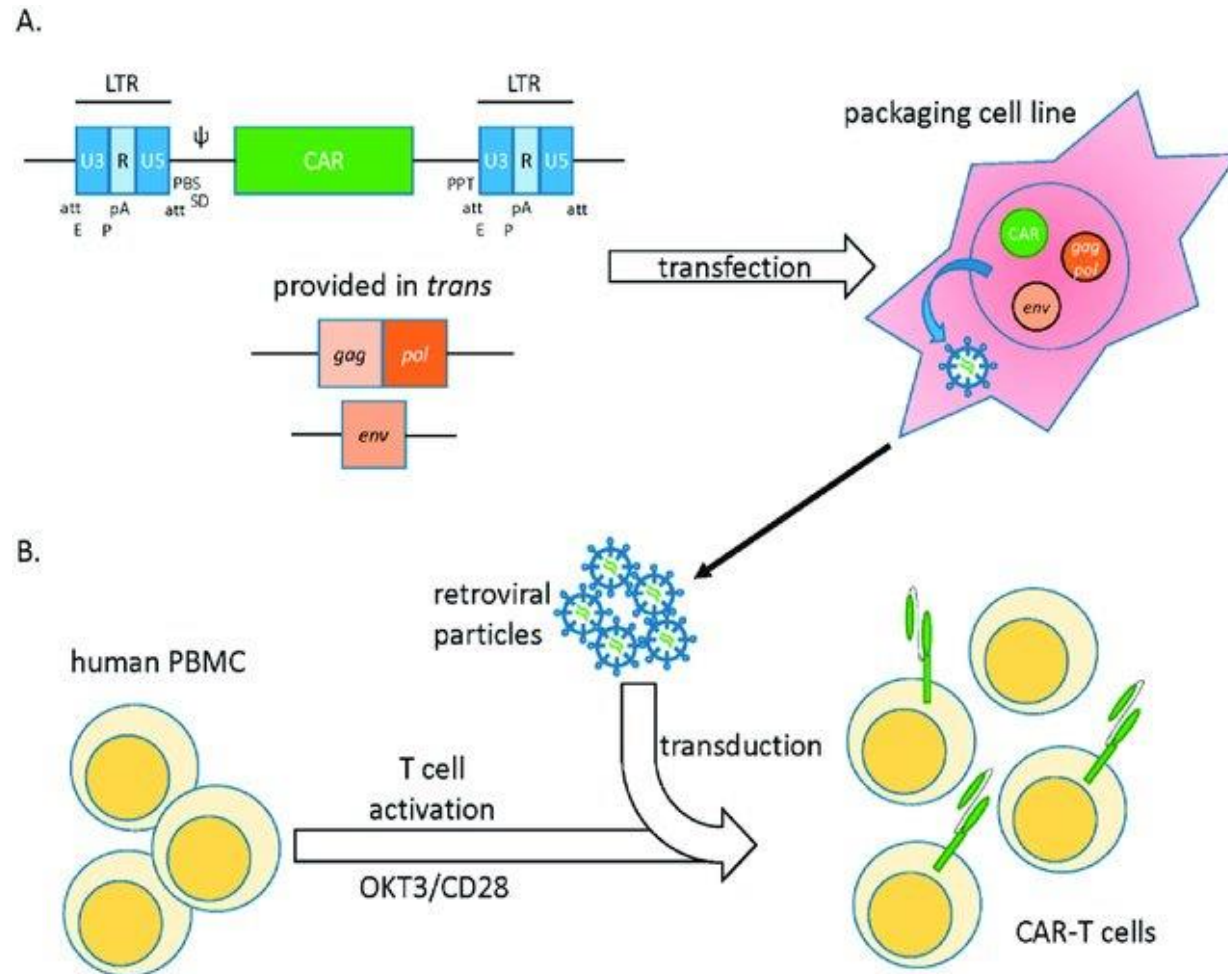


**Identifikace/separace**

**Opravný gen**

# Postup při genové terapii retrovirem

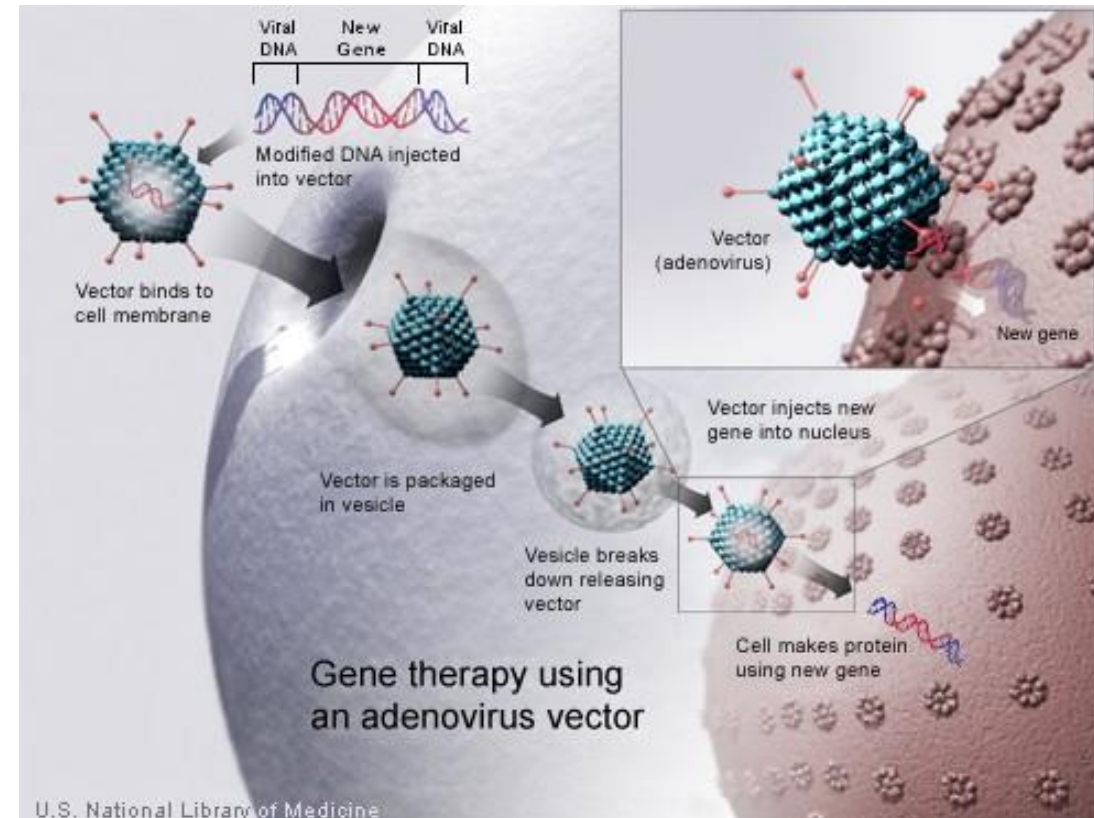
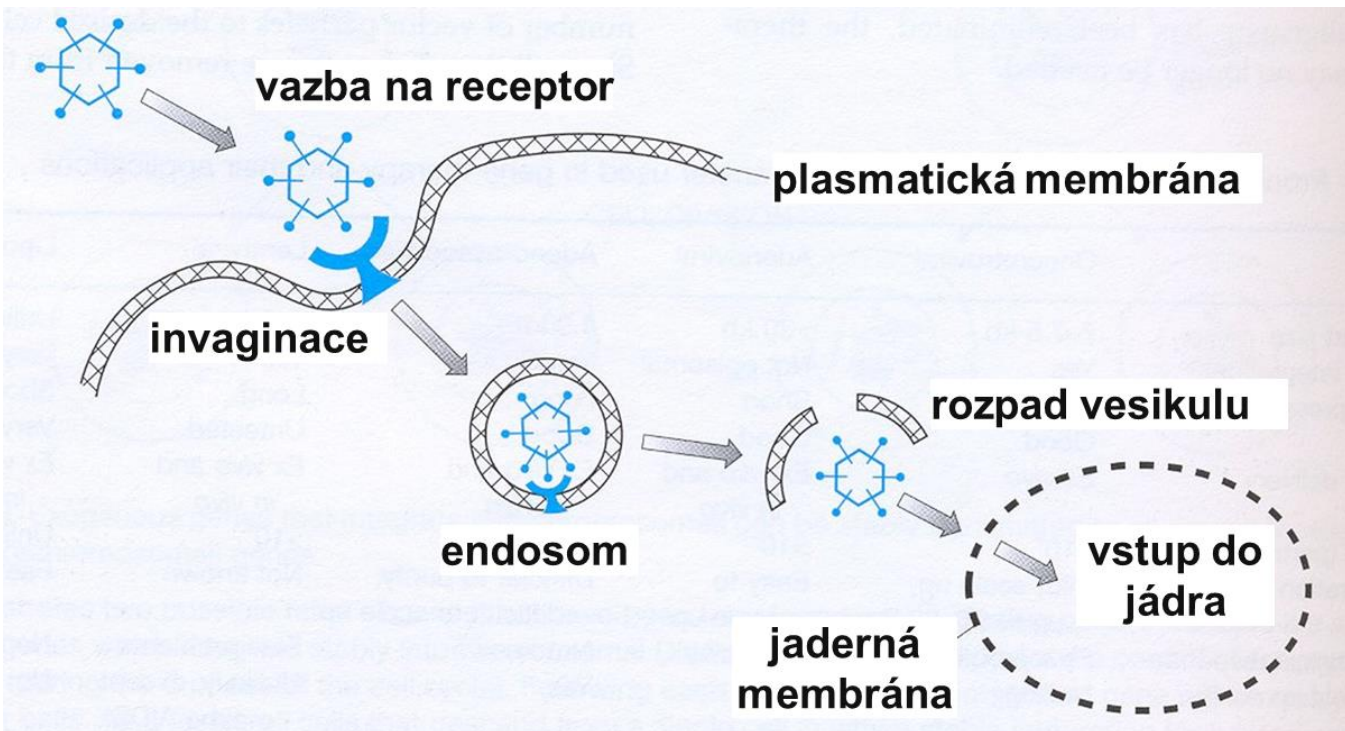
- Integrace do genomu



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

# Genová terapie s adenovirovým vektorem

- Neintegruje se do genomu = episomální DNA
- Infikuje různé druhy dělicích se i nedělicích se buněk
- Silně imunogenní → využijí při výrobě vakcín a protinádorových léčiv
- Replikačně defektní viry → genové terapie a vakcíny
- Replikující se (onkolytické) viry → protinádorová léčiva





# Genová terapie s adeno-asociovaným virem

- Neintegruje se do genomu = episomální DNA
- Využití v *in vivo* genové terapii
- Rekombinantní AAV je vytvořen z nepatogenního neobaleného parvoviru
- Efektivita sbalení viru se výrazně snižuje, pokud je transgenní sekvence delší než 5 kbp
- **Na myším neonatálním modelu byl prokázán vznik hepatocelulárního karcinomu při využití vysoké dávky AAV, u člověka nebyl pozorován**



# Genová terapie spinální muskulární atrofie

## Spinal Muscular Atrophy Type 1

Spinal muscular atrophy type 1, or SMA1, is a progressive, monogenic motor neuron disease characterized by the degeneration and loss of lower motor neurons, leading to muscle atrophy. Affected infants fail to reach motor milestones and, if they survive, receive mechanical ventilation by 2 years of age.

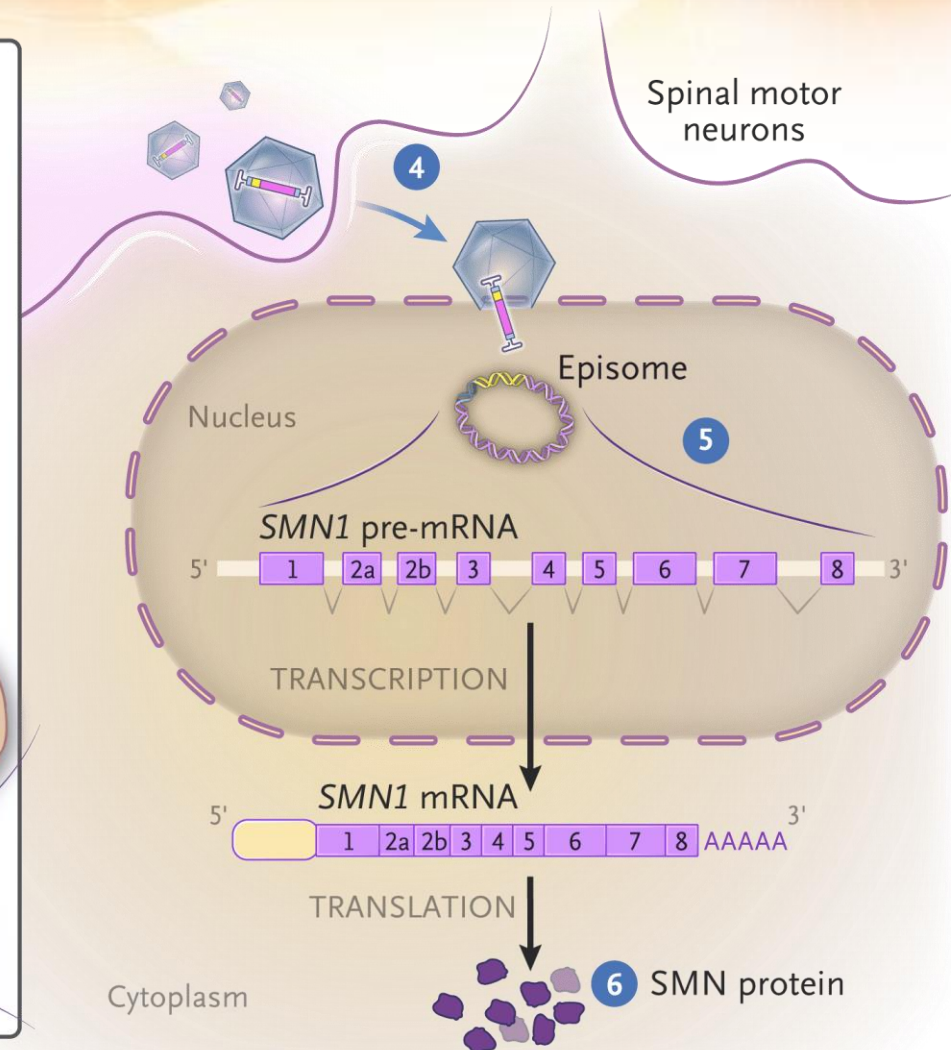
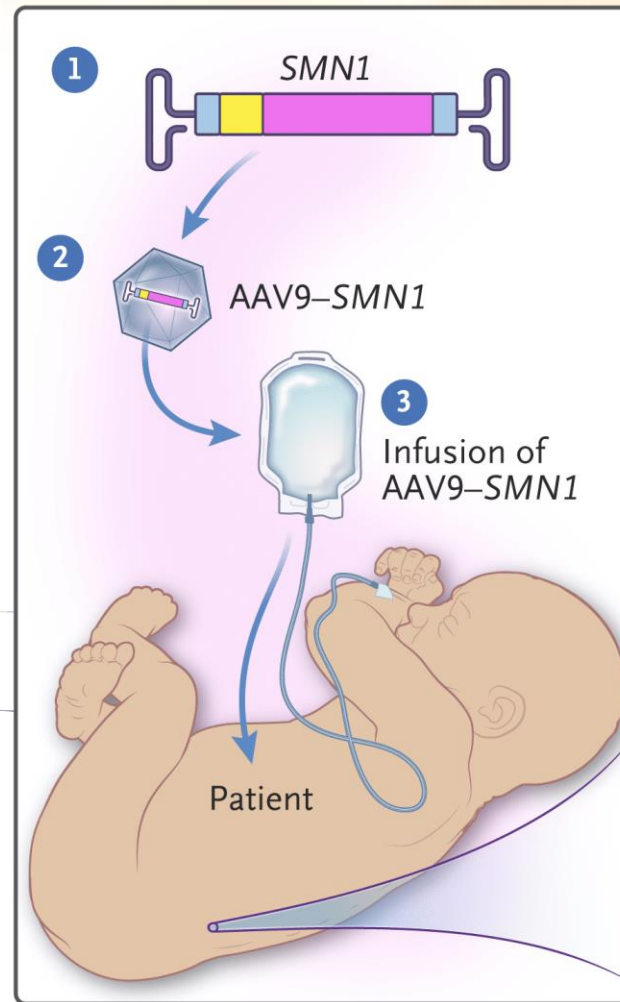
The disease is caused by mutations in *SMN1*, which encodes the survival motor neuron protein. SMA1 is the most severe form of SMA and is the most common genetic cause of death in infants.

There are two approaches to treating SMA1:

- In vivo gene therapy
- Antisense oligonucleotide therapy

## Treatment of SMA1 — In Vivo Gene Therapy

The treatment begins with a functional copy of the gene *SMN1*, which is inserted into an AAV9 vector that is administered by intravenous injection. It does not integrate into the genome of the spinal motor neuron; rather, it is maintained episomally. Transcription of the therapeutic *SMN1* results in the expression of SMN protein, slowing disease progression.



# Schváléné genové terapie

**Table 2. Regulatory Milestones in Gene Therapy.\***

| Year and Milestone   | Regulatory Authority | Indication  | Vector†             | Route of Administration  |
|--|----------------------|---|---------------------|--|
| 2003: approval of recombinant human p53 adenovirus for injection (Gendicine, Sibiono GeneTech)                         | NMPA                 | Head and neck squamous-cell carcinoma   | Ad-p53              | Intratumoral injection; intracavity or intravascular injection |
| 2012: approval of alipogene tiparovec (Glybera, uniQure)   | EMA‡                 | Lipoprotein lipase deficiency   | AAV1-LPL            | Intramuscular injection  |
| 2015: approval of talimogene laherparepvec (Imlygic, Amgen)  | EMA and FDA          | Melanoma  | HSV-GM-CSF          | Intratumoral injection   |
| 2016: approval of autologous CD34+ cells encoding adenosine deaminase cDNA sequence (Strimvelis, Orchard Therapeutics) | EMA                  | Adenosine deaminase-deficient SCID  | RV-ADA              | Transplantation of autologous gene-modified CD34+ cells        |
| 2017   |                      |   |                     |  |
| Approval of tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis)   | FDA                  | Patients younger than 25 yr of age with relapsed or refractory ALL  | LV-CD19             | Intravenous infusion of autologous gene-modified T cells       |
| Approval of axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kite Pharma)  | FDA                  | Certain types of non-Hodgkin's lymphoma   | RV-CD19             | Intravenous infusion of autologous gene-modified T cells       |
| Approval of voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna, Spark Therapeutics)  | FDA                  | Biallelic RPE65-associated retinal dystrophy  | AAV2-RPE65          | Subretinal injection   |
| 2018   |                      |   |                     |  |
| Approval of tisagenlecleucel (Kymriah)   | EMA                  | Patients younger than 25 yr of age with relapsed or refractory ALL  | LV-CD19             | Intravenous infusion of autologous gene-modified T cells       |
| Approval of axicabtagene ciloleucel (Yescarta)   | EMA                  | Certain types of non-Hodgkin's lymphoma   | RV-CD19             | Intravenous infusion of autologous gene-modified T cells       |
| Review of gene-therapy IND applications in United States streamlined to single reviewing agency, the FDA               | FDA and NIH          | —   | —                   | —  |
| Approval of voretigene neparvovec (Luxturna)   | EMA                  | Biallelic RPE65-associated retinal dystrophy  | AAV2-RPE65          | Subretinal injection   |
| 2019   |                      |   |                     |  |
| Conditional approval of autologous CD34+ cells encoding $\beta^{A-T87Q}$ -globin gene (Zynteglo, Bluebird Bio)         | EMA                  | Patients older than 12 yr of age with transfusion-dependent $\beta$ -thalassemia without $\beta^0/\beta^0$ genotype | LV- $\beta$ -globin | Transplantation of autologous gene-modified CD34+ cells        |
| Approval of onasemnogene abeparvovec-xioi (Zolgensma, AveXis)  | FDA                  | Patients younger than 2 yr of age with spinal muscular atrophy  | AAV9-SMN1           | Intravenous infusion   |

\* ALL denotes acute lymphoblastic leukemia, cDNA complementary DNA, EMA European Medicines Agency, FDA U.S. Food and Drug Administration, IND investigational new drug, NIH National Institutes of Health, and NMPA National Medicine Products Administration (China).

† Vector designations indicate the type of vector (adeno-associated viral [AAV], adenoviral [Ad], herpes simplex viral [HSV], lentiviral [LV], or retroviral [RV]) and the gene transduced.

‡ Regulatory approval was allowed to lapse by the sponsor in 2017.

# Co kdybych chtěl začít používat genovou terapii v ČR?

Dle **Vyhlášky 84/2008 Sb.** (Vyhláška o správné lékařské praxi, bližších podmínkách zacházení s léčivy v lékárnách, zdravotnických zařízeních a u dalších provozovatelů a zařízení vydávajících léčivé přípravky) **je možné připravovat přípravky genové terapie** v lékárně (§3(8d)), v podtlakových bezpečnostních boxech s vertikálním laminárním prouděním **třídy čistoty vzduchu A a s odtahem mimo prostor**, které jsou umístěny v prostoru třídy čistoty vzduchu B a jsou vyhrazeny pro tento účel (§5(f)).

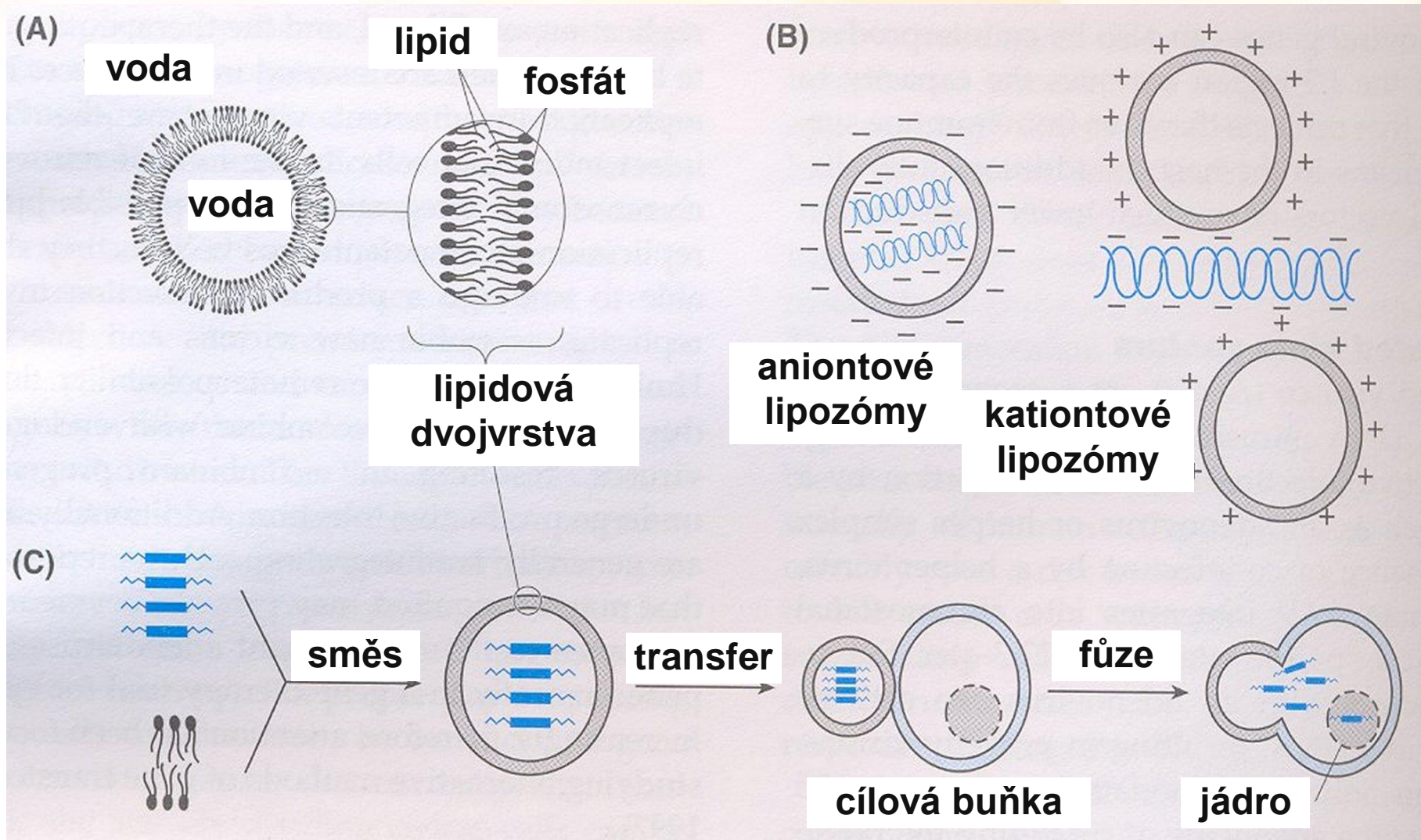


# Transfer genů do buněk nevirový

- **Endocytóza navozená receptory**
- **Transfer prostřednictvím lipozómů**
- **Přímý přenos DNA**
- **Bombardování částicemi**



# *In vivo* transfer lipozómy

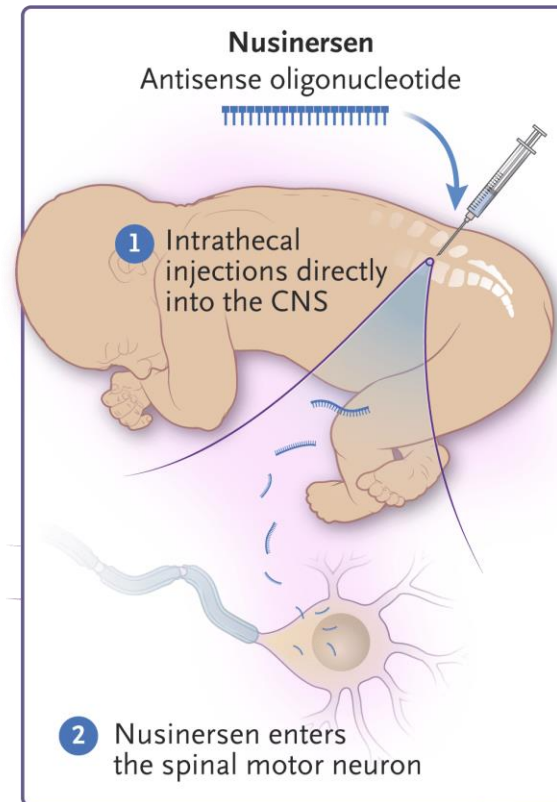
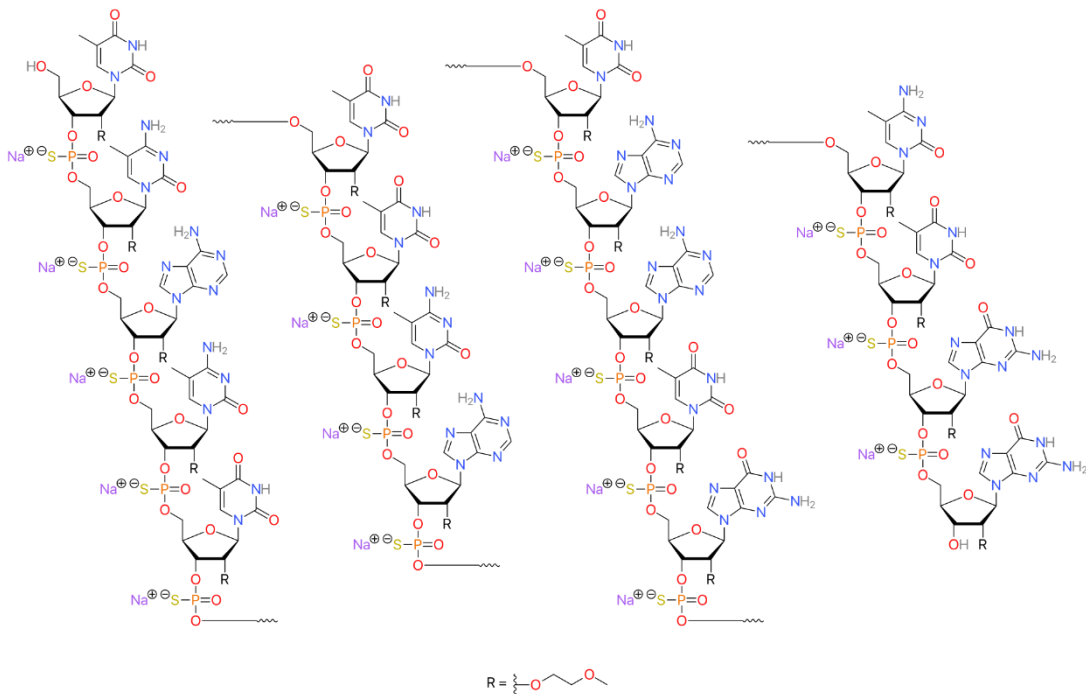




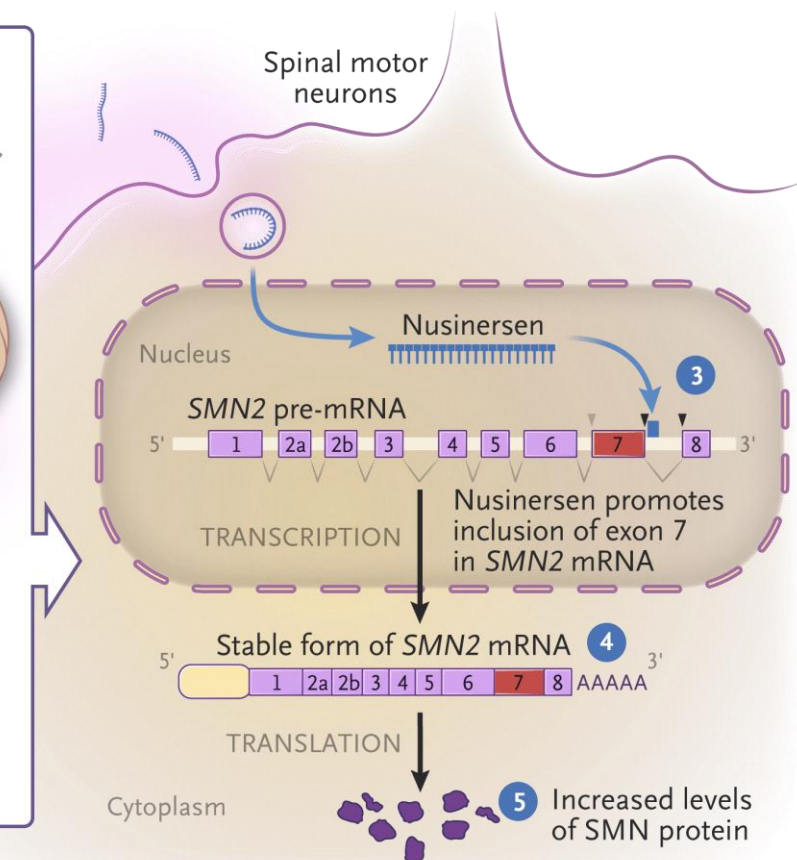
# Genová terapie SMA

## Treatment of SMA1 — Antisense Oligonucleotide

Nusinersen, an antisense oligonucleotide, is administered by intrathecal injection into the cerebrospinal fluid, which bathes the spinal motor neurons. The oligonucleotide, once inside the nucleus of the neuron, binds to the pre-messenger RNA (pre-mRNA) of *SMN2*, a gene that is almost identical to *SMN1*. This binding alters the splicing pattern, which yields a more stable form of *SMN2* mRNA and therefore enhanced levels of SMN protein, thereby slowing disease progression.

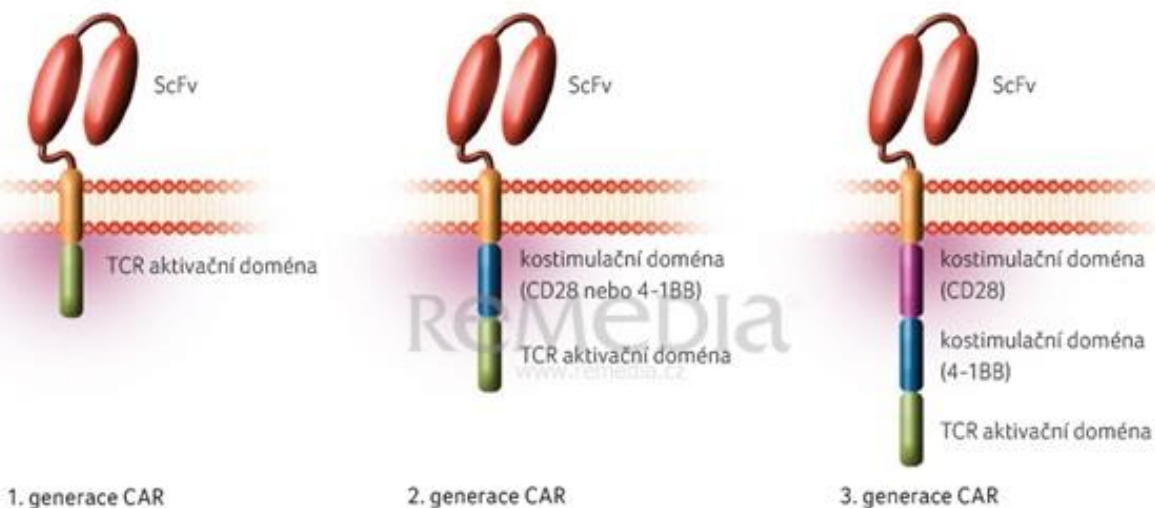


N Engl J Med 2019;381:455-64.



# CAR-T terapie

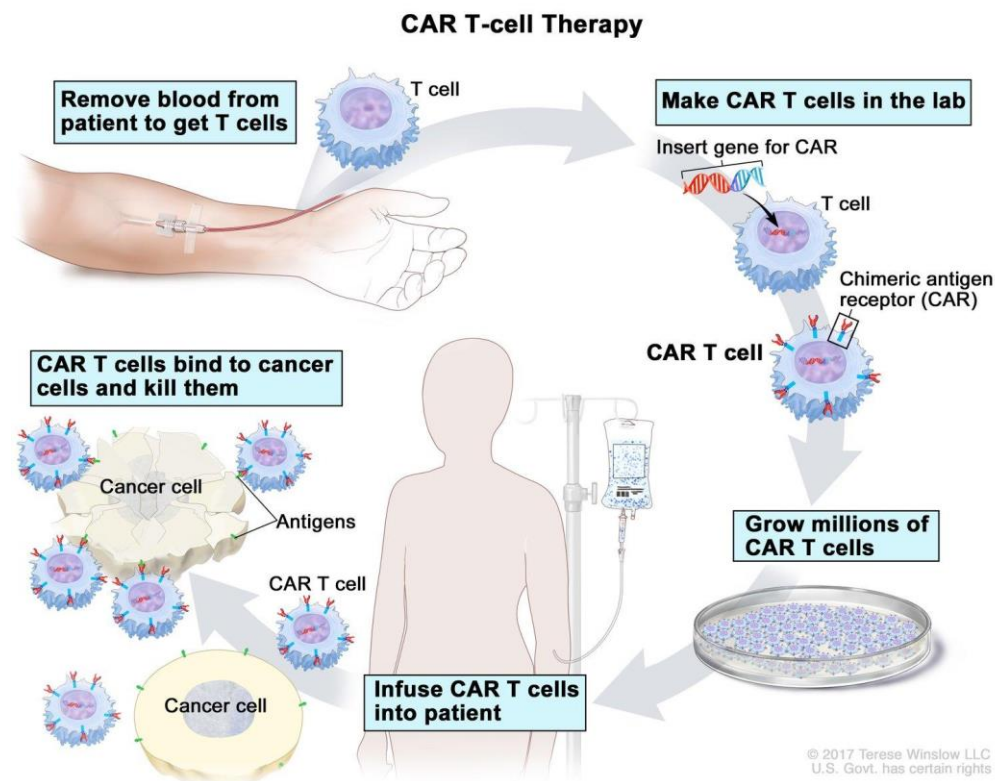
- T-buňky nesoucí **chimerický antigenní receptor (CAR)** (stabilní transfekce)
- CAR → antigen vázající doména za Ig nebo TCR + intracelulární doména pro aktivaci T-buněk
- Hlavně cílená léčba nádorů
- **Výrazná systémová toxicita a nevyjasněný „tumor-off“ efekt.**



OBR. 1 Struktura chimerického antigenního receptoru 1., 2. a 3. generace.

Klíčovou extracelulární částí je ScFv (single chain variable fragment) monoklonální protilátky zajišťující specifitu (v případě axicabtagene ciloleucelu anti-CD19). Intracelulárně jsou umístěny jedna nebo více kostimulačních domén (CD28 u axicabtagene ciloleucelu, 4-1BB u tisagenlecleucelu; obojí 2. generace) a TCR (T buněčný receptor) aktivací doména (CD3e).

CAR – chimerický antigenní receptor, chimeric antigen receptor



© 2017 Terese Winslow LLC  
U.S. Govt. has certain rights



# Příklady GT dědičných onemocnění

**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 | <i>Ex vivo</i> GAT using recombinant retroviruses containing an <i>ADA</i> gene                |
| Cystic fibrosis                         | Respiratory epithelium             | <i>In vivo</i> GAT using recombinant adenoviruses or liposomes to deliver the <i>CFTR</i> gene |
| Familial hypercholesterolemia           | Liver cells                        | <i>Ex vivo</i> GAT using retrovirus to deliver the LDL receptor gene ( <i>LDLR</i> )           |
| Gaucher's disease<br>glucocerebrosidase | Hemopoietic stem cells             | <i>Ex vivo</i> GAT using retroviruses to deliver the gene ( <i>GBA</i> )                       |

GAT, gene augmentation therapy.



# Příklady GT nádorů

| Disorder                   | Cells altered  | Gene therapy strategy   |
|----------------------------|--|---|
| Brain tumors               | Tumor cells <i>in vivo</i><br>Tumor cells <i>ex vivo</i><br>Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>                  | Implanting of murine fibroblasts containing recombinant retroviruses to infect brain cells and ultimately deliver HSV-tk gene<br>DNA transfection to deliver antisense <i>IGF1</i>  |
| Breast cancer              | Fibroblasts <i>ex vivo</i><br>Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>  | Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene<br>Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene   |
| Colorectal cancer          | Tumor cells <i>in vivo</i><br>Tumor cells <i>ex vivo</i>   | Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene<br>Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin   |
| Malignant melanoma         | Fibroblasts <i>ex vivo</i><br>Tumor cells <i>in vivo</i><br>Tumor cells <i>ex vivo</i><br>Fibroblasts <i>ex vivo</i> | Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> gene<br>Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>IL4</i> genes<br>Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin<br>Retroviruses to deliver <i>IL2</i> gene |
| Myelogenous leukemia       | 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  |
| Non-small cell lung cancer | Tumor cells<br>Tumor cells <i>in vivo</i>  | Retroviruses to deliver HSV-tk gene<br>Retroviruses to deliver antisense <i>KRAS</i>  |
| Ovarian cancer             | Tumor cells <i>in vivo</i><br>Tumor cells <i>ex vivo</i>   | Retroviruses to deliver wild-type TP53 gene<br>Retroviruses to deliver HSV-tk gene  |
| Renal cell carcinoma       | Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i><br>Tumor cells <i>ex vivo</i>  | Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene<br>Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or TNF genes   |
| Small cell lung cancer     | Fibroblasts <i>ex vivo</i>   | Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene   |
| Solid tumors               | Tumor cells <i>ex vivo</i><br>Tumor cells <i>in vivo</i>   | DNA transfection to deliver <i>IL2</i> gene<br>Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and $\beta_2$ -microglobulin  |

# Etické aspekty genových terapií

- **Bezpečnost manipulací**
- **Ověření na savčích modelech**
- **Hierarchické schvalování protokolu**
- **Nebezpečí vedlejších účinků**
- **GT zárodečných buněk**

# Nevýhody genové terapie

- **Velmi vysoká finanční náročnost**
- **Technická a technologická náročnost**
- **Nízká úspěšnost terapie, pokud jsou problémy s "uchycením" vnášené genetické informace**
- **Náhodnost vložení genetické informace = narušení protoonkogenu, tumor-supresorového genu = maligní transformace buňky**
- **Genová terapie je eticky problematická**



# Rizika genové terapie

- Inzerční mutageneze – integrace vektoru do genomu může narušit funkci původní DNA
- Při *in vivo* přístupu může vzniknout imunitní reakce na použitý virový vektor

**Table 1.** Potential and Observed Complications of Gene Therapy.\*

| Complication   | Clinical Presentation  | Vector                                  | Evidence   |
|--|--|---|--|
| Gene silencing   | Gradual loss of gene expression without evidence of immune response  | —                                       | Theoretical; not reliably described clinically   |
| Genotoxicity: integration events and insertional mutagenesis                         | Development of leukemia or solid tumors  | Retroviral                              | Documented in studies of gene therapy for X-linked SCID, <sup>1,2</sup> Wiskott–Aldrich syndrome, <sup>3</sup> and chronic granulomatous disease <sup>4</sup>  |
| Phenotoxicity: overexpression or ectopic or dysregulated expression of the transgene | Dependent on transgene, tissue in which transgene is expressed, or both  | —                                       | Theoretical  |
| Immunotoxicity   | Dependent on tissue transduced — for example, elevated aminotransferase levels when liver is transduced or elevated creatine kinase levels when muscle is transduced | More likely with AAV (in vivo delivery) | Documented in experiments involving muscle <sup>5</sup> and trials of treatment for hemophilia, <sup>6,7</sup> spinal muscular atrophy, <sup>8</sup> Leber's hereditary optic neuropathy, <sup>9</sup> and retinal dystrophy caused by mutations in <i>RPE65</i> <sup>10</sup> |
| Horizontal transmission  | Household contacts seropositive  | AAV                                     | Not documented; vector not infectious after 72 hr <sup>11</sup>  |
| Vertical transmission  | Offspring positive for vector transgene  | More likely with AAV (in vivo delivery) | No documented cases; vector has been detected in semen transiently <sup>7,12,13</sup>  |

\* AAV denotes adeno-associated virus, and SCID severe combined immunodeficiency.



# Budoucnost genové terapie

**Záchrana života pacientů s těžkými genetickými chorobami či rakovinou**

**Zpříjemnění života mnoha dalším lidem, jejichž choroba sice není natolik závažná, ale stejně jsou odkázáni na podpůrnou terapii**

**Nutné vymezení hranice mezi tím, na co je ještě etické genovou terapii použít a na co už ne.**

**Budou v budoucnosti "děti na objednávku"? Budeme si moc určit barvu očí, vlasů či výšku našich dětí?**

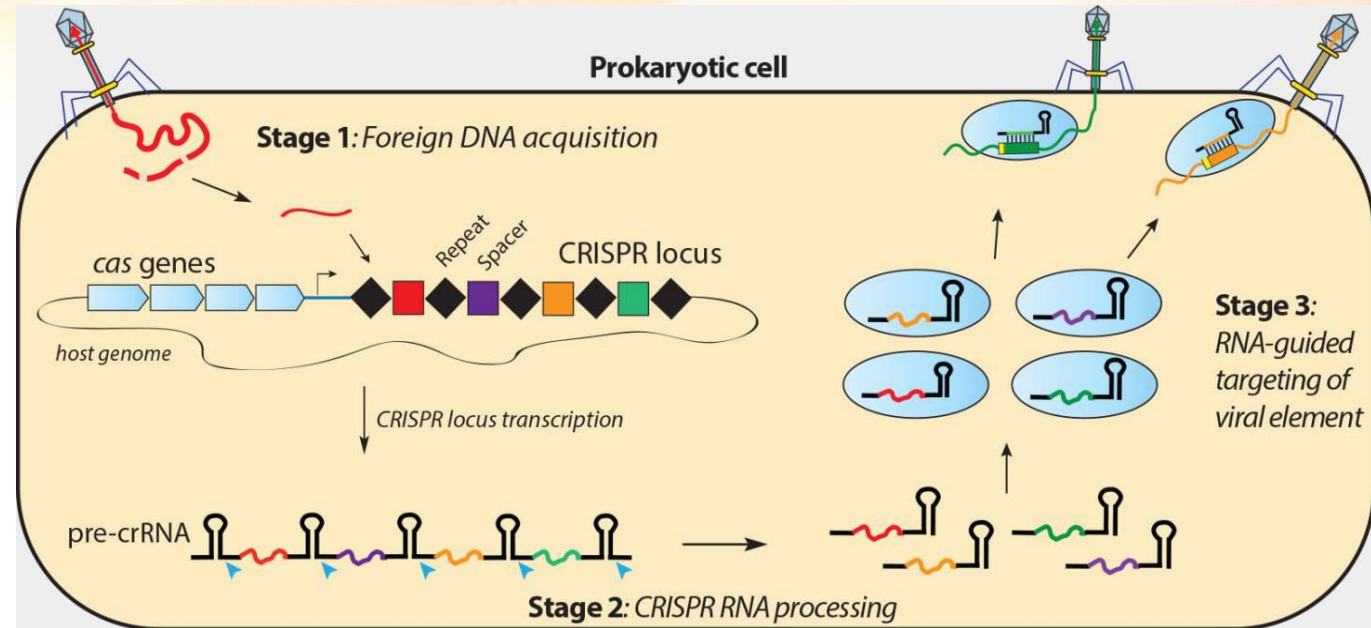
**Dočkáme se éry superlidí?**

**Stane se z genové terapie takový obchod, jakým je dnes třeba plastická chirurgie?**

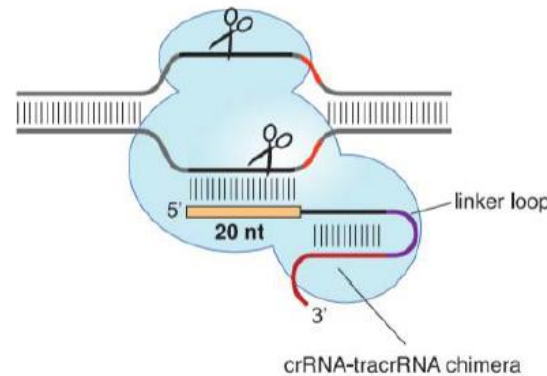
**Editace genomu (např. CRISPR/Cas9 technika) – genový knock-in, knock-out, cílená mutagenese**

# CRISPR/Cas9 technika

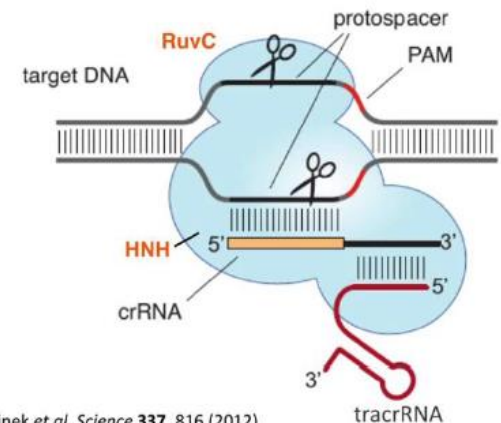
- CRISPR = Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats
- Cas9 = endonukleáza
- Prokaryotický imunitní systém, který zajišťuje rezistenci vůči cizím genetickým elementům, jako jsou plastidy nebo fágy, a představuje tedy formu získané imunity.



Cas9 programmed by single chimeric RNA



Cas9 is a dual-RNA-guided dsDNA endonuclease



# Využití CRISPR/Cas9 v GT

<https://doi.org/10.3390/horticulturae7070193>

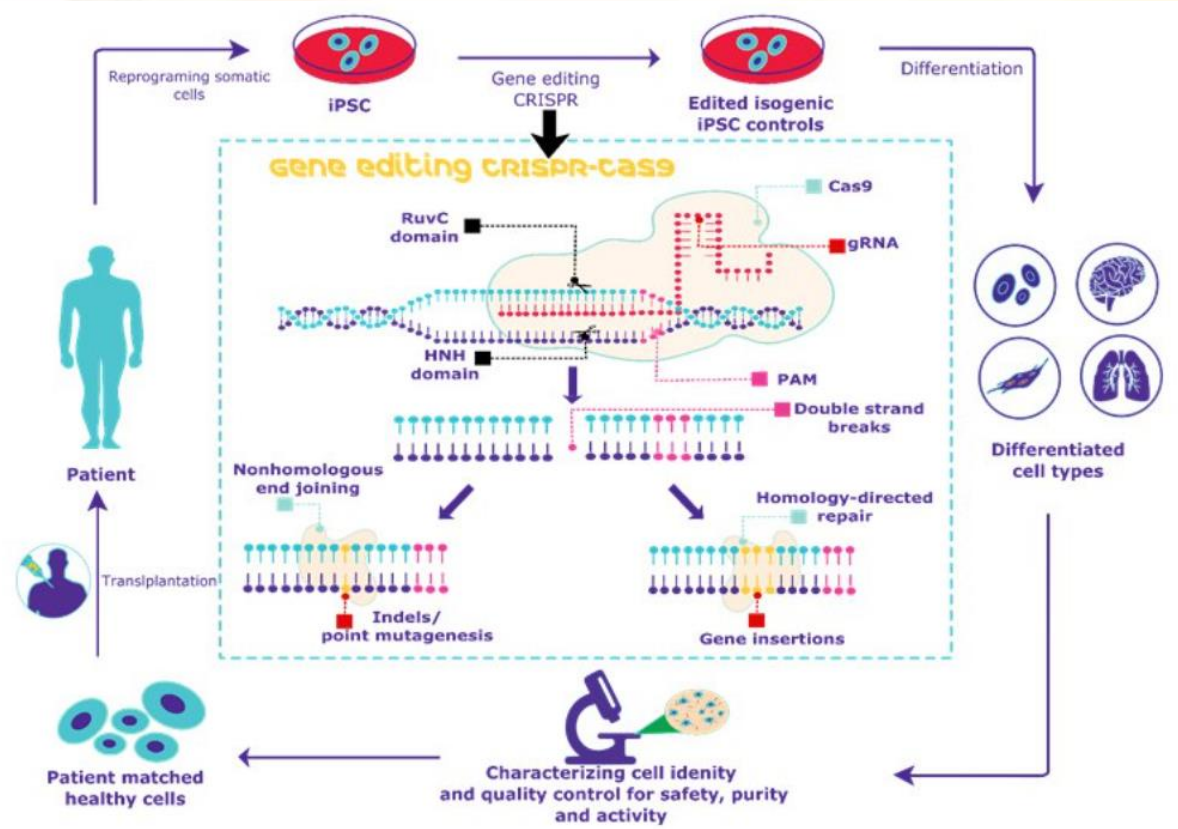
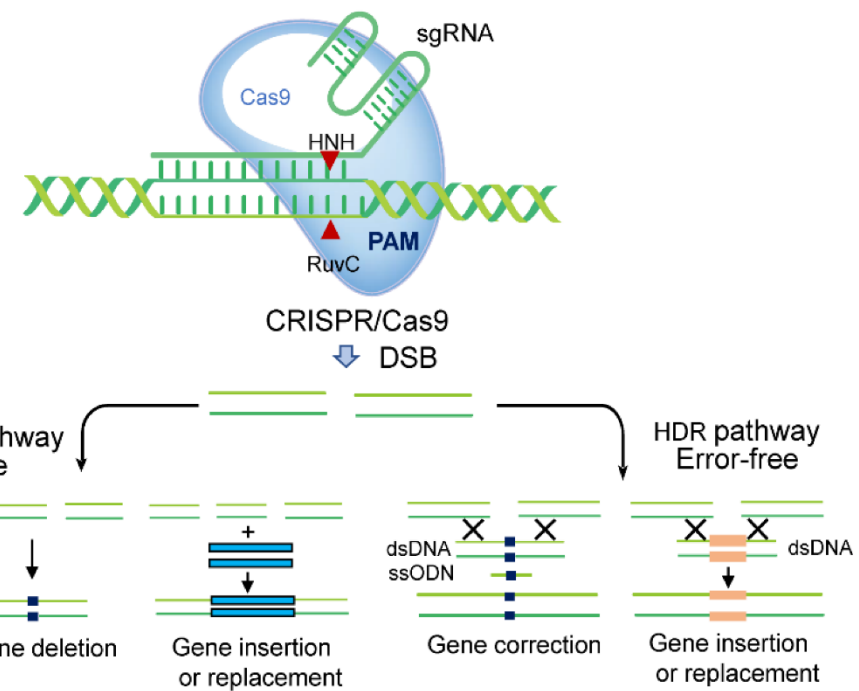


Figure 1. Overview of CRISPR gene editing of human iPSCs. Gene editing of human iPSCs using CRISPR/CAS9 allows for the generation of isogenic disease controls for stem cell research applications.

<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/advanced-gene-editing/human-ipsc-crispr-protocol>

<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

