



# Genová terapie

Regulární biologie a genového inženýrství

# Terapeutické zásahy při léčbě chorob

na úrovni fenotypu

včetně různých typů lékařských zásahů včetně chirurgických  
a odstranění abnormálních metabolitů

– odstranění substrátu, který není dále metabolizován

– odstranění substrátů, které jsou vylučovány v podobě kationů, anionů,

– odstranění substrátů, které jsou vylučovány v podobě koncentrace

– odstranění substrátů, které jsou vylučovány v podobě enzymů

# Terapeutické zásahy při léčbě chorob

## na úrovni mutantního proteinu

• nahrazení chybějící slabé aktivity

• nahrazení zcela nefunkčního proteinu (př. faktor VIII, enzymy, inzulín, antitoxiny, antivenery, antilymfocytární globuliny, antituberkulóza, antirakovina, antizulin)

• nahrazení chybějícího nebo poškozeného orgánu, ale i nahrazení jeho funkce

• terapie



# Genová terapie

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

Zdravotní děj

Genová terapie - kauzální terapie

Chemoterapie - symptomatická terapie

Moderní medicína

# Genová terapie

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

genový vektor

genetický materiál k léčebným účelům

inaktivace genu

# Problémy GT



• přenašečů genů, tzv. vektorů  
• různých strategií

# GT - problém vektorů

## vektory nevirové

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

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 genové pozměněné buňky

# Ideální vektor

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

... velikosti početných buněk,

... inku



# GT - problémy metodické



# GT - problémy etické

Každý návrh klinické studie  
musí být velmi bedlivě posouzen z hlediska existujících zákonů  
musí odpovídat nejnovějším poznatkům lékařské vědy

zvláště tam, kde existuje účinná alternativní léčba  
humánní použití musí být připraven podle

zákonem

musí být důkladně analyzována  
pod dohledem kontrolního orgánu dané instituce



# Současná situace GT v ČR

Humanní medicíně

# Současná situace GT v ČR

GT na experimentálních modelech se intenzivně studuje

dvě oblasti: stavu molekulární genetiky AV ČR  
stavu hematologie a krevních onemocnění

aple,



# GT – využití při léčbě

• získané choroby

## GT u zhoubných nádorů

• cílená exprese vněšeného genu

• vztah mezi genem a biologiou buňky

• význam pro diagnostiku a léčbu

• typ buňky

• gen

• nádorové terapie jiného typu

• nádorových vakcín

# GT – využití při léčbě

• získané choroby

## GT u kardiovaskulárních chorob

• terapeutická angiogeneze

• léčba ischemických postižení myokardu

• léčba ischemických postižení myokardu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří byli léčeni chirurgicky nebo katetrizací

• léčba ischemických postižení myokardu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří byli léčeni katetrizací

• léčba ischemických postižení myokardu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří byli léčeni katetrizací

• léčba ischemických postižení myokardu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří byli léčeni katetrizací

• léčba ischemických postižení myokardu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří byli léčeni katetrizací

# GT – využití při léčbě

získané choroby

## GT v léčbě diabetes mellitus

erui

o primární obnovitelných zdrojů

o specifické tkáně, která by mohla být použita jako substit

o selhávání beta-buněk pankreatu

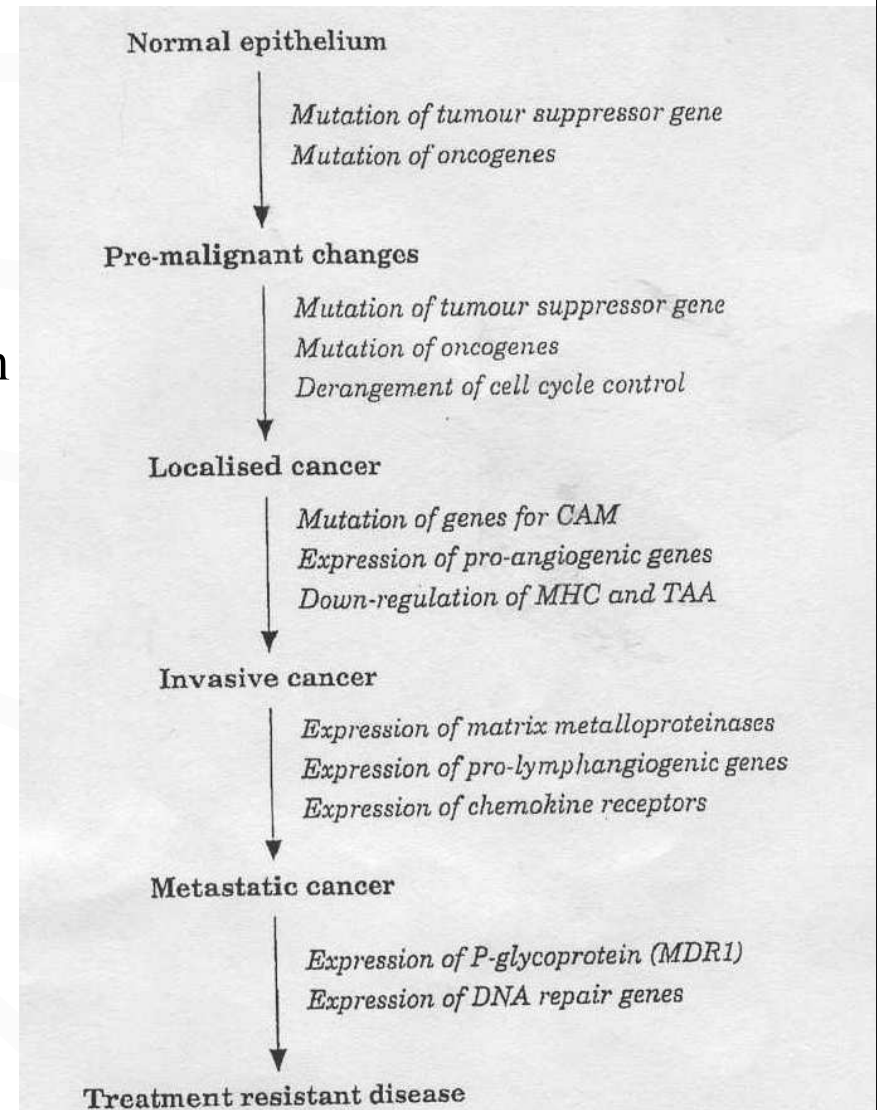
o transplantační



# 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 redukuje 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**

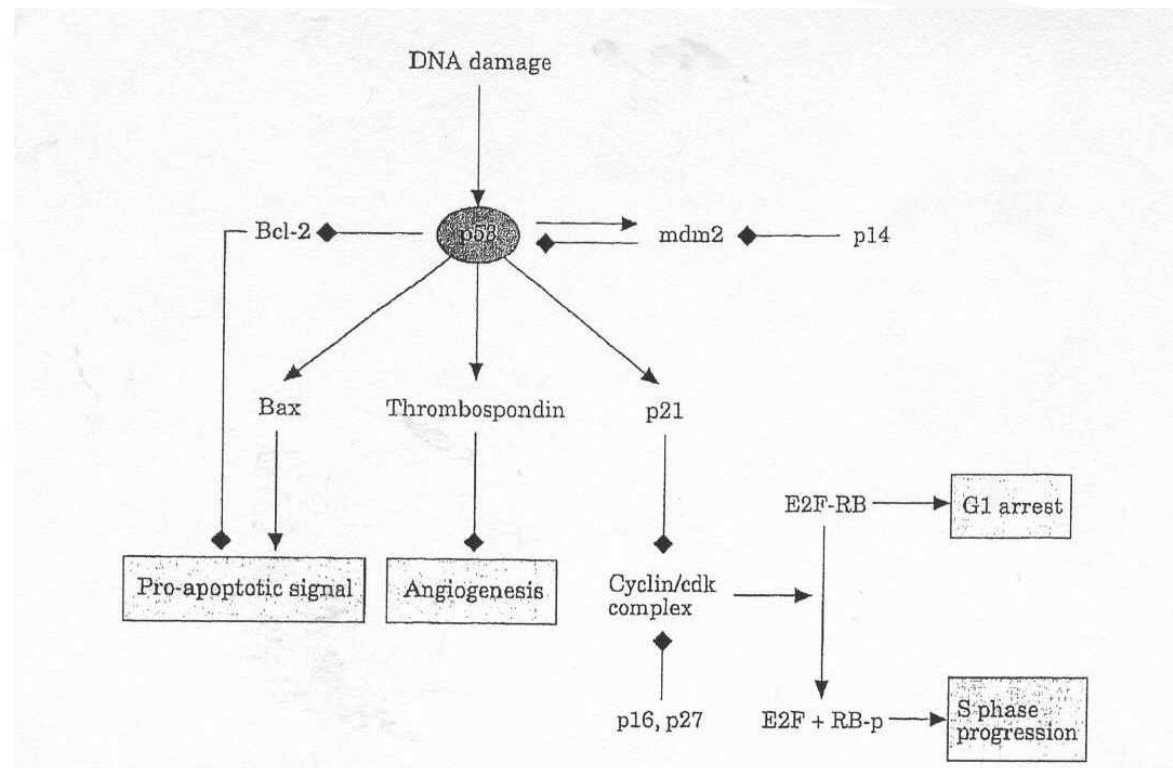
- plíce, tkáň prsu,  
kolorektal, prostata,  
pankreas, vaječník

- **mutantní p53:**

špatná prognóza

- dodání p53 genu do nádorových buněk prokázalo zvýšenou citlivost nádorových buněk k účinku

radioterapie a chermoterapie

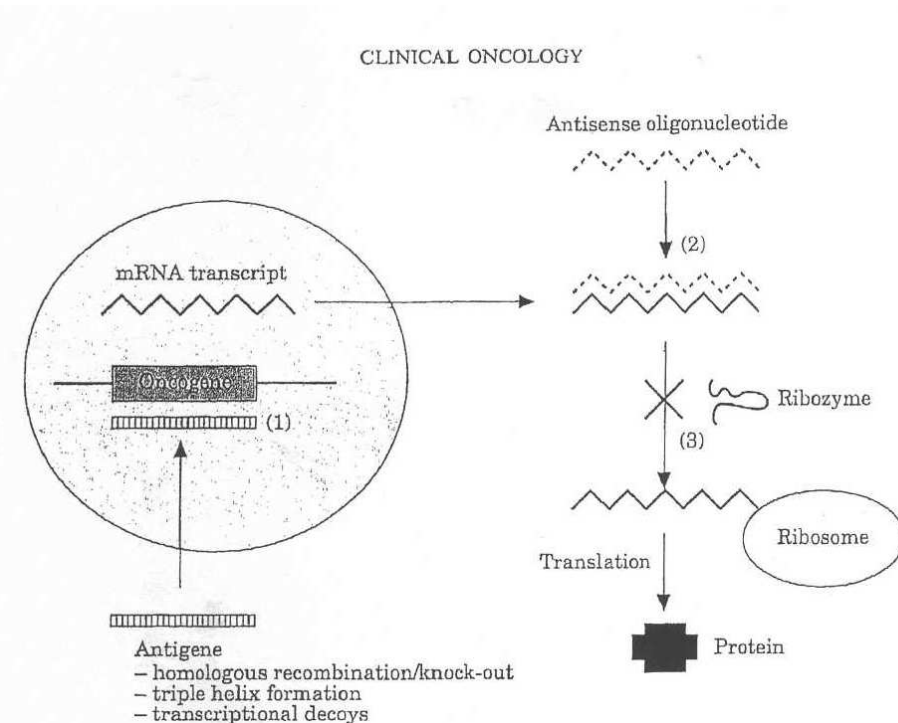


# Geny, kontrolující buněčný cyklus

- **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 cdk<sub>i</sub> 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

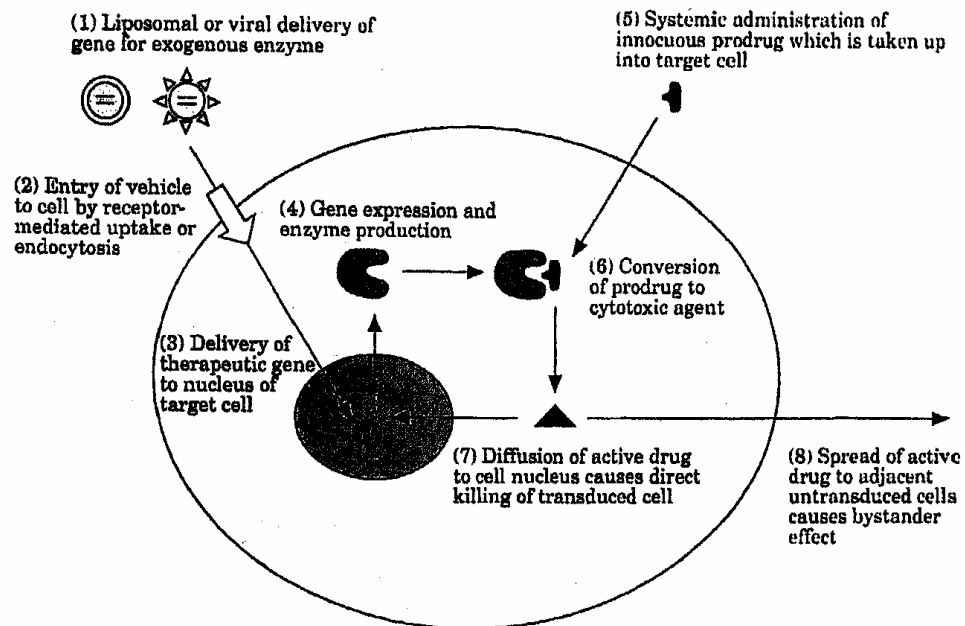


Fig. 4 – Diagrammatic representation of the key components of gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT).

# 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.

