

Genová terapie

**MUDr. Julie Bienertová
Vašků**

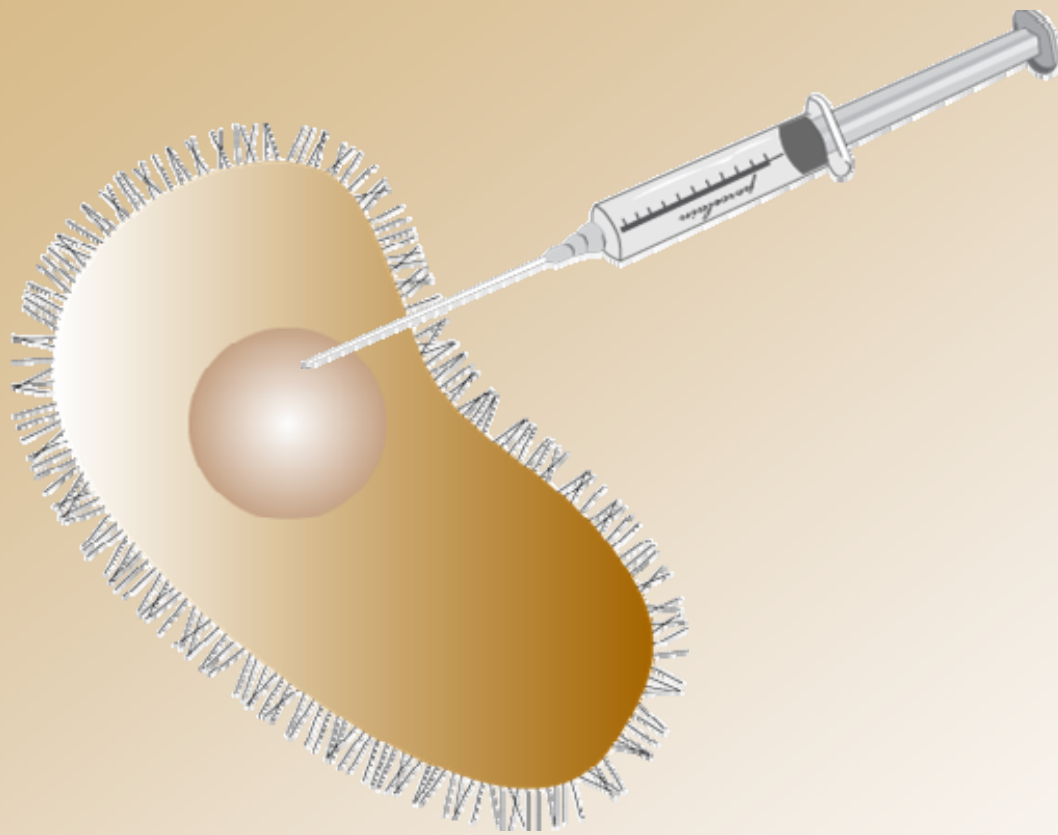
8. 12. 2006



Genová terapie

- Zahrnuje jakoukoliv proceduru, určenou k léčení nemoci genetickou modifikací buněk pacienta.
- Do buněk se transferují: geny nebo jejich části nebo oligonukleotidy.
- **Genová terapie *in vivo*:** transfer přímo do buněk pacienta
- ***In vitro*:** genové modifikace probíhají mimo organismus
- **Genová terapie *ex vivo*:** modifikované buňky se vracejí do organismu

??????



Východiska:


1. Léčba a zlepšování kvality života
 - a. dědičná i získaná onemocnění
 - b. malignity
 - c. AIDS/HIV


Dobrá zpráva: Obrovské pokroky v rekombinantní DNA technologii během uplynulých 2 dekad, parciální úspěchy při léčbě SCID


Špatná zpráva: Účinnost užívaných protokolů pro genovou terapii je diskutabilní,
technické obtíže s transferovými vektory
nedostatečné pochopení biologických interakcí mezi vektorem a pacientem (případ Jesseho Gelsingera

Genová terapie

Klasická genetická terapie

 Je potřeba dopravit geny do vhodných cílových buněk, aby bylo dosaženo optimální exprese vnesených genů s cílem:

 1. zajistit produkci látky, která chybí


 2. aktivovat buňky imunitního systému ve snaze pomoci odstranit nemocné buňky

Genová terapie

Neklasická genová terapie

 **inhibice exprese genů
asociovaných s patogenezi**

 **Korekce genetického defektu a
obnovení normální genové exprese**

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

 *Etické problémy s potenciální terapií **zárodečných mutací.***

Nosiče genetické informace

Virové

- RETROVIRY
- ADENOVIRY / ADENO ASSOCIATED VIRUS
- HERPES VIRY
- LENTIVIRY
- JINÉ

NEVIROVÉ

- RECEPTOROVĚ ZPROSTŘEDKOVANÉ
- LIPOZOMY
- PŘÍMÁ INJEKCE



Genetická onemocnění:

Typ 1: single gene onemocnění (monogenní), 100% heritabilita

příklady: **Srpkovitá anémie**
 Hypercholesterolémie
 Cystická fibróza

**Typ 2: multifaktoriální onemocnění, heritabilita není 100%,
Jsou závislé na enviromentálních faktorech a životním stylu**

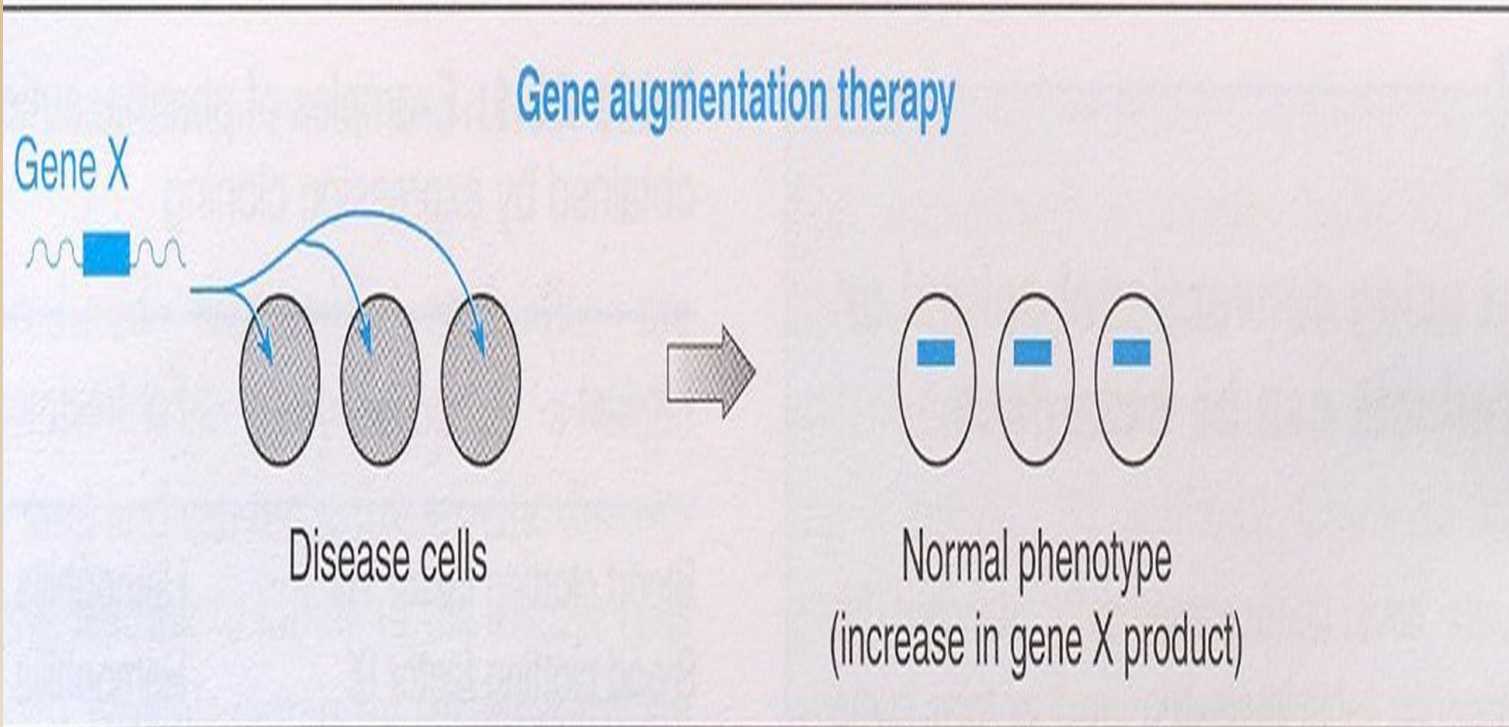
příklady: **Ischemická choroba srdeční**
 Nádorová onemocnění
 Diabetes
 Alkoholismus
 Schizofrénie

Genová terapie a jiné terapeutické molekulárně genetické přístupy

- **Rekombinantní proteiny** a „genetically engineered“ vakcíny
- **Expresní klonování** - produkty normálního genu (klonované geny) jsou exprimovány v mikroorganismech nebo u transgenních zvířat, které slouží k tvorbě velkých množství medicínsky cenných produktů
- **Geneticky vytvářené „engineered“ protilátky**- (geny pro protilátky jsou manipulovány k tvorbě nových částečně nebo plně humanizovaných protilátek) pro terapeutické použití
- **Geneticky vytvářené vakcíny** -především proti tumorům a infekčním agens.

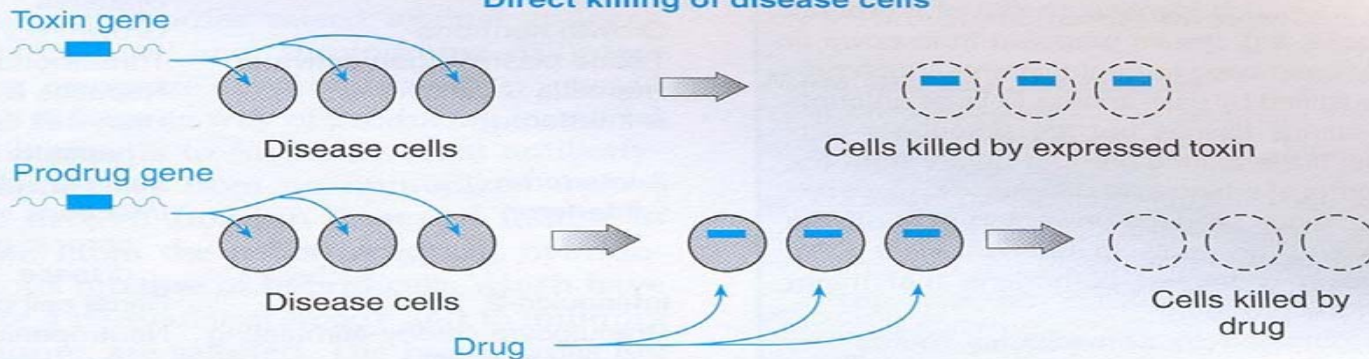
Všeobecné strategie genové terapie

22.1 Principles of molecular genetic-based therapies and treatment

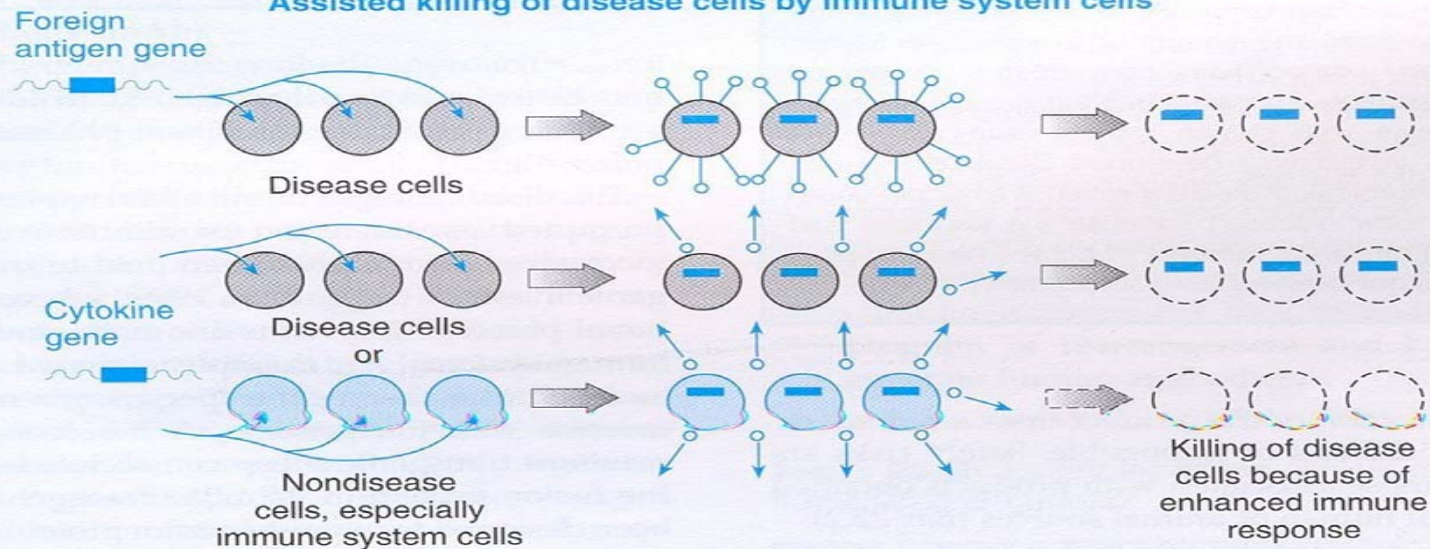


Všeobecné strategie genové terapie

Direct killing of disease cells

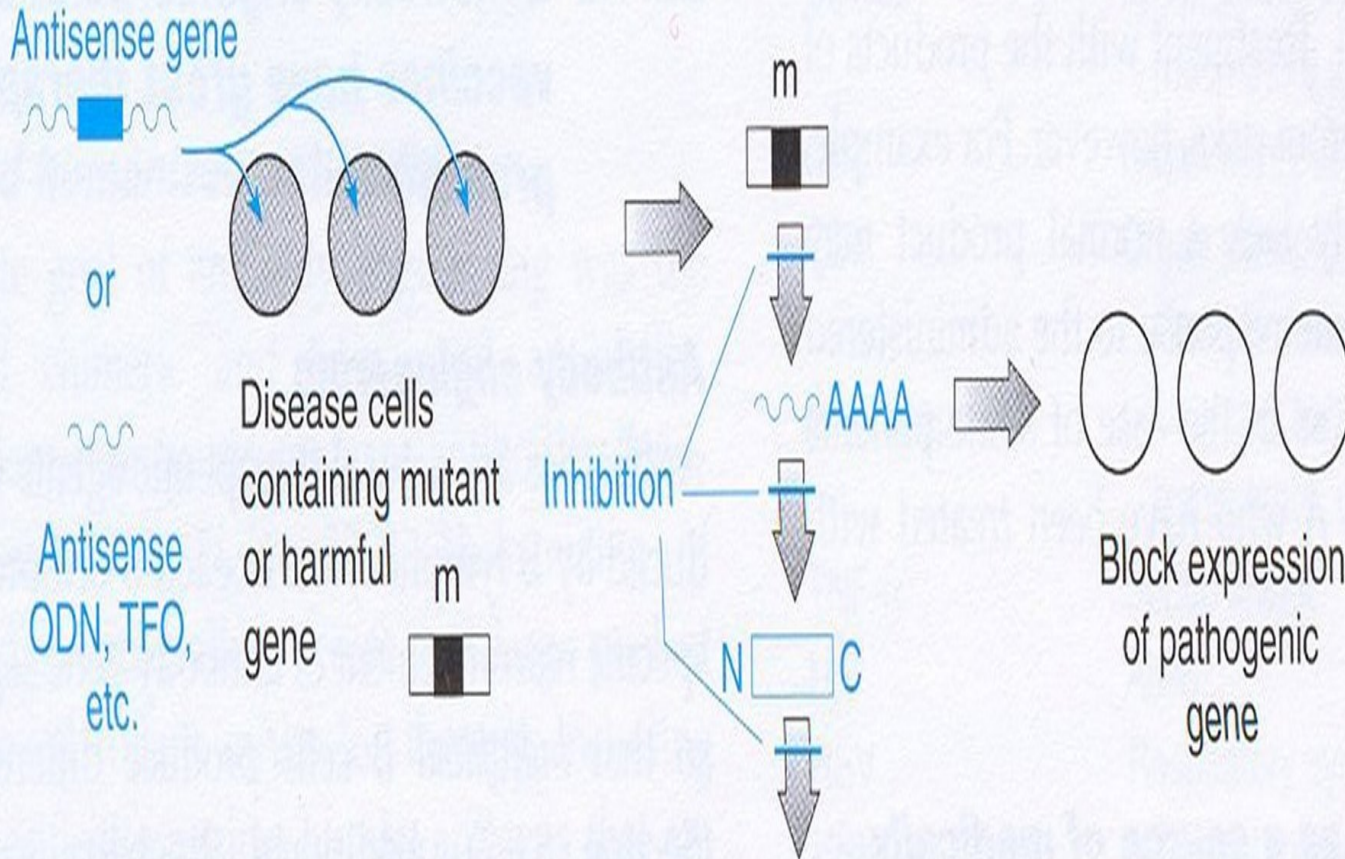


Assisted killing of disease cells by immune system cells



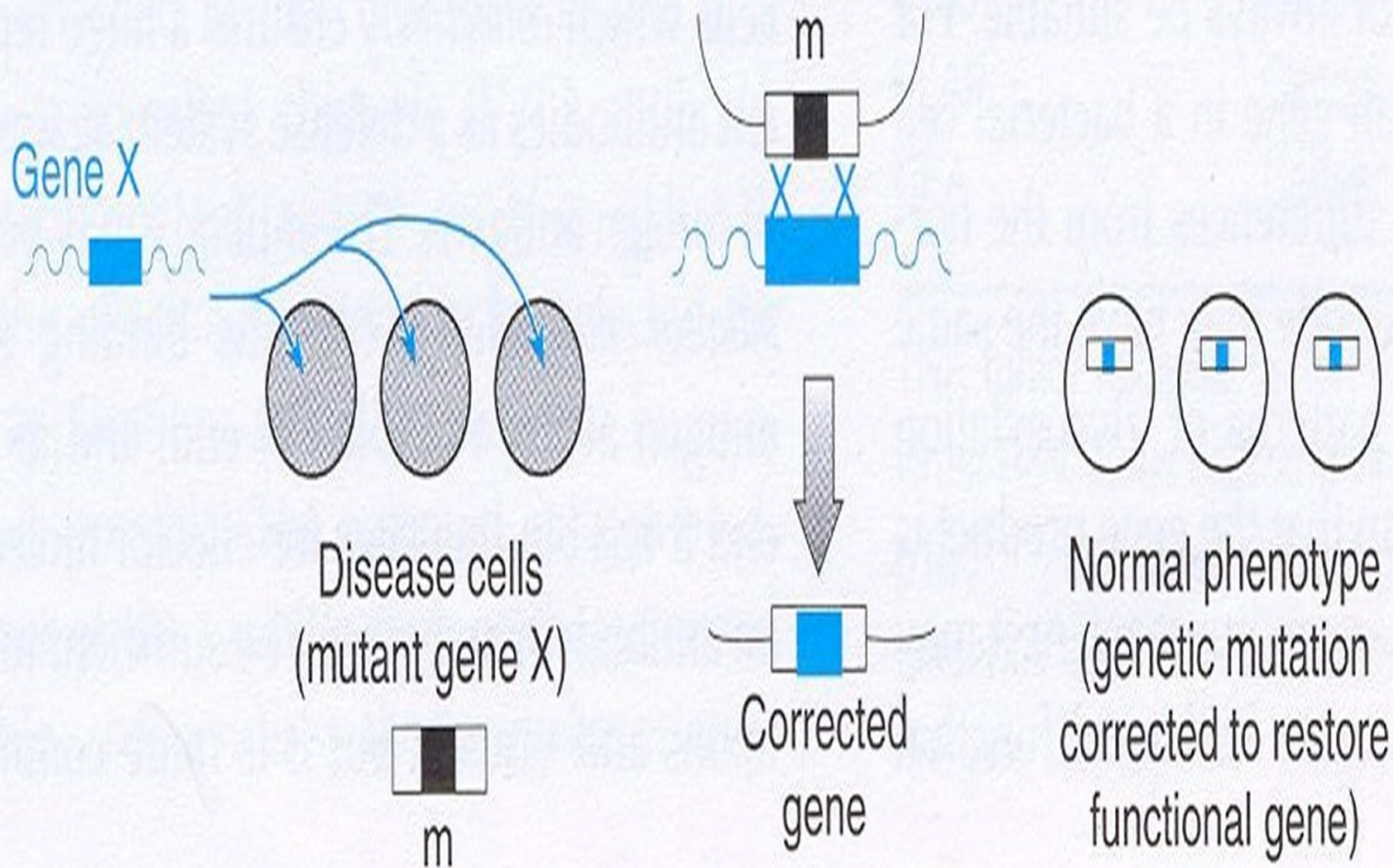
Všeobecné strategie genové terapie

Targeted inhibition of gene expression



Všeobecné strategie genové terapie

Targeted gene mutation correction



„Genetically engineered“ protilátky a vakcíny

Uměle produkované terapeutické protilátky jsou navrženy jako **monospecifické** (poznají jen jeden typ antigenního místa) a poznají specifické antigeny asociované s nemocí, což vede k zabití nemocných buněk

Typy nemocí:

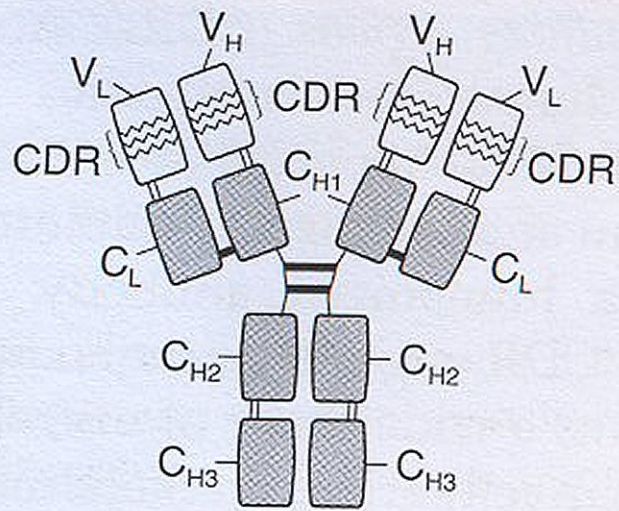
Lymfomy, leukémie, infekční nemoci, autoimunitní nemoci.

Hybridomy = heterogenní směs hybridních buněk (vzniklých fúzí), které jsou schopny produkovat specifické protilátky (B lymfocyty imunizovaného zvířete) a přitom se v kultuře neomezeně dělit (nesmrtelný myší B-lymfocytární tumor).

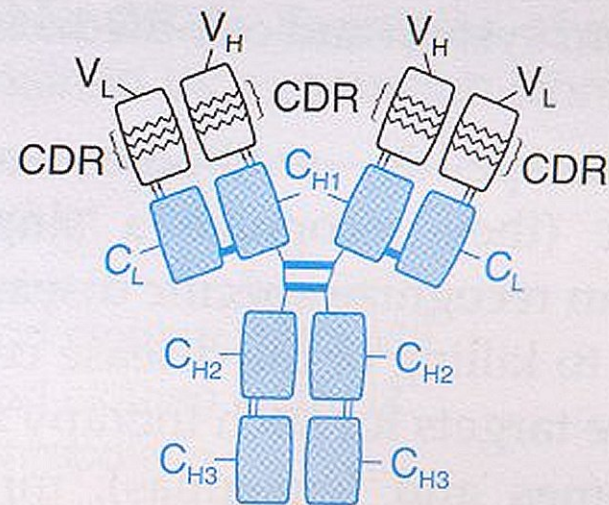
Chimerické a humanizované protilátky

- **Rekombinantní protilátky** **humánní-hlodavčí**
- **Humanizace** **hlodavčích mAb** umožňuje získat **velké množství protilátek** a zároveň **zabránit imunitní odpovědi lidského příjemce:**
 - **chimérické V/C protilátky**
 - **CDR (complementarity determining regions) graft protilátky**
 - **Infekční patogeny** a **antigeny nádorových buněk**

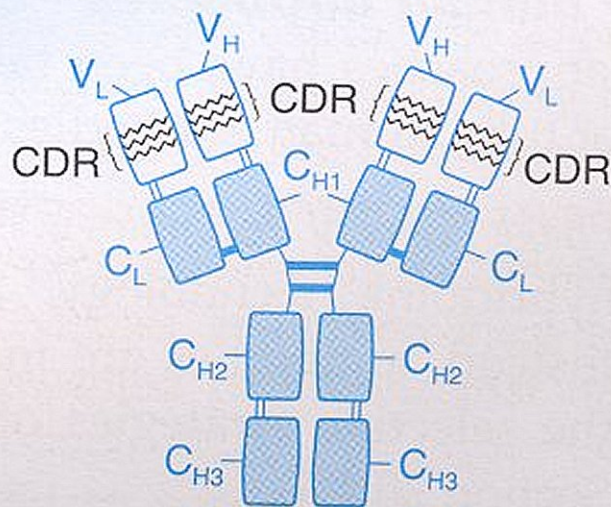




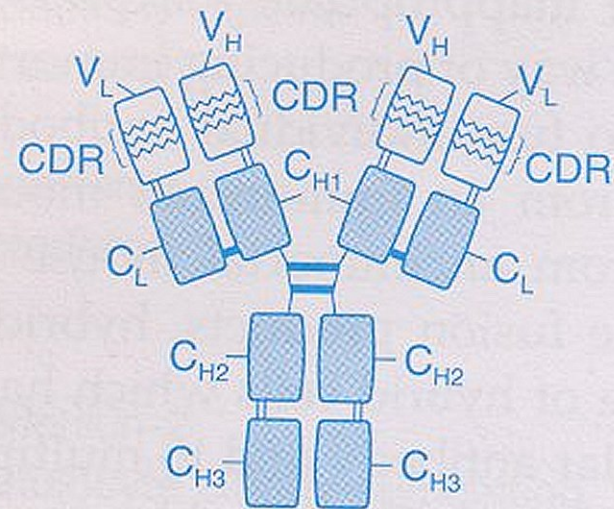
All-rodent antibody



Chimeric (V/C) antibody



Humanized antibody



Fully human antibody

Genetically engineered antibodies.

Table 22.2: Examples of the clinical potential of humanized antibodies

Target	Clinical potential
CDw52	Lymphomas, systemic vasculitis, rheumatoid arthritis
CD3	Organ transplantation
CD4	Organ transplants, rheumatoid arthritis, Crohn's disease
IL-2 receptor	Leukemias and lymphomas, organ transplants, graft-versus-host disease
TNF- α	Septic shock
HIV	AIDS
RSV	Respiratory syncytial virus infection
HSV	Neonatal, ocular and genital herpes infection
Lewis-Y	Cancer
p185 ^{HER2}	Cancer
PLAP	Cancer
CEA	Cancer

Plně lidské protilátky

■ **Technologie *fágového displaye*:** protilátky jsou tvořeny in vitro napodobováním selekční strategie imunitního systému

■ ***Transgenní myši*:** Transfer kvasinkových umělých chromozomů s velkými segmenty lidských těžkých a lehkých Ig řetězců do myších embryonálních buněk. Narozené myši obsahují velmi pozoruhodnou porci lidských V genetických segmentů a jsou schopny tvořit lidské protilátky

Geneticky „engineered“ vakcíny

- Pomocí rekombinantní technologie:
- *Vakcíny nukleových kyselin:*
- bakteriální plasmidy s geny pro patogeny nebo tumorové antigeny, podávané i.m. v solném roztoku. Obsahují silný virový promotor.
- „*gene gun*“ - zlaté perly, do nichž byla precipitována DNA

Geneticky „engineered“ vakcíny

- **Genetická modifikace antigenu** – např. fúze cytokinu s antigenem ke zvýšení antigenicity
- **Genetická modifikace virů- virové vektory**
- **Genetické modifikace mikroorganismů, které způsobí:**
 - odstranění genů nutných pro patogenezu
 - expresi exogenního genu v bakteriích nebo parazitech po jeho inzerci do těchto organismů

Technologie klasické genetické terapie

- Jedná se o zacílení buněk nemocné tkáně
- Geny mohou inzertovány do buněk pacienta *přímo a nepřím*
- Inzertované geny se mohou integrovat

intrachromozomálně
extrachromozomálně

Technologie klasické genetické terapie

- Metody k zacílení nepostižených buněk:
- *Buněčné zabíjení*, způsobené imunitním systémem- jde o podporu imunitní odpovědi namířené proti nádorovým buňkám nebo infekčním agens
- *Uvolnění genetických produktů z buněk na vzdáleném místě* (myoblasty sekretují do krve)

Genetický transfer

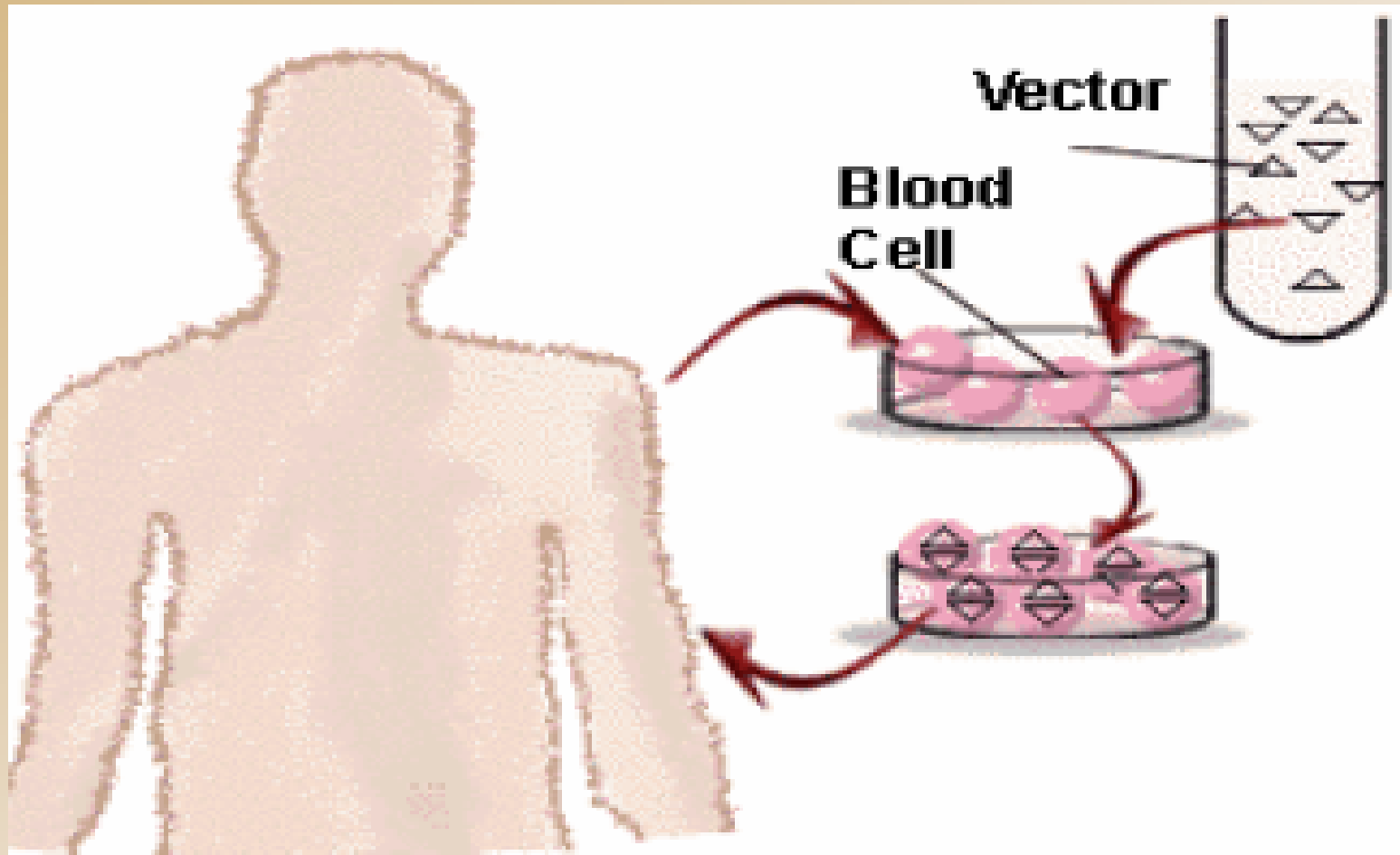
In vivo

Transfer se děje přímo do tkáně pacienta. Pomocí liposomů nebo virových vektorů.

Ex vivo

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

Ex vivo přístup



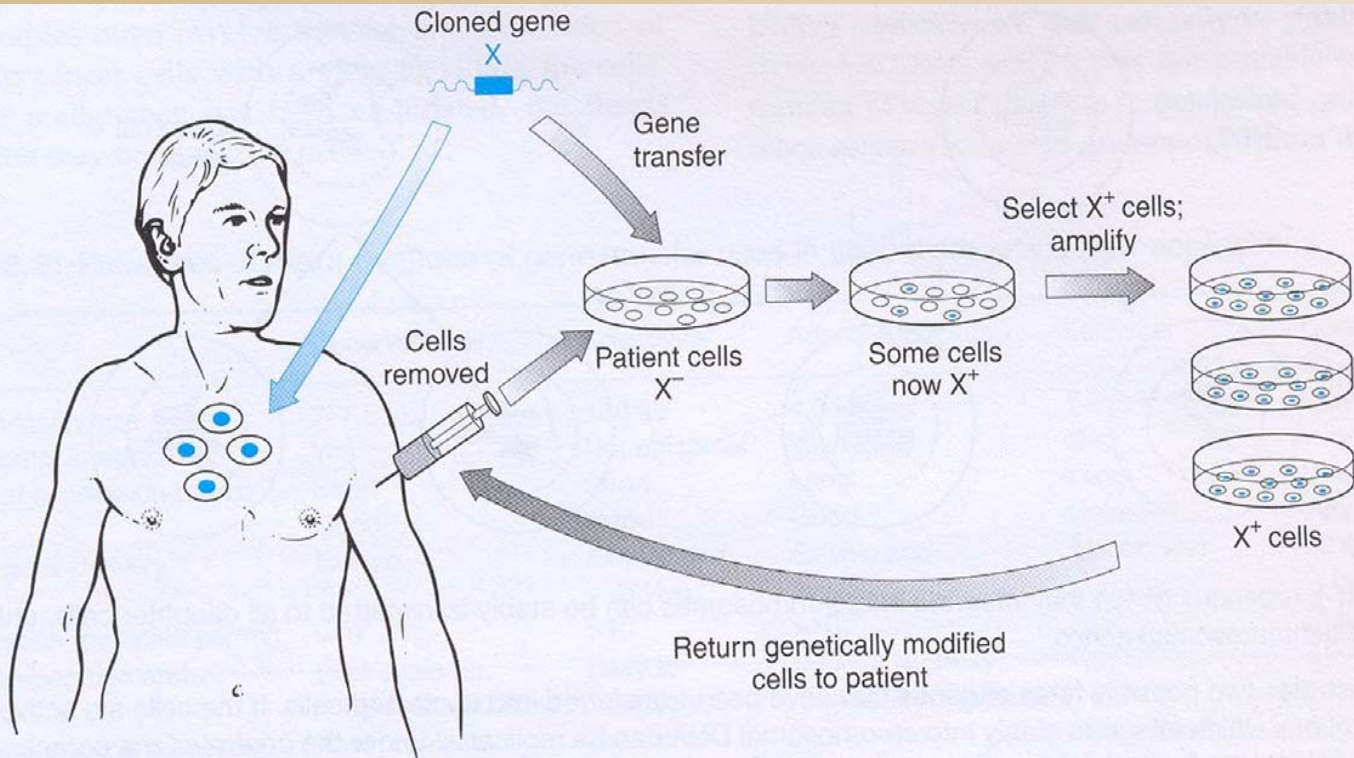


Figure 22.3: *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.

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

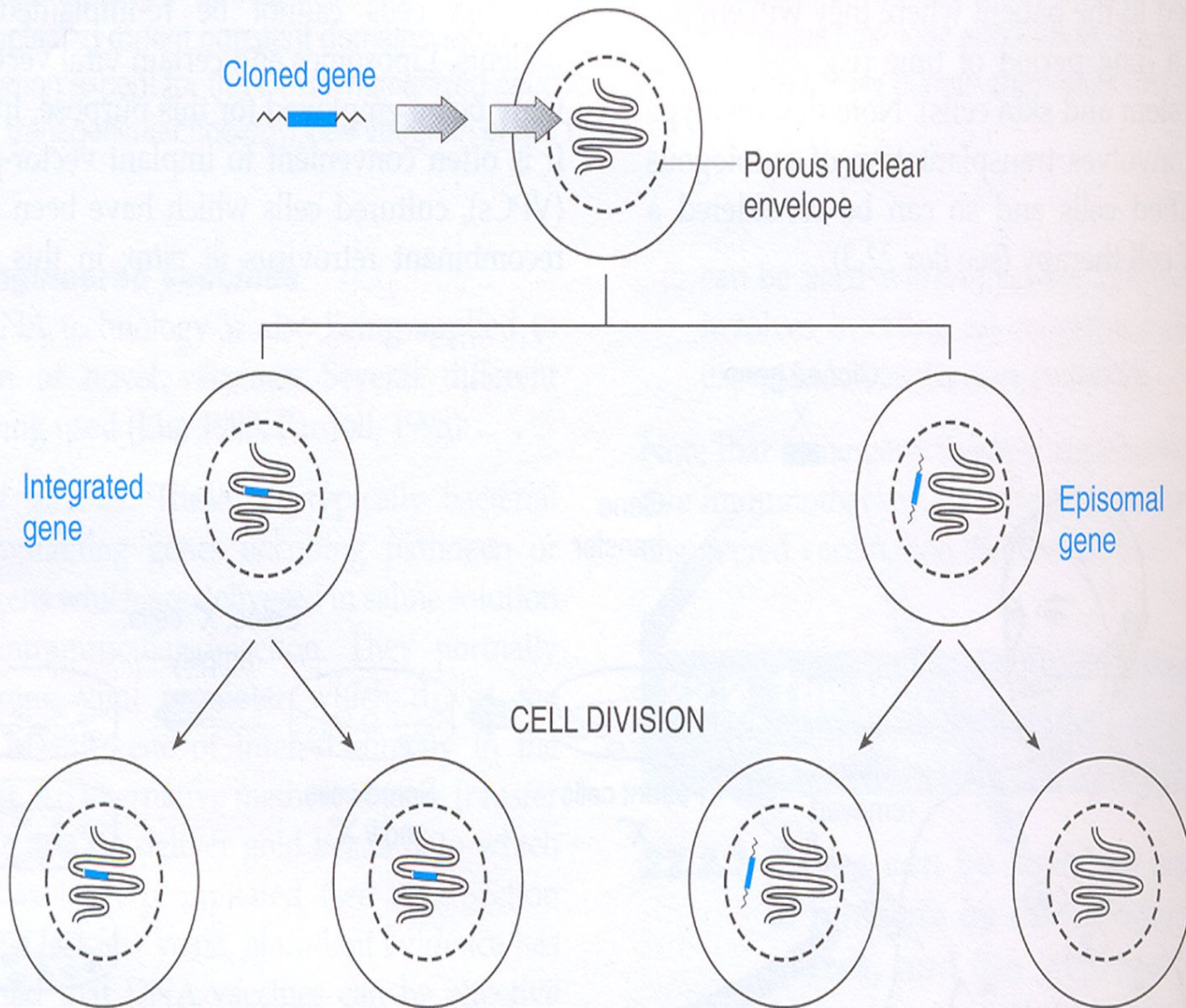
■ **A) do chromozomu**

■ gen se bude rozšiřovat do dalších buněk

■ zajištěna vysoká úroveň exprese (kmenové buňky)

■ náhodná inserce-různá lokalizace –různá úroveň exprese-smrt jednotlivé buňky-rakovina (aaktivace onkogenu, deaktivace supresorového nebo apoptotického genu-výhoda transferu ex vivo.

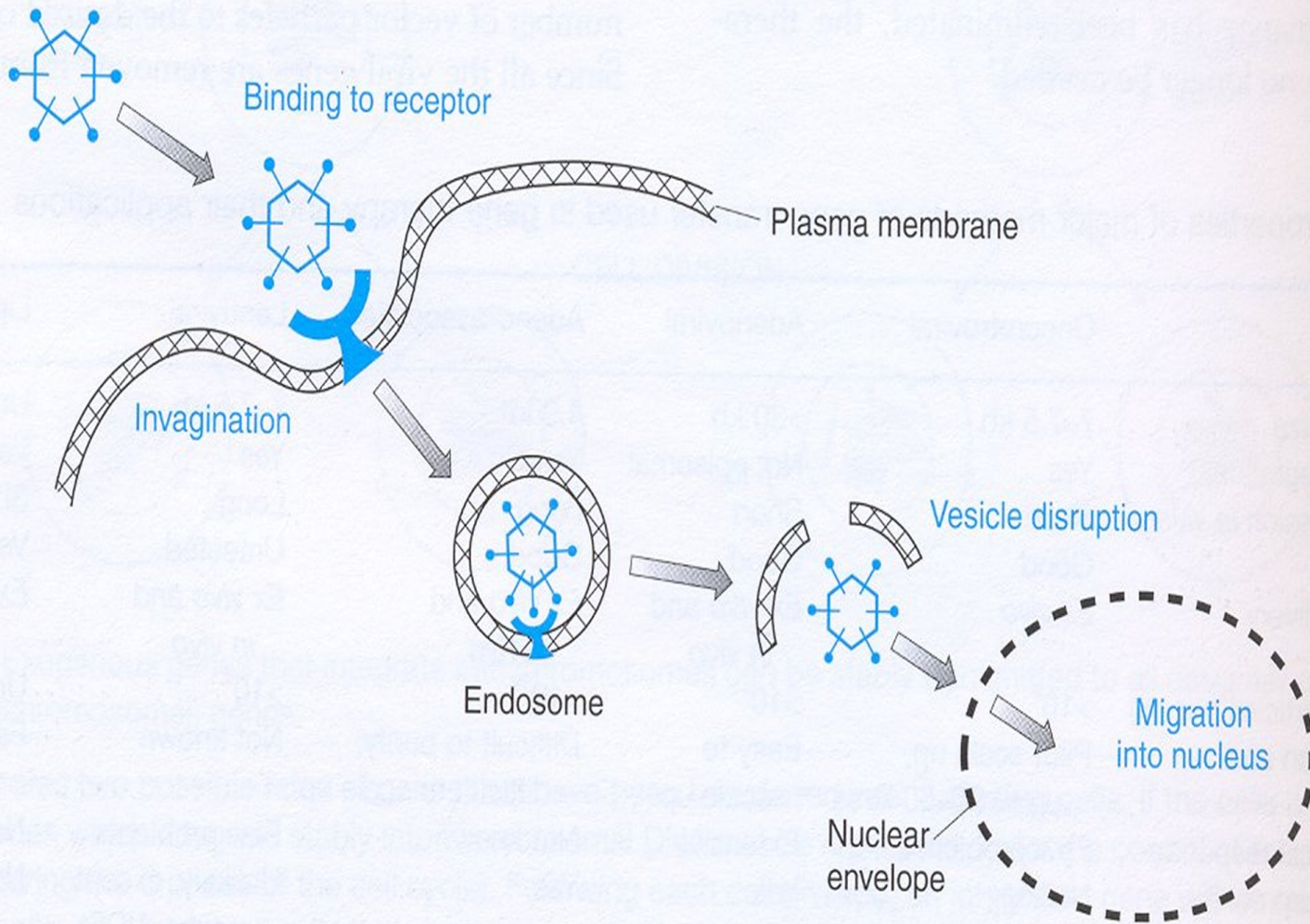
■ **B) extrachromozomálně** – nevýhoda nejistého dlouhodobého účinku



Exogenous genes that integrate into chromosomes can be stably transmitted to all daughter cells, unlike

Virové vektory

- **Onkoretrovirové** - viry s reverzně transkriptázovou funkcí, schopné syntetizovat cDNA.
- **Adenovirové** - mají přirozený tropismus k respiračnímu epitelu
- **Adeno-asociované**-neobsahují virové geny-bezpečné
- **Herpes simplex** - tropické pro CNS
- **Lentivirové** - komplexní retroviry (HIV), které napadají makrofágy a lymfocyty. Schopné transdukce do nedělicích se buněk

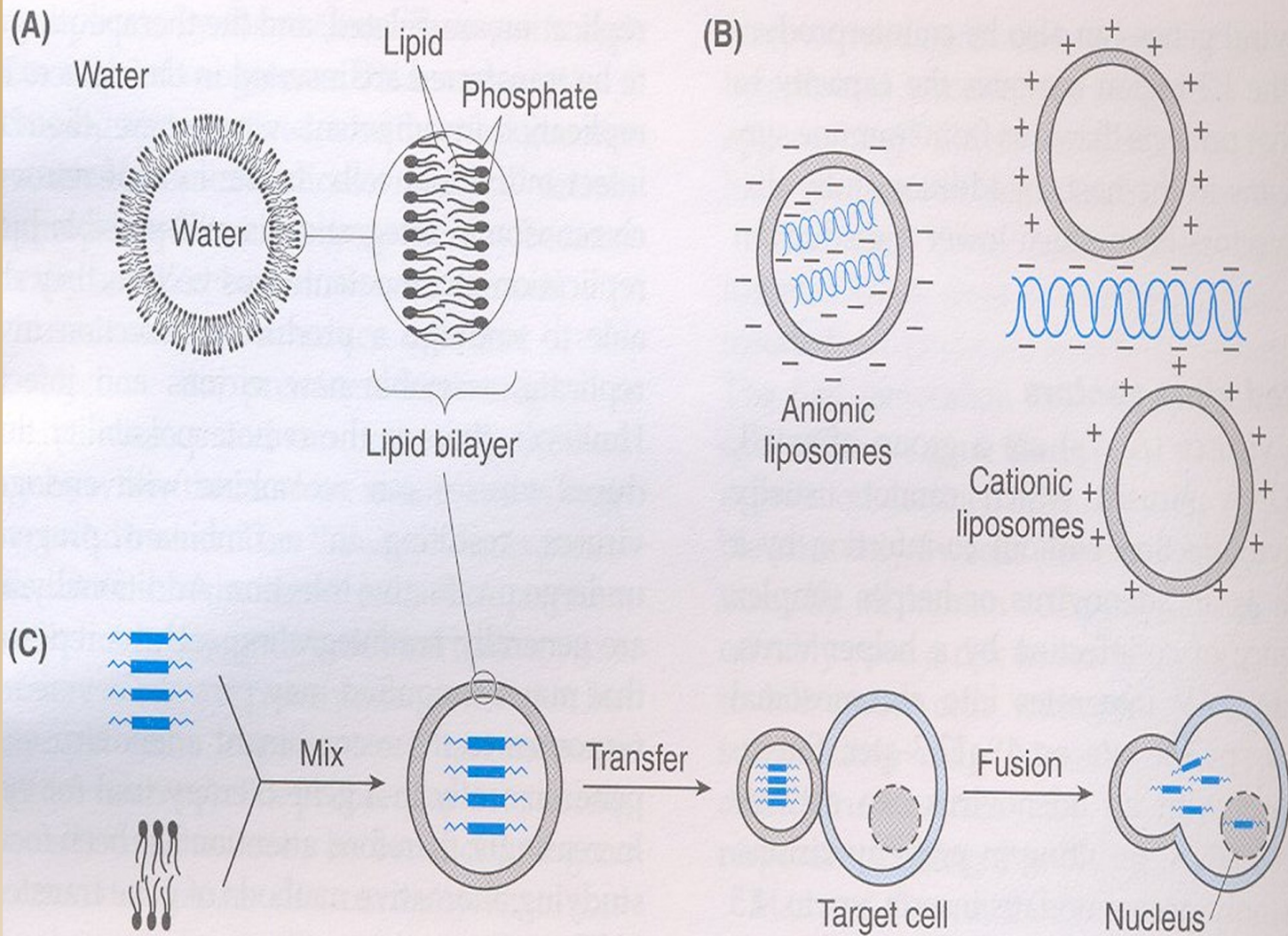


Adenoviruses enter cells by receptor-mediated endocytosis.



Lipozomy

- Sférické měchýřky složené ze syntetické lipidové dvojvrstvy, která se podobá biologickým membránám.
- DNA je zabalena, přežívá a může být endocytózou dopravena do buněk.
- *Kationtové lipozomy* - pozitivní náboj na lipozomech stabilizuje vazbu negativně nabitě DNA na povrchy lipozomů
- *Aniontové lipozomy* internalizují DNA
- Není omezena velikost transferované DNA
- Nízká účinnost transferu
- Extrachromozomální inzerce



In vivo liposome gene delivery.

Přímá injekce/ bombardování částicemi („gene gun“)

- ***Přímá injekce do tkáně*** (sval-DMD).
- ***Gene gun***: DNA je navázána na povrch kovové částice a „nastřelena“
- **Malá účinnost transferu do buňky**
- **Nízká hladina stabilní integrace**

Endocytóza řízená receptorem

- DNA se váže na cílovou molekulu, která se váže na specifický buněčný receptor, což může indukovat endocytózu a transfer DNA do buňky.
- Vazba DNA (s negativním nábojem) se uskutečňuje přes polylysin (s pozitivním nábojem) kovalentně vázaný na receptor (např. asialoglykoproteinový receptor na jaterních buňkách).

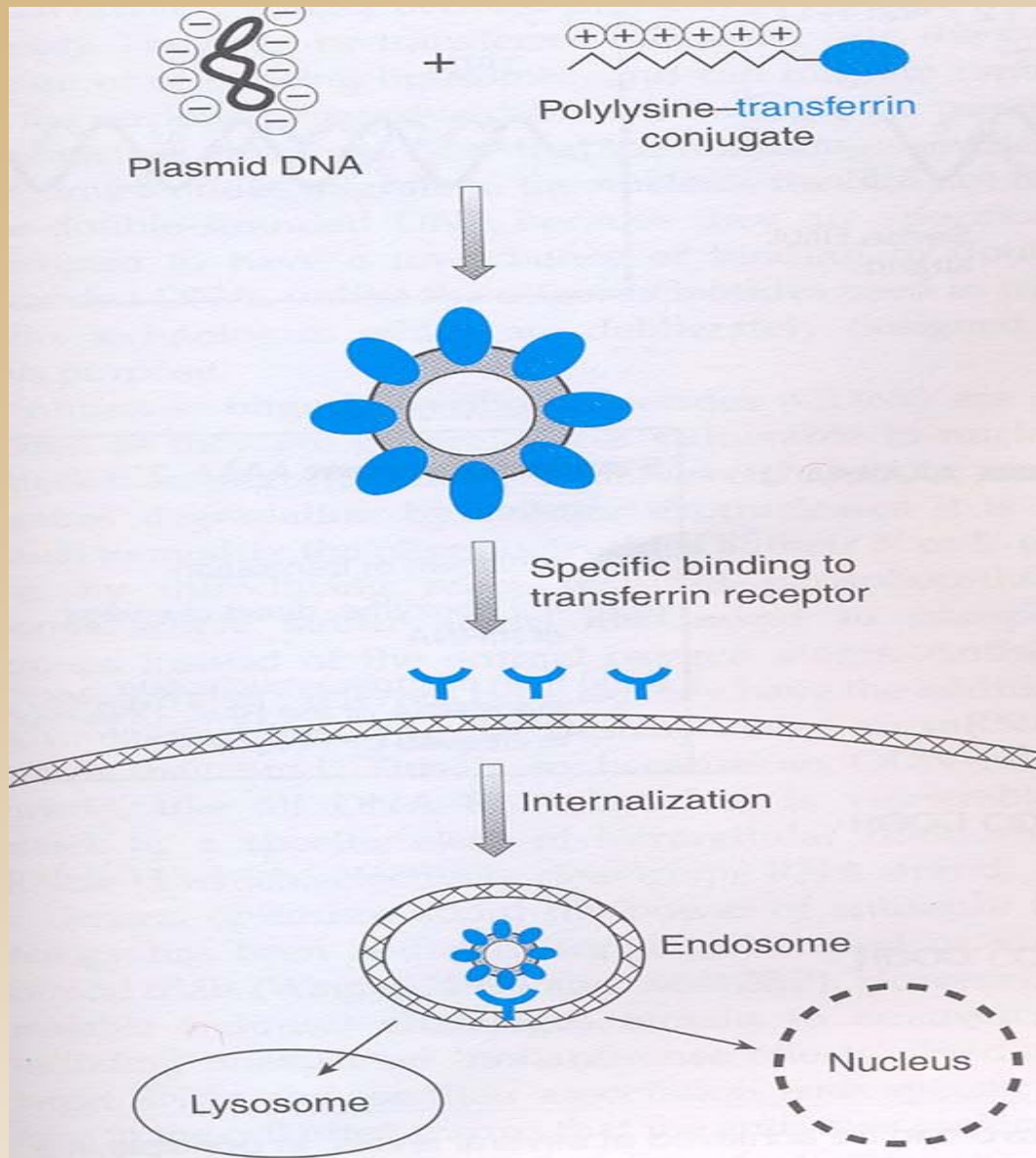


Figure 22.7: Gene transfer via the receptor-mediated endocytosis pathway.

Principy a aplikace terapie založené na inhibici genové exprese a mutační korekce in vivo

- Podstata terapie spočívá ve vyřazení exprese specifických genů, která umožňuje bujení nemocných buněk (inhibice onkogenu)
- *Alelicky specifická* inhibice genové exprese
- *Místně specifická mutageneze* in vivo
- Blokáda možná na úrovni:
 - *DNA* (blokáda transkripce)
 - *RNA* (blokáda post transkripčního processing, transportu mRNA nebo účasti mRNA na funkci ribosomů)
 - *Proteinu* (blokáda posttranslačních úprav, exportu proteinů nebo dalších kroků k funkci proteinu)

Antisense oligodeoxynukleotidy

■ Transferovány do cytoplasmy pomocí lipozomu, potom mohou migrovat do jádra buněk pasivním transportem přes jadernou membránu.

■ Vážou se specificky jen na jednovláknovou NK (=antisense) – mRNA a inhibují tak expresi příslušného genu

Peptidové nukleové kyseliny (PNAs)

- Jsou uměle konstruované- báze NK jsou přichyceny na pseudopeptidovou kostru. Normální fosfodiesterová kostra je nahrazena polyamidovou (peptidovou) složenou z 2-aminoethyl glycinových jednotek.
- PNAs jsou ve srovnání s DNA nebo RNA flexibilnější, což umožňuje stabilnější hybridizaci na DNA nebo RNA (pomocí vodíkových můstků). Jsou resistantní vůči endonukleázám.

Ribozymy

■ Některé molekuly RNA jsou schopny snižovat aktivační energii specifických biochemických reakcí a fungují tedy jako enzymy (ribozymy)

■ Dvě komponenty:

■ *Cílové rozpoznávací sekvence*

■ *Katalytická komponenta*

■ Ribonukleáza P



Látky navržené k inhibici funkce specifických polypeptidů

 **Intracelulární protilátky:**

 ***Oligonukleotidové aptamery*** – oligonukleotidy schopné vázat se na specifické místo na proteinu

 ***Mutantní proteiny***

Pro léčbu mutací typu “gain of function”.

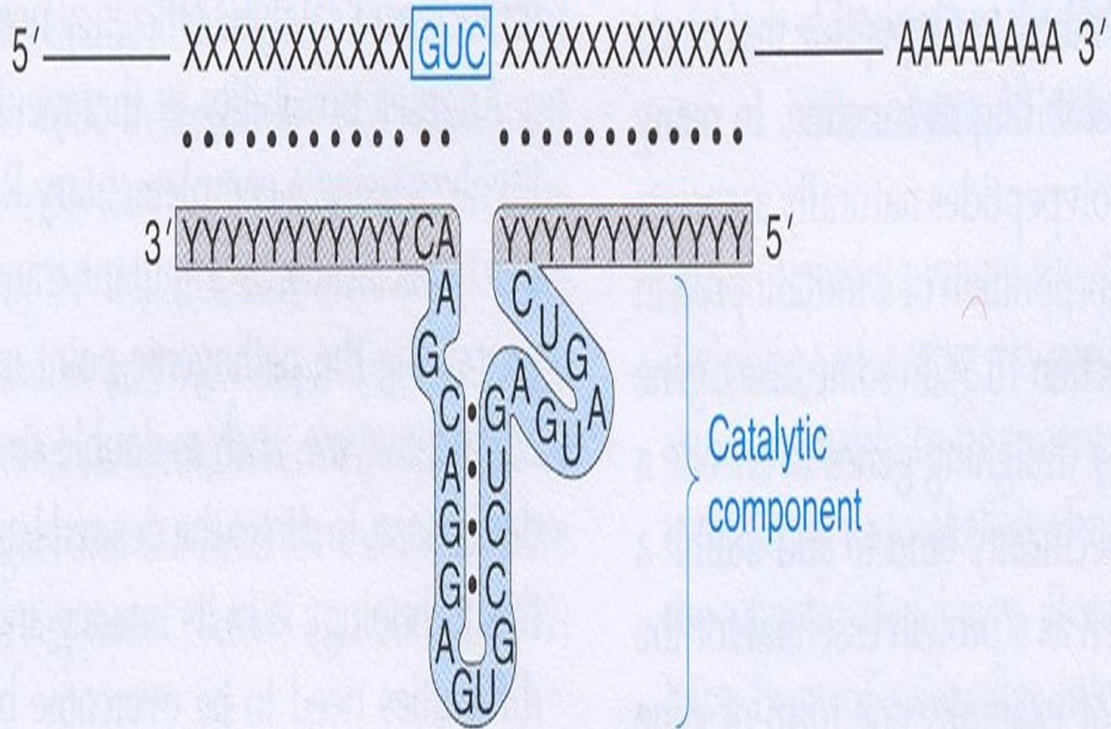


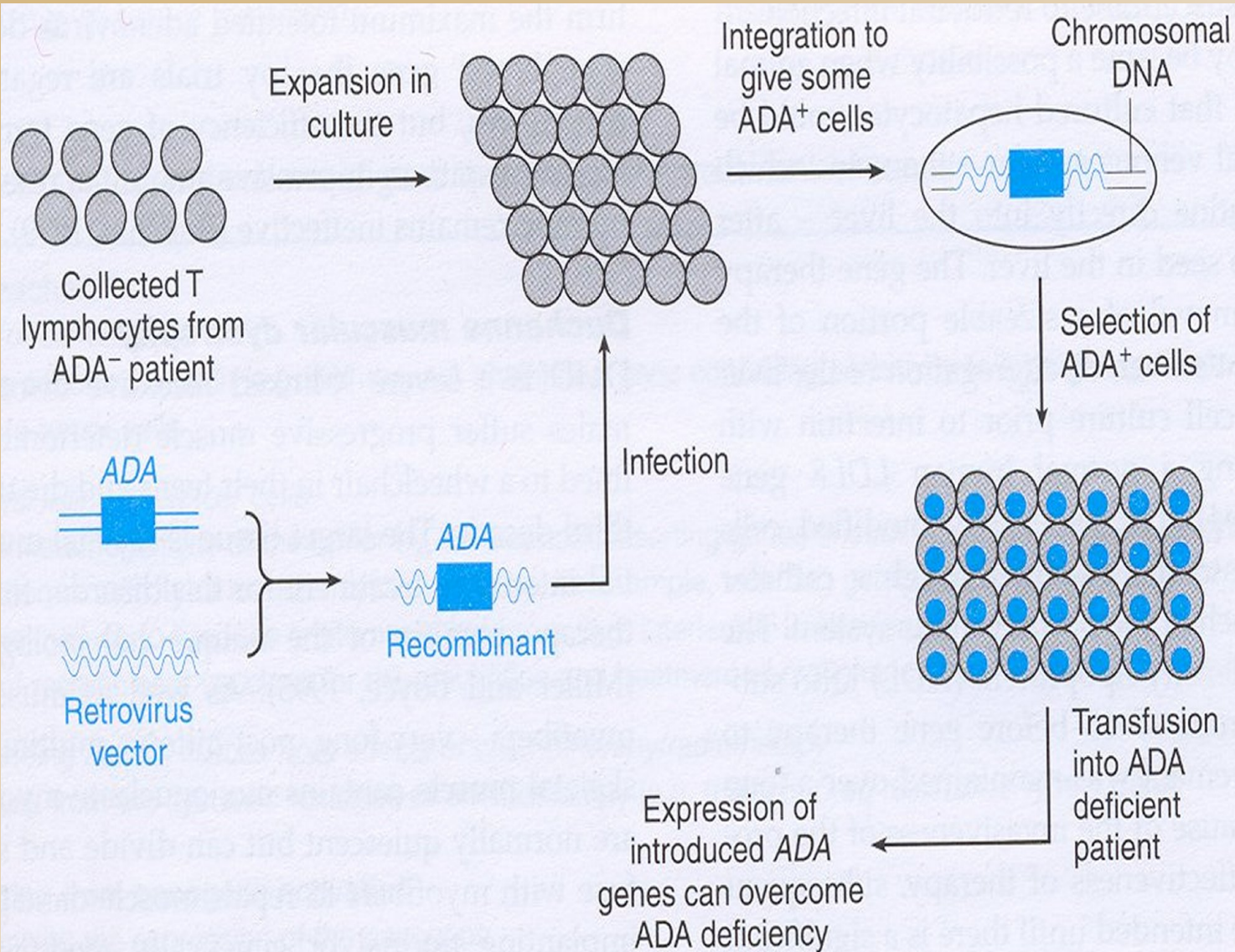
Figure 22.9: Genetically engineered hammerhead ribozymes.

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 glucocerebrosidase	Hemopoietic stem cells	<i>Ex vivo</i> GAT using retroviruses to deliver the gene (<i>GBA</i>)

GAT, gene augmentation therapy.





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

Table 22.7: Examples of cancer gene therapy trials

Disorder	Cells altered	Gene therapy strategy
Brain tumors	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i> Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Implanting of murine fibroblasts containing recombinant retroviruses to infect brain cells and ultimately deliver HSV-tk gene DNA transfection to deliver antisense <i>IGF1</i>
Breast cancer	Fibroblasts <i>ex vivo</i> Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL4</i> gene
Colorectal cancer	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin
Malignant melanoma	Fibroblasts <i>ex vivo</i> Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i> Fibroblasts <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>IL4</i> genes Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin 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 Tumor cells <i>in vivo</i>	Retroviruses to deliver HSV-tk gene Retroviruses to deliver antisense <i>KRAS</i>
Ovarian cancer	Tumor cells <i>in vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver wild-type TP53 gene Retroviruses to deliver HSV-tk gene
Renal cell carcinoma	Hematopoietic stem cells <i>ex vivo</i> Tumor cells <i>ex vivo</i>	Retroviruses to deliver <i>MDR1</i> gene Retroviruses to deliver <i>IL2</i> or <i>TNF</i> 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> Tumor cells <i>in vivo</i>	DNA transfection to deliver <i>IL2</i> gene Liposomes to deliver genes encoding HLA-B7 and β_2 -microglobulin

Table 22.6: Potential applications of gene therapy for the treatment of cancer

General approaches

Artificial killing of cancer cells

Insert a gene encoding a toxin (e.g. diphtheria A chain) or a gene conferring sensitivity to a drug (e.g. herpes simplex thymidine kinase) into tumor cells

Stimulate natural killing of cancer cells

Enhance the immunogenicity of the tumor by, for example, inserting genes encoding foreign antigens or cytokines

Increase antitumor activity of immune system cells by, for example, inserting genes that encode cytokines

Induce normal tissues to produce antitumor substances (e.g. interleukin-2, interferon)

Production of recombinant vaccines for the prevention and treatment of malignancy (e.g. BCG-expressing tumor antigens)

Protect surrounding normal tissues from effects of chemotherapy/radiotherapy

Protect tissues from the systemic toxicities of chemotherapy (e.g. multiple drug resistance type 1 gene)

Tumors resulting from oncogene activation

Selectively inhibit the expression of the oncogene

Deliver gene-specific antisense oligonucleotide or ribozyme to bind/cleave oncogene mRNA

Inhibit transcription by triple helix formation following delivery of a gene-specific oligonucleotide

Use of intracellular antibodies or oligonucleotide aptamers to specifically bind to and inactivate the oncoprotein

Tumors arising from inactivation of tumor suppressor

Gene augmentation therapy

Insert wild-type tumor suppressor gene



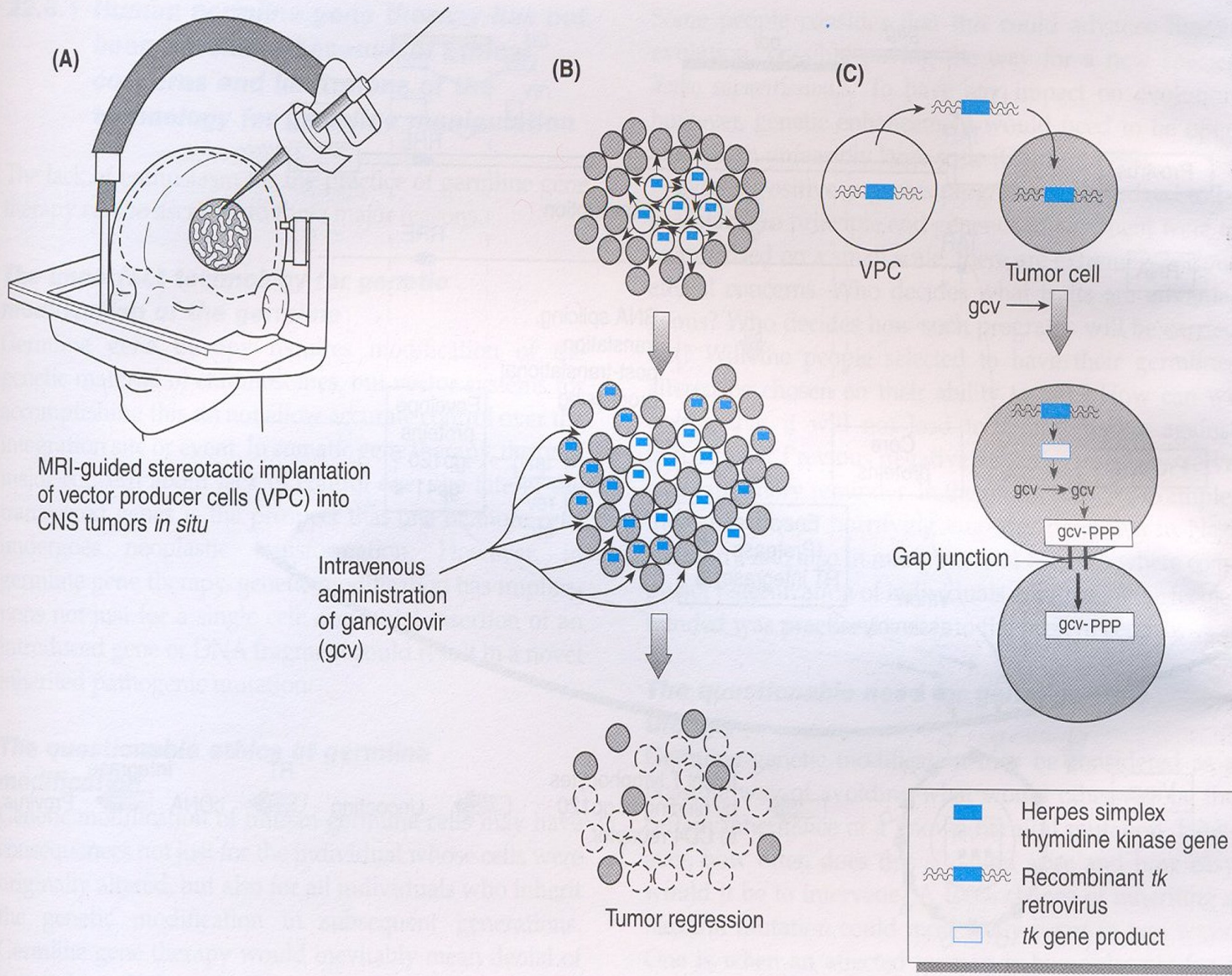


Figure 22.13: *In vivo* gene therapy for brain tumors.

KLINIKA



TIME MAGAZINE

May. 8, 2000

Bubble-Free

French doctors score a gene-therapy triumph

By CHRISTINE GORMAN

The two infants, 11 months and eight months old, suffered from a rare life-threatening disorder called severe combined immunodeficiency. Because a genetic mutation kept their immune systems from fending off even the most innocuous infections, both faced lifelong confinement in sterile shielded environments. Now, 10 months after undergoing treatment in France to correct the defect, these "bubble babies" are out of their bubbles--back at home and acting for all the world like normal babies.

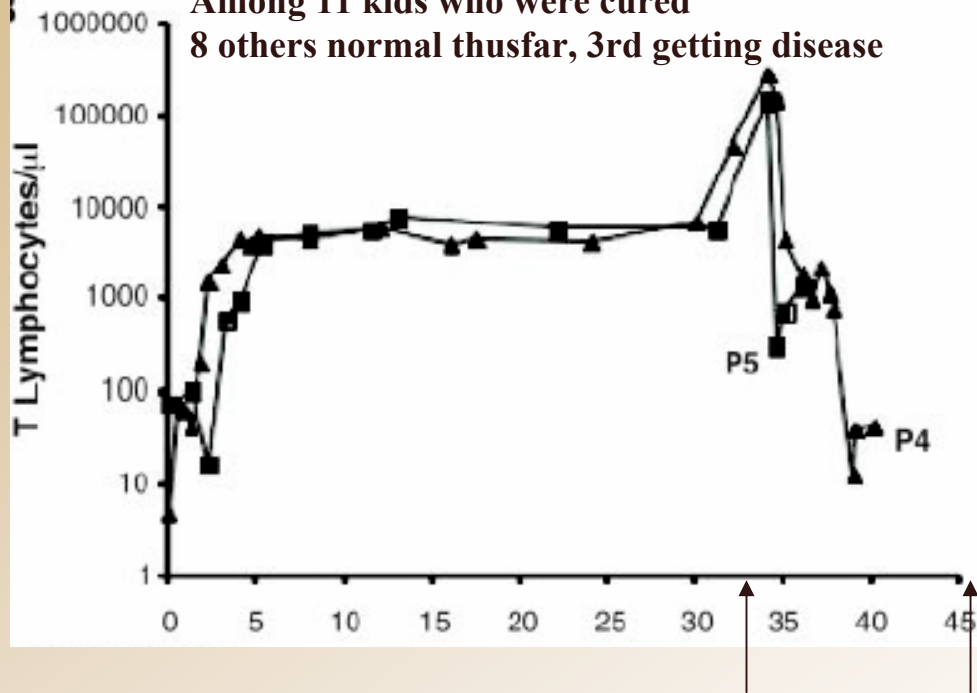


LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1

LMO2 je transkripční faktor nezbytný pro správný vývoj hemopoetických linií

In addition, *Lmo2* transgenic mice were shown to develop T-ALL (28) within 10 months, despite the fact that the transgene expression was not restricted to T cells (29–32).

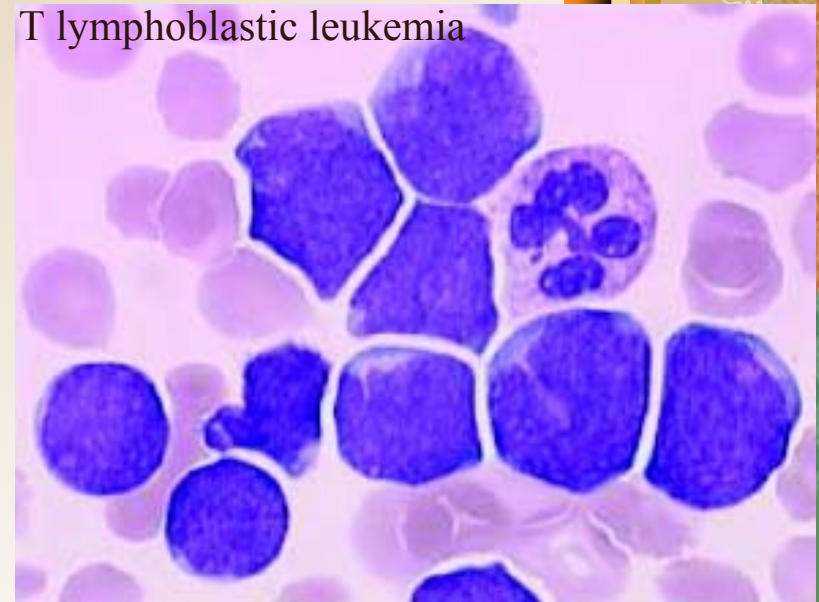
Among 11 kids who were cured
8 others normal thusfar, 3rd getting disease



Standard chemotherapy initiated

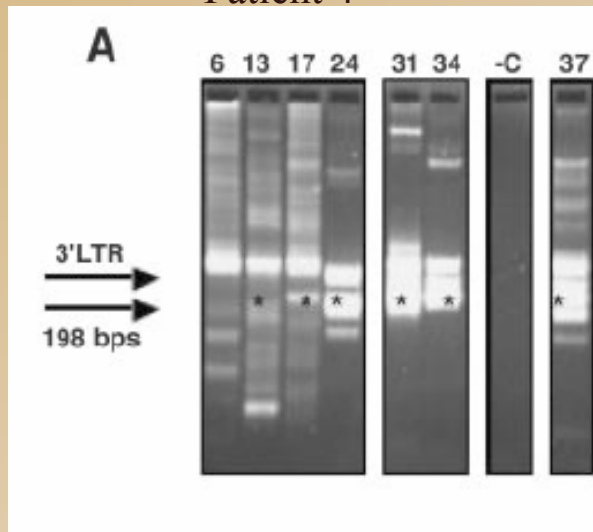
Died

T lymphoblastic leukemia

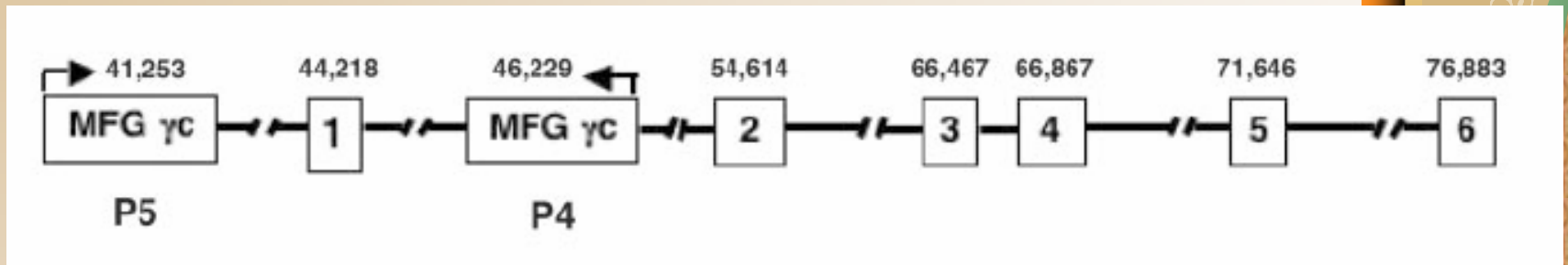
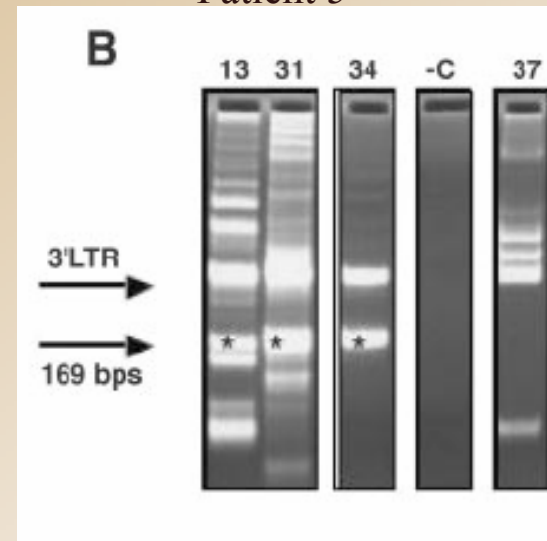


Analýza místa integrace vektoru

Patient 4



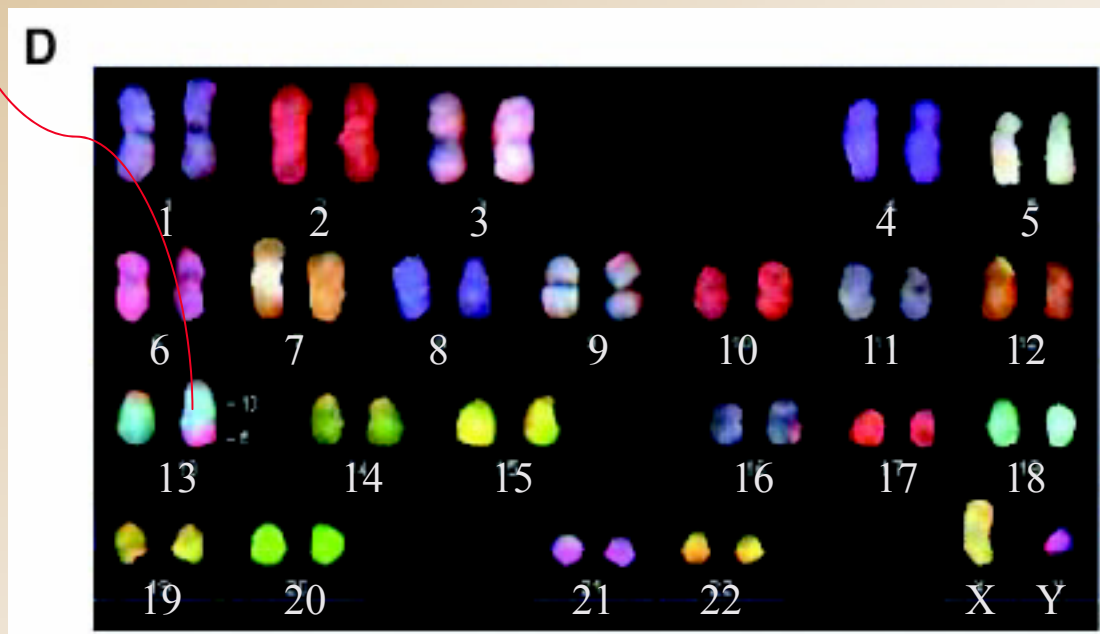
Patient 5



Integrace retrovirových vektorů do intronů LMO2 genu

Model: LMO2 je transkripčně aktivní v časných progenitorových buňkách.
Retrovirus, který se integroval, zesiluje transkripci LMO2.
Šance na integraci do specifického genu je 1 na 25,000.

Další onkoproteiny jsou vytvářeny klonální expanzí.
Nakonec dojde k leukemii.



Co by se mělo na současných protokolech změnit?

Pro studie s retrovirovými vektory zaváděnými do kmenových buněk

Snížit počet buněčných klonů, které se vracejí do těla pacienta

Aktivně vyhledávat místa integrace a lépe integraci zacílovat

Pro aplikaci postmitotických buněk (muskulární dystrofie)

Bude pravděpodobně způsobovat problémy, neboť potřebujeme obrovské množství buněk, aby vůbec došlo k integraci



Případ Jesseho Gelsingera

Adenovirus, virus běžného nachlazení

dsDNA

Vysoký počet kopií (vytvoří se až 10^{12} částic/ml pro genovou terapii)

Neintegruje se

Infikuje a replikuje se v postmitotických tkáních (sval)

Používá se podobně jako retroviry

Příběh Jesseho Gelsingera

Ornathine transcarbamylase (OTC) deficience

Onemocnění ureového cyklu - fatální

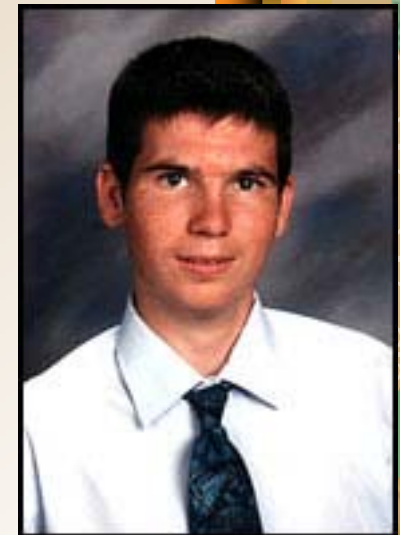
X-linked (Matka přenašečka, syn nemocný). 1/40,000.

Někdy mozaicismus (Jesse)

Kontrolováno nízkoproteinovou dietou a 32 prášky denně

Stálé záchvaty křečí

Terapie: adenovirus do portální žíly



1980 - 9/17/99

Zemřel po 4 dnech na multiorgánové selhání, jeho smrt se přičítá závažné systémové reakci na adenovirový nosič

Úspěchy genové terapie

Photo courtesy of Van de Silva



Ashanti de Silva
úspěšně léčena pro
ADA deficienci - 1990

Ryes Evans úspěšně
léčen pro SCID - 2001

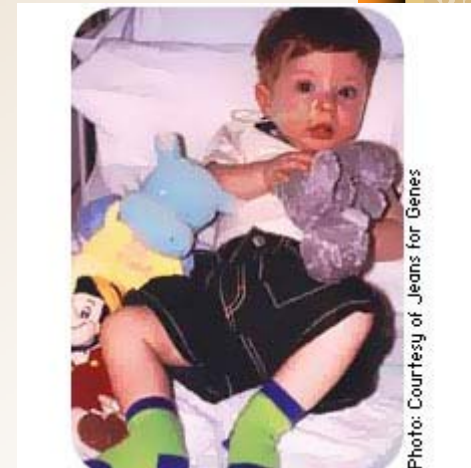


Photo: Courtesy of „Jains for Genes“