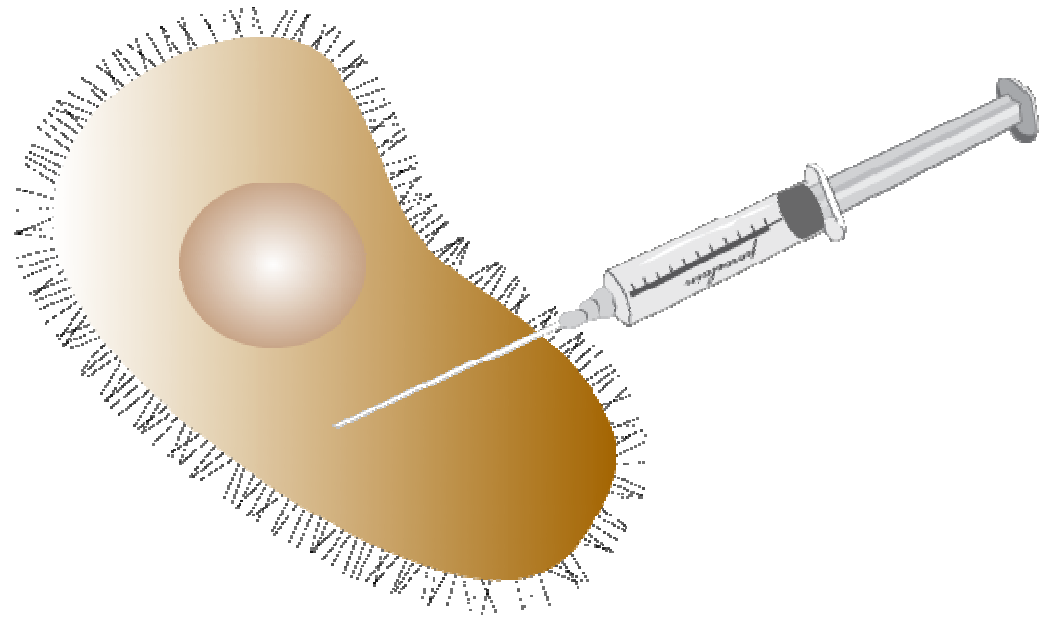


MUNI
SCI

Genová terapie





CHRÁNĚNÉ ZOBRAZENÍ Budьте opatrní – soubory z Internetu můžou obsahovat viry. Pokud je nepotřebujete upravovat, bude bezpečnější zůstat v chráněném zobrazení.

Povolit úpravy

Co je genová terapie

Jedná se o zavedení funkčních genů do buněk a tkání jedince, které jsou postiženy onemocněním. Přestože technologie je zatím nedokonalá, vykazuje použití genové terapie částečné úspěchy již nyní.

4 základní přístupy:

Zavedení normálního genu pro kompenzaci nefunkčního genu

Výměna abnormálního genu za normální gen

Oprava abnormálního genu (např. řízenou selektivní mutagenezou)

Změna regulace genových párů

Kroky genové terapie

- Vektor (= nosič) přináší funkční gen do cílových buněk pacienta
- Cílové buňky jsou infikovány tímto vektorem
- Genetický materiál vektoru se začlení do genetického materiálu buňky příjemce
- Z terapeutického genu se začínají tvořit funkční proteiny, důležité pro správné fungování buňky/tkáně/organismu

Kritéria výběru pacientů a chorob do klinických zkoušek

Tento druh terapie není vhodný pro všechny nemoci, výběr pacientů je omezen podle následujících kritérií:

- Onemocnění musí být *život ohrožující*
- Není dostupná alternativní konvenční terapie
- Je znám gen, který onemocnění způsobuje
- Existuje vhodný systém pro podání terapie

Cíle genové terapie

- a. Dědičná onemocnění
- b. Zhoubná onemocnění
- c. Infekční choroby

Genetická onemocnění

Nejvhodnější kandidáti genové terapie:

„**onemocnění monogenního charakteru**“ – vysoká šance, že se onemocnění projeví u jedince, pokud nese defektní gen, způsobuje je malý počet genů, nejčastěji jeden

„**multifaktoriální choroby**“ – významná souhra s faktory vnějšího prostředí, faktory životního stylu, jsou způsobeny více geny, které mohou mít mezi sebou různé interakce, pokud jedinec nese rizikové varianty, neznamená to, že se onemocnění nutně projeví

Genetický transfer

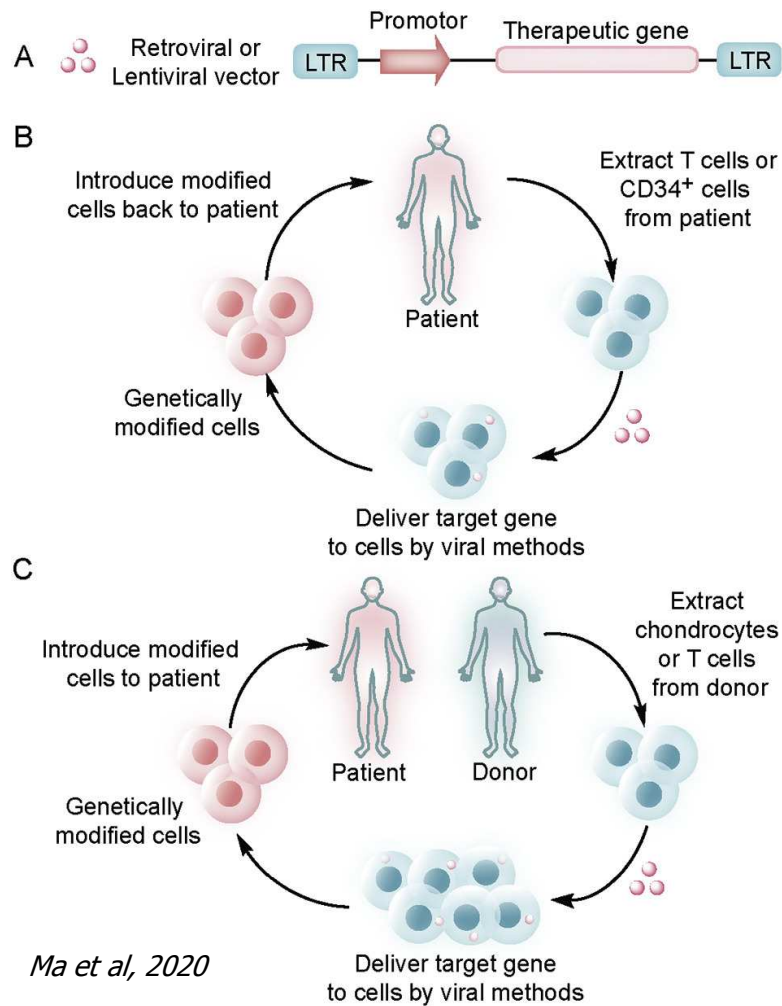
In vivo

Přenos se děje přímo do tkáně pacienta. Pomocí liposomů nebo virových nosičů.

Ex vivo

Přenos genů do buněk v kultuře (transplantace autologních geneticky modifikovaných buněk)

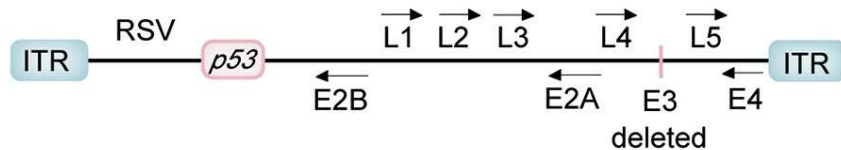
Schéma buněčné genové terapie



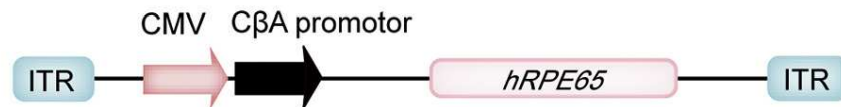
A, retroviral or lentiviral vector for cell-mediated gene therapy; B, patient-derived (autologous) cellular gene therapy products: Cells were removed from the patient, genetically modified and then returned to the patient; C, allogeneic cellular gene therapy products: Cells were removed from the donor, genetically modified and then returned to the patient (recipient).

Schéma virových vektorů pro genovou terapii

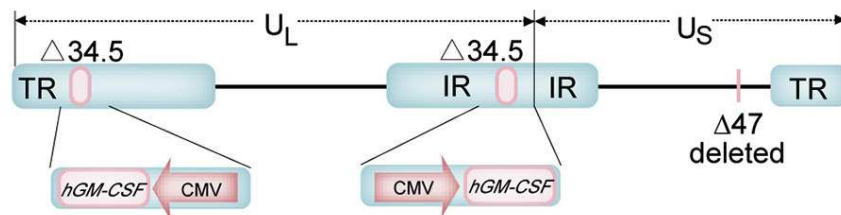
A Gendicine



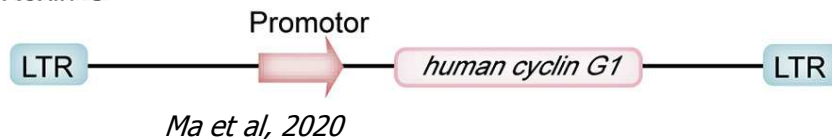
B Luxturna



C Imlygic



D Rixin-G

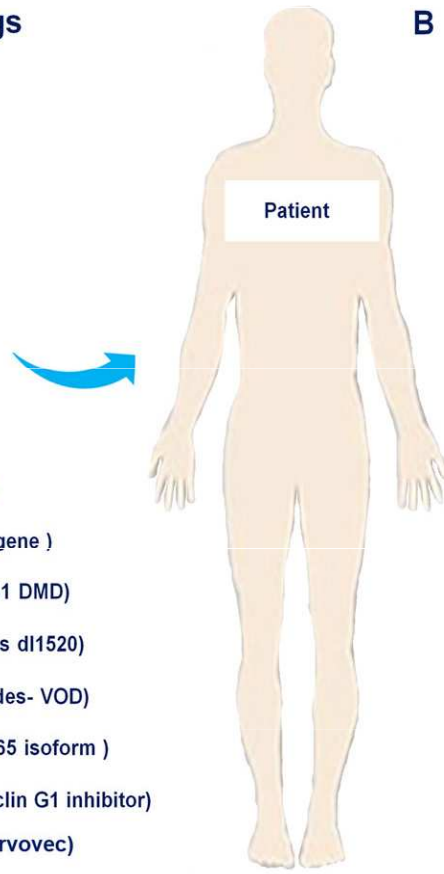


A, Gendicine, the recombinant adenovirus vector encoding human *p53* gene driven by Rous sarcoma virus (RSV) promoter; B, Luxturna (Voretigene Neparvovec-rzyl), the rAAV2 vector encoding human retinal pigment epithelial-specific protein 65 kDa (hRPE65) gene driven by the CMV-enhanced chicken beta-actin promoter (C β A) promoter; C, Imlygic (Talimogene Laherparepvec), the recombinant herpes simplex virus (HSV) type 1 vector encoding human granulocyte macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) driven by CMV promoter; D, Rixin-G, the recombinant retroviral vector bearing human cyclin G1 construct. ITR: inverted terminal repeats; E1-E4: early 1-4 genes; L1-L5: late 1-5 genes; U_L: unique long segment; U_S: unique short segment; TR: terminal repeat; IR: internal repeat; Δ 34.5: the neurovirulence gene encoded by HSV type 1 vector was replaced with the hGM-CSF expression cassette; Δ 47: antigen processing inhibitor encoded by HSV type 1 vector was deleted; LTR: long terminal repeats.

In vivo vs. ex vivo gene therapy drugs

A In vivo Gene Therapy Drugs

Gendicine (Tp53)
Neovasculgen (VEGF)
Glybera (LPL^{S447X} gene)
Luxturna (hRPE65 gene)
Vitravene (ASO-CMV retinitis)
Spinraza (ASO-SMN2 pre-mRNA)
Onpattro (RNAi-transthyretin gene)
Kynamro (ASO - Apo lipoprotein B-100)
Imlygic (HSV-1oncolytic virus GM-CSF gene)
Eteplirsen (Morpholino Oligomer-Exon51 DMD)
Oncorine (E1B 55kDa mutant adenovirus dl1520)
Defitelio (single-stranded oligonucleotides- VOD)
Macugen (RNA oligonucleotide- VEGF165 isoform)
Rexin-G (Retroviral vector encoding cyclin G1 inhibitor)
Zolgensma (Onasemnogene Abeparvovec)



B Ex vivo Gene Therapy Products

Allogenic T cells

Zalmoxis (Suicide HSV-TK- Δ LNDR gene)

Allogenic Chondrocytes

Invossa (TGF β 1gene)

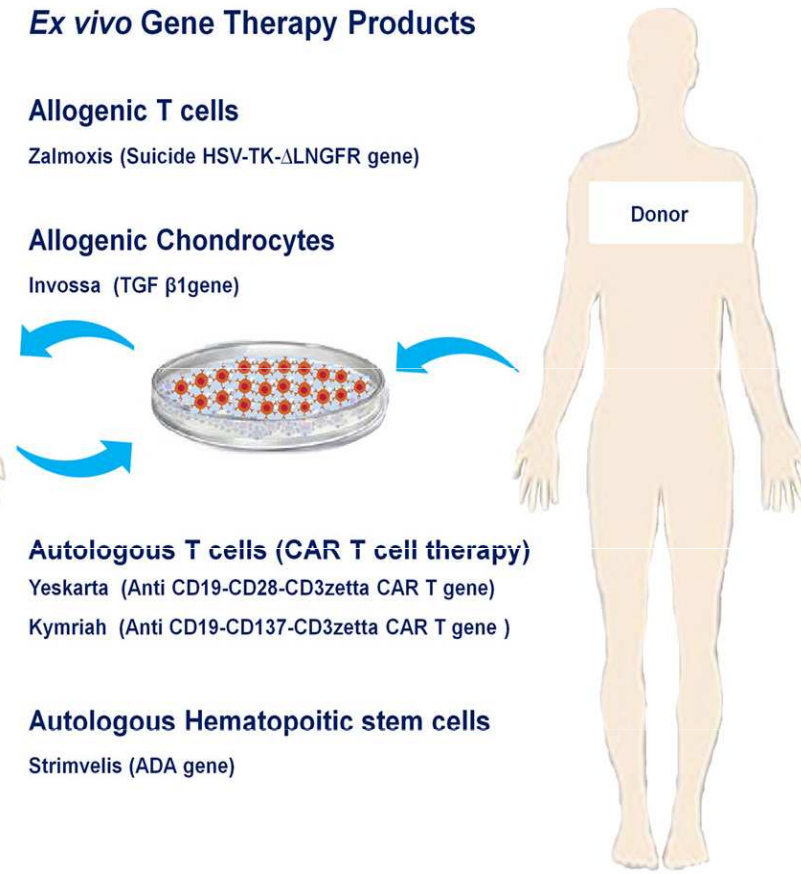
Autologous T cells (CAR T cell therapy)

Yeskarta (Anti CD19-CD28-CD3zetta CAR T gene)

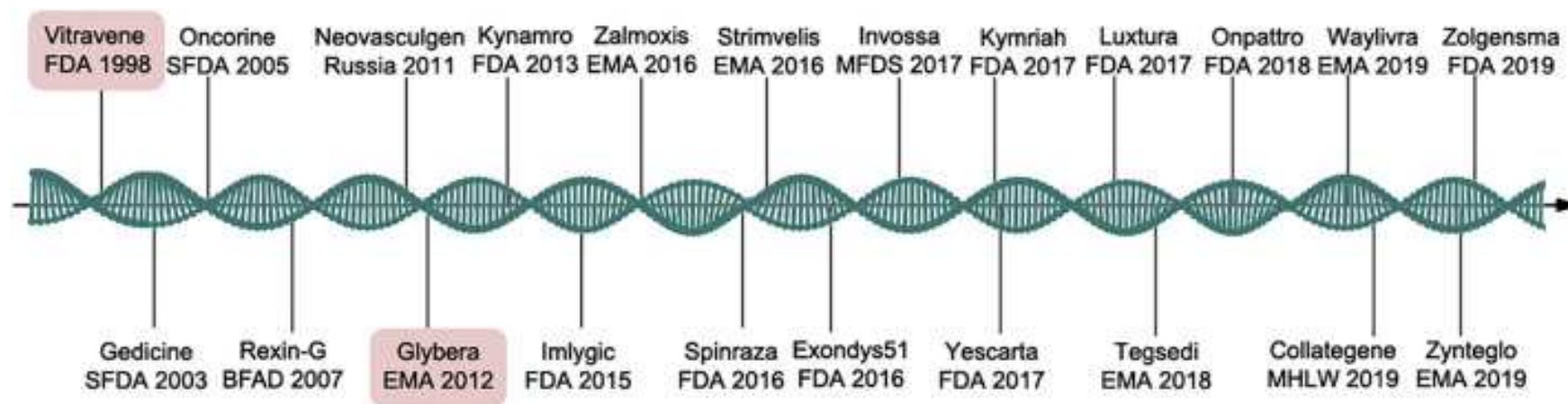
Kymriah (Anti CD19-CD137-CD3zetta CAR T gene)

Autologous Hematopoietic stem cells

Strimvelis (ADA gene)



Časová osa vývoje genové terapie



The timeline of gene therapy drugs approved worldwide 1998-2019. Times for the first global approval of drugs and the first regulatory agency or country gave the approval of drugs were shown in the timeline. Glybera and Vitravene on a pink background had been drawn back from market.

Nosiče genetické informace

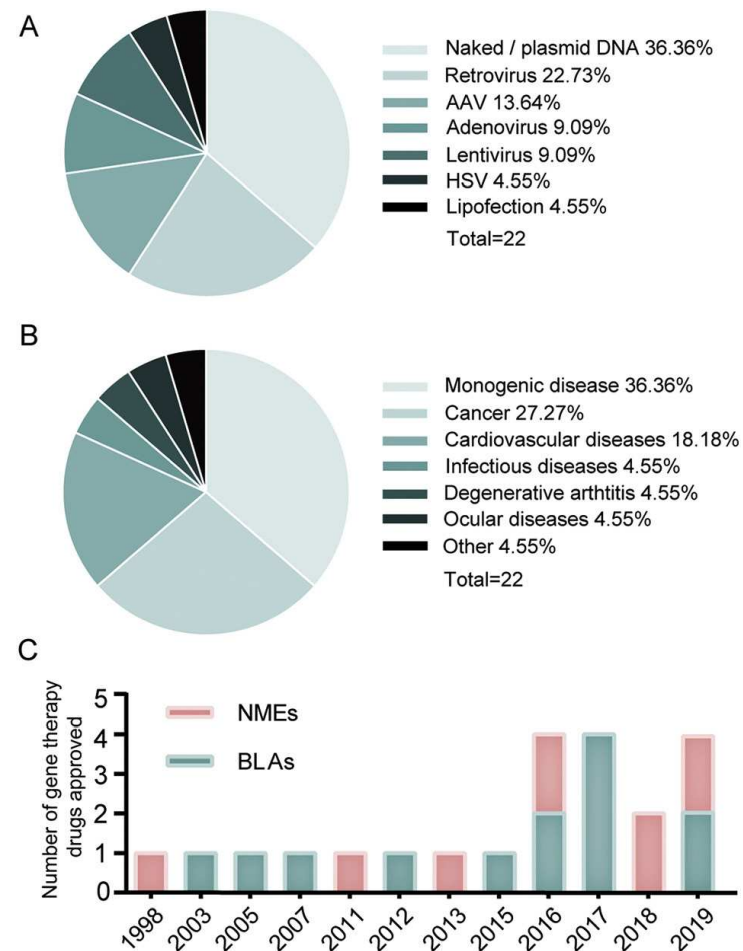
Virové

- Retrovirů/lentivirů
- Adenovirů/adeno-asociovaných virů
- Herpes virů
- Jiné

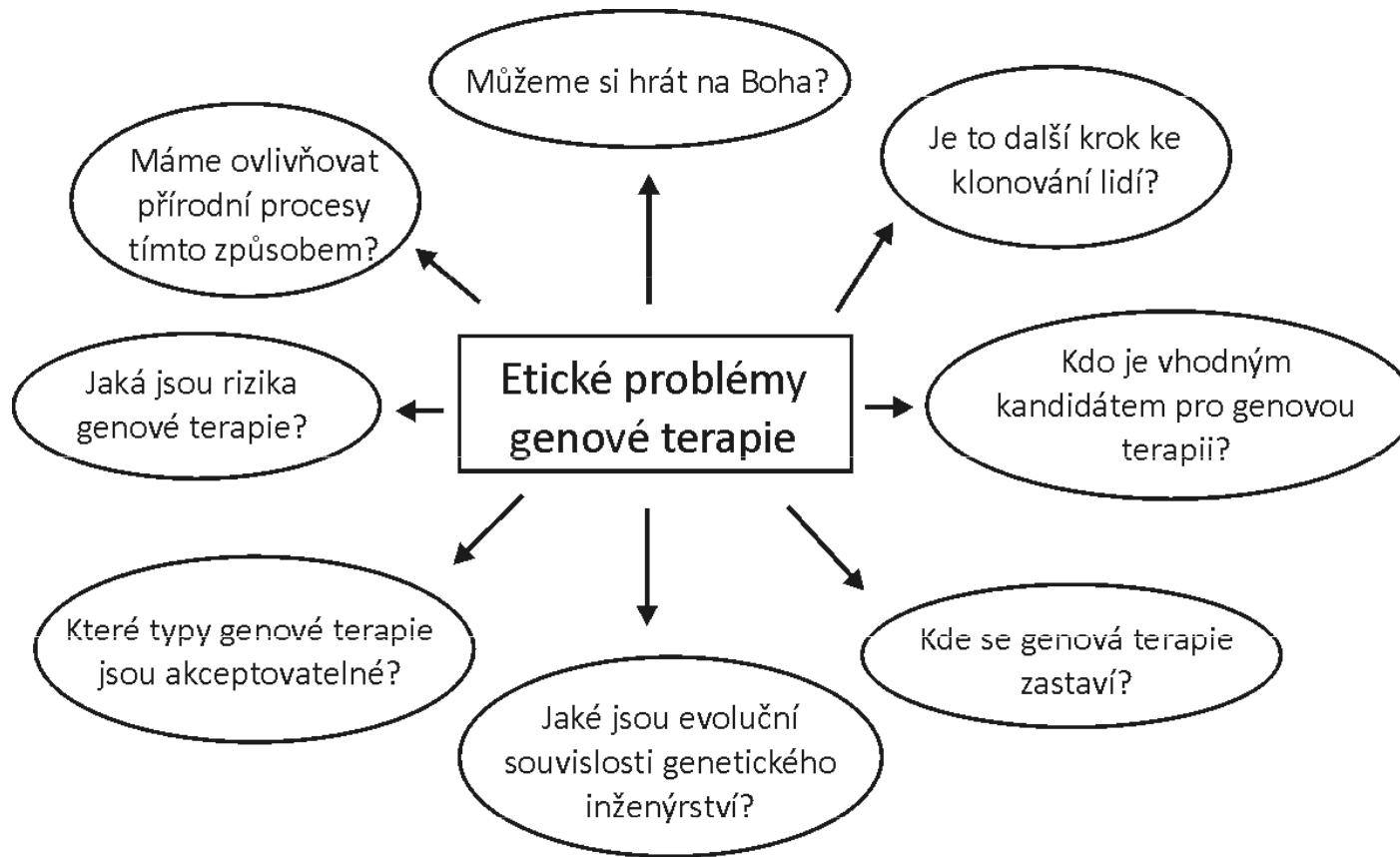
Nevirové

- Receptorem zprostředkované
- Lipozómy
- Přímá injekce

Ma et al, 2020



Etické problémy



(William Bates, 2001)

Somatické vs. zárodečné buňky

Genová terapie – somatických buněk
zárodečných buněk

Evoluční mechanismy pečlivě střeží hranici mezi somatickými a zárodečnými buňkami

...tato koncept se nazývá Weismannova bariéra
(„Weismann barrier“)

Genetická informace proudí pouze ze zárodečných buněk do somatických a nikdy naopak

GT zárodečných vs. somatických buněk

- Genová terapie zárodečných buněk:
 - *In vitro* fertilizace vajíčka
 - Zavedení žádoucího genu do vajíčka (např. retrovirem nebo mikroinjekcí)
 - Integrace normálního genu a jeho exprese
- Genová terapie somatických buněk:
 - Předpokládá znalost úlohy daného genu u daného onemocnění
 - Syntéza normálního genu
 - Exprese genu může probíhat pouze u vybrané skupiny buněk

Pohled na genovou terapii zárodečných buněk

Genová terapie somatických buněk akceptována

Genová terapie zárodečných buněk

„...in the present state of research, it is not morally permissible to act in a way that may cause possible harm to the resulting progeny. In the hypothesis of gene therapy on the embryo, it needs to be added that this only takes place in the context of in vitro fertilization and thus runs up against all the ethical objections to such procedures. For these reasons, therefore, it must be stated that, in its current state, germ line cell therapy in all its forms is morally illicit“ - Dignitas Personae

Genová terapie zárodečných buněk

Vždy v principu neetická, neboť chybí informovaný souhlas

Z dalších generací pasivní příjemci výsledků „pokusů“

*Další generace mají právo zdědit od svých předchůdců
nemodifikovaný genom*

*Nejsme schopni zhodnotit objektivně všechny konsekvence
genetických manipulací*

Komplikace genové terapie

- 1) Krátkodobý efekt genové terapie
- 2) Imunitní reakce organismu
- 3) Technické problémy s virovými vektory
- 4) Multigenní onemocnění

Případ s dobrým koncem

První použití genové terapie se uskutečnilo 14. září 1990 (W.F. Anderson et al.)

Pacientka Ashanti deSilva byla léčena pro ADA - SCID (severe combined immunodeficiency).

Terapie účinkovala přibližně 2 roky, potom potíže, ale pacientka žije dosud, v současnosti se těší dobrému zdraví a studuje na vysoké škole.

Zároveň léčba preparáty ADA.

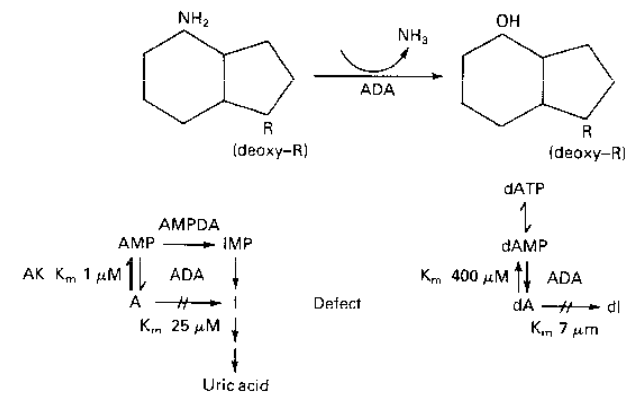




Photo: Courtesy of Jeans for Genes

Ten-month-old Rhys Evans was successfully treated with gene therapy for SCID in 2001.

Případ se špatným koncem

Deficience ornitinkarbamoyltransferázy

Novorozenci → kóma během 72 hodin po porodu

Většina trpí závažným poškozením mozku

Čtvrtina pacientů zemře během prvního roku

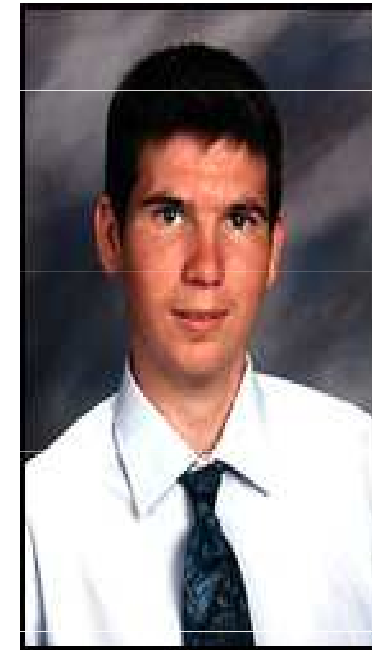
Polovina pacientů zemře do pěti let

Časná léčba nízkoproteinovou dietou

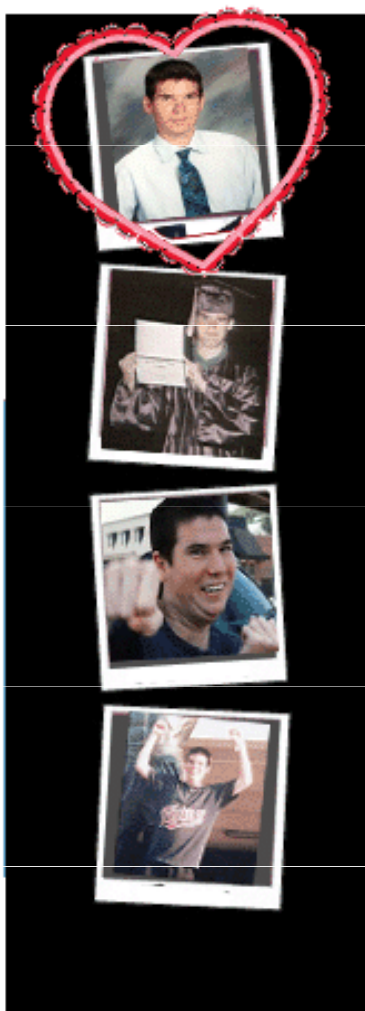
Deriváty benzoátu sodného a jiných preparátů sodíku

→ Snazší eliminace amoniaku z těla

Protokol genové terapie zahájen 13. 9. 1999, podpora životních funkcí ukončena v důsledku mozkové smrti 17. 9. 1999. Příčinou smrti: Syndrom respiračního selhání



1980 - 9/17/99



in memory of
Jesse Gelsinger

the legacy of a hero

jesse gelsinger was a hero
he didn't know he was, but when all the gold was counted
there was nothing in the world that was more precious
than this one kid's contribution to the way that
medical research is conducted



Celý životopis JG sepsaný jeho otcem Paulem Gelsingerem je na
<http://www.jesse-gelsinger.com/>

Francouzská studie

May. 8, 2000

Bubble-Free

French doctors score a gene-therapy triumph

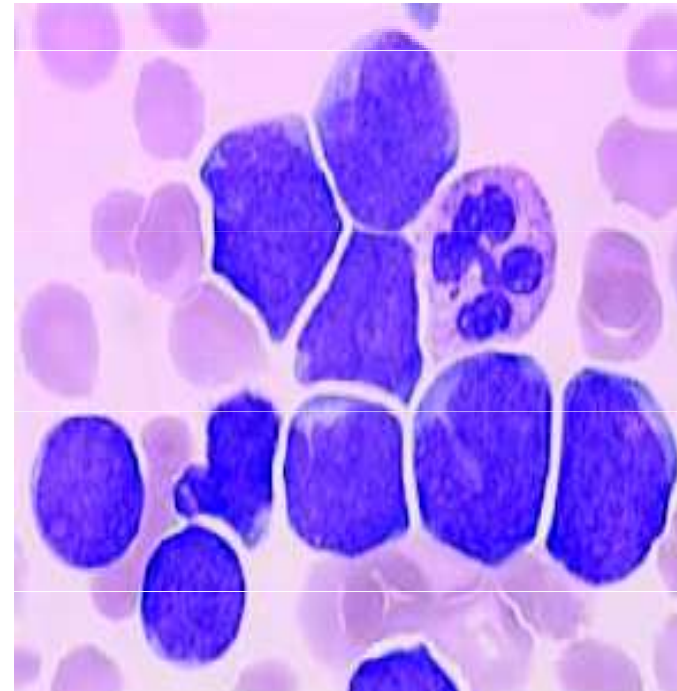
By CHRISTINE GORMAN

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.

LMO-2 indukovaná T-leukémie

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

S. Hacein-Bey-Abina,^{1,2*} C. Von Kalle,^{6,7,8} M. Schmidt,^{6,7}
M. P. McCormack,⁹ N. Wulffraat,¹⁰ P. Leboulch,¹¹ A. Lim,¹²
C. S. Osborne,¹³ R. Pawliuk,¹¹ E. Morillon,² R. Sorensen,¹⁹
A. Forster,⁹ P. Fraser,¹³ J. I. Cohen,¹⁵ G. de Saint Basile,¹
I. Alexander,¹⁶ U. Wintergerst,¹⁷ T. Frebourg,¹⁸ A. Aurias,¹⁹
D. Stoppa-Lyonnet,²⁰ S. Romana,³ I. Radford-Weiss,³ F. Gross,²
F. Valensi,⁴ E. Delabesse,⁴ E. Macintyre,⁴ F. Sigaux,²⁰ J. Soulier,²¹
L. E. Leiva,¹⁴ M. Wissler,^{6,7} C. Prinz,^{6,7} T. H. Rabbitts,⁹
F. Le Deist,¹ A. Fischer,^{1,5†‡} M. Cavazzana-Calvo^{1,2†}



Neterapeutické genetické modifikace

- stejné nástroje a techniky, jaké byly vytvořeny pro pro genovou terapii nemocí člověka, mohou být využity pro jiné nežli genetické manipulace lidských bytostí
- genová terapie je primárně určena k léčbě závažných onemocnění – obecně jsou tyto genetické odchylky chápány jako chyby, které neposkytují svému nositeli žádnou výhodu a které by měly být odstraněny, kdykoli je to možné

Neterapeutické genetické modifikace

- ✘ západní vědecká i teologická tradice chápe nemoc jako zlo, proti kterému je třeba bojovat a které je třeba odstranit
- ✘ odstranění utrpení, které je způsobeno nemocemi, se obecně chápe jako morální dobro či dokonce jako morální imperativ (morální apel na lékaře)
- ✘ Pravdou je, že medicínské znalosti jsou již dnes používány k vylepšení různých aspektů lidských bytostí, které nemají s nemocí nic společného – typickým případem je plastická chirurgie...
- ✘ ...která ovšem není chápána jako neetická či neakceptovatelná

Neterapeutické genetické modifikace

- Může být tentýž přístup aplikován ke genetické modifikaci lidských parametrů, které nesouvisejí s chorobami jako takovými?
- Jedná se zejména o typické kvantitativní znaky, jako je:
 - tělesná výška
 - barva kůže
 - inteligence

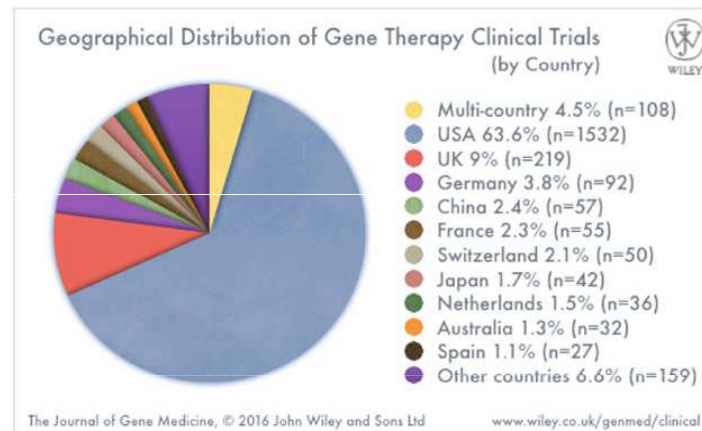
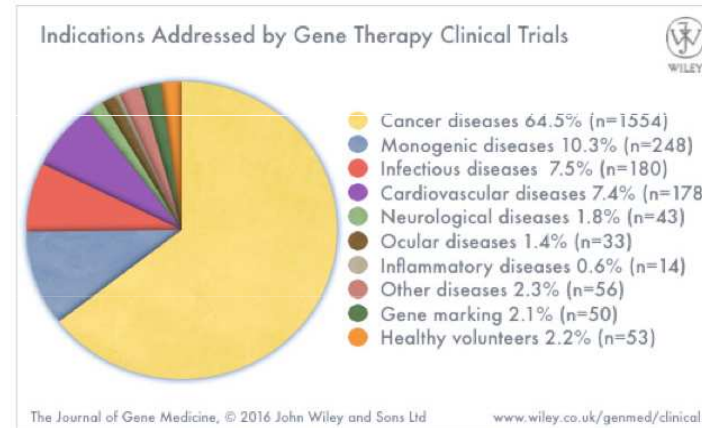
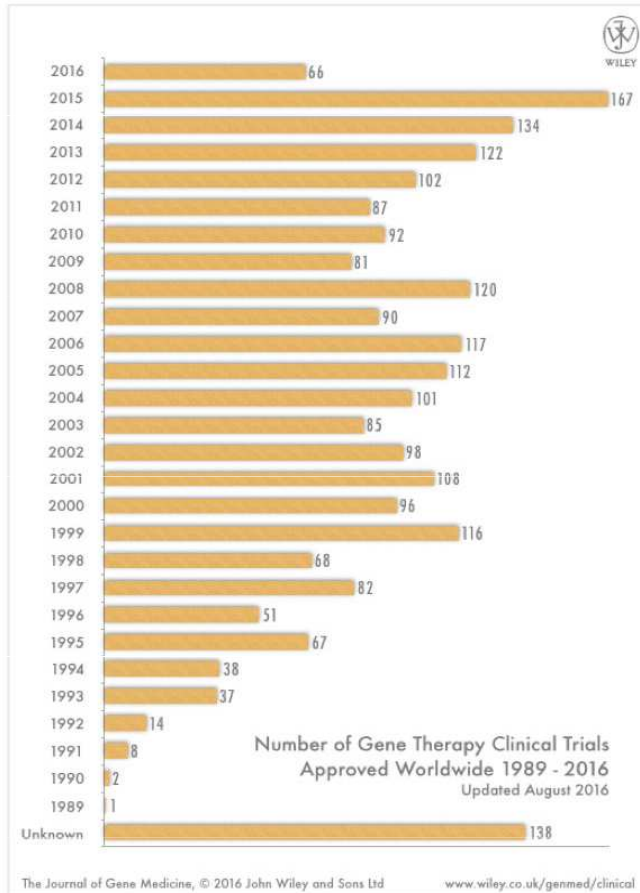
Neterapeutické genetické modifikace

- dítě je od narození od svého okolí determinováno k určité budoucnosti (...ovšem determinováno je i psychosociálním prostředím, co nějž se rodí, atd.)
- možnost vzniku novodobé superiorní třídy populace, favorizované oproti majoritě
- místo toho, abych cítil své úspěchy jako své, budu je cítit jako výsledek genetiků. Čí je vlastně zásluha, že jsem vystudoval VŠ?
- Superiorita jako výsledek modifikovaných genů, nikoli přírodního výběru

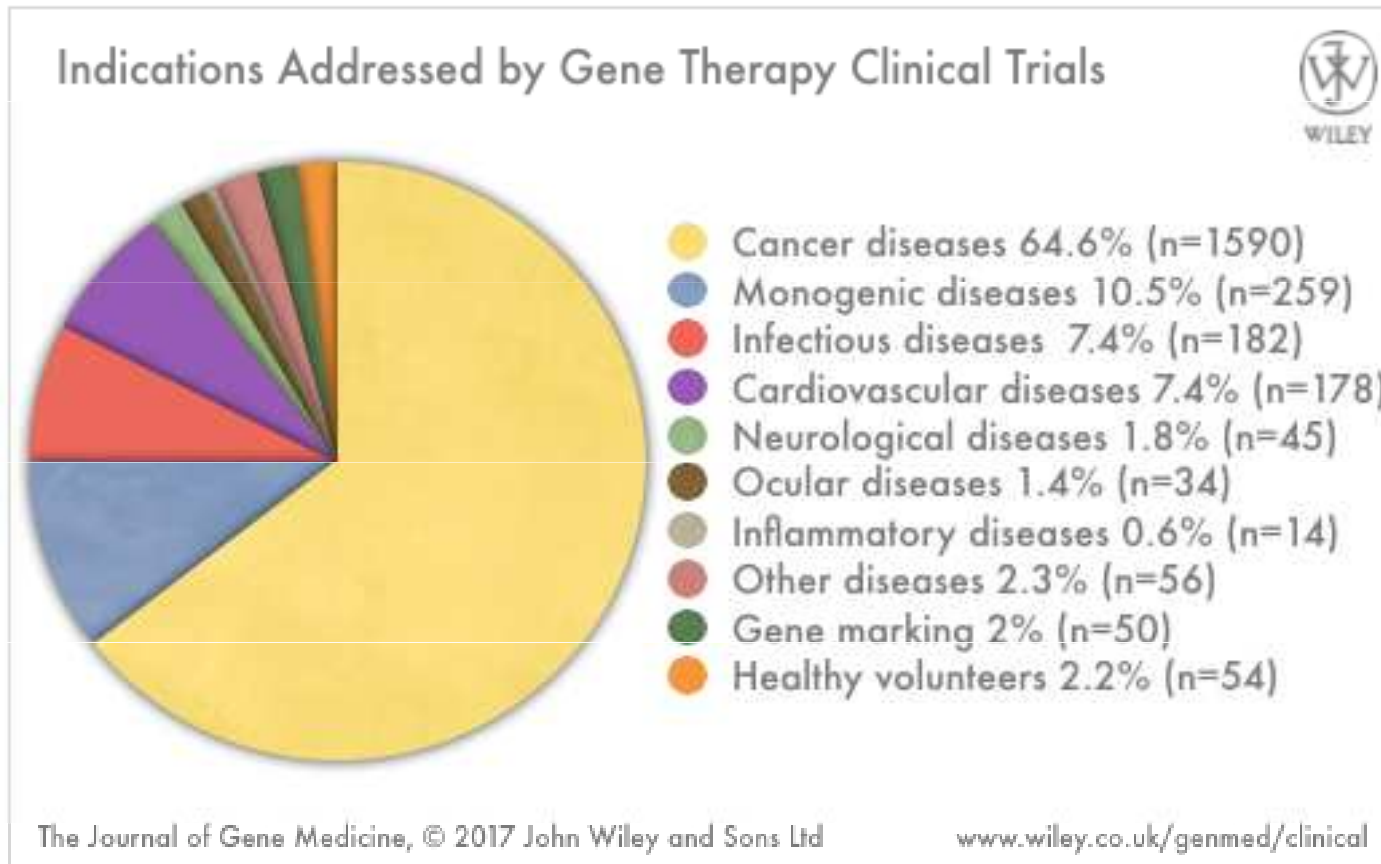
Neterapeutické genetické modifikace

- dítě z pochopitelných důvodů nemůže se změnou svého genomu dát informovaný souhlas, ale to nemůže i s jinými výkony, které mohou ovlivnit jeho život (očkování?)
- K čemu modifikovat, co má být cílem? Kdo určí standard toho, co je „lepší“?

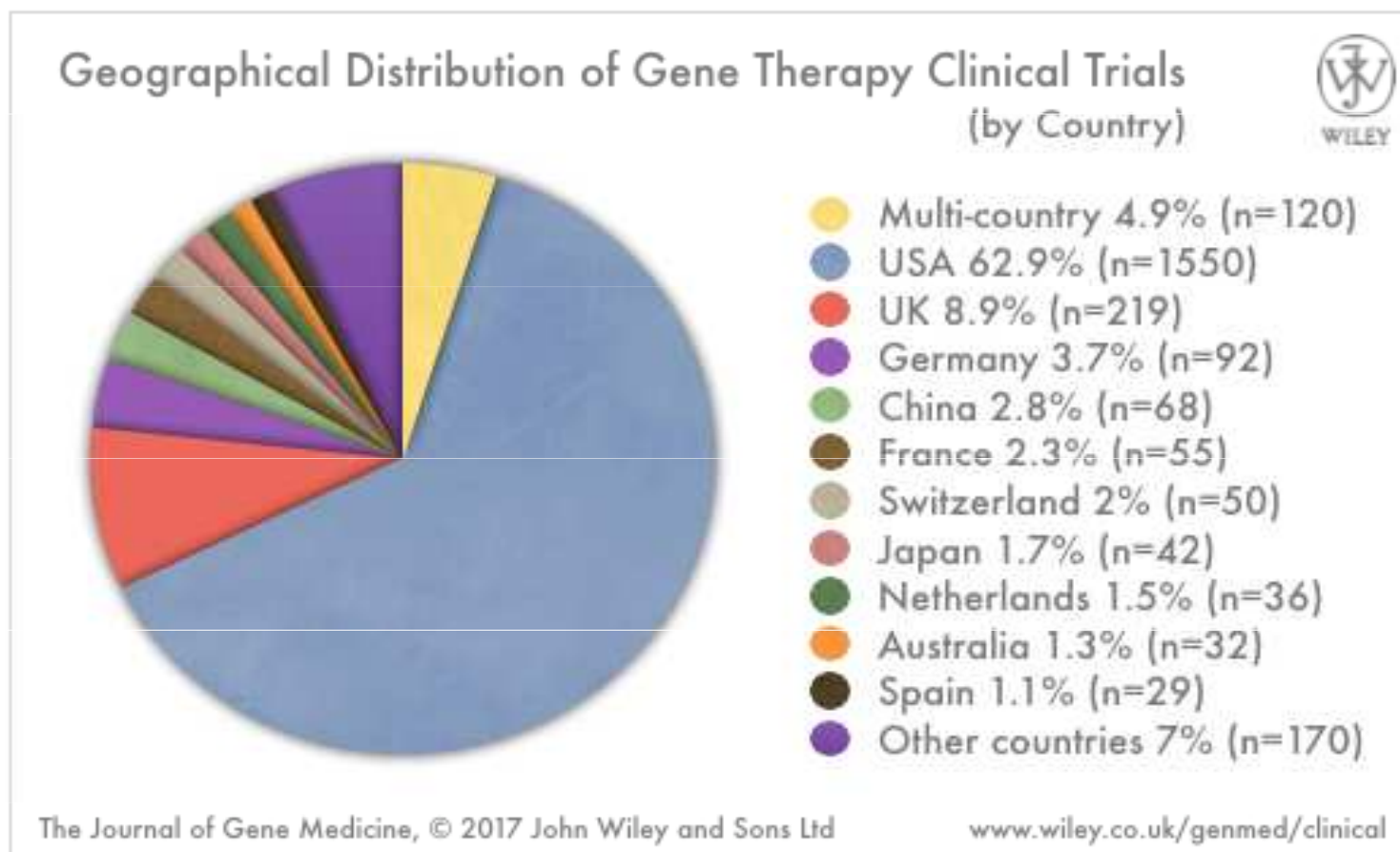
Genová terapie - přehled



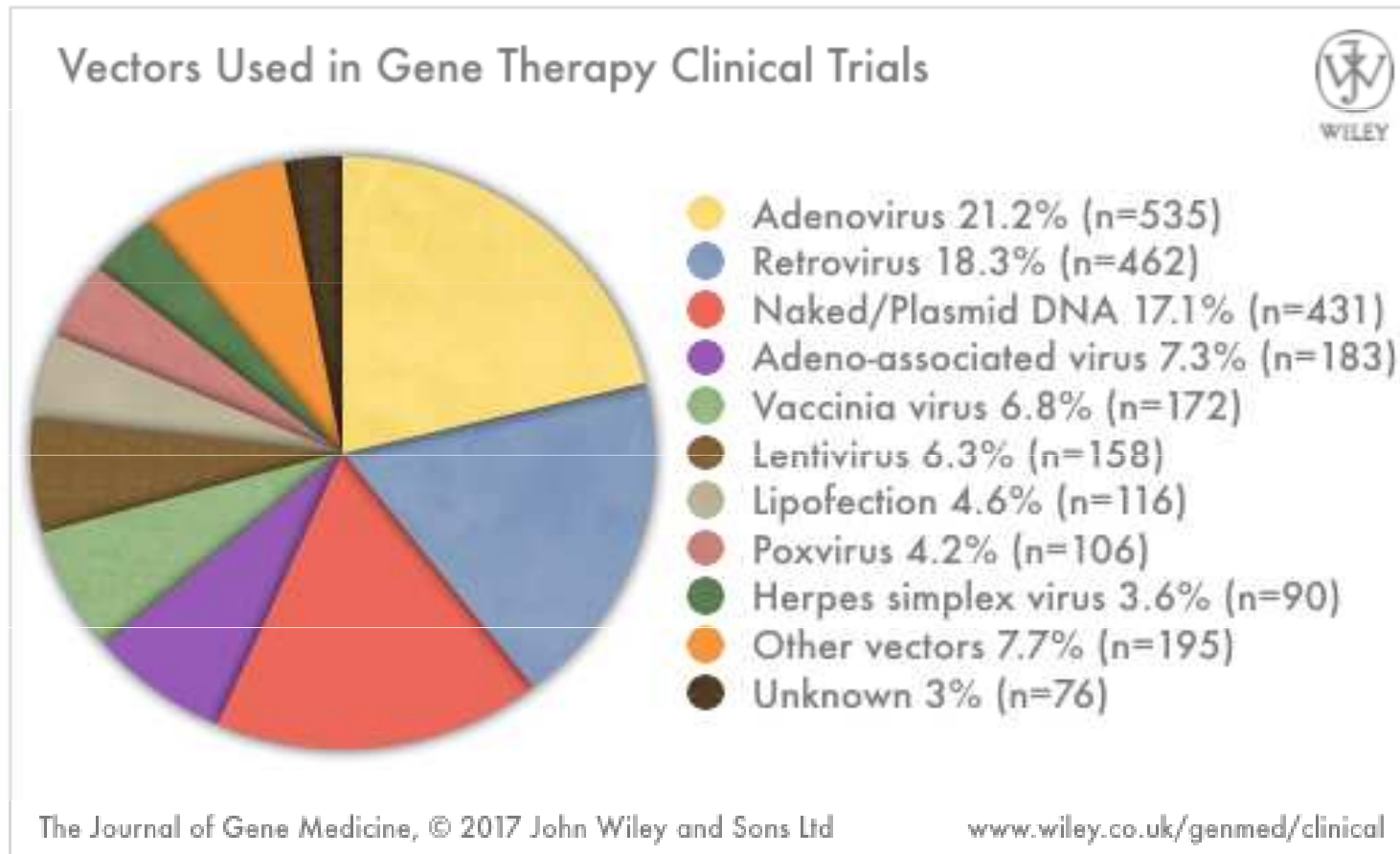
Genová terapie - indikace



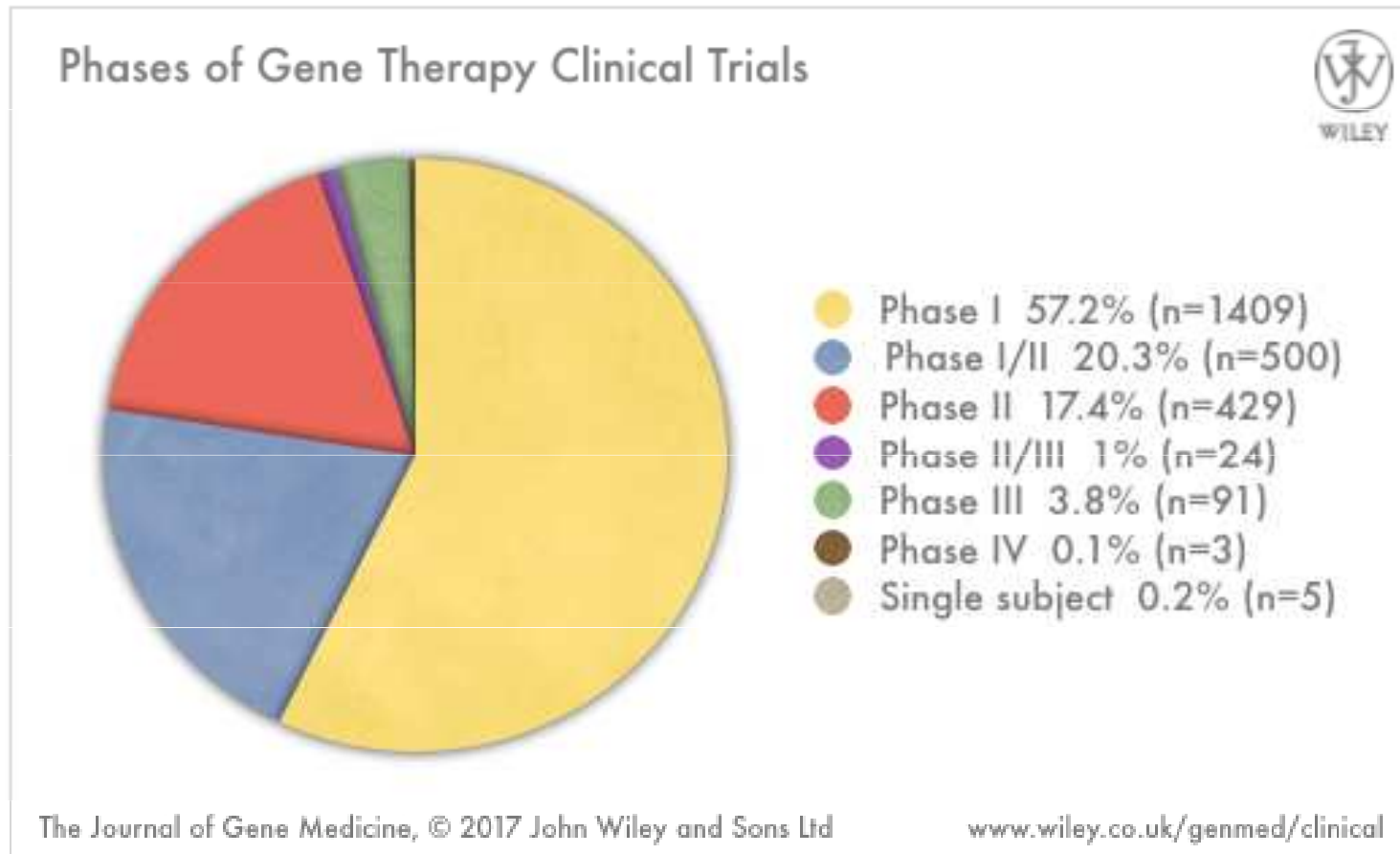
Genová terapie - země



Genová terapie - vektory



Genová terapie – klinické fáze



Genová terapie v ČR

Preparát **Glybera** byl schválen v roce 2012 pro léčbu dědičné poruchy metabolismu tuků. Léčil se jím jediný pacient v roce 2015 a výrobce léku nizozemská firma uniQure jeho produkci v roce 2018 ukončí. Choroba je tak vzácná, že po léku za milion eur není poptávka.

Také další v EU povolený preparát **Strimvelis**, určený pro děti s dědičným selháním imunitního systému, zatím léčil jediného pacienta. Ročně se s touto poruchou narodí v Evropě asi patnáct dětí.

Genová terapie v ČR

Název / reg. č. / forma	Popis	Indikace	Datum registrace	Poznámka
Kymriah EU/1/18/1297/001	geneticky modifikovaná autologní T-buněčná imunoterapie cílená proti antigenu CD19	Léčba pediatrických a mladých dospělých pacientů do 25 let s B-lymfocytární akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), která je refrakterní, v relapsu po transplantaci nebo ve druhém nebo třetím relapsu; léčba dospělých pacientů s relabujícím nebo refrakterním difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) po dvou nebo více liniích systémové terapie.	22. 8. 2018	Ambulantní použití nepravděpodobné, hospitalizace prvních 10 dnů po podání infuze.
Yescarta EU/1/18/1299/001 Infuzní disperze	geneticky modifikovaná autologní T-buněčná imunoterapie cílená proti antigenu CD19	Léčba dospělých pacientů s relabujícím nebo refrakterním difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) a s primárním mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem (PMBCL) po 2 či více liniích systémové léčby	22. 8. 2018	Ambulantní použití nepravděpodobné, hospitalizace prvních 10 dnů po podání infuze.
Luxturna NA Koncentrát a rozpouštědlo pro injekční roztok	živý, nereplikující se AAV virus serotyp 2, který exprimuje lidský gen RPE65	Retinální dystrofie asociovaná s potvrzenou bialelickou mutací RPE65.	Očekává se registrace	Pozitivní stanovisko CHMP 20. 9. 2018 (udělení registrace Evropskou komisí konec 2018 nebo začátek 2019) Ambulantní použití bude nepravděpodobné. Subretinální aplikace.

Název / reg. č. / forma	Popis	Indikace	Datum registrace	Poznámka
Glybera NA Injekční roztok	varianta LPLS ^{447X} lidského genu pro lipoproteinovou lipázu (LPL) ve vektoru	Léčba dospělých pacientů s diagnózou familiárního deficitu lipoproteinové lipázy	24. 10. 2012	28. 10. 2017 registrace vypršela (držitel nepožádal o prodloužení registrace)
Imlygic EU/1/15/1064/001 až 002 Injekční roztok	oslabený virus herpes simplex typu 1 (HSV-1) získaný funkční delecí dvou genů (ICP34.5 a ICP47) a vložením kódující sekvence pro lidský faktor GM-CSF	Léčba dospělých s neresekovatelným melanomem s regionálními nebo vzdálenými metastázami bez postižení kostí, mozku, plic nebo jiného viscerálního postižení	15. 12. 2015	Možné ambulantní použití / jednodenní péče.
Zalmaxis EU/1/16/1121/001 Infuzní disperze	allogenní T-lymfocyty geneticky modifikované retrovirovým vektorem, které kóduje zkrácenou formu receptoru pro humánní nervový růstový faktor s nízkou afinitou (Δ LNGFR) a thymidinkinázu viru herpes simplex 1 (HSV-TK Mut2)	Adjuvantní terapie při transplantaci haploidních hematopoetických kmenových buněk u dospělých pacientů s vysoce rizikovými hematologickými malignitami.	17. 8. 2016	Teoreticky možné ambulantní použití / jednodenní péče. První podání 21 – 49 dnů od transplantace a dále v 1 měsíčních intervalech (maximálně 4x)
Strimvelis EU/1/16/1097/001 Infuzní disperze	autologní frakce obohacená CD34+ buňkami transdukovanými retrovirovým vektorem, který kóduje humánní cDNA sekvenci adenosindeaminázy (ADA) z lidských hematopoetických kmenových /progenitorních	Léčba závažného kombinovaného imunodeficitu způsobeného deficitem adenosindeaminázy (ADA-SCID)	25. 5. 2016	Teoreticky možné ambulantní použití / jednodenní péče.

CHMP – Výbor pro humánní prostředky, EC – Evropská komise

Genová terapie ve světě

- K roku 2017 je registrováno pouze 5 preparátů (FDA, EMA)
- **Kymriah** - schválen FDA, určen k léčbě akutní lymfoblastické leukemie, kterou jen v USA ročně onemocní 3100 lidí. Léčba je určena pacientům ve věku do 25 let, kterým dvakrát selhala standardní léčba využívající chemoterapii a transplantaci kostní dřeně, nebo se jim onemocnění po dočasném ústupu vrátilo.

Genová terapie ve světě: approved by FDA

- [ALLOCORD \(HPC, Cord Blood\)](#)
SSM Cardinal Glennon Children's Medical Center
- [CLEVECORD \(HPC Cord Blood\)](#)
Cleveland Cord Blood Center
- [Ducord, HPC Cord Blood](#)
Duke University School of Medicine
- [GINTUIT \(Allogeneic Cultured Keratinocytes and Fibroblasts in Bovine Collagen\)](#)
Organogenesis Incorporated
- [HEMACORD \(HPC, cord blood\)](#)
New York Blood Center
- [HPC, Cord Blood](#)
Clinimmune Labs, University of Colorado Cord Blood Bank
- HPC, Cord Blood - MD Anderson Cord Blood Bank
- MD Anderson Cord Blood Bank
- [HPC, Cord Blood - LifeSouth](#)
- [HPC, Cord Blood - Bloodworks](#)
- [IMLYGIC \(talimogene laherparepvec\)](#)
modifikovaný HHV (GM-CSF) - melanom
- [KYMRIAH \(tisagenlecleucel\)](#)
CAR-Ts, receptor proti CD19 – ALL
- [LAVIV \(Azficel-T\)](#)
- [LUXTURNA \(voretigene neparovec\)](#)
RPE65- Leberova hereditární neuropatie optiku
- [MACI \(Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane\)](#)
- [PROVENGE \(sipuleucel-T\)](#)
- [TECARTUS \(brexucabtagene autoleucel\)](#)
- [YESCARTA \(axicabtagene ciloleucel\)](#)
CAR-Ts, receptor proti CD19 – velkobuněčný lymfom
- [ZOLGENSMA \(onasemnogene abeparovec-xioi\)](#)
SMN - spinální muskulární atrofie

Genová terapie ve světě: EMA, 2020

- Zynteglo
- Zolgensma
- Yescarta
- Strimvelis
- Luxturna
- Kymriah
- Imligyc
- Glybera

„Gene therapeutics are biological medicinal products. Their active ingredients contain or extis of a nucleic acid (carrier of the genetic information). Gene therapeutics are used to regulate, repair, replace, add to, or remove a nucleic acid sequence. The therapeutic, preventative, and diagnostic effect is in direct connection to the recombinant nucleic acid sequence which the product contains or in direct connection with the product which is formed on the basis of this genetic information.“

Genová terapie ve světě II

- Lékaři odeberou nemocnému krev, izolují z ní T-lymfocyty a speciálním postupem je zamrazí. Takto konzervované buňky pošlou do laboratoří firmy Novartis v New Jersey.
- Zavedou do viru gen, podle kterého si T-lymfocyt vyrobí specifickou „kotvu“ schopnou vázat bílkovinu CD19. Tato bílkovina je typická právě pro bílé krvinky související s akutní lymfoblastickou leukemií.
- Geneticky modifikované krvinky se opět zmrazí, převezou se na kliniku a lékaři je vpraví do těla nemocného. Jakmile se v krvi pacienta chytí na kotvu upravených T-lymfocytů leukemická buňka s bílkovinou CD19, lymfocyt nádorový blast usmrtí.



gene therapy