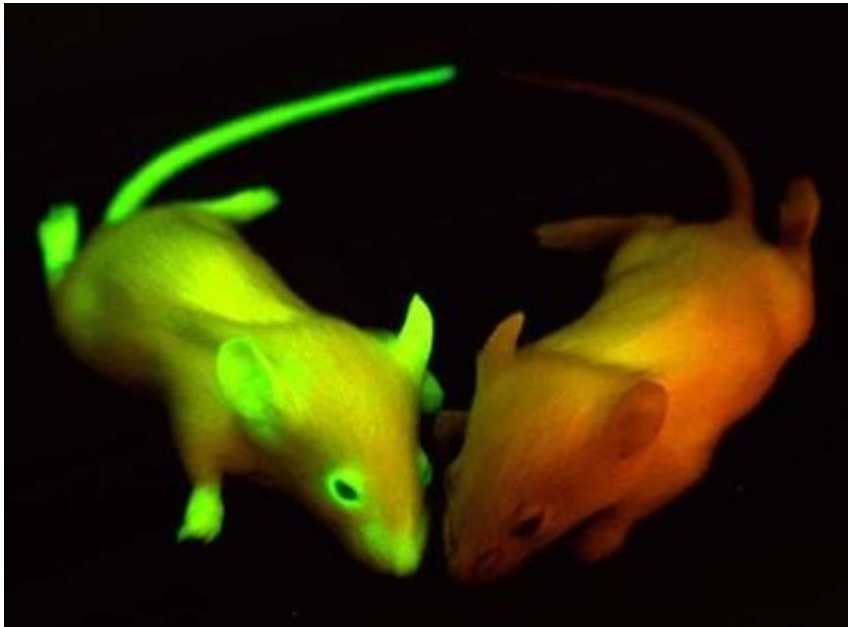


Genové terapie



Ing. Eva Benešová, Ph. D.
Eva.Benesova@vscht.cz

Podstata genové terapie

Využití metod molekulární genetiky k léčbě geneticky podmíněných onemocnění.

- Nukleová kyselina využívána jako terapeutikum
- Účinek na genotypové úrovni
- Zlepšování technik molekulové genetiky a získ potřebných informací o genomu

Definice SÚKL

- biologické léčivé přípravky s léčivou látkou, jež obsahuje rekombinantní NK, nebo je touto kyselinou tvořena používanou nebo podávanou lidem k regulaci, opravě výměně, doplnění nebo odstranění genetické sekvence, přičemž léčebný, preventivní nebo diagnostický účinek těchto léčivých přípravků se vztahuje přímo na sekvenci rekombinantní NK nebo na produkt genetické exprese této sekvence; léčivé přípravky pro genovou terapii nezahrnují vakcíny proti infekčním onemocněním

Dělení genové terapie podle

cílových buněk

GT somatická – pozměněn genom pacienta
- nedochází k přenosu na další generace

GT zárodečná – neprovádí se
- genom změněn ve vajíčku či spermii
- změna přenášena do dalších generací

technologie

GT zprostředkovaná vektory
GT zprostředkovaná oligonukleotidy
(*Genová imunizace – DNA vakcíny*)

Kdy lze využít genovou terapii

Ne každá genetická choroba je vhodná pro genovou terapii
(mutace 1 genu **x** mnoho genů + faktory prostředí)

Musí být známa:

Sekvence genu

Jeho umístění

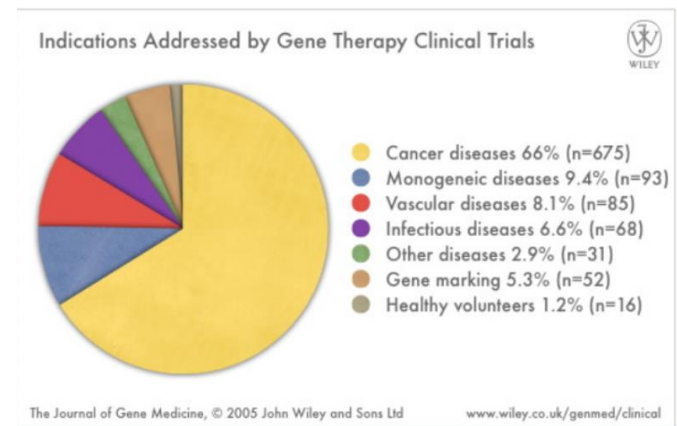
Produkt

Mechanismus účinku

potřeba genové diagnostiky
biochemická diagnostika NESTAČÍ !!!

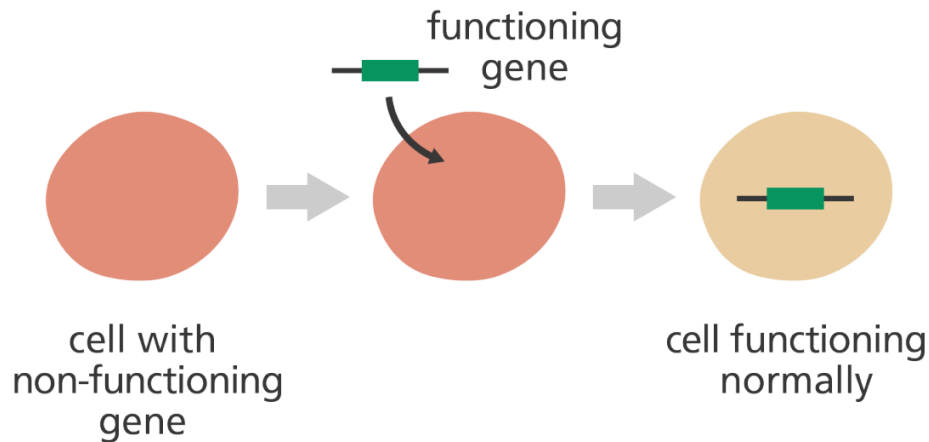
- Původně zaměřením na vrozené monogenní choroby (CF apod.)
- Nyní – rakovina

2/3 testů v USA, zbytek v Velká Británie,
Německo, Španělsko, Francie, Čína a
Japonsko)



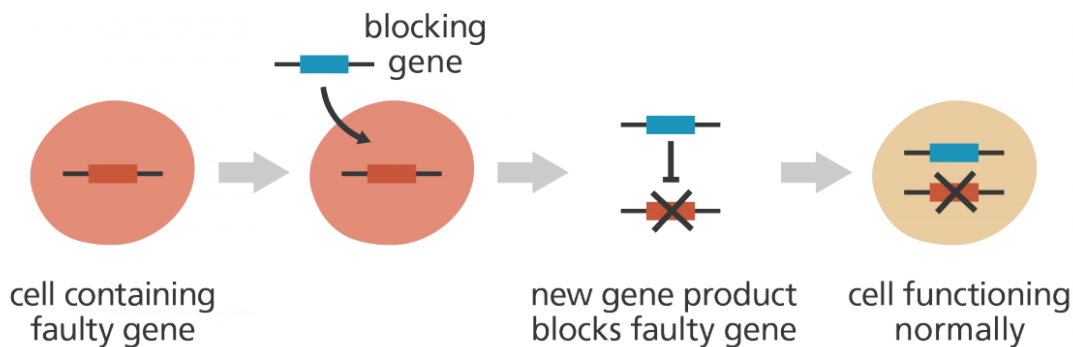
Strategie využívané v GT

Gene augmentation therapy



- Vhodné ve chvíli, kdy poškození genu má za následek deficienci funkčního produktu.
- Přidání funkčního genu do buňky nebo záměna nefunkčního genu za funkční.
- Vhodné například pro léčbu cystické fibrosy.

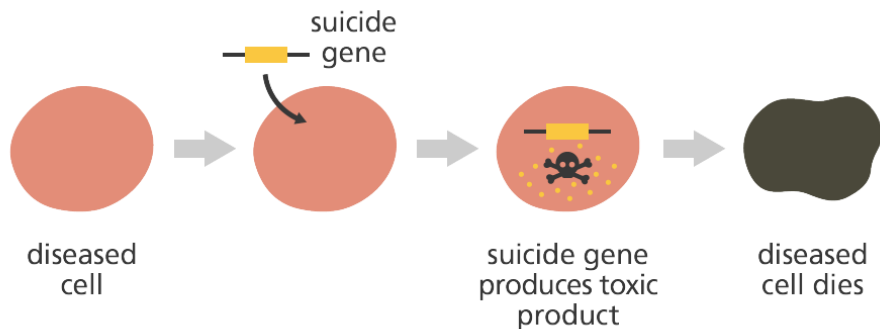
Gene inhibition therapy



- Snaha o eliminaci aktivity genu, která podporuje růst buněk souvisejících s danou chorobou.
- Vhodné pro infekční choroby, rakovinu a dědičné choroby způsobené špatnou funkcí genu.
- Produkt vneseného genu může
 - a) Inhibovat expresi druhého genu
 - b) Interferovat s produktem druhého genu

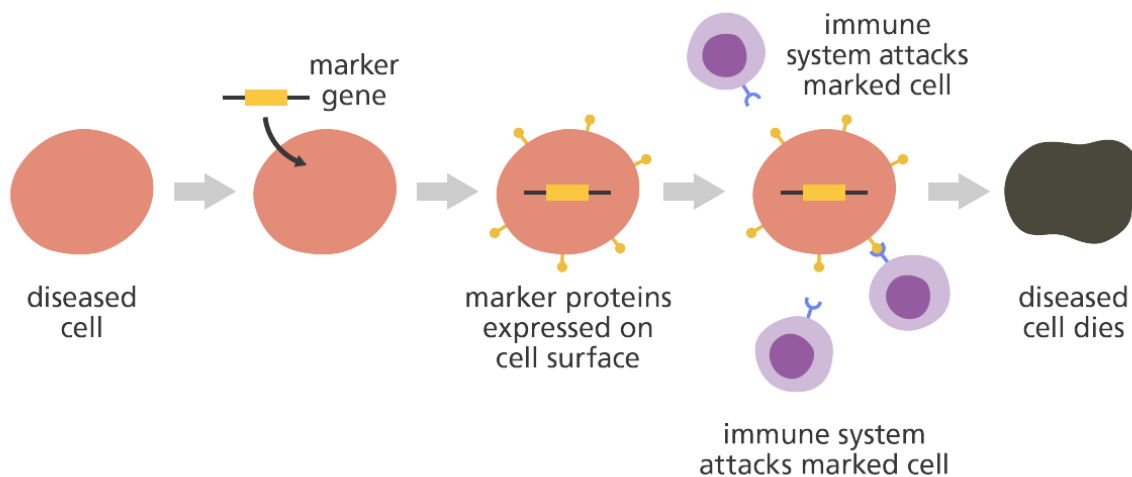
Strategie využívané v GT

Killing of specific cells



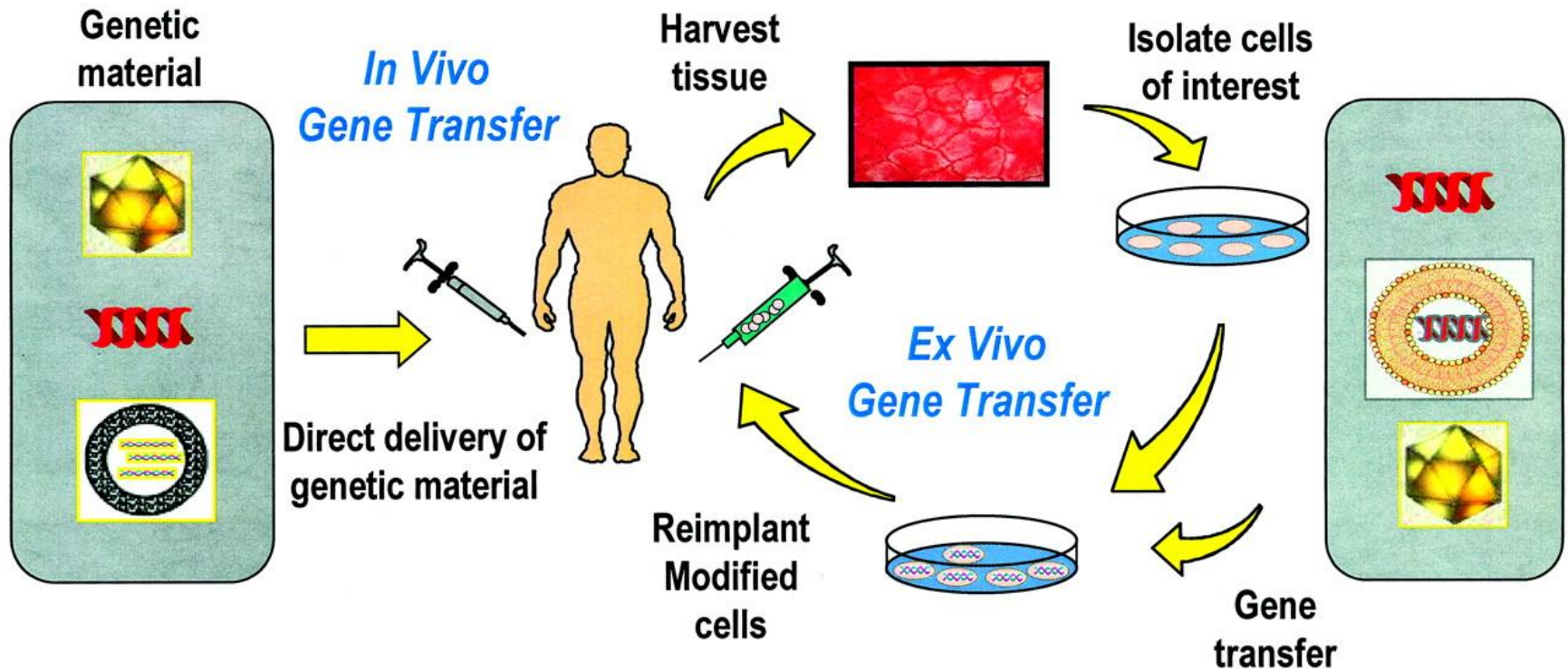
Likvidace konkrétních buněk – například u rakoviny.

A) vložením „sebevražedného genu“
(na trhu **Zalmoxis** – hematologické malignity – schválen 2016)



B) vložením genu, jehož produkt označí buňku pro imunitní systém

In vivo vs. Ex vivo



Jak vpravit gen do tkáně?

Technologie vektoru je základem GT ☺

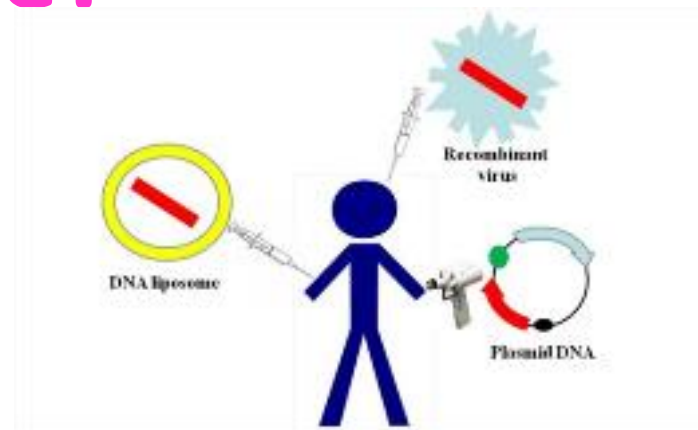
Vektory – virového a nevirového charakteru

a) Za použití biologických vektorů (virální vektory)

- nejpoužívanější

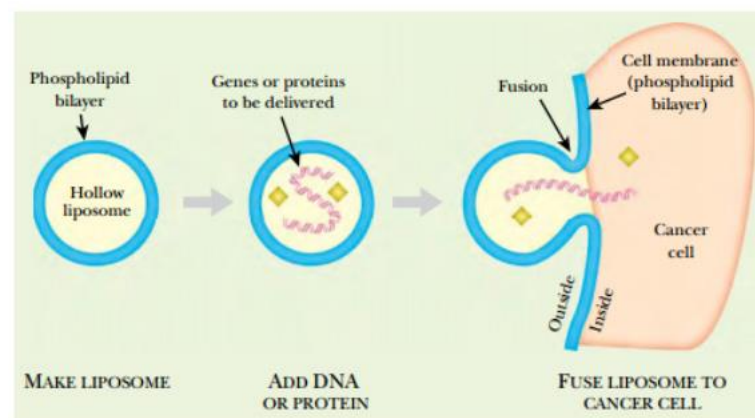
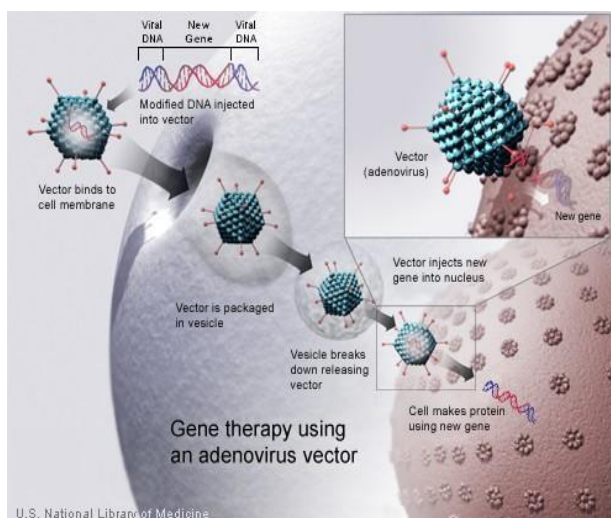
b) Holá DNA – adsorbovaná na kovové částice (např. zlato)

c) DNA obalená lipozomy



http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_en_book/ch03.html (8-12-2017)

• •

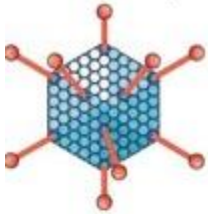


<http://istudy.pk/liposomes-lipoprotection-gene-therapy/> (10-12-2017)

<http://www.genetika-biologie.cz/genova-terapie> (4-12-2017)

Virální vektory

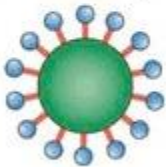
Adenovirus (~36 kb genome)



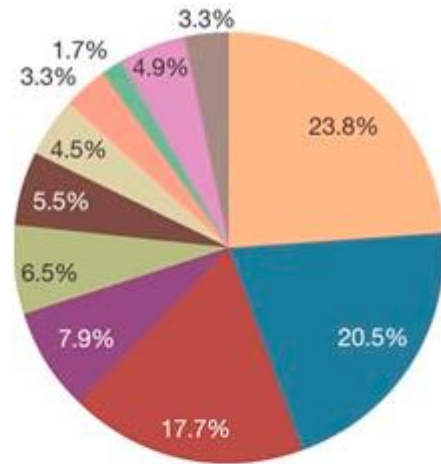
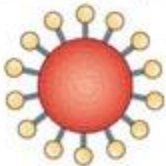
Adeno-associated virus (4.7 kb genome)



Retrovirus (7–10 kb genome)

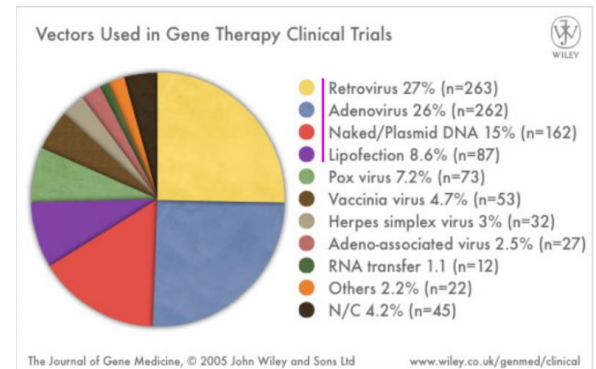


Lentivirus (9–10 kb genome)



- Adenovirus (n = 400)
- Retrovirus (n = 344)
- Naked/plasmid DNA (n = 304)
- Vaccinia virus (n = 133)
- Lipofection (n = 109)
- Poxvirus (n = 93)
- Adeno-associated virus (n = 75)
- Herpes simplex virus (n = 56)
- Lentivirus (n = 29)
- Other categories (n = 82)
- Unknown (n = 55)

Dobré cílení do buněk.
Dobrý vstup do buněk
X
Omezená velikost insertu
Imunogenní



Jaký má být vhodný vektor?

Pokaždé jinak 😊

- Bezpečný (bez vedlejších účinku, neimunogenní)
- Cílený na příslušné buňky
- Snadno získatelný (produkce, purifikace apod.)
- Stabilní
- Efektivní
- Snadno aplikovatelný
- Schopný chránit genetickou informaci, kterou nese
- Nesmí obsahovat – sekvence homologní s funkčními geny, jiné čtecí rámce, informace pro produkci toxického produktu apod.



První testy genové léčby - 1990

- SCID severe combined imunodeficiency - těžká imunodeficiencie
- Jedna z forem se projevuje nedostatkem aktivního enzymu adenosine deaminasy (ADA)
- Riziko infekcí – sterilní prostředí
- 4letá dívka – vektor s genem pro ADA vnesen ex-vivo do T-lymfocytů – opakování 6-12 měsíců

<http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/Ashanti.html> (7-12-2017)

Ashanti DeSilva



<https://www.texaschildrens.org/blog/2017/04/immunodeficiency-awareness-severe-combined-immunodeficiency-newborn-screening> (10-12-2017)

Ale 1999

- První úmrtí následkem vedlejších účinků GT
- adenovirový vektoru nesoucí gen pro ornithin transkarbamoylázu

Ale 2002

- 5 chlapců s vážnější SCID léčeno GT
- ex-vivo
- u dvou propukla leukémie
- transgen se zabudovává do blízkosti onkogenu

2016 EU Strimvelis pro SCID

Komplikace genové terapie

- Velmi vysoká finanční náročnost takovéto terapie (vzácné choroby, individuální přístup).
- Technická náročnost.
- Nízká úspěšnost terapie (efektivita vnášení genetické informace).
- Nutnost kontroly, že vnesený gen nenarušil funkci jiných genů.
- Vektorový virus může infikovat více typů buněk.
- Komplikace s imunitním systémem – reakce na vektor
- Gen může být vnesen do zárodečných buněk.
- Problémy s klasickým klinickým testováním.

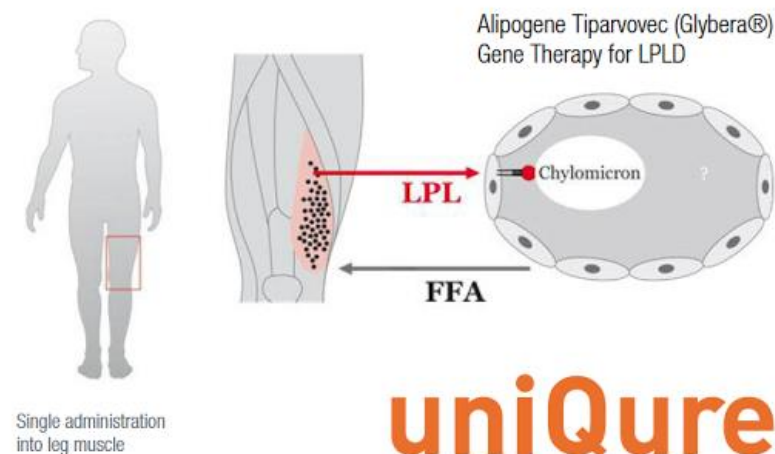
..
..

Etika a komerce

- Genová terapie je eticky problematická.
- na co je etické GT použít a na co už ne? Má GT jen zachraňovat životy nebo je i zpříjemňovat?
- "děti na objednávku"
- Neslyšící děti na objednávku? D – deaf
- Může být dostupná jen pro někoho? Je možné ji zpřístupnit pro všechny?
- Genový doping.

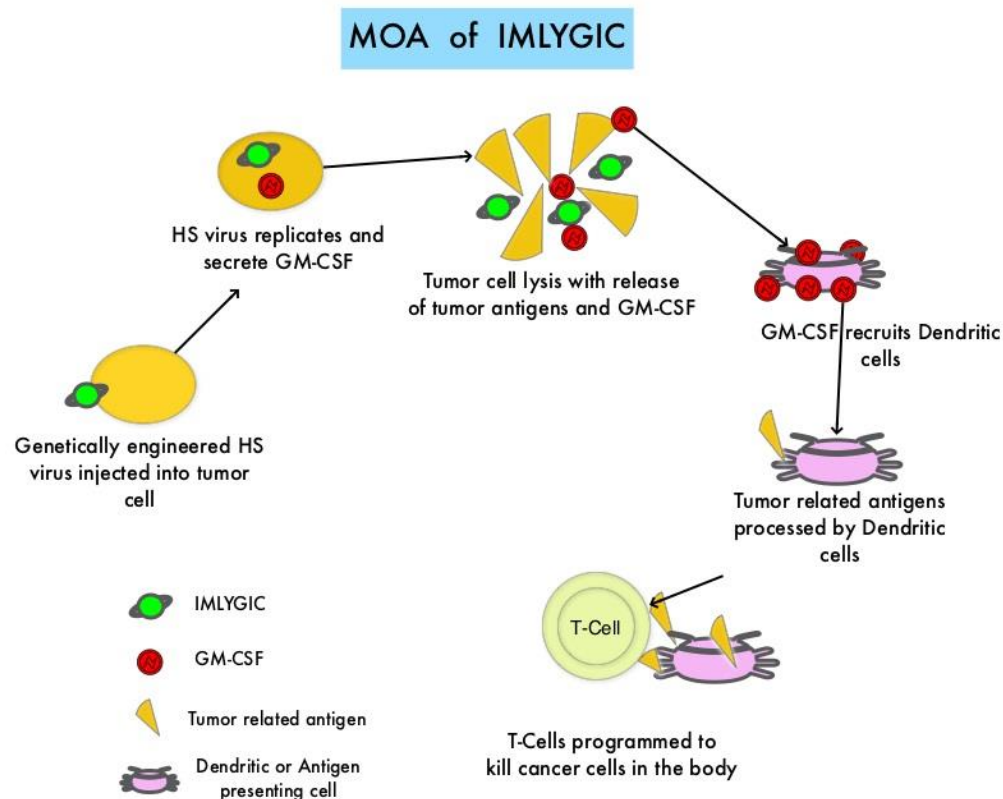
Léčba nedostatku lipoprotein lipasy

Glybera	
Generický název	Alipogene tiparvovec
Látka	virální vektor (adeno-associated viral vector; AAV1) nesoucí gen pro lidskou lipoprotein lipasu (variantu LPLS447X)
Indikace	nedostatek lipoprotein lipasy (LPLD)
Výroba	HEK293 buňky infikované transformovaným adenovirem
Povolení	2012
Pozn.	Virální vektor dopraví gen pro lipoprotein lipasu na místo určení, do kosterního svalstva, kde se exprimuje a následně štěpí chylomikrony a VLDL. LPLD je dědičná metabolická porucha (celosvětově postihuje 1 000 až 5 000 pacientů), pro kterou jsou charakteristické abnormálně zvýšené koncentrace chylomikronů a triacylglycerolů v plasmě. Onemocnění je způsobené nedostatečnou aktivitou lipoprotein lipasy. Bylo objeveno více než 120 mutací tohoto genu, který je lokalizován na chromozomu 8 a je exprimován převážně v kosterním svalstvu, tukové tkáni a srdečním svalu. Nedostatek LPL způsobuje akumulaci chylomikronů a následné silné bolesti břicha, zvětšenou slinivku a ledviny až smrtelné pankreatitidy. Pacienti nejsou schopni trávit lipidy přijímané potravou. První genová terapie s virálním vektorem povolena v USA a Evropě.



Imlygic

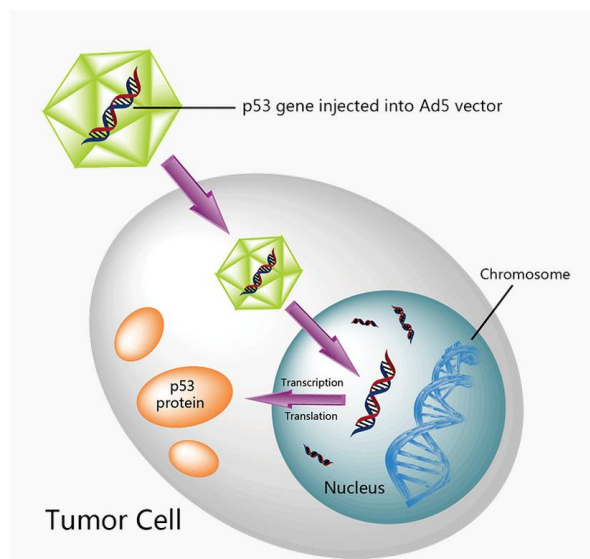
- 2015
- Vnášena sekvence pro lidský faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie
- Indickace: Neresekovatelný maligní melanom



<https://www.oncoprescribe.com/oncoprescribe.com/newsletter.php?top=462> (10-12-2017)

Mimo EU

Gendicin	
Generický název	Genkaxin
Látka	rekombinantní adenovirový vektor nesoucí sekvenci lidského genu pro protein p53
Indikace	dlaždicobuněčné nádory hlavy a krku
Výroba	HEK293 buňky infikované transformovaným adenovirem
Povolení	2003
Pozn.	Protein p53 je jedním z klíčových proteinů spadajících do kategorie antionkogenů. Pokud je jeho funkce neporušena, reguluje svou expresí růst buňky a podílí se na mnoha kontrolních mechanismech. V mnoha typech rakovinných buněk se vyskytují mutace v sekvenci tohoto proteinu, které způsobují jejich nekontrolovaný růst a množení. Adenovirový vektor dopraví genovou sekvenci pro protein p53 do buňky, ale nedochází k integraci do lidské DNA. Gendicine je první léčivo, které je oficiálně povoleno jako genová terapie (zatím pouze v Číně a Indii).



http://en.pharmacodia.com/web/drug/1_12160.html (10-12-2017)

Léčiva na bázi oligonukleotidů

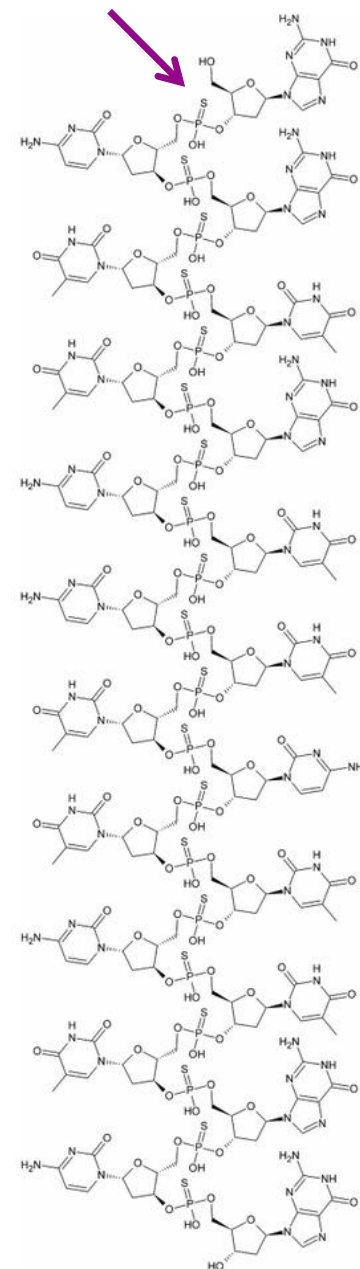
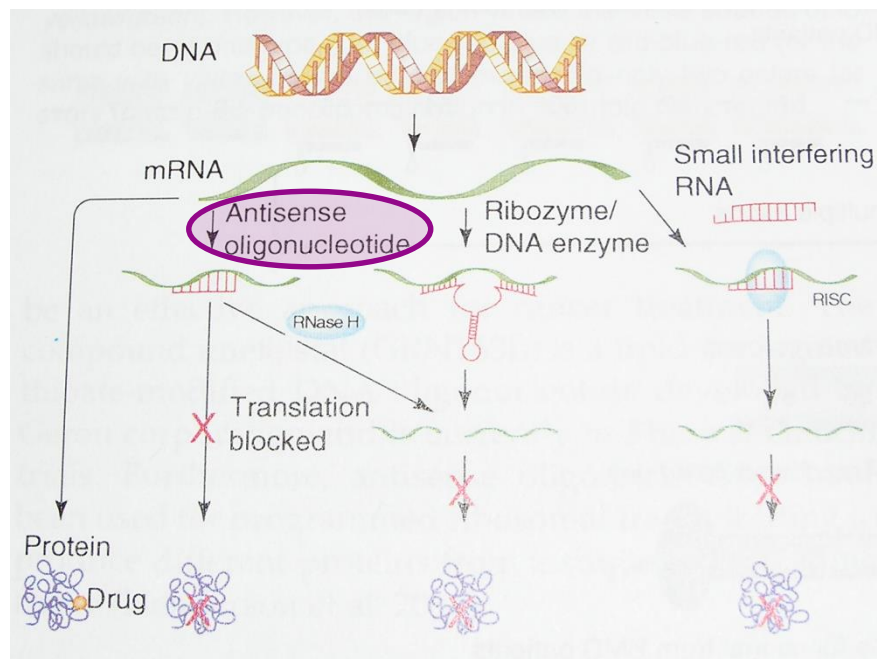
Antisense přístup – sekvence je komplementární k cílové mRNA

- na trhu několik léčiv, další v klinických testech
- modifikované nukleosidy nebo vazby mezi nukleotidy
- inhibice translace
- VÝHODY: - málo nežádoucích účinků
 - nízké výrobní náklady
 - vysoká specifita
 - snadná syntéza, charakterizace a purifikace

Antigene přístup – sekvence je komplementární k DNA

- inhibice transkripce
- zatím žádné léčivo v klinických testech

Antisense terapie

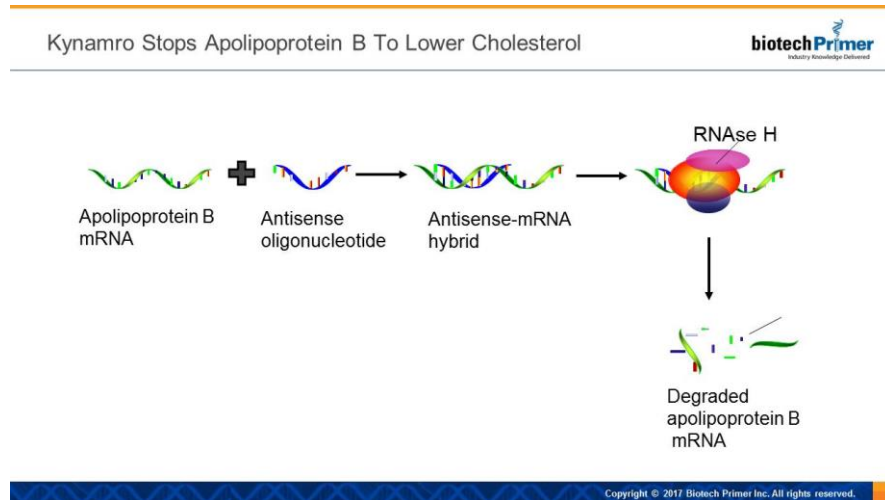


http://en.wikipedia.org/wiki/Fomivirsen#mediaviewer/File:Fomivirsen_composite.png (5-6-2014)

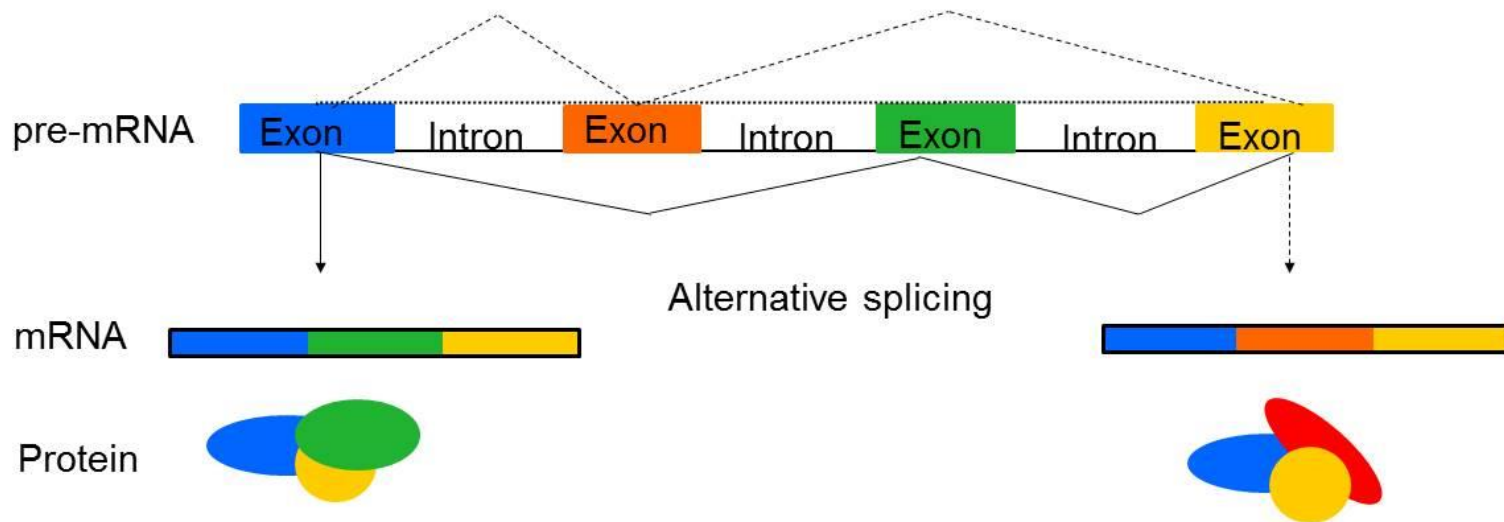
Z knihy: DJA Crommelin, RD Sindelar, B Meibohm: Pharmaceutical Biotechnology, Springer, New York, 4. vydání, 2013

Vitravene	
Generický název	Fomivirsen sodium
Látka	21-merní antisense oligonukleotid modifikované DNA komplementární k IE2 (immediate early region 2) mRNA lidského cytomegaloviru (CMV).
Indikace	aplikace do oka u HIV pacientů pro snížení CMV očních infekcí a následných komplikací
Výroba	Synteticky
Povolení	1998
Pozn.	Vazbou antisense DNA je zastavena syntéza proteinu IE2, který je klíčový pro vznik funkčního CMV. náhrada P-O za P-S

Kynamro	
Generický název	mipomersen sodium
Látka	20 merní antisense modifikovaný oligonukleotid směřovaný proti mRNA apolipoproteinu B
Indikace	Homozygotní familiální hypercholesterolemie
Výroba	Synteticky
Povolení	2013
Pozn.	Struktura oligonukleotidu je G*-C*-C*-U*-C*-dA-dG-dT-dC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-C*-A*-C*-C* kde d značí 2'-deoxy a * značí 2'-O-(2-methoxyethyl). Jednotlivé nukleotidy jsou vázány fosforothioátovou vazbou na místo přirozené fosfordiesterové vazby. Struktura zajišťuje vyšší odolnost proti degradujícím enzymům při zachování biologické aktivity.



Introns & Exons Explained



- **Intron**: region that is cut out of the pre-RNA and is not part of the mRNA
- **Extron**: region that is included in the final mRNA
- **Alternative splicing**: a process that includes or excludes exons from the final, processed mRNA

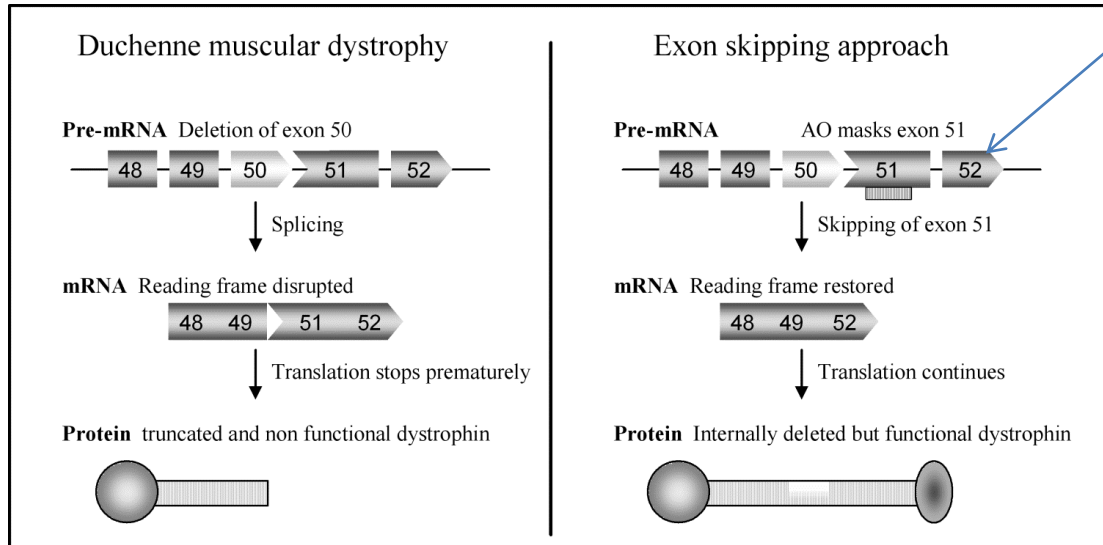
<https://weekly.biotechprimer.com/rna-therapeutics-march-onward/> (9-12-2017)

Antisense-Induced Exon Skipping

Duchennova svalová dystrofie

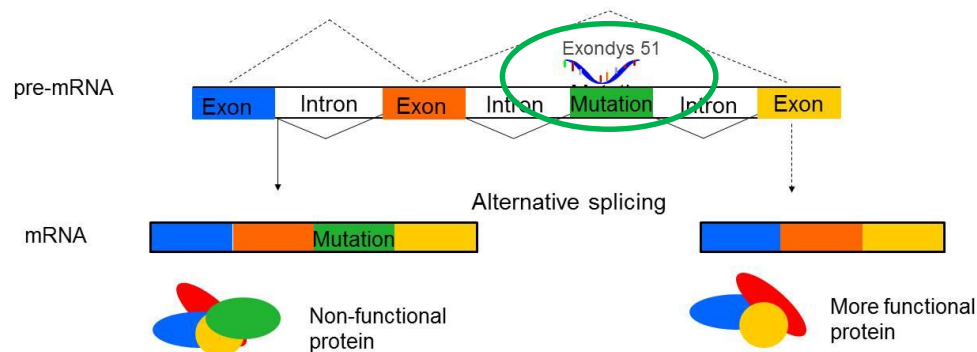
Mutace genu pro dystrofin (chromozom X)

Antisense oligonukleotid



Exon Skipping: Dystrophin Splicing With Exondys 51

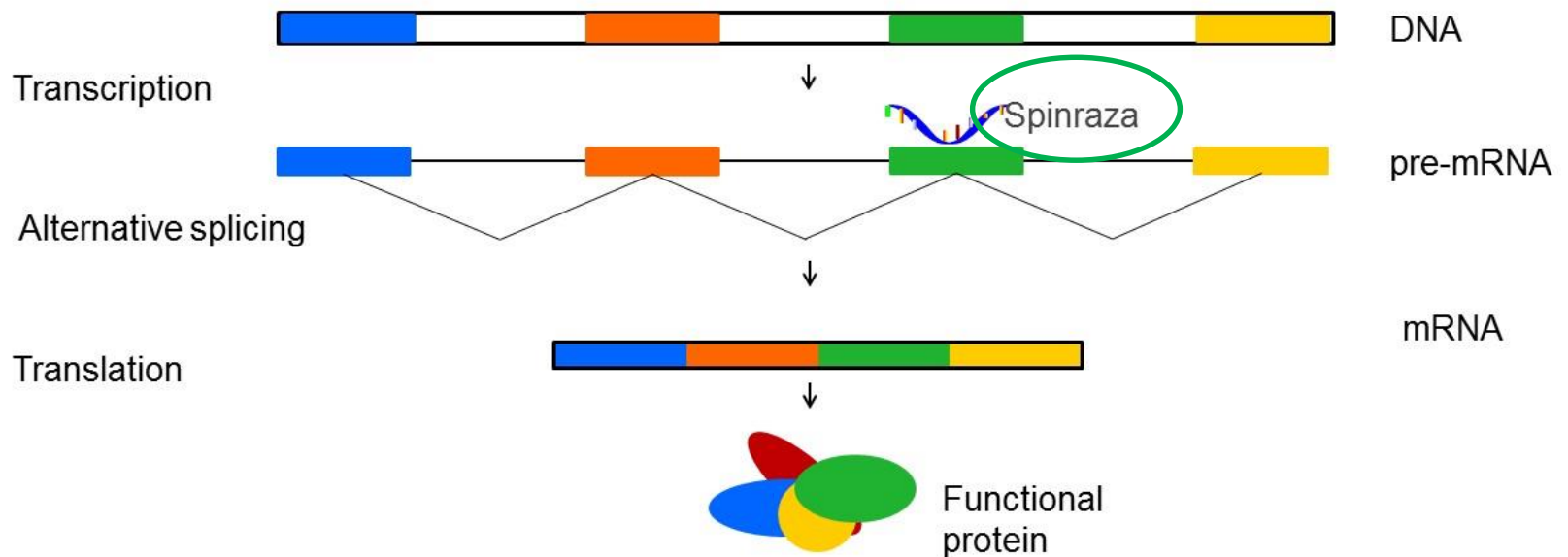
biotechPrimer
Industry Knowledge Delivered



<http://www.skeletalmusclejournal.com/content/1/1/8/figure/F1> (10-7-2014), Goyenvalle and Davies *Skeletal Muscle* 2011 1:8 a dále DJA Crommelin, RD Sindelar, B Meibohm: *Pharmaceutical Biotechnology*, Springer, New York, 4. vydání, 2013

<https://weekly.biotechprimer.com/fna-therapeutics-march-onward/> (9-12-2017)

SMN2 Splicing With Spinraza: Exon Inclusion



Budoucnost

Select Antisense Drugs In Clinical Development

Company	Disease/Drug Target	Phase
Ionis/GSK	Transthyretin (TTR)-mediated amyloidosis/TTR	PIII
Ionis/Akcea	Familial chylomicronemia syndrome/ApoCIII	PIII
Ionis/Achaogen	Severe bacterial infections/aminoglycoside	PIII
Celgene	Crohn's disease/Smad7	PIII
Ionis	Prostate cancer/androgen receptor	PII
Ionis/AstraZeneca	Various cancers/STAT3	PII
Ionis	Diabetes/glucagon receptor	PII
Ionis/Roche	Huntingtin (HTT) protein/Huntington's disease	PII
Ionis/Bayer	Clotting disorders/Factor XI	PII
Sarepta	Ebola, Marburg, influenza viruses	PI

Klinicky testované oligonukleotidy

Oligonucleotide:	Target:	Disease:	Status:	Sponsor:
fomivirsen Vitravene™ (ISIS 2922)	HCMV IE gene-2	CMV retinitis	NDA approved On the market	Isis/Ciba Vision
Pegaptanib (Macugen)	VEGF receptor / VEGF 165	neovascular (wet) age-related macular degeneration (AMD)	FDA approved / on the market	Gilead Sci. / OSI Pharmaceuticals
ISIS 2302	ICAM-1	Rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriasis, ulcerative colitis	Phase III Phase II	Isis/Boehringer Ingelheim
ISIS 3521/CPG 64128A	Protein kinase C- α	Cancer	Phase II	Isis/Novartis
ISIS 5132/CPG 69846A	<i>c-ras</i> kinase	Cancer	Phase II	Isis/Novartis
ISIS 13312	HCMV IE gene	CMV retinitis	Phase I/II	Isis
GEM-92	<i>gag</i> gene	AIDS	Phase I	Hybridon
zintevir	HIV integrase	AIDS	Phase I/II	Aronex
G3139	<i>bcl-2</i>	Cancer	Phase II	Genta
Heptazyme	IRES region	HCV	Phase I	Ribozyme Pharmaceuticals
Angiozyme	VEGFR	angiogenesis (cancer)	Phase I	Ribozyme Pharmaceuticals

Role miRNA (microRNA) při regulaci exprese

21–23 nukleotidů, pravděpodobně kontrola cca 30% protein-kódujících genů (vztah k vývoji, diferenciaci, apoptose, metabolismu, signalizaci apod.)

Potlačení exprese daného genu

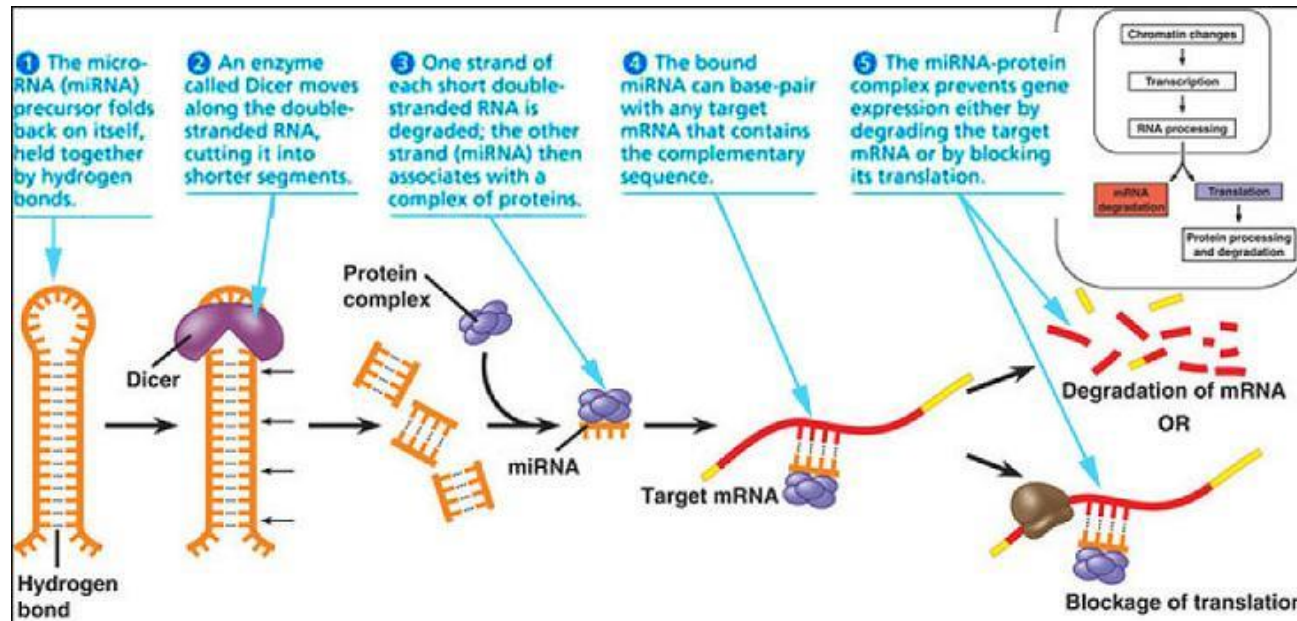
- 2 mechanismy a) degradace mRNA b) blokování translace

Role v onemocněních jako je rakovina a kardiovaskulární a imunitní onemocnění.

miRNA – obrovský potenciál a) v léčbě i b) v diagnostice

Př: cílení na miRNA up-regulované v některých typech rakoviny

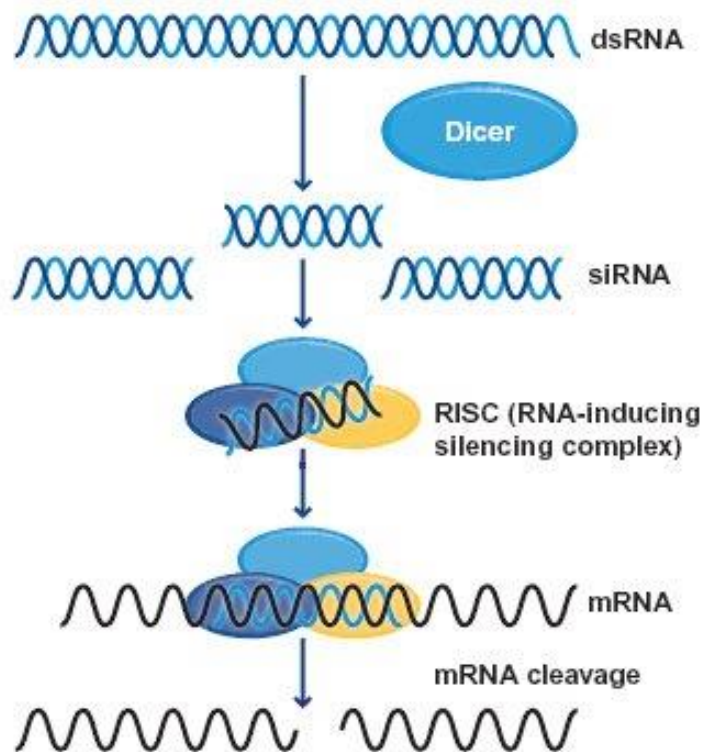
- miRNA silencing, antisense blocking apod.



Role siRNA (small interfering RNA) při procesu RNA interference



siRNA pathway



21-25 nukleotidů
dvouvláknová RNA

potlačení exprese daného genu

Mnoho látek v klinických testech

například:

PF-4523655

(Quark Pharmaceuticals)

- diabetický makulární edém

- věkem podmíněná makulární degenerace

Aptamery a riboswitch

ssDNA či RNA, obvykle délka cca 60 nukleotidů (20 až 100)

Zaujímají definovanou 3D strukturu

Vazba k cílové molekule – tvar, náboj, hydrofobní interakce, vodíkové můstky

Modulace aktivity cílového proteinu

Aptamer – uměle izolovaný (metoda SELEX)

Riboswitch – přirozený výskyt (viry, prokaryota apod.)

Macugen (pegaptanib):

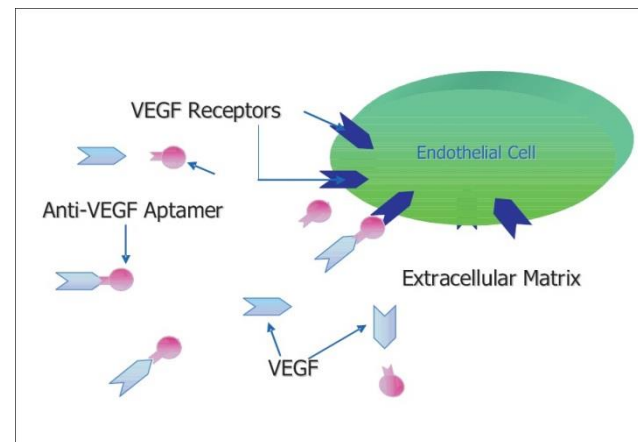
aptamer – konjugát s polyethylenglykolem

cílení a blokace vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

léčba „vlhké“ formy věkem podmíněné makulární degenerace

Další možnosti využití:

- cílení (chimery s nanočásticemi či siRNA)



http://www.ijo.in/temp/IndianJOphtalmol556413-2340445_063004.pdf (7-12-2017)

Macugen	
Generický název	Pegaptanib sodium
Látka	28-merní aptamer (oligonukleotid vázající se na protein), který se velmi silně váže na cévní endotelový růstový faktor (VEGF) oligonukleotid je modifikován pegylací
Indikace	věkem podmíněné makulární degenerace
Výroba	Synteticky
Povolení	2004
Pozn.	Vazba Macugenu brání interakci VEGF s jeho receptorem, čímž dochází k zablokování VEGF-zprostředkované patologické angiogeneze a neovaskularizace. Nejedná se o antisense léčivo, protože nedochází ke komplementární vazbě na DNA či RNA. Podobně jako u protilátek dochází k vazbě na specifický cíl. Léčivo se podává ve formě intravitreálních injekcí (do oka) jako vodný roztok.