

Strategies for treating genetic disorders

- Specially formulated diets
 - Restrictive diet to lower the intracellular level of toxic molecule
 - Supplemented diet to replace a metabolic deficiency
- Inhibition of enzyme reactions
 - Enzyme inhibitor to prevent the accumulation of the toxic molecule by blocking a step in a metabolic pathway that precedes the reaction with a defective enzyme
- Removal of toxic molecules
 - Dialysis
 - Removal of excess cations (chelation)
 - Facilitation of excretion by binding a toxic molecule to a low-molecular-weight compound
- Replacement of defective or missing product
 - Enzyme replacement therapy
 - Protein replacement therapy
 - Cofactor supplementation

Strategies for treating genetic disorders

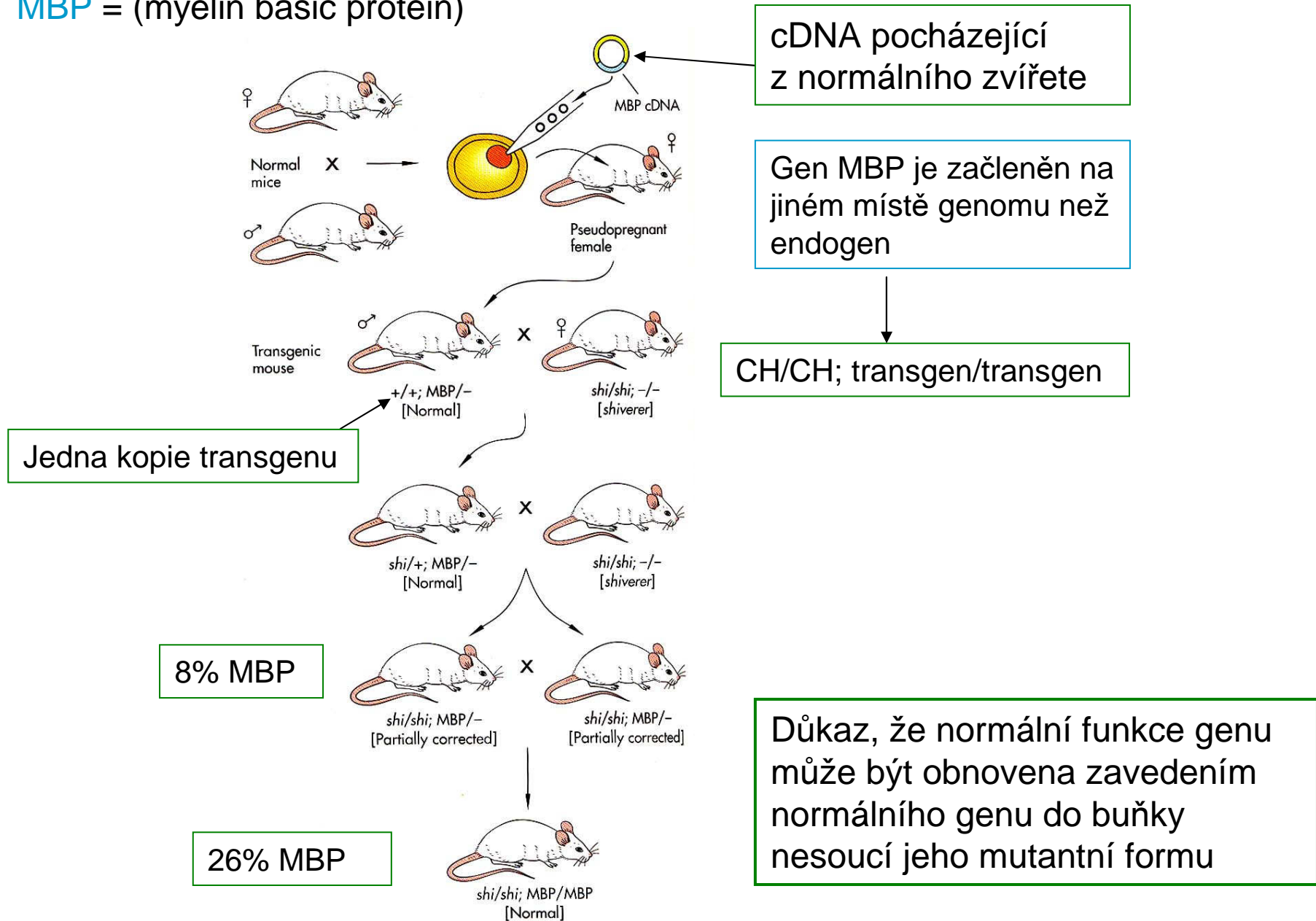
- Alteration of defective protein by small molecules
 - Restoration of partial protein function
 - Directed proteolytic degradation of defective protein
- Transplantation
 - Replacement of a nonfunctional organ (organ transplantation)
 - Providing a required protein synthesized by blood cells (bone marrow transplantation)
- Gene therapy
 - Rectification of a genetic defect with a functional gene
- Nucleic acid therapy
 - Blocking translation of mRNA from a mutant gene with an oligonucleotide (antisense, ribozyme)
 - Correction of gene mutation with an oligonucleotide

Korekce genetických defektů v transgenních zvířatech

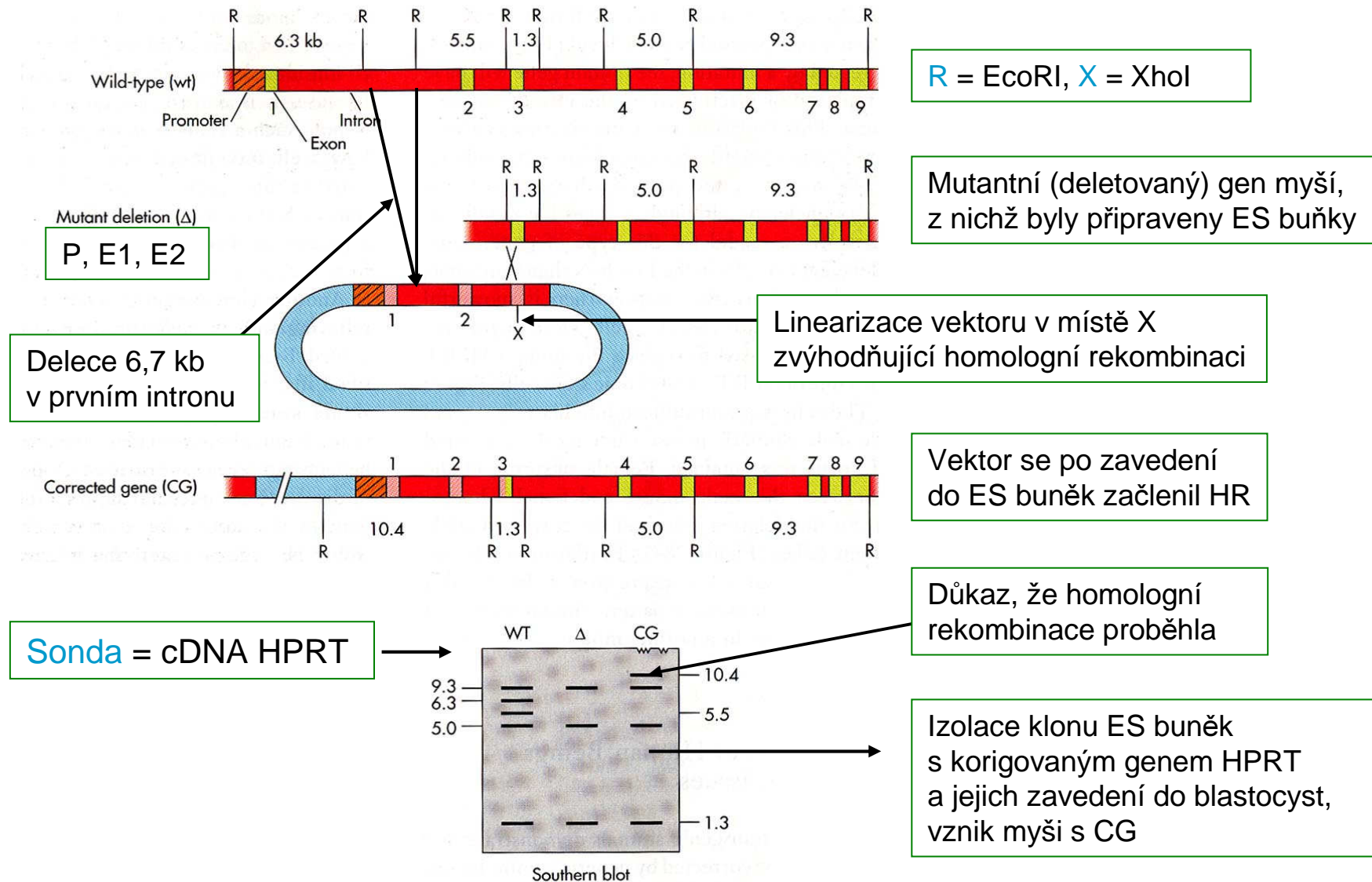
- může být normální funkce obnovena zavedením normálního genu do buňky nesoucí mutantní formu genu (aniž by došlo k začlenění homologickou rekombinací)?
- bude ke korekci docházet v případě, že se produkt tvoří v jiných tkáních?
- bude množství funkčního proteinu dostačující?
- jaké budou vedlejší efekty?

Korekce choroby „shiverer“ – deficiencie MBP

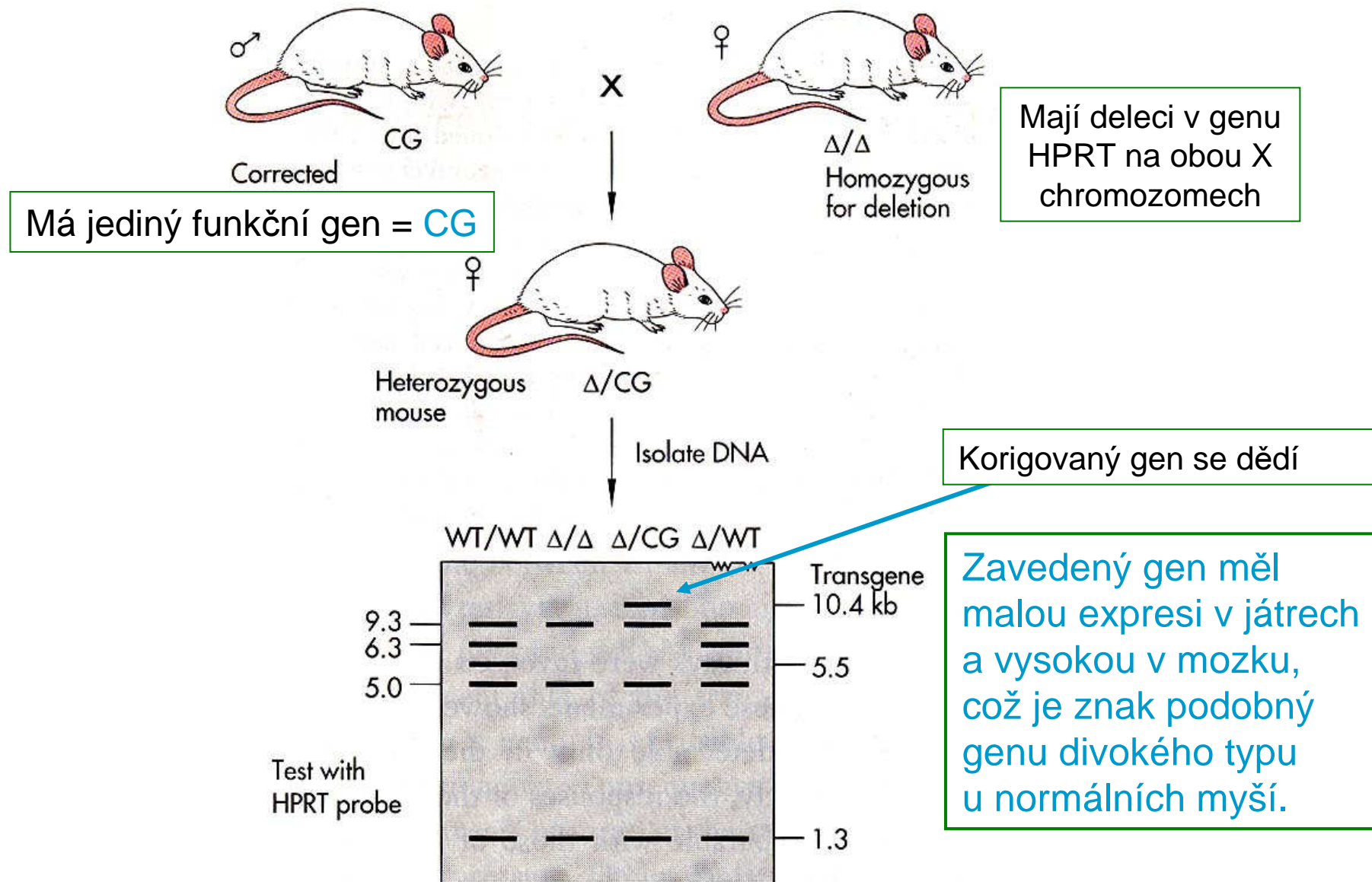
MBP = (myelin basic protein)



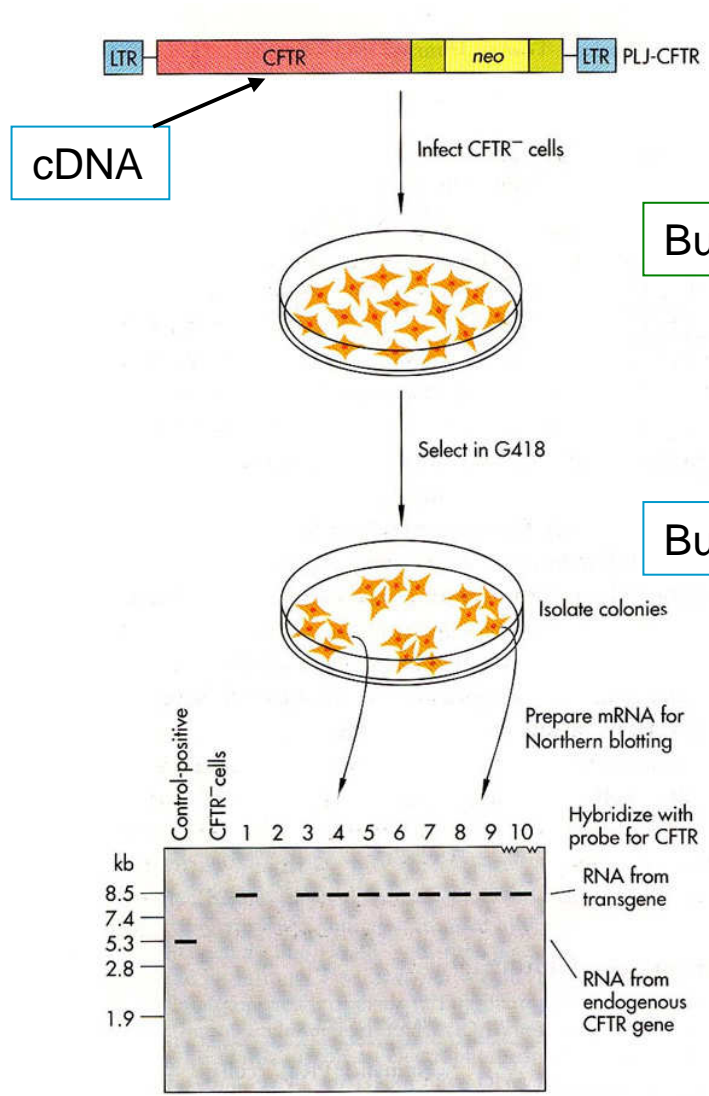
Korekce mutace v genu HPRT homologní rekombinací v ES buňkách (HPRT-)



Korigovaný gen pro HPRT (CG) se stabilně integruje do X-chromozomu



Korekce defektu funkce CFTR in vitro



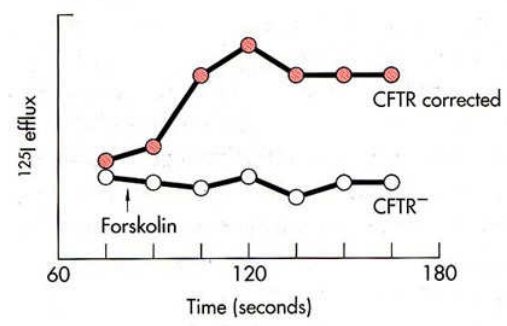
CFTR = transmembránový regulátor

Buňky z pacienta trpícího CF

Buňky rezistentní k G418 – vektor se začlenil

Forskolin = stimulátor adenylátcyklázy

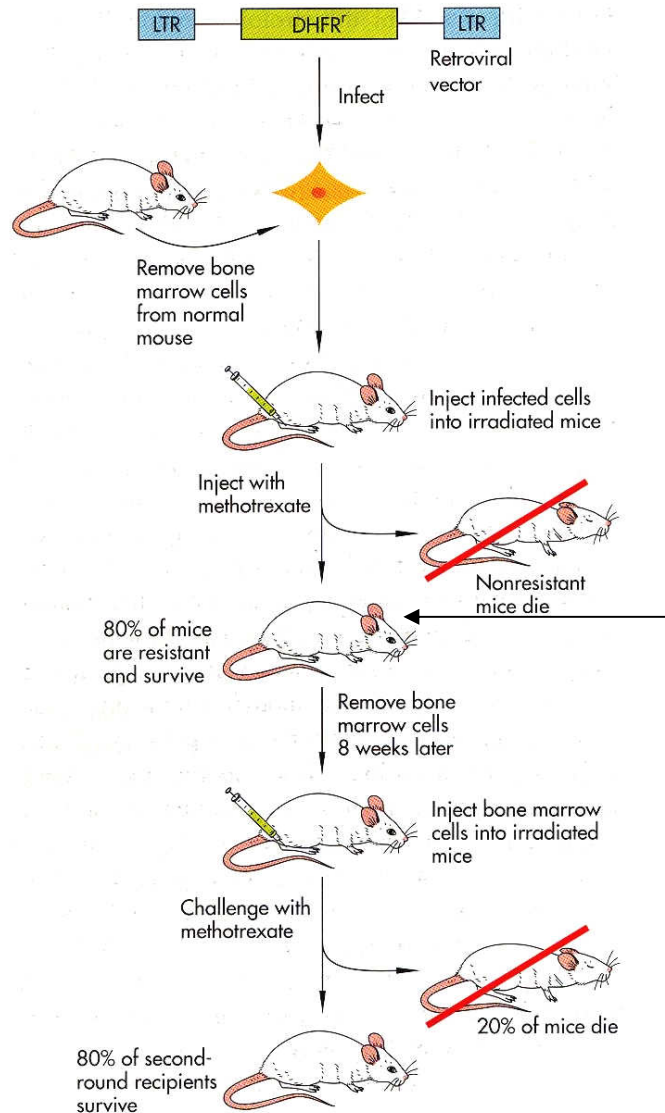
Test positive clone for cAMP-dependent stimulation of ¹²⁵I efflux



Correction of Human Inherited Disorders in Cells in Tissue Culture

Disorder	Human gene	Target cell
Lesch-Nyhan syndrome	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT)	Human HPRT ⁻ cells
Severe combined immunodeficiency	Adenosine deaminase (ADA)	Human ADA ⁻ skin fibroblasts; T cells; B cells
Severe combined immunodeficiency	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	Human PNP ⁻ skin fibroblasts
Gaucher disease	Glucocerebrosidase (GC)	Human GC ⁻ skin fibroblasts; bone marrow
Emphysema	α_1 -Antitrypsin	Human liver cells
Short stature	Growth hormone	Human epidermal cells
Familial hypercholesterolemia (model)	Low density lipoprotein receptor	Hyperlipidemic rabbit fibroblasts; hepatocytes
Phenylketonuria	Phenylalanine hydroxylase	Mouse hepatoma cells
Citrullinemia	Argininosuccinate synthetase	Mouse fibroblasts
Thalassemia	β -Globin	Mouse fibroblasts; mouse erythroleukemia cells
Hemophilia (model)	Factor IX	Hemophilic dog skin fibroblasts

Buňky se zavedeným transgenem přežívají in vivo



Mutantní forma DHFR
rezistentní k metotrexátu

Usmrcení vlastních
kmenových buněk zářením

Primární recipient

V kostní dřeni se exprimuje
DHFR, tj. buňky z primárního
recipienta v ní přežívají

Možné způsoby léčby genetických onemocnění

1. Úprava diety – kareční terapie (galaktosemie, fenylketonurie)
2. Substituční terapie (hemofilie, diabetes, nanismus)
3. Genová terapie (kauzální léčba)
 - vnesení funkčního genu (funkční alela navíc)
 - cílená oprava mutace homologní rekombinací
 - cílené usmrcování geneticky pozměněných buněk
 - cílená inhibice exprese genů zodpovědných za genetickou poruchu

Metody opravy nebo inaktivace patogenních genů v buňkách a tkáních

- A. Oprava mutantní alely homologní rekombinací
- B. Inhibice translace pomocí antisense oligonukleotidů
- C. Selektivní destrukce nebo reparace mRNA pomocí ribozymu
- D. Selektivní inhibice mutantní alely RNA interferencí

Genová terapie

Léčba genetických chorob

- Dědičných
- Nádorových

Podle typu buněk, do nichž jsou geny vnášeny:

- a) Genová terapie zárodečných buněk
- b) Genová terapie somatických buněk

Podle způsobu přenosu genů

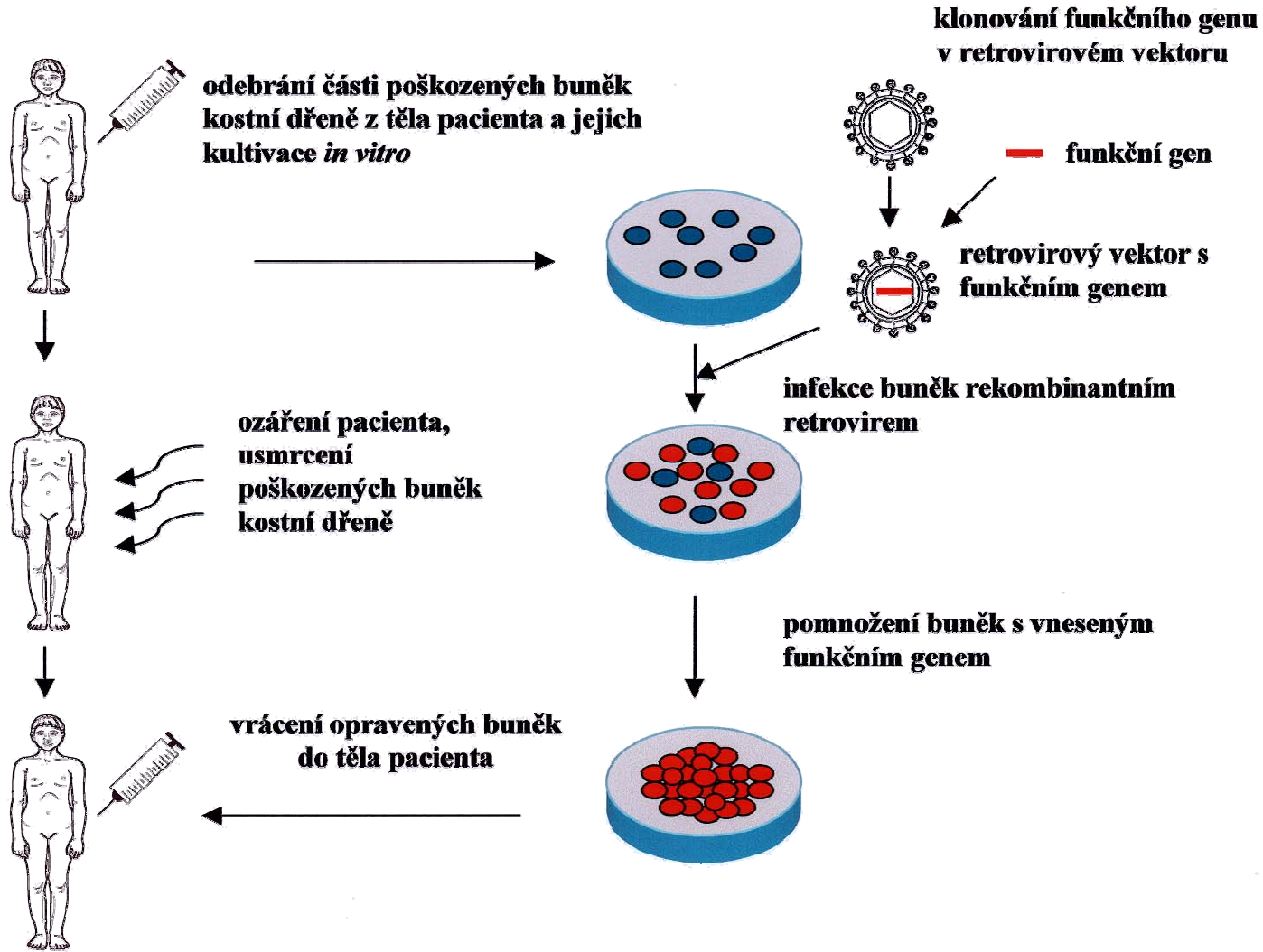
- a) Genová terapie in vitro (ex vivo)
- b) Genová terapie in vivo

Příklady lidských chorob podmíněných monogenně a připadajících v úvahu pro genovou terapii v současnosti

Nemoc	Hlavní symptomy	Produkt defektního genu	Četnost
Deficience adenosin-deaminázy (ADA)	Defektní T-lymfocyty, porucha v tvorbě protilátek, narušení imunitního systému.	adenosindeamináza	1/10 ⁶
Fenylketonurie	Fyzická a psychická retardace.	fenylalaninhydroxyláza	1/12 000
Hemofilie A + B	Porucha v srážlivosti krve, krvácivost.	faktor VIII, faktor IX	1/10 ⁶ mužů
Familiární hypercholesterolemie	Předčasné arteriosklerotické změny cév.	LDL-receptor	1/500
Deficience na α_1 -antitrypsin	Plicní emfyzém, (rozedma plic).	α_1 -antitrypsin	1/3 500
Cystická fibróza, CF	Porucha v transportu Na ⁻ , zahlenění dýchacích cest, embolie.	transmembrá-nový regulátor CF	1/2 500
Gaucherova choroba	Nádory sleziny, zvětšení jater, žluté zbarvení (pigmentace) kůže.	glukocerebrozidáza	?
Duchennova svalová dystrofie	Svalová ochablost.	dystrofin	1/3 000 mužů
Leschův-Nyhanův syndrom	Usazování kyseliny močové v kloubech a ledvinách, poruchy CNS.	hypoxantinguaninfosforibozyltransferáza	1/10 ⁶

Genová terapie in vitro

Ex vivo



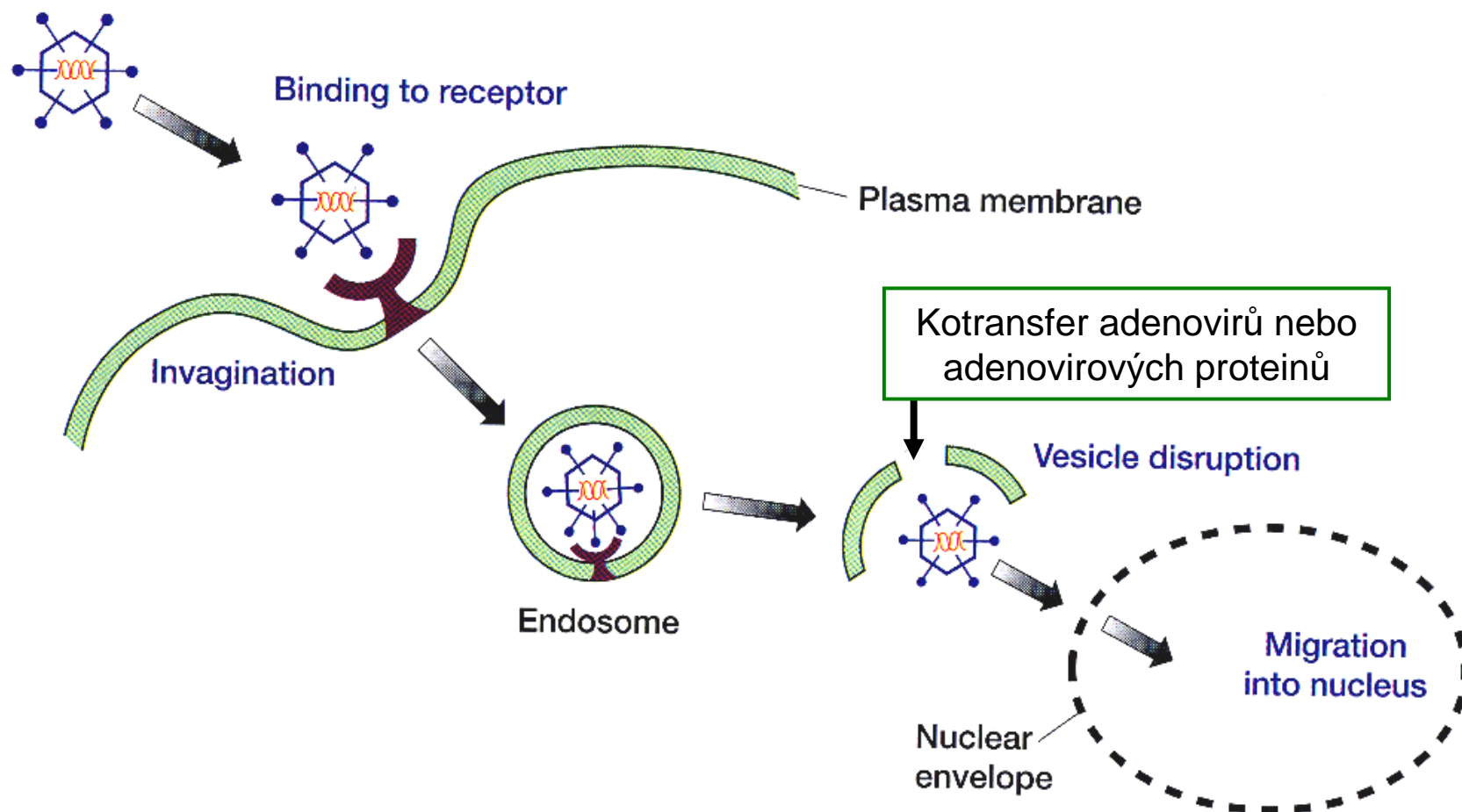
Přímá injekce a bombardování: účinný přenos do buněk různých tkání. Účinnost není vysoká a injikovaná DNA není stabilně integrována. Ve svalech se může DNA udržet i několik měsíců.

Využití: přenos plazmidových konstruktů pro dočasnou expresi transgenu:

- likvidace infekčních agens,
- DNA-vakcinace,
- destrukce nádorů

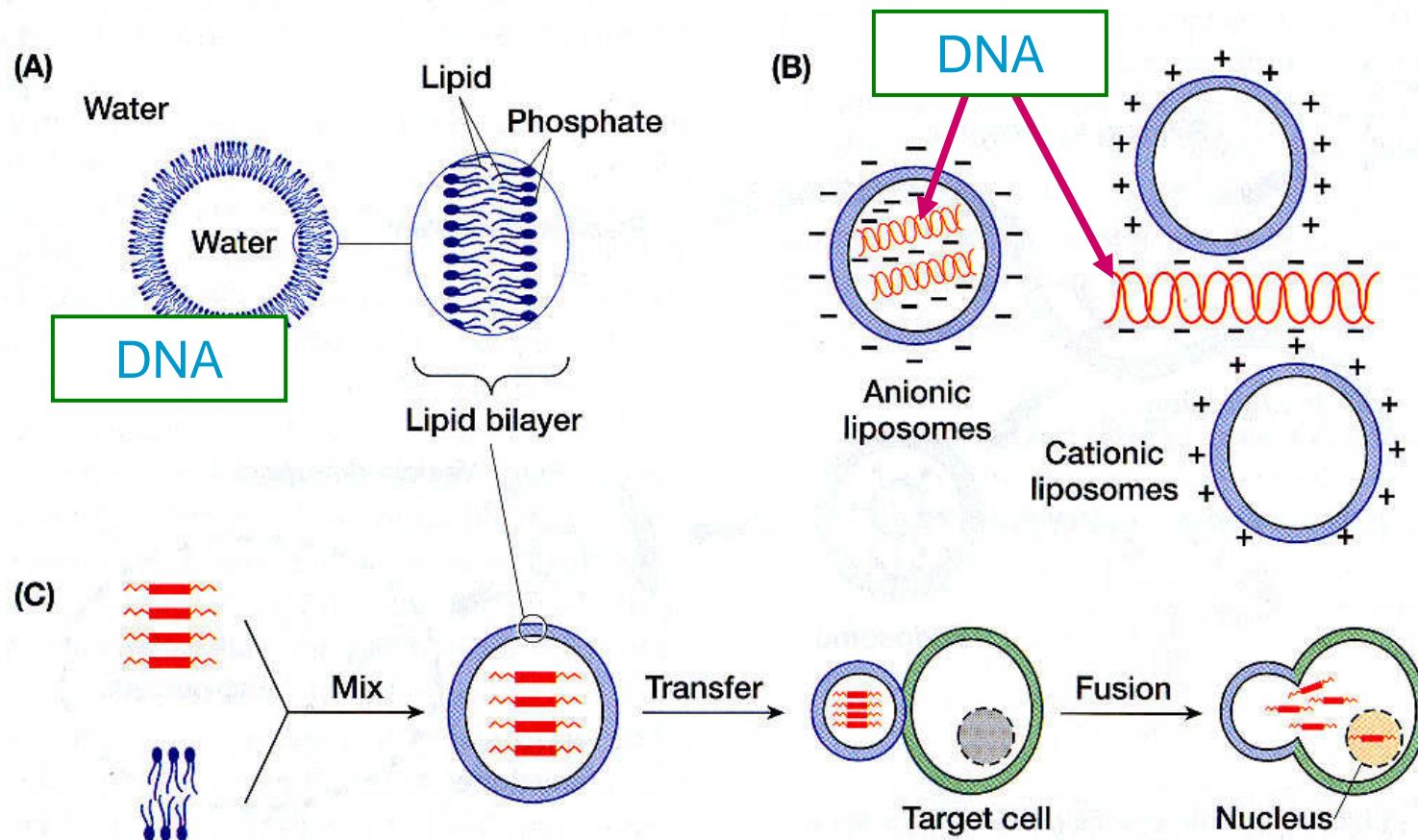
Přenos genů endocytózou zprostředkovanou receptory

Endocytóza: DNA je napojena na molekulu, která se může vázat na receptor buňky, indukovat endocytozu a přenést se tak DNA do buňky. Účinnost metody může být vysoká, ale nedochází k integraci DNA.

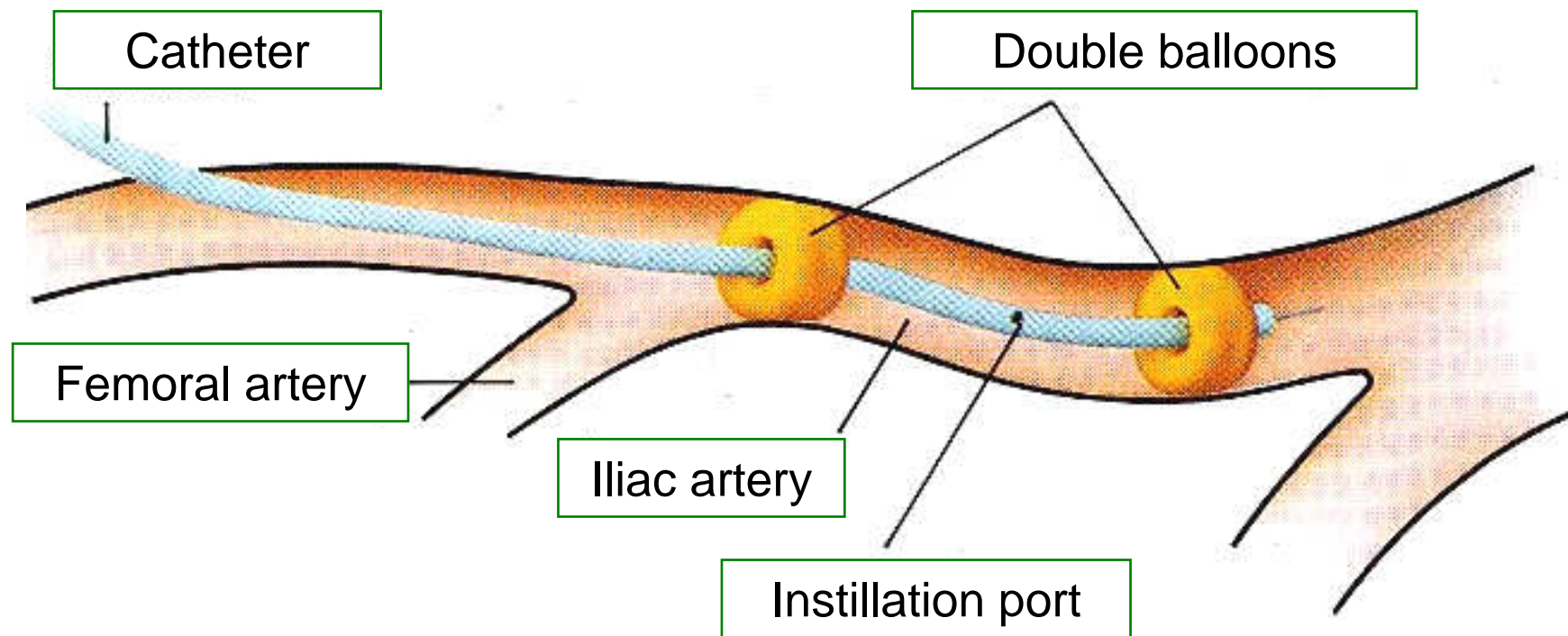


Využití lipozomů pro vnášení genů in vivo

Lipozomy: Syntetické váčky (fosfolipidy), které se tvoří ve vodném prostředí – struktury imitující biologické membrány. Snadno se připravují, není omezena velikost DNA. Účinnost přenosu nízká, DNA se neintegruje do chromozomu a její exprese je dočasná.



Vnášení retrovirových vektorů do těla pacienta (genová terapie in vivo)



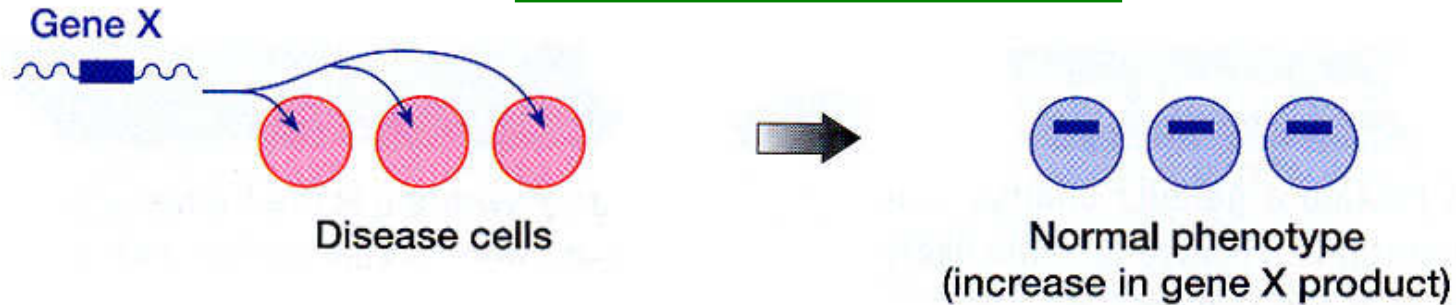
Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

1. Snadné získání buněk z těla
 2. Snadná kultivace v kulturách in vitro
 3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů
 4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat a přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu
- Kmenové buňky kostní dřeně
 - Kožní fibroblasty
 - Hepatocyty
 - Myelocyty

Strategie genové terapie

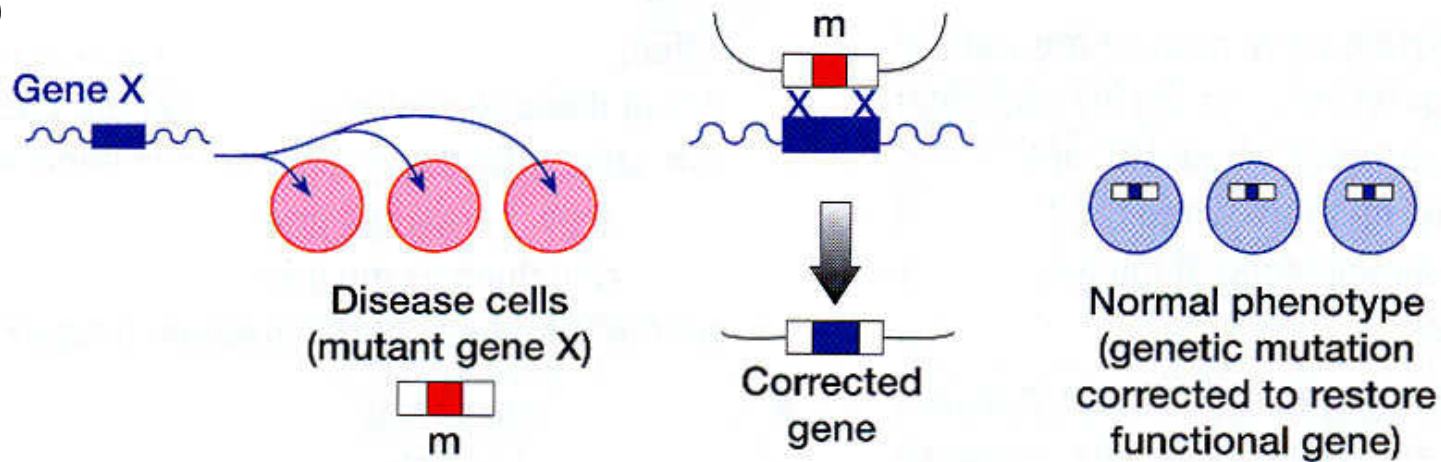
A)

Přidání funkčního genu



B)

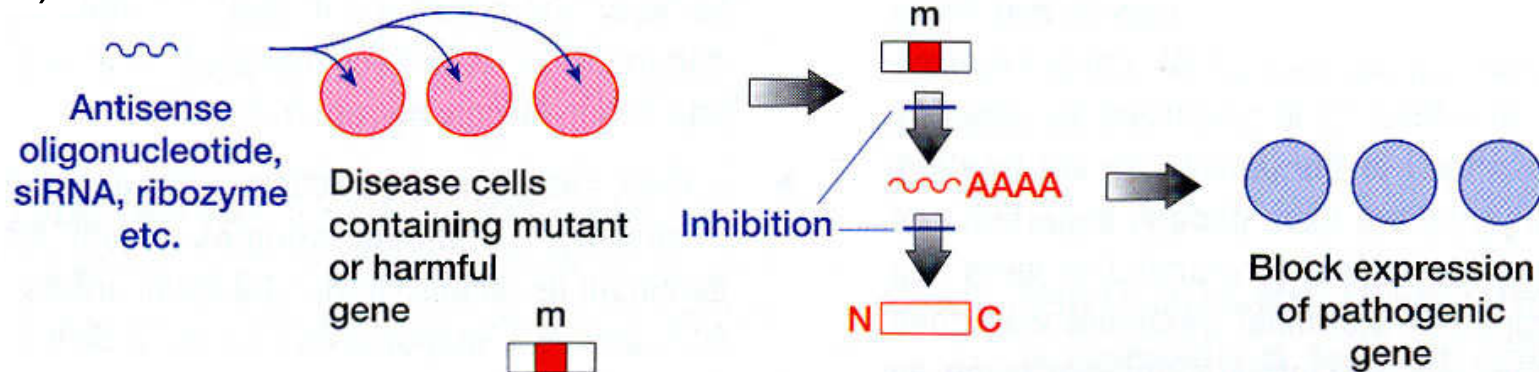
Záměna mutantní formy genu za normální



Strategie genové terapie

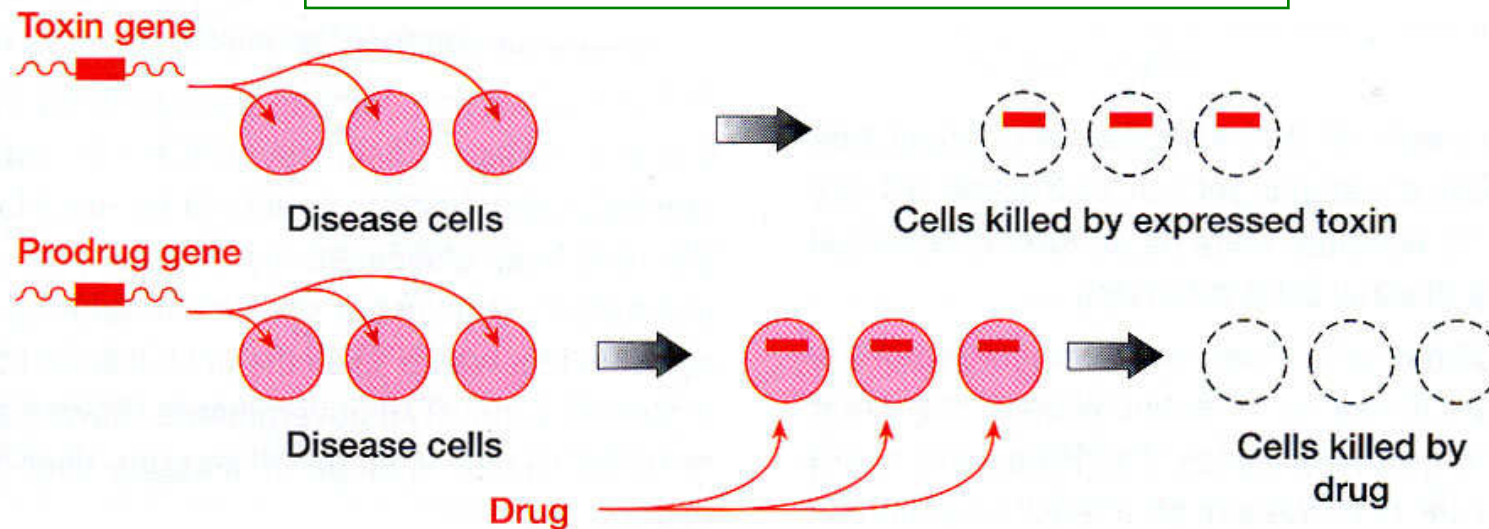
Cílená inhibice genové exprese

C)



D)

Přímé usmrcování patogenních buněk



Strategie genové terapie

C)

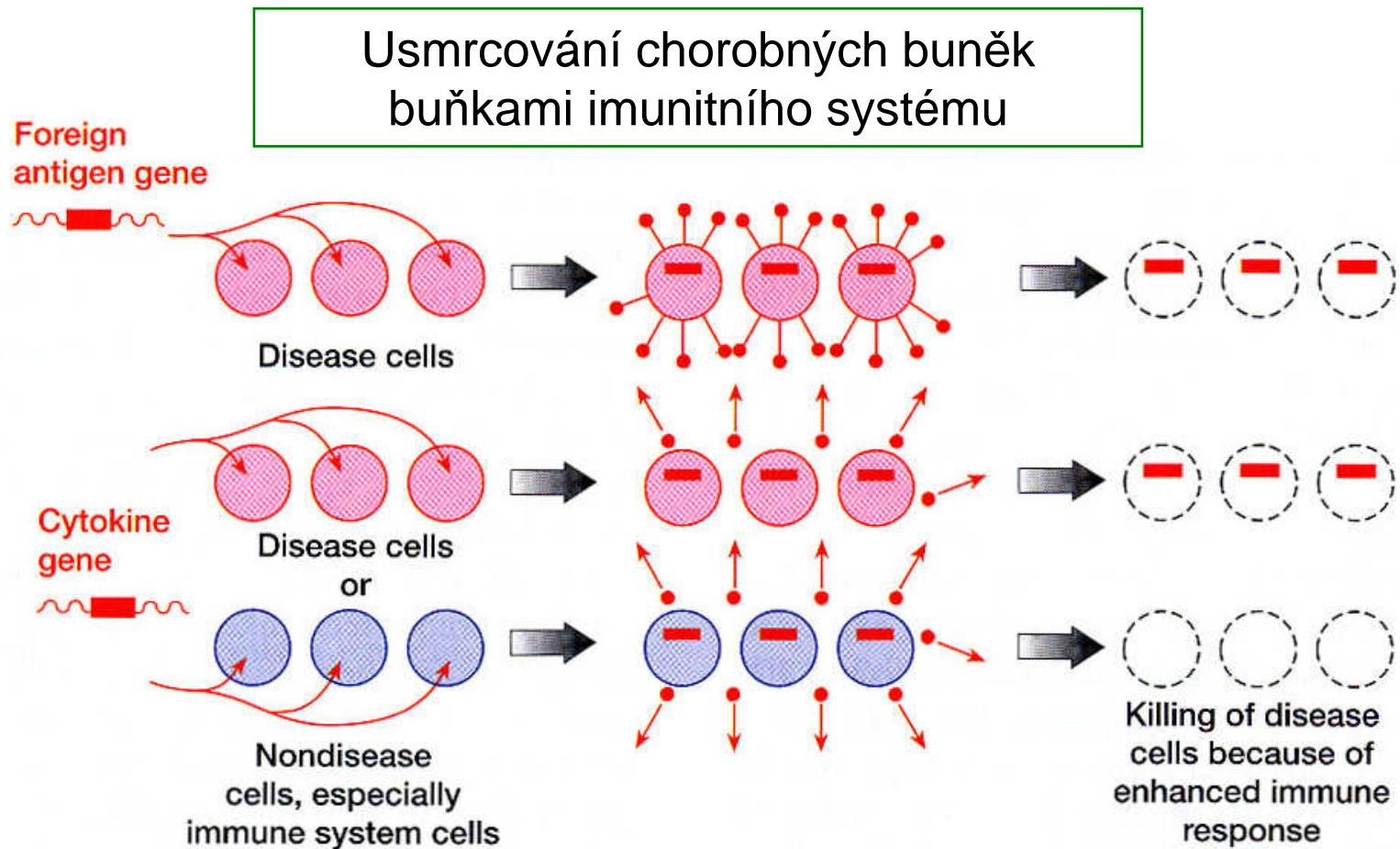
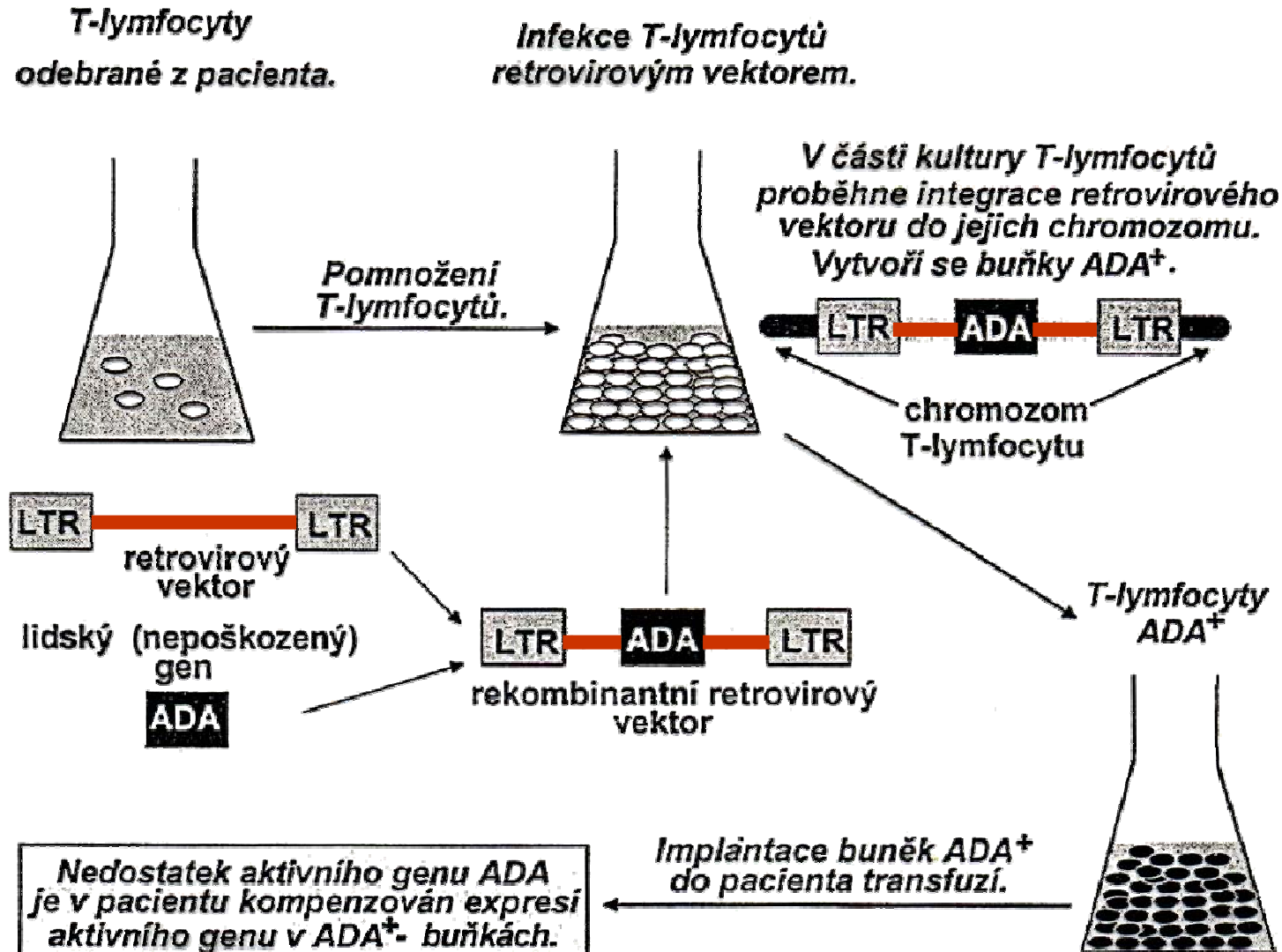


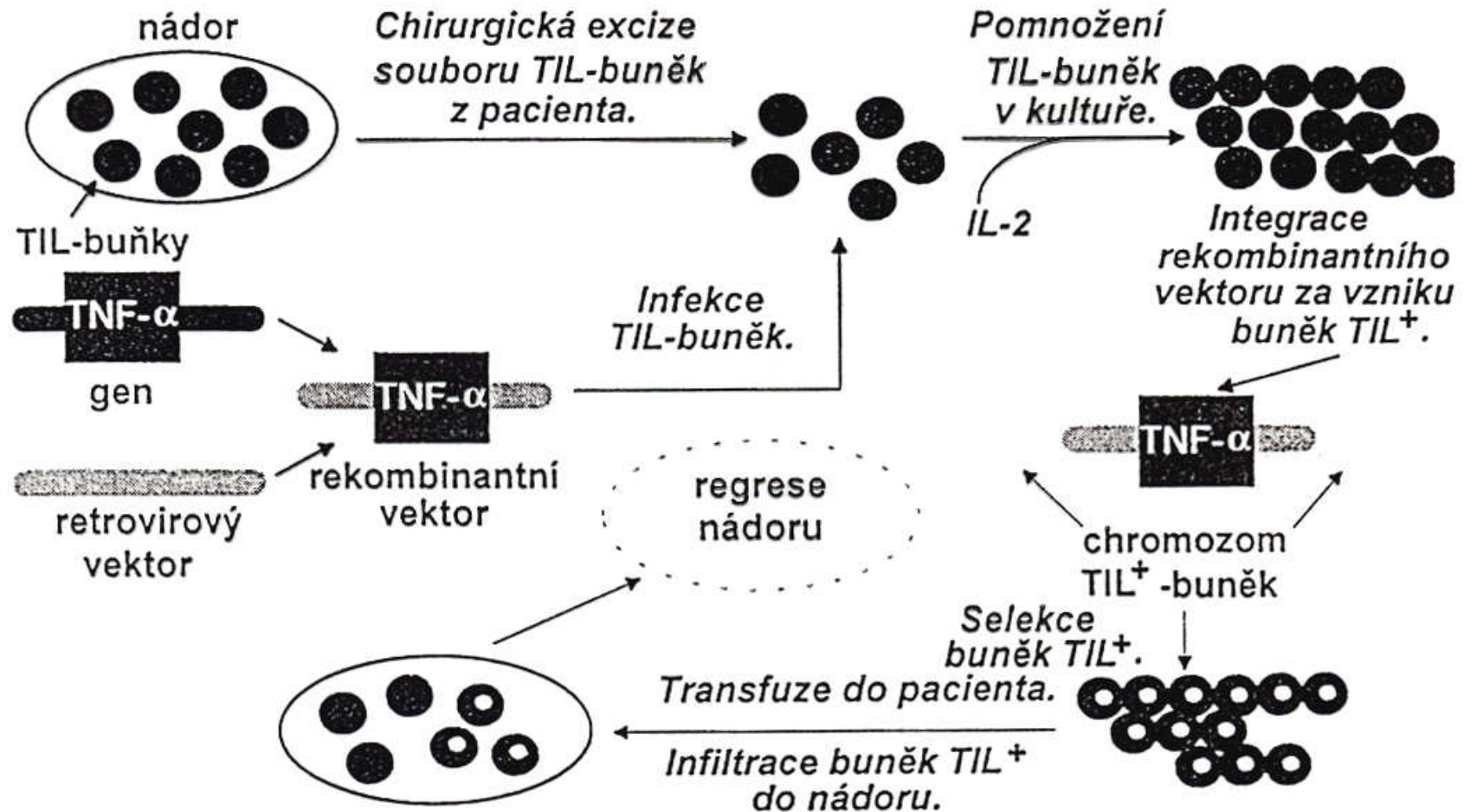
Schéma postupu při genové terapii deficiencie na adenozyndeaminázu





Normal T-cell function requires the enzyme adenosine deaminase (ADA). These two girls suffer from severe combined immunodeficiency disease (SCID) resulting from a mutant form of ADA. They were among the first persons to receive gene therapy. Doctors removed some of the white blood cells from each girl, cultured them, added genetically engineered viruses containing working copies of the ADA gene, and then treated each girl with her own engineered cells. Years after the initial therapy, each girl still has a functional subset of T cells that produces ADA.

Schéma genové terapie melanomu



Alternativa: Přenos genu pro TNF přímo do nádorové buňky

Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

1. Snadné získání buněk z těla
 2. Snadná kultivace v kulturách in vitro
 3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů
 4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat a přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu
- Kmenové buňky kostní dřeně
 - Kožní fibroblasty
 - Hepatocyty
 - Myelocyty

Viry jako vektory

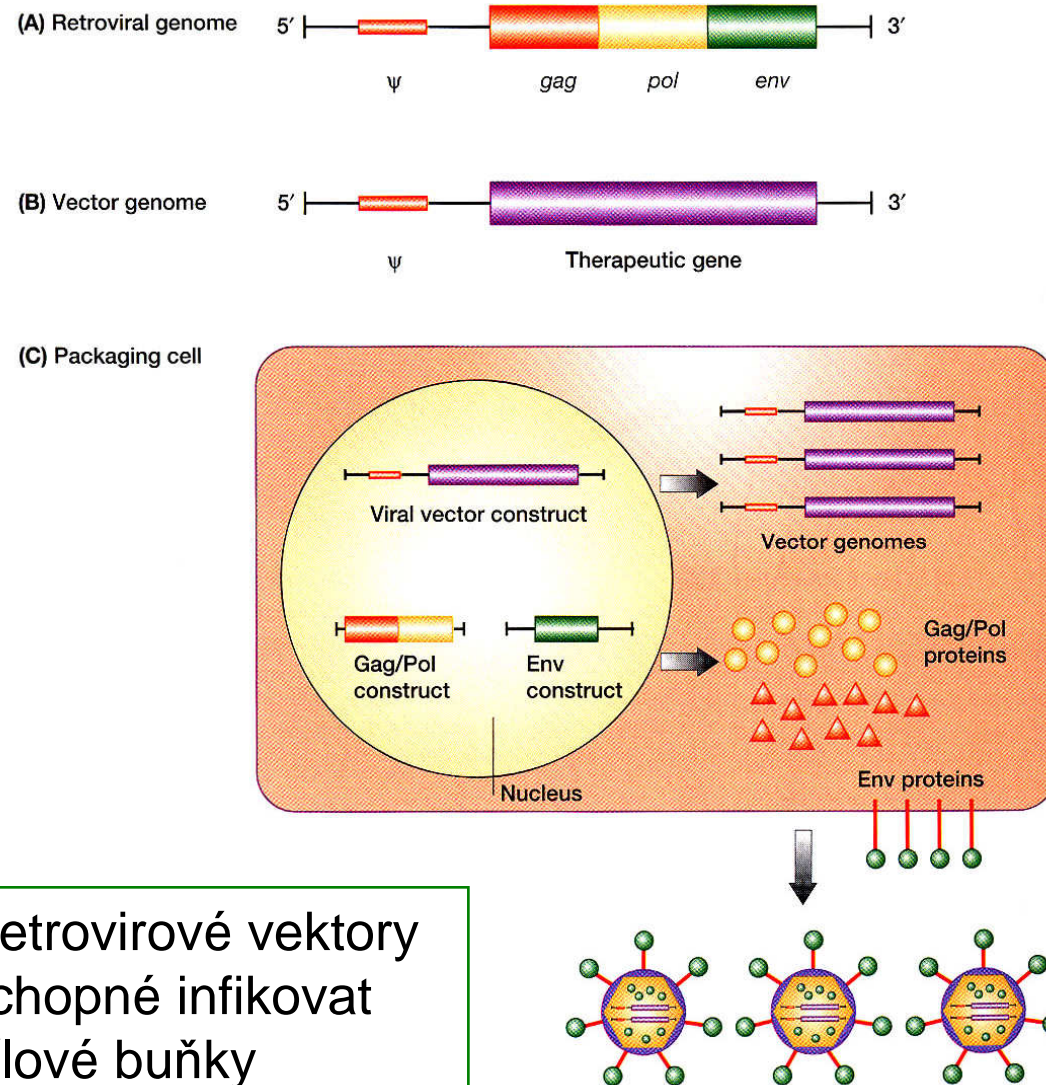
nejpoužívanější v GT, velmi dobře infikují lidské buňky. Asi 70% pokusů s GT

- **Onkoretroviry:** transgen začleňují do chromozomu do dělicích se buněk - výhoda při léčbě nádorů (např. nádory mozku). Riziko inzerční inaktivace endogenů
- **Adenoviry:** *infikují* nedělicí se buňky, DNA zůstává jako epizom v jádře. Jsou bezpečné, ale exprese je krátkodobá. Problém je imunogenicita. Uplatnění tam, kde je nutná vysoká exprese během krátké doby, např při léčbě rakoviny pro zabití buněk.
- **Adenoasociované viry AAVs:** Nepatogenní, schopné infekce jen s využitím adenovirů jako pomocných virů k replikaci. Integrují DNA do chromozomu na specifické místo, umožňující dlouhodobou expresi bez rizika inzerční mutagenese.
- **Lentiviry:** HIV (retrovirus) – infikují nedělicí se buňky. Do chromozomu se integrují náhodně – dlouhodobá exprese. Nutnost odstranění virových genů a zachování schopnosti infikovat nedělicí se buňky.
- **Herpes simplex viry:** Mají tropii pro CNS, v latentní infekci jsou epizomální, tj. dlouhodobě exprimují transgen a šíří jej do okolní synaptické sítě. Hlavní úloha: přenos genů do neuronů pro léčbu nervových chorob (Parkinsonova ch.) a tumory CNS.

Principal viral vectors of potential application for human gene therapy

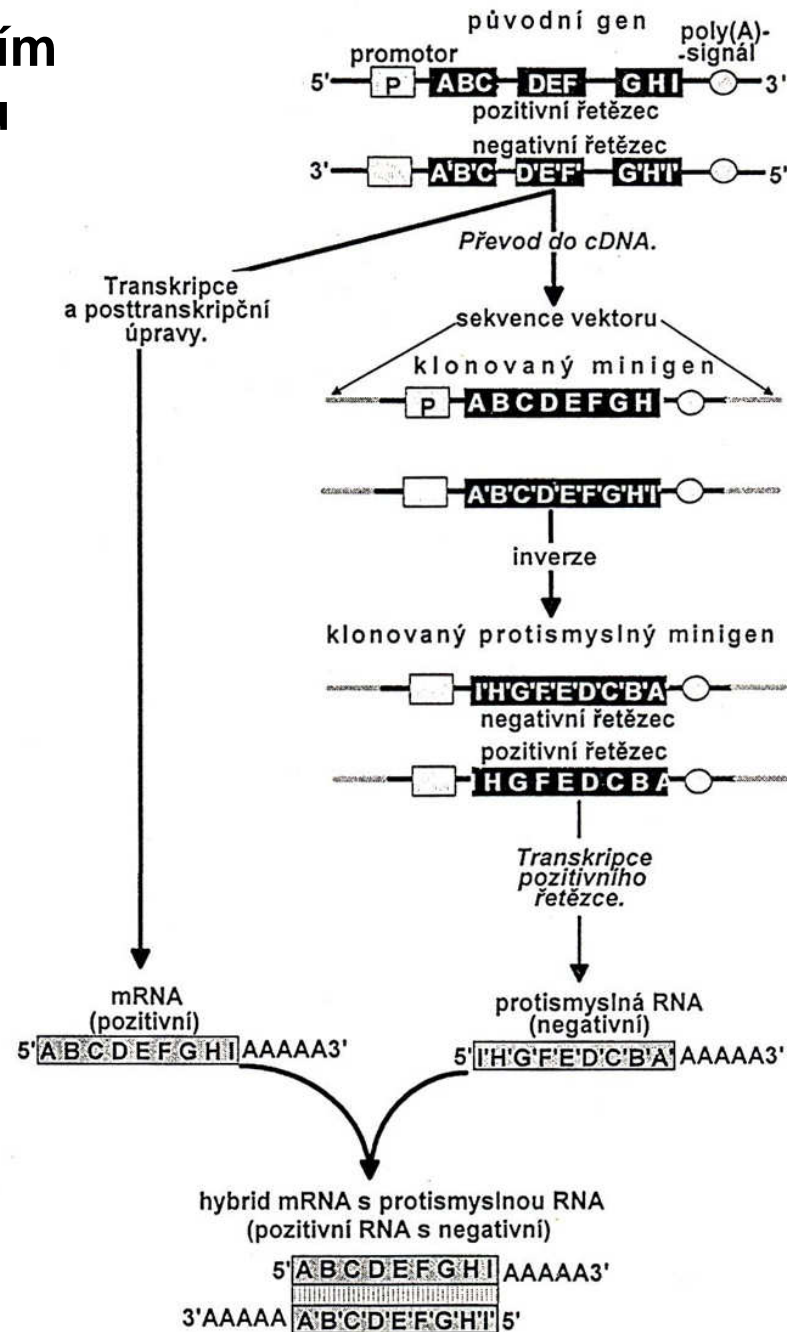
Parent virus	Potential target cells	Advantages	Disadvantages
Retrovirus	Fibroblasts, endothelial cells, myoblasts, smooth muscle cells, hepatocytes, hematopoietic cells and stem cells	Nonpathogenic Integration into host cell genome Relatively simple design Biology well understood	Relatively low virus titers Limited capacity for foreign DNA (< 10 kb) Inefficient <i>in vivo</i> infection Do not infect non-dividing cells Transgene expression may not be prolonged
Adenovirus	Hepatocytes, airway epithelial cells, lymphoid, hematopoietic and myeloid cells	Nonpathogenic replication-defective mutants are available Humans are natural hosts High virus titers High efficiency of <i>in vivo</i> infections Infects cell types that are largely refractory to retrovirus infection Biology well understood Capacity of 7.5 kb foreign DNA or more	Virus does not integrate into host cell genome Vector design more complicated than for retroviruses May recombine with naturally occurring adenoviruses
Adeno-associated virus	Hematopoietic cells, fibroblasts, epithelial cells	Nonpathogenic and noncytotoxic Humans are natural hosts Preferred site-specific integration at human chromosome 19 Ability to establish a latent state Relatively simple design	Relatively low virus titers Limited capacity for foreign DNA (4 kb) Infection efficiency low, depending on cell type Requires adenovirus as helper Many aspects of biology not well understood
HSV	Non-dividing cells such as differentiated neurons and hepatocytes	Replication-defective mutants and packagable plasmid are available High virus titers Broad host-cell range High efficiency of infection Infects cells refractory to retrovirus infection Biology well understood ? Capacity of 30 kb foreign DNA	Plasmids are packaged with low efficiency Plasmids recombine with helper virus Replication-defective viruses are still cytotoxic Viral genome is more difficult to manipulate Gene regulation is complex

Konstrukce retrovirových vektorů a vytváření infekčních virových částic

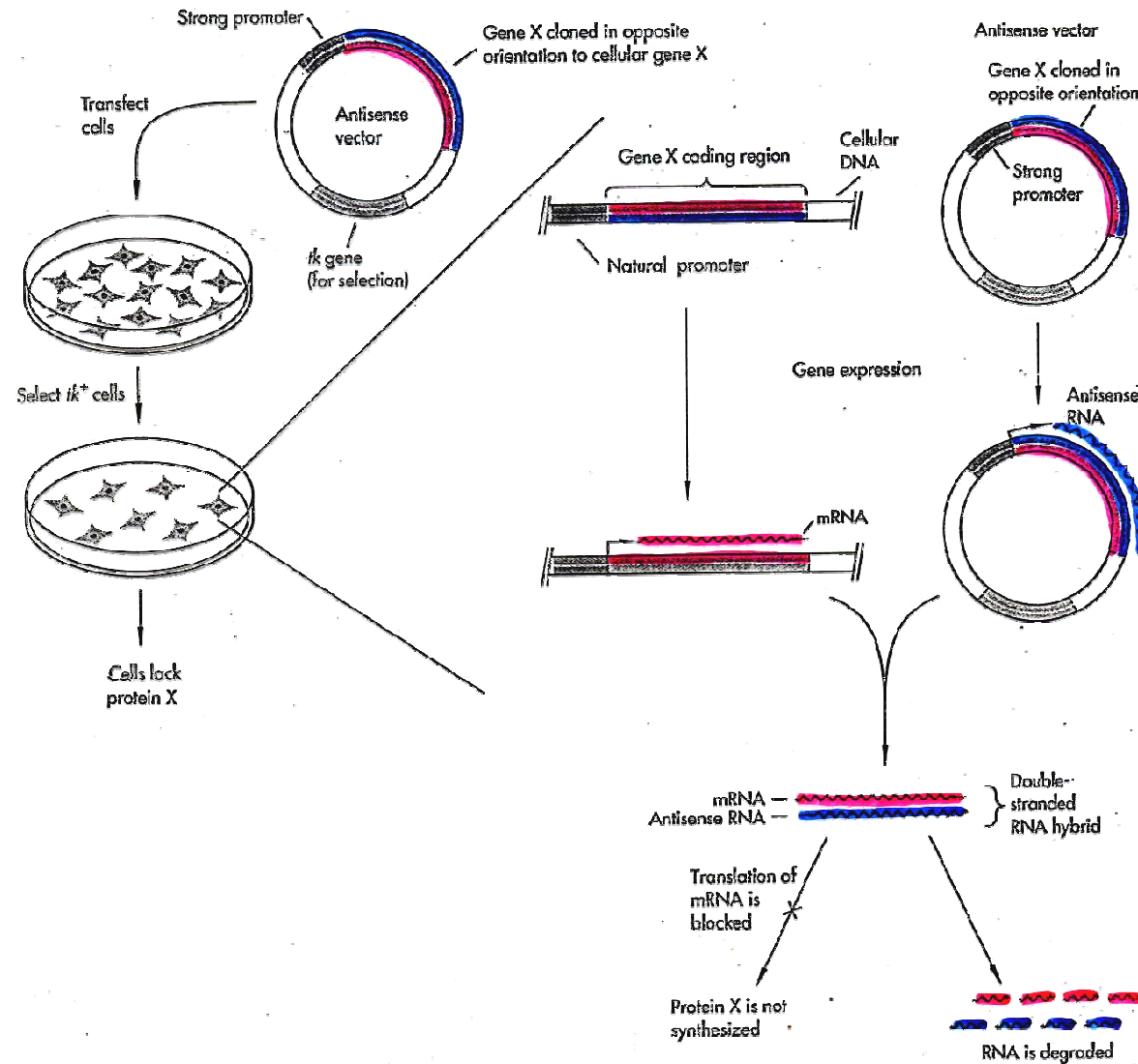


Genová terapie prostřednictvím „antisense“ – oligonukleotidů

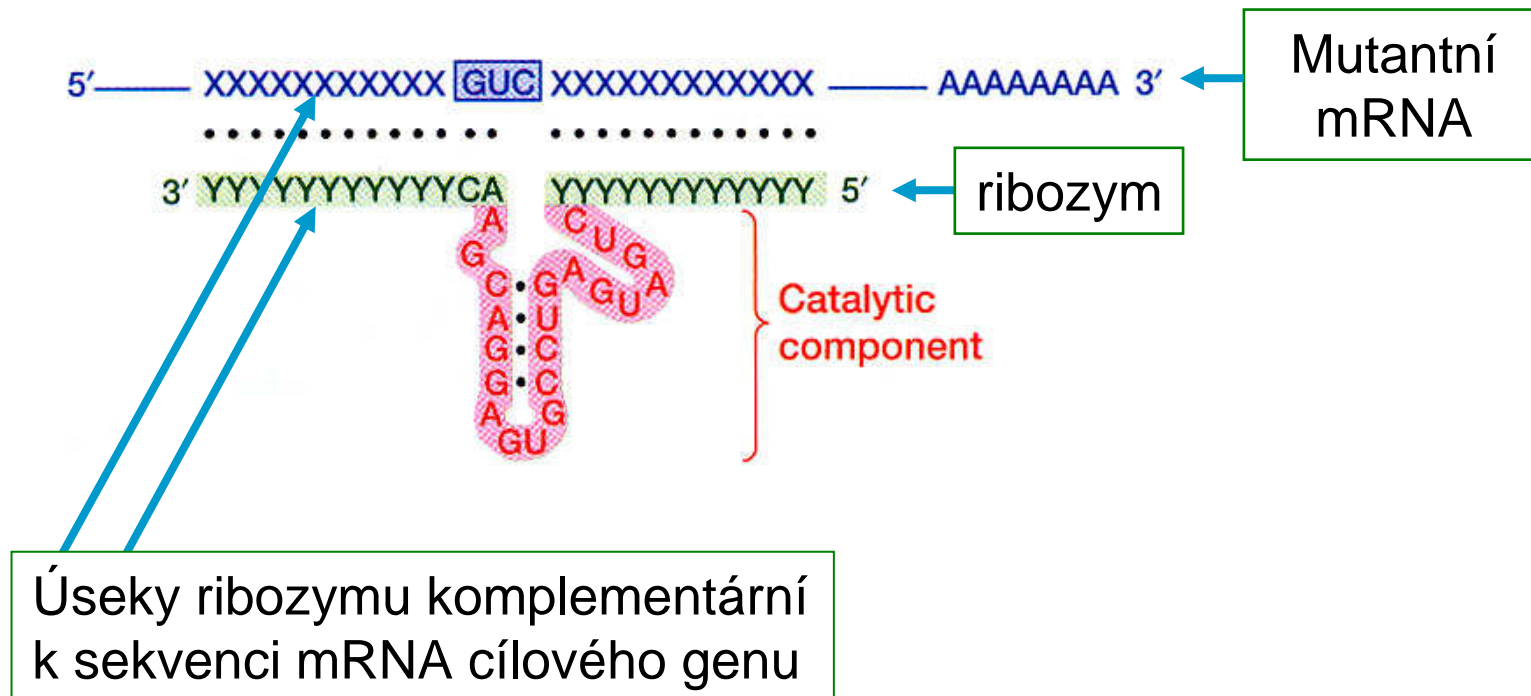
Poznámka: Minigen je uměle připravená rekombinantní DNA, v níž je příslušná kódující sekvence genu spojena s regulačními oblastmi vektoru, které umožňují expresi této kódující sekvence.



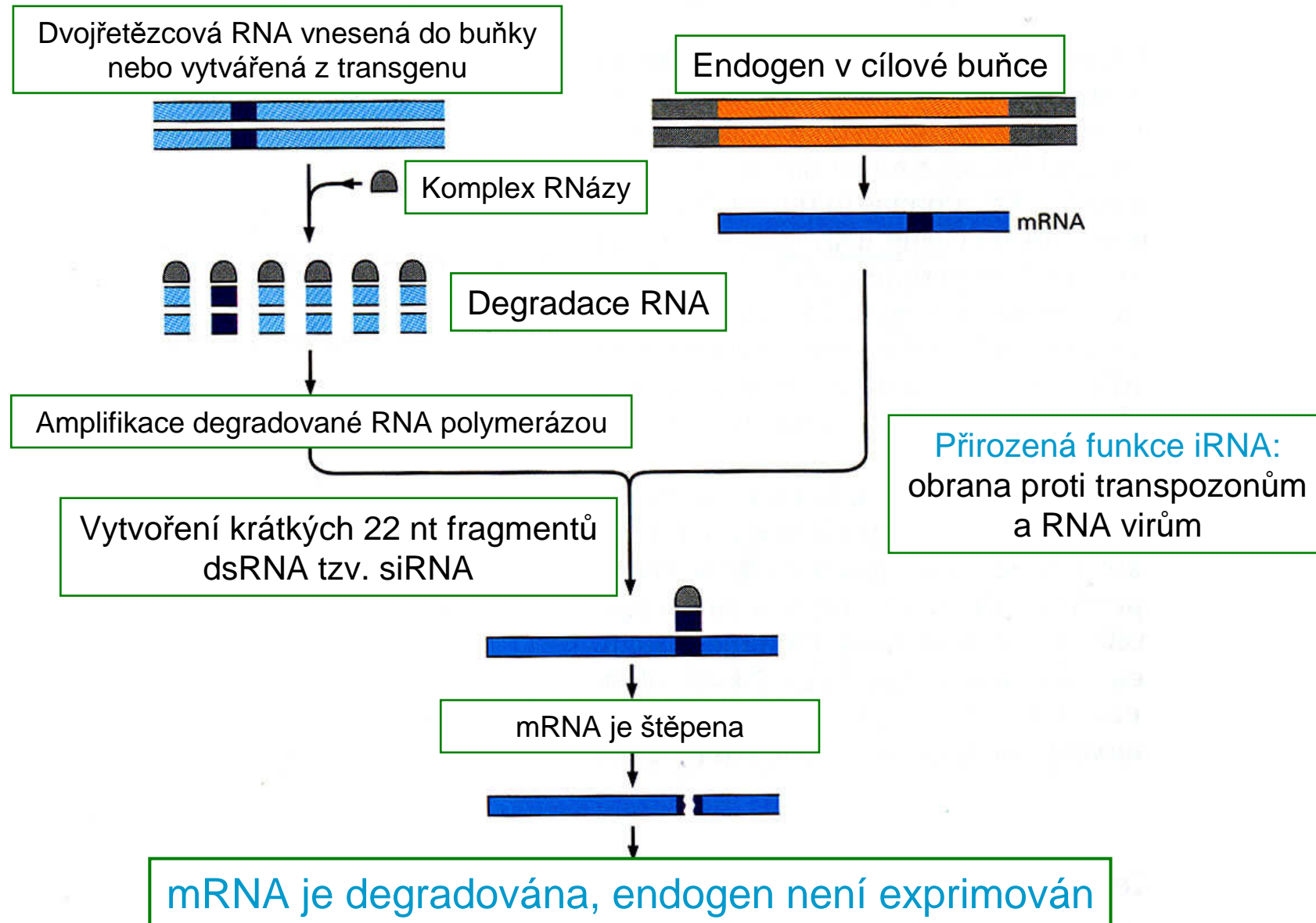
Zábrana exprese genů navozená protismyslovou RNA



Použití ribozymu typu „hammerhead“ ke štěpení mutantní mRNA

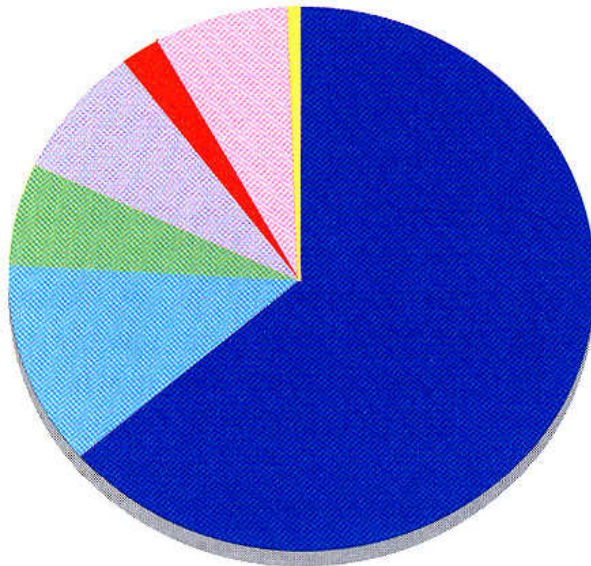


Mechanismus RNA interference -iRNA



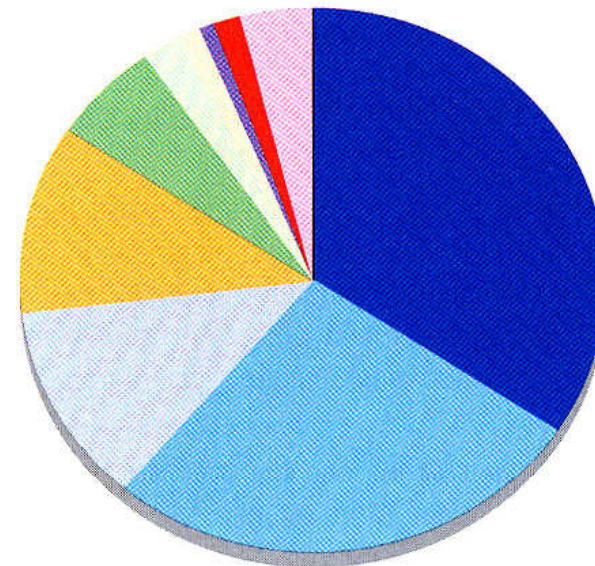
Přehled schválených protokolů genové terapie

(A) Protocols by disease



Cancer	(<i>n</i> =403)	63.4%
Monogenic diseases	(<i>n</i> =78)	12.3%
Infectious diseases	(<i>n</i> =41)	6.4%
Vascular diseases	(<i>n</i> =51)	8.0%
Other diseases	(<i>n</i> =12)	1.9%
Gene marking	(<i>n</i> =49)	7.7%
Healthy volunteers	(<i>n</i> =2)	0.3%

(B) Protocols by vector

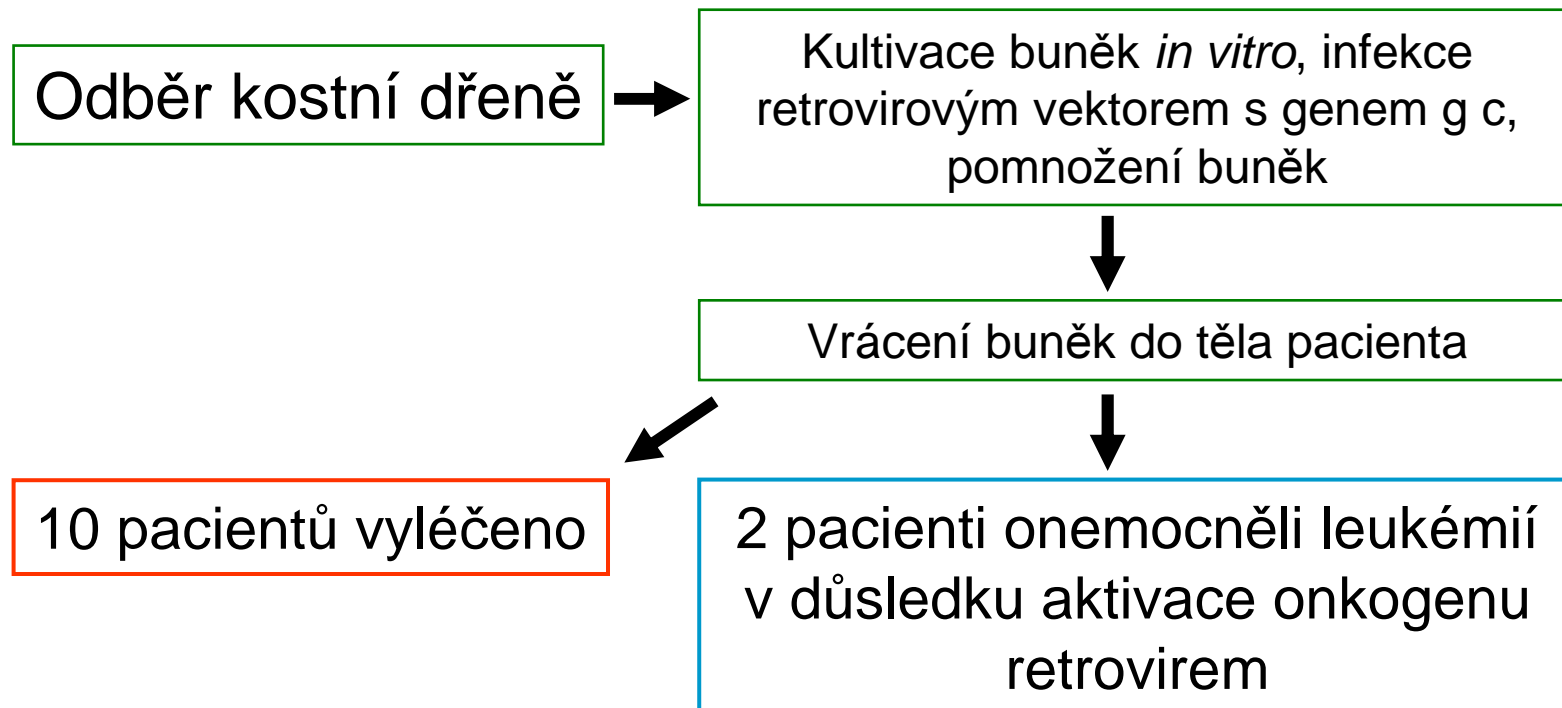


Retrovirus	(<i>n</i> =217)	34.1%
Adenovirus	(<i>n</i> =171)	26.9%
Lipofection	(<i>n</i> =77)	12.1%
Naked/plasmid DNA	(<i>n</i> =70)	11.0%
Pox virus	(<i>n</i> =39)	6.1%
Adeno-associated virus	(<i>n</i> =15)	2.4%
RNA transfer	(<i>n</i> =6)	0.9%
Herpes simplex virus	(<i>n</i> =5)	0.8%
Others	(<i>n</i> =11)	1.7%
N/C	(<i>n</i> =25)	3.9%

Dosud jediný příklad úspěšné léčby chorob genovou terapií

X-SCID – těžká kombinovaná imunodeficience vázaná na X chromozom: mutace genu kódujícího γ c-řetězec receptoru pro interleukin 2, která zabraňuje normálnímu vývoji T-lymfocytů a „killer“ buňkám

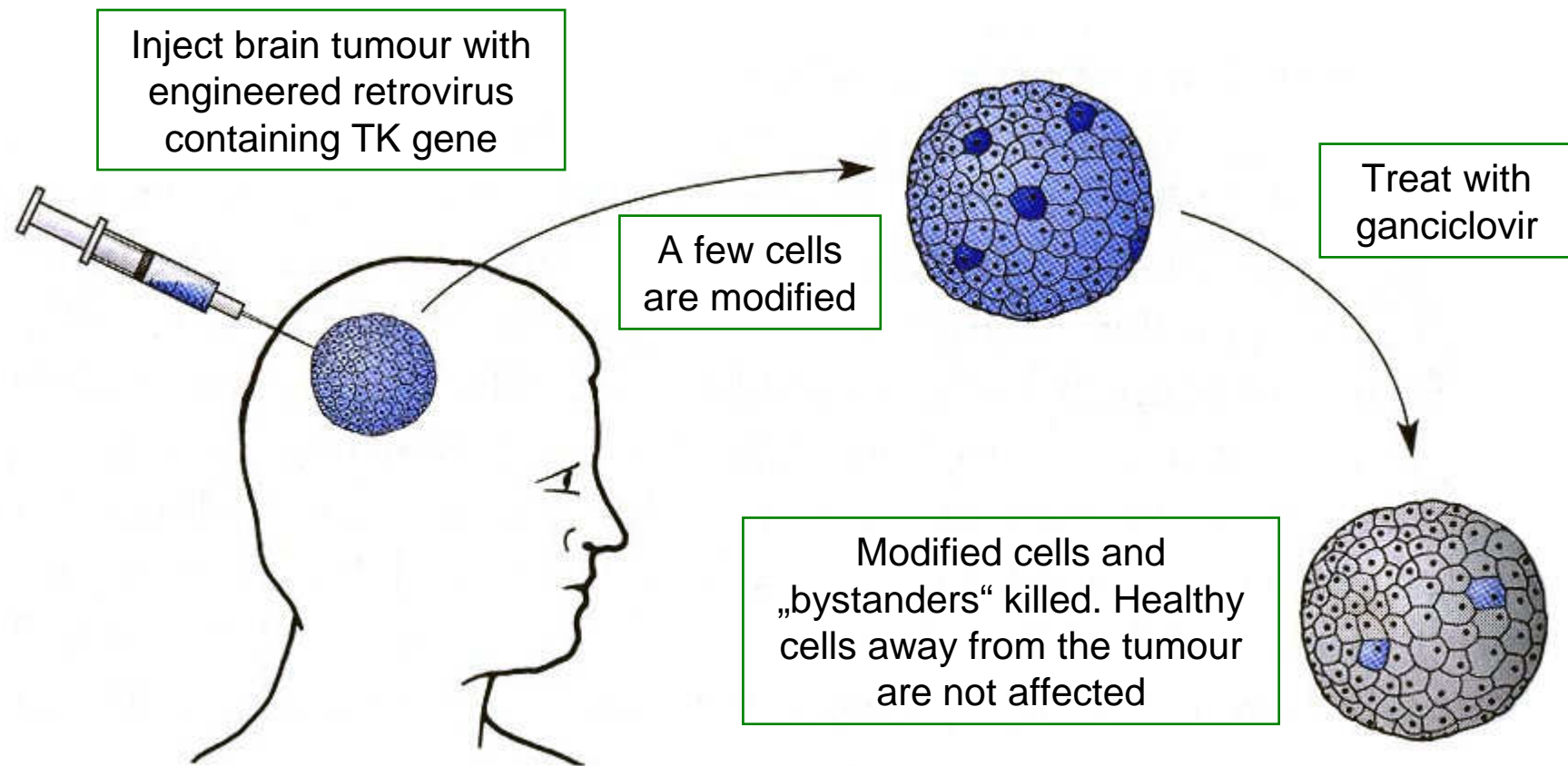
(náchyllost k infekcím, bez transplantace kostní dřeně smrt do 1 roku života)



Genová terapie nádorů

1. dodání genu: obnova funkce nádorových supresorových genů
2. inaktivace genu: zábrana exprese aktivovaného onkogenu
3. genetická manipulace: vyvolání apoptózy nádorových buněk
4. modifikace nádorové buňky tak, aby byla více antigenní a byla zničena imunitním systémem
5. modifikace dendritických buněk ke zvýšení nádorově-specifické imunitní odpovědi
6. použití geneticky upravených onkolytických virů selektivně usmrcujících nádorové buňky
7. genetická modifikace nádorových buněk zajišťující konverzi netoxického prekursoru na toxický produkt

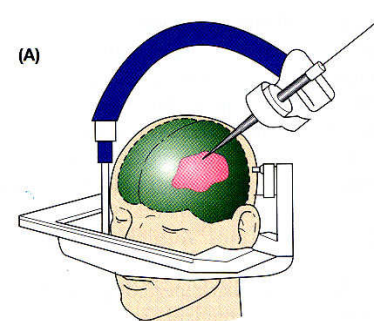
Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie		
Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu.
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu.
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru.
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí.
Prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru.
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retroviru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovány



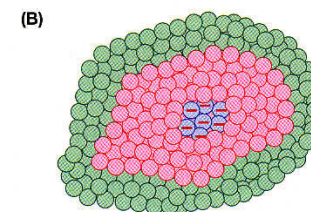
Gene therapy for brain tumours. The tumour is directly injected with a retrovirus containing the mouse thymidine kinase (TK) gene and a few cells take up the vector, shown in blue. These cells convert the prodrug ganciclovir into an active form and are killed (grey cells). Because of the bystander effect surrounding cells are also killed.

Genová terapie in vivo

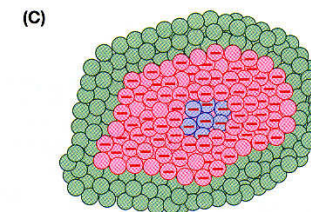
Do nádoru jsou injikovány buňky, do nichž byl *in vitro* vnesen retrovirový vektor, který obsahuje gen pro tymidinkinázu (TK). Vektor se uvolňuje a infikuje okolní nádorové buňky, v nichž se pak vytváří TK (retrovirus je schopen infikovat jen dělící se buňky!). Do těla pacienta je intravenózně podána netoxická látka gancyklovir (gcv), která je TK konvertována na toxický gcv-trifosfát usmrcující buňky.



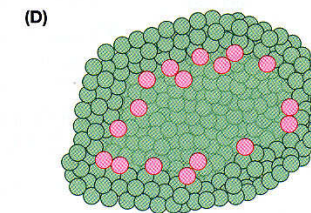
(A) MRI-guided stereotactic implantation of vector producer cells (VPC) into CNS tumors *in situ*



(B) Vector producing cells inside the tumor



(C) Retroviruses infect tumor cells but not normal cells



(D) Gancyclovir kills the infected cells