

# Принципы лечения наследственных заболеваний



Сержанова Виктория Андреевна  
МГНЦ РАМН

# Подходы к лечению наследственных болезней

Симптоматическое

Патогенетическое

Этиологическое

# Патогенетическое лечение



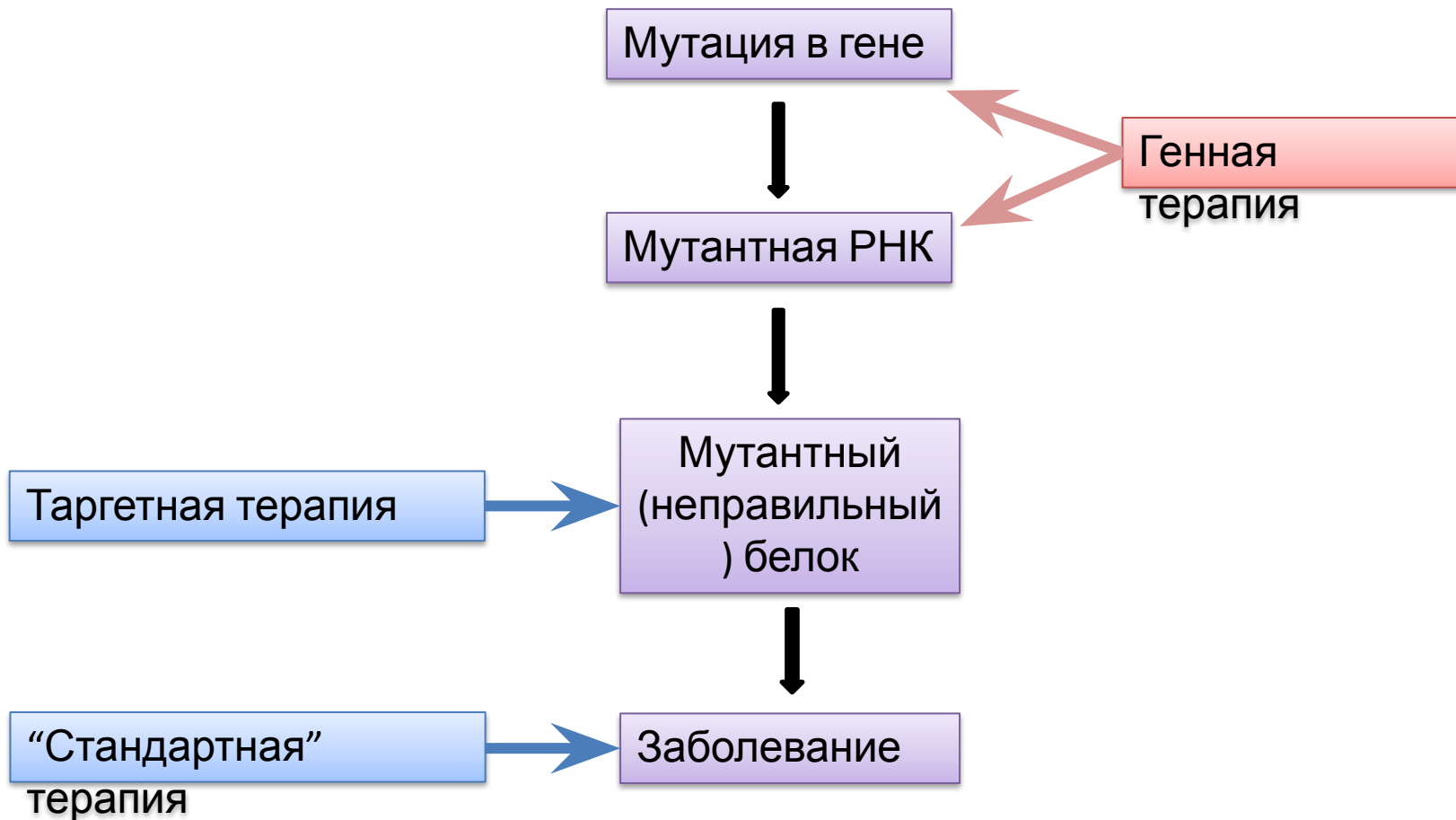
# Генная терапия



# Что такое генная терапия?

**Генная терапия** — совокупность генно-инженерных и медицинских методов, направленных на внесение изменений **генетический аппарат** клеток человека с целью лечения заболеваний.

# Отличие генной терапии от “стандартной” терапии



# В каких случаях может быть применена генная терапия?

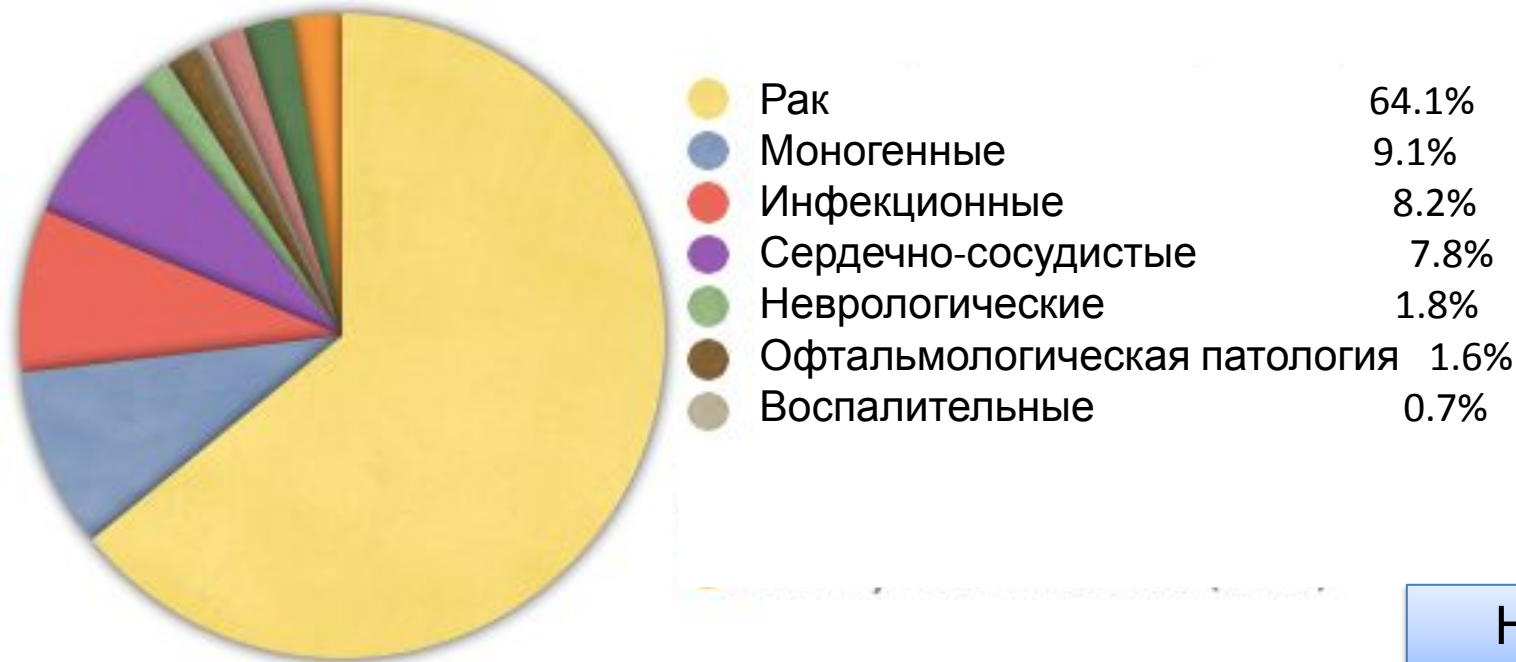
Чужеродный генетический материал  
(вирусная инфекция)

Наследственные заболевания

Соматические мутации  
(рак, диабет и т. д.)

# На какие заболевания направлена генная терапия?

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials

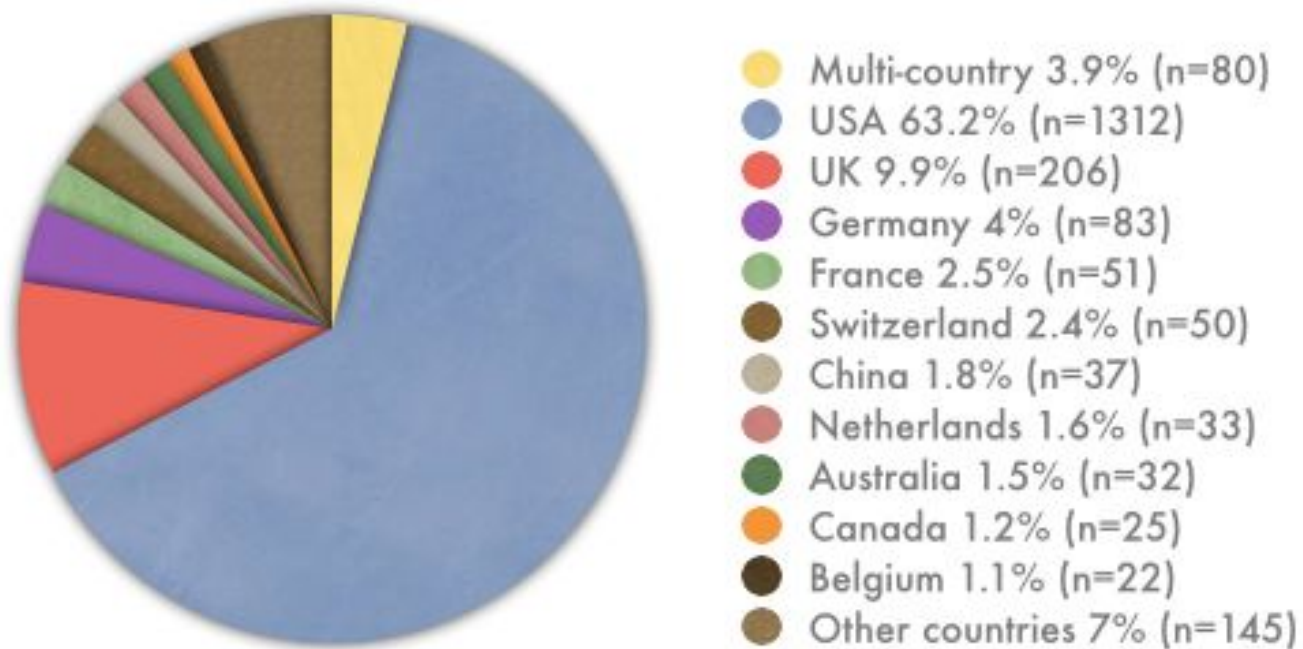


На 2014 год



# По странам

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials  
(by Country)



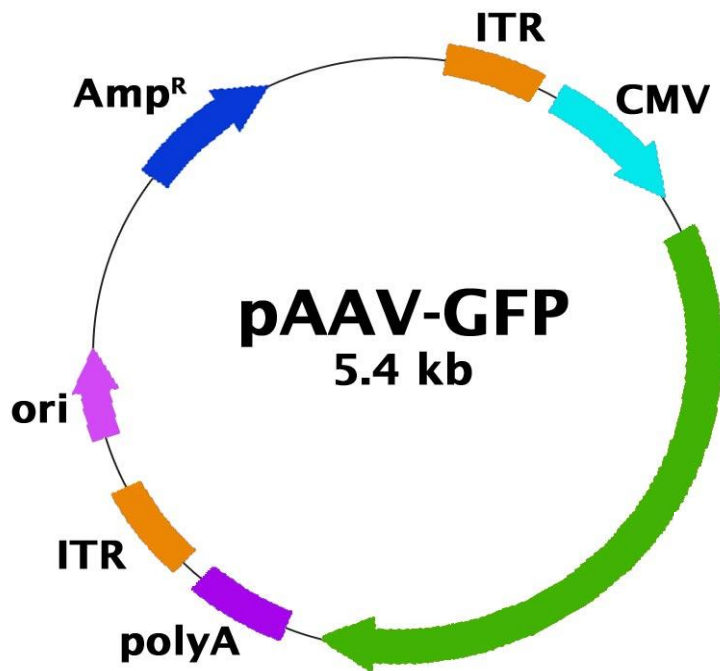
# По странам

Kenya	1	0
Mexico	2	0.1
Netherlands	33	1.6
New Zealand	2	0.1
Norway	4	0.2
Poland	6	0.3
Romania	1	0
Russia	2	0.1
South Korea	17	0.8
Spain	17	0.8
Sweden	10	0.5
Switzerland	50	2.4
Taiwan	1	0
Uganda	1	0
UK	206	9.9
USA	1312	63.2

На 2014 год

# Что представляет из себя препарат для генной терапии?

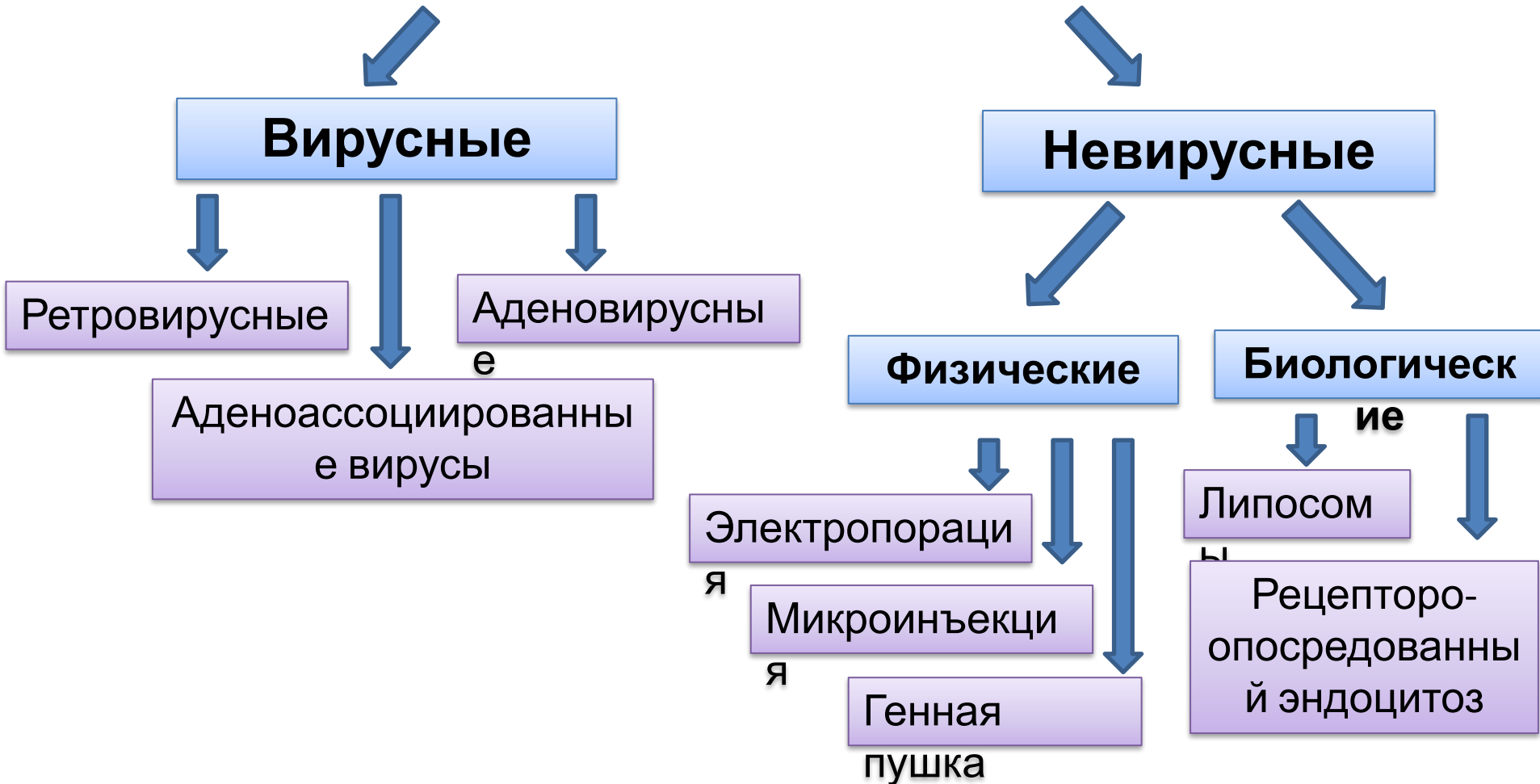
Плазмида



Олигонуклеотид



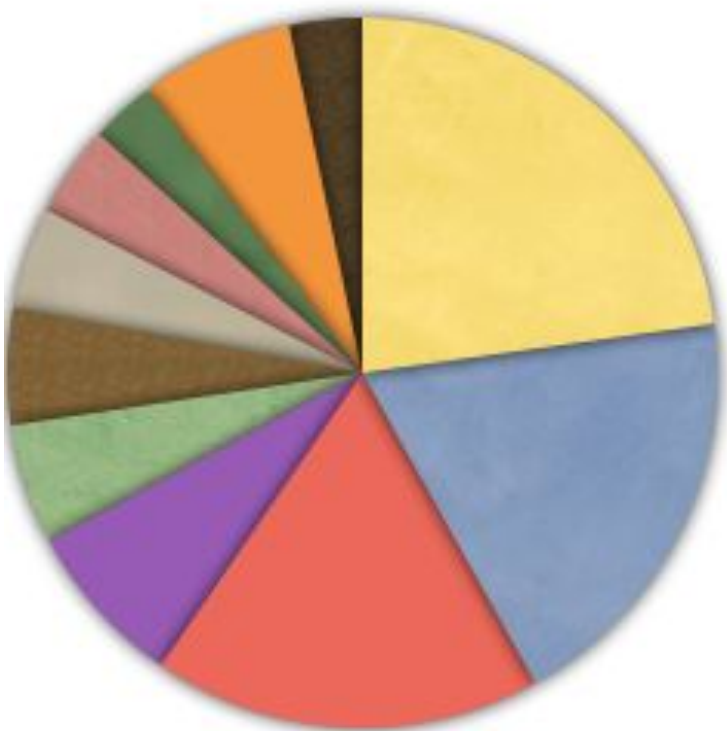
# Способы доставки генетического материала в клетки мишени



# Основные методы доставки геннотерапевтических препаратов

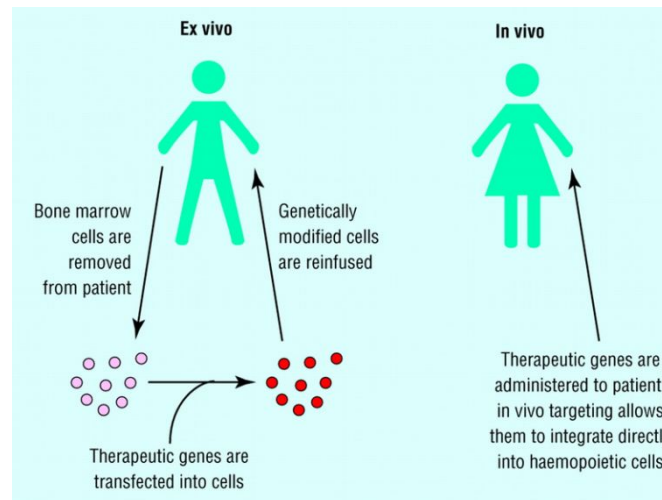
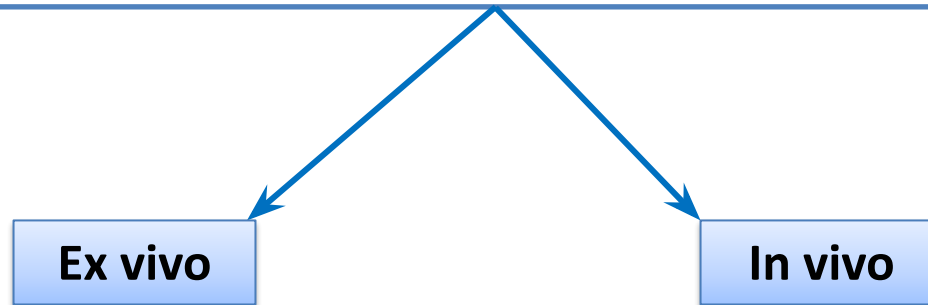
Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials

- Вирусы 66.8%
- Липосомы 5.3%



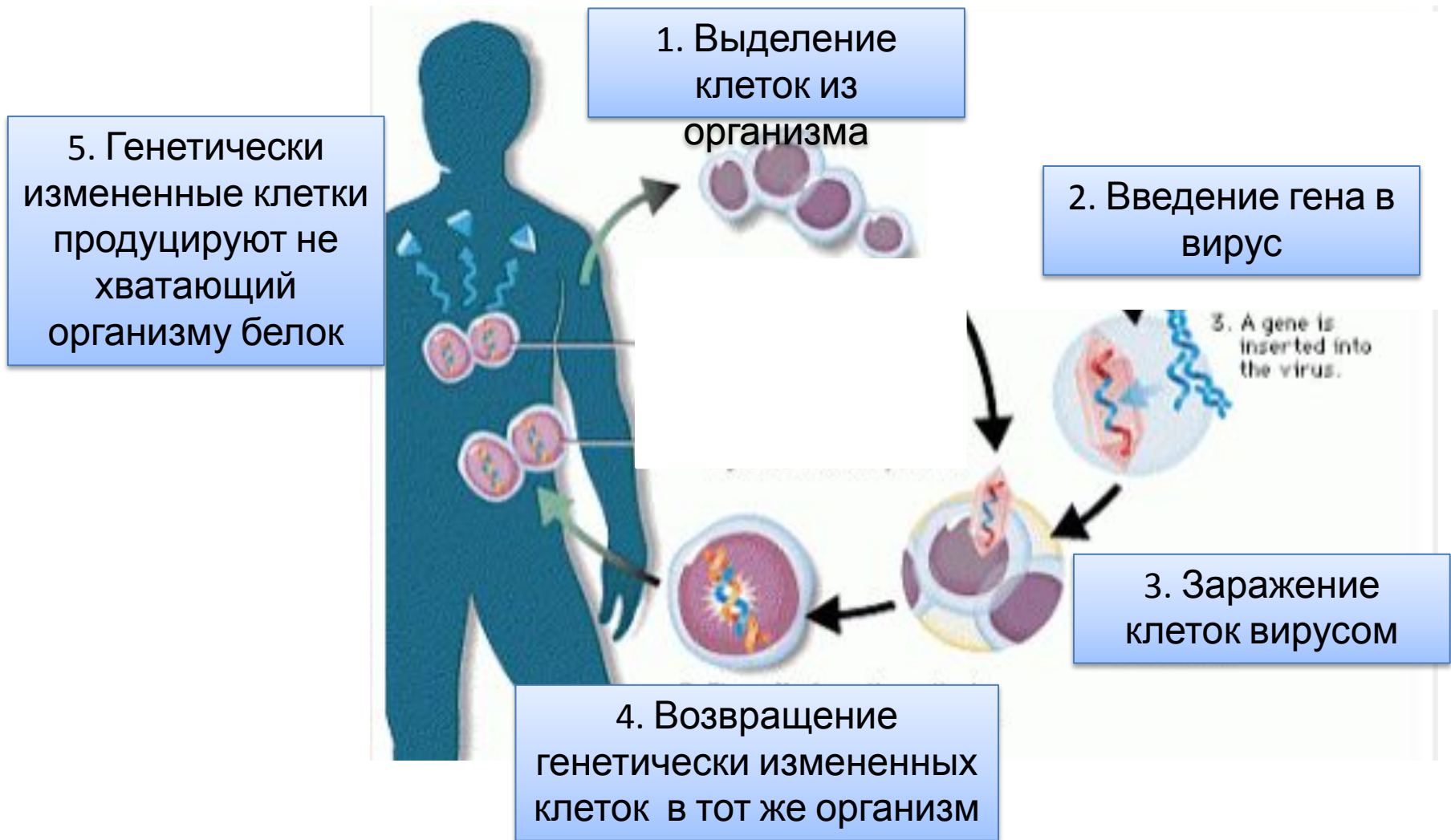
- Adenovirus 22.8% (n=488)
- Retrovirus 19.1% (n=409)
- Naked/Plasmid DNA 17.7% (n=379)
- Vaccinia virus 7.6% (n=162)
- Adeno-associated virus 5.5% (n=117)
- Lipofection 5.3% (n=113)
- Poxvirus 4.7% (n=100)
- Lentivirus 4.2% (n=89)
- Herpes simplex virus 2.9% (n=63)
- Other vectors 7% (n=150)
- Unknown 3.3% (n=71)

# Пути введения генетической информации больному



В зависимости от способа введения экзогенной генетической информации в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*).

# Ex vivo генная терапия



# Ex vivo генная терапия

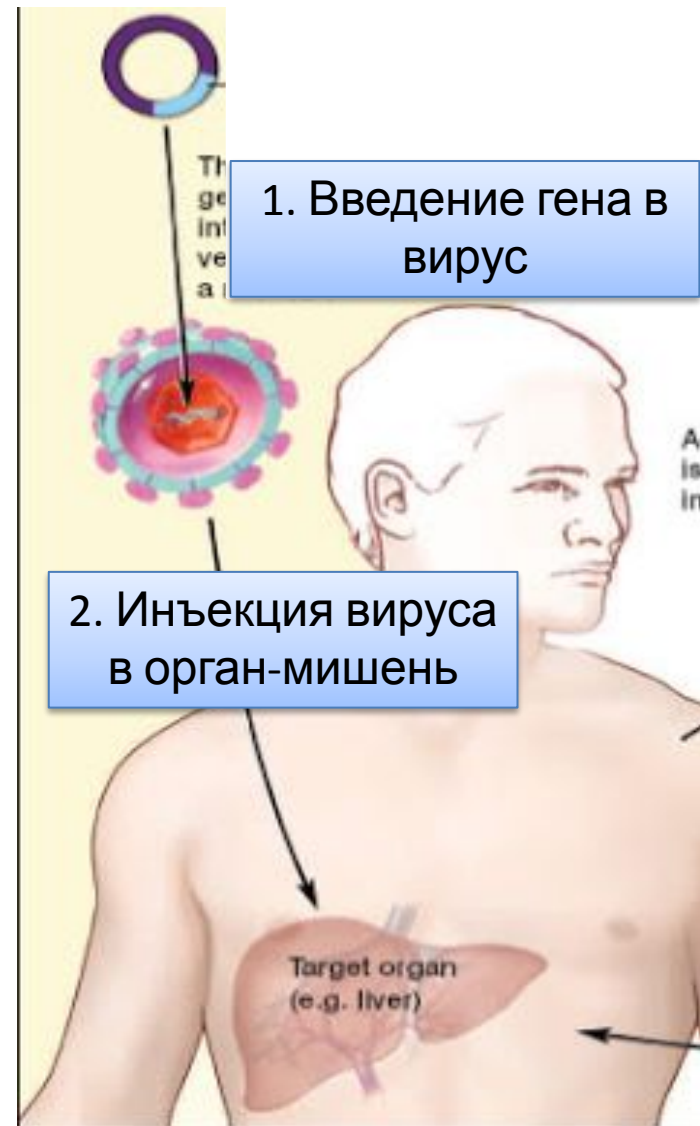
- Используют собственные клетки организма , иммунная система их не отторгает.
- В настоящее время в большинстве допущенных к клиническим испытаниям программ генной терапии используется именно этот подход .





# In vivo генная терапия

- Прямое введение генов непосредственно в ткани больного.
- Особенно перспективно введение генов с помощью аэрозолей для лечения пульмонологических заболеваний (муковисцидоз, рак легких).



# Клетки-мишени для генной терапии

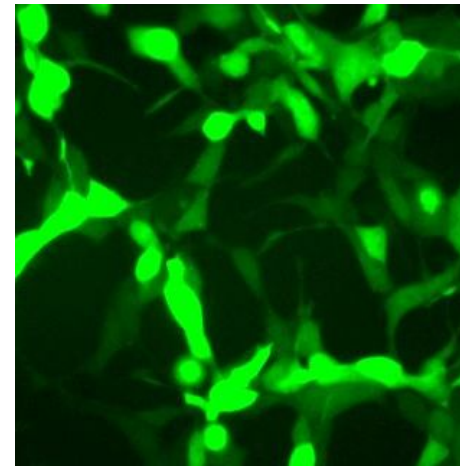
## **эмбриональные** (фетальная генотерапия):

- чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития
- введенный материал попадает во все клетки, в том числе, в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению.
- существует ряд проблем, в том числе этического характера.
- пока неприменима для человека.



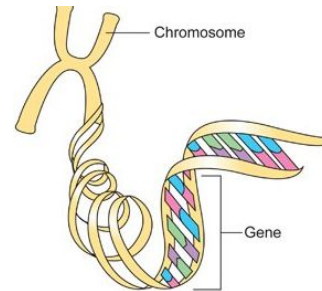
## **соматические** (соматическая генотерапия) :

- генетический материал вводят только в соматические клетки
- не передается половым клеткам.
- основные клетки-мишени для генной терапии

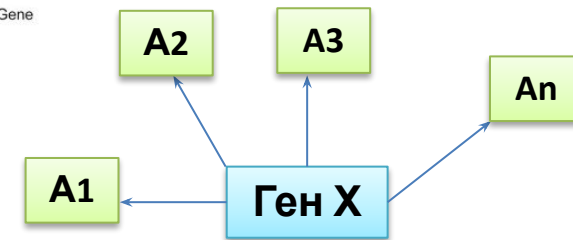


# Что такое аллель гена?

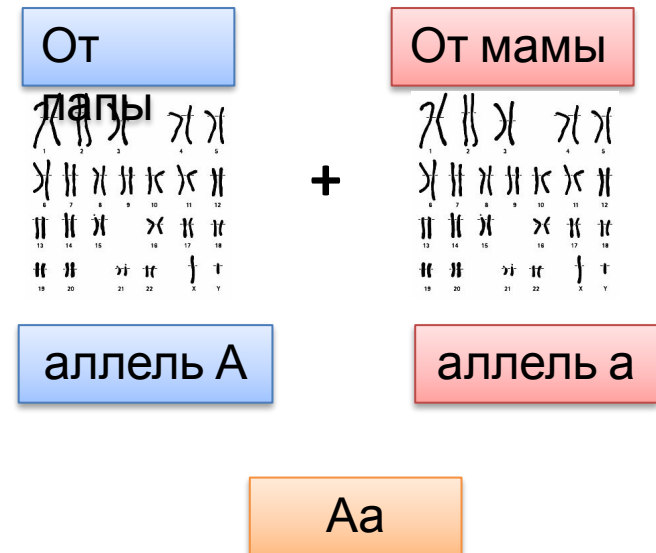
Ген является частью хромосомы



Аллель это вариант гена.  
В популяции один ген может быть представлен огромным количеством аллелей.



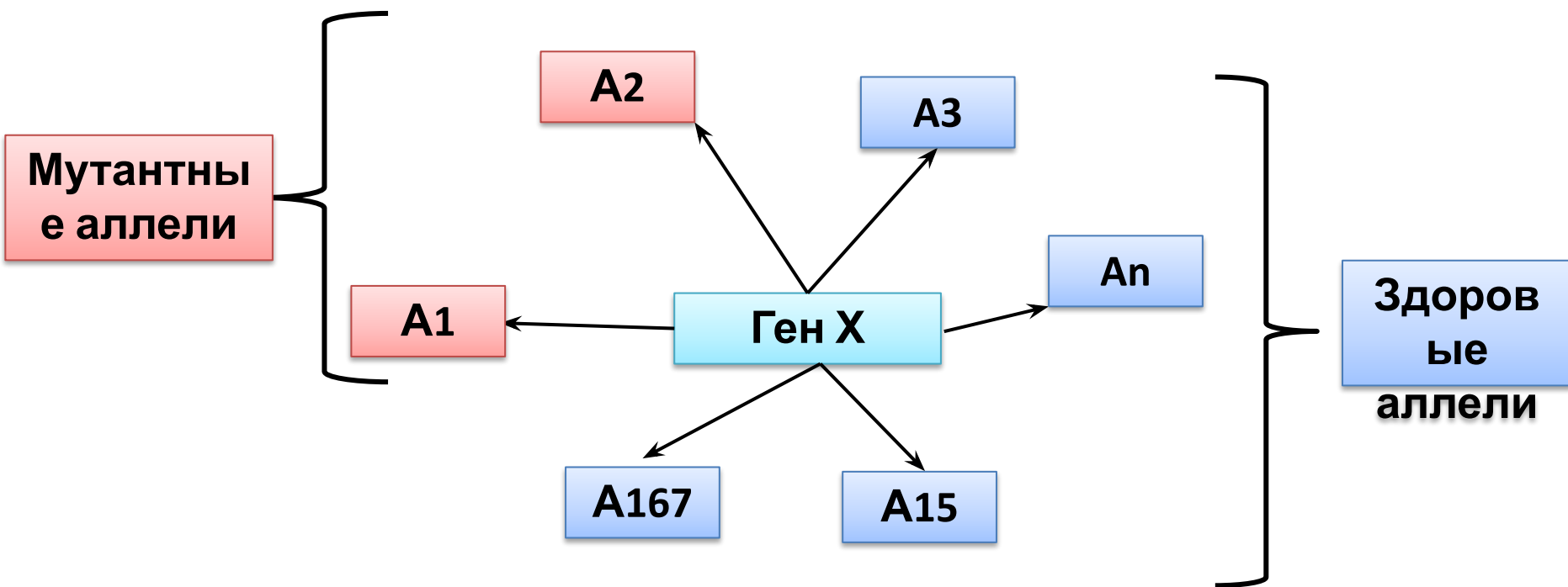
У человека двойной набор хромосом (2N)  
и,соответсвенно, аллелей



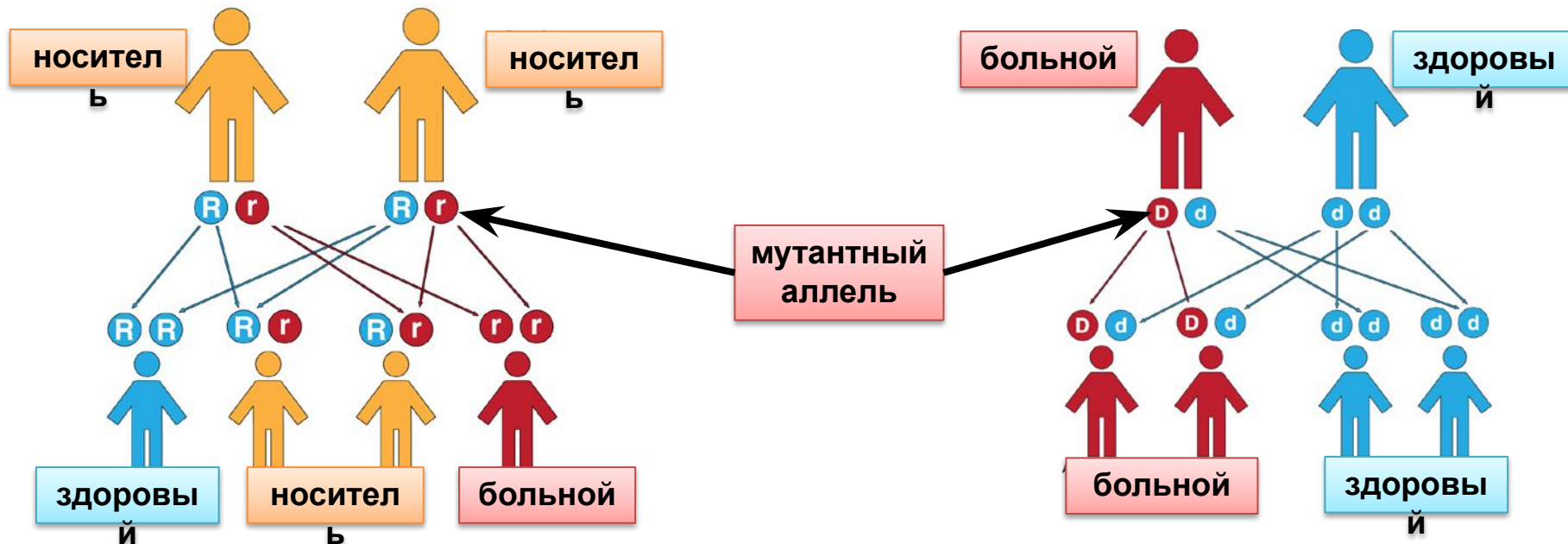
У одного человека каждый ген представлен не более,чем **2 аллелями** .

# Наследственные заболевания

Обусловлены экспрессией мутантного аллеля



# Доминантные и рецессивные заболевания



## Рецессивные заболевания:

- Мутантный аллель фенотипически проявляется только в гомозиготном состоянии
- Экспрессия рецессивного аллеля в присутствии нормального аллеля невозможна

## Доминантные заболевания:

- Мутантный аллель фенотипически проявляется и в гетерозиготном, и в гомозиготном состоянии

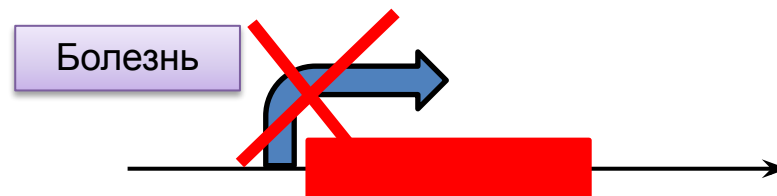
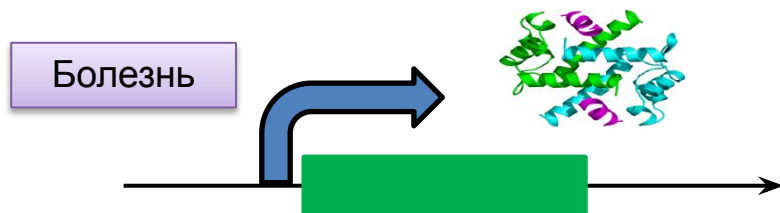
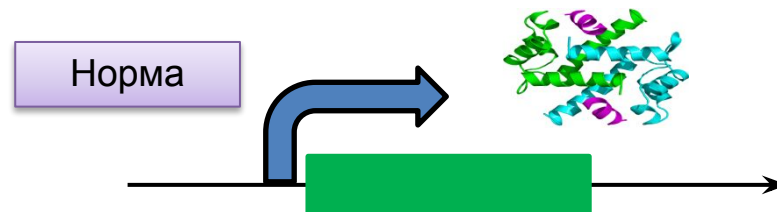
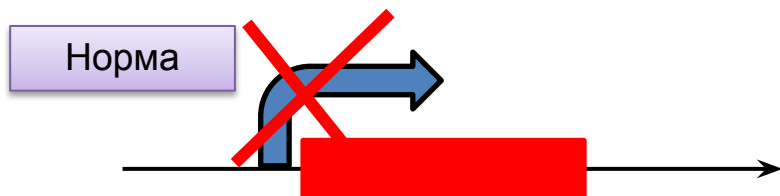
# Стратегии генной терапии

Подавление  
функции гена

Восстановление  
функции гена

Рак  
Доминантные  
заболевания

Рецессивные  
заболевания



# Стратегии генной терапии

нацелены на коррекцию дефекта  
клетки генными модификациями этой  
же клетки

- **Восстановление функции гена:** в клетку организма, которая страдает от потери функции определенного гена, нужно доставить ген, способный обеспечивать недостающую функцию. Например, при рецессивных наследственных заболеваниях.
- **Подавление функции гена:** часто болезнь вызывается избыточной функцией, несвойственной нормальной клетке. Например, при инфекциях или опухолевых трансформациях. Тогда необходимо эту излишнюю функцию подавить .

# Восстановление функции гена

## **Пополняющая** генная терапия:

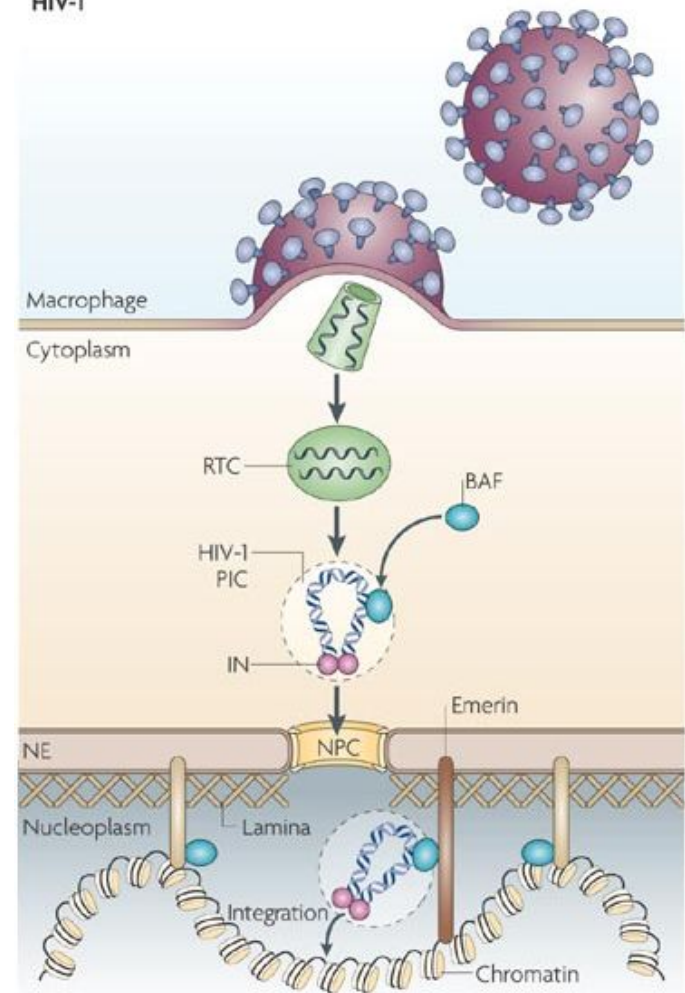
- Больной ген продолжает существовать, но вводят дополнительный здоровый ген, который увеличивает количество недостающего продукта.
- Таким образом можно вылечить болезни рецессивного типа.
- Болезни доминантного типа так вылечить нельзя, так как доминантный фенотип проявляется и в присутствии здорового гена, поэтому пополняющая генная терапия здесь не работает.



# Рекомбинантные вирусы

- Вирусы могут проникать в клетки человека и осуществлять стабильное внедрение собственного генетического материала в геном клетки хозяина.
- Поэтому было предложено использовать их для доставки желаемой генетической информации в геном клеток-мишеней.

HIV-1



# Особенности использования рекомбинантных вирусов

## Недостатки:

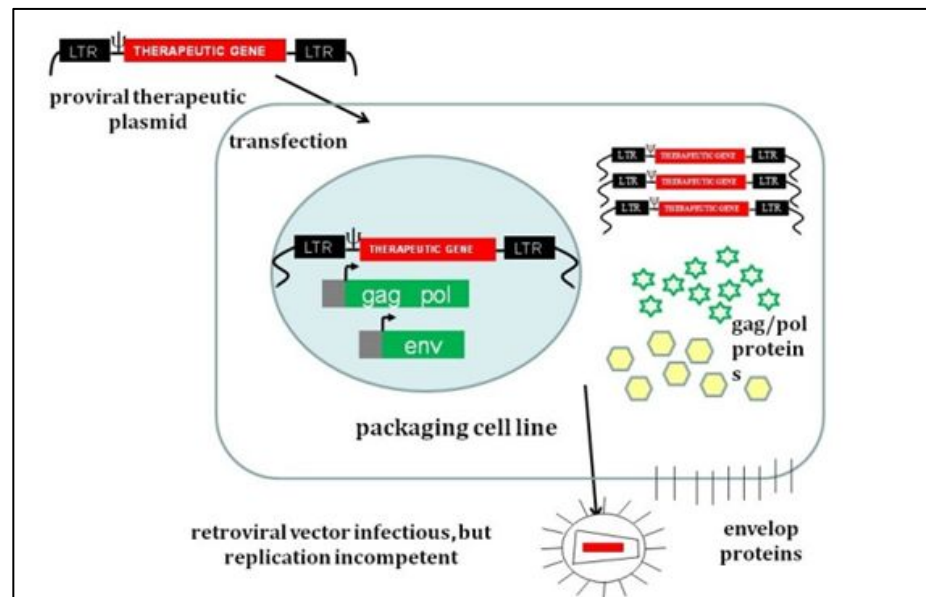
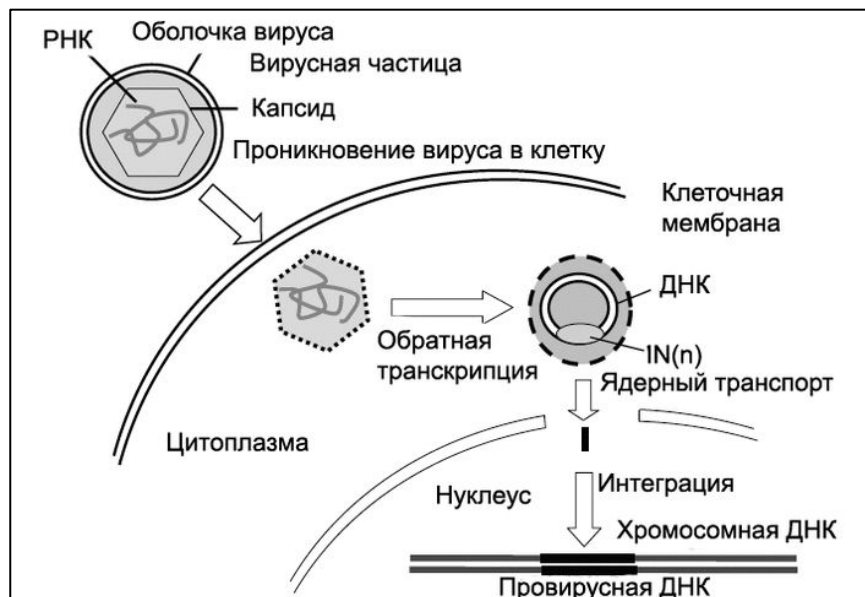
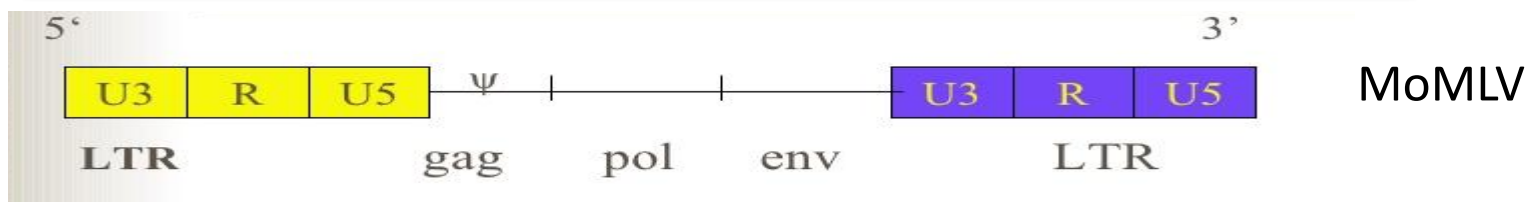
- Иммуногенность (человеческий организм приучен бороться с вирусами, и при введении большого количества вирусных частиц возникает иммунный ответ)
- Неконтролируемое встраивание генома вируса в геном клетки-мишени, что может привести к опухолеобразованию. Небезопасны.

## Преимущества:

- Стабильная экспрессия
- Высокая эффективность трансфекции

# Вирусные векторные системы

## Ретровирусные векторные системы

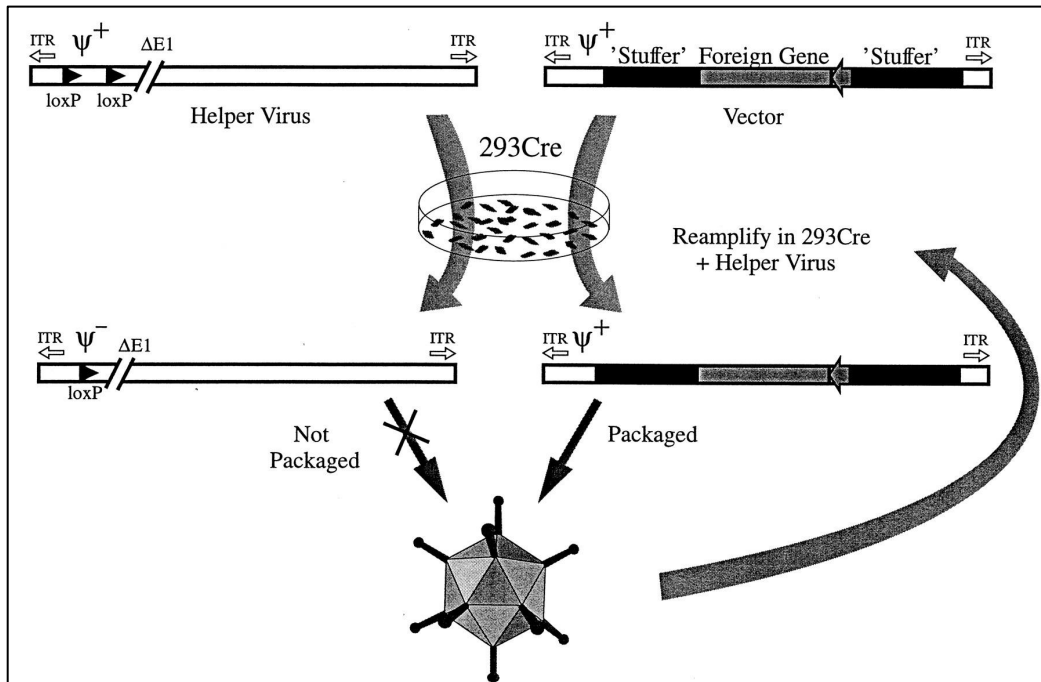
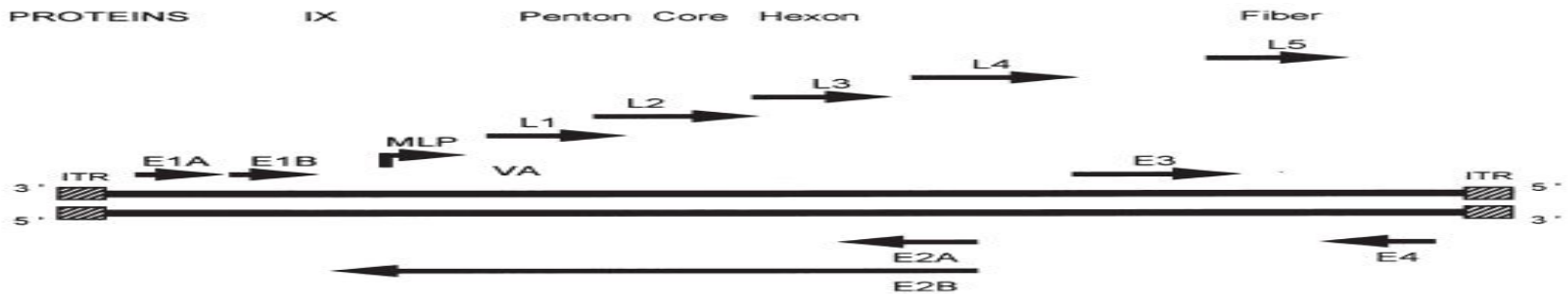


±: Способны интегрировать «терапевтический» ген в геном клетки (длительный эффект)

±: нельзя предсказать куда именно будет интегрироваться ген (риск развития осложнений)

# Вирусные векторные системы

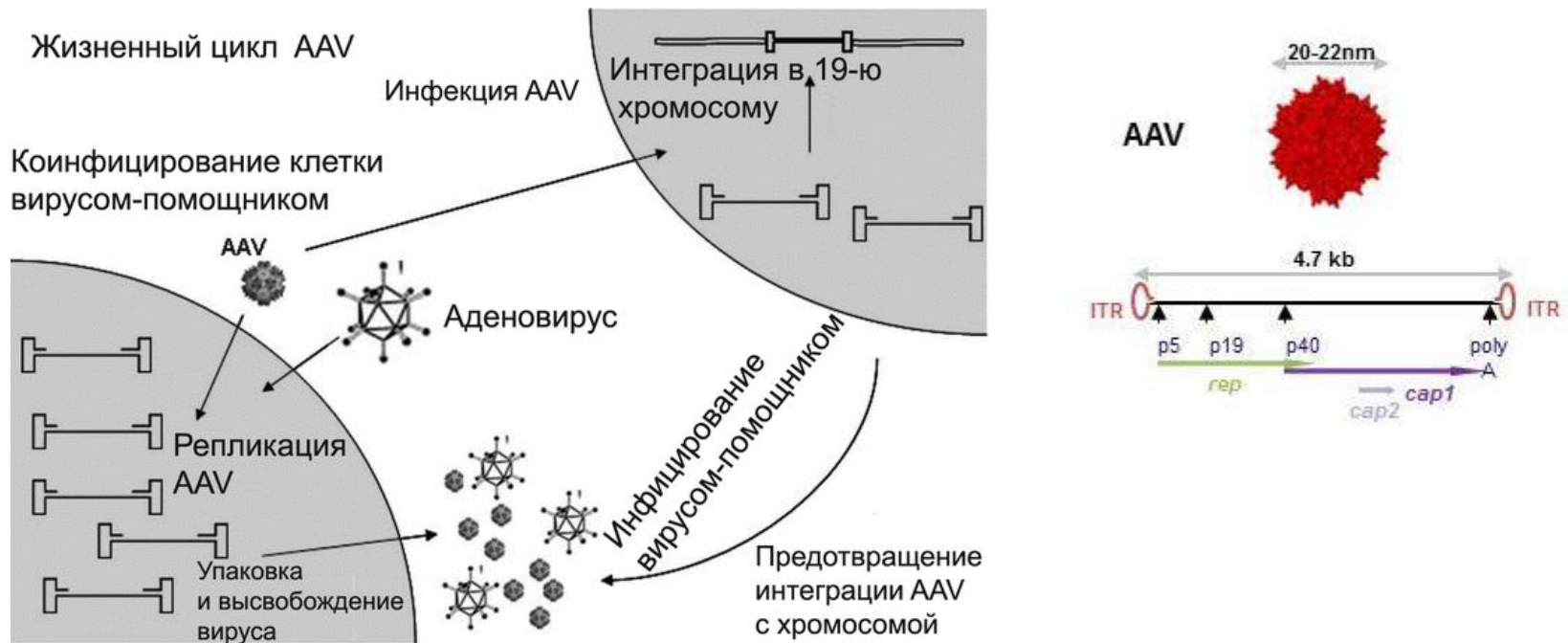
## Аденовирусные векторные системы



Не способны интегрироваться в геном клетки-мишени (непродолжительное действие)

# Вирусные векторные системы

## Аденоассоциированные векторные системы



±: Способен интегрироваться в определенное место в геноме человека

∓: маленький размер вируса не позволяет переносить большие гены

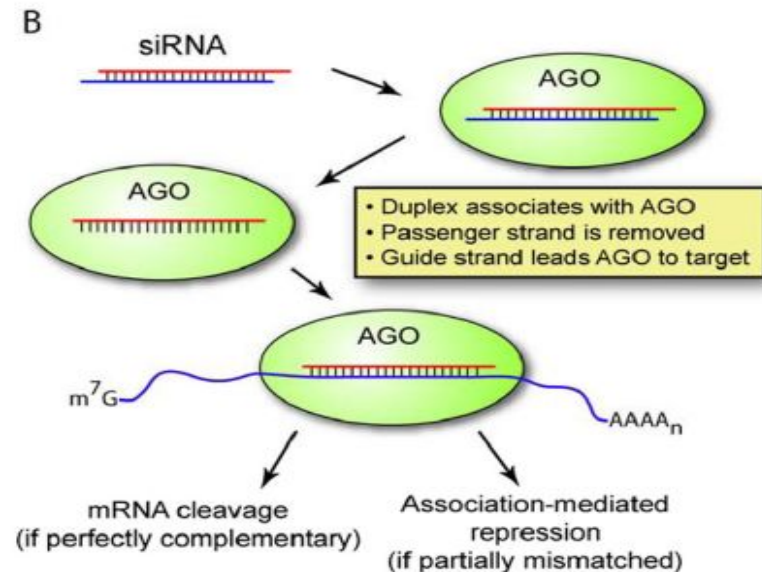
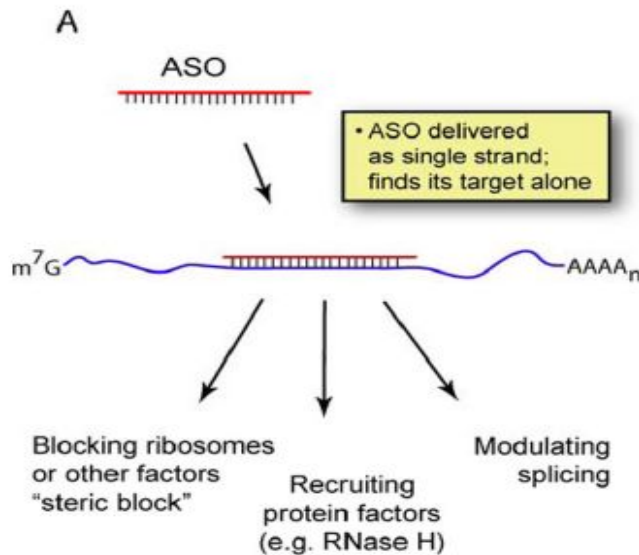
# Сравнение различных способов доставки генетического материала в клетки-мишени

<u>Характеристика</u>	<u>Гамма-ретровирусны е (MLV, FLV и др.)</u>	<u>Лентивирусные (ВИЧ-1 и ВИЧ-2, FIV, CAEV, EIAV, JDV, MVV и др.)</u>	<u>Аденовирусны е (Ad)</u>	<u>Адено- ассоциированн ый вирус (AAV)</u>	<u>Плазмидная ДНК (в искусственно й векторной системе)</u>
<b>Максимальный размер вставки, т.п. о.</b>	7-7,5	7-7,5	До 30	3,5-4,0	Неограничен
<b>Схема доставки генов</b>	Ex vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo
<b>Интеграция с ДНК реципиента</b>	Возможна	Возможна	Невозможна	Возможна/ Невозможна	Маловероятна
<b>Продолжительность экспрессии in vivo</b>	Короткая	Продолжительная	Короткая	Продолжительная	Короткая
<b>Иммунологические проблемы</b>	Незначительны	Незначительны	Серьезны	Неизвестны	Неизвестны
<b>Наличие иммунитета у реципиента</b>	Маловероятно	Маловероятно, за исключением больных СПИДом	Возможно	Возможно	Маловероятно
<b>Проблемы безопасности</b>	Инсерционный мутагенез?	Инсерционный мутагенез?	Воспалительны й ответ, токсичность	Воспалительный ответ, токсичность	Преодолимы в рамках подбора нетоксичных компонентов

# Подавление функции “вредного” гена на уровне мРНК

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСОН)

РНК-интерференция



# От чего зависит эффективность генной терапии?

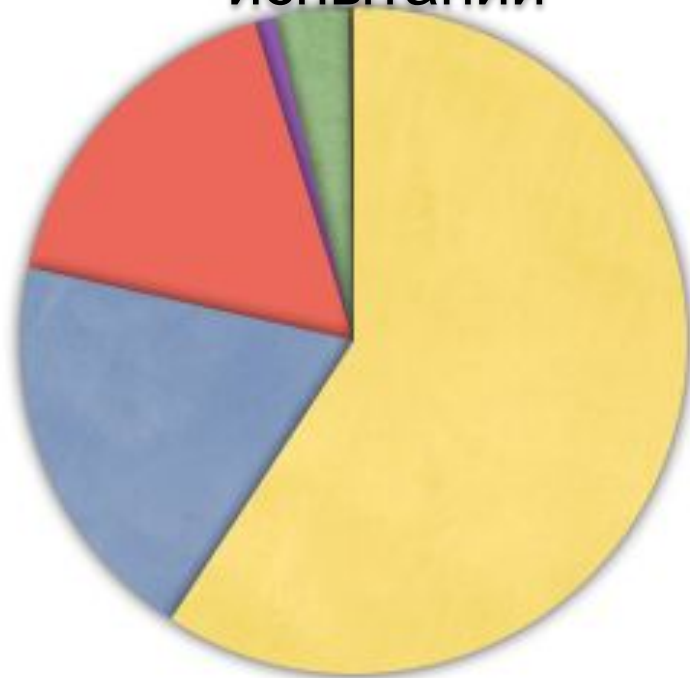
Решающим условием успешной генотерапии является :

- Эффективная доставка чужеродного генетического материала в клетки-мишени
- Длительное функционирование чужеродного генетического материала в клетках-мишенях



# На 2014 год: 2076 генноотерапевтических препаратов проходят клинические испытания

Фазы клинических  
испытаний



- Phase I 59.2% (n=1230)
- Phase I/II 19.3% (n=400)
- Phase II 16.7% (n=346)
- Phase II/III 1% (n=20)
- Phase III 3.6% (n=75)
- Phase IV 0.1% (n=2)
- Single subject 0.1% (n=3)

# Первые попытки применения генной терапии



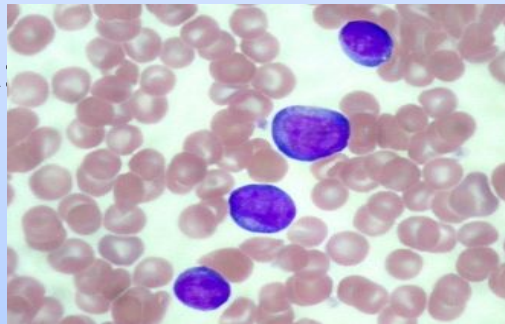
# Недостаточность аденозиндезаминазы

## Этиология:

- Фермент аденозин дезаминаза катализирует превращение аденозина в инозин и аммиак.
- Отсутствие этого фермента ведет к накоплению токсичного для лимфоцитов дезокси-АТФ и последующей гибели клеток.

## Клиническая картина

- Лимфопения.



- Абсолютное число лимфоцитов в среднем не достигает 500 в 1 мкл, при этом значительно снижено число как Т-, так и В- и НК-клеток.
- Вследствие поражения клеточного иммунитета у больных возникают частые тяжелые инфекции.

## Стандартный метод лечения:

Трансплантация костного мозга и периодическое в/в введение рекомбинантного фермента.

# Недостаточность аденозиндезаминазы

- Эта болезнь представляет собой ауточомное рецессивное заболевание. Дети, больные этим наследственным дефектом, гомозиготны по поврежденному гену. А гетерозиготные родители имеют пониженный уровень фермента.
- Лимфоциты больной 4-х летней девочки заранее были отделены от остальных элементов крови, Т-лимфоциты стимулированы к росту. Затем в условиях *in vitro* в них был введен ген аденозиндезаминазы с помощью ретровирусного вектора . Приготовленные таким образом генно-инженерные лимфоциты были возвращены в кровотоки.
- Процесс введения генно-инженерных лимфоцитов повторяли 7 раз на протяжении 10,5 месяцев. После этого произошло заметное улучшение иммунной функции и примерно четверть ее Т-клеток оказались генно-инженерными. Наблюдалось повышение уровня аденозиндезаминазы.
- Недостаток метода: небольшая продолжительность жизни зрелых Т-клеток, необходимо повторять процедуру. Последующие испытания с применением стволовых кроветворных клеток.

# Недостаточность аденозиндезаминазы

- Генная терапия недостаточности аденозиндезаминазы была осуществлена посредством модификации Т-лимфоцитов американским врачом У. Ф. Андерсоном.
- **Первая успешная попытка** применения ex vivo генной терапии .
- Это событие произошло 14 сентября 1990 г., и дата считается днем рождения реальной генной терапии. С этого года стал издаваться журнал Генная терапия.

# Как обстоят дела на сегодняшний день ?

- В мире одобрено к применению 4 геннотерапевтических препарата:
- с 2003 года в Китае: **Gendicine** и **Oncorine**, предназначенные для лечения тяжелых форм рака шеи и головы.
  - с 2011 года в России: **Неоваскулген**, разработанный Институтом Стволовых Клеток Человека и предназначенный для лечения ишемии нижних конечностей.
  - С 2012 года **Glybera** в ЕС. Лечение семейного дефицита ЛПЛ.
  - В США до сих пор запрещено использование генной терапии в клинике.

nature  
biotechnology

 **HEOVASKULGEN**<sup>®</sup>

Journal home > Archive > News > Full Text

Journal content

Journal home

Advance online publication

Current issue

News

*Nature Biotechnology* 22, 3 - 4 (2004)  
doi:10.1038/nbt0104-3

China approves first gene therapy

Sue Pearson<sup>1</sup>, Hepeng Jia<sup>1</sup> & Keiko Kandachi<sup>1</sup>

В настоящее время курс геннотерапевтического воздействия во всем мире прошло около 10 тысяч пациентов, в данной области зарегистрировано более 2300 протоколов клинических испытаний.



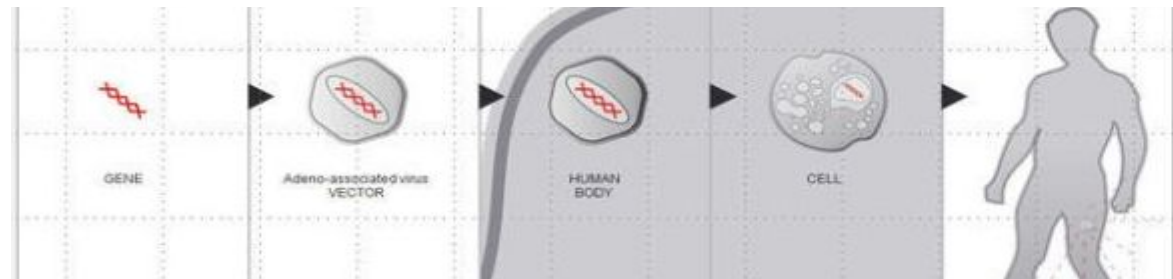
# Семейный дефицит липопротеиновой липазы

## Семейный дефицит липопротеиновой липазы:

- Аутосомно-рецессивное заболевание
- Характеризуется снижением активности или полным отсутствием липопротеиновой липазы.
- При недостаточности этого фермента резко повышается уровень хиломикронов (частиц, участвующих в транспортировке жиров) в крови.
- У больных из-за того, что сосуды «забиваются жиром», инфаркт миокарда или инсульт могут случиться в возрасте 20–25 лет.
- Среди менее устрашающих последствий спонтанное или вызванное нарушением диеты воспаление поджелудочной железы — панкреатит.

# Glybera

- Glybera первый случай разрешения применения генной терапии в Европе (2012).
- Аденоассоциированный вектор
- Необходима однократная инъекция в мышцы
- Испытания проводились на 27 пациентах. Между третьей и двенадцатой неделями после введения препарата наблюдалось ощутимое снижение концентрации жиров в крови.



Стоимость лечения: 1.6 млн \$. Самое дорогое лечение на сегодняшний день



# Проблемы генной терапии

- Генная терапия ещё далека от широкого практического использования. Пока основные успехи достигнуты на моделях.
- Много примеров разных откликов человека и экспериментальных животных на одну и ту же обработку
- Далеки от решения проблемы с адресной доставкой генотерапевтических препаратов
- Возможны серьезные побочные эффекты

**Спасибо за внимание!**