

Принципы лечения наследственных заболеваний



Сержанова Виктория Андреевна
МГНЦ РАМН

Подходы к лечению наследственных болезней

Симптоматическое

Патогенетическое

Этиологическое

Патогенетическое лечение



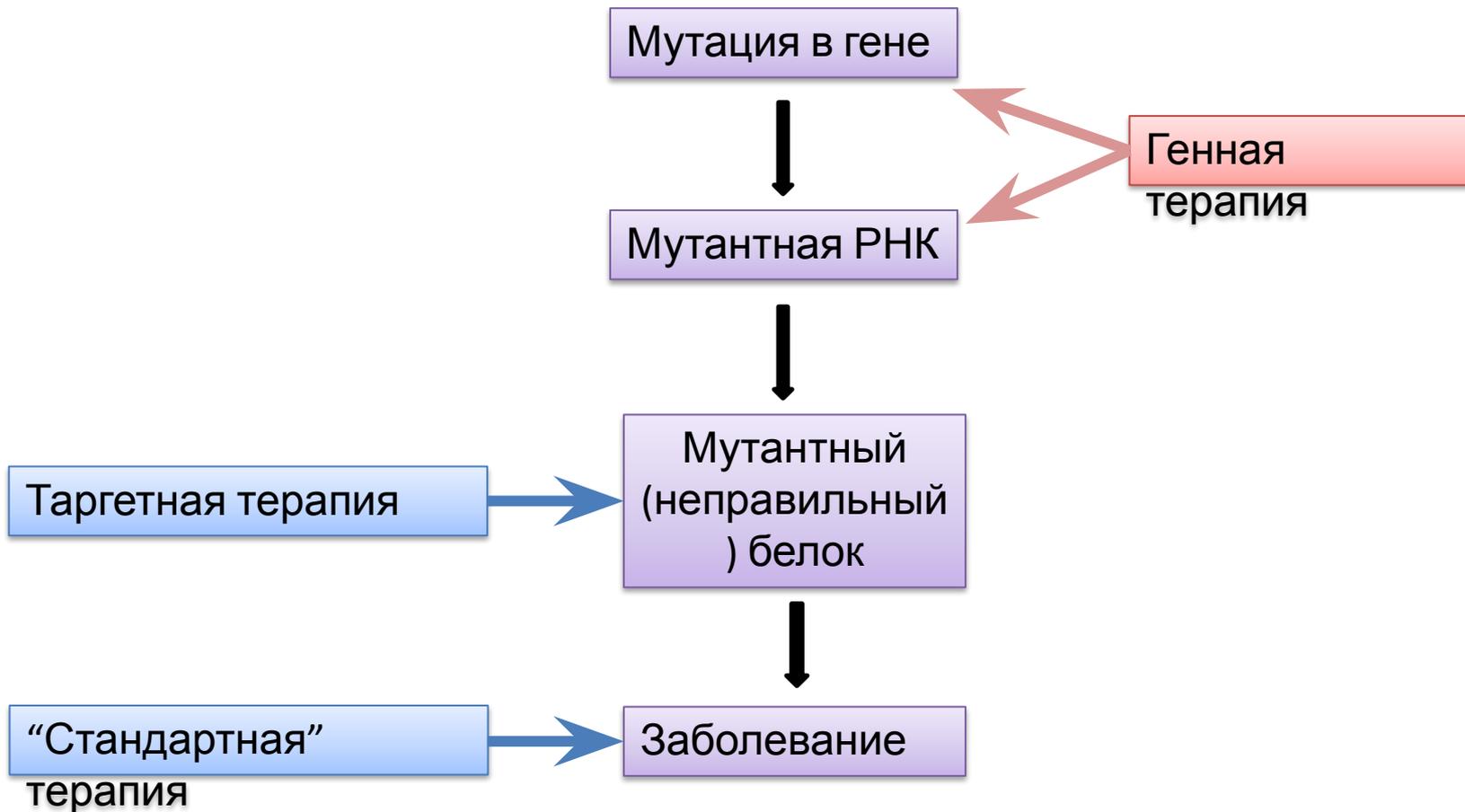
Генная терапия



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?

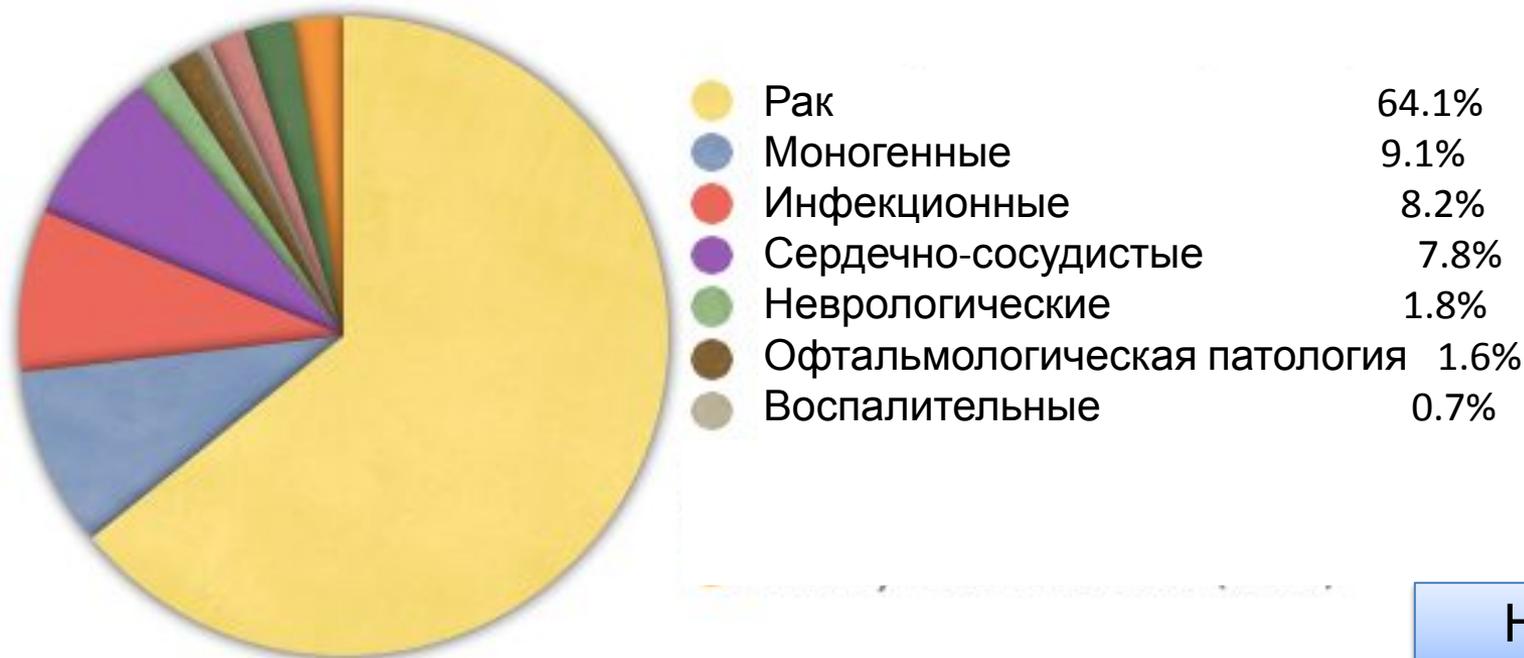
Чужеродный генетический материал
(вирусная инфекция)

Наследственные заболевания

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

На какие заболевания направлена генная терапия?

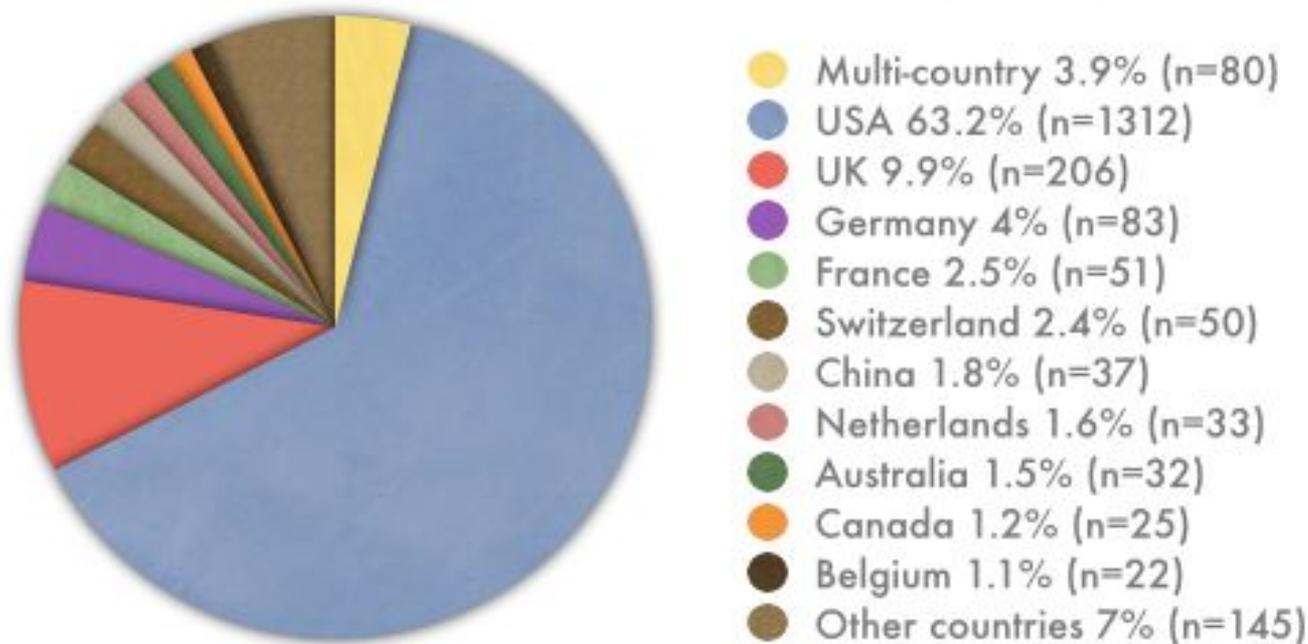
Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



На 2014 год

По странам

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials
(by Country)



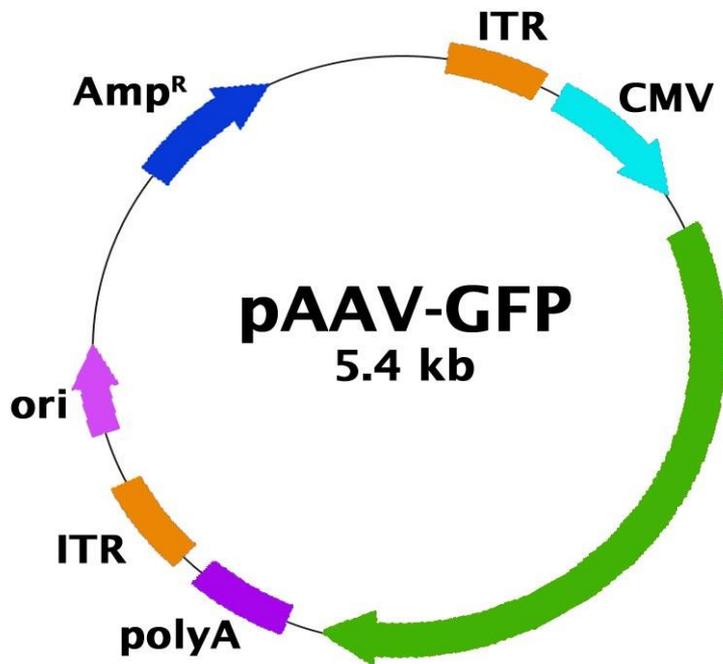
По странам

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

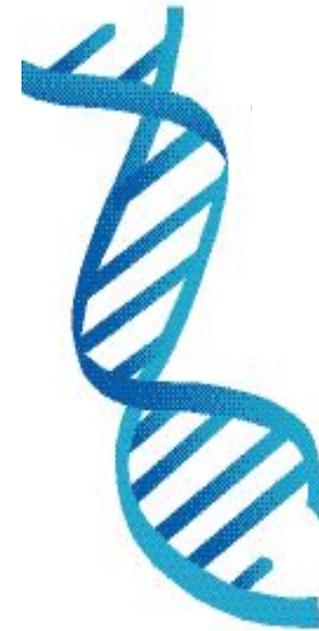
На 2014 год

Что представляет из себя препарат для генной терапии?

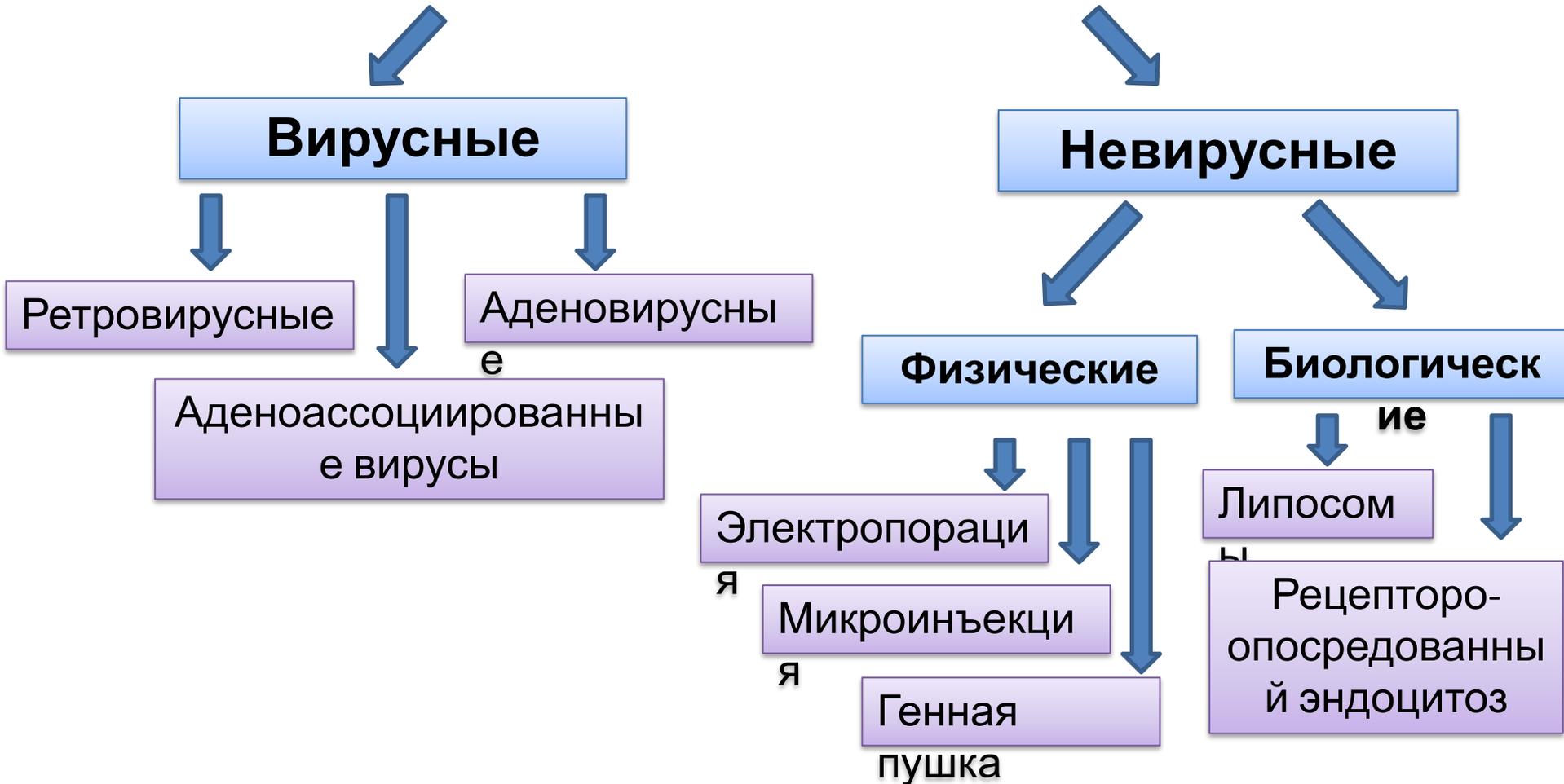
Плазмида



Олигонуклеотид



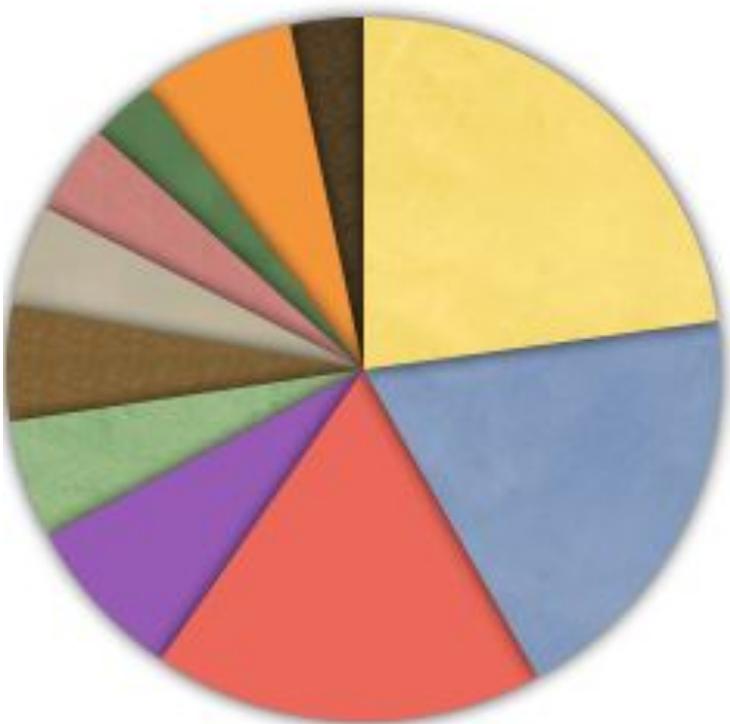
Способы доставки генетического материала в клетки мишени



Основные методы доставки геннотерапевтических препаратов

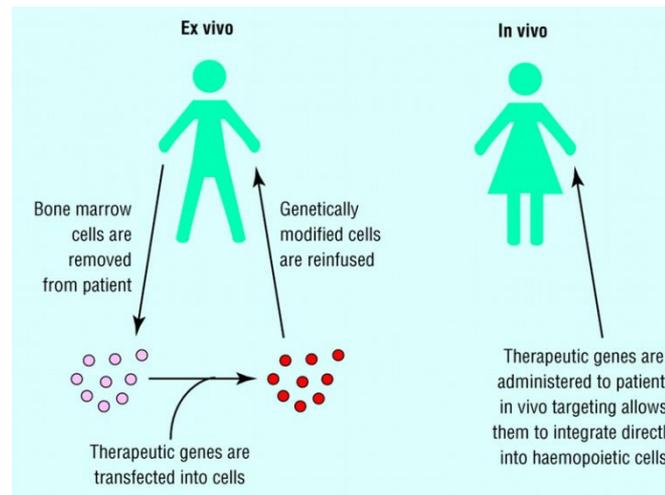
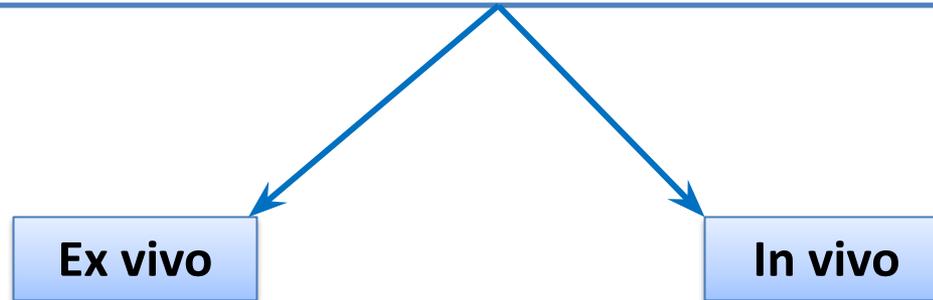
Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials

- 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)

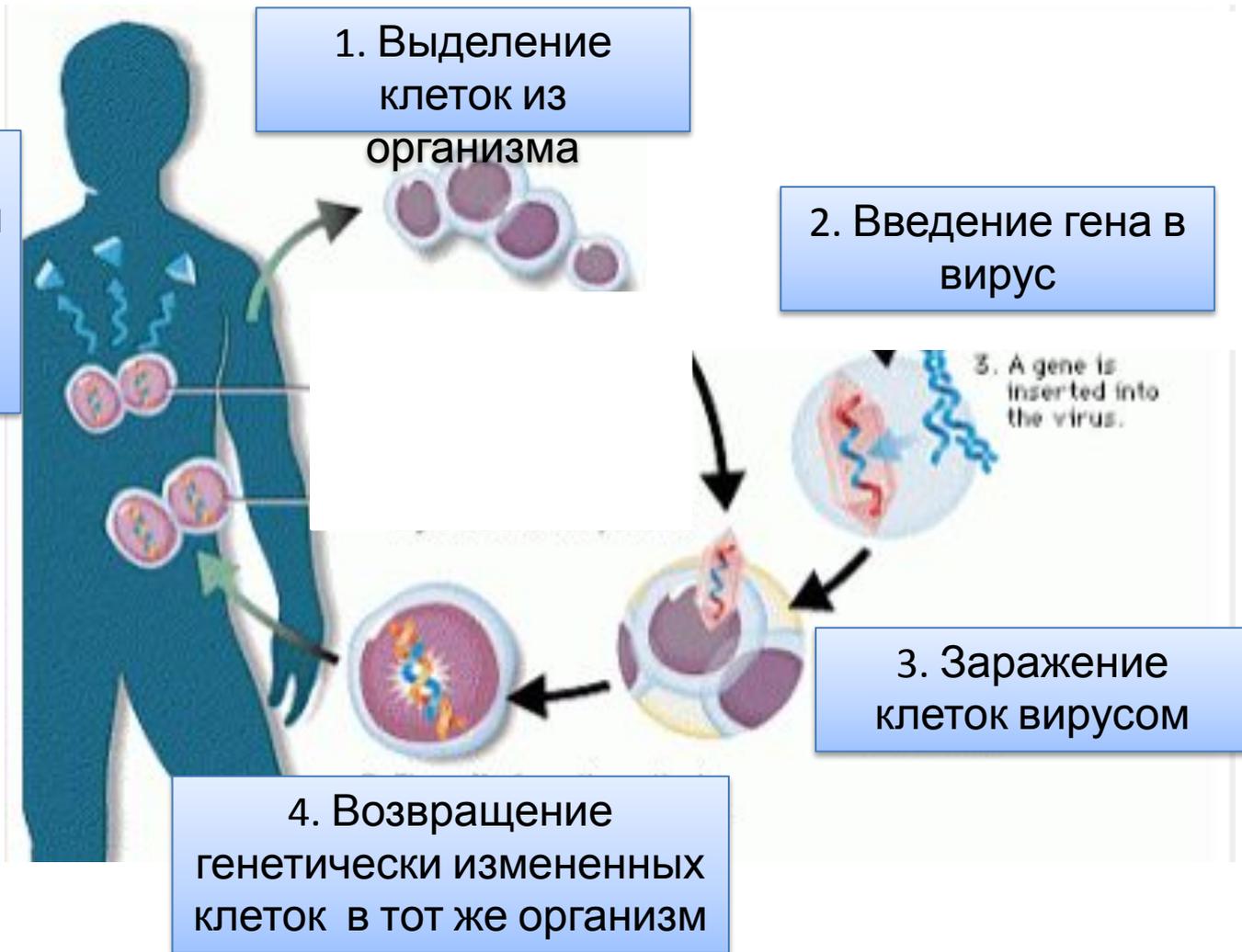
Пути введения генетической информации больному



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

5. Генетически измененные клетки продуцируют не хватающий организму белок



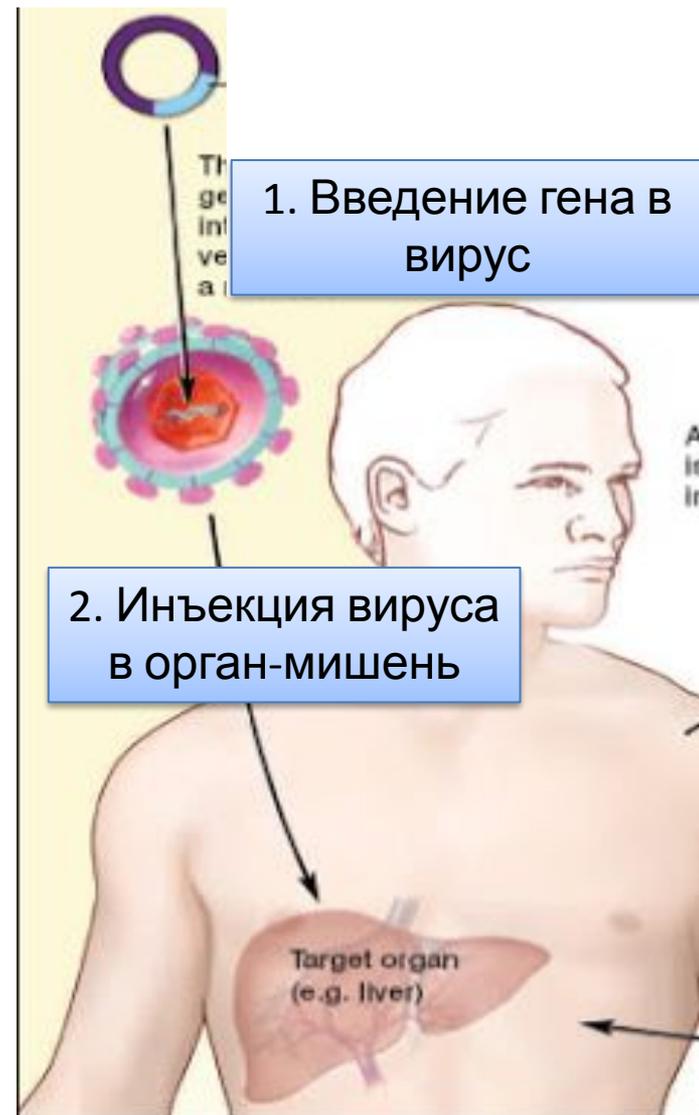
Ex vivo генная терапия

- 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

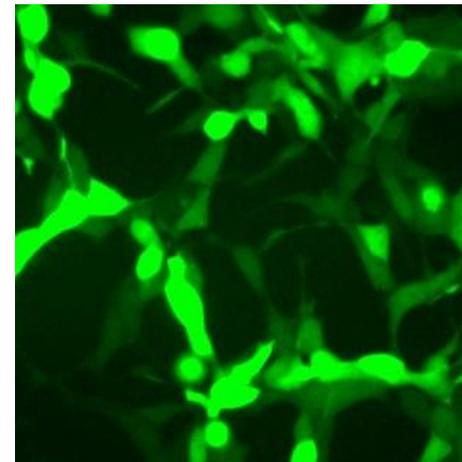
эмбриональные (фетальная генотерапия):

- 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.



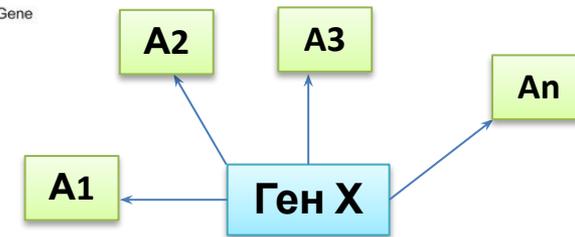
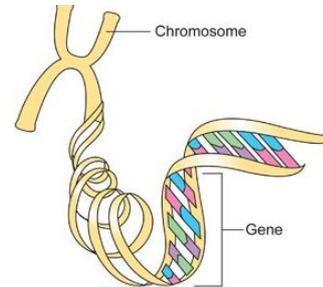
соматические (соматическая генотерапия) :

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



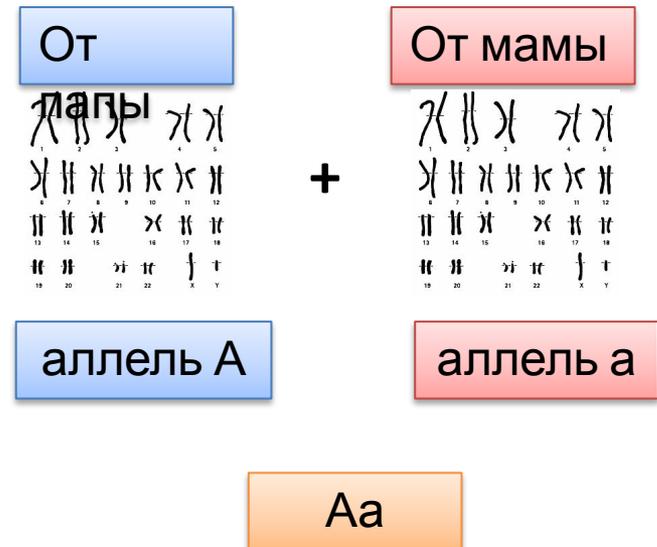
Что такое аллель гена?

Ген является частью хромосомы



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

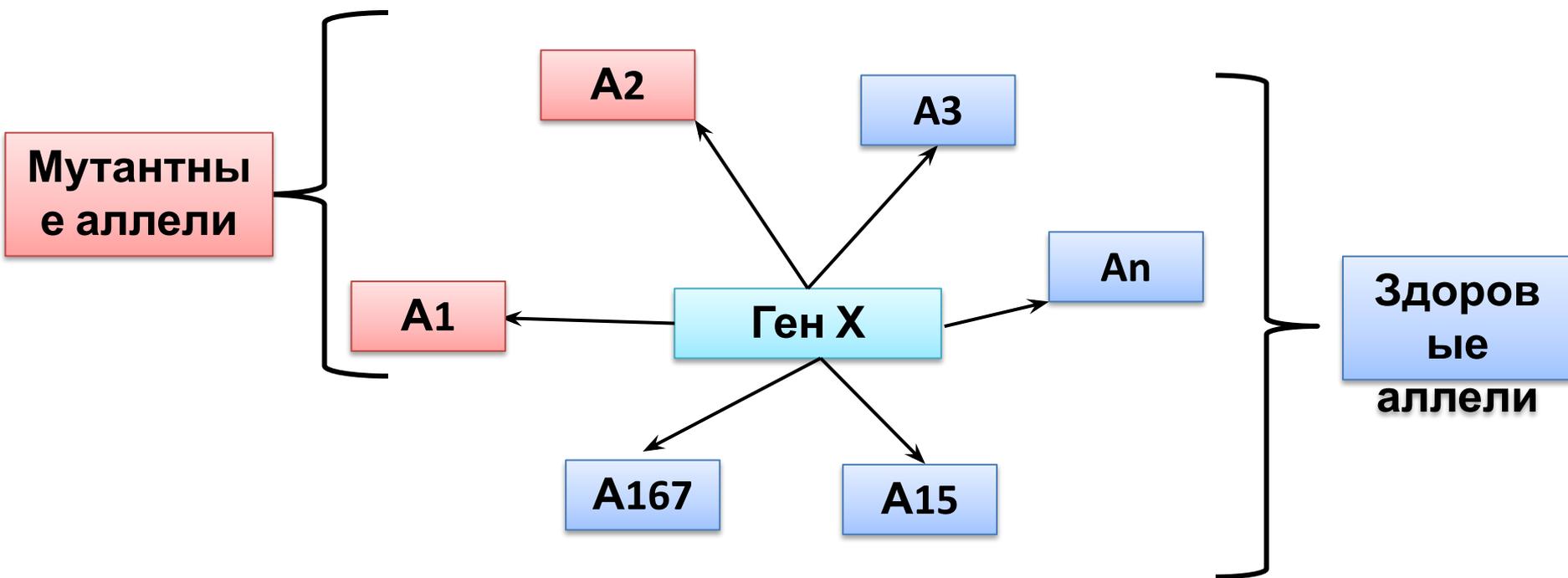
У человека двойной набор хромосом (2N)
и,соответсвенно, аллелей



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

Наследственные заболевания

Обусловлены экспрессией мутантного аллеля



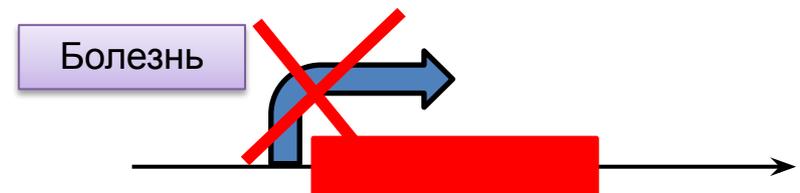
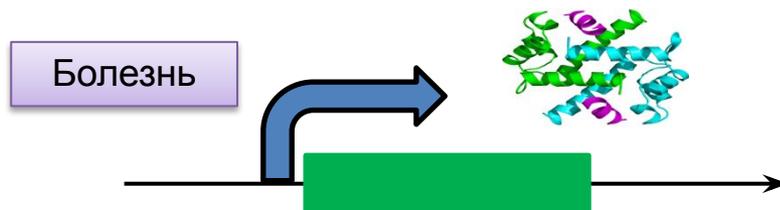
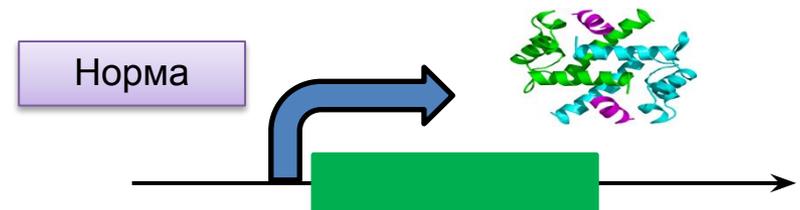
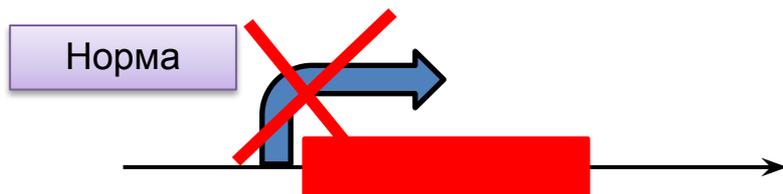
Стратегии генной терапии

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

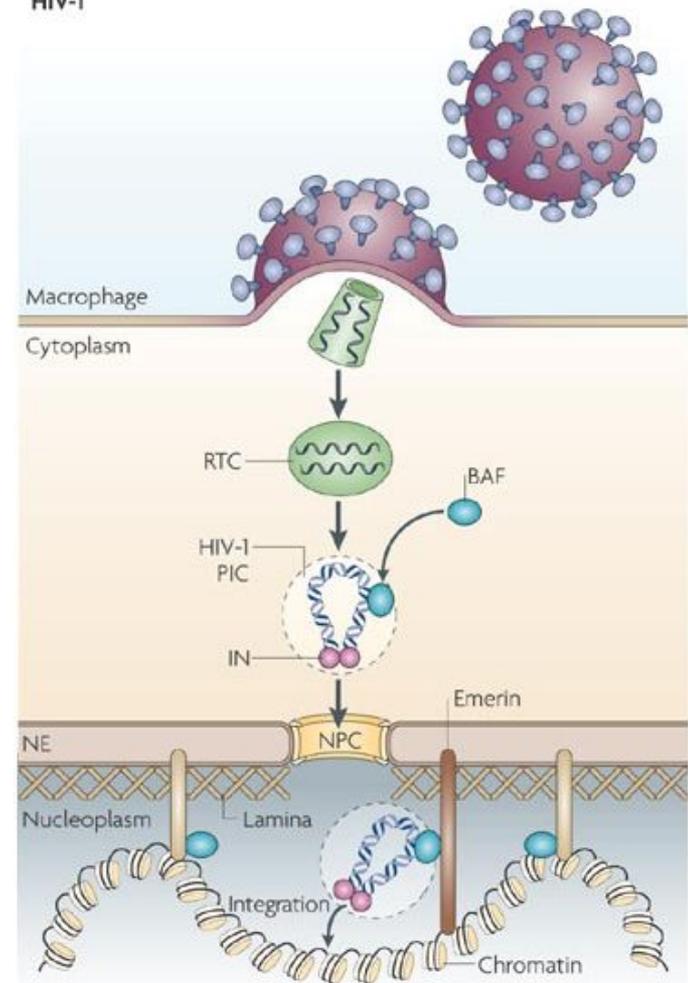
Пополняющая генная терапия:

- 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:

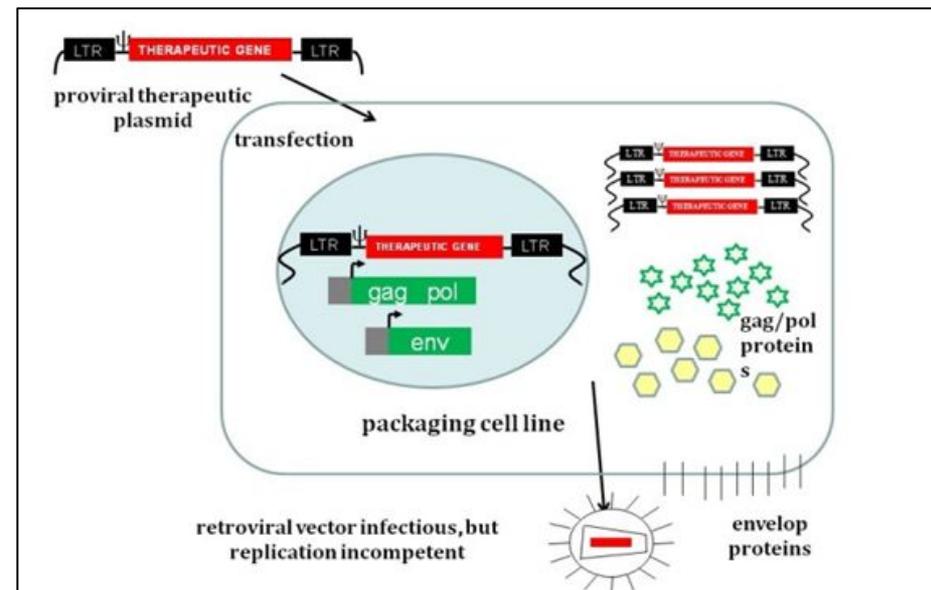
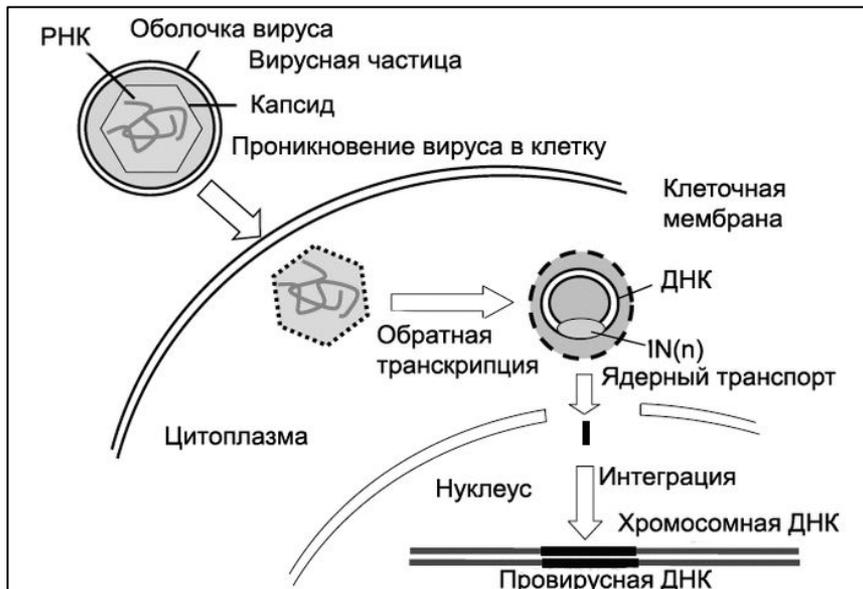
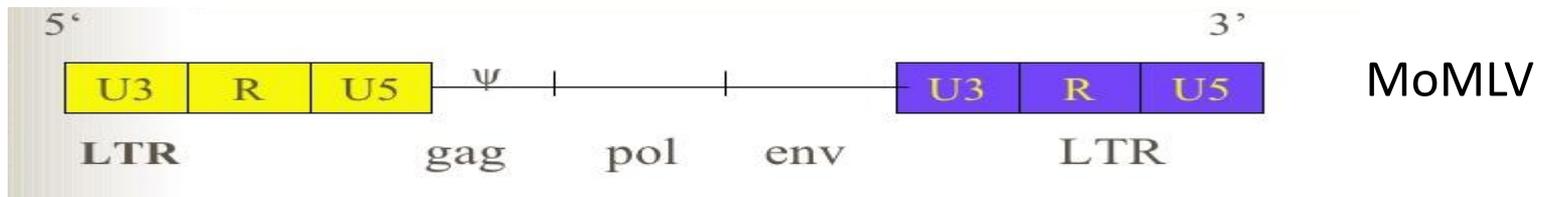
- Иммуногенность (человеческий организм приучен бороться с вирусами, и при введении большого количества вирусных частиц возникает иммунный ответ)
- Неконтролируемое встраивание генома вируса в геном клетки-мишени, что может привести к опухолеобразованию. Небезопасны.

Преимущества:

- Стабильная экспрессия
- Высокая эффективность трансфекции

Вирусные векторные системы

Ретровирусные векторные системы

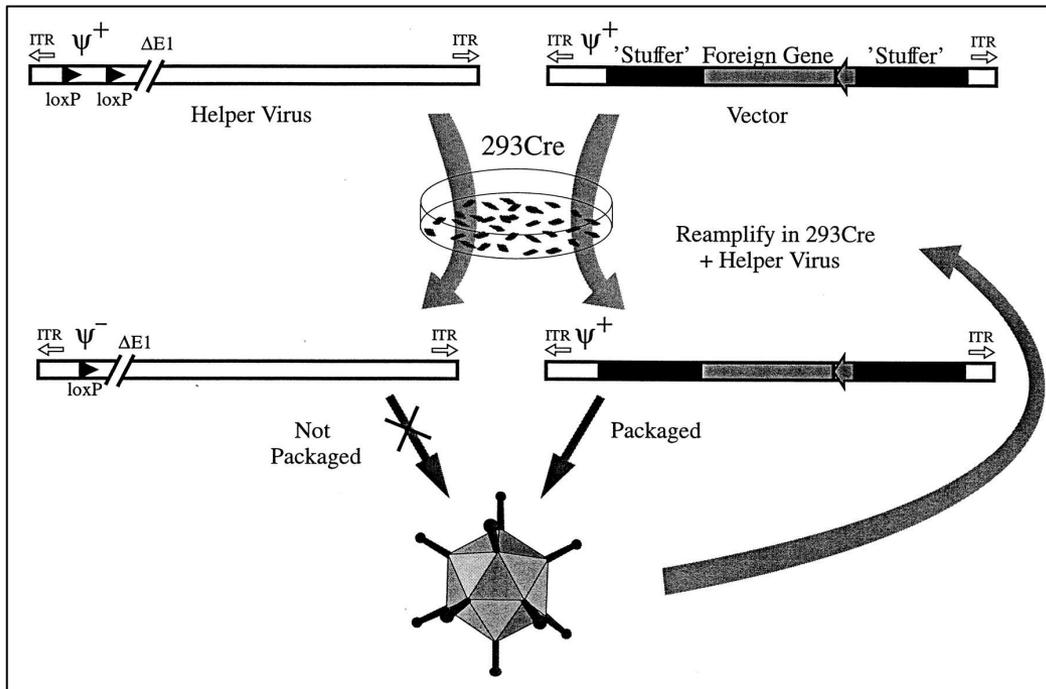
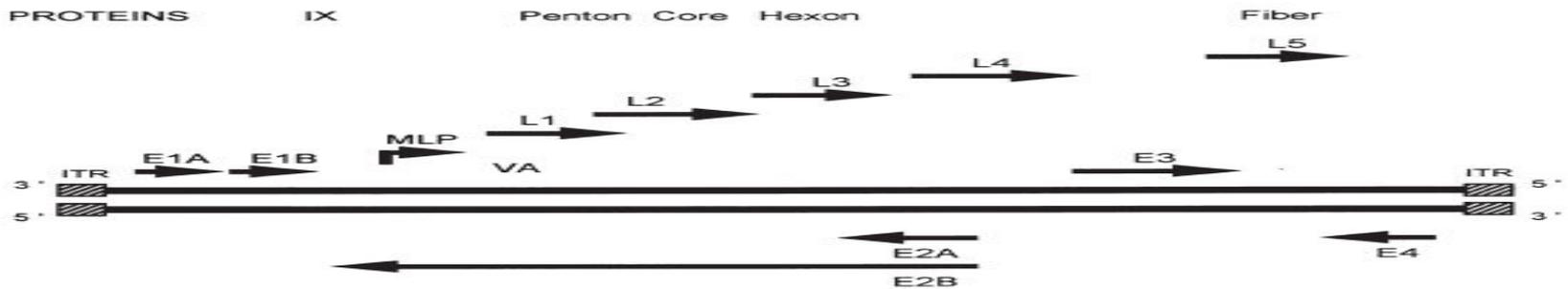


±: Способны интегрировать «терапевтический» ген в геном клетки (длительный эффект)

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

Вирусные векторные системы

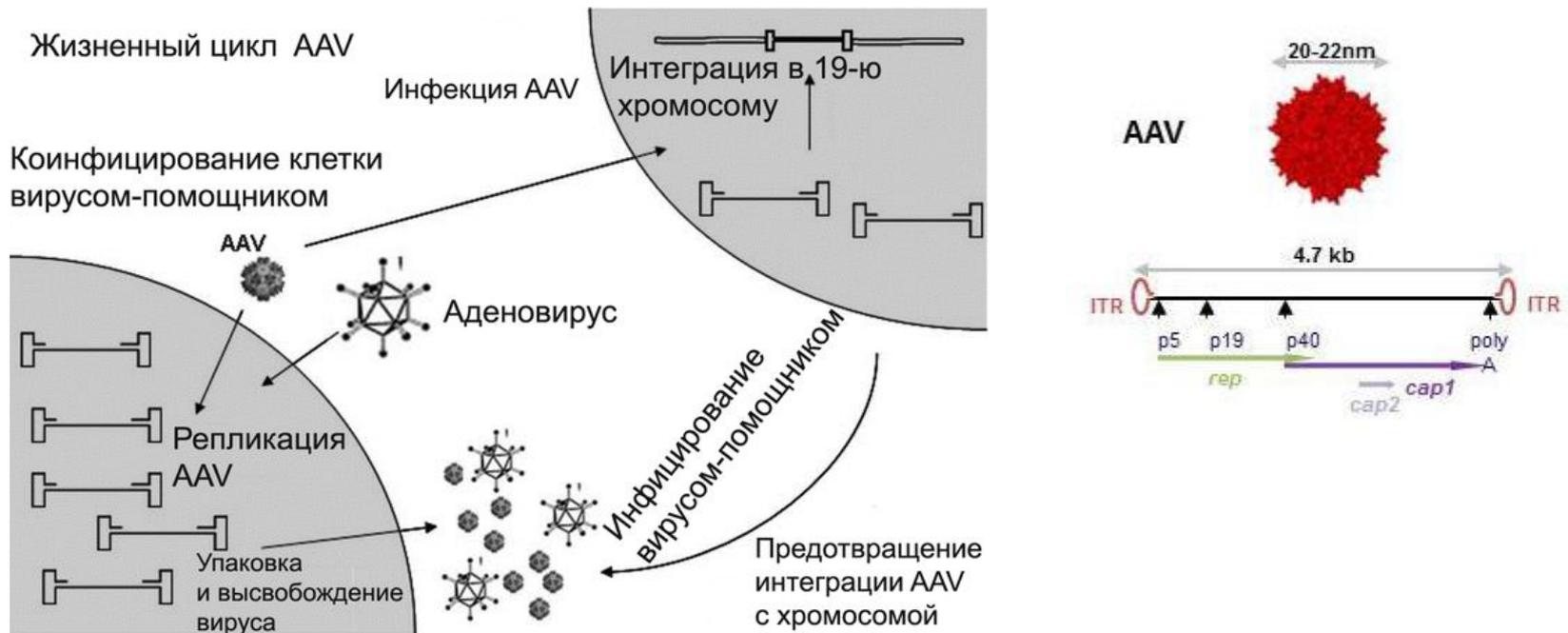
Аденовирусные векторные системы



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

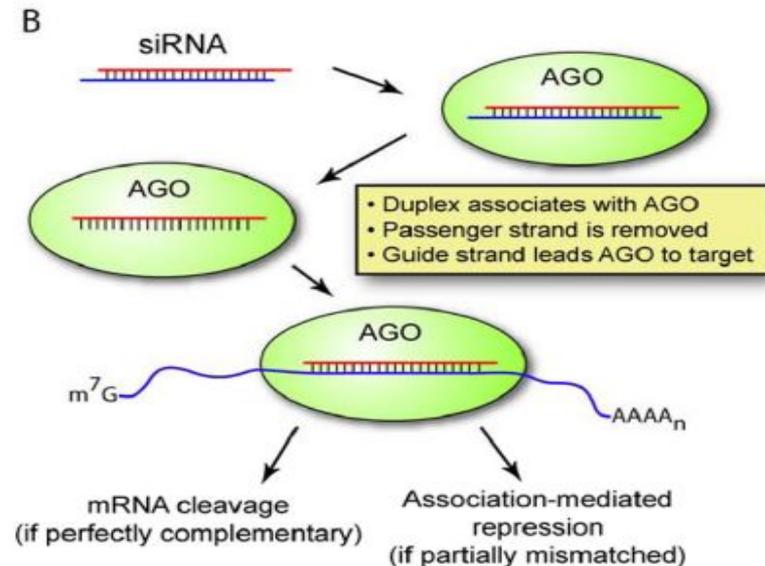
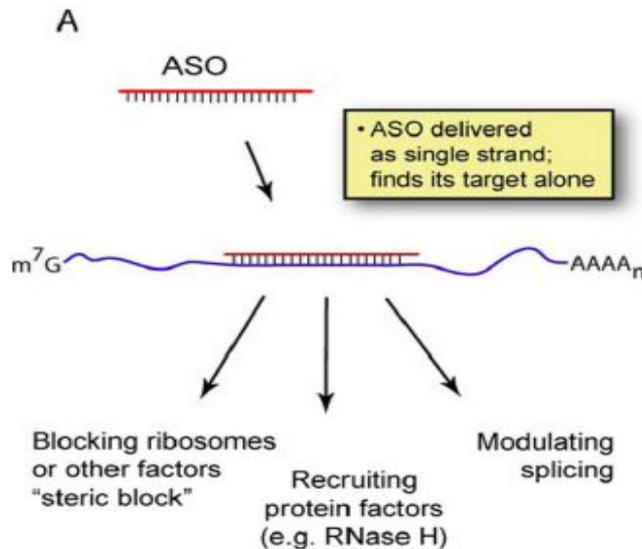
Сравнение различных способов доставки генетического материала в клетки-мишени

<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>
Максимальный размер вставки, т.п. о.	7-7,5	7-7,5	До 30	3,5-4,0	Неограничен
Схема доставки генов	Ex vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo
Интеграция с ДНК реципиента	Возможна	Возможна	Невозможна	Возможна/ Невозможна	Маловероятна
Продолжительность экспрессии in vivo	Короткая	Продолжительная	Короткая	Продолжительная	Короткая
Иммунологические проблемы	Незначительны	Незначительны	Серьезны	Неизвестны	Неизвестны
Наличие иммунитета у реципиента	Маловероятно	Маловероятно, за исключением больных СПИДом	Возможно	Возможно	Маловероятно
Проблемы безопасности	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



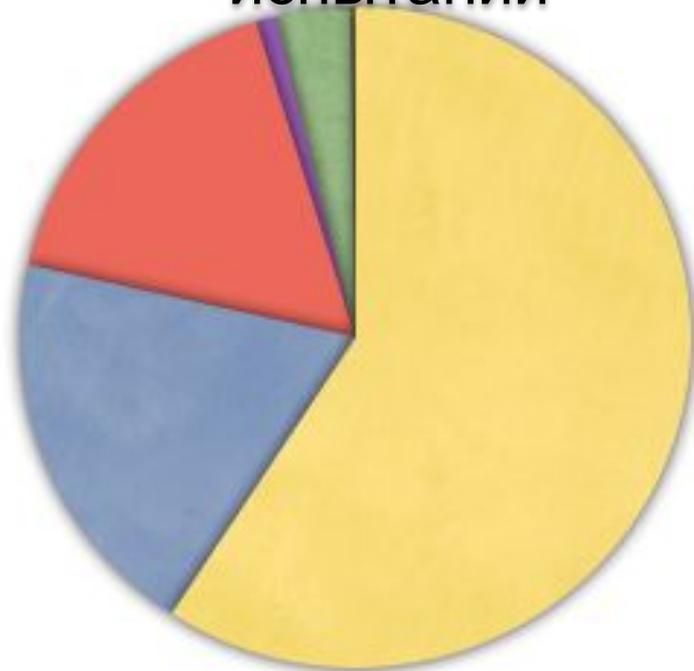
От чего зависит эффективность генной терапии?

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



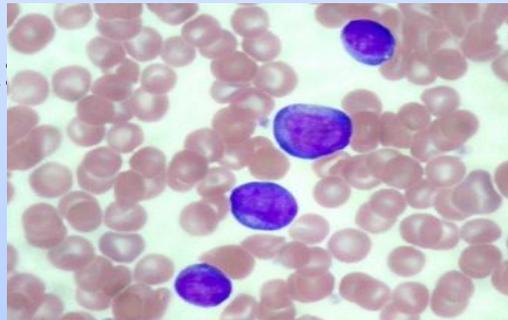
Недостаточность аденозиндезаминазы

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 NK-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 аутосомное 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 кровотока.
- 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**[®]

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 Pearson¹, Hepeng Jia¹ & Keiko Kandachi¹

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



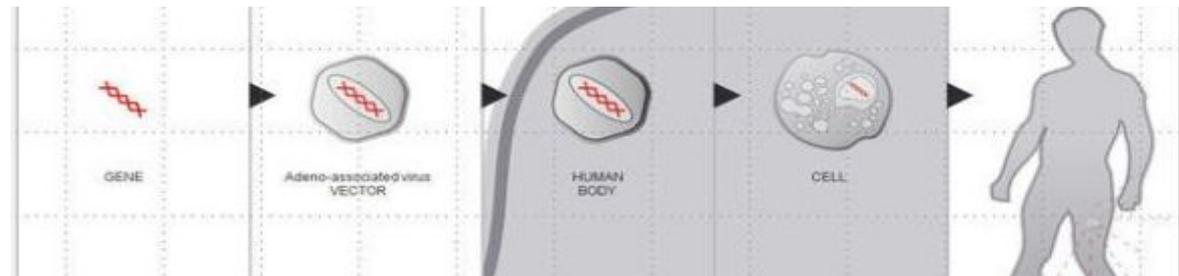
Семейный дефицит липопротеиновой липазы

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!