

# Tehnologija rekombinantne DNA v medicini

Gensko zdravljenje

# rDNA v klinični medicini

## **Genetsko svetovanje:**

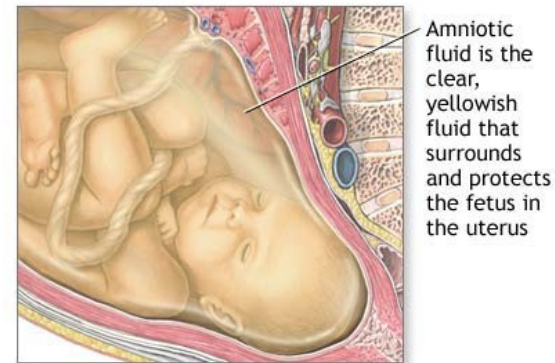
- komunikacija s pacienti, svojci, bodočimi starši, zdravniki
- obveščanje o nevarnostih za razvoj in širjenje dednih bolezni
- opis bolezni in možnosti za njeno diagnosticiranje in preprečevanje
- seznanjanje z molekularno patologijo bolezni
- seznanjanje s postopki in varnostjo genske terapije

## **Genetska diagnostika:**

- detektiranje predkliničnih primerov bolezni
- detektiranje nebolelih prenašalcev dednih bolezni
- genetsko presejanje za identifikacijo posameznikov z ozdravljivimi dednimi boleznimi

## **Gensko zdravljenje**

# rDNA v klinični medicini /2



Prenatalna diagnostika: zarodek v zgodnji fazi razvoja pregledajo z:

- **ultrazvokom, embrioskopijo, fetuskopijo**
- **amniocentezo** - odvzem vzorca amnijske tekočine (v 15. tednu), v kateri plavajo tudi celice zarodka - po odvzemu jih gojijo še 1-2 tedna, nato pa analizirajo (genske in kromosomske analize, koncentracija AFP / $\alpha$ -fetoprotein/ - ni potrebna predhodna namnožitve celic)
- **horionsko biopsijo** (CVS) - horionski vili imajo enako gensko in biokemijsko sestavo kot celice zarodka
- **pregledom vzorca krvi** iz popkovnične vene (v 18. tednu) ali z **biopsijo kože** zarodka

## Testiranje za cistično fibrozo

CF: pogostost 1/2500 pri Kavkazijcih, prenašanje avtosomsko recesivno zaradi težav z dihali in prebavili večina umre pred 30. letom. Znanih je nad 300 mutacij, povezanih s CF.

(ZDA:) Prostovoljno testiranje - 20 min. svetovanje, nato odvzem krvnega vzorca in analiza 31 najpogostejših mutacij (90 % kliničnih primerov). Rezultati v 1 tednu. (Cena 50 USD +150 USD/osebo.)

Odvzem popkovniče krvi po rojstvu: **umbilikalna kri vsebuje veliko izvornih celic, ki bodo morda še uporabne, če bi prišlo do razvoja bolezni in bodo na voljo primerne tehnologije, ki bi omogočile usmerjeno diferenciacijo takih celic v tkiva/organe. Odvzem in hranjenje ponujajo različna podjetja (SLO: ~1600 EUR + 50 EUR/leto).**

# Zdravila na osnovi DNA

Pri klasičnem genskem zdravljenju poskušamo vzpostaviti normalno raven okvarjenih ali manjkajočih proteinov.

Pri boleznih, ki nastanejo zaradi prekomernega izražanja, pa uporabljamo nukleotidna zaporedja, ki se specifično vežejo na gene ali mRNA z zapisom za prekomerno izraženi protein. S tem zmanjšajo njegovo izražanje.

Zaporedja, ki se vežejo na **gene**, imenujemo 'antigeni oligonukleotidi', zaporedja, ki se vežejo na **mRNA**, pa 'protismerni oligonukleotidi'.

Pripravimo lahko tudi protismerna zaporedja, ki se vežejo na zapise za transkripcijske faktorje - s tem lahko delujemo na znižanje transkripcije in translacije. Dodatna možnost zdravljenja je s pomočjo ribocimov, ki jih pripravimo na tak način, da inaktivirajo specifična tarčna zaporedja.

Tržišče za DNA-zdravila naj bi leta 2010 bilo veliko 6,2 milijarde USD. Predvidevajo, da naj bi večina zdravil bila usmerjenih proti rakavim obolenjem in AIDS-u.

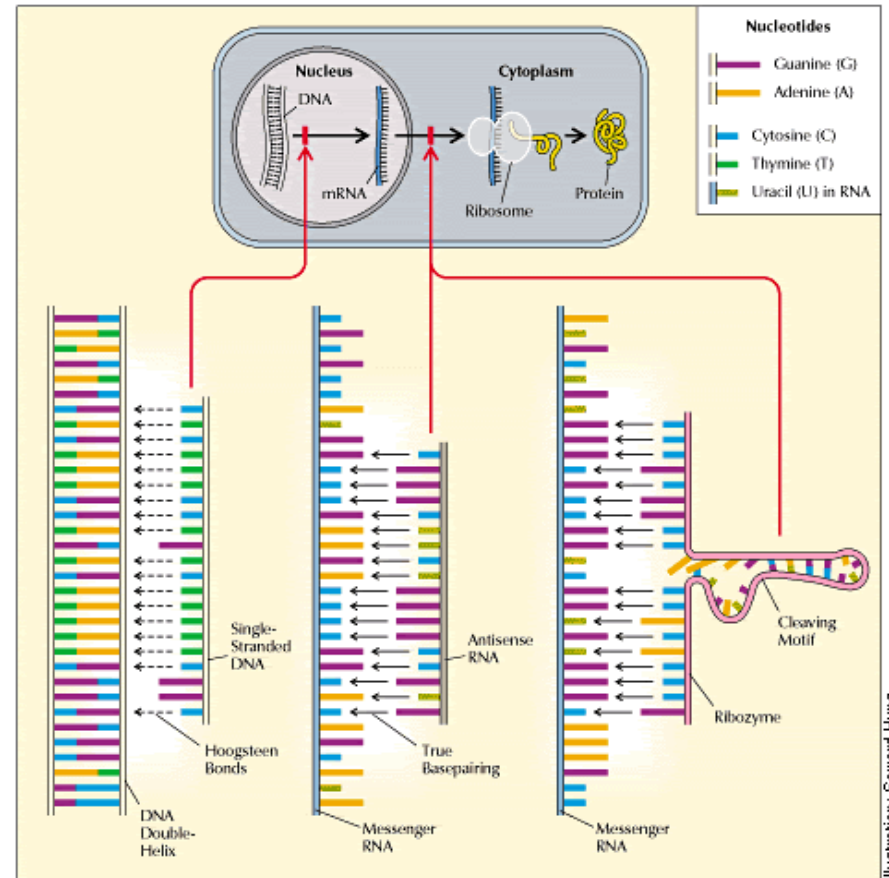
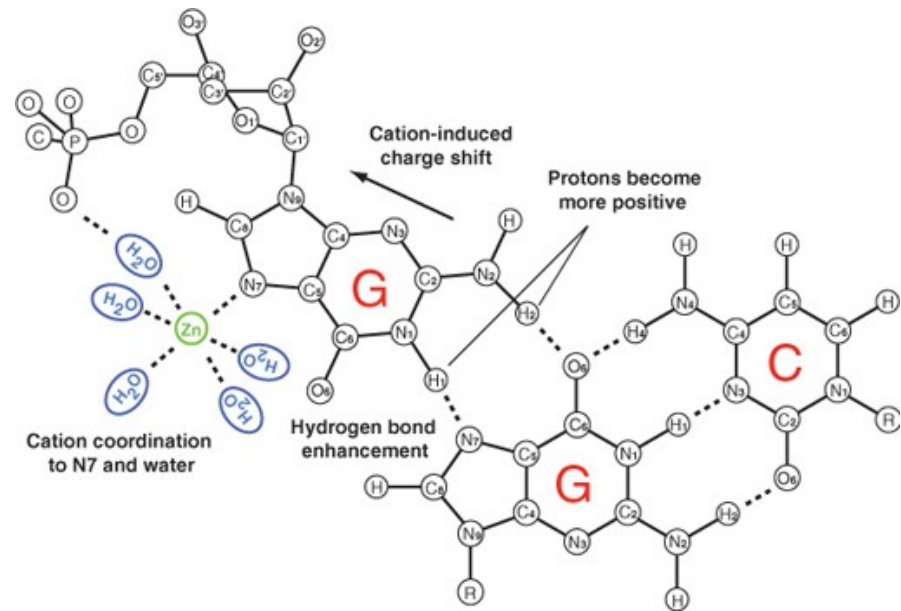
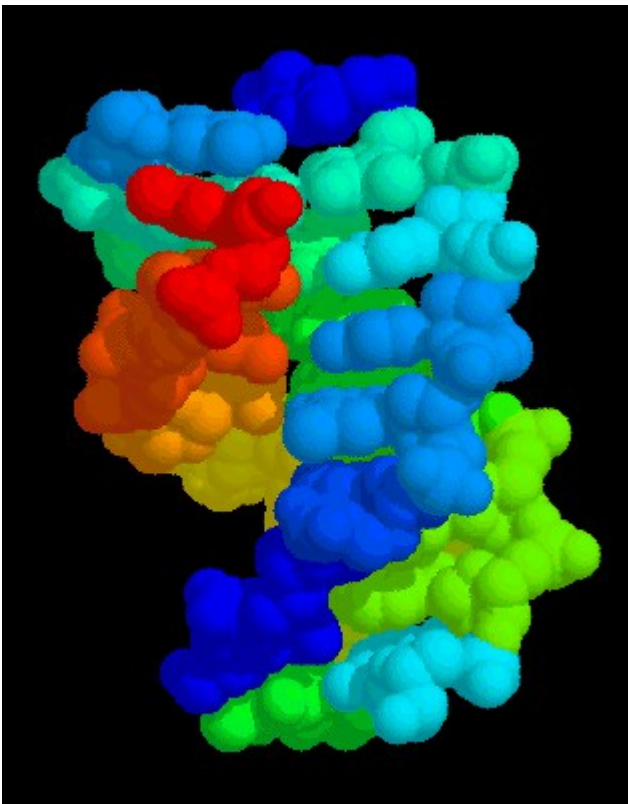


Figure 1. Nucleic acids carrying antisense, the chemical complement of a targeted span of genetic code, raise the prospect of new magic bullets directed specifically at disease-related genes. Normally, every gene's code—its "sense strand"—is transcribed into messenger RNA, which then is translated by a ribosome into a protein (top). Hence, gene expression can be interrupted along the gene itself. The idea shown (bottom left) is an antisense strand whose code sequence, rich in the code letters C and T, can interact (by so-called Hoogsteen binding) with its complement, a se-

quence rich in A and G. The result is a triplex along the DNA double strand. The intent is to jam gene transcription. Gene expression can also be interrupted by attacking a gene's messengers during the translation stage prior to protein synthesis. Two ideas are shown: antisense that binds to a specific site along a specific messenger (bottom center), using the same type of binding that assembles a DNA double helix; or a ribozyme, an RNA capable not only of recognizing a site but also of cleaving it (bottom right). In RNA, U takes the place of T.

Pri 'antigenskih oligonukleotidih' gre za nastanek trojne verige DNA preko Hoogsteenovih vezi. Mg in Zn-ioni stabilizirajo povezave, prav tako kationski peptidi.

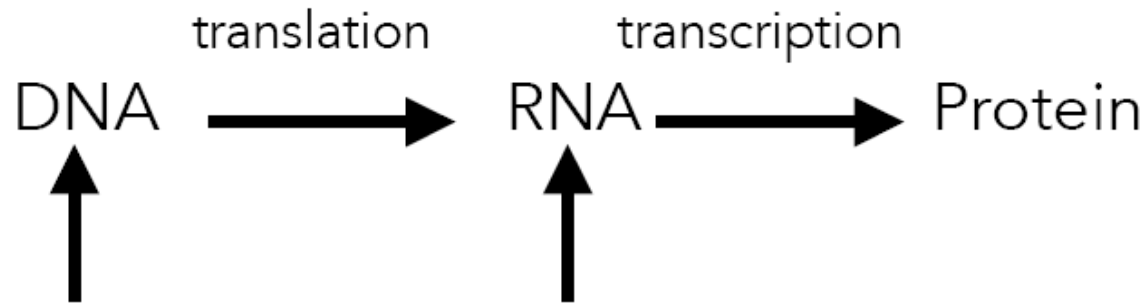
Oligonukleotidi, ki so usmerjeni na zaporedja DNA, tako da nastane atipična trojna vijačnica, so nizko specifični, zato tega pristopa v kliničnih testih niso uporabljali. Trojna vijačnica nastane zaradi interakcij med nabitimi skupinami - to zahteva daljše genske regije, bogate z A in G, zato je izbor tarčnih zaporedij omejen.



<http://www.labs.ibt.tamhsc.edu/potaman/potamantriplestrandeddna.php>

<http://www.uoguelph.ca/mbgwww/courses/4426/Mutagenesis1.html>

## Antisense strategies



### Antisense strategy

- DNA aptamers
- Triple helix forming oligonucleotides
- DNA aptamers

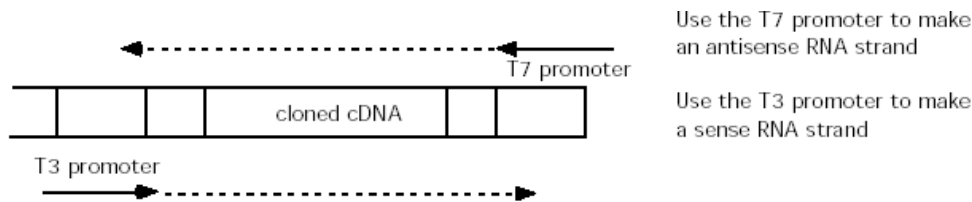
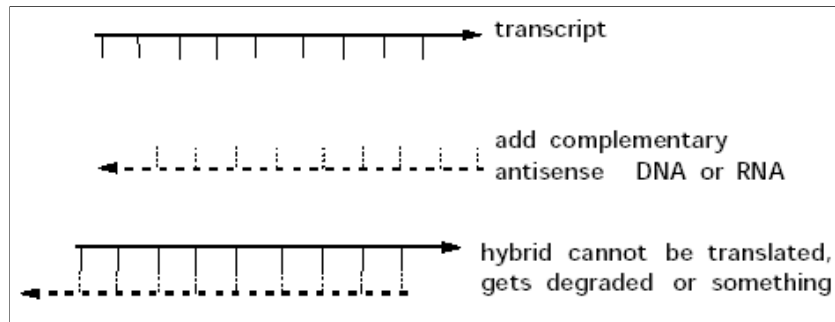
### Antimessage strategy

- Antisense oligonucleotides
- Ribozymes
- Peptide nucleic acids
- RNA aptamers

Source: Jain PharmaBiotech

# Protismerna terapija /1

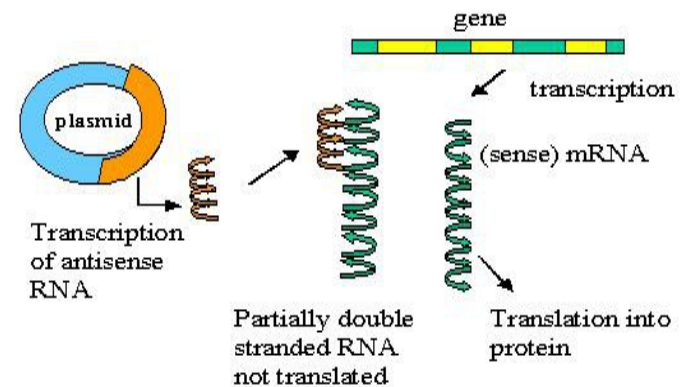
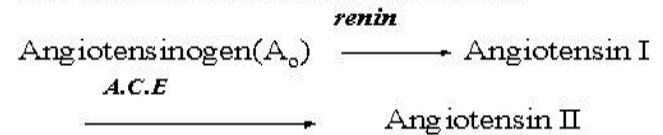
Protismerno RNA lahko pripravimo *in vivo* s pomočjo ekspresijskega vektorja, ki ima za promotorjem zaporedje cDNA v obrnjeni orientaciji.



Applications of Gene Therapy to nongenetic (or complex genetic) disorders- 1

## 1. Titration of Overactive Gene Product

Paradigm for hypertension in humans

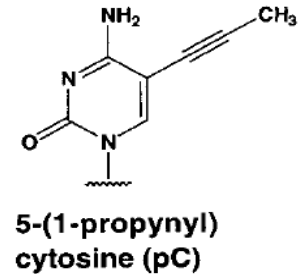
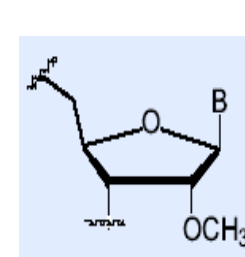
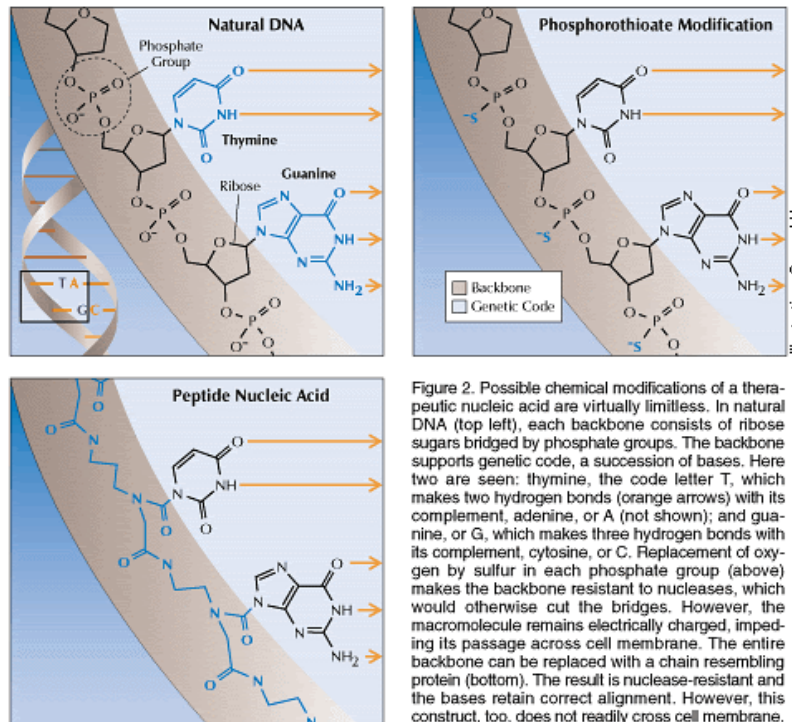


# Protismerna terapija /2

Protismerni oligonukleotid lahko tudi sintetiziramo. **Specifičnost** lahko dosežemo že pri dolžini ~20 nukleotidov, vendar pa vsako zaporedje ni dostopno zaradi sekundarnih struktur mRNA. Zato običajno pripravimo serijo oligonukleotidov in jih preizkusimo na celičnih linijah, ki proizvajajo tarčno mRNA. Izberemo samo tiste, ki zmanjšajo izražanje tarčnega proteina.

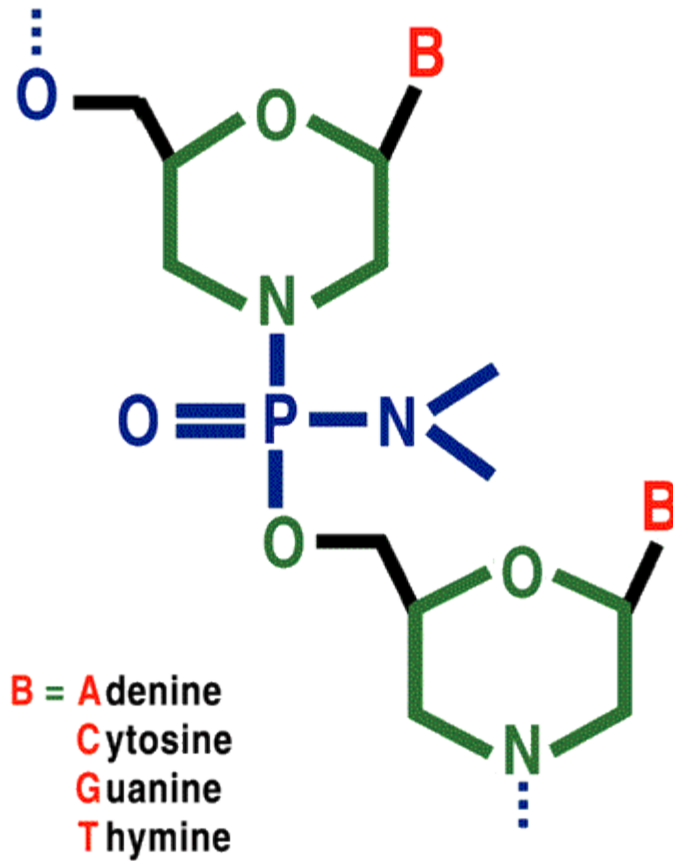
Preprečiti je treba tudi, da bi protismerni oligonukleotid razgradile izvencelične in celične **nukleaze**. To lahko dosežemo z modifikacijami pri sintezi. Fosfodiestrsko vez lahko nadomestimo s **fosforotioatno**. Pri uporabi fosforotioatov je prednost tudi ta, da hibridna molekula aktivira RNazo H, ki razgradi mRNA v hibridu.

Lahko pa tudi ribofosfatno ogrodje nadomestimo s strukturo, ki spominja na peptidno - **PNA** (peptidne nukleinske kisline), ali pa modificiramo **ribozo** (2'-O-metil-riboza) ali **citozin** (C-5 propinil-citozin).





## Morpholino Oligo



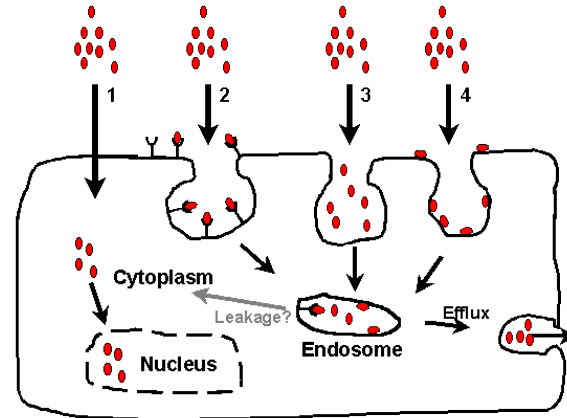
**morfolino – modifikacije oligonukleotidov za večjo stabilnost**

# Protismerna terapija /3

Proste protismerne oligonukleotide je težko spraviti v celico.

Možnosti je več:

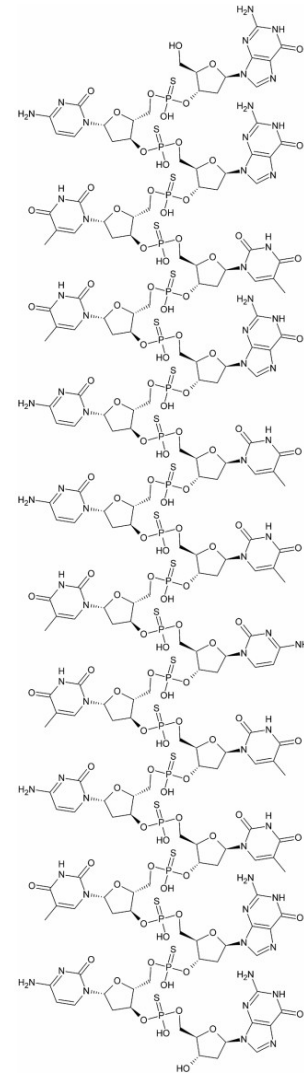
- pasivna difuzija,
- endocitoza s posredovanjem receptorja,
- pinocitoza in
- adsorpcijska endocitoza.



Jedro lokalizacijo so opazili le pri pasivnem prenosu v citoplazmo, v drugih primerih pa je prišlo pretežno do lizosomske razgradnje. Boljše rezultate so dosegli z uporabo DNA, vezane na kationske lipide ali z DNA v liposomih.

Mehanizem delovanja: po vezavi na tarčno mRNA se dupleks razgradi z RNazo H, dupleks pa se tudi ne more vključiti v ribosom, zato do prevajanja ne more priti.

V fazi razvoja je več zdravil, v ZDA pa je za uporabo dovoljeno le eno. **Fomivirsen** uporabljajo za zdravljenje retinitisa, ki ga povzroča CMV. Vbrizgajo ga intravitrealno. Gre za 21 nt dolg oligonukleotid s fosforotioatnim ogrodjem: 5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'.



# Aptameri

**Aptameri** so zaporedja DNA, ki so usmerjena na proteine in torej niso vezana na interakcije med specifičnimi baznimi pari. Aptameri imajo kratka konca z znanim zaporedjem, v sredini pa (~25 – 50 b ) del z naključnim zaporedjem. Takšno oligonukleotidno knjižnico inkubirajo s tarčnim proteinom. Izberejo le zaporedja, ki so se vezala in jih na koncu pomnožijo s PCR.

Aptameri obstajajo tudi na ravni peptidov; uporabljamo mutagenezo, prikaz na površini in več ciklov selekcije.

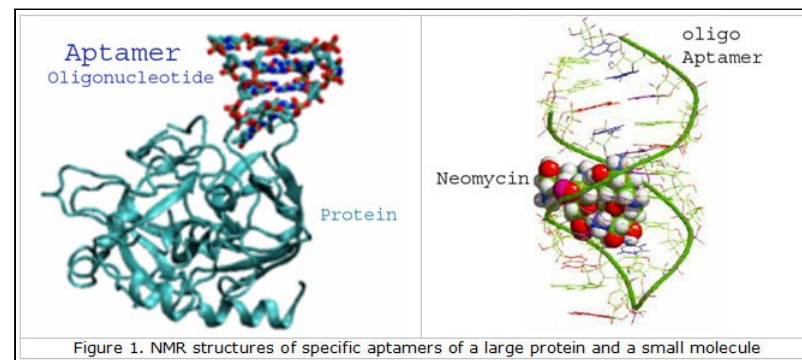
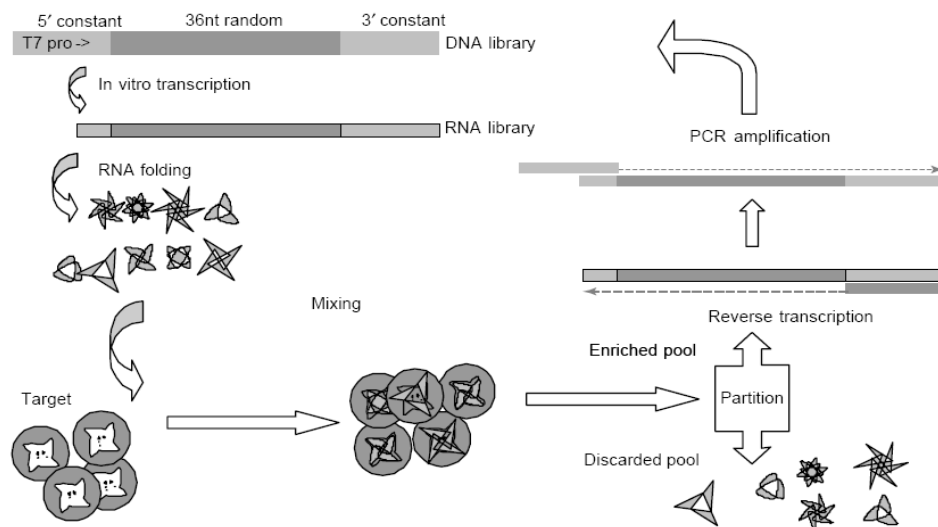
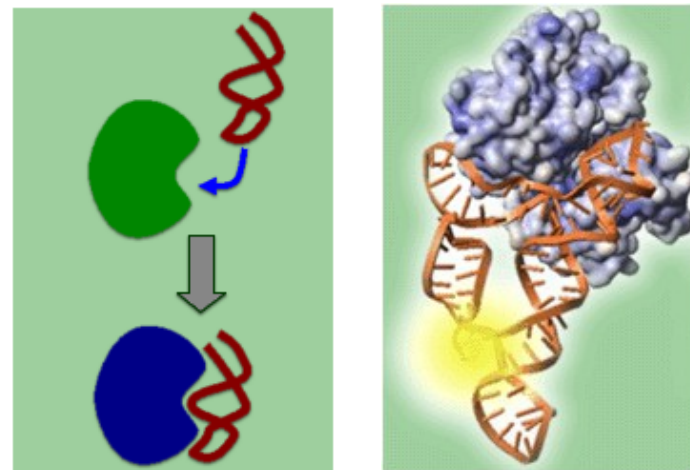


Figure 1. NMR structures of specific aptamers of a large protein and a small molecule

<http://www.genelink.com/newsite/products/aptamers.asp>

# Aptameri: SELEX

Postopek selekcije ima oznako SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).

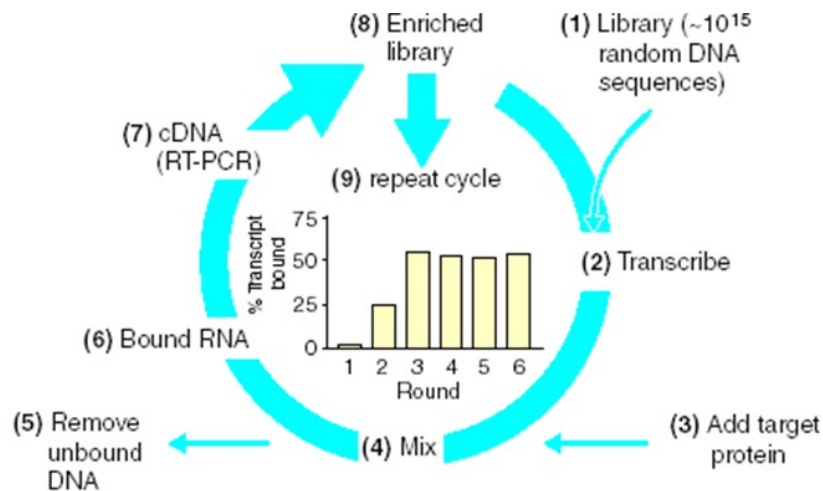


Figure 1B. Automated SELEX process using a standard Biomek 2000 workstation.

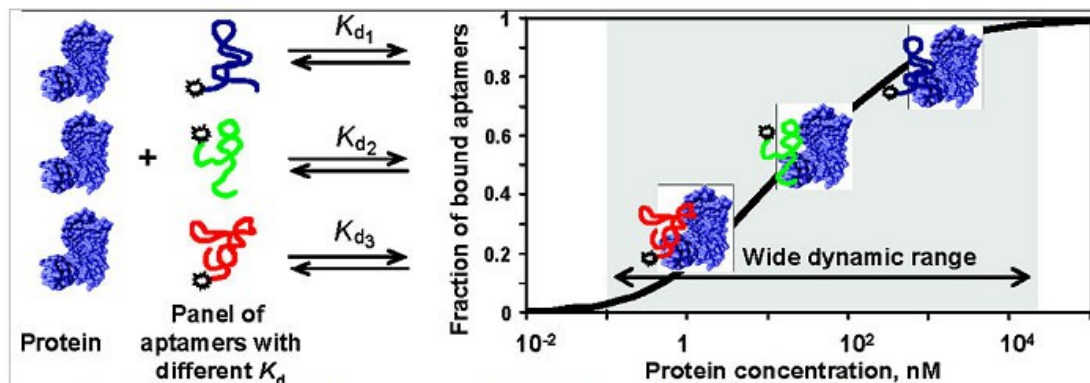
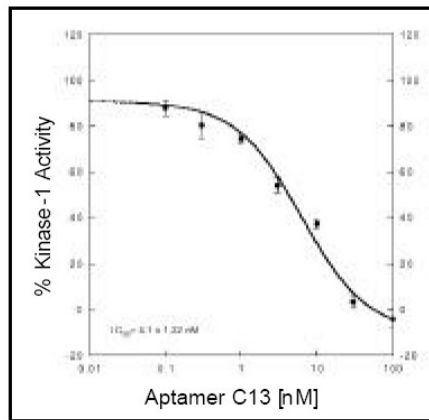


Figure 3. Three Aptamers to the same target with different  $K_d$ . Taken from: Smart Aptamers Facilitate Multi-Probe Affinity Analysis of Proteins with Ultra-Wide Dynamic Range of Measured Concentrations. Andrei P. Drabovich, Victor Okhonin, Maxim Berezovski, and Sergey N. Krylov. J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (23), 7260-7261

# Aptameri /2

tarčni protein	Kd(nM)
KGF	0.006
HIV-RT	0.025
TGF b1	0.030
L-selektin	0.039
VEGFr	0.07
ProV	0.09
ERK	0.2
CD4	0.5
angiogenin	0.65
C5	1
TGF-b2	1
sPLA2	2
interferon-g	2
L-selektin	3
elastaza	5
alfaVbeta3	8
proteaza Hep C	10
YOP	18
trombin	25
IgE	30



**Example of an aptamer that inhibits a kinase target with an IC<sub>50</sub> of ~4 nM**

*Primer:*

Liu et al. (2003) J. Mol. Recognit. 16, 23-27

tarča: goveji trombin

matrično zaporedje:

GCAATGGTACGGTACTTCC-N25-  
CAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA

---> 7 krogov selekcije

izbrani zaporedji (N25):

- UUUGGAAGAUAGCUGGAGAACUAACC
- AAGUGCGGGGGGAGGUGGUGGUUC

Kd=164-240 nM

ne prepoznavata člov. trombina

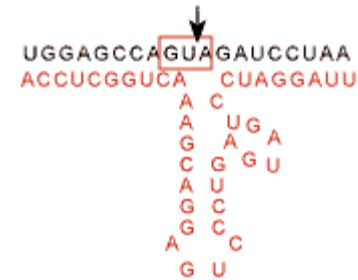
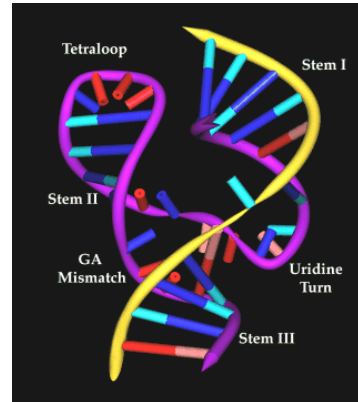
vežeta se na prepoznavno mesto za heparin

Zbirka podatkov o aptamerih vsebuje 3498 zaporedij iz 306 člankov (stanje 12/2005).

<http://aptamer.icmb.utexas.edu/index.html>

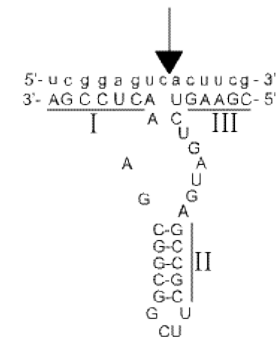
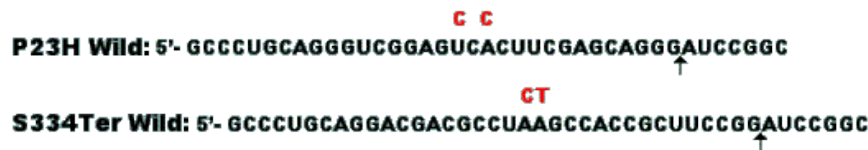
# Ribocimi

Ribocimi so katalitične molekule RNA z ločenima katalitičnim mestom in mestom vezave substrata. Zato lahko vezavno mesto prilagodimo tarčnemu zaporedju. Obstajata dva tipa: **lasnični** in ribocimi v obliki **kladiva**.



Sinteza večjih količin RNA je draga, po vnosu v celico pa se RNA hitro razgradi. Zato so razvili postopek, pri katerem se RNA sintetizira *in vivo* s pomočjo evkariontskega ekspresijskega vektorja.

Z ribocimi poskusno zdravijo npr. retinitis pigmentosa pri modelnih transgenskih podganah. Gen za opsin 2 je mutiran, zato se protein nepravilno zvije, z leti pa se akumulira in postane citotoksičen, kar povzroči odmiranje senzoričnih celic. Ribocime so pripravili tako, da se vežejo v bližini mutacij in cepijo mRNA, zato do translacije ne pride. Transgenske podgane sicer proizvajajo 44 % manj mutiranega proteina kot bi zdrave podgane proizvajale wt proteina. Če so transgenske podgane zdravili z ribocimi, se jim je raven izražanja zmanjšala na polovico.



P23H-Hh

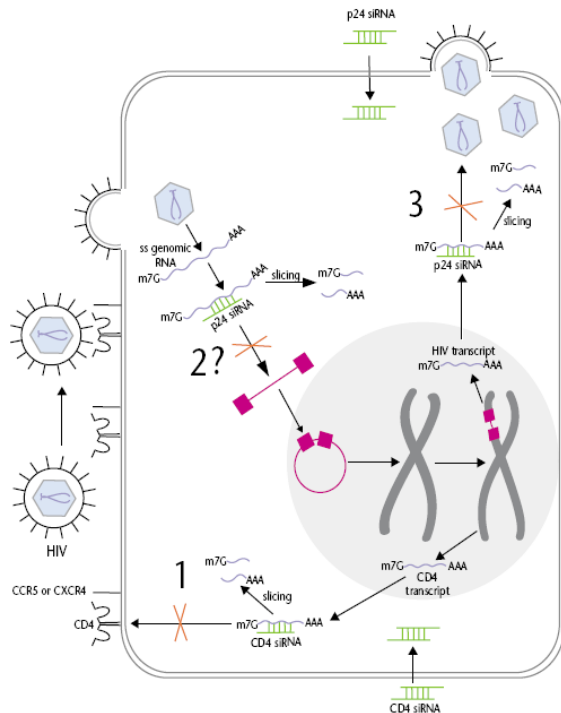
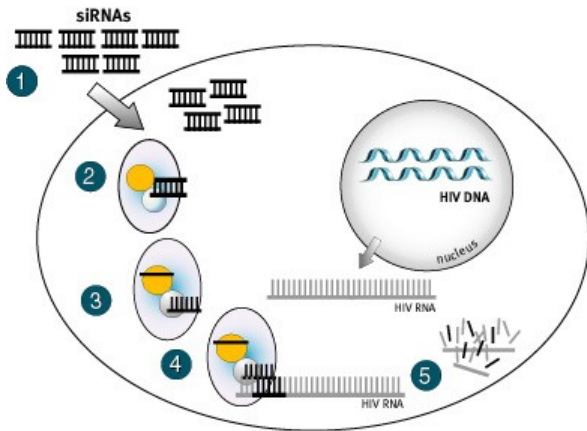
Poskusi so usmerjeni tudi na zdravljenje virusnih bolezni (AIDS; prehlad), raka in drugih bolezni z znanimi povzročitelji.

V naravi katalitičnih molekul DNA ne najdemo, vendar je bilo take molekule mogoče načrtno ustvariti. Sintetične katalitične oligonukleotide vnesemo v celice z liposomi.

# Zdravljenje z RNAi

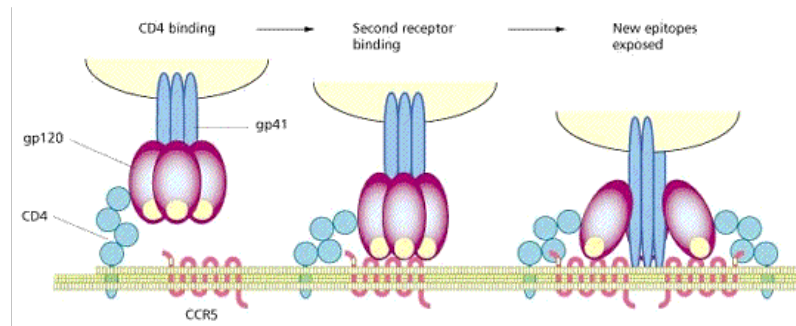
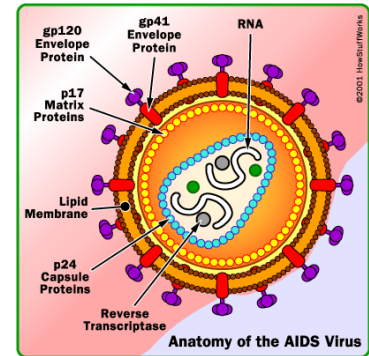
## Inhibicija HIV s pomočjo siRNA:

- 1.: v celico, okuženo s HIV, vnesemo siRNA proti *gag* (zapis za p24, protein sredice HIV)
- 2.: siRNA se vključijo v utiševalni kompleks RISC
3. in 4.: RISC razvije siRNA in razgradi tarčno zaporedje na transkriptu virusne RNA
- 5.: zaradi razgradnje RNA v območju zaporedja *gag* ne more nastati p24 in s tem novi HIV



Enak pristop so uporabili tudi s siRNA proti CD4.

Novina, C.D. et al.  
Nature Medicine 8, 681-686, 2002



# Zdravljenje z izvornimi celicami

S tem, ko so [1999] zaznali izvorne celice tudi v organih, v katerih so sprva menili, da jih ni (možgani, mišice), se je odprla možnost uporabe teh celic za zdravljenje. Celice je treba najprej identificirati / izolirati, namnožiti *in vitro* in nato ponovno vstaviti v okvarjeno tkivo. Podobne uspehe bi lahko dobili tudi z dediferenciranimi somatskimi celicami ali z embrionalnimi izvornimi celicami.

Možni pristopi k zdravljenju možganskih kapi z izvornimi celicami:

*A – izolirane izvorne celice iz možganov namnožimo in reimplantiramo*

*B – embrionalne izvorne celice alogenskih donorjev reprogramiramo in vnesemo*

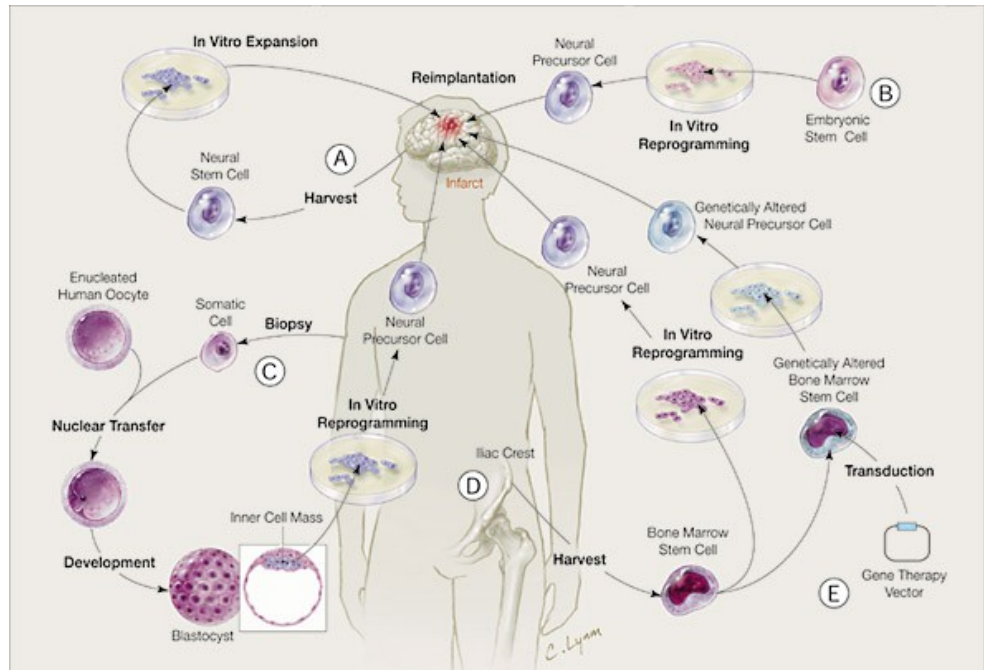
*C – v enukleirane jajčne celice vnesemo jedra iz somatskih celic pacienta, odvzamemo celice iz nastalih blastocist,*

*jih reprogramiramo v živčne izvorne celice in vnesemo v možgane*

*D – lastne izvorne celice kostnega mozga reprogramiramo in implantiramo*

*E – kombiniran pristop z gensko terapijo – pred implantacijo popravimo defekt, ki je morda bil vzrok za infarkt*

(JAMA, 285, 545-550, 2001)





# Genško zdravljenje

Genško zdravljenje je genetsko spreminjanje celic za doseganje terapevtskih učinkov.

Genetsko spreminjanje izvedemo lahko v gojenih celicah, ki jih nato vstavimo v pacienta (pristop *ex vivo*) ali pa celice spreminjamo *in vivo*.

Namen genetskega spreminjanja je, da v celico vnesemo funkcionalen gen, ki bo zagotavljal normalno raven proteina, ki ga gen kodira, in s tem popravimo delovanje okvarjenega ali manjkajočega proteina.

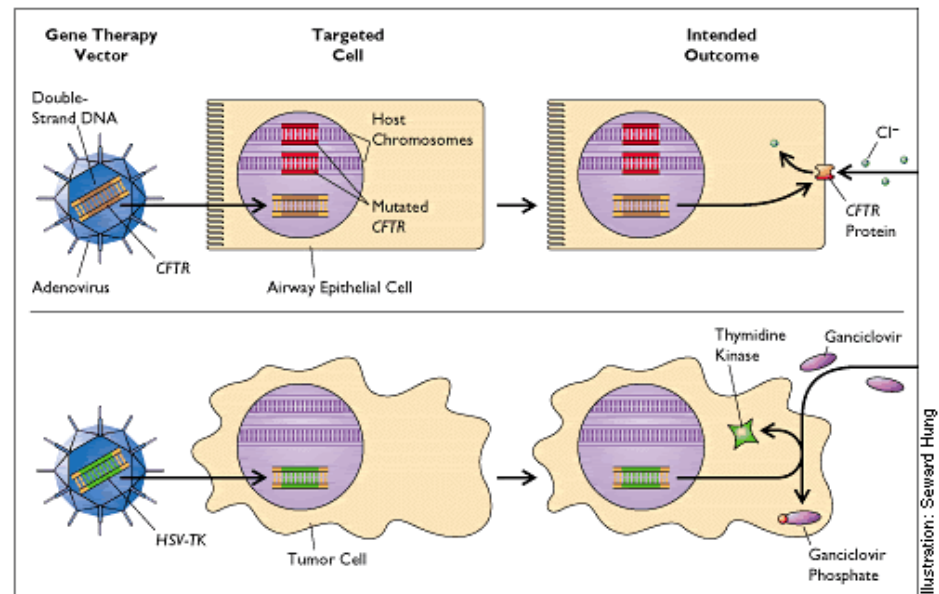
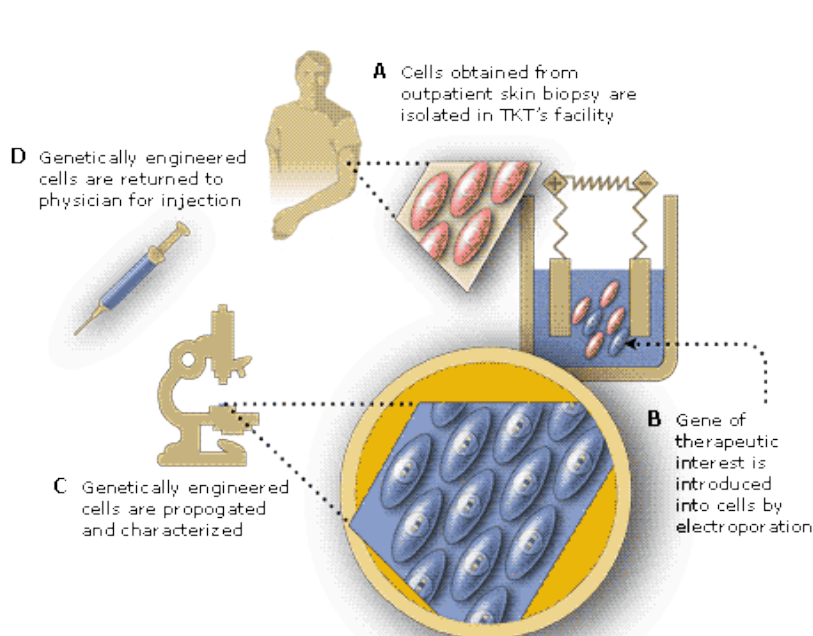


FIGURE 1. Varying purposes of gene therapy are illustrated by two forms of therapy now in clinical trials. In both instances, the therapeutic vector (an adenovirus) delivers a single gene. Against disorders such as cystic fibrosis (top), the intent is gene replacement. In the targeted epithelial cells, the delivered gene substitutes for the patient's defective gene—in this case, two mutated copies of *CFTR*—in restoring natural expression of a chloride channel. Against disorders such as cancer (bottom),

the intent may be to induce a novel cellular function. Hence no gene is replaced. Instead, a novel gene is introduced, in this case a herpes simplex gene coding for a viral thymidine kinase. When the gene is expressed, the tumor cell can convert the prodrug ganciclovir into its active form, facilitating the cell's "suicide." For simplicity, each cell's genome has been symbolized by dual chromosomes, each a double-stranded DNA whose helical twining has likewise been omitted.

# Gensko zdravljenje /2

Zdravimo lahko bolezni, ki jih povzroča okvara posameznih genov, ali pa pridobljene bolezni, kakršne so okvare srca ali rak. Tarčne celice so lahko somatske, lahko pa bile tudi klične (ti poskusi so dovoljeni samo na živalskih modelih).

Najtežja naloga je vnos genetskega materiala v celice. Vnos mora biti specifičen, učinkovit in varen. Najpogosteje kot vektorje za vnos uporabljamo spremenjene viruse, lahko pa tudi DNA v kompleksu s proteini ali lipidi.

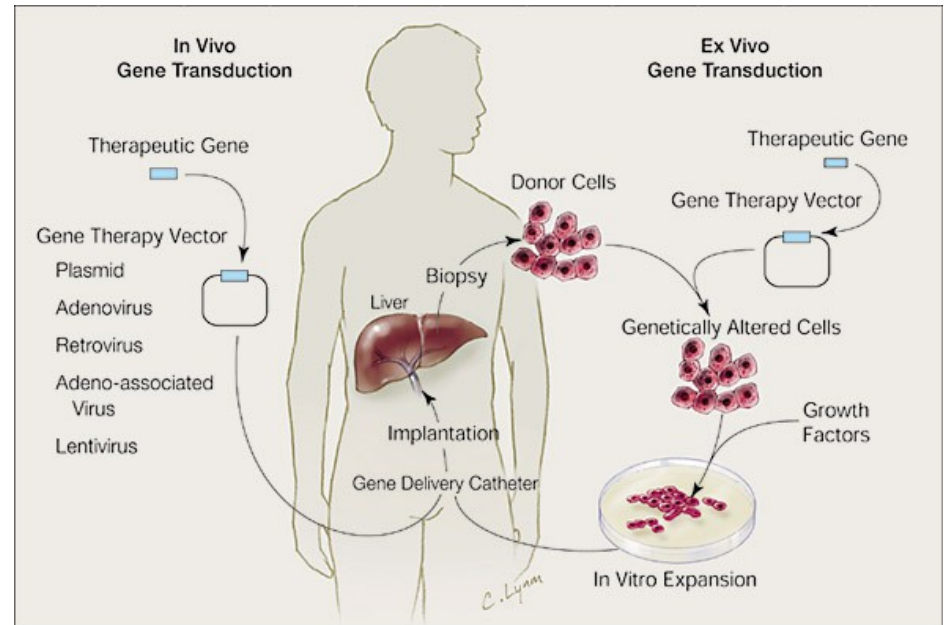
Prve poskuse so opravili 1989/90 *ex vivo*. Zaradi tehnične zahtevnosti in neprepričljivih uspehov so kasneje večinoma prešli na zdravljenje *in vivo*.

Cilji genskega zdravljenja z virusnimi vektorji:

- Stabilno, dolgotrajno izražanje gena, vgrajenega v kromosomsko DNA (npr. retrovirusi ali z adenovirusi povezani virusi (kot so parvovirusi) v odsotnosti pomožnega adenovirusa)
- Če ne vgrajujemo gena v kromosom, želimo doseči čim dolgotrajnejše izražanje gena s pomočjo adenovirusov, herpes-virusov ali plazmidov

Postopek:

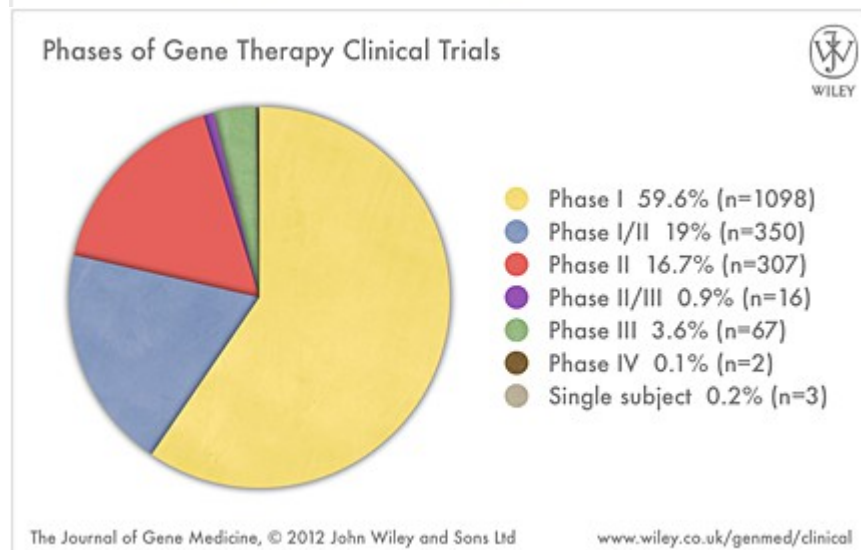
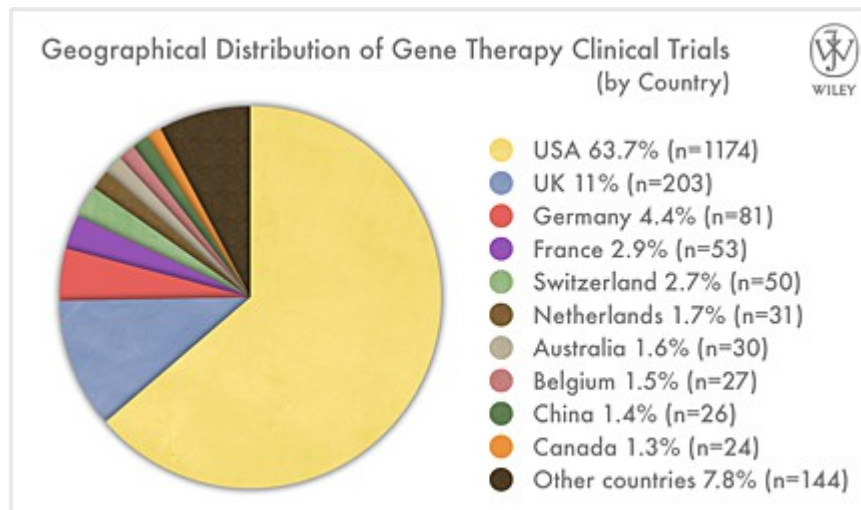
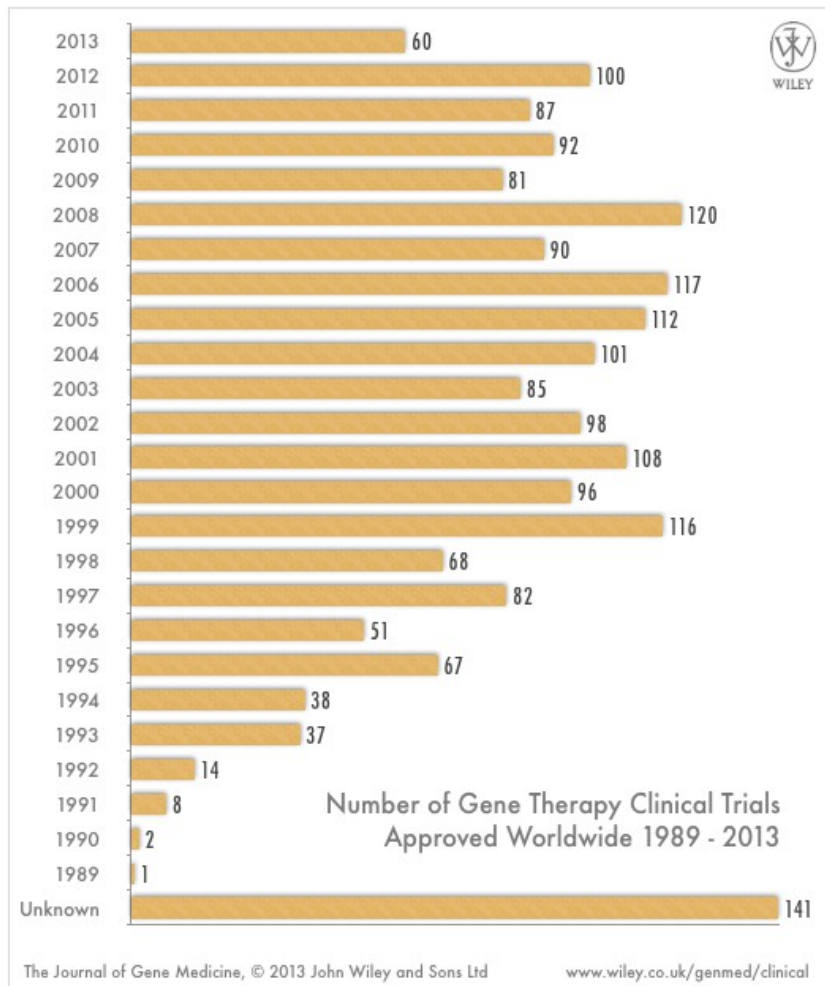
- Inficiranje gojenih človekovih celic (npr. mononuklearnih celic iz periferne krvi, izvornih celic kostnega mozga) in ponovno injiciranje v pacienta
- Injiciranje virusnih delcev v človeka (v žilo ali v tumorsko tkivo)



# Gensko zdravljenje: klinične študije

Statistika VI/2012:

doslej 1843 kliničnih študij v 31 državah;  
 65 % v Ameriki (2001: 81 %),  
 28 % v Evropi (2001: 17 %); UK > DE, FR, CH, NL



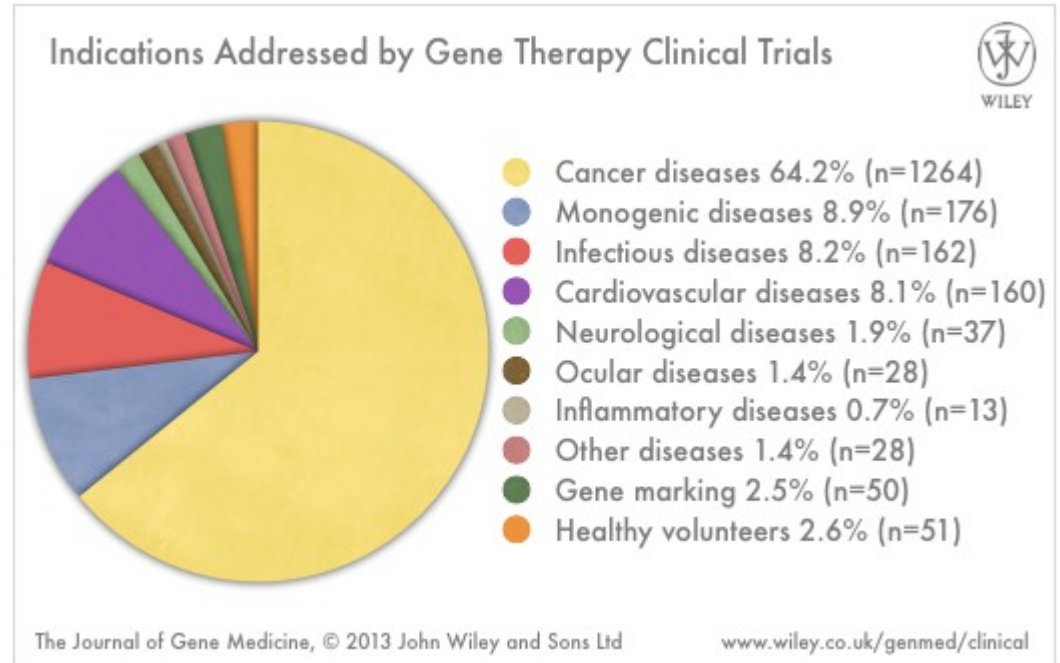
# Gensko zdravljenje: klinične študije /2

Cilji genskega zdravljenja:

- zdravljenje monogenih bolezni
- zdravljenje rakavih bolezni
- zdravljenje prenosljivih bolezni (npr. AIDS)
- zdravljenje drugih bolezni
- gensko označevanje  
(učinkovitost somatske transgeneze, usoda avtotransplantiranega kostnega mozga, nevarnost reimplantacije rakastih celic)

**Problemi:**

- usmerjen vnos v okvarjene celice
- regulacija ekspresije
- zavračanje

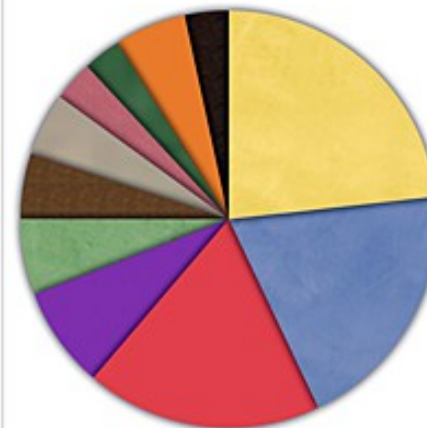


## Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials



- Antigen 20.5% (n=378)
- Cytokine 18.4% (n=340)
- Tumor suppressor 8.3% (n=153)
- Suicide 8.1% (n=149)
- Deficiency 8% (n=147)
- Growth factor 7.5% (n=139)
- Receptor 7.2% (n=132)
- Replication inhibitor 4.3% (n=79)
- Marker 2.9% (n=54)
- Other categories 11.9% (n=220)
- Unknown 2.8% (n=52)

## Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



- Adenovirus 23.3% (n=438)
- Retrovirus 19.7% (n=370)
- Naked/Plasmid DNA 18.3% (n=345)
- Vaccinia virus 7.9% (n=148)
- Lipofection 5.9% (n=111)
- Poxvirus 5% (n=95)
- Adeno-associated virus 4.9% (n=92)
- Herpes simplex virus 3.1% (n=59)
- Lentivirus 2.9% (n=55)
- Other categories 5.6% (n=105)
- Unknown 3.4% (n=64)

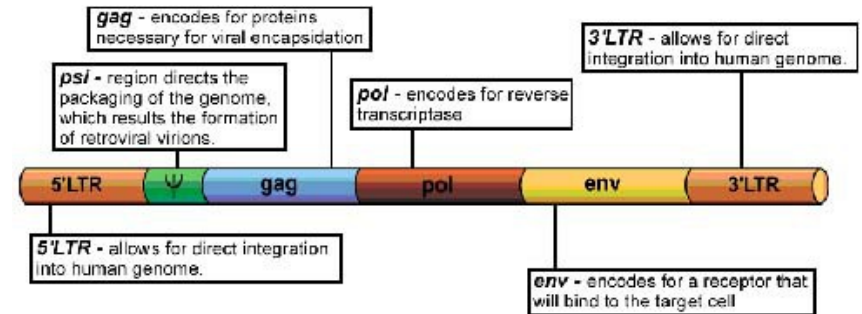
# Retrovirusni vektorji

Retrovirusne vektorje uporabljamo predvsem pri genskem zdravljenju *ex vivo*.

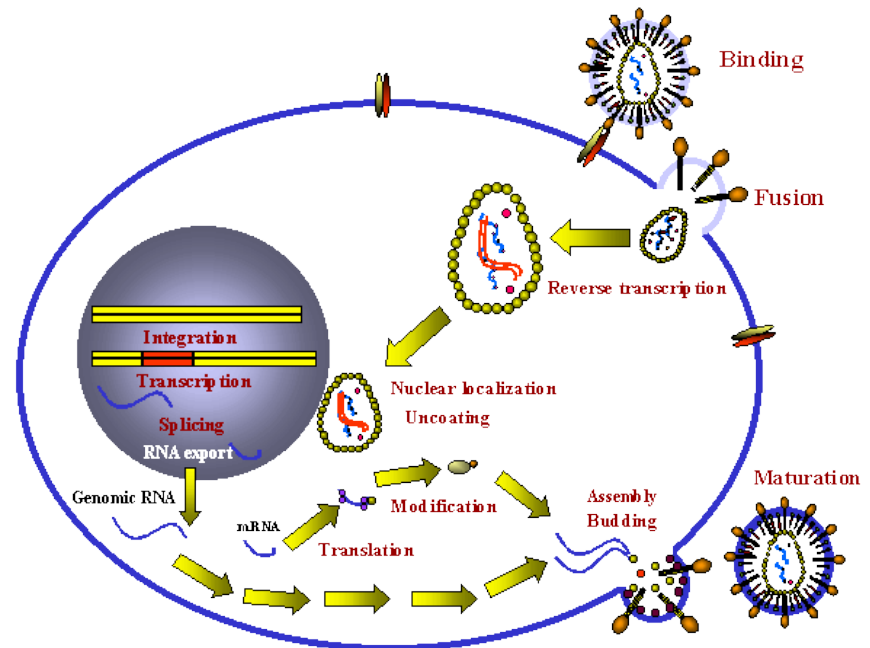
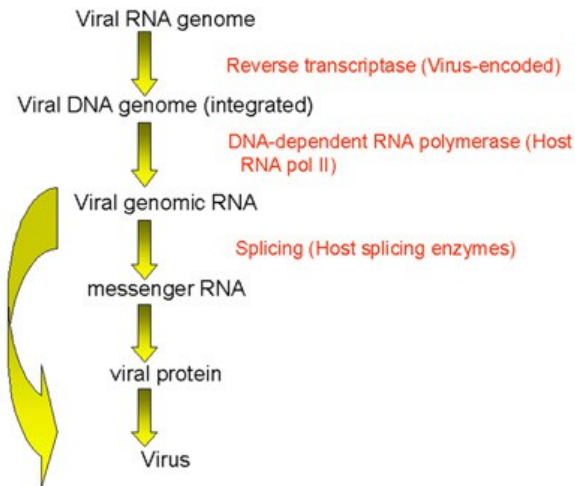
Stopnje pri zdravljenju so:

- odvzem celic iz pacienta
- vnos funkcionalnega gena v izolirane celice
- selekcija gensko spremenjenih celic in namnožitve
- vnos namnoženih celic v pacienta (transplantacija ali injiciranje)

Vektorji so izvedeni iz mišjih retrovirusov, ki pa imajo slabo lastnost, da lahko transformirajo normalne celice v rakaste. Zato so vektorji za uporabo v genski terapiji spremenjeni.

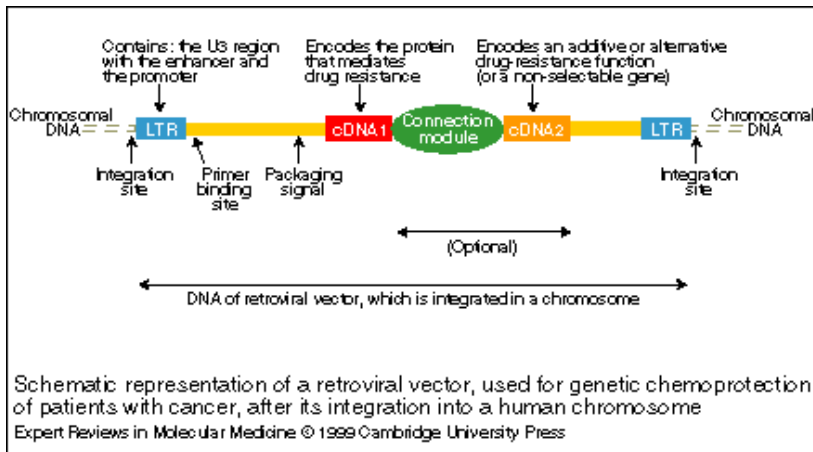


## RNA Tumor Viruses

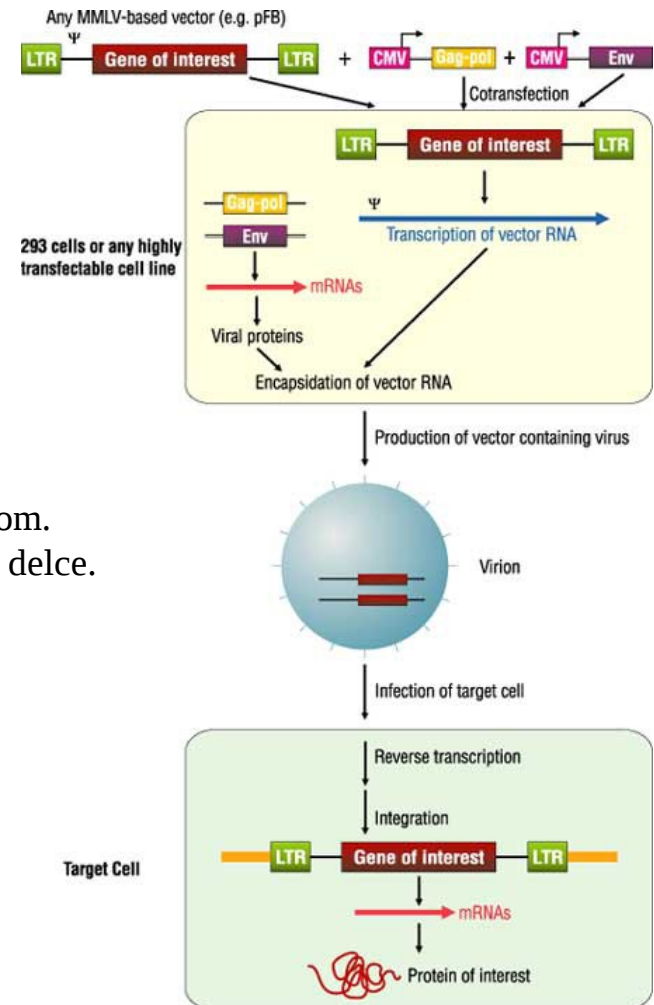


# Retrovirusni vektorji /2

Za vnos terapevtskega gena so najprej celotno zaporedje virusa prenesli v plazmid in izrezali večji del regije *gag* ter celotni regiji *pol* in *env*. Tik za *psi*<sup>+</sup> so vstavili terapevtski gen in markerski gen (običajno NeoR z lastnim promotorjem). Vektorji lahko sprejmejo do 8 kb tuje DNA.



Goli virusi precej neučinkovito vstopajo v celice in se integrirajo v genom. Postopek je bistveno bolj učinkovit, če virusno RNA pakirajo v virusne delce. To dosežemo s pomočjo posebnih (pakirnih) celičnih linij, ki imajo na kromosomu že vgrajeno regijo, sestavljeno iz 5'-LTR – *gag* – 3'-LTR (brez funkcionalnega *psi*<sup>+</sup>), drugje v genomu pa še regijo 5'-LTR – *pol* – *env* – 3'-LTR (brez *psi*<sup>+</sup>). Zaradi odsotnosti *psi*<sup>+</sup> nastajajo prazni virusni delci, če pa celice transficiramo z vektorsko DNA, se bo ta vgradila v genom, prepisovala v RNA in zaradi prisotne regije *psi*<sup>+</sup> bo prišlo do pakiranja v kapside. Zagotoviti je treba, da pakirne linije ne proizvajajo wt retrovirusov, ki bi lahko povzročili transformacijo celic.



# Gensko zdravljenje *ex vivo*

Retroviruse so uporabili v prvih poskusih genskega zdravljenja. Leta 1990 so tako zdravili pomanjkljivost adenzin-deaminaze (ADA), ki povzroča hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost (SCID) zaradi prezgodnjega odmiranja limfocitov T. Brez zdravljenja otroci umrejo v prvih 2 letih življenja, klasično zdravljenje pa zajema presaditev kostnega mozga in injiciranje aktivnega encima. Prvima dvema pacientkama so odvzeli limfocite in vanje vstavili cDNA za encim ADA. Celice so namnožili in jih s transfuzijo vnesli v pacientki 11x v obdobju 2 let. Po 4 letih so zaznali integriran vektor in povišano raven encima, zdravstveno stanje pa se je izboljšalo.

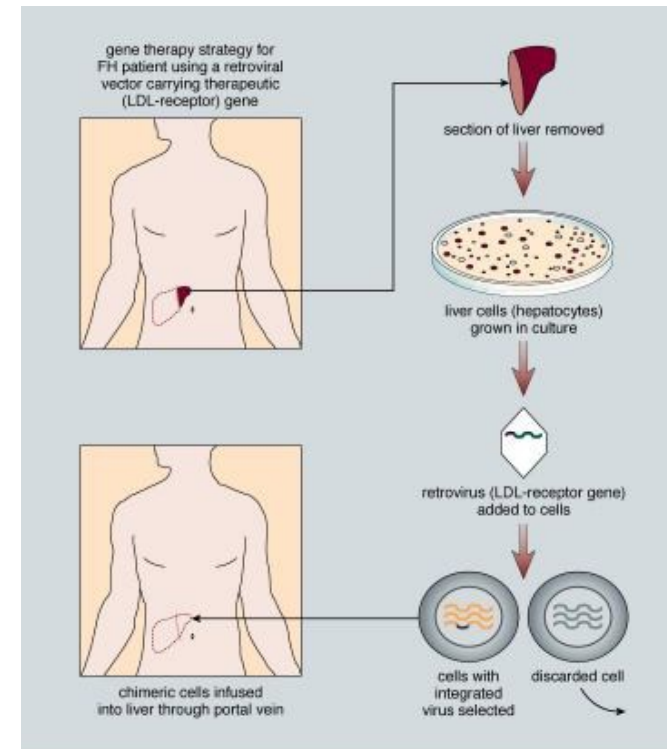
Pacientka ima v obtoku 20-25 % gensko spremenjenih celic in lahko normalno živi ob rednem genskem zdravljenju (Ashanti de Silva).

Prve poskuse zdravljenja SCID, ki ni več vključevalo doziranja aktivnega encima, so opravili šele leta 2000.

Podobno, a s še večjim uspehom so zdravili paciente s hiperholesterolemijo, ki jo povzroča odsotnost receptorja za lipoprotein nizke gostote (LDL) na površini jetrnih celic. Zato se maščobna telesa z LDL-holesterolom ne odstranjujejo iz krvi, kar vodi do hudih žilnih in srčnih bolezni.

Pacientom odstranijo del jeter (do 15 %), izolirajo hepatocite in jih transducirajo z retrovirusnim vektorjem, ki nosi zapis za LDL-receptor. V prvem poskusu takšnega zdravljenja so spremenjene jetrne celice ponovno vnesli v jetra pacienta, kjer so se vsidrale in proizvajale receptorje, lipidna slika pa se je izboljšala.

Če avtoložnih celic, ki bi jih lahko gensko spremenili, ni mogoče izolirati, bi lahko uporabili neavtoložne, vendar jih je treba po vsaditvi enkapsulirati v inertne polprepustne membrane, ki omogočajo prehajanje rekombinantnih proteinov v okolje, protitelesa pa ne morejo doseči tujih celic.





# Adenovirusni sistemi

Za gensko zdravljenje *in vivo* morajo vektorji učinkovito inficirati tarčne celice, zagotoviti prenos v jedro in izražanje terapevtskega gena, ki poteka stalno in v zadostnih ravneh za odpravo napake, ki jo zdravimo. Dobro je tudi, če lahko transficiramo celice, ki se ne delijo (retrovirusi se v genom takih celic ne morejo vključiti).

Pogosto zato uporabljamo adenoviruse, ki lahko inficirajo veliko različnih vrst celic, najlažje epitelne celice dihal, prebavil in očesa. Adenovirusi se prenašajo preko izločkov in povzročajo blažje bolezni (vnetja dihal, konjunktivitis, gastroenteritis pri otrocih).

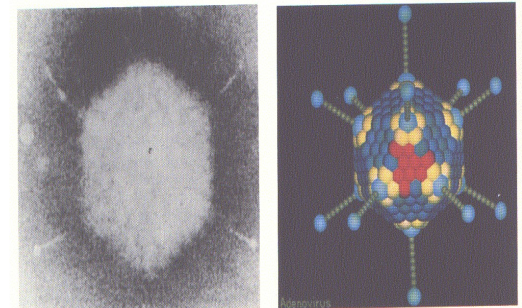
Za razmnoževanje virusov je bistvena prisotnost produkta adenovirusnega gena E1. Vektorje pripravimo v celični liniji, ki ima v genom vključen zapis za E1, transficiramo pa jo z nepopolnim adenovirusom + plazmidom, ki nosi terapevtski gen znotraj dela adenovirusnega zaporedja. V gostiteljski celici pride do rekombinacije med plazmidom in skrajšanim virusom, zaradi prisotnega gena E1 pa pride do nastajanja virusnih delcev. V adenovirus tako lahko vključimo do 7,5 kb tuje DNA.

Po vstopu v tarčno celico virus preide v jedro, kjer pa se ne integrira v genom, tako da je izražanje le prehodno in zdravljenje zahteva večkratno doziranje vektorja.

Rezultati poskusnih zdravljenj niso obetavni, saj je prišlo tudi do smrtnega primera v 1. fazi poskusov zdravljenja pomanjkljivosti ornitin-transkarbamilaze (septembra 1999) z vnosom velikega števila rekombinantnih virusov v jetrno arterijo.

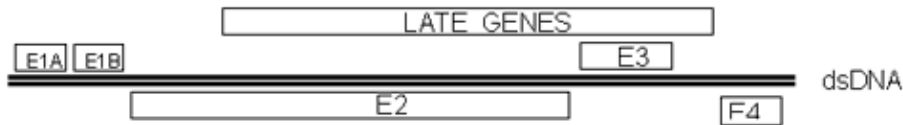
Težave so tudi s sicer nizkimi ravnmi izražanja virusnih antigenov, kar lahko povzroči neželen imunski odziv.

Adenovirusne vektorje izpopolnjujejo (2. in 3. generacija), da bi imeli manj imunski odziv.

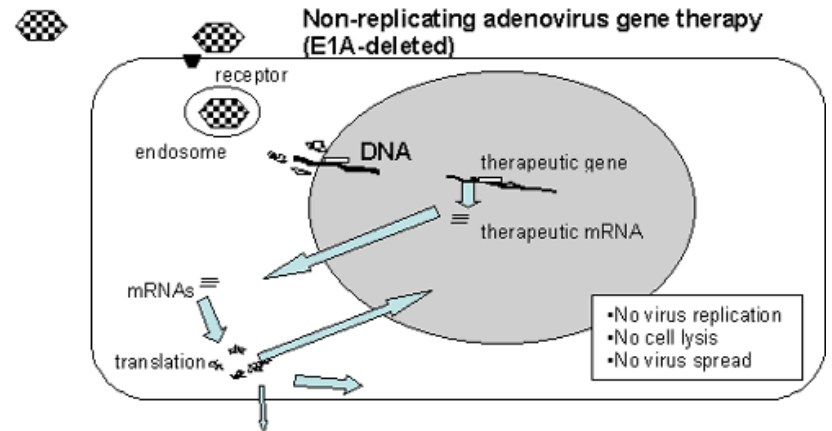
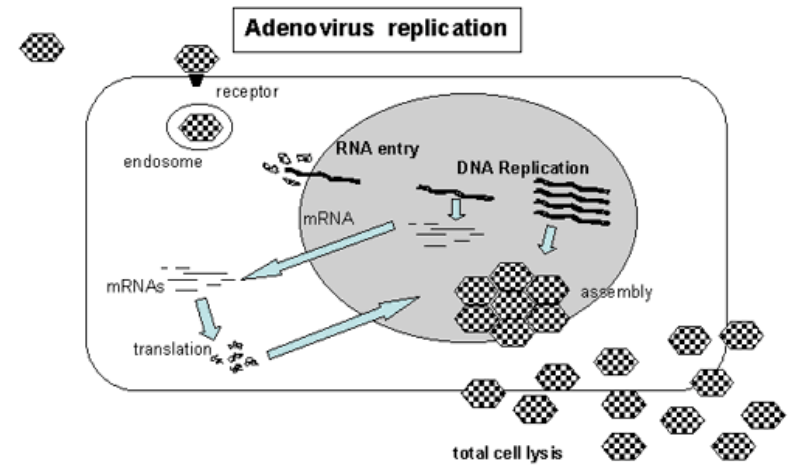
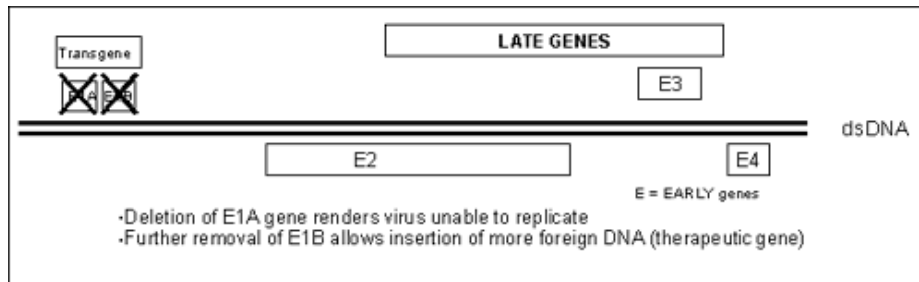
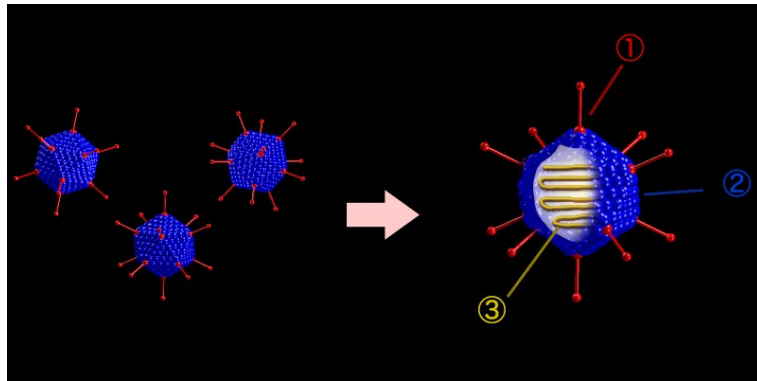


# Adenovirusi

36 kb, dsDNA, brez zunanje plašča



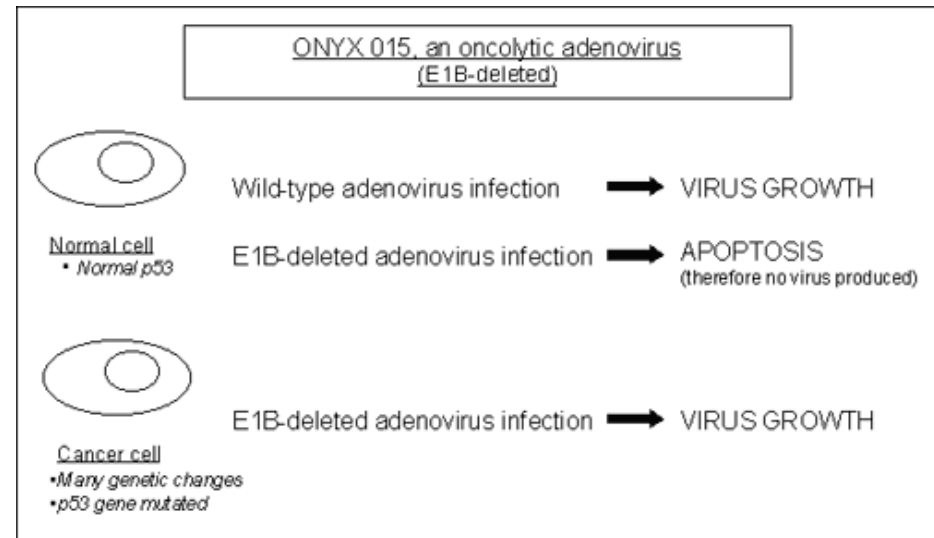
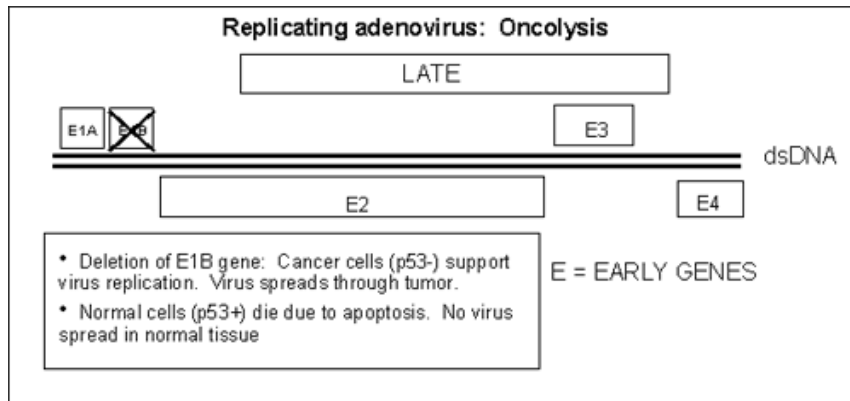
L = Late genes ⇒ Structural components (capsid proteins)  
 E = Early genes ⇒ Replication and Regulation



# Adenovirusi /2

## Pristopi k zdravljenju raka:

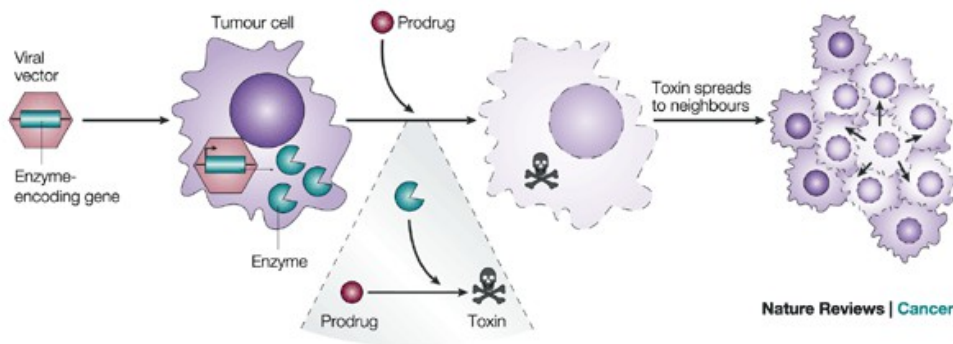
- Gensko zdravljenje z geni, ki zavirajo rast tumorjev (pri raku so geni okvarjeni; vstavimo funkcionalne kopije)
- terapija s samomorilskimi geni:
  - vnos gena za timidin-kinazo virusa herpes (vstavimo v adenovirus, vbrizgamo v tumor)
  - nato zdravljenje z ganciklovirom - celice, ki izražajo TK, odmrejo
- onkoliza: specifična okužba samo tumorskih celic, ne pa okoliškega tkiva.  
Normalne celice + normalni adenoV: celica sproži od p53-odvisno apoptozo, vendar adenovirusni protein E1B blokira p53 toliko časa, da se še lahko razvijejo virusni delci.  
Z delecijo E1B povzročimo, da v normalnih celicah pride do apoptoze, v tumorskih celicah, ki imajo okvaro v genu za p53, pa se virus razmnožuje, razgradi celico in okuži sosednje celice.



# Zdravljenje z aktivacijo prekurzorjev

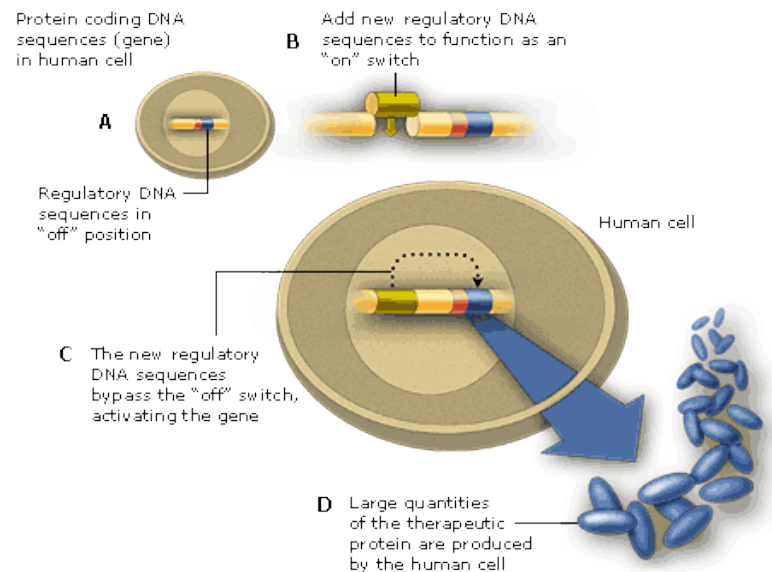
Pri rakastih obolenjih lahko dosežemo inaktivacijo tumorskih celic s kombinacijo zdravila ganciklovir in gena za timidin-kinazo virusa herpes simplex (HSVtk).

Tumorske celice transduciramo z genom HSVtk pod kontrolo močnega promotorja. Čez nekaj dni začnemo zdraviti z ganciklovirom. Kinaza bo fosforilirala ganciklovir do monofosfata, tega pa gostiteljske kinaze hitro pretvorijo do trifosfata, ki inhibira DNA-polimerazo in povzroči odmrtnje deleče se celice. Trifosfatna oblika lahko tudi prehaja v sosednje celice, ki jih gensko nismo uspeli modificirati.



Kombinirani pristopi so bolj učinkoviti kot sam vnos samomorilskega gena; npr. z gensko imunoterapijo, kjer pacientu vnesemo tudi gen za citokine, ki stimulirajo imunski odziv.

Aktivacijo nekaterih genov lahko povzročimo tudi z zamenjavo šibkega promotorja z močnejšim:



# Z adenovirusi povezani vektorji

AAV so mali (4,7 kb) nepatogeni ssDNA virusi, ki se integrirajo v specifično mesto na kromosomu 19. Za infektivnost rabijo proteine drugih virusov, kot npr. adenovirusov. Gostiteljske polimeraze v jedru sintetizirajo 2. verigo virusne DNA, nato pa pride do prepisovanja.

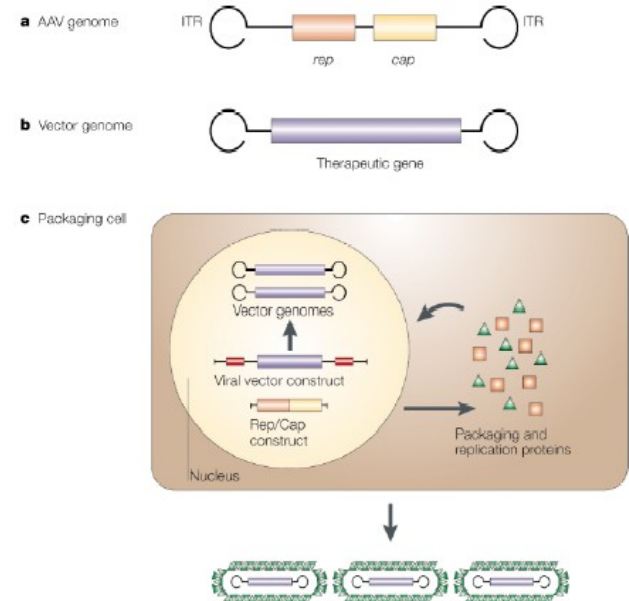
Rekombinantne vektorje pripravijo s kotransfekcijo celic z 2 plazmidoma in pomožnim (adeno)virusom.

Eden od plazmidov nosi terapevtski gen znotraj obrnjenih končnih ponovitev (125 bp), drugi pa gena *rep* in *cap*, ki zapisujeta za replikacijske in kapsidne proteine.

Po infekciji moramo ločiti AAV in pomožne adenoviruse (centrifugiranje, dializa).

Gen *rep* lahko deletiramo, kar povzroči neusmerjeno integracijo v genom, vendar se zato zmanjša nevarnost imunskega odgovora na virusni protein.

Večjo specifičnost infekcije s terapevtskim virusom dosežemo z uporabo vektorjev na osnovi herpes-virusa; npr. virus herpes simplex tip 1 inficira le nedeleče se živčne celice.



vector	advantages	disadvantages
retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• enters cells efficiently</li> <li>• viral genes absent</li> <li>• integrates stably</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hard to produce</li> <li>• limited insert size</li> <li>• random mutagenesis</li> </ul>
adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• enters cells efficiently</li> <li>• produces high expression of therapeutic gene</li> <li>• does not integrate into host chromosome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viral genes must be in vector</li> <li>• induces immune response</li> </ul>
adeno-associated virus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• integrates into chromosome at specific site</li> <li>• does not produce immune response</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• small insert size allowed</li> <li>• hard to produce</li> </ul>
herpesvirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produced at high levels</li> <li>• targets nondividing nerve cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hard to produce</li> <li>• viral gene required</li> </ul>

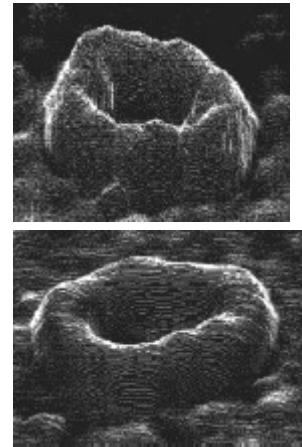
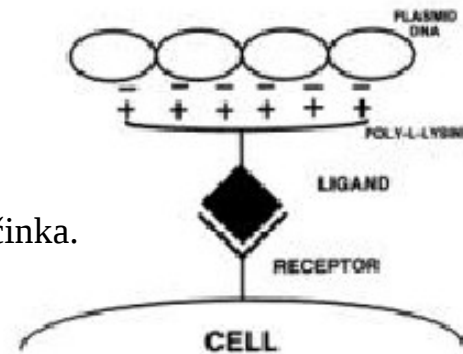
# Nevirusni sistemi vnosa genov

Virusni vektorji za vstop v tarčno celico potrebujejo ustrezen receptor. Tak način vnosa prepreči lizosomsko razgradnjo in omogoči prehod do jedra. Zaradi omejene kapacitete in uporabnosti ter zaradi možnosti indukcije vnetne reakcije so razvili več nevirusnih sistemov vnosa terapevtskih genov.

Najpreprostejši način je vnos gole plazmidne DNA, kar je neučinkovito in zato zahteva velike količine DNA. DNA je običajno fiksirana na delce zlata (1-3  $\mu\text{m}$ ), vnos pa je v tem primeru s pomočjo mikrobombardiranja.

Večjo učinkovitost dosežemo z uporabo liposomov, vendar po internalizaciji pogosto pride do lizosomske razgradnje DNA.

Konjugati z DNA so bolj učinkoviti, saj vstopajo kot endosomi in se izognejo lizosomom. Ligand za specifični celični receptor konjugiramo s poli-Lys, nato pa dodamo DNA, tako da nastane t. im. **toroid**, čvrsta struktura z ligandi na zunanji površini. Transfekcija je vseeno dokaj neučinkovita, čas izražanja pa pogosto prekratek, da bi prišlo do zdravnega učinka.



Optimalne lastnosti bi imel umetni kromosom.

Ta bi moral imeti centromer, telomere in regije *ori*.

Uspelo je že pripraviti mikrokromosome dolžine 6-10 Mb.

