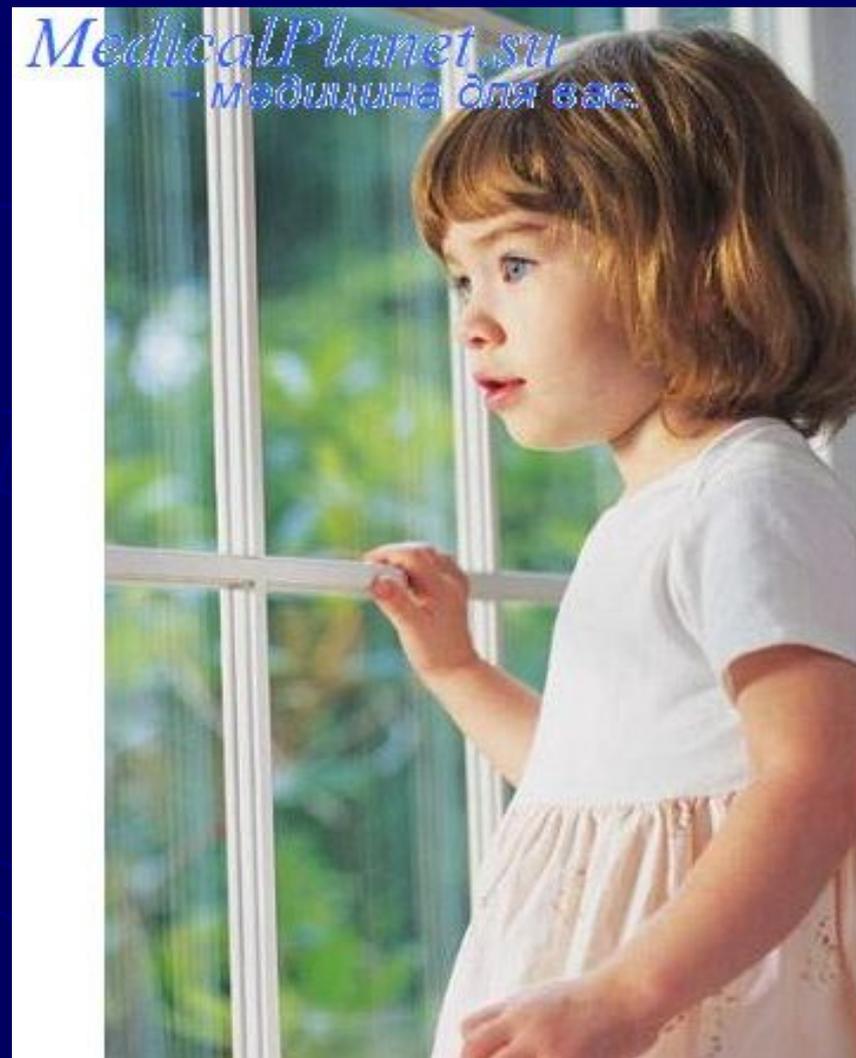


# ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

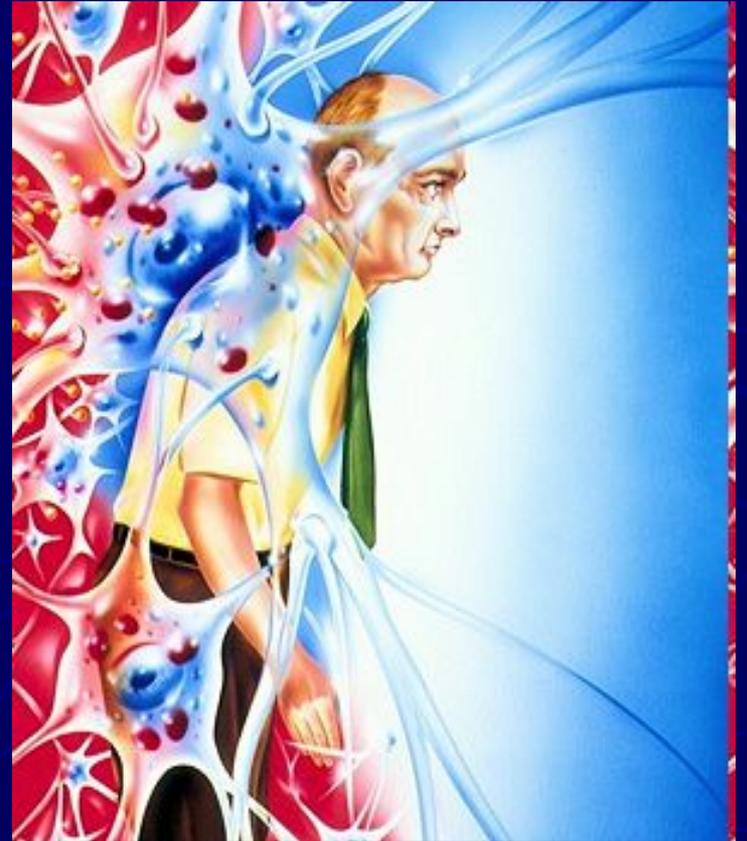


- ▶ Основной принцип - индивидуализированное лечение (лечить не болезнь, а болезнь у конкретного человека).
- ▶ Этот принцип особенно важен, поскольку наследственные болезни обладают гетерогенностью и с одной и той же клинической картиной могут протекать разные наследственные заболевания с разным патогенезом



# Методы лечения

- ▶ 1. Симптоматическое
- ▶ 2. Хирургическое
- ▶ 3. Патогенетическое
- ▶ 4. Этиологическое



# Симптоматическое лечение

- ▶ Лекарственная симптоматическая терапия - наиболее часто используемый метод. Например, симптоматическая терапия миопатии включает в себя - витамины С, В, антихолинэстеразные препараты, АТФ, аминокислоты, анаболические гормоны и другие средства, способствующие улучшению метаболизма в мышцах. Успехи этого раздела терапии связаны с прогрессом фармакологии, обеспечивающим все более широкий выбор лекарств. Вместе с тем расшифровка патогенеза каждой болезни позволяет понять причину возникновения симптома, а на этой основе становится возможной более тонкая лекарственная коррекция.

# Симптоматическое лечение

- ▶ Многие физические методы лечения (климатотерапия, бальнеолечение, разные виды электротерапии, теплолечение) применяются при наследственных болезнях нервной системы, обмена веществ, заболеваниях скелета.
- ▶ У больных после курсов такой терапии улучшается самочувствие, увеличивается продолжительность жизни. Практически при всех наследственных болезнях показано физиотерапевтическое лечение. Например, лекарственная терапия муковисцидоза постоянно дополняется многообразными физиотерапевтическими процедурами (ингаляции, массаж и другие). К симптоматическому можно отнести рентгенорадиологическое лечение при наследственно обусловленных опухолях. Симптоматическое лечение (особенно лекарственное и диетическое) широко применяется и будет использоваться в будущем наряду с самым совершенным патогенетическим и этиотропным лечением наследственных болезней.

# Хирургическое лечение

- ▶ Выделяют три формы хирургической помощи:
- ▶ удаление,
- ▶ коррекция,
- ▶ Трансплантация

Особое значение имеет реконструктивная хирургия, которая применяется при незаращении губы и нёба, атрезии ЖКТ, коррекции костно-мышечной системы

# Патогенетическое лечение

▶ - это лечение по принципу вмешательства в патогенез болезни.

При этом исходят из того, что у больных либо образуется аномальный белок, либо белка образуется недостаточно. За этими событиями следуют изменения цепи превращения субстрата или его продукта. Знание этих принципов позволяет разрабатывать схемы лечения.

## ▶ Примеры патогенетического лечения

### Коррекция на уровне субстрата

При фенилкетонурии диета, ограничивающая содержание фенилаланина в пище позволяет избежать тяжелых поражений нервной системы

### Коррекция на уровне фермента

-поставка в организм недостающих ферментов или введение кофактора (кобаламин, биотин, пиридоксин, аскорбат) или модификация активности фермента (например, введение даназола в течение 30-дневной существенно повышает уровень  $\alpha$ 1-антитрипсина, что предупреждает развитие легочных осложнений

### Коррекция на уровне продукта гена

Для многих болезней установлена патогенетическая значимость отсутствия некоторых веществ в развитии болезни (инсулин, гормоны роста, антигемофильный глобулин и др.). Возмещение недостающего продукта приводит к коррекции обмена

# Пример

Увеличение внеклеточного белка

- ▶ недостаточность альфа-1 антитрипсина

Может  
корректироваться  
ингаляциями  
альфа-1 антитрипсина



# ПРИМЕРЫ

## терапия малыми молекулами

### Куркумин в лечении муковисцидоза

При назначении куркумина мышам - гомозиготам по мутации  $\Delta F508$ , происходило торможение кальциевого насоса в ЭПС, что приводило к нормализации у них транспорта хлоридов в назальном и кишечном эпителии



# Терапия малыми молекулами, приводящая к пропуску мутантных стоп-кодонов

Антибиотики  
способствуют пропуску  
стоп-кодона и  
продолжению синтеза  
белка CFTR с почти  
нормальными  
свойствами



# Этиологическое лечение воздействие непосредственно на причину заболевания



Идеальным случаем было бы убрать больной ген или его больную часть и заменить его, или эту часть, здоровым. Это называется генетической коррекцией (correction).

Но пока осуществляется не нацеленное введение генов. Больной ген продолжает существовать, но вводят дополнительный здоровый ген, который увеличивает количество недостающего клетке или организму продукта. Этот способ называют **пополняющей (augmentative) генной терапией** .

## Генная терапия

- ▶ Используют два основных подхода, различающиеся природой клеток- мишеней:
- ▶ - фетальную генотерапию , при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению), и
- ▶ - соматическую генотерапию , при которой генетический материал вводят только в соматические клетки и он не передается половым клеткам.

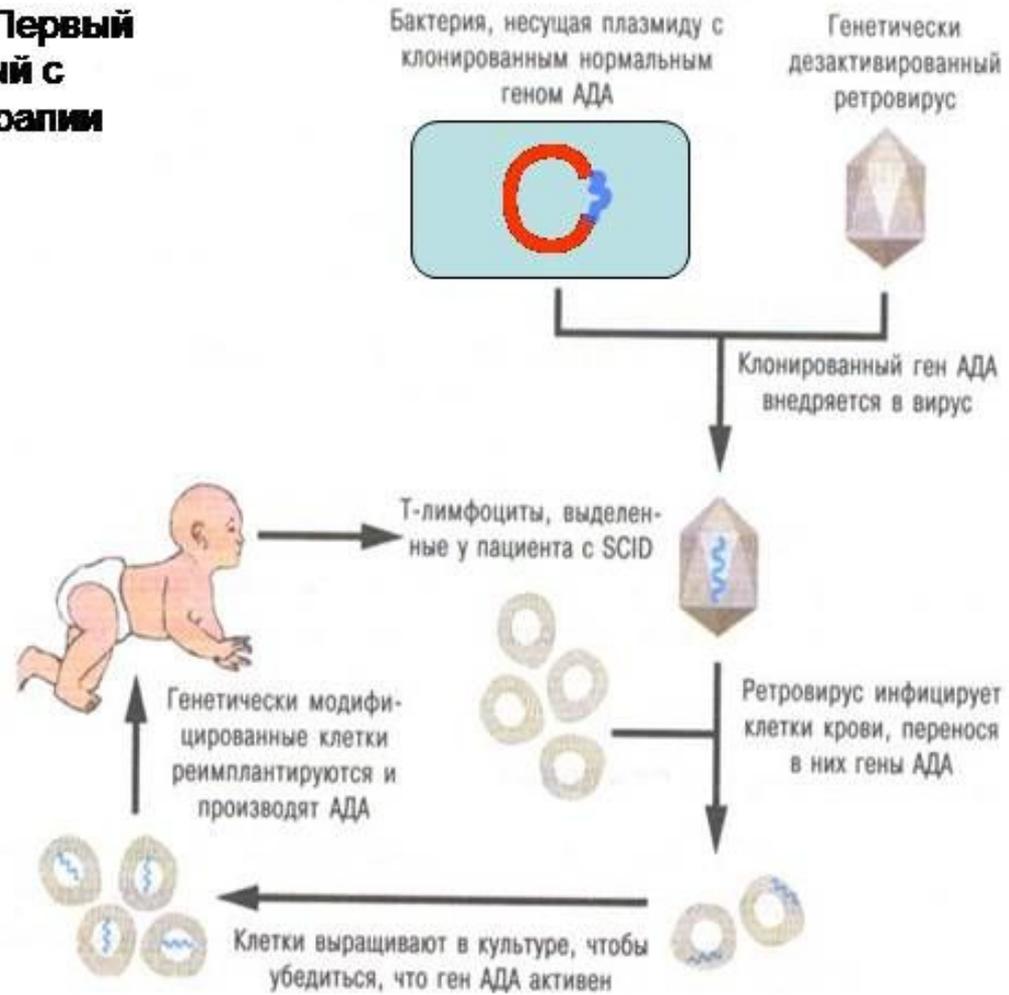
# Есть и третий подход

- ▶ - активация собственных генов организма с целью полного или частичного преодоления действия мутантного гена.
- ▶ Яркий пример такого подхода - использование гидроксимочевины (уменьшает метилирование ДНК) для активации синтеза фетального гемоглобина F у больных с серповидноклеточной анемией и талассемиями.

# Историческая справка

- ▶ Первым моногенным наследственным заболеванием, к которому применили методы генной терапии, стал наследственный иммунодефицит, обусловленный мутацией в гене фермента аденозиндезаминазы. 14-го сентября 1990 года в Бетесде (США) четырёхлетней девочке, страдающей этой достаточно редкой патологией (1:100000) пересадили её собственные лимфоциты, которые предварительно трансформировали *in vitro* геном АДА (ген АДА + ген neo + ретровирусный вектор). Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедуру повторяли с интервалом в 3-5 месяцев. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций.

**Ашани Де-Сильва. Первый человек, вылеченный с помощью генной терапии**



**Схема генной терапии тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), вызванного дефектом гена аденозиндезаминазы (АДА)**

# Генная терапия СПИДа

- ▶ **Мутация гена *CCR5***, встречающаяся примерно у трех процентов европейцев, делает их невосприимчивым ко всем известным штаммам ВИЧ. Эта мутация затрагивает структуру кодируемого *CCR5* белка-рецептора, с помощью которого вирус связывается с иммунными клетками организма-хозяина.
- ▶ Тимоти Рей Браун, которого также называют «берлинским пациентом», улучшил свое состояние благодаря двум пересадкам клеток костного мозга от донора, имевшего врожденную невосприимчивость к ВИЧ (мутация в гене *CCR5*). Это случилось в 2007-2008 годах. Полагается, что клетки с генной мутацией заселили иммунную систему Тимоти и позволили ему перестать принимать лекарства. Впрочем, то, что «берлинский пациент» живет без антиретровирусной терапии и не испытывает проблем со здоровьем, не значит, что ВИЧ-инфекция была полностью побеждена. Не исключено, что вирус затаился и лишь значительно снизил активность.
- ▶ Пациент из города Трентон (США, штат Нью-Джерси) также смог перестать принимать лекарства, однако для этого ему не пришлось проходить через сложную и рискованную операцию (летальность при трансплантации костного мозга — 30%). Вместо этого ученые поработали с его собственными генами. Пациент из города Трентон (США, штат Нью-Джерси) также смог перестать принимать лекарства, однако для этого ему не пришлось проходить через сложную и рискованную операцию (летальность при трансплантации костного мозга — 30%). Вместо этого ученые поработали с его собственными генами: на лейкоциты пациента воздействовали по специальной технологии, благодаря которой они стали производить протеин, разрушающий ген *CCR5* (мутация этого гена делает людей невосприимчивыми к ВИЧ). Эксперимент оказался удачным, и инфицированный человек смог обходиться без терапии. Но не все однозначно. Подобная манипуляция с генами еще пятерых людей не привела к ожидаемому результату. Возможно, предполагают эксперты, каждый второй ген *CCR5* пациента из Трентона мог иметь унаследованную мутацию, что упростило задачу.

# Введение генов

## Вирусные векторы

### РЕТРОВИРУС:

- ▶ клетки-мишени: Фибробласты , Эндотелиальные клетки , Миобласты , Гладкомышечные клетки , Гепатоциты , Гематопоэтические клетки , Стволовые клетки
- ▶ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Непатогенен, Интегрирует в геном, Относительно простое манипулирование, Биология хорошо изучена
- ▶ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Относительно низкие вирусные титры, Ограниченная емкость для внедрения трансгена ((10 кб), Не инфицирует неделящиеся клетки, Экспрессия трансгена м.б. непродолжительной
- ▶ Не очень хорош для in vivo терапии

# АДЕНОВИРУС

- ▶ клетки-мишени: Гепатоциты , Эпителий верхних дыхательных путей , Лимфоидные , гематопозитические и миелоидные клетки
- ▶ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Доступны непатогенные дефектные мутанты, Человек - природный хозяин, Высокие титры, Высокая эффективность при *in vivo* инфекции, Инфицирует как делящиеся так и неделящиеся клетки, неинфицируемые ретровирусами, Биология хорошо изучена, Существуют паковочные клеточные линии
- ▶ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Не интегрирует в геном, Конструкция вектора более сложна, чем у ретровирусов, Может рекомбинировать с природными аденовирусами.

# АДЕНО-АССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС

- ▶ клетки-мишени: Гематопоэтические клетки , Фибробласты , эпителиальные клетки
- ▶ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Непатогенен, нецитотоксичен, Человек - природный хозяин, Предпочтительный сайт интеграции на хромосоме 19,
- ▶ Способен устанавливать латентное состояние, Относительно простое конструирование вектора.
- ▶ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Относительно низкие титры, Малая емкость (4кб), Инфекционность относительно низка, Требуется аденовирус в качестве помощника для инфекции, Биология не очень хорошо изучена.

# ГЕРПЕС ВИРУС (HSV)

- ▶ клетки-мишени: Неделющиеся клетки , дифференцированные нейроны , Дифференцированные гепатоциты
- ▶ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Доступны мутанты дефектные по репликации, доступны пакующие системы, Высокие титры, Широкий спектр клеток-хозяев, Высокая эффективность инфекции, Инфицирует клетки, неинфицируемые ретровирусами,
- ▶ Биология хорошо изучена, Высокая емкость - до 30кб.
- ▶ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:
- ▶ Упаковка происходит с низкой эффективностью, Репликационно-дефектные мутанты цитотоксичны,
- ▶ С вирусным геномом трудно создавать векторные конструкции, Сложная регуляция.

# Невирусные векторы

- ▶ катионные липидсвязанные комплексы с ДНК в составе липосом
- ▶ полимеры

В этом случае ДНК вводят в комплекс с поликатионом (например, полилизин), лигандом для связывания с клеткой и эндоцитоза (таким лигандом может быть, например, трансферрин или антитело, специфичное к какому-либо поверхностному белку клетки) и специальным агентом, облегчающим высвобождение ДНК из этого комплекса и эндосом в цитоплазме. Такие агенты называют эндосомолитическим . Ими могут служить репликационно-дефектные аденовирусные частицы, включаемые в комплекс

- ▶ искусственные хромосомы
- ▶ Физические методы (микроинъекция, электропорация, лазерная микроинъекция)
- ▶ Слияние клеток (микроклеток)

# Клетки-мишени

## Гематопоэтические стволовые клетки

Одной из наиболее реальных мишеней для генной терапии являются гематопоэтические стволовые клетки, т.е. клетки-предшественники зрелых клеток крови. Трансплантации костного мозга широко применяются в медицине, а костный мозг и есть одно из мест, где эти стволовые клетки существуют.

### ▶ Лимфоциты

В лимфоциты больной с недостаточностью аденозиндезаминазы был введен ген АДА. Модифицированные лимфоциты были возвращены в кровоток. В результате было восстановлено функционирование иммунной системы ребенка.

# Клетки печени

- ▶ Эксперименты по генной терапии наследственной гиперхолестеролэмии демонстрируют возможность использования гепатоцитов, в качестве мишеней для *ex vivo* геной терапии. Найдена модель, которая позволяет избежать низкой эффективности введения генов в клетки печени и делает генную терапию, нацеленную на печень, существенно более реальной.

# В настоящее время

- ▶ Стадия клинических испытаний: иммунодефицит, гемофилия В, болезнь Гоше, муковисцидоз.
- ▶ Стадия экспериментальных разработок: гемофилия А, эмфизема лёгких, фенилкетонурия, мышечная дистрофия Дюшенна, талассемия, серповидноклеточная анемия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хронический грануломатоз, респираторный дистресс-синдром.

# РИСКИ генотерапии

1. Неблагоприятный ответ на вектор (например, реакция на аденовирус при дефекте цикла мочевины)
2. Инсерционный мутагенез, приводящий к злокачественным новообразованиям
3. Инсерционная инактивация важного для жизнеспособности гена.

# Не генная, но тоже очень перспективная терапия

Разработаны препараты для лечения - **на основе siRNA**

(малая интерферирующая РНК; Silencing-глушение генов), которые способны разрушать РНК, гомологичные им по последовательности. Таким образом, разрушаются только «нужные» мРНК. С помощью этих синтетических siRNA можно подавлять экспрессию любых генов в том числе, вирусных и «опухолевых».

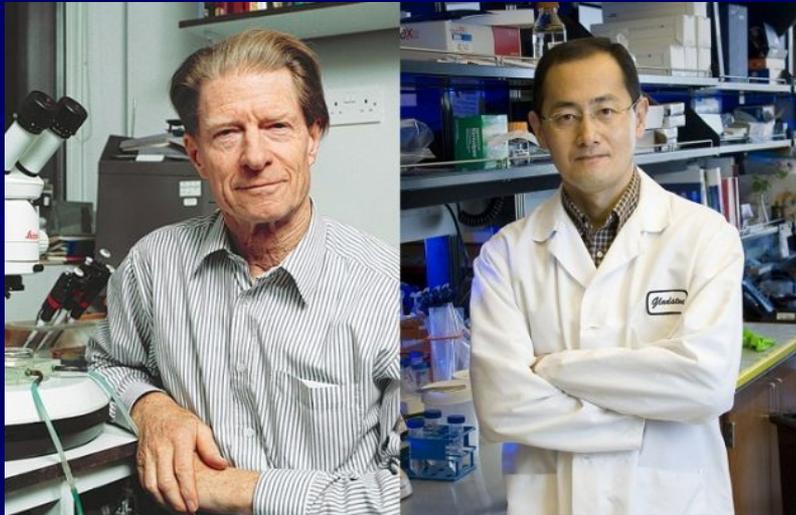
Пример:

## **Лечение макулодистрофии сетчатки**

Макула- центральный участок сетчатки, который обеспечивает человеку ~80% зрения. При возрастной дегенерации (обычно в 70-80 лет, но все чаще теперь и в 40-60 лет) сначала в поле зрения появляются точечные дефекты, потом изображение в центре просто исчезает). В настоящее время разработан препарат SIRNA-27-первое из лекарств серии интерферирующих РНК, допущенных до клинических испытаний.

В живых клетках существуют аналоги siRNA, так называемые микроРНК, которые снижают активность экспрессии некоторых клеточных генов. Снять такую микроРНК-блокаду важных клеточных генов помогут антагонисты РНК (antagomiRNA) – антисмысловые молекулы, инактивирующие клеточные микроРНК). Сняв блокаду можно ген заставить работать быстрее.

# Важное направление - Плюрипотентные клетки



- ▶ В 2012 г. Нобелевскую премию в области физиологии и медицины получили John B. Gordon и Shinya Yamanaka за открытие возможности перепрограммирования зрелых клеток в плюрипотентные (iPSCs).

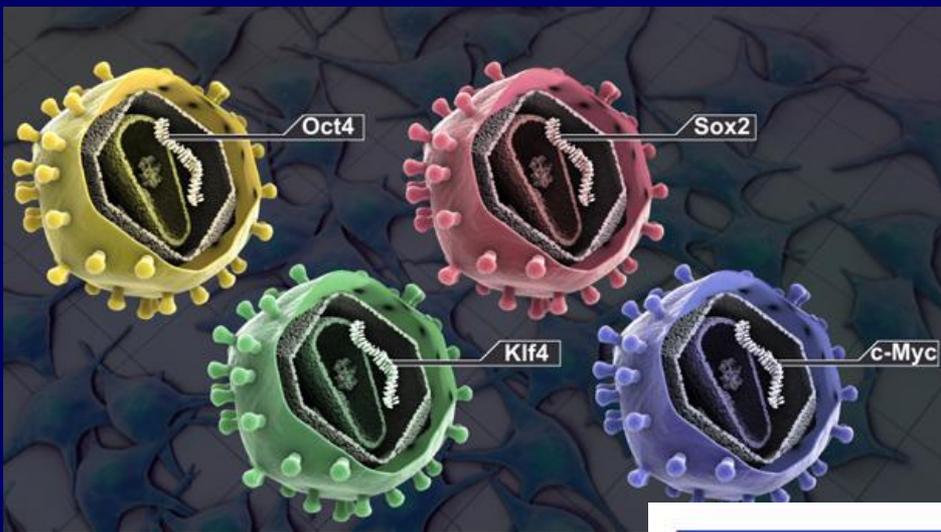
## ЭКСПЕРИМЕНТ ДЖОНА ГАРДОНА



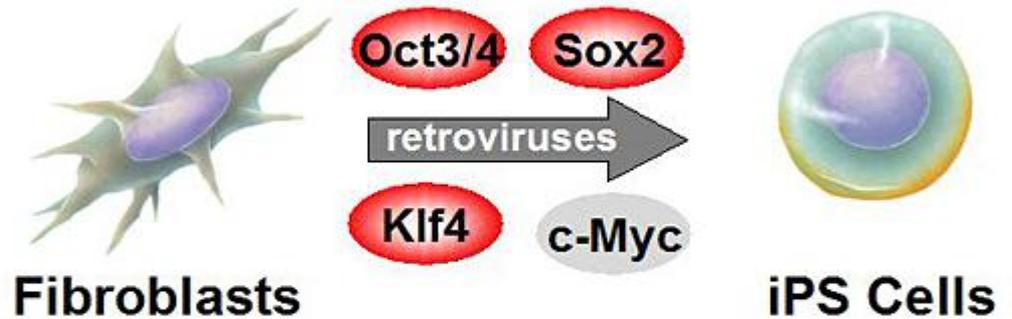
Впоследствии технология переноса ядер развилась в клонирование млекопитающих

## ЭКСПЕРИМЕНТ СИНЬЯ ЯМАНАКИ





## Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells



Mouse iPS cells reported in 2006

Human iPS cells reported in 2007

# Программируемые нуклеазы

- ZFN (Zink-Finger Nucleases)
- TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
- CRISPR-Cas система (Clustered regularly Interspaced Palindromic Repeats- CRISPR associated protein)

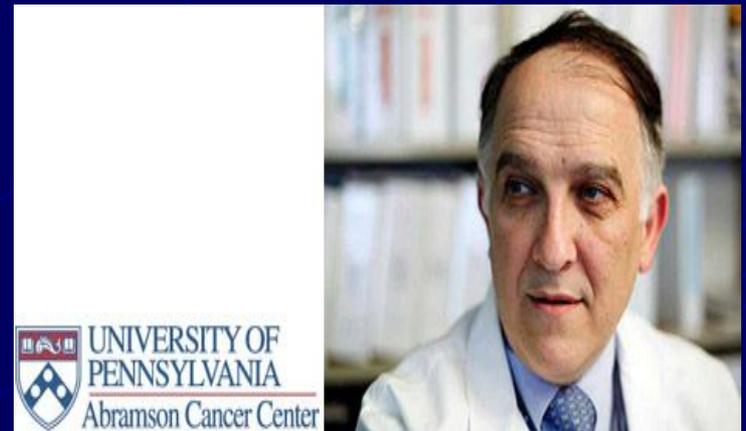


## ZFNs-

«дизайнерские» ферменты адресно «собираются» под определенные гены-мишени и фактически представляют собой инструмент, позволяющий манипулировать клеточным геномом – инактивировать, восстанавливать или изменять определенные последовательности ДНК.

# zinc-finger nucleases - ZFNs

## «цинковые пальцы» - синтетические цинкосодержащие белки-нуклеазы



**Карл Джун (Carl June) и Пабло Тебас (Pablo Tebas), 2013г**

# Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)

are artificial fusion proteins composed of an engineered DNA binding domain fused to a non-specific nuclease domain from the FokI restriction enzyme.

“Method of the Year” for 2011»

Zinc finger and transcription activator-like effector repeat domains with customized specificities can be joined together into arrays capable of binding to extended DNA sequences.

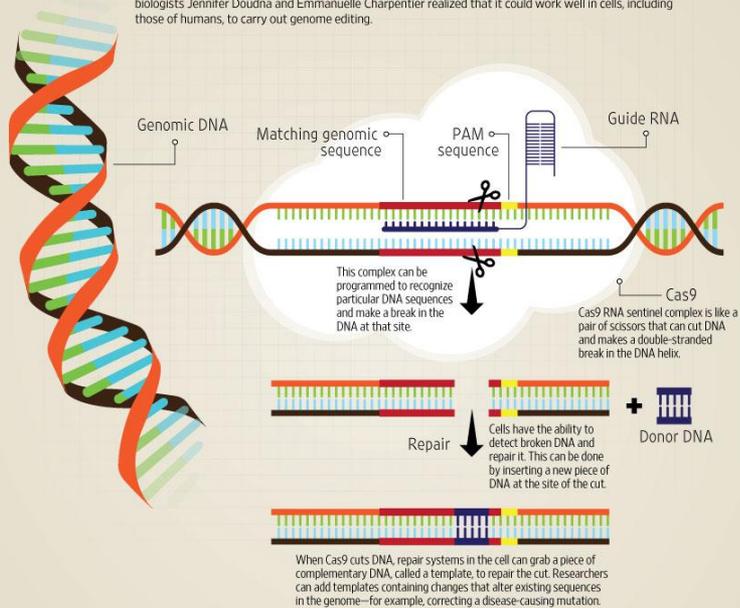
The image shows a screenshot of a NIH Public Access Author Manuscript page. At the top left is the NIH logo. The page is titled "NIH Public Access Author Manuscript" and includes the text "Nat Rev Mol Cell Biol. Author manuscript; available in PMC 2013 July 01." Below this, it states "Published in final edited form as: Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 January ; 14(1): 49–55. doi:10.1038/nrm3486." The main title of the manuscript is "TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing" by J. Keith Joung\* and Jeffrey D. Sander. The authors' affiliations are listed as Massachusetts General Hospital, Molecular Pathology Unit, Center for Computational and Integrative Biology, and Center for Cancer Research, Harvard Medical School, Department of Pathology, 149 13<sup>th</sup> Street, 6<sup>th</sup> floor, Charlestown, MA 02129 USA. A "Preface" section follows, describing engineered nucleases and the newly-developed transcription activator-like effector nucleases (TALENs). The preface text is: "Engineered nucleases enable the targeted alteration of any DNA sequence in a wide range of cell types and organisms. The newly-developed transcription activator-like effector nucleases (TALENs) comprise a non-specific DNA-cleaving nuclease fused to a DNA-binding domain that can be easily engineered so that TALENs can target essentially any sequence. The capability to quickly and efficiently alter any gene sequence using TALENs promises to have profound impacts on biological research and to yield potential therapeutic strategies for genetic diseases." The page is marked as a "NIH-PA Author Manuscript" on the left side.

# CRISPR/Cas9

от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группам

## HOW CRISPR WORKS

CRISPR-Cas9, abbreviated from clustered regularly-interspaced short palindromic repeats, is a hybrid of protein and ribonucleic acid (RNA) which works as an efficient hunt-and-cut system in bacteria. Molecular biologists Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier realized that it could work well in cells, including those of humans, to carry out genome editing.

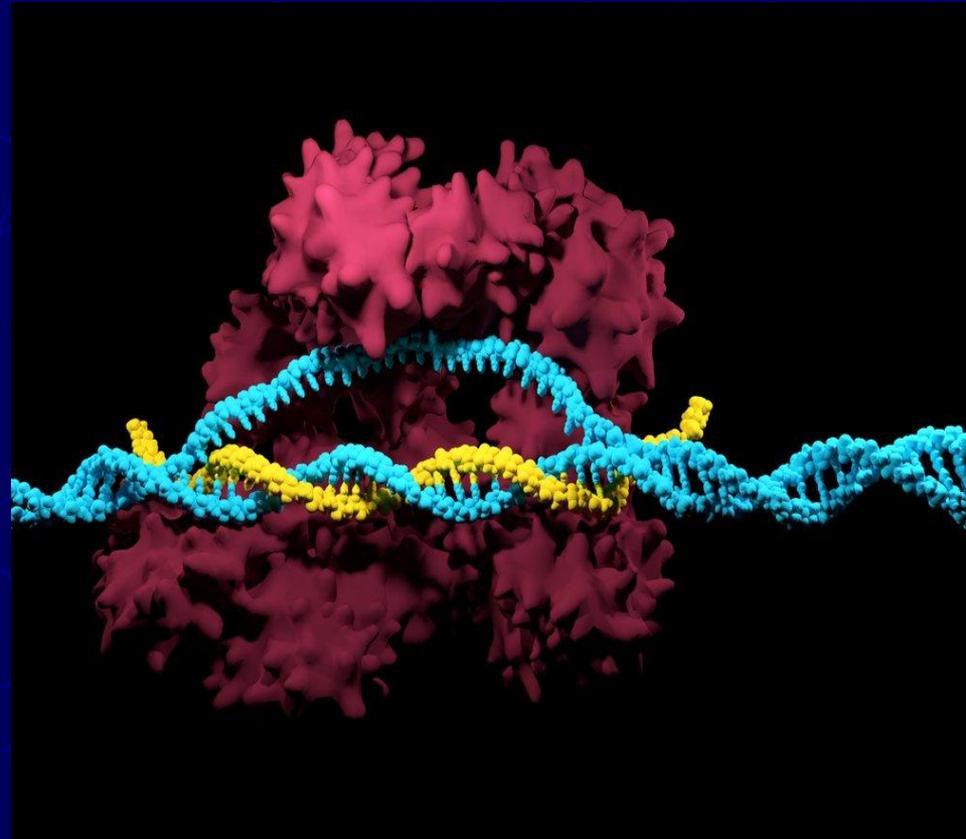


● When viruses infect a cell, they inject their DNA. In bacterium, the CRISPR system allows that DNA to be plucked out of the virus and inserted in little bits

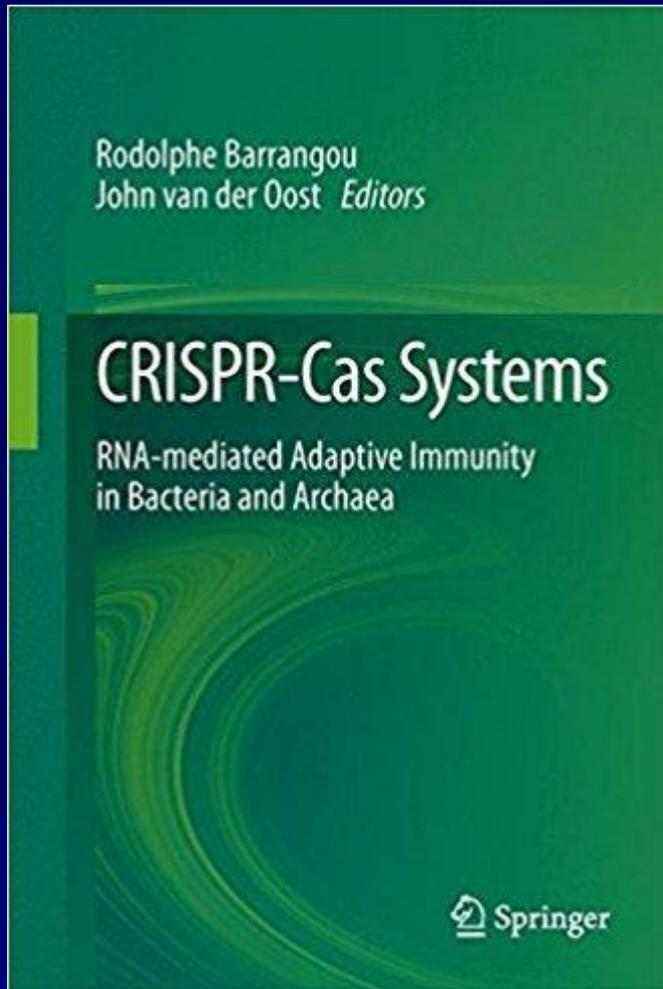
into the chromosome of the bacterium.

● These integrated bits of viral DNA get inserted at a site in the bacteria.

● CRISPR allows cells to record over time the viruses that they have been exposed to, so that cells are protected from those viruses.



Rodolphe Barrangou, John van der Oost.



Barrangou R, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709–1712

Springer Berlin Heidelberg, 2013.



# Профилактика

- ▶ **Первичная профилактика** – система мер, которые должны предупредить зачатие или рождение больного ребенка. К таким мерам относятся:
- ▶ Исключение контакта с генотоксикантами
- ▶ Планирование семьи
- ▶ Разновидностью природной профилактики считают механизм спонтанных абортов, позволяющий элиминировать больной плод
- ▶ Использование методов пренатальной диагностики

# Вторичная профилактика

- ▶ -это коррекция проявления патологических генов. При этом стремятся при патологическом генотипе добиться формирования нормального фенотипа (нормокопирование)
- ▶ Перинатальная первичная профилактика охватывает несколько месяцев до зачатия и заканчивается родами. Например, гипофенилаланиновая диета во время беременности уменьшит проявления ФКУ у ребенка. Прием фолиевой кислоты во время беременности снижает риск дефектов нервной трубки