

Génerápia

Általános áttekintés

A molekuláris medicina rohamléptekkel történő fejlődése lehetővé tette a humán betegségek molekuláris diagnosztikáját; a sejtekben átmenetileg megjelenő idegen nukleinsavak kimutatásától (fertőzések) a szomatikus sejtekben történt mutáción át (karcinogenezis) a csírasejteket ért mutációkig (öröklődő betegségek). Ismertté vált a betegségek egy részének genetikai háttere; a hatalmas léptekkel növekedő elméleti tudás (köztük a humán genom project befejezése) lehetőséget adott rá, hogy az ismereteket klinikai gyakorlatban alkalmazva a betegségek génszinten kezelhetőek legyenek. Ezek a terápiás megközelítések, amelyeket molekuláris terápiának vagy génerápiának nevezünk, az elmúlt évtizedekben hatalmas fejlődésen mentek keresztül, részletes tárgyalásuk messze túlmutat a konzultáció keretein.

A génerápia megítélésénél figyelembe kell vennünk, hogy sok esetben kísérleti stádiumú kezelésekről van szó; az első értékelhető próbálkozások húsz éve kezdődtek (összehasonlításképpen, a csontvelő transzplantáció 1958-ban kezdődött és a hetvenes évek elejére a túlélés 1%-os volt). A jelenleg folyó klinikai próbákról a <http://www.clinicaltrials.gov/> oldal ad felvilágosítást. A próbálkozások elsősorban olyan eseteken folynak, ahol a betegség súlyossága meghaladja a terápia kockázatát. Etikai okokból a betegektől nem vonják meg a génerápiától független kezelési formákat, ami a génerápia eredményességének megítélését tovább nehezíti.

A génerápia célja, hogy sejtbe juttatott *nukleinsavakkal* a hibás, betegséget okozó gént pótoljuk, módosítsuk vagy kiűssük. A nukleinsavakat többnyire *vektorokba* építik be, amelyek segítik a molekula sejtbe való bejutását. A vektorok adása történhet *in vivo* vagy *ex vivo*. Utóbbi esetben a beavatkozást a betegtől nyert sejteken laboratóriumi körülmények között végzik, majd a sejteket a módosítás után visszajuttatják a betegbe (autológ transzplantáció). A vektorokat két nagy csoportba osztjuk, virális illetve nem-virális. Jelen pillanatban a klinikai próbák 90 százalékában virális vektorokat használnak. A vírusokkal történt génbevitelt transzdukciónak, míg általánosságban a DNS beépülését a genomba inzerciónak nevezzük. Attól függően, milyen vektort választunk, a terápiás hatású DNS molekula beépülhet a gazdasejt kromoszóma állományába (és továbbjut az utódsejtekbe) vagy extrakromoszómális DNS formájában marad. Létrehozható *mesterséges emberi kromoszóma* (human artificial chromosomes, HAC) mely a sejtbe juttatva mint új kromoszóma működik. Ezek a biztonságos és hosszú távú expressziót biztosító vektorok egyelőre kísérleti körülmények közt működnek, mivel a mesterséges mikro-kromoszómák konstrukciója és sejtbe történő bejuttatása technikailag nehézkes és rendkívül nagy kihívást jelent a kutatók számára.

A *génpótlás* a leggyakrabban alkalmazott klinikai eljárás; a mutáns gén mellett megjelenő normál gén expressziója pótolni képes a hiányzó (mutáns) fehérjét. A kezdeti génerápia azokat a recesszív, monogénes, funkcióvesztő mutáció következtében kialakult betegségeket célozta meg, ahol ha nem történik meg a fehérje pótlása a betegség halálos kimenetelű. Technikailag jóval nehezebb a *hibás gének módosítása és kiűtése*. Ezen a területen nagy előrelépést jelentett a cink-ujj nukleázok felfedezése. Ezekkel a módosított transzkripciós faktorokkal lehetővé válhat a DNS irányított, specifikus szekvenciákon történő vágása, amelyet rekombináció követ. Fejlesztésük folyamatos (<http://www.zincfingers.org/>).

Kívülről bevitt nukleinsavakkal lehetőség van a génexpresszió és a fehérje funkció befolyásolására is, ilyenkor nem a genetikai állományba avatkoznak be, a

terápia nem a DNS, hanem az RNS szintjén történik. 2006-ban Nobel díjjal jutalmazták az *RNS interferencia* (RNAi) felfedezését, ami mRNS-ek irányított, szekvencia specifikus lebontását jelenti. A génexpresszió szabályozásának ezt a módját, amely a sejtekben fiziológiásan is jelen van, a mikro-RNS (miRNS) molekulák közvetítik. Ezek a rövid (19-23 nukleotid) genomban kódolt RNS molekulák számos élettani folyamatban (egyedfejlődés, proliferáció, apoptózis, differenciáció) szerepet játszanak, és expressziójuk megváltozását kimutatták számos betegségben, köztük daganatokban. Az RNS interferencia laboratóriumi kutatásokban bármely gén expressziójának gátlását (lecsendesítését) lehetővé teszi, és a humán diagnosztikus és terápiás alkalmazások köre is egyre szélesebb. A sejtbe juttatott vagy a sejtben belülről expresszált rövid kettősláncú RNS molekulák (small interfering RNS, siRNS) komplementer módon kötődnek a cél-mRNS molekulához, indukálják annak lebontását, így szekvencia specifikus gátlást eredményeznek. Az RNS *aptamerek* specifikus és stabil háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek, ami specifikus és stabil kötődést eredményez a célmolekulához. A célmolekula lehet sejt felszíni receptor, így az aptamerekhez kötött molekulák „csatolt áruként” irányítottan tudnak a sejtekbe jutni. Ilyen szállítmány lehet tumor-ellenes gyógyszer, enzim, vagy akár siRNS. Az *antisense* (ellenirányú) oligonukleotidok komplementerek a mutáns sense mRNS lánccal, kötődésük megakadályozza a mutáns mRNS transzlációját. Számos antisense terápia áll klinikai próba alatt, egyes szerek (antivirális, koleszterin szint csökkentő) engedélyezésre kerültek. Az antisense-hez hasonlóan a *ribozimek* (enzimaktivitással bíró RNS molekulák) is specifikusan kötődnek a cél-mRNS molekulához, és lebontják azt.

Bizonyos esetekben nem elegendő a normál fehérje pótlása, mert a mutáns fehérje (domináns negatív mutáció) elnyomja a fiziológiás fehérje működését. A mutáns fehérjét kódoló RNS molekulák specifikusan bonthatóak a fent ismertetett módszerekkel.

Technikai nehézségek

Az elmúlt 10 év főbb feladatai közé tartozott a vektor rendszerek finomítása, biztonságosabbá tétele, és termelésük gazdaságosságának javítása.

In vivo terápia esetén a lokálisan vagy szisztémásan adott vektor ideális esetben csak a célsejtekhez jut el, azaz sejtspecifikus, ami nem-virális vektor esetén specifikus ligandok, virális vektor esetén módosított vírus burok fehérjékkel érhető el. A vektornak át kell jutnia az esetleges endothelium barrieren, és be kell jutnia a sejtbe. A bejuttatott DNS molekula elhelyezkedhet extrakromoszómálisan, vagy beépülhet a gazdasejt kromoszóma állományába. Az extrakromoszómális forma nem osztódó sejtekben sokáig fenn tud maradni, osztódó sejtekből viszont kihígul. A beépülésre képes vektorok előnye, hogy a beépült DNS molekulát a sejt osztódása során keletkezett utódsejtek is tartalmazni fogják, hátránya viszont, hogy (mivel a beépülés nem irányítottan történik) a beépülés gének aktivációját/inaktivációját eredményezheti (inzerációs mutagenézis). A terápiás gén expressziójának időtartama szerzett betegségek (fertőzés, tumor) esetén átmeneti időre kell hogy szorítkozzon, míg genetikai betegségek esetén többnyire egész életen át tartó.

A hosszútávú sikeres génterápia egyik fő akadálya a vektor vagy a terápiás géntermék elleni immunválasz. A mesterséges vírusok vad típusú társaikhoz hasonlóan, kiváltják az immunrendszer reakcióját. Különösen igaz ez azokra a szerotípusokra, amelyekkel a legtöbb felnőtt már találkozott élete során.

A génterápiában használt különböző vektorok, és a hozzájuk kapcsolódó terápiás próbálkozások

1. Virális vektorok

1.1 retrovirális vektorok

A retrovírusok manipulációjából nyert vektorok előnye, hogy a provírus kódoló része könnyen lecserélhető a terápiás génre, és a vírus életciklusa során a provírus integrálódik a genomba. A beépíthető inzert maximális mérete 8-10 kilobázis (kb). Hátrányuk, hogy a beépülés inszerciós mutagenézishez, a kezelt sejtek tumoros malformációjához vezethet. Döntően csak osztódó sejteket fertőznek meg. A retrovirális vektorok voltak az első humán génterápiás eljárás választott vektorai (*adenozin-deamináz hiány (ADA)*) és velük történt az első sikeres génterápiás eljárás is (*severe combined immunodeficiency (SCID)*). Mivel a sejt DNS állományába történő beavatkozás hatását nem lehet pontosan kiszámítani, mindkét terápia olyan immunhiányos betegségben történt, ahol a betegség kezelés néhány év alatt halálhoz vezet.

Az immunrendszer részét képező leukociták differenciációja számos ponton zavart szenvedhet, amely súlyos kombinált immundeficienciát (*severe combined immunodeficiency, SCID*) eredményez. Ennek egyik formája egy nukleotid anyagcserében szerepet játszó enzim, az adenzin deamináz génjének mutációja miatt alakul ki. 1990-ben egy 4 éves kislány megfelelő donor hiányában nem részesülhetett csontvelő transzplantációban, így a szülők tájékoztatása után *ex vivo* génterápiát végeztek, a gyermektől nyert csontvelősejteket a funkcionális ADA gént tartalmazó retrovírussal transzformálták, majd a sejteket visszajuttatták (*autológ csontvelő transzplantáció*). A beavatkozást követően a beteg felépült, normál életet élt és él a mai napig. A génterápia sikere mégsem volt egyértelműsíthető, mert a génterápia megkezdése előtt egy új enzimpótló terápiát dolgoztak ki (*ADA-PEG*) amelyet etikai okokból nem vontak meg a betegtől. A párhuzamos terápia egyrészt megnehezítette a génterápia megítélését, másrészt annak kivitelezését is, mivel a funkcióképes ADA gént hordozó sejteknek nem volt növekedési előnyük a mutáns gént hordozó sejtekkel szemben.

A SCID egy másik formáját a citokinek differenciációs hatását közvetítő sejt-felszíni receptor génjének mutációja eredményezi. Egy 2000-ben megjelent közleményben a SCID sikeres *ex-vivo* génterápiájáról számoltak be, a betegek a génterápiás kezelésnek köszönhetően 4 évvel később funkcióképes immunrendszerrel bírtak és normál életvitelt folytattak. Ugyanakkor beigazolódott a retrovirális vektorok legsúlyosabb szövődményétől, az inszerciós mutagenézistől való félelem; a betegek ötödénél a kezeléssel egyértelműen kapcsolatba hozható leukémia fejlődött ki. Ez a génterápiás vektorok továbbfejlesztését, a kezeléseket biztonságának további újragondolását tette szükségessé.

Az egygénesebb betegségek (SCID, cisztás fibrózis, Duchenne-féle muszkuláris disztrófia) mellett előtérbe került az összetettebb genetikai hátterű betegségek, mint a tumorok és a kardiovaszkuláris betegségek kezelése. Tumor terápia részeként klinikai próbákban retrovírusokkal transzdukáltak autológ T sejt limfocitákat. Az ily módon tumor antigén ellenessé tett limfociták remissziót idéztek elő.

1.2 Lentivirális vektorok

A retrovírusok egy alcsoportja, a lentivírusok nem osztódó sejteket is képesek transzdukálni. A terápiák biztonsága érdekében létrehoztak magukat inaktíváló

retrovírusokat, melyek lényege, hogy nem tartalmaznak olyan promoter elemeket, amelyek a beépülés helyétől távolabb levő géneket aktiválni képesek (hiányzó enhanszer hatás).

β -globin cDNS-t expresszáló lentivírussal ex vivo transzdukálták egy talassaemiában szenvedő beteg hematopoetikus sejtjeit, és ezzel sikerült a beteg transzfúzó függését megszüntetni. HIV-alapú lentivirális vektorokkal kísérletet tettek a HIV eliminálására is; nem kódoló RNS molekulák expresszálásával a HIV receptorának expresszióját és a HIV replikációját gátolták.

1.3 Adenovirális vektorok

Az adenovirális vektorok előnye, hogy sokféle sejt transzdukálható, jó hatásfokkal, nagyméretű genomjuk lehetővé teszi nagyméretű inzertek (8 kb) sejtbe juttatását. A vektor episzómális (extrakromoszómális) marad, így hatása osztódó sejtekben többnyire átmeneti. Nyugvó sejtekben amennyiben nem lép fel immunválasz, hosszú távon stabil terápiás plazmaszint érhető el termeltetett fehérjékből (koagulációs faktorok, $\alpha 1$ antitripszin, erythropoietin). Történtek (egyelőre ellentmondásos) klinikai próbák onkolitikus tumorvírusokkal, amelyek csak tumorsejtekben replikálnak. A cukorbetegség terápiájában kísérletek folynak β sejt transzkripciós faktorokkal a β sejtek újraprogramozására és ezzel a hyperglükémia rendezésére.

Az adenovírus szisztémás adása kiválthatja az immunrendszer reakcióját, ami súlyos toxikus következményekkel járhat. Folynak próbálkozások az adenovírusok szerotípusának módosítására, ami az immunválasz mérséklését eredményezhetné, de adenovírusok esetében technikailag ez sokkal nehezebb, mint retrovírusok esetében.

A génterápia első halálos szövődményét a terápiás céllal használt adenovírusra adott masszív immunválasz okozta 1999-ben. A beteg az urea ciklus egyik központi enzimének, az ornitin transzkarbamoiláznak defektusában szenvedett.

1.4 Adeno-asszociált vírusok

Az adeno-asszociált vírusok előnye, hogy integrálódnak a genomba és integrációjuk helye, amely a 19-es kromoszóma egy specifikus részén történik, megjósolhatóbb, mint a retrovírusoké. További előnyük, hogy nem-osztódó sejteken is végezhető transzdukció, nem váltanak ki immunválaszt és könnyen előállíthatók nagy mennyiségben (magas titer) Hátrányuk, hogy a bevihető terápiás DNS szakaszok mérete korlátozott (5 kb). A vírust előnyös tulajdonságai miatt több génregulációt befolyásoló kísérletben használták, mivel itt a kisméretű inzert nem jelent hátrányt. Duchenne-féle disztrófiában, melyet a disztrófiát kódoló, az eddig ismert legnagyobb emberi gén mutációja okoz, a vírussal bevitt RNS molekulákkal sikerült exon kihagyást (exon skipping) indukálni és ezzel működőképes fehérjét termeltetni. Tumor terápiákban onkogének mRNS termékeit sikeresen lebontották AAV által expresszált siRNS molekulákkal.

Több öröklődő vakság esetében sikerrel alkalmaztak génterápiát. Leber-féle veleszületett vakságban a normál gént hordozó AAV subretinális infúziója ígéretes és biztonságos kezelésnek bizonyult. A próbában résztvevő betegek látása kivétel nélkül javult, minél fiatalabb életkorban kezdték a kezelést annál nagyobb mértékben.

Jelenleg folyó kísérletekben az izmot mint „fehérje gyárat” próbálják használni, melyben lipoprotein lipáz (LPL), $\alpha 1$ antitripszin és véralvadási faktorokat termelnek. 2010-ben a gyártó cég kérte egy LPL expresszáló vektor, a Glybera forgalomba hozatalát. A klinikai próbák már egyetlen dózis esetén is igazolták

lipoprotein lipáz deficienciában a Glybera pozitív hatásait, köztük az életet veszélyeztető szövődmény, a hasnyálmirigy gyulladásának megelőzését.

A központi idegrendszer betegségeiben, elsősorban a Parkinson kór kezelésében AAV transzdukcióval sejtbe juttatott terápiás gének (neurotranszmitter termelés befolyásolása, a dopamin szintézis enzimeit, növekedési faktorok) bevitelére már irányítottan (valós idejű mágneses rezonanciás képalkotás (real-time MR imaging)) történhet, akár sejttípus függően.

2. Nem-virális vektorok

Miután a DNS bejut a citoplazmába (többnyire endocitózissal), fehérjékkel komplexet képez, amelyek a sejten belüli vándorlást befolyásolják, szabályozzák. A nem-virális terápia esetében a sejtmag membránja jelenti a döntő akadályt a bevitt DNS számára. A jelenleg folyó vizsgálatok a sejtmagba történő bejutás határfokának javítására irányulnak, peptidek, natív vagy mesterségesen előállított fehérjék, transzkripciós faktor kötőhelyek segítségével. Rendkívül nagy számban kerültek kifejlesztésre szintetikus biológiailag lebomló polimer, melyek a DNS molekulával összekeverve nanorészecskéket hoznak létre. A nem-virális vektoroknak az a hátránya, hogy hatásfokuk elmarad a virális vektorok hatásfokától, a fejlesztések eredményeként bizonyos esetekben eltűnt. Bár a vektorok az esetek döntő részében episzómálisan helyezkednek el, kísérletek folynak irányított inzerciójukra laboratóriumi körülmények között előállított transzpozonokkal (pl. Csipkerózsika (Sleeping Beauty) transzpozon).

A génterápia jövője

A személyre szabott medicina korában vagyunk, amikor a jóslatok szerint a teljes humán genom szekvenálása rövid időn belül 1000 dollár alá esik, és kiválthatja a születéskor végzett géntesztet. A génterápiával párhuzamosan egy új terület, az őssejt kutatás került az érdeklődés középpontjába; várhatóan a génterápiával kombinált őssejterápia a jövő terápiái közt fog szerepelni. Erre példa a következő, vírusos májgyulladás kezelésére történt próbálkozás. Vírusos hepatitis krónikus formájában (HBV, HCV) a májtranszplantátum sejtjeit májban található őssejtekből, vagy májsejtté differenciált pluripotens őssejtekből hozzák létre. A transzplantátum újra fertőződését módosított sejtekkel próbálják megakadályozni oly módon, hogy vírus ellenes siRNA molekulákat expresszálnak a transzplantátum sejtjeiben.

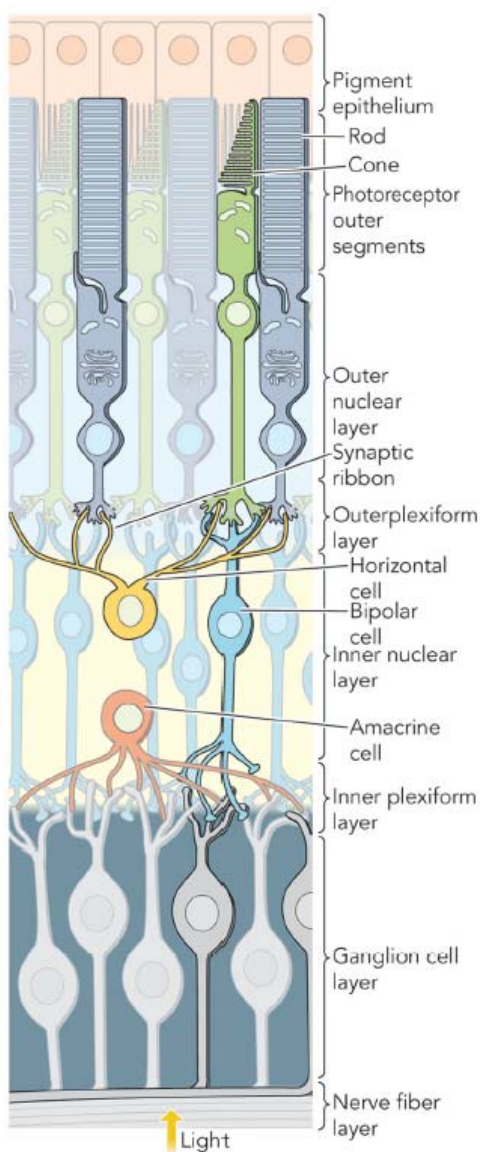
Melléklet, kiegészítő információ: Esettanulmány

Leber Congenital Amaurosis, LCA (<http://omim.org/entry/204100>) génterápiája

Háttér információ

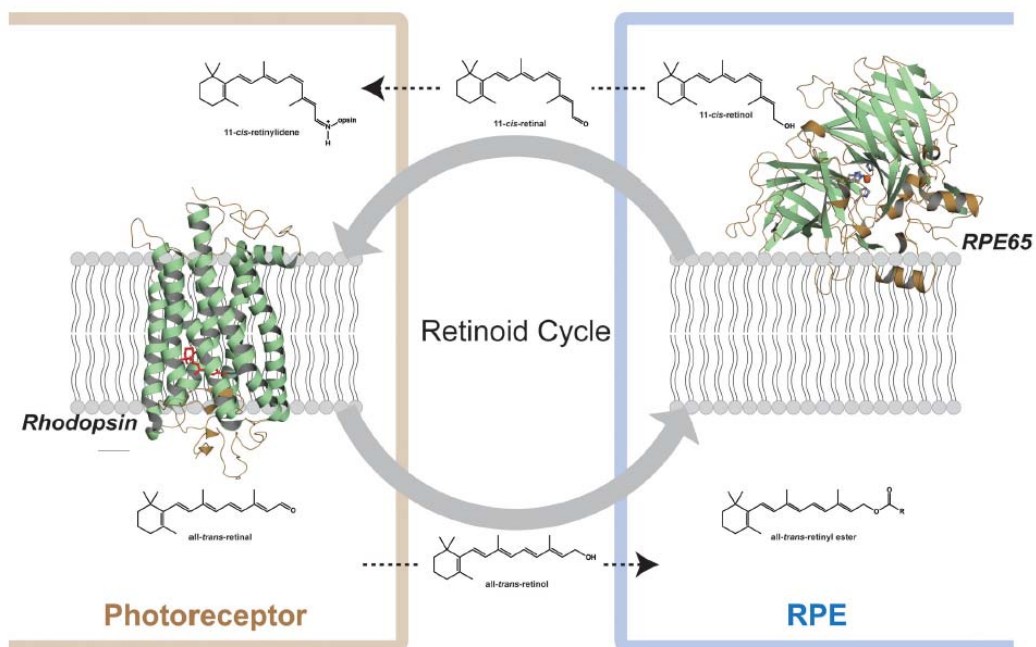
A látás kémiaja és a Retinal Pigment Epithelium Specific Protein, 65 KD, RPE65 funkciója (<http://omim.org/entry/180069>)

Az RPE65 egy izomerhidroláz aktivitással rendelkező enzim, amely transz-retinil észtereket alakít át 11-cisz-retinollá a retina pigment epitheliumában (RPE). Az RPE a retina fotoreceptor sejtjeivel szoros kapcsolatban álló hámréteg (Ld. alábbi ábrát), amely fontos szerepet játszik a retina metabolizmusában és a látás kémiai ciklusának fenntartásában.



A retina sejt szintű morfológiája (K. Palczewski, J Biol Chem 2012; 287: 1616-)

A látási ciklus során a 11-cisz-retinal opszinhoz kötődik és így képződik rodopszin, amelyben fény foton abszorpciója után 11-cisz \rightarrow transz-retinal fotoizomerizáció történik és ez eredményez olyan konformációváltást a rodopszinban, amely után az kölcsönhatásba lép heterotrimer G fehérjével a szignál továbbításához. A transz-retinal leválik az opszin kromofor kötőhelyéről és egy NADPH-függő transz-retinol dehidrogenáz transz-retinollá alakítja át. Ezt követően a transz-retinolnak át kell mennie a szomszédos RPE sejtekbe. Ezt a lépést a retinol zsírsavval történő észterifikációja teszi lehetővé, amelyet lecitin-retinol acil transzferáz katalizál. Az RPE sejtekben a retinil észterek raktár zárványokat képeznek, amelyek szubsztrátot biztosítanak az RPE65 számára. Az utóbbi enzim hidroláz és izomeráz aktivitása eredményeként a transz-retinol felszabadul és 11-cisz-retinollá alakul, amelyet dehidrogenáz oxidál 11-cisz retinállá. A ciklus befejező lépése a 11-cisz retinál diffúziója a fotoreceptor sejtekbe, ahol opszinhoz kötődik. A látás kémiai ciklusát az alábbi ábra foglalja össze.



A látás kémiai ciklusa (K. Palczewski, *J Biol Chem* 2012; 287: 1616-)

A Leber-féle kongenitális amaurosis (LCA) olyan autoszomális recesszív betegség, amely kisgyerekkorban a látás teljes elvesztésével jár. A betegség hátterében az RPE65 hiánya áll. Jellemző, hogy kezdetben a vakság ellenére a retinasejtek sejtek szerkezete hosszú éveken át relatíve megtartott, de az idő múltával progresszív pusztulnak.

Az LCA génterápiás kezelése e gyógyítási eljárás egyik sikertörténete, amely jelenleg egyedülként III. fázisú klinikai kipróbálás stádiumában van (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00999609>, kezdete 2012. augusztus, vége 2014 december, végleges lezárása 2028 december). A sikeres eljárást Katherine High és Jean Bennett munkacsoportjai dolgozták ki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854499>). AAV vektorba építették be az RPE65 gént és 1 szubretinális injekcióval vitték be a beteg rosszabbik szemébe. Tizenkét betegen (8-tól 44 éves korig) 3 kísérletes dózist alkalmaztak ($1,5 \times 10^{10}$ vektor genom, $4,8 \times 10^{10}$ vektor genom és $1,5 \times 10^{11}$ vektor genom) és eddig 2 éves megfigyelés eredményeiről tudtak beszámolni. Minden beteg fényérzékenysége javult, a pupilla reakció szerint legalább 2 nagyságrenddel. A kezelésre a gyerekek reagáltak a legjobban, egy 8 éves fiú teljesen visszanyerte látását (http://www.hhmi.org/bulletin/aug2011/features/gene_therapy_high2.html). Általános jelentőséggel bír az a tény, hogy egyelőre semmilyen mellékhatás nem jelentkezett.