

A génterápia eredményei és perspektívái a primer immundefektusok kezelésében

1992

Sófi Gyula Maródi László

RESULTS AND PERSPECTIVE OF GENE THERAPY IN THE TREATMENT OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY

During the last decade research has been directed toward gene-replacement therapy of genetic disorders, including primary immunodeficiencies. Efficient methods for gene transfer were developed to correct the gene defect in adenosine desaminase deficiency, leukocyte adhesion deficiency and chronic granulomatous disease. Somatic gene therapy in a patient with ADA deficiency was performed two years ago. This paper summarizes initial clinical applications of gene transfer and gene therapy in primary immunodeficiency and the future prospects of gene therapy in cohort of patients.

Az elmúlt évtizedben intenzív kutatómunka irányult a genetikai megbetegedések, ezen belül a primer immundeficienciák génterápiájának kidolgozására. Technikailag kivitelezhetővé vált a gén-transzfer lehetséges módszereit adenosin dezamináz deficienciában, leukocita adhezió protein defektusban és krónikus granulomatózisban. Két évvel ezelőtt megtörtént az első génterápiás beavatkozás ADA deficienciában szenvedő betegen. Közleményünkben összefoglaljuk a génterápia lehetséges módszereit, gyakorlati kivitelezését, és perspektíváit primer immunhiányos állapotok kezelésében.

Correspondence:
László Maródi, MD
Department of Pediatrics
University School of Medicine
H-4012 Debrecen, POB. 32. Hungary

Levelezési cím:
dr. Maródi László
Debreceni Orvostudományi Egyetem
Gyermekegyógyászati Klinika
4012 Debrecen, Pf. 32

gene therapy, primary immunodeficiency,
gene transfer, adenosine desaminase
(ADA) deficiency, leukocyte adhesion
deficiency

génterápia, elsődleges immunhiányos
állapot, gén átvitel, adenosin dezamináz
(ADA) hiány, leukocita adheziós
hiányállapot

Megközelítőleg ötezer olyan kóros jelleget, állapotot vagy betegséget ismerünk, amelyet egyetlen gén struktúrájának megváltozása, és ezzel elégtelen vagy csökkent funkcionális aktivitása idéz elő (1). A rendellenes génműködés az esetek túlnyomó többségében már a korai gyermekkorban klinikai tüneteket eredményez, és mind az élet minőségére, mind az élettartamra kedvezőtlenül hat. A veleszületett rendellenességek legtöbbjét ma még nem tudjuk kielégítő módon gyógyítani; a tartós kezelés óriási terheket jelent mind a beteg és családja, mind a társadalom számára.

A molekuláris genetika fejlődésének köszönhető, hogy a géndefektusok kezelésében ma már realitássá vált a betegséget eredményező mutáns gén normál változatának a sejtbe ültetése és ezáltal a beteg végleges meggyógyítása. Génterápia elsősorban azokban a betegségekben jön szóba, amelyeket egyetlen gén hibás működése okoz. Klasszikus értelemben génterápián azt az eljárást értjük, amelynek során a beteg genetikailag kóros sejtjeibe idegen eredetű, klónozott gént viszünk be abból a célból, hogy a gén hiányzó vagy csökkent működését korrigáljuk. Vannak azonban olyan módszerek is, amelyekben nem szükséges a normál gént abba a sejt vonalba bejuttatni ahol egyébként aktív lenne. Ilyen módszerek alkalmazhatók például az alvadási faktorok hiányából eredő betegségekben. Az alvadási faktorok többségét a máj termeli. A haemophiliák génterápiájához nem szükséges a hiányzó alvadási faktor normál allélját beültetni a májsejtekbe; elegendő és technikailag is egyszerűbben kivitelezhető a normál gén bejuttatása fibroblastokba vagy endothelsejtekbe, ahonnan a géntermék exocitózis útján kerül a véráramba és biztosítani tudja a véralvadáshoz szükséges faktorkoncentrációt. A génterápia definíciója a korábbiakhoz képest tehát módosult: *ma már génterápián értünk minden olyan DNS szintű manipulációt, amelynek eredményeképpen a beteg sejtjei új funkcionális sajátságokra tesznek szert* (2).

A genetikai rendellenességek egy jelentős hányadát teszik ki az immunrendszer veleszületett hiányállapotai. A hibás gént hordozó immundeficiens gyermekek egy részében korai felismerés és megfelelő kezelés nélkül a betegség már a csecsemőkorban halállal végződik (például súlyos kombinált immundefektusok). Az immundeficienciák jelenleg legáltalánosabban alkalmazott kezelési lehetőségei az intravénás immunglobulin-szubsztitúció, a csontvelő-transzplantáció, az utóbbi években pedig a citokin terápia (3). A végső megoldás azonban e területen is csak a molekuláris genetika eredményeitől várható.

Az egész orvostudomány történetében kiemelkedő állomás volt 1990 szeptember 14-e, amikor Blaese és Anderson kutatócsoportja egy négyéves, kombinált immundefektusban, adenzin dezamináz (ADA) deficienciában szenvedő gyermekén szomatikus génterápiát hajtott végre. A beteg véréből izolált T-lymphocytákba in vitro bevitték a hiányzó ADA-gént, majd a kezelt T-sejteket visszajuttatták a betegbe. A sikeresen elvégzett génterápiát követően a gyermek rendszeres időközönként kap „módosított” T-sejt infúziókat, amely klinikailag is jelentős javulást eredményezett.

Hazai génterápiás próbálkozásokról ma még nem lehet beszámolni. Több jól felkészült kutatócsoport dolgozik azonban e területen, így remélhető, hogy hamarosan közlésre kerül az első sikeres hazai génterápiás beavatkozás.

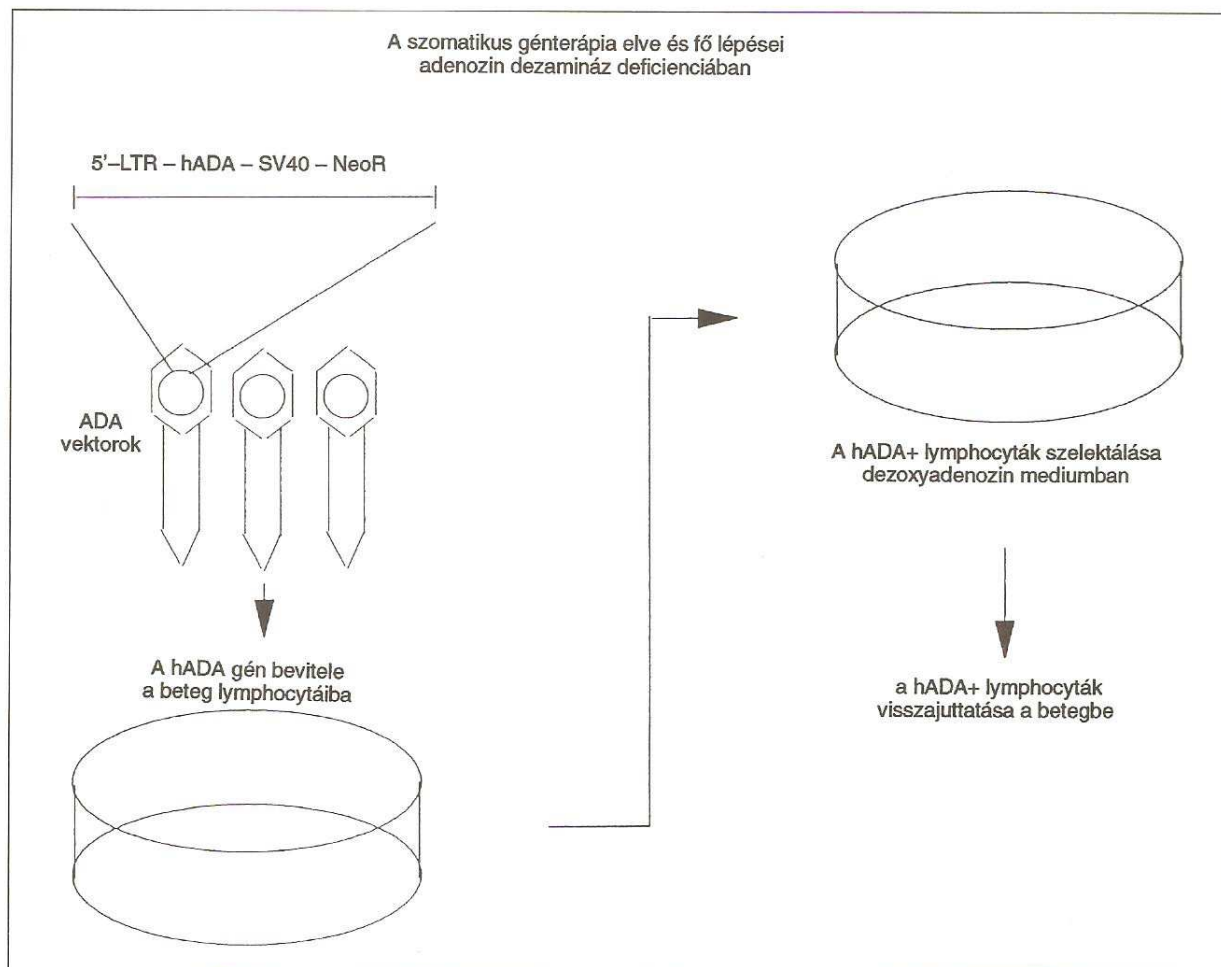
A génterápia módszerei

A génterápia célja, hogy a kóros génműködést normális gén bevitelével helyreállítsa. Ideális eset akkor valósulna meg, ha ezt mellékhatások nélkül, egyszeri beavatkozással véglegesen el tudnánk érni. Lényeges korlátozó tényező, hogy a gént célzottan kell a sejtbe juttatni, lehetőleg arra a kromoszómális helyre (lokuszra), ahol eredetileg is elhelyezkedik. Ha ezt nem sikerül elérni, kicsi az esély arra, hogy a gén működni fog, sőt a génnek működésbe való beavatkozásnak akár súlyos következményei is lehetnek. A génterápia során a nem megfelelő helyre bejutott gén megváltoztathatja a sejt osztódást szabályozó gének működését, és ezzel malignus transzformációt indíthat el.

A gének sejtekbe juttatásának többféle módját kidolgozták, így vannak kémiai, fizikai és biológiai módszerek. A *kémiai módszerek* lényege, hogy a bejuttatni kívánt génszakaszt tartalmazó oldatot elektromos töltéssel rendelkező anyaghoz, például kalcium-foszfáthoz kapcsolják (4), majd ezt az elegyet hozzáadják a kezelni kívánt sejtekhez. A töltéssel rendelkező „hordozó” anyag a sejtmembrán állapotában olyan fizikokémiai változást eredményez, amely lehetővé teszi a klónozott gén sejtbe való bejutását.

Hasonló elven alapszik az egyik *fizikai génbeviteli módszer*, az elektroporáció is (5). Ennek során a sejteket elektromos erőternek teszik ki, amelynek hatására átmenetileg megbomlik a sejthártya integritása, és a tápoldat-

dr. Sófi Gyula
dr. Maródi László
Debreceni Orvostudományi
Egyetem,
Gyermekegyógyászati Klinika
Érkezett: 1992. aug. 08.
Elfogadva: 1992. szept. 20.



1. ábra. Az ADA-deficiencia génterápiája LASN vektor felhasználásával (7). A LASN vektorban a vírus nukleinsav tartalmához mesterségesen hozzáillesztett gének a következők: a vírus nukleinsav megfelelő régiójának 5' végén az LTR szekvencia helyezkedik el, amely vektor eredetű, és a retrovírus kontrollált életciklusában szerepet játszó géneket tartalmazza; a humán eredetű ADA gén; a gén sejtbe jutását jelző Neomycin rezisztencia gén, és ennek az expressziójához szükséges SV40 vírus eredetű promotor szekvencia. A LASN vektorból mesterségesen eltávolították mindazokat a géneket, amelyek a replikációhoz szükségesek

Rövidítések: LTR- long terminal repeat; hADA- human adenzin dezamináz gén; SV40- Simian vírus 40; NeoR- Neomycin rezisztencia gén

ban lévő génszakasz képessé válik a sejtbe való diffundálásra. Az elektromos erőter hatására azonban a sejtek többé-kevésbé súlyosan károsodnak, így emberben ez a módszer nem alkalmas génterápiás felhasználásra. Fizikai génbeviteli eljárás a mikroinjekció is. Mikroinjekciónál a klónozott génszakaszt vékony üvegkapillárral viszik be a kezelni kívánt sejtekbe. Ez a módszer a ma ismert legjobb hatásfokú génbeviteli eljárás. Hátránya azonban, hogy minden sejtet egyenként kell kezelni, így terápiás alkalmazhatósága gyakorlatilag nincs.

A vírusok evolúciójuk során „megtanulták” a gének sejtekbe történő bevitelét.

Óriási lépést jelentett a génszervezet fejlődésében annak felismerése, hogy a vírus genomja kívülről is lehetséges géneket bevinni (6). Mivel a sejtek maganyagában lévő örökítő anyag a DNS, a kutatók figyelme kezdetben a DNS-vírusokra koncentrált. Kiderült azonban, hogy sok DNS-vírus alkalmatlan idegen gének befogadására, mert nem áll rendelkezésre elegendő szabad hely a külső DNS darab számára. A DNS-vírusok vektorként való alkalmazhatóságának másik fő akadálya, hogy

genetikai információs anyaguk általában be sem épül a sejtek saját DNS állományába.

Az RNS-vírusok jó része szintén alkalmatlan a génterápiában vektorként való alkalmazásra, hiszen a genom DNS állományába nem képesek beépülni, a citoplazmában pedig hamar lebomlanak. Ismeretes azonban egy RNS-vírus család, a retrovírusok, melynek tagjai alkalmasnak bizonyultak idegen gének befogadására és a célsejtekbe való bevitelére. Ezeknek a vírusoknak az RNS-e egy olyan speciális enzimet (reverz transzkriptázt) is kódol, amely képes a megfertőzött sejtekben a virális RNS-en kódolt információt DNS molekulára átírni.

A retrovírusok felhasználása humán génterápiás célokra nem kis riadalmat keltett ezen víruscsoport daganatokat előidéző képessége miatt. A génszervi beavatkozások során azonban a retrovírusok elvesztik mindazon génjeiket, amelyek a daganatos megbetegedés előidézésében szerepet játszhatnak, ezzel egyben tovább növelve a befogadandó gén számára rendelkezésre álló teret is. Széles körű biztonságos alkalmazhatóságukat természetesen további kiterjedt vizsgálatoknak kell alátámasztani.

Szomatikus génterápia ADA-deficienciában

A génterápiára alkalmas célsejtek köre korlátozott. A célsejteknek hosszú életűnek és osztódásra alkalmasnak kell lenniük, és eléggé ellenállónak ahhoz, hogy a genetikai manipulációt károsodás nélkül elviseljék. Ezeknek a kritériumoknak elsősorban a csontvelői, a máj- és bőrsejtek felelnek meg. Ez azonban nem jelenti feltétlenül azt, hogy csak ezeknek a sejtvonalaknak az örökletes megbetegedései befolyásolhatók génbevitellel.

A csontvelő sejtjei ideális célpontjai a génterápiának. Csontvelői sejtek könnyen nyerhetők a betegből, osztódási képességük megtartott és egyszerűen visszajuttathatók a helyükre. A csontvelői eredetű sejtek genetikai módosításával nagyszámú hematológiai és immunológiai betegség válhat gyógyíthatóvá.

A génterápiás beavatkozások területén elért eredmények között kiemelkedő helyet foglal az ADA-deficiencia kezelése. Az ADA-deficiencia a primer immunhiányos állapotok egyik leg súlyosabb formája, amelyben mind a celluláris, mind a humorális immunitás veleszületetten, súlyosan károsodott. Az ADA a purinanyagcsere enzime, az adenozint és a dezoxiadenozint bontja le inozinná

és dezoxi-inozinná. Csökkent ADA aktivitás esetén megnő a lymphocytákban az adenozin mennyisége (3).

Culver és munkatársai retrovírus alkalmazásával elsőként juttattak be ADA-gént humán T-lymphocytákba (7). Ezzel a vektorral in vitro kezelték a bevezetőben említett ADA-hiányos gyermek T-lymphocytáit, amelynek hatására a kezelés előtt alig mérhető ADA aktivitás jelentős mértékben fokozódott (8). Bár a kezelés után a CD4+ sejtek száma a normális alatt maradt, az izohemagglutinin szint az átlagosra emelkedett. Mind a késői típusú hiperszenzitivitáson alapuló bőrtesztek, mind az antigénekre adott proliferációs készség normalizálódott. Klinikailag a beteg lázas periódusainak száma csökkent, a fertőzések súlyossága és lefolyásának ideje csökkent. Az eddigi megfigyelések szerint a sejtekbe bevitt gén legalább 2 hónapig fejti ki hatását. Bár a lymphocyták korlátozott élettideje miatt a kezelést rendszeres időközönként meg kell ismételni, a beteg klinikai állapota a kezelés óta drámaian javult.

A génterápia perspektívái leukocita adhezív protein deficienciában

Előrehaladott stádiumban van egy másik immundeficiencia génterápiás kezelésének megalapozása is. A leukocyták adhezív protein deficienciája a sejtfelszíni CD11/CD18 protein komplex elégtelen expressziójának következtében alakul ki (9). A defektus következtében a leukocyták elvesztik azt a képességüket, hogy különböző felületeken megtapadjanak, így jelentős mértékben csökken a kórokozókval való kontaktus létrejöttének lehetősége is (3). A betegséget eredményező CD18 génmutációt retrovírus vektor felhasználásával sikerült in vitro korrigálni klónozott gén leukocytákba való bevitelével (10). Az in vitro kísérletek során sikerült mind az eredetileg is meglévő CD11, mind az újonnan bevitt CD18 gén terméket kimutatni. A leukocyták sejtfelszínén a két molekula dimert képzett, és a sejtek visszanyerték az adhezív képességhez kötött funkcionális aktivitásukat is. Legújabb állatmodellen is kipróbálták az exogén CD18 gén bevitelének hatását (11). A klónozott CD18 gént a kísérleti állatok csontvelői sejtjeibe vitték be in vitro körülmények között, majd a humán CD18 gént is tartalmazó csontvelői sejteket visszatranszfundálták az állatokba. A leukocyták felszínén sikerült az állat saját CD11 molekuláit

kimutatni, amelyek a humán eredetű CD18 komponenssel funkcionális dimert képeztek. Ezekre a vizsgálatokra építve várható, hogy a közeli jövőben a CD18-deficiencia is kezelhetővé válik génterápiás módszerekkel.

A génterápia perspektívái krónikus granulomás betegségben

Az ép phagocytasejtek a bekebelezett kórokozókat képesek intracellulárisan elpusztítani. Ehhez oxigén eredetű toxikus metabolitokat is felhasználnak, amelyek keletkezésében a sejtmembrán NADPH oxidáz enzimrendszerének meghatározó szerepe van. A NADPH rendszer csak több protein együtműködése révén képes funkcióját kifejezteni. A rendszer bármely alkotó tagjának csökkent funkcionális aktivitása esetén a falósejtek elvesztik

a bekebelezett kórokozók elpusztításának képességét, amelyek így intracellulárisan tovább élnek, az antibiotikumok hatásától mintegy védve szaporodnak, és helyi granulomás reakciókat hoznak létre. Az intracelluláris killing defektus prototípusa a krónikus granulomás betegség. Genetikailag a betegség közel 70%-ában X-kromoszómához kötött recesszív öröklődést találunk (3). Az eddigi génterápiás kísérletek eredményei alapján felmerül a külső gén bevitelének lehetősége ebben a kórképben is, de a phagocytasejtek bonyolult funkcionális szabályozottsága ma még számos akadályt állít a génterápia kivitelezése elé.

Az eddigi eredmények alapján remélhető, hogy az elkövetkező évtizedek során a génterápia az örökletes megbetegedések reális kezelési lehetőségeként fog szerepelni. Számos technikai, orvosi, jogi, etikai probléma megoldatlansága ma még akadályozza a széles körű alkalmazást, de a mind tökéletesebb megoldások várhatóan ezeket az akadályokat fokozatosan megszüntetik (12).

IRODALOM

1. McKusick V A. Mendelian inheritance in man: Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 9th Edn, Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1991.
2. Blaese R M. Progress toward gene therapy. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61: S47.
3. Maródi L. Immundeficienciák. Budapest: Medicina, 1988.
4. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745.
5. Keating A, Toneguzzo F. Gene transfer by electroporation: a model for gene therapy. *Prog Clin Biol Res* 1990; 333: 491.
6. Mulligan R C, Howard B H, Berg P. Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome. *Nature* 1979; 277: 108.
7. Culver K W, Osborne W R A, Miller T A et al. Correction of ADA Deficiency in human T lymphocytes using retroviral mediated gene transfer. *Transplantation Proceedings* 1991; 23: 170.
8. Matsumoto S, Sakiyama Y, Ariga T et al. Progress in primary immunodeficiency. *Immunology Today* 1992; 13: 4.
9. Anderson D C, Schmalstieg F C, Finegold, M J et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1985; 152: 668.
10. Wilson J M, Ping A J, Krauss J C et al. Correction of CD18-deficient lymphocytes by retrovirus-mediated gene transfer. *Science* 1991; 248: 1413.
11. Krause J C, Mayo-Bond L A, Rogers C E et al. An in vivo animal model of gene therapy for leukocyte adhesion deficiency. *J Clin Invest* 1991; 88: 1412.
12. Kinnon C, Levinsky R J. Somatic gene therapy for genetic disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 72.