

ديفيد ليليكراي:

مرحبًا بكم، أنا ديفيد ليليكراي، وأعمل أستاذًا في قسم علم الأمراض والطب الجزيئي بجامعة كوينز في كندا، وسأعرض لكم الآن مجموعة من الشرائح التي تتناول العلاج الجيني لمرض الهيموفيليا (نزف الدم الوراثي). والهدف التعليمي من عرض هذه الشرائح هو توضيح العلاج الجيني بصورة صحيحة، بما في ذلك المصطلحات والمفاهيم الأساسية ذات الصلة.

هذه قصة بدأت منذ أكثر من 65 عامًا، ويظهر على هذه الشريحة هنا صورة لفرانيسيس كريك -على اليمين- الشريحة وصورة لجيمس واتسون -على اليسار، وهما ينظران إلى نموذجهما الرائع للحمض النووي (DNA) المسمى بـ «اللؤلؤ المزدوج»، والذي وضعه هذان العالمان في جامعة كامبريدج عام 1953.

نتنقل الآن بشكل سريع إلى بداية الثمانينيات، وذلك عندما تم وصف أول جينات مسؤولة عن إنتاج عوامل التخثر؛ حيث نشر أستاذي «آرثر بلوم» في مجلة نيتشر «Nature» مقال أخبار وأراء يوضح فوائد تجارب الاستنساخ، ويزيد الفهم فيما يتعلق بنشوء وتطور الاضطرابات النزفية، والتشخيص المتقدم، وأخيرًا العلاج الجيني؛ وهو موضوع هذا العرض التقديمي.

أساسيات العلاج الجيني واضحة نسبيًا؛ فهي تتضمن إدخال جين علاجي سليم (عن طريق ناقل) إلى الخلايا المستهدفة، حيث يتحول الحمض النووي الريبي (RNA) للناقل إلى حمض نووي ريبي منزوع الأكسجين (DNA) ويندمج داخل النواة، وينتقل بعد ذلك الحمض النووي الريبي المرسل (mRNA) من خارج النواة إلى الريبوسوم، ليبدأ هذا الأخير عملية الترجمة وبناء البروتين في الخلية، ويبقى هذا البروتين العلاجي داخل الخلية أو يتم إفرازه منها وينتشر في الدورة الدموية للجسم لتحقيق فائدة علاجية.

قبل أن أوصل الحديث عن تفاصيل عملية العلاج الجيني، فمن المهم أن أثير الموضوع الذي نحن بصدد مناقشته الآن؛ وهو العلاج الجيني للخلايا الجسدية. ويتم هذا العلاج بتوصيل جين طبيعي إلى خلايا فرد ما أو بإصلاح جين داخل خلاياه، أي أن ذلك يتم على مستوى فردي وليس من أجل أن تستفيد منه الأجيال القادمة؛ فالعلاج الجيني للخلايا الجسدية يقتصر على الأفراد فقط، ولا نووي تغيير أو تعديل الحمض النووي للخلايا الجنسية.

ستجدون في هذه الشريحة المعروضة هنا، قائمة أمراض يُستخدم العلاج الجيني دائمًا في علاجها بشكل جيد للغاية، وهذه الأمراض هي أمراض أحادية الجين، أي أن النمط الظاهري السريري لها يكون غالبًا بسبب عيوب في جين واحد، ويمكنكم ملاحظة وجود مرض الهيموفيليا في هذه الشريحة. وسبب إدراج الهيموفيليا في هذه القائمة هو أننا نعرف أن الزيادات الطفيفة في عامل التخثر تُحقق مزايا سريرية كبيرة. ونظرًا لأن البروتين يتم إفرازه من الخلية، فهو يحتاج فقط إلى الدخول إلى الدورة الدموية في الجسم. والتعبير بإحكام عن البروتين ليس مطلوبًا، فنحن لدينا نماذج حيوانية جيدة للغاية مثل الفئران والحيوانات الكبيرة -يمكننا بواسطتها اختبار إستراتيجيات العلاج الجيني.

بالنسبة للعلاج الجيني للخلايا الجسدية، ستعرض هذه الشريحة أربعة خيارات علاجية ممكنة. الخيار الأول هو إصلاح الطفرات الجينية؛ وسأشرح المزيد عن هذا الأمر في الشريحة التالية. والخيار الثاني هو إمكانية توصيل جينات سليمة إلى الجسم عبر ناقل غير فيروسي. ولا يزال هذان الخياران ممكنان من الناحية النظرية ولكنهما غير متيسرين من الناحية الإكلينيكية. والخيار الثالث هو العلاج الجيني القائم على الخلايا؛ وسأوضح المزيد عن هذا الأمر في شريحة لاحقة، والخيار الرابع والأخير هو توصيل جينات سليمة إلى الجسم عن طريق ناقل (حامل) فيروسي، وهي الإستراتيجية التي تُستخدم في جميع دراسات العلاج الجيني البشري الجارية حاليًا لمرض الهيموفيليا.

تصف هذه الشريحة إذن مسألة إمكانية تعديل الجينات أو إصلاحها من خلال استخدام إستراتيجيات للتحريض الجيني. على الجانب الأيسر من الشريحة، يمكنكم ملاحظة إمكانية استخدام عملية إعادة التركيب المتماثل كوسيلة للإصلاح الجيني؛ وهذه العملية ممكنة من الناحية النظرية، لكنها غير فعالة إلى حد كبير. أما على الجانب الأيمن من هذه الشريحة، فيمكنكم رؤية عدد من طرق التحرير الجيني القائمة على استخدام إنزيم

نوكلياز. ويستخدم في هذه التقنيات لتحرير الجيني إنزيمات اصطناعية قاطعة للحمض النووي مثل إنزيمات نوكلياز إصبع الزنك (ZFNs)، أو النوكلياز المُستجيب لمشابه منشط النسخ (TALENs)، أو تقنية كريسبر-كاس9 (CRISPR-Cas9) -والتي يتم فيها توصيل إنزيم نوكلياز إلى منطقة معينة من الجينوم لإحداث قطع مزدوج في شريط الحمض النووي لولي الشكل؛ والآن ننظر إلى الجزء السفلي من الشريحة، وسنرى أن القطع المزدوج قد تم تعديله أو إصلاحه بطرق مختلفة. هذه التقنيات قابلة للتطبيق الآن، وسيبدأ قريباً إجراء دراسات سريرية عليها، ولكن فيما يتعلق بمرض الهيموفيليا، فإنه على الرغم من إمكانية تطبيق هذه التقنيات في المختبر وعلى نماذج حيوانية، إلا أنني اعتقد أنه يصعب تطبيقها سريريًا في الوقت الحالي.

فما هي عناصر إستراتيجية العلاج الجيني؟ توضح هذه الشريحة عناصر العلاج الجيني. وسأناقش الآن عملية توصيل جينات علاجية سليمة إلى الخلايا المستهدفة، وكيفية توصيلها، والخلايا المضيفة الملائمة، وبعد ذلك سأحدث عن القياسات ومقاييس النتائج الخاصة بالتعبير عن البروتين المعدل جينياً.

كيف تبدو حاوية الجينات المعدلة وراثياً؟ عادة ما تحتوي الحاوية على تسلسل حمض نووي مشفر أو تسلسل حمض نووي متم بدون إنترونات. ويتراوح حجم معظم هذه الأحماض النووية المتممة من 22000 إلى 7000 قاعدة، وسأوضح في شريحة لاحقة كيفية تعديل تسلسل مشفر.

توضح هذه الشريحة عملية تحسين الشفرة الجينية، وهي عملية يتم فيها تغيير تسلسل النيوكليوتيدات التي تقوم بتشفير الأحماض الأمينية، ولكن دون إحداث تغيير في تسلسل الحمض الأميني. والهدف من هذه الإستراتيجية هو زيادة معدل استنساخ الحمض النووي الريبوزي المرسل (mRNA) لتحسين معالجته وإزالة أي إنترونات متبقية، وأخيراً مطابقة ترجمة mRNA مع الأحماض النووية الريبوزية الموجودة في الخلية المضيفة المستهدفة.

والعناصر الأخرى المطلوبة في حاوية الجينات المنقولة هي عناصر تنظيمية إلى حد ما، وهي موجودة في الطرف "5" من الجين المنقول. وهذه العناصر عناصر محفزة، ويمكن تنظيمها في نوع محدد من الخلايا، كما يمكن أن تكون محفزة للأدوية، وعادة ما تكون هذه العناصر المحفزة - اللازمة لتحفيز التعبير الجيني- مطابقة لنوع معين من الخلايا المضيفة.

ويوجد التسلسل "3" في الطرف الآخر من حاوية الجينات، وهو يعمل على تثبيت الحمض النووي الريبوزي المرسل الذي يتم تشفيره بواسطة تسلسل الحمض النووي المتمم.

تتناول الشريحتان التاليتان الاستراتيجيات العامة لتوصيل الجينات إلى جسم المريض. وتوضح الشريحة الأولى إستراتيجية نقل الجينات إلى داخل الجسم مباشرة، حيث يتم عادة توصيل الجينات المنقولة إما عن طريق التسريب الوريدي أو عن طريق الحقن العضلي. وتتميز هذه الإستراتيجية بسهولة من الناحية العملية؛ وذلك لكونها تستغرق من الطبيب السريري والمريض وقتاً زمنياً محدوداً. أما سلبيات هذه الإستراتيجية فتتمثل في أمرين؛ الأمر الأول هو إمكانية مهاجمة الجهاز المناعي للجسم لنقل الخلايا، ويمكن أن يتسبب ذلك في حدوث بعض المشاكل؛ كما سنتحدث عن ذلك في وقت لاحق. والأمر الثاني هو أن كفاءة الاستهداف الخاصة بالنقل متغيرة؛ لذا فمن المحتمل أن يتم توصيل الجينات إلى خلايا غير مستهدفة.

توضح هذه الشريحة الإستراتيجية الثانية لتوصيل الخلايا. وتعرّف هذه الإستراتيجية بـ "توصيل الجينات الخارجي" (خارج جسم المريض). على الجانب الأيسر من الشريحة، يمكنكم رؤية الإجراء الأول في هذه الإستراتيجية، وهو فصل أو عزل الخلايا السلفية أو الخلايا الجذعية البالغة ذاتية المنشأ من المريض. وبمجرد عزل تلك الخلايا، يتم توصيل نسخة طبيعية من الجين الطافر داخل جسم المريض، أو يمكن تحرير الجين الطافر الموجود في خلايا المريض. وبعد ذلك، تُنمى هذه الخلايا المعدلة وراثياً خارج الجسم، ثم يُعاد إدخالها في جسم المريض حيث تستقر به وتعمل على إنتاج العامل الطبيعي المطلوب؛ وهو -في حالة الهيموفيليا- عامل التخثر الطبيعي الذي لا تنتجه خلايا المريض.



هناك عدد من الإيجابيات والسلبيات في نظام التوصيل هذا. وإيجابيات هذا النظام هي عدم تعرض ناقل الجينات لمقاومة مناعية على النحو الذي يحدث في حالة توصيل الجينات إلى الجسم مباشرة؛ وهذا الأمر يعتبر ميزة لأهميته من الناحية المناعية. كما أن الناقل يقوم باستهداف الخلايا المحددة بشكل مباشر، وبالتالي فإن الخلايا الوحيدة التي ترى الناقل هي الخلايا التي تم فصلها والتعامل معها خارج جسم المريض. أما سلبيات هذا النظام فتتمثل في أنه يتطلب عمالة كثيفة ومرافق خاصة. ومن المهم أيضاً أن يخضع المريض لعملية تهيئة شاملة لكي يتم إعادة زرع الخلايا المعدلة وراثيًا بطريقة ناجحة.

تتضمن جميع الدراسات الحالية للعلاج الجيني لمرض الهيموفيليا نقل الجينات عن طريق ناقل فيروسي عبر الوريد، وقد استخدم لذلك ثلاثة أنواع من الفيروسات وهي: الفيروسات الغدية والفيروسات القهقرية والفيروسات المرتبطة بالفيروسات الغدية.

تتناول هذه الشريحة عملية نقل الجينات بواسطة الفيروسات الغدية. وقد استخدم هذا الناقل الفيروسي في علاج مريض واحد فقط حتى الآن. أثبتت هذه الفيروسات قدرتها العالية على إدخال الجينات العلاجية إلى الخلايا الانقسامية وغير الانقسامية، ويمكن تصنيع كميات كبيرة من هذه الفيروسات بشكل سهل نسبيًا. والجانب السلبي الهام فيما يتعلق باستخدام هذه الفيروسات لنقل الجينات العلاجية إلى الخلايا هي وجود استجابة مناعية طبيعية كبيرة على هذه النواقل الفيروسية. لذا، فمن الممكن حدوث زيادة في السيتوكينات المحرّضة على الالتهابات وتسمم كبدى وانخفاض في عدد الصفائح الدموية، كما يمكن -في الحالات الشديدة- الإصابة بمتلازمة الاستجابة الالتهابية الجهازية (SIRS)، والتي يمكن أن تسبب الوفاة في بعض الأحيان. ولذلك، لا تُعدّ هذه الآلية بشكلها الحالي آلية ملائمة لعلاج مرضى الهيموفيليا.

الآلية الثانية لنقل الجينات تتم باستخدام فيروسات «lentivirus»، ويجري حاليًا دراسة هذه الآلية من خلال عدد من الدراسات قبل السريرية لعلاج مرض الهيموفيليا. وتتميز هذه الفيروسات بقدرتها الفريدة على إدخال الجينات العلاجية إلى الخلايا الانقسامية وغير الانقسامية. وتعتبر سعة الناقل -أي حجم الجينات التي يمكن إدخالها إلى الخلايا- معقولة جدًا، حيث تصل إلى 8000 قاعدة. كما أن الاستجابة المناعية الطبيعية طفيفة. ويميز هذه الآلية أيضًا اندماجها الجيني بشكل مستقر، والذي يبدو عشوائيًا وغير مسرطن بطبيعته؛ ويتضح ذلك من الدراسات واسعة النطاق التي أجريت على نماذج حيوانية.

وأخيرًا، الآلية الثالثة لنقل الجينات؛ والتي تتم باستخدام الفيروس المرتبط بالفيروس الغدي (AAV). هذه صورة مجهرية إلكترونية تظهر العديد من الجزيئات الصغيرة لهذا الفيروس (يمكنكم رؤية جسم كبير لهذا الفيروس في وسط الصورة)، ويُستخدم هذا الناقل الفيروسي في جميع دراسات العلاج الجيني الحالية لمرض الهيموفيليا.

فيروس AAV -كما سأوضح لاحقًا- فيروس صغير للغاية يصيب البشر لكنه غير ممرض. يحتوي هذا الفيروس على جينوم DNA مفرد الشريط؛ كما هو موضح في أعلى الصورة (يبلغ حجمه 4700 قاعدة). يعتمد الفيروس على إنزيم بوليميراز لنسخ الحمض النووي، ويتألف الجينوم -الذي يحيط به من نهايته سلاسل طرفية متكررة ومقلوبة- من مجموعتين من الجينات (جينات التنسخ «Rep gene» وجينات القفيصة «Cap gene») تقومان بترميز البروتينات البنيوية وغير البنيوية. ويحفز هذا الناقل الفيروسي الحد الأدنى من الاستجابة المناعية. ويحتوي الفيروس على العديد من الأنماط المصلية المختلفة نظرًا لوجود اختلافات بين بروتينات القفيصة. تندمج نسبة ضئيلة من جينات الناقل الفيروسي في مجموعة الجينات المضيفة، ويبقى معظمها في صورة سلاسل دائرية مستقرة خارج الصبغية.

توضح هذه الشريحة بشكل أساسي كيفية تحويل جينوم AAV برّي النمط إلى جينوم علاجي منقول بفيروس AAV. عند إزالة جينات التنسخ «Rep gene» وجينات القفيصة «Cap gene»، ومن خلال المخطط المدرج أدناه، يمكنكم ملاحظة أن الجينوم المنقول بفيروس AAV أصبح يحتوي الآن على جينات علاجية (كما هو موضح على الجانب الأيمن) ومحفز أو تسلسل تنظيمي يحفّز التعبير الجيني في عضو أو نوع معين من الخلايا (وهذا المحفّز -الموضح على الجانب الأيسر- هو محفّز للكبد يعمل على تحفيز التعبير الجيني للكبد المنقول إلى خلايا الكبد؛ والتي تستهدفها جميع النواقل المستخدمة حاليًا لعلاج مرض الهيموفيليا). في الجزء



السفلي من الشريحة، يمكنكم ملاحظة أن حجم تسلسل الحمض النووي المتم المنقول يتراوح بين 1300 قاعدة تقريباً بالنسبة لعامل التختثر التاسع و4700 قاعدة بالنسبة لعامل التختثر الثامن محذوف النطاق ب؛ وذلك عند إزالة تسلسل ترميز النطاق ب.

كيف يمكن تصنيع الناقل الفيروسي AAV؟ حسناً، في الجزء العلوي من هذه الشريحة، يمكن رؤية تسلسل الحمض النووي المعدل جينياً مع تسلسلات ITR والموجودة عند الطرفين "5" و"3" للجين المنقول. ويوجد التسلسل المحفز والجين المعدل وراثياً في المنتصف، والذي يتم إدخاله بعد ذلك في قفيصة الناقل الفيروسي AAV لصنع جسيم ناقل، ثم يتم حقن هذا الجسيم في كبد المريض.

وتوضح هذه الشريحة هذه العملية بمزيد من التفصيل. وكما تلاحظون، فإن الجسيم يتفاعل مع غشاء الخلية المضيفة. وبالرغم من أن الناقل الفيروسي AAV يتفاعل بشكل جيد إلى حد ما مع أشكال معينة من المستقبلات، فإنه لا تزال هناك بعض الفجوات المعرفية بشأن ذلك. يندمج الجسيم بعد ذلك في الجزء الداخلي من الخلية. وفي نهاية المطاف، يتحرر الجسيم من داخل الخلية، ويتحلل بروتين القفيصة ويعبر عنه جينياً على سطح الخلية المحورة، ويبقى الحمض النووي المعدل وراثياً داخل النواة، حيث يبقى كسلاسل مستقرة خارج الصبغية أو يندمج في بعض الحالات داخل الحمض النووي للخلية المضيفة.

وهكذا، تشتمل عناصر إستراتيجية نقل الجينات على جينات علاجية بربية النمط وتسلسل حمض نووي متم للعامل التاسع المعدل أو تسلسل للعامل التاسع محذوف النطاق ب. وبالرغم من وجود دراسات يتم إجراؤها على استخدام الفيروسات البطيئة (Lentiviral) في نقل الجينات، إلا أن آلية توصيل الجينات المستخدمة حالياً تتم بالناقل الفيروسي AAV. ولتوصيل الجينات إلى الخلايا المضيفة، وهي الخلايا الكبدية في هذه الحالة، ينبغي معرفة المقاييس الدقيقة لنجاح هذه العملية. وتتضمن هذه العملية قياس مستويات عامل التختثر في البلازما وقياس معدلات النزيف السنوية واستهلاك العامل الثامن الخارجي من قبل المرضى. كما ينبغي بطبيعة الحال مراقبة العملية بأكملها لا اعتبارات تتعلق بالسلامة.

توضح هذه الشريحة مخطط بياني لـ "Gartner hype cycle" للعلاج الجيني. حسناً، لقد بدأ حدوث طفرة تكنولوجية في عقد السبعينيات من القرن الماضي، وبحلول الفترة بين عامي 1990-1995، أصبحنا نعتقد أن العلاج الجيني يمكنه إحداث طفرة علاجية هائلة، والواقع أن بعض أشكال اضطراب نقص المناعة الوراثية، مثل نقص إنزيم أدينوسين دي أميناز (ADA)، قد عولجت بالفعل عن طريق العلاج الجيني. ومع ذلك، فقد حدثت كارثة بحلول عام 1999، حيث توفي مريض يدعى جيسي جيسنجر كان يخضع للعلاج الجيني باستخدام فيروس غدي، وكان هذا الأمر محبطاً بالفعل وأدى إلى توقف تطوير إستراتيجيات العلاج الجيني في ذلك الوقت.

ومع ذلك فقد ساهمت العلوم الأساسية -خلال الفترة بين عامي 2000 إلى 2010- في تطوير النواقل الفيروسية وفهم ما يتعلق بالاستجابة المناعية بشكل أفضل؛ مما أحدث طفرة نوعية في العلاج الجيني. وقد بدأت هذه النقطة النوعية في عام 2010/2011 بعد نجاح أول دراسة سريرية مطوّلة لعلاج الهيموفيليا بالجينات. وهكذا، ونحن الآن في عام 2019، فإننا على وشك إجراء المراحل الثالثة لدراسات سريرية على العلاج الجيني لمرض الهيموفيليا أ والهيموفيليا ب.

توضح هذه الشريحة الأخيرة المستقبل الواعد لعلاج مرض الهيموفيليا بالجينات. ويبين الجزء العلوي من هذه الشريحة تأثير العلاج الإحلالي والعلاج غير الإحلالي وأدوية بدائل عوامل التختثر ذات فترة عمر النصف الطويلة على عملية وقف النزف، وعلى يمين الشريحة، يمكن رؤية تأثير العلاج الجيني. وفي الجزء السفلي من الشريحة، يمكن ملاحظة مستويات عامل التختثر داخل الدورة الدموية للجسم. وعلى يسار الشريحة، يمكن ملاحظة الحدود القصوى والدنيا لمستويات عامل التختثر والتي تتطابق مع التحسينات والانخفاضات التي تحدث في عملية وقف النزف؛ واختلاف هذه المستويات يرجع إلى اختلاف فترة عمر النصف للبروتينات في الدورة الدموية.

وقد تحسنت هذه المستويات بعد إنتاج أدوية ذات فترة عمر نصف طويلة، ويمكن ملاحظة ذلك من خلال المجموعة الثانية من البيانات التي توضح النتائج المتحققة في تحسين عملية إيقاف النزف والنتائج المتحققة في تحسين مستويات عوامل التخثر. ويظهر على يمين الشريحة نتائج استخدام العلاج غير الإحلالي، ويمكن ملاحظة عدم حدوث تحسن في مستويات عوامل التخثر، ويرجع ذلك إلى أن هذا النوع من العلاجات يعمل فقط على تحسين مستوى عملية إيقاف النزف، وهو ما يمكن ملاحظته في الجزء العلوي من المخطط البياني.

وعلى يمين الشريحة، يمكن ملاحظة ما يمكن تحقيقه باستخدام العلاج بالجينات. من المتوقع أن يعمل العلاج الجيني على رفع مستويات عوامل التخثر الفردية والعامل التاسع والعامل الثامن إلى مستويات علاجية هامة، وستكون هذه المستويات مستقرة بعد ذلك نظرًا لاستمرار تعبير الجينات العلاجية المنقولة عن هذه العوامل، وسيكون ذلك كافيًا أكثر من اللازم لخلق وقاية علاجية طويلة الأجل؛ مع الحاجة في أحيان نادرة لاستبدال عوامل التخثر المنقطة.

