جامعة حماة

كلية الصيدلة

السنة الخامسة

مقرر التقانة الحيوية

المحاضرة السابعة

اعداد : ابتسام جرجنازي

إشراف : د. ظلال قطان

العلاج الجيني Gene therapy

هو طريقة جديدة للعلاج ، تستخدم جينات أو قطع قصيرة من عدة نكليوتيدات كجزيئات علاجية بدلاً من المركبات الدوائية التقليدية.

هذه التقنية واسعة الاستخدام لعلاج الجينات المعطوبة التي تشارك في تطور المرض ، ويتضمن العلاج الجيني إدخال جين غريب أو أكثر لداخل الكائن الحي لعلاج خلل جيني موروث أو مكتسب .

في العلاج الجيني يتم وضع الـ DNA المشفر لبروتين علاجي داخل ناقل vector الذي يقوم بنقل الـ DNA لداخل الجسم ، وهكذا تتم معالجة المرض بأقل التأثيرات السمية عن طريق التعبير الجيني عن هذا الـ DNA المدخل بواسطة الآليات الخلوية.

بدأت أول محاولات إدخال الجينات الفعالة إلى جسم المرضى في الثمانينيات من القرن الماضي لعلاج أطفال مصابين بعوز مناعي مترافق وشديد severe combined immunodeficiency أو اختصاراً SCID ، ينجم هذا النمط من العوز المناعي من غياب فعالية إنزيم (ADA) Adenosine deaminase ، الضروري لعملية نضج كل اللمفاويات التائية و البائية في الغدة السعترية و نقي العظم . وينجم عن العوز في ADA غياب فعالية الجملة المناعية لدى المريض بذراعيها الخلوي والخلطي ، مؤدياً إلى سهولة تعرض المريض لإنتانات فيروسية و جرثومية شديدة قاتلة في معظم الأحيان .

أُدخل جين ADA السليم في جين أحد الفيروسات القهقرية retroviruses وتمت عدوى عدد من المرضى الأطفال بالفيروس المعدل جينياً، وبعد عشرة أشهر ظهرت النتائج المشجعة جداً ، حيث أن ممظم الأطفال المعالجين قد تحسنت الاستجابة المناعية لديهم تجاه العوامل الممرضة.

وبدا أن حقل المعالجة الجينية آخذ بالازدهار ، لكن بعد أقل من سنة تطور لدى عدد من الأطفال ابيضاضات دم سرطانيةة اتضح فيما بعد أن معظمها نتج عن انغراس جين الفيروس القهقري بقرب بعض الجينات المولدة للأورام oncogenes في جينات المرضى وتفعيلها، الأمر الذي أدى إلى تطور السرطانات لديهم.

كانت ضربة شديدة لحقل المعالجة الجينية وتوقفت الكثير من الأبحاث إثر ذلك ، لكنها استعادت ألقها بعد عقد من الزمن نتيجة الفعالية المتميزة التي أظهرتها المعالجات الجينية في الكثير من الدراسات

السريرية على مرضى مصابين بأعواز جينية مختلفة.

أهم الأمراض الوراثية التي تستهدف اليوم بالمعالجات الجينية :

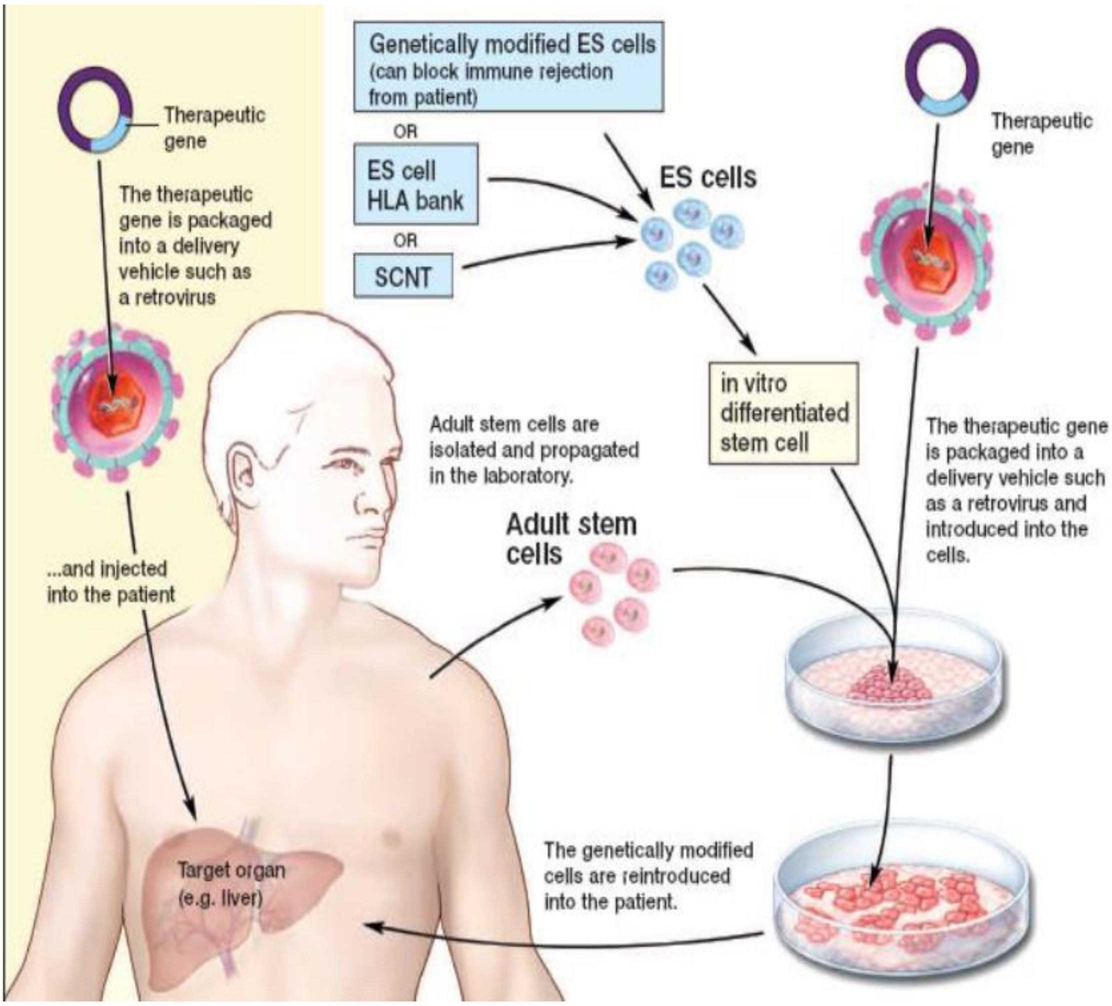
التليف الكيسي cystic fibrosis

الحثل العضلي muscular dystrophy

الناعور hemophilia

العمى الخلقي أو فقدان البصر الوراثي lebers congenital amaurosis

إضافة لذلك تستهدف المعالجة الجينية بعض الأمراض المكتسبة acquired diseases كالسرطان cancer والأمراض التنكسية العصبية neurodegenerative diseases والإيدز AIDS والتهاب الكبد HEPATITIS.



تقسم العلاجات الجينية إلى قسمين :

١- **المعالجة الجينية داخل العضوية in vivo gene therapy**: ويجري خلالها حقناً مباشراً لجسيمات الفيروس المعدل جينياً ضمن الكائن الحي الذي يعدي الخلايا بشكل مباشر ، ويجري التعبير عن الجين المنقولة ضمن الخلايا المستهدفة بالفيروس.

على سبيل المثال: جرى حقن الفيروس المرافق للفيروس الغدي adeno–associated virus الحامل لجين عامل التخثر التاسع في الوريد الكبدي البابي hepatic portal vein لدى عدد من المرض الناعور B ، حيث تم توجيه جسيمات الفيروس مباشرة إلى خلايا الكبد و أعدت الخلايا الكبدية التي شرعت بعد ذلك بأسابيع قليلة بالتعبير عن العامل التاسع وتصحيح العوز في هذا العامل لدى المرضى.

٢- **المعالجة الجينية خارج العضوية ex vivo gene therapy**:

تتضمن هذه المعالجة إخراج خلايا محددة من المريض و إكثارها في المختبر و من ثم إعادتها بالفيروس المعدل جينياً إلى المريض التي تقوم بالتعبير عن الجين المدخل داخل العضوية.

جرى في هذا الصدد الحصول على الخلايا الجذعية المولدة للدم hemotopoietic stem cells (HSCs) من دم مرضى SCID بعد تحريض انتقالها من نقي العظم إلى الدم ،

و أعيدت هذه الخلايا بفيروس قهقري حاو على جين ADA ومن ثم أعيدت إلى دم المريض ، استوطنت الخلايا المحقونة مرة أخرى نقي العظم لدى المرضى وشرعت بالتعبير عن الجين مما أدى إلى تحسن واضح في فعالية الجملة المناعية لديهم.

- الناقل المثالي يجب أن يكون قادراً على نقل الجين للخلية الهدف بكفاءة عالية ولهذا الغرض نستخدم:
- نواقل فيروسية مثل الفيروسات القهقرية والفيروسات الغدانية Adeno virus
- نواقل غير فيروسية مثل البلاسميدات .

<u>في الواقع هناك الكثير من قصص النجاح المثيرة للعلاج الجيني خارج العضوية من بين تلك :</u>

- التعديل الجيني خارج العضوية للخلايا التائية المساعدة التي يستهدفها فيروس الايدز ، بحيث تغير الخلايا من شكل أحد مستقبلاتها الغشائية الضروري لارتباط الفيروس به قبل الدخول إلى الخلية ، وبذلك يمكن استخراج الخلايا التائية المساعدة للمريض وتعديلها جينياً وإعادتها

إليه بحيث لا يتمكن الفيروس من عدواها حتى ولو كان متوافراً بتراكيز عالية في مصل المريض .

- ومن الأمثلة الممتعة أيضاً استخراج بعض الخلايا السرطانية من جسم المريض وتعديلها جينياً بحيث تعبر عن أحد عوامل النمو للخلايا التائية التي تكون مسؤولة عن القضاء على خلايا الورم ، وهكذا وبعد إعادة الخلايا السرطانية المعدلة جينياً تقوم هذه الخلايا نفسها بتفعيل الخلايا التائية التي تهاجمها مما يقوي الاستجابة المناعية ضد الورم.
- ولمدة ليست بعيدة اعترفت منظمة الطعام والغذاء الأمريكية FDA بثلاث علاجات جينية :

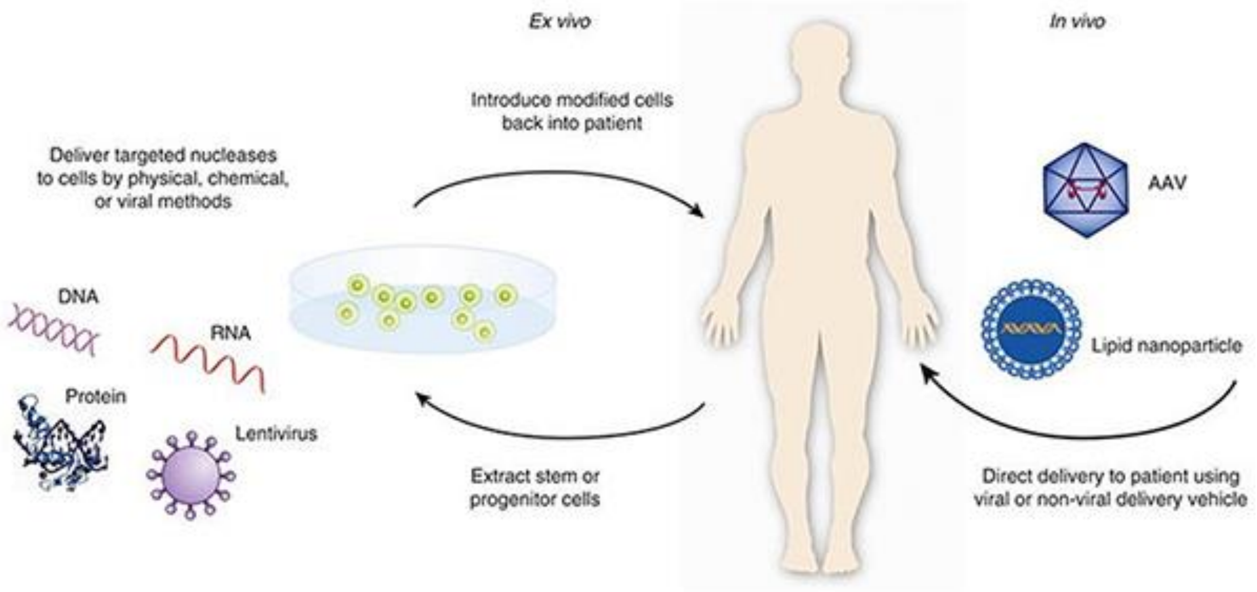
١. **Luxturan** صادقت عليه الـ FDA في ١٢/١٩/ ٢٠١٧ أول علاج جيني يستخدم لتصحيح الخلل الناجم عن طفرة وراثية في جين RPE65 الذي يتسبب بمرض فقد البصر الوراثي ، يعطى حقناً بالعين وتحديداً في منطقة شبكية العين مرة واحدة.

مرض فقد البصر الوراثي : اضطراب وراثي نادر ، حيث يؤدي اختلال وظائف شبكية العين إلى فقد البصر وغالباً من الولادة ، ويتفاوت مدى فقدان الرؤية من مريض لآخر إلا أنه يتصف بالشدة مع مقدرة قليلة على الرؤية إلى عدم القدرة تماماً، سببه طفرة وراثية في واحد من ١٨ جيناً منها جين RPE65 المنتج لأنزيم يلعب دوراً هاماً في الإبصار.

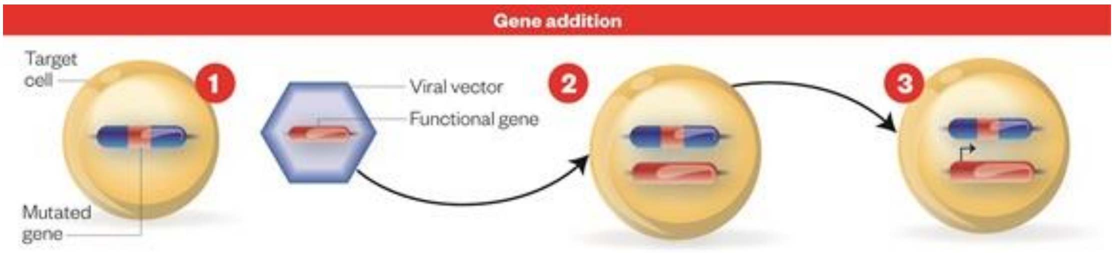
٢. **Kymriah** صادقت عليه الـ FDA بشهر آب ٢٠١٧. يستخدم كخط علاجي ثاني لمرضى سرطان اللمفاويات البائية الحاد والذين أبدوا انتكاساً بعد العلاجات التقليدية السابقة ، يعطى عبر التسريب الوريدي لمرة واحدة.
٣. **Lmlygic** صادقت عليه الـ FDA في تشرين الأول ٢٠١٥ لعلاج الورم الميلانيني (سرطان الجلد) يعطى حقناً تحت الجلد أو في موضع الورم ، عدة مرات .

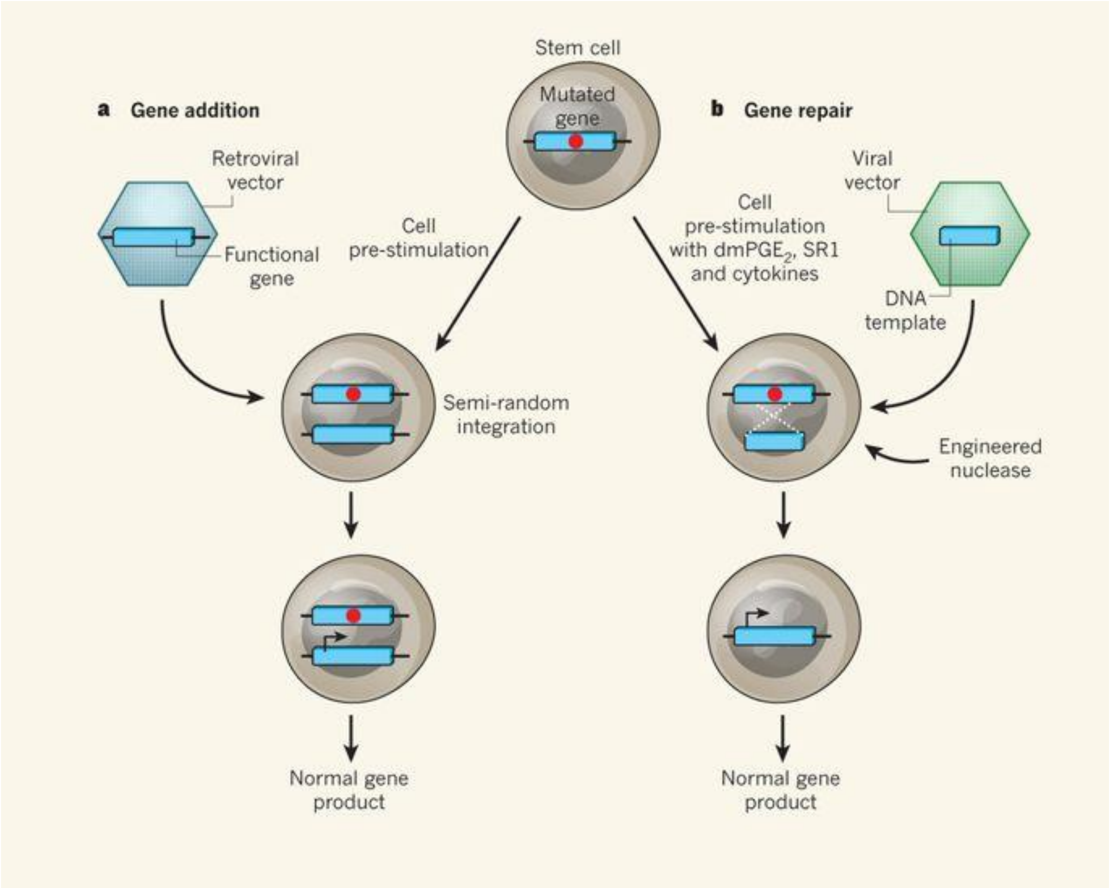
أما التطور الكبير خلال السنوات الماضية القليلة في ميدان المعالجة الجينية فلا يمكن فقط استبدال الجين الهدف المتضرر في خلايا المريض بل في قص الجين الهدف المتضرر واستبداله بالجين السليم ضمن الموقع الجيني ذاته داخل العضوية ، وتبرز هنا تقانات عدة تستخدم نواقل فيروسية معدلة جينياً تحتوي على الجين السليم إضافة إلى جين لإنزيم نوكلياز نوعي يقص ال DNA على أطراف الجين الهدف المتضرر ويستبدله بالجين السليم .

ويبدو أن لهذه التقانات الأخيرة مستقبلاً واعداً في تصحيح الطفرات الجينية سواء داخل العضوية أو خارجها .



يوضح الشكل المعالجة الجينية داخل وخارج العضوية ، يدخل الفيروس في المعالجة داخل العضوية مباشرة in vivo إلى جسم المريض ويؤدي إلى التعبير عن الجين الذي تحمله الخلايا المستهدفة ، بينما تستخرج الخلايا المستهدف في العلاج الجيني خارج العضوية ex vivo ويتم عدواها بالفيروس و من ثم نعيدها إلى داخل جسم المريض لتقوم بالتعبير عن الجين المنقول بالفيروس المعدل جينياً.





يوضح الشكل إضافة addition أو اصلاح repairing الجين الهدف المتضرر .

A) تمكن من إضافة جين سليمة خارج العضوية إلى خلية جذعية عبر ناقل فيروسي حيث تحتوي الخلية على النسخة الهدف المتضررة إضافة إلى النسخة السليمة المنقولة.

B) يقوم إنزيم النوكلياز الموجود ضمن نفس الناقل الفيروسي جنباً إلى جنب مع الجين السليم بقص الدنا على طرفي الجين الهدف المتضرر ، ومن ثم استبدال الجين السليم مكان الالهدف ، وبذلك تحتوي الخلية الجذعية فقط على النسخة السليمة من الجين.

من طرق المعالجة الجينية المستقبلية أيضاً:

تقانة كريسبر

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

التكرارات العنقودية المتناوبة منتظمة التباعد

- هل سمعت؟ هناك ثورة استرعت انتباه المجتمع العلمي بأكمله. خلال السنوات القليلة الماضية، قامت العديد من المعامل البحثية حول العالم باتباع تقنية جديدة تمكننا من إجراء تعديلات محددة على الحمض النووي للبشر والحيوانات والنباتات ومقارنة بالتقنيات السابقة فإن هذه التقنية تُعد الأسرع والأسهل. إنها تقنية "كريسبر – CRISPR"، لم تغير هذه التقنية طريقة البحث التقليدية فقط ولكنها غيرت مفهومنا عن كيفية معالجة الأمراض أيضًا.

- في البداية يجب أن نتطرق قليلًا إلى مفهوم الهندسة الوراثية لكي نفهم أهمية هذه التقنية وغيرها من التقنيات. إن الهندسة الجينية يُمكن وصفها بكل بساطة بأنها التلاعب في الجينات الخاصة بالكائنات الحية كإضافة جين معين إلى كائن بهدف تحسين صفات محددة أو إزالة جين آخر بهدف التخلص من مرض أو صفة غير مرغوبة في هذا الكائن. ومن أشهر الأمثلة على هذا هي البكتريا المُنتجة للأنسولين أو المحاصيل المُعدلة وراثياً. وعلى مر السنين أصبح هذا التطور العلمي مجالًا واسعًا للبحث والتطوير والاستفادة الطبية والصناعية.

أدوات ما قبل كريسبر

- هناك العديد من الطرق التي ظهرت منذ بداية اكتشاف مبادئ الهندسة الوراثية، ولكنها لم تكن مُناسبة بالشكل الكافي. ومن بعض هذه الطرق استخدام الفيروسات المُعدلة جينياً لإدخال جين مُحدد إلى الخلية الُمراد هندستها وراثيًا، لأن الفيروسات بطبيعتها تنقل المادة الوراثية الخاصة بها إلى الخلايا التي تُصيبها وتتكامل مع الحمض النووي الخاص بهذه الخلايا. ومن الطُرق

الأخرى أيضًا استخدام أنزيم يُسمى نيوكلييز أصبع الزنك (Zinc-finger nucleases) ولكن بسبب التكلفة العالية وصعوبة الهندسة، لم يتم استخدام هذه الطريقة بشكل واسع.

ما هو الكريسبر

- كلمة "كريسبر – "CRISPR هي اختصار لـ (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) أو بالعربية التكرارات العنقودية المتناوبة منتظمة التباعد. يُشير الاسم إلى تنظيم فريد من نوعه عبارة عن قطع صغيرة من تسلسلات قواعد الحمض النووي (DNA Sequences) موجودة بداخل الجينوم الخاص بالبكتيريا والأحياء الدقيقة ، تُعد هذه الظاهرة أحد أهم خطوط الدفاع في الجهاز المناعي لهذه الكائنات. تمامًا كالإنسان، يُمكن للفيروسات أن تغزو البكتيريا، ولكن حينها تواجه البكتيريا هذا العدو بالرجوع إلى هذه التتابعات من الحمض النووي المنتظمة التوزيع داخل حمضها النووي والمعروفة اختصارًا بكريسبر .

- وفي مجال الهندسة الجينية غالبًا ما يُشير مصطلح كريسبر إلى نظام كريسبر كاس-٩ (CRISPR-Cas9) الكامل، والذي يُمكن استخدامه لاستهداف مناطق معينة من الحمض النووي وتعديلها بدقة شديدة، ولذلك سيكون حديثنا حول هذا النظام.

كيف يعمل نظام (كريسبر كاس-٩ – CRISPR-Cas9)

- لتوضيح العملية بشكل أبسط، يتخلل التتابعات القصيرة الخاصة بكرسيبرات البكتيريا تتابعات أخرى قصيرة أيضًا تُسمى الفواصل(spacers)؛ هذه الفواصل هي أجزاء من الحمض النووي للفيروس الذي هاجم البكتيريا. تُعتبر هذه الفواصل هي الذاكرة الجينية للإصابات السابقة التي تعرضت لها البكتيريا، ولذلك فإنه عند إصابة البكتريا بفيروس سبق التعرض له وبالتالي حفظه في هذه الذاكرة، يتولى نظام كريسبر الدفاع عن الخلية وذلك عن طريق قطع والتخلص من أي DNA خاص بالفيروس يُشابه القطعة المحفوظة مُسبقًا في الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

- لتسهيل فهم الفكرة يُمكن تخيل نظام كريسبر على أنه نظام التعرف على الوجوه الذي تستخدمه الأجهزة الأمنية، فإذا اعتبرنا الفيروس هو مجرم تم تخزين صورته وحفظها في النظام، وبالتالي إذا مر هذا الشخص من جهاز التعرف مرة أخرى فإنه يتم في الحال التعرف والقبض عليه – في حالة كريسبر تدميره-.

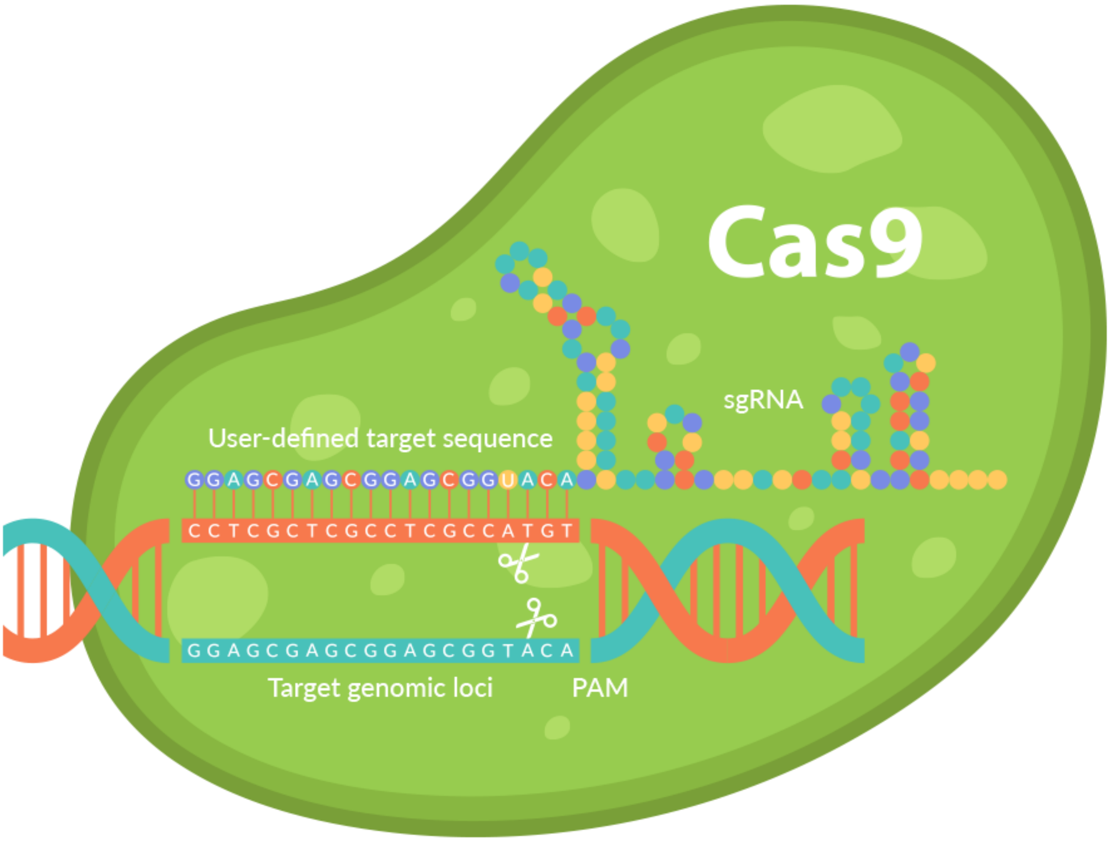
يعمل نظام كريسبر عن طريق الخطوات الأساسية الآتية:

- Adaptation وخلالها يتم مُعالجة الحمض النووي الخاص بالفيروس إلى قِطع أو تتابعات قصيرة يتم إدراجها في تسلسلات الكريسبر الخاص بالخلية كفواصل بين هذه التسلسلات.

- إنتاج الحمض النووي الريبوزي من كريسبر– Production of CRISPR RNA: تخضع تكررات الحمض النووي (CRISPR repeats)بالإضافة للمسافات (Spacers)إلى عملية النسخ ((transcription)، وهي عملية نسخ الـ DNAإلى RNA.وعلى عكس التركيب الحلزوني ثنائي السلسلة للـDNA، فإن جزي ال RNAالناتج يتكون من سلسلة واحدة فقط. تُقطع هذه السلسلة إلى أجزاء قصيرة تُسمى أحماض كريسبر النووية الريبوزية (CRISPR RNAs).

- الاستهداف – Targeting: تقوم (CRISPR RNAs)الناتجة بتوجيه نظام كريسبر للقضاء على المواد الفيروسية. ولأن تتابعات (CRISPR RNA)منسوخة في الأساس من الحمض النووي الخاص للفيروس؛ فإنها تتطابق كليًا مع الجينوم الخاص بالفيروس وتؤدي وظيفتها بشكل ممتاز كدليل للتعرف على التتابعات الفيروسية في البكتيريا.

- و بشكل أساسي يمكننا وصف مكونات نظام «كريسبركاس ٩» عن طريق مكّونين أساسيين ،هما: إنزيم «كاس٩» الأشبه بمقص جزيئي يقوم بقص الحمض النووي ،وجزيء صغير من الحمض النووي الريبي الذي يوجه المقص نحو تسلسل معين من الحمض النووي؛ ليقصه هو دون غيره ويُسمى ب "Guide RNA". (9)



استخدام تقنية كريسبر

- في عام ٢٠١٤، استخدم دانييل أنديرسن وزملاؤه بمعهد ماساتشوستس للتكنولوجيا في كمبريدج تقنية "كريسبر" في الفئران، بغرض تصحيح الطفرات المرتبطة بمرض أيضي يصيب البشر، يُسمى " زيادة التيروسين بالدم تايروسينيميا" .Tyrosinemiaوكان ذلك أول استخدام لتقنية "كريسبر" لإصلاح طفرة مسبِّبة للمرض في حيوان بالغ، وخطوة مهمة لاستخدامها في العلاج الجيني في البشر. وكشفت دراسة أندرسون الخطوات والمراحل المنتظرة، إلى جانب تسليط الضوء على قدرة هذه التقنية، وإمكانياتها.

- وخلال الأعوام الماضية، أُقيمت شركات لتطوير العلاج الجيني القائم على تقنية "كريسبر". ويرى أندرسون وآخرون أن التجارب الإكلينيكية الأولى لمثل هذا العلاجات قد تصبح واقعًا في

العام المقبل، أو خلال العامين المقبلين. وستكون هذه التجارب الأولية . على الأرجح . سيناريوهات، يمكن فيها حقن مكونات "كريسبر" مباشرة في الأنسجة، مثل الحَقْن في العين، أو نزع الخلايا من الجسم، وهندستها في المختبر، ثم إعادتها للجسم مرة أخرى. فعلى سبيل المثال.. من الممكن تصحيح الخلايا الجذعية التي تشكِّل الدم، لعلاج أعراض معينة، مثل أمراض فقر الدم المنجلي، أو الثلاسيميا .β–thalassaemiaوثمة تحدٍّ أكبر، يتمثل في إدخال الإنزيم والحمض النووي الريبي الإرشادي في العديد من الأنسجة الأخرى. وبرغم ذلك.. يأمل الباحثون في استخدام هذه التقنية يومًا ما؛ لعلاج عدد أكبر من الأمراض الوراثية.

- وقد استخدم علماء تقنية كريسبر في استهداف نوع معين من البعوض يُسمى « Anopheles gambiae»ويُعتبر الناقل الأساسي لمرض الملاريا. وتم استخدام تقنية الكريسبر في هذا البحث لتعمل كـ ((gene drive systems، الهدف منها حث الكائن المستهدف من وراثة جينات تُغير من صفات النوع أو الصنف بشكل كامل. في هذه الدراسة تم استهداف ثلاثة جينات مسؤولة عن صفة متنحية في أنثى هذه البعوضة تؤدي إلى إصابتها بالعقم، وفي الحالات الثلاثة تم مُلاحظة حدوث تغييرات قوية في كل من مواقع الجينات المستهدفة، وقُدرت نسبة انتقال التغيير الحادث ب (٩١.٤ إلى ٩٩.٦%). هذه النتائج قد تُعجل بتطوير (gene drives)قادرة على تخفيض تعداد البعوض بحيث لا يكون قادرًا على نقل مرض الملاريا.

- ولا يقتصر استخدام هذه التقنية على الطب فقط وإنما تُستخدم أيضًا في الزراعة، فقد استخدمه الباحثون في هندسة الخنازير الصغيرة، وفي صنع فصائل من القمح والأرز مقاوِمة للأمراض. وأحرز الباحثون كذلك تقدُّمًا في هندسة ماشية بلا قرون، وسلالات ماعز مقاوِمة للأمراض، وبرتقال حلو غني بالفيتامينات. بالإضافة لإمكانية استخدماها في هندسة الأنظمة البيئية.

مشروع الجينوم البشري

Human Genome Project (HGP)

من أضخم المشاريع التي تمت في مجال علم الوراثة والبيولوجيا الجزيئية والتي اعتمدت بشكل مباشر على تطوير تقنية سَلْسَلة الـ DNA.

بدأ العمل في هذا المشروع عام ١٩٩٠ و دام ١٣ عاماً أي أن سلسة الجينوم البشري اكتملت عام ٢٠٠٣.

بسبب ضخامة المشروع شاركت في إنجازه عدة دول ، أمريكا- بريطانيا – ألمانيا – فرنسا – اليابان – الصين.

الجينوم هو تتالي الـ DNA الكامل الموجود لدى المتعضية أو الكائن الحي مع كل ما يحتويه من مورثات ، مع العلم أن المورثات تمثل فقط حوالي ٢% منه أما باقي الجينوم فيتألف من تتاليات عير مشفرة للبروتين ، لكنها تحافظ على سلامة بنية الصبغيات وتنظم (متى وأين وبأية كمية) يجب أن يتم تصنيع البروتينات.

يقاس حجم الجينوم بعدد الأزواج (الأسس) Base pair (bps) ويقدر حجم الجينوم البشري بـ ٣ بليون زوج قاعدي، يختلف حجم الجينوم من كائن لآخر فأصغر حجم يعود لجينوم أحد الجراثيم ويقدر بـ ٦٠٠٠٠٠ زوج قاعدي، والأكبر هو للبشر والفأر.

الأهداف الأساسية لمشروع الجينوم البشري:

١- تحديد ومعرفة كل الجينات الموجودة في الجينوم البشري.

٢- تحديد التتالي الكامل للنكليوتيدات الموجودة في الجينوم البشري.

٣- حفظ هذه المعلومات في قاعدة بيانات للاستفادة منها من قبل الباحثين في هذا المجال.

أهم النتائج التي تم التوصل إليها بعد إتمام المشروع:

١- يقدر العدد الكلي للجينات عند الانسان بـ ٢٠٠٠٠-٢٥٠٠٠ جين (وصل التقدير إلى ٢٠٠٠٠٠٠ جين في بداية المشروع)

٢- يتألف الجينوم البشري من حوالي ٣ بليون نكليوتيد.

٣- يتشارك البشر بحوالي ٩٩.٩% من التتالي النكليوتيدي.

٤- يتألف الجين وسطياً من ٣٠٠٠ نكليوتيد إلا الجينات تختلف في أحجامها بشكل كبير حيث أن أكبر جين بشري حجماً معروف بـ اسم الديستروفين ويتكون من ٢.٤ مليون نكليوتيد.

٥- أكثر من ٥٠% من الجينات المكتشفة ماتزال وظائفها غير معروفة.

٦- أقل من ٢% من الجينوم مشفر للبروتينات وبالمقابل أكثر من ٩٨%منه غير مشفر .

أهم التطبيقات العملية للمشروع في المجالين العلاجي والتشخيصي على المستوى الجزيئي :

أ- التقدم في تشخيص الأمراض ذات الخلفية الوراثية مثل بعض السرطانات (الكولون و الثدي) مرض الزهايمر ، انفصام الشخصية والتوحد وداء السكري.

ب- إيجاد العلاقة بين الجينات والصفات السلوكية غير المرضية مثل الذكاء والشخصية والميول .

ت- الكشف المبكر عن الاستعداد الوراثي للإصابة بمرض معين.

ث- ترشيد اصطناع الدواء .

ج- العلاج الجيني .

ح- العلاج الدوائي على أساس جيني أو علم الجينات الدوائي.