

دکتر مریم اسلامی

پزشک و دکتری تخصصی ژنتیک

چرا ژن درمانی باید عاری از ویروس باشد؟

ژن درمانی‌ها در ارائه درمان‌های جدید برای بیماری‌های صعب‌العلاج پیشین پیشرفت چشمگیری داشته‌اند، اما همچنان گران‌ترین درمان‌های جهان هستند.

اکنون شرکت‌ها در حال جایگزینی ویروس در ژن درمانی با فناوری‌های انتقال جدید هستند که نه تنها بر محدودیت‌های ناقل‌های ویروسی غلبه می‌کنند، بلکه هزینه‌های تولید را نیز کاهش می‌دهند.

Moderna و Generation Bio در ماه آوریل با یکدیگر همکاری کردند تا ژن درمانی‌های غیر ویروسی برای کبد و بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی را در توافقی که بر اساس پلت فرم تحویل نانوذرات لیپیدی Generation Bio (LNP) ساخته شده است توسعه دهند.

این همکاری بخشی از یک روند رو به رشد برای مبادله ژن درمانی مبتنی بر ویروس با پلتفرم‌های نوکلئیک تحویل اسید نوکلئیک است که از هزینه‌های بالا و محدودیت‌های فنی ناقل‌های ویروسی فرار می‌کنند.

نانوذرات لیپیدی یا پروتئینی مهندسی شده، نانوحامل‌های مبتنی بر DNA و روش‌های جدید فیزیکوشیمیایی راه را به سوی داروهای ژنتیکی قابل مصرف مجدد نشان می‌دهند.

ناقل‌های مبتنی بر ویروس - به‌ویژه آنهایی که مبتنی بر ویروس‌های مرتبط با آدنو (AAV) و لنتی ویروس‌ها هستند - بر موج اول ژن‌درمانی‌ها برای کسب تأییدیه نظارتی غالب شده‌اند. اما استقرار گسترده آنها در ده‌ها آزمایش بالینی محدودیت‌های آنها را آشکار کرده است. آکین آکینک، مدیر عامل شرکت Aera Therapeutics، شرکتی که یک سیستم تحویل مبتنی بر نانوذرات پروتئینی را توسعه می‌دهد، می‌گوید: یکی از مسائل فقط زیست‌توده مورد نیاز برای تولید، به عنوان مثال، AAV در مقیاس و در دوزهای مورد نیاز برای نشانه‌های بزرگ است. بردارهای AAV به دلیل ظرفیت بسته‌بندی 4.7 کیلوبازی خود محدودتر می‌شوند. انتخاب ضعیف بافت؛ خطر سمیت کبدی؛ و ایمنی‌زایی که امکان مصرف مجدد را از بین می‌برد. ناقل‌های لنتی ویروسی و تا حدی ناقل‌های AAV نیز نگرانی‌های مربوط به سرطان‌زایی ناشی از یکپارچگی کروموزومی و جهش‌زایی درج را ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، خطر نظری ویروس‌های دارای قابلیت تکثیر که از رویدادهای نوترکیبی در طول تولید لنتی ویروسی پدید می‌آیند، نیاز به آزمایش گسترده در بیماران دارد.

برای ارائه یک جایگزین قابل دوام، فناوری‌های غیر ویروسی باید شرایط مشخصی را برآورده کنند. آنها باید محموله بزرگی را در خود جای دهند و آن را به اندام‌های خاص تحویل دهند، فاقد ایمنی زایی برای اجازه دوز مجدد و حاشیه ایمنی بالا و هزینه تولید پایین باشند. اگرچه بیشتر آنها هنوز در مرحله پیش بالینی هستند، اما این رشته در حال افزایش است.

در ماه‌های اخیر، Aera 193 میلیون دلار برای پیشرفت یک سیستم

پروتئین-نانوذرات مبتنی بر پروتئین‌های درون‌زا انسانی جمع‌آوری کرد.

اینها به طور خود به خود در ساختارهای کپسیدمانندی جمع می‌شوند که می‌توانند محموله اسید نوکلئیک را تحویل دهند.

Intergalactic Therapeutics قصد دارد سال آینده آزمایشات بالینی ژن درمانی

را آغاز کند که از الکتروپوریشن *in vivo* برای تحویل مولکول‌های DNA دایره‌ای و

بسته کووالانسی به سلول‌های شبکه استفاده می‌کند و ReCode Therapeutics

به تازگی با یک LNP نبولیزه شده وارد کلینیک شده است که mRNA کدکننده

پروتئین DNAI را به ریه‌های بیماران مبتلا به دیسکینزی مزگانی اولیه ناشی از جهش

در زنجیره میانی آکسونمال 1 دینئین (DNAI1) می‌رساند.

عرضه جهانی واکسن‌های ارزان قیمت مبتنی بر LNP mRNA COVID-19 نشان داده است که ساخت و تحویل میلیاردها دوز، از جمله دوزهای تکراری، حداقل یک شکل از اسید نوکلئیک امکان‌پذیر است. با این حال، بین تحویل mRNA به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن به صورت موضعی در عضله و تحویل DNA محصور شده با LNP یا سایر محموله‌ها به هسته سلول در بافت‌های هدف، چه در کبد، عضله، ریه، قلب یا سایر اندام‌ها، تفاوت اساسی وجود دارد در حالی که از تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی جلوگیری می‌کند. هدف‌گیری سلولی باید پیچیده‌تر باشد، در حالی که محموله DNA نیز ممکن است نیاز به اصلاح داشته باشد تا اطمینان حاصل شود که در هنگام ورود به سلول به طور مؤثر در هسته محلی سازی شده است.

به عنوان مثال، DNA انتهای بسته Generation Bio (ceDNA) دارای یک ساختار بسته کووالانسی برای مقاومت در برابر حمله هسته‌ای در سیتوپلاسم و دو تکرار انتهایی معکوس است که در کنار تراریخته‌ها و عناصر تنظیم‌کننده آن قرار دارند تا جذب هسته‌ای را افزایش دهند.

کبد مانع دیگری برای هر گونه ژن درمانی ارائه شده به صورت سیستمی است که برای آن اندام در نظر گرفته نشده است، زیرا ناقل‌های ویروسی و غیر ویروسی گردش خون را به طور یکسان، همراه با سایر ماکرومولکول‌ها و نانوذرات برون‌زا و درون‌زا پاک

می کند. دیوید لاکهارت، رئیس و CSO ReCode می گوید که مقصر اصلی، پروتئین سرم آپولیپوپروتئین E (ApoE) است. این ماده به طور بی رویه به LNP های در حال گردش یا سایر وسایل حمل کننده متصل می شود، و بیشتر آنها به کبد ختم می شوند، زیرا سرشار از گیرنده های لیپوپروتئین با چگالی کم با ApoE است.

برای ارسال مستقیم به اندام های مختلف، Recode پنجمین لیپید هدف گیری انتخابی عضو (SORT) را به ترکیب کلاسیک نانوذرات چهار لیپیدی اضافه می کند، رویکردی که توسط بنیانگذار شرکت، دانیل سیگوارت از مرکز پزشکی جنوب غربی دانشگاه تگزاس توسعه یافته است.

لاکهارت می گوید: این یک لیپید جادویی نیست. این لیپیدها به پروتئین های سرم خاصی متصل می شوند که گیرنده های آنها به شدت توسط سلول های هدف بیان می شود. بنابراین، افزودن لیپیدی که به پروتئین چسبنده ویترونکتین متصل می شود، تحویل به ریه را بهبود می بخشد، در حالی که لیپیدی که به $\beta 2$ گلیکوپروتئین 1 متصل می شود، تحویل به طحال را افزایش می دهد.

Generation Bio همچنین پنجمین لیگاند را به LNP های خود اضافه می کند تا از قاچاق پیش فرض به ماکروفاژهای ساکن در کبد و طحال جلوگیری کند، اما مکانیسم

با مکانیسم ReCode متفاوت است. متیو استانتون، CSO در Generation Bio می‌گوید: این یک تعامل مستقیم با گیرنده است. این شرکت هنوز جزئیات LNP های مخفی خود را منتشر نکرده است، اما ادعا می‌کند که می‌تواند از قاچاق پیش فرض به کبد و طحال، به ویژه به ماکروفاژهای ساکن آنها جلوگیری کند.

جوئل دی بیر یکی از بنیانگذاران CSO می‌گوید: ما یک ذره مرکب با عناصر هر کدام داریم. او می‌گوید بارگیری اگزوزوم‌ها با محموله‌های ژنتیکی دشوار است، اما می‌توان آن‌ها را به آسانی در خارج تغییر داد. آنها همچنین از نظر ایمنولوژیکی ساکت هستند، با توجه به وجود آنها در گردش خون و بافت‌های انسانی. او می‌گوید: مسئله LNP البته توزیع زیستی است. اما آنها حامل کارآمد اسیدهای نوکلئیک هستند. هدف این شرکت این است که از مزایای ترکیبی آنها در عین اجتناب از کاستی‌های آنها استفاده کند. وسایل نقلیه تحویل بر اساس مواد دیگر می‌توانند از همان ابتدا از موضوع قاچاق کبد جلوگیری کنند.

Code Biotherapeutics در حال توسعه یک نانوحامل مبتنی بر DNA است که هیچ حرکت ذاتی کبدی ندارد. فناوری آن شامل یک ساختار چند ظرفیتی است که با هیبریداسیون چندین رشته منفرد به مونومرهای دو رشته‌ای مونتاژ شده است، که

سپس برای تشکیل یک ذره پایدار به هم متصل می شوند. حداکثر 18 نسخه از یک محموله درمانی و 18 نسخه دیگر از یک قسمت هدف را می توان به صورت خارجی متصل کرد. برایان مک وی، مدیرعامل و یکی از بنیانگذاران Code می گوید: ما کنترل بسیار دقیقی بر نحوه ساخت آن داریم.

با این حال گزینه دیگر ساختن حامل ها از پروتئین های فاژ است. Gensaic از سه پروتئین کپسید از فاژ M13، ساکن میکروبیوم انسان، در نانوذرات مبتنی بر پروتئین استفاده می کند. لای اریسون، مدیرعامل این شرکت می گوید: این ذرات دارای یک تروپیسیم قبلی نیستند. سیستم مبتنی بر پروتئین به آسانی هم برای روش های مهندسی پروتئین، هم برای افزودن بخش های هدف گیری، و هم برای روش های غربالگری با کارایی بالا، برای شناسایی ذرات با ویژگی های مورد نظر، سازگار است. برنامه های این شرکت در مراحل اولیه باقی مانده است، اما تلاش ها برای دیستروفی عضلانی دوشن، فیبروز کیستیک و اختلالات سیستم عصبی مرکزی در حال انجام است.

رویکرد Aera همچنین شامل پروتئین هایی است که در بدن وجود دارد. آنها از عناصر رترو مانند رتروویروس های درون زانسانی و رتروترانسپوزون ها که درصد قابل توجهی از ژنوم انسان را تشکیل می دهند، مشتق شده اند.

Akinc مدیر عامل شرکت می گوید: با شروع با پروتئین های انسانی، خطر ایمنی کمتری را شروع می کنیم. بنیانگذار علمی فنگ ژانگ از موسسه Broad MIT و هاروارد یکی از این ذرات را بر اساس پروتئینی به نام PEG10 توصیف کرده است. جیسون شپرد از دانشگاه یوتا، نانوذره پروتئین دیگری را بر اساس پروتئینی به نام Arc که در مغز بیان می شود، به Aera عرضه کرده است. این شرکت فعالانه به دنبال دیگران است. آکینج می گوید: من معمولاً فکر می کنم که موارد بهتری وجود خواهند داشت. برای تولید، Aera بر خلاف فرآیند سلولی که ژانگ و همکارانش در گزارش اصلی خود توضیح دادند، از یک فرآیند بدون سلول استفاده می کند.

آکینک می گوید: ما می توانیم دقیقاً آنچه را که در مخلوط قرار می دهیم کنترل کنیم. این شرکت هنوز هیچ برنامه توسعه ای را فاش نکرده است، اما تمرکز اولیه آن بر روی RNA های تداخلی کوتاه مدت (siRNA)، mRNA و محموله های ویرایش ژن خواهد بود. او می گوید: «ما به تحویل DNA نیز علاقه مندیم.

انواع دیگر نانوذرات - به عنوان مثال مبتنی بر پلیمر - به طور پیش فرض به کبد منتقل نمی شوند، بنابراین توسعه دهندگان مجبور به مقابله با این مشکل نباشند.

شان کولاهان، مدیرعامل و یکی از بنیانگذاران Nanite می گوید: معمولاً آنها بر اساس بافت طراحی یا کشف می شوند. قوانینی که تعیین می کنند چرا یک ذره خاص به یک بافت خاص منتقل می شود، به طور کامل درک نشده اند و این شرکت در حال رسیدگی به این موضوع است. اگر دلیل آن را نمی دانید، نمی توانید آنها را به طور مؤثر طراحی کنید. این شرکت برای کشف فضای شیمیایی وسیع نانوذرات پلیمری، سنتز سریع و روش های محاسباتی را توسعه داده است. اخیراً از بنیاد سیستمیک فیبروزیس برای شناسایی نانوذرات مبتنی بر پلیمر مجهز به نفوذ در مخاط غلیظی که راه های هوایی بیماران را مسدود می کند و محموله mRNA را می رساند، کمک مالی دریافت کرده است.

برای کار خارج از بدن یا برای بافت هایی که به راحتی در دسترس هستند، دانشمندان ممکن است از ابزارهای فیزیکی شیمیایی استفاده کنند. به غیر از یکی از SQZ Biotech، که اکنون در تلاش برای سرپا ماندن است، اکثر ابزارها در حال توسعه پیش بالینی هستند، اگرچه آنها به کلینیک نزدیک تر می شوند.

Intergalactic از یک الکتروود سوزنی مانند اختصاصی برای تحویل مولکول های DNA دو رشته ای C3 خود به سلول های هدف استفاده می کند. اینها در شرایط آزمایشگاهی از کتابخانه های تراریخته و عناصر تنظیمی جمع آوری می شوند و سپس به

محصول نهایی در سلول‌های باکتریایی مهندسی شده ترکیب می‌شوند که سهولت ساخت و هزینه پایین کالا را تضمین می‌کند. محصول نهایی DNA کاملاً انسانی است و حاوی هیچ گونه توالی ویروسی یا باکتریایی نیست. در برنامه اصلی این شرکت، با هدف رتینوپاتی ABCA4، محلولی حاوی DNA با تزریق زیر شبکه تجویز می‌شود و سپس همان ناحیه در معرض یک میدان الکتریکی کم انرژی قرار می‌گیرد. روش به طور گسترده قابل اجرا است.

خوزه لورا، CSO بین کهکشانی، می‌گوید: هر بافتی که بتوان بیوپسی کرد، یک کاندید بالقوه برای تحویل [ژن] محلی است.

Avectas مستقر در Maynooth در ایرلند در حال توسعه یک روش جدید برای انتقال ژن *ex vivo* است که در آن سلول‌ها را به‌طور موقت در معرض یک اسپری حل‌کننده که حاوی اتانول و سایر مواد تشکیل‌دهنده است، قرار می‌دهد. این امر غشای سلولی را موقتاً نفوذپذیر می‌کند و به ماکرومولکول‌ها مانند اسیدهای نوکلئیک یا اجزای ویرایش‌کننده ژن اجازه عبور به سیتوپلاسم را می‌دهد. آزمایش‌های آزمایشگاهی روی سلول‌های T نشان می‌دهد که از نظر کارایی انتقال ژن با الکتروپوریشن برابری می‌کند، اما سلول‌های ترانسفکت‌شده اختلال کمتری در بیان ژن نشان می‌دهند.

جاستین مک کیو، مدیر ارشد فناوری در Avectas می‌گوید: در نهایت، این منجر به سلولی می‌شود که پتانسیل عملکرد بسیار بالایی دارد.

در نهایت، ادعای ژن درمانی ممکن است نیاز به بازبینی داشته باشد زیرا بیان تراریخته در طول زمان کاهش می‌یابد، و اگر درمان مبتنی بر ویروس باشد، ایمنی بالقوه به این معنی است که بیماران قادر به دریافت دوز دوم نخواهند بود. ذرات انتقال ژن غیر ویروسی که می‌توانند به طور قابل اعتمادی کمبود ایمنی زایی را نشان دهند، می‌توانند این مشکل را برطرف کنند. علاوه بر این، آنها همچنین می‌توانند معادله ایمنی را در طول توسعه بالینی تغییر دهند.

استانتون می‌گوید: مسئله این نیست که به حداکثر دوز قابل تحمل برسیم و ببینیم آیا مؤثر هستید یا خیر. او می‌گوید در عوض، توسعه‌دهندگان می‌توانند چندین "دوز قابل تحمل" را در طول زمان روی هم بگذارند، که به تیتراژ دوز خاص بیمار اجازه می‌دهد. و اگر آن نانوذررات نیز بتوانند از کبد فرار کنند و به اندام هدف خود برسند، کل تجربه ژن درمانی شبیه مصرف یک داروی بیولوژیک خواهد شد. ارائه این چشم انداز به زمان و تلاش نیاز دارد - اما اکنون در حال شکل‌گیری است.