



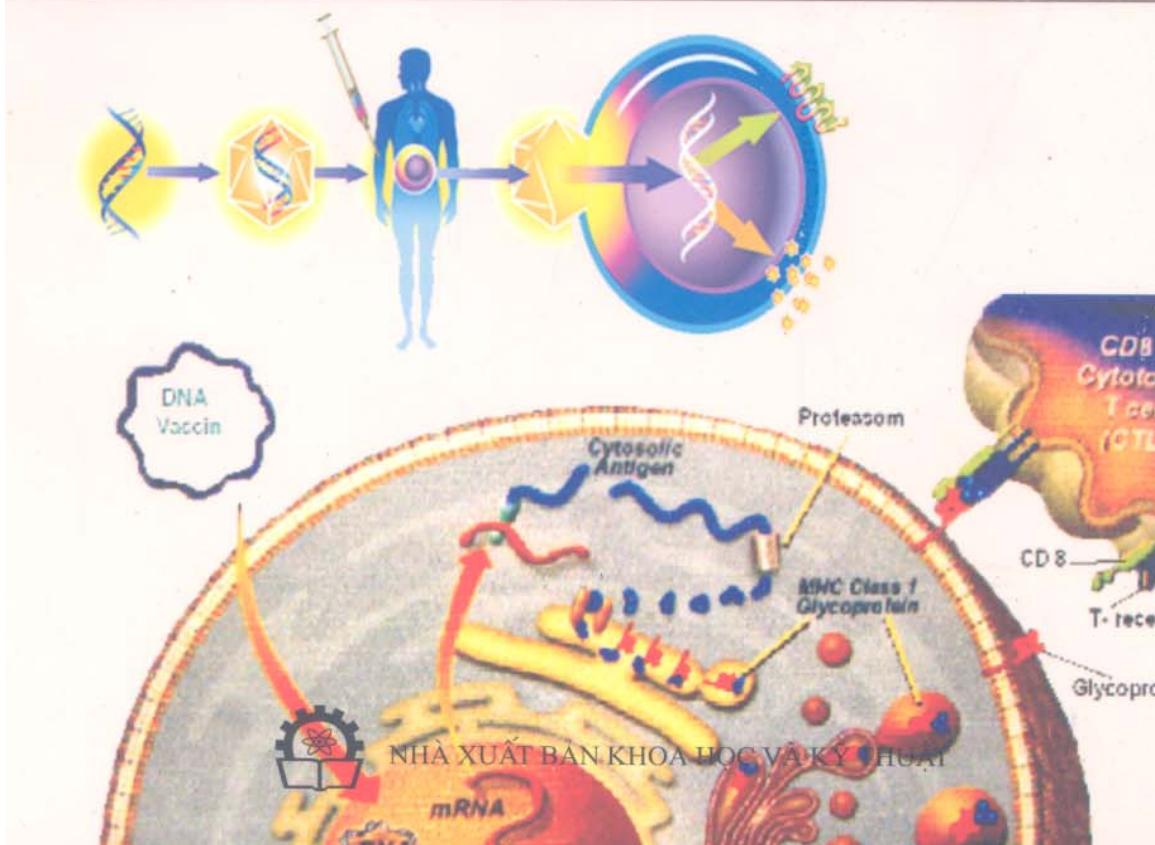
1956 - 2006

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI  
50 NĂM XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN

TS. KHUẤT HỮU THANH

# LIỆU PHÁP GEN

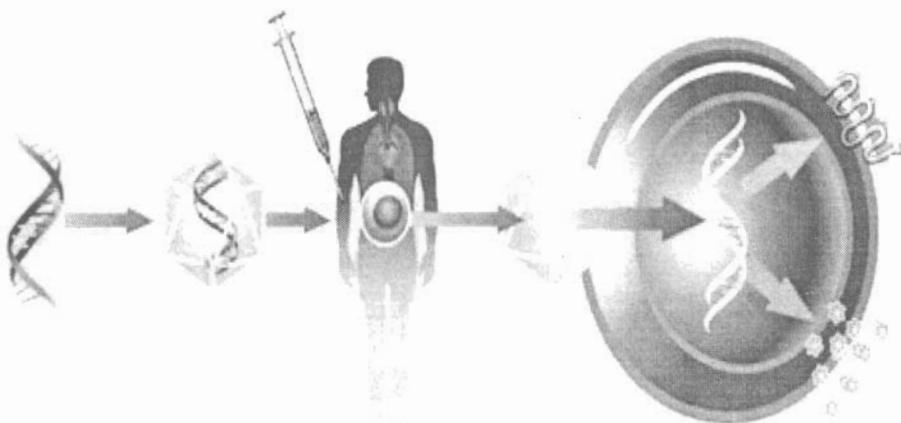
## NGUYÊN LÝ VÀ ỨNG DỤNG



TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

TS. KHUẤT HỮU THANH

# LIỆU PHÁP GEN NGUYÊN LÝ VÀ ỨNG DỤNG



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT  
HÀ NỘI

**5-57-57.040**  
**06-210-04**  
**KHKT-04**

## LỜI GIỚI THIỆU

*Liệu pháp gen hay phương pháp chữa bệnh bằng gen, là một hướng chữa bệnh mới của y- sinh học hiện đại. Liệu pháp gen tuy mới ra đời, nhưng đã có những kết quả rất tốt bước đầu, số lượng bệnh nhân được điều trị cũng như số loại bệnh được chữa trị bằng liệu pháp gen ngày càng tăng. Liệu pháp gen đặc biệt có hiệu quả cao với một số bệnh di truyền như bệnh thiếu hụt miễn dịch SCID, thiếu máu hình liềm, xơ nang, ung thư...vv...*

Tuy nhiên, điều trị bệnh bằng liệu pháp gen cũng còn một số hạn chế nhất định, khiến cho liệu pháp gen chưa được phổ biến rộng rãi.

Sách “**Liệu pháp gen - Nguyên lý và ứng dụng**” của TS. Khuất Hữu Thành cung cấp những kiến thức cơ bản, cập nhật và những thành tựu chủ yếu trong điều trị và chữa các loại bệnh di truyền, bệnh truyền nhiễm của liệu pháp gen.

Cuốn sách gồm 4 chương, cấu trúc một cách hợp lý từ giới thiệu chung về các chiến lược cơ bản trong chữa bệnh của liệu pháp gen, đến các nguyên lý và kỹ thuật của liệu pháp gen và một số thành tựu bước đầu của nó trong bệnh, đồng thời đưa ra vấn đề an toàn cũng như triển vọng của liệu pháp gen trong tương lai.

Sách “**Liệu pháp gen- Nguyên lý và ứng dụng**” là một tài liệu tham khảo bổ ích cho sinh viên các ngành công nghệ sinh học, y học... nhằm đáp ứng nhu cầu học tập của sinh viên ngành Công nghệ sinh học các Trường Đại học Bách khoa, Khoa học tự nhiên, cũng như sinh viên các ngành đại học khác.

Xin trân trọng giới thiệu cuốn sách cùng bạn đọc.

**GS. TSKH. Lê Văn Nhương**  
CHỦ TỊCH HỘI CÔNG NGHỆ SINH HỌC VIỆT NAM

## LỜI NÓI ĐẦU

*Liệu pháp gen hay phương pháp chữa bệnh bằng gen và "thuốc gen" là một phương pháp chữa bệnh mới, đã góp phần điều trị và chữa khỏi một số bệnh do rối loạn di truyền, bệnh nan y như: thiếu máu hồng cầu liêm, ung thư, máu khó đông, xơ nang... Tính đến cuối năm 2003 đã có hàng nghìn bệnh nhân được điều trị bằng liệu pháp gen. Trong đó, gần 69 % chữa các bệnh ung thư, 18% điều trị các bệnh rối loạn di truyền, 9 % điều trị cho bệnh nhân mắc các bệnh truyền nhiễm và bệnh HIV/AIDS...*

*Liệu pháp gen đã trở thành một lĩnh vực thu hút sự quan tâm nghiên cứu của nhiều nhà khoa học, các bác sĩ và ngày càng được sử dụng nhiều hơn trong điều trị và chữa bệnh cho con người.*

*Liệu pháp gen là gì ? Điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen có an toàn không ? Tại sao điều trị liệu pháp gen chưa được phổ biến ? Ở nước ta có thể ứng dụng liệu pháp gen trong chữa bệnh hay không ? ....*

*Để gộp phần làm sáng tỏ những vấn đề trên, đồng thời đáp ứng nhu cầu học tập của sinh viên, chúng tôi biên soạn cuốn sách **Liệu pháp gen - Nguyên lý và Ứng dụng**. Cuốn sách nhằm mục đích cung cấp những kiến thức cơ bản của kỹ thuật gen, cơ sở khoa học của liệu pháp gen trong chữa bệnh cho con người. Sách được sử dụng làm tài liệu học tập hoặc tham khảo cho sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh... thuộc các ngành Công nghệ sinh học, Sinh học, Y học, Nông nghiệp và bạn đọc quan tâm đến lĩnh vực ứng dụng "thuốc gen", "viên gen" trong chữa bệnh.*

*Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. TSKH. Lê Văn Nhương, PGS.TS. Đặng Hữu Lanh, PGS. Lê Ngọc Tú đã nhận xét và đóng góp những ý kiến quý báu. Xin chân thành cảm ơn các bạn đồng nghiệp tạo điều kiện hoàn thành cuốn sách. Trong quá trình biên soạn chắc chắn không thể tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi mong muốn nhận được nhiều ý kiến đóng góp của bạn đọc và đồng nghiệp.*

*Xin chân thành cảm ơn các ý kiến đóng góp của bạn đọc.*

**TS. Khuất Hữu Thành**  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

## MỤC LỤC

	Trang
Lời giới thiệu	3
Lời nói đầu	4
Mục lục	5

### **Chương 1. LIỆU PHÁP GEN**

I. Liệu pháp gen là gì ?	11
1. Khái niệm liệu pháp gen	11
2. Nguyên tắc cơ bản của điều trị bệnh bằng liệu pháp gen	14
II. Các lĩnh vực ứng dụng chủ yếu của liệu pháp gen	16
1. Liệu pháp gen trong điều trị các bệnh do rối loạn di truyền (inherited disorders)	16
2. Liệu pháp gen chữa các bệnh do nhiễm trùng	17
III. Các chiến lược cơ bản của liệu pháp gen	17
IV. Lược sử nghiên cứu và phát triển của liệu pháp gen	18

### **Chương 2. NGUYÊN LÝ VÀ KỸ THUẬT CƠ BẢN CỦA LIỆU PHÁP GEN**

I. Nguyên lý của liệu pháp gen	21
1. Gen liệu pháp và tách dòng gen liệu pháp	21
2. Các loại vectơ thường sử dụng trong liệu pháp gen	23
2.1. Vectơ chuyển gen có bản chất virus	24
2.1.1. Vectơ adenovirus	26
a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của adenovirus	26
b. Nguyên lý thiết kế vectơ adenovirus	27
c. Cơ chế hoạt động của vectơ adenovirus	28
2.1.2. Vectơ retrovirus	30
a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của retrovirus	30
b. Nguyên lý thiết kế vectơ retrovirus	32
c. Cơ chế hoạt động của vectơ retrovirus	34

2. 1. 3. Vectơ Adeno -Associated Virus (AAV)	35
a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của vectơ AAV	35
b. Nguyên lý thiết kế vectơ AAV	36
c. Cơ chế hoạt động của vectơ AAV	38
2. 1. 4. Vectơ Herpes Simplex Virus (HSV)	39
a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của vectơ HSV	39
b. Nguyên lý thiết kế vectơ HSV	40
c. Cơ chế hoạt động của vectơ HSV	41
2. 1. 5. Các loại vectơ liệu pháp có nguồn gốc từ các loại virus khác	42
2. 2. Các vectơ không có bản chất virus	43
2. 2. 1. Liposom là vectơ liệu pháp gen	43
a. Liposom	43
b. Nguyên lý thiết kế vectơ liệu pháp gen liposom	45
c. Cơ chế hoạt động của vectơ liposom	47
2. 2. 2. DNA trần là vectơ liệu pháp gen	48
a. Đặc điểm của vectơ DNA trần	48
b. Ứng dụng vectơ DNA trần trong liệu pháp gen	49
2. 2. 3. Phôi tủy-DNA là vectơ liệu pháp gen	49
a. Đặc điểm của vectơ phôi tủy-DNA	49
b. Hoạt động và ứng dụng của vectơ phôi tủy-DNA	50
c. Ưu điểm và hạn chế của vectơ phôi tủy-DNA	52
2. 2. 4. Vectơ liệu pháp gen là oligonucleotid	53
a. Đặc điểm của vectơ oligonucleotid	53
b. Hoạt động và ứng dụng của vectơ oligonucleotid	53
2. 2. 5. Một số loại vectơ liệu pháp gen khác	55
II. Các kỹ thuật cơ bản của liệu pháp gen	56
1. Các phương pháp chuyển gen thường sử dụng trong liệu pháp gen	57
1. 1. Phương pháp chuyển gen ngoài cơ thể sống ( <i>ex vivo</i> )	57
1. 2. Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào cơ thể sống ( <i>in vivo</i> )	59
2. Một số kỹ thuật thường sử dụng trong liệu pháp gen	60

2.1. Kỹ thuật vi tiêm (micro-injection)	60
2.2. Kỹ thuật điện xung (electroporation)	60
2.3. Kỹ thuật bắn gen (gene gun)	61
2.4. Kỹ thuật liposom (liposom technique)	63
2.5. Kỹ thuật viên gen (gene pill)	64
2.6. Một số kỹ thuật khác trong liệu pháp gen	65
3. Một số xu hướng chữa bệnh bằng liệu pháp gen	66
3.1. Thay thế gen liệu pháp vào vị trí gen hỏng	66
3.2. Tăng cường hoặc hỗ trợ hoạt động của gen	66
3.3. Sửa chữa gen	67
3.4. Ức chế tế bào đích	68
3.5. Tiêu diệt tế bào đích	69

### **Chương 3. ỨNG DỤNG LIỆU PHÁP GEN TRONG CHỮA BỆNH**

I. Liệu pháp gen chữa bệnh thiếu hụt miến dịch tổ hợp trầm trọng (SCID)	71
1. Rối loạn chức năng gen là nguyên nhân của bệnh SCID	71
2. Liệu pháp gen chữa bệnh ADA- SCID	72
3. Liệu pháp gen chữa bệnh X- SCID	74
II. Liệu pháp gen chữa bệnh ung thư	75
1. Cơ sở di truyền của bệnh ung thư	76
2. Liệu pháp gen chữa bệnh ung thư	79
2.1. Vài nét về tình hình mắc bệnh ung thư ở người	79
2.2. Sử dụng liệu pháp gen trong điều trị bệnh ung thư	80
2.2.1. Các loại vectơ liệu pháp sử dụng trong điều trị ung thư	81
2.2.2. Các xu hướng cơ bản điều trị ung thư bằng liệu pháp gen	83
2.2.3. Điều trị ung thư ở người bằng vectơ Paramyxovirus	85
2.2.4. Liệu pháp gen điều trị ung thư ở người bằng gen p53	85
III. Liệu pháp gen chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liềm	86
1. Nguyên nhân gây bệnh thiếu máu hồng cầu liềm	86
2. Các xu hướng chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liềm	89
3. Chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liềm bằng liệu pháp gen	91

3.1. Vectơ liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh SCA	91
3.2. Các bước điều trị bệnh SCA bằng liệu pháp gen	92
<b>IV. Liệu pháp gen chữa bệnh xơ nang</b>	<b>93</b>
1. Khái niệm về bệnh xơ nang (CF)	93
2. Đặc điểm di truyền của bệnh xơ nang	94
3. Liệu pháp gen điều trị bệnh xơ nang ở người	96
3.1. Các liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh xơ nang	96
3.2. Các loại vectơ sử dụng trong điều trị bệnh xơ nang	97
3.3. Xu hướng điều trị bệnh CF ở người trong tương lai	99
<b>V. Liệu pháp gen chữa HIV/ AIDS</b>	<b>99</b>
1. Virus HIV và hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phai AIDS	99
2. Các xu hướng điều trị nhiễm HIV/AIDS bằng liệu pháp gen	102
3. Một số liệu pháp gen điều trị HIV/AIDS	103
3.1. Phòng chống HIV/AIDS bằng gây ức chế hoạt động gen của HIV, hoặc biến đổi gen của HIV	103
3.1.1. Vectơ liệu pháp trong phòng và chữa HIV/AIDS	103
3.1.2. Sử dụng Oligo-antisense và ribozyme trong phòng chống HIV	105
3.2. Phòng chống HIV/AIDS bằng tăng cường miễn dịch tế bào	108
3.2.1. Chiến lược sử dụng gen dội biến Rev 10	108
3.2.2. Chiến lược sử dụng gen tăng cường hoạt động của các gen cytokin	108
3.2.3. Chiến lược sử dụng các gen tự tử và gen độc tố	109
3.3. Vaccin DNA trong điều trị HIV/AIDS	110
<b>VI. Liệu pháp gen chữa một số bệnh khác</b>	<b>111</b>
1. Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ (DMD)	111
1.1. Cơ sở di truyền của bệnh teo cơ	111
1.2. Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ	112
2. Liệu pháp gen chữa bệnh máu khó đông (Hemophilia)	113
2.1. Cơ sở di truyền của bệnh máu khó đông	113
2.2. Liệu pháp gen chữa bệnh máu khó đông	114

---

3. Bệnh rối loạn chuyển hóa Cholesterol gia đình di truyền (Familial Hypercholesterolemia)	114
--	-----

#### **Chương 4. VẤN ĐỀ AN TOÀN CỦA LIỆU PHÁP GEN**

I. Vài nét về an toàn sinh học	116
II. Vấn đề an toàn của liệu pháp gen	118
1. Hiện trạng và những rủi ro của điều trị liệu pháp gen	118
2. Ví dụ về trường hợp rủi ro sau điều trị liệu pháp gen và vấn đề an toàn của liệu pháp gen	119
2.1. Cái chết của Jese Gelsinger sau điều trị liệu pháp gen	119
2.2. Liệu pháp gen có an toàn không?	119
III. Một số điểm hạn chế của liệu pháp gen	120
1. Tại sao hiện nay liệu pháp gen chưa được ứng dụng rộng rãi trong chữa bệnh?	120
2. Triển vọng của liệu pháp gen ở Việt Nam	121
TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH	122

# Chương 1

## LIỆU PHÁP GEN

### I. LIỆU PHÁP GEN LÀ GÌ ?

#### 1. Khái niệm liệu pháp gen

Liệu pháp gen (Gene therapy - GT) thực chất là phương pháp chữa bệnh bằng gen, hay bằng “thuốc gen”. Có nhiều khái niệm khác nhau về liệu pháp gen, có thể hiểu một cách chung nhất: liệu pháp gen là tập hợp các biện pháp để sử dụng các gen cần thiết (còn gọi là gen liệu pháp) nhằm mục đích chữa bệnh cho con người.

##### 1.1. Khái niệm gen liệu pháp

Gen liệu pháp (Therapeutic gene) là thuật ngữ để chỉ các gen có chức năng, có thể sử dụng vào mục đích điều trị và chữa bệnh cho con người. Mỗi loại gen liệu pháp có các đặc điểm và chức năng khác nhau. Gen liệu pháp có thể là:

- Các gen hoạt động bình thường (còn gọi là gen lành) có thể đưa vào tế bào sống để thay thế các gen hỏng, gen mất chức năng, khôi phục hoạt động bình thường của tế bào và sự sống của cơ thể.

- Là những gen có khả năng mã hóa một protein đặc hiệu, khi đưa vào tế bào sống có thể tạo nên các loại protein đặc hiệu. Các loại protein đặc hiệu có thể ức chế hoạt động của một gen khác trong tế bào, kìm hãm khả năng phân chia của tế bào hoặc gây chết các tế bào bị bệnh.

- Những gen khi đưa vào tế bào hoạt động đồng thời với các gen bệnh (gen bị đột biến trong tế bào), làm hạn chế tác động của gen bệnh hoặc hỗ trợ, bù đắp cho các gen bị hỏng.

- Gen liệu pháp còn là “các gen bị bất hoạt” được đưa vào tế bào thay thế cho một gen lành nào đó, nhằm hạn chế sản phẩm không cần thiết của gen lành hoặc tạo ra cho tế bào một trạng thái mới, có tác động chống lại bệnh tật

- Gen liệu pháp có thể là những đoạn Oligo nucleotid, có tác động kìm hãm hoạt động của gen bị hỏng, bị đột biến trong tế bào.....

Ngày nay, với sự phát triển của khoa học công nghệ, sự phát triển của y sinh học phân tử các chiến lược của liệu pháp gen ngày càng nhiều, khái niệm gen liệu pháp ngày càng được mở rộng, ngày càng có nhiều loại gen liệu pháp mới có hiệu quả cao được sử dụng trong chữa bệnh cho con người.

## *1.2. Các loại liệu pháp gen*

Liệu pháp gen (Gene therapy) là tập hợp các kỹ thuật đưa gen liệu pháp (gen lành hay gen cần thiết) vào tế bào người bệnh để thay thế, sửa chữa, kiềm chế gen bị hỏng hoặc phục hồi các gen bị hỏng (bị lỗi, bị sai lệch), nhằm mục đích bù đắp hoặc cung cấp chức năng của các gen bị hỏng và có thể chữa các bệnh do rối loạn di truyền. Liệu pháp gen có thể sử dụng một gen để kiểm soát sự gia tăng quá mức sản phẩm của gen nào đó trong tế bào, đồng thời tạo nên những chức năng mới giúp tế bào chống lại sự xâm nhiễm của các tác nhân gây bệnh, từ đó giúp cơ thể người bệnh phục hồi hoặc hạn chế tác động của bệnh tật.

Liệu pháp gen là một ngành khoa học mới, thời gian phát triển còn rất ngắn. Liệu pháp gen đã đạt được những thành tựu to lớn, mở ra một tương lai tốt đẹp trong điều trị bệnh tật, bảo vệ sức khỏe con người. Tuy nhiên, do kỹ thuật đưa một gen lạ vào tế bào và cơ thể người rất phức tạp, con người chưa làm chủ được hoàn toàn vị trí gắn của gen mới, nên có thể gây hiện tượng gen liệu pháp gắn vào bộ gen sai vị trí. Các sai lệch này có thể gây ra những hiệu quả không mong muốn, như một số ít trường hợp gen liệu pháp tạo một sản phẩm gây kích hoạt các gen tiền ung thư, gen lão hóa, hoặc gây đột biến ở một gen khác ....

Sử dụng liệu pháp gen trong điều trị cần tuân thủ một cách nghiêm ngặt các nguyên tắc cơ bản và các bước thực hiện, để có thể phát huy được ưu điểm của liệu pháp gen trong chữa bệnh, hạn chế các hiệu quả không mong muốn, bảo vệ sức khoẻ con người.

Với thành công trong dự án bộ gen của người (Human Genome Project), con người đã có những hiểu biết cơ bản về cấu trúc và sự sắp xếp các gen trong bộ gen người, tạo cơ sở khoa học cho sự tìm hiểu nguồn gốc của một số bệnh do rối loạn di truyền, bệnh do gen hỏng gây nên, cũng như hiểu biết cơ chế di truyền của rất nhiều bệnh từ thế hệ này sang thế hệ khác. Sự hiểu biết cặn kẽ cấu trúc bộ gen người là cơ sở thúc đẩy sự phát triển của liệu pháp gen trong điều trị nhiều loại bệnh, đặc biệt là các bệnh hiểm nghèo mang lại cuộc sống góp phần bảo vệ sức khoẻ con người.

Liệu pháp gen, hay chữa bệnh bằng gen được chia ra làm hai nhóm phương pháp cơ bản là liệu pháp gen soma và liệu pháp gen giao tử (còn gọi là liệu pháp gen tế bào mầm).

Liệu pháp gen soma (Somatic Gene Therapy) là phương pháp điều trị thay thế hoặc sửa chữa các gen hỏng, gen bệnh của các tế bào soma trong cơ thể người bệnh, giúp người bệnh có thể có cuộc sống bình thường. Liệu pháp gen soma có thể sử dụng một số loại tế bào như: tế bào lympho (lymphocyte), nguyên bào sợi (fibroblast), tế bào gốc (Stem cells), tế bào gan (hepatocyte), tế bào biểu bì (keratinocyte) ... Liệu pháp gen soma đến nay đã chữa và điều trị khỏi hoặc hạn chế biểu hiện bệnh cho một số lượng tương đối lớn người bệnh, với nhiều loại bệnh hiểm nghèo như: thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID), ung thư, thiếu máu hồng cầu liêm, u xơ nang ...

Liệu pháp gen tế bào mầm (Germline Gene Therapy) là phương pháp điều trị, sửa chữa hoặc thay thế gen hỏng cho các giao tử (tinh trùng hoặc tế bào trứng) nhằm tạo ra thế hệ sau bình thường. Liệu pháp gen tế bào mầm hiện nay còn là vấn đề đang được tranh luận ở nhiều nước trên thế giới, chủ yếu vì lý do đạo đức và nhân đạo như vấn đề nhân bản người.

Với mục đích trọng tâm của mọi nghiên cứu, của mọi ngành khoa học là vì sức khoẻ và hạnh phúc con người. Trong tương lai với sự phát triển ngày càng cao của khoa học kỹ thuật, chắc chắn liệu pháp gen nói chung và đặc biệt liệu pháp gen tế bào mầm, sẽ ngày càng phát triển đem lại lợi ích thiết thực cho con người.

Liệu pháp gen là một trong những phương pháp điều trị bệnh tật mới có hiệu quả cao, nhưng hiện nay liệu pháp gen còn là phương pháp điều trị phức tạp, tốn kém, đòi hỏi phương tiện kỹ thuật hiện đại. Do vậy, đến nay ứng dụng liệu pháp gen trong chữa bệnh còn hạn chế, chỉ mới điều trị và chữa bệnh cho một số bệnh nhân có điều kiện ở những nước phát triển. Liệu pháp gen ở những nước nghèo, nước kém phát triển mới chỉ dùng lại ở những thử nghiệm, điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen là mong muốn trong tương lai.



Hình 1.1. Sơ đồ các bước cơ bản của liệu pháp gen somatic.

## 2. Nguyên tắc cơ bản của điều trị bệnh bằng liệu pháp gen

Điều trị bệnh cho con người bằng liệu pháp gen cần tuân thủ các quy định của Tổ chức Y tế Thế giới WHO và các quy định cụ thể của từng quốc gia. Chẳng hạn, ở Mỹ một bệnh nhân trước khi được điều trị bằng liệu pháp gen phải qua các

thủ tục: gửi hồ sơ đầy đủ về bệnh nhân và liệu pháp gen cụ thể sẽ sử dụng trong điều trị đến Viện Y tế Quốc gia - NIH (National Institutes of Health), sau khi đã được sự đồng ý của giám đốc NIH, hồ sơ được chuyển đến Viện Thẩm định Quốc gia (Institutional Review Board- IRB), sau đó qua sự kiểm duyệt của Hội đồng An toàn Sinh học Quốc gia (Institutional Biosafety Committee – IBC). Khi hồ sơ đã qua các cấp thẩm định và được cấp phép, các bệnh viện mới được thực hiện điều trị bằng liệu pháp gen.

Để liệu pháp gen thực sự hiệu quả trong điều trị và chữa bệnh cho con người, giám thiểu các hậu quả không mong muốn, ngoài nấm vũng bệnh tật cũng như tiến triển bệnh tật của bệnh nhân, cần tuân thủ một số nguyên tắc cơ bản sau:

- Theo dõi và hiểu biết cẩn kẽ quá trình phát triển bệnh và cơ chế bệnh học, đặc biệt chú ý đến đặc tính di truyền của bệnh do một gen hay nhiều gen gây nên.

- Nắm được cấu trúc và chức năng của gen gây bệnh (gen bị hỏng, bị đột biến) và vị trí có thể có của các gen gây bệnh trong bộ gen, đồng thời nắm vững cấu trúc, chức năng của các gen liệu pháp được sử dụng trong điều trị bằng liệu pháp gen.

- Dự đoán trước hiệu quả chữa bệnh bằng liệu pháp gen, chỉ áp dụng điều trị trong trường hợp có hiệu quả cao.

- Theo dõi và kiểm tra chặt chẽ hoạt động và biểu hiện gen mới trong các thử nghiệm trên động vật và kiểm tra sự đáp ứng miễn dịch tế bào trong cơ thể động vật thử nghiệm

- Một liệu pháp gen cần được thử nghiệm trên động vật nhiều lần có kết quả cao, mới được áp dụng điều trị bệnh ở người.

- Thực hiện liệu pháp gen chữa trị bệnh cho con người, cần theo dõi chặt chẽ diễn biến và tiến triển của bệnh, đồng thời kết hợp trị liệu thêm một số hoá dược hoặc trị xạ đặc hiệu để tăng hiệu quả của liệu pháp gen.

## II. CÁC LĨNH VỰC ỨNG DỤNG CHỦ YẾU CỦA LIỆU PHÁP GEN

### 1. Liệu pháp gen trong điều trị các bệnh do rối loạn di truyền (inherited disorders)

#### 1. 1. Liệu pháp gen trong điều trị và chữa các bệnh do rối loạn di truyền các locus đơn gen (monogenic)

Trong tế bào khi một số gen đơn bị hỏng hoặc mất cấu trúc bình thường (rối loạn chức năng gen), có thể gây nên các bệnh di truyền. Bệnh tật trong trường hợp này có thể gây tử vong ở giai đoạn sớm nếu không được chữa trị, hoặc để lại các di chứng và di truyền 100% cho các thế hệ sau. Một số loại bệnh điển hình do rối loạn hoặc mất chức năng các gen đơn (Single locus) gây nên là:

ADA deficiency	(thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng)
Sickle Cell Anemia	(thiếu máu hồng cầu liềm)
Hemophilia	(bệnh ưa chảy máu hay bệnh máu khó đông)
Cystic fibrosis	(bệnh xơ nang và viêm phổi cấp)
Parkinson	(bệnh giảm trí nhớ Parkinson)
Gaucher Disease	(bệnh run rẩy Gaucher)
Chronic granulomatosis disease	(bệnh rối loạn mãn tính chức năng hạt)
Familial hypercholesterolemia	(bệnh rối loạn Cholesterol gia đình)

#### 1. 2. Liệu pháp gen trong điều trị và chữa các bệnh do rối loạn di truyền các locus đa gen (polygenic)

Một số loại bệnh do nhiều gen thuộc các locus khác nhau quy định, tùy theo mức độ hỏng hoặc mất chức năng gen của một hay nhiều gen (allele) mức độ biểu hiện bệnh là khác nhau. Những bệnh ở trường hợp này di truyền dưới 100% cho các thế hệ sau. Các bệnh điển hình như:

Heart disease	(bệnh tim bẩm sinh)
Cancer	(bệnh ung thư)
Diabetes	(bệnh tiểu đường)

Alcoholism	(bệnh nghiện rượu)
Schizophrenia	(bệnh tâm thần phân liệt)
Criminal behavior	(hành vi tội phạm do gen)

## 2. Liệu pháp gen chữa các bệnh do nhiễm trùng

Virus, vi khuẩn gây bệnh đã gây nên hàng loạt bệnh tật cho con người, trong đó có nhiều loại bệnh hiểm nghèo như ung thư, lao, HIV..., gây thiệt hại to lớn về kinh tế và sức khỏe con người. Y học hiện đại ngày càng có nhiều phương pháp mới, nhiều loại thuốc mới giúp con người chống lại tật bệnh. Liệu pháp gen là một trong những phương pháp chữa bệnh có hiệu quả cao, nhiều bệnh nhân bị các bệnh nhiễm trùng nguy hiểm như ung thư gan, lao, HIV, viêm gan B... đã được điều trị bằng liệu pháp gen. Trong tương lai, khả năng điều trị bệnh truyền nhiễm bằng liệu pháp gen ngày càng nhiều với hiệu quả và chất lượng cao.

## III. MỘT SỐ CHIẾN LƯỢC CỦA LIỆU PHÁP GEN

Hiện nay liệu pháp gen đang ngày càng được ứng dụng trong điều trị và chữa bệnh có hiệu quả. Tuỳ theo loại bệnh, nguyên nhân của bệnh và mức độ biểu hiện của bệnh cần sử dụng các biện pháp cụ thể khác nhau để đảm bảo hiệu quả cao của liệu pháp gen. Một số chiến lược của liệu pháp gen thường được sử dụng hiện nay là:

1. Thay thế gen (Gene replacement)
2. Tăng cường hiệu quả hoạt động của gen (Gene Augmentation Therapy - GAT)
3. Sửa chữa gen (Gene correction)
4. Tiêu diệt các tế bào đích nhờ các sản phẩm đặc hiệu của gen liệu pháp (Targeted killing of specific cells)
5. Ủc chế biểu hiện của các gen hỏng ở tế bào đích (Gene ablation)

#### IV. LUỢC SỬ NGHIÊN CỨU LIỆU PHÁP GEN

Phát minh cấu trúc xoắn kép của phân tử DNA của James Watson và Francis Crick năm 1953, đã mở ra một kỷ nguyên mới của di truyền phân tử và công nghệ sinh học phân tử. Cùng với hàng loạt các thành tựu của nhiều ngành khoa học, liệu pháp gen bắt đầu được hình thành và phát triển nhanh chóng trở thành một xu hướng mới trong y học hiện đại.

Năm 1960 dự án đầu tiên để xuất sử dụng gen trong sản xuất các chế phẩm điều trị bệnh ở người được thành lập.

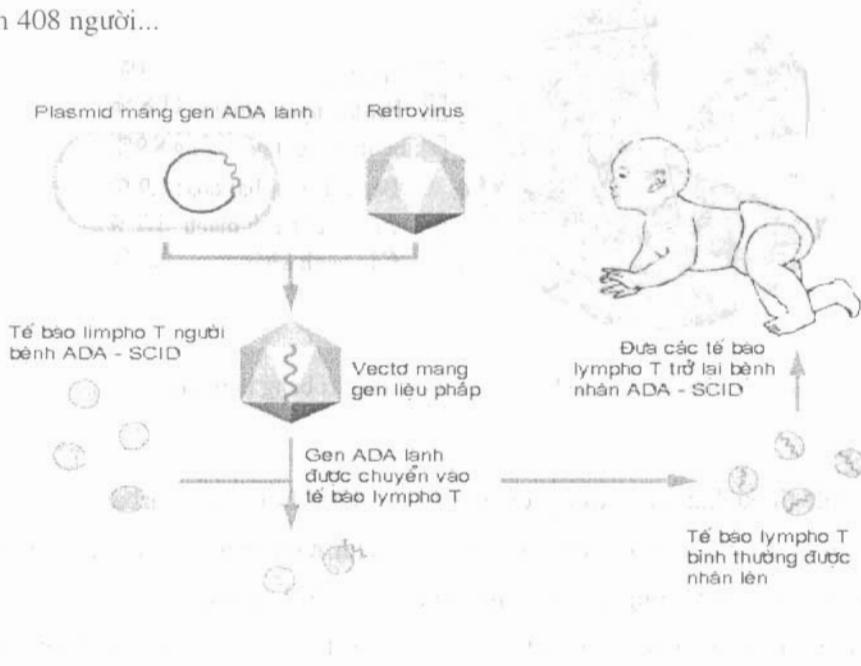
Trong ba thập niên 1970 - 1990 với nhiều phát minh về enzym giới hạn, kỹ thuật PCR, tổng hợp nhân tạo DNA và protein... đã có nhiều thành tựu của công nghệ DNA tái tổ hợp được ứng dụng trong các lĩnh vực y học, sản xuất và đời sống. Kỹ thuật chuyển gen phát triển mạnh, tạo nên nhiều giống cây trồng chuyên gen, vật nuôi chuyên gen... phục vụ lợi ích con người.

Năm 1990 thành công liệu pháp gen đầu tiên của William Anderson, Michael Blaise, và Ken Culver đánh dấu một bước tiến mới trong lĩnh vực ứng dụng kỹ thuật gen trong điều trị bệnh cho con người. Bằng công trình liệu pháp gen đầu tiên chữa bệnh suy giảm miễn dịch trầm trọng ở người do thiếu hụt enzym ADA (Adenosine Deaminase Deficiency) gây nên, đã mở ra một thời kỳ mới của y - sinh học hiện đại trong chữa bệnh cho con người.

Tháng 9 năm 1990, thành công đầu tiên sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh cho con người của French Anderson và R. Michael Blaese. F. Anderson và Michael Blaese đã điều trị bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID - Severe Combined Immunodeficiency) do thiếu hụt enzym ADA gây nên cho cháu gái Ashanti 4 tuổi, đã mở ra một kỷ nguyên mới của Y-Sinh học hiện đại. Cuối năm 1990, cháu gái Cynthia 9 tuổi mắc bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng như cháu Ashanti cũng được cứu chữa thành công.

Đến 12 / 1994 có hơn 500 bệnh nhân được điều trị bằng liệu pháp gen cho nhiều loại bệnh khác nhau. Tính đến 2001, theo thống kê của tạp chí Gene Medicine ([www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)) đã có 3464 bệnh nhân được chữa trị bằng

liệu pháp gen, trong đó số người bị ung thư được điều trị nhiều nhất là 2389 người chiếm 69%, thứ hai là bệnh truyền nhiễm (chủ yếu là nhiễm HIV) chiếm 11,8 % gồm 408 người...

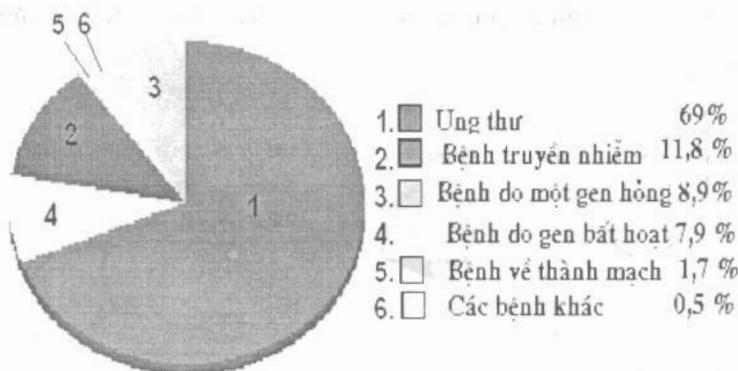


Hình 1.2. Sơ đồ chữa bệnh ADA - SCID ở người bằng liệu pháp gen.

Số loại bệnh tật được chữa trị bằng liệu pháp gen ngày càng nhiều, bao gồm hàng loạt bệnh hiếm nghèo như bệnh ung thư, bệnh thiếu hụt enzym ADA, bệnh xơ nang, bệnh thiếu máu hồng cầu liềm, bệnh lão hoá sớm.... Số lượng bệnh nhân bị bệnh hiếm nghèo, được điều trị bằng liệu pháp gen ngày một tăng.

Bệnh ung thư, một loại bệnh gây nên do đột biến gen hoặc do virus gây ung thư, có tỉ lệ người mắc bệnh tương đối cao ở nhiều nước trên thế giới. Hiện nay bệnh ung thư là bệnh có số người được chữa và điều trị bằng liệu pháp gen nhiều nhất tới 69% tổng số bệnh nhân điều trị bằng liệu pháp gen.

Bệnh máu khó đông do một gen lặn đột biến, nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X ở người, là bệnh gây ảnh hưởng nặng đến cuộc sống và sức khoẻ con người. Bệnh máu khó đông có thể được chữa khỏi bằng liệu pháp gen.



Hình 1.3. Biểu đồ một số loại bệnh được điều trị bằng liệu pháp gen.

Bệnh thiếu hụt trâm trọng enzym OTC (Ornithine transcarbamylase) do một gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X là bệnh hiểm nghèo, gây hậu quả rất nghiêm trọng. Thông thường trẻ mới sinh sau 72 giờ bị hôn mê, một nửa số trẻ tử vong tháng tuổi đầu tiên, số còn lại thường tử vong trước 5 tuổi. Thủ nghiệm liệu pháp gen trong điều trị bệnh thiếu hụt enzym OTC đầu tiên với Jesse Gelsinger vào ngày 13 tháng 9 năm 1999, tuy chưa cứu sống được Jesse Gelsinger nhưng đã mở ra một triển vọng mới trong cứu chữa các bệnh nan y.

Gần đây sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh Huntington bằng antisens RNA, đã thu được kết quả tốt mở ra tiềm năng to lớn trong tương lai có thể chữa khỏi bệnh Huntington cho con người. (*NewScientist.com* /2003). Một phát minh mới trong liệu pháp gen là kỹ thuật tạo ra các liposom có kích thước siêu bé (25 nm), dễ dàng mang gen liệu pháp qua các lỗ trên màng nhân, hoặc sử dụng vectơ liposom được bao bọc trong một lớp vỏ PEG (polyethylene glycol), để đưa các gen vào tế bào não nhằm chữa bệnh Parkinson đã có kết quả khả quan có thể sử dụng liệu pháp gen chữa các bệnh hiểm nghèo cho con người (*NewScientist.com* /2003).

Những năm gần đây, hàng nghìn bệnh nhân bị bệnh xơ nang, bệnh nhân nhiễm HIV, bệnh nhân bị ung thư đã được điều trị bằng liệu pháp gen, mang lại cuộc sống bình thường cho người bệnh.

# Chương 2

## NGUYÊN LÝ VÀ KỸ THUẬT CƠ BẢN CỦA LIỆU PHÁP GEN

### I. NGUYÊN LÝ CỦA LIỆU PHÁP GEN

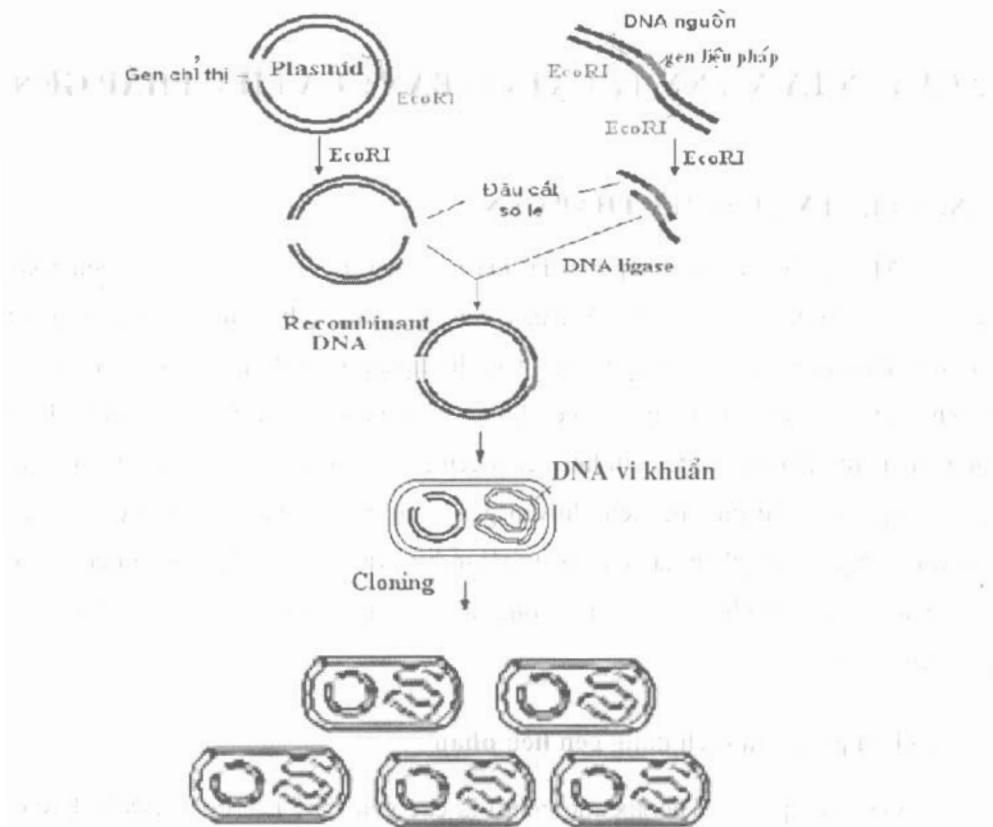
Mục đích của liệu pháp gen là đưa một gen mới còn gọi là gen liệu pháp vào tế bào người, làm cho gen mới gắn vào bộ gen của tế bào đúng vị trí cần thiết và hoạt động bình thường trong tế bào. Gen liệu pháp hoạt động, tạo các sản phẩm có khả năng hạn chế tác dụng của gen hỏng hoặc ức chế gen hỏng làm giảm biểu hiện của bệnh. Do vậy, thực hiện liệu pháp gen gồm một số bước cơ bản: tách dòng gen liệu pháp, chọn phương tiện chuyển gen (còn gọi là chọn vectơ chuyển gen) phù hợp với gen liệu pháp, tạo các vectơ tái tổ hợp và kỹ thuật đưa vectơ mang gen liệu pháp vào tế bào chủ hoặc cơ thể, đồng thời theo dõi hoạt động và biểu hiện của gen liệu pháp.

#### 1. Gen liệu pháp và tách dòng gen liệu pháp

Gen liệu pháp (Therapeutic gene) là các gen (hay các đoạn DNA, RNA) cần thiết để thay thế các gen bị hỏng, kìm hãm hoạt động của các gen hỏng, hoặc hỗ trợ hoạt động cho các gen bị mất chức năng trong tế bào chủ, nhằm khôi phục hoạt động bình thường của tế bào và của cơ thể sống.

Tách dòng gen liệu pháp (Cloning of Therapeutic gene) được thực hiện bằng các phương pháp tách dòng thực nghiệm thông thường, trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử và kỹ thuật gen. Để liệu pháp gen có hiệu quả cao cần chú ý đến tính tương thích của gen liệu pháp và tế bào đích (là tế bào soma hay tế

bào sinh dục). Khi các tế bào cho và tế bào nhận cùng nhóm hoặc cùng nguồn gốc có thể làm tăng hiệu quả của liệu pháp gen. Các gen liệu pháp sau khi tách dòng, và chuyển vào tế bào đích phải đảm bảo giữ được chức năng nguyên vẹn. Sự thành công của liệu pháp gen phụ thuộc rất lớn vào kết quả lựa chọn và tách dòng gen liệu pháp và tế bào đích.



Hình 2.1. Sơ đồ các bước tách dòng gen liệu pháp (gen cần thiết).

Gen liệu pháp có thể tách dòng từ các nguồn tế bào cho khác nhau như tế bào vi khuẩn, tế bào động thực vật, tế bào người và một số loại virus. Tách dòng gen liệu pháp có hiệu quả cao đối với các gen đã biết cặn kẽ kích thước, vị trí của

gen trong bộ gen. Hiệu quả tách dòng gen liệu pháp còn phụ thuộc vào cấu trúc, chức năng gen, và sản phẩm của hoạt động gen, cũng như mức độ hiện đại của các thiết bị thí nghiệm.

Tùy theo đặc tính của gen liệu pháp và mục đích của liệu pháp gen, có thể tách dòng gen liệu pháp từ bộ gen (genome), hoặc từ mRNA. Trường hợp cần các gen nguyên vẹn (kể cả các vùng không mang mã di truyền) phải tách dòng từ bộ gen. Thường chỉ thực hiện với các gen có kích thước nhỏ, cần tách chiết và tinh sạch DNA tổng số, sau đó dựa vào đặc điểm đã biết của gen cần thiết để lựa chọn các loại enzym giới hạn và kỹ thuật tách dòng hợp lý. Nếu các gen cần thiết có kích thước lớn, hoặc chỉ cần các phân DNA mang mã di truyền, phải thực hiện tách dòng gen từ các mRNA. Trong trường hợp này cần tách chiết mRNA, và thực hiện kỹ thuật phiên mã ngược để tạo các gen liệu pháp là các cDNA tương ứng. Trường hợp sử dụng gen liệu pháp là các đoạn oligo nucleotid đã biết trình tự (mạch kép hoặc mạch đơn), có thể tạo các đoạn oligo nucleotid bằng phương pháp tổng hợp nhân tạo.

## 2. Các loại vectơ thường sử dụng trong liệu pháp gen

Liệu pháp gen ngày càng trở thành phương pháp chữa bệnh hiệu quả cao, một phương thuốc sinh học đặc hiệu (Biomedicine) đang dần dần trở thành phổ biến trong y học. Tuy nhiên, với trình độ khoa học hiện tại, hiểu biết chưa thật đầy đủ về cấu trúc chức năng hoạt động của từng gen cũng như cả bộ gen con người, liệu pháp gen còn nhiều hạn chế về kết quả chữa bệnh, ứng dụng trong chữa bệnh mới chỉ ở phạm vi hẹp.

Để có thể nâng cao hiệu quả của liệu pháp gen trong chữa bệnh, một vấn đề quan trọng là chọn vectơ chuyển gen phù hợp với gen cần chuyển, phù hợp với loại tế bào đích và loại bệnh cần điều trị.

Vectơ chuyển các gen liệu pháp trong liệu pháp gen gọi là vectơ liệu pháp. Vectơ liệu pháp trước hết là một vectơ chuyển gen, ngoài ra còn có một số đặc điểm đặc trưng riêng:

- Vector liệu pháp phải đảm bảo đưa các gen liệu pháp vào tế bào (cơ thể) dễ dàng, không gây tổn thương các hoạt động của các gen khác của bộ gen con người (không hoặc rất ít gây đáp ứng miễn dịch, không gây phá huỷ chức năng các mô, không có tác động kích hoạt các gen tiền ung thư...).

- Vector liệu pháp phải có khả năng mang một gen liệu pháp có kích thước càng lớn càng tốt.

- Vector liệu pháp có sự linh hoạt với các tế bào đích, mô đích để có thể gắn gen liệu pháp vào đúng những vị trí định trước. Ngoài ra, các vector chuyển gen liệu pháp gen phải có tính tiện dụng cao, dễ sử dụng và thuận tiện cho y tế cộng đồng.

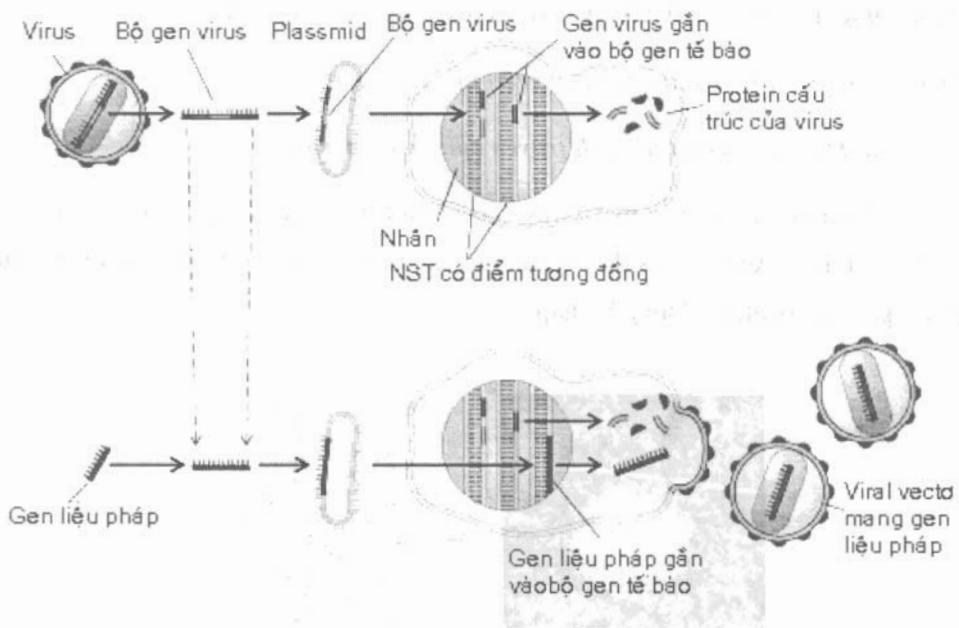
Hiện nay, dựa vào bản chất và nguồn gốc của vector liệu pháp gen người ta chia các vector liệu pháp làm hai nhóm: vector có bản chất virus (viral vector) và vector không có bản chất virus (nonviral vector).

## **2. 1. Các vector liệu pháp gen có bản chất virus (viral vector)**

Sự phát triển của khoa học, đặc biệt là sinh học phân tử và kỹ thuật gen, giúp con người hiểu rõ cơ chế xâm nhiễm và gây bệnh của nhiều loại virus. Khi xâm nhiễm tế bào, virus có khả năng chuyển bộ gen của virus vào trong các tế bào chủ. Một số nhóm virus có thể được gắn bộ gen virus hoặc một số gen của chúng vào bộ gen tế bào chủ, tạo thành một thể thống nhất. Các gen virus gắn với bộ gen tế bào chủ, có thể tồn tại lâu dài cùng với quá trình phân chia của tế bào chủ, tạo nên các provirus. Mỗi loại virus thuộc nhóm này, đều có một cơ chế đặc hiệu riêng để gắn một phần hoặc cả bộ gen virus với bộ gen tế bào với thời gian ngắn và hiệu quả cao. Hiện tượng tạo nên các provirus được gọi là trạng thái tiềm sinh của virus. Virus ở trạng thái tiềm sinh gọi là các virus ôn hoà. Đối với các virus gây bệnh, đó là thời gian ủ bệnh. Thời gian ủ bệnh dài ngắn khác nhau tùy loại virus, tùy thuộc đặc điểm của tế bào chủ và điều kiện ngoại cảnh. Thời gian ủ bệnh có thể kéo dài vài giờ, vài ngày, một vài tháng đến hàng chục năm...

Trong quá trình tồn tại và phân chia của tế bào chủ, bộ gen virus gắn với bộ gen tế bào cũng được nhân lên tạo nên vô số các tế bào mang các gen virus, vẫn

hoạt động bình thường gọi là provirus. Khi trong cơ thể, hoặc từ ngoài môi trường có một tác nhân nào đó không bình thường (thường là tia tử ngoại, các chất độc, tia phóng xạ hoặc nhiệt độ cao...) tác động vào provirus, làm cho bộ gen virus tách khỏi bộ gen tế bào, thực hiện quá trình tái bản gen virus và tổng hợp các thành phần của virus trong tế bào chủ. Quá trình lắp ghép các thành phần của virus tạo nên các virion, các virion hoạt động tạo nên vô số virus mới phá vỡ tế bào chủ tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác. Đây là giai đoạn biểu hiện rõ rệt nhất của bệnh, gây giảm sút sức khoẻ con người hoặc có thể gây tử vong.



Hình 2.2. Sơ đồ tạo viral vector sử dụng trong liệu pháp gen.

Trên cơ sở hiểu biết đặc điểm bộ gen virus và cơ chế xâm nhiễm tế bào, cơ chế gắn gen của virus vào bộ gen tế bào. Con người đã tìm ra các biện pháp loại bỏ các gen có hại của virus, hoặc gây bất hoạt các gen có hại của virus, nhưng vẫn giữ lại các gen virus giúp cho sự xâm nhiễm và gắn gen vào bộ gen tế bào, tạo nên các vectơ liệu pháp gen.

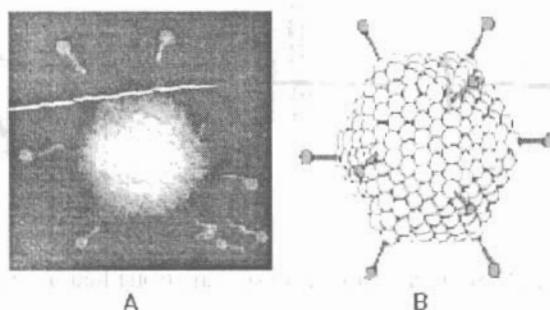
Vectơ liệu pháp gen hình thành từ những virus biến đổi gen, có mang các gen liệu pháp (Therapeutic gene) gọi là vectơ liệu pháp gen có bản chất virus – viral vectơ (viral vector). Trong viral vectơ gen liệu pháp được thay thế vào vị trí một số gen của virus, nhưng vẫn đảm bảo khả năng xâm nhiễm và chuyển gen liệu pháp vào tế bào, hoặc gắn gen liệu pháp với bộ gen tế bào đích để thực hiện chức năng chữa bệnh.

Vectơ liệu pháp gen có bản chất virus được chia thành nhiều nhóm tùy theo đặc điểm cấu trúc bộ gen và đặc điểm xâm nhiễm, đặc điểm gây bệnh của virus... Viral vectơ gồm một số loại chủ yếu: vectơ adenovirus, vectơ retrovirus, vectơ adeno -associated virus (AAV), vectơ herpes simplex virus (HSV)....

### 2.1.1. Vectơ adenovirus (*adenoviral vector*)

#### a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của adenovirus

Adenovirus là một loại virus có capsid đa diện 20 mặt, phần lõi chứa DNA mạch kép. Adenovirus được phân lập đầu tiên từ amidan tuyến vòm họng của người, gây các bệnh về đường hô hấp.



Hình 2.3. A - Hình dạng kích thước adenovirus dưới kính hiển vi điện tử.

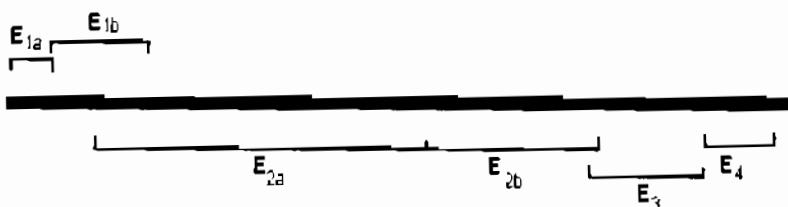
B - Mô hình cấu trúc không gian adenovirus.

Vỏ capsid của adenovirus cấu tạo từ 252 phân tử protein, xếp thành 20 mặt tam giác. Bộ gen của adenovirus là một chuỗi DNA xoắn kép dài 36 kb, gồm hơn

50 gen. Trong bộ gen của adenovirus có 4 vùng gen quan trọng đối với sự tồn tại và hoạt động của nó ký hiệu là E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> và E<sub>4</sub>. Trong đó gen E<sub>1</sub> có chức năng mã hoá cho các protein enzym giúp cho quá trình phiên mã tổng hợp các protein sớm (protein enzym của virus), các gen E<sub>2</sub> và E<sub>3</sub> điều hòa quá trình và tái bản DNA virus, dịch mã tổng hợp các protein muộn, đồng thời có liên quan đến sự đáp ứng miễn dịch của vật chủ trong quá trình tấn công của adenovirus.

#### b. Nguyên lý thiết kế vector adenovirus

Adenoviral vector là vector liệu pháp gen tạo nên từ các adenovirus tái tổ hợp. Để tạo được vector adenovirus đầu tiên cần tạo các adenovirus tái tổ hợp có khả năng xâm nhiễm và chuyên gen liệu pháp vào tế bào vật chủ, nhưng mất khả năng tái bản trong tế bào chủ. Để thiết kế adenoviral vector cần loại bỏ gen E<sub>1</sub> của adenovirus, thay thế bằng phức hợp promoter - gen liệu pháp và các gen cần thiết điều khiển quá trình biểu hiện của gen liệu pháp trong tế bào chủ. Gen E<sub>1</sub> của adenovirus cũng được gây bất hoạt hoặc loại bỏ. Bộ gen adenovirus sau khi đã loại bỏ các đoạn gen E<sub>1a</sub>, gen E<sub>1b</sub> được đưa vào tế bào đóng gói (packaging cell) đồng thời với gen liệu pháp. Trong tế bào đóng gói, quá trình tái tổ hợp ở những điểm tương đồng tạo nên bộ gen adenovirus tái tổ hợp chứa gen liệu pháp.

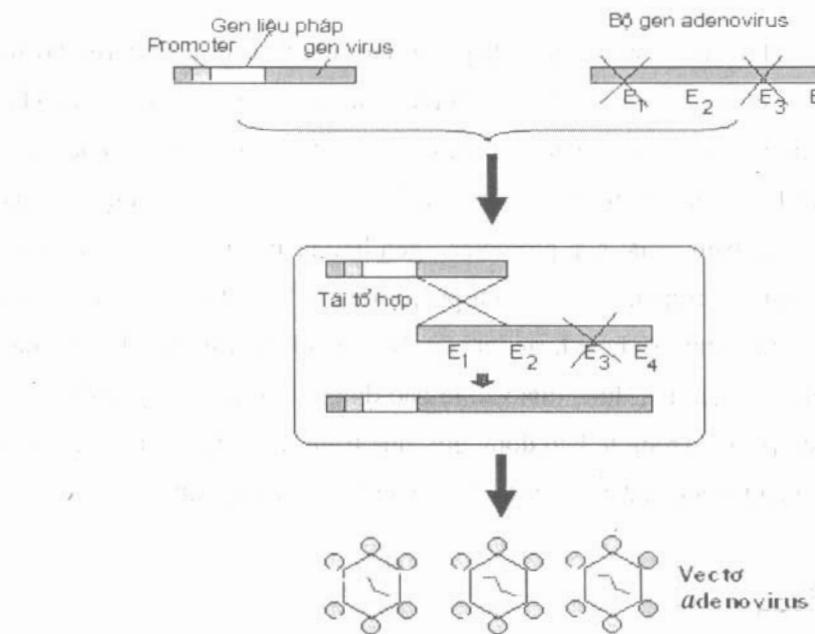


Hình 2.4. Sơ đồ cấu trúc bộ gen của adenovirus.

Adenovirus tái tổ hợp có khả năng biểu hiện gen liệu pháp nhưng mất khả năng tái bản DNA gọi là vector adenovirus.

Trong liệu pháp gen hai loại vector adenovirus là FG (first generation) và HD (Helper dependent) được sử dụng nhiều nhất. Vector FG (vector thế hệ thứ nhất)

kích thước khoảng 8,3 kb, trong đó các vùng gen quan trọng của E<sub>1</sub> và vùng gen E<sub>3</sub> bị loại bỏ thay thế bằng gen liệu pháp và các gen cần thiết khác. Vectơ HD (vectơ phụ thuộc helper) bị cắt bỏ phần lớn gen của adenovirus, do vậy có thể cho phép cài gắn những gen liệu pháp có kích thước lớn. Đặc điểm quan trọng của vectơ HD là ít gây đáp ứng miễn dịch và chỉ có thể tái bản trong các tế bào bị virus helper xâm nhiễm.

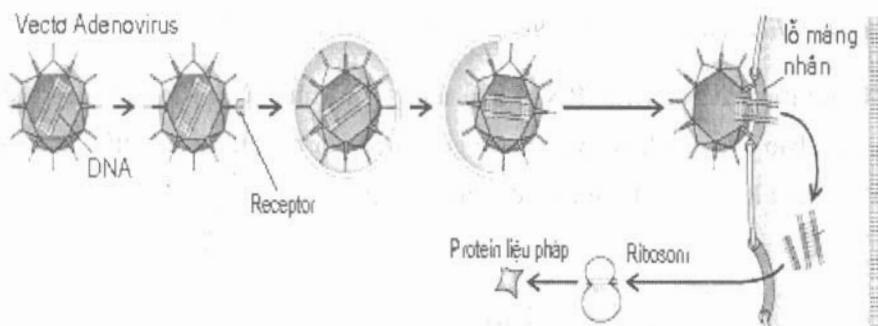


Hình 2.5. Sơ đồ quá trình hình thành vectơ adenovirus.

### c. Cơ chế hoạt động của vectơ liệu pháp adenovirus

Adenovirus là loại virus xâm nhiễm cả tế bào không phân chia và các tế bào đang phân chia, nên vectơ adenovirus cũng có khả năng xâm nhiễm cả 2 loại tế bào. Vectơ adenovirus có thể mang các gen liệu pháp kích thước lớn từ 8 kb đến 30 kb (1 kb = 1000 bp), không gây đột biến gen của các tế bào đích. Đặc điểm bất lợi nhất khi sử dụng vectơ adenovirus là gây hiệu ứng giảm mạnh đáp ứng miễn dịch của tế bào.

Vector adenovirus có khả năng xâm nhiễm và chuyển gen cho nhiều loại tế bào, do nhiều loại tế bào đích có các cơ quan thụ cảm (receptor) phù hợp với adenovirus. Khi xâm nhiễm vào trong tế bào chủ, phần lõi mang bộ gen virus và gen liệu pháp chui qua lỗ màng nhân. Bộ gen của adenovirus, cũng như các gen của vector adenovirus không có khả năng gắn với bộ gen tế bào như ở retrovirus. Trong nhân tế bào chủ các gen của adenovirus thực hiện quá trình phiên mã, quá trình dịch mã trong tế bào chất của tế bào chủ tạo nên protein liệu pháp và các loại protein cần thiết cho virus.



Hình 2. 6. Cơ chế hoạt động của vectơ adenovirus.

Hiện nay, có thể sử dụng một loại vectơ adenovirus có khả năng tái bản DNA, vectơ này được sử dụng trong liệu pháp gen chữa bệnh ung thư. Khi thiết kế các vectơ adenovirus này, chỉ cần cài gen liệu pháp mã hoá các protein đặc hiệu có thể tiêu diệt các tế bào u một cách chọn lọc, đồng thời gây bất hoạt các gen độc và gen có hại của adenovirus. Protein liệu pháp tạo ra trong tế bào đích làm ngừng quá trình phát triển của khối u, hoặc tiêu diệt khối u. Ví dụ, vectơ ONXY- 015 bị cắt bỏ gen  $E_{1b}$  thay vào đó là gen mã hoá một loại protein đặc hiệu. Trong các tế bào bình thường vectơ ONXY- 015 bị tiêu huỷ, do không chống được tác động phân huỷ của các sản phẩm của gen p53 trong tế bào bình thường. Trong các tế bào khối u, do gen p53 bị hỏng gây hiện tượng tế bào phân chia không kiểm soát, khi đó vectơ

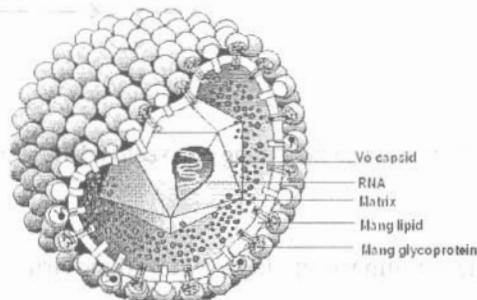
ONXY-015 được tái bản tạo nên các protein liệu pháp đặc hiệu tiêu diệt tế bào ung thư.

Hiện nay, vectơ adenovirus được sử dụng nhiều nhất trong chữa bệnh ung thư cũng như trong điều trị các bệnh xơ nang, máu khó đông, loạn dưỡng cơ... Trong tương lai vai trò và khả năng ứng dụng vectơ adenovirus trong điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen, ngày càng được ứng dụng rộng rãi với hiệu quả cao.

### 2.1.2. Vectơ retrovirus (Retroviral vector)

#### a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của retrovirus

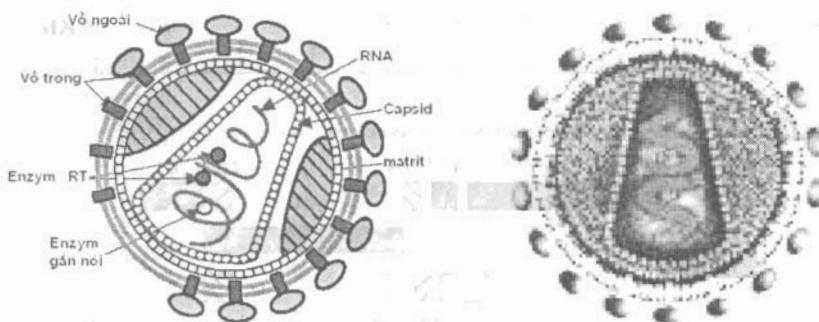
Retrovirus là loại virus RNA, khả năng xâm nhiễm tế bào chủ cao. Khi xâm nhiễm tế bào chủ có khả năng gắn bộ gen virus với bộ gen tế bào chủ, là cơ sở thuận lợi để thiết kế các vectơ liệu pháp gen hiệu quả.



Hình 2.7. Sơ đồ cấu trúc không gian của retrovirus.

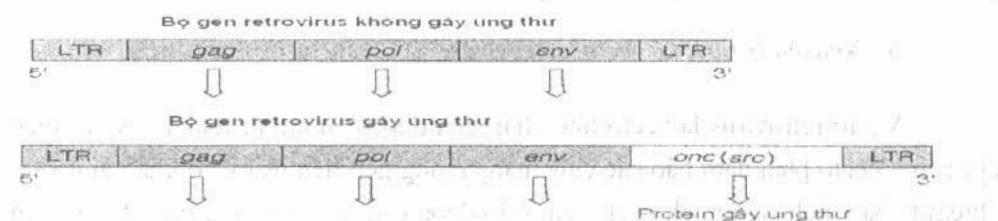
Cấu trúc retrovirus gồm phần vỏ có ba lớp, phần lõi RNA gồm 2 sợi đồng dạng. Lớp vỏ ngoài cùng là glycoprotein (gp 120), tiếp đến lớp vỏ kép lipid, lớp trong cùng là vỏ capsid. Bên trong lớp vỏ capsid là RNA, và các loại enzym của virus. Enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase) giúp virus chuyển bộ gen RNA sang dạng cDNA mạch kép. Enzym cài xen (integrase) giúp cho quá trình cài xen bộ gen virus với bộ gen tế bào chủ ở những điểm tương đồng.

Bộ gen retrovirus ở dạng RNA sợi đơn, thường gồm hai sợi RNA cấu trúc và kích thước giống nhau, kích thước khoảng 7 kb – 11 kb. Mỗi sợi RNA chứa ba nhóm gen chủ yếu: *gag*, *pol*, *env*. Một số virus gây ung thư có thêm nhóm gen gây ung thư - *oncogen*.



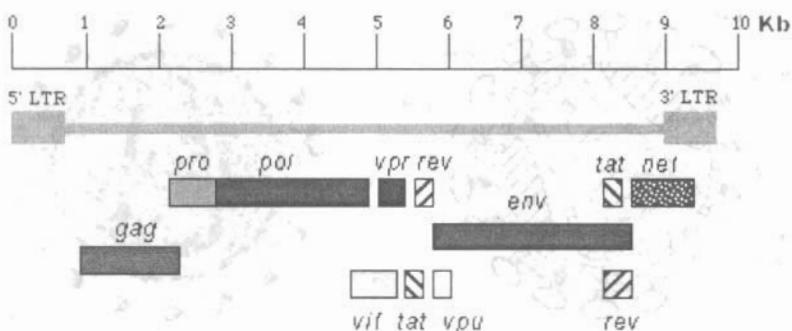
Hình 2.8. Sơ đồ cấu trúc cắt ngang của retrovirus.

Gen *gag* mã hoá protein lõi trong thành phần cấu trúc hạt virion, gen *pol* mã hoá enzym phiên mã ngược và các enzym cần thiết cho hoạt động của virus, còn gen *env* mã hoá protein trong cấu trúc các lớp vỏ của virus. *Oncogen* mã hoá các protein tiền ung thư, hoặc protein gây hiện tượng phân chia không bình thường của tế bào, tạo nên các khối u. Hai đầu mỗi sợi RNA có một trình tự lặp dài tận cùng - LTR (long terminal repeats).



Hình 2.9. Sơ đồ cấu trúc bộ gen retrovirus.

Đoạn lặp LTR mang một số trình tự cần thiết cho quá trình biểu hiện gen của virus và một trình tự đặc hiệu giúp cho quá trình gắn bộ gen virus với bộ gen tế bào chủ, gọi là trình tự gắn xen - *att* (attachment site). Trong bộ gen retrovirus còn có một trình tự giúp quá trình "dóng gói" bộ gen của virus gọi là trình tự *ψ*.



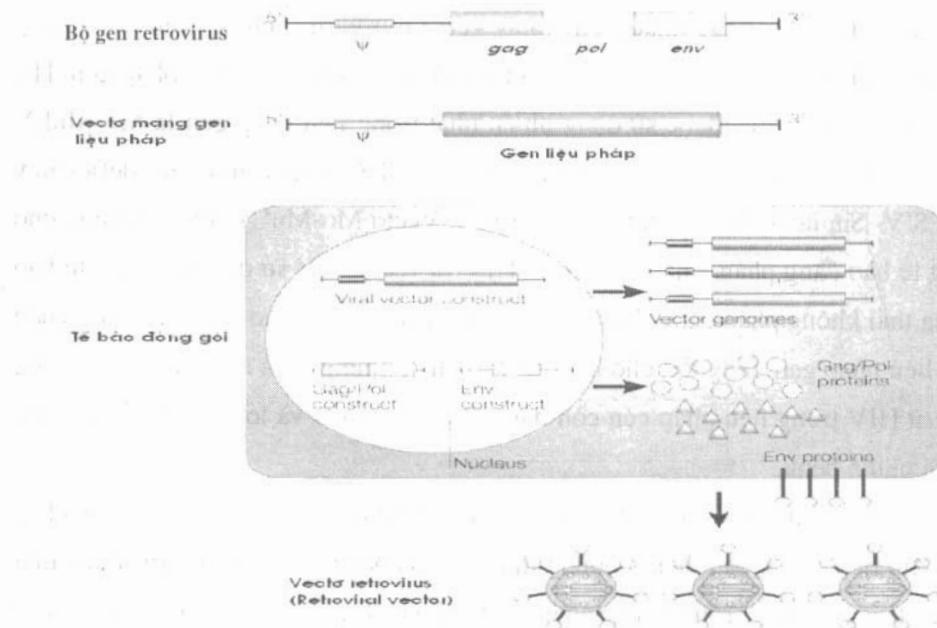
Hình 2.10. Sơ đồ cấu trúc bộ gen virus HIV.

Trong họ retrovirus các virus thuộc nhóm Lentivirus có bộ gen tương đối phức tạp, ngoài 3 nhóm gen chủ yếu *gag*, *pol* và *env* còn có các gen *vif*, *tat*, *vpu*, *nef*, *vpr*, *rev*., mỗi gen có chức năng khác nhau, có khả năng biến đổi nhanh giúp cho tính thích ứng cao của virus. Ví dụ, virus HIV là một điển hình của virus nhóm Lentivirus, có bộ gen xấp xỉ 10 kb, gồm 9 gen *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *tat*, *vpu*, *nef*, *vpr*, *rev* có kích thước khác nhau, chức năng khác nhau. HIV là loại virus nguy hiểm, gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người.

#### b. Nguyên lý thiết kế vectơ retrovirus

Vectơ retrovirus là vectơ liệu pháp gen được cấu tạo từ retrovirus đã biến đổi gen. Vectơ phải đảm bảo các chức năng mang gen liệu pháp, có khả năng xâm nhiễm tế bào đích và làm cho gen liệu pháp được gắn với bộ gen tế bào chủ, nhưng không gây độc cho tế bào chủ. Nguyên lý chung của quá trình thiết kế vectơ retrovirus phải loại bỏ các gen độc của virus, chỉ giữ lại một số gen cần thiết của virus cho quá trình xâm nhiễm, tái bản, gắn gen, đồng thời cài thêm các gen liệu

pháp. Vectơ retrovirus phải có khả năng làm cho gen liệu pháp hòa nhập vào bộ gen tế bào đích với tần số cao, không gây đột biến gen tế bào đích, ít hoặc không gây hiệu ứng phụ bất lợi.



Hình 2.11. Các bước tạo vectơ retrovirus.

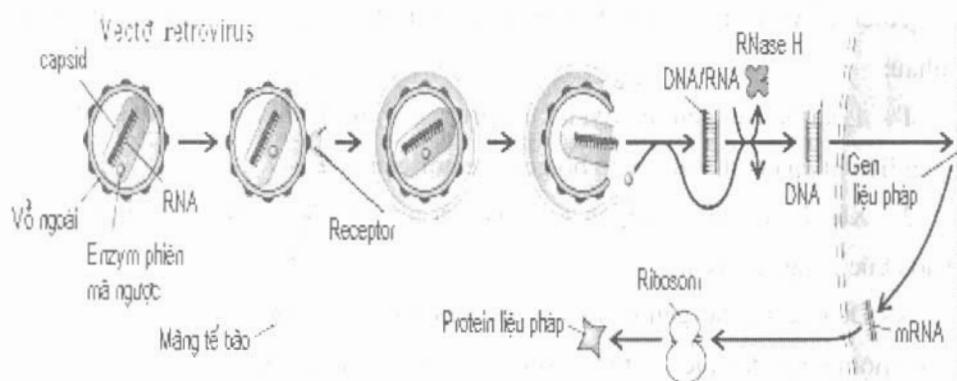
Thiết kế vectơ retrovirus là một quá trình phức tạp, gồm nhiều giai đoạn khác nhau:

- 1 - Loại bỏ các gen chủ yếu của virus *gag*, *pol*, *env* và *oncogen* thay thế bằng gen liệu pháp tạo thành vectơ bộ gen (vector genome).
- 2 - Xử lý cắt riêng các gen *gag*, *pol* và gen *env* của retrovirus nhưng vẫn đảm bảo chức năng các gen.
- 3 - Đưa vectơ bộ gen cùng với các gen *gag*, *pol* và gen *env* đã xử lý của virus vào một tế bào đặc hiệu là tế bào đóng gói (packaging cell).
- 4 - Trong tế bào đóng gói, các gen virus hoạt động tổng hợp các thành phần vỏ của virus, các thành phần vỏ virus kết hợp với vectơ mang gen liệu pháp hình thành nên vectơ retrovirus (retroviral vector).

### c. Cơ chế hoạt động của vectơ retrovirus

Mỗi loại retrovirus có những đặc điểm cấu trúc gen, khả năng xâm nhiễm và tái bản gen đặc trưng riêng, do đó từ các loại retrovirus khác nhau tạo nên các loại vectơ retrovirus khác nhau. Hiện nay vectơ retrovirus chiếm trên 60 % tổng các loại vectơ liệu pháp sử dụng trong điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen. Hai nhóm vectơ retrovirus được sử dụng nhiều nhất trong liệu pháp gen là Mo-MuLV (Moloney murine leukemia virus) và Lentivirus (HIV- human immuno deficiency virus, SIV- Simian immuno deficiency virus). Vectơ Mo-MuLV được sử dụng cho những tế bào đang phân chia, còn vectơ HIV và vectơ SIV sử dụng cho các tế bào ở trạng thái không phân chia. Mặc dù sử dụng virus HIV để tạo các vectơ liệu pháp trong liệu pháp gen ở người cho kết quả cao nhất, nhưng đến nay vẫn dễ sử dụng vectơ từ HIV trong liệu pháp gen còn đang được tranh cãi và lo sợ mức độ an toàn đối với người bệnh.

Vectơ retrovirus được đưa đến các tế bào đích bằng nhiều kỹ thuật khác nhau. Khi tiếp cận tế bào đích ở những thụ thể (receptor), vectơ retrovirus được đưa vào bên trong tế bào. Trong tế bào chất của tế bào đích các thành phần vỏ của vectơ bị phân huỷ, phần lõi RNA được giải phóng.



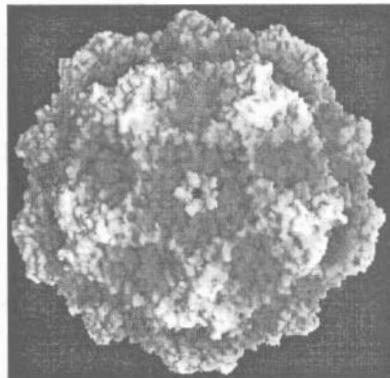
Hình 2.12. Cơ chế hoạt động của vectơ liệu pháp retrovirus.

Enzym phiên mã ngược của virus xúc tác quá trình chuyển RNA sợi đơn thành cDNA sợi kép. cDNA qua lỗ màng nhân vào trong nhân tế bào đích, nhờ enzym integrase của virus làm cho cDNA mạch kép được gắn xen vào bộ gen ở những điểm tương đồng. Gen liệu pháp cũng đồng thời được gắn vào bộ gen của tế bào đích, phiên mã và dịch mã tạo nên các protein liệu pháp trong tế bào đích.

Ngày nay, vectơ retrovirus đã được sử dụng có hiệu quả trong nhiều liệu pháp gen chữa bệnh ung thư, bệnh suy giảm miễn dịch do thiếu hụt enzym ADA, bệnh thiếu máu, bệnh tiểu đường... Trong tương lai khi trình độ của kỹ thuật gen được nâng cao, các vectơ retrovirus sẽ thực sự là loại vectơ liệu pháp gen được ưa chuộng và sử dụng rộng rãi trong điều trị, chữa bệnh bảo vệ sức khoẻ con người.

### 2. 1. 3. Vectơ Adeno-Associated Virus (AAV)

#### a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của Adeno - Associated Virus (AAV)

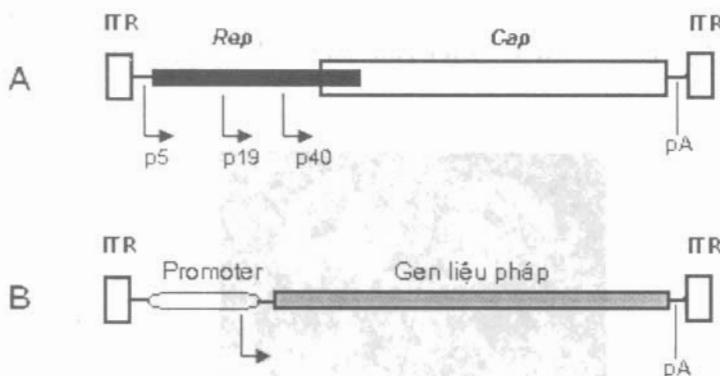


Hình 2. 13. Cấu trúc không gian của Adeno - Associated Virus (AAV).

Adeno - Associated Virus (AAV) là loại virus kích thước nhỏ thuộc nhóm parvovirus không gây bệnh cho người. Khi không có mặt của một loại virus trợ giúp (helper virus ) khác như adenovirus, virus herpes... AAV có thể xâm nhiễm các tế bào không phân chia, gắn bộ gen của AAV vào tế bào người ở vị trí đặc hiệu trên

nhiễm sắc thể số 19 tạo nên tiền virus (provirus). Provirus tồn tại cùng bộ gen người một thời gian dài trong tế bào, khi gặp một điều kiện nào đó AAV tách khỏi bộ gen người, thực hiện các quá trình phiên mã, tái bản tạo nên vô số hạt virion AAV trong tế bào, chuẩn bị chu trình xâm nhiễm các tế bào khác.

Bộ gen của AAV là DNA sợi đơn, được bao bọc trong lớp vỏ capsid. Bộ gen AAV có kích thước khoảng 4,5 - 4,7 kb, hai đầu là các trình tự lặp tận cùng đảo ngược ITR (Inverted Terminal Repeats) gồm 145 bp. Bộ gen AAV gồm 2 nhóm gen chính là gen *rep* và gen *cap*, các promoter p5, p19 và p40, phần cuối bộ gen là trình tự gắn đuôi poly Adenin – poly A (polyadenylation). Gen *cap* mã hoá protein trong cấu trúc vỏ capsid của AAV, gen *rep* mã hoá các enzym giúp cho quá trình tái bản, phiên mã cũng như quá trình gắn bộ gen AAV vào bộ gen tế bào chủ.

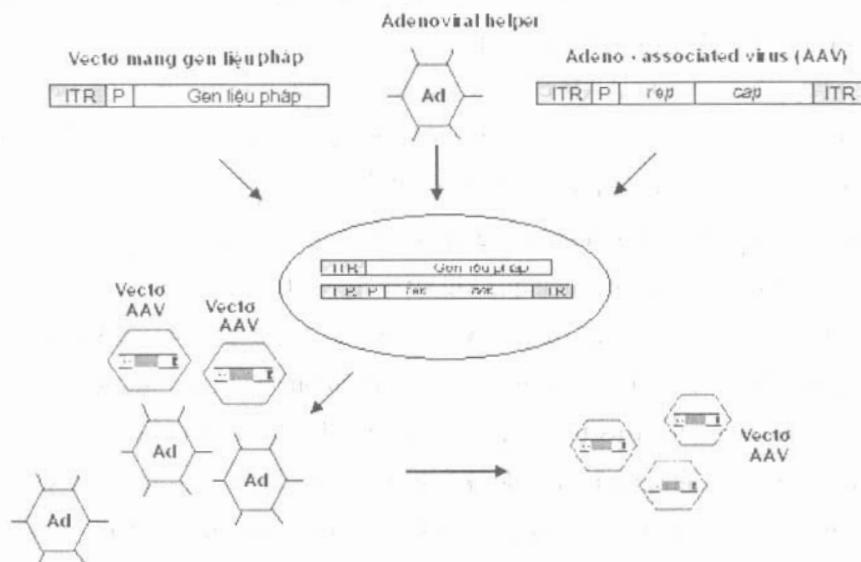


b. Nguyên lý thiết kế vectơ Adeno-Associated Virus (AAV vector)

Khi thiết kế các vectơ AAV phải loại bỏ các gen *rep*, gen *cap* của AAV đồng thời thay thế vào vị trí đó là gen liệu pháp và promoter thích hợp. Thiết kế vectơ AAV cần lưu ý chỉ sử dụng các gen liệu pháp có kích thước nhỏ, khi kích thước gen liệu pháp quá lớn, làm mất khả năng hoạt động của vectơ. Bộ gen của

AAV có kích thước nhỏ, chỉ thích hợp với các gen liệu pháp kích thước dưới 4 kb, khi gen liệu pháp kích thước lớn hơn 5 kb gây mất tác dụng của vectơ.

Quá trình thiết kế vectơ AAV cần sự có mặt của virus trợ giúp (helper virus), thường sử dụng là các adenoviral helper giúp quá trình tái tổ hợp đồng thời với gen liệu pháp, gọi là sự đồng chuyển nhiễm (cotransfection). Hiện nay, thiết kế vectơ AAV người ta sử dụng đồng thời ba thành phần chủ yếu gồm: vectơ plasmid mang gen liệu pháp và các đoạn ITR, virus Adeno - Associated Virus (AAV) và virus trợ giúp là adenoviral helper.



Hình 2.15. Sơ đồ quá trình thiết kế vectơ AAV.

Quá trình chuyển nhiễm đồng thời làm cho quá trình tái tổ hợp giữa plasmid mang gen liệu pháp, AAV và adenoviral helper tạo nên vectơ mang AAV mang gen liệu pháp và các dạng adenovirus lai. Bằng kỹ thuật xử lý nhiệt để gây bất hoạt các adenovirus lai (do vectơ AAV bền nhiệt hơn), sau đó sử dụng kỹ thuật siêu ly tâm phân đoạn, có thể tách được các vectơ AAV mang gen liệu pháp cần thiết.

Vectơ AAV được đánh giá là loại vectơ liệu pháp gen có nhiều đặc điểm tốt, phù hợp với yêu cầu sử dụng.

- Đặc điểm quan trọng nhất là vectơ AAV có hiệu quả chuyển gen rất cao, không gây bệnh cho người, mặt khác protein virus không được biểu hiện do đó không gây đáp ứng miễn dịch trong tế bào hoặc gây hiệu ứng viêm trong cơ thể.

- Virus AAV kiêu dại và vectơ AAV chỉ có thể tái bản khi có mặt các virus trợ giúp (helper virus) nên không gây lây lan rộng.

- Vectơ AAV chỉ có khả năng gắn, chèn các gen ở một số vị trí rất hạn chế, nên có hiệu quả giảm khả năng gắn sai vị trí của vectơ, giảm hiệu quả đột biến hoặc gây ung thư như các loại vectơ khác.

Tuy nhiên, vectơ AAV còn rất nhiều hạn chế, do vậy sử dụng vectơ AAV trong liệu pháp gen cần chú ý khắc phục để nâng cao hiệu quả của liệu pháp. Do kích thước của vectơ AAV nhỏ, nên chỉ có thể cho cài gắn và chuyển những gen liệu pháp kích thước nhỏ, sau khi cài gen liệu pháp thường gây úc chế tái bản DNA của vectơ AAV, làm hạn chế hiệu quả khi sử dụng vectơ AAV.

Trong quá trình tạo vectơ AAV, sự tái tổ hợp giữa AAV kiêu dại, adenovirus helper và vectơ mang gen liệu pháp thường tạo nên những vectơ AAV mang một vài gen của virus trợ giúp (adenovirus helper), có thể gây các đáp ứng miễn dịch không mong muốn. Do đó, kỹ thuật tạo vectơ AAV cần hết sức nghiêm ngặt, cần phải nghiên cứu tìm tòi các kỹ thuật mới, nhằm ngăn chặn vectơ AAV tránh “nhiễm” các gen không cần thiết của adenovirus helper.

Hiện nay, con người chưa hiểu biết được một cách cẩn kẽ cơ chế gắn gen, chuyển gen của AAV vào tế bào chủ, do đó cũng hạn chế khả năng sử dụng vectơ AAV trong liệu pháp gen.

#### *c. Cơ chế hoạt động của vectơ liệu pháp AAV (AAV vector)*

Vectơ AAV được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư, bệnh xơuang (Cystic fibrosis), bệnh nghẽn mạch vành tim và nhiều loại bệnh khác có hiệu quả. Vectơ AAV có nhiều ưu điểm được coi là loại vectơ AAV triển vọng trong liệu pháp gen.

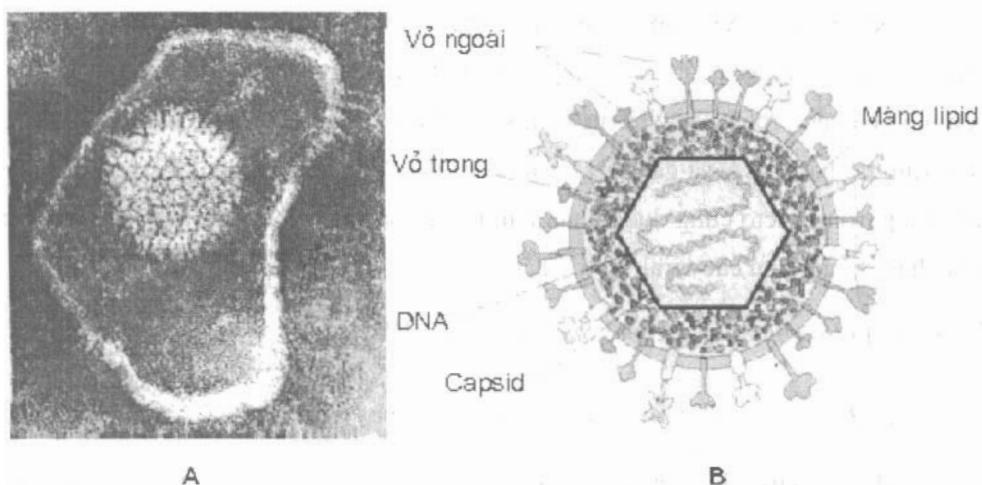
Khi vectơ AAV tiếp cận tế bào ở các thụ thể đặc trưng (receptor), toàn bộ các gen qua lỗ màng nhân vào trong nhân tế bào. Trong nhân tế bào chủ, một số gen mã hóa các protein enzym (protein sớm) được phiên mã và dịch mã, giúp cho quá trình tái bản DNA và gắn DNA vào vị trí đặc hiệu trên bộ gen tế bào chủ. Gen liệu pháp trong vectơ cũng được nhân lên, phiên mã và dịch mã tạo nên các protein liệu pháp, giống như các viral vectơ khác.

#### 2.1.4. Vectơ liệu pháp từ Herpes Simplex Virus (HSV)

##### a. Đặc điểm cấu tạo và di truyền của herpes virus

Herpes virus là một nhóm virus lớn, có bộ gen là DNA mạch kép, gây nhiều loại bệnh ở người và động vật. Herpes virus có thể xâm nhiễm tế bào thần kinh trung ương và các hạch thần kinh cảm giác trong thời kỳ ủ bệnh, khi hoạt động tái bản gây các bệnh trên người và động vật. Herpes virus có kích thước khoảng 150 nm, cấu tạo gồm vỏ ngoài, vỏ trong, màng lipid, vỏ capsid và phần lõi chứa DNA. Vỏ capsid cấu tạo từ 162 đơn phân (capsomer), tạo hình đa diện 20 mặt. Bộ gen herpes virus là phân tử DNA mạch kép, kích thước 152.260 bp.

Herpes virus tương đối đa dạng, gồm nhiều nhóm có sự phân biệt gọi là herpes typ 1, herpes typ 2..., do đó được gọi là virus herpes đơn hình (herpes simplex) ký hiệu là HSV-1, HSV-2. Bộ gen của herpes virus có các vùng chính : vùng U<sub>1</sub> (unique long) kích thước khoảng 20 kb và vùng U<sub>s</sub> (unique short), các trình tự lặp lại IR<sub>L</sub> (internal repeat long) và IR<sub>s</sub> (internal repeat short) nối giữa U<sub>1</sub> với U<sub>s</sub>. Bộ gen herpes virus có cấu trúc phức tạp gồm hơn 80 gen, phân bố không đồng nhất. Ví dụ, HSV-1 có đoạn U<sub>s</sub> gồm 13 gen, ký hiệu U<sub>s</sub> 1, U<sub>s</sub> 2... đến U<sub>s</sub> 13. Trong vùng IR<sub>L</sub> chứa hai gen LAT (Latency associated transcript), LAT<sub>1</sub> dài 2,5 kb và LAT<sub>2</sub> dài 1,5 kb. Bộ gen herpes virus gồm ba nhóm gen chủ yếu là: nhóm gen  $\alpha$  hay gen rất sớm - IE (immediate early), nhóm gen  $\beta$  hay gen sớm - E (early) và nhóm gen  $\gamma$  còn gọi là gen muộn - L (late), hai dấu bộ gen là các trình tự TR (terminal repeat)... Trong bộ gen có khoảng một phần hai các gen không cần thiết cho sự tái bản của herpes virus trong tế bào chủ.



Hình 2.16. A - Cấu trúc Herpes virus dưới kính hiển vi điện tử.

B - Sơ đồ cấu tạo Herpes virus .

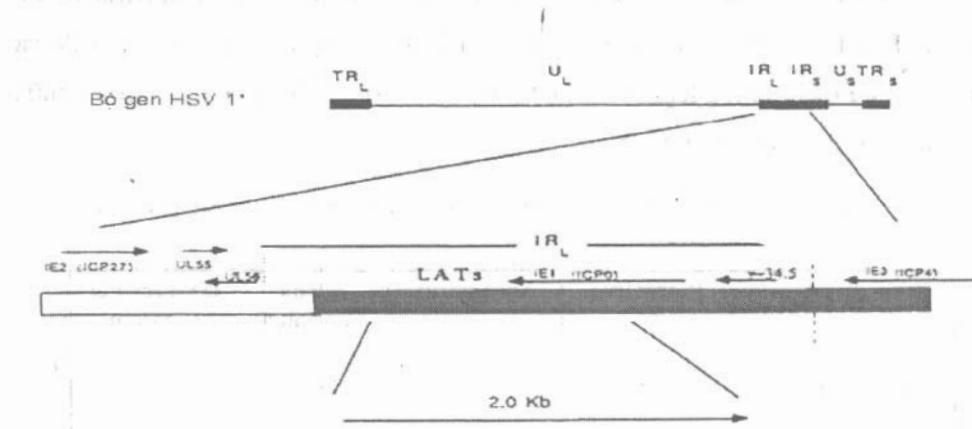
### b. Nguyên lý thiết kế vectơ HSV-1 (HSV-1 vector)

Hiện nay vectơ HSV-1 được sử dụng nhiều trong các thử nghiệm điều trị nhiều loại bệnh bằng liệu pháp gen. Thiết kế vectơ HSV-1 dựa trên cơ sở tái tổ hợp của virus Herpes simplex typ 1 (HSV -1) với Amplicon plasmid. Amplicon plasmid là một plasmid tái tổ hợp mang gen Ori (origin replication), gen kháng Ampicillin trong plasmid của *E. coli* đồng thời mang gen Ori và gen mã hoá khả năng đóng gói của HSV và gen liệu pháp có gắn đoạn promoter kiểm soát nhóm gen rất sớm (promoter immediate – early).

Amplicon plasmid và virus trợ giúp (helper virus) cùng được gây nhiễm vào tế bào khả biến (complementing cell line). Quá trình tái tổ hợp trong nhân tế bào khả biến tạo nên các vectơ HSV mang gen liệu pháp có thể sử dụng trong liệu pháp gen.

*c. Cơ chế hoạt động của vectơ HSV-1 (HSV-1 vector)*

Vectơ HSV-1 là một loại vectơ liệu pháp gen có nhiều ưu thế, có khả năng cho gắn và chuyển những gen liệu pháp kích thước tương đối lớn từ 30 Kb đến 50 Kb. Vectơ HSV-1 xâm nhiễm tế bào chủ nhanh, thời gian tiềm ẩn dài, đồng thời không gây hoặc ít gây đáp ứng miễn dịch không mong muốn ở tế bào chủ. Mặt khác, có thể tạo vectơ HSV-1 với mức độ cao, nên có nhiều thuận lợi đảm bảo hiệu quả cao trong liệu pháp gen.



Hình 2.17. Sơ đồ cấu trúc bộ gen của herpes virus.

Hiện nay, vectơ HSV-1 sử dụng trong liệu pháp gen còn hạn chế, do vectơ HSV-1 có thể tạo một số hợp chất độc trong tế bào một cách gián tiếp. Ví dụ, một số sản phẩm do các gen thuộc nhóm gen  $\alpha$  - gen rất sớm mã hoá (ICP4, ICP6 ...), tạo nên một số hợp chất độc với tế bào, gây các hiệu ứng không mong muốn của liệu pháp gen. Mặt khác, vectơ HSV-1 chỉ biểu hiện đặc hiệu ở tế bào thần kinh, do đó sử dụng vectơ HSV-1 trong điều trị các loại bệnh bị giới hạn rất hẹp, chủ yếu điều trị các bệnh liên quan đến hệ thần kinh. Gần đây, người ta đã thử nghiệm cài thêm các promoter của các nhóm tế bào khác (không phải tế bào thần kinh), bước đầu thu được kết quả về tính đa dạng trong hoạt động và biểu hiện của vectơ liệu pháp HSV-1.

Nhiều nghiên cứu thực nghiệm, cho thấy vectơ liệu pháp HSV là loại vectơ liệu pháp có triển vọng trong liệu pháp gen. Hướng nghiên cứu thiết kế các loại vectơ HSV mới đa năng không chỉ hoạt động trong các tế bào thần kinh, mà có thể hoạt động trong các loại tế bào khác nhau, mở ra khả năng ứng dụng rộng rãi và hiệu quả của vectơ HSV trong liệu pháp gen.

#### *2.1.5. Các loại vectơ liệu pháp gen có nguồn gốc từ các loại virus khác*

Trên cơ sở thành công của bốn nhóm viral vectơ chủ yếu adenoviral vectơ, retroviral vectơ, AAV viral vectơ và HSV viral vectơ, ngày nay con người đã và đang thiết kế thêm nhiều loại vectơ liệu pháp gen mới, có hiệu quả cao trong chữa và điều trị bệnh tật cho con người.

Bảng 2. 1. So sánh hiệu quả sử dụng một số loại vectơ liệu pháp gen

	Retrovirus	Adenovirus	Adeno associated	DNA trán & Liposom
Hiệu quả điều trị (%)	63%	16%	2%	13%
Kích thước đoạn DNA insert	8 kb	Khoảng 30 kb	4kb	Không giới hạn
Gắn với bộ gen	Có	Không	Hiếm	Hiếm
Sản phẩm	>10 <sup>6</sup> cfu/ml	>10 <sup>11</sup> cfu/ml	>10 <sup>12</sup> cfu/ml	Không giới hạn
Phương pháp	<i>ex vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>
Sự biểu hiện	Dài	Ngắn	Ngắn	Ngắn
Mức độ biểu hiện	Vừa phải	cao	Vừa phải	Cao
Khả năng miễn dịch	Hẹp	Rộng	Rộng	Không
Độ an toàn	Tạo đột biến gen	Phản ứng viêm, tạo độc tố	Phản ứng viêm,	Không

Các loại pox virus, foamy virus, và nhiều loại virus khác đã và đang được sử dụng thử nghiệm thiết kế vectơ liệu pháp gen cho hiệu quả tin cậy. Để lựa chọn loại vectơ liệu pháp thích hợp trong điều trị bệnh, cần nghiên cứu kỹ đặc điểm của bệnh cụ thể, nắm vững các mặt ưu điểm và hạn chế của mỗi loại vectơ liệu pháp để

có thể chọn và sử dụng có hiệu quả nhất. Các loại vectơ liệu pháp có hiệu quả khác nhau, được sử dụng trong liệu pháp gen khác nhau tuỳ theo từng loại bệnh. Hiện nay, retroviral vectơ có hiệu quả điều trị cao nhất trong các loại vectơ liệu pháp (63%), vectơ liệu pháp AAV có hiệu quả điều trị thấp nhất (2%)...

## 2. 2. Các vectơ liệu pháp gen không có bản chất virus (*nonviral vector*)

Trong liệu pháp gen, ngoài các loại vectơ bản chất virus còn sử dụng nhiều loại vectơ không bản chất virus. Viral vectơ có khả năng xâm nhiễm tế bào chủ cao, chuyển các gen liệu pháp và gắn gen liệu pháp có hiệu quả. Mật hạn chế lớn nhất của viral vectơ là mức độ an toàn của tế bào chủ, do các gen chèn không đúng vị trí tạo nên các đột biến gen của tế bào chủ. Trong một số trường hợp, liệu pháp gen gây đáp ứng miễn dịch không mong muốn ở những mức độ nhất định. Ngoài ra, viral vectơ thường bị giới hạn kích thước gen liệu pháp, do đó hạn chế khả năng ứng dụng trong điều trị bệnh bằng liệu pháp gen.

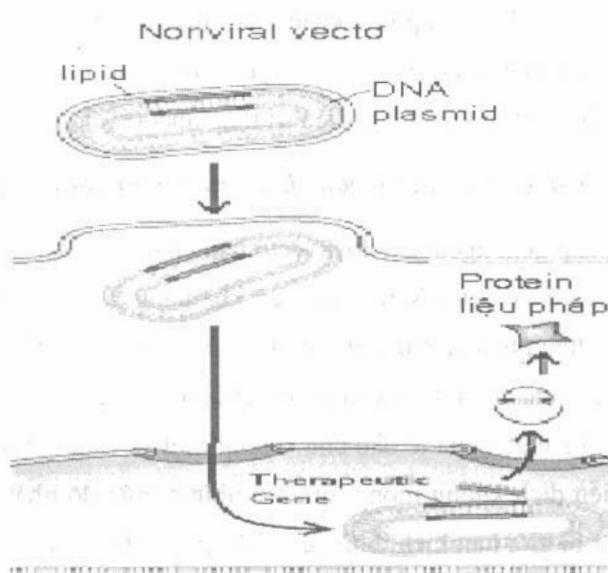
Vectơ liệu pháp không có bản chất virus (*nonviral vector*), được nghiên cứu và ứng dụng nhằm bổ sung những điểm yếu của viral vectơ, tăng cường hiệu quả liệu pháp gen trong điều trị và chữa bệnh. Nonviral vectơ cho phép cài gắn các gen liệu pháp có kích thước không hạn chế, ít gây đột biến nên ngày càng được sử dụng trong chữa bệnh bằng liệu pháp gen.

Vectơ liệu pháp gen không có bản chất virus bao gồm nhiều loại như liposom, phức hợp liposom – polycation, DNA trần, oligo nucleotid, oligo- antisense, tập hợp các peptid đặc hiệu...

### 2. 2. 1. Liposom là vectơ liệu pháp gen

#### a. Liposom

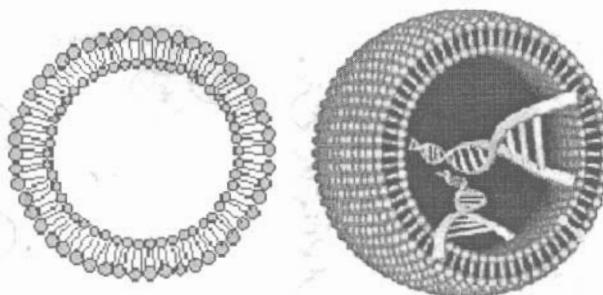
Vectơ liệu pháp liposom đã được thử nghiệm điều trị trên một số đối tượng động vật và con người có hiệu quả. Người ta sử dụng vectơ liposom mang gen CFTR để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh xơ nang, vectơ liposom cài gen mã hóa interleukin-2 được thử nghiệm trong điều trị khối u thận... cho các kết quả khá quan.



Hình 2.18. Sơ đồ hoạt động của nonviral vecto.

Hạn chế lớn nhất khi điều trị liệu pháp gen bằng vecto liposom thường gây một vài hiệu ứng phụ không mong muốn, nên vecto liposom chưa được ứng dụng rộng rãi. Với thành tựu của kỹ thuật gen, con người ngày càng tạo nên nhiều loại vecto liệu pháp gen liposom, và ứng dụng vecto liposom trong điều trị, chữa bệnh bằng liệu pháp gen có hiệu quả hơn.

Liposom cấu tạo từ các lớp màng lipid tạo dạng túi, bên trong chứa nước, kích thước khoảng 10 nm đến 1000 nm. Liposom thường có một lớp lipid mang điện tích dương - DOTMA (dioleoyloxypropyl-trimethyl-ammonium chloride) và các phân tử lipid trung tính - DOPE (dioleoylphosphatidyl-ethanolamine) nên liposom có điện tích dương (+). Liposom có thể kết hợp với các phân tử, hoặc các chất mang điện tích âm (-) tạo thành phức hợp ổn định.



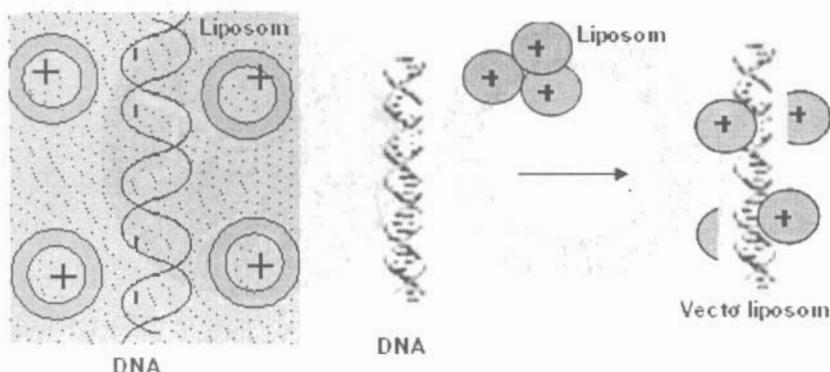
Hình 2.19. Sơ đồ cấu tạo một vectơ liposom.

Liposom và các phức hợp của liposom với các chất khác dễ dàng chui qua màng tế bào, do đó người ta có thể thiết kế các phức hợp liposom mang các gen liệu pháp (liposom-DNA) làm vectơ liệu pháp gen.

*b. Nguyên lý thiết kế vectơ liệu pháp gen liposom (liposome vector)*

Vectơ liệu pháp gen liposom có ưu điểm nổi bật là có thể mang gen liệu pháp có kích thước rất lớn, qua màng tế bào dễ dàng nên được ưa chuộng trong liệu pháp gen. Hiện nay thiết kế tạo vectơ liposom thực chất là tạo các phức hợp liposom-DNA. Phân tử DNA có điện tích âm (-) có thể kết hợp với liposom tạo nên các phức hợp ổn định, được sử dụng làm vectơ liệu pháp gen. Thiết kế vectơ liệu pháp liposom được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau.

- Tạo vectơ liposom bằng cách đặt các đoạn DNA ở mặt trong liposom. Phân tử DNA có thể kết hợp ở phía trong của màng lipid bằng tương tác giữa DNA tích điện âm và màng lipid tích điện dương.



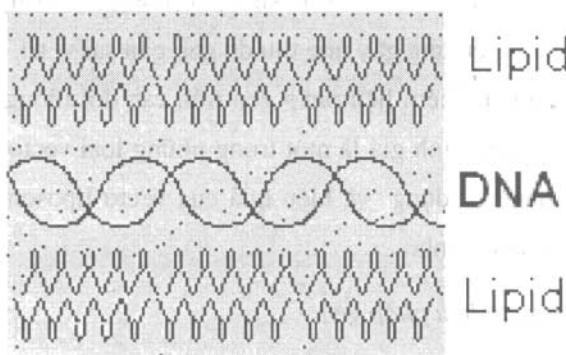
Hình 2. 20. Sơ đồ thiết kế một loại vectơ liposom.

- Phương pháp thường sử dụng nhất là thiết kế các liposom bám dọc theo chiều dài phân tử DNA (gen liệu pháp). Phương pháp này yêu cầu tính toán hợp lý giữa độ dài của gen liệu pháp, với kích thước và số lượng liposom, để đảm bảo được sự cân bằng diện tích, đảm bảo tính ổn định của vectơ. Ví dụ, thiết kế vectơ liposom mang gen liệu pháp có kích thước 500 bp (cặp bazơ), sử dụng loại liposom kích thước 250 nm. Mỗi liposom có khoảng 25000 lipid, trong đó gồm khoảng 1250 phân tử lipid mang điện tích dương (DOTMA), một liposom có tổng diện tích + 1250. Do đó, để thiết kế vectơ liệu pháp liposom thực chất là tạo phức hợp liposom – DNA ổn định, cân bằng diện tích. Trong trường hợp này một vectơ liposom với kích thước gen liệu pháp (DNA) bằng 500 bp có tổng diện tích -5000 (trung bình mỗi cặp bazơ có diện tích -10), cần sử dụng 4 liposom ( $4 \times 1250 = 5000$ ).

- Tạo vectơ liposom bằng cách tạo các lớp màng lipid kép bọc gen liệu pháp, phân tử DNA (gen liệu pháp) ở giữa hai lớp màng kép các phân tử lipid.

Để tăng cường hiệu quả của vectơ liposom, khi thiết kế vectơ liposom người ta thường đưa thêm một lượng nhất định enzym lisozym. Enzym lisozym làm tăng cường tính ổn định và độ bền của DNA. Enzym lisozym bảo vệ DNA tránh

sự phân huỷ của enzym phân huỷ DNA (DNase), nên độ bền của DNA trong vectơ liposom có thể được tăng lên hơn 100 lần. Ngày nay, với tiến bộ của kỹ thuật gen và công nghệ proteomic, con người đã đang thử nghiệm gắn gen liệu pháp với các loại protein khác, hoặc bọc vectơ liposom bằng một lớp PEG (polyethylenglycol) làm tăng tính hiệu quả của vectơ liposom trong liệu pháp gen....



Hình 2.21. Vectơ liposom cấu tạo từ các lớp kép phân tử lipid.

### c. Cơ chế hoạt động của vectơ liposom

Vectơ liposom có khả năng tiếp xúc với màng tế bào của các tế bào đích và chui qua màng tế bào, khi đó lớp các phân tử lipid bị phân huỷ làm cho các gen liệu pháp được đưa vào trong tế bào. Gen liệu pháp có thể được đưa vào trong nhân, tồn tại trong nhân như những đơn vị gen độc lập. Trong nhân các gen liệu pháp có thể có quá trình tái tổ hợp làm cho gen liệu pháp được gắn vào bộ gen của tế bào.

Trong liệu pháp gen, DNA (gen liệu pháp) phải được hoà nhập trong bộ gen tế bào, có thời gian tồn tại tương đối và phải được phiên mã và biểu hiện như các gen riêng biệt của tế bào. Tuỳ theo mục đích cụ thể của từng liệu pháp, yêu cầu gen liệu pháp có thời gian tồn tại lâu dài, ổn định trong bộ gen, hoặc chỉ tồn tại và

hoạt động trong một thời gian ngắn từ vài giờ đến một vài ngày trong tế bào. Vector liposom có thể mang gen liệu pháp kích thước lớn, giúp cho hoạt động của gen liệu pháp trong tế bào đích có hiệu quả hơn.

Sử dụng vector liposom trong liệu pháp gen có nhiều điểm thuận lợi: Vector liposom cho phép mang gen liệu pháp kích thước không hạn chế, có khả năng chuyển gen cho rất nhiều loại tế bào khác nhau, quá trình chuyển gen có hiệu quả trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Một khác, sử dụng vector liposom trong liệu pháp gen còn làm giảm hiệu ứng ung thư do gen gắn sai vị trí.

Bằng nhiều thực nghiệm liệu pháp gen trên các đối tượng động vật và con người, vector liposom được đánh giá là một trong những loại vector liệu pháp gen có tiềm năng lớn, khả năng sử dụng và hiệu quả của vector liposom trong liệu pháp gen ngày càng được khẳng định.

## 2. 2. 2. DNA trần là vector liệu pháp gen

### a. Đặc điểm của vector DNA trần (*Naked DNA vector*)

Trong những năm qua, sử dụng DNA như một nguồn cung cấp gen mới trong chuyển gen ở thực vật và động vật, bằng các phương pháp vật lý, đã thu được nhiều kết quả tốt, con người tiến tới sử dụng DNA trần làm vector liệu pháp gen trong chữa bệnh.

Vector DNA trần được thiết kế ở dạng các plasmid, là những vòng DNA mang gen liệu pháp và một số gen cần thiết cho quá trình tái bản gen trong tế bào chủ. Thiết kế các plasmid theo các kỹ thuật thông thường trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử và kỹ thuật gen.

Vector DNA trần có một số ưu điểm như cho phép mang các gen liệu pháp kích thước không hạn chế, dễ dàng chuyển gen vào tế bào, có hiệu quả với các liệu pháp *ex vivo* và *in vivo*. Các vector DNA trần rất thuận lợi khi đưa gen liệu pháp vào tế bào đích (tế bào ung thư, khối u,...) bằng vi tiêm, nên được ứng dụng nhiều trong chữa bệnh ung thư. Tuy nhiên, do vector DNA trần mang gen liệu pháp không có khả năng gắn vào bộ gen tế bào. Khả năng biểu hiện gen liệu pháp trong tế bào rất

khó khăn, thời gian biểu hiện của gen trong tế bào ngắn nên sử dụng vectơ DNA trân bị hạn chế so với các loại vectơ khác. Mặt khác, DNA trân khi đưa vào tế bào thường gây đáp ứng miễn dịch mạnh, do vậy sử dụng DNA trân làm vectơ trong liệu pháp gen chữa bệnh còn gặp rất nhiều khó khăn.

#### b. *Ứng dụng vectơ DNA trân trong liệu pháp gen*

Hiện nay vectơ DNA trân sử dụng trong liệu pháp gen còn nhiều hạn chế, nhưng đã có một số thực nghiệm điều trị và chữa bệnh bằng vectơ DNA trân cho kết quả tốt. Người ta thường sử dụng kỹ thuật vi tiêm DNA trân vào các tế bào biểu bì, tế bào mô cơ để điều trị một số bệnh di truyền. Ví dụ, bệnh vảy cá hình lá là bệnh rối loạn di truyền do thiếu enzym transglutaminaza1 (TGase1). Vi tiêm vectơ DNA trân mang gen mã hóa gen TGase1 trực tiếp vào mô biểu bì của bệnh, đã phục hồi biểu hiện gen GTase1, làm cho da có khả năng tái sinh.

Vectơ DNA trân mang gen liệu pháp được đưa vào tế bào đích chủ yếu bằng vi tiêm, ngoài ra có thể sử dụng các kỹ thuật bắn gen, xung điện hoặc polyethylenglycol (PEG)...

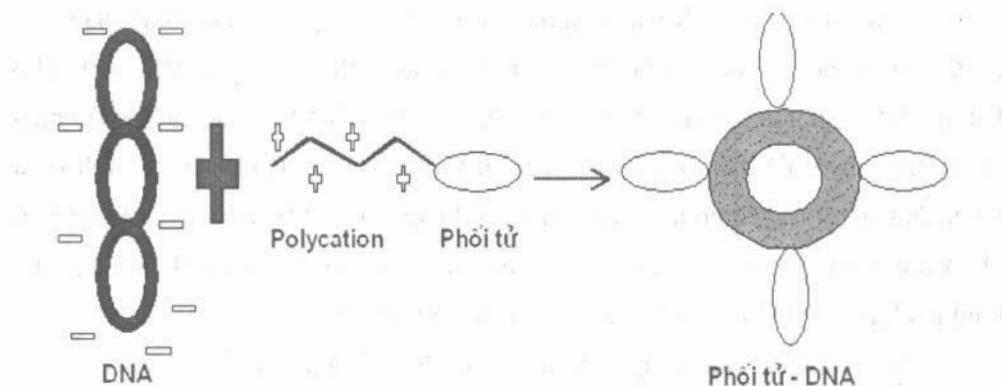
Trong liệu pháp gen, mức độ biểu hiện gen khi sử dụng vectơ DNA trân thấp hơn nhiều so với sử dụng các vectơ có bản chất virus và vectơ liposom..

#### 2. 2. 3 . *Phối tử - DNA là vectơ liệu pháp gen*

##### a. *Đặc điểm của vectơ phối tử - DNA (Ligand-DNA vector)*

Phối tử - DNA là phức hợp gồm ba thành phần phối tử, DNA và polycation. Phối tử (ligand) là thành phần liên kết với màng tế bào, tại các thụ thể (receptor) trên màng tế bào chất của tế bào chủ. Polycation chuỗi các phức hợp mang điện tích dương (+). Gen liệu pháp (DNA) mang điện tích âm (-). Cả ba thành phần tương tác lân nhau tạo thành phức hợp “phối tử – DNA”, phức hợp này qua màng tế bào dễ dàng, giúp chuyển các gen liệu pháp đến các tế bào đích chính xác với hiệu quả cao.

Thiết kế vectơ phổi tử – DNA cần lưu ý kích thước của mỗi thành phần, để vectơ có hiệu quả cao nhất. DNA (gen liệu pháp) trong vectơ ở dạng DNA xoắn kép, không giới hạn kích thước. Phổi tử có thể là một dạng protein đặc hiệu, các đại phân tử sinh học, các kháng thể... Polycation có thể là tập hợp các acid amin (polylysine), hoặc các chất khác (polytransferin)...



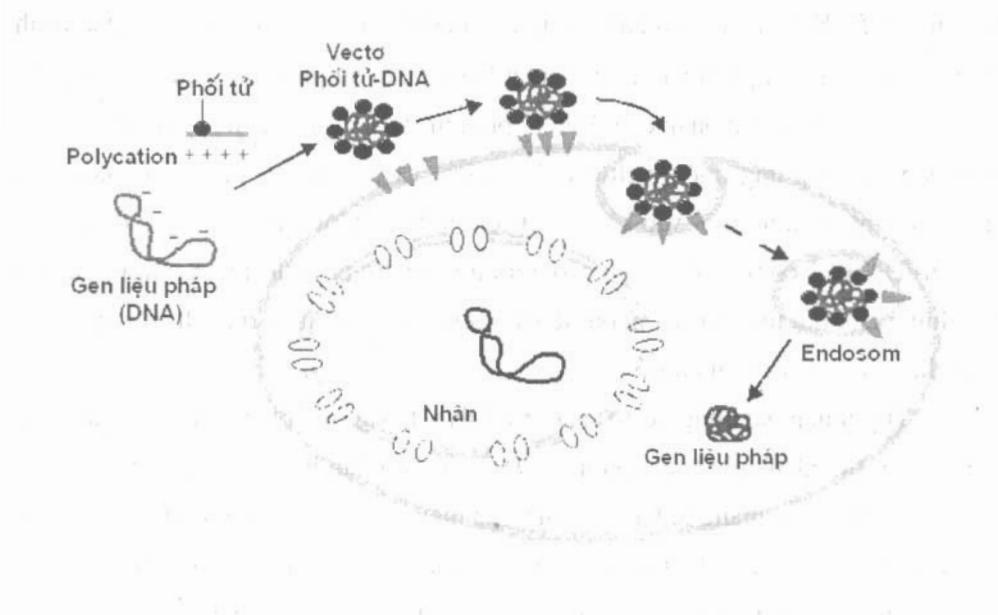
Hình 2. 22. Sơ đồ thiết kế vectơ phổi tử-DNA (Ligand-DNA).

Vectơ phổi tử – DNA đã được thử nghiệm trong nhiều liệu pháp gen *in vivo* và *ex vivo* cho thấy được hiệu quả khá tốt. Ví dụ, Wilson và cộng sự (1992) thử nghiệm đưa gen liệu pháp bằng vectơ phổi tử - DNA chữa bệnh tăng cholesterol trong máu ở thỏ Watanabe. Kết quả sau hai ngày kể từ khi thực hiện liệu pháp, lượng cholesterol trong huyết thanh đã giảm 25-30%, sau 5 ngày lượng cholesterol trở về hàm lượng bình thường. Năm 1995, Ferkol và cộng sự đã đưa gen liệu pháp bằng vectơ phổi tử - DNA vào các tế bào biểu mô khí quản của chuột có thể được dùng để điều trị bệnh xơ nang....

#### b. Hoạt động và ứng dụng vectơ phổi tử- DNA trong liệu pháp gen

Các vectơ phổi tử- DNA được sử dụng trong liệu pháp gen nhằm chuyển gen liệu pháp vào tế bào, qua các thụ thể (receptor) trên màng tế bào. Trong vectơ

các phổi tử có vai trò xác định vị trí các receptor trên màng tế bào, làm cho phức hợp phổi tử - DNA có thể qua được hàng rào kiểm soát của màng tế bào, giải phóng DNA (gen liệu pháp) vào trong tế bào. Tuỳ theo loại tế bào đích cần thực hiện liệu pháp gen, khi thiết kế vectơ phổi tử - DNA cần phải chọn loại phổi tử thích hợp. Chẳng hạn các tế bào của các mô thuộc hệ hô hấp, gan và ruột có các thụ thể globulin miễn dịch (immunoglobulin receptor), một số loại thụ thể transferrin (transferrin receptor), thụ thể insulin (insulin receptor)... với mỗi loại tế bào đích cần lựa chọn loại phổi tử phù hợp giúp cho vectơ phổi tử - DNA liên kết với các thụ thể tốt hơn, liệu pháp gen hiệu quả hơn.



Hình 2. 23. Sơ đồ hoạt động của vectơ phổi tử-DNA.

Khi tiếp cận các receptor đặc hiệu màng tế bào lõm vào, phức hợp phổi tử - DNA được đưa vào trong tế bào tạo endosom giống như cơ chế thực bào. Sau đó, các endosom bị phá vỡ bởi các tác nhân phá vỡ màng như peptid fusogenic, các hợp chất làm giảm tính liên kết của lipid như cloroquin..., làm cho gen liệu pháp được giải phóng trong tế bào chất. Gen liệu pháp chui qua lỗ màng nhân vào nhân, phần lớn gen liệu pháp (DNA) tồn tại tự do ngoài bộ gen của tế bào đích, ở một số các tế

bào đang phân chia gen liệu pháp có thể hoà nhập vào trong bộ gen của tế bào chủ nhờ cơ chế trao đổi chéo và tái tổ hợp. Gen liệu pháp được phiên mã trong nhân và dịch mã trong tế bào chất tạo nên protein liệu pháp có khả năng chữa bệnh. Tuỳ theo đặc điểm của gen liệu pháp, protein liệu pháp tồn tại trong tế bào hoặc được tiết ra khỏi tế bào.

### *c. Ưu điểm và hạn chế của vector phôi tử- DNA trong liệu pháp gen*

Sử dụng vector phôi tử- DNA là một phương pháp hiệu quả trong liệu pháp gen, nhằm chuyển một lượng lớn các gen liệu pháp không giới hạn kích thước (có thể tới gần 50 Kb) vào tế bào đích trong các liệu pháp *in vivo* và *ex vivo*. Quá trình chuyển các gen liệu pháp vào tế bào đích không cần sự phân chia của tế bào, khả năng biểu hiện gen liệu pháp cao. Vector phôi tử- DNA ưu việt hơn các viral vector là không gây đáp ứng miễn dịch ở tế bào đích, và có thể đưa nhiều loại gen liệu pháp khác nhau đồng thời vào cùng một loại tế bào. Một đặc điểm quý của vector phôi tử- DNA là có tính đặc hiệu cao, mỗi loại vector phôi tử- DNA chỉ thích hợp với những loại thụ thể của các nhóm tế bào riêng biệt, nên hiệu quả chuyển gen liệu pháp đúng tế bào đích rất cao.

Tuy nhiên, sử dụng vector phôi tử- DNA trong liệu pháp gen còn gặp một số trở ngại: thứ nhất các vecor phôi tử-DNA bị giới hạn bởi kích thước tương ứng của các thụ thể trên màng tế bào, và tính đặc hiệu của các thụ thể, một loại thụ thể có thể có mặt trên nhiều loại tế bào gây khó khăn cho liệu pháp gen. Thứ hai, các gen liệu pháp tồn tại tự do, rất hiếm có trường hợp gen liệu pháp hoà nhập vào trong bộ gen tế bào, do vậy thời gian biểu hiện gen liệu pháp rất ngắn, phải tiến hành liệu pháp lặp đi lặp lại nhiều lần. Thứ ba, hiện nay con người còn hiểu biết chưa đầy đủ về cấu trúc đặc trưng của phức hợp phôi tử- DNA- polycation và cơ chế hoạt động của vector phôi tử – DNA.

Vector phôi tử – DNA là một vector ít gây đáp ứng miễn dịch, không gây tăng viêm, không gây tổn thương tế bào hoặc tạo các hiệu ứng phụ không mong muốn, do vậy vector phôi tử – DNA là một trong những loại vector liệu pháp gen có

hiệu quả. Hiện nay, sử dụng vectơ phôi từ - DNA trong điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen là một lĩnh vực mới, cần tiếp tục các nghiên cứu để hoàn thiện phương pháp, làm cho vectơ phôi từ - DNA là vectơ có hiệu quả cao hơn trong liệu pháp gen.

## 2. 2. 4. Vectơ liệu pháp gen là oligonucleotid

### a. Đặc điểm của vectơ oligonucleotid

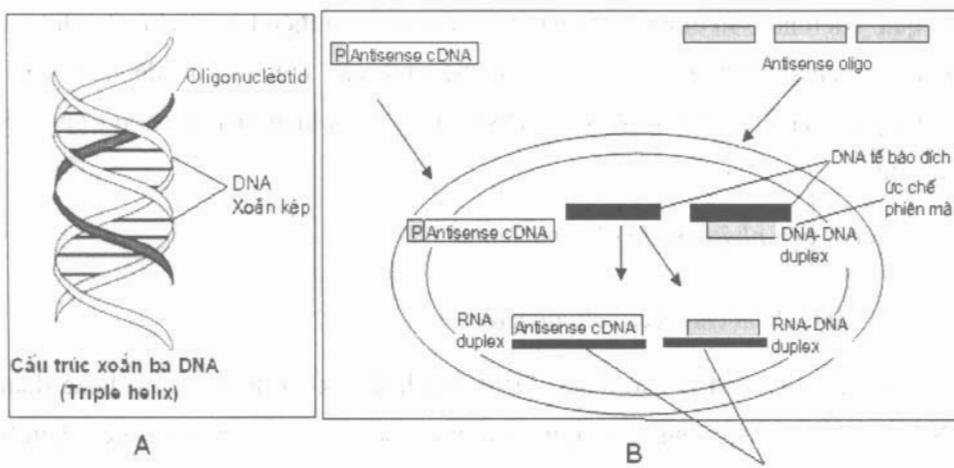
Oligonucleotid là các đoạn DNA mạch đơn kích thước ngắn, hoặc đoạn cDNA mạch đơn được tổng hợp trên cơ sở mạch khuôn của gen bệnh (gen đích bị hỏng). Trong liệu pháp gen, các oligonucleotid được đưa vào tế bào đích tạo các dạng xoắn ba của DNA (triple helix), ngăn cản hoạt động và biểu hiện của một gen nào đó, nhằm hạn chế mức độ biểu hiện của bệnh.

Các đoạn oligonucleotid có kích thước trung bình 20- 40 nucleotid, thích hợp tạo các xoắn ba của DNA. Mục đích chủ yếu của liệu pháp tạo các xoắn ba DNA ở những gen bệnh (gen đích bị đột biến hoặc hoạt động không bình thường), để hạn chế quá trình phiên mã và dịch mã, hạn chế biểu hiện của protein bệnh lý. Oligonucleotid được sử dụng với vai trò ức chế, kìm hãm hoạt động của gen đích, nên các đoạn oligonucleotid còn được gọi là các oligo - antisens hay antigen, được sử dụng như một loại vectơ liệu pháp gen.

### b. Hoạt động và ứng dụng của vectơ oligonucleotid

Vectơ oligonucleotid có thể được đưa vào tế bào bằng nhiều kỹ thuật khác nhau như vi tiêm, điện xung, hoặc trong các liposom... (Xem chương 3: Các kỹ thuật cơ bản của liệu pháp gen).

Trong nhân tế bào các oligonucleotid bắt cặp với các cặp nucleotid bổ sung trên phân tử DNA xoắn kép theo nguyên lý Chargaff tạo nên các nhóm ba nucleotid đối nhau kiểu G - (G-C), T - (A-T) hoặc G - (C-G), T - (T-A).



Hình 2. 24. Sơ đồ hoạt động của vectơ liệu pháp oligonucleotid :

A - hình thành các xoắn ba DNA (DNA triple helix).

B - hình thành các dạng RNA duplex, RNA- DNA, DNA-DNA duplex.

Sử dụng oligonucleotid trong liệu pháp gen, bên cạnh khả năng tạo triple helix với các gen bệnh là DNA mạch kép (DNA triplex), các vectơ oligonucleotid còn có thể tạo nên các DNA-DNA duplex với các gen của virus DNA mạch đơn, gây ức chế phiên mã của gen virus, hoặc tạo dạng DNA-RNA duplex với gen của virus RNA gây ức chế phiên mã và dịch mã của các gen này, hạn chế biểu hiện của protein bệnh lý, giảm mức độ bệnh tật.

Nhiều thực nghiệm cho thấy vectơ oligonucleotid có thể sử dụng trong liệu pháp gen theo cơ chế tạo xoắn ba DNA với gen bệnh, hạn chế các bệnh ung thư (ung thư da, ung thư ruột, ung thư phổi...), chống bệnh viêm gan B, bệnh cúm, HIV...

Mặt hạn chế của vectơ oligonucleotid trong liệu pháp gen là các oligo dễ bị phân huỷ bởi các enzym nucleaza nội bào và enzym ngoại bào, thời gian tồn tại trong tế bào ngắn, do đó hạn chế khả năng ứng dụng của các oligonucleotid.

Vectơ oligonucleotid được sử dụng trong thực nghiệm tương đối sớm (M. Cooney, 1988), với các kỹ thuật hiện đại vectơ oligonucleotid có thể là một trong những vectơ liệu pháp gen được sử dụng rộng rãi trong tương lai.

## 2. 2. 5. Một số loại vectơ liệu pháp gen khác

Ribozym được sử dụng là vectơ liệu pháp gen mới. Ribozym là các đoạn RNA ngắn khoảng 40 đến 50 ribonucleotid có trình tự đặc hiệu, có chức năng như một enzym cắt được phát hiện năm 1983 (Thomas Cech, Đại học Colorado và Sid Altman, Đại học Yale). Ribozym cắt các phân tử RNA khác ở những vị trí nhất định, nên được sử dụng trong một số liệu pháp gen chữa ung thư hoặc chữa các bệnh thoái hoá thần kinh (neuro-degenerative). Ribozym có thể làm mất chức năng mRNA của gen bệnh, ức chế dịch mã làm hạn chế biểu hiện của bệnh. Ribozym được thương mại hóa từ 1989, nhưng đến nay sử dụng vectơ ribozym trong liệu pháp gen còn rất mới mẻ, số lượng các thử nghiệm cho kết quả chưa rõ rệt cần tiếp tục các nghiên cứu để tăng cường hiệu quả của ribozym.

Nhiễm sắc thể nhân tạo cũng được xem là vectơ liệu pháp gen. Nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn – BAC (bacterial artificial chromosome), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú – MAC (mammalian artificial chromosome), nhiễm sắc thể nhân tạo của người - HAC (human artificial chromosome)... đã và đang được thử nghiệm làm vectơ liệu pháp gen chữa một số bệnh có hiệu quả.

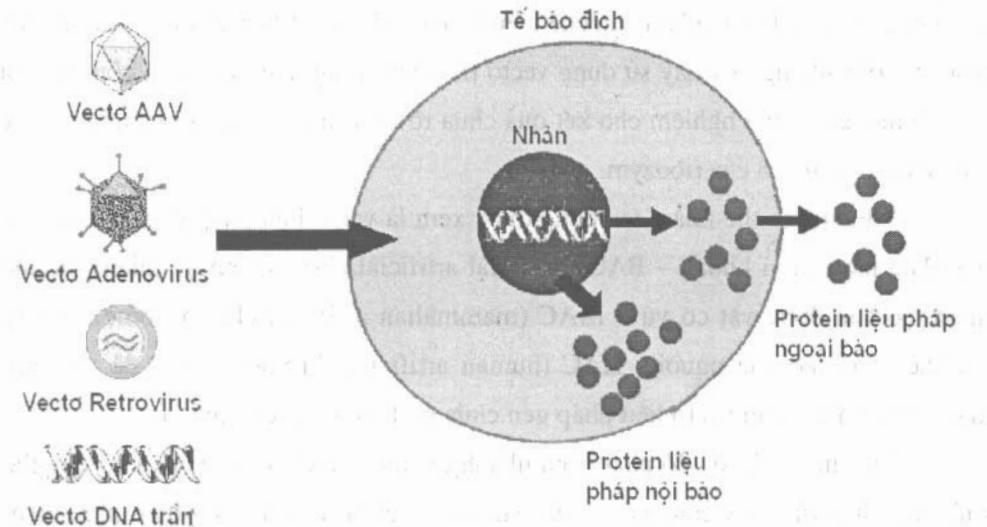
Đến nay, với tốc độ phát triển nhanh chóng của kỹ thuật gen và công nghệ sinh học phân tử, ngày càng có nhiều loại vectơ liệu pháp gen mới được phát hiện, nhiều vectơ liệu pháp được cải tiến tăng tính hiệu quả. Mỗi loại vectơ liệu pháp gen đều có những ưu điểm và những mặt hạn chế, không có một loại vectơ liệu pháp nào tối ưu cho tất cả các kỹ thuật liệu pháp gen.

Để đảm bảo tính an toàn cao cho người bệnh, đảm bảo hiệu quả cao của liệu pháp gen trong điều trị và chữa bệnh, cần phải nghiên cứu thật kỹ lưỡng loại vectơ liệu pháp gen và lựa chọn kỹ thuật liệu pháp thích hợp tránh gây các hiệu ứng phụ bất lợi. Mặt khác, sử dụng vectơ liệu pháp phải cân nhắc tính hai mặt lợi

- hại của vectơ và liệu pháp gen trong chữa bệnh, nhằm bảo vệ tốt nhất sức khoẻ con người.

## II. CÁC KỸ THUẬT CƠ BẢN CỦA LIỆU PHÁP GEN

Mục đích cuối cùng của liệu pháp gen là tìm ra các kỹ thuật chuyển các gen liệu pháp vào tế bào người, làm cho các gen liệu pháp được phiên mã và dịch mã tạo nên các protein liệu pháp có tác dụng chữa bệnh. Sử dụng các loại vectơ liệu pháp khác nhau cho từng loại tế bào đích thích hợp, tạo nên các loại protein liệu pháp khác nhau, có thể là protein nội bào hoặc protein ngoại bào.



Hình 2. 25. Sơ đồ mục đích của liệu pháp gen.

Các kỹ thuật chuyển gen có vai trò vô cùng quan trọng, quyết định hiệu quả của liệu pháp gen. Để có hiệu quả liệu pháp gen cao, không gây các hiệu ứng phụ cho người bệnh cần nghiên cứu kỹ đặc điểm của loại bệnh cần điều trị liệu

pháp gen, để có thể lựa chọn loại vectơ liệu pháp, loại tế bào đích cũng như kỹ thuật chuyển gen thích hợp và có hiệu quả cao.

Có rất nhiều loại tế bào đích khác nhau, có thể sử dụng có hiệu quả cao trong liệu pháp gen: tế bào lympho (lymphocyte), nguyên bào sợi (fibroblastocyte), tế bào gan (hepatocyte), tế bào biểu bì (keratinocyte), tế bào gốc (stem cells) và các tế bào sinh dục....

Để đảm bảo hiệu quả cao trong chữa bệnh bằng liệu pháp gen, cần căn cứ vào đặc điểm loại tế bào đích, loại vectơ liệu pháp để lựa chọn kỹ thuật chuyển gen thích hợp. Hiện nay, trong liệu pháp gen có hai phương pháp cơ bản, là chuyển gen ngoài cơ thể sống (*ex vivo*) và chuyển gen trực tiếp vào cơ thể sống (*in vivo*).

## 1. Các phương pháp chuyển gen thường sử dụng trong liệu pháp gen

### 1.1. Phương pháp chuyển gen ngoài cơ thể sống (*ex vivo*)

Phương pháp chuyển gen ngoài cơ thể sống hay còn gọi là phương pháp *ex vivo*. Phương pháp *ex vivo* được ứng dụng chữa và điều trị nhiều loại bệnh có kết quả tốt. Thành công đầu tiên của liệu pháp gen chữa bệnh cho con người (1990) là sử dụng phương pháp *ex vivo*, để chữa bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng ADA - SCID. Bệnh ADA – SCID do bị hỏng gen mã hoá enzym ADA (Adenosine Deaminase Deficiency). Gen mã hoá enzym ADA có kích thước 32 kb gồm 12 exon, nằm trên nhiễm sắc thể số 22 của người. Khi gen này bị hỏng gây mất chức năng các tế bào lympho T và B, gây rối loạn chức năng miễn dịch của cơ thể, làm cho cơ thể miễn dịch rất kém. Được các bác sĩ French Anderson và R. Michael Blaese điều trị bằng liệu pháp gen *ex vivo*, hai em gái Ashanti 4 tuổi và Cynthia 9 tuổi được chữa khỏi bệnh thiếu hụt miễn dịch năm 1990.

Phương pháp *ex vivo* là phương pháp lấy tế bào bị bệnh có gen hỏng ra khỏi cơ thể, thực hiện các liệu pháp gen ngoài cơ thể tạo các tế bào đã thay các gen lành cho gen bị hỏng (gen gây bệnh), sau đó tế bào lành được nhân lên một khối

lượng đủ lớn rồi đưa trở lại cơ thể. Phương pháp *ex vivo* có thể làm hạn chế biểu hiện bệnh hoặc chữa khỏi bệnh hoàn toàn.

Phương pháp *ex vivo* gồm một số bước cơ bản sau:

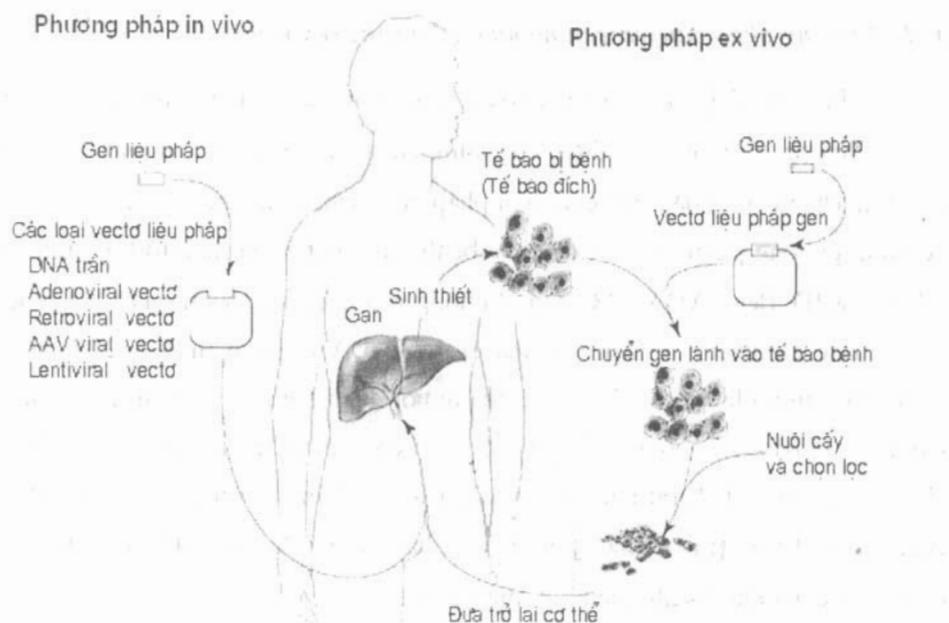
- Bước 1: Bằng kỹ thuật sinh thiết, lấy các tế bào từ các mô bị bệnh ra khỏi cơ thể người bệnh, nuôi cấy ở những điều kiện thích hợp đảm bảo các tế bào bị bệnh vẫn phân chia bình thường.

- Bước 2: Tách dòng gen liệu pháp và chọn lọc các vectơ liệu pháp thích hợp với tế bào bị bệnh (tế bào đích). Tạo nên các vectơ tái tổ hợp mang gen liệu pháp (gen lành), bằng công nghệ DNA tái tổ hợp.

- Bước 3: Đưa vectơ tái tổ hợp mang gen lành vào tế bào đích, nuôi cấy các tế bào đích trong những điều kiện thích hợp, đảm bảo khả năng phân chia bình thường của các tế bào.

#### Phương pháp *in vivo*

#### Phương pháp *ex vivo*



Hình 2. 26. Sơ đồ các phương pháp chuyển gen trong liệu pháp gen .

- Bước 4: Kiểm tra, theo dõi chặt chẽ các thế hệ tế bào đích mới tạo nên trong quá trình nuôi cấy. Chọn lọc những tế bào khỏe mạnh bình thường, là những tế bào bị bệnh đã được thay thế gen bệnh bằng gen lành.

- Bước 5: Nuôi cấy riêng các tế bào bình thường đã chọn lọc được, tiếp tục theo dõi biểu hiện của gen lành trong tế bào, kiểm tra mức độ đáp ứng miễn dịch và các hiệu ứng phụ... để chọn lọc các tế bào hoàn toàn đáp ứng yêu cầu chữa bệnh.

- Bước 6: Nuôi cấy tế bào khỏe mạnh, để các tế bào phân chia đạt một số lượng cần thiết, sau đó đưa các tế bào này quay trở lại cơ thể người bệnh. Tiếp tục theo dõi hoạt động của các tế bào khỏe mạnh trong cơ thể người bệnh.

Phương pháp *ex vivo* thường được áp dụng điều trị trong các liệu pháp gen soma (somatic gene therapy). Phương pháp *ex vivo* thường sử dụng các loại vectơ liệu pháp như: adenoviral vectơ, retroviral vectơ, lentiviral vectơ, AAV vectơ, DNA trần, liposom, polycation.... . Các loại tế bào đích thường dùng là các tế bào soma như tế bào tuỷ xương, tế bào gan, tế bào gốc, tế bào biểu bì, ....

### ***1. 2. Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào cơ thể sống (in vivo)***

Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào cơ thể sống gọi là phương pháp *in vivo*. Phương pháp *in vivo* có thuận lợi căn bản là không cần lấy tế bào bị bệnh ra ngoài cơ thể sống, ít thao tác liệu pháp hơn, nhưng hiệu quả thường không rõ rệt do không kiểm soát được mức độ hòa nhập của các gen liệu pháp trong tế bào bị bệnh.

Phương pháp *in vivo* gồm một số bước cơ bản sau:

- Bước 1: Căn cứ đặc điểm của bệnh, loại tế bào hoặc mô bị bệnh để chọn vectơ liệu pháp thích hợp với loại tế bào bị bệnh (tế bào đích).

- Bước 2: Tách dòng gen liệu pháp thích hợp, tạo các vectơ tái tổ hợp mang gen liệu pháp.

- Bước 3: Bằng kỹ thuật vi tiêm, đưa vectơ tái tổ hợp mang gen liệu pháp vào tế bào bệnh hoặc mô bị bệnh.

- Bước 4: Kiểm tra, theo dõi chặt chẽ hoạt động của các vectơ tái tổ hợp trong cơ thể người bệnh, cũng như mọi thay đổi về mức độ biểu hiện bệnh, trạng thái sức khoẻ... .

Phương pháp *in vivo* thường sử dụng các loại vectơ liệu pháp là: adenoviral vectơ, retroviral vectơ, AAV vectơ, HSV-1 vectơ, DNA trần, và liposom. Nhiều loại bệnh có thể được điều trị bằng liệu pháp *in vivo*, trong đó điều trị bệnh ung thư cho kết quả tốt nhất.

## 2. Một số kỹ thuật thường sử dụng trong liệu pháp gen

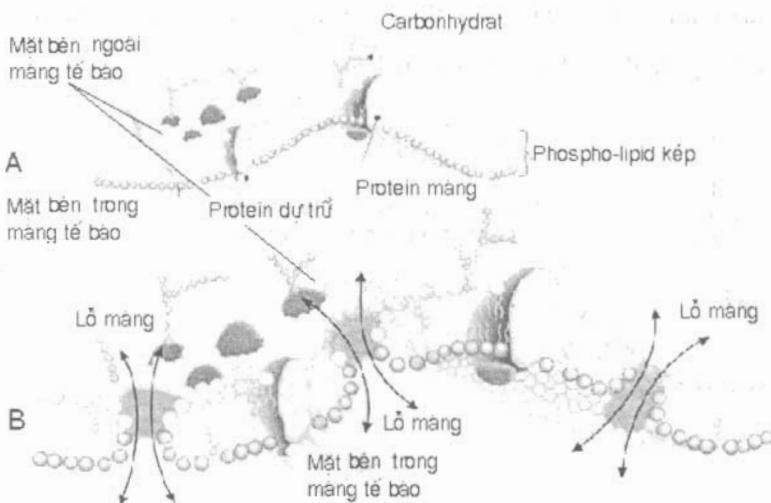
### 2.1. Kỹ thuật vi tiêm (*micro-injection*)

Kỹ thuật vi tiêm trong liệu pháp gen soma thường sử dụng để tiêm các vectơ liệu pháp trực tiếp vào các khối u ung thư. Các vectơ liệu pháp có thể mang các gen mã hoá độc tố (toxine), cytokin để hạn chế sự phát triển của khối u hoặc tiêu diệt tế bào khối ung thư. Vi tiêm có thể được sử dụng để đưa trực tiếp vectơ mang gen dystrophin vào mô cơ người bệnh bị teo cơ do bị bệnh loạn dưỡng cơ (muscular dystrophy), thường sử dụng. Ngoài ra, nhiều liệu pháp sử dụng kỹ thuật vi tiêm để đưa vectơ mang gen liệu pháp vào thẳng tế bào đích, với sự hỗ trợ của kính hiển vi. Kỹ thuật vi tiêm cũng được sử dụng trong liệu pháp gen tế bào mầm, để đưa các gen đã biến đổi trực tiếp vào tế bào trứng, hoặc giai đoạn đầu của sự phát triển phôi...

Để thực hiện kỹ thuật vi tiêm cần có thiết bị vi tiêm, cũng như các điều kiện phụ trợ. Vi tiêm chủ yếu sử dụng vectơ DNA trần ở dạng plasmid, hoặc vectơ là các đoạn oligonucleotid. Kỹ thuật vi tiêm được sử dụng với liệu pháp *ex vivo* và cả liệu pháp *in vivo*.

### 2.2. Kỹ thuật điện xung (*electroporation*)

Kỹ thuật điện xung thường sử dụng trong liệu pháp *ex vivo*. Nhờ tác động của xung điện tạo nên các “lỗ” màng, giúp cho các vectơ không có bản chất virus dễ dàng mang gen liệu pháp vào trong tế bào.



Hình 2. 27. A - Màng tế bào trước khi có xung điện.

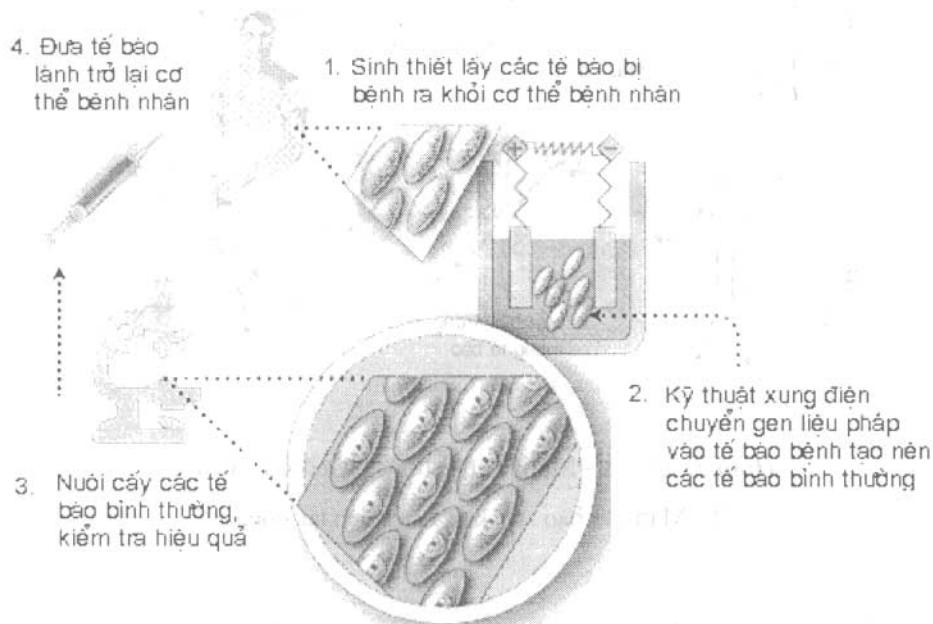
B - Màng tế bào sau khi xung điện tác động.

Sử dụng thiết bị điện xung (electroporation) tạo điện thế cao khoảng 500 V/cm, với khoảng thời gian ngắn (4 - 5 phân nghìn giây) tạo nên các lỗ trên màng tế bào, làm cho gen liệu pháp vào tế bào dễ dàng. Trong nhiều trường hợp, kỹ thuật điện xung chuyển các gen liệu pháp vào trong nhân tế bào, các gen liệu pháp có thể tồn tại trong nhân tế bào đích như những gen độc lập có chức năng. Một số ít trường hợp gen liệu pháp có thể xâm nhập vào bộ gen của tế bào, nhờ quá trình tái tổ hợp ở những vị trí tương đồng, gen liệu pháp có thể thay thế gen bị hỏng.

### 2. 3. Kỹ thuật bắn gen (gene gun)

Kỹ thuật bắn gen là một trong những kỹ thuật chuyển vectơ mang gen liệu pháp vào tế bào đích có hiệu quả cao. Thực hiện kỹ thuật bắn gen cần có thiết bị bắn gen (gene gun), và các vi đạn làm bằng vàng nguyên chất. Kích thước vi đạn trong liệu pháp gen ở động vật và người từ 1 - 6 micromet. Các vi đạn được trộn với vectơ

mang gen liệu pháp và phụ gia, tạo thành một lớp màng bao quanh vi đạn. Bằng lực đẩy mạnh của khí heli hoặc gas trong thiết bị bắn gen, làm cho vi đạn đã được bao bọc bởi gen liệu pháp được đưa vào trong tế bào.

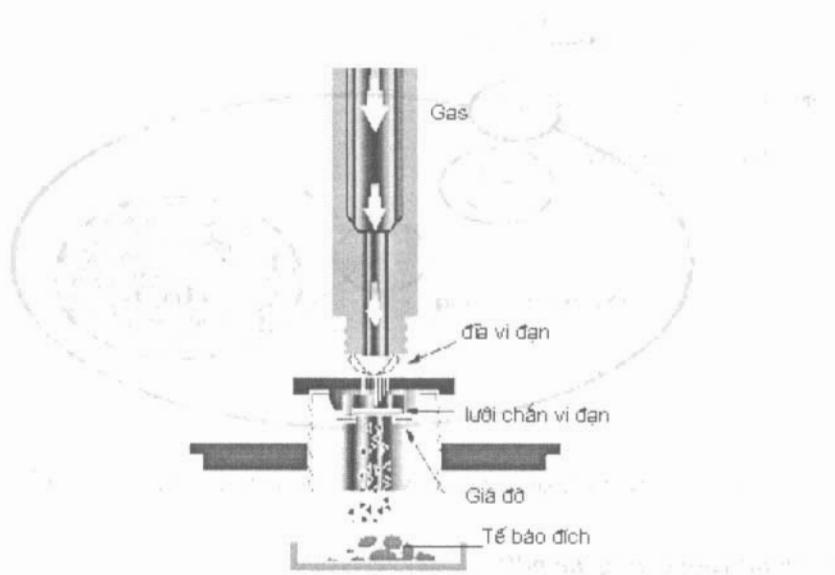


Hình 2. 28. Sơ đồ kỹ thuật điện xung trong liệu pháp gen *ex vivo*.

Liệu pháp gen sử dụng kỹ thuật bắn gen có hiệu quả cao, khi lựa chọn vectơ mang gen liệu pháp phù hợp với kích thước vi đạn. Cần tính toán chính xác khoảng cách từ đầu nòng súng bắn gen đến tế bào đích, cũng như áp lực khí nén của súng bắn gen, tránh trường hợp vi đạn bắn quá mạnh hoặc quá yếu. Sau khi thực hiện kỹ thuật bắn gen, cần theo dõi chặt chẽ hoạt động của gen liệu pháp.

Kỹ thuật bắn gen thường sử dụng vectơ liệu pháp là DNA trần, phức hợp DNA- liposom... Trong liệu pháp *ex vivo* có thể kiểm tra hiệu quả bắn gen và hiệu quả hoạt động của gen liệu pháp trước khi đưa trở lại cơ thể sống, nên hiệu quả

tương đối cao. Trong liệu pháp *in vivo*, do không kiểm soát chính xác tế bào đích, nên hiệu quả liệu pháp không cao.

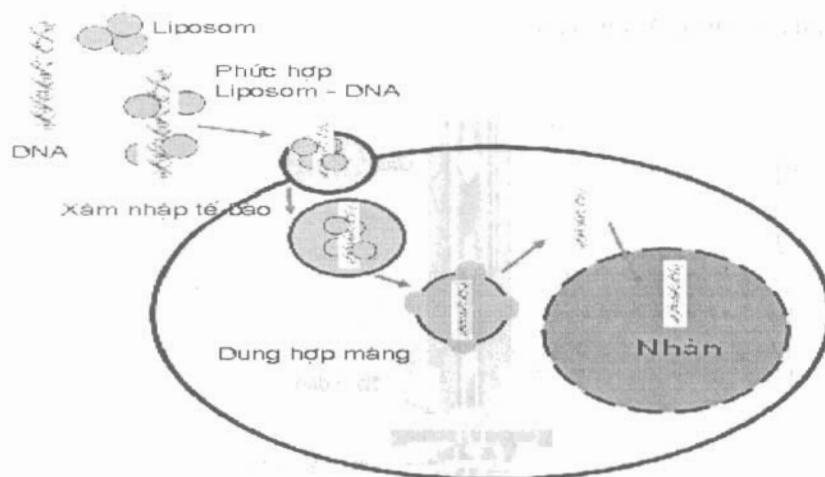


Hình 2. 29. Sơ đồ hoạt động của súng bắn gen.

## 2. 4. Kỹ thuật liposom (*liposome technique*)

Liposom mang gen liệu pháp có khả năng chui qua màng tế bào, đưa các gen liệu pháp vào trong tế bào. Trong tế bào gen liệu pháp có thể tồn tại như các gen độc lập trong nhân, được dịch mã tạo các protein liệu pháp có tác dụng chữa bệnh, hoặc có sự tái tổ hợp với bộ gen tế bào, hòa nhập và cùng tồn tại với bộ gen của tế bào.

Vectơ liposom có thể mang gen liệu pháp kích thước lớn không hạn chế, có khả năng chuyển gen cho rất nhiều loại tế bào khác nhau, có hiệu quả trong liệu pháp *ex vivo* và *in vivo*. Kỹ thuật liposom dễ thực hiện, thời gian phát hiện kết quả nhanh, tương đối an toàn cho người bệnh do làm giảm hiệu ứng gen gắn sai vị trí hạn chế gây đột biến gen và ung thư. Thực hiện kỹ thuật liposom cần lưu ý chọn loại tế bào đích thích hợp để nâng cao hiệu quả của liệu pháp gen.



Hình 2. 30. Sơ đồ hoạt động của vectơ liposom trong liệu pháp gen.

## 2. 5. Kỹ thuật viên gen (gene pill)

Kỹ thuật “viên gen” là một kỹ thuật còn rất mới mẻ trong liệu pháp gen. “Viên gen” là phương pháp điều trị bệnh bằng liệu pháp gen, sử dụng theo đường uống. Kỹ thuật viên gen giúp người bệnh thuận lợi rất nhiều trong điều trị, độ an toàn rất cao, dễ sử dụng trong điều trị. Tuy nhiên, hiện nay kỹ thuật viên gen có hiệu quả chưa cao, do chỉ có thể mang các gen liệu pháp có kích thước nhỏ, hiệu quả liệu pháp phụ thuộc nhiều vào trạng thái cơ thể của bệnh nhân. Mặt khác, trình độ khoa học công nghệ hiện tại, mới chỉ tạo ra một số ít loại viên gen trong điều trị thử nghiệm. Với sự tiến bộ không ngừng của khoa học kỹ thuật, chắc chắn “viên gen” sẽ trở thành một kỹ thuật rất hiệu quả, để điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen trong tương lai.

Kỹ thuật viên gen yêu cầu tập hợp một lượng đủ lớn gen liệu pháp kích thước nhỏ, có thể ở dạng plasmid hoặc phức hợp DNA-peptid, được bao bọc trong một màng bao hỗn hợp lipid đặc hiệu giống như kiểu màng bao viên thuốc kháng sinh. Sau khi gen liệu pháp được đưa vào trong tế bào biểu mô ruột, được phiền mã dịch mã tạo các protein liệu pháp có tác dụng chữa bệnh.

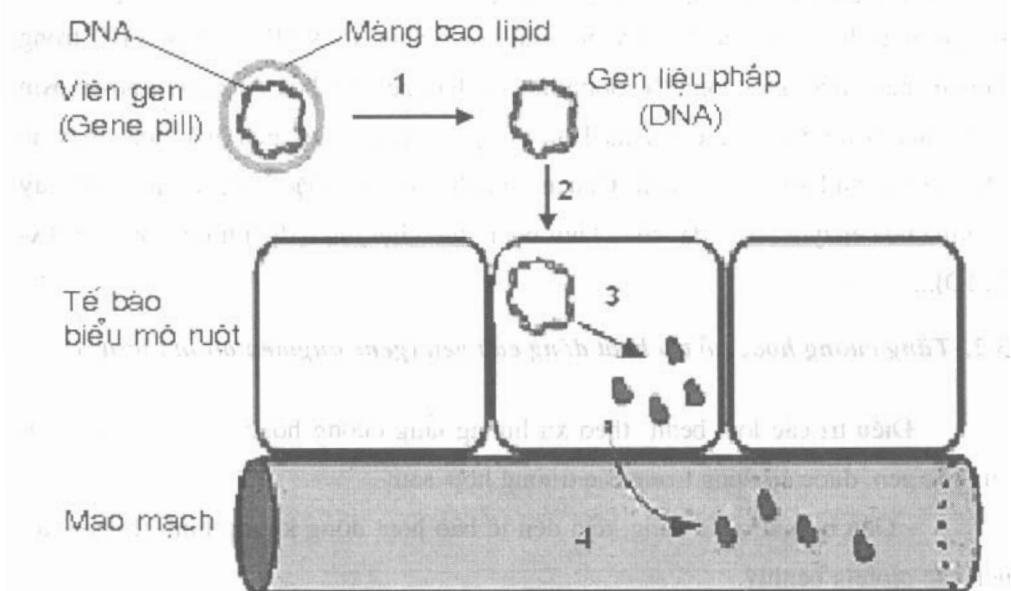
Các bước cơ bản của kỹ thuật viên gen gồm:

1- Viên gen (gene pill) được đưa vào cơ thể bằng đường miệng, gọi là uống “thuốc gen”.

2- Gen liệu pháp được giải phóng, được hấp thụ qua màng tế bào biểu mô ruột.

3 - Protein liệu pháp được tổng hợp trong tế bào biểu mô ruột.

4 - Protein liệu pháp vào mao mạch, di đến các mô bị bệnh, ức chế hoạt động của gen bệnh hoặc làm giảm biểu hiện bệnh.



Hình 2. 31. Sơ đồ hoạt động của “viên gen” (gene pill).

## 2. 6. Một số kỹ thuật khác trong liệu pháp gen

Bên cạnh các kỹ thuật cơ bản nói trên, trong liệu pháp gen còn sử dụng một số kỹ thuật khác như kỹ thuật canxi phosphate (Calcium phosphate precipitation), kỹ thuật polycation...

Trong điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen thường sử dụng phối hợp nhiều kỹ thuật khác nhau, để đảm bảo hiệu quả chữa bệnh cao nhất.

### **3. Một số xu hướng chữa bệnh bằng liệu pháp gen hiện nay**

#### ***3.1. Thay thế gen liệu pháp vào vị trí gen hỏng (gene replacement)***

Liệu pháp gen thay thế gen hỏng bằng các gen lành, hoặc gen có chức năng chữa bệnh là xu hướng được nghiên cứu nhiều nhất. Nhiều bệnh gây nên do một gen bị đột biến, dẫn đến rối loạn chức năng gen gây thay đổi cấu trúc protein tạo nên các trạng thái bệnh lý. Chiến lược thay thế gen đã được áp dụng trong một số trường hợp điển hình như: thay gen mã hoá “Nhân tố VIII” (Factor VIII) trong điều trị bệnh máu khó đông (hemophilia A), thay gen mã hoá Anpha-1-anti-trypsin khi chữa bệnh thiếu hụt Anpha-1-anti-trypsin hoặc thay gen mã hoá enzyme glucocerebrosidase trong bệnh Gauche (bệnh run rẩy). Đặc biệt, trường hợp thay gen mã hoá enzym ADA đã chữa khỏi bệnh thiếu hụt miễn dịch trầm trọng (ADA-SCID)...

#### ***3.2. Tăng cường hoặc hỗ trợ hoạt động của gen (gene augmentation therapy)***

Điều trị các loại bệnh theo xu hướng tăng cường hoặc hỗ trợ hoạt động của các gen, được áp dụng trong các trường hợp sau:

- Gen bị mất chức năng, dẫn đến tế bào hoạt động không bình thường tạo nên các protein bệnh lý.

- Trong tế bào có quá nhiều bản sao của một gen bình thường, các hoạt động phiên mã và dịch mã quá mạnh làm dư thừa quá mức các sản phẩm bình thường của gen, gây các trường hợp bệnh lý.

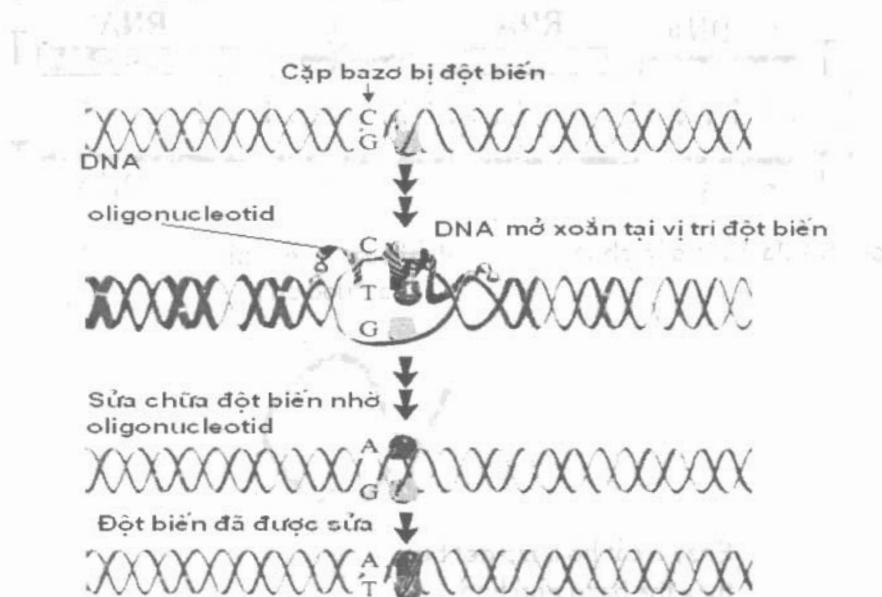
- Khôi phục trạng thái bình thường của kiểu gen, khi một số gen nào đó bị biến đổi, hoặc chuyển vị trí làm thay đổi kiểu gen.

Xu hướng tăng cường hoạt động gen hay hỗ trợ cho hoạt động của gen bị hỏng, được sử dụng trong điều trị các bệnh di truyền do rối loạn chức năng của các gen đơn (monogenic). Một số bệnh điển hình được điều trị là bệnh xơ nang (cystic

fibrosis), bệnh máu khó đông (haemophilia), bệnh loạn dưỡng cơ (muscular dystrophy) ...

### 3.3. Sửa chữa gen (gene correction)

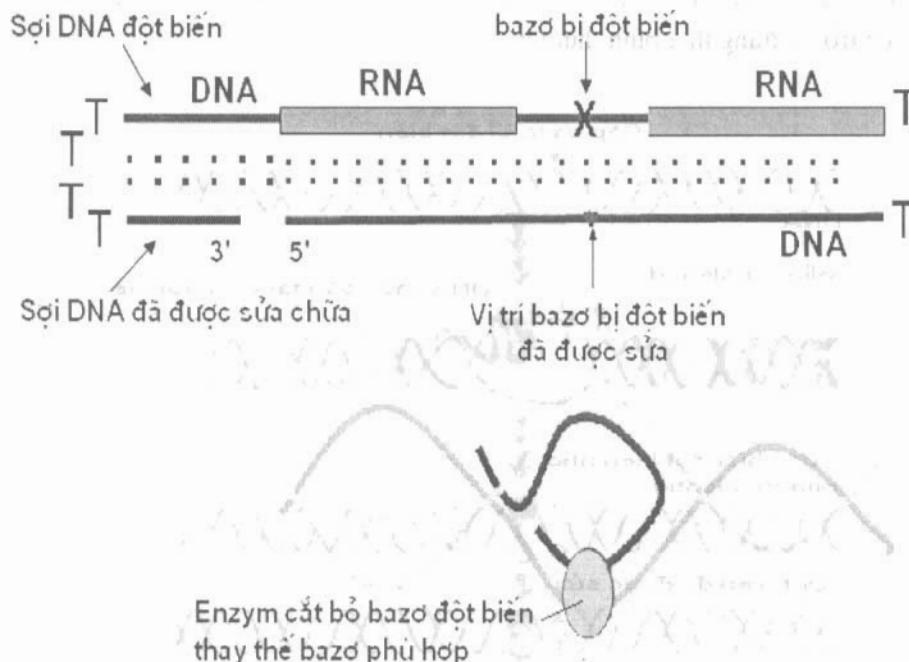
Khi phát hiện bệnh lý do gen bị đột biến ở một hoặc một số nucleotid, có thể áp dụng biện pháp sửa chữa gen (gene correction) nhằm khôi phục hoạt động của gen trở lại trạng thái bình thường.



Hình 2. 32. Sửa chữa gen bị đột biến nhờ oligonucleotid.

Xu hướng điều trị sửa chữa gen đã được áp dụng trong nhiều thử nghiệm. Một số trường hợp điển hình như: sửa chữa gen mã hoá enzym hydroxyurea là enzym kích thích quá trình tổng hợp hemoglobin thai nhi (Hb F), trong liệu pháp điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu liêm; sửa chữa gen *p53* bị hỏng trong liệu pháp gen điều trị ung thư phổi; sửa chữa gen E 1A và gen BRCA 1 trong điều trị ung thư buồng trứng hoặc sửa chữa gen CFTR trong chữa bệnh xơ nang....

Cho đến nay, nhiều loại bệnh đã được điều trị bằng chiến lược sửa chữa gen đã có kết quả khá rõ rệt. Khó khăn lớn nhất của xu hướng điều trị sửa chữa gen là bằng phương pháp *in vivo* hoặc *ex vivo* rất khó đưa gen liệu pháp vào đúng vị trí đột biến, vị trí gen bị sai lệch.



Hình 2. 33. Sơ đồ cơ chế sửa chữa gen đột biến.

### 3.4. Úc chế tế bào đích (gene ablation)

Hướng điều trị úc chế hoạt động của tế bào đích, có thể bằng cách cắt bỏ mRNA, úc chế hoạt động của gen hoặc mRNA.

Thực hiện liệu pháp gen bằng chiến lược úc chế tế bào đích, có thể sử dụng một số biện pháp sau:

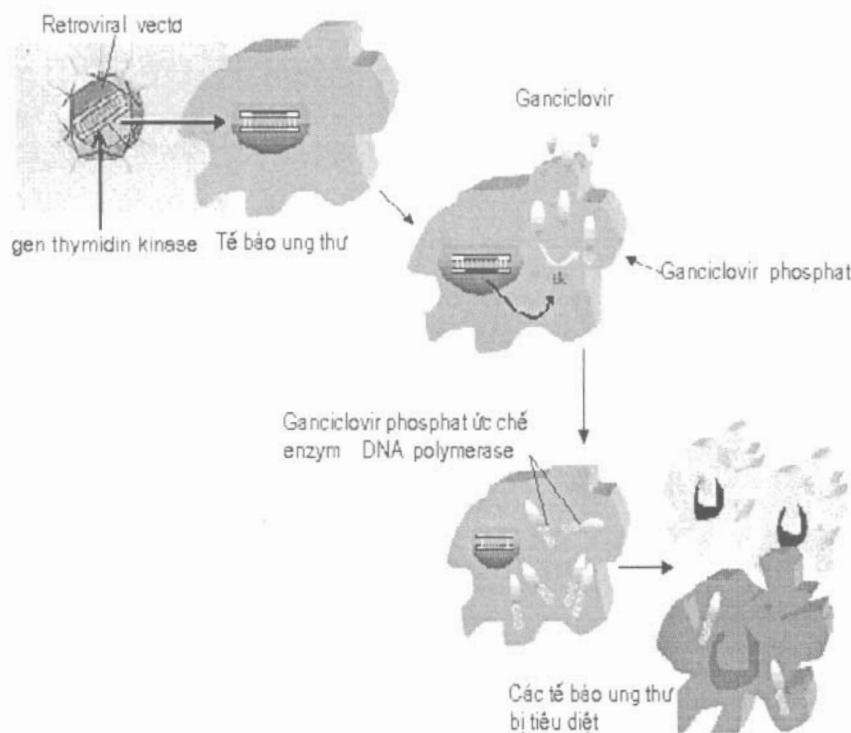
- Sử dụng ribozyme để cắt bỏ hoặc sửa chữa các mRNA.

- Dùng các chuỗi oligonucleotid để hình thành các xoắn ba DNA (triple helix), nhằm ức chế tái bản của gen và ức chế quá trình phiên mã của gen.

- Sử dụng vectơ oligonucleotid antisens (antisens oligo) tạo nên các mRNA xoắn đôi (duplex), làm ức chế quá trình dịch mã trên phân tử mRNA.

### 3.5. Tiêu diệt tế bào đích (targeted killing)

Liệu pháp gen chữa bệnh bằng cách tiêu diệt tế bào đích là biện pháp có hiệu quả cao đối với các tế bào ung thư, tế bào khối u. Trong chiến lược tiêu diệt tế bào đích bị bệnh, các viral vectơ mang các gen liệu pháp chủ yếu là những gen mã hoá cytokin hoặc độc tố (toxin), ví dụ như gen thymidin kinase.... thường được sử dụng.



Hình 2. 34. Sơ đồ cơ chế tiêu diệt tế bào đích.

Tiêu diệt tế bào đích, cần phải lựa chọn loại vector liệu pháp và kỹ thuật chuyển gen liệu pháp vào tế bào đích thích hợp để các gen liệu pháp được đưa vào đúng tế bào đích, hoặc vào giữa các khối u ung thư. Muốn hiệu quả tiêu diệt tế bào đích cao, các gen liệu pháp phải có khả năng biểu hiện mạnh, thời gian tồn tại và biểu hiện của gen liệu pháp cân đối dài ở mức nhất định, dù để tiêu diệt tế bào đích. Liệu pháp gen bằng chiến lược tiêu diệt tế bào đích, là hướng điều trị bệnh ung thư có hiệu quả cao, ngoài ra còn được sử dụng trong điều trị một số loại bệnh khác có hiệu quả.

## Chương 3

### ỨNG DỤNG LIỆU PHÁP GEN TRONG CHỮA BỆNH

#### I. LIỆU PHÁP GEN CHỮA BỆNH THIẾU HỤT MIỄN DỊCH TỔ HỢP TRÂM TRỌNG - SCID (Severe Combined Immuno Deficiency)

##### 1. Rối loạn chức năng gen là nguyên nhân gây bệnh SCID

Bệnh SCID là bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng ở người, làm giảm sút sức khoẻ hoặc có thể gây chết do dễ bị mắc các bệnh truyền nhiễm khác. Bệnh SCID do rối loạn di truyền, gây mất chức năng tế bào miễn dịch lympho T, lympho B, tế bào NK... (Fischer, 1991). Các tế bào lympho xuất phát từ tế bào nguồn của tuỷ xương, có khả năng nhận biết các vi sinh vật và tác các nhân xâm nhiễm để đáp ứng miễn dịch tương ứng. Tế bào bạch cầu lympho T phát triển và “chín” ở tuyến úc (thymus) nên ký hiệu T, các lympho B phát triển trong tuỷ xương (bone marrow) được ký hiệu là B. Các tế bào NK là những tế bào lympho có hạt lớn, có khả năng nhận biết tế các bào bị ung thư, các vi sinh vật xâm nhiễm và tiêu diệt chúng nên gọi là tế bào giết tự nhiên được ký hiệu là NK hay T<sub>NK</sub> (natural killer).

Có nhiều biểu hiện bệnh SCID khác nhau, tuỳ theo mức độ sai hỏng của các gen (defective gene), dẫn đến rối loạn chức năng của các loại tế bào lympho gây thiếu hụt miễn dịch ở cơ thể người. Hiện nay, bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng ở người được chia làm hai nhóm: bệnh SCID liên kết nhiễm sắc thể giới

tính X (X- SCID) và bệnh SCID do sai hỏng các gen nằm trên nhiễm sắc thể thường.

Bệnh X-SCID do bị sai hỏng gen  $\gamma c$  (common gamma) nằm ở locus 13.1 trên cánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X của người (Xq13.1), làm mất hoặc gây rối loạn chức năng của các tế bào miễn dịch lympho T, B và tế bào giết tự nhiên NK. Bệnh X-SCID thường gặp ở con trai, chiếm tỷ lệ 50 – 60% tổng số các loại bệnh SCID ở người. Đến nay, nguyên nhân bệnh X-SCID đã được nhiều nghiên cứu xác định cụ thể. Do sai hỏng gen  $\gamma c$  dẫn đến làm mất chức năng các thụ thể IL - 2R (interleukin – 2 receptor) hoặc các thụ thể IL – 4R, IL- 7R, IL – 9R... làm mất chức năng các tế bào lympho T, B và NK gây bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng SCID (Leonard, 1994).

Bệnh SCID ở người do nhiều loại rối loạn gen gây nên. Khi bị sai lệch một trong các gen ADA, PNP, CD , và ZAP 70... gây biến đổi cấu trúc enzym, protein tương ứng đều bị bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng ở các mức độ khác nhau. Gen ADA (Adenosine Deaminase Deficiency) mã hoá enzym Adenosine Deaminase, nằm trên cánh dài nhiễm sắc thể số 20 (20q12-13.11), có kích thước 32 Kb. Gen ZAP 70 nằm trên nhiễm sắc thể số 2 (2q12) mã hoá protein ZAP có khối lượng 70 kDa, gen JAK-3 mã hoá enzym JAK-3 kinase .....Khi một hoặc vài loại enzym, protein này bị mất chức năng đều gây bệnh SCID (Blaese, 1996).

## 2. Liệu pháp gen chữa bệnh ADA-CID

Khi gen mã hoá enzym Adenosine Deaminase bị hỏng, dẫn đến rối loạn chức năng của các tế bào bạch cầu lympho T và B gây bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng gọi là ADA - SCID. Để khôi phục hoạt động bình thường của gen ADA, người ta đã sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau của liệu pháp gen nhằm thay thế gen ADA bị sai hỏng bằng gen bình thường. Điều trị bệnh ADA-SCID bằng các liệu pháp gen khác nhau cho các kết quả khác nhau. Trong đó, liệu pháp gen sử dụng retroviral vectơ để chuyển gen ADA lành vào tế bào lympho T cho kết quả tốt nhất.

Bằng liệu pháp gen *ex vivo* thay gen ADA lành vào gen ADA bị hỏng nhờ vectơ retroviral, năm 1990 các bác sĩ French Anderson và Michael Blaese đã điều trị khỏi bệnh cho hai em Ashanti 4 tuổi và Cynthia 9 tuổi, là thành công đầu tiên của liệu pháp gen chữa bệnh ở người.

Bệnh ADA – SCID ở người được điều trị bằng liệu pháp gen *ex vivo*, gồm 4 bước cơ bản sau:

1. Lấy các tế bào lympho T từ máu bệnh nhân ADA- SCID, do bị sai hỏng gen ADA ra khỏi cơ.

2. Thiết kế liệu pháp là retroviral vectơ mang gen ADA bình thường.

3. Trộn vectơ liệu pháp với tế bào lympho T ở những điều kiện thích hợp tạo quá trình chuyển gen và lựa chọn các tế bào mang gen liệu pháp (trường hợp chữa bệnh cho em gái Ashanti đã sử dụng một tỷ retroviral vectơ mang gen ADA lành).

4. Đưa các tế bào lympho T mang gen liệu pháp trở lại cơ thể người bệnh. Theo dõi hoạt động của gen liệu pháp, mức biểu hiện khả năng miễn dịch và trạng thái sức khoẻ của bệnh nhân. Kết quả sau điều trị liệu pháp gen 5-6 tháng số tế bào miễn dịch lympho T tăng dần lên, sau 2 năm khả năng miễn dịch của bệnh nhân được phục hồi (Blaese và cộng sự, 1995).

Điều trị bệnh ADA- SCID ở người còn có thể bằng các liệu pháp gen khác như liệu pháp polyethylenglycol (PEG-ADA), liệu pháp tế bào gốc.....Các thử nghiệm bằng các liệu pháp này trên tế bào người, cho kết quả thấp. Ví dụ, sử dụng PEG-ADA để chuyển gen ADA lành vào các tế bào tràn của người và động vật chỉ có 10% số tế bào khôi phục được khả năng miễn dịch bình thường (Hart và cộng sự, 1986; Hirschhorn, 1990, 1996). Một thử nghiệm sử dụng tế bào gốc là các tế bào tế bào tạo máu - HSC (hematopoietic stem cell) và retroviral vectơ mang gen ADA chuyển vào người bệnh, đã thu được kết quả tăng khả năng miễn dịch của người bệnh. Nhiều nhóm nghiên cứu thử nghiệm sử dụng liệu pháp gen *in vivo*, trộn lẫn AAV vectơ mang gen liệu pháp ADA người và các tế bào tuỷ xương tiêm vào khỉ Rhesus, nhưng kết quả thu được còn rất hạn chế (dưới 3%) (Bodine và cộng sự, 1996)...

Hiện nay bằng các thực nghiệm cụ thể chữa bệnh ADA-SCID ở người và động vật, cho thấy hiệu quả chữa bệnh rất khác nhau, tuỳ thuộc vào liệu pháp gen được lựa chọn cũng như loại vector và trạng thái bệnh của bệnh nhân. Con người ngày càng cải tiến kỹ thuật, tìm tòi các loại vector liệu pháp mới để liệu pháp gen ngày càng có hiệu quả cao trong chữa bệnh thiếu hụt miễn dịch tủy hợp trâm trọng SCID ở người.

### 3. Liệu pháp gen chữa bệnh X- SCID

Bệnh X-SCID chiếm hơn một nửa tổng số các bệnh SCID ở người (50 % – 60%) thường gặp ở đàn ông, do bị đột biến gen  $\gamma c$ . Gen  $\gamma c$  mã hoá gama cytokin của các thụ thể interleukin -2, - 4, - 7, - 9, - 15 làm mất chức năng của các tế bào miễn dịch lympho T, B và NK, gây bệnh thiếu hụt miễn dịch tủy hợp trâm trọng. Nguyên tắc chữa bệnh X-SCID người bằng liệu pháp gen cũng giống như chữa bệnh ADA-SCID, cần phải thay thế gen  $\gamma c$  trên nhiễm sắc thể giới tính X bị hỏng bằng gen  $\gamma c$  bình thường. Bệnh nhân X-SCID bị thiếu hụt miễn dịch tủy hợp nghiêm trọng, chỉ có thể sống trong điều kiện vô trùng tuyệt đối, cùng với các thiết bị hô hấp nhân tạo do bị viêm phổi nặng, nếu không được điều trị kịp thời dễ bị tử vong.

Thành công đầu tiên chữa bệnh X-SCID bằng liệu pháp gen của các bác sĩ thuộc một bệnh viện ở nước Anh, đã cứu sống bé trai Rhys Evans. Biểu hiện bệnh thiếu hụt miễn dịch nghiêm trọng phát hiện ở bé Rhys Evans lúc được 4 tháng tuổi, kèm theo nhiễm bệnh viêm phổi cấp rất nặng, xác định bị X-SCID. Liệu pháp gen điều trị bệnh cho Rhys Evans bằng phương pháp *ex vivo* để ghép tế bào tủy xương. Tế bào tủy xương của em bé được lấy ra kết hợp trị xạ, sau đó chọn lọc những tế bào khoẻ được chuyển gen  $\gamma c$  bình thường nhờ sử dụng vector retroviral. Đến 18 tháng tuổi bé Rhys Evans đã được ra viện sống cùng gia đình với sức khoẻ bình thường, nhưng khả năng khôi phục cuộc sống bình thường của Rhys Evans cần phải theo dõi chặt chẽ trong nhiều năm sau này (Biomedicine 4/2002).

Thực nghiệm của bệnh viện Necker ở Pari (Pháp) với 11 bệnh nhân là trẻ em trai từ 1 đến 9 tháng tuổi bằng liệu pháp gen theo kỹ thuật *ex vivo*: chọn lọc các tế bào tuỷ xương CD34 (một dạng tế bào lympho T - cluster of differentiation) trộn chung với retroviral vector mang chuỗi cDNA của gen  $\gamma c$ , sau ba ngày đêm đưa trở lại cơ thể bệnh nhân. Liệu pháp gen trong điều trị X- SCID thông thường sử dụng 14.000.000 đến 26.000.000 tế bào CD<sub>34</sub> trộn với từ 5.000.000 đến 9.000.000 vectơ mang gen liệu pháp cho một kilogram thể trọng bệnh nhân. Kết quả sau điều trị liệu pháp gen từ 3 đến 13 tháng có 10 bệnh nhân trong tổng số 11 em được điều trị đã khôi phục được các tế bào lympho T, B và NK, khả năng miễn dịch tăng được xuất viện về nhà.

Liệu pháp gen chữa bệnh SCID đã thành công ở các nước Ý, Israel, Anh, Pháp và Mỹ... (Alain Fischer, Science 17th 10/ 2003)

## II. LIỆU PHÁP GEN CHỮA BỆNH UNG THƯ

Bệnh ung thư cho đến nay vẫn được coi là một trong những chứng bệnh nan y, làm giảm sút sức khoẻ con người, và loại bệnh có tỉ lệ gây tử vong cao. Ung thư là sự phát triển không bình thường của các tế bào, do sai lệch hoặc đột biến một hoặc một số gen trong tế bào. Các tế bào ung thư có quá trình phân chia không kiểm soát, không chịu sự kiểm soát của sự chết theo chương trình (apoptosis), tạo nên các dạng khối u. Có hai nhóm nguyên nhân chủ yếu gây ung thư là: do tế bào và cơ thể bị nhiễm virus gây ung thư và đột biến gen do ảnh hưởng của các yếu tố bất lợi của môi trường (tia UV, chất gây phóng xạ, khói thuốc lá, chất độc hoá học... ).

### 1. Cơ sở di truyền của bệnh ung thư

Các tác nhân gây ung thư đều gây sự phân chia không kiểm soát của tế bào, hoặc biến đổi không bình thường cấu trúc, chức năng của tế bào dẫn đến các bệnh

ung thư. Xét đến cùng, bệnh ung thư liên quan đến hoạt động của hai nhóm gen chủ yếu là gen ung thư (oncogen) và gen kìm hãm ung thư (antioncogen).

Gen ung thư (oncogen) là những dạng đột biến khác nhau của các gen bình thường có tiềm ẩn khả năng gây ung thư gọi là gen tiền ung thư (proto-oncogene). Oncogen được phân biệt làm hai loại oncogen của virus ký hiệu là V-oncogen và oncogen của tế bào ký hiệu là c-onco hay c-proto-oncogen (Cellular proto-oncogene).

Oncogen của các virus (V-oncogene) gây biến hình, dị dạng các tế bào dẫn đến các bệnh ung thư. Có nhiều loại V-oncogen khác nhau: gen *Src* của virus sarcoma Rous gây ung thư Sarcoma, gen *Myc* của retrovirus gây ung thư vú gồm hai dòng *c-Myc* và *N-Myc*, gen *Ras* gây ung thư trực tràng, ung thư phổi gồm các dòng *K-Ras*, *N-Ras*, *H-Ras*...

Proto-oncogen trong tế bào bao gồm nhiều nhóm gen khác nhau: *Rb1*, *Ras*, *Ret*, *Mys*, *Raf*, *Rar*... các proto-oncogen gây phân chia không bình thường của tế bào trong các mô, các hệ cơ quan khác nhau, tạo nên các dạng ung thư khác nhau. Khi proto-oncogene bị đột biến có thể trở thành oncogen. Ví dụ, chỉ một biến đổi rất nhỏ trong ras-proto-oncogen thay đổi một bộ ba ở vị trí thứ 12 (nên acid amin valin bị thay bằng glycine) làm cho ras - proto-oncogene trở thành gen ung thư (*Ras*). Gen tiền ung thư myc – proto-oncogen trở thành myc- oncogen khi thay đổi vị trí từ nhiễm sắc thể số 9 ở người sang nhiễm sắc thể số 22.... Một số gen ung thư của virus (Viral oncogene) có nguồn gốc từ các gen bình thường của tế bào c-proto-oncogene (Cellular proto-oncogene). Trong số các gen gây ung thư của retrovirus (v-oncogen) có khoảng 80 - 99% tương đồng với các gen tiền ung thư của tế bào. Đa số các v-oncogen giống như bản copy không bình thường các RNA thông tin (mRNA) của tế bào đã cắt bỏ các đoạn intron, do đó khả năng gây ung thư của các v-oncogen rất lớn.

Bảng 3.1. Nguồn gốc một số gen ung thư của retrovirus (v-oncogen)

Retrovirus	Viral oncogen	Cellular proto-oncogene
Rouse sarcoma virus	v-src	c-src (src)
Simian sarcoma	v-sis	c-sis (sis)
Harvey murine sarcoma	v-H-ras	c-H-ras (H-ras)
Kirsten murine sarcoma	v-K-ras	c-K-ras (K-ras)
FBJ murine osteosarcoma	v-fos	c-fos (fos)
Avian myelocytomatisis	v-myc	c-myc (myc)
Abelson leukemia virus	v-abl	c-abl (abl)
Avian erythroblasts	v-erbB	c-erbB (erbB)

Gen kìm hãm ung thư (antioncogen hay tumor suppressor gene) là những gen đặc hiệu trong tế bào, có chức năng kiểm soát quá trình phân chia tế bào, ức chế sự phân chia quá mức hoặc sự biến dạng, biến đổi chức năng các tế bào ung thư. Có nhiều loại gen kìm hãm ung thư khác nhau, điển hình là các gen *p53*, gen *Fud*, gen *Rb1*...

Gen *p53* nằm ở locus thứ 13 trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 17 ở người (17p13), gồm 11 exon. Gen *p53* mã hoá một protein có 393 acid amin, có khối lượng phân tử 53 kDa nên gọi là protein 53 (p53). Protein 53 có chức năng kiểm soát sự phân chia không bình thường của các tế bào, do p53 kích thích hoặc ức chế sự sao chép trong phân chia tế bào, kích hoạt sự chết theo chương trình hoá của tế bào (apoptosis). Do đó, sự biến đổi trong gen *p53* (đột biến hoặc bất hoạt) gây hậu quả tế bào tăng sinh vô hạn tạo nên các khối u. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy 70% ung thư đại tràng, hơn 50% ung thư phổi và 40% ung thư vú ở người do mất chức năng gen *p53* (Đái Duy Ban, 2002; Howard A. Gutman 2001).

Gen *Rb1* nằm ở locus thứ 14 trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 13 ở người (13q14), mã hoá protein retinoplas (pRB) có khối lượng phân tử 110 kDa. Protein pRB làm nhiệm vụ phosphorin hoá trong điều hoà sự phân chia tế bào ở pha S và pha G<sub>1</sub>. Khi bị đột biến làm mất chức năng gen *Rb1* gây ung thư retinoblastoma. Các gen kìm hãm ung thư khác nhau có các chức năng khác nhau, có thể hoạt động riêng rẽ hoặc phối hợp dẫn đến ức chế hoặc kích hoạt các gen ung thư (oncogen), làm cho thời gian biểu hiện của ung thư cũng như mức độ bệnh khác nhau.

Ung thư chủ yếu do gen bị biến đổi gây nên. Ngoài các gen ung thư (oncogen) và gen kìm hãm ung thư (antioncogen) còn có những gen làm tăng tính nhạy cảm với ung thư như Nf1 (17q11), Wt1 (11p13), Brca1 (17q21)...những gen này có liên kết với các gen ung thư, làm tăng nhanh sự phát triển của ung thư hoặc gây di căn sớm của các u ác tính.

Ngoài ra, các thụ thể (receptor) của tế bào cũng đóng vai trò quan trọng đến khả năng bị ung thư, do khả năng tiếp nhận các virus hoặc tiếp nhận DNA, RNA ngoại lai. Gần đây, một số nghiên cứu bệnh ung thư cho thấy các thụ thể có thể làm tăng 20% ung thư vú.

Hiện nay các thống kê y học cho thấy khoảng 20 -30% ung thư ở người do gen ras bị đột biến, 2-5% ung thư do gen *Src* bị đột biến, 40 % - 50% các bệnh ung thư ở người do gen mã hoá protein 53 (gen p 53) và gen mã hoá Rb –protein (gen Rb) bị đột biến hoặc mất chức năng.

Trong các tế bào bình thường, sản phẩm của các gen antioncogen có tác động kìm hãm hoạt động của các oncogen, nên các tế bào phân chia và hoạt động bình thường. Ngược lại, khi các gen áp chế ung thư mất chức năng có thể là kích hoạt hoặc tăng cường hoạt động của các oncogen, hình thành bệnh ung thư. Một bệnh ung thư không chỉ do một gen quyết định, mà còn chịu ảnh hưởng của nhiều gen khác trong tế bào cũng như điều kiện bất lợi của môi trường. Nguyên nhân sâu xa của bệnh ung thư là các điều kiện bất lợi bên trong và bên ngoài tế bào như tia phóng xạ, chất độc hoá học, thuốc trừ sâu, khói thuốc lá, ô nhiễm môi trường... những nhân tố này gây đột biến gen hoặc kích hoạt sự hoạt động của gen tiền ung

thư, hoặc gây mất chức năng của các gen kìm hãm ung thư tạo nên sự phát triển không bình thường của tế bào, gây ra bệnh ung thư.

## 2. Liệu pháp gen chữa bệnh ung thư

### 2.1. Vài nét về tình hình mắc các loại bệnh ung thư ở người

Ngày nay, cùng với sự phát triển cao của công nghiệp, việc sử dụng hoá chất và các chất bảo vệ thực vật không hợp lý trong sản xuất nông nghiệp, cũng như chế độ sinh hoạt làm cho con người ngày càng mắc phải nhiều loại tật bệnh, trong đó ung thư là một trong những bệnh có chiều hướng gia tăng mạnh.

*Bảng 3. 2. Thứ tự mức độ mắc một số loại bệnh ung thư ở người*

Xếp loại	<u>Người châu Á</u>	<u>Người châu Âu và châu Mỹ</u>
1	Ung thư dạ dày	Ung thư vú
2	Ung thư gan	Ung thư phổi
3	Ung thư phổi	Ung thư tiền liệt tuyến
4	Ung thư ruột	Ung thư gan
5	Ung thư trực tràng	Ung thư buồng trứng

Trong nhiều loại ung thư ở người, có bảy loại ung thư có tỉ lệ người mắc bệnh cao gồm ung thư dạ dày (stomach cancer), ung thư vú (breast cancer), ung thư gan (liver cancer), ung thư phổi (lung cancer), ung thư tiền liệt tuyến (prostate cancer), ung thư ruột (intestinal cancer) và ung thư buồng trứng (ovary cancer)...

Do ảnh hưởng của điều kiện môi trường, mức sống và đặc điểm chủng tộc, nên mức độ mắc các chứng bệnh ung thư ở người rất khác biệt nhau ở các quốc gia và vùng lãnh thổ khác nhau. Ví dụ, người châu Á có tỉ lệ mắc bệnh ung thư dạ

dày cao nhất, ngược lại người châu Âu, châu Mỹ có tỉ lệ mắc bệnh ung thư vú rất cao.

Trong các loại ung thư, ung thư gan (liver cancer) là loại ung thư gặp ở hầu hết các nước trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan ngày càng cao. Đến nay, nguyên nhân chủ yếu gây ung thư gan được xác định là do các loại virus gây viêm gan (HAV, HBV, HCV, HEV, HGV), HIV... và ký sinh trùng sòi rét. Chỉ tính năm 2000, số người mắc ung thư gan ở Trung Quốc là 306.391 người; Hàn Quốc: 13.522 người; Nhật: 44.516; Mỹ: 11.565... Các loại bệnh ung thư đều gây giảm sút sức khoẻ, giảm tuổi thọ, đối với đàn ông ung thư phổi có tỉ lệ tử vong cao nhất, sau đó là ung thư tuyến tiền liệt.

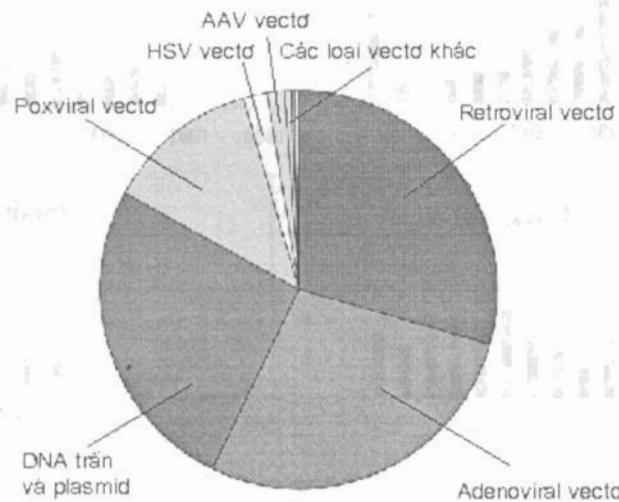
## *2. 2. Sử dụng liệu pháp gen trong điều trị bệnh ung thư*

Điều trị ung thư có thể thực hiện bằng trị xạ, hoá chất, các dạng độc tố miễn dịch, hoặc liệu pháp gen. Trước đây, ung thư điều trị chủ yếu bằng hoá chất và trị xạ, một vài năm gần đây có một số chế phẩm protein đặc hiệu được thử nghiệm chữa ung thư trên người có hiệu quả như: chế phẩm B3(dsFv)PE-38(LMV-9) chữa ung thư phổi, ung thư vú và ung thư đại tràng hoặc chế phẩm TP-38 điều trị ung thư não...

Trong điều trị ung thư nhiều cytokin được chú ý nghiên cứu và thử nghiệm, trong đó Interleukin 2 (IL-2) có hiệu quả điều trị ung thư cao, thời gian điều trị ngắn ít gây các hiệu ứng phụ như điều trị bằng hoá chất và trị xạ. IL-2 được sử dụng trong điều trị ung thư thận (1982), ung thư da ác tính di căn (1988) có hiệu quả cao (từ 76%-82%).

Liệu pháp gen là một trong những phương pháp mới điều trị ung thư có hiệu quả. Điều trị ung thư bằng liệu pháp gen được thực hiện bằng cả 2 liệu pháp *in vivo* và *ex vivo*. Liệu pháp gen chữa ung thư có thể sử dụng phương pháp *in vivo*, như liệu pháp điều trị ung thư gan, ung thư phổi..., bằng kỹ thuật vi tiêm đưa thẳng vào giữa khối u các vectơ mang gen liệu pháp tương ứng, để ức chế hoặc tiêu diệt các tế bào ung thư. Đối với một số loại ung thư có thể điều trị bằng phương pháp *ex*

*vivo* như ở ung thư bạch cầu..., trong nhiều trường hợp có thể đồng thời sử dụng cả hai liệu pháp.

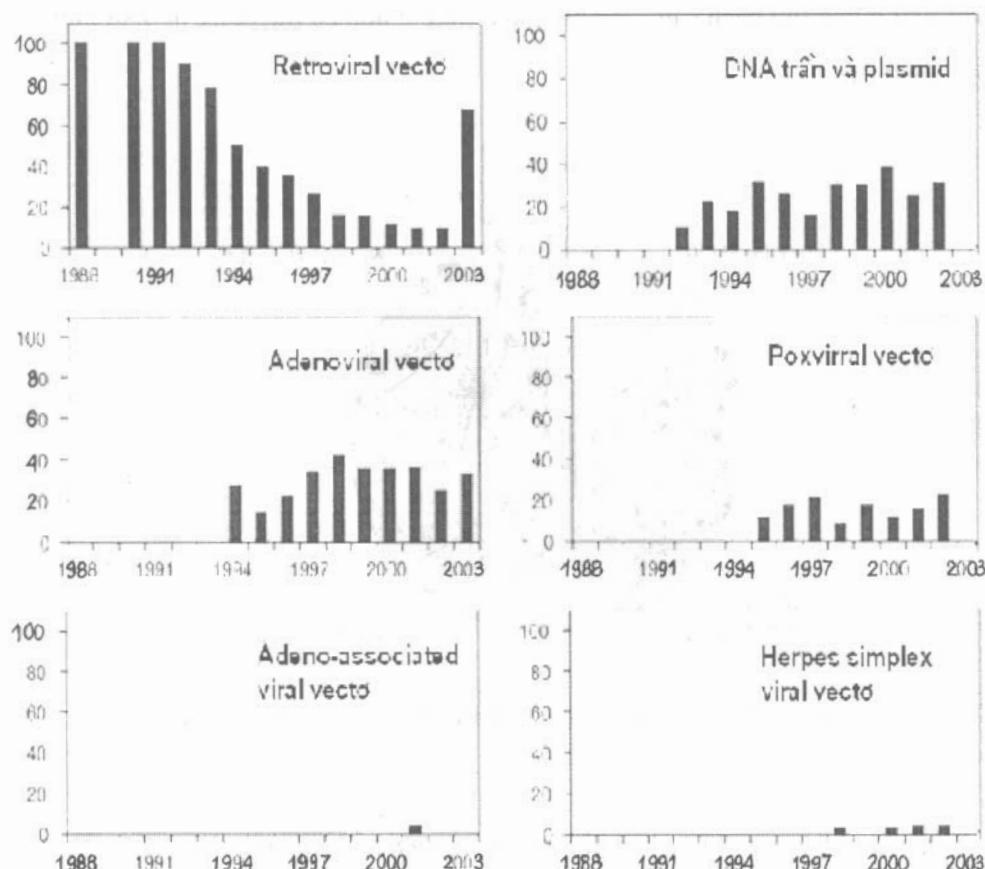


Hình 3. 1. Tỉ lệ các loại vectơ liệu pháp gen trong điều trị ung thư.

### 2. 2. 1. Các loại vectơ liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh ung thư

Hiện nay bệnh ung thư là loại bệnh chiếm tỉ lệ cao nhất, trong các loại bệnh được điều trị bằng liệu pháp gen (69%). Trong liệu pháp gen điều trị ung thư sử dụng nhiều loại vectơ liệu pháp khác nhau, trong đó retroviral vectơ, adenoviral vectơ và vectơ DNA trân, plasmid được sử dụng nhiều nhất.

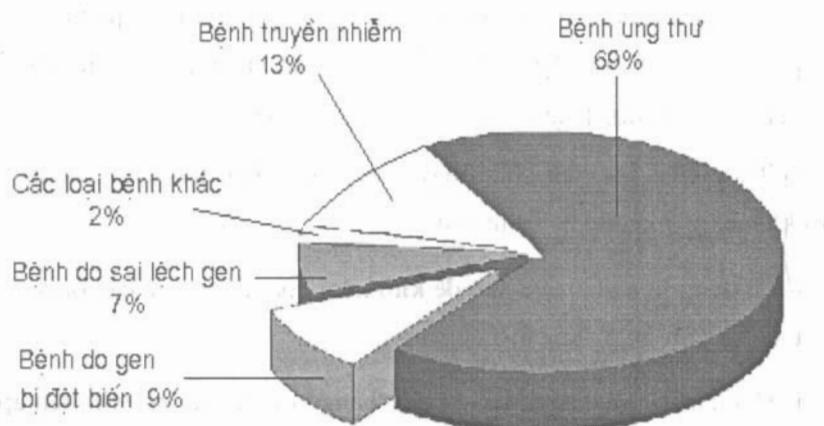
Tuỳ theo loại bệnh ung thư, sự phát triển của kỹ thuật gen và y sinh học hiện đại, các loại vectơ được sử dụng trong liệu pháp gen thay đổi theo từng thời gian khác nhau. Retroviral vectơ là loại vectơ được sử dụng sớm nhất trong các loại vectơ liệu pháp gen. Tỉ lệ % sử dụng retroviral vectơ thay đổi theo thời gian: từ năm 1988 đến 1991 sử dụng vectơ retrovirus chiếm 100%, năm 2000 chỉ còn dưới 20%, năm 2003 chiếm hơn 70% tổng số các loại vectơ liệu pháp được sử dụng.



Hình 3.2. Tỉ lệ (%) các loại vectơ liệu pháp được sử dụng từ 1998 – 2003.

Adenoviral vecto được sử dụng từ 1994 nhưng đến năm 2003 vẫn chỉ chiếm dưới 40%. Vecto HSV được sử dụng từ 1998 nhưng đến nay vẫn còn được sử dụng trong một số ít trường hợp. Vecto AAV mới bắt đầu được sử dụng từ 2002 với một tỉ lệ rất khiêm tốn.

Trong các loại bệnh được điều trị bằng liệu pháp gen, bệnh ung thư là loại bệnh được điều trị chiếm tỉ lệ cao nhất tới 69%, sau đó là các bệnh gây nên do rối loạn chức năng gen 16%, bao gồm cả bệnh di truyền bẩm sinh và do đột biến gen, xếp thứ ba là các bệnh truyền nhiễm 13% (chủ yếu do bị nhiễm virus).



Hình 3.3. Phần trăm các loại bệnh được điều trị bằng liệu pháp gen.

### 2.2.2. Các xu hướng cơ bản điều trị ung thư bằng liệu pháp gen

Các bệnh ung thư thường được phát hiện muộn, nên phần lớn các trường hợp khi phát hiện đã có sự hình thành khối u. Khối u tạo thành do các gen ung thư, hoặc gen kìm hãm ung thư bị rối loạn hoặc mất chức năng, dẫn đến sự phân chia vô hạn của các tế bào ung thư trong khi các tế bào xung quanh phân chia bình thường. Khối u chia làm hai loại là u lành và u ác tính, biểu hiện các trạng thái nhẹ hay nặng của một bệnh ung thư. Trong phần lớn các trường hợp, u lành chuyển thành u ác tính khi bệnh nặng, ngoại trừ một số trường hợp u lành không có khả năng trở thành u ác tính như các u nước, u bã đậu...

Liệu pháp gen điều trị ung thư bằng tác động trực tiếp vào khối u, có thể được thực hiện theo nhiều chiến lược khác nhau:

1- Ức chế phát triển của khối u (Tumor suppressor): thực hiện các liệu pháp *ex vivo* hoặc *in vivo* với các viral vectơ mang các gen liệu pháp *p53*, *pRb*...

2- Kích hoạt tế bào chết theo chương trình (apoptosis): sử dụng các gen liệu pháp BAX tăng cường gây kích hoạt chết theo chương trình, hoặc sử dụng

gen BCL-2 để ngăn chặn các phản ứng chống apoptosis (anti-apoptotic). Trường hợp apoptosis các tế bào co lại, tách khỏi các tế bào xung quanh, các gen *ced* (gen tự tử – *suicide gene*) được hoạt hoá làm cho tế bào teo dần rồi chết.

3- Thực hiện các liệu pháp thay gen nhằm phục hồi các protein bị hỏng, phục hồi khả năng miễn dịch của tế bào.

4- Sử dụng liệu pháp antisense để kìm hãm hoạt động của các oncogen, hoặc ức chế tác dụng các sản phẩm của oncogen

5- Hạn chế sự phát triển của khối u bằng vi tiêm các protein tiền apoptosis (pro-apoptotic protein) như các protein BAX (sản phẩm của gen BAX) hoặc interferon (TNF), kết hợp sử dụng trị xạ hoặc điều trị hoá chất.

6- Sử dụng các gen tự tử *ced* (*suicide gene*) và các sản phẩm của gen tự tử “thuốc gen” tiêm thẳng vào khối u, chẳng hạn tiêm ganciclovir – sản phẩm của gen mã hoá enzym Thymidin Kinase có tác dụng tiêu diệt các tế bào ung thư.

7- Biện pháp tác động trực tiếp vào tế bào ung thư bằng bao vây thành mạch (Anti-angiogenic). Đây là biện pháp chặn mối liên hệ về mặt dinh dưỡng của tế bào ung thư, làm cho tế bào ung thư thiếu dinh dưỡng và chết dần dần. Hiện nay, đã phát hiện hơn 40 các hợp chất tự nhiên có chức năng này, như: endostatin, angiostatin...

Với tốc độ phát triển nhanh của y học hiện đại và kỹ thuật gen, hiện nay ngày càng có thêm những biện pháp mới có hiệu quả cao trong liệu pháp gen chữa bệnh ung thư ở người. Theo thông báo của trung tâm ung thư M.D. Anderson, thuộc Đại học Texas, Mỹ đã phát hiện 3 gen liên quan đến ung thư phổi nằm trên nhiễm sắc thể số 3 ở người. Những người bị ung thư phổi thường do đột biến mất 3 gen này (01F 6, NPRL 2 và FUS 1). Các thử nghiệm cấy 3 gen 01F 6, NPRL 2 và FUS 1 vào chuột bị ung thư phổi nặng cho thấy chỉ một thời gian ngắn các khối u ung thư ngừng phát triển. Các thử nghiệm vi tiêm các gen nói trên vào khối u ung thư của người đã đưa lại kết quả tốt, mở ra triển vọng mới tốt đẹp trong điều trị ung thư ở người bằng liệu pháp gen.

### 2. 2. 3. Điều trị ung thư ở người bằng vector Paramyxovirus

Liệu pháp gen điều trị ung thư ở người bằng sử dụng vector liệu pháp có nguồn gốc từ Paramyxovirus, là một trong những phương pháp phổ biến trong điều trị ung thư, gồm các bước cơ bản sau:

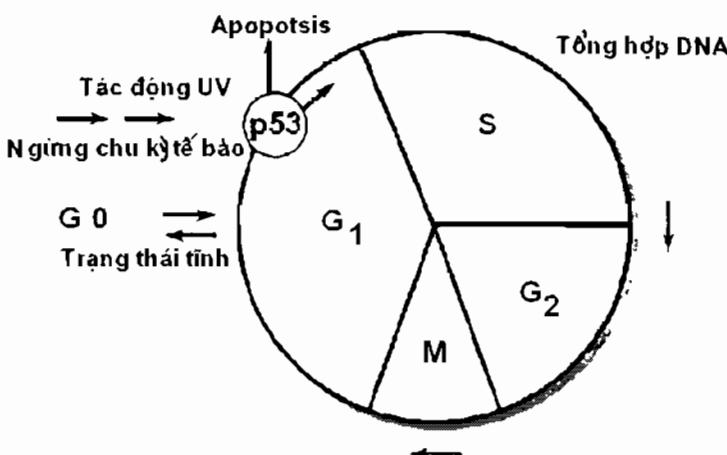
- Sử dụng vector liệu pháp từ Paramyxovirus biến đổi gen, kết hợp chiếu tia UV và xử lý nhiệt với các vector tái tổ hợp mang các gen liệu pháp
- Chuyển vector liệu pháp vào các bệnh nhân mắc bệnh ung thư bằng vi tiêm trực tiếp vào giữa khối u, tiêm vào tĩnh mạch, đưa qua đường hậu môn....
- Theo dõi hoạt động và biểu hiện của gen liệu pháp trong cơ thể bệnh nhân, cũng như tiến triển của bệnh và sức khỏe bệnh nhân.
- Kết hợp sử dụng thêm một số loại thuốc đặc hiệu hỗ trợ cho điều trị liệu pháp gen để giảm bệnh nhanh, tăng hiệu quả của liệu pháp gen.

Thực nghiệm liệu pháp gen tiến hành điều trị cho một nhóm bệnh nhân ở Mỹ mắc bảy loại ung thư khác nhau gồm: ung thư phổi (Lung), ung thư dạ dày (Gastric), ung thư tử cung (Uterine), ung thư da (Skin), ung thư gan (Hepatic), ung thư trực tràng (Rectal), ung thư thực quản (Esophageal) cho kết quả rất khả quan. Trên tổng số 90 bệnh nhân được điều trị, có một số bệnh nhân có khối u biến mất hoàn toàn, nhiều trường hợp kích thước khối u giảm dần, trong đó 41 % bệnh nhân kích thước khối u giảm trên 50%.

Điều trị liệu pháp gen các bệnh ung thư mở ra một triển vọng mới trong chữa bệnh ung thư ở người. Sau khi thực hiện liệu pháp gen một vài ngày đến một tuần đã biểu hiện giảm kích thước khối u. Tuy nhiên để khỏi bệnh hoàn toàn cần một thời gian tương đối dài, đồng thời cần kết hợp điều trị thêm một số loại kháng sinh và các thuốc đặc hiệu khác.

### 2. 2. 4. Liệu pháp gen điều trị ung thư ở người bằng gen p53

Tùy theo từng loại bệnh ung thư, khi thực hiện điều trị bằng liệu pháp gen cần sử dụng các loại gen liệu pháp khác nhau. Các thực nghiệm điều trị cho thấy hơn 50% các trường hợp ung thư ở người liên quan đến mất hoạt tính gen p53.



Hình 3. 4. Vai trò của gen p53 trong chu kỳ tế bào.

Chức năng chủ yếu của gen p53 điều hoà quá trình phân chia tế bào và kích hoạt hiện tượng apoptosis của tế bào. Do gen p53 hoạt động ở pha G<sub>1</sub> dẫn đến ức chế sự phân chia tế bào, khi bị đột biến gen p53 không còn khả năng kiểm soát sự phân chia tế bào, tế bào phân chia vô hạn dẫn đến hình thành các khối u.

Sử dụng adenoviral vector và gen p53 lành trong liệu pháp gen có thể chữa rất nhiều loại ung thư ở người như: ung thư phổi (lung cancer), ung thư buồng trứng (ovarian cancer), ung thư đầu và cổ (head – neck cancer), ung thư tế bào tạo sắc tố melanin (melanoma cancer)....

Trong điều trị ung thư, hiện nay đã có gần 60% các trường hợp bị bệnh ung thư được điều trị bằng sử dụng gen p53 và phương pháp *ex vivo* hoặc *in vivo*. Kết hợp điều trị thêm một phần bằng trị xạ hoặc hoá chất, liệu pháp gen sử dụng gen p53 trong điều trị các bệnh ung thư ở người ngày càng có hiệu quả cao và được quan tâm nhiều hơn ở nhiều bệnh viện, ở các nước trên thế giới.

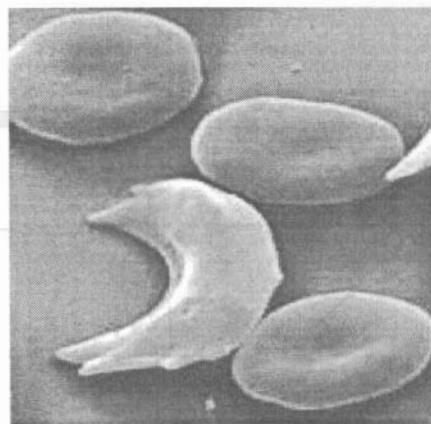
### III. LIỆU PHÁP GEN CHỮA BỆNH THIẾU MÁU HỒNG CẦU LIỀM

#### 1. Nguyên nhân gây bệnh thiếu máu hồng cầu liềm

Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm SCA (Sickle Cell Anemia) là loại bệnh di do đột biến gen  $\beta$  globin làm thay đổi chức năng phân tử protein, xuất hiện

hemoglobin S. Khi các phân tử hemoglobin S trao đổi oxy với các tế bào, có thể liên kết với nhau tạo các cấu trúc hình que, làm cho hồng cầu biến dạng thành hình liềm. Hồng cầu liêm không có hình lõm hai mặt như hồng cầu bình thường, độ trơn kém không chui qua được các mao mạch, thường xếp lại thành đám gây tắc mao mạch gây cản trở qua trình lưu thông của máu.

Thời gian tồn tại của hồng cầu bình thường trong máu trung bình là 120 ngày trong máu, còn tế bào hồng cầu liêm có thời gian tồn tại ngắn, khoảng từ 15 đến 25 ngày. Sau một thời gian, số lượng tế bào hồng cầu bình thường giảm dần, do các tế bào hồng cầu mới sinh ra không bù đắp kịp số tế bào hồng cầu chết đi, trong máu thiếu một lượng hồng cầu ngày càng lớn, gọi là bệnh thiếu máu hồng cầu liêm.

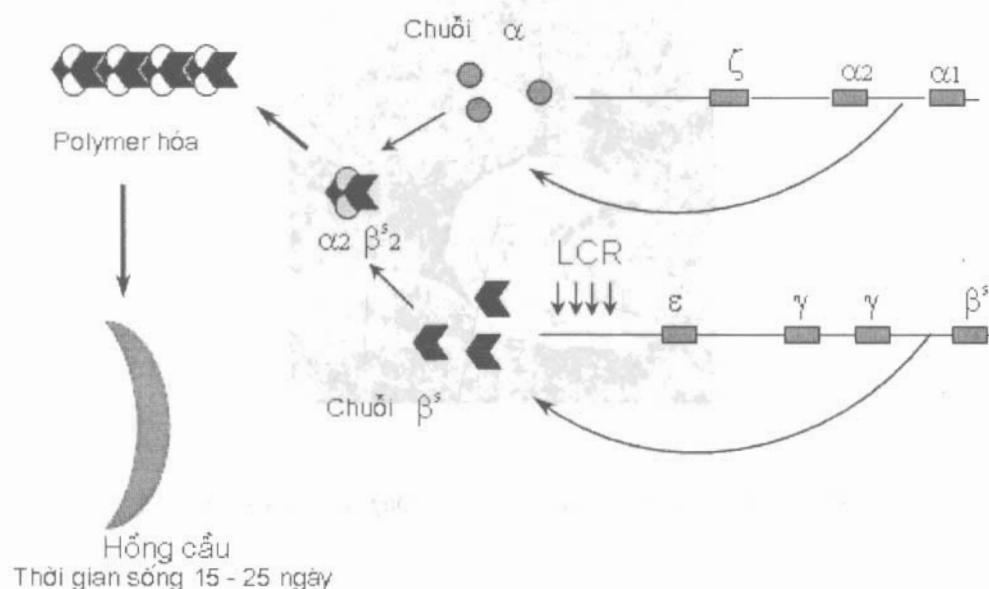


Hình 3.5. Hình dạng hồng cầu bình thường và hồng cầu liêm.

Bệnh thiếu máu hồng cầu liêm làm cho quá trình vận chuyển và trao đổi oxy với các tế bào và mô giảm mạnh, dẫn đến nhiều trạng thái bệnh lý của người bị thiếu máu như: người xanh xao, vàng da, mệt mỏi, mắt kém dần, bị đau hoặc sưng ở những nơi mao mạch bị tắc bởi các hồng cầu liêm, gây thiếu máu cục

bộ ở chân tay, lưng, khớp... Một số trường hợp bệnh nặng gây tắc các mao mạch trong não, gây nên những cơn đột quỵ nguy hiểm đến tính mạng người bệnh.

Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm ở người chủ yếu do các đặc điểm của hemoglobin bị thay đổi. Hemoglobin người được xác định bởi hai nhóm gen, nhóm gen  $\alpha$  nằm trên nhiễm sắc thể số 16 ở người, nhóm gen  $\beta$  nằm trên nhiễm sắc thể số 11 ở người. Trong quá trình phát triển từ giai đoạn phôi đến trưởng thành, có ba dạng hemoglobin thay thế nhau: hemoglobin phôi HbE (Embryonic hemoglobin), hemoglobin thai HbF (Foetal hemoglobin) và hemoglobin trưởng thành HbA. Sau khi sinh lượng Hb F giảm dần, trẻ sơ sinh được 4 - 5 tháng tuổi HbF chỉ còn khoảng 2-3 % hàm lượng hemoglobin tổng số. Người bị bệnh thiếu máu hồng cầu liềm do HbA bị biến đổi thành HbS.



Hình 3.6. Cơ sở phân tử của đột biến gen  $\beta^s$  tạo hồng cầu liềm.

Nguyên nhân chủ yếu của bệnh thiếu máu hồng cầu liêm do một đột biến diêm ở gen  $\beta$  globin, làm thay đổi các đặc điểm của hemoglobin. Gen  $\beta$  globin là một gen có kích thước nhỏ khoảng 2 kb. Đột biến gen  $\beta$  globin thành gen  $\beta^s$  globin, làm cho acid amin ở vị trí thứ 6 của chuỗi peptid  $\beta$  bị thay đổi, acid amin glutamine của chuỗi peptid  $\beta$  bị thay bằng acid amin valin tạo thành chuỗi peptid  $\beta^s$ . Sự thay đổi này tạo nên tính kị nước của chuỗi peptid, gây hiện tượng polyme hoá làm cho các chuỗi peptid kết dính với nhau không bình thường, tạo nên hemoglobin S (HbS). Các phân tử HbS kết hợp với nhau, tạo nên các sợi cứng, gây biến dạng hồng cầu bình thường, hình thành nên các tế bào hồng cầu liêm.

## 2. Các xu hướng chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liêm

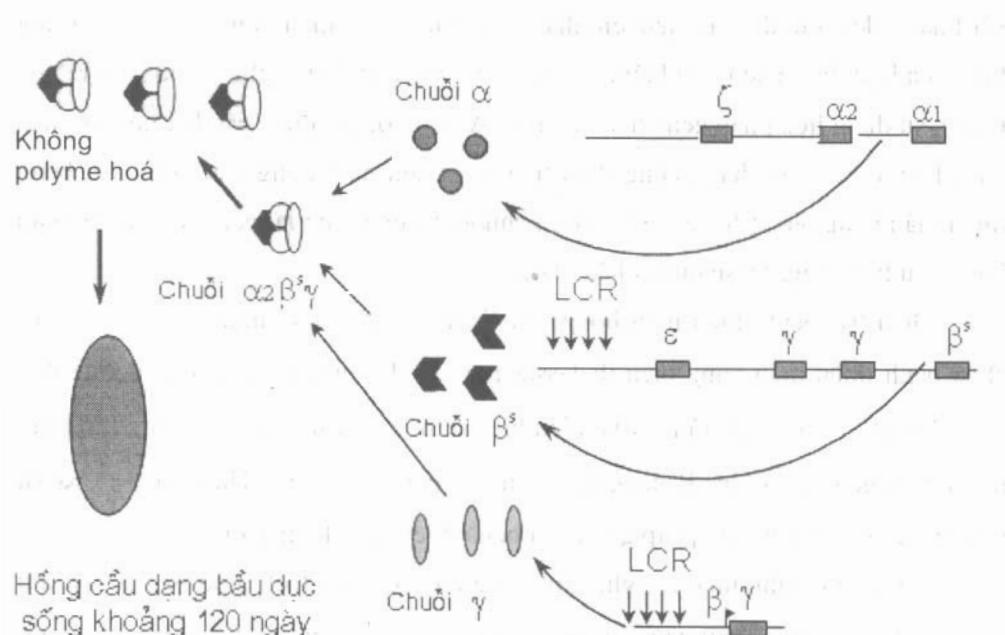
Các công trình nghiên cứu thực nghiệm trên người, trên chuột và các động vật khác, đều xác định rõ nguyên nhân gây bệnh thiếu máu hồng cầu liêm do đột biến gen  $\beta$  globin. Điểm đột biến, các dạng đột biến đã được nghiên cứu rất kỹ. Tuy nhiên, sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh SCA ở người thu được các kết quả rất hạn chế. Trên cơ sở các thành công điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu liêm, và bệnh thiếu máu vùng biển (thalassaemia) trên chuột, trong tương lai gần bệnh thiếu máu hồng cầu liêm ở người sẽ được chữa khỏi.

Điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu liêm ở người khó hơn rất nhiều so với chữa bệnh thiếu máu vùng biển thalassaemia (do đột biến khác trên gen  $\beta$  globin gây nên), do gen  $\beta^s$  globin có sự biểu hiện ở mức độ cao, có chức năng mới tạo nên Hb S (gen  $\beta^s$  globin là dạng đột biến của gen  $\beta$  globin). Hiện nay, có ba xu hướng chủ yếu trong liệu pháp gen chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liêm ở người.

Xu hướng thứ nhất là nghiên cứu sửa chữa các sai lệch ở bộ ba mã hoá thứ 6 của gen  $\beta^s$  globin, hạn chế biểu hiện của gen  $\beta^s$  globin và đồng thời sử dụng retroviral vector để bổ sung thêm hai gen  $\beta$  và gen  $\gamma$  globin vào tế bào tủy xương của người mắc bệnh SCA. Chuỗi peptid  $\gamma$  globin ở người là một chất ức chế mạnh quá trình kết chuỗi của HbS, nên liệu pháp gen chữa bệnh SCA theo hướng làm

tăng biểu hiện của  $\beta$  globin hay tạo dạng globulin lai  $\gamma/\beta$  ở tế bào hồng cầu. Sau khi chuyển bổ sung đồng thời gen  $\beta$  globin và  $\gamma$  globin, sự biểu hiện gen tạo nên các chuỗi peptid  $\gamma$  globin có tác dụng hạn chế sự polyme hoá của các chuỗi peptid  $\beta$  globin. Sự kết hợp của các peptid  $\beta$  globin,  $\gamma$  globin và các chuỗi peptid  $\beta^s$  globin không bị kết dính, tạo nên các dạng hồng cầu hình bầu dục. Hồng cầu hình bầu dục có cấu trúc lõm hai mặt, có khả năng vận chuyển và trao đổi oxy qua mao mạch, không gây tắc nghẽn mao mạch, hạn chế biểu hiện của bệnh thiếu máu hồng cầu liêm (khả năng trao đổi oxy và thời gian tồn tại của các tế bào hồng cầu bầu dục kém hơn hồng cầu bình thường).

Xu hướng thứ hai sửa chữa các sai lệch ở bộ ba mã hoá thứ 22 và bộ ba mã hoá thứ 87 trên gen  $\beta$  globin, tạo nên các dạng hemoglobin Hb F và Hb A<sub>2</sub>, giảm mức thiếu máu của người mắc bệnh SCA (McCune và cộng sự, 1994).



Hình 3.7. Sơ đồ liệu pháp gen chữa bệnh hồng cầu liêm bằng bổ sung các gen  $\beta$  globin và gen  $\gamma$  globin.

Xu hướng thứ ba của liệu pháp gen điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu liêm là chiến lược thay thế gen (replacement gene). Liệu pháp gen nhằm cắt bỏ gen bị hỏng ( $\beta^+$ ), thay thế bằng gen  $\beta$  globin bình thường cho các tế bào tạo máu trong tuỷ xương, giúp các tế bào tạo máu hình thành nên các dạng hồng cầu bình thường. Liệu pháp gen theo hướng này thường sử dụng để điều trị bệnh SCA cho trẻ sơ sinh, hiện nay kết quả của liệu pháp này mới chỉ là những thử nghiệm ban đầu. Để thực sự là một phương pháp chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liêm hiệu quả, các nhà khoa học còn đang tiếp tục nghiên cứu.

### 3. Chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liêm bằng liệu pháp gen

#### 3.1. Vector liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh SCA

Vector liệu pháp có vai trò quan trọng quyết định hiệu quả trong liệu pháp gen điều trị bệnh SCA ở người. Trong các loại vector liệu pháp, lentivirus vector được đánh giá là loại vector có hiệu quả tốt nhất, vì lentivirus giúp cho các gen liệu pháp hoà nhập tốt nhất vào bộ gen người. Do nhiều loại virus trong họ lentivirus là nguyên nhân gây nhiều bệnh hiểm nghèo ở người như AIDS, lao, ung thư...nên sử dụng lentivirus làm vector liệu pháp còn nhiều hạn chế. Các lentivirus có khả năng biến đổi rất mạnh và nhanh, nên có thể gây các hậu quả không lường trước cho cơ thể người. Vì vậy người ta thường sử dụng các retrovirus quen thuộc để thiết kế vector liệu pháp, hạn chế bớt các rủi ro.

Mặt khác, để hạn chế khả năng biến đổi của retroviral vector, người ta đã cải biến một vài trình tự nhỏ của gen  $\beta$  globin, tăng tính ổn định của vector từ retrovirus (Rivella và Sadelain, 1998).

Gần đây, nhiều thực nghiệm sử dụng AAV vector mang gen  $\beta$  globin trong điều trị bệnh SCA ở người cho những kết quả khá quan. Virus AAV không gây bệnh ở người, có khả năng hoà nhập bộ gen của AAV vào bộ gen người ở locus thứ 13 trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 19 ở người (19q13). Các thử nghiệm thiết kế vector AAV mang gen  $\gamma$  globin và gen  $\gamma$  globin, sử dụng trong điều trị bệnh SCA mở ra một triển vọng mới: tỷ lệ chuyển gen  $\gamma$  globin từ 4-71%, hàm lượng Hb F tăng

từ 26-40% (Miller và cộng sự, 1993), sử dụng AAV vectơ chuyên gen  $\beta$  globin vào tế bào tuỷ xương cho thấy hiệu quả chuyển gen có thể đạt tới 6% sau 1 tháng và có 0,4% tế bào tuỷ xương được hồi phục (Ponnazhagan và cộng sự, 1997)...

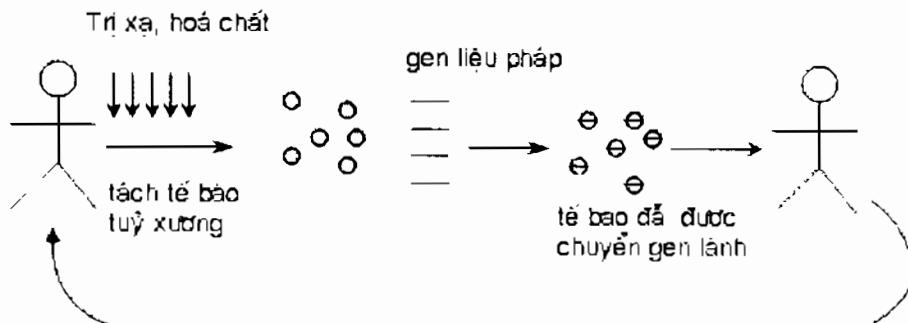
Hiện nay AAV vectơ là loại vectơ được chú ý nghiên cứu và cải biến nhiều nhất, là vectơ triển vọng trong liệu pháp gen chữa bệnh hồng cầu liêm ở người.

### 3. 2. Các bước điều trị bệnh SCA bằng liệu pháp gen

Hiện nay, điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu liêm ở người còn gặp rất nhiều khó khăn, kết quả còn thấp. Một số thực nghiệm chữa bệnh thiếu máu hồng cầu liêm chủ yếu bằng biện pháp tăng cường và hỗ trợ hoạt động của gen  $\beta$  globin kết hợp trị xạ hoặc hoá chất. Liệu pháp này không chữa khỏi bệnh mà chỉ làm giảm mức độ biểu hiện bệnh, kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân, gồm một số bước sau:

Bước 1: Tách các tế bào tuỷ xương của người bệnh và chiếu xạ để chọn các tế bào khỏe mạnh và trộn chung với vectơ retrovirus mang gen  $\beta$  globin bình thường để tạo các tế bào tuỷ xương tái tổ hợp. Nuôi tế bào tuỷ xương tái tổ hợp ở điều kiện thích hợp để tạo một số lượng đủ lớn các tế bào tuỷ xương mang gen  $\beta$  globin lành.

Bước 2: Thực hiện trị xạ, và điều trị hoá dược để tiêu diệt bởi các tế bào tuỷ xương mang gen đột biến.



Hình 3. 8. Sơ đồ các bước chữa bệnh hồng cầu liêm.

Bước 3: Chuyển các tế bào tuy xương mang gen  $\beta$ -globin bình thường vào bệnh nhân. Sau một thời gian các tế bào không mang gen đột biến sinh trưởng và phân chia, bệnh thiếu máu giảm dần.

Bước 4: Do lượng tế bào mang gen đột biến ( $\beta$ -globin) vẫn tiếp tục được hình thành trong cơ thể người bệnh, nên sau một thời gian nhất định mức độ bệnh thiếu máu lại tăng lên, do đó phải lặp lại các bước điều trị gày nhiều tốn kém.

Hiện nay, các thử nghiệm liệu pháp gen khác nhau trên chuột mắc bệnh SCA, đều thu được kết quả rất tốt. Cuối năm 2001, công trình nghiên cứu của Pauliuk sử dụng liệu pháp gen đã chữa khỏi bệnh thiếu máu hồng cầu liềm ở chuột chuyển gen. Trong một tương lai không xa, bệnh thiếu máu hồng cầu liềm ở người chắc chắn sẽ được chữa khỏi bằng liệu pháp gen.

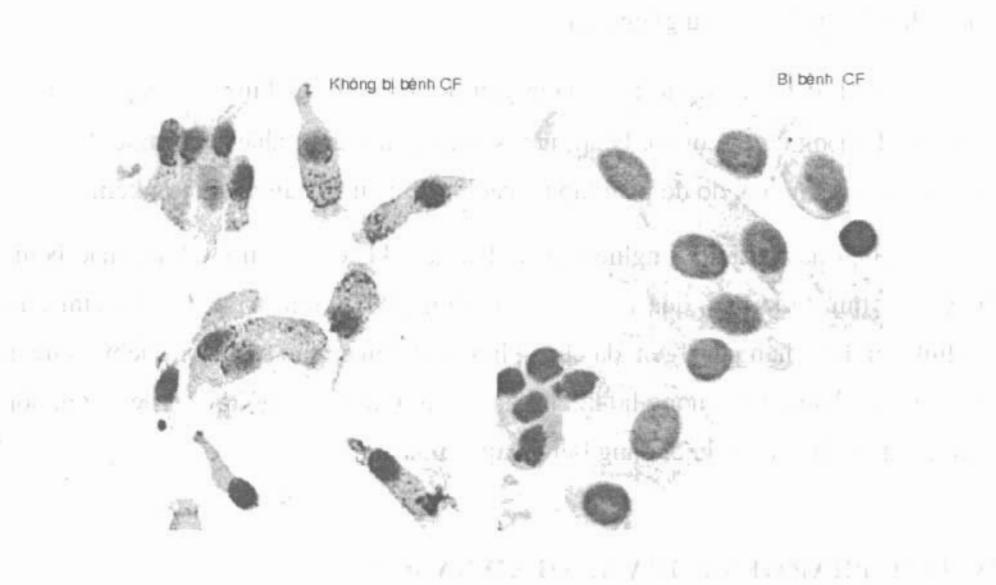
## IV. LIỆU PHÁP GEN CHỮA BỆNH XƠ NANG

### 1. Khái niệm về bệnh xơ nang CF (Cystic fibrosis)

Bệnh xơ nang (CF) được phát hiện lần đầu tiên 1938 từ một trẻ sơ sinh bị viêm phổi và suy hô hấp. Bệnh gây nên do đột biến gen trên nhiễm sắc thể thường, gây rối loạn chức năng chuyển hóa các ion  $\text{Cl}^-$  (Chloride ion) trong tế bào, dẫn đến các chứng viêm phổi, viêm tuy, viêm gan... gây giảm sút sức khoẻ, có thể dẫn tới tử vong do bị suy hô hấp nặng. Bệnh xơ nang là bệnh di truyền, có tỷ lệ mắc bệnh là 1/ 2.500 người. Đặc biệt, ở người Capcazor (Caucasian) tỉ lệ mắc bệnh CF rất cao (khoảng 1- 5%). Hiện nay, số người mắc bệnh ngày càng tăng, ở Mỹ- 30.000 người, ở Anh có 7.000 người mắc bệnh, ở Scotlant -700 người...

Bệnh xơ nang do một loại protein màng (CFTR) bị mất chức năng, không có khả năng đưa các ion  $\text{Cl}^-$  thura ra khỏi tế bào, làm mất cân bằng giữa nước và muối trong tế bào. Bệnh xơ nang thường hình thành một lớp dịch nhầy gây rối loạn

chức năng protein màng, lớp dịch nhầy ngày càng đặc ở các mô tế bào bị bệnh CF, gây các chứng bệnh phổi, gan, tuy và ruột...



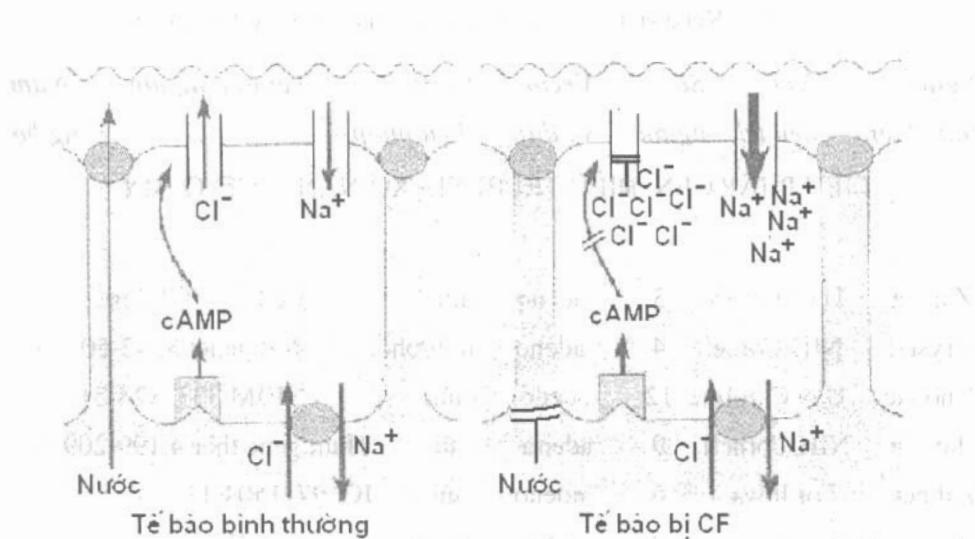
Hình 3.9. Tế bào bị bệnh CF và tế bào bình thường dưới kính hiển vi.

Người bị bệnh xơ nang, thường mắc các bệnh đường hô hấp, do lớp dịch nhầy càng dày và đặc ảnh hưởng đến trao đổi oxy và các triệu chứng viêm thanh quản, phổi cấp tính gây tử vong. Người bị bệnh xơ nang có nguy cơ bị nhiễm nhiều loại vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm thuộc các họ *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aerugiosa* và *Burkholderia cepacia* (Antony Meager, 1999). Người bệnh CF có thể bị rối loạn chức năng tuy dẫn đến bệnh tiểu đường typ II, bệnh viêm gan mãn tính hoặc gây các triệu chứng tắc ruột...

## 2. Đặc điểm di truyền của bệnh xơ nang

Cơ sở di truyền của bệnh xơ nang bắt đầu được chú ý nghiên cứu từ năm 1980. Năm 1989 các nhà khoa học Collins, Riordan và Tsui ở Toronto Canada đã tách dòng được gen gây bệnh xơ nang, ký hiệu CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), gọi tắt là gen CF. Gen CF mã hóa một loại protein

màng gồm 1480 acid amin gọi là protein CFTR. Gen CF là một gen lặn, nằm trên nhiễm sắc thể số 7 ở người có kích thước 250 kb gồm 27 exon. Gen CF mã hoá phân tử mRNA có kích thước 6,5 kb (Zielenski và cộng sự, 1991). Người ta đã phát hiện hơn 400 đột biến khác nhau trên gen CF, trong đó nhiều đột biến gây bệnh CF. Ví dụ, trên 70 % bệnh nhân CF bị đột biến mất 3 cặp nucleotid ở exon số 10 (Kareem và cộng sự, 1989; Tsui, 1992).



Hình 3.10. Trao đổi ion  $\text{Cl}^-$  ở tế bào bị bệnh CF và tế bào bình thường.

Protein CFTR là loại protein màng ở các tế bào biểu bì của cơ quan hô hấp, tế bào biểu mô ruột, tế bào gan, tuy... có chức năng chuyển hóa ion chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) trong chu trình cAMP. Protein CFTR đảm bảo sự cân bằng các ion  $\text{Na}^+$  và ion  $\text{Cl}^-$  trong và ngoài tế bào. Khi protein CFTR bị biến đổi, mất chức năng gây tích tụ quá mức các ion  $\text{Cl}^-$  trong tế bào, hình thành các chất độc trong tế bào, gây nên các bệnh lý.

Năm 1990 đã tổng hợp được cDNA từ gen CF, và tạo các retroviral vector mang gen liệu pháp chữa bệnh CF, là một bước tiến bộ của Y sinh học phân tử trong chữa bệnh CF ở người. Năm 1992 sử dụng liệu pháp gen, đã khôi phục được

chức năng trao đổi ion chlorid của protein CFTR ở các bệnh nhân mắc bệnh xơ nang, nhiều bệnh nhân CF đã được điều trị bằng liệu pháp gen.

### 3. Liệu pháp gen điều trị bệnh xơ nang ở người

#### 3.1. Các liệu pháp sử dụng trong điều trị bệnh xơ nang

Bảng 3.3 Kết quả điều trị bệnh CF ở các nước Mỹ, Anh và Pháp

<i>Người</i>	<i>Nơi</i>	<i>Số</i>	<i>Vector</i>	<i>Vị trí</i>	<i>Tài liệu nguồn</i>	<i>Năm</i>
<i>thực hiện</i>	<i>điều trị</i>	<i>người</i>	<i>sử dụng</i>	<i>liệu pháp</i>		<i>công bố</i>

#### LIỆU PHÁP GEN ĐIỀU TRỊ BỆNH XƠ NANG (CF) Ở MỸ

Zabner	U of Iowa	3	adeno	mũi	Cell 75, 207-216	93
Crystal	NIH/Cornell	4	adeno	mũi/phổi	Nat genet 8, 42-50	94
Knowle	U N Carolina	12	adeno	mũi	NEJM 333, 823-31	95
Hay	NIH/Cornell	9	adeno	mũi	Hum gene ther 4,199-209	95
Zabner	U of Iowa	6	adeno	mũi	JCI 97, 1504-11	96
Wagner Stanford		10	AAV	xoang	Lancet 351, 1702-3	98

#### LIỆU PHÁP GEN ĐIỀU TRỊ BỆNH XƠ NANG (CF) Ở ANH

Caplen	Brompton	15	liposome	mũi	Nat med 1, 39-46	95
Gill	Oxford/Camb.	12	liposome	mũi	Gene ther 4, 199-209	97
Porteous	Edinburgh	16	liposome	mũi	Gene ther 4, 210-18	97
Alton	Brompton	16	liposome	mũi/phổi	Lancet 353, 947-54	99

#### LIỆU PHÁP GEN ĐIỀU TRỊ BỆNH XƠ NANG (CF) Ở PHÁP

Bellon	Lyon	6	adeno	mũi/phổi	Hum gene ther 8, 15-25	97
--------	------	---	-------	----------	------------------------	----

Điều trị bệnh xơ nang ở người đã thu được những kết quả tương đối tốt. Sau liệu pháp gen có khoảng 50% mRNA của gen liệu pháp hoạt động tốt, 5 -15% các mRNA hoạt động kém. Thực nghiệm điều trị trên 27 bệnh nhân CF ở Anh năm 1999 cho thấy có 17 người có kết quả (chiếm 63%), trong đó chỉ có 6 bệnh nhân phục hồi chức năng protein CFTR, chiếm 22% (Hyde và cộng sự, 2000). Bệnh xơ nang đã được điều trị thành công ở nhiều nước trên thế giới (bảng 3.3). Số lượng người đã được chữa khỏi bệnh hoặc giảm biểu hiện bệnh ngày càng tăng.

Các xu hướng sử dụng liệu pháp gen trong điều trị bệnh xơ nang ở người hiện nay gồm:

- Sử dụng vectơ liệu pháp mang gen liệu pháp – cDNA (do kích thước gen CF quá lớn nên chỉ tổng hợp cDNA từ mRNA mã hoá protein CFTR và một số trình tự đặc hiệu), làm cho gen liệu pháp gắn với nhiễm sắc thể ở những điểm đặc hiệu.
- Thực hiện chiến lược sửa chữa gen bằng vectơ mang các oligonucleotid để sửa chữa đột biến trên gen CF.
- Sử dụng kỹ thuật episomal, nghĩa là chuyển các đoạn cDNA cần thiết vào tế bào, sao cho cDNA vào nhân dính với bộ gen ở một điểm nào đó và tồn tại như một đơn vị độc lập trong tế bào.

### **3. 2. Các loại vectơ sử dụng trong điều trị bệnh xơ nang**

Liệu pháp gen trong điều trị bệnh xơ nang ở người, có thể sử dụng viral vectơ hoặc non-viral vectơ.

Viral vectơ thường sử dụng là adenovirus, adeno-associated virus (AAV), retrovirus, Lentivirus, Paramyxovirus

Non-viral vectơ là các phức hợp cationic liposom: GL67, PEI, Plasmid, SecR, Integrin...

Thực nghiệm đầu tiên chữa bệnh CF ở người, là liệu pháp gen sử dụng retroviral vectơ để chuyển cDNA mã hoá protein CFTR vào các dòng tế bào CF, tuy nhiên kết quả chưa rõ rệt. Các thực nghiệm sau này sử dụng vectơ từ moloney murine leukemia virus (MoMLV), và HIV-1 cho kết quả tốt hơn, nhưng có các hiệu ứng phụ và kém ổn định (Naldini và cộng sự, 1996 ; Goldman và cộng sự 1997). Sử dụng Adenoviral vectơ trong điều trị CF có nhiều thuận lợi như: Có hiệu quả cao, không tạo gen ung thư hoặc kích hoạt gen ung thư, không gắn gen với bộ gen tế bào đồng thời cho phép làm yếu virus dễ dàng bằng nhiệt độ hoặc hoá chất.

Bảng 3.4. Hiệu quả của các loại vectơ trong điều trị bệnh CF ở người

<i>Vector</i>	<i>Vị trí liệu pháp</i>	<i>Số lượng</i>	<i>Có gen</i>	<i>Tạo mRNA</i>	<i>Hiệu quả</i>
<i>liệu pháp</i>					
adeno/AAV	mũi	50	20/38	14/35	2/44 (4,5%)
adeno	phổi	10	7/10	1/10	1/10 (10%)
liposom	mũi	25	14/16	8/15	0/25 (0,0%)
liposom	phổi	8	-	-	7/8 (87,5%)

Điểm hạn chế lớn nhất khi sử dụng adenoviral vectơ là thời gian biểu hiện ngắn và rất khó khăn trong tạo chế phẩm. Tuy nhiên, đến nay trong thực tế liệu pháp gen chữa bệnh CF ở người, chủ yếu là sử dụng adenoviral vectơ (bảng 3.3). Trong một số trường hợp, vectơ mang gen liệu pháp điều trị bệnh CF ở người sử dụng vectơ liposom cho kết quả rất cao, ngược lại có trường hợp không có kết quả (bảng 3.4.).

Hiệu quả sử dụng vectơ liệu pháp gen trong điều trị bệnh CF ở người phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, trong đó vị trí điều trị (loại tế bào, mô, loại bệnh...) có ý nghĩa quyết định đến hiệu quả chữa bệnh. Số liệu ở bảng 3.4. cho thấy sử dụng vectơ liposom chuyển gen liệu pháp vào tế bào phế nang đạt kết quả 87,5% trong khi chuyển gen vào các tế biểu niêm mạc mũi không thu được kết quả.

### **3.3. Xu hướng điều trị bệnh CF ở người trong tương lai**

Trong những năm tối, để điều trị và chữa bệnh xơ nang ở người có hiệu quả cao hơn nữa, các nhà khoa học trên thế giới đặt vấn đề cần chú ý một số xu hướng sau:

- a. Phát triển các loại vectơ liệu pháp hiệu quả cao
  - Nghiên cứu và tìm hiểu cặn kẽ hiệu quả của các gen nội sinh
  - Giảm tối đa các độc tố và sự đáp ứng miễn dịch trong thực hiện liệu pháp gen.
  - Nghiên cứu các hợp chất, các quá trình các liên kết chất chẽ với các thụ thể (receptor) trên màng tế bào.
  - Thiết kế và thử nghiệm các thế hệ vectơ mới như vectơ lai giữa các dạng virus, vectơ tổng hợp, vectơ là các nhiễm sắc thể nhân tạo của người.
- b. Nghiên cứu lai tạo các động vật dương tính hoặc âm tính với CF, ví dụ tạo các giống cừu CF<sup>+</sup> và CF<sup>-</sup> ....
- c. Phát triển các mẫu chuẩn (kit) cho xét nghiệm CF.
- d. Thủ nghiệm liệu pháp gen tế bào gốc (stem cell therapy)...

## **IV. LIỆU PHÁP GEN CHỮA HIV/AIDS**

### **1. Virus HIV và hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS)**

Bệnh AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) là hội chứng suy giảm miễn dịch do nhiễm virus HIV (human immunodeficiency virus), làm mất sức đề kháng của cơ thể với các tác nhân gây bệnh, có thể dẫn đến ung thư hoặc tử vong.

Từ năm 1971 – 1981 phát hiện một số bệnh nhân là những người đồng tính nam bị viêm phổi cấp, sử dụng kháng sinh liều cao không khỏi, hệ thống miễn dịch suy giảm. Bệnh nhân mắc bệnh AIDS đầu tiên phát hiện ở Mỹ, ngày 5/6/1981. Theo báo cáo của WTO đến 2001 trên thế giới đã có 20 triệu người chết vì AIDS, trong đó có 40 triệu người nhiễm HIV, tốc độ nhiễm HIV liên tục tăng

nhanh gấp 1,5 lần những năm trước đây. Ở Việt Nam người mắc bệnh AIDS đầu tiên là một phụ nữ ở thành phố Hồ Chí Minh, phát hiện 12/1990. Tính đến hết tháng 31/5/2004, ở nước ta có 81.206 người được phát hiện nhiễm HIV trong đó có 112.684 người đã chuyển sang AIDS, trong đó có 7.208 người đã chết vì AIDS (Tạp chí AIDS và cộng đồng 7/2004). Việt Nam được đánh giá là quốc gia có tỷ lệ nhiễm HIV thấp hơn so với nhiều nước trong khu vực và thế giới. Tuy nhiên, nguy cơ lan rộng khá cao nếu không có các biện pháp phòng, chống và điều trị thích hợp. Nước ta đã có các biện pháp phòng chống lây nhiễm HIV/AIDS tích cực, nhằm hạn chế tỷ lệ nhiễm HIV có xu hướng già tăng mạnh những năm gần đây. Ngày 17/3/2004 Thủ tướng Chính phủ đã ban hành Chiến lược Quốc gia phòng chống AIDS đến 2010, và tầm nhìn 2020. Mục tiêu chung của chiến lược là: "không chế tỷ lệ nhiễm HIV/AIDS trong cộng đồng dân cư dưới 0,3% vào năm 2010 và không tăng sau 2010; giảm tác hại HIV/AIDS đối với sự phát triển kinh tế xã hội". Ngày 23/6/2004 Tổng thống Mỹ J. Bush tuyên bố chọn Việt Nam là nước duy nhất ngoài châu Phi và vùng vịnh Caribe tham gia vào chương trình phòng chống AIDS khẩn cấp của Tổng thống (PEPFAR). Ngoài ra, chúng ta đã chủ động tìm tòi và nghiên cứu các bài thuốc dân tộc có tác dụng phòng chống HIV/AIDS, đồng thời giáo dục rộng rãi trong cộng đồng hiểu biết về HIV/AIDS, tránh các nguy cơ lây nhiễm HIV như không sử dụng chung kim tiêm, sinh hoạt tình dục an toàn...với nhiều biện pháp tích cực, chúng ta có thể hạn chế được tốc độ lây nhiễm AIDS trong cộng đồng.

Virus gây suy giảm miễn dịch ở người được phân lập năm 1983 gọi là HIV gọi là HIV typ I (HIV-1), năm 1986 phát hiện một loại virus khác cũng gây suy giảm miễn dịch đặt tên là HIV typ II (HIV-2). Trong số người nhiễm HIV, chủ yếu là nhiễm HIV-1 chiếm 98% trong tổng số các ca nhiễm HIV, nhiễm HIV-2 chủ yếu ở miền tây của châu Phi, chiếm khoảng 2%, lây lan chậm.

Bộ gen của HIV kích thước 10 kb, bao gồm 9 gen chính *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *tat*, *vpu*, *nef*, *vpr*, *rev*. Mỗi gen có cấu trúc chức năng khác nhau: gen *tat* (trans activator) điều hoà tái bản gen của HIV, gen *vif* (virion infectivity factor) mã hoá

một loại protein 23 kDa tham gia quá trình lắp ghép virion, gen *nef* (negative regulator factor) mã hoá protein 27 kDa, giúp cho sự thay đổi và liên kết với protein CD<sub>4</sub> của màng tế bào; các gen *env*, *gag* mã hoá các thành phần cấu trúc protein vỏ, capsid, gen *pol* mã hoá các loại enzym virus và enzym phiên mã ngược...., gen *tat* và một trình tự đặc hiệu - *att* (attachment site) của HIV, giúp cho HIV có thể gắn và hoà nhập với bộ gen của HIV với bộ gen tế bào chủ tạo các tiền virus (provirus).

Cơ chế lây nhiễm của HIV, đặc biệt là HIV-1 đến nay đã được nghiên cứu khá đầy đủ. HIV-1 lây nhiễm chủ yếu bằng sinh hoạt tình dục không an toàn, tiêm chích, hoặc phụ nữ nhiễm HIV mang thai lây sang con (lây ở giai đoạn mang thai, tỉ lệ nhiễm HIV của trẻ sơ sinh chiếm khoảng 30% tổng số trẻ em là con bệnh nhân HIV/AIDS). Khi cơ thể bị nhiễm HIV, virus HIV xâm nhập tế bào lympho T (T CD<sub>4</sub>) tại các thu thể CD<sub>4</sub> và thu thể *Chemokine* (một loại protein màng đặc hiệu do gen CCR<sub>5</sub> mã hoá) trên bề mặt tế bào. Sau khi xâm nhiễm tế bào, virus HIV có cơ chế gắn và hoà nhập bộ gen virus với bộ gen tế bào, tạo nên các provirus ở vô số tế bào lympho T và các tế bào miễn dịch khác gây suy giảm miễn dịch. Trong một điều kiện nào đó trong tế bào hoặc điều kiện ngoại cảnh bất lợi như tia UV, phóng xạ, chất độc..., bộ gen của HIV tách ra khỏi bộ gen tế bào, tái bản tạo các thế hệ HIV mới phá vỡ các tế bào tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác. Ngoài các tế bào lympho T (T CD<sub>4</sub>), HIV có thể xâm nhiễm nhiều loại tế bào khác như lympho B, đại thực bào đa nhân, bạch cầu, tế bào thần kinh.... làm suy giảm nhanh chóng hệ thống miễn dịch của cơ thể, các triệu chứng nhiễm HIV/AIDS biểu hiện. Thời gian ủ bệnh và chuyển từ nhiễm HIV sang AIDS dài ngắn khác nhau, có thể từ vài tháng đến vài năm hoặc hàng chục năm..., tùy thuộc trạng thái sức khoẻ của người bệnh và điều kiện môi trường. Từ khi bắt đầu nhiễm HIV đến AIDS chia làm ba giai đoạn: giai đoạn sơ nhiễm kéo dài vài tuần đến nhiều tháng, giai đoạn tiềm ẩn kéo dài từ 1 đến hàng chục năm, giai đoạn AIDS do hệ thống miễn dịch giảm mạnh, dễ mắc các bệnh nhiễm trùng khác, sức khoẻ suy kiệt nhanh nên có thể tử vong trong vòng 3 tháng đến 1 năm.

Những nghiên cứu mới đây cho thấy khi gen CCR<sub>5</sub> bị đột biến mất 32 cặp bazơ trong đoạn mang mã của gen, gây biến đổi tính chất thụ thể *Chemokine* có tác dụng ngăn cản sự xâm nhiễm của HIV-1. Chẳng hạn, ở các quần thể người Capcazơ (Caucasian) tỉ lệ nhiễm HIV-1 thấp hơn các chủng tộc người khác từ 10,8 % - 16%, do người Capcazơ có tỉ lệ đồng hợp về đột biến gen CCR<sub>5</sub> khá cao từ 81% - 83% (Dean và cộng sự, 1996). Những nghiên cứu này là cơ sở của các kỹ thuật liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS.

Một trong những khó khăn trong sản xuất các loại biệt dược chống HIV là khả năng biến đổi rất nhanh của bộ gen, làm cho HIV thích ứng nhanh với các loại biệt dược, nên cho đến nay chưa có loại “thuốc” đặc hiệu tuyệt đối với HIV.

## **2. Các xu hướng điều trị nhiễm HIV/AIDS bằng liệu pháp gen**

Trong nhiều năm qua, nhiều loại kháng sinh và biệt dược được nghiên cứu và thử nghiệm trong điều trị chống nhiễm HIV/ AIDS, đã có những kết quả tốt góp phần kéo dài cuộc sống cho nhiều bệnh nhân AIDS. Các loại thuốc Starudine, Lamirudine, Nerirapine, Azathioprine (AZT), Antiretroviro (ARV)... đặc biệt là thuốc ARV (kháng virus) là những thuốc điều trị AIDS đã góp phần hiệu quả trong điều trị HIV/AIDS. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp nhiễm HIV điều trị AZT không có hiệu lực, có thể do một số chủng HIV đã có các đột biến thích ứng với AZT, ARV...

Để có thể hạn chế nhiễm HIV và đại dịch AIDS trong xã hội, trong những năm gần đây một hướng mới trong điều trị AIDS được chú ý nghiên cứu và thử nghiệm là liệu pháp gen.

Các xu hướng chủ yếu của liệu pháp gen trong điều trị nhiễm HIV/ AIDS là:

- Sử dụng vectơ liệu pháp để chuyển các gen liệu pháp vào tế bào nhằm hạn chế khả năng xâm nhiễm, và tái bản của HIV

- Kích hoạt hệ thống gen của tế bào, tăng cường miễn dịch chống sự phát triển của HIV/ AIDS.

- Sử dụng các gen tự từ *ced* đã biến đổi, làm cho tế bào bị chết khi có HIV xâm nhiễm.
- Tạo các vaccine DNA phòng chống nhiễm HIV.

### 3. Một số liệu pháp gen điều trị HIV/AIDS

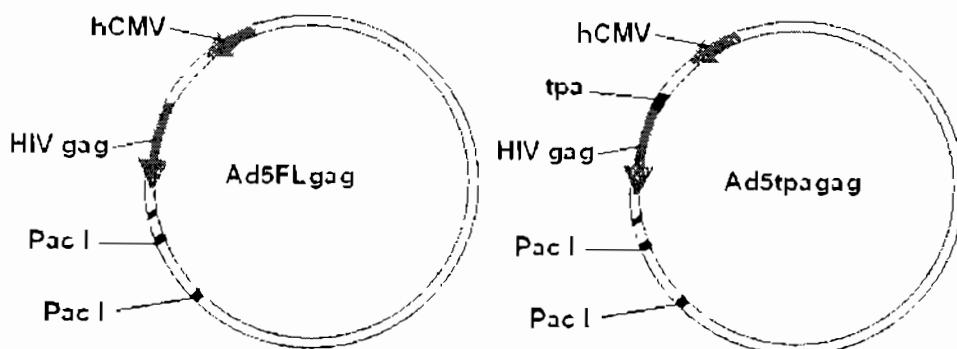
#### 3.1. Phòng chống HIV/ AIDS bằng gây ức chế hoạt động gen của HIV, hoặc biến đổi gen của HIV

Hiện nay liệu pháp gen phòng chữa HIV và AIDS theo chiến lược thiết kế các vectơ mang gen liệu pháp đưa vào tế bào và cơ thể, được chú ý nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất. Liệu pháp gen theo hướng này tuân thủ các bước cơ bản cơ bản của liệu pháp gen, nhưng do HIV là loại virus có khả năng siêu biến đổi, có thể gắn bộ gen của virus vào bộ gen tế bào người, nên thiết kế vectơ liệu pháp gấp rất nhiều khó khăn: cần phải đưa gen liệu pháp đúng vị trí để hạn chế được hoạt động và biểu hiện của HIV, phục hồi hệ thống miễn dịch, đồng thời không gây các hiệu ứng phụ bất lợi và không gây đột biến gen, đảm bảo an toàn cho con người... Vì những lý do trên, đến nay liệu pháp gen phòng chữa HIV/AIDS vẫn còn ở giai đoạn thử nghiệm chủ yếu trên động vật và trên người.

##### 3.1.1. Vectơ liệu pháp trong phòng và chữa HIV/ AIDS

Trong liệu pháp gen phòng và chữa HIV/AIDS sử dụng cả hai loại vectơ liệu pháp. Vectơ có bản chất virus thường sử dụng là vectơ thiết kế từ adenovirus AAV và HIV-1. Vectơ không có bản chất virus thường sử dụng các oligonucleotid, polycation, liposom...

AAV viral vectơ được thiết kế mang một gen liệu pháp 4,7 kb nhằm hạn chế tái bón HIV trong tế bào, tuy nhiên khả năng gắn gen liệu pháp vào nhiễm sắc thể số 19 của người rất thấp, và hầu như không có tác dụng (Chaterjee và cộng sự, 1992).

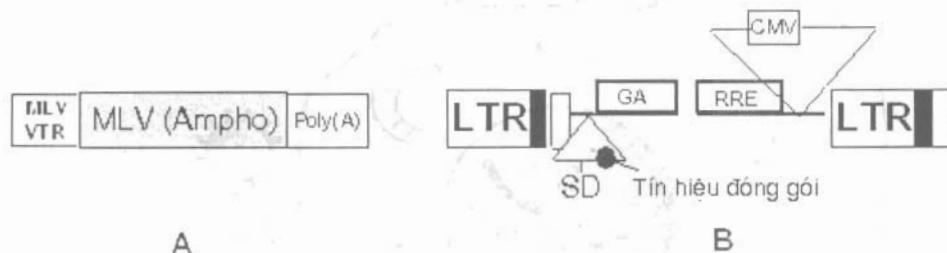


Hình 3. 11. Adenoviral vectơ trong liệu pháp gen chống HIV/AIDS.

Vectơ liệu pháp thiết kế từ adenovirus là một vectơ lai chứa ba loại gen: gen của adenovirus là đoạn gen Ad5; gen của HIV là gen *gag* và *tpa* đã biến đổi của HIV; gen của người là promoter CMV (hCMV – gen human cytomegavirus). tạo nên hai vectơ liệu pháp gen phòng chống HIV là vectơ **Ad5FLgag** (Ad5 HIV-1 gag) và **Ad5tpagag** (Ad CMV1- tpaHIVgag). Các vectơ liệu pháp gen **Ad5FLgag** và **Ad5tpagag** đã được thử nghiệm trên khỉ và trên chuột cho kết quả rất khả quan, tỷ lệ tế bào nhiễm HIV của khỉ được điều trị giảm nhiều so với ở khỉ không được điều trị. Các vectơ này là những vectơ triển vọng có thể sử dụng phòng và chống HIV/AIDS cho người trong thời gian sắp tới.

Vectơ liệu pháp thiết kế từ virus HIV-1 được thiết kế và thử nghiệm từ năm 1991 (Poznansky và cộng sự, 1991; Shimada và cộng sự 1991). Cơ sở thiết kế vectơ liệu pháp phòng chống HIV-1 từ bộ gen HIV -1 đã biến đổi, và được cài gắn thêm một số gen khác có chức năng ức chế tái bản hoặc hoạt động của HIV. Đến nay, có nhiều loại vectơ phòng chống HIV được sử dụng. Trong đó có một số vectơ thử nghiệm có hiệu quả.

Ví dụ, vectơ pCMVAR9 bao gồm bộ gen virus HIV-1 đã cắt bớt một số gen, và cài thêm promoter hCMV của bộ gen người (hCMV – gen human cytomegavirus) và tín hiệu đóng gói SD (packaging signal); Vectơ mã hoá protein vỏ của virus (env-coding plasmid), plasmid này được thiết kế gồm các gen mã hoá vỏ của virus MLV (Moloney murine leukemia virus); Vectơ HIV chuyển dịch (transfer vector), vectơ này mang các gen GA, RRE và promoter CMV của bộ gen người có chức năng ngăn cản tái bản gen của HIV trong tế bào đồng thời hạn chế khả năng gắn bộ gen HIV với bộ gen tế bào....



Hình 3.12. A - Env- coding plasmid.

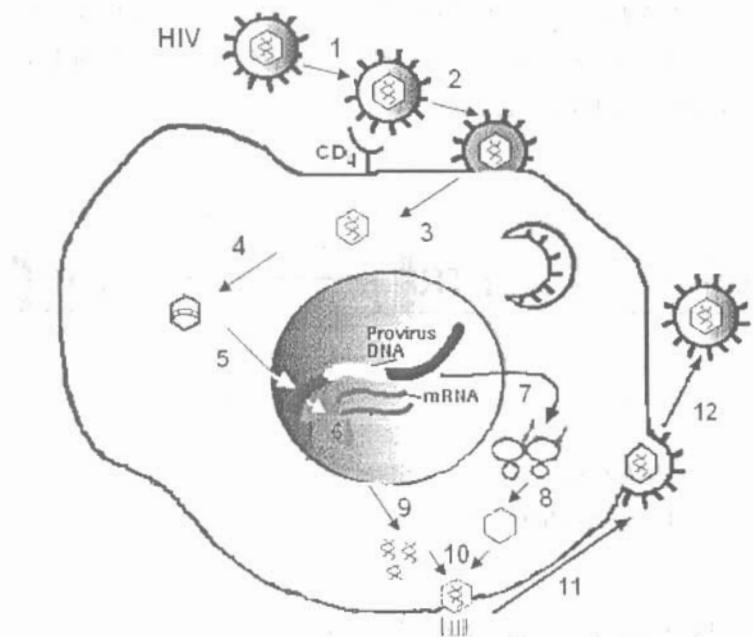
B - Vectơ chuyển dịch (Transfer vector).

Các vectơ HIV-1 phòng chống nhiễm HIV/AIDS đã được thử nghiệm trên chuột, có hiệu quả hạn chế phát triển của virus HIV trong tế bào. Tuy nhiên khi sử dụng viral vectơ HIV-1 có hiện tượng tái tổ hợp gen giữa vectơ liệu pháp với virus HIV, dẫn đến các đột biến gen và các hậu quả không mong muốn. Do vậy vectơ liệu pháp HIV-1 cho đến nay còn là vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu, thử nghiệm trên động vật và trên các tế bào người in vitro.

### 3.1.2. Sử dụng Oligo- antisens và ribozym trong phòng chống HIV/ AIDS

Trong liệu pháp gen phòng chống HIV/AID còn nhiều thử nghiệm sử dụng nhiều loại vectơ không có bản chất virus (non – viral vector), điển hình là các oligo - antisens, ribozym (Cohen và cộng sự, 1991; Lori và cộng sự, 1994; Bordier và cộng sự, 1995)....

Oligo-antisen có thể ức chế quá trình dịch mã của HIV hoặc ức chế hoạt động phiên mã của nhiều gen khác nhau của HIV như ức chế gen *gag* (Lori và cộng sự, 1994), kìm hãm gen *rev* (Vandedriessche và cộng sự, 1995) gen *env* (Guotoku. J và cộng sự, 1991)...



Hình 3.13. Các giai đoạn trong chu trình xâm nhiễm và phát triển của HIV.

Ribozym được dùng tìm đến RNA thông tin (mRNA) của HIV, thực hiện phản ứng cắt đặc hiệu, làm mất hoạt tính mRNA của HIV (Dropulic, 1994). Virus HIV-1 ribozym có thể tác động và gây mất hoạt tính mRNA của một số gen HIV như các gen *gag*, *pol*, *tat* (Chen và cộng sự, 1992; Dropulic, 1994)...

Hiện nay nhiều thử nghiệm viral vectơ và nonviral vectơ phòng chống HIV/AIDS, tuy nhiên các thử nghiệm trên người thu được kết quả còn thấp. Cần nghiên cứu để tìm ra các vectơ liệu có hiệu quả thực sự, góp phần hạn chế tác động của đại dịch AIDS toàn cầu.

Sử dụng các liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS, cần lựa chọn các giải pháp thích hợp với từng giai đoạn khác nhau trong chu trình xâm nhiễm tế bào và phát triển của HIV, nhằm đảm bảo hiệu quả của liệu pháp. Quá trình phát triển của HIV từ lúc xâm nhiễm tế bào lympho T CD<sub>4</sub>, đến khi hình thành các thế hệ HIV mới, có thể chia làm 11 giai đoạn chủ yếu.

Trong mỗi giai đoạn, hoạt động của HIV và các gen rất khác biệt, do vậy cần sử dụng các liệu pháp hợp lý ở mỗi giai đoạn. Ví dụ, khi HIV đang ở giai đoạn 2 có thể sử dụng kháng thể kháng protein vỏ (anti-env antibodies), khi ở giai đoạn 9 có thể sử dụng ribozym hoặc oligo – antisense chống gag (oligo – antisense against gag)...(Bảng 3.5)

Bảng 3.5. Một số chiến lược liệu pháp gen chống HIV/AIDS

Tính chất của giai đoạn	Liệu pháp thích hợp
1 Tiếp cận tế bào tại thụ thể CD <sub>4</sub>	Oligo-antisense chống liên kết thụ thể, kháng thể chống CCR <sub>5</sub> , ribozym..
2 Gắn với thụ thể CD <sub>4</sub>	Ribozym, oligo-antisense chống env, transdominant gp41
3 Phân lõi tách khỏi phân vỏ	
4 Phiên mã ngược tạo cDNA	Ribozym, oligo-antisense chống pol
5 Bộ gen HIV gắn với bộ gen tế bào	Viral vector chống tat, att
6 Phiên mã tạo mRNA virus	Ribozym, oligo-antisense chống pol
7 Dịch mã tổng hợp protein vỏ	
8 Hình thành vỏ capsid	
9 Tái bản bộ gen HIV	Transdominant rev, ribozym
10 Lắp ghép các hạt virion	Viral vector, transdominant gag
11 Các virus HIV mới phá tế bào	
12 Tiếp tục xâm nhiễm tế bào khác	

### **3.2. Phòng chống HIV/ AIDS bằng tăng cường miễn dịch của tế bào**

Trong chiến lược phòng chống HIV/AIDS bằng liệu pháp gen, vấn đề tăng cường miễn dịch chống HIV/AIDS của tế bào, được chú ý nghiên cứu của rất nhiều nhà khoa học (Martin, 1990; Levitskaya và cộng sự, 1995; Woffendin và cộng sự, 1996; Liêm và cộng sự, 1993,...). HIV chỉ xâm nhiễm tế bào tại các thụ thể CD<sub>4</sub> của tế bào, một số trường hợp tế bào có protein CD<sub>4</sub> bị biến đổi làm cho cơ thể không bị lây nhiễm HIV. Những phát hiện ở chủng tộc người Capcazơ có tỷ lệ nhiễm HIV thấp do gen CCR<sub>5</sub> bị đột biến, đã tạo cơ sở cho các nghiên cứu theo hướng tăng cường miễn dịch của tế bào chống HIV.

#### *3.2.1. Chiến lược sử dụng gen đột biến Rev 10*

Một trong các nghiên cứu có kết quả hạn chế HIV xâm nhiễm rất tốt là tạo một loại protein đột biến trong tế bào bằng gen Rev 10. Sử dụng vectơ oligonucleotid mang Rev 10, chuyển vào tế bào lympho T CD<sub>4</sub> bào nhờ kỹ thuật bắn gen. Kết quả cho thấy, có sự tái tổ hợp với bộ gen tế bào tạo nên các tế bào lympho T CD<sub>4</sub> mang gen đột biến Rev 10, các tế bào này có khả năng kìm hãm sự xâm nhiễm của HIV (Woffendin và cộng sự, 1996; Liêm và cộng sự, 1993).

#### *3.2.2. Chiến lược sử dụng gen tăng cường hoạt động của các gen cytokin*

Một hướng nghiên cứu khác là tăng cường hoạt động các gen cytokin trong tế bào. Tất cả các phân tử protein, các chất tạo nên bởi hệ thống tế bào miễn dịch trong đáp ứng miễn dịch gọi là cytokin (cytokine). Cytokin bao gồm nhiều loại khác nhau, trong đó các interferon (IFN gồm ba loại chủ yếu IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  và IFN $\gamma$ ) và interleukin (IL gồm nhiều loại từ IL-1, IL-2, IL-3... đến IL-13) đóng vai trò vô cùng quan trọng trong hệ miễn dịch của cơ thể.

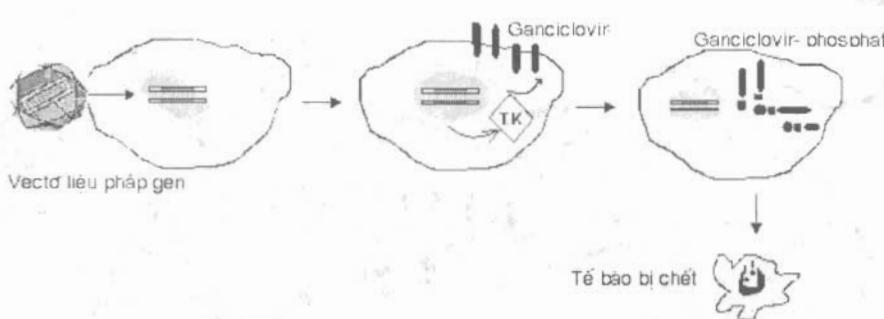
Interferon (IFN $\alpha$  và IFN $\beta$ ) được sản sinh ở các tế bào bị nhiễm virus, được chuyển đến các tế bào xung quanh, làm cho các tế bào này có tác dụng ngăn cản sự xâm nhiễm của các loại virus. Trong trường hợp tế bào nhiễm HIV, do hoạt động các gen HIV làm suy yếu khả năng sản sinh interferon của tế bào. Liệu pháp

gen với chiến lược đưa một gen liệu pháp để tăng cường hoạt động gen sản sinh interferon, đã và đang được nghiên cứu và thử nghiệm trên chuột.

Cytokin được tổng hợp chủ yếu từ các lympho T hoạt hoá và các đại thực bào. Trong các loại cytokin, nhóm Interleukin là nhóm các chất có vai trò kích thích sự tăng sinh và biệt hoá các tế bào miễn dịch. Trong đó IL-2 có tác dụng kích thích sự tăng sinh của các tế bào T CD4<sup>+</sup>, ngăn cản sự phá huỷ hệ miễn dịch do HIV gây ra, khống chế tái bản và nhân lên của HIV. Với vai trò quan trọng của IL-2 đối với hệ thống miễn dịch chống HIV/AIDS, hiện nay một số thử nghiệm liệu pháp gen theo xu hướng tăng cường gen mã hoá IL-2 cho các tế bào nhiễm HIV, đã thu được nhiều kết quả bước đầu. Chiến lược tăng cường gen IL-2 trong liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS, là một trong những hướng được ưu tiên nghiên cứu trong những năm tới, nhằm đưa lại hiệu quả thực sự trong phòng chống đại dịch thế kỷ – HIV/AIDS.

### 3. 2. 3. Chiến lược sử dụng các gen tự tử (Ced) và gen độc tố (toxic gene)

Khi HIV mới xâm nhiễm tế bào, bằng liệu pháp đưa các gen tự tử (Ced) thymidin kinase (TK) phối hợp sử dụng thuốc chống virus ganciclovir (GCV), tạo thành phức hợp ganciclovir-phosphat.



Hình 3. 14. Sử dụng gen tự tử (TK) trong phòng chống HIV/AIDS.

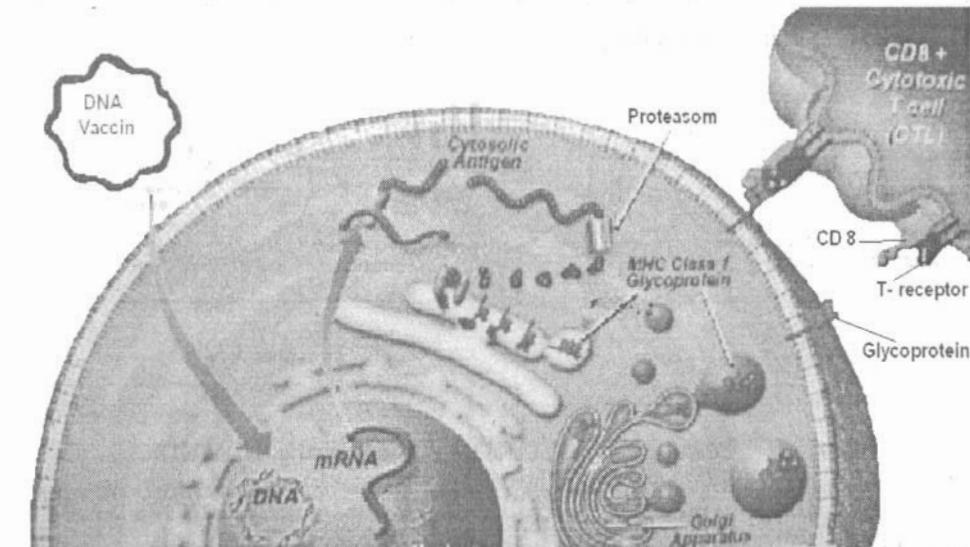
Ganciclovir-phosphat ức chế hoạt động của enzym DNA polymerase, làm cho quá trình tái bản gen của tế bào bị ngừng, sự phân chia tế bào bị gián đoạn, tế

bào co lại và chết dần. Tế bào nhiễm HIV bị chết, sẽ hạn chế khả năng lây lan của HIV trong cơ thể.

Các gen độc tố (toxic gene) của một số loại vi khuẩn như *Pseudomonas* exotoxin, cũng được sử dụng trong liệu pháp gen chống HIV/AIDS. Thiết kế vectơ CD<sub>4</sub> - *Pseudomonas* exotoxin và chuyển vào tế bào, các độc tố tạo thành gây biến đổi cấu trúc thụ thể, làm hạn chế khả năng xâm nhiễm của HIV (Berger và cộng sự 1988; Ashorn và cộng sự, 1991). Các liệu pháp sử dụng toxin gen mới chỉ dùng ở các thử nghiệm in vitro, và còn được nghiên cứu tiếp tục.

### 3.3. Vaccin DNA trong điều trị HIV/AIDS

Vaccin DNA được xem là một chiến lược hiệu quả của liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS. Những nghiên cứu đầu tiên vaccin DNA là thử nghiệm chống bệnh lao trên chuột của các nhà khoa học Anh (1986). DNA từ vi khuẩn lao để sản xuất vaccin DNA, tiêm vào chuột nhắt tạo nên những con chuột nhắt miễn dịch với vi khuẩn lao. Hàng loạt các vaccin DNA chống viêm gan B, ung thư cũng được thử nghiệm trên tế bào người và các động vật thử nghiệm.



Hình 3.15. Sơ đồ vai trò của vaccin DNA trong liệu pháp gen phòng chống HIV/AIDS.

Vaccine DNA khác với các loại vaccine khác ở chỗ vaccine DNA là phức hợp các gen (DNA), khi đưa vào tế bào các gen được tái bản, phiên mã và dịch mã trong tế bào tạo nên các loại protein liệu pháp tương ứng. Protein liệu pháp có tác dụng ngăn cản sự xâm nhập của HIV, hoặc ức chế sự phát triển và nhân lên của HIV trong tế bào. Các loại vaccine khác (vaccine vi khuẩn, virus giảm độc tố; vaccine mảnh peptid, vaccine tái tổ hợp...) đều là các protein kháng nguyên, khi đưa protein kháng nguyên vào cơ thể gây đáp ứng miễn dịch tế bào, kích thích các loại tế bào tương ứng với kháng nguyên sản sinh các kháng thể đặc hiệu.

Hiện nay vaccine DNA HIV-1 đã và đang được thử nghiệm phòng chống HIV/AIDS trên chuột có hiệu quả cao. Bản chất của vaccine DNA HIV-1 là một vectơ liệu pháp gen, được cài tiến từ bộ gen HIV-1. Một số loại vaccine DNA, được thử nghiệm phòng chống HIV/AIDS được tạo thành từ các plasmid tái tổ hợp, gồm plasmid pTXGE và các gen đặc hiệu cho hệ thống miễn dịch ở người như gen IL-2, gen IFN-γ và gen GM-CSF. Plasmid tái tổ hợp pTXGE được tạo thành từ plasmid pTX (4,5-5 kb) cài thêm bộ gen HIV-1 biến đổi (đã xoá bỏ một số vùng gen của HIV như gen *pol*, các gen *rpu*, *vpr*, *tat* bị xoá một vài vùng nhỏ).

Sử dụng vaccine DNA HIV-1 tiêm cho chuột thí nghiệm cho kết quả rất tốt. Đối tượng thử nghiệm là chuột cái Buffalo 4-5 tuần tuổi, do trung tâm B & K Universal Group cung cấp. Mỗi con chuột được tiêm vaccine HIV-1 với liều 400 µg 3 lần trong 8 tuần. Sau 2 tuần tính từ lần tiêm cuối cùng chuột thí nghiệm được kiểm tra khả năng miễn dịch với HIV, kết quả các chuột thí nghiệm có khả năng miễn dịch cao với HIV. Thí nghiệm thử nghiệm vaccine DNA phòng chống HIV/AIDS trên chuột thành công, đã mở ra một triển vọng mới trong điều trị HIV/AIDS cho người bằng vaccine DNA.

## VI. LIỆU PHÁP GEN CHỮA MỘT SỐ BỆNH KHÁC

### 1. Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ (Duchene Muscular Dystrophy)

#### 1. 1. Cơ sở di truyền của bệnh teo cơ DMD

Bệnh teo cơ hay còn gọi là loạn dưỡng cơ DMD (Duchene Muscular Dystrophy) là một bệnh do rối loạn di truyền đơn gen, gây triệu chứng mất khả

năng co dãn của cơ dẫn đến bị teo cơ, mất khả năng vận động của các chi. Một số ít trường hợp còn gây hoặc mất khả năng co dãn một số cơ của hệ tiêu hoá, hệ tim mạch gây nguy hiểm đến tính mạng con người. Bệnh DMD do đột biến lặn của gen dystrophin gây nên. Gen dystrophin là một gen nằm ở locus thứ 21 trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể giới tính X ở người ký hiệu Xp21 (Davies và cộng sự, 1983), do đó bệnh DMD thường gặp ở đàn ông với tỉ lệ khoảng 1 trên 3500 người, còn ở phụ nữ ít gặp hơn (khi đồng hợp tử lặn gen đột biến này).

Gen dystrophin có kích thước tương đối lớn, khoảng 2400 kb, có 79 exon (79 đoạn mang mã di truyền) phần gen không mang mã gọi là intron chiếm 99,4% kích thước gen. Gen dystrophin ở người phiên mã tổng hợp mRNA có kích thước 14 kb, mã hoá protein dystrophin bình thường 427 kDa. Do bị đột biến ở các mức độ khác nhau, biểu hiện các mức độ bệnh DMD khác nhau làm xuất hiện các loại protein dystrophin khác nhau trong mỗi cơ thể bệnh nhân DMD. Có bốn mức độ bệnh DMD dystrophin khác nhau: bệnh dystrophin thường gặp khi tạo các protein dystrophin đột biến dạng R-Dystrophin (260 kDa) và dạng B-Dystrophin (1400 kDa); bệnh Apo-dystrophin -1 có S-Dystrophin (71 kDa); bệnh Apo - dystrophin-2 có protein dystrophin đột biến dạng G-Dystrophin (114 kDa) và bệnh Apo-dystrophin-3 có protein dystrophin đột biến dạng G-Dystrophin (40 kDa). Bệnh DMD không chỉ gây liệt hệ cơ vận động, mà có thể gây liệt các cơ trơn trong hệ tiêu hóa hoặc hệ tuần hoàn, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người hoặc tử vong (Lidov và cộng sự, 1995).

### *1. 2. Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ DMD*

Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ DMD có thể thực hiện theo nhiều phương pháp khác nhau, có những kết quả khác nhau tùy theo mức độ của bệnh. Một số chiến lược liệu pháp gen chủ yếu trong điều trị bệnh teo cơ DMD là:

- Chiến lược chuyển vector liệu pháp mang cDNA dystrophin bình thường vào cơ thể bệnh nhân, nhằm thay thế cho các gen dystrophin bị đột biến (Dickson và cộng sự 1991)

- Chiến lược sử dụng các phức hợp gen dystrophin – glycoprotein (DAGC – dystrophin associated glycoprotein complex) (Beckman và Bushby, 1996).

- Chiến lược vi tiêm trực tiếp các cDNA mã hoá dystrophin được bao gói bởi các liposom, cho kết quả có trên 10% các tế bào tạo thẻ tái tổ hợp mang gen cDNA dystrophin bình thường (Alton và cộng sự, 1993).

- Chiến lược sử dụng retrovirus mang gen dystrophin bình thường được sử dụng trong các thực nghiệm *in vitro* và *in vivo* (Miller và cộng sự 1990; Dunckley và cộng sự, 1993; Deconinck và cộng sự, 1996).

- Chiến lược sử dụng oligo-antisense nhằm ức chế hoạt động và biểu hiện của các gen dystrophin đột biến (Blake và cộng sự, 1995; Parrish và cộng sự, 1996).

Hiện nay các thực nghiệm chữa bệnh teo cơ DMD *in vitro* và *in vivo* ở chuột và một số trên người, tuy nhiên các liệu pháp gen chữa bệnh DMD cho con người chưa thực sự có hiệu quả cao.

## 2. Liệu pháp gen chữa bệnh máu khó đông (Hemophilia)

### 2. 1. Cơ sở di truyền của bệnh máu khó đông (Hemophilia)

Bệnh máu khó đông là bệnh gây nên do rối loạn di truyền đơn gen. Có hai loại bệnh máu khó đông là hemophilia A và hemophilia B. Bệnh hemophilia A do bị đột biến, gây mất chức năng gen mã hoá một loại protein đặc hiệu gọi là yếu tố VIII (factor VIII ký hiệu là F.VIII), bệnh chủ yếu ở đàn ông tần số trung bình 1 trên 10.000 người. Bệnh hemophilia B gây nên do rối loạn chức năng gen mã hoá yếu tố IX, tần số mắc bệnh khoảng 1 trên 50.000 người. Khi các loại protein F.VIII hoặc protein F.IX bị mất chức năng, làm giảm sự hình thành các yếu tố gây đông máu làm cho máu đông chậm hoặc không đông.

Gen mã hoá protein F.VIII nằm trên nhiễm sắc thể X của người, kích thước khoảng 186.000 bp, mã hoá protein F.VIII có trọng lượng phân tử khoảng 300 kDa. Trên nhiễm sắc thể X của người còn mang gen mã hoá protein F. IX, kích thước 33.000 bp, mã hoá protein F. IX có trọng lượng phân tử khoảng 55 KDa. Do các gen F. VIII và gen F. IX nằm trên nhiễm sắc thể X, nên bệnh máu khó đông

thường gặp ở đàn ông, vì trên nhiễm sắc thể Y không mang gen tương ứng. Do các đột biến lặn, nên trường hợp phụ nữ bị bệnh máu khó đông tương đối hiếm, bệnh chỉ biểu hiện khi đồng hợp từ cả 2 gen đột biến.

### **2. 2. Liệu pháp gen chữa bệnh máu khó đông (*Hemophilia*)**

Ở người bình thường hàm lượng F.VIII trong máu khoảng 100-200ng/ml, khi hàm lượng dưới 10ng/ml làm máu không đông. Từ năm 1987 những thực nghiệm đầu tiên chữa bệnh máu khó đông ở chuột đã được thử nghiệm (Connelly và cộng sự, 1995; Fallaux và cộng sự, 1996; Palmer và cộng sự, 1989, 1991). Các thử nghiệm dùng adenoviral vectơ mang gen F.VIII cDNA (vectơ Av1ALH81, hoặc Av1ALAPH81) chuyển vào chuột nhất bị máu khó đông, hàm lượng F. III ở chuột được điều trị đạt 300ng/ml, có trường hợp tăng cao đến 2000ng/ml (Yang và cộng sự, 1994; Connelly và cộng sự, 1995).

Sử dụng retroviral vectơ để chuyển gen F.IX, năm 1993 Lu và cộng sự đã điều trị có hiệu quả cho 2 trường hợp bệnh hemophilia B. thí nghiệm chuyển Adenoviral vectơ mang gen F.IX cDNA của người cũng được vào chuột, làm tăng hàm lượng protein F.IX người trong máu chuột đạt 400ng/ml ( Smith và cộng sự, 1993). Các thực nghiệm sử dụng AAV vectơ trong điều trị bệnh máu khó đông ở người cũng được nhiều nghiên cứu thử nghiệm trên chuột, chó....

### **3. Bệnh rối loạn chuyển hóa cholesterol gia đình di truyền (Familial Hypercholesterolemia)**

Bệnh Familial Hypercholesterolemia do bị mất gen mã hoá các thụ thể kiểm soát cholesterol trong các tế bào gan, mất khả năng lọc cholesterol làm cho hàm lượng cholesterol trong máu tăng cao, gây các bệnh tim nặng hoặc đột quỵ. Bệnh Familial Hypercholesterolemia có thể di truyền qua các thế hệ, ở các thế hệ sau biểu hiện của bệnh thường nặng hơn.

Năm 1993 thử nghiệm điều trị liệu pháp gen đầu tiên cho bệnh nhân bị bệnh Familial Hypercholesterolemia bằng kỹ thuật *ex vivo*, đã mang lại cuộc sống

bình thường cho người bệnh. Liệu pháp gen này đã sử dụng retroviral vector mang gen lành chuyển vào  $3,2 \times 10^9$  tế bào gan người bệnh (khoảng 15% khối lượng gan của bệnh nhân), nuôi cấy *ex vivo* chọn lọc các tế bào tái tổ hợp gen lành, rồi đưa trở lại người bệnh. Sau thời gian 2-3 tháng người bệnh có tiến triển tốt, gan phát triển bình thường, hàm lượng cholesterol trong máu giảm 25%, người bệnh có sức khoẻ bình thường. Cho đến nay, đã có thêm nhiều người bệnh được điều trị bệnh Familial Hypercholesterolemia bằng liệu pháp gen.

Một số bệnh rối loạn di truyền đơn gen khác như bệnh Gauche, bệnh Parkinson... đã được điều trị thử nghiệm bằng liệu pháp gen. Bệnh Gauche do bị hỏng gen mã hoá enzym Glucocerebrosidase, gây hiện tượng run rẩy không chủ động làm cho hoạt động của con người mất chính xác. Bệnh Parkinson do bị hỏng gen Dopa Decarboxylasse (DDC) dẫn đến rối loạn chuyển hoá Dopamin và giảm quá trình tổng hợp Dopamin trong não gây giảm trí nhớ, hoặc mất trí nhớ... Nhiều thử nghiệm sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh Parkinson, bệnh Gauche cho kết quả tốt, giúp bệnh nhân giảm mức độ biểu hiện bệnh, sức khoẻ được phục hồi...

Tóm lại, với các cơ sở khoa học và thành tựu bước đầu của liệu pháp gen. Chúng ta có thể tin tưởng trong một tương lai gần, liệu pháp gen sẽ trở thành một phương pháp chữa bệnh và phòng chống bệnh tật cho con người hiệu quả nhất.

## Chương 4

### VẤN ĐỀ AN TOÀN CỦA LIỆU PHÁP GEN

#### I. VÀI NÉT VỀ AN TOÀN SINH HỌC

An toàn sinh học là vấn đề được quan tâm không chỉ ở các nước phát triển, mà ở hầu hết các quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới. Có nhiều quy ước, quy định quốc tế về an toàn sinh học, trong đó Công ước về Đa dạng Sinh học (Convention of Biodiversity) và Nghị định thư Catagena (Catagena Protocol). Vấn đề an toàn sinh học hiện nay được chú ý nhiều nhất là tác động của sinh vật biến đổi gen (GMO- Genetically Modified Organism) đến sức khoẻ con người, ngoài ra sự tác động môi trường - con người- môi trường là mối quan tâm thứ 2 của an toàn sinh học.

Trong những năm cuối của thế kỷ 20 đến nay, hàng loạt cây trồng biến đổi gen, động vật chuyển gen ra đời đã đem lại những lợi ích đáng kể cho con người như năng suất cao, chất lượng sản phẩm tốt, giảm thiểu sử dụng thuốc trừ sâu và phân bón hoá học, hạ giá thành sản phẩm....Tuy nhiên, sinh vật biến đổi gen nói chung và thực phẩm biến đổi gen nói riêng, cũng đưa đến những ngại ngài về độ an toàn với sức khoẻ con người. Các hội chứng về dị ứng, đau cơ, tăng ở Mỹ và một số nước châu Âu trong những năm 90 được cho là do nguyên nhân sử dụng khoai tây biến đổi gen, sử dụng ngô và đậu tương biến đổi gen...Mặt khác, người ta còn lo ngại các cây trồng chuyển gen có thể truyền gen sang cây dại, thông qua thụ phấn chéo hoặc lai xa gây trở ngại cho sản xuất sau này. Chẳng hạn, lúa và ngô được chuyển gen chống cỏ dại, có thể gây nguy cơ tạo “siêu cỏ dại” hoặc một số

gen virus chuyển vào động vật thực vật có thể tạo nên những biến chủng virus mới gây bệnh nguy hiểm cho con người ...

Bằng thực tế các nghiên cứu và kiểm nghiệm khoa học của nhiều tổ chức thế giới WHO, FAO, UNEP, ... và các cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (U.S Food and Drug Administration), trung tâm kiểm tra dịch bệnh Mỹ CDC (Center for Disease Control).... Người ta đã đi đến các kết luận: GMO không gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người, “không có bằng chứng nào cho thấy thực phẩm chuyển gen đang hiện có trên thị trường, gây ra bất cứ lo ngại nào về sức khỏe con người hay có bất kỳ khía cạnh nào kém an toàn hơn so với cây trồng tạo được nhờ lai giống truyền thống” (Jane E. Henney, Ủy viên Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ) hoặc như đánh giá của FAO/WHO năm 2000: “Ủy ban tư vấn tham mưu với những cách đánh giá độ an toàn của các thực phẩm chuyển gen đã được phê chuẩn cho thương mại hoá”...

Với những kết quả rõ rệt của GMO, xu hướng toàn cầu về phát triển thực phẩm chuyển gen, chấp nhận sử dụng các thực phẩm chuyển gen ngày càng nhiều. Liên minh châu Âu (EU) đã bãi bỏ lệnh cấm nhập và bán các sản phẩm chuyển gen, thực thi các quy định về dán nhãn các sản phẩm, thực phẩm có chứa trên 9% nguyên liệu từ GMO. Diện tích phát triển cây trồng cây chuyển gen toàn cầu ngày càng tăng, các loại động vật chuyển gen, vi sinh vật biến đổi gen được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm, nông nghiệp và đời sống ngày càng phát triển mạnh.

Năm 2003 tổng diện tích trồng cây chuyển gen toàn cầu là 67,7 triệu ha tăng 15% so với năm 2002, tăng 40 lần so với năm 1996 (1,7 triệu ha). Số loại cây trồng biến đổi gen được trồng ngày càng nhiều: đậu tương, bông, ngô, cải dầu, cà chua, lúa, mía cù cải đường, bắp cải và nhiều loại hoa phong lan, hoa hồng, hoa cúc ...trong đó, có 4 loại cây trồng có diện tích trồng trot lớn nhất là đậu tương biến đổi gen chiếm 61%, ngô 23% bông 11%, cải dầu 5%... Ngoài cây trồng, nhiều loại động vật chuyển gen, vi sinh vật biến đổi gen được đưa vào sản xuất đã đem lại nguồn lợi to lớn cho con người.

Với một vài dẫn chứng về mặt có lợi và tác động bất lợi của sinh vật chuyển gen đối với sức khỏe con người, chúng ta có thể yên tâm về lợi ích của

GMO, những lo ngại về mức độ an toàn của GMO đối với con người cũng dần dần được loại bỏ.

## II. VẤN ĐỀ AN TOÀN CỦA LIỆU PHÁP GEN

### 1. Hiện trạng và những rủi ro của điều trị liệu pháp gen

Thực chất của liệu pháp gen là chuyển gen vào cơ thể người, nhằm mục đích chữa bệnh cho con người. Liệu pháp gen chỉ là một trường hợp rất đặc biệt của chuyển gen, do vậy những lo ngại về mức độ an toàn của liệu pháp gen đối với người bệnh là tất nhiên. Trong liệu pháp gen ở người, phải tuân thủ những quy định quốc tế, và các quy định nghiêm ngặt cụ thể của từng quốc gia về an toàn sinh học nói chung, phải tuân thủ các nguyên tắc chặt chẽ của y-sinh học phân tử để giảm thiểu những rủi ro, hạn chế các tác hại đến sức khỏe con người.

Liệu pháp gen có hiệu quả cao hay thấp phụ thuộc rất nhiều vào sự tồn tại và ổn định, khả năng hòa nhập của các gen liệu pháp (DNA) vào bộ gen của tế bào người, cũng như sự phân chia bình thường của các tế bào sau khi thực hiện liệu pháp gen. Hiệu quả liệu pháp gen, còn phụ thuộc nhiều vào kích thước, tính chất của gen liệu pháp và loại vectơ sử dụng, cũng như phụ thuộc vào sự lựa chọn đúng, chuẩn xác và phù hợp các kỹ thuật liệu pháp.

Những rủi ro thường gặp trong liệu pháp gen thường do gen liệu pháp không hoạt động và biểu hiện, gen liệu pháp gắn sai vị trí gây các đột biến gen, hoặc gen liệu pháp biểu hiện không bình thường tạo các protein bị sai lệch gây đáp ứng miễn dịch bất lợi của tế bào. Nguy cơ tiềm ẩn lớn nhất là trong liệu pháp gen sử dụng nhiều vectơ có bản chất virus, do vậy ở những mức độ nhất định các vectơ virus có thể biến đổi, trở thành tác nhân gây bệnh, có thể kích hoạt các oncogen gây nên ung thư, hoặc tạo các đột biến gen trong bộ gen người bệnh...

Một hiện thực khác là liệu pháp gen ra đời rất muộn so với nhiều ngành khoa học khác. Với hơn 10 năm tuổi (tính từ thành công đầu tiên năm 1990, chữa bệnh thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trâm trọng ADA- SCID), liệu pháp gen là một ngành khoa học còn quá mới mẻ, trình độ hiểu biết con người về cơ chế gây bệnh

của một số gen đột biến chưa đầy đủ, trình độ kỹ thuật mới chỉ có được ở một số nước tiên tiến. Do đó, hiệu quả cao, thực sự của liệu pháp gen trong điều trị và chữa bệnh cho con người còn ở trong tương lai những năm tới.

## **2. Ví dụ về trường hợp rõ rệt sau điều trị liệu pháp gen và vấn đề an toàn của liệu pháp gen**

### ***2.1. Cái chết của Jesse Gelsinger sau điều trị liệu pháp gen***

Jesse Gelsinger sinh năm 1981, khi sinh ra đã mắc bệnh rối loạn Ornithin (OTC - ornithine transcarbamylase deficiency), gây nên do đột biến một gen trên nhiễm sắc thể X. Ngày 13 tháng 9 năm 1999, khi vừa 18 tuổi Jesse Gelsinger được điều trị bằng liệu pháp gen tại Viện Đại học Tổng hợp ở Pennsylvania, Mỹ. Jesse Gelsinger được chuyển vào cơ thể một lượng lớn vectơ adenovirus mang gen liệu pháp OTC. Ngày 14/9/1999 bị hôn mê, ngày 17 tháng 9 1999 Jesse Gelsinger bị chết do suy hô hấp nặng và hôn mê sâu.

Sau cái chết của Jesse Gelsinger có rất nhiều lo ngại về sự an toàn của liệu pháp gen. Một số ý kiến cho rằng liệu pháp gen đã gây nên cái chết của Jesse Gelsinger? Liệu pháp gen không an toàn?

### ***2. 2. Liệu pháp gen có an toàn không?***

Bệnh OTC gây nên do đột biến gen OTC nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X của người, làm rối loạn chuyển hóa amoniac, gây hậu quả rất nghiêm trọng có thể tử vong ngay sau khi sinh. Bệnh OTC thường gặp ở con trai với tỉ lệ 1 trên 10.000 người, bệnh có tỉ lệ tử vong cao, khoảng 50% trẻ sơ sinh tử vong ở tháng tuổi đầu tiên, số còn lại thường tử vong trước 5 tuổi, tỉ lệ sống sót rất ít với điều kiện sử dụng thuốc thường xuyên.

Trong thời gian sống, Jesse Gelsinger phải thường xuyên sử dụng thuốc và sự hỗ trợ của y tế, sử dụng chế độ ăn kiêng ít protein và uống các loại nước không có protein. Một số lần Jesse Gelsinger bị hôn mê do nồng độ amoniac vượt quá mức, dù đã sử dụng rất nhiều thuốc giúp cơ thể có thể chống lại hàm lượng amoniac

tăng quá cao. Sức khoẻ ngày càng giảm sút, 13/9/1999 Jesse Gelsinger tình nguyện thử nghiệm điều trị liệu pháp gen.

Trên cơ sở tính chất nguy hiểm của bệnh OTC, trường hợp Jesse Gelsinger sống được đến 18 tuổi là một tiến bộ rất lớn của y học, liệu pháp gen điều trị cho Jesse Gelsinger chí là cơ hội cuối cùng rất mong manh với mạng sống của anh. Do vậy, cái chết của Jesse Gelsinger được kết luận không phải do nguyên nhân liệu pháp gen không an toàn.

Liệu pháp gen đã chữa khỏi bệnh cho một số bệnh nhân SCID, máu khó đông, ung thư.... Tuy nhiên, một số bệnh nhân sau điều trị vẫn có những đáp ứng miễn dịch không mong muốn, hoặc có sự thay đổi nhỏ chức năng ở một số nội quan gan, thận,... Do vậy, vấn đề an toàn của liệu pháp gen cần được nghiên cứu tiếp tục để liệu pháp gen là phương pháp chữa bệnh hữu hiệu cho con người.

### **III. MỘT SỐ ĐIỂM HẠN CHẾ CỦA LIỆU PHÁP GEN**

#### **1. Tại sao hiện nay liệu pháp gen chưa được ứng dụng rộng rãi trong chữa bệnh ?**

Trên cơ sở những luận cứ khoa học về phương pháp điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen ở các phần trước, và các thành tựu chữa bệnh cho con người của liệu pháp gen, có thể khẳng định liệu pháp gen là phương pháp chữa bệnh hiện đại và khoa học. Liệu pháp gen có thể giúp cho con người chữa được một số bệnh hiểm nghèo, mà khả năng của y học hiện đại còn nhiều hạn chế như các bệnh SCID, SCA, HIV/AIDS, bệnh máu khó đông....

Hiện nay, liệu pháp gen đã điều trị khỏi bệnh cho nhiều bệnh nhân ở các nước tiên tiến, tuy nhiên liệu pháp gen còn chưa được sử dụng phổ biến trong điều trị cho bệnh nhân, do nhiều nguyên nhân khác nhau:

- Liệu pháp gen đòi hỏi các phương tiện kỹ thuật hiện đại, chi phí tốn kém nên ở những nước kém phát triển, nước nghèo hiện nay chưa đủ tiềm lực cả về phương tiện kỹ thuật, đội ngũ chuyên viên và kinh phí để thực hiện chữa bệnh bằng liệu pháp gen.

- Liệu pháp gen là ngành khoa học- y học hiện đại còn quá mới mẻ, trình độ hiểu biết của con người còn chưa đầy đủ về đặc điểm của gen bệnh, vai trò và hoạt động của gen liệu pháp. Do đó, đến nay phần lớn liệu pháp gen chữa bệnh vẫn mang tính chất thử nghiệm.

- Do tính chất chữa bệnh đến bản chất cuối cùng của bệnh là các gen bị hỏng, bị lỗi. Tính đa dạng của các gen ở mỗi người vô cùng lớn, cùng một loại bệnh do đột biến ở cùng một gen, nhưng ở các người bệnh khác nhau có mức độ đột biến, mức độ biểu hiện bệnh khác nhau. Vì vậy, điều trị liệu pháp gen không thể áp dụng đồng loạt cho mọi bệnh nhân.

- Trong điều trị liệu pháp gen, do sử dụng các vectơ chuyển gen bản chất virus hoặc không có bản chất virus để đưa gen liệu pháp vào cơ thể người bệnh, trong một số trường hợp tuy cứu được cuộc sống con người nhưng vẫn gây một số hiệu ứng phụ không lợi cho cơ thể người.

Do một số mặt còn hạn chế của liệu pháp gen, nên hiện nay điều trị và chữa bệnh bằng liệu pháp gen chưa được phổ biến. Con người cần tiếp tục nghiên cứu nhiều hơn nữa, để trong tương lai gần liệu pháp gen có hiệu quả chữa bệnh tuyệt đối, góp phần bảo vệ sức khỏe con người.

## 2. Triển vọng của liệu pháp gen ở Việt Nam

Ở nước ta hiện nay đã và đang có một số nghiên cứu điều trị ung thư bằng liệu pháp miễn dịch như nghiên cứu và sản xuất interferon, IL<sub>2</sub>... trong điều trị các bệnh ung thư. Chúng ta được sự quan tâm của Nhà nước với các chương trình nghiên cứu trọng điểm, đã sản xuất thành công vaccin viêm gan tái tổ hợp, nhiều viện nghiên cứu và trường đại học có các chuyên gia giỏi về sinh học phân tử và kỹ thuật gen...Mặt khác, hướng liên doanh liên kết với các bệnh viện hiện đại nước ngoài, cũng như số bệnh viện 100 % vốn nước ngoài ngày càng nhiều ở Việt Nam. Chúng ta có thể tin tưởng rằng, trong tương lai không xa liệu pháp gen trong chữa bệnh cho con người sẽ được phát triển từng bước ở nước ta.

## TÀI LIỆU THAM KHÁO CHÍNH

1. *Đái Duy Ban và cộng sự* (2002). Sinh học phân tử của ung thư vòm họng. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. *Đỗ Ngọc Liên* (1999). Miễn dịch học cơ sở. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội
3. *Lê Định Lương, Quyền Định Thi* (2003). Kỹ thuật di truyền và ứng dụng. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội
4. *Khuất Hữu Thành* (2003). Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Tạp chí AIDS và cộng đồng 7/2004.
6. *Alan Cantwell JR* (2004). Âm mưu diệt chủng bí mật bằng AIDS. NXB Thông tấn, Hà Nội (Bản dịch)
7. *J. Caroline* (2004). Suicide gene therapy: Methods and reviews. Springer.
8. Charles Brenner (2004) Onco-genomics: Molecular Approaches to Cancer. Willey. London. UK.
9. *Jochen Deker, Udo Reis chl* (2004). Molecular diagnosis of infectious diseases. Garland Science. UK
10. *Kohn D.B . et al.,* (2003). Nature Reviews Cancer 3:477-488
11. *R. F. Weaver* (2002). Molecular Biology, International Edition. USA
12. *Anthony Meager* (1999). Gene therapy technologies, applications and regulations: from laboratory to clinic. John Wiley & Sons LTD. UK.
13. *N.R. Lemoine* (2000). Understanding Gene Therapy. BIOS Scientific Publishers. UK
14. *Meager.T* (1998). The molecular biology of cytokines. John Wiley & Sons, New York, USA
15. *Salima Hacein- Bey- Abina et al.,* (2002). Sustained Correction of X- Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. The New England journal of medicine. 346: 1185-1193, Number 16
16. *Cavazzana-Calvo M et al.,* ( 2001). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Unit 429, Gene Therapy Laboratory, Hospital Necker, 75743 Paris Cedex 15, France.
17. *Flint et al.,* (2000). Principles of Virology ASM Press, 2000
18. *Rosenberg, S.A.* (2001). Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 411, 380-384

19. Hyde *et al.*, (2000). Gene Therapy 7:1156
20. Leung, Lawrence L.K. (2002). Hematology: Hemophilia A. Scientific American Medicine 1: 14-15,
21. Couric, John M. (1984) "Hemophilia has outlasted the czars" FDA Consumer: Health, 18.
22. Pacheco, Maria. (1998) Hemophilia A. McGill's Medical Guide II: 813-816.
23. Blaese, R.M. *et al.*, (1995). T lymphocyte- detected gene therapy for ADA-SCID: initial trial result after 4 years. Science, 270: 475-480.

#### Tư liệu từ một số trang Web

<http://www.wiley.co.uk/genmed>

<http://www.aidsmeds.com/news>

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?P00451>

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post.Omim/dispmim?306700>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/getfeat>

<http://www.sciam.com/0996issue/0996olifffdiagram1.html>

[http://www.rvc.ac.uk/Extranet/DNA\\_1/DNA\\_1\\_intro.htm](http://www.rvc.ac.uk/Extranet/DNA_1/DNA_1_intro.htm)

<http://library.thinkquest.org/24355/data/light/details/media/recombinantanim.html>

<http://www.organoninc.com/products/consumer/>

<http://www.sciam.com/0996issue/0996olifffdiagram1.html>

[http://www.genome.ou.edu/ protocol book](http://www.genome.ou.edu/protocolbook)

<http://www.kumc.edu/biochemistry/bioc800>

<http://web4.infotrac.galegroup.com/itw/infomark/>

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

TS. KHUẤT HỮU THANH

**LIỆU PHÁP GEN  
NGUYÊN LÝ VÀ ỨNG DỤNG**

*Chịu trách nhiệm xuất bản :*

PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI

*Bìa tập và sửa bài :*

ThS. NGUYỄN HUY TIẾN

NGỌC LINH

*Trình bày bìa :*

HƯƠNG LAN

**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT  
70, TRẦN HUNG ĐẠO – HÀ NỘI**

---

In 1000 cuốn, khổ 16x24 cm tại Nhà in KH&CN.

Giấy phép xuất bản số: 06-210 - Cục Xuất bản cấp ngày 05/1/2004

In xong và nộp lưu chiểu tháng 1 năm 2005.

**204242**  
Túi nệm bùa phật green



1 007042 801810  
17.000 VN

Giá: 17.000đ