

## BIOTEHNOLOOGIA JA MEDITSIIIN

### VAKTSIINID

Tänapäeva maailmas põeb ligikaudu kaks miljardit inimest haigusi, mida teoreetiliselt oleks võimalik ära hoida vaktsineerimise abil. Vaktsiinid koosnevad kas tapetud (inaktiveeritud) või elusatest mittevirentsetest (attenueeritud) haigusetekiitajatest. Traditsiooniliselt toimub vaktsiinide tootmine nii, et haigusetekiitajat kasvatatakse kultuuris, puhastatakse ja inaktiveeritakse või attenueeritakse selliselt, et säiliks immuunvastuse esilekutsumisvõime. Nii on saadud mitmete haiguste vastaseid vaktsiine: difteeria, läkakõha, teetanus, rõuged ja polümeliit. Samas on traditsioonilisel tootmisel rida probleeme

1. Kõiki haigusetekiitajaid ei saa kultuuris kasvatada ega seega nende vastu tavameetodil vaktsiine toota.
2. Looma- või inimeste viiruste tootmine vajab imetaja rakukultuure, mis on kallid.
3. Nii viiruste saagis kui ka kasvukiirus rakukultuuris on madal, muutes seeläbi vaktsiini tootmise kalliks.
4. Laboritöötajate ohutus patogeenidega töötamisel.
5. Vaktsiinis sisalduva patogeeni ebapiisav inaktiivatsioon või attenuatsioon tootmisprotsessis, mistõttu vaktsiin võib muutuda ohtlikuks.
6. Attenueeritud tüvede aktiivsus võib taastuda, seepärast on vajalik pidev vaktsiini testimine.
7. Kõiki haigusi (näit. AIDS) ei saa traditsiooniliste vaktsiinide abil ära hoida.
8. Paljude vaktsiinide "eluiga" on piiratud ja sageli vajavad nad spetsiaalseid hoiutingimusi (probleemid arengumaades).

### Rekombinantsete DNA-de tehnoloogia ja uued vaktsiinid

1. Patogeense agensi virulentsusgeeni(d) saab eemaldada, säilitades immuogeensed omadused. Taoliselt modifitseeritud patogeene on võimalik kasutada elus vaktsiinidena, ilma et tekiks oht virulentsuse taastumiseks.
2. Elusad mittepatogeensed kandur (carrier)-süsteemid. Võivad kanda kindlaid antigeenseid determinante. Carrier-süsteemid indutseerivad tugeva immunoloogilise vastuse patogeeni vastu.
3. Patogeenide, keda on võimatu kasvatada kultuuris, antigeensete determinantide geenide eraldamine, kloonimine ja ekspresseerimine alternatiivsetes peremees-süsteemides nagu *E. coli* või

imetaja rakuliinid. Kloonitud geenide valke saab kasutada "subühiku vaktsiinidena".

4. Mõned infitseerivad agensid ei hävita peremeesrakku otse vaid põhjustavad haiguse, mille puhul peremehe immuunsüsteem atakeerib oma (nakatatud) rakke. Nende haiguste puhul on võib-olla võimalik luua suunatud rakuspetsiifilised "killer" süsteemid. Kuigi tegemist pole "päris" vaktsiiniga atakeerib antud tüüpi süsteem ainult infitseeritud rakke eemaldades sellega immuunvastuse allika. Konstrueeritakse liitvalke, milles üks osa kinnitub infitseeritud rakule ja teine osa tapab raku

### Subühiku vaktsiinid

#### Subühiku vaktsiinid kasutavad patogeense organismi või viiruse komponente.

**Eelised:** Immunogeenina kasutatava valgu eraldamine ja puhastamine kindlustab keemiliselt täpselt määratletud, lisavalkude ja nukleiinhapete vaba preparaadi, mistõttu oht ebasoovitavate kõrvaltoimete tekkeks on väike.

**Puudused:** Spetsiifilise valgu puhastamine on kallis ja teatud olukorras võib eraldatud valk omada *in situ* olukorrast erinevat konformatsiooni, mis põhjustab immunogeensuse muutuse.

#### Subühiku vaktsiin Herpes simplex'i viiruse (HSV-1) vastu.

Esiteks identifitseeriti patogeense agensi antikehi esile kutsuv(ad) komponent(did), mis reageerivad infektsioosse agensi intaktse vormi vastu. Hiirtega tehtud katsete tulemusel leiti, et HSV-1 puhul on selliseks agensiks envelope glükoproteiin D (gD). Geen eraldati ja kloonitati CHO (chinese hamster ovary) rakkudesse. gD täisjärjestus kodeerib valku, mis on normaalselt seotud imetaja peremees-raku membraaniga. Kuid membraaniseoselise valgu puhastamine on märgatavalt raskem kui lahustuva valgu puhul. Seega modifitseeriti gD geeni eemaldades sealt C-terminaalne transmembraanne sidumisdomään. Viidi CHO rakkudesse- produkt glükosüleeriti ja sekreteeriti söötmesse

#### Suu- ja sõrataudi viiruse (FMDV) subühiku vaktsiin

Väga virulentne viirus. Siiani rakendati vaktsiinina formaliiniga tapetud viirust. 1 miljard doosi aastas üle kogu maailma.

Kloneeriti kapsiidi viirus valk 1 (VP-1). Kuna on tegemist üheaheelalise RNA viirusega, siis tehti sellest kõigepealt cDNA (ligikaudu 8 kb pikk). Sisestati *E. coli* ekspressiooni-vektorisse. Saadi liitvalk, mis koosnes 396 AH-st ja sisaldas ka carrier valgu (bakteriofaag MS2 replikaasi valk) osa ja kogu FMDV VP1 valku, mis omas immuunogeenseid omadusi.

### Peptiidvaktsiinid

Ka valgu teatud väike osa (domään) võib toimida efektiivse subühiku vaktsiinina ja indutseerida antikehade tootmise. Olulise efekti peaksid andma vaid need valgu domäänid, mis on kättesaadavad antikeha seostumisel asudes viiruse pinnal ja eba-olulised viiruse sees asuvad valgu domäänid. Selliselt on võimalik kasutada lühikesi peptiide, mis mimitseerivad epitoope (antigeenseid determinante) on immuunogeensed.

On proovitud FMDV VP-1-e erinevaid peptiide, mis lokaliseeruvad VP-1 C-terminuse lähedal (141-160; 151-160 ja 200-213) ja (9-24; 17-32; ja 25-41) N-terminuse lähedal. Kõik seoti eraldi inertsele carrier valgule (kuna väikesed peptiidid degradeeritaks muidu kiiresti ära). 141-160 AH peptiid kutsus esile küllaldase koguse antikehade tekke hilisema FMDV nakatumise vastu.

Kuigi on saadud positiivseid tulemusi peab peptiidse materjali kogus immunoloogilise vastuse esilekutsumiseks olema **ca 1000 korda suurem** kui inaktiveeritud FMDV kasutamisel. Sellest üle saamiseks liideti **FMDV VP-1 142-160 peptiidi kodeeriv DNA väga immuunogeense carrier molekuli geeniga (hepatiit B core protein; HBcAg)**. Selle liitgeeni ekspresseerimisel *E. coli*'s või loomarakkude koekultuuris saadud valgumolekulid assambleerusid ise stabiilseteks "**27-nm partikliteks**", kus FMDV VP-1 peptiid lokaliseerus partikli välispinnal. Hinnates immuunogeensust merisigadel leiti, et VP-1 142-160 peptiidi liitpartiklid HBcAg-ga omasid umbes 1/10 inaktiveeritud FMDV aktiivsusest ja 500 korda aktiivsemad kui 142-160 AH sünteetiline peptiid vabal kujul. Mõningad puudused:

1. Peptiid peab omama sama konformatsiooni, mis on epitoobil intaktses viiruspartiklis.
2. Üks epitoope pole alati küllaldaselt immuunogeenne.

### Elusad rekombinantset vaktsiinid

1. Mittepatoogeensed organismid, millesse on sisestatud ja mis ekspresseerivad patogeense sihtmärki organismi mingit antigeenset determinanti.

2. Patogeensete organismide muudetud tüved, mille virulentsusgeen(id) on modifitseeritud või deleteeritud. Antigeensed determinandid esitatakse immuunsüsteemile sellises konformatsioonis, mis on väga sarnane patogeense organismi antigeenile

### Attenueeritud vaktsiinid

#### Koolera.

Elus vaktsiinid on tavaliselt palju efektiivsemad kui inaktiveeritud või subühiku vaktsiinid. Põhiline tingimus: elus vaktsiin ei tohi sisaldada inokuleeritavas materjalis virulentseid vorme.

Bakter *Vibrio cholerae* moodustab peensooles kolooniaid ja sekreteerib suures koguses **heksameerset enterotoksiini, mis koosneb ühest A subühikust (omab ADP ribosülatsiooni aktiivsust ja stimuleerib adenülaadi tsüklaasi) ja viiest identset B subühikust, mis seostuvad spetsiifiliselt soole retseptoriga**. A subühikul on kaks domääni: A<sub>1</sub> peptiid, mis sisaldab toksilist aktiivsust ja A<sub>2</sub> peptiid mis seob A subühikut B subühikuga. Kuna eelnevate uurimistega oli näidatud, et subühiku vaktsiin, mis sisaldas inaktiveeritud heksameerset koolera enterotoksiini polnud aktiivne, tehti *V. cholerae* tüvi, milles deleteeriti osa A<sub>1</sub> peptiidi kodeerivast järjestusest ning saadi A<sub>1</sub> peptiidi deletsiooniga stabiilne *V. cholerae* tüvi. Tüvi ei tooda enterotoksiini, kuid on säilitanud kõik teised patogeense *V. cholerae* biokeemilised omadused.

### Vektor vaktsiinid

#### Viiruste vastased

Vaccinia viirus elusvaktsiinina. Healoomuline poxviirus. Kaheaheelaline DNA genoom ca 187 kb kodeerib ligikaudu 200 erinevat valku. Viirus replitseerub infitseeritud rakkude tsütoplasmas, kuna vaccinia viiruse DNA sisaldab DNA polümeraasi, RNAPolümeraasi geene ja samuti ensüüme, et cap'ida, metüleerida ja lisada mRNA-le poliadenülatiooni signaal. Seega kui viia võõrgeen vaccinia viiruse genoomi vaccinia viiruse promotori kontrolli alla, siis ekspresseeritakse seda peremehe regulatoorsetest ja ensümaatilistest funktsioonidest sõltumatult. Viirusel on lai peremees spekter, ta on molekulaarsel tasemel hästi iseloomustatud ja seepärast sobiv kandidaat vektorvaktsiiniks.

Vektorvaktsiini puhul on tähtis kloneeritud antigeene kodeerivate geenide "kohale viimine" ja ekspressioon, mille tagajärjel tekib immuunvastus. Selle viiruse genoom on väga suur ja seal pole unikaalseid restriktiooni saite. Seega ei saa sinna otseselt võõr DNA-d

sisestada ja need viiakse sinna *in vivo* homoloogilisel rekombinatsioonil. (**JOONIS**)

**Vaccinia viirusesse on sisestatud arvukalt antigene:**

Hepatiit B pinnaantigeen;

Gripi NP ja HA valgud;

Marutõve viiruse G valk

Herpes simplex'i glükoproteiinid jne.

Rekombinantsete viirustega on ka vaktsineeritud looduses elavaid loomi näiteks marutõve viiruse glükoproteiini ekspresseeriva rekombinantsete vaktsiinia viiruse abil. Rakendati Kesk-Euroopas rebastel söötes neile kanapäid, millele oli lisatud viirust. Šveitsis ja Belgias oli kampaania väga edukas.

Brochier et al., (1991) Large scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine *Nature* **354**, 520-522.

**Eelised:**

1. Autentne antigeeni(de) ekspressioon viiruse poolt sarnaselt loomulikule infektsioonile.
2. Viirus võib peremehes replitseeruda, seeläbi amplifitseerides antigeeni kogust, mis aktiveerib antikehade vabanemist B-rakkudest (humoraalne vastus) ja stimuleerida T-rakkude tootmist (rakuliselt vahendatud immuunvastus).
3. Antigeeni geeni inserteerimine vaccinia viiruse genoomi ühte või mitmesse saiti vähendab tema virulentsust.

**Puuduseks** on see, et vaktsineerides immuunosupresseeritud peremeest (nagu AIDS-i haige) võib viia tõsisele viirusinfektsioonile.

**Bakterite vastased vaktsiinid**

1. Kõiki bakterhaigusi ei saa ravida antibiootikumidega
2. Antibiootikumide kasutamine üle 40 aasta on viinud bakteritüvede tekkele, mis on resistentsed mitme antibiootikumi suhtes (MDR).
3. Antibiootikumide säilitamine (eriti troopikas)
4. Sageli on üsna raske teha täielikku antibiootikumi kuuri.

**Bakterite kasutamine antigeenide ülekandemehhanismina**

Näiteks Bacillus Calmette-Guerin ehk BCG. Pasteuri instituudis 1921. aastal saadud attenueeritud veise tuberkuloosi *Mycobacterium bovis* tüvi.

BCG-d on laialdaselt kasutatud kliinilises praktikas tuberkuloosi vaktsiinina ja ta on üsna ohutu (komplikatsoonide oht väike (0.19 miljoni kohta)). Immuunogeenne ja annab pikaajalise efekti (5 kuni 50 aastat) ainsa inokulatsiooniga. Võimalik kasutada ka booster'eid. Saab manustada suu kaudu, kuna teda ei kahjusta ema antikehad, võib anda kohe

sünnijärgselt. Samuti on Mükobakteri valgud tuntud kui efektiivsed immuunadjuvandid.

**Rekombinantsed rBCG.**

Mõnel juhul võib saada võõrantigeeni kuni 15% kõigist BCG valkudest. Hiirtel tehtud uurimused näitavad, et tekib tugev humoraalne (antikeha) immuunsus. Lisaks sellele tekib rakuline immuunsus, mis on eriti kasulik on BCG kasutamine teatud viirushaiguste nagu HIV või rakusiseste patogeeni *Leishmania* või *Mycobacterium leprae* korral, millest ei saa efektiivselt lahti neutraliseerivate antikehadega. On näidatud, et leishmaniooside ja pneumokokkide infektsiooni korral aitab hästi, osaliselt SIV-I ja leetrite korral ja ei aita malaaria ja lepra korral.

**Anti-idiotüüpsed vaktsiinid**

Kui tehakse antikehasid teiste antikehade vastu mis, seostuvad mingi kindla antigeeniga, siis mõni neist anti-antikehadest omab originaalantigeeni immunoloogilisi omadusi. Neid antikehi nimetatakse anti-idiotüüpsed antikehadeks.

Anti-idiotüüpsed antikehi võib kasutada siis kui:

1. Antigeense materjali saamine on raske.
2. Kas sihtmärk molekul või organism ise on ainult nõrgalt antigeensed.
3. Kui patogeenset organismi on raske või ohtlik kultuuri viia
4. Patogeeni spetsiifiline determinant on vaja märkida neutraliseerimiseks
5. Antigeen ei ole valk

**DNA vaktsiinid ehk geneetiline immuuniseerimine**

**NB!** Väga palju huvitavat infot DNA vaktsiinide kohta leiab

<http://www.DNAvaccine.com>

**DNA immuniseerimine on:**

1. "Paljaste" DNA (või RNA) järjestuste otsene viimine kudedesse *in vivo*, et kutsuda esile immuunvastust indutseerivate valkude süntees *in situ*.
2. Plasmiidse DNA (või RNA) otsene sisestamine süstimisel või biolistiliselt peremeesorganismi kudedesse, kus see on võimeline esile kutsuma antigeensete valkude ekspressiooni transfekteeritud rakus.

Seega meenutab DNA vaktsineerimine viirusinfektsiooni, kuna valgu sünteesiks kasutatakse peremeesraku biosünteesi mehhanisme.

DNA vaktsiinid koosnevad vaid *E. coli* päritoluga plasmiidsest DNA-st, mis ei ole:

1. Infitseeriv,
2. Ei replitseeru
3. Kodeerib ainult meid huvitavaid valke (st. mitte täiendavaid viiruslikke valke)

## Vektorid

Vektorplasmidi põhikomponendid on:

1. Tugev promootor süsteem näit. Tsütomegaloviiruse (CMV) varane promootor
2. Sobiv kloonimissait meid huvitava geeni sisestamiseks
3. Polüadenülatiooni järjestus (terminaator)
4. Prokariotne replikatsiooni origin plasmidi saamiseks *E. coli*'s
5. Selektioonimarkerid.

## Plasmiidne DNA kui vektor, geen ja adjuvant

Plasmiid funktsioonid:

1. Kodeeriv järjestuse antigeensele valgule
2. Geeni transportmehhanism
3. Osaleb adjuvandna DNA-vahendatud immuuniseerimisel, kuna polinukleotiidid on immuun-süsteemi mittespetsiifilisteks stimulaatoriteks.

## DNA vaktsiinid indutseerivad nii humoraalse kui rakulise immuunvastuse

Asjaolu, et DNA vaktsiinid indutseerivad CTL vastuse eristab neid paljudest teistest vaktsiinitüüpidest, mis indutseerivad kas primaarselt või ainult antikehad. Antikehad neutraliseerivad primaarselt patogeene ja hoiavad ära või limiteerivad infektsiooni, kuna CTL tunneb ära ja lüübib patogeene nakatunud rakke ja abistab infektsiooni mahasurumisel. Seega on immuunsüsteemi mõlema komponendi indutseerimine DNA vaktsiinidele kindlaks eeliseks.

## Areng ja perspektiivid

Esimest korda õnnestus DNA kasutamine vaktsiinina 1992. aastal. Peale seda on ilmunud antud vallas ridamisi töid. Kuid vaatamata kõigele sellele on mitmed küsimused vastusetta.

1. Kuidas DNA siseneb rakku peale lihasesse süstimist?
2. Millised rakud osalevad antigeenide presentatsioonil et indutseerida CTL ja saavutada kaitse?

Kui neile küsimustele oleks vastused olemas, siis saaks disainida väga erinevaid vaktsiine spetsiifiliste nakkushaiguste vastu.

## Teine oluline küsimuste ring on meetodi ohutus.

1. **Plasmidi potentsiaalne integratsioon peremeesraku genoomi**, võib viia insertioonmutatsioonide tekkele.
2. **Autoimmuunvastuse teke.** Näiteks patogeensed anti-DNA antikehad. Tulemused on näidanud, et kõrge afiinsusega antikehi ei teki. Plasmiidset DNA-d saab ka hiljem täiendavalt sisestada, et võimendada immuunvastust.
3. **Immunoloogilise tolerantsuse teke**

Antigeeni ekspressioon peremees võib viia spetsiifilise tolerantsuse kujunemisele selle antigeeni suhtes.

## DNA vaktsiinid: eelised tervishoiu jaoks

### 1. Vaktsiinide tootmine ja kasutamine

- A) DNA vaktsiinide tootmine on lihtsam kui inaktiveeritud patogeene, subühiku või rekombinantsete valgulistele vaktsiinide puhul.
- B) Tootmine on unifitseeritav. Erinevaid antigeene kodeerivaid plasmide on võimalik saada sama tehnoloogiaga.
- C) DNA on väga stabiilne ja resistentne ekstreemsetele temperatuuridele.

### 2. Vaktsiinide uuringud ja uute vaktsiinide loomine

- A) Võimalus antigeense valgust järjestusi modifitseerida või lisada heteroloogilisi epitoope lihtsate manipulatsioonidega plasmiidsetel DNA-l
- B) Võimalus inkorporeerida antigeensust suurendavaid modifikatsioone.

## GENEETILISED HAIGUSED JA NENDE DIAGNOSTIKA

### Geneetiliste haiguste skriining

Eesti kohta vaata SA TÜK Molekulaardiagnostika keskus: [www.dnatest.med.ee](http://www.dnatest.med.ee)  
Viiakse läbi vaid teatud populatsioonides, etnilistes gruppides, kus on teada haiguse suur esinemine

Näiteks: üle 35 a. nn. vanuseriskiga rasedad  
Downi sündroomi sagedus 1,2-1,7:1000 vast-sündinu kohta

20. a.	1: 2000
30. a.	1: 1000
40. a.	1: 110
45. a.	1: 20

### Prenataalne diagnostika

#### 1. Amniotsentees (AFS amniotic fluid sampling)

Prenataalses diagnostikas on kasutatud alates 1950-ndatest aastatest (Eestis 1990,1987) (spektrofotomeetriga määrati bilirubiini taset reesusimmunisatsiooni korral)

Tavaliselt **15-18 rasedusnädalal**, Ultraheli kontrolli all

Raseduse katkemise oht u. 0,5%

Amniotsenteesi soovitatakse rutiinselt kõigile üle 35a. rasedatele kromosoomianomaaliate ja Downi sündroomi diagnostikaks.

Nii tsütogeneetikaks kui DNA diagnostikaks kasutatakse amnionirakkude kultuuri (muide ca 20 % amnionivedelikust saadud rakke on pärit emalt)

#### 2. Koorioni hattude biopsia e. koorioni biopsia (CVS chorionic villus sampling)

Kasutusel alates 1980 aastatest. Eestis CVS 1990 Med. Geneetika Keskus

Raseduse **katkemise oht** suurem kui AC-I ca **2%-4%**, kasutatakse tavaliselt suurema riskiga rasedatel (üle 10% ),

Eelised:

- 1) Saadakse rohkem materjali 10-60 µg loote DNAd
- 2) Varasem protseduur, **tavaliselt 9-10 rasedusnädalal**.
- 3) Kui loode on haige ja vanemad otsustavad katkestada, mahub ajaliselt 12 nädala sisse, ohutum, vanematele moraalselt kergem.

### Preimplantatiivne Geneetiline Diagnostika (PGD)

Alternatiivne võimalus AC ja CVSile. Suhteliselt uus meetod, esimesed PGD lapsed sündisid ca 10a. tagasi. Meetodi areng on toimunud tänu *in vitro* viljastamise (IVF) arengule. PGD aitab üle saada kõige valulisemast probleemist: raseduse katkestamisest. Kunstlikult viljastatud embrüod testitakse enne implanteerimist.

3 päeva peale viljastamist kui embrüo on 6-8 raku staadiumis võetakse välja 1-2 blastomeeri. Kuna rakud on veel totipotentsed, siis teoreetiliselt ei kujuta see ohtu arenevale embrüole

Rasestumise % peale PGD ja IVF on sama, mis ainult IVF järgselt (25%)

Samuti võib analüüsida trofektodermi rakke blastotsüsti staadiumis, st.ca 5 päeva peale viljastamist. Sellel meetodil saaks embrüost analüüsida rohkem rakke st. oleks rohkem DNAd.

Esimene haigus, mida PDG diagnoositi oli tsüstiline fibroos (CF) 1992 a.

Praeguseks PGD protokollid olemas üle 20 haiguse testimiseks.

### Geeniteraapia üldpõhimõtted

#### Fenüülketonuuria

Mutatsiooni tagajärjel fenüülalaniin hüdroksülaasi (PAH) geenis, mille alusel toodetakse maksas vastavat ensüümi, on rikutud fenüülalaniini üleviimine türosiiniks. Kui on tegemist homosügootse patsiendiga, siis ei toodeta PAH ensüümi üldse või toodetakse vastavat ensüümi väga väikeses koguses, mille tagajärjel kuhjub verre suur kogus endogeenset fenüülalaniini. Fenüülalaniini kõrge tase viib kesknärvisüsteemi neuronite aksonite müeliintuppede ebanormaalsele moodustumisele, mille tagajärjel tekib lapsel tõsine vaimne alaareng. See aminohapete metabolismi häire esineb sagedusega 1:10.000 vastsündinu kohta.

Fenüülketonuuria puhul rakendatakse fenüülalaniini vaba dieeti, mille tagajärjel on lapse areng normaalne.

Teiste geneetiliste haiguste puhul, juhul kui defektse valgu funktsionaalne vorm ei kutsu esile immuunvastust, rakendatakse asendus-teraapiat, mille puhul vastavat ensüümi viiakse organismi süstimise teel. Näiteks hemofiilia, SCID-i ja Gaucher-i tõve korral. Kuigi sellistest vahenditest on küll mõningast kasu on nad siiski ajutised.

Antud defekti korrigeerimiseks DNA tasemel kasutatakse **geeniteraapiat**, mille puhul **mittefunktsionaalne geen asendatakse selle geeni töötava koopiaga**.

#### Severe Combined Immunodeficiency - SCID

1990. aastate alguses toimusid esimesed katsed SCID-i teraapias, mille põhjus on ensüüm adnosiini deaminaasi (ADA) puudumine. Selle tulemusel tõuseb tsirkulatoorses süsteemis adnosiini ja deoksüadenosiini tase, mis on mõlemad toksilised ja letaalsed B ja T lümfotsüütidele, mille tulemusel tekib immuunsus puudulikkus.

Patsiendilt eraldatud lümfotsüütidesse viidi funktsionaalse ADA geeni kloneeritud cDNA. Rakud viidi kultuuri, selekteeriti, kasvatati seal ja viidi geneetiliselt modifitseeritud lümfotsüütidele patsiendile tagasi regulaarsete intervallide tagant 2 aasta vältel. Peale nelja aasta möödumist katse algusest oli mõlemal patsiendil integreerunud vektor ja ADA geeni ekspressioon tuvastatav.

NB! **Käesoleval ajal toimub kogu inimese geeniteraapia somaatiliste rakkudega**. Eetilistel, ohutusest ja muudest põhjustest tingituna ei tehta seda praegu sugurakkude peal.

#### Rida probleeme:

1. Kuidas saada kätte sihtmärk rakud
2. Kuidas sisestada funktsionaalne geen.
3. Milline osa sihtmärk rakkudest peab saama funktsionaalse geeni, et sellest oleks kasu haiguse vastu.
4. Kas on vaja täpselt reguleerida sisseviidud geeni transkriptsiooni
5. Kas sisseviidud geeni üleekspressioon võib samuti põhjustada mingeid teisi füsioloogilisi probleeme
6. Kas funktsionaalset geeni sisaldavad rakud säilivad või tuleb nende sisseviimist korrata.

#### Ex vivo geeni teraapia

Põhilised etapid:

1. Patsiendilt eraldatakse rakud
2. Korrigeeritakse geenidefekt uue geeni sisse viimisega isoleeritud rakkudesse

3. Selekteeritakse ja kasvatatakse korrigeeritud rakud
4. Viiakse või transplanteeritakse need rakud patsiendile tagasi.

Kuna kasutatakse autoloogilisi (patsiendi enda) rakke, siis immunoloogilisi probleeme ei teki.

*Ex vivo* geeniteraapiat saab rakendada ainult juhtudel, kui vastava koe rakke saab kehast eemaldada, geneetiliselt modifitseerida ja pärast jälle tagasi viia. Tegelikult võib *ex vivo* geeniteraapiat vaadelda kui modifitseeritud rakuteraapiat.

Kui autoloogilisi rakke ei ole võimalik kasutada, siis saab *ex vivo* geeniteraapiat teha ka heteroloogiliste (teiselt inimeselt) pärit rakkudega, lahendades immuunvastuse tekke probleemi.

### Vektorid

Vektorite puhul on väga oluline, kas sisseviidud geen integreerub kromosoomi või jääb episoomina raku.

#### Integratsioon kromosoomi:

1. Geen antakse edasi igal raku jagunemisel igale tütarrakule
2. Saavutatakse pikaajaline stabiilne ekspressioon
3. Oluline näiteks tüvirakkude korral
4. Puuduseks on juhuslik insertioon. Geeni asukoht võib erinevates rakkudes varieeruda
5. Samuti võib rikkuda mõne elutähtsa geeni funktsiooni
6. Mingi rakulise onkogeeni võimalik aktivatsioon

#### Episomaalne integratsioon:

1. Probleemiks on pikaajaline ekspressioon
2. Rakkude jagunemisel toimub segregatsioon tütarakkude vahel
3. Vähi teraapia puhul vahel ongi vaja lühiajalist ekspressiooni

### In vivo geeni teraapia

Funktsionaalne geen viiakse otse patsiendi rakkudesse või vastavasse koesse. See võib olla ainus võimalus kui individuaalseid rakke ei saa kultuuri viia ja seal küllaldaselt koguses kasvatada (näiteks ajukoe rakke) või ka juhtudel kui rakke ei saa edukalt reimplanteerida.

Retroviirusvektoritega saab sisestada materjali vaid jagunevatesse rakkudesse. Paljudes kudedes aga suur osa rakkudest ei jagune. Seega tuleb kasutada teisi meetodeid. Kuna koed millesse on vaja sisestada geneetilisi materjali on tavaliselt väga erinevad, siis ka meetodid on erinevad.

### Viiruslikud süsteemid

#### Retroviirused ja retroviirusvektorid

**Vt.** looma biotehnoloogia loeng ja selle joonised

Eelkõige ohutuse küsimus. Näiteks kasutatakse pakkimisliini konstrueerimisel erinevaid promotoreid asetades *gag* ja *pol* geenid 5'LTR-i kontrolli alla ja *env* geeni tsütomegaloviiruse promotori kontrolli all. (Sellist konstrukti nim. plasmoviiruseks ja see ei tohiks rekombineeruda replikatsiooni kompetentse retroviirusega. Sinna saab sisestada vaid 3.5 kb DNA-d). Teine võimalus on vektori pakkimine teise viiruse envelope sisse. Envelope määrab seostumise ja infektsiooni spektri. Nimetatakse viiruse pseudotüüpideks.

#### Adenoviirused

Nakatavad arvukalt mittejagunevaid inimese rakke. Hingamisteed, sooletrakt. Kasutatakse ulatuslikult elusvaktsiinina respiratoorsete infektsioonide korral.

Adenoviiruse DNA läheb raku tuuma, kus ekspresseeritakse transgeen. Rekombinantne DNA ei integreeru raku kromosoomi ja ei püsi seal kaua. Seetõttu tuleb adenoviirus süsteemi puhul teraapiat korrata.

Adenoviirusvektorite puhul on probleemiks mõne adenoviiruse geeni ekspressioon (kuigi väga madalal tasemel), mille tõttu kujuneb välja immuunvastus ja vastavad rakud hävitatakse.

Sellest on püütud erinevatel viisidel üle saada vähendades vektori koostises olevate viirusvalkude hulka.

#### AAV süsteem (Adeno-Associated Viruses)

Pisikesed mittepatogeensed üheaahelised inimese DNA viirused (4.7kb), mis integreeruvad kromosoom 19 spetsiifilise saiti (19q13.3qter). Produktiivne infektsioon sõltub teise viiruse (nagu adenoviiruse) valkudest.

Võivad anda püsiva ja pikaajalise geeniekspressiooni.

#### Herpes simplex viiruse süsteem

Kuigi nii adeno- kui retroviiruste sihtmärk rakkude spektrit saab muuta, infitseerivad mõned viirused loomulikult teel teatud kindalt rakutüüpi. HSV-1 infitseerib mittejagunevaid närvirakke. HSV1 on tavaline inimese patogeen, mis põhjustab herpest. Neuronites jääb viirus latentseks. Reaktivatsioon initsieeritakse stressi või hormonaalsete muutuste poolt.

HSV on kaheaahelaline DNA viirus (152 kb pikk)

#### Mitteviiruslikud geenide ülekande süsteemid

Puhta DNA sisestamine analoogiliselt NH immuniseerimisega. Kogused on väikesed ja samuti on raske jõuda soovitud kudedeni.

**Liposoomid:** DNA konstrukti ümbritsemine kunstliku lipiidmembraaniga

### Geeniekspressiooni inhibeerimine

Kuigi suure osa geeniteraapia alastest uuringutest moodustavad mittefunktsionaalse geeni asendamisega seotud tööd, on teatud olukordades on vajalik töötava geeni(de) (üle) ekspressiooni suunatud inhibeerimine. Seda on võimalik saavutada erinevatel tasemetel

#### DNA tasemel

A) Funktsionaalse geeni inaktivatsioon *in situ* homoloogilisel rekombinatsioonil vastavalt muteeritud geenikoopiaga.

B) Oligonukleotiidide kasutamine. Teatud tingimustel võib DNA moodustada kolme-

kordse heeliksi. Selleks disainitakse geenispetsiifiline oligonukleotiid, mis paardub kindla sihtmärk geeni järjestusega kaheaheelalises DNA-s ja inhibeerib selle geeni transkriptsiooni. Üheaheelalise oligonukleotiidi seostumine kaheaheelalise DNA-ga toimub nn. Hoogsteen'i paardumise kaudu (vesiniksidemed). Selliste sidemete puhul on kõige stabiilsemad G seondumine G-ga GC aluspaaris ja T seondumine A-ga AT aluspaaris.

#### RNA tasemel

Antisense oligod või antisense geen, ribosüümid.

#### Valgu tasemel

Polüpeptiidi funktsiooni inhibeerimine. Seda on tunduvalt vähem uuritud kui geeni ekspressiooni inhibeerimist DNA või RNA tasemel.

**TABEL** Peamiste geeniteraapias kasutatavate meetodite omadused ja nende rakendamine

Omadus	Onkoretro viirus vektorid	Adeno viirus vektorid	Adeno-associated viirus vektorid	Lenti viirus vektorid	Lipo soomid
Inserdi suurus	7-7.5kb	>30kb	4.0kb	7-7.5kb	Piiramata
Integratsioon kromosoomi sagedus	Jah	Ei, episoomina	Jah/Ei	Jah	Väga madal
<i>In vivo</i> ekspressioon	Lühike	Lühike	Pikk	Pikk	Lühike
Stabiilsus	Hea	Hea	Hea	Testimata	Väga hea
Sisestamis viis	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i> ja <i>in vivo</i>	<i>Ex vivo</i> ja <i>in vivo</i>	<i>Ex vivo</i> ja <i>in vivo</i>	<i>Ex vivo</i> ja <i>in vivo</i>
Kontsentratsioon	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>11</sup>	>10 <sup>12</sup>	>10 <sup>8</sup>	Piiramata
Valmistamine (scale-up)	Piloot scale-up kuni 20-50l	Lihtne scale-up	Keeruline scale-up	Teadmata	Lihtne scale-up
Immuun vastus	Vähe probleeme	Tõsine	Teadmata	Vähe probleeme	Ei teki
Eelnev immuunsus	Vähe tõenäoline	Jah	Jah	Vähe tõenäoline	Ei
Ohutus	Võimalik insertioon mutagenees	Põletik, toksilisus	Põletik, toksilisus	Võimalik insertioon mutagenees	Ei

Verma & Somia (1997) *Nature* **389**, p242