A hemofilia kezelésének fejlődése a transzfúziótól a génterápiáig

Tárgyszavak: hemofilia; terápia; vértranszfúzió; vérplazma; krioprecipitátum; VIII. faktor; tisztítás; rekombináns DNS-technika; génterápia.

Az A típusú hemofilia (vérzékenység) olyan öröklött rendellenesség, amely 10 000 férfi közül egyet érint és súlyos vérzési zavarokat eredményez. A világon közel 150 000 személyt kezelnek emiatt a betegség miatt. A hemofilia A gyakorisága állandó marad, de a fejlődő országokban javuló egészségügyi ellátás hatására emelkedni fog a kezelésben részesülő, összes beteg száma. A hemofilia A terápia globális piaca valószínűleg meghaladja az 1 Mrd USD-t. Ez igen nagy összeg – tekintetbe véve a viszonylag kis betegpopulációt – és azt a tényt tükrözi, hogy a kezelés költségének donimáns része a bioterapeutikumok.

A hemofilia A kezelésére egyedül rendelkezésre álló módszer a helyettesítési terápia. Az első biogyógyszerek a VIII. (véralvadási) faktorból készült koncentrátumok – albuminnal és polivalens immunglobulinokkal együtt – voltak.

A hemofilia leírása már a babilóniai Talmudban is megtalálható (i.e. 400–500). A betegség első eredményes kezelésére teljes vért alkalmaztak (1840), később (1929) bevezették a citrátos vér használatát. Ugyanakkor megfigyelték, hogy a hemofiliásoknál normális a vérzési idő. Számos korai közlemény nem tesz különbséget a hemofilia A (VIII. faktor aktivitásának hiánya) és a hemofi-
lia B (IX. faktor aktivitásának hiánya) között. Ezt a két kórképet csak 1947-ben választották külön és 1952-ben dokumentálták a két klinikai egység fennállását.

A hemofilia hagyományos kezelése

Az 1960-as évek végéig a hemofilia A kezelése teljes vér és vérplazma alkalmazására korlátozódott. Nagyobb előrehaladást jelentett az emberi vérplazma frakcionálási módszerének kidolgozása, amely lehetővé tette a fehérjék extrakcióját és különválasztását. Bár a biokémikusok különböző fehérjeki-

csapó szert fejlesztettek ki, mégis a Cohn által alkalmazott etanol – megfelelő hőmérséklet, ionerősség és pH beállításával – eredményezett lényeges haladást a plazma nagyüzemi frakcionálása terén. Azonban ez a munka nagymértékben az albumin- és γ-globulinfrakciók előállítására szorítkozott. Lehetővé vált egy Cohn-frakció alkalmazása a hemofilia A kezelésére. A Cohn-féle I. frakció tartalmazta a VIII. plazmafrakció és a fibrinogén zömét, amely az USA-ban már az 1950-es évek elején hozzáférhető volt. Előállították az I. frakció alfrakcióit hemofilia kezelésére, ezenkívül a liofilezett plazma is elfogadott kezelési lehetőség volt. Azonban a fagyasztva szárított termékek oldékonysági problémái, valamint a teljes vér és plazma érbe adásával járó térfogati túlterhelés csalódást okozott.

Vérplazmából készített krioprecipitátum

A hemofilia terápiájának további haladása egy véletlen laboratóriumi megfigyelésnek köszönhető. Ha a megfagyasztott vérplazmát lassan felengedni hagyják redukált hőmérsékleten, akkor a plazmafehérje frakció egy része csapadék alakjában marad a plazmában. A csapadék fibrinogént és „hidegben oldhatatlan globulinokat” tartalmaz, de meglepő módon a VIII. faktor is jelen van. Ennek eredményeképpen 1965-ben a Stanford Egyetemen kifejlesztették a „krioprecipitátumot” hemofilia A kezelésére. Ez a felfedezés lehetővé tette, hogy majdnem minden helyi véradó központ hatékony és „hordozható” gyógyszert biztosítson a hemofilia kezelésére. Lehetővé vált a krioprecipitáció beépítése a plazmafrakcionálásba kezdeti lépésként, majd a kriomentes plazma tovább frakcionálható albuminra, γ-globulinokra és egyéb gyógyhatású fehérjékre. A krioprecipitátum eltávolítása után a VIII. faktorban szegényt plazmát fel lehet használni más klinikai célra.

A krioprecipitátum hatékonyságának fokozása céljából alkalmazták a donor DDAVP-vel (1-deamino-8-D-arginin vagy dezmopresszin) való „stimulálását”. A DDAVP az L-arginin-vazopresszin szintetikus analógja, amelynek infúziója növeli a plazmában levő VIII. faktor és Willebrand-faktor koncentrációját, amit enyhe hemofilia esetén alkalmaznak.

A fehérjék fizikai–kémiájának jobb megismerése rávilágított az oldékonyságot irányító tényezőkre is. Különösen a pH, az ionerősség és a hőmérséklet hatásának megértése eredményezett jelentős haladást a Cohn-frakcionálás terén. Ez egyrészt kissé jobb hatékonyságú VIII. faktor-koncentrátumok kidolgozását eredményezte, másrészt az oldékonysággal és hozammal kapcsolatos problémák továbbra is megmaradtak. 1964-ben USA-beli kutatók észlelték az aminosavak hatását a VIII. faktor krioprecipitátum-kivonatból. Ezt az eljárást ipari méretekben is alkalmazták, ami hasznos terápiás koncentrátumot eredményezett, és ezt 1968-ban Hemofil márkanéven forgalmazták.

Ez az anyag pozitív klinikai tapasztalatokkal járt, de egyre növekvő problémát jelentett a kórokozók jelenléte. Ennek ellenére a Hemofil és más, hason-

ló minőségű termékek kifejlesztése nagy különbséget eredményezett a hemofilia kezelése és a betegek életmódja tekintetében.

Míg ezek a különböző preparátumok igen hatékony VIII. faktor-koncentrátumoknak tekinthetők, addig a fibrinogén és egyéb fehérjék még mindig jelentős mennyiségben voltak jelen. Ezért ezek a koncentrátumok használhatók a Willebrand-szindróma kezelésére is.

A VIII. faktor-koncentrátumok veszélyei

Különböző módszerekkel próbálták kiküszöbölni a VIII. faktor-koncentrátumoknak tulajdonított nem-A és nem-B hepatitisz (később hepatitisz C-ként azonosított) kockázatát. Leginkább a terápiás termékek hőkezelésével foglalkoztak, de más módszereket is javasoltak. 1983-ban a Hyland Laboratories cég (USA) forgalomba hozta a Hemofil T-t, amelyet 72 óráig 60 °C-on tartottak liofilezett állapotban. A klinikai vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy ez az anyag nem volt mentes a nem-A és nem-B hepatitisz kórokozóitól, de az AIDS átvitele szempontjából biztonságosnak bizonyult. A HIV elterjedése a hemofiliás populációban az 1980-as évek egyik tragikus eredménye volt, amely a világon kezelt betegek több mint 50%-ának megfertőződéséhez vezetett.

A hőkezelt anyag lényeges terápiás haladást jelentett, de továbbra is probléma maradt a vírusokkal szembeni biztonság és a terméktisztaság. Terápiás szempontból előrehaladást jelentett a plazmából készült VIII. faktor tisztítása immunaffinitás-kromatográfiával. 1987-ben az Armour cég (ma Aventis) piacra dobta a Monoclate-ot, amelyben a vírusokat hőkezeléssel inaktiválták – szárított állapotban –, majd pasztőrözött humán albuminnal stabilizálták. 1988-ban a Hyland Laboratories bevezette a Hemofil M-et, amelyet ugyanilyen módon stabilizáltak. Ezt a készítményt gyártás folyamán oldószer/detergenssel (tri(n-butil)foszfát/Triton), amely minden, lipidburokkal rendelkező vírust kiküszöböl, beleértve a hepatitisz-B, -C és HIV vírusokat is. A Hemofil M gyártása során az oldószer/detergens keveréket a monoklonáris affinitáskromatográfiás lépés előtt alkalmazták, ami közel azonnal inaktiválta a lipidburkos vírusokat.

Újabb gyógyászati anyagok a hepatitisz kezelésére

Ez a két termék ultratiszta VIII. faktor-koncentrátumnak tekinthető, alkalmazásuk során nem tapasztaltak káros reakciókat, kivéve a VIII. faktor-inhibitor megjelenését. Az utóbbi – amely a hemofiliás betegek közel 10%-ánál fordul elő – lehetővé tette új gyógyhatású anyagok kifejlesztését, pl. Autoplex-T, FEIBA (VIII. faktor-inhibitort kikapcsoló aktivitás), NOVOSEVEN (VIIa. faktor) és Hyate-C (sertés VIII. faktor). A VIII. faktor-inhibitorok a VIII. faktor fehérjéje elleni antitestek, amelyek kezelésére különböző terápiás lehetőségek vannak; pl. tolerizáció, az inhibitort kikapcsoló biogyógyszerek. Az Autoplex-T egy

részben aktivált protrombinkomplex-koncentrátum, amely aktivált alvadási faktorok keverékéből áll. Feltehetően közvetlenül aktiválja a X. faktort, amely csillapítja a vérzést és eredményesen alkalmazható a VIII. faktor-inhibitorok kezelésére. A FEIBA hasonló összetételű készítmény és közvetlenül aktiválja a protrombint a Xa. faktor útján, eredményesen használták a VIII. faktor-inhibitorok kezelésére. A NOVOSEVEN (rekombináns VIIa. faktor) egy újabb lehetőség a VIII. faktor-inhibitorok kezelésére, amely közvetlenül aktiválja a X. faktort szövetfaktor jelenlétében. Ezt a terméket gyorsan elfogadták VIII. faktor-inhibitor kezelése céljára. Egy másik terápiás lehetőség a Hyate-C, amely kofaktorként működik X. faktornak IXa. faktor által katalizált aktiválásához. Ez a készítmény is eredményesen alkalmazható VIII. faktor-inhibitorok kezelésére. Használatát korlátozza, hogy antitestek fejlődnek ki ellene.

Rekomnináns DNS-technika alkalmazása a VIII. faktor előállítására

A VIII. faktor tisztításra irányuló törekvésekkel párhuzamosan letették az alapokat a rekombináns VIII. faktor készítmények kifejlesztéséhez. Az 1970/80-as évek fordulóján több vállalat törekvéseinek középpontjában állt terápiás fehérjék kidolgozása a rekombináns DNS-technológia alkalmazásával. Eleinte sikereket értek el inzulinnal, szöveti plazminogénaktivátorral és növekedési faktorokkal. Azonban a VIII. faktor fehérjéjének komplexitása óriási kihívást jelentett a fehérje klónozása és expressziója tekintetében (hörcsögsejttenyészet alkalmazásával). Ezenkívül problémát okoz ennek a fehérjének a mérete (2332 aminosavból áll), valamint a jelentős, transzláció utáni módosulás (egyes tirozilmaradékok glikozilálása és szulfatálása). A VIII. faktor glikozilálása nem kritikus a biológiai aktivitás szempontjából, de fontos a keringési felezési idő tekintetében. A tirozilmaradékok szulfatálása a VIII. faktor trombin hatására létrejövő „aktiválódása” szempontjából lényeges, amely a biológiai funkcióra vonatkozólag kritikus. A VIII. faktor valószínűleg egyláncú fehérjeként szintetizálódik, de a kiválasztás folyamán korlátozott mértékű proteolízisen megy át. A VIII. faktor a Willebrand-faktorral képzett komplex alakjában cirkulál, így a VIII. faktor fehérje jóval bonyolultabb, mint a rekombináns fehérjék.

A VIII. faktort kódoló cDNS szekvenciáját 1984-ben közölték a Genentech és a Genetics Institute kutatói. A Hyland Laboratories cégekkel való együttműködés eredményeképpen előállították az első rekombináns VIII. faktort, amelyet infúzió alakjában alkalmaztak egy hemofilia A-s betegnél (1987, USA). A Recombinate nevű termék 1992 óta hozzáférhető az USA-ban. A Bayer cég Kogenate készítménye a következő évben került forgalomba. Újabban kifejlesztették a Refactot – a VIII. faktor B-doménhiányos, rekombináns variánsa – amelyet jelenleg a Genetics Institute gyárt és forgalmaz Európában (1999) és az USA-ban (2000).

A monoklonális tisztított és rekombináns VIII. faktor-készítmények kifejlesztése jelentősen megváltoztatta a betegek kezelési módját. A kevésbé tisztított preparátumok esetében a betegnek gyakran fel kellett keresnie a hemofiliás gondozó központot, bár az 1970-es években fokozatosan kifejlesztették az otthoni gondozási programokat. A tisztított preparátumokat átadták a betegnek vagy családjának, így azt otthon vagy bármely más helyen felhasználhatták. Egy másik változás a folyamatos infúzió – mint terápiás lehetőség – kialakítása volt. Megállapították, hogy a hemofilia A hatékony profilaxisa elérhető a plazma 1%-os VIII. faktorszintjével és a gyakoribb VIII. faktor-infúziók csökkentik a ritkább injekciókkal járó „maximumokat és minimumokat". Ezt a koncepciót továbbfejlesztette a VIII. faktor-készítmény folyamatos infúziójának kidolgozása.

Génterápia

Felmerült a génterápia esetleges alkalmazása a hemofilia kezelésére. Valószínű, hogy a hemofilia terápiája a hiányzó fehérje parenterális (gyomor–bél rendszert megkerülő) adagolása egy terápiás koncentrátum formájában háttérbe fog kerülni a következő évtizedekben, és egy bizonyos formájú génterápia lép a helyébe. Ez feltehetően úgy történik, hogy a VIII. faktor-gén/cDNS-t vagy egy aktív származékát beviszik a beteg sejtjeibe, így lehetővé válik a VIII. faktor-fehérje expressziója/kiválasztása a keringésbe. Ennek hatására várható a normál fehérje szuboptimális expressziója, és ennek eredményeként jelentősen mérséklődni fognak a betegek klinikai tünetei.

Számos vállalat közölte, hogy célul tűzte ki a hemofilia génterápiájának kifejlesztését. 1998-ban megkezdték a klinikai kipróbálást VIII. faktorhiányos betegek körében úgy, hogy a betegek fibroblasztjait VIII. faktor termelésére transzdukálták, majd ezeket az átalakított sejteket visszavezették a beteg hasüregébe. Nemrég a Chiron cég közölte, hogy elkezdték a hemofilia génterápiájának kipróbálását több klinikán. Programjuk magában foglalja a B-doménhiányos VIII. faktort kódoló retrovírusvektor intravénás adagolását. Az Avigen vállalat elkezdte IX. faktor hiányában szenvedő betegek klinikai terápiáját IX. faktor cDNS-ét hordozó adeno-szatellita vírus izomba való adagolásával. Ennek során eddig 9 beteget kezeltek bizonyos fokú sikerrel. A hemofilia génterápiájának kifejlesztése során a legnagyobb technikai probléma a különböző vektorok alkalmazása és az új gyógymódok nagyfokú megbízhatóságának igénye, mivel a jelenlegi terápiák egyaránt biztonságosak és hatékonyak. Az aktuális génterápia a defektív gén „fixálását" jelentené. Ez különösen érekes a mozaikképzés esetén, amikor egyetlen bázispárt át lehet alakítani és így kijavíthatók az egyetlen bázispár-pontmutációk.

Kilátások

Bármi legyen is a génterápia mechanizmusa, valószínűleg a VIII. faktorfehérje pótlási terápiája végső fokon – évtizedek múlva – elavulttá válik, feltéve ha az általános egészségügyi színvonal lehetővé teszi ennek az újításnak az alkalmazását. Azonban még vannak problémák a korszerű technológiákkal kifejlesztett koncentrátumokkal, valamint a génterápiával. Az ultratiszta koncentrátumok folyamatosan terjedő használatával egyidejűleg meg kell érteni, hogy a VIII. faktor egyéb, terápiás koncentrátumai gazdaságosabbak lehetnek, mivel megőrzik a beteg biztonságát. Közölték (1999), hogy a krioprecipitálás továbbra is hatékony terápiás lehetőségnek tekinthető.

Az utóbbi 35 évben kifejlesztett koncentrátumok alkalmazását ki fogja szorítani a génterápia. Azonban nem szabad hagyni, hogy a jelenlegi technológia csábítására szem elől tévesszük a terápiás célt. A biotechnológusoknak elsősorban ezt a terápiás célt kell szem előtt tartani, amely nem más, mint a beteg egészsége és jóléte.

(Dr. Pálfi Ágnes)

Kingdon, H. S.; Lundblad, L.: An adventure in biotechnology: the development of haemophilia A therapeutics – from whole-blood transfusion to recombinant DNA to gene therapy. = Biotechnology and Applied Biochemistry, 35. k. 2. sz. 2002. ápr. p. 141–148.

EGYÉB IRODALOM

Arányi P.: Farmakogenetika és gyógyszergyártás. = Magyar Tudomány, 47. k. 5. sz. 2002. p. 595–600.

Patthy L.: A genomkorszak bioinformatikája. = Magyar Tudomány, 47. k. 5. sz. 2002. p. 575–581.

Kosztolányi Gy.: A genomika kölcsönhatásai a medicinával és az egyetemes tudománnyal. = Magyar Tudomány, 47. k. 5. sz. 2002. p. 567–574.

Sándor J.: Genomika és jog. = Magyar Tudomány, 47. k. 5. sz. 2002. p. 615–625.