

# LIỆU PHÁP GEN TRONG TỬ CUNG

BS. Nguyễn Khánh Duy<sup>1</sup>, BS. Dương Thùy Trang<sup>1</sup>, BS. Hồ Ngọc Anh Vũ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Y Dược TP HCM, <sup>2</sup>Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

## TỔNG QUAN

Các bất thường về di truyền là một trong những nguyên nhân chính gây nên nhiều kết cục bất lợi trong thai kỳ, là gánh nặng về tâm lý, kinh tế cho gia đình và xã hội. Bên cạnh các bất thường nhiễm sắc thể, bệnh lý đơn gen là nguyên nhân góp phần đáng kể gây ra nhiều rối loạn bẩm sinh. Cho đến nay có hơn 3.500 bệnh lý đơn gen đã được xác định (Amberger, 2019). Sự bùng nổ về công nghệ trong lĩnh vực Sinh học phân tử và Y học bào thai, cùng với liệu pháp gen trong tử cung (in utero gene therapy – IUGT) giúp chẩn đoán sớm và tiềm năng chữa khỏi các bệnh lý di truyền đơn gen trong giai đoạn phôi thai trước khi tiến triển đến những tổn thương không hồi phục hoặc tử vong trong tử cung. Bài viết tổng hợp các bằng chứng hiện có về sự tiến bộ, những thách thức hiện tại và tiềm năng trong tương lai của liệu pháp gen trong tử cung.

## LIỆU PHÁP GEN

Liệu pháp gen (gene therapy) được phân loại dựa trên cơ chế phân tử gồm liệu pháp gen truyền thống và chỉnh sửa gen.

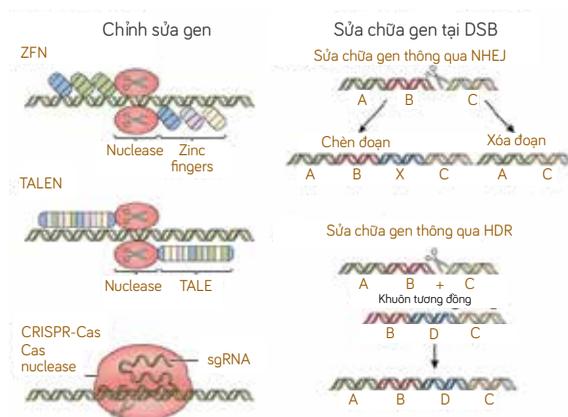
### Liệu pháp gen truyền thống

Liệu pháp gen truyền thống là phương pháp thay thế gen bị đột biến bằng gen khỏe mạnh thông qua các hệ thống phân phối (chủ yếu dựa trên virus). Gen được chuyển có thể tích hợp trực tiếp vào bộ gen hoặc tồn tại độc lập dưới dạng DNA tự do (episome). Mục tiêu của liệu pháp gen điều trị bệnh di truyền là đạt được sự biểu hiện “bền vững” của “gen thay thế” ở mức đủ để cải thiện triệu chứng hoặc chữa khỏi bệnh với các tác dụng phụ tối thiểu. Liệu pháp gen truyền thống đã được chứng minh có hiệu quả

qua nhiều nghiên cứu, tuy nhiên vẫn còn tồn tại một số hạn chế. Cụ thể những DNA ngoại lai tích hợp trực tiếp theo cách ngẫu nhiên, không có vị trí xác định gây ra các biến thể với những hậu quả không mong muốn như mất hoạt tính một gen chức năng, khởi động một gen im lặng, hay hoạt tính sinh ung (oncogenesis). Khi tồn tại dưới dạng episome, các gen chuyển sẽ mất khi các tế bào sao chép vì episome không được nhân đôi và do đó không truyền sản phẩm chuyển gen được cho các tế bào con. Hạn chế còn liên quan đến hoạt tính sinh miễn dịch của vector mang làm giảm hiệu quả của liệu pháp gen truyền thống (Katherine, 2019).

### Liệu pháp chỉnh sửa gen

Mặc dù phần lớn các nghiên cứu về liệu pháp gen trong tử cung tập trung vào liệu pháp gen truyền thống, tuy nhiên những tiến bộ trong công nghệ chỉnh sửa gen trong tử cung có tiềm năng điều trị khỏi vĩnh viễn một số bệnh di truyền sau một đợt điều trị duy nhất. Liệu pháp



Hình 1. Các enzyme cắt chuyên biệt và cơ chế sửa chữa DNA của tế bào (Yung, 2021)

chỉnh sửa gen cho phép tạo ra những thay đổi trên trình tự gen nội sinh tại một vị trí xác định. Chỉnh sửa hệ gen khởi đầu bằng việc tạo ra sự đứt đôi của DNA (double sequence break, DSB) ở vị trí chuyên biệt. Sự phát triển các kỹ thuật dựa trên enzyme cắt trình tự chuyên biệt DNA (sequence-specific nuclease – SSN) như: zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator like effector nuclease (TALEN), hay phát hiện sinh học phân tử vĩ đại nhất thế kỷ 21 – hệ thống CRISPR – Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/CRISPR – associated protein 9, Cas9) cho phép tạo DSB tại vị trí cụ thể của DNA. Việc sửa chữa DNA được thực hiện thông qua hai cơ chế chính: ghép nối không tương đồng (nonhomologous end joining, NHEJ) hoặc sửa chữa trực tiếp tương đồng (homology – directed repair, HDR). Cơ chế sửa chữa DNA thông qua NHEJ gắn trực tiếp các điểm đứt của DSB với sự tham gia của các enzyme mà không cần chuỗi DNA khuôn tương đồng. Cho đến nay, hầu hết các công bố về chỉnh sửa gen sử dụng con đường NHEJ để loại bỏ gen (knock-out gen), phá vỡ gen gây bệnh được biểu hiện quá mức hoặc hoạt động theo cơ chế đột biến âm tính trội (dominant negative mutation). Cơ chế HDR có chủ yếu trong các pha S/G2 của chu trình tế bào, sử dụng các chuỗi DNA tương đồng làm khuôn (template) để sửa chữa DSB. Vì thế cho phép sửa chữa một cách chính xác từng nucleotide, chẳng hạn như chuyển đổi một biến thể  $\beta^s$  thành một alen  $\beta$  globin bình thường trong trường hợp bệnh hồng cầu hình liềm. (Yin, 2017; Yung, 2021). Gần đây là hệ thống chỉnh sửa base (base editing, BE) và chỉnh sửa prime (prime editing, PE) được phát triển, cho phép chỉnh sửa gen mục tiêu mà không cần cắt đôi sợi DNA, hứa hẹn mang lại nhiều đột phá trong tương lai (Anzalone, 2019).

Trong hơn 20 năm qua, đã có những tiến bộ đáng kể về tính an toàn và hiệu quả của liệu pháp gen sau sinh trong điều trị các bệnh di truyền, với hơn 700 thử nghiệm lâm sàng đã và đang được thực hiện. Hiện đã có 6 sản phẩm liệu pháp

gen được chấp thuận trong điều trị bởi Cơ quan quản lý Dược phẩm châu Âu (EMA) và/hoặc Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA), trong đó có 4 sản phẩm cho các rối loạn di truyền đơn gen như: bệnh  $\beta$ -thalassemia, rối loạn võng mạc di truyền, bệnh teo cơ tủy và hội chứng suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng do thiếu hụt adenosine deaminase (severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency) (Collins, 2018).

### NHỮNG THẾ MẠNH CỦA LIỆU PHÁP GEN TRONG TỬ CUNG

Liệu pháp gen trong tử cung mang lại tiềm năng chữa khỏi bệnh trước khi khởi phát quá trình sinh lý bệnh không thể đảo ngược hoặc tử vong trong tử cung. Rối loạn di truyền có thể gây tổn thương không hồi phục ở nhiều cơ quan trong thai kỳ như bệnh lý liên quan đến tích lũy các chất ở lysosome (bệnh Mucopolysaccharide (MPS) type VII, bệnh Gaucher). Một số bệnh di truyền không gây ảnh hưởng trong thời kỳ mang thai, tuy nhiên có thể gây tử vong tại thời điểm sinh như bệnh thiếu hụt protein surfactant B, C gây tử vong nhanh chóng sau sinh do suy hô hấp không đáp ứng với điều trị surfactant. Phương pháp điều trị duy nhất ở bệnh này là ghép phổi (Wert, 2009). Điều chỉnh di truyền trong thời kỳ mang thai (khi chức năng phổi không cần thiết) có thể cung cấp đủ thời gian để phổi phát triển bình thường và đầy đủ chức năng tại thời điểm sinh. Nghiên cứu của Alapati và cộng sự (2019) ghi nhận tiêm trực tiếp vào buồng ối vector Adenovirus chứa công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR – NHEJ có thể chỉnh sửa gen các tế bào biểu mô phổi, cải thiện khả năng sống còn trong mô hình chuột với bệnh phổi thiếu protein surfactant C bẩm sinh (Alapati, 2019). Bên cạnh can thiệp sớm, liệu pháp gen trong tử cung còn có một số lợi thế so với liệu pháp gen sau sinh.

**Kích thước thai còn nhỏ** giúp giảm tối thiểu “liều điều trị”, tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển gen hiệu quả (Palanki, 2020).

**Sự chưa trưởng thành về mặt miễn dịch**

cho phép đưa vào các kháng nguyên (vector, sản phẩm chuyển gen) mà không gây ra đáp ứng miễn dịch và tạo nên sự dung nạp miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên, điều này đặc biệt có ý nghĩa đối với các bệnh cần nhiều đợt điều trị. Nghiên cứu của Chan và cộng sự (2019) sử dụng vector AAV (Adeno – associated viral vector) chứng minh hiệu quả điều trị bệnh Hemophilia B khi can thiệp ở giai đoạn bào thai, đồng thời chứng minh sự dung nạp miễn dịch ở mức cao và không có tác dụng phụ của vector hoặc biểu hiện gen sau 4 năm ở khỉ (Chan, 2019). Liệu pháp gen trong tử cung khắc phục được hạn chế đòi hỏi cần phải sử dụng thuốc ức chế miễn dịch để ngăn chặn phản ứng miễn dịch đối với các sản phẩm chuyển gen của liệu pháp gen sau sinh (Raper, 2003). Nhiều nghiên cứu trên động vật và thử nghiệm lâm sàng đã ghi nhận sự hiện diện của các kháng thể kháng sản phẩm chuyển gen ở những trường hợp điều trị liệu pháp gen sau sinh (Calcedo, 2011). Đặc biệt, nghiên cứu của Charlesworth và cộng sự (2019) ghi nhận sự diện hiện các kháng thể kháng Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9) và Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) trong huyết thanh người, điều này có thể làm giảm hiệu quả chỉnh sửa gen sau sinh bằng hệ thống CRISPR – Cas9 (Charlesworth, 2019).

**Sự chưa trưởng thành về mặt miễn dịch:** là những mục tiêu lý tưởng để can thiệp. Sự sao chép mạnh mẽ của tế bào gốc trong thời kỳ bào thai giúp cải thiện hiệu quả của quá trình chuyển gen, hay khả năng chỉnh sửa gen của hệ thống CRISPR – Cas9 vốn đòi hỏi sự nhân đôi của tế bào (Palanki, 2020).

**Cấu trúc giải phẫu đặc biệt trong thời kỳ bào thai:** giúp việc chuyển gen đến cơ quan đích có thể được thực hiện thông qua các con đường khác nhau. Tiêm theo đường tĩnh mạch rốn vào cuối tam cá nguyệt thứ hai hay thậm chí tiêm trực tiếp buồng tim trong giai đoạn sớm của thai kỳ có thể được thực hiện một cách an toàn dưới hướng dẫn siêu âm. Gan là cơ quan tạo máu chính trong thời kỳ bào thai, do đó tiêm

theo đường tĩnh mạch rốn giúp tiếp cận các tế bào gốc tạo máu ở gan và đồng thời tiếp cận đến các cơ quan khác của cơ thể. Tiêm trực tiếp sản phẩm chuyển gen vào buồng ối, thông qua cơ chế thở và nuốt của thai giúp vận chuyển các sản phẩm chuyển gen đến các cơ quan đích là phổi và đường tiêu hóa (Palanki, 2020).

**Sự tăng tính thấm của hàng rào máu não ở giai đoạn thai:** cho phép điều trị các rối loạn hệ thần kinh trung ương bằng liệu pháp gen qua đường toàn thân (Palanki, 2020). Việc điều trị sớm giúp ngăn chặn những tổn thương không hồi phục của não. Nghiên cứu của Masara và cộng sự (2020) chứng minh liệu pháp gen trong tử cung đường toàn thân với vector AAV giúp hồi phục biểu hiện enzyme glucocerebrosidase, ngăn ngừa sự thoái hóa thần kinh nghiêm trọng ở não trên mô hình chuột với bệnh Gaucher (Masara, 2020).

## NHỮNG THÁCH THỨC HIỆN TẠI CỦA LIỆU PHÁP GEN TRONG TỬ CUNG

Mặc dù các nghiên cứu trên mô hình động vật cho đến nay vẫn chưa chứng minh được tác dụng phụ đáng kể của liệu pháp gen trong tử cung đối với thai hoặc các cơ quan của mẹ, nhưng vẫn còn tồn tại một số rào cản trong thực hiện thử nghiệm lâm sàng liên quan đến liệu pháp gen trong tử cung.



Hình 2. Những thế mạnh của liệu pháp gen trong tử cung (Palanki, 2020).

**Sự hiểu biết về hệ miễn dịch của thai cho đến thời điểm hiện tại còn hạn chế.** Mặc dù hệ thống miễn dịch của thai được xem là chưa trưởng thành, nhưng những báo cáo gần đây ghi nhận khi có sự trình diện các kháng nguyên với các tế bào của thai nhi, các tế bào nhớ và tế bào T sẽ góp phần tạo ra môi trường dung nạp miễn dịch ngay từ tuổi thai 11 đến 14 tuần (McGovern, 2017).

**Sự tồn tại kháng thể của người mẹ.** Với các loại vector và thành phần gen tương đồng (ortholog) hay hệ thống CRISPR – Cas9 được sử dụng đã được ghi nhận trong một số nghiên cứu (Calcedo, 2011; Charlesworth, 2019). Tuy nhiên, các kháng thể của mẹ có thể sẽ không còn thách thức khi liệu pháp gen được thực hiện sớm trong thai kỳ, trước khoảng thời gian các kháng thể của mẹ có thể đi qua nhau (thường là nửa sau tam cá nguyệt 2 và đạt đỉnh trong tam cá nguyệt 3) (Peranteau, 2020).

**Thời điểm thực hiện liệu pháp gen trong tử cung.** Vấn đề này là một thách thức, góp phần cản trở thực hiện thử nghiệm lâm sàng liên quan đến liệu pháp gen trong tử cung. Những kiến thức hiện tại gợi ý giai đoạn sớm trong thai kỳ là thời điểm lý tưởng để thực hiện liệu pháp gen trong tử cung (McGovern, 2017, Peranteau, 2020).

**Khả năng chẩn đoán sớm và chính xác trong tam cá nguyệt thứ nhất.** Các bệnh lý di truyền đơn gen trong tử cung liệu pháp gen trong tử cung có thể được thực hiện cũng là một thách thức trong thực hành (Chougnnet, 2018; McGovern, 2017).

## **ĐỒNG THUẬN HIỆN TẠI VỀ LIỆU PHÁP GEN TRONG TỬ CUNG**

Với mục tiêu hướng tới ứng dụng lâm sàng trong tương lai, đồng thuận về liệu pháp gen trong tử cung của Hiệp hội Miễn dịch và Cây ghép Thai Quốc tế (International Fetal Transplantation and Immunology Society, IFeTIS) (2019) nhấn mạnh mục tiêu lý tưởng của liệu pháp gen trong tử cung là những bệnh

di truyền dẫn đến tổn thương không hồi phục và/hoặc tử vong trong tử cung hay sau sinh đồng thời không tồn tại các biện pháp điều trị hiệu quả sau sinh. Bất kỳ can thiệp nào đối với thai cần xem xét đầy đủ các vấn đề đạo đức, tính an toàn cho mẹ và thai. Một số bệnh di truyền có thể được chọn cho nghiên cứu trong tương lai như: bệnh hồng cầu hình liềm, bệnh teo cơ cột sống, bệnh xơ nang, hội chứng suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng, Hemophili A, thalassemia, rối loạn trao đổi chất bẩm sinh, rối loạn dự trữ lysosome, thiếu alpha-1-antitrypsin (Porada, 2019). Hiệu quả điều trị được chứng minh trên các mô hình động vật hiện nay cho thấy liệu pháp gen trong tử cung có thể không còn quá xa trong tương lai.

## **KẾT LUẬN**

Liệu pháp gen trong tử cung có tiềm năng chữa khỏi các rối loạn di truyền mà hiện tại không có phương pháp điều trị hiệu quả. Hiện vẫn còn một số thách thức và các vấn đề đạo đức liên quan. Tuy nhiên, với sự phát triển không ngừng của khoa học và công nghệ, việc ứng dụng liệu pháp gen trong tử cung trong thực hành lâm sàng là một mục tiêu thực tế.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, Rossidis AC, Stratigis JD, Ahn NJ, et al. In utero gene editing for monogenic lung disease. *Sci Transl Med.* 2019;11(488):eaav8375
2. Almeida – Porada G, Waddington SN, Chan JKY, Peranteau WH, MacKenzie T, Porada CD. In utero gene therapy consensus statement from the IFeTIS. *Mol Ther.* 2019;27(4):705 – 7.
3. Amberger, C.A. Bocchini, A.F. Scott, A. Hamosh, OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype – gene relationships, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D1038 – D1043
4. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR (2019) Search – and – replace genome editing without double – strand breaks or donor DNA. *Nature* 576: 149 – 157.
5. Collins FS, Gottlieb S. The next phase of human gene – therapy oversight. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1393 – 5
6. High KA, Roncarolo MG. *Gene Therapy.* N Engl J Med. 2019 Aug 1;381(5):455 – 464. doi: 10.1056/NEJMra1706910. PMID: 31365802.
7. Wert SE, Whitsett JA, Noguee LM. Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr Dev Pathol.* 2009;12(4):253 – 74
8. Palanki R, Peranteau WH, Mitchell MJ. Delivery technologies for in utero gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Feb;169:51 – 62.
9. Shanahan, M, Aagaard, K, McCullough, L, Chervenak, F. Society for Maternal – Fetal Medicine Special Statement: Beyond the scalpel: in utero fetal gene therapy and curative medicine. *American journal of obstetrics and gynecology,* 225(6), B9 – B18. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.09.001>
10. Yung NK, Maassel NL, Ullrich SJ, Ricciardi AS, Stitelman DH. A narrative review of in utero gene therapy: advances, challenges, and future considerations. *Transl Pediatr.* 2021 May;10(5):1486 – 1496.
11. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Jun;16(6):387 – 399.