

# Wykład im. prof. Janiny Misiewicz

## Lecture in memory of Prof. Janina Misiewicz

**Marek Jakóbsiak**

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### Perspektywy terapii genowej

#### Perspectives in gene therapy

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 289–293**

Terapię genową można zdefiniować jako terapię opartą na wprowadzaniu genów do komórek pacjenta w celu uzyskania efektu terapeutycznego. Do wprowadzania genów do komórek używa się jako nośników tak zwanych wektorów. Najczęściej w próbach klinicznych używane są: adenowirusy, retrowirusy, nagie plazmidowe DNA, a także wirusy krowianki, tak zwane wirusy związane z adenowirusami i lipofektyną [1, 2]. Zalety i wady najczęściej stosowanych wektorów podano w tabeli 1.

Chociaż na świecie przeprowadzono lub prowadzi się już w sumie około 1500 prób klinicznych, obejmujących kilka tysięcy pacjentów cierpiących na wiele chorób, to nadal terapia genowa u ludzi budzi wiele dyskusji i emocji. W ocenie jej dotychczasowych dokonań należy podkreślić, że nie stała się ona dotąd wiodącą metodą w leczeniu jakiegokolwiek choroby. W większości przypadków próby tej terapii dały wyniki bardzo skromne albo nie dały żadnych pozytywnych rezultatów. Orędownicy terapii genowej przewidują jednak, że w nadchodzących latach stanie się ona wiodącą metodą w leczeniu wielu chorób. Krytycy terapii genowej z kolei dopatrują się w niej wielu zagrożeń i niebezpieczeństw. Oto niektóre z nich:

- wektory wirusowe mogą być niebezpieczne dla pacjentów;
- użycie wektorów retrowirusowych może doprowadzić do powstania „nowych” wirusów;
- istnieje ryzyko, że zmianom genetycznym mogą ulec komórki płciowe pacjenta;
- powstaną pokusy genetycznego „ulepszania” człowieka;
- wiedza zdobyta w trakcie doskonalenia terapii genowej może być wykorzystana do celów wojny biologicznej;
- w wyniku terapii genowej zmarło już kilku pacjentów.

Wielu ludzi dopatruje się w terapii genowej wręcz zagrożenia dla ciągłości naszego gatunku. Padają też oskarżenia o marnotrawienie olbrzymich pieniędzy, które można by spożytkować na bardziej konkretne i realne cele medyczne.

Żadna z zatwierdzonych ani planowanych terapii genowych nie dotyczy jednak wprowadzania genów do komórek płciowych lub ich prekursorów, a więc nie powinno być realnego niebezpieczeństwa, że poddany terapii genowej osobnik będzie przekazywać wprowadzony gen swojemu potomstwu. Istnieją opinie, że prędzej czy później zde-

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Marek Jakóbsiak, Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1a, budynek F, 02-097 Warszawa, tel.: (022) 599 21 99, faks: (022) 599 21 94, e-mail: marek.jakobisiak@wum.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.01.2009 r.  
Copyright © 2009 Via Medica  
ISSN 0867–7077

Tabela 1. Zalety i wady wektorów najczęściej używanych w terapii genowej u ludzi

Table 1. Advantages and disadvantages of gene therapy

Wektory	Zalety	Wady
Adenowirusy	Komórki dzielące się i dzielące się	Immunogenność
Retrowirusy	Łatwość użycia	Tylko komórki dzielące się, mutageneza
Plazmidowe DNA	Łatwość produkcji, duża wielkość genu	Mała wydajność wprowadzania genu

cydujemy się na to, ponieważ tylko wymiana zmutowanego genu — odpowiedzialnego za dziedziczną chorobę — na gen prawidłowy może na stałe znieść ryzyko przenoszenia jej z pokolenia na pokolenie. Na razie nie jest znana skuteczna i niezawodna metoda wymiany uszkodzonego genu. Pracuje się nad przystosowaniem do tego celu rekombinacji homologicznej. Dotychczas nie wydano również zgody na próby genetycznego manipulowania inteligencją człowieka, ale zakaz ten jest o tyle łatwy do przestrzegania, że ludzie jeszcze tego nie potrafią. Gdy sztuka ta zostanie opanowana, zapewne trudno będzie upilnować przestrzegania takiego zakazu. Natomiast rzeczywiście terapia ta jest, przynajmniej na razie, bardzo kosztowna.

Pierwszą próbę terapii genowej u ludzi przeprowadzono w Stanach Zjednoczonych w 1990 roku u dwojga dzieci cierpiących na ciężki złożony niedobór odporności wywołany brakiem deaminazy adenozy. Ostatnie lata przyniosły zarówno pierwsze poważne porażki, jak i sukcesy terapii genowej. W 1999 roku zmarł w następstwie terapii genowej młody pacjent cierpiący na niedobór transkarbamylazy ornityny, ale w 2000 roku z kolei opublikowano pierwsze udane wyniki tej terapii u dzieci z ciężkim złożonym niedoborem odporności, związanym z chromosomem X. Spośród około 20 dzieci cierpiących na ten niedobór i poddanych terapii genowej, czworo zachorowało na białaczkę będącą powikłaniem terapii [3]. Był to wielki cios w nadzieje pokładane w tej metodzie leczniczej. Jako „narzędzi” (wektorów) do wprowadzania genów do ludzkich komórek używa się, jak wspomniano, najczęściej wirusów. W przypadku porażki w 1999 roku użyto w tym celu adenowirusów, a w przypadku dzieci leczonych z powodu niedoboru odporności były to retrowirusy. W tym ostatnim przypadku spełniły się niestety obawy genetyków, którzy ostrzegali, że używając wektorów retrowirusowych, stwarza się ryzyko, że któryś z nich wbuduje się przypadkowo w pobliżu któregoś z protoonkogenów, wzmacniacze (*enhancers*) obecne w genach wirusowych przekształca go w onkogen, a komórkę, w której doszło do tego niefortunnego zdarzenia, w komórkę nowotworową.

Wydaje się, że u dzieci, które zachorowały na ostrą białaczkę limfatyczną, ważną przyczyną transformacji nowotworowej prowadzącej do białaczki było wbudowanie się wektora retrowirusowego w pobliżu protoonkogeny *LMO-2* [4]. Niestety, jedno z tych dzieci już zmarło. Od tego czasu uczyniono wiele, aby zmniejszyć ryzyko związane z użyciem wektorów wirusowych w terapii genowej, a także doskonalili się niewirusowe metody wprowadzania genów do komórek. Można by zapytać, dlaczego w przypadku ciężkiego złożonego niedoboru odporności próbuje się stosować nadal obciążoną ryzykiem terapię genową, zamiast przeszczepienia szpiku. Należy jednak pamiętać, że przeszczepienie szpiku też jest obciążone ryzykiem (odrzucenie, reakcja przeszczepu przeciw gospodarzowi), a w dodatku nie dla wszystkich pacjentów można znaleźć odpowiedniego dawcę. Krytycy terapii genowej głoszą, że choć zabiła ona już pierwszych pacjentów, to jeszcze nikogo nie uratowała. Twierdzenie to jest tylko w połowie prawdziwe, ponieważ żyją młodzi pacjenci poddani terapii genowej z powodu ciężkiego, złożonego niedoboru odporności związanego z chromosomem X, którzy zawdzięczają życie tej właśnie terapii. Jedną z niewirusowych metod wprowadzania genów do komórek jest użycie w tym celu plazmidowego DNA, które można zamknąć w liposomach albo można opłaszczyć nim na przykład mikroskopijne kulki złota i wstrzeliwać je przy użyciu tak zwanego pistoletu genowego do warstwy podstawnej naskórka lub do odsłoniętych operacyjnie mięśni.

Chociaż nie można obecnie rozstrzygnąć wszystkich sporów dotyczących terapii genowej, to powinniśmy przynajmniej bardzo pilnie i uważnie śledzić jej postępy. Ci lekarze, którzy z góry odrzucają i wyśmiewają terapię genową, próbują często po prostu zamaskować swoją ignorancję i brak podstawowej wiedzy, niezbędnej do zrozumienia zasad, na których się ona opiera.

Terapię genową próbuje się stosować w około stu chorobach u ludzi [1] (tab. 2). Najwięcej prób klinicznych terapii genowej dotyczy nowotworów. Terapia genowa nowotworów opiera się na wielu różnych podejściach terapeutycznych [5]. Te spo-

**Tabela 2. Próby stosowania terapii genowej u ludzi (niektóre choroby)****Table 2. Clinical trials of gene therapy (selected diseases)**

Nowotwory
Wrodzone niedobory odporności
Ciężki złożony niedobór odporności związany z brakiem dezaminazy adenozynej
Ciężki złożony niedobór odporności związany z mutacją genu dla łańcucha $\gamma$ c receptora dla interleukin: 2, 4, 7, 9, 15 i 21
Przewlekła choroba ziarniniakowa
Choroby płuc
Mukowiscydoza
Niedobór $\alpha$ -1-antytrypsyny
Hemofilia
Choroby naczyń
Choroba wieńcowa
Choroba tętnic obwodowych
Zaburzenia wzrodu
Choroby spichrzeniowe, np. Huntera, Hurlera, Gauchera
Reumatoidalne zapalenie stawów
Choroba Parkinsona
Choroba Alzheimera
Padaczka
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a
Degeneracja siatkówki
AIDS
Hemoglobinopatie

śród nich, które dały najbardziej obiecujące wyniki w doświadczeniach na zwierzętach, próbuje się już realizować w terapii genowej nowotworów człowieka.

Największa grupa terapii genowych wypróbowanych w klinice opiera się na wprowadzaniu do pobranych od pacjenta komórek nowotworowych genów dla tych cytokin, które wydzielane w normalnych warunkach przez limfocyty lub makrofagi najefektywniej pobudzają układ odpornościowy przeciw nowotworowi [6].

Chodzi o to, żeby układ odpornościowy wprowadzić ze stanu anergii i tolerancji w stosunku do antygenów nowotworowych. Sztucznie otrzymane komórki nowotworowe wydzielają lokalnie cytokiny, mające na celu przełamanie tego niekorzystnego dla pacjenta stanu tolerancji. Przed podaniem w formie szczepionki tych zmienionych komórek nowotworowych, na wszelki wypadek poddaje się je działaniu promieniowania jonizującego w dawce na tyle wysokiej, żeby nie mogły proliferować.

Należy przyznać, że w doświadczeniach na zwierzętach wiele spośród tych terapii genowych dało bardzo zachęcające wyniki, a nawet prowadziło w niektórych przypadkach do całkowitych wyleczeń. Chodzi prawdopodobnie o to, że limfocyty, pobudzone przez tak sztucznie otrzymane komórki nowotworowe, potrafią wyjść ze stanu swoistego uśpienia i rozwinąć skuteczną odpowiedź przeciwnowotworową, zdolną do zabicia nie tylko sztucznie otrzymanych komórek nowotworowych, ale także pozostałych, niezmiennych komórek nowotworowych — nawet tych, które tkwią gdzieś ukryte w przerzutach. Nic dziwnego, że rozpoczęto już próby kliniczne. Pacjentów szczepiono komórkami nowotworowymi transfekowanymi genami dla: interferonu- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-24, czynnika martwicy nowotworu (TNF, *tumor necrosis factor*) i czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Rozważa się również szczepienie komórkami nowotworowymi z genami dla dwóch różnych cytokin wzmacniających swoje działanie przeciwnowotworowe. Do komórek nowotworowych pacjenta, które mają być użyte jako szczepionka, wprowadza się również geny dla cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*), aby mogły prezentować antygeny nowotworowe albo geny dla cząsteczek kostymulujących, których brakuje na ogół na komórkach nowotworowych.

W innej metodzie terapii genowej antygen nowotworowy poddaje się takim manipulacjom, że staje się bardziej immunogeny, a więc skuteczniej pobudza odpowiedź immunologiczną przeciw komórkom nowotworowym pacjenta. Efekt ten uzyskuje się, zmieniając antygen, tak żeby lepiej pasował do rowka prezentującej go limfocytom T cząsteczki MHC albo żeby lepiej pasował do receptora rozpoznającego go limfocytu T.

Zachęcające wyniki otrzymano w próbach terapii genowej u pacjentów z czerniakiem, izolując od nich, namnażając i „udoskonalać” ich limfocyty T cytotoksyczne (Tc) [7]. Jak wspomniano, u chorego na nowotwór rozwija się bardzo często tolerancja immunologiczna na antygeny nowotworowe, co uniemożliwia pobudzenie odpowiedzi jego limfocytów T przeciw komórkom nowotworowym. Aby ominąć ten problem, izoluje się od chorego limfocyty T, pobudza się je bardzo immunogenymi antygenami nienowotworowymi, na przykład wirusowymi lub transplantacyjnymi, tak żeby wytworzyć efektywne limfocyty Tc, namnaża się je przez inkubację z odpowiednimi cytokinami, zwiększając nawet tysiące razy ich liczbę,

i wprowadza się do nich geny kodujące „sztuczne” receptory rozpoznające antygeny nowotworowe.

Kolejne podejście w terapii genowej nowotworów oparte jest paradoksalnie na wykorzystaniu niepowodzeń obserwowanych w trakcie chemioterapii niektórych nowotworów. Wiadomo, że remisja nowotworu, którą obserwuje się po pierwszym kursie chemioterapii, kończy się często wznową procesu nowotworowego. Jeżeli pacjenta z tak odnawiającym się nowotworem podda się ponownie chemioterapii, to niestety nierzadko obserwowany jest brak lub znaczne osłabienie odpowiedzi na zastosowane leczenie. Okazało się, że za takie niepowodzenie często odpowiada pojawienie się w błonie komórek nowotworowych glikoproteiny P kodowanej przez gen oporności wielolekowej (MDR, *multi-drug resistance*). Glikoproteina ta działa — w najprostszej ujęciu — jak pompa usuwająca lek z komórki. Nic więc dziwnego, że wyposażone w nią komórki nowotworowe będą odporne nie tylko na jeden, ale na wiele chemioterapeutyków — stąd nazwa genu.

Aby zrozumieć, jak powyższe obserwacje wykorzystuje się w terapii genowej, należy jeszcze zastanowić się, dlaczego w chemioterapii nowotworów nie stosuje się dostatecznie wysokich dawek leków gwarantujących eliminację wszystkich komórek nowotworowych w organizmie pacjenta i pewne wyleczenie bez groźby wznowy nowotworu. Dawek takich nie stosuje się dlatego, że byłyby one również toksyczne dla szybko proliferujących komórek krwiotwórczych i choć zniszczyłyby nowotwór, to spowodowałyby śmierć pacjenta. Pomyślano więc, żeby najpierw wyposażić komórki krwiotwórcze pacjenta w glikoproteinę P, a dopiero potem poddać go chemioterapii w wysokiej dawce. W tym celu izoluje się macierzyste komórki krwiotwórcze pacjenta, wprowadza się do nich gen *MDR*, zapewniając w nich odpowiednio wysoką ekspresję glikoproteiny P, i zwraca się je ponownie pacjentowi. Teraz można mu podać nawet kilkakrotnie wyższą dawkę leków w porównaniu z dawką normalnie dopuszczalną. Pomysł ten realizuje się już obecnie w kilku próbach klinicznych, między innymi w leczeniu raka sutka, raka jajnika, raka pęcherza i chłoniaka niezłośliwego.

Wiele emocji budzi terapia genowa oparta na wprowadzaniu do komórek nowotworowych — pozostałych w miejscu usuniętego chirurgicznie guza — antyonkogenu, który w komórkach tego nowotworu uległ unieczynnieniu. Pierwsze próby terapii genowej z zastosowaniem antyonkogenu *p53* podjęto w przypadku raka płuc. Do ognisk nowotworowych wprowadzono prawidłowy gen *p53* przy użyciu bronchoskopu lub igły pod kontrolą

aparatu rentgenowskiego. Otrzymano zachęcające wyniki. U trzech spośród dziewięciu pacjentów zaobserwowano regresję guza. Kolejne próby tej terapii podjęto nie tylko w przypadku raka płuc, ale także raka głowy i szyi, w przypadku raka wątroby oraz w przypadku innych nowotworów. Warto dodać, że wzmaga ona działanie chemioterapii i radioterapii. W raku jajnika próbuje się z kolei wprowadzać do komórek nowotworowych antyonkogen *BRCA1*. Terapia oparta na podawaniu *p53* jest pierwszą zatwierdzoną terapią genową na świecie. Została dopuszczona w Chinach do leczenia raka głowy i szyi [8]. Należy wspomnieć, że próbuje się również tak zmodyfikować antyonkogeny, żeby skuteczniej sprawowały swoje funkcje supresji nowotworów. Niestety niektóre zmienione w ten sposób antyonkogeny zmniejszają co prawda ryzyko rozwoju nowotworu, ale za cenę przyspieszonego starzenia się.

Interesującym podejściem w terapii genowej nowotworów jest użycie tak zwanych wirusów onkolitycznych [9]. Najbardziej zaawansowane są próby stosowania u pacjentów chorujących na raka głowy i szyi adenowirusa Onyx-015, który wydaje się wybiórczo niszczyć komórki nowotworowe ze zmutowanym antyonkogenem *p53*.

Dla powstania nowotworu często dominujące znaczenie ma aktywacja protoonkogenu, przekształcająca go w onkogen, który w sposób niekontrolowany pobudza proliferację komórek lub — rzadziej — chroni je przed apoptozą. W tych przypadkach pomyślano o metodach, które blokowałyby czynność takiego onkogenu. Do tego celu próbuje się stosować tak zwane oligonukleotydy antysensowne, rybozomy albo mały interferujący RNA (siRNA, *small interfering RNA*). Czynniki te są komplementarne dla nici określonego RNA, hybridując w związku z tym tylko z mRNA, na którego matrycy ma powstać produkt białkowy określonego onkogenu. W wyniku tego połączenia swoiście blokują one ekspresję określonego onkogenu. Przeprowadzono już wiele prób inaktywacji określonych onkogenów przy użyciu oligonukleotydów antysensownych u chorych na różne nowotwory, ale jak na razie ten kierunek poszukiwań nie dał zachęcających wyników [10]. Rybozomy blokujące funkcje określonych genów HIV próbowano stosować u pacjentów z AIDS, natomiast siRNA, między innymi do hamowania syntezy VEGF (*vascular endothelial growth factor*) u chorych ze związaną z wiekiem degeneracją siatkówki i u pacjentów z AIDS, którzy nie odpowiadają na stosowaną standardowo terapię wielolekową.

Wdzięcznym obiektem terapii genowej jest hemofilia. Wynika to z tego, że nawet jeżeli w następstwie terapii genowej uzyska się poziom czyn-

nika krzepnięcia VIII lub IX około 2% normy, chro- ni się już leczone dziecko przed najbardziej uciąż- liwymi powikłaniami hemofilii, jakimi są sponta- niczne wylewy do mięśni i stawów, które prowadzą nieuchronnie do kalectwa. W próbach terapii ge- nowej w hemofilii uzyskano już nawet poziom czynnika krzepnięcia rzędu kilkunastu procent normy, ale jak na razie, niestety tylko przejściowo.

W próbach leczenia choroby wieńcowej lub choroby naczyń obwodowych wprowadza się do- mięśniowo lub dotętniczo geny dla czynników sty- mulujących powstawanie naczyń, takich jak: czyn- nik wzrostu śródbłonna naczyń, czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik wzrostu hepatocytów i czyn- nik indukowany przez hipoksję [11].

Zachęcające są wstępne wyniki prób leczenia przy użyciu terapii genowej wrodzonej degenera- cji siatkówki [12]. Jeżeli chodzi o schorzenia neu- rologiczne, to bardzo zaawansowane wydają się próby terapii genowej w chorobie Parkinsona [13]. W próbach tych wprowadza się między innymi gen dla dekarboksylazy kwasu glutaminowego do ją- der niskowzgórzowych mózgu, który odpowiada za syntezę neurotransmitera o właściwościach hamu- jących — kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. W innej pró- bie wprowadzano do prądkowia gen dla hydro- ksylazy tyrozyny — nadający zdolność do syntezy L-dopa lub do skorupy (*putamen*) gen dla neurtu-

ryny, która jest białkiem neurotropowym podob- nym do czynnika neurotrofowego pochodzącego z komórek glejowych. Z kolei w chorobie Alzheim- era prowadzone są próby wprowadzania do mózgu pacjentów autologicznych fibroblastów, wyposa- żonych w gen dla czynnika wzrostu nerwu.

## Piśmiennictwo

1. Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 — a update. *J. Gene Med.* 2007; 9: 833–842.
2. Flotte T.R. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *Cell. Physiol.* 2007; 213: 301–305.
3. Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G.P., Soulier J., Lim A., Morillon E. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovi- rus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 3132–3142.
4. Thrasher A.J. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 2008; 28: 457–471.
5. Prados J., Melguizo C., Boulaiz H., Marchal J.A., Aranega A. Cancer gene therapy: strategies and clinical trials. *Cell. Mol. Biol.* 2005; 51: 23–36.
6. Podhajcer O.L., Lopez M.V., Mazzolini G. Cytokine gene transfer for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18: 183–194.
7. Leen A.M., Rooney C.M., Foster A.E. Improving T cell therapy for cancer. *Ann. Rev. Immunol.* 2007; 25: 243–265.
8. Jia H. Gene therapy finds welcoming environment in China. *Nature Med.* 2006; 12: 263.
9. Liu T.C., Kirn D. Gene therapy progress and prospects in can- cer: oncolytic viruses. *Nature Med.* 2008; 15: 877–884.
10. Gleave M.E., Monia B.P. Antisense therapy for cancer. *Nature Rev. Cancer* 2005; 5: 468–479.
11. Rissanen T.T., Yla-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol. Ther.* 2007; 15: 1233–1247.
12. Miller J.W. Preliminary results of gene therapy for retinal de- generation. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2282–2284.
13. Alton E., Ferrari S., Griesenbach U. Progress and prospect: Gene therapy clinical trials (Part 1). *Gene Ther.* 2007; 14: 1439–1447.