

# Terapia genowa nowotworów

## Cancer gene therapy

### Streszczenie

Terapia genowa jest stosunkowo nową i szybko rozwijającą się gałęzią leczenia nowotworów. Polega na zmianie genomu komórki poprzez wprowadzenie znanego genu za pomocą wektorów wirusowych (adenowirusy, retrowirusy, lentiwirusy, AAV *Adeno-associated virus*, wirusy opryszczki, hybrydowe wektory wirusowe) oraz niewirusowych. Niszczenie komórek nowotworowych obejmuje różne strategie pośrednie i bezpośrednie. Wydaje się, że dzięki terapii genowej uda się w przyszłości skutecznie leczyć wiele chorób, w tym nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** terapia genowa nowotworów, wektory, nośniki niewirusowe, perspektywy terapii genowej.

### Abstract

The gene therapy is a relatively new and quickly expanding method of cancer treatment. It consists in changing of the genome of a cancerous cell by inserting an already known gene with the help of vectors, either viral (adenovirus, retrovirus, lentivirus, AAV, Herpes Simplex Virus and hybrid viral vectors) or non-viral. Destruction of the cancerous cells includes various direct and indirect strategies. It seems that in the future thanks to the gene therapy we can successfully cure many diseases, among others – the cancer.

**Key words:** cancer gene therapy, viral vectors, non-viral vectors, perspectives of gene therapy.



**Marcin Szwarz**  
student V roku  
Wydz. Farmaceutycznego WUM

Zatwierdzono do publikacji: styczeń 2014 r.

Zarówno w Polsce, jak i na całym świecie, nowotwory stanowią ogromny problem zdrowotny. W samym roku 2010 zgłoszono w Polsce ponad 140,5 tys. nowych zachorowań na nowotwory złośliwe, przy czym zanotowano prawie 92,5 tys. zgonów z tego powodu. Mimo dostępu do nowoczesnych terapii i leków, nowotwory są drugą najczęstszą przyczyną zgonów ogółem, jednocześnie zajmując pierwsze miejsce wśród czynników powodujących śmierć przed 65. rokiem życia. Ze względu na skalę problemu terapia nowotworów jest na świecie jednym z najczęstszych tematów badań naukowców. Od 1866 roku, kiedy to Lissauer zaobserwował regresję objawów u chorych na białaczkę szpikową leczonych niewielką dawką roztworu Fowlera (zawierającego arsenian potasu), zyskano bogaty arsenał broni do walki z tą chorobą. Jedną z nich jest terapia genowa.

W ludzkich organizmach, liczących średnio ponad  $10^{14}$  komórek, codziennie dochodzi do licznych mutacji. Te najgroźniejsze, gdy nie zostaną naprawione, mogą okazać się powodem transformacji komórki w ko-

mórkę nowotworową. W procesie rozwoju nowotworu, w komórkach potomnych dochodzi zwykle do przyspieszonej akumulacji dalszych mutacji, polegających na utracie, amplifikacji i przemieszczeniu wielu genów oraz wtórnych zaburzeniach ich ekspresji. Prowadzi to do postępującej dezintegracji genomu. W dalszej mikroewolucji komórkowej dochodzi do wyłonienia dominującego klonu tworzącego ostatecznie guz nowotworowy. Komórki nowotworowe charakteryzuje niepojętym rozplem spowodowany utratą kontroli nad procesami regulującymi proliferację komórek, ich apoptozę, różnicowanie się oraz zdolności do samonaprawy zmian mutacyjnych.

Pierwotną przyczyną choroby nowotworowej jest zmiana w genomie, a więc genetyczne zróżnicowanie komórek nowotworowych od zdrowych. Dlatego terapia genowa wydaje się być doskonałą bronią do walki z tą chorobą.

### Nośniki genów

Podstawowym problemem terapii genowej jest znalezienie optymalnego nośnika -

wektora. Jego zadaniem jest wydajny transfer genu do komórek (szczególnie w przypadku terapii *in vivo*) w sposób selektywny i kontrolowany. Obecnie wykorzystuje się wektory wirusowe, bakteryjne, plazmidowe oraz całą gamę nośników syntetycznych.

**Wektory wirusowe** są, jak dotąd, najbardziej skutecznymi nośnikami używanymi do transferu genów. Nośniki takie pozyskuje się zastępując część genów wirusowych genem terapeutycznym. Dodatkowo – często wprowadza się promotory tkankowe i nowotworowo swoiste (ich ekspresja jest największa w konkretnych tkankach). Nawet gdy konieczna jest ścisła regulacja ekspresji genu terapeutycznego, wykorzystuje się promotory regulowane (naturalne, np. promotor erytropoetyny, którego aktywacja zależy od stężenia parcjalnego tlenu, lub systemy, których ekspresja jest regulowana przez substancję egzogenną, np.: system tetracyklinowy aktywowany w obecności tetracykliny lub doksycykliny). Jako wektory wirusowe wykorzystuje się rekombinowane adenowirusy, retrowirusy, lentiwirusy, AAV (*Adeno-associated virus*), wirusy opryszczki oraz tworzy się hybrydowe wektory wirusowe (jednym z przykładów może być kombinacja adenowirusów z wektorami AAV). Każdy z powyższych wektorów posiada zarówno zalety, jak i ograniczenia. Dlatego tak ważny jest odpowiedni dobór wirusa do

konkretnej terapii. Retrowirusy są dobrym wyborem przy terapii *ex vivo*, np. przy wykorzystaniu komórek macierzystych, ze względu na możliwość uzyskania długotrwałej ekspresji transgenu spowodowanej wbudowywaniem genów wirusowych do genomu gospodarza, bez ryzyka wystąpienia mutacji insercyjnych w komórkach innych niż docelowe. Najważniejsze zalety i ograniczenia wektorów wirusowych zebrano w tabeli.

Nośniki niewirusowe zdobywają coraz większą popularność pomimo faktu, że praktycznie wszystkie próby kliniczne terapii genowej są prowadzone przy użyciu wektorów wirusowych. Można nimi dość łatwo i bezpiecznie manipulować (wprowadzenie wirusowych wektorów obecnej generacji do organizmu może wiązać się z ryzykiem rekombinacji genetycznej *in vivo*). Ponieważ metody fizyczne wprowadzania DNA plazmidowego do komórki (mikroiniekcja, elektroporacja, sonoporacja, bombardowanie cząstkami przy użyciu tzw. pistoletu genowego) ograniczają się praktycznie do terapii *ex vivo*, więcej uwagi poświęca się badaniom nad metodami transferu genów z udziałem związków chemicznych (nośników). Konstrukcja takiego nośnika musi uwzględniać wiele przeszkód, jakie napotka on w czasie terapii.

Istotne cechy idealnego nośnika niewirusowego to:

- zdolność kondensowania i ochrony przenieszonego DNA przed degradacją
- zdolność przyłączania się do docelowych komórek w bardzo swoisty sposób
- zdolność wnikania do komórek w drodze fuzji lub endocytozy (w przypadku endocytozy – powodowania endosmolizy)
- zdolność transportowania transgenu do jądra komórki.

Kondensacja DNA jest podstawowym wymogiem dla nośnika niewirusowego. Im mniejszy będzie taki kompleks (nośnik-DNA), tym wydajniejsza będzie transfekcja. Ponadto „nagie DNA” posiada, podobnie jak błona komórkowa, ładunek ujemny, zatem kompleks o ładunku dodatnim będzie dodatkowo ułatwiał wnikanie transgenu do cytoplazmy. Ochrona przed degradacją jest nie mniejszym problemem. Jedną z najważniejszych cech choroby nowotworowej jest występowanie przerzutów

Tabela

**Zalety i ograniczenia stosowania wektorów wirusowych w terapii genowej**

Wektory	Zalety	Ograniczenia
Adenowirusy	Duża wydajność transdukcji <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> , także komórek nie dzielących się Wysoki poziom ekspresji transgenu Możliwość uzyskiwania preparatów wirusa o wysokim mianie	Silna odpowiedź immunologiczna na białka wirusa i infekowane komórki, uniemożliwiająca wielokrotne podawanie Cytotoksyczność Krótkotrwała ekspresja transgenu (brak integracji z genomem)
Retrowirusy	Długotrwała ekspresja transgenu (integracja)	Wprowadzenie transgenu możliwe tylko do komórek dzielących się Możliwe mutacje insercyjne (przypadkowa integracja z genomem) Zastosowanie ograniczone głównie do transdukowania komórek <i>ex vivo</i>
Lentiwirusy	Transdukują także komórki nie dzielące się Długotrwała ekspresja transgenu Wydajnie wprowadzają transgeny do komórek macierzystych szpiku	Możliwe mutacje insercyjne (integracja z genomem) Trudna konstrukcja i kontrola jakości
AAV	Mała immunogenność Wydajnie transdukują szeroki zakres komórek <i>in vivo</i> , także komórki nie dzielące się. Długotrwała ekspresja transgenu <i>in vivo</i> (integracja)	Możliwe mutacje insercyjne (integracja z genomem) Trudna konstrukcja i kontrola jakości Możliwość zanieczyszczenia preparatu wirusa AAV adenowirusem
Wirusy opryszczki	Transdukują komórki nie dzielące się Można wprowadzać duże transgeny (około 15 kbp) Neurotropizm	Krótkotrwała ekspresja transgenu (brak integracji z genomem) Niskie miana

(na podst. Szala S. (red.), *Terapia genowa*, Warszawa 2003)

i ich rozsiew, dlatego najskuteczniejsze nośniki będą docierały nawet do miejsc odległych od pierwotnego ogniska nowotworu. Dla przykładu polimery PEI (polietylenoiminy) z podstawionymi 600 grupami cetylowymi (-C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>) wykazują zwiększoną odporność na degradację w surowicy (jednak mniejszą dostępność przenieszonego DNA dla mechanizmu transkrypcyjnego komórki). Mniejszą (w porównaniu z wirusami) wydajność transferu DNA próbuje się zwiększać za pomocą różnego rodzaju modyfikacji, na przykład za pomocą nośników wykorzystujących swoiste receptory na powierzchni komórek docelowych. Wydajność uwalniania kompleksów nośnik-DNA z endosomów do cytoplazmy jest uzależniona od obecności w nośniku składnika zdolnego do destabilizacji błony endosomu (w przeciwnym wypadku w dojrzałym endosomie aktywacja enzymów litycznych prowadzi do zniszczenia kompleksu i degradacji DNA). Składnikiem takim może być fosfatydyloetanolamina (DOPE) lub podjednostki pewnych toksyn bakterii z ro-

dzaju *Pseudomonas* i *Diphtheria*, a nawet elementy strukturalne niektórych wirusów (np. fragment hemaglutyniny wirusowej). W celu zwiększenia wydajności transferu transgenu do jądra stosuje się w konstrukcji nośników wirusowe sygnały lokalizacji jądrowej, nierzadko w połączeniu z innymi białkami.

Przy wykorzystaniu metod niewirusowych w transferze transgenów musi być zoptymalizowanych wiele czynników. Jednak nietrudno wyobrazić sobie, że w przyszłości terapia genowa opierać się będzie na wektorach całkowicie syntetycznych, wykorzystujących szereg mechanizmów znanych z cytofizjologii i wirusologii. Wydaje się, że konstrukcja takich nośników będzie umożliwiała naukowcom bezpieczną manipulację i kontrolę nad losami transgenu, a terapia genowa stanie się najskuteczniejszą bronią do walki z nowotworami.

**Terapia nowotworów**

Źródłem procesu nowotworzenia są zaburzenia w funkcjonowaniu genów spowo-

dowane przez szereg mutacji kumulujących się w materiale genetycznym przez dziesięciolecia. Ich ilość w genomie komórki jest wypadkową siły działania egzogennych czynników mutagennych, aktywności układów detoksykacyjnych organizmu i sprawności mechanizmów naprawy DNA.

Istnieje kilka strategii terapii genowej w walce z nowotworem.

Pierwszą z nich jest zmiana „złośliwego” fenotypu. Polega ona na naprawie lub zablokowaniu ekspresji zmutowanych genów, w wyniku czego uniemożliwiany jest podział komórki nowotworowej lub nawet zmuszenie jej do apoptozy. Wiele prób klinicznych polegało na wprowadzaniu prawidłowego genu p53, najbardziej znanego supresora transformacji nowotworowej (jest on zmutowany w większości typów nowotworów). Mimo że tylko niewielki odsetek pacjentów (około 10 proc.) zareagowało na leczenie, metoda ta jest udoskonalana poprzez modyfikacje genu p53 i wektorów. Strategia swoistego hamowania ekspresji zmutowanego genu może wykorzystywać m.in.: antysensowne nukleotydy, rybozomy (enzymatyczne RNA), deoksyrybozomy (enzymatyczne oligonukleotydy DNA) lub niskozłączone, interferujące RNA (siRNA). Z ich pomocą próbuje się hamować ekspresję onkogenów (np.: *k-ras*, *c-fos*, *c-myc*, *bcr-abl*, *c-myb*), obecnych w wielu rodzajach nowotworów. Wykorzystuje się również do hamowania ekspresji genu oporności wielolekowej (*mdr1*), łączonego z chemioopornością nowotworów, w celu uwrażliwienia komórek nowotworowych na podawane chemioterapeutyki.

Kolejną strategią wykorzystywaną w terapii genowej nowotworów jest bezpośrednia eliminacja komórek nowotworowych. Czasem gen kodujący próbuje się wprowadzić do komórek nowotworowych licząc, że w wyniku jego ekspresji komórki te zostaną zabite. Niekiedy próbuje się wprowadzać gen kodujący toksyczne białko do komórek nowotworowych, który po ekspresji zabiłby ją. Jednak trzeba pamiętać, że taki schemat postępowania jest uzależniony od swoistości transferu genu.

Częściej wykorzystuje się tzw. geny samobójcze, które kodują białka przekształcające nietoksyczny substrat (prolek) w toksyczne metabolity, indukujące apoptozę w tych komórkach. Kolejną próbą jest wykorzystanie genów pro-

apoptotycznych, kodujących endogenne białka indukujące apoptozę. Jednak ze względu na to, że wywołują one apoptozę we wszystkich komórkach, niezwykle ważne jest zapewnienie ograniczenia ich ekspresji jedynie do komórek nowotworowych. Ten problem zdaje się być rozwiązany przy wykorzystaniu wirusowych genów proapoptotycznych (np. *e4orf4*), które indukują apoptozę jedynie w stransformowanych komórkach nowotworowych. Również niektóre wirusy indukują lizę wyłącznie komórek nowotworowych (tzw. wirusy onkolityczne), na przykład adenowirus ONYX-015 replikuje się jedynie w komórkach nowotworowych ze zmutowanym genem supresorowym p53.

Niezwykle ciekawe są próby wykorzystania bakterii beztlenowych mogących rozwijać się tylko w warunkach niedotlenienia (hipoksji). Ze względu na ogromną ilość tlenu, którego potrzebują rosnące guzy nowotworowe, praktycznie zawsze znajdują się one właśnie w stanie hipoksji. Bakterie beztlenowe, po odpowiednich modyfikacjach genetycznych, wykorzystywane są jako swoisty wektor do wprowadzania genów samobójczych w rejony niedotlenienia.

Niezwykle ważny dla strategii bezpośredniej eliminacji komórek nowotworowych jest fakt, że toksyczne metabolity powstające w zmodyfikowanych genetycznie komórkach mogą przenikać na zewnątrz i niszczyć sąsiednie komórki niezmodyfikowane. Efekt ten często nazywany jest efektem sąsiedztwa (*bystander effect*) i zwiększa powodzenie leczenia terapii guzów nowotworowych. Kolejną zaletą jest to, że niszczone komórki nowotworowe uwalniają antygeny, które mogą być prezentowane przez komórki dendrytyczne i uaktywniać dodatkową odpowiedź immunologiczną.

W eliminacji komórek nowotworowych można wykorzystywać także bardziej pośrednie metody. Przeprowadzono wiele badań mających na celu stymulowanie organizmu do walki z nowotworem. Wykorzystuje się w tym celu m.in. endogenne białka modyfikujące odpowiedź immunologiczną – cytokiny. Duże, miejscowe ich stężenie (uzyskane np. po podaniu doguzowym) dość efektywnie stymuluje układ odpornościowy do walki z nowotworem. Innym sposobem jest wykorzystanie tzw. szczepio-

nek genetycznych, których zadaniem jest mobilizowanie organizmu do walki przeciwko konkretnym antygenom nowotworowym. Można to uzyskać przez pobranie od pacjenta komórek jakiegoś układu odpornościowego i zmodyfikowanie ich genetycznie. Zmienione w ten sposób „superkomórki” skuteczniej atakują nowotwór.

Niezwykle ciekawa, z punktu widzenia teoretycznego, jest strategia antyangiogenna. Ma ona na celu zahamowanie rozwoju naczyń krwionośnych odżywiających guzy nowotworowe i w wyniku tego uniemożliwić jego wzrost (w tym celu wprowadza się geny kodujące endogenne inhibitory angiogenezy).

Niezależnie, która ze strategii okaże się najskuteczniejsza, trzeba pamiętać, że nowotwory są wyjątkowo zróżnicowaną grupą chorobową i mają niezwykłą zdolność do adaptacji oraz nabywania oporności na leczenie. Dobrym przykładem może być genom raka piersi. W badaniach przeprowadzonych na greckim uniwersytecie w Janinie wykryto 27 173 mutacji w guzie pierwotnym raka piersi, natomiast w komórkach przerzutowych w mózgu znaleziono ich ponad 51 700.

## Podsumowanie

Od pierwszych prób klinicznych w zakresie terapii genowej nowotworów minęło ponad dwadzieścia trzy lata. Od tamtego czasu przeprowadzono tysiące badań, odkryto wiele nowych mechanizmów i zaproponowano nowe strategie leczenia. Mimo to przed terapią genową jest wiele nierozwiązanych problemów i trudności. Nadal dalecy jesteśmy od metody, która umożliwi całkowite zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych bez naruszania przy tym tych zdrowych. Jednak z każdym rokiem przeprowadza się coraz więcej badań klinicznych przy udziale terapii genowej (w 2013 roku zarejestrowano ich ponad 1970), w tym ponad 65 proc. dotyczyła nowotworów. Wydaje się, że XXI wiek będzie czasem ingerencji w genom ludzki i realne stanie się rozszyfrowanie tajemnic ukrytych w ludzkim DNA, co umożliwi stosowanie terapii genowych w skutecznym leczeniu chorób nowotworowych.

Adres do korespondencji:  
marcin.szwarz90@gmail.com.

Wykaz literatury u autora