

Inżynieria genetyczna jako metoda leczenia ludzkich chorób

Obietnica na przyszłość



ALICJA JÓZKOWICZ
JÓZEF DULAK
Uniwersytet Jagielloński, Kraków
alicia@mol.uj.edu.pl
jdulak@mol.uj.edu.pl

Dr hab. Alicja Józkowicz bada powstawanie naczyń krwionośnych oraz testuje wektory wirusowe w terapii genowej



Choroba genetyczna? Nic prostszego: wystarczy zmienić wadliwy gen na prawidłowy. Ta prosta w teorii idea okazuje się bardzo trudna w praktyce

Prof. dr hab. Józef Dulak zajmuje się biotechnologią medyczną oraz biologią naczyniową, a zwłaszcza procesami angiogenezy i waskulogenezy



Prof. dr hab. Stanisław Szala pracuje nad naczyniami nowotworowymi jako celem terapii przeciwnowotworowej

terapii genowej, którą definiuje się jako leczenie chorób za pomocą kwasów nukleinowych, zarówno genów – cząsteczek, w których zapisana jest informacja o budowie białka – jak i tzw. niekodujących sekwencji DNA lub RNA. Niestety, ma ona głównie charakter eksperymentalny, ponieważ jej stosowanie okazało się znacznie trudniejsze, niż początkowo przypuszczano.

Optymistyczne początki

Pierwsza udana transformacja genetyczna komórek ssących miała polski akcent: przeprowadzona została w roku 1962 przez pracującego na Uniwersytecie Wisconsin polskiego uczonego Wacława Szybalskiego i jego żonę Elizabeth. Wprowadzili oni fragmenty prawidłowego DNA genomowego do ludzkich fibroblastów, w których upośledzony był metaboliczny szlak rezerwowej syntezy nukle-

Czekający na terapię chłopiec chory na niewydolność układu odpornościowego żyje w sterylnym „akwarium”. Jego starszy kolega dzięki udanej terapii genowej znajduje się już po drugiej stronie



otydów. To wtedy profesor Szybalski po raz pierwszy użył terminu „terapia genowa”, sugerując, że w przyszłości możliwe będzie modyfikowanie genomu w celu leczenia chorób.

Wyniki doświadczeń na zwierzętach uzasadniały optymizm, z jakim przystąpiono do prób klinicznych. Pierwszą z nich przeprowadzono w roku 1990 w Stanach Zjednoczonych. Chorobą z wyboru był wrodzony niedobór odporności (SCID), wynikający z mutacji w genie deaminazy adenozykowej (ADA). Chorzy na SCID muszą spędzać całe życie odizolowani od otoczenia, ponieważ każda infekcja stanowi zagrożenie dla ich życia. Od czteroletniej dziewczynki chorej na niedobór odporności pobierano leukocyty i w laboratorium wprowadzano do nich prawidłowe kopie genu ADA. „Wyleczone” w ten sposób komórki ponownie podawano dziecku. Dziś ta już młoda kobieta jest zdrowa i prowadzi normalne życie, choć nie wiadomo, na ile jej wyleczenie było efektem terapii genowej, a na ile towarzyszącymi terapii zastrzykami z enzymem ADA. Niemniej w kolejnych próbach u kilku innych pacjentów zastosowano wyłącznie terapię genami i także osiągnięto istotną poprawę. Takie wyniki nie tylko nie osłabiły optymizmu badaczy, ale sugerowały, że w krótkim czasie terapia genowa stanie się skuteczną metodą leczenia wielu chorób.

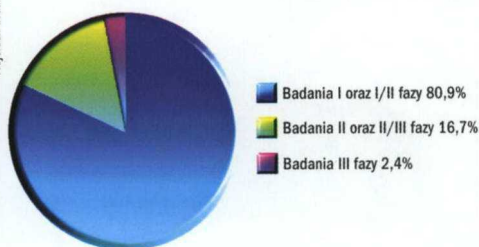
Zderzenie z rzeczywistością

Wprowadzenie genu do komórki w taki sposób, żeby zadziałał, jest jednak bardzo trudne. Można próbować robić to na wiele sposobów. Aby wprowadzić transgen (czyli gen obcy, pozakomórkowy) do mięśni szkieletowych, wystarczy np. wstrzyknąć do nich roztwór z tym genem (w postaci plazmidu). W doświadczeniach na królikach, u których wcześniej wywołaliśmy niedotlenienie kończyn, wprowadzenie genu kodującego VEGF (białko stymulujące powstawanie naczyń krwionośnych) prowadziło do nasilenia angiogenezy i znaczącej poprawy przepływu krwi.

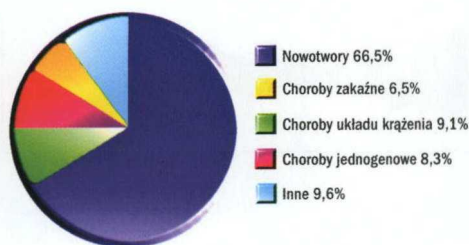
Podobną strategię próbowano stosować w klinice. Wyniki pierwszych eksperymentów zespołu nieżyjącego już profesora Jeffreya Isnera były bardzo obiecujące. Obserwowano tworzenie się nowych naczyń, a u niektórych chorych podanie plazmidu znacznie poprawiło stan zdrowia. Niestety, później okazało się, że opisywane efekty są

Wojciech Biedrzycki

A. Fazy prób klinicznych terapii genowych



B. Choroby leczone w próbach klinicznych terapii genowych



Większość stosowanych na świecie terapii genowych wciąż znajduje się na etapie prób klinicznych w różnych fazach badań (A); obecnie metody takie najczęściej testuje się do leczenia nowotworów (B), (wg. www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

przede wszystkim wynikiem samego zabiegu, a nie syntezy białka z wprowadzonego genu, która była bardzo słaba.

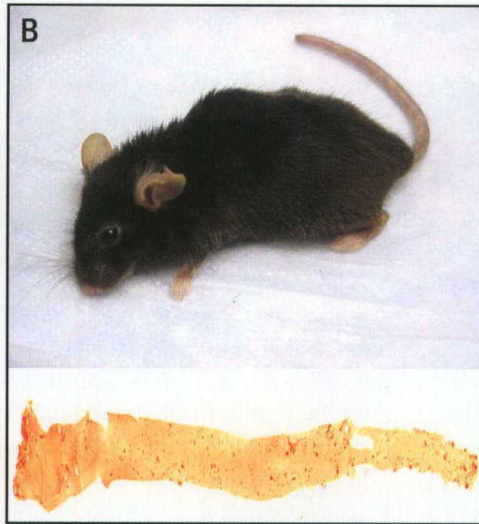
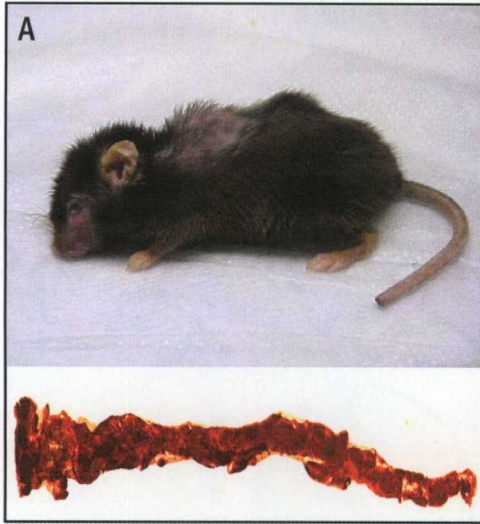
Trudności z wyrażaniem

Aby móc uzyskać wysoki poziom ekspresji genu, konieczne było zastosowanie innej metody: tzw. wektorów wirusowych. Wektor to nośnik genów, a wektor wirusowy to specjalnie przygotowany wirus, w którym geny niezbędne dla życia wirusa zastępuje się genem, który chcemy wprowadzić do komórek (tzw. transgenem). Dzięki temu wirus nie może się namnażać, zachowuje jednak zdolność wprowadzania genów do komórek. Obecnie najczęściej stosuje się wektory adenowirusowe (zbudowane na bazie pewnej klasy wirusów zwanych adenowirusami) ze względu na ich dużą skuteczność. Mają one jednak poważną wadę: wywołują silną reakcję układu odpornościowego. Stanowi to zagrożenie zdrowia, a nawet życia biorcy, a jednocześnie komórki, które pobrały wirusa, są specyficznie niszczone przez układ immunologiczny. Silna reakcja na podanie wektorów adenowirusowych stała się w 1999 roku przyczyną śmierci jednego z pacjentów. Po tej tragedii wstrzymano na pewien czas wszystkie próby kliniczne z wykorzystaniem adenowirusów.

Obecnie adenowirusy są wykorzystywane przede wszystkim w próbach leczenia nowotworów, gdyż w tym przypadku aktywacja układu odpornościowego może nawet zwiększyć efektywność terapii. Na bazie adenowi-

Inżynieria genetyczna jako metoda leczenia ludzkich chorób

Obie te myszy urodziły się chore, uszkodzenie genu *apoE* prowadzi do ciężkiej miażdżycy. Mysz na zdjęciu po prawej stronie poddano leczeniu wektorem adenowirusowym typu *gutless* zawierającym cDNA z prawidłowym *apoE*. Kontrolne zwierzę po lewej stronie cierpi na silną miażdżycę. Na dole tętnice szyjne wybarwione czerwienią olejową uwidaczniającą blaszki miażdżycowe



Alicja Józkowicz

rusa powstał Gendicine, pierwszy na świecie nośnik zaaprobowany do leczenia guzów szyi i głowy w Chinach. W połączeniu z radioterapią znacząco wydłuża on życie pacjentów.

Wirus bez wnętrza

Najlepszym rozwiązaniem wspomnianego problemu okazało się usunięcie z genomu adenowirusa wszystkich kodujących sekwencji DNA, czyli stworzenie wektorów *gutless* (z ang. oznacza wektor „bez wnętrzości”). Za ich pomocą badacze z zespołu Lawrence’a Chana z Houston (w tym jedno z nas, Alicja Józkowicz) byli w stanie całkowicie zablokować rozwój miażdżycy u myszy pozbawionych genu *apoE*, nie wywołując przy tym żadnych skutków ubocznych. Efekt utrzymywał się przez całe życie zwierzęcia, czyli przez ponad 2,5 roku. Wektory *gutless* nie są jednak pozbawione wad – białka kapsydu wirusa wciąż mogą aktywować układ odpornościowy, a mało wydajna metoda produkcji utrudnia ich stosowanie w próbach klinicznych.

Większe nadzieje można wiązać z łatwiejszymi do uzyskania wektorami AAV, z których również usuwa się wszystkie geny wirusowe. Stosując je, osiągnano długotrwałą poprawę objawów hemofilii lub dystrofii mięśniowej nie tylko u myszy, ale i u większych zwierząt – psów i rebusów. Obiecujące wyniki uzyskano też w próbach klinicznych, np. w leczeniu choroby Parkinsona. Kilka miesięcy temu pojawiło się doniesienie o przypadku śmierci pacjentki cierpiącej na reumatoidalne zapalenie stawów, której podano wektor AAV z genem terapeutycznym. Okazało się jednak,

że przyczyną tego tragicznego zdarzenia nie był wektor, ale efekty uboczne innego leku.

Wobec powyższych trudności próbuje się stosować także inną strategię. Komórki są modyfikowane genetycznie pozaustrojowo, a później wprowadzane do organizmu. Do tego celu nadają się wektory retrowirusowe, które wbudowują transgen do genomu. Jest to obecnie jedna z najczęściej wykorzystywanych strategii w próbach klinicznych terapii genowej. Ze stosowaniem retrowirusów wiąże się jednak pewne ryzyko, długo uznawane za teoretyczne. Nie możemy kontrolować, w jakie miejsce w genomie wbudowany zostanie wprowadzany gen. Może się znaleźć w okolicy tzw. onkogenów, czyli genów, których mutacje (zmiany) powodują powstanie nowotworu. Szansa na takie zdarzenie jest oczywiście minimalna, jednak jak się, niestety, okazało – realna. U kilkunastu leczonych chłopców modyfikacja komórek krwiotwórczych przyniosła zdecydowaną poprawę. Niestety, u trzech pacjentów w ciągu 2–3 lat rozwinęła się białaczka, która stała się przyczyną śmierci jednego z nich. Ten dramatyczny efekt uboczny był prawdopodobnie wynikiem integracji wektora w pobliżu onkogeny LMO2, stymulującego niekontrolowane podziały komórek. Próby kliniczne prowadzone we Francji zostały zawieszono do czasu opracowania bezpieczniejszych nośników.

Wektory retrowirusowe próbuje się wykorzystywać także w leczeniu nowotworów. W tym przypadku modyfikuje się komórki nowotworowe, wprowadzając do nich np. geny cytokin, tak by aktywowały układ odpornościowy. Badania takie od wielu lat pro-

wadzi w Poznaniu zespół profesora Andrzeja Mackiewicza. Niedawno opisano również obiecujące wyniki terapii przerzutującego czerniaka za pomocą limfocytów, do których wprowadzono geny receptorów rozpoznających charakterystyczne dla czerniaka białko MART-1. W założeniu zmodyfikowane limfocyty na swojej powierzchni wytwarzają receptory rozpoznające to białko i niszczą komórki, które białko to zawierają. U dwóch spośród kilkunastu chorych uzyskano znaczącą poprawę i zanik przerzutów.

Nie zawsze jednak terapia genowa ma na celu wprowadzanie genów, aby uzyskać produkcję określonego białka. Coraz więcej prób zmierza do hamowania niepożądanego aktywności genów. Wykorzystuje się przy tym niekodujące fragmenty DNA lub RNA wprowadzane do komórek bez pomocy wektorów. Obecnie największe nadzieje wiąże się z interferującymi cząsteczkami RNA (siRNA) oraz z aptamerami RNA (cząsteczkami wiążącymi się do białka VEGF). Próbuje się ich używać między innymi do leczenia pacjentów ze starczym, wysiękowym zwyrodnieniem plamki żółtej, które jest najczęstszą przyczyną utraty wzroku u osób powyżej 65. roku życia. Próby kliniczne oraz obserwacje lekarzy wskazują, że stosowane jako lek aptamery znacząco spowalniają utratę wzroku.

Oczarowani na wyrost

Na początku lat 90. mogło się wydawać, że terapia genowa wkrótce będzie powszechnie stosowana. Rozbudzenie dużych nadziei musiało przynieść rozczarowanie. Pierwsze optymistyczne doniesienia interpretowano dość bezkrytycznie. W mediach pojawiały się sensacyjne informacje o „przełomie” w leczeniu kolejnych chorób, mimo że prowadzono dopiero doświadczeniach na zwierzętach lub rozpoczynała się próba kliniczna. Nie sposób nie zauważyć, że społeczeństwo stosuje inną miarę do prób z tradycyjnymi lekami niż z kwasami nukleinowymi, traktując terapię genową

jako rodzaj nieuprawnionej „zabawy w Boga” i przekraczanie granic. Głośnym echem odbija się każde odnotowanie efektów ubocznych. Nie można ich lekceważyć, jednak warto pamiętać, że tylko w USA liczbę zgonów spowodowanych efektami ubocznymi leków ocenia się na ponad 15 tysięcy rocznie. Niestety, nie ma skutecznej terapii, która nie niesłaby żadnego ryzyka, istotna jest jednak ocena, jak duże jest to ryzyko w stosunku do korzyści.

Nadzieje i wyzwania

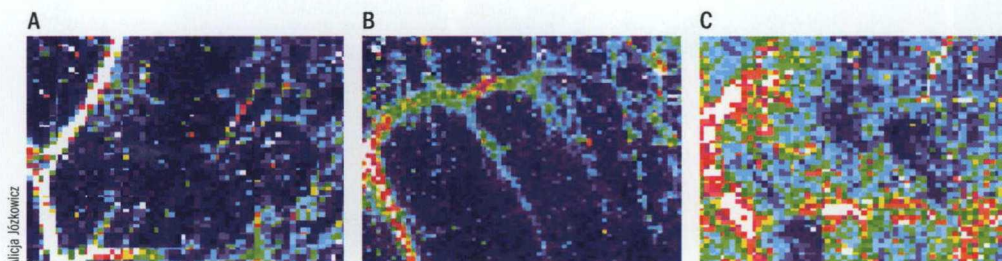
Jest realna nadzieja, że terapia genowa będzie wykorzystywana w leczeniu nowotworów - tu działanie kwasów nukleinowych może być krótsze, a aktywacja układu odpornościowego jest nawet pożądana. Ogromnym wyzwaniem pozostaje leczenie wrodzonych chorób genetycznych, gdyż wciąż brak bezpiecznego wektora umożliwiającego długotrwałą ekspresję transgenów. Coraz bardziej obiecujące stają się wektory hybrydowe łączące zalety różnych nośników, np. *gutless* i AAV, oraz takie, które umożliwiają wprowadzanie genów w ściśle zdefiniowane miejsce genomu (oparte na transpozonach). Innym pomysłem jest stosowanie transgenów, których aktywność można regulować (np. przez podwyższony poziom cholesterolu) lub które są aktywne jedynie w określonej tkance.

Mimo że dotychczas więcej było niepowodzeń niż sukcesów, wierzymy, że terapia genowa wciąż jest nadzieją medycyny i pozwoli pomóc pacjentom cierpiącym na nieuleczalne choroby. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Szala S. (2003). *Terapia genowa*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Van Rooij E., Olson E.N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*, 117, 2369-2376.
- Jazwa A., Józkowicz A., Dulak J. (2007). New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. *Current Gene Therapy*, 7, 7-23.

Leczenie genami testuje się na zwierzętach. Plazmid zawierający cDNA ludzkiego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF) zmienia przepływ krwi w niedotlenionym mięśniu. A - przepływ bezpośredni po indukcji niedotlenienia; B - po dwóch tygodniach od podania kontrolnego genu; C - po dwóch tygodniach od podania genu VEGF. Jaśniejszy kolor oznacza wyższe wartości przepływu



Alicja Józkowicz