

JERZY NOWAK

Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,

POSTĘPY TERAPII GENOWEJ CHOROÓB DZIEDZICZNYCH

Olbrzymi postęp, jaki dokonał się w ciągu ostatnich kilku lat w zakresie technologii transferu genu, można wytłumaczyć niezwykle atrakcyjnością nowego podejścia metodycznego w leczeniu chorób oraz dużymi możliwościami wykorzystania terapii genowej w przyszłości (KAY i Woo 1994). Wykorzystanie inżynierii genetycznej w leczeniu chorób genetycznych przez wiele lat rozważano w sferze naukowej fantazji (CULLITON 1992). Wraz z rozwojem metod badawczych pojawiły się realne przesłanki uzasadniające podjęcie pierwszych prób korekty zaburzeń genetycznych. Pierwszy eksperyment kliniczny z transferem genu deaminazy adenzynowej w celu leczenia ciężkiego, złożonego zespołu niedoboru odporności zakończył się powodzeniem. Aktualnie obserwujemy wręcz eksplozję badań terapii genowej i prób szybkiego zastosowania u ludzi uzyskiwanych wyników doświadczalnych w warunkach *in vitro* i na zwierzętach laboratoryjnych.

Potencjalne możliwości ingerencji w informację genetyczną człowieka w celach leczniczych obejmują terapię genową komórek somatycznych, terapię genową komórek rozrodczych, wzmocnienie genetyczne oraz genetyczną eugenikę (ANDERSON 1992). Z uwagi na możliwości techniczne, a przede wszystkim ze względów etycznych podejmowane eksperymentalne próby obejmują wyłącznie terapię genową komórek somatycznych. Od terapii genowej należy wyraźnie oddzielić czysto teoretyczny termin — genetyczną eugenikę, czyli poprawianie cech populacji człowieka, takich jak: inteligencja, charakter, osobowość dokonywane pod nadzorem instytucji państwowych. Początkowo wydawało się, że terapia genowa będzie ograniczona do chorób uwarunkowanych defektami genetycznymi. W klasycznym ujęciu terapia genowa polega na wprowadzeniu genu prawidłowego do komórki, która wykazuje jego brak lub posiada gen zmutowany. Bardzo szybko okazało się, że technologia transferu genu może być wykorzystana nie tylko w chorobach uwarunkowanych genetycznie, ale również w schorzeniach nowotworowych i infekcyjnych, jak na przykład w AIDS (GUTIERREZ i współaut. 1992, GILBOA i SMITH 1994). Perspektywicznie terapia genowa stwarza jakościowo nowe możliwości leczenia wielu chorób. Znakomita większość — około 70% zatwierdzonych i przygotowywanych protokółów prób klinicznych terapii genowej dotyczy chorób nowotworowych, znacznie mniej

chorób genetycznych. Aktualnie są stosowane różne formy terapii genowej. Najczęściej terapia genowa chorób genetycznych polega na wprowadzeniu genu prawidłowego przy pozostawieniu genu z defektem. Ponadto jest możliwa modyfikacja genu *in situ* zwana „chirurgią genową”, czyli wycinanie zmutowanego genu lub sekwencji i wprowadzanie prawidłowego odcinka DNA.

Teoretycznie większość chorób wywołana brakiem lub defektem jednego genu mogłaby być leczona poprzez wprowadzenie i ekspresję prawidłowego genu do odpowiednich komórek docelowych.

Podejmowane próby kliniczne leczenia chorób dziedzicznych transferem genu są zachęcające, w wielu przypadkach uzyskiwano znaczącą poprawę, jednakże dotychczas nie udało się całkowicie wyleczyć choroby dziedzicznej (ANDERSON 1992, MULLIGAN 1993).

Celem niniejszego opracowania jest omówienie możliwości i perspektyw zastosowania inżynierii genetycznej komórek somatycznych w leczeniu chorób genetycznych.

LECZENIE CHOROÓB GENETYCZNYCH

Większość genetycznie uwarunkowanych chorób człowieka jest dziedziczona w sposób recesywny. Szereg chorób jednogenowych charakteryzuje się ciężkimi objawami obejmującymi upośledzenie umysłowe, zaburzenia widzenia i słyszenia, zaburzenia metaboliczne i związane z nimi nieprawidłowości budowy ciała, wagi i wzrostu. Leczenie chorób uwarunkowanych genetycznie w większości przypadków polega na: ograniczeniach dietetycznych, uzupełnianiu brakujących czynników, na przykład witamin, kofaktorów, usuwaniu z organizmu substancji toksycznych powstałych w wyniku zaburzonej przemiany metabolicznej (NYHAN 1991). Oprócz leczenia dietetycznego w bardzo wielu zaburzeniach metabolicznych, uwarunkowanych genetycznie jest stosowana transplantacja całych narządów lub tkanek, głównie szpiku kostnego, znacznie rzadziej wątroby i nerek. Pomimo niewątpliwie pozytywnych wyników leczenia niektórych chorób metabolicznych, uwarunkowanych genetycznie, w znakomitej większości przypadków pełne wyleczenie jest niemożliwe, a uzyskiwane efekty lecznicze są krótkotrwałe. Z wyjątkiem przeszczepu szpiku, dzięki któremu można w zasadzie wyleczyć niektóre choroby genetyczne, pod warunkiem znalezienia tkankowo-zgodnego dawcy, bardzo często osiąga się tylko częściowo korektę występujących objawów chorobowych. Niektóre choroby uwarunkowane genetycznie mogą być leczone poprzez odpowiednią dietę, która jest uzupełniana lub z której są usuwane określone składniki pożywienia (SWEETMAN 1991). Na marginesie można dodać, że w przypadku wszystkich witamin mamy analogiczne uzupełnianie diety w substancje nie produkowane przez organizm z uwagi na brak odpowiednich genów. Uzupełnienie — suplementację kofaktorów — witamin można uznać za rodzaj skutecznego leczenia braku produkcji witamin przez organizm człowieka. Innym sposobem leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie jest usuwanie z organizmu gromadzących się, szkodliwych dla organizmu substancji (SCHNEIDER 1991). Przykładem może być choroba Wilsona, w której dochodzi do odkładania się w wątrobie i centralnym układzie nerwowym złogów związków

miedzi powodujących poważne objawy chorobowe, którym można zapobiec poprzez stosowanie środków wiążących i usuwających miedź z organizmu. W ciężkiej chorobie krwi — w talasemii, w której występuje defekt genu beta globiny, dochodzi do akumulacji dużych ilości związków żelaza powodujących uszkodzenie serca i wątroby, a u dzieci dodatkowo zaburzenia dojrzewania i wzrostu. Usuwanie z organizmu substancji sprzyja poprawie klinicznej chorých. Dalszą możliwością leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie jest podawanie brakujących enzymów (HERSHFIELD 1991). Przykładem jest ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency — SCID), w którym brak deaminazy adeniny prowadzi do bardzo ciężkiego zaburzenia odporności, z czym wiąże się duża skłonność do ciężkich infekcji, często kończących się śmiertelnie już w pierwszych latach życia. Podawanie deaminazy adenozyiny łącznie z glikolem polietylenowym wyraźnie poprawia stan zdrowia chorego, jednakże terapia ta jest niezwykle kosztowna. Inną możliwością leczenia chorób genetycznych są przeszczepy komórek lub tkanek (PARKMAN 1991). Wspomniany wyżej zespół SCID może być skutecznie wyleczony pod warunkiem przeszczepu szpiku kostnego całkowicie zgodnego antygenowo z chorym dzieckiem. Pomimo istnienia tylu możliwości terapii chorób uwarunkowanych genetycznie, koncepcja wprowadzenia funkcjonalnego genu do komórek lub tkanek chorego i całkowitego wyleczenia choroby genetycznej, jest niezwykle atrakcyjna zarówno dla badaczy, klinicystów i oczywiście samego pacjenta.

W wielu przypadkach chorób genetycznie uwarunkowanych nie jest wymagana ścisła regulacja poziomu brakującego enzymu, jak również utrzymywanie jego stężenia na poziomie identycznym do obserwowanego u osób zdrowych. W licznych chorobach metabolicznych objawy kliniczne nie występują w przypadku bardzo znacznego obniżenia stężenia brakującego enzymu, na przykład w hemofilii stężenie czynnika krzepnięcia IX w granicach 10%–20% wartości stwierdzanych u zdrowych osobników nie wywołuje żadnych objawów klinicznych. Dopiero dalszy spadek poniżej 1% wiąże się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia spontanicznych krwiaków dostawowych i zaburzeniami krzepnięcia niezwykle groźnymi w przypadku nawet drobnych urazów (skaleczenie, wyrwanie zęba). Leczenie transferem genu chorób metabolicznych na obecnym etapie wydaje się stosunkowo trudne. W większości przypadków do uzyskania efektu terapeutycznego jest konieczne wprowadzenie genu do komórki z defektem, która nie zawsze jest łatwo dostępna (np. komórki wątrobowe). Można przypuszczać, że w niektórych chorobach, jak na przykład w hemofilii ektopowa produkcja czynników krzepnięcia skutecznie usunie wszelkie objawy kliniczne. Natomiast w przypadku fenylketonurii trudno sobie wyobrazić, żeby hydroksylaza fenylalaniny produkowana w innym niż fizjologicznym miejscu, to jest w wątrobie, mogłaby wpłynąć na zmianę objawów chorobowych.

UWARUNKOWANIA TERAPII GENOWEJ CHOROÓB DZIEDZICZNYCH

Pierwsza próba terapii genowej talasemii, podjęta w roku 1980 przez Martina Clina zakończyła się niepowodzeniem, co było bezpośrednim powodem wstrzymania prób klinicznych na prawie 10 lat (LARRICK i BURCK 1991). W tym czasie

rozwój technologiczny sprawił, że transfer genów został znacznie dopracowany pod względem technicznym. Paradoksem jest, że obecnie leczeniem z wyboru talasemii jest przeszczep szpiku, a nie transfer genu. Nie wszystkie choroby genetyczne mogą być na równi poddawane terapii genowej. Przed podjęciem prób klinicznych jest konieczne spełnienie szeregu warunków oraz przeprowadzenie niezbędnych doświadczeń *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych.

Wybór choroby do zastosowania eksperymentalnej terapii genowej jest uwarunkowany wieloma czynnikami. Na obecnym etapie rozwoju terapii genowej chorób uwarunkowanych genetycznie w zasadzie obiektem zainteresowań są wyłącznie schorzenia jednogenowe dziedziczone w sposób recesywny. Dalszym warunkiem jest brak alternatywnego leczenia, co może wiązać się z wysoką zapadalnością i umieralnością osób dotkniętych chorobą. Oczywiście sprawą jest zlokalizowanie defektu genetycznego powodującego daną chorobę — komórka lub tkanka docelowa musi być jednoznacznie zdefiniowana. Jest konieczna również możliwość transferu genu do komórki z defektem. Transfer leczniczego genu powinien być wykonany w warunkach *in vitro* i na zwierzętach doświadczalnych. Bardzo ważnym warunkiem jest uzyskanie stabilnej ekspresji brakującego lub zmutowanego genu. W warunkach *in vitro* należy przeprowadzić doświadczenia z ludzkimi komórkami docelowymi, które po transfekcji powinny wykazywać ekspresję wprowadzonego genu. W badaniach na zwierzętach jest konieczne udowodnienie efektu terapeutycznego poprzez zmianę fenotypu patologicznego na prawidłowy (np. pojawienie się aktywności enzymatycznej). Komórka, do której ma zostać wprowadzony terapeutyczny gen, powinna posiadać zdolność do samoodnawiania. Tylko w takim przypadku jednorazowy transfer genu zapewni długotrwały efekt leczniczy (KOHN i współaut. 1989).

Podobnie jak w przypadku testowania nowych związków o działaniu terapeutycznym również w przypadku transferu genu należy ocenić występowanie ewentualnych objawów ubocznych, jak na przykład zaburzeń metabolizmu lub działania mutagennego białka produkowanego przez wprowadzony gen. Transfer genu i jego ekspresja prowadzi do pojawienia się białka, które może posiadać właściwości immunogenne. Z sytuacją taką należy się liczyć w przypadku transferu genu, który uprzednio w organizmie nie występował.

Projekt terapii genowej u człowieka każdorazowo musi ocenić ryzyko wystąpienia objawów ubocznych w stosunku do osiąganego efektu leczniczego, który należy porównać z wynikami możliwymi do osiągnięcia leczeniem alternatywnym — konwencjonalnym. W ocenie potencjalnych objawów ubocznych należy zwrócić uwagę na możliwości przeniesienia użytego wektora w układzie wertykalnym, czyli na dalsze pokolenia i horyzontalnym, czyli nie zamierzoną infekcję komórek prawidłowych (MILLER 1992).

Oprócz uzyskania zgody pacjenta lub jego prawnych opiekunów powinno się przeprowadzić analizę wpływu zastosowanej terapii genowej nie tylko na chorego, ale również na jego rodzinę. Z uwagi na możliwe niejasności, uprzedzenia oraz emocje związane z transferem genu powinno dążyć się do jak najszerzej pojętej edukacji społeczeństwa poprzez rzetelną informację w środkach masowego przekazu oraz dyskusje z udziałem przedstawicieli różnych specjalności. Istniejące już w wielu krajach ustawodawstwo wymaga uzyskania formalnej zgody odpowiednich instytucji na podejmowanie wszelkich prób klinicznych

związanych z transferem genu do komórek somatycznych człowieka (DANIELSON 1988).

TRANSFER GENU DO KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Niezbędnym warunkiem podjęcia prób terapii genowej u człowieka jest uzyskanie odpowiednich nośników — wektorów, zdolnych do transdukcji określonego genu do komórek docelowych. Wprowadzenie nowego genu do komórki docelowej i uzyskanie jego ekspresji stanowi podstawowy element terapii genowej. Stąd szybki rozwój metod transferu genu, przydatnych w terapii. Wspólną cechą wszystkich metod jest uzyskanie efektywnego dostarczenia określonego genu do komórki. Gen można wprowadzić do komórki metodami fizykochemicznymi i biologicznymi. W tabeli 1 zestawiono metody transferu genu do komórek.

Tabela 1
Zestawienie metod wprowadzania genów do komórek

I. Metody fizykochemiczne:

1. Transfekcja precypitatu DNA z fosforanem wapnia.
2. Fuzja DNA z liposomami.
3. Mikroinjekcja dojądrowa.
4. Elektroporacja.

II. Metody biologiczne:

1. Wektory wirusów DNA — adenowirusów.
2. Wektory wirusów RNA — retrowirusy.

Jedną z najważniejszych wspólnych cech wszystkich metod transferu genu do komórki jest wydajność mierzona efektywną integracją wprowadzonego DNA z genomem gospodarza. Użycie wektorów wirusowych DNA lub RNA jest zdecydowanie najbardziej wydajne. Przy wprowadzaniu DNA za pomocą wektorów wirusowych od kilkudziesięciu do 100% komórek nabywa nowy gen,

natomiast przy zastosowaniu metod fizycznych DNA jest efektywnie wprowadzany do jednej komórki na 1000, 10000, czy nawet 1 mln. Z reguły przy stosowaniu metod fizykochemicznych wydajność jest bardzo różna. W zasadzie wszystkie fizykochemiczne metody transfekcji są stosunkowo mało skomplikowane. Geny są wprowadzane i integrują się z genomem komórek w sposób całkowicie losowy. Bardzo prostą metodą transferu DNA do komórki jest elektroporacja. Technika ta umożliwia wprowadzenie fragmentów DNA do wielkości 150 kb. Istotną wadą jest uszkodzanie błony komórkowej, prowadzące często do śmierci komórki.

Biologiczne wektory używane do transferu genu są konstruowane z naturalnie występujących wirusów. Idealny wektor wirusowy powinien transfekować praktycznie wszystkie komórki docelowe. Wektor taki powinien charakteryzować się wysokim stopniem integracji z DNA genomowym z następową ekspresją wprowadzonego genu. Wysoce pożądana byłaby możliwość fizjologicznej regulacji ekspresji wprowadzonego genu. Należy zauważyć, że wydajność transferu genu, czyli integracja z genomem komórki docelowej, nie zawsze idzie w parze z ekspresją wprowadzonego genu (LANCUVILLE i współaut. 1988).

WPROWADZANIE GENU *EX VIVO* I *IN VIVO*

W terapii genowej wprowadzenie do komórki genu prawidłowego w miejsce brakującego lub zmutowanego można dokonać w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. W układzie *in vitro* do komórek docelowych pobranych od chorego terapeutyczny gen jest wprowadzany za pomocą wektorów. Komórki genetycznie zmodyfikowane *in vitro* są następnie wprowadzane do organizmu chorego. Znacznie trudniejszym zadaniem jest wprowadzenie genu w warunkach *in vivo*.

Wektory rekombinacyjne używane w celu wprowadzania terapeutycznego genu do różnych komórek mogą być zastosowane w dwojaki sposób. Pierwszy — transfer genu *ex vivo* obejmuje pobranie od chorego komórek docelowych, wprowadzenie *in vitro* (czyli *ex vivo*) terapeutycznego genu i wprowadzenie tak zmodyfikowanych komórek z powrotem do organizmu chorego. Drugi — transfer genu *in vivo* polega na wprowadzeniu terapeutycznego genu bezpośrednio do komórek (tkanki) chorego, bez pobierania komórek docelowych. W przypadku transferu *in vivo* jest konieczne zastosowanie wektora, który z dużą wydajnością i wysoką swoistością przenosi gen terapeutyczny do komórek docelowych. Dotychczas transfer genu typu *in vivo* zastosowano jedynie przy wprowadzaniu genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductor) do komórek śródbłonkowych jamy nosowej i pęcherzyków płucnych (ROSENFELD i współaut. 1992, HYDE i współaut. 1993).

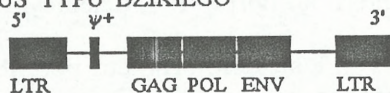
WEKTORY RETROWIRUSOWE

W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że są to retrowirusy, z których usunięto wszystkie geny wirusowe z wyjątkiem sekwencji promotorowych. Z tego względu białka wirusowe nie są syntetyzowane przez komórki zakażone wektorami retrowirusowymi. W miejsce sekwencji wirusowych jest wstawiony gen przeznaczony do transferu (rys. 1). Z reguły obok genu terapeutycznego do wektora jest wklonowany gen umożliwiający selekcję transfekowanych komórek w medium hodowlanym. Czynnikiem selekcyjnym często jest gen *neo* warunkujący oporność zakażonych komórek na neomycynę. W ten sposób tylko komórki z wbudowanym wektorem, wykazujące oporność na neomycynę, rozwijają się w medium selekcyjnym.

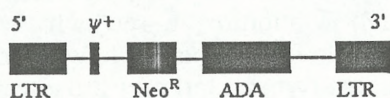
Cząsteczka retrowirusa jest złożona z podwójnej nici RNA, kodującego białko wirusowe (GAG), odwrotną transkryptazę i integrazę (POL) oraz białka otoczki wirusa (ENV). W celu utworzenia wektora są usuwane geny *gag*, *pol* i *env*, a na ich miejsce są wprowadzane nowe sekwencje. Strukturalne geny wirusa *gag*, *pol* i *env* oraz sekwencje promotorowe LTR (long terminal repeats) są niezbędne dla replikacji i transferu cząsteczek wirusowych z komórki do komórki. Sztucznie utworzony wektor retrowirusowy nie posiada zdolności do replikacji z uwagi na brak odpowiednich sekwencji. W celu wyprodukowania kompletnej cząsteczki wirusowej jest konieczne użycie tak zwanych komórek pakujących, produkujących puste otoczki wirusowe. Komórki pakujące zawierają wszystkie geny

A

WIRUS TYPU DZIKIEGO

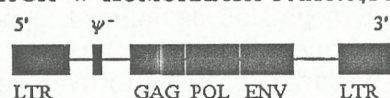


WEKTOR Z GENEM TERAPEUTYCZNYM np: ADA

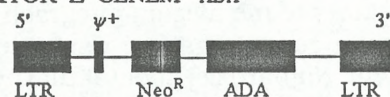


B

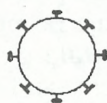
WEKTOR W KOMÓRKACH PAKUJĄCYCH



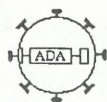
WEKTOR Z GENEM ADA



PRODUKCJA



Otoczek wirusowych

Cząsteczek wirusa
z genem ADA

Rys. 1. Schemat uzyskiwania wektorów retrowirusowych.

A. Do wirusa typu dzikiego w miejsce genów strukturalnych *gag*, *pol*, *env* jest wprowadzany gen terapeutyczny *ADA* wraz z genem oporności na neomycynę *Neo^R*. B. Komórki pakujące, ze względu na brak sekwencji Ψ , produkują puste otoczki wirusowe, do których jest „pakowany” wektor z genem *ADA*. Częsteczka wirusa z genem *ADA* jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej bez możliwości namnażania ze względu na brak strukturalnych genów wirusowych.

konieczne do syntezy białek wirusowych z wyjątkiem sekwencji Ψ i produkują otoczki wirusa bez RNA. Brak sekwencji Ψ uniemożliwia upakowanie RNA w otoczkę białkową. Po wprowadzeniu do komórek pakujących sekwencji DNA w wektorze retrowirusowym dochodzi do utworzenia cząsteczek wirionu, z wprowadzonymi sekwencjami DNA, posiadających zdolność do zakażenia komórek docelowych bez możliwości namnażania. Taka cząsteczka jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej bez możliwości dalszej replikacji ze względu na brak genów wirusowych. Proces wprowadzania nowego genu przy użyciu wektora retrowirusowego nie posiadającego zdolności do replikacji określa się mianem transdukcji (HUBER i współaut. 1991), w przeciwieństwie do transfekcji-infekcji, w której dzielące się cząsteczki wirusa rozprzestrzeniają się do wielu komórek. Schemat uzyskiwania wektorów retrowirusowych przedsta-

wiono na rysunku 1. Największą zaletą wektorów retrowirusowych jest wysoka wydajność wprowadzania genów do komórek docelowych. Natomiast ich główną wadą jest niezdolność do transdukcji komórek nie dzielących się (KOHN i współaut. 1989).

Z użyciem wektorów retrowirusowych wiąże się problem potencjalnych objawów ubocznych, związanych z losową integracją retrowirusa w genom komórki gospodarza. Integracja genów retrowirusowych może wywołać zmiany o charakterze mutagennym, polegające, na przykład, na aktywacji komórkowych onkogenów. Z doświadczeń na zwierzętach wiadomo, że retrowirusy zdolne do replikacji mogą prowadzić do aktywowania onkogenów. Nie wiadomo jak duże jest prawdopodobieństwo wystąpienia tego typu zmian przy stosowaniu niezdolnych do replikacji wektorów retrowirusowych (FRIEDMANN 1989).

WEKTORY ADENOWIRUSOWE

Wektory bazujące na adenowirusach mogą stać się najbardziej popularnymi nośnikami w terapii genowej. Wektory konstruowane na bazie adenowirusów i tak zwane „adeno-associated-virus” posiadają szereg istotnych zalet. Istnieje możliwość umieszczenia w nich sekwencji DNA wielkości kilkudziesięciu kb, wykazują tropizm do różnych ludzkich komórek przy całkowitym braku patogenności. Dodatkową zaletą jest, że wektory te nie ulegają integracji z genomem gospodarza. Co więcej, raz wprowadzone geny mogą być usunięte z komórki poprzez infekcje wirusami pomocniczymi. Najbardziej spektakularnym przykładem zastosowania wektora adenowirusowego było uzyskanie ekspresji ludzkiego genu *CFTR* (cystis fibrosis transmembrane conductance regulator) po wprowadzeniu do górnych dróg oddechowych szczura jako przygotowanie do podjęcia prób leczenia mukowiscydozy. Ekspresja białka CFTR utrzymywała się przez kilka tygodni po wprowadzeniu wektora adenowirusowego (ROSENFELD i współaut. 1992).

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII GENOWEJ

Rodzaj komórek, do których jest wprowadzany gen mający działanie lecznicze, jest uzależniony od rodzaju schorzenia. W terapii chorób genetycznych komórkami docelowymi będą te, które fenotypowo objawiają określone zaburzenia spowodowane istniejącym defektem genetycznym. W zależności od choroby genetycznej mogą to być komórki szpiku, wątroby, pęcherzyków płucnych, fibroblasty skóry i limfocyty krwi obwodowej. Komórkami docelowymi w chorobach genetycznych mogą być również inne, nie dotknięte defektem komórki lub tkanki. Jako przykład potencjalnego zastosowania transferu genu do komórek innych niż wykazujące zaburzenie genetyczne, może być uzyskanie produkcji, na przykład, insuliny lub czynników krzepnięcia krwi przez fibroblasty, które mogłyby „dawkować” brakujące czynniki. Jednakże w większości chorób genetycznie uwarunkowanych optymalna komórka docelowa powinna wywodzić się z tkanki dotkniętej zaburzeniem i posiadać zdolność do samopowielania, czyli

być w pewnym sensie nieśmiertelną, tak ażeby po jednokrotnym wprowadzeniu genu leczniczego zachował on swoją aktywność praktycznie przez całe życie (FERRAN i współaut. 1991). W przypadku terapii genowej nowotworów i AIDS komórki, do których są wprowadzane nowe geny, niekoniecznie muszą posiadać zdolność do samoodnawiania. Wręcz przeciwnie, optymalnym rozwiązaniem jest modyfikacja komórki nowotworowej w taki sposób, ażeby w miarę szybko prowadziła do uzyskania efektu leczniczego, po czym powinna sama ginąć lub być niszczona. Oddzielną grupę komórek docelowych stanowią komórki mięśni, do których można w sposób bezpośredni, drogą iniekcji wprowadzać plazmidowy DNA sprzężony z terapeutycznym genem. Komórki mięśniowe, a w szczególności mioblasty, mogą być wykorzystywane do produkcji, na przykład hormonu brakującego w ustroju (WOLF i współaut. 1990).

TERAPIA GENOWA CIĘŻKIEGO ZŁOŻONEGO NIEDOBORU ODPORNOŚCI — SCID

Terapia genowa chorób genetycznych polega na wprowadzeniu do organizmu prawidłowego genu w miejsce brakującego lub uszkodzonego. Wprowadzony gen powinien ulegać ekspresji tak, ażeby jego produkt funkcjonował jak w organizmie zdrowym. Z wielu chorób genetycznych, ciężki złożony niedobór odporności SCID spełniał wszelkie warunki uzasadniające podjęcie pierwszych prób terapii genowej (FERRAN i współaut. 1991). SCID jest spowodowany defektem genu deaminazy adenozyry (ADA), w wyniku czego dochodzi do zaburzenia różnicowania limfocytów T. Defekt genetyczny występuje we wszystkich komórkach, jednakże brak ADA w czasie rozwoju grasicy powoduje selektywną toksyczność metabolitów adenozyry (jak np. trójfosforan deoksyadenozyry) dla niedojrzałych limfocytów T. SCID dziedziczy się jako cecha autosomalna recesywna, występuje z częstością 1 na 100 urodzeń. Przebieg kliniczny charakteryzuje się częstymi ciężkimi infekcjami występującymi od wczesnego dzieciństwa. Ze względu na brak odporności wszelkie infekcje mają bardzo ciężki przebieg. Nie leczony SCID prowadzi do śmierci dziecka w pierwszym lub drugim roku życia. W tabeli 2 przedstawiono krótką charakterystykę SCID. Stosowane dotychczas leczenie SCID polegało głównie na przeszczepie tkankowo-zgodnego szpiku kostnego. Ponadto było możliwe leczenie substytucyjne deaminazą adenozyry w połą-

Tabela 2

Charakterystyka ciężkiego złożonego niedoboru odporności — severe combined immunodeficiency syndrome — SCID

1. Brak enzymu deaminazy adenozyry.
2. Choroba autosomalna recesywna.
3. Częstość występowania 1:100 tys. urodzeń.
4. Ciężkie oportunistyczne zakażenia od wczesnego dzieciństwa.
5. Selektywna toksyczność metabolitów w stosunku do limfocytów T.
6. Blisko 100% śmiertelność w pierwszych latach życia.

czeniu z glikolem polietylenowym (KOHN i współaut. 1989). Uwarunkowania wyboru SCID do podjęcia klinicznych prób terapii genowej zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Przesłanki uzasadniające podjęcie klinicznych prób terapii genowej w ciężkim złożonym niedoborze odporności — SCID

1. Sklonowanie ludzkiego genu deaminazy adenozy — ADA.
2. Zlokalizowany defekt pojedynczego genu prowadzi do utraty aktywności enzymu ADA.
3. Wyleczenie tylko w przypadku przeszczepu szpiku całkowicie tkankowo-zgodnego.
4. Uzyskanie ekspresji genu ADA w komórkach transfekowanych *in vitro*.
5. *In vivo* transfekowane komórki rosną lepiej niż limfocyty z defektem.
6. Wykazanie terapeutycznego działania wysokich dawek enzymu ADA.
7. Szeroki zakres terapeutycznej aktywności enzymu ADA.
8. Brak objawów ubocznych przy podawaniu wysokich dawek ADA.

Pierwszego transferu genu ADA do limfocytów T czteroletniej dziewczynki, leczonej uprzednio podawaniem ADA w połączeniu z glikolem polietylenowym, dokonano 14 września 1990 roku (CULLINTON 1990). Do chwili obecnej wykonano kilka dalszych prób terapii genowej SCID. Wyniki pierwszej terapii są bardzo obiecujące — uzyskano normalizację zaburzonych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej i humoralnej, a przede wszystkim znaczną poprawę kliniczną. Leczone dzieci nie muszą już przestrzegać reżimu życia w warunkach sterylnych.

Z uwagi na stosunkowo krótki czas przeżycia limfocytów T uzyskane efekty lecznicze są krótkotrwałe i transfer genu ADA należy powtarzać co kilka tygodni lub miesięcy. Obecnie podjęto próby transferu genu ADA do komórek szpiku wzbogaconego w komórki pnia, czyli posiadających zdolność do samoodtwarzania. Jest wysoce prawdopodobne, że dzięki uzyskaniu efektywnej integracji i ekspresji genu ADA w komórkach pnia, choroba genetyczna — SCID będzie całkowicie wyleczalna po jednorazowym transferze genu (WEATHERALL 1991).

PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ W CHOROBAH GENETYCZNYCH

Obiecujące wyniki terapii genowej ciężkiego złożonego niedoboru odpornościowego stwarzają realną szansę na zastosowanie analogicznego podejścia leczniczego również w innych chorobach uwarunkowanych genetycznie. Pierwsze próby u chorych z mukowiscydozą wypadły pozytywnie, co pozwala optymistycznie prognozować dalszy rozwój terapii genowej chorób dziedzicznych. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* i na zwierzętach uzyskano ekspresję wielu genów, których defekt jest odpowiedzialny za szereg chorób genetycznych u ludzi. Należy przypuszczać, że w najbliższej przyszłości zostaną przeprowadzone pierwsze próby kliniczne w fenyloketonurii, mukowiscydozie, niedoborze alfa-1-antytrypsyny, hemofilii i innych (PENG i współaut. 1988, WILSON i CHOWDHURY 1990, DAI i współaut. 1992). W tabeli 4 zestawiono choroby uwarunkowane

genetycznie, w których w najbliższych latach będą najprawdopodobniej podjęte pierwsze próby kliniczne z terapią genową (STRAUSS 1994, YEI i współaut. 1994).

Tabela 4

Choroby uwarunkowane genetycznie, w których możliwe jest zastosowanie terapii genowej

Choroba	Komórka docelowa	Gen
Zespoły niedoboru odpornościowego	szpik kostny, limfocyty	fosforylaza purynowa deaminaza adenozyiny
Zespół Lesch-Nyhan'a	szpik kostny, fibroblasty skóry	fosforybozylotransferaza hypoksantynowoguaninowa
Fenyloketonuria	hepatocyty	hydroxylaza fenyloalaniny
Galaktozemia	hepatocyty	urydylotransferaza galaktozy, galaktokinaza
Choroba Gaucher'a	komórki szpiku	glukocerebrozydaza
Choroba Tay-Sachsa	hepatocyty	beta-galaktozydaza
Hemofilia A	fibroblasty skóry	czynnik krzepnięcia VII
Hemofilia B	fibroblasty skóry	czynnik krzepnięcia IV
Niedobór alfa-1-antytrypsyny	hepatocyty	alfa-1-antytrypsyna
Mukowiscydoza	komórki nabłonkowe	CFTR
Talasemia	komórki szpiku	beta-globina
Anemia sierpowata	komórki szpiku	beta-globina
Rodzinna hypercholesterolemia	hepatocyty	receptor LDL
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	komórki mięśniowe	dystrofia

OBJAWY UBOCZNE TERAPII GENOWEJ

Pomimo przedsięwzięcia szeregu środków ostrożności należy się liczyć z możliwością występowania objawów ubocznych terapii genowej. Z uwagi na całkowicie losową integrację wektora retrowirusowego przenoszącego terapeutyczny gen, istnieje możliwość, na przykład, wskutek rekombinacji wyłączenia prawidłowo funkcjonującego genu, włączenia genu nieaktywnego, a w szczególności aktywacji komórkowych onkogenów, mogącej prowadzić do transformacji nowotworowej. Tak więc w najgorszym przypadku istnieje nawet ryzyko rozwoju nowotworu. Innym potencjalnym objawem ubocznym terapii genowej może być indukcja odpowiedzi immunologicznej przeciwko białku produkowanemu przez nowo wprowadzony gen. Taka sytuacja może mieć miejsce szczególnie w chorobie genetycznej, która może być wyleczona przez produkcję brakującego w organizmie białka, które w sensie immunologicznym jest białkiem obcym. Oprócz możliwej immunogenności trudno przewidzieć następstwa znacznej, niefizjologicznej nadprodukcji białka, kodowanego przez wprowadzony gen (BOUT i współaut. 1994).

Przy terapii wektorami retrowirusowymi nie można całkowicie wykluczyć produkcji wirusa typu dzikiego, co może się zdarzyć w niezamierzonym zanie-

czyszczeniu używanego wektora wirusem typu helper. Z kolei wektory adenowirusowe mogą prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia komórek nabłonkowych. Potencjalne, ogólne objawy uboczne, jak na przykład gorączka, dreszcze, zmiana obrazu krwi, powiększenie wątroby, wysypka i inne mogą być związane z rodzajem, dawką, sposobem podania wektora, jak również z wielkością i modulacją ekspresji wprowadzonego genu (OSTROVE 1994).

ASPEKTY SOCJALNE I ETYCZNE TERAPII GENOWEJ

Przed 20-tu laty postęp w inżynierii genetycznej został tylko na bardzo krótko przyhamowany futurystycznymi przepowiedniami produkcji bezmózgowych robotów lub katastroficzną pandemią wirusem grypy przenoszącym śmiertelność gen rakowy. Obecnie już nikt nie kwestionuje potrzeby uzyskiwania metodami inżynierii genetycznej leków stosowanych na coraz szerszą skalę — insuliny, czynników krzepnięcia, hormonów wzrostu i szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby. Większość kwestii etycznych dotyczy samej, całkowicie nowej technologii powodującej bezpośrednie zmiany w materiale genetycznym człowieka. Istnieje duża zbieżność pomiędzy leczeniem ciężkiego złożonego niedoboru odporności przeszczepem szpiku i terapią genową. W pierwszym przypadku wprowadzamy do organizmu obce komórki z prawidłowym genem, w drugim tylko prawidłowy gen. Terapia genowa komórek somatycznych nie wpływa na geny przekazywane potomstwu. Wysuwane są zastrzeżenia o coraz bardziej mechanistycznym traktowaniu człowieka bez zwracania uwagi na aspekty socjalne i moralne związane z życiem ludzkim. Z drugiej jednak strony lepsze poznanie genetycznych aspektów życia powinno przyczyniać się do większego poszanowania życia człowieka. Jednakże w przypadku osiągnięcia sukcesu terapii genowej w ciężkich schorzeniach, może zająć pokusa jej zastosowania nie do leczenia lecz dla „poprawiania” na przykład urody, siły mięśniowej, wzrostu, koloru oczu (MILLER 1994). Teoretycznie istnieje możliwość, że rodzice zamiast wymyślnej diety, uprawiania sportu, wykształcenia, będą chcieli dodatkowo zaaplikować swemu potomstwu terapię genową w celu posiadania „idealnego” dziecka. Rozważania nad tego typu problemami są bardzo spekulacyjne i powinny być zastępowane szeroką dyskusją na temat realnych możliwości i korzyści terapii genowej dla, jak sama nazwa wskazuje, leczenia ludzi chorych (LEDLEY 1987).

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ

Prawdopodobnie w najbliższych latach badania zostaną skoncentrowane nie na klasycznych chorobach genetycznych, a przede wszystkim na nowotworach i to zarówno w sensie leczenia, jak i zapobiegania przerzutom oraz niszczenia opornych na konwencjonalną terapię komórek rakowych, tak zwanych resztkowych.

Oprócz chorób jednogenowych, których terapia genowa będzie stanowiła leczenie przyczynowe, w chorobach wieloczynnikowych, na przykład w chorobie

Alzheimera, Parkinsona, schizofrenii będzie można zastosować genetyczne leczenie objawowe, usuwające bardzo przykre dolegliwości tych chorób.

Nie można wykluczyć, że w przyszłości terapia genowa będzie miała duże zastosowanie również w chorobach wewnętrznych, głównie w schorzeniach układu krążenia. Jako przykład można podać już rozpoczęte próby kliniczne leczenia wybranych postaci rodzinnej hypercholesterolemii poprzez transfer genów dla receptora LDL (low density lipoprotein). Wydaje się, że wraz z nowymi odkryciami dotyczącymi genetycznej predyspozycji występowania wielu chorób terapia genowa znajdzie zastosowanie również w zapobieganiu ich występowania (KARP i BRODER 1994).

Chirurgia urazowa bardzo odległa od terapii genowej może w przyszłości wykorzystywać transfer genów dla substancji biologicznie czynnych w celu szybszego gojenia się ran i „naturalnej” — bez udziału antybiotyków — ochrony przed zakażeniem (LARRICK i BURCH 1991).

Terapia genowa dopiero zaczyna się rozwijać. Dziś jeszcze nie możemy mówić o przełomie leczenia chorób dzięki inżynierii genetycznej. Nie można jeszcze stwarzać nadziei, szczególnie ciężko chorym na cudowne wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że terapia genowa będzie stawała się coraz powszechniejszą i skuteczniejszą formą leczenia i zapobiegania wielu chorobom.

PROGRESS IN GENE THERAPY OF HEREDITARY DISEASES

Summary

This paper presents an overview of somatic human gene therapy, gene transfer methods and construction of appropriate vectors, present and potential target cells for gene transfer, choice of appropriate disease to be treated by gene therapy, promising candidates for somatic gene therapy, side effects, some ethical considerations and future perspectives of curing genetic diseases by somatic gene therapy.

Most of the social and ethical questions concerning gene therapy have been raised in the context of other novel medical interventions. For the first time in human history it is possible to alter the human genome directly. Somatic gene therapy does not pose ethical problems significantly different from those represented by other types of experimental therapy, such as organ transplantation, recombinant pharmaceuticals or modern surgical techniques. It can be said that the medical world is convinced of the necessity of future application of gene therapy, but information on potentials and problems of this new technology should be widely disseminated to the public.

We can hope that significant improvements in gene transfer techniques over the next few years will result in very precise human gene targeting and thus lead to effective treatment of many hereditary disorders.

LITERATURA

- ANDERSON W. F., 1992. *Human Gene Therapy*. Science, 256, 808–813.
- ANDERSON W. F., 1992. *Uses and abuses of human gene transfer*, W: *Human gene therapy*. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. 1–2.
- BOUT A., PERRICAUDET M., BASKIN G., IMLER J.-C., SCHOLTE B. J., PAVIRANI A., VALERIO D., 1994. *Lung gene therapy: In vivo adenovirus-mediated gene transfer to rhesus monkey airway epithelium*. Human Gene Therapy, 5, 3–10.
- CULLITON B. J., 1989. *French Anderson's 20-Year Crusade*. Science, 246, 748.
- CULLITON B. J., *Gene therapy begins*. Science, 249, 1372.

- DAI Y., ROMAN M., NAVIAUS R. K., VERMA I. M., 1992. *Gene therapy via primary myoblasts: Long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10892-10895.
- DANIELSON H., 1988. *Gene therapy in man. Recommendations of European Medical Research Councils*. Lancet, 1271-1272.
- FERRARI G., ROSSINI S., FIAVAZZI R., GIAVAZZI R., MAGGIONI D., NOBILI N., SOLDATI M., UNGERS G., NAVILIO F., GILBOA E., BORDIGNON C., 1991. *An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency*. Science, 251, 1363-1366.
- FRIEDMANN T., 1989. *Progress toward human gene therapy*. Science, 244, 1275-1280.
- GILBOA E., SMITH C., 1994. *Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model*. TIG, 10, 139-144.
- GUTIERREZ A. A., LEMOINE N. R., SIKORA K., 1992. *Gene therapy for cancer*. Lancet, 339, 715-720.
- HERSHFIELD M. S., 1991. *Enzyme replacement therapy for inherited metabolic diseases*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 76-94.
- HUBER B. E., RICHARDS C. A., KRENITSKY T. A., 1991. *Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8039-8034.
- HYDE S. C., GILL D. R., HIGGINS C. F., CUTHBERT A. W., 1993. *Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy*. Nature, 362, 250-255.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Research, 54, 653-665.
- KAY M. A., WOO S. L. C., 1994. *Gene therapy for metabolic disorders*. TIG, 10, 253-257.
- KOHN D. B., ANDERSON W. F., BLAESE R. M., 1989. *Gene therapy for genetic diseases*. Cancer Investigation, 7, 179-192.
- LANEUVILLE P., CHANG W., KAMEL-RIED S., FAUSER A. A., DICK J. E., 1988. *High efficiency gene transfer and expression in normal human hematopoietic cells with human hematopoietic cells with retrovirus vector*. Blood, 71, 811-814.
- LARRICK J. W., BURCK K. L., 1991. *Introduction and overview of human gene therapy*. W: *Gene therapy*. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo, 1-14.
- LARRICK J. W., BURCK K. L., 1991. *Perspectives and future directions*. W: *Gene therapy*. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo, 259-261.
- LEDLEY F. D., 1987. *Somatic gene therapy for human disease: a problem of eugenics?* TIG, 3, 112-115.
- MILLER A. D., 1992. *Human gene therapy comes of age*. Nature, 357, 455-460.
- MILLER H. I., 1994. *Gene therapy for enhancement*. Lancet, 344, 316-317.
- MULLIGAN R. C., 1993. *The basic science of gene therapy*. Science, 260, 926-931.
- NYHAN L. W., 1991. *Classic approaches to the treatment of inherited metabolic disease*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1-33.
- OSTROVE J. M., 1994. *Safety testing programs for gene therapy viral vectors*. Cancer Gene Therapy, 1, 125-131.
- PARKMAN R., 1991. *Organ transplantation as therapy for genetic diseases*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 95-106.
- PENG H., ARMENTANO D., MACKENZIE-GRAHAM L., SHEN R-F., DARLINGTON G., LEDLEY F. D., WOO S. L. C., 1988. *Retroviral-mediated gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase in primary mouse hepatocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8146-8150.
- ROSENFELD M. E., YOSHIMURA K., TRAPNELL B. C., YONEYAMA K., RESENTHAL E. R., DALEMANS W., FUKAYAMA M., BARGON J., STIER L. E., STRATFORD-PERRICAUDET L., PERRICAUDET M., GUGGINO W. B., PAVIRANI A., LECOCQ J. P., CRYSTAL R. G., 1992. *In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium*. Cell, 68, 143-155.
- SCHNEIDER J. A., 1991. *Treatment of inherited metabolic diseases by chelation or other methods of toxin removal*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 62-75.
- SOONPIN Y., MITTEREDER N., TANG K., O'SULLIVAN C., TRAPNELL B. C., 1994. *Gene Therapy*, 1, 192-200.
- STRAUSS M., 1994. *Liver-directed gene therapy: prospects and problems*. Gene Therapy, 1, 156-164.
- SWEETMAN L., 1991. *Cofactor replacement*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 34-61.
- WEATHERALL D. J., 1991. *Gene therapy in perspective*. Nature, 349, 275-276.
- WILSON J. M., CHOWDHURY J. R., 1990. *Prospects for gene therapy of familial hypercholesterolemia*. Mol. Biol. Med., 7, 223-232.
- WOLFF J. A., MALONE R. W., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P. L., 1990. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 247, 1465-1468.