

JERZY NOWAK

*Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań*MOŻLIWOŚCI I PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ CHOROÓB
NOWOTWOROWYCH*

GENY A RAK

Wyniki badań molekularnych wskazują na ścisły związek mechanizmów procesu nowotworowego z zaburzeniami genetycznymi. Czy przyczyna raka tkwi w genach? Aktualna koncepcja rozwoju nowotworu zakłada akumulację zaburzeń różnych genów, a zwłaszcza onkogenów i genów przeciwnowotworowych, prowadzącą w efekcie do klonalnej proliferacji, nie kontrolowanej przez mechanizmy homeostazy ustrojowej.

Olbrzymi postęp w zakresie zrozumienia genetyczno-molekularnych podstaw chorób nowotworowych stwarza całkowicie nowe możliwości zapobiegania i leczenia nowotworów (GUTIERREZ i współaut. 1992). Początkowo wydawało się, że terapia genowa, polegająca na osiągnięciu efektu leczniczego poprzez wprowadzenie do komórki genu prawidłowego w miejsce zmutowanego lub brakującego, będzie mogła być stosowana głównie w chorobach genetycznych (FRIEDMANN 1989, KOHN i współaut. 1989). Bardzo szybko okazało się jednak, że technologia transferu genu może być pomocna w leczeniu nowotworów (CULLITON 1990). Należy przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości coraz precyzyjniej będzie można korygować zaburzenia genetyczne występujące w schorzeniach nowotworowych. Ponadto wczesne wykrycie genetycznej predyspozycji do nowotworzenia umożliwi podjęcie działań zapobiegawczych poprzez, na przykład, unikanie ekspozycji na czynniki genotoksyczne, niepalenie papierosów, zastosowanie szczepionek przeciwrakowych. Precyzyjna molekularno-genetyczna diagnostyka już obecnie pozwala na opracowywanie eksperymentalnych modeli zapobiegania i leczenia chorób nowotworowych (KARP i BRODER 1994).

Od pierwszej klinicznej próby terapii genowej ciężkiego złożonego niedoboru odporności minęło zaledwie 5 lat. Liczba prowadzonych aktualnie prób klinicznych terapii genowej nowotworów przewyższa łączną liczbę zatwierdzonych protokołów leczenia chorób genetycznych i zakaźnych, w tym AIDS. Wydaje się, że w najbliższych latach nastąpi wręcz eksplozja prób terapii genowej nowotwo-

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 4.S402 96 06p04.

rów, a za lat kilkadziesiąt technologia transferu genu może całkowicie zdominować inne formy leczenia nowotworów.

STRATEGIA TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Możliwości zastosowania terapii genowej nowotworów zmierzają w kilku zasadniczych kierunkach:

1. Zwiększanie immunogenności komórek nowotworowych, na przykład, przez transfer genu kodującego immunogeny antygen.
2. Wzmacnianie aktywności przeciwnowotworowej limfocytów cytotoksycznych przez wprowadzenie genów cytokin.
3. Transfer do komórek nowotworowych genów tak zwanych samobójców aktywujących leki.
4. Hamowanie ekspresji onkogenów przez transfer sekwencji antysensownych.
5. Wprowadzanie prawidłowych genów przeciwnowotworowych w miejsce zmutowanych.
6. Transfer genów toksyn pod kontrolą promotorów specyficznych dla danego nowotworu.
7. Ochrona komórek macierzystych przed agresywną chemioterapią przez wprowadzanie genów wielolekowej oporności.

GENETYCZNE ZNAKOWANIE

Wstępem do zastosowania technologii transferu genu w eksperymentalnych próbach leczenia nowotworów było tak zwane genetyczne znakowanie, polegające na wprowadzeniu genu oporności na neomycynę do limfocytów naciekających guz — TIL (tumor infiltrating lymphocytes). Celem tych badań było wykazanie, że cytotoksyczne komórki (TIL) pobrane od chorego, namnożone w hodowli *in vitro* w obecności interleukiny 2 (IL-2) i podane z powrotem do organizmu gromadzą się na obrzeżach tkanki nowotworowej doprowadzając do jej niszczenia. Wykazanie skuteczności działania namnożonych *in vitro* komórek TIL zapoczątkowało wprowadzanie do TIL genów mogących mieć działanie terapeutyczne w wybranych nowotworach (MULLIGAN 1993). Znakowanie genetyczne jest obecnie wykorzystywane dla oceny skuteczności autologicznego przeszczepu szpiku u dzieci w ostrej białaczce szpikowej, ostrej białaczce limfoblastycznej, przewlekłej białaczce szpikowej i w zwojaku zarodkowym.

GENY STOSOWANE W TERAPII NOWOTWORÓW

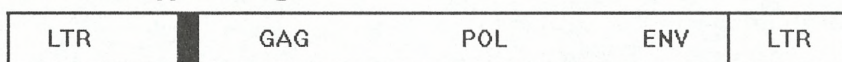
Transfer genu do komórki docelowej i uzyskanie jego ekspresji stanowi podstawowy element terapii genowej (MILLER 1992). W dotychczas podejmowanych próbach klinicznych oraz w eksperymentach na zwierzętach wykorzystuje się w terapii genowej nowotworów następujące geny:

1. Immunomodulujące.

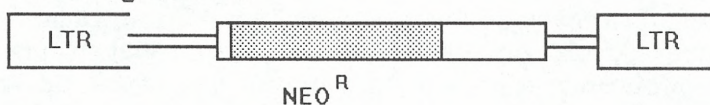
2. Aktywujące leki tak zwane geny samobójcy.
3. Blokujące ekspresję określonych genów — sekwencje antysensowne.
4. Onkogeny i geny przeciwnowotworowe.
5. Toksyn.
6. Ochronne.

Geny można wprowadzać do komórki różnymi metodami fizykochemicznymi i biologicznymi (OSTROVE 1994). W terapii genowej nowotworów największe zastosowanie znajdują wektory retrowirusowe i adenowirusowe. Próbuje się również wprowadzać terapeutyczne geny za pomocą liposomów (CULVER i BLEASE 1994). Schemat uzyskiwania wektora retrowirusowego przedstawiono na ryc.1.

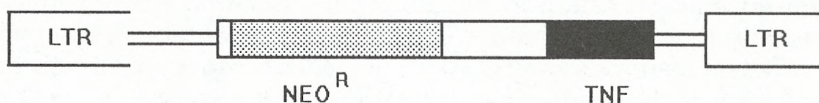
Retrowirus typu dzikiego



Wektor z genem Neo^R



Wektor z genem TNF



Ryc. 1. Schemat uzyskiwania wektora retrowirusowego. W miejsce genów strukturalnych *gag*, *pol*, *env* wirusa typu dzikiego jest wprowadzony gen oporności na neomycynę Neo^R (a) lub gen czynnika martwicy guza *TNF* (b).

W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że konstrukcja wektora retrowirusowego polega na usunięciu z wirusa typu dzikiego wszystkich genów strukturalnych i wprowadzeniu na ich miejsce genu terapeutycznego (HUBER i współaut. 1991). W celu wyprodukowania kompletnej cząsteczki wektora retrowirusowego jest konieczne użycie tak zwanych komórek pakujących, produkujących puste otoczki wirusowe. Komórki pakujące zawierają wszystkie geny konieczne do syntezy białek wirusowych, z wyjątkiem sekwencji psi i produkują otoczki wirusa bez RNA. Brak sekwencji psi uniemożliwia upakowanie RNA w otoczkę białkową. Po wprowadzeniu do komórek pakujących wektora retrowirusowego dochodzi do utworzenia pełnych cząsteczek wirionu, posiadających zdolność do zakażenia komórek docelowych bez możliwości namnażania. Taka cząsteczka jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej, bez zdolności do dalszej replikacji ze względu na brak genów wirusowych (LANEUVILLE 1988).

TRANSFER GENU *EX VIVO* I *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 transplantacja tak zmodyfikowanych komórek z powrotem do organizmu chorego. Drugi, trudniejszy transfer genu *in vivo* polega na wprowadzeniu terapeutycznego genu bezpośrednio do komórek (tkanki) chorego, bez pobierania komórek docelowych. W przypadku transferu *in vivo* zasadniczym ograniczeniem jest zastosowanie wektora, który swoiście przenosi gen terapeutyczny do komórek docelowych z dużą wydajnością.

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Rodzaj komórek, do których jest wprowadzany gen mający działanie lecznicze, jest uzależniony od rodzaju schorzenia (ANDERSON 1992). W przypadku terapii genowej nowotworów transferu genu można dokonywać do komórek nowotworowych, limfocytów, fibroblastów i komórek macierzystych szpiku kostnego (CULVER i współaut. 1994). Głównym celem w terapii genowej nowotworów jest doprowadzenie do całkowitego zniszczenia komórek nowotworowych poprzez transfer odpowiednich genów. Optymalnym rozwiązaniem byłaby genetyczna modyfikacja komórki nowotworowej prowadząca do jej szybkiego zniszczenia. Zasadniczą grupą komórek w terapii genowej nowotworów są limfocyty, które poprzez transfer genu stają się bardziej toksyczne lub indukują inne komórki do wywierania efektu cytotoksycznego na tkankę nowotworową. Genetycznie zmodyfikowane fibroblasty mogą również produkować czynniki toksyczne i immunomodulujące lub indukować odpowiedź przeciwnowotworową. Ostatnią grupę stanowią komórki macierzyste szpiku, do których wprowadzone geny oporności wielolekowej chronią przed agresywną chemioterapią.

ZWIĘKSZANIE IMMUNOGENNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

W eksperymentalnym leczeniu nowotworów od wielu lat podejmowano próby zwiększania immunogenności komórek nowotworowych. Próby te obejmowały hybrydyzację komórek nowotworowych z prawidłowymi, działanie na komórki nowotworowe wirusami lub związkami zmieniającymi powierzchniowe antygeny (na przykład mutagenami). W celu zwiększania immunogenności komórek nowotworowych próbowano stosować interferon gamma indukujący wzrost ekspresji antygenów zgodności tkankowej. Wszystkie te zamierzenia miały prowadzić do zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej poprzez indukcję cytotoksycznych i wspomagających limfocytów T, komórek naturalnej (spontanicznej) cytotoksyczności — NK (natural killers), makrofagów i przeciwciał.

ANTYGENY NOWOTWOROWE JAKO CEL ATAKU TERAPII GENOWEJ

Rozwój badań nad antygenami nowotworowymi pozwolił na lepsze zrozumienie mechanizmów odporności przeciwnowotworowej. Odkrycie antygenów specyficznych dla czerniaka, takich jak MAGE 1,2 i 3, MART 1, gp100 umożliwia podjęcie prób mających na celu indukcję swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej i wykorzystanie jej w terapii (PARDOL 1994). Oprócz stosunkowo nielicznych swoistych antygenów istnieje bardzo wiele antygenów występujących na komórkach nowotworowych, przeciwko którym jest możliwe uzyskanie efektywnej odpowiedzi immunologicznej. Przykłady antygenów indukujących swoistą odpowiedź immunologiczną, mogącą doprowadzić w efekcie do zniszczenia nowotworu, zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Antygeny występujące na komórkach nowotworowych mogące znaleźć praktyczne zastosowanie w immunoterapii

Rodzaj antygeny	Nowotwór
Produkty podwyższonej ekspresji genu <i>HER1/Neu</i>	raki jajników, piersi i płuca
Białka fuzyjne jako wynik translokacji chromosomów, na przykład <i>bcr-abl</i>	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna
Produkty punktowo zmutowanych genów <i>N-ras</i>	gruczolakoraki trzustki, jelita
Białka prawidłowych genów o ekto-powej ekspresji, na przykład antygen karcynoembrionalny	guzy trzustki
Nieprawidłowo glikozylowane powierzchniowe białka, na przykład <i>Muc1</i>	raki jajników, piersi, trzustki
Produkty genów wirusowych, na przykład E7 HPV	rak szyjki macicy

GENY ZGODNOŚCI TKANKOWEJ W IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW

Bardzo ważnymi czynnikami zwiększającymi immunogenność komórek nowotworowych są antygeny zgodności tkankowej — MHC (major histocompatibility complex). Z reguły limfocyty T wspomagające (helper — CD4+) rozpoznają antygen nowotworowy łącznie z produktami genów zgodności tkankowej klasy II, prezentowanymi przez makrofagi czyli komórki prezentujące antygen. Zaktywowane limfocyty T wspomagające CD4+ produkują cytokiny stymulujące cytotoksyczność limfocytów T (CD8+). Z kolei cytotoksyczne limfocyty T w celu aktywacji oprócz limfokin muszą rozpoznawać antygeny komórek nowotworowych łącznie z produktami genów zgodności tkankowej klasy I (MHC I).

Wiadomo było od dawna, że wzrost ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I wzmacnia zdolność do lizy komórek nowotworowych przez cytotoksyczne

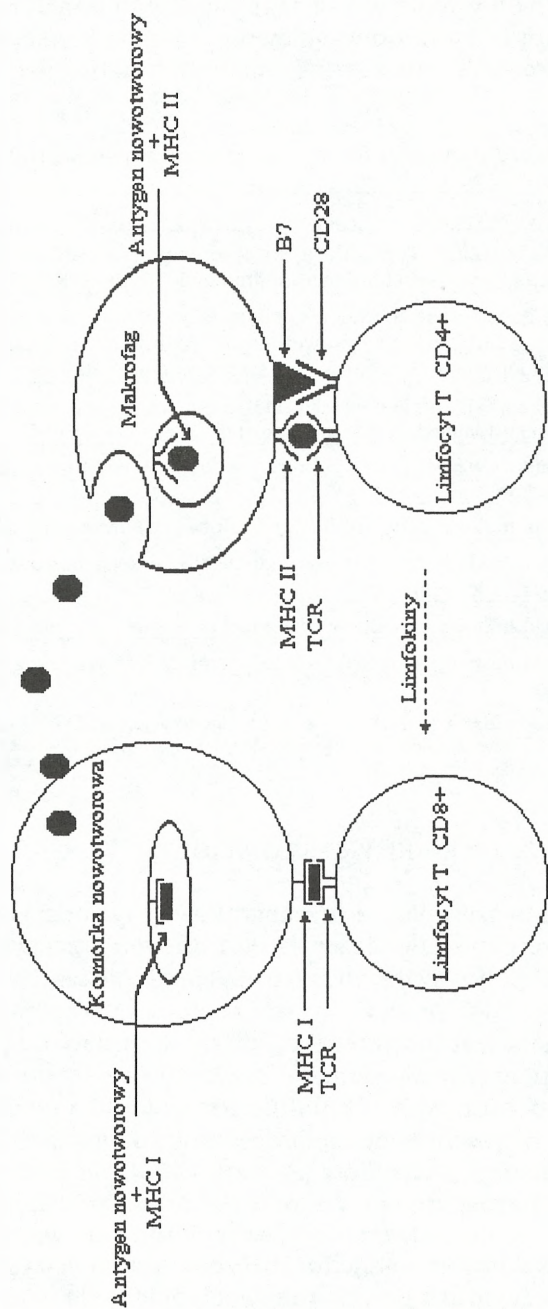
limfocyty T. Badania wykonane na zwierzętach doświadczalnych wykazały, że transfer genów *MHC I* powodował obniżenie tumorogenności komórek nowotworowych oraz ich zdolności do tworzenia przerzutów. Obserwacje te tłumaczono efektywnym niszczeniem komórek guza przez cytotoksyczne limfocyty T rozpoznające antygeny nowotworowe, łącznie z produktami genów *MHC I*. Niestety, nie we wszystkich układach doświadczalnych udało się potwierdzić ścisłą zależność pomiędzy poziomem ekspresji antygenów *MHC I* a tumorogennością i zdolnością do tworzenia przerzutów. Co więcej, zwiększona ekspresja antygenów *MHC I* na komórkach używanych w szczepionkach przeciwrakowych nie zawsze powodowała potencjalizację odporności przeciwnowotworowej.

Ekspresja antygenów *MHC II* na większości komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego może być indukowana przez działanie interferonu gamma. Dzięki temu komórki rakowe mogą funkcjonować jako prezentujące antygen (antygen nowotworowy łącznie z *MHC II*) limfocytom T wspomagającym (helper). Jednakże z uwagi na brak na komórkach rakowych molekuł B7 nie mogą one efektywnie stymulować limfocytów T helper. Co więcej, brak cząsteczek B7 może prowadzić do anergii limfocytów T i tak zwanej ucieczki immunologicznej. Równoczesne zastosowanie transferu genu dla B7 i indukcji antygenów *MHC II* stwarza duże szanse na uzyskanie szczepionki przeciwrakowej skutecznie stymulującej powstawanie swoistych cytotoksycznych limfocytów T (SIKORA 1994). Molekuły B7 występują na aktywowanych antygenem komórkach prezentujących antygen takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B. Molekuły B7 stanowią ligandy dla dwóch receptorów limfocytów T — CD28 i CTLA4. Schemat komórkowych interakcji prowadzących do wytworzenia odporności przeciwnowotworowej przedstawiono na rycinie 2.

Aktualnie są prowadzone badania mające na celu transfer do komórek nowotworowych sztucznie utworzonych genów kodujących hybrydowe cząsteczki złożone z *MHC I* i *II*, których produkty po związaniu antygeny nowotworowego mogłyby skutecznie stymulować powstawanie swoistych limfocytów T wspomagających i cytotoksycznych.

ZWIĘKSZANIE ODPORNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ POPRZECZ TRANSFER GENÓW CYTOKIN

Transfer genów cytokin i ich receptorów ma na celu potencjalizację odpowiedzi immunologicznej miejscowej i układowej. Dzięki wytwarzaniu przez genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe dużych ilości cytokin dochodzi do wzmocnienia lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Cytokiny mogą stymulować cytotoksyczne i wspomagające limfocyty T, komórki NK (natural killers), makrofagi i eozynofile. Cytokiny produkowane przez komórki nowotworowe powodują również wystąpienie miejscowej reakcji zapalnej, mogącej przyczynić się do niszczenia tkanki rakowej mechanizmami odporności nieswoistej. Niektóre cytokiny, jak na przykład czynnik martwicy guza — TNF (tumor necrosis factor), działają bezpośrednio niszcząco na komórki nowotworowe. W tabeli 2 zestawiono wyniki transferu genów różnych cytokin na komórki nowotworowe. W badaniach na zwierzętach uzyskano szereg obiecujących wyników wskazujących na możli-



Ryc. 2. Schemat komórkowych interakcji prowadzących do wytworzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Do aktywacji limfocytów wspomagających CD4+ jest konieczne związanie antygenu nowotworowego łącznie z produktami MHC klasy II oraz molekuł B7 przez receptory CD28. Te dwa sygnały stymulują limfocyty T CD4+ do produkcji limfokin, które aktywują limfocyty T cytotoksyczne CD8+ rozpoznające na komórce nowotworowej antygen łącznie z produktami MHC klasy I.

wość skutecznego niszczenia komórek nowotworowych poprzez potencjalizację układowej lub miejscowej odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie przeprowadzonych prób klinicznych wydaje się, że w najbliższych latach będzie można wykorzystać immunoterapię komórkową głównie do niszczenia minimalnych ilości komórek nowotworowych (MRD — minimal residual disease) pozostałych po chemioterapii.

Tabela 2

Efekt transferu genów cytokin do komórek nowotworowych

Cytokina	Efekt <i>in vivo</i>
IL-2	regresja guza, stymulacja miejscowej i układowej odpowiedzi immunologicznej — cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK
IL-4	regresja guza, masywne nacieki makrofagów i eozynofiliów, potencjalizacja prezentacji antygenów nowotworowych, stymulacja układowej odpowiedzi immunologicznej — cytotoksyczne i wspomagające limfocyty T
INF γ	wzrost ekspresji antygenów MHC I i II, często regresja guza wskutek indukcji układowej odpowiedzi immunologicznej
TNF	spowolnienie wzrostu guza poprzez bezpośredni efekt toksyczny i aktywację makrofagów
IL-7	aktywacja makrofagów, indukcja układowej odpowiedzi immunologicznej
GM-CSF	stymulacja układowej i lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez indukcję różnicowania komórek prekursorowych
MCP1	aktywacja nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, nacieki z makrofagów
G-CSF	aktywacja nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, nacieki z makrofagów

Objaśnienia skrótów: IL-2 — interleukina 2, IL-4 — interleukina 4, INF γ — interferon gamma, TNF — czynnik martwicy guza, IL-7 — interleukina 7, GM-CSF — czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów, MCP1 — białko chemoatrakcji monocytów, G-CSF — czynnik wzrostu kolonii granulocytów

SZCZEPIONKI PRZECIWRAKOWE

Koncepcja wytworzenia szczepionki przeciwrakowej wywodzi się ze skutecznych i stosowanych na szeroką skalę szczepień ochronnych przeciwko chorobom wirusowym (na przykład polio, odra, wirusowe zapalenie wątroby, różyczka, a ostatnio nawet grypa). W przypadku szczepionek przeciwwirusowych odpowiedź immunologiczna jest indukowana przeciwko prostym i jednocześnie immunogennym antygenom wirusowym. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych szczepień ochronnych, aktualnie szczepionki przeciwrakowe są stosowane nie przed, ale po rozwinięciu się procesu nowotworowego, co niestety nie daje w pełni zadowalających wyników (PARDOL 1993). Na marginesie warto zauważyć, że z uwagi na bardzo dużą różnorodność antygenów komórek nowotworowych wszelkie koncepcje uniwersalnej szczepionki rakowej są po prostu niemożliwe, podobnie jak wytworzenie jednej szczepionki na wszystkie choroby zakaźne. Uzyskiwanie szczepionek przeciwrakowych opiera się na dwóch zasadniczych strategiach. Pierwsza wykorzystuje komórki nowotworowe genetycznie zmodyfikowane. Druga strategia opiera się na uzyskiwaniu szczepionek przeciwko ściśle zdefiniowanym antygenom nowotworowym (PARDOL 1993). Z reguły

w celu uzyskania szczepionki przeciwrakowej wykorzystuje się komórki pobrane od chorego. W niektórych przypadkach, jak na przykład w czerniaku złośliwym próbuje się stosować komórki ustalonej linii czerniaka wykazujące wysoką ekspresję antygenów HLA-A1. Teoretycznie wszystkie antygeny zestawione w tabeli 2 mogą służyć wzmocnieniu odporności przeciwnowotworowej. Jednakże ich praktyczne wykorzystanie i skuteczność jest jak dotąd niewielkie, między innymi ze względu na podawanie szczepionek pacjentom z zaawansowaną chorobą nowotworową, często u których stosowano uprzednio chemioterapię, która oddziałuje supresyjnie na układ odpornościowy. Podejmowane są próby kliniczne z zastosowaniem jako szczepionki przeciwrakowej naświetlanych komórek nowotworowych modyfikowanych różnymi genami przede wszystkim cytokin i *MHC*. Naświetlane komórki z wprowadzonym genem na przykład dla *INF* lub *IL-2* zachowują *in vivo* zdolność do wytwarzania cytokin nawet przez kilkanaście dni. Można przypuszczać, że podawanie chorym ich własnych komórek nowotworowych modyfikowanych genetycznie i naświetlanych będzie przedmiotem coraz liczniejszych prób klinicznych. Oprócz wyżej wspomnianych cytokin są podejmowane również badania nad zastosowaniem genów dla *IL-4*, *IL-6*, *IL-7*, *IL-12*.

Większą nadzieję stwarzają rekombinacyjne szczepionki, które posiadają sekwencje kodujące swoiste antygeny nowotworowe. Tym samym odpada konieczność izolacji komórek nowotworowych od poszczególnych chorych. Wydaje się, że w przyszłości można będzie zastosować rekombinacyjne szczepionki jeszcze przed pierwszymi objawami choroby nowotworowej. Dotyczy to szczególnie występującego endemicznie raka szyjki macicy, przyczynowo związanego z zakażeniem wirusem brodawczaka (papilloma virus subtyp 16). Skuteczność tego typu szczepionki wykazano w doświadczeniach na zwierzętach.

TRANSFER DO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH GENÓW AKTYWUJĄCYCH LEKI TAK ZWANYCH SAMOBÓJCÓW

Atrakcyjnym podejściem terapeutycznym jest zastosowanie genów aktywujących nietoksyczne związki w leki skutecznie niszczące komórki nowotworowe. Metoda ta polega na „uwrażliwieniu” komórek nowotworowych na substancje nietoksyczne dla prawidłowych komórek (MOOLTEN 1994). Najczęściej wprowadza się *in situ* gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki za pomocą odpowiedniego wektora. Produkt tego genu powoduje konwersję nietoksycznego gancycloviru w środek hamujący replikację DNA, czyli działający cytotoksycznie. Innym genem samobójcą jest gen deaminazy cytozynowej, zmieniający nietoksyczną 5-fluorocytozynę w aktywny lek 5-fluorouracyl (SIKORA 1994). Geny samobójcy aktywujące leki działają pod kontrolą promotorów genów ulegających preferencyjnej ekspresji w komórkach nowotworowych (tabela 3). Dzięki temu wektory mogą zakażać również komórki prawidłowe, jednakże ekspresja genów samobójców zachodzi wyłącznie w komórkach nowotworowych. Transfer genów uwrażliwiających komórki na gancyclovir zastosowano u kilkudziesięciu chorych z guzami mózgu i rakiem jajnika. W guzach mózgu (glejaków), w których zawiodło standardowe leczenie, obserwowano u większości chorych zadowalające efekty,

w żadnym jednak przypadku nie uzyskano całkowitego wyleczenia. Na modelu myszy bezgranicznych stwierdzono całkowitą regresję wielu ludzkich guzów litych bez objawów ubocznych. Wydaje się, że transferem genu kinazy tymidynowej będzie można podejmować próby leczenia w pierwotnym raku wątroby, rakach jelita grubego, jajnika i pęcherza moczowego oraz w czerniaku złośliwym, jak również w przerzutach do wątroby, opłucnej i otrzewnej.

Tabela 3

Przykłady genów ulegających selektywnej ekspresji w komórkach nowotworowych

Gen	Nowotwór
Antygen karcynoembrionalny	rak jelita grubego
Alfa- fetoproteina	rak pierwotny wątroby
Antygen specyficzny dla prostaty	rak prostaty
Amylaza	rak trzustki
Kalcitonina	rak rdzeniasty tarczycy
Tyrozynaza	czerniak złośliwy
Wilina	rak żołądka
<i>c-erbB2</i> , <i>c-erbB3</i>	rak piersi
<i>c-erbB4</i>	rak piersi, rak żołądka

Przy stosowaniu genów samobójców zaobserwowano efekt „bystander”, klinicznie bardzo pożądany, polegający na „uczuleniu” na gancyclovir komórek sąsiadującymi z tymi, do których został wprowadzony gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki. Wykazano, że dla osiągnięcia efektu „bystander” jest konieczny bezpośredni kontakt między komórkami.

Istnieje możliwość profilaktycznego zastosowania transferu genów samobójców także w stanach przedrakowych. Geny samobójcy mogą być również wykorzystane jako dodatkowe zabezpieczenie komórek, do których są wprowadzane inne lecznicze geny w ramach terapii genowej różnych schorzeń. Komórki te mogłyby być niszczone po osiągnięciu zamierzonego efektu terapeutycznego.

HAMOWANIE EKSPRESJI ONKOGENÓW PRZEZ TRANSFER SEKWENCJI ANTYSSENSOWNYCH

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem sekwencji antysensownych DNA lub RNA, które mogą wyłączać ekspresję niepożądanych genów i tym samym hamować rozwój procesu nowotworowego. W licznych doświadczeniach *in vitro* obserwowano zmianę fenotypu nowotworowego na prawidłowy w komórkach, do których wprowadzono komplementarne mRNA (antysens) do mRNA odpowiedniego onkogenu. Sekwencje antysensowne mogą blokować produkcję białek zmutowanych onkogenów. Sekwencje antysensowne *K-ras* zastosowano już w raku niedrobnokomórkowym płuca oraz w guzach mózgu. Istnieje również możliwość zastosowania tego samego leczenia w rakach trzustki, w których w 75% obserwuje się mutacje *c-ras* (SIKORA 1994). Zasadniczym problemem

stosowania sekwencji antysensownych jest ich wprowadzenie do wszystkich komórek guza gwarantujące skuteczną terapię.

WPROWADZANIE PRAWDŁOWYCH GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH W MIEJSCE ZMUTOWANYCH

Aktualna koncepcja rozwoju procesu nowotworowego zakłada między innymi zaburzenie relacji pomiędzy onkogenami i genami przeciwnowotworowymi. Uważa się wręcz, że rak to choroba cyklu komórkowego, w którym zasadniczą rolę odgrywa szereg genów, w tym najbardziej poznany gen *p53*. Gen ten oprócz niewątpliwego udziału w regulacji cyklu życiowego komórki jest zaangażowany w indukcję programowej śmierci komórki. Niezwykle atrakcyjnym wydaje się być podejście mające na celu włączanie w komórках nowotworowych genów programowej śmierci, co mogłoby stanowić rzeczywisty przełom w terapii genowej nowotworów. W ostrych białaczkach limfoblastycznych typu T stwierdzono, że mutacja genu *p53* wywołana stosowaną chemioterapią koreluje z większym rozsiewem procesu chorobowego we wznowie białaczki. Transdukcja komórek nowotworowych genem *p53* typu dzikiego prowadzi do zahamowania potencjału przerzutowego blastów białaczkowych. Istnieje możliwość wprowadzania do komórki za pomocą odpowiednio skonstruowanych wektorów większej liczby kopii genu *p53*. W hodowlach *in vitro* udało się uzyskać zmianę fenotypu nowotworowego komórek poprzez wprowadzenie innych genów przeciwnowotworowych takich jak *Rb-1* (retinoblastoma) i *DCC* (deleted in colon cancer) (CULVER i BLEASE 1994, GUTIERREZ i współaut. 1992). Podobnie jak w przypadku stosowania sekwencji antysensownych poważnym problemem jest wprowadzenie prawidłowych genów przeciwnowotworowych do wszystkich komórek.

TRANSFER GENÓW TOKSYN

Inną możliwością niszczenia komórek nowotworowych jest transfer genów toksyn pod kontrolą promotorów specyficznych dla danego nowotworu. Produkcję toksyny, na przykład błoniczej, można indukować za pomocą promotorów genów ulegających ekspresji wyłącznie w komórkach nowotworowych, co może znaleźć zastosowanie w eksperymentalnych próbach terapii nowotworów (CULVER i BLEASE 1994).

OCHRONA KOMÓREK MACIERZYSTYCH PRZED AGRESYWNĄ CHEMIOTERAPIĄ PRZEZ WPROWADZANIE GENÓW WIELOLEKOWEJ OPORNOŚCI

W eksperymentalnym leczeniu nowotworów próbuje się ochraniać prawidłowe komórki przed wysoką toksycznością chemioterapeutyków. Ochrona komórek macierzystych szpiku poprzez transfer genu wielolekowej oporności pozwala na stosowanie bardzo wysokich dawek cytostatyków skutecznie niszczących komórki nowotworowe. Klasycznym genem wywołującym oporność na metotreksat jest gen reduktazy dihydrofolianowej. Zastosowanie genów ochra-

niających prawidłowe komórki jest jak dotąd ograniczone do komórek szpiku. Transfer genu wielolekowej oporności do komórek macierzystych CD34+ umożliwia rekonstrukcję szpiku kostnego. Należy dodać, że w niektórych przypadkach wprowadzenie, po zastosowanej chemioterapii prawidłowych, transdukowanych komórek CD34+ prowadziło do wznowy procesu chorobowego, co sugeruje istnienie pierwotnego defektu w pozornie „prawidłowych” komórkach CD34+.

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Należy sądzić, że w najbliższych latach dojdzie do wręcz ekspotencjalnego wzrostu liczby prób klinicznych terapii genowej nowotworów. Badania kliniczne będą zmierzać zarówno do leczenia wysoce zaawansowanego nowotworu, zapobiegania przerzutom, jak i niszczenia opornych na konwencjonalną terapię komórek rakowych, to jest resztkowych (WEATHERALL 1991). Podejmowane próby kliniczne będą polegały głównie na obniżaniu tumorogenności i immunogenności komórek nowotworowych (SIKORA 1994). W miarę poznawania mechanizmów kontrolujących rozwój komórek coraz większe zainteresowanie będą wzbudzały geny kontrolujące cykl komórkowy, w tym różnego rodzaju czynniki transkrypcyjne (LARRICK i BURCK 1991).

Krytycznym elementem w terapii genowej nowotworów jest dostarczenie leczniczego genu do wszystkich komórek nowotworowych. Aktualnie stosowana technologia transferu genu, niestety nie jest w stanie w warunkach *in vivo* dostarczyć potrzebną sekwencję DNA do wszystkich komórek nowotworowych. Najlepsze efekty można uzyskać z transferem genu kinazy tymidynowej, gdzie obserwuje się efekt „bystandar”, czyli rozprzestrzenianie się produktu tego genu również do innych, sąsiednich komórek. Stosowane obecnie wektory, ze względu na swoją wielkość i właściwości, z trudem mogą przekraczać bariery śródbłonna naczyń krwionośnych, a dotarcie do słabo unaczynionej tkanki rakowej jest prawie niemożliwe. Co więcej, komórki nowotworowe z reguły wykazują odmienny stopień zróżnicowania. Wydaje się, że o wiele bardziej skutecznie będą działały geny, których produkty posiadają aktywność miejscową, co nie wymaga konieczności wprowadzenia określonego genu do każdej komórki. Pewne nadzieje na rzeczywisty przełom w dostarczaniu wektorów z terapeutycznymi genami do komórek nowotworowych stwarzają ostatnie badania wyprodukowania wektorów, które na zasadzie swoistego tropizmu są wiązane przez receptory występujące wyłącznie na komórkach docelowych. Przykładem jest swoiste wiązanie skonstruowanego wektora z erytropoetyną do komórek z receptorami dla tego czynnika (BARINAGA 1994). Można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości będzie możliwe dostarczanie do ściśle określonych komórek pożądaných sekwencji, na przykład antyionkogenów, toksyn lub innych biologicznych leków, skutecznie niszczących komórkę rakową lub zmuszających ją do „powrotu” do stanu prawidłowego.

Terapia genowa nowotworów dopiero zaczyna się rozwijać. Obecnie nie można jeszcze stwarzać nadziei, szczególnie ciężko chorym na cudowne wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że terapia

genowa będzie stawiała się coraz powszechniejszą i skuteczniejszą formą leczenia i zapobiegania nowotworom.

CANCER GENE THERAPY — FUTURE APPLICATIONS AND PERSPECTIVES

Summary

It is generally assumed that gene the transfer technology approaches will provide an effective treatment not only for genetic diseases but also for cancer. Improvements in the design of vectors and knowledge of the genetic basis of carcinogenesis have finally resulted in first clinical trials. The human gene therapy was started in September 1990 by transfer of the adenosine deaminase (ADA) gene into lymphocytes of a child having a lethal defect in this enzyme, leading to immuno deficiency. The first cancer gene therapy was initiated by transfer of *NeoR* gene into tumor infiltrating lymphocytes (TIL) followed by insertion of the tumor necrosis factor (TNF) gene into TIL. Currently many approved human gene transfer trials are under way.

The clinical protocols that have been approved for the gene therapy of cancer reveal that several distinct approaches are being pursued, among them: (1) Enhancing the immunogenicity of the tumor cells, for example by insertion of genes that encode immunogenic antigens. This can be often effectively achieved by introducing vectors carrying *HLA* class I or class II genes into a tumor cells, that are negative for the inserted *HLA* genes. The objective is to induce an immune response to the foreign *HLA* antigen with the hope that other tumor surface antigens are also recognized and an immune response is simultaneously developed against them; (2) Enhancing the antitumor activity of the immune cells, for example by introducing cytokine gene into tumor cells *in vitro*; this is basically a tumor cell vaccination to potentiate the anti-cancer immuno response; (3) Insertion of a "suicide" gene into tumor cells, for example by introducing the gene that encodes the herpes simplex virus thymidine kinase, the product of which subsequently converts prodrug into a cytotoxic metabolite leading to the tumor cell death; (4) The use of antisense DNA or RNA sequences, which block the expression of oncogenes; (5) This is a very promising approach and the first protocol approved in 1990 concerned the insertion of a normal *p53* gene into non-small cell lung carcinomas that are *p53* defective; (6) Killing tumor cells by inserting toxin genes under the control of a tumor-specific promotor (e.g. diphtheria toxin gene); (7) The use of the multidrug resistance (*MDR*) gene to protect bone marrow cells to allow higher-dose chemotherapy.

It is our great hope that in future the gene transfer technology will become a standard practice for the treatment and prevention of malignancies.

LITERATURA

- ANDERSON W. F., 1992. *Human Gene Therapy*. Science, 256, 808-813.
- BARINAGA M., 1994. *Gene therapy. Step taken toward improved vectors for gene transfer*. Science, 266, 13-26.
- CULLITON B. J., 1990. *Gene therapy begins*. Science, 249, 1372.
- CULVER K. W., BLEASE R. M., 1994. *Gene therapy for cancer*. TIG, 10, 174-178.
- FRIEDMANN T., 1989. *Progress toward human gene therapy*. Science, 244, 1275-1280.
- GUTIERREZ A. A., LEMOINE N. R., SIKORA K., 1992. *Gene therapy for cancer*. Lancet, 339, 715-720.
- 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.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Research, 54, 653-665.
- KOHN D. B., ANDERSON W. F., BLEASE R. M., 1989. *Gene therapy for genetic diseases*. Cancer Investigation, 7, 179-192.
- LANEUVILLE P., CHANG W., KAMEL-RIED S. et al., 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. *Perspectives and future directions*, [W:] *Gene therapy*. 259-261. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo.
- MILLER A. D., 1992. *Human gene therapy comes of age*. Nature, 357, 455-460.

- MOOLTEN F. L., 1994. *Drug sensitivity („suicide”) for selective cancer chemotherapy*. *Cancer gene therapy*, 1, 279-287.
- MULLIGAN R. C., 1993. *The basic science of gene therapy*. *Science*, 260, 926-931.
- OSTROVE J. M., 1994. *Safety testing programs for gene therapy viral vectors*. *Cancer Gene Therapy*, 1, 125-131.
- PARDOL D. M., 1993. *Cancer vaccines*. *Immunol.Today*, 14, 310-316.
- PARDOL D. M., 1994. *A new look for the 1990s*. *Nature*, 369, 357-358.
- SCHWARTZ R. H., 1992. *Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*. *Cell*, 71, 1065-1068.
- SIKORA K., 1994. *Genetic approaches to cancer therapy*. *Gene Therapy*, 1, 149-151.
- WEATHERALL D. J., 1991. *Gene therapy in perspective*. *Nature*, 349, 275-276.