

Terapia genowa nowotworów

Aleksander Górny

Maciej Wiznerowicz

Andrzej Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów

Katedra Onkologii AM

Wielkopolskie Centrum Onkologii

Poznań

1. Wstęp

Koncepcja terapii genowej powstała ok 30 lat temu, gdy po raz pierwszy udało się wprowadzić DNA do komórki eukariotycznej. Rozwój technik inżynierii genetycznej, szczególnie w ciągu ostatnich piętnastu lat, doprowadził na początku lat dziewięćdziesiątych do pierwszych prób klinicznych u ludzi. Kamieniami milowymi, które doprowadziły do stanu obecnego było kilkanaście zdarzeń m.in. opracowanie technologii zwierząt transgenicznych w 1981 r. W tym samym czasie na rynku pojawił się pierwszy komercyjny produkt rekombinowany genetycznie. W 1986 r. opracowano technikę polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), a rok później rozpoczęto program mapowania ludzkiego genomu. W końcu w 1990 r. opracowano technologię używania myszy *knockout*. Faktycznie przełomem, który stworzył realne możliwości zastosowania koncepcji terapii genowej w praktyce stało się udoskonalenie technik wprowadzania DNA do komórki, a szczególnie użycie nośników (wektorów) wirusowych (1).

Terapia genowa może być zdefiniowana jako korekcja niewłaściwego fenotypu komórki poprzez wprowadzenie do niej „poprawnej” informacji lub modyfikacja komórki prawidłowej poprzez wprowadzenie do niej nowej informacji genetycznej. Terapia ta może być zastosowana zarówno do leczenia chorób dziedzicznych opartych głównie na defektach genetycznych jak i chorób nabytych, np. nowotwory czy AIDS.

Wiele schorzeń dziedzicznych jest spowodowanych poprzez defekt pojedynczego genu, który powoduje zaburzenie swoistego szlaku metabolicznego. W tym przypadku terapia będzie polegała na wprowadzeniu funkcjonalnej kopii genu do komórki, w której defekt ten wystąpił. W ten sposób zostanie poprawiony fenotyp komórki i przywrócone jej właściwe funkcje metaboliczne. Niektóre potencjalne zastosowania terapii genowej w przypadku chorób genetycznych ujęto w tab. 1.

TABELA 1
 NIEKTÓRE Z CHOROÓB DZIEDZICZNYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM PRÓB TERAPII GENOWEJ

Choroba genetyczna	Produkt genu	Rodzaj komórek
ostrzy złożony niedobór immunologiczny (SCID)	dezaminaza adenozykowa	limfocyty T\B
<i>granulomatosis chronica</i>	cytochrom b	neutrofile
choroba Gauchera	glukocerebrozydaza	makrofagi
anemia złośliwa	β -globina	erytrocyty
α - i β - talasemia	α - i β -globina	erytrocyty
zespół Lesch-Nyhana	fosforybozylotransferaza hipoksantynowa	komórki zwojów podstawowych
dystrofia mięśniowa Duchenne'a	dystrofina	komórki mięśniowe
choroba Parkinsona	dopamina	komórki istoty czarnej mózgu
rozedma	α -1-antytrypsyna	komórki nabłonka płuc
zwłóknienie torbielowate (CF)	CF-śródbłonowy regulator przewodnictwa	komórki nabłonka płuc i trzustki
fenyloketonuria	hydroksylaza fenyloalaninowa	hepatocyty
hipercholesterolemia rodzinna	receptor dla LDL	hepatocyty
hemofilia a i B	czynnik VII i IX	płytki krwi

W artykule tym przedstawimy aktualne koncepcje i strategię terapii genowej nowotworów oraz przesłanki poparte badaniami przedklinicznymi, które stanowiły podstawę protokołu klinicznego terapii genowej czerniaka złośliwego opracowanego w Zakładzie Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu w Wielkopolskim Centrum Onkologii.

2. Metody transferu genów

Metody wprowadzania genów do komórki można najogólniej podzielić na trzy główne grupy: chemiczne, fizyczne (niewirusowe) i wirusowe (tab. 2). Za pomocą metod chemicznych wprowadzone zostaje DNA do komórki z efektywnością mniej więcej 1 pozytywna komórka na 10 000. W zastosowaniu niektórych metod fizycznych, jak np. w elektroporacji — 1 komórka na 1000. Wektory wirusowe natomiast charakteryzują się wysoką efektywnością sięgającą nawet 100% komórek transdukowanych. Wprowadzanie genów przy użyciu tych ostatnich określa się mianem transdukcji.

TABELA 2
METODY TRANSFERU GENÓW STOSOWANE W PRÓBACH TERAPII GENOWEJ

Metoda	Zastosowanie		Stała (S) lub przejściowa (P) Ekspresja genu
	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	
Niewirusowa (chemiczna i fizyczna)			
precypitacja CaPO ₄	+/-	-	S
elektroporacja	+/-	-	S
bezpośrednie wstrzyknięcie DNA	-	+	P
lipofekcja	+/-	+	P
kompleksy adenowirus-ligand-DNA	-	+	P
kompleksy ligand-DNA	-	+	P
Wirusowa			
retrowirusy	+	?	S
adenowirusy	+/-	+	P
wirusy <i>adeno-associated</i>	+	?	S
wirusy <i>Herpes Simplex</i>	+/-	+	?
wirusy <i>Vaccinia</i>	+/-	+	P
wirusy <i>Polio</i>	+/-	+	P
wirusy <i>Sindbis</i> i inne wirusy RNA	+/-	+	P

Opracowano i udoskonalono cały szereg wektorów ekspresyjnych w oparciu na genomach adenowirusów, retrowirusów, *adeno-associated* i innych typów wirusów (tab. 2). Ze względu na unikatowy cykl życiowy, wektory retrowirusowe są dotychczas najszerzej stosowane, chociaż wiele nadziei wiąże się z wektorami opartymi na genomach *adeno-associated*. Materiałem genetycznym retrowirusów jest RNA, który po wnikięciu do komórki jest przepisywany na DNA i z kolei zostaje wbudowany do genomu zainfekowanej komórki. Zawiera on sekwencje czynnościowe (promotrowe i wzmacniające) oraz strukturalne (kodujące białka enzymatyczne — *pol*, zrębu — *gag* i otoczki — *env*). Większość stosowanych wektorów wykorzystuje genom mysich, bądź ptasich retrowirusów. Ze względu na dobrze poznaną biologię najczęściej wykorzystuje się mysiego wirusa białaczki Moloneya. Wektory retrowirusowe charakteryzują się zdolnością transdukowania szerokiego spektrum komórek. Wszystkie systemy retrowirusowe składają się z dwóch elementów: 1) wektora retrowirusowego, zawierającego konkretny gen, oraz 2) układu dostarczającego białka strukturalne *in trans* (komórki pakujące).

2.1. Wektory retrowirusowe

Konstruowane są poprzez zastąpienie własnej informacji genetycznej retrowirusa przez geny, które mają zostać wprowadzone do komórki. Najczęściej przygotowane w ten sposób wektory zawierają również geny oporności na

antybiotyki toksyczne dla komórek eukariotycznych (neomycyne, hygromycynę czy puromycynę) pozwalające na pozytywną selekcję komórek transdukowanych. Ekspresja obu genów może być kontrolowana przez jeden (2), bądź przez różne promotory (3): endogenny — retrowirusowy i egzogenny — innego pochodzenia. W pierwszym przypadku składanie (ang. *splicing*) mRNA odbywa się przy udziale naturalnych mechanizmów retrowirusowych (3,4). Ostatnio powstały wektory dwucistronowe, w których synteza produktów obu genów zachodzi na bazie jednego mRNA. Mają one wiele zalet, przede wszystkim uzyskuje się większe miano zrekombinowanego wirusa; można do wektora upakować większą ilość informacji genetycznej i co bardzo ważne, uzyskuje się wysoce efektywną ekspresję genów (3).

Istotnym elementem w budowie wektora retrowirusowego jest sygnał pakujący (sekwencja *psi*), która umożliwia wbudowanie powstałej cząsteczki mRNA do otoczki białkowej (5). Powstanie kompletnego rekombinowanego wektora retrowirusowego wymaga również obecności genów kodujących białka enzymatyczne i białka otoczki (*gag*, *pol*, *env*). Wprowadzenie dodatkowej informacji genetycznej w postaci cDNA kodującego interesujące nas białko wymagało usunięcia tych genów, ponieważ długość RNA zdolna do upakowania w otoczkę jest ograniczona. W ten sposób wektory retrowirusowe są strukturami niezdolnymi do samodzielnej replikacji. Jednakże białka strukturalne otoczki mogą zostać dostarczone *in trans* poprzez tzw. „komórki pakujące”.

2.2. Komórki pakujące

Pierwsze generacje komórek pakujących powstały na początku lat osiemdziesiątych. Były to mysie fibroblasty, do których na stałe wprowadzono funkcjonalne geny *gag*, *pol* i *env*, jednakże w obrębie sekwencji pakującej *psi* dokonano mutacji (5,6). Zmodyfikowane w ten sposób komórki produkowały mRNA na których dochodziło do syntezy strukturalnych białek retrowirusowych. Te z kolei formowały otoczkę, do której jednak własny materiał genetyczny wirusa nie był pakowany. Po wprowadzeniu do tych komórek wektora retrowirusowego (poprzez transfekcję) dochodzi do syntezy mRNA zawierającego oprócz sztucznie wklonowanego cDNA funkcjonalną sekwencję *psi*, pozwalającą na upakowanie tegoż mRNA do otoczki. Powstały w ten sposób kompletny retrowirus zawiera pożądaną informację genetyczną i jest zdolny na drodze infekcji (transdukcji) wprowadzić ją do komórek docelowych.

Niestety, pierwsze uzyskane linie komórek pakujących stwarzały dość duże ryzyko powstania „dzikiego” wirusa, tzw. wirusa pomocniczego, na drodze rekombinacji (przekazania sekwencji pakującej) pomiędzy wektorem i zmutowanym wirusem obecnym w tych komórkach (7). W celu ograniczenia tego zjawiska wprowadzono dodatkowe mutacje do konstruktów pakującego. Najczęściej stosowana w terapii genowej linia komórek pakujących PA317 (8) zawiera prowirus, w którym oprócz delekcji w regionie *psi*, usunięto część 5' LTR (ang. *long terminal repeat*), a 3' LTR zamieniono na sygnał poliadenylujący wirusa SV40. Najnowsza generacja komórek pakujących zawiera dwa oddziel-

ne konstrukty. Jeden jest odpowiedzialny za ekspresję genów *gag* i *pol*, a drugi koduje białka otoczki (9,10,11,12). W ten sposób wzrasta liczba potencjalnych rekombinacji, które musiałyby zajść aby powstał „dziki” wirus.

3. Strategia terapii genowej

W strategii terapii genowej zakłada się wprowadzenie do komórki aktywnego genu zarówno w postaci funkcjonalnego homologu genu uszkodzonego, jak i genu terapeutycznego, którego produkt dałby oczekiwany efekt. Wiele chorób genetycznych, w tym częściowo choroba nowotworowa, jest wynikiem mutacji w obrębie pojedynczego genu. W niektórych z tych schorzeń wprowadzenie funkcjonalnej kopii genu (**wzmocnienie genu**) przyniosłoby efekt terapeutyczny, nawet w przypadku niewielkiej produkcji danego białka. Do tych defektów można zaliczyć: choroby szpiku, erytroenzymopatie, hepatoenzymopatie, choroby centralnego układu nerwowego. Na przykład 10 – 20% normalnie występującego aktywnego czynnika IX znosi ostrą postać hemofilii B (13). Jednakże korekcja innych zaburzeń wymaga określonego stężenia danego białka wydzielanego w odpowiedzi na swoisty sygnał. W tym przypadku wprowadzony gen musi znaleźć się pod kontrolą właściwych elementów regulacyjnych. Efekt ten można potencjalnie osiągnąć poprzez tzw. **wymianę genu**, w przeciwieństwie do opisanego już **wzmocnienia genu**. Nie zawsze konieczna jest korekcja informacji genetycznej w komórkach obciążonych konkretnym defektem. W tych przypadkach określony gen może zostać wprowadzony do innego rodzaju komórek, które w ten sposób zmodyfikowane zniosą patologiczny fenotyp. Ten rodzaj terapii został najlepiej udokumentowany przy użyciu szczurzego modelu choroby Parkinsona, w której objawy mogą zostać zniesione poprzez zastosowanie dopaminy. W tym doświadczeniu produkujące dopaminę fibroblasty zostały wszczepione do mózgowia niwelując w ten sposób proces patologiczny.

4. Obecnie stosowane koncepcje terapii genowej nowotworów

Według danych opublikowanych w miesięczniku „Human Gene Therapy” aktualnie (listopad 1994) na świecie zatwierdzono do realizacji łącznie 83 protokoły terapii genowej i terapii znacznikowej (gdzie w miejsce genu terapeutycznego wprowadzono tylko gen znacznikowy, np. oporności na antybiotyki). Trzydzieści trzy protokoły dotyczą nowotworów litych (czerniak złośliwy, raki nerki, płuc, jelita grubego i guzy mózgu). W obrębie tych 33 protokołów wyróżnia się pięć zasadniczych trendów czy strategii postępowania (zestawienie). Najwięcej protokołów dotyczy genetycznych szczepionek przeciwrakowych.

ZESTAWIENIE
STRATEGIE TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Obecnie stosowane strategie terapii genowej nowotworów

- Genetyczne komórkowe szczepionki przeciwrakowe
- Wprowadzanie genu HLA-B7 do komórek guza *in situ*
- Wprowadzanie „genów samobójców” do tkanki nowotworowej *in situ*
- Inaktywacja onkogenów lub/i wprowadzanie genów supresorowych do tkanki nowotworowej *in situ*
- Użycie genów oporności wielolekowej (MDR) w celu ochrony komórek szpiku w trakcie chemioterapii

4.1. Genetyczne komórkowe szczepionki przeciwrakowe

W ciągu kilkudziesięciu lat zaobserwowano, że wiele nowotworów pomimo ekspresji na swojej powierzchni antygenów, które są rozpoznawane jako obce przez układ odpornościowy, unika destrukcji. Doprowadziło to do prób aktywacji własnego układu odpornościowego przeciwko nowotworom. W tym celu m.in. opracowano szczepionki przeciwrakowe oparte na lizatach komórek nowotworowych, autologiczne bądź allogeniczne komórki nowotworowe naświetlane promieniami gamma albo sprzężone z adiuwantem (wirusowym lub bakteryjnym). Zastosowana immunizacja powodowała stymulację swoistych cytotoksycznych limfocytów T (CTL) i wzrost miana przeciwciał klasy IgM i IgG skierowanych przeciwko swoistym antygenom nowotworowym. Takie postępowanie u dużej liczby chorych prowadziło do bardzo istotnego wydłużenia życia.

Podjęmowano również próby bezpośredniej aktywacji CTL. W tym celu izolowane od chorych limfocyty naciekające guz (ang. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TILs) charakteryzujące się zdolnością rozpoznawania komórek nowotworowych, inkubowano *ex vivo* w obecności interleukiny drugiej (IL - 2), która odgrywa podstawową rolę w regulacji immunologicznej, stymulując proliferację limfocytów w odpowiedzi na antygen. Przygotowane w ten sposób limfocyty były w stanie w krótkim czasie niszczyć komórki nowotworowe.

W ostatnich latach powstała koncepcja genetycznych komórkowych szczepionek przeciwrakowych. Strategia tej terapii polega na lokalnym wzmocnieniu prezentacji antygeny, bądź kostymulacji układu odpornościowego, poprzez miejscowe dostarczenie wysokiego stężenia odpowiednich czynników, w celu aktywacji komórek cytotoksycznych. Jedną z grup czynników pełniących taką rolę są cytokiny. Praktycznie, postępowanie polega na pobraniu tkanki nowotworowej od chorych, izolacji komórek nowotworowych, ich namnożeniu *in vitro*, wprowadzeniu *ex vivo* za pomocą wektorów wirusowych danych genów, naświetleniu odpowiednią dawką promieni Rtg i wstrzyknięciu choremu podskórnym (szczepionki autologiczne). Ponadto, opracowuje się szczepionki allogeniczne. Oparte są one na komórkach ustalonych linii ludzkich nowotworów

(HLA – A1,2 pozytywnych) transdukowanych genami czynników stymulujących. Naświetlone promieniami Rtg komórki wstrzykuje się chorym HLA – A1 lub/i HLA – A2 pozytywnym podskórną. W przypadku szczepionek allogeniczných unika się izolacji i hodowli własnych komórek chorego, a obecność antygenów zgodności tkankowej HLA – A1/2 stwierdza się u 70% osobników populacji europejskiej. Próbuje się również stosować inne typy komórek jako nośniki genów czynników stymulujących (np. fibroblasty), które po zmieszaniu z komórkami autologicznymi i naświetleniu podaje się chorym w ten sam sposób. Jednakże obecnie nie można jeszcze ocenić ewentualnych różnic skuteczności przedstawionych dróg postępowania.

Cytokiny są głównymi modulatorami reakcji immunologicznych i zapalnych. Stosując mysie systemy doświadczalne w immunizacji komórkami nowotworowymi, produkującymi większość cytokin (głównie IL – 2, IL – 6, IL – 7, czynnikiem nekrotyzującym guzy α -TNF- α , czynnikiem stymulującym rozwój kolonii granulocytów i makrofagów — GM – CSF) wykazano ich zdolność do generacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jeden z pierwszych modeli zastosowanych do oceny przeciwnowotworowej aktywności cytokin opierał się na wprowadzeniu cDNA danej cytokiny do wektora ekspresyjnego, transfekcji komórek nowotworowych i szczepieniu nimi zwierząt doświadczalnych. Przy użyciu tego systemu wykazano aktywność i poznano mechanizm działania wielu cytokin (tab. 3). W większości przypadków nie wpływają one na proliferację komórek guza *in vitro*, tak zatem mechanizm immunomodulacji opiera się na stymulacji komórek efektorowych.

TABELA 3
KOMÓRKI ELEKTOROWE INDUKOWANE
W WYNIKU MIEJSCOWEGO WYDZIELANIA CYTOKIN PRZEZ KOMÓRKI GUZA

Cytokina	Główne komórki elektorowe	Inne komórki elektorowe	Literatura
IL – 1	nie oznaczono	nie oznaczono	(53)
IL – 2	T – CD8+	NK, makrofagi, neutrofile, eozynofile	(15, 16, 54)
IL – 4	eozynofile	makrofagi, T – CD8+	(19, 38)
INF – γ	T – CD8+	NK	(16, 55)
IL – 6 IL – 6/sII – 6R	T – CD4+, T – CD8+ T – CD4+, T – CD – 8+	NK, makrofagi NK	(22, 23, 25)
IL – 7	T – CD4+, T – CD8+, makrofagi		(26, 27, 28, 29)
TNF – α	T – CD4+, T – CD8+	makrofagi	(42)
G-CSF	neutrofile	makrofagi, eozynofile, T – CD8+	(56)
GM – CSF	T – CD4+, T – CD8+		(18)

Głównymi komórkami cytotoksycznymi, swoiście hamującymi wzrost nowotworu, są limfocyty T – CD8+. Najważniejszymi aktywatorami tej populacji

komórek są IL-2 (14,15) i INF (16,17). IL-2 jest jednym z podstawowych czynników wpływających na aktywację i proliferację limfocytów T. Mechanizm działania INF τ opiera się na powodowaniu wzrostu ekspresji antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy pierwszej (MHC-I), a tym samym na bardziej efektywnej prezentacji antygenów nowotworowych.

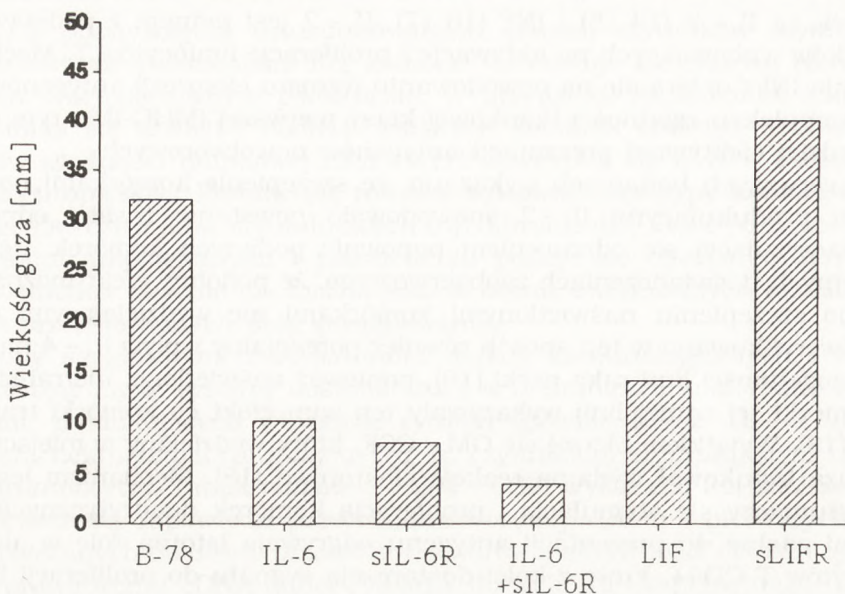
W pierwszych badaniach wykazano, że szczepienie komórkami nowotworowymi produkującymi IL-2 spowodowało powstanie trwałej odporności charakteryzującej się odrzuceniem ponownie podanych komórek. Jednakże w kolejnych doświadczeniach zaobserwowano, że podobny efekt można otrzymać po szczepieniu naświetlonymi komórkami nie wydzielającymi cytokin (18). Zweryfikowano w ten sposób również potencjalny wpływ IL-4 na wzrost immunogenności linii raka nerki (19), ponieważ naświetlone, nietransfekowane komórki tej samej linii wykazywały ten sam efekt co komórki transfekowane (18). Wyjątkiem okazał się GM-CSF, który wydzielany w miejscu wzrostu guza indukował wydajną reakcję efektorową (18). Mechanizm jego działania tłumaczy się stymulacją i proliferacją komórek dendrytycznych, które w pełni zdolne do prezentacji antygeny odgrywają istotną rolę w aktywacji limfocytów T CD4+, które z kolei dostarczają sygnału do proliferacji limfocytom T CD8+ (cytotoksycznym). Ponadto, zdolność stymulacji limfocytów T posiadają inne cytokiny takie jak: IL-6, IL-7 czy IL-12.

W pierwszych doświadczeniach wykazano, że IL-6 zastosowana ogólnie zapobiega wzrostowi czerniaka i formowaniu przerzutów (20,21). Podczas kolejnych badań zaobserwowano znacznie większy efekt po wprowadzeniu genu dla IL-6 do komórek nowotworowych (22,23,24). Przeciwnowotworowe działanie IL-6 polegające na aktywacji limfocytów T wykazano stosując niskoimmunogenną linię mysiego włóknakiomiesaka. Aktywacja obu subpopulacji — CD4+ i CD8+ była niezbędna do cofnięcia się przerzutów po dożylnym zastosowaniu cytokiny.

W przeprowadzonych przez nas badaniach potwierdziliśmy rolę IL-6 w modulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej (25). Ponadto, wykazaliśmy, że rozpuszczalna forma receptora dla IL-6 (sIL-6R), promująca działanie IL-6 *in vitro*, wydzielana przez komórki mysiego czerniaka wraz z IL-6 potęguje jej efekt. IL-6 w połączeniu z sIL-6R silnie hamowała wzrost guza, zdolność do tworzenia przerzutów i stymulowała długotrwałą odporność przeciwczeraniakową (rys. 1 i 2). Mechanizm działania kompleksu IL-6/sIL-6R związany był z aktywacją limfocytów T oraz komórek NK (25).

Wspomniano już, że IL-7 jest również czynnikiem aktywującym limfocyty T (26,27,28,29). Stosując model mysiego włóknakiomiesaka i glejaka zaobserwowano wpływ IL-7 na proliferację komórek CD8+ (27,28). Wyniki te potwierdzono przy użyciu metody selektywnej deplekcji limfocytów T-CD8+. Inna grupa badaczy wykazała w doświadczeniach z użyciem transfekowanej IL-7 linii mysiego szpiczaka udział makrofagów i limfocytów CD4+ w odrzuceniu nowotworu (26).

Niektóre różnice interpretacji wyników efektów cytokin w stosowanych modelach doświadczalnych przez różne grupy badaczy, wynikają prawdopodobnie

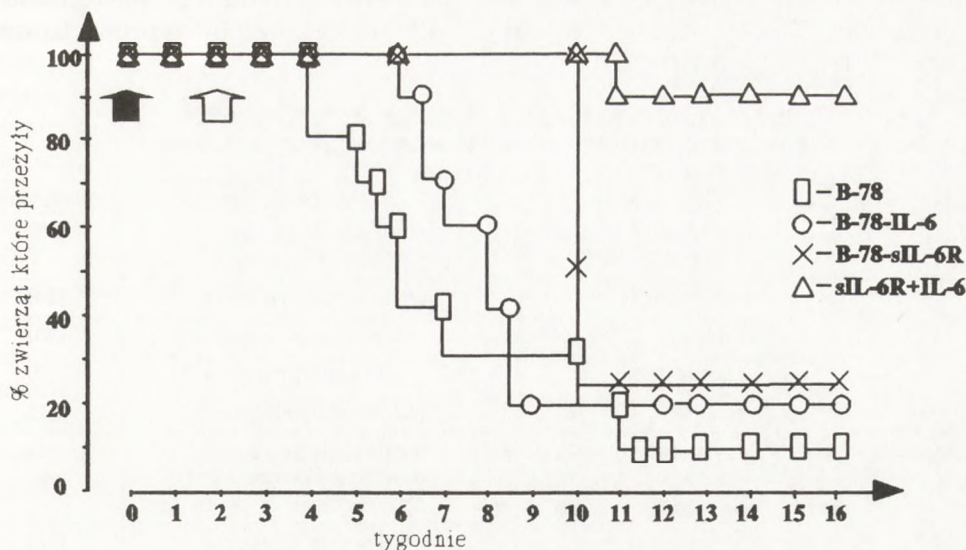


Rys.1. Analiza wzrostu guzów u myszy C57Bl/6 x C3H szczepionych podskórnie komórkami mysiego czerniaka (B-78) transfekowanymi genami cytokin. B-78 — komórki transfekowane „pustym” wektorem ekspresyjnym; IL-6 — komórki B-78 transfekowane genem dla IL-6; sIL-6R — B-78 transfekowane genem dla rozpuszczalnego receptora IL-6; IL-6 + sIL-6R — mieszanina 1:1 komórek przygotowanych jw. LIF — B-78 transfekowane genem dla czynnika hamującego wzrost białaczek (ang. *leukemia inhibitory factor*); sLIF-R — B-78 transfekowane rozpuszczalnym receptorem LIF.

nie z tego, że każdy zespół stosował linie komórkowe wywodzące się z odmiennych typów nowotworów.

Z jednej strony zahamowanie wzrostu guza może zależeć od stopnia ekspresji antygenów nowotworowych czy antygenów MHC, z drugiej natomiast od profilu wydzielanych endogennie cytokin. Ten ostatni czynnik ma istotne znaczenie ponieważ zaobserwowano produkcję wielu cytokin przez różne typy komórek nowotworowych (głównie IL-6, G-CSF, TGF- β) (28,30). Cytokiny mogą aktywować limfocyty T nie tylko bezpośrednio, lecz również na drodze wzrostu ekspresji antygenów MHC klasy I i II na komórkach nowotworowych lub na „profesjonalnych” komórkach prezentujących antygen. Dotyczy to również tzw. kostymulatorów powierzchniowych (B-7,1; B-7,2; B-7,3) (31,32,33), których obecność jest niezbędna do pełnej aktywacji limfocytów T i których ekspresja wzrasta pod wpływem INF γ (34), a jest obniżana przez IL-10 (35). Wprowadzenie genów cząsteczek kostymulujących do komórek guza silnie zwiększyło ich zdolność do stymulacji swoistych limfocytów cytotoksycznych (36,37).

Podczas gdy wiele cytokin, wydzielanych lokalnie w miejscu wzrostu guza, aktywuje mechanizmy swoiste, to produkcja innych prowadzi do stymulacji komórek biorących udział w reakcjach zapalnych. Jednym z przykładów jest IL-4, której wpływ na cytotoksyczność eozynofili został potwierdzony poprzez



Rys. 2. Analiza przeżycia myszy C57Bl/6 x C3H szczepionych podskórnie transfekowanymi komórkami B-78 (strzałka wypełniona) i doszczepianych podskórnie komórkami B-78 po upływie 2 tygodni.

obserwację, że myszy pozbawione tej populacji komórek nie były zdolne do odrzucenia guza w odpowiedzi na IL-4 (38). Z kolei czynnik stymulacji wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF) okazał się zasadniczy w stymulacji aktywności przeciwnowotworowej neutrofilii (39). Również szereg cytokin wydzielanych lokalnie powoduje nasilenie naciekania tkanki nowotworowej przez makrofagi, np. IL-2 (40), IL-4 (38), IL-7 (29), G-CSF (39), INF τ (41) czy TNF α - (42). Zwiększony napływ komórek zapalnych w miejsce wzrostu guza przyczynić się może do zwiększenia immunogenności (poprzez wzrost prezentacji antygeny, np. przez makrofagi i ułatwić w ten sposób rozpoznanie nowotworu przez swoiste mechanizmy efektorowe. Cytokiny regulujące procesy zapalne (IL-1, TNF- α , INF- τ , IL-4) wpływają na ekspresję cząstek adhezyjnych na komórkach endotelium (43,44). Aktywacja śródbłonna pozwala na „wychwyt” i dalszą migrację komórek zapalnych do tkanek. IL-4, np. indukuje pojawienie się cząsteczki VCAM-1 (44), dla której ligand (integryna VLA-4) znajduje się na limfocytach T, B, monocytach i makrofagach. Wpływ cytokin na endotelium poprzez oddziaływanie na jego proliferację może modylować angiogenezę w miejscu rozwoju nowotworu.

Wiele opisanych już cytokin testowano stosując model doświadczalny zbliżony do potencjalnej sytuacji klinicznej w celu określenia możliwości zastosowania danego czynnika do opracowania przeciwnowotworowej szczepionki komórkowej. Strategia ta polega na podaniu zwierzętom doświadczalnym allogenicznym komórkom nowotworowym w celu wywołania wzrostu guza lub uformowania przerzutów. Następnie te same zwierzęta szczepione są komórkami

transfekowanymi genami cytokin. Efekt terapeutyczny takiego postępowania stwierdzono stosując szereg cytokin i linii komórkowych wyprowadzonych z różnych nowotworów (tab. 4).

TABELA 4
PRÓBY LECZENIA EKSPERYMENTALNIE INDUKOWANYCH NOWOTWORÓW
POPURZEC ZASTOSOWANIE KOMÓREK TRANSFEKOWANYCH GENAMI CYTOKIN

Cytokina	Linia komorkowa	Efekt terapeutyczny	Literatura
Il - 2	rak pęcherza MBT-2	zmniejszenie guza, wydłużenie przeżycia	(45)
Il - 4	rak nerki RENCA	wydłużenie przeżycia	(19)
	szpiczak J558L	zahamowanie wzrostu	(38)
	glioblastoma C6	wydłużenie przeżycia	(57)
Il - 6	rak płuc	redukcja przerzutów	(22)
Il - 6/sIL - 6R	melanoma B - 78H1	wydłużenie przeżycia, redukcja przerzutów, zahamowanie wzrostu	(25)
GM - CSF	melanoma	wydłużenie przeżycia	(18)

4.2. Wprowadzanie genu HLA-B7 do komórek guza *in situ*

Innym sposobem immunoterapii genowej jest bezpośrednio wprowadzenie genu HLA - B7 do komórek czerniaka, które wykazują brak ekspresji tego antygeny na powierzchni. Gen wprowadza się *in vivo* przy użyciu lipofekcji. Zmodyfikowane komórki nowotworowe mają być lokalnie niszczone i powinny indukować swoistą odpowiedź cytotoksyczną. Obecnie realizowany jest jeden protokół kliniczny oparty na tej zasadzie.

4.3. Wprowadzenie „genów samobójców” do tkanki nowotworowej *in situ* i aktywacja mechanizmów samobójczych

W innej strategii zakłada się bezpośrednio wprowadzenie do komórek nowotworowych *in vivo* genów kodujących toksynę, bądź genów, których produkt uwrażliwia komórki na substancje toksyczne. Jednym z tzw. genów samobójców (ang. *suicide genes*) jest gen kinazy tymidynowej wirusa *Herpes Simplex* (HSV - tk). Produkt tego genu fosforyluje nietoksyczny u ludzi lek przeciwwirusowy — homolog nukleotydu guanidynowego — acyklowir (bądź gancyklowir), przekształcając go w formę toksyczną dla komórek. Fosforylowany analog gancyklowiru wbudowując się do nowo syntetyzowanego DNA hamuje polimerazę DNA oraz blokuje replikację prowadząc do śmierci komórki. W serii badań przedklinicznych (46,47) stransfekowane genem HSV - tk komórki nowotworowe oraz komórki nietransfekowane wszczepiano zwierzętom laboratoryjnym. Następnie podawano dożylnie gancyklowir. W przeciwieństwie do gru-

py kontrolnej uzyskano całkowitą regresję guzów uformowanych przez komórki zawierające gen HSV – tk. Podobne badania były prowadzone na modelu guzów mózgu u szczurów (48). W tym doświadczeniu fibroblasty produkujące wektor retrowirusowy zawierający cDNA dla HSV – tk zostały wprowadzone do guza *in vivo*, przy użyciu stereotaksji. Po upływie pięciu dni (okres potrzebny na zainfekowanie komórek przez wirusa oraz na ekspresję genu) podano gancyklowir, który spowodował całkowitą regresję guzów u jedenastu na czternaście szczurów. Na szczególną uwagę zasługuje to, że pomimo wprowadzenia genu HSV – tk tylko do części komórek zdołano uzyskać tak znaczący efekt terapeutyczny. Zjawisko to tłumaczy się tym, że gancyklowir fosforylowany przez komórki zainfekowane, przenika przez połączenia międzykomórkowe zabijając pozostałe, niemodyfikowane komórki guza. Ponadto dzięki unikatowej biologii retrowirusów, wprowadzających informację tylko do komórek dzielących się, normalne komórki mózgowia będące w fazie G_0 nie podlegają infekcji. Nie są one również wrażliwe na fosforan gancyklowiru dyfundujący wokół ponieważ upośledza on tylko komórki, w których dochodzi do replikacji DNA.

Innym genem samobójcą jest gen kodujący dezaminazę cytozynową. Został on również wykorzystany na potrzeby opisanej strategii (49). Enzym ten przekształca nietoksyczną 5' – fluorocytozynę w toksyczną pochodną 5' – fluorouracyl. W przeciwieństwie jednak do fosforanu gancyklowiru 5' – fluorouracyl nie posiada zdolności do dyfundowania przez połączenia międzykomórkowe, a zatem niszczone są tylko te komórki, do których gen wprowadzono.

Ostatnim przykładem zastosowania „genów samobójców” w terapii genowej nowotworów jest użycie genu kinazy tymidynowej wirusa *Varicella Zoster* (VZV – tk). W obecności VZV – tk nietoksyczny związek arabinonukleozyd 6 – metopurynowy (araM) zostaje przekształcony do monofosforanu, który jest następnie metabolizowany do toksycznego trójfosforanu. Komórki wątrobiaka zainfekowane za pomocą wektora retrowirusowego zawierającego cDNA VZV – tk pod kontrolą promotora dla α – fetoproteiny (AFP) wykazywały ekspresję tego genu oraz były wrażliwe na traktowanie (araM). Ponadto nie dochodziło do ekspresji AFP – VZVtk w liniach komórkowych pochodzących z innych narządów niż wątroba wskazując na wysoką swoistość tkankową zastosowanej technologii (50).

Obecnie zatwierdzone są 4 (łącznie z naszym) protokoły kliniczne terapii genowej guzów mózgu oraz 1 terapii przerzutów czerniaka złośliwego. Strategia polega na bezpośrednim wstrzyknięciu do guza komórek pakujących (PA317) produkujących rekombinowany retrowirus niosący gen HSV-tk z następnym podaniem gancyklowiru.

4.4. Wprowadzenie genów supresorowych i/lub antyonkogenów do tkanki nowotworowej *in situ*

Nowotwory najprawdopodobniej powstają wskutek szeregu zaburzeń genetycznych, dziedzicznych jak i nabytych, które akumulują się z czasem w komórce. Mutacje genów, powodować mogą ekspresję onkogenów bądź inakty-

wację genów supresorowych. W jednej ze strategii zakłada się odpowiednią korekcję transformowanych komórek poprzez zahamowanie aktywności onkogenów lub wprowadzenie do komórek nowotworowych funkcjonalnych homologów genów supresorowych (51). Słuszność tych założeń potwierdzono eksperymentalnie na modelach zwierzęcych poprzez modyfikację ekspresji onkogenu *k-ras* i genu supresorowego *p53* w przypadku raka płuc (52). Jeden protokół kliniczny tego typu jest obecnie realizowany.

4.5. Użycie genów oporności wielolekowej (MDR) w celu ochrony komórek szpiku w trakcie chemioterapii

Chemioterapia jest obecnie jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów. Jednakże stosowanie wysokich dawek poszczególnych leków jest ograniczone ze względu na znaczną toksyczność, zwłaszcza w odniesieniu do komórek szpiku. W jednej z koncepcji zakłada się wprowadzenie genów MDR do komórek prekursorowych szpiku w celu ich ochrony przy zastosowaniu wysokich dawek chemioterapeutyków. Wykazano, że komórki transdukiowane przy użyciu wektora retrowirusowego są bardziej odporne na działanie wielu leków. Również myszy, którym wprowadzono zmodyfikowane komórki były mniej wrażliwe na działanie tych samych środków. Obecnie realizowane są 3 protokoły kliniczne tego typu terapii u chorych na raka sutka, jajnika oraz u chorych z zaawansowanym procesem nowotworowym.

5. Podsumowanie

W ciągu ostatnich kilku lat rozwój inżynierii genetycznej i dokładne zrozumienie mechanizmów wielu dotychczas nieuleczalnych chorób spowodował burzliwy rozwój terapii genowej. Choroba nowotworowa zwłaszcza w ostatnim stadium rozwoju jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów we współczesnym świecie. Nic dziwnego zatem, że naukowcy zdecydowali się na spożytkowanie tej nowej technologii do walki z rakiem.

Pomimo wielu technicznych, jak i etycznych problemów szereg klinicznych protokołów zostało zaakceptowanych i wprowadzonych już w życie (tab. 5). Opierają się one na transferze genów do limfocytów jak i do komórek nowotworowych. Pierwsze próby przyniosły ekscytujące wyniki; w wielu przypadkach aplikacja genetycznie zmodyfikowanych komórek spowodowała cofnięcie się zaawansowanych przerzutów nowotworowych i całkowite wyleczenie chorych. Jednak na ostateczną ocenę tej terapii będziemy musieli jeszcze poczekać.

Zamierzeniem naszym podczas pisania tej pracy przeglądowej było podsumowanie obecnych koncepcji eksperymentalnych o największym znaczeniu dla terapii genowej nowotworów u ludzi. Wiele innych metod transferu genów (wektory adenowirusowe, *adeno-associated* i in.) i różne rodzaje tkanek czy komórek są i będą obiektem obecnych i przyszłych badań. Mimo wszystko ciągle jeszcze nasza wiedza dotycząca biologii komórki, kontroli jej proliferacji

czy ekspresji genu jest w wielu wypadkach niewystarczająca. Entuzjazm otaczający próby terapii genowej powinien skierować nasze wysiłki na wszystkie istotne obszary badań.

TABELA 5
PRÓBY KLINICZNE TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Rodzaj nowotworu	Czynnik	Główny wykonawca	Strategia
melanoma	Il - 2	S. A. Rosenberg	autologiczne limfocyty Tc
melanoma	TNF- α	S. A. Rosenberg	autologiczne limfocyty Tc
melanoma	Il - 2	B. Gansbacher	naświetlone allogeniczne limfocyty Tc
rak nerki	Il - 2	B. Gansbacher	jw.
melanoma	Il - 4	M. T. Lotze	naświetlone autologiczne fibroblasty i naświetlone autologiczne limfocyty Tc
neuroblastoma	Il - 2	M. K. Brener	autologiczne limfocyty Tc
glioma	HSVtk	E. Oldfield	
rak płuc	k-ras p53	J. A. Roth	antysensowe cDNA
glioma	HSVtk	K. Culver	
rak nerki	GM-CSF	J. Simons	naświetlone autologiczne limfocyty Tc
melanoma	INF- τ	H. F. Siegler	naświetlone autologiczne limfocyty Tc
melanoma	HLA-B7	G. J. Nabel	allogeniczne HLA
astrocytoma	HSVtk	C. Raffel	transdukcja <i>in vivo</i>
rak piersi	MDR	C. Hesdorffer	transdukcja komórek szpiku
glioblastoma	Il - 2	R. E. Sobol	naświetlone autologiczne limfocyty Tc lub fibroblasty
rak płuc	Il - 2	P. A. Cassileth	naświetlone autologiczne limfocyty Tc
rak piersi	MDR	J. O'Shaughnessy	transdukcja komórek szpiku
melanoma	Il - 2	T. K. DasGupta	naświetlone allogeniczne limfocyty Tc HLA-A2
melanoma	Il - 2	J. S. Economou	naświetlone allogeniczne limfocyty T lub naświetlone autologiczne limfocyty Tc
melanoma	Il - 2	S. Osanto	naświetlone allogeniczne limfocyty Tc
melanoma	Il - 6/sil - 6R	A. Mackiewicz	mieszanina naświetlonych autologicznych i naświetlonych transfekowanych allogenicznych komórek czerniaka

Praca finansowana była przez Komitet Badań Naukowych, grant nr 4S40209606.

Literatura

1. Salmons B., Gunsburg W. H., (1993), *Hum. Gene Ther.*, 4, 129 – 141.
2. Gilboa E., Eglitis M. A., Kantoff P. W., Anderson W. F., (1986), *BioTechniques*, 4, 504 – 512.
3. Levine F., Yee J. K., Friedmann T., (1991), *Gene*, 108, 167 – 174.
4. Koo H. M., Brown A. M. C., Kaufman R. J., Prorock C. M., Ron Y., Dougherty J.P., (1992), *Virology*, 186, 669 – 675.
5. Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D., (1983), *Cell*, 33, 153 – 159.
6. Cone R. D., Mulligan R. C., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3107 – 3110.
7. Miller A. D., Trauber D. R., Buttimore C., (1986), *Somatic Cell Mol. Genet.*, 12, 175 – 183.
8. Miller A. D., Buttimore C., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, 6, 2895 – 2902.
9. Bosselman R. A., Hsu R-Y., Bruszewski J., Hu S., Martin F., Nicolson M., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1797 – 1806.
10. Markowitz D., Goff S., Bank A., (1988), *Virology*, 167, 400 – 406.
11. Markowitz D., Goff S., Bank A., (1988), *J. Virol.*, 62, 1120 – 1124.
12. Dougherty J. P., Wiśniewski R., Yang S., Rhode B. W., Temin H. M., (1989), *J. Virol.*, 63, 3209 – 3212.
13. Yao S-N., Wilson J. M., Nabel E. G., Kurachi S., Hachiya H. L., Kurachi K., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8101 – 8105.
14. Fearon E. R., Pardoll D. M., Itaya T., Golumbek P., Levitsky H. I., Simons J. W., Karasuyama H., Vogelstein B., Frost P., (1990), *Cell*, 60, 3539 – 3543.
15. Gansgacher B., Zier K., Daniels B., Cronin K., Bannerji R., Gilboa, E., (1990), *J. Exp. Med.*, 172, 1217 – 1224.
16. Gansbacher B., Zier K., Daniels B., Cronin K., Bannerji R., Gilboa E., (1990), *Cancer Res.*, 50, 7820 – 7825.
17. Watanabe Y., Kuribayashi K., Miyatake S., Nishihara K., Nakayama E., Taniyama T., Sakata T., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9456 – 9460.
18. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R. C., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3539 – 3543.
19. Golumbek P., Lazenby A., Levitsky H. I., Jaffe L. M., Karasuyama H., Baker M., Pardoll D. M., (1992), *Science*, 254, 713 – 716.
20. Mule J. J., McIntosh J. K., Jablons D. M., Rosenberg S. A., (1990), *J. Exp. Med.*, 171, 629 – 636.
21. Mule J. J., Custer M. C., Travis W. D., Rosenberg S. A., (1992), *J. Immunol.*, 148, 2622 – 2629.
22. Porgador A., Tzehoval E., Katz, A., Vadai E., Revel M., Feldman M., Eisenbach L., (1992), *Cancer Res.*, 52, 3679 – 3686.
23. Mullen C. A., Coale M., Levy A. T., Stetler-Stevenson W. G., Liotta L. A., Brandt S., Blease R. M., (1992), *Cancer Res.*, 52, 6020 – 6024.
24. Sun W. H., Kreisle R. A., Philips A. W., Ershler W. B., (1992), *Cancer Res.*, 52, 5412 – 5415.
25. Mackiewicz A., Wiznerowicz M., Roeb E., Nowak J., Pawłowski T., Baumann H., Heinrich P. C., Rose-John S., (1994), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (w druku).
26. Hock H., Dorsh M., Diamanstein T., Blankenstein T., (1991), *J. Exp. Med.*, 174, 1291 – 1298.
27. Jicha D. L., Mule J. J., Rosenberg S. A., (1991), *J. Exp. Med.*, 174, 1511 – 1515.
28. Aoki T., Tashiro K., Miyatake S., Kinash T., Nakano T., Oda Y., Kikuchi H., & Honjo T., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3850 – 3854.
29. McBride W. H., Thacker J. D., Comora S., Economou J. S., Kelly D., Hogge D., Dubbinet S. M., Dougherty, G. J., (1992), *Cancer Res.*, 52, 3931 – 3937.
30. van Meir E., Sawamura Y., Diserens A. C., Hamou M. F., de Tribolet N., (1990), *Cancer Res.*, 50, 6683 – 6688.

31. Gimmi C. D., Freeman G. J., Grbben J. G., Sugita K., Freedman A. S., Morimoto C., Nadler L. M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6575 - 6579.
32. Koulova L., Clark E. A., Shu G., Dupont B., (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 759 - 762.
33. Linsley P. S., Brady W., Grosmaire L., Aruffo A., Damle N. K., Ledbetter J. A., (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 721 - 730.
34. Freedman A. S., Freeman G. J., Rhyhart K., Nadler L. M., (1991), *Cell. Immunol.*, 137, 429 - 437.
35. Ding L., Linsley P. S., Huang L., Germain R. N., Shevach E. M., (1993), *J. Immunol.*, 151, 1224 - 1234.
36. Chen L., Ashe S., Brady W. A., Hellstrom I., Hellstrom K. E., Ledbetter J. A., McGowan P., Linsley P. S., (1993), *Cell*, 71, 1093 - 1102.
37. Townsend S. E., Allison J. P., (1993), *Science*, 259, 368 - 370.
38. Tepper R. I., (1992), *Bone Marrow Transpl.*, 9, 177 - 181.
39. Colombo M. P., Ferrari G., Stoppacciaro A., Parenza M., Rodolfo M., Mavilio F., Parmiani G., (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 889 - 897.
40. Forni G., Giovarelli M., Santoni A., Modesti A., Forni M., (1987), *J. Immunol.*, 138, 4033 - 4041.
41. Giovarelli M., Cofano F., Vecchi A., Forni M., Landolfo S., Forni G., (1986), *Int. J. Cancer*, 37, 141 - 147.
42. Asher A. L., Mule J. J., Kasid A., Restifo N. P., Salo J. C., Reichert C. M., Jaffe G., Fendly B., Kriegler M., Rosenberg S. A., (1991), *J. Immunol.*, 146, 3227 - 3234.
43. Bevilacqua M. P., Prober J. S., Wheeler M. E., Cotran R. S., Gimbrone M. J., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2003 - 2009.
44. Thornhill M. H., Wellicome S. M., Mahiouz D. L., Lanchbury J. S. S., Kyan-Aung U., Haskard D. O., (1991), *J. Immunol.*, 146, 592 - 598.
45. Connor J., Bannerji R., Saito S., Heston W., Faire W., Gilboa E., (1993), *J. Exp. Med.*, 177, 1127 - 1134.
46. Moolten F. L., (1986), *Cancer Res.*, 46, 5276.
47. Moolten F. L., (1990), *Crit. Rev. Immunol.*, 10, 203-233.
48. Culver K. W., Ram Z., Wallbridge S., Ishi, H., Oldfield E. H., Blease R. M., (1992), *Science*, 256, 1550 - 1552.
49. Mullen C. A., Kilstrup M., Blease R. M., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 33 - 37.
50. Huber B. E., Richards C. A., Krenitsky T. A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8039 - 8043.
51. Friedmann T., (1992), *Cancer*, 70, 1810-1816.
52. Roth J. A., et al., (1992), *Recombinant DNA Advisory Committee Protocol*, aproved 9/15/92.
53. Douvdevani A., Huleihel M., Zoller M., Segal S., Apte R. N., (1992), *Int. J. Cancer*, 51, 822 - 830.
54. Karp S. E., Farber A., Salo J. C., Hwu P., Jaffe G., Asher A., Shiloni F., Restifo N. P., Mule J. J., Rosenberg S. A., (1993), *J. Immunol.*, 150, 896 - 908.
55. Hock H., Dorsh M., Kunzendorf U., Qin Z., Diamanstein T., Blankenstein T., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2774 - 2778.
56. Stoppacciaro A., Melani C., Parenza M., Mastracchio A., Bassi C., Baroni C., Parmiani G., Colombo M. P., (1993), *J. Exp. Med.*, 178, 151 - 161.

Gene therapy of cancer

Summary

Progress in genetic engineering has lead to the development of efficient methods of transfer and expression of genes in eucariotic cells.

This technology has been employed to kill cancer cells. Five major strategies of cancer gene therapy have been proposed and are currently verified in clinical trials. They include: (1) genetic cellular vaccines, (2) suicide genes, (3) multidrug resistance genes, (4) HLA genes transfer into cancer cells, and (5) repair of defective suppressor genes and/or removal of activated oncogene.

Key words:

gene therapy, retroviral vectores, gene transfer, cytokines, cancer.

Adres dla korespondencji:

Andrzej Mackiewicz, Zakład Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.