



## Nowe strategie wykorzystania wektorów plazmidowych i wirusowych w terapii genowej

Alicja Józkowicz, Józef Dulak

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### New strategies for application of plasmid and viral vectors in gene therapy

#### Summary

The success of gene therapy depends on development of efficient and safe delivery vectors. Recently, significant progress has been achieved in application of various non-viral delivery methods and numerous modified viral vectors for experimental gene therapy. Some of those vectors have been also successfully used in clinical trials of gene therapy. Further progress in this still promising, although not-fulfilling all expectations, treatment is dependent on the careful evaluation of the modes of transgene delivery and regulation of transgene expression in the diseased tissues. In this review the current progress in development of some of the tools for therapeutic gene transfer is discussed.

#### Key words:

gene therapy, adenoviral vectors, AAV vectors, plasmid vectors, regulable transgene expression.

#### Adres do korespondencji

Alicja Józkowicz,  
Zakład Biotechnologii  
Medycznej,  
Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Gronostajowa 7,  
31-271 Kraków;  
e-mail:  
alicia@mol.uj.edu.pl

### 1. Wstęp

Transformacja genetyczna komórek eukariotycznych przeprowadzona została po raz pierwszy w roku 1962 przez Elizabeth i Waclawa Szybalskich, pracujących na Uniwersytecie Wisconsin. Stosując roztwór fosforanu wapnia wprowadzili oni fragmenty DNA genomowego do ludzkich komórek szpiku. Badacze ci są również autorami terminu „terapia genowa” (1).

Terapia genowa to leczenie chorób za pomocą kwasów nukleinowych. Ta szeroka definicja obejmuje terapeutyczne wykorzystywanie zarówno genów jak i krótszych, niekodujących sekwencji DNA lub RNA. W zależności od rodzaju choroby dąży się bądź do naprawy wady genetycznej poprzez wprowadzenie do komórek prawidłowej postaci zmutowanego genu, bądź też próbuje się modyfikować aktywność poszczególnych genów. W tym drugim przypadku terapia może polegać na wprowadzaniu dodatkowych kopii, a przez to wzmacnianiu działania tych genów, które nie funkcjonują wystarczająco wydajnie. Może również zmierzać do zahamowania aktywności genów, których nadmierna ekspresja jest przyczyną chorób. To właśnie w hamującej terapii genowej wykorzystuje się także niekodujące sekwencje DNA lub RNA.

Opracowano wiele technik wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (2,3). Bez względu na zastosowaną metodę, wprowadzany do komórki materiał genetyczny napotyka podobne przeszkody, które musi pokonać. Pierwszą z nich jest przeniknięcie przez plazmalemę. Ma ona ładunek ujemny, podobnie jak DNA czy RNA, co bardzo utrudnia przyłgnięcie kwasów nukleinowych do powierzchni komórki. Co więcej, zarówno DNA jak i RNA są hydrofilowe, co uniemożliwia ich wnikanie na drodze fuzji z lipidową błoną (3).

Aby stransformować komórkę musimy albo spowodować powstanie w błonie porów albo posłużyć się nośnikami ułatwiającymi wniknięcie DNA czy RNA do komórki na zasadzie fuzji z błoną lub fagocytozy. Jeśli materiał genetyczny połączony z nośnikiem jest dostarczany dzięki fuzji z plazmalemą – gromadzi się w cytoplazmie pod błoną. RNA może podjąć swoje funkcje już tutaj, jednak DNA – znacznie częściej stosowany do transformacji – musi przedostać się do jądra. Transport ten jest bardzo mało wydajny i zdecydowana większość cząsteczek zostaje strawiona w cytoplazmie. Najczęściej jednak materiał genetyczny związany z nośnikami wnika do komórki nie dzięki fuzji, lecz na drodze endocytozy. Wówczas początkowo lokalizuje się w endosomach, co stanowi dodatkową trudność, gdyż może w nich zostać szybko zniszczony przez nukleazy. Generalnie, przy zastosowaniu większości metod wprowadzenie DNA lub RNA do wnętrza komórki jest stosunkowo proste, natomiast o skuteczności transformacji decyduje efektywność uwalniania kwasu nukleinowego z endosomu i wydajność transportu DNA do jądra (3,4).

W większości przypadków DNA wprowadzony do transformowanych komórek pozostaje w jądrze jako element episomalny i nie wbudowuje się do chromosomów gospodarza. Utrzymuje się na niezmienionym poziomie zwykle od kilkunastu godzin do kilku dni, a następnie jest stopniowo degradowany. Ponadto, w trakcie podziału komórki egzogeny DNA nie replikuje i jest przekazywany tylko do niektórych komórek potomnych. Ekspresja transgeny występującego w formie episomalnej może być znacznie dłuższa *in vivo* w komórkach nie dzielących się, np. mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym czy w komórkach dzielących się rzadko, takich jak hepatocyty (3).

Należy pamiętać, że są wektory – przede wszystkim wektory retrowirusowe i lentiwirusowe, które wbudowują transgen do chromosomów gospodarza, pozwa-

lając na jego stabilną ekspresję (2). Wprowadzony DNA nie jest degradowany, lecz ulega replikacji wraz z DNA genomowym i jest przekazywany wszystkim komórkom potomnym. Integracja transgenu z DNA gospodarza zdarza się również przy wykorzystaniu innych wektorów, np. plazmidów lub wektorów adenowirusowych, ale proces ten jest bardzo mało wydajny i jego częstość waha się od 1 na 100 do 1 na 1000 stransdukowanych komórek (2,4).

Wbudowanie transgenu do endogenego DNA komórki pozwala na uzyskanie długotrwałego efektu biologicznego, bywa zatem zjawiskiem bardzo pożądanym. Może jednak prowadzić także do skutków ubocznych, wywołując zmiany w funkcjonowaniu genów gospodarza. Jedną z konsekwencji może być unieczynnienie genu na skutek wbudowania transgenu w obręb sekwencji kodującej lub w miejsca regulatorowe. Insercja może też wywoływać jednoczesną delecję długich fragmentów DNA genomowego lub zmieniać wzór jego metylacji. Jednocześnie, jeśli transgen jest regulowany przez silny promotor (zwłaszcza przez sekwencje promotorowe LTR wektorów retrowirusowych) jego obecność może aktywować ekspresję genów położonych w pobliżu insercji (5).

Podstawowym narzędziem stosowanym do sklonowania i namnożenia transgenu są plazmidy. Są one niezbędne do uzyskania każdego, nawet najbardziej zaawansowanego wektora stosowanego w terapii genowej. Mogą również być wykorzystywane bezpośrednio jako nośnik wprowadzający transgen do komórki.

Wklonowanie wybranego genu do plazmidu wykonuje się najczęściej wykorzystując obecne w plazmidzie miejsca rozpoznawane i cięte przez enzymy restrykcyjne. Zgrupowane są one zazwyczaj w segmencie określanym jako polilinker (MCS, ang. *multi-cloning site*). Aby wklonowany DNA ulegał ekspresji w komórkach eukariotycznych, konieczne jest podłączenie go do sekwencji promotorowych. Najprostszy i najczęściej stosowanymi promotorami są sekwencje DNA pochodzenia wirusowego, np. promotor ludzkiego wirusa cytomegalii (CMV) bądź małpiego wirusa SV40. Coraz częściej używane są również promotory pochodzące z komórek eukariotycznych, zwykle z genów konstytutywnych, takich jak gen  $\beta$ -globiny, aktywnych we wszystkich typach komórek. Szczególnie obiecujące jest jednak stosowanie promotorów tkankowospecyficznych, dzięki którym ekspresja transgenu zachodzi tylko w wybranych komórkach. Można też wykorzystywać promotory, których aktywność jest regulowana, np. przez antybiotyki lub obniżone stężenie tlenu w tkance (6,7).

Plazmidy stosowane w dotychczasowych próbach terapii genowej najczęściej zawierały jeden transgen terapeutyczny. Okazuje się jednak, że złożony charakter chorób może wymagać zwiększania ekspresji większej liczby genów. Wykorzystuje się wówczas tzw. plazmidy policistronowe. W wektorach takich ekspresja drugiego genu terapeutycznego może być regulowana przez sekwencję IRES (ang. *internal ribosome entry site*), umożliwiającą translację mRNA niezależną od czapeczki 5'. Brak jednak jednoznacznych danych dotyczących efektywności takich wektorów, która w przypadku genu zależnego od IRES może być niższa (8).

## 2. Narzędzia terapii genowej

W niektórych przypadkach, aby wprowadzić materiał genetyczny do organizmu, wystarczy wstrzyknąć do tkanki roztwór DNA plazmidowego w soli fizjologicznej. Jest to tzw. nagi DNA. Jego wykorzystanie jako nośnika ma wiele zalet. Plazmidy są bowiem proste i tanie w produkcji, a ich podanie do organizmu wywołuje znikome efekty uboczne, ograniczone zwykle do niewielkiego odczynu zapalnego. Można w ten sposób uzyskać transformację mięśni szkieletowych i kardiomiocytów oraz niektórych komórek skóry. Dużą wydajność transfekcji nagim DNA i wysoki poziom ekspresji transgenu uzyskiwano w doświadczeniach prowadzonych na myszach. Należy jednak zaznaczyć, że w wielu badaniach poddaje się w wątpliwość efektywność tej metody u ludzi. Opisywane np. efekty lecznicze w terapii choroby niedokrwiennej serca za pomocą wektorów plazmidowych z genami stymulującymi powstawanie naczyń krwionośnych są zapewne wynikiem samego zabiegu, a nie ekspresji transgenów, która jest bardzo niska przy wykorzystaniu nagiego DNA u ludzi (1,9).

Obecnie testowanych jest wiele technik mających na celu zwiększenie skuteczności dostarczania plazmidów do tkanek. Jedną z nich jest tzw. metoda hydrodynamiczna. Polega ona na szybkim wstrzyknięciu do krwi dużej objętości płynu zawierającego plazmidowy DNA. Oznacza to, że myszy ważące około 20 g podaje się do żyły ogonowej w ciągu kilku sekund ponad 1,5 mL soli fizjologicznej zawierającej 5 µg plazmidu. Ekspresję genu wprowadzonego w plazmidzie obserwuje się zwłaszcza w wątrobie, ale także w innych tkankach (10). Zastosowanie tej metody w terapii genowej człowieka wymaga optymalizacji sposobu podawania płynu w taki sposób, by nie doszło do uszkodzenia narządów. Obecnie szanse na zastosowanie tej techniki w praktyce klinicznej są jednak znikome.

Podawanie nagiego DNA do większości tkanek jest nieskuteczne. Nie można go również wprowadzać do komórek hodowanych *in vitro*. W tym przypadku trzeba użyć którejś z metod fizycznych, biochemicznych lub biologicznych, ułatwiających transformację.

Metody fizyczne pozwalają na wprowadzenie kwasu nukleinowego do cytoplazmy lub do jądra komórkowego poprzez lokalne i odwracalne uszkodzenie błony. Najczęściej stosowaną procedurą jest elektroporacja, polegająca na poddaniu komórek działaniu krótkotrwałego impulsu elektrycznego o wysokim napięciu. Prowadzi to do tworzenia się w plazmalemmie porów o nanometrowej średnicy, które zanikają spontanicznie po około 30 minutach. Materiał genetyczny może wnikać do komórek albo w czasie gdy pory są otwarte, albo na skutek przemieszczania się składników błony komórkowej przy ich zamykaniu. Elektroporacja bywa wyjątkowo skuteczna, także w komórkach do których bardzo trudno wprowadzić transgeny innymi metodami. Często wiąże się jednak z poważnym uszkodzeniem komórek. Początkowo była stosowana tylko *in vitro*, ale od pewnego czasu, dzięki opracowaniu odpowiednich urządzeń, możliwe jest wspomaganie poprzez elektroporację transferu nagiego DNA do skóry, mięśni szkieletowych czy nawet wątroby (10).

Metody biochemiczne opierają się na zastosowaniu chemicznych nośników tworzących kompleksy z kwasami nukleinowymi. Najczęściej wykorzystywanymi nośnikami są lipidy kationowe (liposomy kationowe) lub polimery aminowe (oligodendrimery), które pozwalają zneutralizować ujemny ładunek kwasów nukleinowych. Kompleksy dostają się do komórki na drodze fagocytozy lub – rzadziej – fuzji z błoną komórkową. Niektóre z nośników ułatwiają również uwolnienie kwasu nukleinowego z endosomu do cytoplazmy i chronią go przed aktywnością nukleaz (2,10).

Pierwszym zastosowanym nośnikiem chemicznym ułatwiającym transformację genetyczną *in vitro* był fosforan wapnia (1). Jest on często używany również obecnie, zwłaszcza przy wprowadzaniu jednocześnie kilku plazmidów do szybko dzielących się linii komórkowych. Efektywność transdukcji hodowli pierwotnych jest jednak z reguły bardzo słaba. Znacznie droższymi, ale też zwykle skuteczniejszymi nośnikami są lipidy kationowe, często łączone z lipidami obojętnymi. Są one mało toksyczne, mogą jednak wywoływać aktywację niektórych komórek i indukować produkcję cytokin pozapalnych (1,2,10).

Liposomy można też stosować do dostarczania plazmidów *in vivo*. Po dożylnym wstrzyknięciu liposomów większość plazmidowego DNA trafia do płuc i wątroby, wykrywa się go jednak także w innych narządach, np. śledzionie. W organizmie przeprowadzanie i skuteczne wykorzystanie lipopleksów jest ograniczone poprzez występowanie rozmaitych barier. We krwi kompleksy narażone są na wychwycenie przez komórki fagocytujące, DNA na strawienie przez nukleazy, a większość plazmidów i tak nie dociera do komórek, gdyż zostaje zatrzymana w macierzy pozakomórkowej. Lipopleksy, w porównaniu z wektorami wirusowymi są więc stosunkowo mało efektywne, mniej stabilne i osiągnięta poprzez ich zastosowanie ekspresja transgeny jest krótkotrwała. Mogą też indukować odpowiedź zapalną.

W doświadczeniach klinicznych lipopleksy wykorzystywane są nieco rzadziej aniżeli nagi plazmidowy DNA. Stosowano je np. do wprowadzania plazmidu z genem białka kanału jonowego CFTR do nabłonka dróg oddechowych pacjentów chorych na mukowiscydozę. Obecnie testuje się je w terapii przeciwnowotworowej a także w niektórych próbach leczenia schorzeń układu krążenia (1,9,11-17).

Wydajność transfekcji za pomocą liposomów można zwiększyć, dodając do nośnika tłuszczowego ligandy wiążące się z receptorami występującymi na powierzchni komórek. Jednym z takich ligandów jest asialoglikoproteina, wiążąca się z receptorem obecnym na hepatocytach. Zastosowanie sekwencji RGD poprawia natomiast skuteczność transfekcji do komórek śródbłonka, a połączenie liposomów z przeciwciałem przeciwko selektynie E umożliwia zwiększenie transfekcji pobudzonych komórek śródbłonka, np. w guzie nowotworowym. Jednym z bardziej efektywnych sposobów okazało się połączenie liposomów z białkami osłonki wirusa gorączki japońskiej (HVJ, ang. *heماغlutinin virus of Japan*). Nośniki takie, zwane wiropopleksami, wykorzystano m.in. do dostarczania plazmidów do komórek ściany naczyń krwionośnych (18).

Drugą, bardzo popularną grupą nośników chemicznych są oligodendrymery, zbudowane np. z polimerów poliamidoaminowych (3). Tworzą one gwiazdziste lub sferyczne struktury z licznymi grupami aminowymi wewnątrz i na zewnątrz cząsteczki, nadającymi dendrymerom ładunek dodatni. Dzięki temu dendrymery łatwo formują kompleksy z DNA lub RNA, które następnie dostają się do komórki na drodze fagocytozy. Stosowane są przy transformacji komórek *in vitro*, a ich zaletą jest zarówno stosunkowo duża wydajność jak i mały poziom cytotoksyczności i aktywacji komórek.

Najbardziej wyrafinowanymi technikami transformacji genetycznej są jednak metody biologiczne, opierające się na wykorzystaniu różnego rodzaju wektorów wirusowych. Wektory takie tworzy się poprzez usunięcie niektórych genów niezbędnych dla normalnego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa i zastąpieniu ich transgenem. Obecnie stosuje się wektory pochodzące od wielu różnych wirusów, niektóre z nich wykorzystywane są też w próbach klinicznych (1,2,4).

Jednymi z najczęściej używanych narzędzi są wektory retrowirusowe (2,4,19). Wprowadzają one transgen do chromosomów gospodarza, dlatego zapewniają jego stabilną ekspresję. Zdecydowana większość wektorów retrowirusowych pochodzi od wirusa mysiej białaczki Moloneya (MLV, ang. *Moloney murine leukemia virus*). Są one nośnikami szczególnie przydatnymi do dostarczania transgenów *in vitro*: zmodyfikowany wektor uzyskany na bazie MLV infekuje wiele typów komórek, może być produkowany w stosunkowo wysokich mianach ( $10^6$ - $10^7$  cząstek infekcyjnych/mL) i zapewnia długotrwałą ekspresję genu. Naturalny tropizm onkoretrowirusów do komórek mysich modyfikuje się poprzez wprowadzanie do osłonki białek umożliwiających wiązanie się do innych typów komórek. Zastosowanie genu wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV) pozwala na produkcję wektorów wykazujących powinowactwo do wielu typów komórek zarówno kręgowców, jak i bezkręgowców.

Należy jednak pamiętać, że wektory retrowirusowe mogą skutecznie wprowadzać materiał genetyczny jedynie w trakcie podziału komórek (2,4,19). Wyjątek stanowią wektory lentiwirusowe, które mogą transdukować również komórki nie dzielące się. Są one coraz powszechniej wykorzystywane, zwłaszcza do transformacji komórek nerwowych. Ważną cechą retrowirusów jest też to, że choć nie indukują odpowiedzi immunologicznej, są jednak bardzo wrażliwe na degradację przez układ dopełniacza – dlatego podane *in vivo* są nieskuteczne. Można je natomiast z powodzeniem stosować do transdukcji komórek *ex vivo*. Strategia *ex vivo* terapii genowej polega na pobraniu od pacjenta komórek, ich hodowli w laboratorium, infekcji wektorem retrowirusowym, a następnie selekcji i namnożeniu komórek zmodyfikowanych, które podaje się z powrotem do organizmu chorego. Pozwala to uniknąć zniszczenia wektorów przez układ dopełniacza oraz umożliwia zwiększenie skuteczności wektorów, gdyż komórki *in vitro* można np. sprowokować do podziałów poprzez podanie odpowiednich mitogenów. Taka strategia umożliwia ponadto użycie znacznie mniejszej liczby wektorów, co jest bardzo ważne w przypad-

ku wektorów retrowirusowych, gdyż ich produkcja w wysokich mianach jest bardzo trudna. Ze stosowaniem wektorów retrowirusowych wiąże się jednak ryzyko mutagenyzy insercyjnej. Retrowirusy (także HIV) wbudowują się preferencyjnie w regiony bogate w geny, zwłaszcza aktywne transkrypcyjnie (20). Obecnie testuje się kilka strategii mających na celu zmniejszenie ryzyka.

Co najmniej równie często jak retrowirusy wykorzystywane są wektory adenowirusowe, będące jednymi z najbardziej uniwersalnych nośników (2,19,21). Mogą one wnikać do prawie wszystkich typów komórek, zarówno dzielących się jak i nie dzielących się, a ich skuteczność *in vitro* często sięga 100%. Naturalnym celem adenowirusów *in vivo* są komórki nabłonkowe układu oddechowego i pokarmowego. Po podaniu do krwi wektory transdukuje natomiast głównie wątrobę, wprowadzając geny zarówno do hepatocytów jak i komórek śródbłonna. Także *in vivo* ich efektywność jest imponująca – po jednorazowej iniekcji mogą zainfekować praktycznie wszystkie komórki wątroby. Wprowadzony transgen pozostaje w jądrze w formie episomalnej, pozwalając na bardzo silną ekspresję. Jest ona jednak krótkotrwała i obniża się gwałtownie już po kilku dniach, zaś przestaje być wykrywana zwykle po kilku tygodniach.

W transformacji komórek *in vitro*, w większości doświadczeń *in vivo* czy większości prób klinicznych stosuje się wektory adenowirusowe pierwszej generacji, czyli takie z których genomu usuwa się region E1 lub regiony E1 i E3. Ich pojemność wynosi około 9 kb (21-23). Ponadto, wektory adenowirusowe (a także natywne, inaktywowane adenowirusy) mogą być wykorzystywane do dostarczania do komórek bardzo dużych fragmentów DNA, np. sztucznych chromosomów bakteryjnych (BAC, ang. *bacterial artificial chromosome*), których długość sięga 170 kb. W tym przypadku DNA jest skondensowany i przyczepiony do zewnętrznej części kapsydu adenowirusowego za pomocą streptawidyny/biotyny lub polietylenoiminy. Przyłączony DNA razem z kapsydem wnika do komórki na drodze fagocytozy, a następnie jest uwalniany z fagosomu do cytoplazmy.

Wadą najczęściej używanych wektorów adenowirusowych, zawierających nadal sporą liczbę genów wirusowych, jest ich immunogenność. Na podstawie wyników badań na zwierzętach oraz prób klinicznych dowodzi się, że podanie wektorów adenowirusowych pierwszej generacji może wywoływać zapalenie i odpowiedź cytotoksyczną skierowaną przeciwko zainfekowanym komórkom, co jest główną przyczyną wyciszenia ekspresji transgeny. Niemniej jednak wektory adenowirusowe są obecnie najczęściej wykorzystywanymi wektorami w próbach klinicznych terapii genowej (19; patrz też: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)) i uważa się, że przy właściwym dozowaniu ryzyko wystąpienia reakcji zapalnych jest stosunkowo niewielkie.

W ciągu kilku ostatnich lat prowadzono bardzo intensywne badania mające na celu udoskonalenie wektorów adenowirusowych, a zwłaszcza zmniejszenie ich cytotoksyczności i immunogenności (21). Jedną z testowanych możliwości jest usunięcie dodatkowych sekwencji z wektorów  $\Delta E1/\Delta E3$ . Chociaż w wielu doświadczeniach potwierdzono, że wektory takie zapewniają dłuższą ekspresję transgeny i wywołują

słabszą reakcję zapalną, jednak czas ekspresji i poziom bezpieczeństwa wciąż nie były w pełni satysfakcjonujące. Zasugerowano zatem, że rozwiązaniem może być usunięcie z genomu wszystkich sekwencji kodujących i pozostawienie jedynie tych fragmentów DNA wirusowego, które są niezbędne do replikacji. Dodatkową korzyścią takiego rozwiązania byłoby zwiększenie pojemności nośnika. Ponieważ sekwencje niezbędne do replikacji i zapakowania genomu do kapsydu obejmują mniej niż 500 par zasad, teoretycznie możliwe było przygotowanie wektora o pojemności do 37 kb. W ten sposób pojawiły się wektory III generacji, inaczej wektorami typu *gutless* (21,24-28).

Usunięcie sekwencji kodujących całkowicie eliminuje możliwość produkcji białek wirusowych przez zainfekowane komórki, dzięki czemu wektory *gutless* są zdecydowanie mniej immunogenne niż adenowirusy wcześniejszych generacji. W efekcie zapewniają silną i długotrwałą ekspresję transgenów. Duża pojemność wektorów *gutless* pozwala na włączenie do nich sekwencji nawet najdłuższych znanych cDNA (np. cDNA dystrofiny), a w wielu przypadkach umożliwia również wprowadzenie kompletnych sekwencji genomowych, obejmujących wszystkie introny i egzony oraz endogenne sekwencje regulacyjne. Możliwe jest też wklonowanie do jednego wektora kilku niezależnych jednostek replikacyjnych, a także wykorzystanie tkankowospecyficznych promotorów eukariotycznych.

Badania eksperymentalne z wektorami *gutless* są bardzo obiecujące. Za pomocą takich wektorów udało się np. skutecznie zapobiec miażdżycy u myszy podatnych na jej rozwój (25,26) czy też powstrzymać patologiczną otyłość u myszy obciążonych cukrzycą (24,27,28). Wynik taki osiągnięto po jednorazowym podaniu wektorów, a ekspresja transgenu i efekt terapeutyczny utrzymywały się przez bardzo długi czas, nawet ponad dwa lata. Mimo że wektory *gutless* nie indukują późnej fazy cytotoksyczności, nie są jednak pozbawione wad – mogą wywoływać skutki uboczne, np. trombocytopenię, związane z obecnością kapsydu adenowirusowego.

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się wektorom wywodzącym się z wirusów towarzyszących adenowirusom (AAV, ang. *adeno-associated viruses*) (2,4,29,30). Również one mogą transdukować wiele typów komórek, zarówno dzielących się jak i nie dzielących się. Są bardzo cenione jako potencjalne nośniki, gdyż nie indukują silnej odpowiedzi układu odpornościowego. Wprowadzany przez nie transgen pozostaje zwykle w formie episomalnej lub integruje z przypadkowymi miejscami genomu.

Dziki wirusy AAV wbudowują się do genomu, i to w ściśle określonym miejscu (tak zwane locus AAVS1) na chromosomie 19 (29). Taka specyficzna integracja byłaby bardzo pożądaną cechą w terapii genowej, gdyż minimalizowałaby ryzyko indukcji mutagenyzy insercyjnej, przy jednoczesnym zapewnianiu długotrwałej ekspresji transgenu. Okazuje się jednak, że usuwanie podczas produkcji wektorów AAV wirusowego genu *rep*, który jest niezbędny do specyficznej integracji powoduje, że w przeciwieństwie do dzikich wirusów, wektory AAV nie wbudowują się w genom w ściśle określonych miejscach.

Ograniczeniem wektorów AAV jest niewielka pojemność – można w nich umieścić odcinek DNA nie większy niż 5 kb. Dla niektórych celów jest to pojemność wy-

starcząca, ale jeśli terapeutyczny gen jest duży, AAV nie mogą być stosowane. Obecnie opracowuje się metody pozwalające na ominięcie tego problemu, wykorzystując np. zdolność łączenia się dwóch genomów AAV w konkatamery. W ten sposób długi gen może być wprowadzony do komórki za pomocą dwóch wektorów.

Wektory AAV zapewniają długotrwałą ekspresję genów po podaniu *in vivo* do komórek nie dzielących się, np. mięśni szkieletowych. Ekspresję stwierdzano nawet po dwóch latach od podania wektorów u myszy, a po kilku miesiącach po podaniu wektorów psom, małpom i ludziom (29,30). Dlatego, jak się wydaje, wektory AAV mogą być szczególnie obiecujące w leczeniu np. wrodzonych chorób monogenowych. Należy jednak zaznaczyć, że produkcja wektorów AAV jest stosunkowo mało wydajna (zob. prace (31) oraz (32)), co stanowi istotne ograniczenie używania AAV w próbach klinicznych.

Pozostałe typy wektorów, choć intensywnie badane, są rzadko stosowane w próbach eksperymentalnej terapii genowej (2,4). Obecnie coraz więcej doświadczeń poświęca się wektorom herpetowirusowym. Do ich produkcji wykorzystuje się najczęściej dwa wirusy: wirus Epsteina-Barr (EBV) i wirus opryszczki (HSV). W ich genomie można umieścić insert długości 30-40 kb. Wektory pochodzące od wirusa HSV przeznaczone są przede wszystkim do transdukcji neuronów, a wektory EBV wnikają głównie do limfocytów B. Co ciekawe, w wielu komórkach wektory herpetowirusowe mogą replikować, zapewniając episomalną, lecz długotrwałą ekspresję transgenu.

Inną interesującą grupą są wektory pokswirusowe, wywodzące się z wirusa krowianki. Nie wbudowują się do genomu, a najczęściej stosuje się je przy testach szczepionek genetycznych. Ich zaletą jest duża pojemność, silna ekspresja transgenu i możliwość transdukowania wielu typów komórek. Do wprowadzania transgenów *in vitro* stosowane są także wektory alfawirusowe, pochodzące z wirusów Semliki Forest lub Sindbis. Również one mogą transdukować różne typy komórek, dzielących się i nie dzielących się, tak kręgowców jak i bezkręgowców. Są przydatne do przejściowej transformacji, zapewniając bardzo wysoki poziom ekspresji transgenu. Jednocześnie jednak hamują syntezę wielu białek endogenych i mogą być toksyczne dla komórek.

Ostatnią grupą bardzo ważnych wektorów, wykorzystywanych szczególnie przy produkcji białek rekombinowanych są wektory bakulowirusowe (33). Wywodzą się one przede wszystkim z bakulowirusów z podrodziny wirusów jądrowej poliedrozy (NPV), a zwłaszcza z bakulowirusa AcNPV infekującego motyla *Autographa californica*. Wirus ten może replikować jedynie w komórkach owadów łuskoskrzydłych (*Lepidoptera*), zatem wektory bakulowirusowe przygotowuje się w hodowlach odpowiednich komórek owadzych. Mimo to można je stosować do wprowadzania transgenów do komórek ssaczy. Wnikają do komórek na drodze fagocytozy i zapewniają episomalną ekspresję transgenu. Co istotne, nawet podane w wysokich mianach nie są toksyczne dla komórek, nie ulegają też w nich replikacji. Mogą zatem okazać się wektorami bardzo bezpiecznymi. W większości przypadków badania nowych typów wektorów wirusowych mają jednak charakter eksperymentalny i nie rozpoczęto jeszcze prób klinicznych.

### 3. Regulowane systemy ekspresji genów

Obok wysokiej wydajności transfekcji najistotniejszą cechą dobrego wektora byłaby możliwość regulacji ekspresji wprowadzonego transgenu w zależności od potrzeb organizmu. Intuicyjnie, jak się wydaje, najlepszym sposobem regulacji mogłoby być wykorzystanie naturalnego promotora transgenu. Strategia taka miałaby jednak sens tylko w takim przypadku, gdyby w komórkach poddawanych modyfikacji regulacja ekspresji nie była zaburzona. Niestety, często przyczyną chorób nabytych, związanych z nadmierną lub osłabioną aktywnością genów, jest niewłaściwy mechanizm regulacji ekspresji genu endogennego. Można zatem przypuszczać, że mechanizm taki byłby również niewydajny po wprowadzeniu do komórek dodatkowych kopii genu, pod kontrolą jego własnego promotora.

Regulowana ekspresja genu ma istotne znaczenie, wtedy gdy nadmierna produkcja białka terapeutycznego jest równie niepożądana jak jego niedobór, a w szczególności w przypadku, gdy białka terapeutyczne w dużej ilości wykazują właściwości toksyczne. Do regulowanych systemów ekspresji genów zaliczamy układy aktywowane przez antybiotyki lub hormony (6,7). Do pierwszej grupy należą rozmaite modyfikacje regulacji ekspresji zależnej od tetracykliny lub rapamycyny, natomiast do drugiej układy regulowane przez progesteron lub ekdyzon.

Inny sposób regulacji ekspresji może polegać na wykorzystaniu promotorów tkankowospecyficznych. Wykorzystując sekwencje DNA aktywowane tylko w określonych typach komórek możemy uzyskać ograniczoną ekspresję genów. Wreszcie, możliwe jest połączenie systemów regulacji chemicznej z regulacją tkankowospecyficzną, gdy geny białek służących regulacji chemicznej (aktywatory zależne od antybiotyków lub hormony) znajdują się pod kontrolą promotorów tkankowospecyficznych (1,6).

Ciekawym systemem regulacji ekspresji są wektory aktywowane przez niedotlenienie. Wektory takie zawierają kilkunukleotydową sekwencję wiążącą czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor*) (34). Czynnik ten jest nieaktywny w komórkach w warunkach normalnego dostępu tlenu, ulega jednak stabilizacji w hipoksji, która ma miejsce np. w niedotlenionym mięśniu sercowym czy wewnątrz guza nowotworowego. Wektory tego typu są obecnie testowane jako narzędzia do terapii w chorobie niedokrwiennej serca lub nóg oraz w leczeniu nowotworów (1,9).

### 4. Hamowanie ekspresji genów

Choroby spowodowane nadmierną aktywnością genów można leczyć wykorzystując kwasy nukleinowe o właściwościach hamujących ekspresję. Strategia ta jest najczęściej stosowana w chorobach nabytych, takich jak miażdżyca, nowotwory, choroby autoimmunologiczne, przewlekłe stany zapalne i infekcje.

W terapii hamującej ekspresję genów wykorzystuje się niekodujące fragmenty kwasów nukleinowych (35). Mogą to być cząsteczki DNA lub RNA. Do pierwszych na-

leżą oligonukleotydy antysensowe, pułapki oligonukleotydowe (*DNA decoys*), jednociowe DNA tworzące tripleksy oraz DNazymy, natomiast do drugiej grupy zalicza się interferujące cząsteczki RNA (siRNA, miRNA) oraz rybozymy. Ze względu na miejsce supresorowego działania kwasów nukleinowych, procesem hamowanym może być: transkrypcja (w przypadku pułapek oligonukleotydowych), dojrzewanie RNA (blokowane przez oligonukleotydy antysensowe), jego stabilność (przez antysensy i rybozymy) oraz translacja (przez antysensy, rybozymy i interferujące RNA).

Do terapii eliminującej komórki o nadmiernej aktywności genów zaliczamy także zastosowanie genów supresorowych (np. genów blokujących aktywację czynników transkrypcyjnych, genów kodujących czynniki antyangiogenne), genów samobójczych oraz onkolitycznych wirusów defektywnych.

Jednymi z najwcześniej stosowanych inhibitorów były oligonukleotydy antysensowe. Są to jednociowe cząsteczki DNA, najczęściej o długości 12-20 nukleotydów i sekwencji komplementarnej do wybranego mRNA, które po rozpoznaniu i hybridyzacji z RNA, zapobiegają translacji. Degradacja mRNA odbywa się przez RNazę H, trawiącą RNA tworzącą dupleks z DNA.

Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych w badaniach *in vitro* potwierdziło poprawność idei hamowania ekspresji genów za pomocą cząsteczek blokujących, jednakże próby ich stosowania *in vivo* nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Do leczenia dopuszczono jedynie oligonukleotyd o nazwie Vitravene, blokujący translację genu wirusa cytomegalii i stosowany u pacjentów z AIDS. Ostatnio jednak produkt ten został wycofany z rynku ze względu na niską skuteczność.

Bardzo ciekawą grupą inhibitorów są rybozymy, czyli cząsteczki RNA zdolne do trawienia docelowego mRNA (36). Mogą być one dostarczane do komórek w postaci gotowej, tj. katalitycznej cząsteczki RNA, ale jest to sposób mało wydajny, w szczególności *in vivo*, ze względu na niską trwałość RNA. Problem ten częściowo rozwiązuje się poprzez odpowiednie modyfikacje, które zwiększają stabilność rybozymów. Takie zmodyfikowane cząsteczki można podawać dożylnie lub domięscowo. Znacznie lepsze efekty osiąga się jednak wprowadzając DNA kodujący cząsteczki rybozimu za pomocą wektorów wirusowych, z których najlepsze, jak się wydaje, są wektory AAV.

Zaletą rybozymów jest ich zdolność do reakcji enzymatycznej, dzięki czemu mogą być używane w znacznie mniejszych ilościach aniżeli oligonukleotydy antysensowe. Oprócz hamowania ekspresji genów, rybozymy mogą być wykorzystywane do naprawy mutacji (36,37). Dzięki zdolności do wycinania RNA możliwe jest usunięcie zmutowanego odcinka z docelowego mRNA i ewentualne wprowadzenie prawidłowego fragmentu. Tę właściwość rybozymów wykorzystuje się np. w próbach leczenia anemii sierpowatej lub dystrofii mięśniowej.

Rybozymy znalazły zastosowanie jako cząsteczki hamujące ekspresję onkogenów, takich jak *ras* i *bcr-abl*, czy też receptorów czynników wzrostowych, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*). Badania obejmowały również próby hamowania ekspresji genów wirusa opryszczki,

wirusa EBV, wirusów zapalenia wątroby typu B i C, ludzkich retrowirusów HTLV i wirusa HIV. Zaawansowane próby kliniczne dotyczyły jednak tylko rybozemu hamującego ekspresję genu receptora czynnika VEGF oraz rybozemu hamującego replikację wirusa HIV. Badania te zostały zawieszono z chwilą odkrycia mechanizmu interferencji RNA.

Interferencja RNA to hamowanie ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym za pomocą dwuniciowych fragmentów RNA, zawierających sekwencje komplementarne do sekwencji docelowego RNA (36). Metoda ta wzbudziła w ostatnich latach olbrzymie zainteresowanie, a intensywne badania i szeroki arsenał stosowanych technik pozwalają żywić nadzieję, że stanie się ona skutecznym narzędziem nie tylko w pracach badawczych, ale również w terapii genowej.

Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywają cząsteczki o długości 21-26 nukleotydów, czyli małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) (36). Powstają one z prekursorowych, długich cząsteczek RNA, na skutek aktywności enzymu DICER. siRNA łączą się z kompleksem enzymatycznym zwanym RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), do którego włączany jest także docelowy mRNA. Prowadzi to do rozplecenia cząsteczki siRNA, hybrydyzacji z komplementarnym odcinkiem docelowego mRNA i trawienia mRNA przez nukleazę obecną w kompleksie RISC. Cały proces jest wielokrotnie powtarzany, dzięki czemu uzyskuje się znaczące ograniczenie ekspresji docelowego RNA. W terapii genowej planuje się podawanie gotowych cząsteczek siRNA lub stosowanie wektorów umożliwiających ekspresję siRNA. W wektorach takich sekwencja kodująca siRNA znajduje się najczęściej pod kontrolą promotora U6 lub H1 polimerazy RNA typu III.

Wysoka specyficzność działania siRNA pozwala mieć nadzieję na jego skuteczność terapeutyczną. Zastosowanie siRNA usuwającego mRNA VEGF, najważniejszego mediatora procesów angiogenezy, jest testowane u pacjentów cierpiących na starcze zwyrodnienie plamki żółtej, chorobę oczu prowadzącą do utraty wzroku. Podobne badania prowadzi się z siRNA hamującym ekspresję mRNA jednego z receptorów VEGF.

Inną możliwością hamowania ekspresji genów są pułapki oligonukleotydydowe, czyli dwuniciowe sekwencje DNA, zawierające odcinki wiążące czynniki transkrypcyjne. Pułapki wprowadzane do komórek w dużych ilościach nie dopuszczają do aktywacji przez czynnik transkrypcyjny genów zawierających w promotorach sekwencje obecne w pułapce (38,39).

Pułapki oligonukleotydydowe wiążące czynnik transkrypcyjny E2F wykorzystano w próbach klinicznych hamowania zarostania pomostów tętniczo-żylnych, tzw. bypasów, wykonywanych u pacjentów z chorobą wieńcową. E2F jest czynnikiem odpowiedzialnym za proliferację komórek, których niekontrolowany rozplem doprowadza do zwężenia światła przeszczepionego naczynia. Wprowadzenie do komórek pułapek wiążących E2F miało na celu zahamowanie podziałów. Niestety, mimo bardzo obiecujących wyników badań na zwierzętach oraz prób klinicznych I i II fazy, zakrojone na szeroką skalę testy obejmujące ponad 3000 pacjentów nie wykazały

żadnej większej skuteczności pułapek E2F w porównaniu do placebo (39). Przyczyny nie są znane, przypuszcza się, że brak efektu mógł być spowodowany bardziej skomplikowanym niż wcześniej przypuszczano mechanizmem działania licznych czynników z grupy E2F, które oprócz stymulowania podziałów komórek mogą je także hamować.

## 5. Przyszłość terapii genowej

Dotychczas na świecie, głównie w Stanach Zjednoczonych zainicjowano prawie 1200 prób klinicznych terapii genowej różnych chorób, najczęściej nowotworowych (2,4,19; patrz: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)). W większości są to badania I i II fazy, testujące przede wszystkim bezpieczeństwo terapii. Bierze w nich udział stosunkowo niewielu pacjentów. Najbardziej zaawansowane są badania nad terapią wykorzystującą wektor adenowirusowy z genem p53, w celu leczenia raka szyi i głowy. Badania te w USA weszły w fazę III, a w Chinach wektor taki został już oficjalnie zarejestrowany i dopuszczony do stosowania pod handlową nazwą Gendicine (40).

Idealna terapia powinna być skuteczna i pozbawiona efektów ubocznych. Pożądane jest, by była łatwa w stosowaniu i tania. Jak trudno jest osiągnąć te warunki wiedzą wszyscy zajmujący się wprowadzaniem nowych leków. Brak efektów ubocznych jest marzeniem, które nigdy nie może być w pełni osiągnięte. Nie ma bowiem terapii bez efektów ubocznych. Istotnym ograniczeniem są także olbrzymie koszty produkcji wektorów do prób klinicznych. Najważniejszym jak dotychczas problemem jest jednak skuteczność terapii genowej. Ten cel udało się osiągnąć tylko w nielicznych przypadkach.

Terapia genowa pozostaje jednak nadzieją medycyny. To właśnie terapia genowa, zapewne w połączeniu z terapią komórkową może być uwieńczeniem wysiłków zmierzających do opanowania chorób. Trzeba jednak przyznać, że trudności z jakimi przychodzi się mierzyć biotechnologom i lekarzom stosującym terapię genową są tak duże, że dotychczas więcej jest niepowodzeń niż sukcesów. Jesteśmy jednak przekonani, że terapia genowa w przyszłości będzie skutecznie stosowana w leczeniu wielu chorób, w szczególności wrodzonych chorób jednogenowych i nowotworów.

Praca finansowana z projektów 2 P04 016 26 i PBZ-KBN 096 P05 2004 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

## Literatura

1. Jaźwa A., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Current Gene Therapy*, 7, 7-23.
2. Verma I. M., Weitzman M. D., (2005), *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 711-738.
3. Pack D. W., Hoffman A. S., Pun S., Stayton P. S., (2005), *Nature Rev. Drug Discovery*, 4, 581-593.
4. O'Connor T. P., Crystal R. G., (2006), *Nature Rev. Genetics*, 7, 261-276.
5. Cavazzana-Calvo M., Lagresle C., Hacein-Bey-Abina S., Fischer A., (2005), *Ann. Rev. Med.*, 56, 585-602.
6. Agha-Mohammadi S., Lotze M. T., (2000), *J. Clin. Invest.*, 105, 1177-1183.
7. Gołda S., Kucharzewska P., Cisowski J., Florczyk U., Zagórska A., Jaźwa A., Łoboda A., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 82-97.
8. Kucharzewska P., Zagórska A., Leja J., Jaźwa A., Gozdecka M., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 66-81.
9. Dulak J., Zagórska A., Wegiel B., Łoboda A., Józkowicz A., (2006), *Cell Biochem. Biophys.*, 44, 31-42.
10. Herweijer H., Woff J. A., (2003), *Gene Therapy*, 10, 453-458.
11. Dulak J., Partyka L., Józkowicz A., Heba G., Prager M., Neumayer C., Sobhian B., Thurner M., Nanobashvili J., Fuegl A., Ratajska A., Polterauer P., Pachinger O., Weidinger F., Dembinska-Kiec A., Redl H., Huk I., (2002), *Eur. Surgery*, 34, 105-110.
12. Józkowicz A., Fügl A., Nanobashvili J., Dulak J., Valentini D., Funovics P., Neumayer C., Polterauer P., Redl H., Huk I., (2003), *Int. J. Artif. Organs*, 26, 161-169.
13. Dulak J., Schwarzach S. P., Zwick R. H., Alber H., Millonig G., Weiss C., Hugel H., Frick M., Józkowicz A., Pachinger O., Weidinger F., (2005), *Vasc. Med.*, 10, 285-291.
14. Dulak J., Józkowicz A., (2002), *Eur. Surgery*, 34, 101-104.
15. Dulak J., Józkowicz A., (2004), *Biotechnologia*, 3(66), 35-54.
16. Kapturczak M. H., Dulak J., (2005), *Nowiny Lekarskie*, 74, Suppl II, 23-32.
17. Melo L. G., Pachori A. S., Kong D., Gnecci M., Wang K., Pratt R. E., Dzau V. J., (2004), *Circulation*, 109, 2386-2393.
18. Shimamura M., Sato N., Yoshimura S., Kaneda Y., Morishita R., (2006), *Front. Biosci.*, 11, 753-759.
19. Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., Edelstein R. M., (2004), *J. Gene Med.*, 6, 597-602.
20. Trono D., (2003), *Science*, 300, 1670-1671.
21. Stopa M., Dulak J., Józkowicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 22-32.
22. Stopa M., Dulak J., Józkowicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 22-32.
23. Stopa M., Jaźwa A., Mleczo K., Dulak J., Józkowicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 98-122.
24. Józkowicz A., Dulak J., Nanobashvili J., Polterauer P., Prager M., Huk I., (2002), *Eur. Surgery*, 34, 95-100.
25. Kim I. H., Józkowicz A., Pietra P. A., Oka K., Chan L., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13282-13287.
26. Oka K., Chan L., (2005), *Acta Biochim. Pol.*, 52, 285-291.
27. Nuno-Gonzalez P., Chao H., Oka K., (2005), *Acta Biochim. Pol.*, 52, 285-291.
28. Józkowicz A., Dulak J., (2005), *Acta Biochim. Pol.*, 52, 589-599.
29. McCarty D. M., Young Jr. S. M., Samulski R. J., (2004), *Annu. Rev. Genet.*, 38, 819-845.
30. Rutkowski A., Jaźwa A., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 33-44.
31. Jaźwa A., Rutkowski A., Gołda S., Rehahn A., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 141-156.
32. Rutkowski A., Jaźwa A., Popowa S., Józkowicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 34-44
33. Ghosh S., Parvez M. K., Banerjee K., Sarin S. K., Hasnain S. E., (2002), *Mol. Ther.*, 6, 5-11.
34. Zagórska A., Dulak J., (2004), *Acta Biochim. Pol.*, 51, 563-585.
35. Opalinska J. B., Gewirtz A. M., (2003), *Sci STKE*, 28, (206), pe47.
36. Dorssett Y., Tuschl T., (2004), *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 318-329.
37. Szala S., (red.), (2003), *Terapia genowa*, PWN, Warszawa.
38. Conti V. R., Hunter G. C., (2005), *JAMA*, 294, 2495-2497.

39. Aleksander J. H., Hafley G., Harrington R. A., Peterson E. D., Ferguson T. B., Jr., Lorenz T. J., Goyal A., Gibson M., Mack M. J., Gennevois D., Califf R. M., Kouchoukos N. T., PREVENT IV Investigators, (2005), JAMA, 294, 2446-2454.
40. Wilson J. M., (2005), Hum. Gene Ther., 16, 1014.