



Wektory AAV w terapii genowej

Andrzej Rutkowski, Agnieszka Jaźwa, Alicja Józkowicz,
Józef Dulak

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

AAV vectors for gene therapy

Summary

This paper reviews the principles of the AAV vectors' generation. It describes various methods for their production and purification, as well as ways for increasing the efficiency and selectivity of the transduction by means of capsid modifications and use of various AAV serotypes. The second part of the article briefs clinical trials carried out so far with the use of the AAV vectors, particularly emphasizing the differences between feasibilities of vectors based on AAV and other virus types.

Key words:

gene therapy, AAV vectors, targeted vectors.

1. Wstęp

Wirusami towarzyszącymi adenowirusom (AAV, ang. *adeno-associated virus*), zakażona jest większość populacji ludzkiej powyżej 10 roku życia. Zakażenie to nie wywołuje jednak stanu zapalnego, a immunogenność tych wirusów ograniczona jest jedynie do indukcji produkcji przeciwciał skierowanych przeciw białkom ich kapsydu (1). Obecność AAV stwierdzono w drogach rodnych kobiet, które doznały poronienia w pierwszym trymestrze ciąży, a także w nasieniu niektórych bezpłodnych mężczyzn. W żadnym z tych przypadków nie wykazano jednak, że to zakażenie wirusem było bezpośrednią przyczyną patologii.

Brak dowodów na chorobotwórczość AAV oraz ich niska immunogenność zwróciły uwagę naukowców na możliwość wyko-

Adres do korespondencji

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

biotechnologia

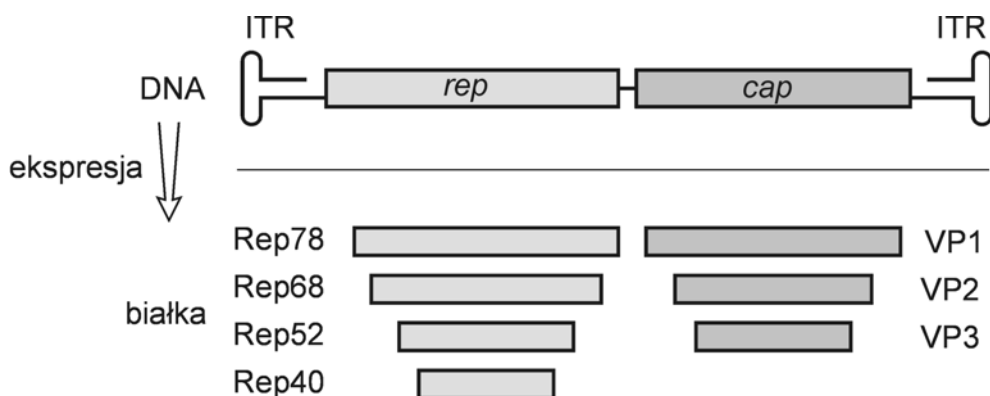
3 (78) 33–44 2007

rzystania tych wirusów jako potencjalnych wektorów w terapii genowej. Dodatkowym atutem AAV jest fakt, że – w przeciwieństwie do retrowirusów – są w stanie infekować komórki dzielące się bardzo wolno, jak śródbłonek naczyniowy, lub nie dzielące się, jak neurony czy mięśnie szkieletowe. Istotną cechą odróżniającą AAV od retrowirusów jest fakt, że jeśli wbudowują się do genomu człowieka, to tylko w ściśle określonej lokalizacji na 19 chromosomie, która została nawet nazwana AAVS1 (ang. *AAV integration site-1*).

2. Struktura i natura wirusów AAV

Materiałem genetycznym AAV jest jednoniciowy DNA o długości około 4700 zasad, co z punktu widzenia terapii genowej stanowi ich wadę, gdyż ogranicza wielkość terapeutycznego genu, jaki można w nich umieścić. Na obu końcach genomu znajdują się tzw. odwrócone powtórzenia końcowe (ITR ang. *inverted terminal repeats*) (rys. 1), które funkcjonują jako miejsce inicjacji replikacji, miejsce kierujące integracją z genomem gospodarza, oraz jako sygnał pakowania do kapsydu. Pomiędzy sekwencjami ITR znajdują się dwie otwarte ramki odczytu. Jedna z nich (gen *cap*) koduje trzy białka kapsydu o nakładającej się sekwencji, a druga (gen *rep*) – białka niezbędne (lecz niewystarczające) do replikacji i składania wirusa.

Do dziś poznano 11 serotypów AAV, różniących się powszechnością występowania oraz typem komórek, które infekują. Najczęściej wykorzystywany w badaniach serotyp drugi (AAV2) wnika efektywnie do neuronów i mięśni szkieletowych, AAV8 – do hepatocytów, serotypy AAV1 i AAV7 skutecznie infekują mięśnie szkieletowe, podczas gdy do infekcji śródbłonna najlepszy jest prawdopodobnie serotyp AAV5.



Rys. 1. Schemat budowy genomu AAV. Genom wirusa AAV składa się z dwóch otwartych ramek odczytu *rep* oraz *cap*, których ekspresja prowadzi do powstania czterech funkcjonalnych białek Rep oraz trzech białek VP budujących kapsyd wirusa. Geny *rep* i *cap* leżą między dwoma odwróconymi powtórzeniami końcowymi (ITR).

Na szczególną uwagę zasługuje serotyp AAV9, który, jak się wydaje, transdukuje z dużą wydajnością prawie wyłącznie komórki mięśnia sercowego. Zjawisko to miałooby ogromne znaczenie dla potencjalnej terapii genowej różnych chorób serca.

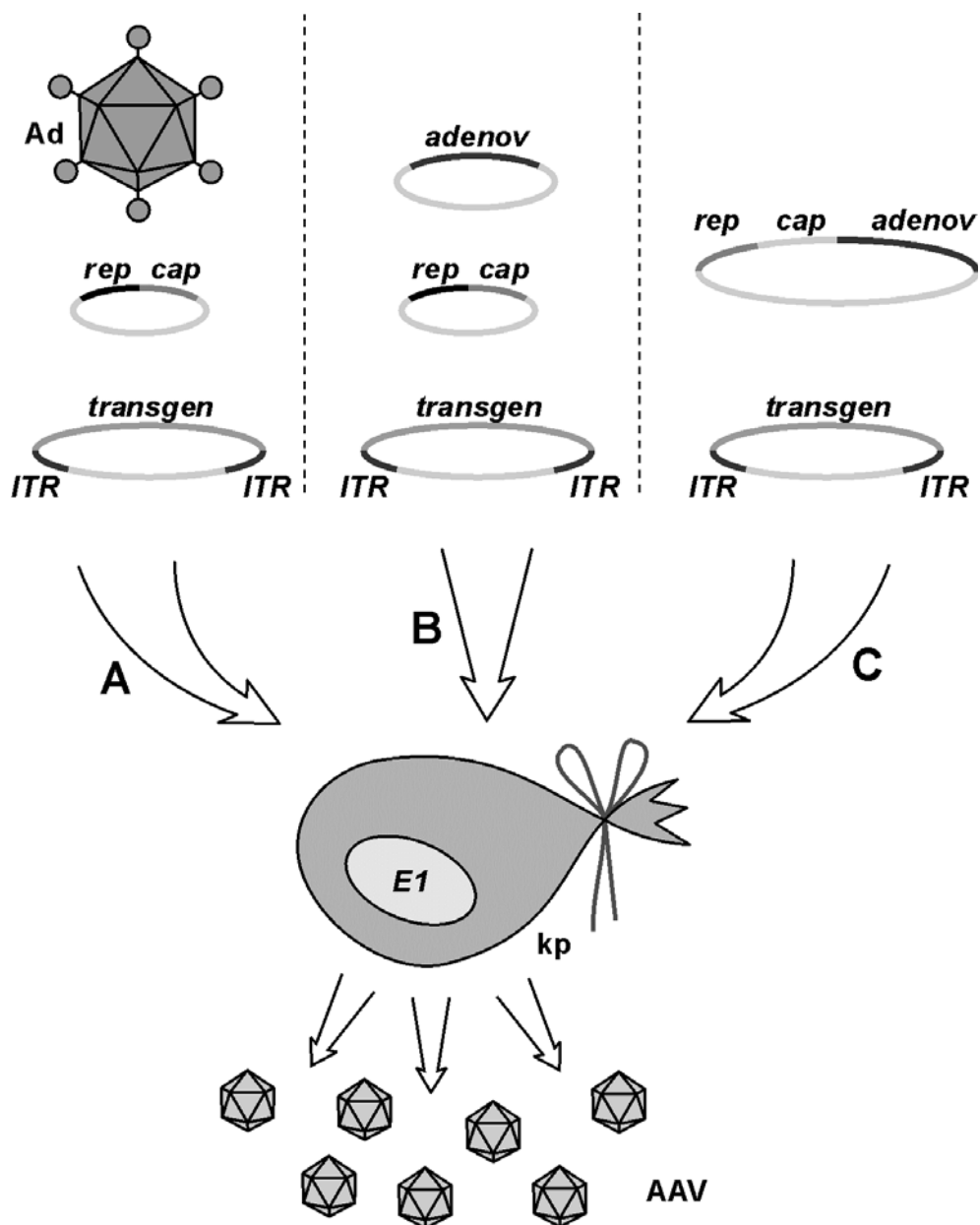
Wirusy AAV należą do grupy *Dependovirus*, co oznacza, że nie są w stanie namnażać się w komórkach, które nie zostały wystawione na działanie czynnika stresogennego. Dlatego też – w porównaniu z innymi wektorami wirusowymi – ich produkcja powoduje dodatkowe trudności. Najlepiej poznanym czynnikiem pozwalającym na namnażanie AAV jest jednoczesna infekcja adenowirusem – stąd nazwa „wirusy towarzyszące adenowirusom” (3).

3. Wektory AAV – produkcja i oczyszczanie

Ogólna strategia produkcji wektorów AAV jest taka sama, jak w przypadku innych wektorów wirusowych. Wykorzystywane do tworzenia wektorów komórki pakujące muszą produkować białka strukturalne wirusa oraz białka funkcjonalne, biorące udział w replikacji genomu wirusa i procesie składania dojrzałych wirionów. Wybrany gen (reporterowy lub terapeutyczny) zlokalizowany jest *in cis* (tzn. na tej samej cząsteczce DNA) względem sekwencji pakującej. W przypadku wektorów AAV za pakowanie odpowiedzialne są sekwencje ITR, a transgen musi zostać umieszczony metodami inżynierii genetycznej pomiędzy dwiema takimi sekwencjami.

Pierwotną strategią produkcji wektorów AAV była kotransfekcja komórek pakujących dwoma plazmidami (jednym z genem oflankowanym sekwencjami ITR, drugim z genami *rep* i *cap*) przy jednoczesnej infekcji małą ilością dzikich adenowirusów (rys. 2A). Udało się ustalić, że spośród wszystkich genów adenowirusa, tylko cztery są zasadnicze w procesie dojrzewania wirusów AAV. Od tej pory zaczęto stosować nową strategię: zamiast zakażać komórki adenowirusami (co mogło powodować późniejsze zanieczyszczenie tymi wirusami), wprowadzono kotranfekcję komórek pakujących trzema plazmidami, gdzie trzeci plazmid zawierał niezbędne geny adenowirusowe (rys. 2B). Obecnie istnieje komercyjnie dostępny system produkcji wektorów AAV wykorzystujący komórki nazwane AAV-293 (*AAV Helper-Free System, Stratagene*) (zob. (4)). Komórki te wykazują stabilną ekspresję jednego z genów adenowirusa, dzięki czemu nadają się również do produkcji wektorów adenowirusowych pierwszej generacji (zob. (5)). Skonstruowano również plazmid pDG, który zawiera w sobie jednocześnie geny *rep* i *cap* wirusa AAV oraz pomocnicze geny adenowirusa (4,6) (rys. 2C).

Po wyprodukowaniu wektorów AAV przez komórki pakujące, najprostszą metodą ich wykorzystania jest użycie nieoczyszczonych lizatów komórkowych. W lizatach takich zawarte są jednak wszystkie rozpuszczalne w wodzie składniki cytoplazmy komórki, które mogą wywierać niepożądany wpływ na infekowane komórki i zaburzać wyniki eksperymentu *in vitro* (4). Pierwszą metodą stosowaną do oczyszczania wirusów i wektorów AAV było ultrawirowanie w gradiencie gęstości chlorku



Rys. 2. Strategie produkcji wektorów AAV. Do komórek pakujących (kp), wykazujących stabilną ekspresję genu E1 adenowirusa wprowadza się geny potrzebne do produkcji wektorów AAV; (A) na jednym plazmidzie podaje się gen reporterowy lub terapeutyczny, na drugim – geny wirusa AAV jednocześnie infekując komórki małymi ilościami adenowirusa (Ad); (B) stosuje się te same dwa plazmidy, co poprzednio, a zamiast wirusa pomocniczego transfekuje się komórki trzecim plazmidem zawierającym niezbędne geny adenowirusa; (C) uproszczenie poprzedniej strategii, w którym wszystkie geny, oprócz genu terapeutycznego/reporterowego, umieszczone są na jednym plazmidzie.

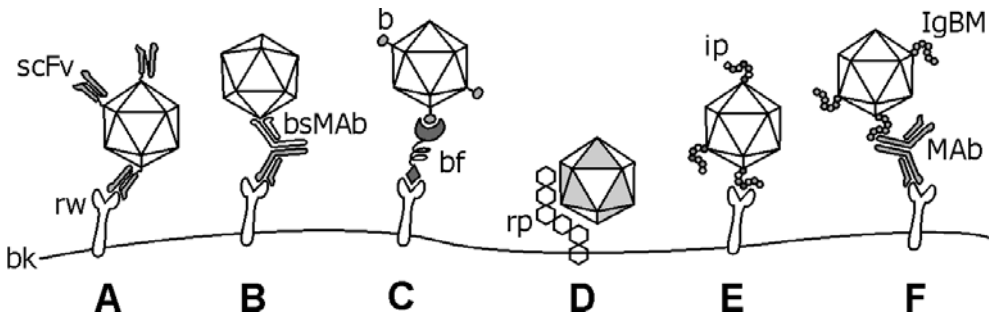
cezu (7). Metoda ta jest jednak bardzo czasochłonna i pracochłonna, a używany chlorek cezu może być toksyczny, stąd tak oczyszczone wirusy nie nadawałyby się do użycia w klinice. Dlatego opracowano metodę oczyszczania poprzez ultrawirowanie w gradiencie gęstości jodiksanolu (8), który nie jest toksyczny (4).

W przypadku produkcji wektorów opartych na serotypie 2 można wykorzystać również oczyszczanie wektorów na kolumnie z heparyną, gdyż serotyp ten posiada wysokie do niej powinowactwo (4). Dla serotypu 5, który wykazuje silne powinowactwo do kwasów sjałowych, wykorzystano podobną metodę, tzn. chromatografię powinowactwa na kolumnach wypełnionych mucyną, białkiem o dużej zawartości reszt kwasu sjałowego.

4. Nakierowywanie wektorów AAV na wybrane typy komórek

Wspomniano, że poszczególne serotypy wirusów AAV (a co za tym idzie – wektory oparte na tych serotypach) infekują różne typy komórek z różną wydajnością. Celem terapii genowej może być modyfikacja określonej tkanki. W takim przypadku potrzebne są wektory infekujące wybiórczo dany rodzaj komórek. Jeśli wirusy takie nie występują naturalnie, możliwe jest stworzenie wektorów zmodyfikowanych tak, by selektywnie i wydajnie transdukowały wybrane typy komórek.

Pierwsze takie nośniki stworzono w 1998 r. (9). Do genu kodującego białko kapsydu wirusa AAV, metodami inżynierii genetycznej wprowadzono sekwencję kodującą fragment scFv przeciwciała, rozpoznającego antygen powierzchniowy komórek docelowych (rys. 3A). Efektywność i specyficzność infekcji została zwiększona, jednak zmodyfikowane wektory powstawały w bardzo niskich mianach (rzędu 100 wirusów na mL). Opracowano również kilka metod, które nie wymagały ani znajomości dokładnej struktury białek kapsydu AAV, ani też ich genetycznych modyfikacji. Jedną z nich było stworzenie dwuswoistych przeciwciał, które z jednej strony



Rys. 3. Metody nakierowywania wektorów AAV. Opis w tekście. b – biotyna; bf – białko fuzyjne; bk – błona komórkowa; bsMAB – dwuswoiste przeciwciało monoklonalne; IgBM – motyw wiążący przeciwciała; ip – insert peptydowy; MAb – przeciwciało monoklonalne; rp – receptor pierwotny; rw – receptor wtórny; scFv, jednołańcuchowa część zmienna przeciwciała; objaśnienia w tekście.

rozpoznawały kapsyd wektora, a z drugiej antygen powierzchniowy docelowych komórek (rys. 3B). W 1999 r. zwiększono tym sposobem efektywność transdukcji komórek wektorami AAV 70-krotnie (10).

Kolejna pomysłowa strategia bazowała na modyfikacji kapsydu wektora AAV poprzez chemiczną biotynylację (11). Takie wektory przed podaniem komórkom inkubowano z białkiem fuzyjnym składającym się z awidyny oraz czynnika wzrostu nabłonka (EGF). Docelowe komórki wykazywały wysoką ekspresję receptora dla EGF, dzięki czemu zmodyfikowane wektory skutecznie do nich wnikały (rys. 3C). Inna metoda, opisana w 2004 r. polegała na stworzeniu wektorów, których kapsyd składał się z białek różnych serotypów (rys. 3D), a powstałe wektory infekowały niektóre linie skuteczniej niż oba serotypy rodzicielskie (12).

W latach 1999-2003 różne grupy badawcze próbowały poznać strukturę białka kapsydu wirusa AAV2. Dokonywano tego głównie poprzez porównywanie sekwencji tego białka z sekwencjami analogicznych białek z innych parwowirusów, których struktura krystaliczna została już poznana. Na podstawie otrzymanych wyników wnioskowano, które sekwencje białka kapsydu AAV są najprawdopodobniej wyeksponowane na powierzchni wirionu i te obszary były modyfikowane. Jednym z najważniejszych wyników tych badań, było ustalenie, które reszty aminokwasowe odpowiedzialne są za wiązanie proteoglikanu siarczanu heparanu (HSPG) – pierwotnego receptora AAV2 (13). Wymiana tych reszt powodowała utratę powinowactwa powstałych wektorów do HSPG (14). Było to odkrycie ważne, pozwalające na zwiększenie skuteczności infekcji. Błonowa forma HSPG funkcjonuje bowiem jako receptor, ale forma pozakomórkowa HSPG, wiążąc wektory, uniemożliwia ich dotarcie do powierzchni komórki (15). Utrata zdolności wiązania do HSPG jest, jak się wydaje, również ważna przy potencjalnym zastosowaniu wektorów AAV w terapii genowej. Ostatnio zasugerowano, że wiązanie HSPG jest czynnikiem ułatwiającym endocytozę wirusów AAV przez komórki dendrytyczne i prezentację antygenów ich kapsydu limfocytom T, co indukuje odpowiedź immunologiczną (16). Możliwe zatem, że zastosowanie w przyszłości wektorów zmodyfikowanych w taki sposób, aby nie miały powinowactwa do HSPG, jeszcze bardziej zmniejszy ich immunogenność, a zwiększy wydajność transdukcji.

Kolejne odkrycia dotyczące kapsydu AAV2 były związane z pierwszymi udanymi próbami nakierowania tych wirusów na wybrane komórki. Do białek znajdujących się na powierzchni wirusa, najczęściej w miejsce aminokwasu 587, wprowadzano inne reszty aminokwasowe, tak by białka były rozpoznawane przez receptory błonowe komórek (rys. 3E). Tak zmodyfikowane wektory podawano następnie komórkom wykazującym wysoką ekspresję danego receptora, co skutecznie zwiększało infekcyjność i specyficzność zmodyfikowanych wirusów (14).

W 2002 r. ustalono strukturę krystaliczną białka kapsydu AAV (17). Na podstawie tego odkrycia potwierdzono wyniki opisanych doświadczeń. Pozycja 587, w okolicach której badacze najczęściej wstawiali dodatkowe aminokwasy, faktycznie była bardzo dobrze wyeksponowana na powierzchni kapsydu, a sąsiednie aminokwasy zasadowe istotnie przyczyniały się do wiązania heparyny i HSPG (17).

Ciekawą próbą nakierowania wektorów AAV na wybrane komórki było wbudowanie domeny odpowiedzialnej za wiązanie immunoglobulin IgG, w miejsce aminokwasu 587 białka kapsydu (18). Tak zmodyfikowane wirusy, po inkubacji z IgG rozpoznającą antygen charakterystyczny dla wybranych komórek mogą infekować je o wiele skuteczniej (rys. 3F). Zaletą tego systemu jest uniwersalność, gdyż ten sam wektor po inkubacji z różnymi IgG można wykorzystywać do selektywnej transdukcji różnych typów komórek. Niestety, wprowadzenie do genu *cap* sekwencji kodującej domenę wiążącą IgG znacznie upośledzało pakowanie DNA do kapsydów, powodując powstawanie pustych wektorów. Z tego powodu strategia ta nie zapewniała wyższej ekspresji transgeny, niż użycie wektorów niemodyfikowanych (18).

Po ustaleniu, że pozycja 587 białka kapsydu AAV może być użyta do insercji peptydów bez obniżenia ilości i infekcyjności produkowanych wektorów, postanowiono umieszczać w niej sekwencje aminokwasowe wybrane metodą ekspresji fagowej (rys. 3E). W ten sposób wyodrębniono np. sekwencję peptydową SIGYPLP, która wiązała się do komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC). Jej wstawienie do kapsydu wektorów AAV zwiększyło specyficzność transdukcji śródbłonnków *in vitro*, a podanie takich wektorów myszom zaowocowało specyficzną ekspresją transgeny w komórkach śródbłonna naczyń żylnych (19). Z użyciem tej samej metody wyprodukowano również wirusy efektywniej transdukujące komórki mięśni gładkich żyły udowej (20).

5. Przykłady zastosowań wektorów AAV w terapii genowej u zwierząt

Integracja wirusów AAV z genomem gospodarza w ściśle określonej pozycji AAVS1 na chromosomie 19, wymaga obecności białka Rep78, kodowanego przez genom dzikiego wirusa. Jednak podczas produkcji wektorów wirusowych pozostawia się tylko sekwencje ITR. W efekcie wektory AAV po zakażeniu docelowych komórek nie produkują białka Rep78. W tej sytuacji integracja zdarza się rzadko i następuje w miejscach przypadkowych. Niska częstość przypadkowej integracji stanowi zaletę wektorów AAV, gdyż zmniejsza ryzyko transformacji nowotworowej. Do tej pory nie stwierdzono przypadków powstawania nowotworów po zastosowaniu wektorów AAV w próbach prowadzonych na zwierzętach (21). Istnieją jednak sytuacje, gdy integracja genomowa byłaby zjawiskiem wręcz pożądanym, oczywiście pod warunkiem, że zachodziłaby nieprzypadkowo. Przykładowo, gdy komórki wymagające modyfikacji genetycznej są komórkami intensywnie dzielącymi się, episomalna ekspresja transgeny spowoduje, że wraz z kolejnymi mitozami, gen ten będzie występował coraz mniej licznie, aż w końcu jego ekspresja zaniknie. Integracja zapewniałaby długotrwałą ekspresję transgeny.

Ukazało się już wiele publikacji wykazujących skuteczne działanie terapii genowej z wykorzystaniem wektorów AAV na zwierzęcych modelach chorób. W jednym z eksperymentów myszom wszczepiano podskórnie komórki raka jajnika, a następ-

nie podawano im wektory AAV z genem rozpuszczalnej formy receptora typu 1 dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) (22). VEGF jest białkiem odpowiedzialnym za indukcję wzrostu nowych naczyń, również tych odżywiających nowotwory. Rozpuszczalny receptor działa jak pułapka wychwytyjąca VEGF, uniemożliwiając aktywowanie angiogenezy i hamując wzrost guza. U leczonych w ten sposób myszy zaobserwowano istotne statystycznie spowolnienie rozwoju nowotworu w porównaniu z myszami kontrolnymi, które otrzymywały AAV z genem reporterowym. W innych badaniach z wykorzystaniem wektorów AAV5 udało się zmniejszyć stan zapalny w chorobie reumatoidalnej u szczurów (23). W chorobie tej istotnym białkiem odpowiedzialnym za przebieg zapalenia jest czynnik transkrypcyjny NFκB, który normalnie jest blokowany przez nieufosforylowany inhibitor. Fosforylacja inhibitora przez specyficzną kinazę prowadzi do uwolnienia NFκB, który migruje do jądra komórkowego, gdzie aktywuje geny kodujące cytokiny prozapalne. W opisanych badaniach do stawów zwierząt podano w wektorach AAV zmutowaną, nieaktywną i genetycznie dominującą formę genu kinazy inhibitora NFκB. W komórkach maziowych nie dochodziło więc do fosforylacji inhibitora NFκB, a tym samym nie następowała produkcja cytokin prozapalnych. W tej samej pracy autorzy przedstawili również wyniki wskazujące, że AAV5 skutecznie infekuje komórki ludzkiej maziówki (23). Możliwe zatem, że w przyszłości wykorzystanie serotypu 5 wektorów AAV kodujących nieaktywną kinazę inhibitora NFκB stanie się skuteczną terapią reumatoidalnego zapalenia stawów. W innej pracy opisano próbę złagodzenia przebiegu choroby Alzheimera w modelu mysim (24). W tym celu podano w wektorach AAV fragment scFv przeciwciała wiążącego białko beta amyloidu – głównego sprawcy degeneracji neuronów w tej chorobie. Po takiej interwencji stwierdzono u leczonych myszy znacznie mniejsze złogi β-amyloidu niż u zwierząt kontrolnych. Stosując wektory AAV, udało się również zahamować u myszy rozwój miażdżycy (25). Wykorzystano w tym celu zwierzęta z wyłączonym genem apolipoproteiny E (apoE). U myszy kontrolnych miażdżycza rozwijała się w bardzo szybkim tempie, jednak u zwierząt, którym podano gen apoE w wektorach AAV, blaszki miażdżycowe w ogóle nie powstały.

Ukazało się również wiele prac poświęconych terapiom hemofilii w modelach zwierzęcych. W pracach tych opisane jest leczenie zarówno hemofilii typu A jak i B, zastosowanie wektorów AAV o różnych serotypach, podawanie wektorów różnymi drogami, a badania prowadzone są na różnych gatunkach zwierząt, od myszy, przez psy (traktowane już jako „duży” model zwierzęcy), po naczelne (26). Badania te przyniosły bardzo obiecujące wyniki. U zwierząt zaobserwowano wzrost poziomu terapeutycznych białek w surowicy oraz ogólną poprawę parametrów krzepliwości krwi i co najważniejsze – znaczne zmniejszenie częstości krwawień. Wykazano, że ekspresja transgenów może utrzymywać się na terapeutycznym poziomie nawet przez ponad 3 lata. Otrzymywane wyniki nie były jednak wyłącznie pozytywne. Hemofilia może być powodowana produkcją zmutowanych białek czynników krzepliwości, lub też całkowitym brakiem tych białek. U zwierząt, które należały do tej

drugiej grupy czasami obserwowano tylko przejściową poprawę po terapii wektorami AAV. Było to spowodowane rozpoznaniem produkowanego terapeutycznego białka jako obcego i eliminacją produkujących je komórek (27). Jest to przykład bardzo istotnego problemu, przed którym staje terapia genowa polegająca na wprowadzaniu genów (nie tylko za pomocą wektorów AAV) kodujących białka, których organizm chorego w ogóle nie produkuje. Wykazano jednak, że przynajmniej u myszy efektu tego można uniknąć, podając wektor AAV z genem terapeutycznym domięśniowo (26). Chociaż takie wprowadzenie wektorów wywoływało odczyn zapalny, to po kilku tygodniach objawy zapalenia ustępowały, a u 70% zwierząt transgen znów pojawiał się w krążeniu. Również u psów, którym podano domięśniowo gen IX czynnika krzepliwości w wektorach AAV, doszło do znacznej poprawy parametrów krzepnięcia krwi (28). Zabieg ten był jednorazowy, jednak ekspresja genu utrzymała się nawet 2,5 roku później (29).

6. Próby kliniczne z wykorzystaniem wektorów AAV

Wykorzystanie wektorów AAV do terapii genowej hemofilii u ludzi jest obecnie testowane w ramach prób klinicznych pierwszej fazy. Wyniki są obiecujące. Po pierwsze wykazano, że domięśniowe podanie wektorów AAV nie wywołuje u ludzi reakcji zapalnych (30). Po drugie, chociaż u pacjentów stwierdzano wysokie poziomy przeciwciał przeciwko kapsydom AAV, to nawet 10 miesięcy po podaniu wektorów w mięśniach wykrywano wprowadzony DNA oraz kodowane przez transgen białko (30). Po trzecie, ani podawanie dożylnie, ani domięśniowe wektorów nie powoduje modyfikacji komórek rozrodczych pacjentów (31).

W pierwszych podjętych próbach klinicznych na ludziach nie udało się jednak osiągnąć efektów terapeutycznych, a poziom czynnika krzepliwości we krwi nie przekroczył 2% wartości fizjologicznych (30). W badaniach tych podawano wektory domięśniowo. W kolejnych doświadczeniach, gdzie podobne dawki wektora podano do tętnicy wątrobowej, osiągnięto widoczny efekt terapeutyczny (32). Trwał on jednak niestety tylko 8 miesięcy, gdyż, jak ustalono, układ odpornościowy pacjentów rozpoznał białka kapsydu wektorów AAV na komórkach, które uległy transdukcji i zniszczył je. Być może lepszym rozwiązaniem będzie zastosowanie wektorów opartych na innych serotypach, które z jednej strony selektywnie transdukują hepatocyty, a z drugiej nie mają zdolności wiązania HSPG i nie indukują tym samym silnej odpowiedzi przeciwko białkom wirusa (16).

Wspomniano już, że badania wirusów i wektorów AAV opierały się głównie na serotypie drugim, który *in vitro* skutecznie infekuje komórki nabłonka płucnego. W związku z tym jednym z pierwszych genów, który podano *in vivo* z zastosowaniem wektorów AAV był gen białka CTFR, którego mutacja powoduje mukowiscydozę. Gen ten został połączony z unikatową sekwencją, która pozwoliła na jego wykrycie zarówno na poziomie mRNA jak i białka aż do sześciu miesięcy po podaniu

wirusów królikom (33). W ostatnich latach opublikowanych zostało wiele wyników badań, dotyczących wykorzystania wektorów AAV w leczeniu mukowiscydozy. W pierwszych próbach wykazano, że wielokrotne podawanie wektorów AAV w aerozolu do płuc pacjentów nie wywoływało istotnych efektów ubocznych (34). W badaniach II fazy u pacjentów chorych na mukowiscydozę potwierdzono bezpieczeństwo użycia wektorów AAV (35), a nawet wykazano, że dają one efekt terapeutyczny istotny statystycznie w porównaniu z pacjentami, którzy otrzymywali placebo (36). Dla porównania, leczenie tej samej choroby z użyciem adenowirusów przyniosło mniej zadowalające rezultaty. Małe dawki wektorów adenowirusowych były bezpieczne, ale nie dawały efektu terapeutycznego lub efekt ten był przejściowy, a organizm uodparniał się na podawane wektory. Większe dawki wywoływały natomiast odpowiedź układu immunologicznego i powodowały odczyn zapalny, przy czym w jednej z prób klinicznych zaobserwowano przejściową poprawę stanu pacjentów, lecz w innej – nie (36). Porównanie to pokazuje istotną różnicę w możliwości wykorzystania wektorów adenowirusowych oraz wektorów AAV do terapii mukowiscydozy. Ponieważ komórki nabłonka płucnego dzielą się bardzo wolno, wykorzystanie do leczenia tej choroby wektorów retrowirusowych jest praktycznie niemożliwe.

Wektory AAV okazały się także bezpieczne, gdy wprowadzono je do mózgów szczurów i małp z rodzaju *Chlorocebus* (37). W badaniu tym zastosowano gen CLN2 kodujący peptydazę tripeptydylową (TPP), której mutacje powodują rozwój choroby neurodegeneracyjnej – późnej dziecięcej neuronalnej lipofuscynozy ceroidowej. Wektory AAV pozwoliły na uzyskanie stabilnej ekspresji TPP u zwierząt, co zachęciło naukowców do rozpoczęcia badań klinicznych I fazy. Mają one polegać na wprowadzeniu do mózgów dzieci z mutacją w genie CLN2 wektorów AAV kodujących prawidłową wersję genu (38). Podjęto również próby pierwszej fazy badań klinicznych u ludzi cierpiących na chorobę Parkinsona oraz neurodegeneracyjną chorobę Canavan, rzadką leukodystrofię spowodowaną mutacją w genie aspartoacylasy (39).

Choroby uwarunkowane genetyczne to często choroby śmiertelne lub – jak choroby neurodegeneracyjne – odbierające człowiekowi możliwość godnego życia. Do tej pory większość z nich leczy się objawowo lub zapobiegawczo. Rozwój terapii genowych, w tym terapii opartych na wektorach AAV, a także możliwość połączenia terapii genowej i komórkowej pozwala wierzyć, że uda się opracować skuteczne metody leczenia przyczynowego. Obiecujące wyniki wstępnych badań klinicznych dają nadzieję na wykorzystanie wektorów AAV w leczeniu hemofilii lub mukowiscydozy, a w dalszej przyszłości także chorób neurodegeneracyjnych.

Praca finansowana z projektów PBZ-KBN 096 P05 2004 i 1998 P01 2006 31 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Andrzej Rutkowski otrzymuje stypendium Sapere Auso z Małopolskiej Fundacji Stypendialnej. Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Alicja Józko-wicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Literatura:

1. Erles K., Sebkova P., Schlehofer J. R., (1999), *J. Med. Virol.*, 59, 406-411.
2. Pacak C. A., Mah C. S., Thattaliyath B. D., Conlon T. J., Lewis M. A., Cloutier D. E., Zolotukhin I., Tarrantal A. F., Byrne B. J., (2006), *Circ. Res.*, 99, e3-9.
3. Atchison R. W., Casto B. C., Hammon W. M., (1965), *Science*, 149, 754-756.
4. Jaźwa A., Rutkowski A., Gołda S., Rehahn A., Józkwicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 141-156.
5. Stopa M., Dulak J., Józkwicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 123-140.
6. Grimm D., Kern A., Rittner K., Kleinschmidt J. A., (1998), *Hum. Gene Ther.*, 9, 2745-2760.
7. Rose J. A., Hoggan M. D., Shatkin A. J., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 86-92.
8. Zolotukhin S., Byrne B. J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R. J., Muzyczka N., (1999), *Gene Ther.*, 6, 973-985.
9. Yang Q., Mamounas M., Yu G., Kennedy S., Leaker B., Merson J., Wong-Staal F., Yu M., Barber J. R., (1998), *Hum. Gene Ther.*, 9, 1929-1937.
10. Bartlett J. S., Kleinschmidt J., Boucher R. C., Samulski R. J., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 181-186.
11. Ponnazhagan S., Mahendra G., Kumar S., Thompson J. A., Castillas M., Jr., (2002), *J. Virol.*, 76, 12900-12907.
12. Rabinowitz J. E., Bowles D. E., Faust S. M., Ledford J. G., Cunningham S. E., Samulski R. J., (2004). *J. Virol.*, 78, 4421-4432.
13. Summerford C., Samulski R. J., (1998), *J. Virol.*, 72, 1438-1445.
14. Grifman M., Trepel M., Speece P., Gilbert L. B., Arap W., Pasqualini R., Weitzman M. D., (2001), *Mol. Ther.*, 3, 964-975.
15. Pajusola K., Gruchala M., Joch H., Luscher T. F., Yla-Herttuala S., Bueler H., (2002), *J. Virol.*, 76, 11530-11540.
16. Vandenberghe L. H., Wang L., Somanathan S., Zhi Y., Figueredo J., Calcedo R., Sanmiguel J., Desai R. A., Chen C. S., Johnston J., Grant R. L., Gao G., Wilson J. M., (2006), *Nat. Med.*, 12, 967-971.
17. Xie Q., Bu W., Bhatia S., Hare J., Somasundaram T., Azzi A., Chapman M. S., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10405-10410.
18. Ried M. U., Girod A., Leike K., Buning H., Hallek M., (2002), *J. Virol.*, 76, 4559-4566.
19. White S. J., Nicklin S. A., Buning H., Brosnan M. J., Leike K., Papadakis E. D., Hallek M., Baker A. H., (2004), *Circulation*, 109, 513-519.
20. Work L. M., Nicklin S. A., Brain N. J., Dishart K. L., von Seggern D. J., Hallek M., Buning H., Baker A. H., (2004), *Mol. Ther.*, 9, 198-208.
21. Kay M. A., Nakai H., (2003), *Nature*, 424, 251.
22. Takei Y., Mizukami H., Saga Y., Yoshimura I., Hasumi Y., Takayama T., Kohno T., Matsushita T., Okada T., Kume A., Suzuki M., Ozawa K., (2006), *Int. J. Cancer*, 120, 278-284.
23. Tas S. W., Adriaansen J., Hajji N., Bakker A. C., Firestein G. S., Vervoordeldonk M. J., Tak P. P., (2006), *Hum. Gene Ther.*, 17, 821-832.
24. Fukuchi K., Tahara K., Kim H. D., Maxwell J. A., Lewis T. L., Accavitti-Loper M. A., Kim H., Ponnazhagan S., Lalonde R., (2006), *Neurobiol. Dis.*, 23, 502-511.
25. Kitajima K., Marchadier D. H., Miller G. C., Gao G. P., Wilson J. M., Rader D. J., (2006), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 1852-1857.
26. Wang L., Calcedo R., Nichols T. C., Bellinger D. A., Dillow A., Verma I. M., Wilson J. M., (2005), *Blood*, 105, 3079-3086.
27. Mount J. D., Herzog R. W., Tillson D. M., Goodman S. A., Robinson N., McClelland M. L., Bellinger D., Nichols T. C., Arruda V. R., Lothrop C. D., Jr., High K. A., (2002), *Blood*, 99, 2670-2676.
28. Herzog R. W., Yang E. Y., Couto L. B., Hagstrom J. N., Elwell D., Fields P. A., Burton M., Bellinger D. A., Read M. S., Brinkhous K. M., Podsakoff G. M., Nichols T. C., Kurtzman G. J., High K. A., (1999), *Nat. Med.*, 5, 56-63.
29. Kay M. A., Manno C. S., Ragni M. V., Larson P. J., Couto L. B., McClelland A., Glader B., Chew A. J., Tai S. J., Herzog R. W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., High K. A., (2000), *Nat. Genet.*, 24, 257-261.

30. Manno C. S., Chew A. J., Hutchison S., Larson P. J., Herzog R. W., Arruda V. R., Tai S. J., Ragni M. V., Thompson A., Ozelo M., Couto L. B., Leonard D. G., Johnson F. A., McClelland A., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., Kay M. A., High K. A., Glader B., (2003), *Blood*, 101, 2963-2972.
31. Arruda V. R., Fields P. A., Milner R., Wainwright L., de Miguel M. P., Donovan P. J., Herzog R. W., Nichols T. C., Biegel J. A., Razavi M., Dake M., Huff D., Flake A. W., Couto L., Kay M. A., High K. A., (2001), *Mol. Ther.*, 4, 586-592.
32. Manno C. S., Pierce G. F., Arruda V. R., Glader B., Ragni M., Rasko J. J., Ozelo M. C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P. K., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J. F., Lessard R. R., Sommer J. M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H. C., High K. A., Kay M. A., (2006), *Nat. Med.*, 12, 342-347.
33. Flotte T. R., Afione S. A., Solow R., Drumm M. L., Markakis D., Guggino W. B., Zeitlin P. L., Carter B. J., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 3781-3790.
34. Aitken M. L., Moss R. B., Waltz D. A., Dovey M. E., Tonelli M. R., McNamara S. C., Gibson R. L., Ramsey B. W., Carter B. J., Reynolds T. C., (2001), *Hum. Gene Ther.*, 12, 1907-1916.
35. Wagner J. A., Nepomuceno I. B., Messner A. H., Moran M. L., Batson E. P., Dimiceli S., Brown B. W., Desch J. K., Norbash A. M., Conrad C. K., Guggino W. B., Flotte T. R., Wine J. J., Carter B. J., Reynolds T. C., Moss R. B., Gardner P., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1349-1359.
36. Moss R. B., Rodman D., Spencer L. T., Aitken M. L., Zeitlin P. L., Waltz D., Milla C., Brody A. S., Clancy J. P., Ramsey B., Hamblett N., Heald A. E., (2004), *Chest*, 125, 509-521.
37. Sondhi D., Peterson D. A., Giannaris E. L., Sanders C. T., Mendez B. S., Rostkowski A. B., Blanchard B., Bjugstad K., Sladek J. R., Jr., Redmond D. E., Jr., Leopold P. L., Kaminsky S. M., Hackett N. R., Crystal R. G. (2005), *Gene Ther.*, 12, 1618-1632.
38. Crystal R. G., Sondhi D., Hackett N. R., Kaminsky S. M., Worgall S., Stieg P., Souweidane M., Hosain S., Heier L., Ballon D., Dinner M., Wisniewski K., Kaplitt M., Greenwald B. M., Howell J. D., Strybing K., Dyke J., Voss H., (2004), *Hum. Gene Ther.*, 15, 1131-1154.
39. Janson C., McPhee S., Bilaniuk L., Haselgrove J., Testaiuti M., Freese A., Wang D. J., Shera D., Hurh P., Rupin J., Saslow E., Goldfarb O., Goldberg M., Larijani G., Sharrar W., Liouterman L., Camp A., Kolodny E., Samulski J., Leone P., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 1391-1412.