

Czy powinniśmy się obawiać terapii genowej?

Józef Dulak

W terapii genowej lekiem jest kwas nukleinowy. Powszechnie ta forma leczenia kojarzy się z wprowadzaniem do komórek prawidłowej postaci genu zmutowanego, jak to ma miejsce w przypadku jednogenowych chorób dziedzicznych. Terapia genowa najczęściej polega jednak na podawaniu dodatkowych kopii genów, które z różnych powodów nie funkcjonują prawidłowo. W ten sposób zwiększa się ekspresję genów chroniących np. przed rozwojem miażdżycy, albo genów hamujących podziały komórek nowotworowych. Terapia genowa to także wykorzystanie sekwencji kwasów nukleinowych nie kodujących genów, czyli np. nukleotydów antysensowych, krótkich sekwencji DNA wiążących się do docelowej cząsteczki mRNA i blokujących jego translację. Ostatnio olbrzymie zainteresowanie wzbudza możliwość wykorzystania mechanizmu interferencji RNA, czyli odkrytego niecałe dziesięć lat temu sposobu hamowania ekspresji genów przez krótkie, dwuniciowe fragmenty RNA.

Terapia komórkowa to w pewnym sensie także terapia genowa. Zamiast pojedynczych genów mających wywołać pożądany efekt terapeutyczny, w terapii komórkowej podaje się komórki macierzyste o znacznym potencjale różnicowania w inne, pożądane typy komórek. W ten sposób, poprzez działanie wielu genów uzyskuje się efekt leczniczy.

Terapia komórkowa obecnie kojarzy się przede wszystkim z zastosowaniem zarodkowych komórek macierzystych, ale pamiętać należy, że terapię komórkową w medycynie stosuje się od kilkudziesięciu lat. Przeszczepy szpiku kostnego, zawierającego liczne macierzyste komórki hematopoetyczne są przecież terapią komórkową. Podanie prawidłowych komórek szpiku pacjentom z białaczką jest zastąpieniem zmutowanej postaci genu wywołującego białaczkę poprzez gen prawidłowy. Komórki macierzyste szpiku są tutaj nośnikiem tego prawidłowego genu, a zarazem celem jego działania.

Terapia genowa narodziła się w roku 1962, kiedy to Waślaw i Elizabeth Szybalski zmienili komórki pozbawione enzymu HPRT, niezdolne do wzrostu w specjalnej pożywce HAT, w komórki normalne. Udało im się do osiągnąć dzięki pomysłowości, cierpliwości i przypadkowi. W czasie, gdy nieznaną była jeszcze sekwencja żadnego genu (a rok 1962 był tym, kiedy James Watson, Francis Crick i Marice Wilkins otrzymali Nagrodę Nobla za odkrycie struktury DNA) odważny był pomysł podania do zmutowanych komórek DNA wyizolowanego z komórek

normalnych. Efekt był mizerny, nic szczególnego się nie działo, komórki nadal ginęły w pożywce HAT. Za wyjątkiem kilku, które profesorowi Szybalskiemu udało się „wyłowić” spośród martwych. Przetrwały one i były zdolne do podziałów. Na podstawie tych obserwacji Waclaw Szybalski wysunął wniosek, że zdolność życia w pożywce HAT stała się możliwa dzięki pobraniu przez komórki zmutowane prawidłowego genu HPRT. DNA sam nie wnika do komórek – jest naładowany ujemnie, podobnie jak powierzchnia błony komórkowej. Ale w pożywce znajdowało się przypadkowo więcej jonów wapnia, które zneutralizowały ładunek DNA, pozwalając mu wejść do komórki. W taki sposób został wykonany pierwszy transfer genów do komórek ssaków, a profesor Szybalski interpretując wyniki zaproponował, iż w przyszłości można będzie leczyć choroby za pomocą terapii genowej. Tak bowiem nazwał tę procedurę, którą sam pierwszy przeprowadził.

Obecnie znamy znacznie wydajniejsze sposoby dostarczania genów do komórek ssaków. Wciąż stosuje się tzw. nagi DNA, najczęściej w postaci kolistych cząstek plazmidowego DNA. To DNA pochodzenia bakteryjnego, w obręb którego włącza się gen terapeutyczny i wstrzykuje do komórek, np. do mięśni nóg lub serca. Ale jest to sposób stosunkowo mało wydajny, choć niektóre badania wskazywały na jego skuteczność w podawaniu genów stymulujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych i leczeniu choroby niedokrwiennej serca lub nóg. Znacznie wydajniejsze jest dostarczanie genów za pomocą wektorów wirusowych. Są to zmodyfikowane cząstki wirusów, z których usunięto wszystkie lub większość genów patogennych, wprowadzając na ich miejsce geny terapeutyczne.

Spośród kilku rodzajów wektorów wirusowych najczęściej stosowane w terapii są wektory retrowirusowe oraz adenowirusowe. Różnią się one pewnymi właściwościami.

Wektory retrowirusowe to cząsteczki RNA, które po wnikięciu do komórki przepisywane jest na DNA i może integrować się z genomem komórki. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie długotrwałej ekspresji wprowadzonego genu, który w przypadku komórek długo żyjących może utrzymywać się nawet przez całe życie chorego. Zdolność retrowirusów, a więc i wektorów retrowirusowych do integracji do genomu komórki stwarza ryzyko wywołania mutacji, gdyż integracja ta ma charakter przypadkowy. Świadomość niebezpieczeństwa mutagenezy insercyjnej towarzyszyła stale badaczom zajmującym się wektorami retrowirusowymi, ale doświadczenia na zwierzętach i próby kliniczne u ludzi (w większości prób klinicznych terapii nowotworów wykorzystuje się wektory retrowirusowe) napawały optymizmem, gdyż nie obserwowano takiego zjawiska.

Drugą najczęściej stosowaną grupą są wektory adenowirusowe. Te z kolei zbudowane są z DNA, zdolne są zakażać wiele typów komórek i dzięki wysokiej wydajności umożliwiają wysoką ekspresję wprowadzonych genów. W najpowszechniej stosowanej odmianie tych wektorów pozostawia się jednak większość genów wirusowych (co podyktowane jest sposobem namnażania tych wektorów), które ulegają ekspresji w komórkach chorego i z tego powodu komórki zakażone takimi wektorami są szybko eliminowane przez jego układ odpornościowy.

Pierwsza próba kliniczna terapii genowej została przeprowadzona w roku 1990. Od tego czasu różnym sposobom leczenia za pomocą terapeutycznych kwasów nukleinowych poddanych zostało około 10 tysięcy pacjentów. Uwzględniam tutaj zarówno próby polegające na podawaniu genów kodujących białka, jak i duże badania kliniczne wykorzystujące niekodujące sekwencje tzw. pułapek nukleotydowych, wiążące czynniki transkrypcyjne i zapobiegające w ten sposób nadmiernej proliferacji komórek. W tych próbach odnotowywano rozmaite efekty uboczne, ale w większości przypadków były one spowodowane chorobą, a nie zastosowanym sposobem leczenia. W rzeczywistości odnotowano tylko dwa rodzaje poważnych efektów ubocznych, oba związane z rodzajem stosowanych wektorów.

Wspomniane wektory adenowirusowe I generacji są bardzo skuteczne w dostarczaniu genów do komórek, jednak ze względu na obecność licznych genów wirusowych są nadal silnie immunogenne. Białka wirusowe (w tym białka kapsydu) są obiektem ataku przeciwciał, które większość z ludzi posiada na skutek wcześniejszego kontaktu z adenowirusami. Podanie dużych ilości wektora adenowirusowego może więc wywołać silną odpowiedź, która w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. W roku 1999 takie tragiczne wydarzenie miało miejsce w Filadelfii i dotknęło 19-letniego Jessy Gelsingera poddawanego terapii genowej z powodu niedoboru transkarbonylasy ornitynowej. Wada ta powoduje zaburzenia syntezy mocznika i problemy z usuwaniem produktów przemiany materii. Organizm mężczyzny zareagował bardzo gwałtownie na podaną dużą ilość wektorów, rozwinął się bardzo silny, niekontrolowany proces zapalny i pacjent zmarł w kilka dni po podaniu wektora. Ten nieszczęśliwy zbieg okoliczności (do którego doszło częściowo na skutek pewnych zaniedbań proceduralnych i niewłaściwej analizie badań wstępnych u pacjenta) powstrzymał na pewien okres próby terapii genowej z wykorzystaniem adenowirusów. Niemniej jednak wektory te, stosowane dotychczas u kilku tysięcy pacjentów, nie wywołały tak drastycznych efektów, a w niektórych chorobach posiadamy już mocne dowody na skuteczność tych nośników jako dostarczycieli genów terapeutycznych. Tak jest np., w przypadku podawania prawidłowego genu p53 pacjentom z rakiem szyi i gło-

wy, u których taka terapia znacząco zwiększa skuteczność chemio lub radioterapii. Podobnie stosowanie wektorów adenowirusowych do wprowadzania genu samobójczego kinazy tymidynowej, znacząco przedłużając życie pacjentom z glejakiem.

Mimo tego niefortunnego wydarzenia obecnie stosowanie wektorów adenowirusowych, aczkolwiek obarczone pewnym ryzykiem, nie wywołuje istotnych sprzeciwów i próby takie są kontynuowane. Trochę inna sytuacja, rodząca pytania o dopuszczalność terapii, pojawiła się w przypadku leczenia niedoborów odporności.

Pierwszą taką próbę przeprowadzono w roku 1990, w Stanach Zjednoczonych. Od czteroletniej dziewczynki chorej na niedobór odporności spowodowany mutacją w genie deaminazy adenozykowej (ADA) pobierano leukocyty i wprowadzano do nich wektor retrowirusowy z prawidłową kopią ADA. Następnie zmodyfikowane, wyleczone komórki ponownie podawano dziecku. Pacjentka, obecnie już młoda kobieta, jest zdrowa i prowadzi normalne życie. Należy zaznaczyć, że otrzymywała równocześnie zastrzyki z gotowym enzymem ADA, nie wiadomo więc, na ile wyleczenie jest rzeczywiście efektem terapii genowej. U kilku kolejnych pacjentów zastosowano jednak wyłącznie gen ADA i osiągnięto istotną poprawę. Wydaje się, że terapia genowa jest skuteczna w leczeniu złożonych niedoborów odporności, a mała grupa pacjentów poddanych dotychczas leczeniu w taki sposób wynika z małej liczby chorych na tę odmianę niedoboru. Chorzy mogą być także leczeni za pomocą przeszczepu szpiku albo poprzez podawanie gotowego enzymu.

Inną sytuację mamy jednak w przypadku najczęstszego niedoboru, spowodowanego mutacją w genie łańcucha γ c receptora cytokin. Gen ten zlokalizowany jest w chromosomie X, dlatego choroba występuje tylko u chłopców. Najbardziej znanym pacjentem z tą chorobą był w latach 70. ub. wieku tzw. „chłopiec z bańki”, David Vetter. Kilkanaście lat spędził w namiocie foliowym, oddzielony całkowicie od świata zewnętrznego. Zmarł na skutek infekcji wirusem Epstein-Barra, jaka wywiązała się u niego po przeszczepie szpiku kostnego od młodszej siostry.

Alogeniczny przeszczep szpiku jest metodą z wyboru stosowaną u chłopców z niedoborem odporności typu X-SCID. Dla około połowy z nich nie ma jednak odpowiedniego dawcy, a stosowanie enzymatycznej terapii zastępczej, jak w przypadku niedoboru ADA, nie wchodzi tutaj w rachubę. Gen γ c musi być obecny w komórkach układu odpornościowego, by prawidłowy łańcuch receptora mógł ulokować się w błonie komórkowej.

Od roku 2000 znany jest skuteczny sposób eliminowania niedoboru odporności za pomocą terapii genowej połączonej z terapią komórkowa. Kluczem do

sukcesu, odbudowy prawidłowego układu immunologicznego wydaje się tutaj nie tylko wprowadzanie prawidłowego genu receptora γc do komórek układu odpornościowego, ale wybranie jako obiektu terapii hematopoetycznych komórek macierzystych. Modyfikacja takich komórek na wczesnym etapie różnicowania pozwala na efektywniejsze odtworzenie układu immunologicznego i trwalszy efekt terapii.

Prekursorami tej terapii byli lekarze francuscy ze szpitala Neckera w Paryżu. Dr Marina Cavazzana Calvo oraz Dr Alain Fischer w roku 1999 pobrali od chłopców chorych na X-SCID szpik kostny, wyhodowali niezróżnicowane komórki macierzyste, do których *in vitro* wprowadzili wektor retrowirusowy z prawidłowym genem receptora γc . Tak zmodyfikowane komórki, po podaniu pacjentom odtworzyły w pełni funkcjonalny układ odpornościowy. W ten sposób opracowana została terapia, które może być stosowana u tych chłopców z X-SCID, u których nie można wykonać przeszczepu szpiku kostnego. Od publikacji wyników badań w roku 2000 leczeniu poddano 10 chorych, i za wyjątkiem jednego u wszystkich terapia okazała się w pełni skuteczna. Niemal identyczną strategię zastosowali badacze brytyjscy, którzy także wyleczyli dziesięciu chłopców. Entuzjazm i nadzieje związane z tym sukcesem terapii genowej były więc jak najbardziej uzasadnione.

Modyfikacja komórek macierzystych poprzez wprowadzenie do nich prawidłowego genu za pomocą wektora retrowirusowego niesie jednak za sobą ryzyko efektu ubocznego. U czterech spośród kilkunastu leczonych Francuzów rozwinęła się w kilka lat po terapii białaczka. Jeden z chłopców zmarł. Przez długi czas nic takiego nie działo się u pacjentów brytyjskich, jednak w grudniu ub. roku białaczka pojawiła się u jednego z siedmiu poddanych leczeniu chłopców. Tak więc efekt uboczny wystąpił u około 30% pacjentów, i jak wskazują analizy jest niewątpliwie związany z zastosowaną metodą leczenia. Winą można by obdzielić po równo i wektor retrowirusowy, i komórki macierzyste, a także i sam gen terapeutyczny. Próby zostały wstrzymane.

W tej sytuacji rodzą się pytania o bezpieczeństwo tej metody leczenia. Czy terapia, pociągająca za sobą tak dramatyczny efekt uboczny u niemal 1/3 chorych jest uzasadniona? Rodzice chłopców oczekujących na terapię apelują o wznowienie prób. Czy w obecnym stanie naszej wiedzy kontynuowanie prób w sposób taki jak dotychczas jest jednak dopuszczalne? Z pewnością zmierzać należy do takiej modyfikacji stosowanych procedur, by ograniczać ryzyko rozwoju białaczki. Czy jednak szansa normalnego życia dla co najmniej 2/3 chorych nie jest wystarczająco mocnym argumentem? Nie wszyscy zdajemy sobie sprawę, że w pierwszych próbach leczenia białaczek za pomocą przeszczepów szpiku przeżywało

10% chorych. Chemioterapia stosowana w nowotworach, zwłaszcza dziecięcych, jest bardzo często skuteczna, ale u znacznej grupy chorych po pewnym czasie dochodzi do wtórnych komplikacji. Zatem czy eksperymentalna terapia genowa w niedoborze odporności typu X-SCID powinna być zawieszona i dopuszczona ponownie dopiero wtedy, gdy będziemy mieć pewność, że jest bezpieczna?

Ale kiedy będziemy mieć pewność, że nowe metody nie wywołają efektów ubocznych? Wcześniejsze badania na zwierzętach nie wskazywały na tak znaczne ryzyko mutagenyzy inercyjnej i rozwoju białaczki. Wydaje się, że przyczyna tkwić może w samej naturze genu kodującego łańcuch receptora γ c, a także w fakcie, iż białaczka jest spowodowana wbudowaniem się wektora w obręb onkogenu LMO2 i jego aktywacją. Pracuje się obecnie nad takim wektorami, które wbudowałyby się preferencyjnie w inne miejsca, nie w obręb onkogenu LMO2.

Czy obserwowane efekty uboczne wystąpią także w przypadku innych chorób, które mogą być leczone za pomocą podobnej strategii? Jakich efektów możemy się spodziewać w próbach innych terapii genowych wykorzystującej także komórki macierzyste? Czy na obecnym etapie wiedzy możemy przewidzieć, jakie onkogeny mogą być aktywowane w różnych komórkach macierzystych na skutek przypadkowej integracji wektora retrowirusowego? Czy korzyści ze stosowania skutecznej terapii genowej przeważają nad znacznym ryzykiem efektów ubocznych?

Od każdej terapii oczekuje się nie tylko skuteczności, ale i bezpieczeństwa. Te same wymagania stawiane są przed terapią genową. Jest to jak najbardziej zrozumiałe i uzasadnione. Twierdzę jednak, że w przypadku tej metody leczenia pojawiające się efekty uboczne są nadmiernie wyolbrzymiane i m.in. przez to terapia genowa jest często postrzegana jako niosąca za sobą duże ryzyko dla pacjenta. Sądzę, iż pogląd taki jest nieuzasadniony, a efekty uboczne, których należy unikać, są w rzeczywistości rzadsze aniżeli w innych stosowanych terapiach. Warto pamiętać, że tylko w Stanach Zjednoczonych liczbę zgonów spowodowanych efektami ubocznymi leków dopuszczonych na rynek ocenia się na ponad 15 000 rocznie. Z powodu terapii genowej zmarło dotychczas na przestrzeni 19 lat testowania tej metody 2 chorych! Na kilka tysięcy osób poddanych leczeniu. Niestety, nie ma skutecznej terapii, która nie niosłaby żadnego ryzyka. Istotna jest jedynie ocena, czy w stosunku do korzyści nie jest ono zbyt duże.

Od listopada ubiegłego roku świat naukowy i lekarski z zapartym tchem śledzi niebywały postęp badań nad uzyskiwaniem tzw. indukowanych pluripotencjalnych ludzkich komórek macierzystych (iPS). Otrzymuje się je poprzez wprowadzenie za pomocą wektorów retrowirusowych kilku genów do komórek somatycznych, np. fibroblastów skóry. Aktywność tych genów powoduje odróż-

nicowanie się komórek, które nabierają charakteru zarodkowych komórek macierzystych zdolnych do przekształcania się w każdy typ komórek somatycznych. Uzyskiwanie takich komórek ogranicza problemy etyczne, jakie dla niektórych wiążą się z wykorzystywaniem ludzkich zarodkowych komórek macierzystych. iPS mogą być potencjalnie wykorzystane w terapii genowej, a eksperymenty na myszach, które wyleczono z hemofilii za pomocą iPS zmodyfikowanych prawidłowym genem łańcucha β -globiny i zróżnicowanych do komórek hematopoetycznych pokazują, że jest to możliwe. Niemniej, doświadczenia płynące z terapii genowej X-SCID wskazują, iż zanim będziemy mogli planować terapeutyczne wykorzystanie iPS, konieczne jest wyeliminowanie ryzyka mutagenyzy inercyjnej spowodowanej integracją wektorów retrowirusowych używanych do transferu reprogramujących genów, a także unikanie stosowania transferu onkogenów. Badania eksperymentalne wskazują, iż jest to możliwe. Krótko działające wektory, przenikające błonę komórkową czynniki transkrypcyjne niezbędne do odróżnicowania czy też drobne cząsteczki potrafiące zastąpić geny wprowadzone do komórek zmniejszyć mogą ryzyko rozwoju nowotworów.

Terapia genowa testowana w badaniach klinicznych od niemal 20 lat wciąż jeszcze pozostaje metodą eksperymentalną. W jej historii wiele było sytuacji, które w sposób nieuzasadniony rozbudzały nadmierny entuzjazm pacjentów. Wydaje się, że np. stosowane dotychczas metody transferu genów stymulujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych są nieskuteczne, choć zarazem nie są niebezpieczne. Powstaje pytanie, czy uzasadnione jest kontynuowanie prób klinicznych, które nie przynoszą spodziewanych rezultatów i łudzenie pacjentów rzekomą szansą wyleczenia.

Z drugiej strony niewątpliwie skuteczna terapia genowa złożonych niedoborów odporności napotkała na problemy, które wykorzystywane są przez przeciwników terapii genowej jako argument za jej zaprzestaniem. Czy ryzyko poważnych efektów ubocznych musi prowadzić do wstrzymania tych prób do czasu opracowania bezpiecznej metody? To jedno z konkretnych pytań, na które odpowiedź powinni znaleźć lekarze, naukowcy i bioetycy. Czy jednak głos pacjentów i rodziców chorych dzieci nie powinien być decydujący?

Bibliografia

- Baum C., *What are the consequences of the fourth case?*, „Molecular Therapy” 15 (2007), s. 1401-1402.
- Jozkowicz A., Dulak J., Szala S., *Obietnica na przyszłość*, „Academia” nr 1/2008, s. 1-4.
- Kaiser J., *Clinical research. Death prompts a review of gene therapy vector*, „Science” 317 (2007), s. 580.
- Kimmelman J., *The ethics of human gene transfer*, „Nature Reviews Genetics” 9 (2008), s. 239-244.
- Kimmelman J., *Recent developments in gene transfer: risks and ethics*, „British Medical Journal” 330 (2005), s. 79-82.