

GENSKO ZDRAVLJENJE RAKA

Prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

gsersa@onko-i.si

IZVLEČEK

Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni. Na področju zdravljenja raka poteka veliko raziskav, saj imajo trenutne metode zdravljenja omejeno učinkovitost in neželene učinke. Za učinkovito gensko zdravljenje raka so potrebni dostavni sistemi, ki jih delimo na virusne in nevirusne. Pristopi genskega zdravljenja pri raku so imunološki, kjer izkoriščamo imunski sistem za uničenje rakavih celic preko antigenskih, stimulatornih in kostimulatornih molekul, in molekularni, kjer izkoriščamo inaktivacijo onkogenov, vstavitev genov, ki zavirajo rast tumorja (tumor-supresorski geni), uporabo interferenčne RNA, vnašamo encime za aktivacijo zdravil, onkolične viruse ali zaviramo angiogenezo.

Ključne besede: rak, virusni vektorji, nevirusni vektorji, pristopi za zdravljenje

UVOD

Rak je bolezen oziroma skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic v različnih organih, brez fiziološke funkcije za ta organ (Serša, 2009). Tumor, ki nastaja, kviri fiziološke funkcije organa, zaradi invazivnosti tumorskih celic pa nastajajo oddaljeni zasevki oz. metastaze. Za zdravljenje raka uporabljamo različne načine (kirurško zdravljenje, radioterapija, sistemsko zdravljenje), med novejšje pa spada gensko zdravljenje. Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni (Kočevar, 2010). Prvotno so z njim poskušali zdraviti pogoste monogenske bolezni krvnih celic, kot sta talasemija beta in anemija srpastih celic (Kohn, Candotti, 2009). Nato se je težišče v sredini 80-ih let prejšnjega stoletja prestavilo na veliko

redkejšo bolezen hude kombinirane imunske pomanjkljivosti (angl. Severe Combined Immunodeficiency Disease; SCID,), nastale zaradi okvare v encimu adenzin deaminaza (ADA) (Kohn, Candotti, 2009). Ravno ta bolezen je postala tarča prve odobrene klinične študije z genskim zdravljenjem pri dveh otrocih leta 1990, študija pa je dala zagon novim raziskavam. Tako je število poskusov z genskim zdravljenjem slabo desetletje strmo naraščalo, vse do smrti 18-letnega bolnika leta 1999 zaradi vnetne reakcije na adenovirusni vektor ter razvoja levkemiji podobne klonalne proliferacije limfocitov pri dveh otrocih leta 2002 (Edelstein, Abedi, Wixon, 2007). Po zaustavitvi takrat potekajočih in načrtovanih študij ter ugotavljanju vzrokov nastanka neželenih učinkov danes njihovo število spet počasi narašča in potekajo študije uporabe genskega zdravljenja pri različnih boleznih.

Ravno pri zdravljenju raka gensko zdravljenje počasi napreduje kljub številnim predkliničnim raziskavam. Pri uvajanju vsakega novega zdravljenja je začetek težak in počasen, a z razvojem novih molekularnih tehnologij, ki bodo omogočile cenovno ugodno in sprejemljivo pripravo genskih konstruktov za zdravljenje raka, lahko pričakujemo razmah genskega zdravljenja.

Osnovni principi genskega zdravljenja

Pri zdravljenju rakavih bolezni lahko z genskim zdravljenjem popravimo oz. zamenjamo genetske okvare, značilne za rakave celice. Tako lahko zamenjamo gene z geni, ki zavirajo rast tumorja (tumorje zavirajoči geni), ali po drugi strani onemogočimo izražanje onkogenov, t. j. gena, ki je odgovoren za nastanek bolezni. Poleg tega pa lahko tudi sprožimo smrt tarčnih tumorskih celic, npr. z gensko usmerjeno kemoterapijo, z ojačitvijo imunskega odziva ali s ciljanjem tumorskega žilja (Kamensek, Sersa, 2008). Dostava genskega materiala lahko poteka na dva načina: *in vivo* ali *ex vivo*. Pri načinu *in vivo* DNA dostavimo neposredno v tarčne celice tkiva bolnika. Za razliko od tovrstnega zdravljenja pa pri načinu *ex vivo* bolniku najprej odvzamemo celice organa, v katerem se izraža genska motnja. Odvzete celice gojimo v celični kulturi in vanje vnesemo gensko informacijo, čemur sledi presaditev modificiranih celic v tarčno tkivo (Slika 1).

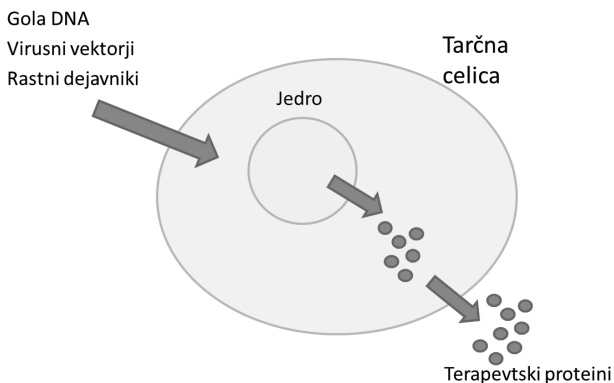
Ključnega pomena za gensko zdravljenje je dostava želenega gena v celice. Za to uporabljamo različne tipe vektorjev, ki jih v grobem razdelimo na virusne in nevirusne. Virusni ostajajo najpogostejši; do sedaj so jih raziskovalci uporabili v približno dveh tretjinah kliničnih študij z genskim zdravljenjem.

V odobrenih, še trajajočih ali zaključenih kliničnih študijah z genskim zdravljenjem za dostavne sisteme najpogosteje uporabljamo adenoviruse, sledijo jim retrovirusi, vse pogostejše pa so nevirusne dostavne metode, kot so vnos gole/plazmidne DNA z uporabo elektroporacije in lipofekcija. Gensko zdravljenje lahko cilja somatske ali zarodne celice. Le pri slednjih pride do prenosa spremembe na potomce, je pa tovrstno zdravljenje vprašljivo (predvsem etično) za izvedbo pri večjih živalih in ljudeh (Kočevar, 2010).

Gensko zdravljenje raka

Zaenkrat je največ kliničnih študij genskega zdravljenja usmerjenih v gensko zdravljenje raka, približno dve tretjini (Edelstein et al., 2007). Gensko zdravljenje raka je pomemben nov pristop k zdravljenju raka, ki temelji na ciljanem in specifičnem zdravljenju, podobno kot zdravljenje s tarčnimi zdravili. Cilj obeh pristopov je čim bolj specifično ciljati tumorske celice in čim manj prizadeti nemaligne, normalne celice. Ustaljena načina zdravljenja raka, kot sta radioterapija in sistemsko zdravljenje, ne izpolnjujeta vseh teh pogojev, kar mnogokrat vodi do lokalnih in sistemskih neželenih učinkov. Vnos genske informacije tako predstavlja izziv za potekajoče študije in alternativo klasičnim načinom zdravljenja.

Pri vsakem genskem zdravljenju je poglobitnega pomena varen in učinkovit vnos genskega materiala, od bolezni pa je odvisno, koliko časa mora vzdržati v celicah (El-Aneed, 2004b). Tako je ponekod zaželeno čim daljše izražanje genov, drugje pa je zadosti že kratko obdobje. Večina načinov za gensko zdravljenje raka spada k slednjim. Pri dostavi genov za zdravljenje je pomembno tudi, ali bomo genski material vnesli sistemsko ali lokalno (t. i. ciljana dostava). Odločitev je odvisna od lokacije oz. dostopnosti tumorja in prisotnosti oddaljenih zasevkov ter samih sposobnosti dostavnih sistemov. Kar nekaj tipov tumorjev je primernih za neposreden vnos genov za zdravljenje (npr. melanom) ali druge načine lokalnega vnosa genov za zdravljenje (npr. peritonealno injiciranje za rak jajčnikov). Pri oddaljenih zasevkih pa pride v poštev vnos materiala v krvni obtok in ciljanje določenega mesta. Tu se lahko zatakne. Dostavni sistemi morajo namreč v krvi preživeti nevarnost razgradnje in celične obrambne mehanizme, ko pridejo do izbranega tkiva se morajo specifično vezati na tarčne celice, ko so enkrat v celici, pa se morajo tam izogniti še znotrajceličnim oviram. Da bi zadostili čim več zahtevam, so v uporabi in razvoju številni virusni in nevirusni dostavni sistemi.



Slika 1. Princip genske terapije, Prevc A, 2015.

Dostavni sistemi

Virusi so naravno razviti za infekcijo celic in vnos svojega genskega materiala vanje (El-Aneed, 2004b). Pri genskem zdravljenju uporabljamo t. i. virusne vektorje, ki so laboratorijsko spremenjeni, tako da so odstranjeni geni za njihovo patogenost (npr. oviranje virusnega razmnoževanja z odstranitvijo strukturnih genov). Kot dostavni sistemi veljajo virusni vektorji za bolj učinkovite kot nevirusni, a jih pesti vprašanje varnosti. Poleg tega so omejeni z velikostjo vključka in jih je težko proizvajati. V uporabi za gensko zdravljenje raka prevladujejo adenovirusni in retrovirusni vektorji, vektor virusa vakcinije, adenovirusom pridruženi virusni vektorji ter vektor herpesa simpleksa.

Nekatere slabosti virusnih dostavnih sistemov, kot sta npr. varnost ali proizvodnja na veliko, so manj izrazite pri nevirusnih dostavnih sistemih (El-Aneed, 2004b). V tej kategoriji za uporabo v genskem zdravljenju raka prevladujejo gola DNA kot posebna enota ter kationski lipidi in polimeri. Prva je bila uspešno uporabljena za neposredno injiciranje v tumorje ali kot cepivo DNA, vendar pa jo organizem lahko hitro odstrani. Za zaščito in za zmanjšanje velikosti oz. kompleksnosti lahko DNA »vgradimo« v kationske nevirusne dostavne sisteme, kot so kationski lipidi in kationski polimeri (Ogris, Wagner, 2002). Ti z negativno nabito DNA interagirajo (vstopajo v interakcijo) preko elektrostatičnih interakcij, neto naboj celega kompleksa pa ostane pozitiven, kar v nadaljnji stopnji omogoči učinkovito interakcijo z

negativno nabitimi celičnimi membranami in vstop molekule v celico, ki v glavnem poteka z endocitozo. Kationske nevirusne vektorje sicer pesti slabša učinkovitost v primerjavi z virusnimi in so odvisni od svojih fizikalno-kemijskih lastnosti, vendar pa jih z lahkoto preoblikujemo, npr. za zmanjšanje nespecifičnih interakcij s sestavinami krvi ali za ciljanje receptorjev na površini tarčne celice (Ogris, Wagner, 2002).

Golo DNA lahko neposredno uporabimo za vnos, če jo vnesemo blizu bolezenskega mesta in stran od elementov, ki bi jo utegnili razgraditi. Tako jo na primer v krvi ogrožajo nukleaze. Gola DNA brez ustreznega dostavnega sistema ne vstopa v celice. Za uspešen vnos genske informacije v celice so nam v pomoč številne fizikalne in kemijske metode. Učinkovita in varna metoda je elektroporacija – fizikalna metoda za dostavo različnih molekul v celice z aplikacijo kontroliranih zunanjih električnih polj, ki ustvarijo pore v celični membrani in tako začasno povečajo njeno propustnost (Cemazar, Sersa, 2007). Z metodo elektroporacije smo proučevali uporabo različnih genov za zdravljenje tumorjev. Še posebej primerna je za dostavo genov, ki ciljajo na tumorsko žilje, saj že metoda sama po sebi deluje žilno razdiralno. Na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo izvedli zdravljenje prvega bolnika z uporabo elektroporacije kot dostavnega sistema za antiangiogeni gen pri zdravljenju kožnih metastaz melanoma v okviru evropske klinične študije.

Pristopi k zdravljenju

Razvoj raka je povezan s številnimi spremembami na genskem nivoju. Zaradi njegove kompleksne narave gensko zdravljenje na tem področju poteka s pomočjo različnih pristopov. Njihova razdelitev je težka, ker se med seboj prepletajo. Ena izmed možnosti je delitev na imunološke in molekularne pristope (Kočevar, 2010), posamezne pristope pa lahko tudi kombiniramo z že obstoječimi načini zdravljenja, npr. z radioterapijo (Kamensek, Sersa, 2008). Kombinacija radioterapije kot lokalnega zdravljenja in promotorjev, katerih delovanje sprožimo z ionizirajočim sevanjem, lahko omogoči nadzorovano izražanje genov za zdravljenje v tumorju (t. i. transkripcijsko ciljanje) in s tem prispeva k zmanjšanju toksičnosti za normalno tkivo.

Imunološki pristop

Rakave celice so po naravi imunogene, vendar pa so se sposobne izogibati imunskemu sistemu. To lahko počnejo zaradi izločanja imunosupresivov, znižanega izražanja antigenov ali molekul pglavitnega histokompatibilno-

stnega sistema in pomanjkanja kostimulacije (El-Aneed, 2004a). Posledično imunski odziv organizma ni dovolj za prepoznavanje in uničenje tumorskih celic. Gensko zdravljenje, ki spreminja imunski odziv bolnika (imunoterapija), lahko izkoristimo kot spodbudo celični imunosti, predmet raziskav pa so tudi celična cepiva in cepiva DNA z antigen-kodirajočimi geni, ki se predstavijo imunskim celicam in aktivirajo njihov odziv za uničenje tumorskih celic.

Ena izmed možnosti imunološkega pristopa je prenos gena za imunostimulirajočo molekulo (npr. citokini), pri čemer se aktivirajo predvsem limfociti T in naravne celice ubijalke (El-Aneed, 2004a). Daud in sodelavci (Daud et al., 2008) so ta princip uporabili pri bolnikih z metastatskim melanomom, in sicer z elektroporacijskim vnosom gena za interlevkin-12 (IL-12). Gre za prvo klinično študijo za dostavo plazmidne DNA z elektroporacijo *in vivo* na ljudeh. Na 24 bolnikih so v svoji klinični študiji I. faze ugotovili, da je postopek varen in ga bolniki dobro prenašajo. Še posebej pa je vredno izpostaviti, da ima metoda potencial tudi za zdravljenje razsejane bolezni. Pri nekaj vključenih bolnikih so se poleg lezij, v katere so injicirali plazmid, zmanjšale tudi oddaljene, nezdravljene lezije. Pri polovici teh bolnikov so opazili sistemski odziv na gensko zdravljenje, bodisi v obliki stabilizirane bolezni bodisi kot zmanjšanje nezdravljenih lezij, pri treh bolnikih pa celo popolno regresijo oddaljenih lezij.

Molekularni pristop

Za tumorje je značilno spremenjeno izražanje nekaterih genov, za kar so krive predvsem mutacije. Te spremembe lahko izkoriščamo za gensko zdravljenje z molekularnim pristopom in tako na različne načine ciljamo onkogene in gene, ki zavirajo rast tumorja, gene, vpletene v angiogenezo itd. Poleg tega lahko za zdravljenje uporabimo tudi viruse, ki se selektivno razmnožujejo v rakavih celicah (onkolitični virusi), in gene, ki pretvarjajo neaktivna zdravila v aktivna (samomorilski geni). Cilj omenjenih možnosti je zaustavitev celičnega cikla ali programirana celična smrt (apoptoza) (El-Aneed, 2004b).

Onkogeni in geni, ki zavirajo rast tumorja

Ena glavnih genskih skupin, vpletenih v nastanek raka, je skupina onkogenov. Na njihovo biološko aktivnost lahko vplivamo s t. i. antionkogeni (protismiselni oligonukleotidi, angl. antisense oligonucleotides), ki se vežejo na mRNA preko parjenja baz in tako zavirajo onkogeno aktivnost.

Predmet raziskav so tudi antionkogeni, ki se vežejo na zaporedje v DNA (antigenski oligonukleotidi, angl. antigene oligonucleotides) z vodikovimi vezmi in tako zavirajo onkogeno aktivnost.

Druga velika skupina, vpletena v nastanek raka, je skupina genov, ki zavirajo rast tumorjev. Ti nadzorujejo delitev celice in jo lahko, če je treba, usmerijo v apoptozo. Za gensko zdravljenje lahko prenesemo divji tip proteina v celice z mutiranim genom in tako nadomestimo njegovo funkcijo. Glavni predstavnik teh genov je *p53*, ki je mutiran v skoraj 40 % rakov (El-Aneed, 2004b).

Uporaba interferenčne RNA

V posebno skupino pristopov lahko uvrstimo uporabo interferenčne RNA (Prosen, 2014). Princip delovanja temelji na komplementarnosti med kratkimi dvoverižnimi RNA (mikro RNA (miRNA), kratke interferenčne RNA (siRNA)) in tarčno mRNA, kar vodi v utišanje izbranega gena. V grobem razdelimo kratke dvoverižne molekule RNA na tiste, ki jih sintetiziramo v laboratoriju in jih vnašamo v celice z dostavnimi sistemi (siRNA), in na endogene miRNA, ki nastanejo s prepisom iz molekule DNA (De Fougerolles, 2007).

V sklop interferenčnih RNA spadajo tudi male nekodirajoče miRNA, ki nastanejo s prepisom iz DNA. Njihova funkcija je predvsem uravnavanje izražanja proteinov. Povezali so jih z različnimi boleznimi, med drugim tudi z onkogenim ali tumor-zavirajočim vplivom pri raku, kadar so deli DNA, ki kodirajo za miRNA, mutirani ali se drugače nepravilno izražajo. Tako na primer mutirana oblika miRNA ne razgrajuje tarčnega onkogenega mRNA, kar vodi v povečano izražanje tega onkoproteina. Gre za novejša področja, kjer še ni kliničnih testiranj pri genskem zdravljenju raka.

Samomorilski geni

Naslednji pristop uporablja t. i. samomorilske gene. Tu gre za pretvorbo neaktivne snovi z neselskimi encimi v fiziološko aktivno (citotoksično) obliko. Eden izmed najbolj proučevanih sistemov je timidin kinaza iz virusa herpesa simpleksa (Nasu Y, 2007), ki fosforilira in s tem aktivira ganciklovir. Slednji preko apoptotskih in neapoptotskih mehanizmov uniči rakavo celico (El-Aneed, 2004a).

Onkolitični virusi

Virusni vektorji za uporabo pri genskem zdravljenju raka so lahko replikacijsko

okvarjeni ali replikacijsko selektivni (onkolitični). Slednji imajo naravno ali umetno vgrajeno sposobnost tumorske selektivnosti. Na ta način so se sposobni razmnoževati in uničiti le tumorske celice, brez ogrožanja normalnih (Lu, 2004).

Angiogeneza

Angiogeneza je tvorba novih žil iz že obstoječih in je, med drugim, potrebna za rast tumorjev. Brez nje tumorji težko zrastejo več kot 2-3 mm. Eden izmed pristopov genskega zdravljenja raka je ciljanje na gene, povezane z angiogenezo. To lahko dosežemo na dva načina, in sicer z zaviranjem njenih aktivatorjev ali z vstavitvijo njenih zaviralcev (Liu, 2006).

ZAKLJUČEK

Gensko zdravljenje je zadnja desetletja predmet številnih raziskav, velik delež pa jih poteka na področju zdravljenja raka. Pri tem je velikega pomena, kako dostavimo želeni gen za zdravljenje. Pričakujemo lahko, da bo v prihodnosti uspešno zdravljenje raka z genskim zdravljenjem vključevalo predvsem kombinacije, bodisi z že obstoječimi načini zdravljenja raka bodisi z različnimi pristopi genskega zdravljenja.

LITERATURA

Cemazar M, Sersa G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. Current Opinion in Molecular Therapeutics. 2007; 9:554-62.

Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK et al. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. Journal of Clinical Oncology. 2008; 26:5896-903.

De Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2007; 6:443-53.

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 - an update. Journal of Gene Medicine. 2008; 9:833-42.

El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. European Journal of Pharmacology. 2004a; 498:1-8.

- El-Aneed A. *An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. Journal of Controlled Release.* 2004b; 94:1-14.
- Kamensek U, Sersa G. *Targeted gene therapy in radiotherapy. Radiology and Oncology.* 2008; 42:115-35.
- Kočevar N, Čemažar M, Serša G. *Gensko zdravljenje raka. Farm Vest.* 2010; 61:8-16.
- Kohn DB, Candotti F. *Gene Therapy Fulfilling Its Promise. New England Journal of Medicine.* 2009; 360:518-21.
- Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MC. *Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. World J Gastroenterol.* 2006; 12:6941-8.
- Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. *Intra-tumor injection of HI101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. World J Gastroenterol.* 2004; 10:3634-8.
- Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, Manabe D, Thompson TC, Kumon H. *Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. Mol Ther.* 2007; 15:834-40.
- Ogris M, Wagner E. *Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. Drug Discovery Today.* 2002; 7:479-85.
- Prevc A, *Onkološki inštitut Ljubljana, 2015.*
- Prosen L, Markelc B, Dolinsek T, Music B, Cemazar M, Sersa G. *Mcam Silencing With RNA Interference Using Magnetofection has Antitumor Effect in Murine Melanoma. Mol Ther Nucleic Acids.* 2014; 3:205.
- Serša G. *Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. Farm Vest.* 2009; 60:43-7.