

## Γονιδιακή Θεραπεία για τον Καρκίνο: Υποσχέσεις ή πραγματικότητα;

Έλενα Κ. Σιαπάτη<sup>1</sup>, Κωνσταντίνα Βαΐτση<sup>1</sup>, Γεώργιος Βασιλόπουλος<sup>1,2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η έρευνα για την γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου είχε θέσει υψηλούς στόχους τα τελευταία 20 χρόνια αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν εφάμιλλα των προσδοκιών. Ο καρκίνος αποτελεί μια επίκτητη γενετική διαταραχή και η γονιδιακή θεραπεία προσφέρει τη δυνατότητα της εξατομικευμένης παρέμβασης προσαρμοσμένης στο ακριβές γενετικό προφίλ του κάθε όγκου. Ως εκ τούτου, η στοχευμένη γενετική παρέμβαση, υπόσχεται χαμηλή τοξικότητα σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Στη συγκεκριμένη ανασκόπηση παρουσιάζουμε τις προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, τα εμπόδια στην εφαρμογή τους και τις στρατηγικές βελτίωσης. Πρόσφατες τεχνολογικές πρόοδοι υποδηλώνουν ότι η μεταφορά γονιδίων θα μπορούσε τελικά να αποτελέσει μια ισχυρή μέθοδο για την ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων κατά του καρκίνου.

Haema 2016; 7(1): 92-99 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες ιατρικές προκλήσεις. Ο επιστημονικός αγώνας δρόμου που έχει διανυθεί την τελευταία δεκαετία έχει σαφώς βελτιώσει την κατανόηση της μοριακής βάσης των διαφορετικών τύπων καρκίνου, αλλά η πρόοδος όσο αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν ήταν ισόποση. Η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο – με ελάχιστες εξαιρέσεις – υπόκεινται σε γενικευμένες θεραπείες όπως χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία οι οποίες όμως δρουν και στα φυσιολογικά κύτταρα με αποτέλεσμα μεγάλη τοξικότητα και μικρή βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Είναι επόμενο ότι η έκρηξη των γνώσεων στην παθογένεια του καρκίνου και η ανάγκη για βελτιστοποίηση των θεραπευτικών χειρισμών, οδήγησε στην ανάγκη για εξατομικευμένες ή στοχευμένες θεραπείες κατά του καρκίνου.

Δεδομένου ότι ο καρκίνος αποτελεί επίκτητη γονιδιακή διαταραχή, η γονιδιακή στόχευση υπόσχεται αποτελεσματική θεραπεία, προσαρμοσμένη στην ακριβή

γενετική δομή του κάθε όγκου. Η εφαρμογή της όμως ξεφεύγει από την κλασική έννοια της αντικατάστασης ενός μεταλλαγμένου γονιδίου, όπως συμβαίνει στις μονογονιδιακές γενετικές διαταραχές, και επεκτείνεται στη γενικότερη χρήση γενετικού υλικού για την τροποποίηση κυττάρων (*in vitro* ή *in vivo*)<sup>1</sup>.

Η κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για μονογονιδιακές ασθένειες, έχει αρχίσει να δίνει απτά αποτελέσματα με την επιτυχή αντιμετώπιση διαφόρων νόσων όπως ανοσοανεπαρκειών, αιμορροφιλίας και β-Μεσογειακής αναιμίας.<sup>2</sup> Σε αντίθεση, η επιτυχία των κλινικών δοκιμών στη γονιδιακή θεραπεία κακοηθειών είναι σε γενικές γραμμές πολύ κατώτερη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη γενετική ετερογένεια του νεοπλασματος μεταξύ ασθενών η οποία απαιτεί τη μεταφορά περισσότερων του ενός γονιδίων και αποκλείει την ανάπτυξη μιας κοινής θεραπευτικής προσέγγισης. Επίσης, η κλινική διόρθωση των περισσότερων μονογονιδιακών ασθενειών αρκείται στη διόρθωση ενός μικρού ποσοστού των κυττάρων. Για παράδειγμα, στην αιμορροφιλία Β, έκφραση του παράγοντα ΙΧ σε επίπεδο 10% των φυσιολογικών επαρκεί για τη διόρθωση της νόσου.<sup>3</sup> Εν αντιθέσει, για τη θεραπεία κακοηθών νόσων ένα μικρό ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων είτε με το επιδιορθωτικό είτε με το καταστροφικό γονίδιο δε θα ήταν επαρκές. Έτσι, η γονιδιακή μεταφορά από μόνη της δεν αποτελεί θεραπευτική επιλογή

---

<sup>1</sup>Εργαστήριο Γονιδιακής Θεραπείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)

<sup>2</sup>Αιματολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ε.Κ. Σιαπάτη, e-mail: esiapati@bioacademy.gr

εκτός εάν το κύριο μέρος των κυττάρων του όγκου είναι γενετικά τροποποιημένο όπως για παράδειγμα με έναν θανατηφόρο ιικό φορέα που θα ήταν ικανός να αναπαράχθει μόνο μέσα στα κύτταρα του όγκου. Για αυτό το λόγο οι προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας έχουν στραφεί στο μικροπεριβάλλον του όγκου, στην ανοσολογική απάντηση ενάντια των καρκινικών κυττάρων καθώς και στην αύξηση της ανθεκτικότητας των φυσιολογικών κυττάρων σε ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Στην παρούσα ανασκόπηση, θα παρουσιάσουμε τη σύγχρονη state-of-the-art του επιστημονικού πεδίου, τα επιτεύγματα και τις προοπτικές του.

## 1. Προσεγγίσεις που στοχεύουν στον όγκο

### 1.1. Μεταφορά ενζύμων στοχευμένης μεταβολής φαρμάκων

Σημαντική προσέγγιση στη γενετική τροποποίηση των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων. Το ένζυμο ενεργοποιεί ένα χορηγούμενο προφάρμακο σε κυτταροτοξική ουσία και επιφέρει στοχευμένο κυτταρικό θάνατο. Πάνω από 20 ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό με κύριο εκπρόσωπο την κινάση της θυμιδίνης (HSV-tk), υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του valaciclovir σε τοξικά νουκλεοσίδια.<sup>4</sup> Τα κύρια πλεονεκτήματα της θεραπείας αυτής εστιάζονται στην αυξημένη επιλεκτικότητα των φαρμάκων για τα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που μειώνει πιθανές παρενέργειες, καθώς και στο ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενεργού φαρμάκου από ό,τι με την κλασσική χημειοθεραπεία. Τέλος, ο κυτταρικός θάνατος που επέρχεται στον όγκο ενδέχεται να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα, ενισχύοντας τη συνολική θεραπευτική απόκριση. Για την αποτελεσματική εφαρμογή όμως, είναι απαραίτητη η στοχευμένη μεταφορά των ενζύμων στα καρκινικά κύτταρα, τα υψηλά ποσοστά μεταγωγής του όγκου και η χρήση ασφαλών, μη ανοσογόνων φορέων. Σε σχετική μελέτη φάσης III ασθενών με γλοιοβλάστωμα, έχουν ανακοινωθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα<sup>5</sup> αλλά ακόμα η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έχει λάβει επίσημη έγκριση από τις αρμόδιες αρχές.

### 1.2. Ογκολυτικοί ιοί

Στα μέσα του 20ού αιώνα άρχισε η χρήση ογκολυτικών ιών που έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο ενώ ταυτόχρονα δεν επηρεάζουν τα υγιή κύτταρα.<sup>6</sup> Οι ιοί που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό έχουν περαιτέρω τροποποιηθεί γενετικά ώστε να στοχεύουν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, να επάγουν τη

μετάδοση του ιού, την έκφραση κυτταροτοξικών πρωτεϊνών και τελικά να επιφέρουν κυτταρική λύση. Ένα πλήθος ιών έχουν επιταχθεί για ογκολυτική θεραπεία συμπεριλαμβανομένου του αδενοϊού, του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV, Herpes Simplex Virus type 1) και του ιού της ασθένειας του Newcastle.<sup>7,8</sup> Αυτοί οι ιοί έχουν επιλεγεί λόγω της ικανότητάς τους να στοχεύουν καρκινικά κύτταρα, όπως επίσης και λόγω της ευκολίας να υποστούν γενετικές τροποποιήσεις. Σημαντικό παράδειγμα ογκολυτικής θεραπείας αποτελεί η χρήση του αδενοϊού Onyx-015 από τον οποίο απουσιάζει το γονίδιο E1B, γνωστό για την απενεργοποίηση που προκαλεί στην πρωτεΐνη p53 του κυτταρικού κύκλου.<sup>9</sup> Ενώ ο φυσιολογικός ιός για να πολλαπλασιαστεί πρέπει να απενεργοποιήσει την πρωτεΐνη p53, ο γενετικά τροποποιημένος ιός πολλαπλασιάζεται μόνο σε κύτταρα με μεταλλάξεις στην p53 όπως συμβαίνει σε καρκινικά κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα της προσέγγισης σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής/τραχήλου.<sup>10</sup> Αν και ικανοποιητικό ποσοστό των ασθενών ανταποκρίθηκε στη θεραπεία, η εμπορική προώθηση του συγκεκριμένου ιού διεκόπη στην Αμερική. Παρόμοιες ογκολυτικές θεραπείες στοχεύουν κύτταρα με υπερενεργό RAS μονοπάτι ή ελαττωματική σηματοδότηση μέσω ιντερφερονών, και έχουν παρουσιάσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα χωρίς όμως να φτάσουν σε μελέτες τελικής φάσης.<sup>10,11</sup>

Σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή της θεραπείας με ογκολυτικούς παράγοντες αποτελεί η φτωχή μεταγωγική ικανότητα των ιών η οποία ενδέχεται να οδηγήσει σε ένα μικρό μόνο ποσοστό λύσης των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η υπάρχουσα ανοσία ενάντια στους αδενοϊούς συχνά οδηγεί σε ανοσολογική απόκριση και εξάλειψη του ιού προτού προλάβει να διαμολύνει τα κύτταρα. Αυτή την ανεπιθύμητη ανοσολογική απάντηση έχουν εκμεταλλευτεί οι επιστήμονες σε κάποιες περιπτώσεις ογκολυτικών ιών, ενσωματώνοντας ανοσοδιεγερτικά γονίδια, όπως αυτά των GM-CSF ή της ιντερλευκίνης 12.<sup>2</sup> Το κύριο πλεονέκτημα της ογκολυτικής θεραπείας είναι πως εξασφαλίζει ότι ο υγιής ιστός θα επηρεαστεί ελάχιστα. Επίσης, όταν συνδυαστεί με την έκφραση κυτταροτοξικών γονιδίων η θεραπεία αυτή μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα αλλά και αυτά στον περιβάλλοντα ιστό κάνοντας το μικροπεριβάλλον λιγότερο ευνοϊκό για την ανάπτυξη του καρκίνου.

## 2. Προσεγγίσεις που ενισχύουν στην αντίσταση του ξενιστή

### 2.1. Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία αφορά την ενίσχυση του αμυντικού συστήματος ώστε να αναγνωρίσει, να εντοπίσει και

να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο υποδεικνύουν την ύπαρξη αντισωμάτων και T-λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα, καθιστώντας το ανοσοποιητικό σύστημα ικανό να αναγνωρίζει ως ξένα τα κύτταρα του όγκου. Μία από τις πρώτες προσεγγίσεις αφορά τον εμβολιασμό του ασθενούς με ακέραια καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν καταστεί ανενεργά με ακτινοβολία και έχουν αναμιχθεί με ένα ανοσοενισχυτικό. Σε γενικές γραμμές ο εμβολιασμός αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για την προστασία των ζώων και των ανθρώπων από βακτηριδιακές και ιογενείς λοιμώξεις, αλλά τα εμβόλια δεν είναι γενικά αποτελεσματικά έναντι προϋπάρχουσας νόσου. Επιπρόσθετα, για να εδραιωθεί ο εμβολιασμός ως μια ασφαλής μέθοδος ενάντια στον καρκίνο θα πρέπει να βρεθούν ειδικά αντιγόνα τα οποία να απουσιάζουν από τα υγιή κύτταρα του ξενιστή. Οι πιο μελετημένες προσεγγίσεις που αφορούν τον εμβολιασμό κατά του καρκίνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Δεδομένου ότι σε αρκετές περιπτώσεις προχωρημένης ασθένειας το ανοσοποιητικό σύστημα είναι εξασθενημένο, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η ανοσοθεραπεία θα πρέπει να επάγει κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) αντί αντισωμάτων.<sup>12</sup> Η αντιγονοπαρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I ή II). Οι MHC I υποδοχείς εκφράζονται σε όλα τα εμπύρρινα κύτταρα και οδηγούν στην άμεση ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Η αντιγονοπαρουσίαση μέσω των υποδοχέων MHC II, οι οποίοι συναντώνται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα δένδριτικά (DCs), οδηγεί σε προσαρμοστική ανοσοαπόκριση μέσω των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (T helper cells). Και στις δύο περιπτώσεις σημαντική είναι η ανάπτυξη κυττάρων μνήμης, τα οποία σε επόμενη επαφή με το αντίγονο θα παρέχουν άμεση και ενισχυμένη ανοσία.

Στα πλαίσια αυτά, η γονιδιακή θεραπεία αποσκοπεί στη μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με ανοσοδιεγερτικά μόρια όπως κυταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. ιντερλευκίνη-2, GM-CSF). Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά *in vitro* ή *in vivo* ώστε να εκφράζουν γονίδια που επάγουν μια ή περισσότερες από τις φάσεις ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1). Στην περίπτωση όπου τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά, η συλλογή γίνεται είτε από τον ασθενή (αυτόλογα κύτταρα) ή από καρκινικές κυτταρικές σειρές (αλλογενή κύτταρα). Στα κύτταρα αυτά εν συνεχεία προστίθενται ένα ή περισσότερα γονίδια με διάφορες μεθόδους μεταγωγής ή παροδικής διαμόλυνσης.<sup>13</sup> Ένας άλλος τύπος ανοσοθεραπείας που δοκιμάζεται είναι η άμεση έγχυση ανοσοδιεγερτικών γονιδίων *in vivo*. Στην περίπτωση αυτή το DNA λαμβάνεται και εκφράζεται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή από τα

κύτταρα του όγκου.<sup>14,15</sup> Για ενίσχυση και εξειδίκευση της απόκρισης, τα συγκεκριμένα εμβόλια συνήθως εμπεριέχουν και καρκινικά αντιγόνα (π.χ. CEA).<sup>16-18</sup>

Εναλλακτικά, η γενετική τροποποίηση μπορεί να γίνει σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς ώστε να τα ευαισθητοποιήσει στα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών από τον ασθενή τα οποία διαμολύνονται με καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με ανοσοδιεγερτικά μόρια *ex vivo*. Η χρήση δένδριτικών κυττάρων έχει δοκιμαστεί σε πληθώρα κλινικών μελετών με ανάμεικτα αποτελέσματα. Επιτυχές παράδειγμα αποτελεί το εμβόλιο κατά του καρκίνου του προστάτη που στοχεύει την όξινη φωσφατάση μέσω της έγχυσης δένδριτικών κυττάρων διαμολυσμένων με το αντίστοιχο cDNA.<sup>19</sup> Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα κλινικής μελέτης σε άνδρες με προχωρημένη νόσο συνέβαλαν στην έγκριση του προϊόντος στις ΗΠΑ. Ωστόσο, η επιτυχία της παραδοσιακής ανοσοθεραπείας αποδεικνύεται περιορισμένη καθώς τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αποφυγής της ανοσολογικής ανίχνευσης. Αν και η βιβλιογραφία κατακλύζεται από σχετικές μελέτες με πολλά υποσχόμενα προκλινικά δεδομένα, οι επακόλουθες κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ποσοστά επιτυχίας της τάξης του 10%.

## 2.2. Θεραπεία με γενετικά τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα

Λόγω των εγγενών ανεπαρειών στο ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με καρκίνο, έχει εναλλακτικά μελετηθεί η άμεση ενίσχυσή του με τροποποίηση των T λεμφοκυττάρων *ex vivo* και στη συνέχεια επιστροφή των κυττάρων αυτών στον ασθενή. Η μεταφορά γενετικά τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων αποτελεί μια υποσχόμενη στρατηγική στην καταπολέμηση του καρκίνου. Το κύριο πλεονέκτημα της είναι ότι προσπερνά την ανάγκη για αντιγονοπαρουσίαση, και ενεργοποιεί ακόμη και κύτταρα που έχουν πληγεί άμεσα από τον καρκίνο ή έμμεσα από χημειοθεραπεία.<sup>2</sup>

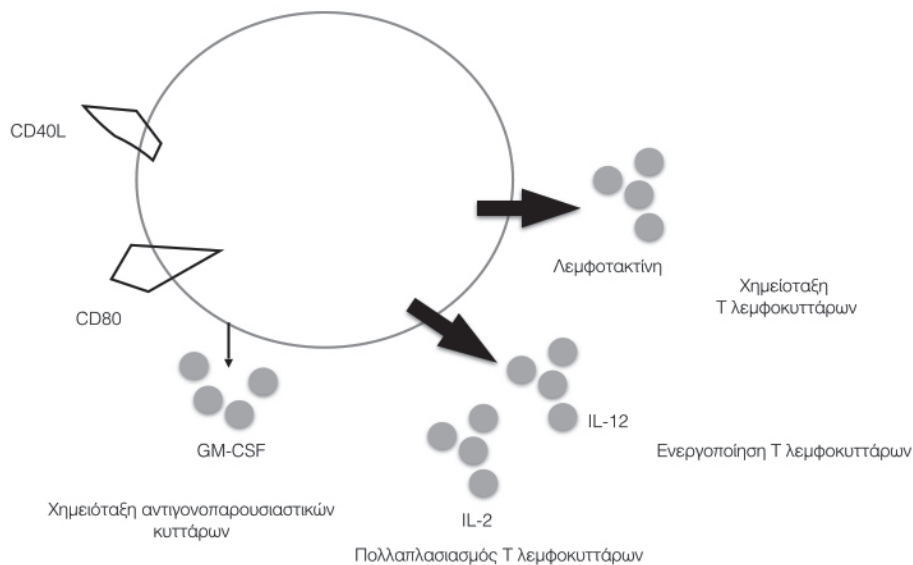
Για να εξαλειφθούν πιθανά προβλήματα στην απομόνωση και καλλιέργεια αυτόλογων T λεμφοκυττάρων από τον ασθενή, οι ερευνητές έχουν καταλήξει στη γενετική μεταφορά TCR υποδοχέων ειδικών για συγκεκριμένα καρκινικά αντιγόνα (π.χ. MART-1, CEA, MAGE-A3)<sup>20</sup> όπως φαίνεται στην Εικόνα 2Α. Σε κλινικές μελέτες, η μεταφορά γενετικά τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων με TCR υποδοχείς, αν και επιφέρει μείωση του όγκου, παρουσιάζει σοβαρή τοξικότητα και κάποιες φορές οδηγεί και στην ανάπτυξη φλεγμονής. Αυτό υποδηλώνει ότι οι TCR υποδοχείς αντιδρούν και με το ίδιο αντιγόνο που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Ένα περαιτέρω σοβαρό μειονέκτημα της συγκεκριμένης

νης μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι οι TCR υποδοχείς μπορεί να αλληλεπιδράσουν με συγκεκριμένα HLA, περιορίζοντας σημαντικά τη χρήση τους.

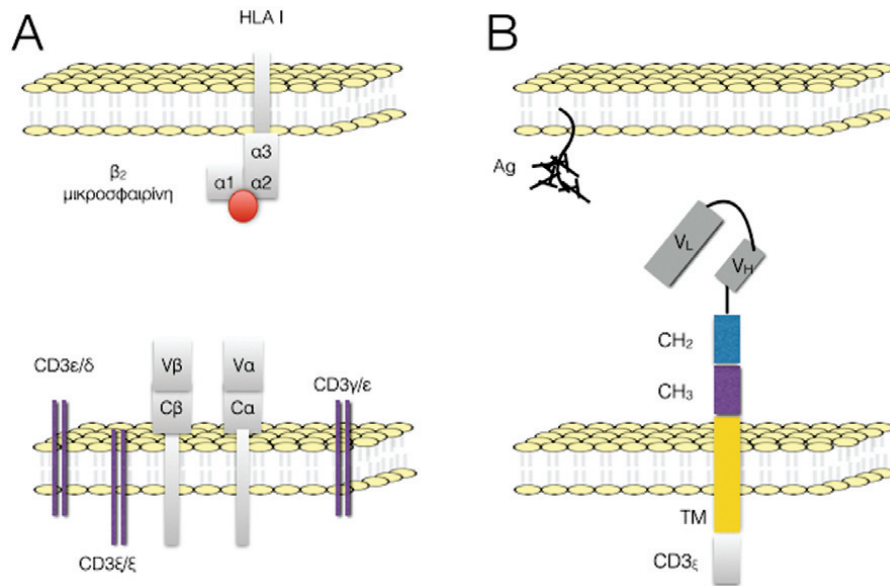
Η λύση στο πρόβλημα επήλθε με τη δημιουργία των χιμαϊρικών αντιγονοϋποδοχέων (chimeric antigen receptors, CARs) οι οποίοι συνδυάζουν την ενδοκυττάρια σημα-

**Πίνακας 1. Μειονεκτήματα και Πλεονεκτήματα Εμβολίων κατά του καρκίνου**

Τύπος εμβολίου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<b>Καρκινικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Εκτενώς μελετημένο</li> <li>2. Επεξεργάζεται για να ενισχύσει την αντιγονοπαρουσίαση</li> <li>3. Μπορεί να χορηγηθεί με ανοσοενισχυτικά</li> <li>4. Μεγάλη πιθανότητα να εκφράζει τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>5. Τα καρκινικά αντιγόνα δεν χρειάζεται να ταυτοποιηθούν</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Προϋποθέτει την ύπαρξη αυτόλογου όγκου ή κυτταρικής σειράς που να μοιράζονται τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>2. Μειωμένη Ικανότητα επαγωγής ανοσολογικής απόκρισης</li> </ol>
<b>Γενετικά τροποποιημένα καρκινικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Μεγάλη πιθανότητα να εκφράζουν τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>2. Τα καρκινικά αντιγόνα δεν χρειάζεται να ταυτοποιηθούν</li> <li>3. Συχνά είναι τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν και ανοσοδιεγερτικά μόρια και κυτταροκίνες</li> <li>4. Χρήση αλλογενών καρκινικών κυτταρικών σειρών και ινοβλαστών ως προσέγγιση για την πιο γρήγορη παραγωγή εμβολίων</li> <li>5. Έχουν αναφερθεί ανοσολογικές και κλινικές αποκρίσεις στη θεραπεία</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Είναι απαραίτητη η ύπαρξη αλλογενούς όγκου ή καρκινικών κυτταρικών σειρών που να εκφράζουν τα σχετικά αντιγόνα του όγκου</li> <li>2. Μεγάλος χρόνος παραγωγής</li> <li>3. Αδύναμη αντιγονοπαρουσίαση από πολλά είδη όγκων</li> <li>4. Ανάγκη για <i>ex vivo</i> κυτταρική καλλιέργεια</li> <li>5. Κόστος, χρόνος και δυσκολία στην παραγωγή</li> </ol>
<b>Dna</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έχει κατασκευαστεί έτσι ώστε να εκφράζει το καρκινικό αντιγόνο ενδιαφέροντος</li> <li>2. Εύκολη και σταθερή παραγωγή</li> <li>3. Μπορεί να χορηγηθεί απευθείας</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Απαιτεί λεπτομερή γνώση της γονιδιακής αλληλουχίας του αντιγόνου</li> <li>2. Απαραίτητη η δόση υψηλής ποσότητας πλασμιδιακού DNA ώστε να επάγει ανοσολογική απόκριση</li> </ol>
<b>Ιικοί φορείς</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έχουν κατασκευαστεί ώστε να εκφράζουν το καρκινικό αντιγόνο ενδιαφέροντος</li> <li>2. Μπορούν να κατασκευαστούν ώστε να συνεκφράζουν ανοσοδιεγερτικά μόρια και κυτταροκίνες</li> <li>3. Μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων φορέων</li> <li>4. Έχουν αναφερθεί κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Επικράτηση ιικών αντιγόνων έναντι καρκινικών αντιγόνων</li> <li>2. Ασθενής αντιικική απόκριση</li> <li>3. Κίνδυνος τοξικότητας</li> </ol>
<b>Δενδριτικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Χρήση ισχυρών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων</li> <li>2. Ικανότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας δενδριτικών κυττάρων</li> <li>3. Τα αντιγόνα στόχοι μπορεί να είναι προσδιορισμένα ή και όχι</li> <li>4. Πολλαπλές μέθοδοι "φόρτωσης" αντιγόνων</li> <li>5. Έχουν αναφερθεί ανοσολογικές και κλινικές αποκρίσεις</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ανάγκη για <i>ex vivo</i> κυτταροκαλλιέργεια</li> <li>2. Κόστος, χρόνος και δυσκολία στη παρασκευή</li> <li>3. Πιθανότητα αντοχής στα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα</li> <li>4. Έλλειψη κριτηρίων για τυποποίηση τελικού προϊόντος</li> </ol>



**Εικόνα 1.** Γενετική τροποποίηση καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να τροποποιηθούν γενετικά ώστε να βελτιωθεί η αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα ή η ικανότητα τους να προσελκύουν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) (CD40L, GM-CSF), να προσελκύουν ή να ενεργοποιούν Τ λεμφοκύτταρα (CD80, IL12) ή να ενεργοποιούν την κλωνική έκπτυξη των Τ λεμφοκυττάρων (IL2).



**Εικόνα 2.** Γενετική τροποποίηση του Τ λεμφοκυτταρικού Υποδοχέα (TCR). Στο πάνελ Α φαίνεται ο κυτταρικός υποδοχέας με τις α (VaCa) και (VβCβ) αλυσίδες που αναγνωρίζει πεπτίδια συνδεδεμένα με μόρια HLA τάξης I (σύμπλοκο β2 μικροσφαιρίνης, α1, α2, α3). Ο χημειοκτικός TCR (πάνελ Β) αναγνωρίζει το αντιγόνο (Ag) με τις αλυσίδες VL και VH (προερχόμενες από ανοσοσφαιρίνη) οι οποίες έχουν συνδεθεί με το σηματοδοτικό τμήμα του TCR (CH2, CH3, TM και CD3ε).

τοδοτική ικανότητα των TCR υποδοχέων με το τμήμα πρόσδεσης αντιγόνου ενός μονοκλωνικού αντισώματος (Εικόνα 2B). Οι CARs παρέχουν την ευελιξία ενός μονοκλωνικού αντισώματος όσο αφορά την αναγνώριση αντιγόνων ανεξαρτήτου ιστοσυμβατότητας, ενώ διατηρούν

την ικανότητα των Τ λεμφοκυττάρων να στρατολογούν διάφορους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης (κυτταρικούς και χυμικούς) ενάντια στον όγκο.

Στην πράξη, η χρήση γενετικά τροποποιημένων Τ λεμφοκυττάρων με CAR υποδοχείς δεν επέφερε τα αναμε-

νόμμενα αποτελέσματα.<sup>21</sup> Περαιτέρω τροποποιήσεις των υποδοχέων με την ενσωμάτωση συνδιεγερτικών μορίων (π.χ. CD27, CD28) οδήγησε σε καλύτερη ενεργοποίηση και επιβίωση των T λεμφοκυττάρων.<sup>22</sup> Ενθαρρυντικά είναι και τα κλινικά αποτελέσματα μετά από έγχυση T λεμφοκυττάρων που φέρουν τους βελτιωμένους CAR υποδοχείς σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή νευροβλάστωμα.<sup>23-30</sup> Παρ' όλα αυτά, πολλοί όγκοι μπορεί να αποδειχθούν εντελώς ανθεκτικοί σε αυτή την αντιμετώπιση επειδή διαθέτουν στρατηγικές διαφυγής της ανοσολογικής απόκρισης. Γι' αυτό το σκοπό, ενισχύεται η δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων έναντι του όγκου με στρατηγικές που αποσκοπούν στη βελτίωση της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης τους *in vivo*. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη γονιδίων για χημειοτακτικούς παράγοντες, για κυτταροκίνες ή με την εξουδετέρωση της έκφρασης του ανασταλτικού παράγοντα FasL. Επιπρόσθετη ασφάλεια στην όλη διαδικασία προσδίδει η συν-μεταφορά γονιδίων αυτοκτονίας, όπως της κινάσης της θυμιδίνης (HSV-tk), που μπορεί να ενεργοποιηθούν αν χρειαστεί.

### Συμπεράσματα και Προοπτικές

Γιατί ο εμβολιασμός κατά του καρκίνου δεν έχει επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα; Η επιτυχία της χρήσης αυτόλογων καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από την πιθανότητα αποφυγής της ανοσοαπόκρισης και από τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου. Επιπρόσθετα, η αποτυχία του εμβολιασμού ως αντι-καρκινικής θεραπείας, μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ενός μικρού κυτταρικού υποπληθυσμού, των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs, Cancer Stem Cells). Αντίστοιχα με τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, τα CSCs παρουσιάζουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και σε αυτά οφείλεται η αρχική ανάπτυξη του όγκου καθώς και η υποτροπή. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό οφείλεται και η αντίσταση του καρκίνου στη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Βάσει των δεδομένων αυτών, η στόχευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, της ρίζας της καρκινογένεσης αποτελεί τη νέα στρατηγική θεραπείας του καρκίνου.

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί έναν εναλλακτικό θεραπευτικό στόχο, δεδομένου του ρόλου που παίζει στην ανάπτυξη και στην εδραίωση του καρκίνου. Στο μικροπεριβάλλον, σημαντικό ρόλο παίζει η αγγειογένεση που είναι αναγκαία για την εξέλιξη του καρκίνου και φάρμακα τα οποία την παρεμποδίζουν έχουν σημαντική θεραπευτική αξία. Η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονο-

κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα αιμοπετάλια.<sup>30</sup>

Μέσω της γονιδιακής θεραπείας θα μπορούσε να στοχευθεί η αγγείωση του όγκου παρεμποδίζοντας την έκφραση και δράση ενός ή περισσοτέρων αγγειογενετικών παραγόντων [π.χ. του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (bFGF) ή του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF)]. Εναλλακτικά, η έκφραση αναστολέων της αγγειογένεσης (π.χ. της ενδοστατίνης, αγγειοστατίνης, θρομβοσπονδίνης-1) αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση που στοχεύει στο μικροπεριβάλλον του όγκου.<sup>30</sup>

Σε γενικές γραμμές, η γονιδιακή θεραπεία για τον καρκίνο εγκυμονεί κινδύνους λόγω της χρήσης εξωγενούς γενετικού υλικού και την ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Παρ' όλη την αναπτυσσόμενη τεχνολογία φορέων για γονιδιακή μεταφορά, η ενσωμάτωση των ικόν φορέων παραμένει τυχαία και διατρέχει τον κίνδυνο της περαιτέρω μεταλλαξιγένεσης στα ήδη παθολογικά καρκινικά κύτταρα. Η συνεχής τεχνολογική ανάπτυξη φορέων όμως που φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία και μονωτές της χρωματίνης για μεταγραφική αυτονομία, υπόσχεται να μειώσει την πιθανότητα ενεργοποίησης ογκογονιδίων λόγω της ενσωμάτωσης των φορέων.

Εν αντιθέσει με την τοξικότητα από τα κοινά φάρμακα, τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ενδέχεται να έχουν πολλαπλάσια καρκινική δράση όταν παραμένουν *in vivo*. Επίσης ο εμβολιασμός με απευθείας έγχυση DNA *in vivo* ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητη ενσωμάτωση του γονιδίου σε φυσιολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Σαν διακόπτης ασφαλείας σε περιπτώσεις μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιείται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την HSV-tk, μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική η οποία βρίσκεται σε τελική φάση κλινικών δοκιμών σε T λεμφοκυτταρική θεραπεία.<sup>31</sup> Πρέπει όμως να επισημάνουμε ότι η δράση της είναι χρονοβόρος και ενδέχεται να είναι ατελής αν τα κύτταρα βρίσκονται σε μεταμιτωτικό στάδιο. Επιπλέον, λόγω της ικής προέλευσης του γονιδίου, μπορεί να προκαλέσει και ανοσοαπόκριση πριν προλάβει να δράσει.

Αν και ελάχιστα εγκεκριμένα προϊόντα γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί κατά τα τελευταία 20 χρόνια, αυτό αναμένεται ότι σύντομα θα αλλάξει. Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι, λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης του καρκίνου, απαιτείται πρόοδος όσον αφορά την κατανόηση της βιολογίας του για να μπορέσουν να αναπτυχθούν εξατομικευμένες θεραπείες που θα έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα σε συγκεκριμένες υποκατηγορίες ασθενών. Καθώς οι ερευνητές έχουν αρχίσει να αξιοποιούν ένα συνδυασμό συνεργικών προσεγγίσεων για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, μπορούμε να ελπίζουμε για μεγαλύτερη επιτυχία στον τομέα αυτό στο εγγύς μέλλον.

## Gene therapy for cancer: Promises or reality?

by Elena K. Siapati<sup>1</sup>, Konstantina Vaitisi<sup>1</sup>, George Vassilopoulos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Laboratory, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA),

<sup>2</sup>Haematology Clinic, Medical School, University of Thessaly, Greece

**ABSTRACT:** Research on gene therapy for cancer had set high standards over the past 20 years but has essentially delivered very little. Since cancer is an acquired genetic disorder, gene therapy can accommodate individual genetic variability, thereby minimising the toxicities achieved with generic drugs. In this review we present the strategies employed for the gene therapy of cancer, the obstacles and ways around them. Recent technological advances in the field indicate that gene transfer could finally entail a powerful approach for the development of safe and efficacious treatment of cancer.

### Βιβλιογραφία

1. Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*. 2006; 4:218-227.
2. Brenner KM, Gottschalk S, Leen MA, Vera FJ. Is Cancer Gene Therapy an empty suit? *Lancet Oncology*. 2013; 14:e447-456.
3. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011; 365:2357-2365.
4. Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol*. 2005; 30:71-88.
5. Westphal M, Yi-Herttua S, Martin J, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. (in press).
6. Chiocca EA. Oncolytic Viruses. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:938-950.
7. Lin E, Nemunaitis J. Oncolytic viral therapies *Cancer Gene Therapy*. 2004; 11:643-664.
8. Liu TC, Galanis E, Kim D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007; 4:101-117.
9. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kim DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med*. 1997; 3:639-645.
10. Patel MR, Kratzke RA. Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials. *Transl Res*. 2013; 161:355-364.
11. Heo J, Reid T, Ruo L, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med*. 2013; 19:329-336.
12. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*. 2004; 113:1515-1525.
13. Siapati KE, Barker S, Kinnon C, et al. Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12. *British Journal of Cancer*. 2003; 88:1641-1648.
14. Stevenson FK, Mander A, Chudley L, Ottensmeier CH. DNA fusion vaccines enter the clinic. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60:1147-1151.
15. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 2011; 239:62-84.
16. Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, et al. Immunogenicity of a plasmid DANN vaccine encoding chimeric idiootype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2002; 62:5845-5852.
17. Tagawa ST, Lee P, Snively J, et al. Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with stage IV melanoma. *Cancer*. 2003; 98:144-154.
18. Conry RM, Curiel DT, Strong TV, et al. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2782-2787.
19. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:411-422.
20. Morgan RA, Chinnsamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013; 36:133-151.
21. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006; 314:126-129.
22. Gottschalk S, Edwards OL, Sili U, et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood*. 2003; 101:1905-1912.
23. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 365:725-733.
24. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011; 3:95ra73.
25. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cy-

- tokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012; 119:2709-2720.
26. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. *Blood*. 2011; 118:4817-4828.
27. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. *J Clin Invest*. 2011; 121:1822-1826.
28. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere L, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Sci Transl Med*. 2013;5:177ra38.
29. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 368:1509-1518.
30. Tandle A, Blazer GD, Libutti KS. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *Journal of Translational Medicine*. 2004; 2:22.
31. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011; 365:1673–1683.