

Received: 2014.11.25  
Accepted: 2015.10.07  
Published: 2015.12.31

## Wirusowy transfer liganda czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TRAIL) w terapii genowej

### Viral transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in gene therapy

Ewelina Wędrowska<sup>1</sup>, Tomasz Wandtke<sup>1</sup>, Andrzej Dyczek<sup>2</sup>, Joanna Woźniak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genoterapii, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz/Toruń

<sup>2</sup>Konsultacyjna Przychodnia Specjalistyczna Kardiologiczna i Kardiochirurgiczna, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II

#### Streszczenie

Ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę (TRAIL) selektywnie wzbudza śmierć komórek nowotworowych w wyniku zewnątrzpochoźnej apoptozy.

W podjętych dotąd przedklinicznych próbach terapii genowej dokonano wirusowego transferu genu TRAIL do komórek raka gruczołu krokowego, pęcherza, sutka, nerki, wątroby, a także niedrobnokomórkowego raka płuca i glejaka. Wykazano intensywną apoptozę komórek docelowych *in vitro*. W licznych badaniach doświadczalnych stwierdzono regresję lub remisję choroby. W przeciwieństwie do chemioterapii, wirusowy transfer TRAIL nie wykazywał działań niepożądanych. Obiecujące wyniki terapii z użyciem transgenu TRAIL obserwowano w reumatoidalnym zapaleniu stawów i cukrzycy typu 1.

Wektory adenowirusowe (AdV) kodujące TRAIL wydają się najbardziej obiecujące w przeciwnowotworowej terapii genowej. Poddano je licznym modyfikacjom, zwiększając wydajność transfekcji i ekspresji transgenu w komórkach docelowych.

Jak dotąd, przeprowadzono jedno badanie kliniczne I fazy. U chorych z rakiem gruczołu krokowego podanie do guza AdV kodującego transgen TRAIL powodowało miejscową reakcję zapalną i apoptozę komórek raka.

#### Słowa kluczowe:

TRAIL • transfer wirusowy • apoptoza • adenowirus • rak

#### Summary

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) selectively induces carcinoma cell death through the extrinsic pathway of apoptosis.

Preclinical trials of gene therapy have been conducted using viral transfer of the TRAIL transgene into prostate, bladder, breast, kidney, liver, non-small cell lung cancer and also glioblastoma cells. Experiments *in vitro* demonstrated the extensive apoptosis of target cells as well as frequent disease regression or remission. TRAIL transfer did not show any side effects, opposite to chemotherapy. Encouraging results of TRAIL-related gene therapy were observed in rheumatoid arthritis and type 1 diabetes.

Adenoviral vectors (AdV) encoding TRAIL are the most promising tool in anti-tumor therapy. They have undergone numerous modifications by increasing transfection efficiency and transgene expression in target cells.

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Key words:</b>     | However, only one clinical phase I trial has been performed. AdV encoding the TRAIL transgene caused local inflammation and apoptosis in patients with prostate cancer.<br><b>TRAIL • apoptosis • viral transfer • apoptosis • adenovirus • cancer</b> |
| <b>Full-text PDF:</b> | <a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1189923">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1189923</a>                                                                                                                                                  |
| <b>Word count:</b>    | 4506                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Tables:</b>        | 1                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Figures:</b>       | 1                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>References:</b>    | 73                                                                                                                                                                                                                                                     |

**Adres autorki:** mgr Ewelina Wędrowska, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: ewelina.wedrowska@gmail.com

**Wykaz skrótów:** **AAV** - wirusy adenosatelitarne (adeno-associated viruses); **Ad** - adenowirus (adenovirus); **Ad2,5,35** - serotyp 2, 5, 35 adenowirusa; **AdV** - wektor adenowirusowy (adenoviral vector); **Apo2L** - apoptosis ligand 2; **Bax** - białko proapoptotyczne podrodziny Bax (Bcl-2-associated protein X); **Bcl-2** - rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B-cell leukemia/lymphoma-2); **Bcl-XL** - inhibitory białko apoptozy (B-cell lymphoma-extra large); **BID** - aktywowane białko proapoptotyczne podrodziny BH3-only (BH3 interacting domain death antagonist); **B-NHL** - niezmierny chłoniak z komórek B (B-cell non-Hodgkin's lymphoma); **CAR** - coxsackie adenowirus receptor; **cDNA** - sekwencja kodująca DNA (coding DNA sequence); **cFLIP** - białko antyapoptotyczne, hamuje kaspazę 8 (cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein); **CpG** - niemetylowane sekwencje DNA złożone z oligonukleotydu cytozyno-guaninowego (cytosine-phosphate-guanine); **DcR** - receptor pułapkowy (decoy receptor); **DD** - domena śmierci (death domain); **DED** - wykonawcza domena śmierci (death execution domain); **DISC** - kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć komórki (death-inducing signaling complex); **DR** - receptory śmierci (death receptor); **EGFR** - receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor); **FADD** - białko adaptorowe - domena śmierci sprzężona z **Fas** (Fas-Associated Death Domain protein); **FasL** - ligand Fas; **FL** - gen reporterowy lucyferazy (firefly luciferase); **GBM** - glejak wielopostaciowy (glioblastoma multiforme); **hTERT** - odwrotna transkryptaza ludzkiej telomerazy (human telomerase reversed transcriptase); **MMP** - metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases); **NOD** - mysz model cukrzycy typu 1 (non-obese diabetic); **NSCLC** - niedrobnokomórkowy rak płuca (non-small cell lung cancer); **SCID** - wrodzony defekt odporności (severe combined immunodeficiency); **shRNA** - krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (short hairpin RNA); **siRNA** - małe interferujące cząsteczki RNA (small interfering RNA); **SMAC** - białko proapoptotyczne, wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy (second mitochondrial activator of caspase); **sTRAIL** - postać rozpuszczalna TRAIL (soluble TRAIL); **stTRAIL** - trimeryczna postać rozpuszczalna (soluble trimeric TRAIL); **TIMP-1** - tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1); **TNF** - czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **TNF $\alpha$**  - czynnik martwicy nowotworu alfa (tumor necrosis factor alfa); **TRAIL** - ligand czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand); **TRAIL-R** - receptor TRAIL (TRAIL-receptor).

## TRAIL I PROCES APOPTOZY

Cząsteczka TRAIL (ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę, tumor necrosis factor related-apoptosis inducing ligand), znana także jako Apo2L (apoptosis ligand 2), została odkryta i opisana w latach 1995-1996 przez dwa niezależne zespoły [37,62]. Od tego czasu TRAIL stał się potencjalnym celem terapii proapoptotycznych.

TRAIL należy do nadrodziny cząsteczek TNF (tumor necrosis factor) [62]. Występuje w postaci rozpuszczal-

nej – sTRAIL (soluble TRAIL) oraz jako cząsteczka powierzchniowa komórek czynnych immunologicznie m.in. limfocytów T, komórek NK, makrofagów, neutrofilów, komórek dendrytycznych [52]. Ekspresję TRAIL wykazano w tkankach, takich jak wątroba, płuca, nerki, łożysko, śledziona, węzły chłonne [34]. Podstawową rolą TRAIL w warunkach fizjologicznych jest nadzór immunologiczny i udział w zapobieganiu powstania i rozprzestrzeniania się zmian nowotworowych [16,31]. Wydaje się, że najważniejszą cechą TRAIL jest zdolność do selektywnej indukcji apoptozy komórek nowotworowych



bez wywołania cytotoksycznego działania w komórkach prawidłowych [3].

Ze względu na ściśle proapoptotyczny charakter działania czynnika TRAIL, trzeba w tym miejscu zrekapitulować podstawowe wiadomości dotyczące apoptozy. W uproszczeniu jest to odmiana zaprogramowanej śmierci komórki kontrolowana przez aparat genetyczny, zależna od dostawy energii (ATP) i nieindukująca miejscowego odczynu zapalnego. Jest kilka mechanizmów uruchamiających apoptozę, wśród nich zwłaszcza szlaki zewnątrzpochodny (receptorowy) i wewnątrzpochodny (mitochondrialny). W obu zachodzi uruchomienie kaskady enzymów podstawowych dla śmierci komórki, znanych jako kaspazy [26,46]. Mechanizmem spustowym szlaku receptorowego jest właśnie przyłączenie się do powierzchniowego receptora śmierci – jego liganda. Najbardziej znane ligandy śmierci to: FasL i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ). Każdy z ligandów ma swoje dla siebie receptory, a także białka adaptorowe pośredniczące w aktywacji kaspazy-8, pierwszego enzymu kaskady aktywowanej receptorowo. Ponadto istnieje możliwość pobocznego wzmocnienia procesu apoptozy przez czynniki ścieżki receptorowej: aktywna kaspaza-8 katalizuje czynnik BID, który uruchamia wówczas szlak mitochondrialny [26,46].

TRAIL jest właśnie typowym ligandem szlaku receptorowego. Działa przez związanie swoistych receptorów powierzchniowych umiejscowionych na komórkach docelowych. Rozpoznaje 5 typów receptorów i od tego, z którym się zwiąże, zależą dalsze losy komórki [64]. Apoptozę wywołuje przyłączenie się do swoistych dla TRAIL receptorów śmierci (DR, death receptor): TRAIL-R1 (DR4) i TRAIL-R2 (DR5) [13,64]. Skutek biologiczny wywołany przyłączeniem TRAIL do receptora (DR4 lub DR5) jest najmocniejszy, gdy ligand działa jako homologiczny trimer, co prowadzi do jednoczesnej trimeryzacji receptora. Wówczas zachodzą zmiany konformacyjne DR4 i DR5. Jedną z wewnątrzkomórkowych domen receptora, tzw. domena śmierci (DD, death domain), rozpoznaje homologiczny motyw domeny DD właściwego białka adaptorowego [45]. Jest nim czynnik FADD (fas-associated death domain protein). Następuje dimeryzacja tzw. wykonawczej domeny śmierci (DED, death execution domain) między cząsteczką FADD, a prokaspazą-8. Powstaje zespół białek znany jako DISC (death-inducing signaling complex), obejmujący m.in. prokaspazę-8 (lub -10) i FADD. Jego główna rola polega na autokatalizie i aktywacji prokaspazy-8. Aktywna kaspaza-8 uruchamia kaspazy efektorowe -3 (i -7). Antagonistycznie działającym, nieaktywnym homologiem kaspazy-8, służącym komórce do ewentualnego hamowania szlaku zewnątrzpochodnego jest białko cFLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein). Konkuruje ono o wiązanie FADD z kaspazą-8 [26,38,49].

Oprócz receptorów śmierci DR4 i DR5, na błonie komórek docelowych obecne mogą być także swoiste dla TRAIL receptory „pułapkowe” – DcR (decoy receptors): TRAIL-R3 (DcR1) i TRAIL-R4 (DcR2). Nie tylko nie indukują procesu apoptozy, lecz hamują go, rywalizując o ligand

z właściwymi receptorami śmierci. Tym samym mogą zabezpieczać komórkę przed śmiercią, a nawet promować proliferację. Podobną rolę pełni osteoprotegryna (OPG), wydzielana do środowiska komórki jako rozpuszczalny receptor TRAIL [27,64].

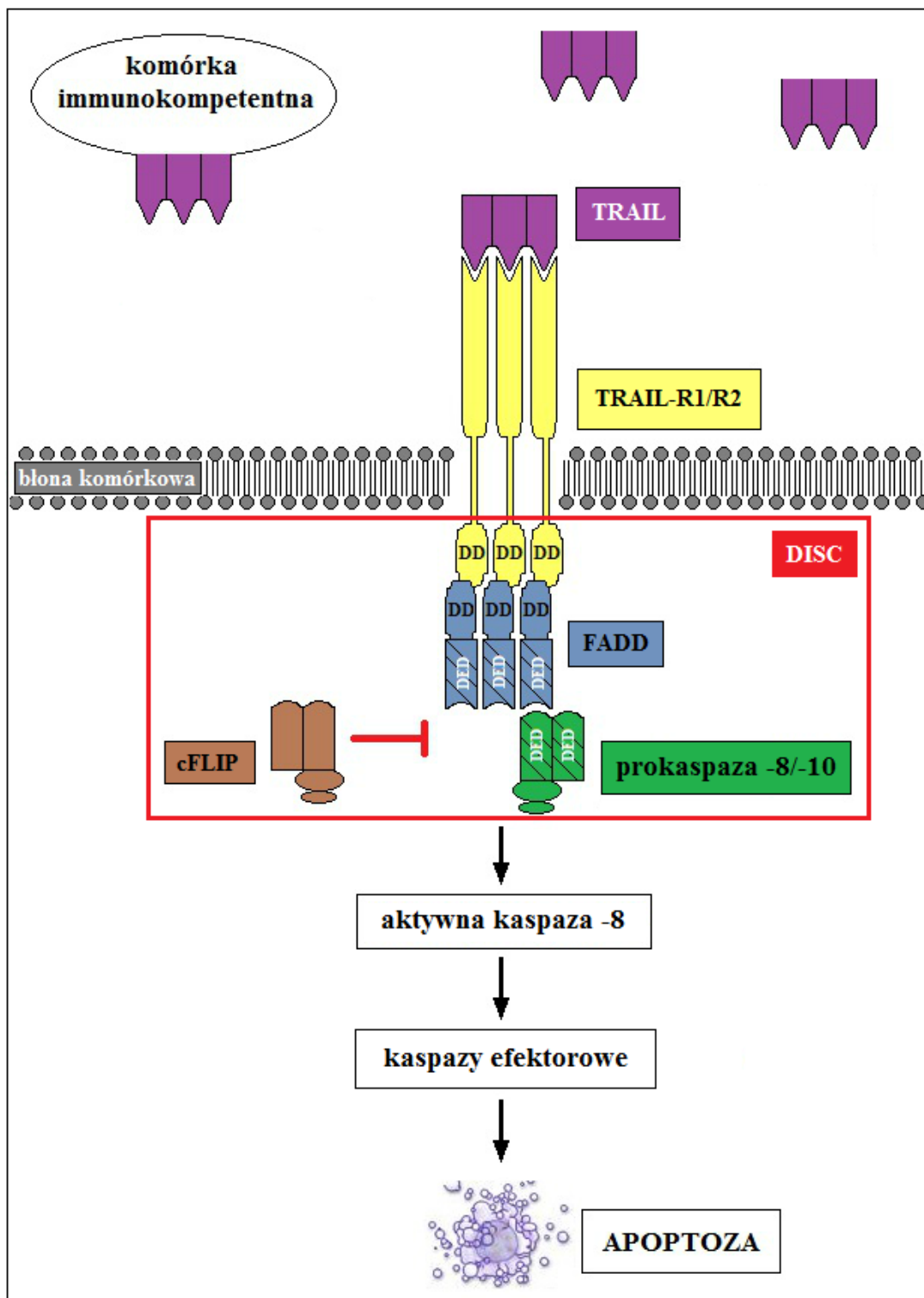
Dokładne mechanizmy molekularne selektywnej apoptozy indukowanej przez TRAIL nie są w pełni zrozumiałe. Na przykład badania *in vitro* i *in vivo* wskazują na zróżnicowaną i niejednorodną podatność komórek nowotworowych na apoptozę wzbudzaną przez ten czynnik. Przyjmuje się, że znaczny odsetek badanych typów komórek nowotworowych nie jest podatny na jego działanie [1,13,22]. Oporność komórek nowotworowych na działanie TRAIL może dotyczyć wielu punktów szlaku apoptozy. Wynika np. z mutacji genów DR, różnic w ich ekspresji powierzchniowej, liczby konkurujących z nimi receptorów „pułapkowych” i obecności wielu innych wewnątrzkomórkowych białek pro- i antyapoptotycznych [13,16,36].

Mimo to wskazuje się, że TRAIL może być obiecującym narzędziem terapii genowej w chorobach nowotworowych. Zastosowanie TRAIL w onkologii wpisuje się w zalecany, spersonalizowany sposób leczenia, oparty na profilu molekularnym choroby. Rozwój terapii genowej i genetyki przyczynia się do tworzenia nowych leków skierowanych przeciw konkretnym cząsteczkom powierzchniowym nowotworów. W grupie tej mieści się poszukiwanie nowych i doskonalenie już stosowanych technik genoterapii, wykorzystujących czynnik TRAIL. W jednym przypadku oceniono skuteczność odpowiedniej terapii w badaniu klinicznym. Większość prowadzonych badań ma na celu pokonanie oporności komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną przez TRAIL. Ponadto czynnik ten spróbowano niedawno użyć m.in. w leczeniu cukrzycy typu 1 i jej powikłań [6,19,41].

## TERAPIA GENOWA

Terapia genowa polega na wprowadzeniu materiału genetycznego do komórek ludzkich w celu uzyskania istotnego działania terapeutycznego (wyleczenia lub poprawy stanu chorego). W części przypadków materiał zawiera sekwencje kodujące (technika suplementacyjna), w innych – hamujące czynność niepożądanych genów (technika supresyjna) [51]. Przeważająca większość opisanych niżej badań zalicza się do pierwszej z nich (suplementacja transgenu TRAIL). Wyjątkiem były doświadczenia, w których w tym samym wektorze, oprócz transgenu TRAIL, zastosowano sekwencje kodujące małe interferujące cząsteczki RNA (siRNA, small interfering RNA) oraz RNA o strukturze spinki do włosów, stanowiące przykład techniki supresyjnej [25,73].

Istnieje wiele sposobów wprowadzania genów do komórek, czyli tzw. transfekcji (w przypadku wektorów wirusowych używa się też terminu transdukcji). Odbyna się najczęściej za pomocą odpowiednio skonstruowanych nośników, czyli wektorów. Są nimi: 1) zmodyfikowane wirusy, w tym retro-, lenti- i adenowirusy, wirusy ade-



**Ryc. 1.** Zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy indukowany TRAIL. Na schemacie przedstawiono homologiczny trimer TRAIL; przedstawiono obecny na powierzchni komórki układu immunologicznego oraz w postaci rozpuszczalnej (niezwiązanej z komórką). Po przyłączeniu liganda zachodzą zmiany konformacyjne zewnętrznych domen receptorów śmierci DR4 i DR5. Wewnątrzkomórkowa domena śmierci DD rozpoznaje homologiczny motyw domeny DD białka adaptorowego FADD. Następnie dochodzi do dimeryzacji wykonawczych domen śmierci DED cząsteczki FADD z prokaspazą-8 i powstaje zespół białek DISC (death-inducing signaling complex). W obrębie DISC zachodzi aktywacja kaspazy-8, która następnie uruchamia kaspazy efektorowe -3 i -7. cFLIP jest antagonistycznie działającym, nieaktywnym homologiem kaspazy-8, konkurującym z nią o wiązanie FADD (służy komórce do ewentualnego hamowania szlaku zewnątrzkomórkowego)



**Tabela 1.** Zalety i wady najczęściej stosowanych wektorów wirusowych w terapii genowej

| Wektory          | Zalety                                                                                                                                                                     | Wady                                                                                                                                                        |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adenowirusowe    | wysoki poziom ekspresji transgeny; wydajna transdukcja <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> komórek dzielących się i nie dzielących się                                         | brak integracji z genomem gospodarza i krótkotrwała ekspresja transgeny; silna immunogenność                                                                |
| Adenosatelitarne | wydajna transdukcja <i>in vivo</i> komórek dzielących się i nie dzielących się; integracja z genomem gospodarza i długotrwała ekspresja transgeny; niewielka immunogenność | niewielka pojemność; niska wydajność uzyskiwania wektora                                                                                                    |
| Retrowirusowe    | integracja z genomem gospodarza i długotrwała, stabilna ekspresja transgeny                                                                                                | głównie transdukcja <i>ex vivo</i> ; ograniczenie do infekowania komórek dzielących się (gamma-retrowirusy); ryzyko wystąpienia mutacji (losowa integracja) |
| Lentivirusowe    | aktywne przechodzenie do jądra komórkowego i transdukcja komórek nie dzielących się; duża wydajność transdukcji komórek macierzystych szpiku                               | niskie miano preparatów wirusa                                                                                                                              |

nosatelitarne i wirusy opryszczki; 2) plazmidy; 3) nośniki niewirusowe np. lipidy i liposomy kationowe [20]. Z wirusów są usuwane geny odpowiedzialne za ich wirulencję. Powstaje wolne miejsce, które można wykorzystać do heterologicznej rekombinacji sekwencji leczniczej. Jeśli koduje białko (jak to się odbywa w doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy), nazywa się transgenem (zwykle nie jest to pełna sekwencja genu, lecz cDNA) [18,51].

Genoterapię można stosować *in vivo* lub *ex vivo*. Metoda *in vivo* polega na podaniu terapeutycznego genu bezpośrednio do organizmu chorego. Na ogół wykorzystuje się właśnie wektory wirusowe, niekiedy liposomy kationowe. W metodzie *ex vivo* komórki pobiera się z organizmu chorego, hoduje je *in vitro*, wprowadza swoiste sekwencje, a po selekcji transfekowanych komórek ponownie podaje choremu [8,20,51].

Istota prawidłowo zaplanowanej terapii genowej sprowadza się więc do: 1) zaprojektowania sekwencji terapeutycznej (np. transgeny), 2) wybrania optymalnego wektora, 3) opracowania najlepszej techniki transfekcji oraz 4) trafnego doboru komórek docelowych.

W onkologicznej terapii genowej stosuje się m.in. genetyczną modyfikację komórek raka przez wyciszenie ekspresji zmutowanego, nadaktywnego onkogenu (wspomniana wyżej technika supresyjna), prowadzenie prawidłowej kopii brakującego lub nieczynnego genu (zwykle supresora onkogenezy), a także dodatkowych kopii genów kodujących „lecznicze” białka (np. cytokiny aktywujące miejscowo układ immunologiczny). Coraz częściej wykorzystuje się terapię antyangiogenną, genetyczną immunoterapię oraz wzbudzenie zaprogramowanej śmierci komórek nowotworowych – jest to tzw. terapia proapoptotyczna [11,53]. Właśnie cząsteczka TRAIL jest narzędziem terapii proapoptotycznej, gdyż pozwala na wybiórczą indukcję apoptozy w komórkach nowotworu

bez cytotoksycznego działania na tkanki prawidłowe. Jest to możliwe dzięki temu, że syntetyzowany przez komórkę nowotworową TRAIL może się przyłączyć do receptora śmierci tej samej komórki i wywołać jej apoptozę, niejako w mechanizmie autokrynnym [12,40,62].

Genoterapia może stanowić zarówno alternatywę jak i uzupełnienie standardowego leczenia onkologicznego – w tym drugim przypadku zwiększa jego skuteczność. Skuteczność chemioterapii jest ograniczona lekoopornością nowotworów [21,40,65]. Z tych względów terapia i immunoterapia genowa są atrakcyjną alternatywą w onkologii.

W pracy przedstawiono najważniejsze przykłady zastosowania cząsteczki TRAIL w wybranych chorobach. Podsumowuje dotychczasowe dokonania i perspektywy stosowania TRAIL w genoterapii.

### TRAIL W DOŚWIADCZALNEJ TERAPII GENOWEJ

W wielu pracach doświadczalnych z zastosowaniem TRAIL wskazano na jego skuteczność w hamowaniu wzrostu i potencjału inwazyjnego nowotworu przy jednoczesnym braku istotnych działań niepożądanych [17,23,35,42,61,70]. Jako nośniki dla TRAIL w terapii genowej stosuje się m.in. (opisywane niżej) adenowirusy, retrowirusy, lentivirusy, a także komórki macierzyste [4] i elektroporację [33]. Skoncentrowano się na opisie badań wykorzystujących transfer wirusowy. Technika ta jest szczególnie obiecująca, gdyż wirusy, niezdolne do replikacji pozakomórkowej, niejako „profesjonalnie” infekują komórki gospodarza. Z powodzeniem zostały więc wykorzystane w charakterze nośników do przenoszenia genów [56,71]. Każdy z wspomnianych w pracy wektorów wirusowych ma zalety i wady, w zależności od typu komórek docelowych i zdolności do wydajnej, stałej lub czasowej ekspresji transgeny [8] (tab.1).

## Wektory adenowirusowe (AdV adenoviral vector)

Spośród wektorów wirusowych kodujących TRAIL, najczęściej wykorzystuje się adenowirusy (Ad adenovirus). Charakteryzują się dużą wydajnością transdukcji *in vivo* oraz *ex vivo* zarówno komórek dzielących się, jak i nie dzielących się. Mogą być używane do transdukcji wielu typów tkanek. Często stosuje się je w próbach terapii przeciwnowotworowej, gdyż umożliwiają uzyskanie preparatów o wysokiej ekspresji transgenu (ma to znaczenie np. w technice tzw. szczepionek DNA). Jest to jednak zjawisko krótkotrwałe, ponieważ wirusy te nie integrują się z genomem gospodarza i komórki szybko się ich pozbywają. Dotąd zidentyfikowano 51 serotypów adenowirusów. Najdokładniej opisano Ad2 oraz Ad5 i to one są wykorzystywane najczęściej do konstrukcji AdV [8,47].

Pierwszy raz użyto wektor adenowirusowy do indukcji apoptozy komórek nowotworowych przez TRAIL w 2000 r. Griffith i wsp. zastosowali wektor Ad5 zawierający jako transgen cDNA dla TRAIL (Ad5-TRAIL) pod kontrolą promotora ludzkiego cytomegalowirusa (pCMV). Alternatywnie posłużono się rekombinowanym, rozpuszczalnym białkiem TRAIL. Transdukcji poddano ludzkie linie komórkowe: raka gruczołu krokowego (PC-3), czerniaka (WM 164, WM 793), raka gruczołowego sutka (MDA 231), raka pęcherza (RT-4) i linię prawidłowych komórek nabłonka stercza (PrEC). Dowiedziono, że apoptozie w znaczącym odsetku uległy komórki większości linii nowotworowych, z wyjątkiem linii czerniaka WM 164, która okazała się oporna na apoptozę indukowaną przez TRAIL. Co ważne, apoptoza nie wystąpiła w nienowotworowej linii PrEC. Wyniki wykazały, że wprowadzenie wektora adenowirusowego kodującego transgen TRAIL do komórek nowotworowych wrażliwych na apoptozę mediowaną przez ten czynnik, nasila jego syntezę i powoduje śmierć komórek [9].

Doniesienia te stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań z użyciem AdV kodujących TRAIL jako narzędzia genoterapii nowotworów *in vivo*. Griffith i Broghammer potwierdzili w 2001 r. skuteczność nośnika Ad5-TRAIL jako inhibitora wzrostu komórek raka gruczołu krokowego. Mysiom CB.17 (z wrodzonym defektem odporności, SCID, severe combined immunodeficiency) wszczepiono podskórną ludzkiego raka stercza ALVA 31 i raka pęcherza RT-4. Następnie bezpośrednio w miejsce implantu wstrzykiwano wektor Ad5-TRAIL. Dochodziło do zahamowania wzrostu obu typów raka; badania histopatologiczne tkanki nowotworowej wykonane po 24 godzinach wykazały rozległe obszary apoptozy. U jednego z siedmiu zwierząt wystąpiła całkowita regresja choroby. Wykazano, że wektor Ad5-TRAIL może działać dwutorowo: bezpośrednio zakażać komórki guza powodując ich apoptozę oraz transdukować odporne na TRAIL prawidłowe komórki nabłonka stercza, które następnie zabijają sąsiednie, wrażliwe komórki raka. Obserwacja wydaje się szczególnie ważna, gdyż do tego czasu skuteczność genoterapii z użyciem pojedynczego transgenu w podobnych modelach doświadczalnych ograniczała się wyłącznie do transdukowanych komórek nowotworowych. Po jednorazowym podaniu wektora ob-

serwowano względnie długotrwałą (do 7 dni) i wysoką ekspresję TRAIL [10].

Działanie wektorów Ad-TRAIL oceniono w innych modelach nowotworów złośliwych [2,14,15]. VanOosten i wsp. w 2007 r. zauważyli, że zastosowanie terapii Ad-TRAIL z jednoczesnym podaniem oligonukleotydów CpG sprzyja regresji nowotworu i wydłuża życie myszy z rakiem nerki. Użycie nukleotydów CpG prowadziło do generacji pamięci immunologicznej, znamiennie ograniczając częstość wznowy raka u zwierząt doświadczalnych [55].

Kim i wsp. badali *in vitro* różnice w skuteczności przeciwnowotworowego działania wektora adenowirusowego Ad-pSurvivin-TSTA-TRAIL-FL w zależności od warunków doświadczenia. Wekimtor ekspresyjny TRAIL i gen reporterowy lucyferazy FL (firefly luciferase), zawierający promotor genu surwiwiny oraz TSTA (dwukierunkowy system zwiększający aktywność transkrypcyjną promotora) użyto do eliminacji komórek raka wątroby szczura linii MCA-RH7777. Zwierzętom z wszczepionym rakiem podawano wektor dożylnie lub wprost do guza. Ta druga technika okazała się skuteczniejsza [24].

W 2013 r. Yuan i wsp. użyli wektor adenowirusowy kodujący rozpuszczalną trimeryczną postać TRAIL (stTRAIL, soluble trimeric TRAIL). Transgen znajdował się pod kontrolą promotora genu CD20, markera nieziarniczego chłoniaka z komórek B (B-NHL). W praktyce klinicznej stosuje się rituksymab, humanizowane przeciwciało anti-CD20, jednak wielu chorych z B-NHL wykazuje oporność na lek. W badaniu z rekombinowanym adenowirusem AdP20-stTRAIL wykazano, że stTRAIL wydzielany przez transdukowane komórki linii BJAB (limfoblasty B) hamuje ich wzrost *in vitro* oraz *in vivo*. Terapia genowa z użyciem Ad-stTRAIL może się więc okazać nową skuteczną strategią w B-NHL, a także innych nowotworach [72].

Natomiast Wang i wsp. w 2012 r. podjęli próbę wzmocnienia działania proapoptotycznego transgenu TRAIL, dołączając do insertu wektora adenowirusowego ZD55 dodatkową sekwencję kodującą linker IETD (aminokwasy: Ile-Glu-Thr-Asp), za którą umieścili cDNA genu SMAC (second mitochondrial activator of caspase), ważnego mediatora apoptozy w szlaku mitochondrialnym. Tak rekombinowanym wektorem (ZD55-TRAIL-IETD-Smac) transdukowano komórki ludzkich linii raka: wątroby (Huh-7, PLC, Bel-7404), płuca (NCI-H460), szyjki macicy (HeLa), jelita grubego (SW620), sutka (Bcap37), a także prawidłowe komórki wątroby (IQSG-7701) i prawidłowe ludzkie płucne komórki zarodkowe (WI-38). Tylko linie nowotworowe uległy masywnej apoptozie. U myszy szczepu Balb/c z wszczepionym podskórną rakiem wątroby stwierdzono całkowitą regresję choroby po około 2,5 miesięcznej obserwacji od wstrzyknięcia wektora do tkanki guza. Należy podkreślić, że insert wektora ZD55 można modyfikować łącząc za pomocą opisanej wstawki (IETD) sekwencję TRAIL z innymi genami, jak cDNA dla interleukiny-24, która indukuje ekspresję kaspazy-8, nasilając tym samym apoptozę komórek docelowych [57].



Inny kierunek badań zakłada łączenie konwencjonalnej chemioterapii z terapią genową bazującą na transdukcji wektorów kodujących TRAIL. Mao i wsp. podjęli w 2014 r. próbę skojarzonej terapii wektorem adenowirusowym ZD55-TRAIL i gemcytabiną w linii raka pęcherza moczowego (T24). W badaniach *in vitro* i eksperymentach *in vivo* u myszy wykazano dużą wydajność transdukcji, czego dowodem była nadekspresja TRAIL na powierzchni komórek T24. Najwyższy odsetek komórek apoptotycznych wykazano w ramieniu doświadczenia, w którym łączono genoterapię z gemcytabiną [32].

Wychodząc z podobnych założeń, Xu z wsp. połączyli terapię wektorem adenowirusowym kodującym TRAIL z 1) przeciwciałem monoklonalnym cetuksymabem lub 2) z drobnocząsteczkowymi inhibitorami kinazy receptorowej EGFR (epidermal growth factor receptor): gefitynibem lub erlotynibem. Posłużyli się liniami niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, non-small cell lung cancer): H460, A549 SW1573. W porównaniu do monoterapii, jednoczesne podanie wektora oraz inhibitorów EGFR silniej hamowało proliferację komórek raka i zwiększało częstość ich apoptozy. Wykazano wzrost stężenia proapoptotycznego białka BAX i jednoczesny spadek aktywności onkogeny, kinazy białkowej B (PKB/Akt) *in vitro*. Natomiast w warunkach *in vivo* genoterapia skojarzona z podaniem cetuksymabu hamowała wzrost guza bez działań niepożądanych u myszy doświadczalnych. Badaniem histopatologicznym, barwieniem techniką TUNEL i aneksyną V wykazano maszyną apoptozę utkania nowotworowego [67].

W 2012 r. Zhang i wsp. w doświadczeniu z modelowymi liniami ustalonymi komórek NSCLC zastosowali wektor adenowirusowy Ad5-TRAIL-siBcl2, umożliwiającą koekspresję TRAIL oraz siRNA docelowo hamujących ekspresję antyapoptotycznego genu Bcl-2. Transdukcja Ad5-TRAIL-siBcl2 powodowała wzmożoną apoptozę komórek raka, jednak nie wpływała na prawidłowe komórki płuc (linii WI-38). Następnie wykazano *in vivo* w modelu myszy SCID, że Ad5-TRAIL-siBcl2 powodował regresję nowotworu znacznie wyższą od innych wektorów (kodujących pojedynczy gen leczniczy). Nasilone działanie przeciwnowotworowe było więc wywołane jednoczesną inhibicją Bcl-2 i wysoką ekspresją TRAIL [73].

Ponieważ nie wszystkie komórki nowotworowe są wrażliwe na apoptozę indukowaną przez TRAIL, zmodyfikowano dotychczasowe strategie. Wektory adenowirusowe wnikają do komórek docelowych za pośrednictwem pierwszorzędowych receptorów CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor) i drugorzędowych receptorów integrynowych, a poziom ekspresji obu typów receptorów decyduje o efektywności transdukcji. Komórki, które nie mają białek powierzchniowych CAR (lub ich ekspresja jest niska), trudno ulegają transfekcji przez AdV [48]. Jacob i wsp. zmodyfikowali więc wektor inkorporując motyw RGD (Arg-Gly-Asp) wiążący integryny. Do transdukcji wykorzystano wektor adenowirusowy Ad-TRAIL-F-RGD kodujący TRAIL pod kontrolą promotora genu ludzkiej telomerazy (hTERT), zwykle silnie aktywnej w komórkach nowotwo-

rowych. Działanie proapoptotyczne wektora zbadano w 5 liniach komórkowych ludzkiego raka jelita grubego: DLD1, LOVO, SW620, CRM, L174T, które cechował brak znaczącej powierzchniowej ekspresji CAR. Zastosowanie zmodyfikowanego AdV wywołało zahamowanie proliferacji komórek i wzrost odsetka komórek apoptotycznych [15].

Wektory adenowirusowe, ze względu na silny swoisty neurotropizm, znalazły także zastosowanie w nowotworach mózgu. Wohlfahrt i wsp. wykorzystali wektor Ad5-Ad35.IR-E1A-TRAIL w przedklinicznych próbach terapii glejaka wielopostaciowego (GBM łac. *glioblastoma multiforme*). Użyli linii komórkowych U87, SF767 i T98G oraz myszy SCID, którym wszczepiono glejaka. Wektor zmodyfikowano przez inkorporację białka włókna wirusa Ad35 do kapsydu Ad5, co umożliwiło preferencyjne łączenie się nośnika z receptorami CD46 (ludzkie błonowe białko regulacyjne będące receptorem dla adenowirusa serotypu 35), występującymi licznie m.in. na powierzchni komórek glejaka, w przeciwieństwie do receptora CAR (którego ekspresja na komórkach GBM jest niewielka). Genom wektora kodował sekwencje: odwróconych powtórzeń – IR (inverted repeats), pretranskrypcyjne białko E1A oraz TRAIL. Umożliwiło to nowotworowością i wydajną replikację DNA wirusa oraz wzmocniło proapoptotyczne działanie TRAIL. Wykazano *in vitro*, że wektor skutecznie transdukuje komórki GBM, a częstość apoptozy powodowana przez TRAIL była istotnie wyższa niż po użyciu wektorów kontrolnych, w tym niezawierających transgeny TRAIL. W doświadczeniach *in vivo* uzyskano znamienne zahamowanie wzrostu guza po iniekcji Ad5-Ad35.IR-E1A-TRAIL [63]. Terapie z wykorzystaniem wektorów adenowirusowych kodujących TRAIL są skuteczne nie tylko w chorobach nowotworowych. Yao i wsp. zbadali wpływ Ad-TRAIL na rozrost błony maziowej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). W króliczym modelu tej choroby wykazali, że transfer Ad-TRAIL bezpośrednio do stawu indukował apoptozę komórek maziówki (synowioocyty), hamował nacieki leukocytozy i stymulował syntezę białek chrząstki stawowej [68]. Podobne badanie przeprowadził zespół Terzioglu w liniach pierwotnych komórek błony maziowej stawu pobranych od ośmiu chorych z RZS. Wykazano, że hodowane *in vitro* synowioocyty miały wysoki poziom ekspresji receptora pułapkowego DcR2, który korelował z opornością na apoptozę indukowaną TRAIL. Badacze transfekowali odporne komórki maziówki wektorem Ad5-hTRAIL i dodatkowo wprowadzili do nich siRNA anty-DcR2. Indukowano apoptozę synowioocytów [54]. Wyniki wykazują, że terapia genowa może stanowić atrakcyjny, bo nieinwazyjny mechanizm ograniczenia rozrostu błony maziowej stawów, hamując ich niszczenie w RZS, a nawet wykazując potencjał regeneracyjny.

Dirice i wsp. wypróbowali TRAIL jako wspomagającą terapię w cukrzycy typu 1, ułatwiający przeżycie allogenicznego przeszczepu tkanki prawidłowych wysepek Langerhansa. W szczurzym modelu wykazali, że nadekspresja TRAIL w komórkach przeszczepu przedłuża jego przeżycie. Potwierdzili to transdukcją wektorem Ad5-TRAIL szczurze allogeniczne wysepki trzustkowe i następnie

wszczepiając je pod torebkę nerki chorych zwierząt. Czynność transplantu monitorowano, oznaczając masę ciała i stężenie glukozy we krwi. Szczury z transdukowanym przeszczepem utrzymywały stałą normoglikemię i optymalną masę ciała w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (z przeszczepem wysepek nietransfekowanych). Zdarzające się po przeszczepie ostre zapalenie trzustki było mniej nasilone u zwierząt z przeszczepem transfekowanych wysepek [6].

Potencjalną rolę TRAIL w rozwoju cukrzycy typu 1 badali także Kang i wsp. Myszom NOD (non-obese diabetic) dożylnie aplikowano wektor adenowirusowy kodujący ludzki gen TRAIL (Ad-hTRAIL), a następnie jeden raz w tygodniu monitorowano stężenie glukozy we krwi. Skuteczność terapii sprawdzano przez oznaczanie stężenia metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej – MMP (enzymów zaangażowanych w patogenezę cukrzycy) oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1 (TIMP-1). Wykazano, że myszy po iniekcji Ad-hTRAIL miały znacznie niższe od wyjściowego stężenie glukozy we krwi i znacząco zwiększone stężenie TIMP-1 w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy wyjaśnili to w sposób następujący: nadekspresja TRAIL indukuje sekrecję TIMP-1, hamując tym samym aktywność metaloproteinaz i chroniąc komórki  $\beta$  trzustki przed apoptozą. TRAIL i TIMP-1 mogą zatem stanowić potencjalne narzędzia w próbach zapobiegania cukrzycy typu 1 [19].

Wektory adenowirusowe stanowią zaledwie jeden z wielu sposobów wprowadzania transgenów do komórek. Jednak zalety tego typu nośników sprawiają, że w wielu przypadkach pozostają metodą z wyboru [48].

### Wektory wirusów adenosatelitarnych

W próbach terapii genowej z użyciem TRAIL z powodzeniem wykorzystywane są także należące do rodziny *Parvoviridae* wirusy adenosatelitarne (AAV, adeno-associated viruses). Wykazują niewielką immunogenność, zakażają zarówno komórki dzielące się, jak i nie dzielące się oraz zapewniają długotrwałą ekspresję transgenów. AAV dzięki obecności genu *rep*, integrują się miejscowo swoiście z ludzkim chromosomem 19, ale mogą też występować pozachromosomowo. Ze względu na mały rozmiar nie mogą przyjąć transgenów większego niż 5 kpz. Najlepiej poznanym czynnikiem pozwalającym na replikację AAV jest koinfekcja komórki adenowirusem – stąd inna nazwa „wirusy towarzyszące adenowirusom” [18,39,44].

Zalety wektorów AAV sprawiły, że znalazły zastosowanie jako nośniki TRAIL w terapiach przeciwnowotworowych. W badaniach na liniach ustalonych raka jelita grubego, wektory AAV kodujące TRAIL powodowały masową apoptozę komórek aż do całkowitej eradykacji linii [35]. Wyniki zaobserwowano *in vivo*, stosując wektor AAV kodujący rozpuszczalną postać TRAIL w mysim modelu raka płuca [70]. W celu rozszerzenia tropizmu i zdolności wiązania do różnych typów receptorów komórkowych zaczęto konstruować AAV mozaikowe [66]. Shi i wsp. zastosowali wektor AAV2/5 kodujący TRAIL, który ze względu

na mozaikową budowę wykazywał zwiększony tropizm do komórek linii A549, niedrobnokomórkowego raka płuca. Wyniki badania histopatologicznego i doświadczenia z hodowlą komórkową wskazały, że transdukcji ulegały jedynie komórki nowotworowe; nie obserwowano wpływu na prawidłowe tkanki [43]. Oprócz projektowania postaci y7h mozaikowych z innymi wektorami AAV, można je swoiście skierować przeciw danemu typowi nowotworu przez odpowiednie modyfikacje, np. zmieniając promotor lub rekombinując sekwencje odpowiednich genów (podobnie jak w doświadczeniach z adenowirusami) [28,70]. Obiecujące wyniki uzyskano za pomocą wektora AAV, gdy transgen TRAIL poprzedzono konstytutywnie aktywnym w większości nowotworów promotorem telomerazy hTERT (konstrukt AAV-hTERT-TRAIL). Transdukowano komórki linii raka wątroby, okrężnicy i sutka *in vitro*, potwierdzając cytotoksyczność tylko wobec komórek nowotworowych [60]. Podobne obserwacje poczyniono *in vivo* w modelu raka wątroby, uzyskując regresję choroby [58,59]. Ma i wsp. uzyskali nadekspresję TRAIL, swoistą dla komórek raka wątroby, przez fuzję transgenów TRAIL z ludzkim peptydem sygnałowym insuliny. Powstał wektor o nazwie AAV-ISON-T, który podawano doustnie myszom z wszczepionym podskórnie ludzkim rakiem wątroby linii SMMC-7721. Uzyskano regresję nowotworu, czemu towarzyszyła długotrwała ekspresja rozpuszczalnej postaci TRAIL w wątrobie [30].

Wektory AAV zastosowano także w chorobach nienowotworowych. Secchiero i wsp. zbadali działanie AAV-TRAIL na myszach pozbawionych apolipoproteiny E (apoE-knockout) z cukrzycą wywołaną doświadczalnie przez podanie streptozotocyny. Powikłaniem choroby było zwiększenie powierzchni blaszek miażdżycowych aorty, proliferacja komórek w jej ścianie, nacieki makrofagów i ogniskowa utrata śródbłonna. Zastosowanie powtarzanych dootrzewnowo lub pojedynczych dożylnych iniekcji wektora AAV kodującego zrekombinowany ludzki TRAIL istotnie zmniejszyło rozwój blaszek miażdżycowych i hamowało nacieki zapalne ściany aorty, gdyż wzbudzało miejscowo apoptozę makrofagów. Ponadto wykazano, że TRAIL promuje migrację komórek śródbłonna aorty, ale nie monocytów i makrofagów. Z opisanego badania wynika, że systemowe podawanie AAV-TRAIL może być nowatorską metodą leczenia makroangiopatii cukrzycowej [41].

### Inne wektory kodujące transgen TRAIL: retrowirusowe i lentiwirusowe

Retrowirusy (wirusy RNA) cechują się zdolnością do wbudowywania genów terapeutycznych w swoiste miejsca genomu komórki gospodarza. Dzięki temu ekspresja transgenów jest długotrwała. Integracja z genomem wiąże się jednak z ryzykiem wystąpienia mutacji, a następnie transformacji nowotworowej. Ponadto typowe retrowirusy (tzw. gamma-retrowirusy) infekują jedynie komórki dzielące się, co ogranicza zakres ich stosowania [8,69].

Suzuki i wsp. wykorzystali wektor retrowirusowy kodujący TRAIL do doświadczalnej transdukcji komórek szpicza-





ka linii RPMI-8226, wrażliwych na apoptozę indukowaną przez TRAIL, a także komórek mięsaka kości linii MG-63, opornych na działanie tego białka. W celu zniszczenia obu typów nowotworów, terapię genową poprzedzono chemioterapią (doksorubicyną z cisplatyną), zakładając, że cytostatyki dodatkowo uwrażliwią komórki na śmierć indukowaną ekspresją TRAIL. Skojarzona terapia okazała się skuteczna. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu z linią komórkową MG-63, charakteryzującą się opornością wielolekową i nadekspresją silnie antyapoptotycznego białka Bcl-XL [50]. Li i wsp. również zastosowali kodujący TRAIL wektor retrowirusowy do indukcji apoptozy w komórkach linii raka jajnika A2780. Zaobserwowano silny synergizm genoterapii z działaniem cisplatyny – zarówno *in vitro*, jak i w doświadczeniu, w którym komórki A2780 wszczepiono myszom Balb/c [29]. Prezentowane rozwiązanie może stanowić skuteczne narzędzie u chorych onkologicznych z chemoopornością.

W terapii stosuje się również lentiwirusy (przede wszystkim te oparte na wirusie HIV1), które stanowią *de facto* podrodzinę retrowirusów, wyróżniającą się aktywnym przechodzeniem do jądra komórkowego przez pory kariolemy. Tym samym wirusy te mogą transdukować komórki niedzielące się. Wśród innych zalet, wykazują się dużą wydajnością transdukcji komórek macierzystych szpiku. Ograniczenia związane z ich stosowaniem polegają głównie na ryzyku mutagenyzy oraz trudnościach z kontrolą jakości [7,8].

Kock i wsp. wykorzystali zmodyfikowane wektory lentiwirusowe (LV) kodujące: 1) rozpuszczalną postać TRAIL oraz 2) shRNA (krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (short hairpin RNA), przekształcane w cytoplazmie we wspomniane cząsteczki siRNA). shRNA było skierowane przeciw Bcl-2 w komórkach linii glejaka *in vitro* oraz *in vivo*. Jednoczesne podanie obu wektorów okazało się skuteczniejsze (także w sensie wydajności transfekcji) w porównaniu z monoterapią LV-sTRAIL. Synergiczne działanie wywołało wzmożoną apoptozę komórek nowotworu. Tak więc jednoczesna aktywacja szlaku apoptozy zależnego od TRAIL wraz z wyciszeniem ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2, zwiększa skuteczność leczenia glejaków. Może być też użyteczna w opracowywaniu nowych terapii eksperymentalnych nowotworów opornych na cytostatyki [25].

Wenger i wsp. zastosowali wektor lentiwirusowy kodujący TRAIL (LV-TRAIL) do indukcji apoptozy komórek linii ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca P693. Wyniki badań *in vitro* hodowli komórkowej potwierdziły wydajność transdukcji. Nie powiódł się natomiast eksperyment *in vivo* – nie wykazano wzmożonej apoptozy w wycinkach nowotworu wszczepionego podskórnie myszom doświadczalnym. Możliwe więc, że wektory LV kodujące TRAIL bardziej nadają się do zastosowania *ex vivo*, tj. transdukcji prawidłowych komórek towarzyszących nowotworom, takim jak komórki macierzyste, zrębu guza oraz śródbłonna – w celu indukcji parakrynej apoptozy w sąsiadujących komórkach nowotworowych, a mniej do

bezpośredniej transdukcji samych komórek nowotworowych *in vivo* [61].

### TERAPEUTYCZNE PRÓBY KLINICZNE Z WYKORZYSTANIEM TRAIL PROWADZONE W OPARCIU O DOKOMÓRKOWY TRANSFER GENÓW

Dotąd w amerykańskim rejestrze Narodowego Instytutu Zdrowia USA (U.S. National Institute of Health) figuruje wiele doniesień o badaniach klinicznych powiązanych w sposób bezpośredni lub pośredni z użyciem TRAIL [5]. Jednak tylko jedno badanie kliniczne dotyczy prób wykorzystania technik terapii genowej [13].

Wcześniej przedstawione szczególne walory rekombinowanych wektorów adenowirusowych sprawiły, że tylko one, spośród przywołanych w niniejszym opracowaniu rozwiązań, osiągnęły status narzędzia testowanego w badaniach klinicznych [9,10].

W badaniu klinicznym I fazy, zaprojektowanym przez Holocha i Griffitha, wykorzystano wektor Ad5 kodujący TRAIL. Dwunastu chorym z rakiem gruczołu krokowego, podzielonym na 4 grupy, podawano wektor adenowirusowy zmieszany z preparatem Gelfoam (Ad5-TRAIL/Gelfoam) bezpośrednio do płatów stercza. Protokół badania zakładał wstrzykiwanie rosnących dawek wektora ( $4,2 \times 10^9$ - $1,3 \times 10^{11}$  kopii) z zachowaniem 4-tygodniowych przerw między kolejnymi iniekcjami. Zastosowanie Gelfoamu – roztworu macierzy kolagenowej w stężeniu 30 mg/ml, umożliwiło właściwą dystrybucję wektora w tkance docelowej i późniejsze zlokalizowanie kompleksu Ad5-TRAIL/Gelfoam w badaniach radiologicznych. Założeniem badania – typowo dla I fazy – było monitorowanie ewentualnych działań niepożądanych, ustalenie maksymalnej bezpiecznej dawki wektora i potwierdzenie, że Ad5-TRAIL/Gelfoam podany wprost do gruczołu wywoła: 1) bezpośrednią transfekcję komórek raka i w konsekwencji ich apoptozę oraz 2) transfekcję prawidłowych komórek stercza, które wzbudzą apoptozę sąsiednich komórek raka. W wycinkach pobranych od chorych leczonych tą techniką obserwowano obecność komórek zapalnych i pozytywny odczyn reakcji TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), świadczący o fragmentacji DNA, typowej dla zaprogramowanej śmierci komórkowej [13]. Potwierdzono bezpieczeństwo badania, a także wstępnie potwierdzono skuteczność proponowanej metody. Konieczne są jednak dalsze prace nad jej optymalizacją.

### PODSUMOWANIE

Ostatnie dekady to czas dynamicznego rozwoju medycyny, przejawiający się opracowaniem wielu nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych. W nurt ten wpisała się genoterapia, postrzegana wciąż raczej jako dziedzina medycyny eksperymentalnej, a nie konwencjonalne postępowanie terapeutyczne, jednak przeprowadzone dotąd doświadczenia przedkliniczne i badania kliniczne wydają się potwierdzać pogląd o jej perspektywach, jako przyszłej skutecznej alternatywie leczniczej. Dotyczy to szczególnie chorych, u których metody konwencjonalne zawodzą.

Trafnym przykładem może być chemioterapia niektórych typów lekoopornych nowotworów i brak selektywności tego sposobu leczenia. Trwa poszukiwanie nowych, skutecznych i bardziej selektywnych (mniej toksycznych) strategii leczniczych. Terapia genowa z wykorzystaniem TRAIL wydaje się spełniać, przynajmniej w części przypadków, obie te przesłanki.

Jak przedstawiono wyżej, transfer genu TRAIL za pomocą wektorów wirusowych pozwala nie tylko na uzyskanie zadowalających wyników leczniczych, lecz także umożliwia zawężenie postępowania terapeutycznego do frakcji komórek, które tego wymagają. Wektory retro- oraz lentiwirusowe, choć przynosiły w badaniach *in vitro* zadowalające rezultaty, są rzadko stosowane. Ich zaleta, polegająca na długotrwałej ekspresji transgenu, nie jest wystarczająca, wobec niebezpieczeństwa onkogenezy. Same retrowirusy nie są zdolne do transdukcji komórek dzielących się. Złotym środkiem wydają się wektory AAV. Możliwość ich zastosowań znacznie zawęża wielkość kodowanego transgenu.

Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że ze względu na szeroki zakres komórek docelowych, wysoki poziom transdukcji i wydajną ekspresję transgenu, szczególną użyteczność

w terapii genowej z wykorzystaniem TRAIL wykazały wektory adenowirusowe. Charakterystyczne, że jedyne jak dotąd badanie kliniczne z użyciem genu kodującego TRAIL przeprowadzono właśnie z ich udziałem.

Użycie wektorów z transgenem TRAIL wydaje się obiecującym narzędziem terapii chorób nowotworowych, a także reumatoidalnego zapalenia stawów i cukrzycy (wraz z jej powikłaniami). Prawdopodobnie zakres chorób leczonych tą techniką niebawem się poszerzy. Wciąż istnieją jednak nierozwiązane problemy, stanowiące istotne wyzwanie na przyszłość. Dotyczy to także terapii z wykorzystaniem wektorów adenowirusowych i TRAIL: duża immunogenność AdV, relatywnie krótkotrwała ekspresja transgenu i problem dobrania tkankowoswoistego, a zarazem wydajnego promotora.

Terapia genowa, niezależnie od problemów jakie napotyka, to dziedzina innowacyjna, podążająca wieloma ścieżkami rozwoju. Mnogość perspektyw i pomysłów daje nadzieję na opracowanie skuteczniejszych i bezpieczniejszych od dotychczas stosowanych, metod leczenia chorób, w tym takich, które uważane są dotąd za nieuleczalne.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Almasan A., Ashkenazi A.: Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003; 14: 337-348
- [2] Armeanu S., Lauer U.M., Smirnow I., Schenk M., Weiss T.S., Gregor M., Bitzer M.: Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2369-2372
- [3] Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung S., Lawrence D.A., Marsters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J. i wsp.: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 155-162
- [4] Attar R., Sajjad F., Qureshi M.Z., Tahir F., Hussain E., Fayyaz S., Farooqi A.A.: TRAIL based therapy: overview of mesenchymal stem cell based delivery and miRNA controlled expression of TRAIL. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 6495-6497
- [5] ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=%22trail%22&Search=Search> (28.10.2014)
- [6] Dirice E., Sanlioglu A.D., Kahraman S., Ozturk S., Balci M.K., Omer A., Griffith T.S., Sanlioglu S.: Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad-5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum. Gene Ther.*, 2009; 20: 1177-1189
- [7] Escors D., Breckpot K.: Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2010; 58: 107-119
- [8] Giacca M.: *Gene therapy*, Springer-Verlag Milan 2010
- [9] Griffith T.S., Anderson R.D., Davidson B.L., Williams R.D., Ratliff T.L.: Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis. *J. Immunol.*, 2000; 165: 2886-2894
- [10] Griffith T.S., Broghammer E.L.: Suppression of tumor growth following intralesional therapy with TRAIL recombinant adenovirus. *Mol. Ther.*, 2001; 4: 257-266
- [11] Gromadzka A., Kubiczak M., Jankowska A.: Terapia genowa i jej zastosowanie w leczeniu nowotworów ginekologicznych. *Ginekol. Pol.*, 2010; 81: 50-54
- [12] Gura T.: How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science*, 1997; 277: 768
- [13] Holoch P.A., Griffith T.S.: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009; 625: 63-72
- [14] Huang X., Lin T., Gu J., Zhang L., Roth J.A., Stephens L.C., Yu Y., Liu J., Fang B.: Combined TRAIL and Bax gene therapy prolonged survival in mice with ovarian cancer xenograft. *Gene Ther.*, 2002; 9: 1379-1386
- [15] Jacob D., Bahra M., Schumacher G., Neuhaus P., Fang B.: Gene therapy in colon cancer cells with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene driven by the hTERT promoter. *Anticancer Res.*, 2004; 24: 3075-3079
- [16] Johnstone R.W., Frew A.J., Smyth M.J.: The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 782-798
- [17] Kagawa S., He C., Gu J., Koch P., Rha S.J., Roth J.A., Curley S.A., Stephens L.C., Fang B.: Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3330-3338
- [18] Kamieniarz K., Goździcka-Józefiak A.: Zastosowanie AAV jako wektorów w terapii genowej. *Biotechnologia*, 2005; 1: 79-94
- [19] Kang S., Park E.J., Joe Y., Seo E., Park M.K., Seo S.Y., Chung H.Y., Yoo Y.H., Kim D.K., Lee H.J.: Systemic delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) elevates levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology*, 2010; 151: 5638-5646



- [20] Karra D., Dahm R.: Transfection techniques for neuronal cells. *J. Neurosci.*, 2010; 30: 6171-6177
- [21] Keane M.M., Ettenberg S.A., Nau M.M., Russel E.K., Lipkowitz S.: Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.*, 1999; 59: 734-741
- [22] Kelley S.K., Harris L.A., Xie D., Deforge L., Totpal K., Bussiere J., Fox J.A.: Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of *in vivo* efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 299: 31-38
- [23] Kim K.U., Seo S.Y., Heo K.Y., Yoo Y.H., Kim H.J., Lee H.S., Choi S.S., Hwang T.H., Lee H.J.: Antitumor activity of TRAIL recombinant adenovirus in human malignant glioma cells. *J. Korean Med. Sci.*, 2005; 20: 1046-1052
- [24] Kim Y.I., Ahn B.C., Ronald J.A., Katzenberg R., Singh A., Paulmurugan R., Ray S., Gambhir S.S., Hofmann L.V.: Intratumoral versus intravenous gene therapy using a transcriptionally targeted viral vector in an orthotopic hepatocellular carcinoma rat model. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 2012; 23: 704-711
- [25] Kock N., Kasmieh R., Weissleder R., Shah K.: Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia*, 2007; 9: 435-442
- [26] Kopiński P., Chorostowska-Wynimko J., Dyczek A., Giżycka A.: Apoptoza limfocytów pęcherzykowych. Część 1 – szlaki apoptozy limfocytów. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2014; 82: 170-182
- [27] Kruyt F.A.: TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2008; 263: 14-25
- [28] Kwon I., Schaffer D.V.: Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. *Pharm. Res.*, 2008; 25: 489-499
- [29] Li F., Guo Y., Han L., Duan Y., Fang F., Niu S., Ba Q., Zhu H., Kong F., Lin C., Wen X.: *In vitro* and *in vivo* growth inhibition of drug-resistant ovarian carcinoma cells using a combination of cisplatin and a TRAIL-encoding retrovirus. *Oncol. Lett.*, 2012; 4: 1254-1258
- [30] Ma H., Liu Y., Liu S., Xu R., Zheng D.: Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice. *Hepatology*, 2005; 42: 1355-1363
- [31] Manzo F., Nebbioso A., Miceli M., Conte M., De Bellis F., Carafa V., Franci G., Tambaro F.P., Altucci L.: TNF-related apoptosis-inducing ligand: signalling of a 'smart' molecule. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 460-466
- [32] Mao L., Yang C., Li L., Nai L., Fan L., Wang J., Li W., Wen R., Chen J., Zheng J.: Replication-competent adenovirus expressing TRAIL synergistically potentiates the antitumor effect of gemcitabine in bladder cancer cells. *Tumour Biol.*, 2014; 35: 5937-5944
- [33] Matsubara H., Mizutani Y., Hongo F., Nakanishi H., Kimura Y., Ushijima S., Kawachi A., Tamura T., Sakata T., Miki T.: Gene therapy with TRAIL against renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 2165-2171
- [34] Mérino D., Lalaoui N., Morizot A., Solary E., Micheau O.: TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007; 11: 1299-1314
- [35] Mohr A., Henderson G., Dudus L., Herr I., Kuerschner T., Debatin K.M., Weiher H., Fisher K.J., Zwacka R.M.: AAV-encoded expression of TRAIL in experimental human colorectal cancer leads to tumor regression. *Gene Ther.*, 2004; 11: 534-543
- [36] Norris J.S., Hyer M.L., Voelkel-Johnson C., Lowe S.L., Rubinchik S., Dong J.Y.: The use of Fas Ligand, TRAIL and Bax in gene therapy of prostate cancer. *Curr. Gene Ther.*, 2001; 1: 123-136
- [37] Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S., Donahue C.J., Moore A., Ashkenazi A.: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 12687-12690
- [38] Przybylski G., Wielikdzier J., Kopiński P.: Mechanizmy zaprogramowanej śmierci efektorowych limfocytów T. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1374-1390
- [39] Rutkowski A., Jaźwa A., Józkwicz A., Dulak J.: Wektory AAV w terapii genowej. *Biotechnologia*, 2007; 3: 33-44
- [40] Rzońca S., Małecki M.: Proapoptyczna terapia genowa a wrażliwość nowotworów na chemioterapię. *Współcz. Onkol.*, 2009; 13: 61-65
- [41] Secchiero P., Candido R., Corallini F., Zacchigna S., Toffoli B., Rimondi E., Fabris B., Giacca M., Zauli G.: Systemic tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery shows antiatherosclerotic activity in apolipoprotein E-null diabetic mice. *Circulation*, 2006; 114: 1522-1530
- [42] Shah K., Tung C.H., Breakefield X.O., Weissleder R.: *In vivo* imaging of S-TRAIL-mediated tumor regression and apoptosis. *Mol. Ther.*, 2005; 11: 926-931
- [43] Shi J., Zheng D., Liu Y., Sham M.H., Tam P., Farzaneh F., Xu R.: Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1687-1692
- [44] Skubis-Zegadło J., Stachurska A., Małecki M.: Vectorology of adeno-associated viruses (AAV). *Dev. Period Med.*, 2013; 17: 202-206
- [45] Stańczyk M., Majsterek I.: Apoptoza - cel ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej. *Postępy Biol. Kom.*, 2008; 35: 467-484
- [46] Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 420-428
- [47] Stopa M., Dulak J., Józkwicz A.: Najważniejsze cechy wektorów adenowirusowych. *Biotechnologia*, 2007; 3: 22-32
- [48] Stopa M., Dulak J., Józkwicz A.: Optymalizacja warunków transdukcji wybranych linii komórkowych przy użyciu wektorów adenowirusowych pierwszej generacji. *Biotechnologia*, 2007; 3: 123-140
- [49] Suliman A., Lam A., Datta R., Srivastava R.K.: Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 2001; 20: 2122-2133
- [50] Suzuki H., Hotta T., Koyama T., Komagata M., Imakiire A., Yanase N., Yoshimoto T., Mizuguchi J.: Retrovirus-mediated transduction of TRAIL and chemotherapeutic agents co-operatively induce apoptotic cell death in both sarcoma and myeloma cells. *Anticancer Res.*, 2003; 23: 3247-3253
- [51] Szala S.: Założenia terapii genowej. W: *Terapia Genowa*, red. S. Szala; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003, str. 1-34
- [52] Szliszka E., Zydowicz G., Mizgala E., Krol W.: Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.*, 2012; 41: 818-828
- [53] Śliwińska-Hill U., Trocha J.: Najnowsze terapie przeciwnowotworowe. *Post. Farm.*, 2011; 1: 14-18
- [54] Terzioglu E., Bisgin A., Sanlioglu A.D., Ulker M., Yazisiz V., Tuzuner S., Sanlioglu S.: Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2007; 46: 783-789
- [55] VanOosten R.L., Griffith T.S.: Activation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T Cells after intratumoral Ad5-TRAIL/CpG oligodeoxynucleotide combination therapy. *Cancer Res.*, 2007; 67: 11980-11990
- [56] Walther W., Stein U.: Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 2000; 60: 249-271
- [57] Wang S.B., Tan Y., Lei W., Wang Y.G., Zhou X.M., Jia X.Y., Zhang K.J., Chu L., Liu X.Y., Qian W.B.: Complete eradication of xenograft hepatoma by oncolytic adenovirus ZD55 harboring TRAIL-IETD-Smac gene with broad antitumor effect. *Hum. Gene Ther.*, 2012; 23: 992-1002

- [58] Wang Y., Huang F., Cai H., Zhong S., Liu X., Tan W.S.: Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma. *J. Gene Med.*, 2008; 10: 518-526
- [59] Wang Y., Ma L., Wang S., Bao Y., Ni C., Guan N., Zhao J., Fan X.: Assessment of CAR- or CD46-dependent adenoviral vector-mediated TRAIL gene therapy in clinical adenocarcinoma lung cancer cells. *Oncology*, 2009; 77: 366-377
- [60] Wang Y.G., Wang J.H., Zhang Y.H., Gu Q., Liu X.Y.: Antitumor effect of a novel adeno-associated virus vector targeting to telomerase activity in tumor cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2004; 36: 492-500
- [61] Wenger T., Mattern J., Haas T.L., Sprick M.R., Walczak H., Debatin K.M., Büchler M.W., Herr I.: Apoptosis mediated by lentiviral TRAIL transfer involves transduction-dependent and -independent effects. *Cancer Gene Ther.*, 2007; 14: 316-326
- [62] Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., Goodwin R.G.: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995; 3: 673-682
- [63] Wohlfahrt M.E., Beard B.C., Lieber A., Kiem H.P.: A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL Leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models. *Cancer Res.*, 2007; 67: 8783-8790
- [64] Wu G.S.: TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2009; 285: 1-5
- [65] Wu X.X., Ogawa O., Kakehi Y.: TRAIL and chemotherapeutic drugs in cancer therapy. *Vitam. Horm.*, 2004; 67: 365-383
- [66] Wu Z., Asokan A., Samulski R.J.: Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol. Ther.*, 2006; 14: 316-327
- [67] Xu F., Tian Y., Huang Y., Zhang L.L., Guo Z.Z., Huang J.J., Lin T.Y.: EGFR inhibitors sensitize non-small cell lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Chin. J. Cancer*, 2011; 30: 701-711
- [68] Yao Q., Wang S., Gambotto A., Glorioso J.C., Evans C.H., Robbins P.D., Ghivizzani S.C., Oligino T.J.: Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium. *Gene Ther.*, 2003; 10: 1055-1060
- [69] Yi Y., Noh M.J., Lee K.H.: Current advances in retroviral gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, 2011; 11: 218-228
- [70] Yoo J., Choi S., Hwang K.S., Cho W.K., Jung C.R., Kwon S.T., Im D.S.: Adeno-associated virus-mediated gene transfer of a secreted form of TRAIL inhibits tumor growth and occurrence in an experimental tumor model. *J. Gene Med.*, 2006; 8: 163-174
- [71] Young L.S., Searle P.F., Onion D., Mautner V.: Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J. Pathol.*, 2006; 208: 299-318
- [72] Yuan X.F., Peng H.W., Ding Y.H., Yan C.H., Zhang Y.J., Yang M., Xiong D.S.: Adeno-associated virus-mediated gene transfer of a secreted transfer of secretable trimeric TRAIL gene expression driven by CD20 promoter. *Exp. Hematol.*, 2013; 41: 221-230
- [73] Zhang H., Sui A., Wang Z., Liu S., Yao R.: Adenovirus-mediated TRAIL expression and downregulation of Bcl-2 expression suppresses non-small cell lung cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Med.*, 2012; 30: 358-364

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

