

(13)

# Badania eksperymentalne nad metodami terapii genowej i komórkowej w leczeniu chorób dystroficznych siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*

*Experimental studies on cell and gene therapies for retinal dystrophies with a particular focus on *ABCA4* retinopathies*

Aneta Ścieżyńska<sup>1</sup>, Dominika Oziębło<sup>2</sup>, Monika Ołdak<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. dr hab. Jacek Malejczyk

<sup>2</sup> Zakład Genetyki, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu w Warszawie

Kierownik: dr hab. n. med. Monika Ołdak

<sup>3</sup> Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie

<b>Streszczenie:</b>	Dystrofia siatkówki prowadzi do stopniowej, nieodwracalnej utraty wzroku. Ważną grupą dystrofii siatkówki są retinopatie <i>ABCA4</i> . Obecnie nie ma skutecznych metod leczenia tej grupy chorób, niemniej jednak wraz z rozwojem molekularnych form terapii opracowanie nowych metod leczniczych wydaje się coraz bardziej realne. Autorki niniejszej pracy podsumowują ostatnie postępy terapii genowej i komórkowej, które znajdują zastosowanie w chorobach dystroficznych siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii związanych z mutacjami genu <i>ABCA4</i> .
<b>Słowa kluczowe:</b>	gen <i>ABCA4</i> , choroba Stargardta, dystrofia siatkówki, terapia genowa, terapia komórkowa, badania kliniczne.
<b>Summary:</b>	Retinal dystrophies lead to gradual irreversible vision deterioration. The <i>ABCA4</i> retinopathies constitute an important group of retinal dystrophies. However, there are no effective therapies available for this group of diseases. Yet, with the advent of molecular therapies, the development of prospective therapeutic approaches seems feasible. The paper summarizes recent advances in gene and cell therapy that may be implemented in retinal dystrophies, especially in <i>ABCA4</i> -associated diseases.
<b>Key words:</b>	<i>ABCA4</i> gene, Stargardt disease, retinal dystrophies, gene therapy, cell therapy, clinical trials.

## 1. Wstęp

Dziedziczne choroby dystroficzne siatkówki są uwarunkowane genetycznie i różnicowane klinicznie oraz etiologicznie. Jednym z głównych genów, który odgrywa istotną rolę w etiologii chorób siatkówki, jest gen *ABCA4*. Jego dysfunkcja prowadzi do powstania chorób dystroficznych siatkówki odmiennych fenotypowo określanymi również mianem „retinopatii *ABCA4*”. Należą do nich m.in.: choroba Stargardta (młodzięcza dystrofia plamki, ang. Juvenile Macular Dystrophy), dno żółtoplamiste (ang. Fundus Flavimaculatus), niektóre z dystrofii czopkowo-pręcikowych (ang. Cone-rod Dystrophies – CRD), a także zwyrodnienia barwnikowe siatkówki (ang. Retinitis Pigmentosa – RP) (1). Do dzisiaj nie opracowano takich metod leczenia choroby Stargardta i innych retinopatii *ABCA4*, których skuteczność zostałaby udowodniona w badaniach. Wyzwaniem dla rozwoju terapii genowej jest duży rozmiar genu *ABCA4*, który koduje aż 50 egzónów, a jego otwarta ramka odczytu obejmuje 6800 par zasad.

## 2. Cel

Autorki niniejszej pracy podjęły próbę przybliżenia założeń, napotykanymi trudnościami, a także podsumowania ostatnich do-

niesień z dziedziny terapii genowej i komórkowej, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób dystroficznych siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*.

## 3. Terapia genowa

W przypadku chorób o podobnym fenotypie, lecz odmiennym molekularnym podłożu, niejednokrotnie trudne jest postawienie jednoznacznej klinicznej diagnozy choroby, od której często zależy dobranie odpowiednich metod leczenia lub podjęcie działań mających na celu zapobieganie progresji choroby. Szansą na skrócenie nierzadko złożonej procedury diagnostycznej może się okazać wykorzystanie zdobytych dotychczas informacji z dziedziny genetyki molekularnej. Dzięki diagnostyce genetycznej, która staje się coraz bardziej dostępna, rozróżnienie wielu podobnych fenotypowo chorób jest łatwiejsze. W zależności od wykrytych mutacji niejednokrotnie jest możliwe postawienie bardziej precyzyjnej prognozy przebiegu choroby niż byłoby to możliwe tylko na podstawie badań okulistycznych. Wiedza na temat podłoża genetycznego stwarza możliwości badania wpływu interakcji międzygenowych, a także czynników środowiskowych na przebieg choroby. Ponadto wraz z rozwojem terapii genowych wiedza

na temat molekularnej przyczyny choroby może zwiększać szansę na personalizację leczenia chorób dotąd nieuleczalnych.

Idealny wektor w terapii genowej chorób siatkówki powinien się charakteryzować m.in. wysokim tropizmem do komórek docelowych, dużą pojemnością transgeny, indukcją długotrwałej ekspresji transgeny oraz tolerancją immunologiczną ze strony gospodarza. Te cechy stanowią główne ograniczenia terapii genowej, dlatego nieustannie poszukuje się najlepszego nośnika spełniającego ww. założenia (2).

Należy pamiętać, że z aplikacją terapii genowej może się wiązać ryzyko indukcji genów onkogennych i odpowiedzi immunologicznej gospodarza na podany kapsyd wirusa. To ostatnie ryzyko jest mniejsze w przypadku terapii genowych chorób siatkówki niż w przypadku terapii genowej innych tkanek, z uwagi na uprzywilejowanie immunologiczne oka (bariera krew-siatkówka). Ponadto dzięki wielowarstwowości i kompartmentowości oka możliwe jest podanie już małych dawek transgeny, dla których zostanie osiągnięty efekt terapeutyczny (2).

Głównymi drogami podania transgeny są bezpośrednia iniekcja do ciała szklistego lub aplikacja nośnika do przestrzeni podsiatkówkowej. Podanie transgeny do ciała szklistego jest łatwiejsze, niemniej jednak obciążone ryzykiem jego szybszej eliminacji z oka, dlatego niezbędne staje się jego ponowne podanie. Ponadto obecność włókien kolagenowych i proteoglikanów może unieruchomić nośnik w ciele szklistym, bariery anatomiczne oka natomiast, takie jak warstwa neurosensoryczna siatkówki oraz błona graniczna wewnętrzna siatkówki, mogą uniemożliwić dyfuzję nośnika do fotoreceptorów. Użycie wektorów o niewielkich rozmiarach, np. wektorów towarzyszących adenowirusom, stwarza szansę, że terapia zakończy się powodzeniem, jednakże większe wektory, takie jak lentiwirusy, muszą być podawane podsiatkówkowo (3). Iniekcja podsiatkówkowa jest preferowaną metodą podawania transgeny. Ta metoda jest połączona z witrektomią, dlatego też jest obciążona większą inwazyjnością i możliwymi komplikacjami. Iniekcja pod siatkówkę ma niewątpliwą zaletę, którą jest dłuższe i bezpośrednie oddziaływanie nośnika na docelowe komórki siatkówki finalnie przyczyniające się do poprawy efektywności terapii (4).

### 3.1 Terapia z użyciem wektorów towarzyszących adenowirusom

Wziąwszy pod uwagę ostatnie doniesienia na temat sukcesów terapii genowej z wykorzystaniem wektorów wirusowych towarzyszących adenowirusom (ang. Adeno-associated Viruses – AAV), można twierdzić, że zastępowanie zmutowanego genu jego prawidłową kopią wydaje się coraz bardziej realne. Ważna jest jednak odpowiednia diagnoza podłoża genetycznego, ponieważ tylko dzięki niej możliwe będzie zaprojektowanie odpowiedniego konstruktów ukierunkowanego w molekularną przyczynę choroby (5). Wydaje się, że dotychczas AAV są najbardziej popularnym nośnikiem wykorzystywanym w terapii genowej w okulistyce z uwagi na ich łatwość do transfekcji komórek siatkówki (6). Zastosowanie AAV w terapii chorób siatkówki wywołanych mutacjami w genie *ABCA4* może jednak sprawić trudności w stworzeniu konstruktów, ze względu na olbrzymi rozmiar omawianego genu sięgający prawie 7 tysięcy par zasad (kpz).

Formy dzikie AAV zawierają genom złożony z 4,7 kpz, w skład którego wchodzi 4 geny kodujące 4 białka replikacyjne i 3 białka kapsydu, otoczone z każdej strony przez flankujące

obszary odwrotnych terminalnych powtórzeń (ang. Inverted Terminal Repeats – ITRs). W terapiach genowych rekombinowane AAV (rAAV) zachowują obszary ITRs, wewnętrzna część ich genomu natomiast jest zastępowana terapeutycznym DNA, które ma zostać przetransportowane do komórki docelowej. Liczne serotypy adenowirusów różnią się budową ich otoczki zewnętrznej tj. kapsydu. Inżynieria genetyczna umożliwia stworzenie odmian rAAV, które wobec niezmiennego zawartości niesionego genu będą się różniły kapsydem, a tym samym również powinowactwem do docelowych komórek (7). Upakowanie sekwencji ITRs najlepiej poznanego serotypu AAV2 do kapsydu innego serotypu AAV pozwala otrzymać cząsteczkę rAAV2/n, gdzie pierwszy numer definiuje źródło ITRs AAV, w miejscu n natomiast umieszcza się numer serotypu będącego źródłem kapsydu. Od rodzaju kapsydu zależy tropizm rAAV do docelowej tkanki, a obecność wielu serotypów AAV umożliwia efektywną transdukcję wielu różnych tkanek (8).

Nadal trwają poszukiwania rekombinowanego AAV, którego kapsyd byłby zdolny pomieścić tak duże geny jak np. *ABCA4*. Pojawiły się doniesienia świadczące o tym, że rekombinowane wirusy rAAV2/1–5 są zdolne pomieścić do 6 kpz, wiriony z większym genomem jednak są preferencyjnie degradowane w tkankach docelowych przez proteasomy, dlatego dodatkowo należałoby podawać inhibitory proteasomów (9). Co ciekawe Alloca i wsp. wyszczególnili jeden z serotypów rekombinowanych rAAV5, którego kapsyd jest zdolny pomieścić nawet do 8,9 kpz jednoniciowego DNA, a zatem także genu *ABCA4* (7).

Obecnie prowadzone badania kliniczne, w których wykorzystuje się AAV do terapii genowych chorób siatkówki, są uważane za bezpieczne, niemniej jednak do rozwiązania wciąż pozostaje kwestia przemijającej ekspresji transgeny związanej z eliminacją komórek zainfekowanych wektorami AAV przez układ immunologiczny gospodarza (10). Ponadto trwają badania mające na celu zwiększenie efektywności transfekcji komórek siatkówki przez wektory AAV, a także tropizmu cząsteczek wektora do docelowych komórek poprzez modyfikacje białek ich kapsydu (11). Wyniki doświadczeń sugerują również, że modyfikowanie reszt tyrozynowych kapsydu AAV może znacząco zwiększać transdukcję wektorów do siatkówki (11, 12).

Ciekawe są wyniki dotychczas przeprowadzonych badań na zwierzętach, które pokazują, że upakowanie genomu wirusa AAV2 do kapsydu AAV8 (tworząc rekombinowany wektor rAAV2/8) znacząco zwiększa transdukcję komórek fotoreceptorowych u naczelnych (13). Wyniki innych badań wskazały, że kapsyd wektora AAV5 efektywnie transdukuje czopki znajdujące się w plamce galki ocznej naczelnych, dowodem na to jest przywrócenie makakom trójchromatycznego widzenia barw (14). Pomimo obiecujących wyników terapii genowych, uzyskanych dzięki wykorzystaniu wektorów AAV, wciąż trudno się pozbyć obaw związanych zwłaszcza ze skutkami pierwszych terapii genowych z użyciem AAV, takimi jak efekty uboczne powodowane indukcją układu immunologicznego gospodarza i uogólnionym stanem zapalnym, które w kilku przypadkach doprowadziły do śmierci pacjentów. W związku z tym nieustannie są poszukiwane nowsze i jeszcze bardziej efektywne sposoby leczenia chorób siatkówki (15).

Lam i wsp. rozpoczęli badania, w których nośnikiem genu są tzw. wektory adenowirusowe zależne od wirusa pomocni-

czego (ang. Helper Dependent Adenoviruses – HD-Ad). Mogą one pomieścić nawet do 30 kpz, to umożliwia zapakowanie jednego bardzo dużego genu lub wielu małych genów łącznie z ich obszarami regulatorowymi. W przeciwieństwie do klasycznych wektorów AAV wektory HD-Ad nie zawierają sekwencji kodujących wirusa z wyjątkiem końcowych sekwencji ITR oraz sekwencji pakujących, które umożliwiają enkapsydację cząsteczek wirusowych. W komórkach, które uległy transdukcji, nie powstają białka wirusa, których obecność mogłaby indukować odpowiedź immunologiczną gospodarza. Ponadto ekspresja przenoszonego genu jest zwiększona w porównaniu z AAV, a do całkowitej transdukcji komórek RPE można użyć mniejszego stężenia cząsteczek wektora HD-Ad – to zwiększa bezpieczeństwo stosowanej terapii. Pomimo obiecujących wyników badań prowadzonych z wykorzystaniem HD-Ad w odniesieniu do komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. Retinal Pigment Epithelium – RPE) nie udało się osiągnąć znaczących rezultatów w komórkach fotoreceptorowych. Jeśli udało by się opracować sposób ich skutecznej transdukcji, wówczas możliwe byłoby zastosowanie HD-Ad w leczeniu np. choroby Stargardta (16).

### 3.2 Terapia z użyciem lentiwirusów – wektor StarGen i nowe perspektywy

Wektory lentiwirusowe są niezwykle cennymi narzędziami w terapii genowej. Lentiwirusy mogą dostarczyć stabilne geny trwale do genomu docelowych komórek. Mogą też transdukować niedzielące się komórki, a to jest istotne w przypadku transfekcji komórek już zróżnicowanych takich jak np. fotoreceptory. Ponadto lentiwirusy mogą nieść duży konstrukt (8–9 kpz), który przewyższa zdolność upakowania standardowych wektorów AAV (17, 18).

Głównym wektorem, który wykorzystywano w badaniach z lentiwirusami, był wirus niedokrwistości zakaźnej koni (ang. Equine Infectious Anemia Virus – EIAV). Powoduje on samooznaczającą się niedokrwistość (ang. self-limiting anemia) u koni i jest niepatogenny dla ludzi (18). Wektor lentiwirusowy wraz z formą dziką genu *ABCA4* aplikowano do przestrzeni podsiatkówkowej myszy (*Abca4*<sup>-/-</sup>). Już pojedyncza iniekcja transgenu redukowała poziom akumulacji cząsteczek A2E i był on porównywalny do poziomu mierzzonego u zdrowych osobników z grupy kontrolnej, którą stanowiły myszy o dzikim fenotypie. Ponadto ów poziom był 3–5-krotnie niższy w porównaniu do poziomu u myszy z grupy kontrolnej *Abca4*<sup>-/-</sup> (17).

Sukces doświadczenia zachęcił naukowców do kontynuacji badań na innych zwierzętach, m.in. na królikach i makakach. Do badań posłużył wektor StarGen – niereplikujący, zrekombinowany wektor lentiwirusowy bazujący na EIAV. Wyniki tych badań dowodzą, że StarGen może z dużą efektywnością transdukować zarówno fotoreceptory, jak i RPE u dorosłych makaków, to jest zgodne z danymi uzyskanymi również dla innych gatunków zwierząt. Ponadto wyniki badań uzyskane po ponad 6 miesiącach od iniekcji wektora StarGen do oczu królików i makaków dowodzą jego bezpieczeństwa i dobrej tolerancji u badanych zwierząt. Badania histopatologiczne również nie wykazały żadnych zmian będących konsekwencją iniekcji wektora StarGen, a analiza biodystrybucji pokazała, że obszar występowania wektora StarGen ograniczał się wyłącznie do oka (18).

Ekstrapolacja wyników uzyskanych w badaniach terapii genowej zwierząt dla potrzeb terapii genowej ludzi wymaga dużej ostrożności, efektywna transdukcja fotoreceptorów i znaczące zmniejszenie akumulacji cząsteczek A2E jednak skłaniają ku przemyśleniom, że terapia lentiwirusowa jest dobrym narzędziem do leczenia chorób związanych z genem *ABCA4* (17).

Wyniki badań nad wektorem StarGen przyczyniły się do powstania projektu StarGen, który obecnie znajduje się w fazie I/IIa badań klinicznych (nr NCT01367444; clinicaltrials.gov), celem jest zastosowanie terapii genowej u chorych na chorobę Stargardta i potencjalnie inne choroby związane z dysfunkcją transportera *ABCA4*. Przewidywany czas zakończenia badań to 2017 rok. Projekt StarGen zakłada ewaluację dawek na trzech poziomach zapewniających bezpieczeństwo, tolerancję i biologiczną aktywność. Pojedyncze podanie dawki było efektywne przez pół roku.

Ponadto trwają badania mające na celu określenie długotrwałego bezpieczeństwa i biologicznej aktywności wektora StarGen (nr NCT01736592; clinicaltrials.gov). Planowany czas zakończenia obserwacji to 2022 rok. Badania są przeprowadzane w USA (Portland, Oregon), a także we Francji (w Paryżu) i obecnie nie ma innych zatwierdzonych lentiwirusowych terapii genowych, które mogłyby być zastosowane w leczeniu choroby Stargardta.

### 3.3 Terapia z użyciem polimerowych wektorów nanocząsteczkowych

Terapie oparte na nośnikach niewirusowych były uważane za mniej wydajne w dostarczaniu transgenów do komórki, a także w utrzymaniu jego trwałej ekspresji, a to było niezbędne w przypadku genów takich jak *ABCA4*. Jednakże ich wielkimi zaletami są brak patogenności i mniejsza reakcja immunologiczna gospodarza w odpowiedzi na ich iniekcję. Wydaje się, że wielką nadzieją i przyszłością terapii genowych są nanocząsteczki DNA o średnicy 8–10 nm.

Nanocząsteczka jest zbudowana z jednej cząsteczki syntetycznego DNA opłaszczonej glikolem polietylenowym (PEG) podstawionym 30-merowym peptydem lizyny (CK30PEG10K) (19). Elektrostatyczne interakcje między polimerami o dodatnim ładunku (polikationowymi) a cząsteczkami DNA o ujemnym ładunku skutkują powstaniem kompleksów, których ładunek jest zbliżony do obojętnego. Brak polarności w połączeniu z małym rozmiarem cząsteczek umożliwia transfer niesionego genu do komórki postmitotycznej (niedzielącej), a następnie jego bierne przedostanie się do jądra przez pory jądrowe, których średnica wynosi 25 nm (20). Farjo i wsp. pokazali, że nanocząsteczki mogą przedostać się do różnych tkanek oka zależnie od miejsca, w którym wykonano iniekcję. Niemal wszystkie typy komórek, zwłaszcza komórki fotoreceptorowe, ulegały transfekcji nanocząsteczkami i wykazywały ekspresję transgenów, której poziom był zależny od podanej dawki (21).

Niewątpliwymi zaletami wektorów nanocząsteczkowych są również długotrwała ekspresja genu, którego są nośnikiem, i efektywność w transfekcji postmitotycznych komórek potwierdzona doświadczalnie (19). Wyniki badań dowodzą, że iniekcja nanocząsteczek DNA do cytoplazmy komórek charakteryzuje się wyższą ekspresją transgenów niż iniekcja „nagiętego” DNA, jednakże niższą ekspresją niż uzyskana wskutek bezpośredniego transferu do jądra komórki (19, 20).

Kolejnymi zaletami nanocząsteczek są ich biodegradowalność oraz minimalna toksyczność wobec docelowych tkanek, nawet pomimo wielokrotnych iniekcji. Tę tezę potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych na myszach, u których w ciągu kilkudniowej obserwacji po iniekcji nanocząsteczek DNA do przestrzeni podsiatkówkowej nie zanotowano zwiększonego napływu limfocytów ani obecności markerów świadczących o stanie zapalnym siatkówki (22). Ponadto wektory nanocząsteczkowe zostały wykryte w obszarze ich iniekcji, czyli oku, w przeciwieństwie do wektorów AAV, które zostały wykryte również w drodze wzrokowej w ośrodkowym układzie nerwowym (23).

Warto raz jeszcze podkreślić, że cechą wyróżniającą nanocząsteczki jest ich ogromna pojemność licząca od 5 do 20 kpz, to sugeruje, że nanocząsteczki z powodzeniem mogą pełnić rolę nośnika dużych genów (24). Efektywność transfekcji dużych wektorów została potwierdzona wynikami licznych badań prowadzonych na gryzoniach, w tym wynikami uzyskanymi przez Han i wsp., którzy w sierpniu 2012 roku użyli nanocząsteczek jako wektorów prawidłowej kopii genu *ABCA4*. Transgen wprowadzono następnie do przestrzeni podsiatkówkowej w obszarze centralnoskroniowym gałek ocznych 30-dniowych myszy chorych na chorobę Stargardta (5), to zaowocowało długotrwałą ekspresją genu utrzymującą się nawet do 8 miesięcy od podania iniekcji, zredukowaną ilością odkładających się złogów lipofuscyny i poprawą jakości widzenia u zwierząt. Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu stanowią fundament dla dalszych badań dotyczących choroby Stargardta u ludzi, który może stać się alternatywą do terapii z użyciem wektorów wirusowych (5, 25).

#### 4. Terapia komórkowa

Wraz z rozwojem medycyny regeneracyjnej komórki macierzyste znajdują coraz więcej zastosowań. Ostatnie badania przedstawiają próby wdrożenia komórek macierzystych do leczenia chorób degeneracyjnych siatkówki, m. in. choroby Stargardta (26). Uwaga badaczy jest skupiona na embrjonalnych komórkach macierzystych (ang. Embryonic Stem Cells – ESCs), indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (ang. Induced Pluripotent Stem Cells – iPSCs), a także na próbie stworzenia z komórek macierzystych trójwymiarowej warstwy siatkówki (27).

Zaletą komórek macierzystych jest ich potencjał do różnicowania się w dowolny rodzaj komórek, w tym również komórki nerwowe, które mogą zastąpić utracone fotoreceptory oraz komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (28). Wyniki badań przeprowadzonych na myszach dowodzą, że komórki macierzyste integrują się z warstwą siatkówki oraz adaptują morfologię i pozycję m.in. fotoreceptorów czy komórek zwojowych siatkówki (29). Przez długi czas jedynie z ESCs możliwe było wygenerowanie funkcjonalnej fotoreceptorowej odpowiedzi na światło (30). Ze względów etycznych, a także z uwagi na obawy dotyczące powstawania zmian nowotworowych, poszukiwano innych rozwiązań, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób siatkówki. Jednym z nowo odkrytych sposobów, uhonorowanym nagrodą Nobla w 2012 roku, jest przeprogramowanie komórek somatycznych (np. fibroblastów skóry) i ich odróżnicowanie do komórek podobnych do embrjonalnych komórek macierzystych (ang. ESC-like cells) z pluripotencjalnymi właściwościami, czyli iPSCs (26).

Xie i wsp. udało się wyhodować stabilne linie komórkowe multipotentnych siatkówkowych komórek macierzystych (ang. Retinal Stem Cells – RSCs) uzyskanych z siatkówki dorosłych myszy. W odpowiednich warunkach RSCs są zdolne do proliferacji we wszystkie typy komórek siatkówki, zwłaszcza w komórki fotoreceptorowe, które po iniekcji do przestrzeni podsiatkówkowej myszy formują synapsy z jej neuronami i integrują się z siatkówką gospodarza, uzyskując odpowiedź na światło. Ponadto nie zaobserwowano skutków ubocznych transplantacji takich jak formowanie się zmian nowotworowych. Te wyniki dowodzą również, że RSCs wyhodowane z siatkówki dorosłego osobnika mają potencjał produkowania funkcjonalnych komórek fotoreceptorowych i być może znajdą zastosowanie w leczeniu chorób siatkówki, w tym choroby Stargardta (30).

Obecnie trwają badania kliniczne, w których wykorzystuje się komórki macierzyste do leczenia chorób siatkówki, w żadnym z nich jednak iPSCs nie są używane do leczenia choroby Stargardta. Japońscy naukowcy zamierzają rozpocząć badania z udziałem chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (Age-related Macular Degeneration – AMD), w których będą wykorzystywane ich własne komórki RPE wywodzące się z iPSCs (ang. iPSCs-derived RPE). Wdrożenie tej metody do leczenia choroby Stargardta, a także innych chorób monogenowych związanych np. z dysfunkcją genu *ABCA4*, może jednak przysporzyć większych trudności, gdyż wymagałoby to wcześniejszej naprawy uszkodzonego genu. Bez naprawy komórki somatyczne pomimo odróżnicowania nadal nosiłyby defekt genetyczny, nie nadawałyby się zatem do terapii (26).

Ocata Therapeutics (USA) prowadzi badania kliniczne (nr NCT01345006 oraz NCT02445612 clinicaltrials.gov) z udziałem chorych na chorobę Stargardta, w których są używane komórki RPE wyhodowane z ludzkich embrjonalnych komórek macierzystych (ang. hESCs – derived RPE, hRPE) (31). Kontrolowane różnicowanie hESCs *in vitro* pozwoliło na otrzymanie ponad 99% komórek przejawiających charakterystyczne cechy komórek RPE, które po iniekcji do przestrzeni okołosiatkówkowej szczura zintegrowały się z RPE gospodarza. Iniekcja komórek do ludzkiego oka zajętego chorobą Stargardta również przyniosła poprawę jakości widzenia (31). Shwartz i wsp. przedstawili długoterminowe wyniki badań klinicznych przeprowadzonych z udziałem 18 pacjentów (9 pacjentów chorych na chorobę Stargardta oraz 9 pacjentów z dystrofią plamki związaną z wiekiem). U pacjentów wykonano standardową witrektomię przez część płaską ciała rzęskowego. Podawano 150  $\mu$ l substancji zawierającej 50000, 100 000 lub 150 000 komórek nabłonka barwnikowego siatkówki do przestrzeni podsiatkówkowej jednego oka pacjenta w obszarze przejściowym między uszkodzonymi a niezmiennymi obszarami siatkówki. Najlepsza skorygowana ostrość wzroku u pacjentów przystępujących do badania wynosiła od 20/200 do dostrzegania ruchów ręki. Po półrocznej terapii u 9 chorych na AMD obserwowano poprawę ostrości wzroku o 15 liter w 4 oczach oraz o 11–14 liter w 2 oczach. Zmian nie stwierdzono u 3 pacjentów. U chorych na chorobę Stargardta udokumentowano poprawę ostrości widzenia o 15 liter w 3 oczach, zmian nie zaobserwowano natomiast w 4 oczach, w 1 oku zaś odnotowano pogorszenie ostrości wzroku. Wyniki tego badania dowiodły, że komórki były dobrze tolerowane przez ponad 37 miesięcy od momentu ich transplantacji. Ponadto nie zaobserwowano,



aby hRPE uczestniczyły w tworzeniu zmian nowotworowych, odpowiedzi zapalnej, a także różnicowały się w komórki inne niż oczekiwane komórki docelowe (32).

## 5. Podsumowanie

W tej pracy przedstawiono badania eksperymentalne prowadzone w dziedzinach terapii genowej i komórkowej w celu leczenia dystrofii siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*. Pomimo trwających prób klinicznych obecnie nie opracowano procedury terapeutycznej, która znalazłaby zastosowanie w leczeniu retinopatii *ABCA4*. Niemniej jednak stopień zaawansowania prowadzonych badań pozwala mieć nadzieję, że już wkrótce zostanie stworzona właściwa forma ich terapii.

**Publikacja powstała w związku z realizacją projektu Narodowego Centrum Nauki N N402 591640 (5916/B/P01/2011/40), projektu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1M15/PM11D/14.**

## Piśmiennictwo:

- Burton DS, Ali M, McKibbin M: *Retinal phenotypes in patients homozygous for the G1961E mutation in the ABCA4 gene*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 520.
- Kumar-Singh R: *Barriers for retinal gene therapy: separating fact from fiction*. Vision Res. 2008; 48: 1671–1680.
- Taney LS, Reichel E: *Gene Therapy for Treatment of Retinal Disease*. Retina Today. 2015; 10: 47–50.
- Charbel Issa P, MacLaren RE: *Non-viral retinal gene therapy: a review*. Clin Experiment Ophthalmol. 2012; 40: 39–47.
- Han Z, Conley SM, Makkia RS, Cooper MJ, Naash MI: *DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice*. J Clin Invest. 2012; 122: 3221–3226.
- Yanoff M, Duker JS, Augsburger JJ: *Ophthalmology*: Mosby Elsevier, 2009.
- Allocca M, Doria M, Petrillo M, Colella P, Garcia-Hoyos M, Gibbs D, et al.: *Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice*. J Clin Invest. 2008; 118: 1955–1964.
- Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM: *New recombinant serotypes of AAV vectors*. Curr Gene Ther. 2005; 5: 285–297.
- Grieger JC, Samulski RJ: *Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps*. J Virol. 2005; 79: 9933–9944.
- Reichel MB, Ali RR, Thrasher AJ, Hunt DM, Bhattacharya SS, Baker D: *Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye*. Gene Ther. 1998; 5: 1038–1046.
- Charbel Issa P, De Silva SR, Lipinski DM, Singh MS, Mouravlev A, You Q, et al.: *Assessment of tropism and effectiveness of new primate-derived hybrid recombinant AAV serotypes in the mouse and primate retina*. PLoS One. 2013; 8: e60361.
- Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, et al.: *High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors*. Mol Ther. 2009; 17: 463–471.
- Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, et al.: *Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey*. Sci Transl Med. 2011; 3: 88ra54.
- Mancuso K, Hauswirth WW, Li Q, Connor TB, Kuchenbeker JA, Mauck MC, et al.: *Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates*. Nature. 2009; 461: 784–787.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA: *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet. 2003; 4: 346–358.
- Lam S, Cao H, Wu J, Duan R, Hu J: *Highly efficient retinal gene delivery with helper-dependent adenoviral vectors*. Genes Dis. 2014; 1: 227–237.
- Kong J, Kim SR, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J, et al.: *Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy*. Gene Ther. 2008; 15: 1311–1320.
- Binley K, Widdowson P, Loader J, Kelleher M, Iqbal S, Ferrige G, et al.: *Transduction of photoreceptors with equine infectious anemia virus lentiviral vectors: safety and biodistribution of StarGen for Stargardt disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 4061–4071.
- Cai X, Conley SM, Nash Z, Fliesler SJ, Cooper MJ, Naash MI: *Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa*. FASEB J. 2010; 24: 1178–1191.
- Liu G, Li D, Pasumarthy MK, Kowalczyk TH, Gedeon CR, Hyatt SL, et al.: *Nanoparticles of compacted DNA transfect postmitotic cells*. J Biol Chem. 2003; 278: 32578–32586.
- Farjo R, Skaggs J, Quiambao AB, Cooper MJ, Naash MI: *Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles*. PLoS One. 2006; 1: e38.
- Ding XQ, Quiambao AB, Fitzgerald JB, Cooper MJ, Conley SM, Naash MI: *Ocular delivery of compacted DNA-nanoparticles does not elicit toxicity in the mouse retina*. PLoS One. 2009; 4: e7410.
- Han Z, Conley SM, Makkia R, Guo J, Cooper MJ, Naash MI: *Comparative analysis of DNA nanoparticles and AAVs for ocular gene delivery*. PLoS One. 2012; 7: e52189.
- Fink TL, Klepcyk PJ, Oette SM, Gedeon CR, Hyatt SL, Kowalczyk TH, et al.: *Plasmid size up to 20 kbp does not limit effective in vivo lung gene transfer using compacted DNA nanoparticles*. Gene Ther. 2006; 13: 1048–1051.
- McBain SC, Yiu HH, Dobson J: *Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery*. Int J Nanomedicine. 2008; 3: 169–180.
- Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart MJ, da Cruz L, Coffey PJ: *Stem cells in retinal regeneration: past, present and future*. Development. 2013; 140: 2576–2585.
- Tibbetts MD, Samuel MA, Chang TS, Ho AC: *Stem cell therapy for retinal disease*. Curr Opin Ophthalmol. 2012; 23: 226–234.
- Das AM, Zhao X, Ahmad I: *Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources*. Semin Ophthalmol. 2005; 20: 3–10.
- Kurimoto Y, Shibuki H, Kaneko Y, Ichikawa M, Kurokawa T, Takahashi M, et al.: *Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia*. Neurosci Lett. 2001; 306: 57–60.
- Li T, Lewallen M, Chen S, Yu W, Zhang N, Xie T: *Multipotent stem cells isolated from the adult mouse retina are capable of producing functional photoreceptor cells*. Cell Res. 2013; 23: 788–802.

31. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al.: *Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report*. Lancet. 2012; 379: 713–720.
32. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al.: *Human embryonic stem cell-derived retinal pigment*

*epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies*. Lancet. 2015; 385: 509–516.

Praca wpłynęła do Redakcji 19.08.2015 r. (KO-00027-2015)  
Zakwalifikowano do druku 03.01.2016 r.




**Adres do korespondencji (Reprint requests to):**

**dr hab. n. med. Monika Ołdak**  
Zakład Genetyki Światowe Centrum Słuchu,  
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu  
ul. Mokra 17  
Kajetany 05-830 Nadarzyn  
e-mail: m.oldak@ifps.org.pl

# I Międzynarodowa Konferencja Od nauki do praktyki OKULISTYKA - KATAMARANY 2016

Mikołajki, 3-4 czerwca 2016



-  Przypadki kliniczne w okulistyce
-  Postępy w medycynie – nie tylko okulistyka
-  Sesja specjalna – wideochirurgia oka

**Organizator:**



Centrum Mikrocirurgii Oka Laser  
Klinika Prof. Jerzego Szalik

Centrum Mikrocirurgii Oka Laser w Warszawie  
00-131 Warszawa | ul. Grzybowska 6/10  
[www.okolaser.com.pl](http://www.okolaser.com.pl)

**Partner naukowy:**

Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
03-709 Warszawa | ul. Sierakowskiego 13

**Biuro Organizatora:**



InspireCongress Sp. z o.o.  
50-315 Wrocław | ul. Nowowiejska 38  
tel.: +48 71 780 90 52 | fax: +48 71 780 90 54  
[biuro@inspirecongress.pl](mailto:biuro@inspirecongress.pl) | [www.inspirecongress.pl](http://www.inspirecongress.pl)

Informacje o konferencji dostępne na stronie [www.okolaser.edu.pl](http://www.okolaser.edu.pl)