

W rozwoju guzów pierwotnych i przerzutów dużą rolę odgrywa powstanie unaczynienia (angiogeneza). Dane doświadczalne wskazują, że zahamowanie unaczynienia guzów pierwotnych i przerzutów prowadzi, w konsekwencji, do zahamowania ich wzrostu. W artykule omówiliśmy możliwości wykorzystania terapii genowej w hamowaniu angiogenezy w nowotworach. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie w antyangiogennej terapii genowej genów kodujących tzw. „rozpuszczalne” receptory dla czynników wzrostu (VEGF i angiopoetyny-1) oraz białkowe inhibitory angiogenezy (angiostatyna i endostatyna).

Słowa kluczowe: angiogeneza, terapia genowa nowotworów, receptory VEGF, angiostatyna, endostatyna.

Several data show that transfer of sequences encoding angiostatin, endostatin or truncated receptors for VEGF can be used to inhibit tumor growth and metastasis.

Key words: angiogenesis, cancer gene therapy, VEGF receptors, angiostatin, endostatin.

Antyangiogenna terapia genowa

Antiangiogenic gene therapy

Urszula Wilczyńska, Jarosław Szary, Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii-Institut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

WSTĘP

Jednym z podstawowych założeń terapii chorób uwarunkowanych genetycznie, chorób monogenetycznych, np.: fenylketonurii lub mukowiscydozy, są manipulacje pozwalające na rewersję zmienionego („patologicznego”) fenotypu na fenotyp prawidłowy.

Najogólniej, manipulacje te polegają na wprowadzeniu do komórek z brakującym prawidłowym genem, genu prawidłowego. Ekspresja tego genu sprawia, iż w komórkach pojawia się prawidłowe białko „korygujące” ogólnoustrojowe zmiany patologiczne [1].

W przypadku chorób, w których powstaniu i przebiegu bierze udział wiele różnych genów (np. chorób nowotworowych) manipulacje takie, prowadzące do korekty zmienionego patologicznego fenotypu na fenotyp prawidłowy, są trudne do przeprowadzenia. W chorobach nowotworowych wykorzystuje się raczej zabiegi polegające na wprowadzeniu do komórek nowotworowych genów, których białkowe produkty mają doprowadzić do zniszczenia komórek nowotworowych [2, 3].

W badaniach przedklinicznych oraz we wstępnych próbach klinicznych stosuje się dwa typy (rodzaje) niszczenia komórek nowotworowych: niszczenie bezpośrednie oraz tzw. niszczenie pośrednie (Ryc. 1., który przedstawia podstawowe założenia terapii genowej chorób nowotworowych).

Niszczenie bezpośrednie komórek nowotworowych polega na tym, że wprowadzony do nich gen (najczęściej pochodzenia wirusowego lub bakteryjnego) koduje enzym metabolizujący nieaktywny prolek do aktywnego leku [4]. Jest to tzw. koncepcja genów samobójczych: wprowadzone geny „uczulają” komórki nowotworowe na pewnego typu leki lub „radiouczulają” je na promieniowanie jonizujące; zob. m.in. nasze prace [5, 6].

Niszczenie pośrednie polega na tym, że wprowadzony do komórek nowotworowych gen koduje białko, tzw. białko immunomodulacyjne (najczęściej: różnego typu cytokiny), mobilizujące układ immunologiczny do swoistego niszczenia komórek nowotworowych [2, 3, 7].

W ostatnich latach pojawiła się nowa strategia dotycząca pośredniego niszczenia komórek nowotworowych, tzw. antyangiogenna terapia genowa [8]. W terapii tej wykorzystu-

je się geny, których ekspresja prowadzi do zahamowania angiogenezy. Przypomnijmy, że zahamowanie angiogenezy w nowotworach (ograniczenie powstawania naczyń w guzach pierwotnych i przerzutach) prowadzi do zahamowania ich wzrostu. Angiogenezie oraz białkowym inhibitorom angiogenezy poświęciliśmy odrębne artykuły [9, 10].

W artykule tym przedstawiliśmy natomiast doświadczalne założenia antyangiogennej terapii genowej.

ZASTOSOWANIA ANTYANGIOGENNEJ TERAPII GENOWEJ W BADANIACH PRZEDKLINICZNYCH

W terapii antyangiogennej istnieje możliwość wykorzystania szeregu różnorodnych genów kodujących białkowe inhibitory angiogenezy. Na przykład wprowadzenie do komórek nowotworowych jednego z tzw. genów supresorowych, genu p53, kodującego białko o szerokim, pleiotropowym działaniu, prowadzi m.in. do zahamowania transkrypcji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) – jednego z czynników proangiogennych [11-13]. Brak tego czynnika hamuje proliferację komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych i tym samym, wzrost doświadczalnych guzów.

Zmniejszenie ilości czynników wzrostowych indukujących proliferację komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych może także odbywać się na innej drodze. Do komórek nowotworowych wprowadza się geny kodujące odpowiednio zmienione (zmutowane) rozpuszczalne receptory czynników wzrostowych (VEGF [14-16] lub angiopoetyna 1 [17]). Kompletny receptor dla VEGF posiada zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, część transbłonową oraz cytoplazmatyczną domenę posiadającą aktywność kinazy białkowej. Rozpuszczalne receptory posiadają tylko domenę zewnątrzkomórkową, która wiąże czynniki wzrostowe wydzielane przez komórki nowotworowe lub makrofagi, uniemożliwiając transdukcję sygnału do podziału w komórkach śródbłonkowych (Ryc. 2A, a także tab. 1.).

W antyangiogennej terapii genowej wykorzystano także gen kodujący antysensowny mRNA dla VEGF [18]. Antysensowny mRNA tworzy hybrydę z prawidłowym mRNA dla

Tab. 1. Przykłady antyangiogennej terapii genowej

Rodzaj genu terapeutycznego	Aktywność białka kodowanego przez transgen
1. Geny supresorowe: – prawidłowy, niezmutowany gen p53 [11-13]	Zahamowanie ekspresji genu VEGF
2. Gen kodujący antysensowy mRNA dla VEGF [18]	Zahamowanie ekspresji genu VEGF
3. Geny kodujące zmodyfikowane receptory czynników wzrostu: – gen kodujący nierozpuszczalny fragment receptora Flt-1 [14] – gen kodujący rozpuszczalny fragment receptora Flt-1 [15, 16] – gen kodujący rozpuszczalny fragment receptora Tie2 [17]	Wiązanie liganda (czynnika wzrostu VEGF) Wiązanie liganda (czynnika wzrostu VEGF) Wiązanie liganda (angiopoetyny-1)
4. Gen kodujący fragment urokinazy [19]	Ligand wiążący się z receptorem urokinazy, hamowanie systemu urokinaza/plazminogen/plazmina
5. Geny kodujące białkowe inhibitory angiogenezy: – gen kodujący czynnik płytkowy 4 [29] – gen kodujący angiostatynę [24-26] – gen kodujący endostatynę [27]	Cytokina biorąca udział m.in. w hamowaniu proliferacji komórek śródbłonkowych Hamowanie proliferacji komórek śródbłonkowych Hamowanie proliferacji komórek śródbłonkowych

VEGF, co prowadzi do obniżenia ekspresji genu kodującego ten czynnik wzrostu. W efekcie uzyskuje się zmniejszenie wytwarzania czynnika wzrostu i zahamowanie proliferacji komórek śródbłonkowych.

Oryginalnym rozwiązaniem w antyangiogennej terapii genowej jest wykorzystanie sekwencji kodującej N-końcowy fragment urokinazy [19]. Genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe wydzielają fragment urokinazy, który wiąże się z odpowiednim receptorem komórkowym i hamuje aktywację urokinazy, powstanie plazminy z plazminogenu. Zahamowanie systemu urokinaza-plazminogen-plazmina odgrywa ważną rolę w kontroli migracji komórek śródbłonkowych. Przypomnijmy, że plazmina to enzym aktywujący metaloproteazy biorące udział w trawieniu macierzy zewnątrzkomórkowej i ułatwiające w ten sposób migrację różnym typom komórek (w tym także migrację komórek śródbłonkowych tworzących naczynia krwionośne).

Nieco innym rozwiązaniem w antyangiogennej terapii genowej jest wprowadzenie do komórek nowotworowych genów kodujących białkowe inhibitory proliferacji komórek śródbłonkowych, np. czynnika płytkowego 4 (PF 4), angiostatyny czy endostatyny (Ryc. 2B., tab. 1.).

Angiostatyna jest proteolitycznym fragmentem plazminogenu [20], (zob. także naszą pracę [10], w której opisaliśmy powstawanie i właściwości biologiczne angiostatyny).

Angiostatyna hamuje podziały i migra-

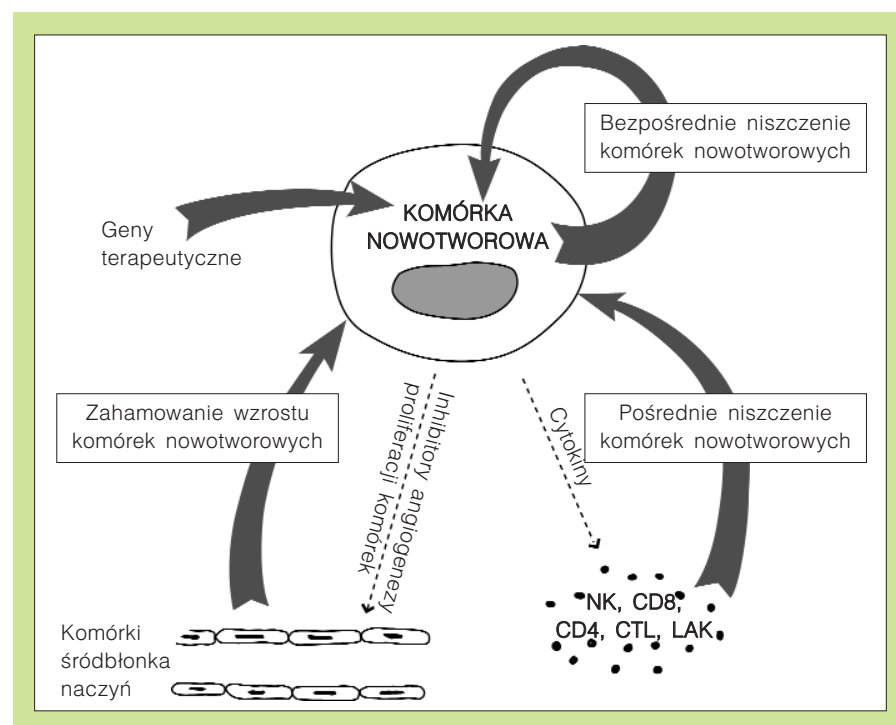
cję komórek śródbłonkowych, lecz mechanizm jej działania nie jest do końca poznany. Stwierdzono również, że angiostatyna

indukuje w komórkach śródbłonkowych stan apoptozy [21]. Angiostatyna wiąże się z syntezą ATP obecną na powierzchni komórek śródbłonkowych i hamuje aktywność tego enzymu [22]. Synteza ATP podnosi wewnątrzkomórkowe stężenie ATP i pozwala przeżyć komórkom śródbłonkowym w warunkach hipoksji np. wewnątrz guza. Zahamowanie aktywności tego enzymu przez angiostatynę prowadzi prawdopodobnie do zmian metabolicznych i stąd – do ograniczenia podziałów i żywotności komórek śródbłonkowych.

Skuteczność terapii angiostatyną (podawanej w postaci białka rekombinowanego) potwierdzono *in vivo* dla eksperymentalnych guzów pierwotnych i przerzutów wywodzących się z wielu linii komórek nowotworowych [23]. Podobne efekty jak przy zastosowaniu angiostatyny w postaci białka uzyskano, podając doguzowo wektory adenowirusowe i reowirusowe zawierające cDNA kodujący angiostatynę [24-26].

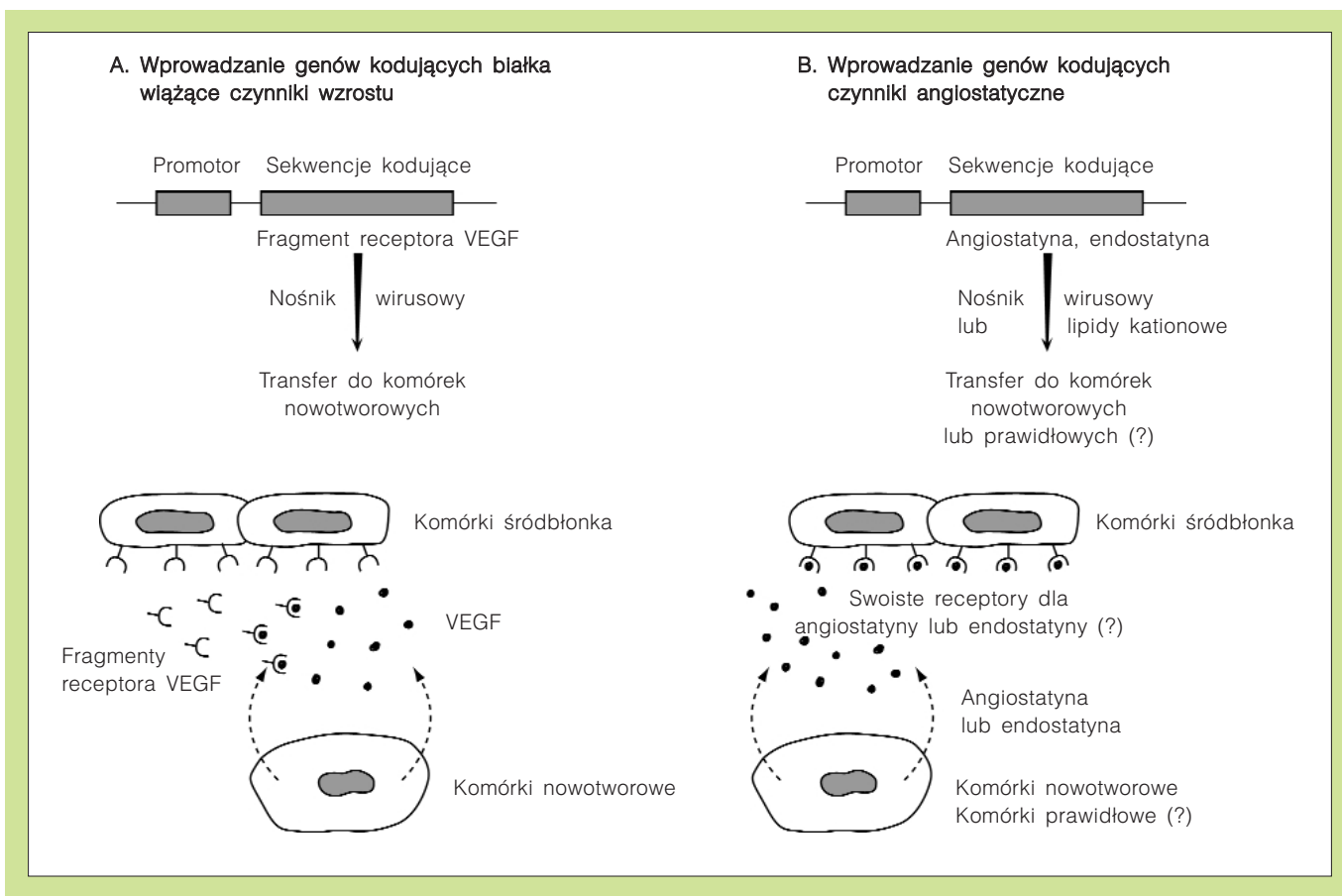
Innym silnym inhibitorem wzrostu komórek śródbłonkowych jest endostatyna (proteolityczny fragment kolagenu XVIII) [27], (zob. także naszą pracę [10]). Podobnie jak angiostatyna hamuje ona wzrost guzów oraz ogranicza ilość i wzrost przerzutów [28]. Sekwencje kodujące endostatynę sklonowano w wektorze wirusowym, który będzie można zastosować w terapii nowotworów [18].

Inhibitorem angiogenezy jest również czynnik płytkowy 4 (PF 4) [29]. Terapię genową z zastosowaniem tego czynnika testowano na modelach glejaka [30]. Guzy wywodzące się z komórek, do których wprowadzono PF 4 rosły wolniej i były słabiej unaczynione niż guzy kontrolne.



Ryc. 1. Modele terapii genowej nowotworów

Wprowadzone do komórek nowotworowych geny kodujące różnego typu białka terapeutyczne. Komórki nowotworowe są niszczone przez metabolity enzymów kodowanych przez tzw. geny samobójcze lub poprzez indukcję swoistej odpowiedzi immunologicznej (immunomodulacyjna rola cytokin) oraz poprzez zahamowania angiogenezy (inhibitory angiogenezy)



Ryc. 2. Dwa podstawowe modele terapii genowej stosowane w hamowaniu angiogenezy nowotworów

A – DNA posiadający sekwencje kodujące rozpuszczalny fragment receptora jest wprowadzany do komórek nowotworowych za pomocą nośników wirusowych. W komórkach nowotworowych zachodzi ekspresja transgenu. Na zewnątrz komórek wydzielane są rozpuszczalne receptory, które dzięki prawidłowej domenie zewnętrzkomórkowej wiążą czynnik wzrostu (VEGF); brak transdukcji sygnału uniemożliwia w konsekwencji proliferację komórek śródbłonkowych;

B – Do komórek nowotworowych lub prawidłowych, za pomocą odpowiednich nośników, wprowadzany jest DNA zawierający sekwencje kodujące czynniki angiostatyczne (angiostatyna lub endostatyna). W wyniku ekspresji transgenu w komórkach pojawiają się białkowe inhibitory, które hamują proliferację komórek śródbłonkowych

W antyangiogennej terapii genowej można zatem wyróżnić dwie strategie: pośrednią i bezpośrednią. Bezpośrednia antyangiogenna terapia genowa polega na zastosowaniu genów białkowych inhibitorów angiogenezy np.: angiostatyny, endostatyny, PF 4. W terapii pośredniej wykorzystuje się geny hamujące wydzielanie angiogennych czynników wzrostu (np.: geny kodujące anty-sensowny mRNA dla VEGF, czy geny supresorowe-p53) lub rozpuszczalne receptory, które uniemożliwiają wiązanie czynników wzrostu z receptorami komórek śródbłonkowych (rozpuszczalne receptory: Flt-1, Tie-2). Większość przykładów antyangiogennej terapii genowej przedstawiamy w tabeli 1.

ZAKOŃCZENIE

Niewątpliwą zaletą antyangiogennej terapii genowej jest jej uniwersalność, która polega na możliwości zastosowania tych samych genów terapeutycznych dla różnych typów guzów. Komórki śródbłonkowe naczyń, również naczyń guza, są komórkami prawidłowymi, o stałym charakterze, w odróżnieniu od komórek nowotworowych, które są bardzo różnorodne (różne w różnych typach nowotworów), jak również bardzo niestabilne, ulegające częstym mutacjom, tworząc zróżnicowane klony, często odporne na dotychczas stosowa-

ne metody terapii przeciwnowotworowej. Jest mało prawdopodobne, żeby terapia antyangiogenna indukowała w komórkach śródbłonkowych stan oporności [28, 31].

Teoretycznie terapia ta powinna charakteryzować się minimalną toksycznością i brakiem wpływu na wzrost komórek prawidłowych. Wprowadzanie do komórek nowotworowych, a także niektórych komórek prawidłowych genów kodujących białkowe inhibitory angiogenezy może stać się cenną innowacją w terapii nowotworów i uzupełnieniem dotychczas stosowanych metod leczenia. Wprowadzony gen, kodujący białkowy inhibitor angiogenezy, może utrzymywać się stosunkowo długo w komórkach, a jego wydłużona w czasie ekspresja może sprzyjać ciągłemu i długotrwałemu wytwarzaniu i wydzielaniu terapeutycznego białka. Może poprawić to komfort leczenia pacjenta oraz zmniejszyć niebezpieczeństwo nieodpowiedniego dobrania dawki terapeutycznej białka. Ponadto, przez wprowadzenie transgenu, którego czas utrzymywania w komórkach jest odpowiednio długi, pacjent unika ogromnej ilości częstych dożylnych wlewno-

Last but not least, ważną kwestią są również koszty terapii. W przypadku terapii genowej jest on dużo niższy niż produkcja zrekombinowanych białek antyangiogennych.

Reasumując: antyangiogenna terapia ge-

nowa może okazać się nowym i cennym rozwiązaniem w terapii guzów pierwotnych i przerzutów, których wzrost jest uzależniony od angiogenezy.

Autorzy składają podziękowania pani Beacie Bęben za wykonanie rysunków.

Praca została sfinansowana z grantu KBN nr 4P05A 046 15.

PIŚMIENNICTWO

- Anderson W. F.: *Human gene therapy*. Nature 1998, 392, 25.
- Roth J. A., Cristiano R. J.: *Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going?* J. Nat. Cancer Inst. 1997, 89, 21.
- Mastrangelo M. J., Berd D., Nathan F. E., Lattime E. C.: *Gene Therapy for Human Cancer: An Essay for Clinicians*. Semin. Oncol. 1996, 23, 4.
- Niculescu-Duvaz I., Spooner R., Marais R., Springer C. J.: *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*. Bioconjugate Chem. 1998, 9, 4.
- Szala S., Missol E., Sochanik A., Stróżyk M.: *The use of cationic liposomes DC-CHOL/DOPE and DDAB/DOPE for direct transfer of Escherichia coli cytosine deaminase gene into growing melanoma tumors*. Gene Ther. 1996, 3, 1026.
- Szary J., Missol E., Tarnowski R., Szala S.: *Selective augmentation of radiation effects by 5-fluorocytosine on murine B16 (F10) melanoma cells transfected with cytosine deaminase gene*. Cancer Gene Ther. 1997, 4, 269.
- Colombo M. P., Forni G.: *Immunotherapy I: Cytoki-*

- ne gene transfer strategies. *Cancer Metast. Rev.* 1996, 15, 317.
8. Kong H. L., Crystal R. G.: *Gene Therapy Strategies for Tumor Antiangiogenesis*. J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90, 273.
 9. Szala S., Radzikowski C.: *Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów*. Nowotwory 1997, 47, 1.
 10. Budryk M., Szala S.: *Angiostatyna oraz inne polipeptydy hamujące angiogenezę nowotworów*. Współczesna Onkologia 1997, 3, 11.
 11. Bouvet M., Ellis L. M., Nishizaki M., Fujiwara T., Liu W., Bucana C. D., Fang B., Lee J. J., Roth J. A.: *Adenovirus-mediated Wild-Type p53 Gene Transfer Down-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Inhibits Angiogenesis in Human Colon Cancer*. *Cancer Res.* 1998, 58, 2288.
 12. Xu M., Kumar D., Srinivas S., Detolla L. J., Yu S. F., Strass S. A., Mixson A. J.: *Parenteral Gene Therapy with p53 Inhibits Human Breast Tumors In Vivo Through a Bystander Mechanism Without Evidence of Toxicity*. *Hum. Gene Ther.* 1997, 8, 177.
 13. Riccioni T., Cirielli C., Wang X., Passaniti A., Capogrossi M. C.: *Adenovirus-mediated wild-type p53 overexpression inhibits endothelial cell differentiation in vitro and angiogenesis in vivo*. *Gene Ther.* 1998, 5, 747.
 14. Millauer B., Shawver L. K., Plate K. H., Risau W., Ullrich A.: *Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant*. *Nature* 1994, 367, 576.
 15. Kong H. L., Hecht D., Song W., Kovacs I., Hackett N. R., Yayon A., Crystal R. G.: *Regional Suppression of Tumor Growth by In Vivo Transfer of a cDNA Encoding a Secreted Form of the Extracellular Domain of the flt-1 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*. *Hum. Gene Ther.* 1998, 9, 823.
 16. Goldman C. K., Kendall R. L., Cabrera G., Sorocceanu L., Heike Y., Gillespie G. Y., Siegal G. P., Mao X., Beet A. J., Huckle W. R., Thomas K. A., Curiel D. T.: *Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 8795.
 17. Lin P., Buxton J. A., Acheson A., Radziejewski C., Maisonnier P. C., Yancopoulos G. D., Channon K. M., Hale L. P., Dewhirst M. W., George S. E., Peters K. G.: *Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 8829.
 18. Nguyen J. T., Wu P., Clouse M. E., Hlatky L., Terwilliger E. F.: *Adeno-associated Virus-mediated Delivery of Antiangiogenic Factors as an Antitumor Strategy*. *Cancer Res.* 1998, 58, 5673.
 19. Li H., Lu H., Griscelli F., Opolon P., Sun L. Q., Rago T., Legrand Y., Belin D., Soria J., Soria C., Perricaudet M., Yeh P.: *Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice*. *Gene Ther.* 1998, 5, 1105.
 20. O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R. A., Moses M., Lane W. S., Cao Y., Sage E. H., Folkman J.: *Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma*. *Cell* 1994, 79, 315.
 21. Claesson-Welsh L., Welsh M., Ito N., Anand-Apte B., Soker S., Zetter B., O'Reilly M., Folkman J.: *Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 5579.
 22. Moser T. L., Stack M. S., Asplin I., Enghild J. J., Hojrup P., Everitt L., Hubchak S., Schnaper H. W., Pizzo S. V.: *Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 2811.
 23. O'Reilly M. S., Holmgren L., Chen C., Folkman J.: *Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice*. *Nature Med.* 1996, 2, 689.
 24. Griscelli F., Li H., Bennaceur-Griscelli A., Soria J., Opolon P., Soria C., Perricaudet M., Yeh P., Lu H.: *Angiostatin gene transfer: Inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 6367.
 25. Cao Y., O'Reilly M. S., Marshall B., Flynn E., Ji R. W., Folkman J.: *Expression of Angiostatin cDNA in a Murine Fibrosarcoma Suppresses Primary Tumor Growth and Produces Long-Term Dormancy of Metastases*. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 1055.
 26. Tanaka T., Cao Y., Folkman J., Fine H. A.: *Viral Vector-targeted Antiangiogenic Gene Therapy Utilizing an Angiostatin Complementary DNA*. *Cancer Res.* 1998, 58, 3362.
 27. O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R., Folkman J.: *Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth*. *Cell* 1997, 88, 277.
 28. Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M. S.: *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance*. *Nature* 1997, 390, 404.
 29. Maione T. E., Gray G. S., Petro J., Hunt A. J., Donner A. L., Bauer S. I., Carson H. F., Sharpe R. J.: *Inhibition of Angiogenesis by Recombinant Human Platelet Factor-4 and Related Peptides*. *Science* 1990, 247, 77.
 30. Tanaka T., Manome Y., Wen P., Kufe D. W., Fine H. A.: *Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth*. *Nature Med.* 1997, 3, 437.
 31. Folkman J.: *Antiangiogenic gene therapy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 9064.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Urszula Wilczyńska**

Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice