Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii, 2012, 1, 33–40

**Praca poglądowa**
***Review***

Adriana Wawer, Anna Sznejder-Pachołek, Ilona Joniec-Maciejak, Joanna Schwenkgrub, Andrzej Członkowski

# Wirusy zależne od adenowirusów w terapiach genowych chorób neurodegeneracyjnych

## *Adeno-associated virus vectors in gene therapies of neurodegenerative diseases*

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie

**STRESZCZENIE**

Opracowanie skutecznych metod leczenia chorób neurodegeneracyjnych stanowi wciąż ogromne wyzwanie. W wielu przypadkach nie jest znana przyczyna wystąpienia choroby, brak również skutecznej farmakoterapii. Obecnie duże nadzieje w leczeniu wielu chorób wiąże się z wykorzystaniem terapii genowej, której istotą jest wprowadzanie do określonych komórek ośrodkowego układu nerwowego (OUN) terapeutycznego genu, najczęściej za pomocą nośników wirusowych. Coraz szerzej wykorzystuje się w tym celu wektory oparte na wirusach AAV. W prezentowanej pracy przedstawiono zakończone oraz trwające badania kliniczne wykorzystujące wektory AAV do transferu terapeutycznego genu w terapii: choroby Parkinsona, choroby Alzheimera, stwardnienia zanikowego bocznego, choroby Canavana oraz późnej dziecięcej neuronalnej lipofuscynozy ceroidowej. Wyniki przedstawionych badań wskazują na dobry profil tolerancji i bezpieczeństwo tego rodzaju terapii.

**SUMMARY**

The search for effective therapy of neurodegenerative diseases is an important issue and an important challenge. Nowadays, there are high hopes for the gene therapy based treatment. This involves using a noninfectious virus administered directly into the brain. AAV vectors are increasingly being used as tools for delivery of therapeutic agents to the CNS. The present paper aims to review clinical trials carried out so far with the use of the AAV vectors in treatment of neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Canavan disease and late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Results obtained from these trials show good tolerance of AAV vectors in the CNS and safety of therapies.

**Słowa kluczowe:** wektory AAV, terapia genowa, choroby neurodegeneracyjne, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne

**Key words:** AAV vectors, gene therapy, neurodegenerative diseases, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis

## WSTĘP

Choroby neurodegeneracyjne, a wśród nich m.in. choroba Parkinsona i choroba Alzheimera, są schorzeniami, które dotyczą znacznej części populacji, a zachorowalność na nie wrasta wraz z wiekiem. Poszukiwanie metod skutecznej terapii chorób neurodegeneracyjnych jest istotną kwestią i realnym wyzwaniem nie tylko dla farmakologów. Prowadzone są liczne badania zarówno przedkliniczne – z zastosowaniem zwierzęcych modeli tych chorób – jak również kliniczne, które mają na celu dokładne poznanie patomechanizmów degeneracji neuronów występującej w przebiegu tych chorób, a w konsekwencji próby znalezienia skutecznego sposobu hamowania tych

procesów. Terapia genowa wydaje się być w przypadku chorób neurodegeneracyjnych jedną z obiecujących możliwości.

Terapia genowa, definiowana jako wprowadzanie genów do komórek pacjenta w celu uzyskania efektu terapeutycznego, to terapia wciąż nowa, niosąca ze sobą zarówno wiele nadziei, jak i obaw. Jak dotąd nie jest ona podstawową metodą leczenia żadnej z występujących chorób. Spektrum potencjalnych zastosowań terapii genowej wydaje się być szerokie, dając nadzieję na rozszerzenie arsenału terapeutycznego wobec wielu, nieuleczalnych dziś, chorób.

Do chwili obecnej opracowano wiele metod wprowadzania pożądanego genu do komórek docelowych. Większość z tych metod opiera się na wykorzystaniu do tego celu nośników genów, zwanych wektorami. Coraz szerzej stosuje się wektory wirusowe. Są one pochodnymi wirusów, charakteryzują się wydajnym systemem przenoszenia swoich genów do komórek człowieka i wykorzystują naturalną zdolność wirusów do wprowadzania swojego materiału genetycznego do jądra komórki gospodarza. Wykorzystanie wektorów wirusowych w terapiach genowych pozwala na wprowadzanie genów kodujących białka trudne do ogólnoustrojowego podania oraz umożliwia lokalne ich wytwarzanie (np. w mózgu). W ten sposób wprowadza się do komórki brakujące geny bądź też zastępuje geny uszkodzone przez mutację, można również za ich pomocą dostarczać sekwencje blokujące ekspresję określonych genów.

Wektory wirusowe są produkowane na bazie różnorodnych wirusów. Wybór odpowiedniego wektora wirusowego do transferu genu zależy m.in. od tego, jak duży jest pożądany gen i do jakich komórek chcemy go dostarczyć.

## WEKTORY AAV

Wirusy zależne od adenowirusów (AAV, ang. *Adeno-Associated Virus*) zostały odkryte przypadkowo, w 1965 roku, jako zanieczyszczenia preparatów adenowirusowych (Atchison i wsp. 1965). Od tamtej pory są przedmiotem licznych badań, a ostatnio cieszą się szczególnie dużym zainteresowaniem jako wektory stosowane w terapii genowej. Są one jednymi z najmniejszych i strukturalnie najprostszych zwierzęcych wirusów DNA. Ich wirion ma średnicę około 20 nm i nie posiada osłonki. Materiałem genetycznym wirusa jest jednoniciowy DNA (ssDNA), zbudowany z około 5 tysięcy zasad. Wirusy AAV posiadają dwie duże otwarte ramki odczytu z nienakładającymi się na siebie sekwencjami – CAP (gen ten koduje białka kapsydu) i REP (gen kodujący białka niestrukturalne niezbędne do replikacji wirusa) (Gonçalves 2005).

Do namnażania wirusy AAV wymagają obecności wirusa wspomagającego (pomocniczego, ang. *helper virus*): adeno- lub herpeswirusa (Muzyczka 1992; Berns i Linden 1995). Gdy jest on nieobecny, ssDNA wirusa AAV zostaje przepisane do dsDNA, ulega integracji z DNA komórkowym gospodarza na chromosomie 19 i pozostaje w takiej formie aż do infekcji wirusem pomocniczym. Jeśli do niej dojdzie, DNA wirusa AAV zostaje uwolnione i rozpoczyna się cykl replikacyjny (Berns i Linden 1995).

Do tej pory wyizolowano i opisano 12 serotypów wirusa AAV (Schmidt i wsp. 2008). Każdy z serotypów ma odmienne właściwości związane ze zdolnością do infekcji komórek określonej tkanki, co ma ogromne znaczenie przy konstruowaniu z nich wektorów wykorzystywanych w terapii genowej. Najczęściej w terapii genowej wykorzystywany jest, endemiczny dla człowieka, wirus AAV serotypu-2 (Rutkowski i wsp. 2007).

Wektory wirusowe wytwarzane są z „dzikich" wirusów AAV poprzez zastąpienie sekwencji REP i CAP wirusa transgenem. Podczas tworzenia rekombinowanych wektorów „dzikie" wirusy są pozbawiane ok. 96% genomu – pozostawia się tylko końcowe sekwencje ITR (ang. *Inverted Terminal Repeats*), niezbędne do inicjacji replikacji wirusa (Kaplitt i Pfaff 1996).

Wektory AAV posiadają liczne zalety, wśród których najważniejszymi w kontekście leczenia schorzeń neurologicznych, wydają się być ich zdolność do transdukcji niedzielących się komórek, długotrwała ekspresja transgenu oraz brak toksyczności. Największe ograniczenie w stosowaniu tych wektorów stanowi natomiast ich stosunkowo niewielka pojemność – do genomu AAV można wklonować tylko 4 do 4,5 tysięca zasad (McCown 2005). Problematyczne jest także uzyskiwanie wysokich stężeń wektora. Prowadzone są jednak badania mające na celu wyeliminowanie obu tych ograniczeń (Ghosh i wsp. 2011; Sun i wsp. 2000; Yan i wsp. 2000; Jaźwa i wsp. 2007).

## PRÓBY KLINICZNE Z WYKORZYSTANIEM WEKTORÓW AAV

### Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (chP) jest schorzeniem dotykającym szczególnie osoby powyżej 60 roku życia (Samii i wsp. 2004). Do chwili obecnej nie jest w pełni znana etiologia choroby i mimo prowadzonych licznych badań nie można zatrzymać progresji choroby, a jedynie nieco spowolnić jej rozwój. Wiele uwagi poświęca się próbom leczenia choroby Parkinsona

z wykorzystaniem wektorów AAV. Próby kliniczne poprzedzone są zakrojonymi na szeroką skalę badaniami przedklinicznymi z wykorzystaniem zwierzęcych modeli chP.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na wykorzystanie w leczeniu chP czynników neurotroficznych. Czynniki neurotroficzne zwiększają przeżywalność neuronów, stymulują ich wzrost oraz różnicowanie. Jednym z takich czynników jest neurotroficzny czynnik pochodzenia glejowego (GDNF, ang. *Glial Cell Neurotrophic Factor*). W badaniach przedklinicznych, prowadzonych m.in. na małpach, zauważono, że GDNF może poprawiać funkcje degenerujących neuronów dopaminergicznych, a tym samym łagodzić objawy chP oraz zapobiegać dalszym procesom neurodegeneracyjnym, a w konsekwencji hamować rozwój choroby (Kordower i wsp. 2000). W trybie badań klinicznych otwartych u chorych z chP po jednorazowym podaniu do skorupy GDNF zaobserwowano wzrost aktywności neuronów dopaminergicznych. W przypadku grupy kontrolnej, takich zmian nie stwierdzono (Gash i wsp. 1996). Wyniki powyższych badań dały podstawę do zaprojektowania próby klinicznej wykorzystującej wektor AAV2 niosący gen dla neurturyny (NTN, ang. *neurturin*), będącej analogiem GDNF (NCT00252850). Badania I fazy przeprowadzono na 12 pacjentach z chP (9 mężczyzn i 3 kobiety) w wieku 35–75 lat. Były to osoby z dużymi zaburzeniami funkcji motorycznych oraz nasilonymi dyskinezami pomimo stosowania terapii farmakologicznej. Osoby te musiały mieć też od minimum 5 lat zdiagnozowaną chorobę wg kryteriów UK Brain Bank Criteria. W badaniu wektor AAV2-NTN (nazwany CERE-120) podawano stereotaktycznie bezpośrednio do skorupy. Uczestnicy badania otrzymali $1{,}3\times10^{11}$ genomów wektora/pacjenta (vg/pacjent) – 6 osób, $5{,}4\times10^{11}$ vg/pacjent – 6 osób. Nie stwierdzono istotnych działań niepożądanych w przeciągu pierwszego roku od podania wektora. Pacjentów oceniano wg skali UPDRS (ang. *Unifited Parkinson's Disease Rating Scale*). Zauważono 36-procentową poprawę funkcji motorycznych po roku, w porównaniu do okresu początkowego, oraz mniejsze nasilenie dyskinez u 50% pacjentów, szczególnie w zakresie tzw. *off-medication dysinesia* (form dyskinez utrzymujących się po podaniu lewodopy). Natomiast w teście oceniającym aktywność w zakresie codziennych czynności nie zauważono istotnej statystycznie poprawy. Analiza za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, *Positron Emission Tomography*) nie wykazała wpływu na szybkość wychwytu lewodopy po podaniu wektora AAV2-NTN. Jak podkreślają autorzy projektu, prowadzone przez nich badania, które obejmowały małą grupę pacjentów, z nasilonymi, utrudniającymi normalne funkcjonowanie objawami choroby wskazują na niewielką poprawę funkcji motorycznych, uzyskaną już po miesiącu od rozpoczęcia testów. Tylko u dwóch pacjentów w grupie, która otrzymała większą dawkę wektora, zaobserwowano obecność przeciwciał anty-AAV2 (Marks i wsp. 2008). W związku z pozytywnymi wynikami I fazy badań, w 2006 roku zainicjowano II fazę badań z użyciem wektora AAV2-NTN (NCT00400634). W badaniu wzięło udział 58 pacjentów, w przedziale wiekowym 35–75 lat, z potwierdzonymi objawami chP wg UK Brain Bank Criteria; 38 osób otrzymało stereotaktycznie AAV2-NTN w ilości $5{,}4\times10^{11}$ vg/pacjent, natomiast 20 osób poddano pozorowanemu zabiegowi stereotaktycznemu. W badaniu zastosowano podwójną ślepą próbę. Po 12 miesiącach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w funkcjach motorycznych pomiędzy grupą z podanym AAV2-NTN a grupą kontrolną. Natomiast po 18 miesiącach, różnica między obiema grupami wynosiła około 7,6 punktów w skali UPDRS i może być zakwalifikowana jako umiarkowana poprawa. Prawdopodobnie dłuższy czas obserwacji pozwolił na stwierdzenie efektu działania czynników troficznych i wykazanie pożądanych zmian (Marks i wsp. 2010; Bankiewicz i wsp. 2006; Herzog i wsp. 2008).

W trakcie badań zaobserwowano wystąpienie objawów niepożądanych u 13 pacjentów z grupy, która otrzymała wektor, oraz u 4 pacjentów z grupy, która miała zabieg pozorowany. U żadnego z pacjentów nie wykryto przeciwciał anty-AAV2 (Marks i wsp. 2010).

Na podstawie wyników autopsji wykonanej u dwóch pacjentów zmarłych podczas terapii (przyczyną śmierci był w pierwszym przypadku zawał, w drugim zator tętnicy płucnej, oba przypadki nie miały związku z podaniem wektora) stwierdzono znacznie mniejszą dystrybucję czynnika troficznego w porównaniu do wyników uzyskanych w zwierzęcych modelach choroby. Fakt ten autorzy tłumaczą głównie dużo rozleglejszą degeneracją neuronów i utratą funkcji transportu czynników troficznych do istoty czarnej u ludzi, niż ma to miejsce w modelach zwierzęcych (Bartus i wsp. 2011).

W oparciu o wyniki obu powyżej opisanych badań opracowano kolejne badanie kliniczne z wykorzystaniem wektora AAV2-NTN (NCT00985517). Jest to randomizowane badanie fazy I/II z podwójnie ślepą próbą. W badaniu tym zastosowana zostanie wyższa dawka wektora ($2{,}4\times10^{12}$ vg/pacjent) oraz zostanie wydłużony czas obserwacji. Na bieżącym etapie zakończono już rekrutację uczestników (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985517).

W badaniach nad wykorzystaniem terapii genowej w chP badany jest również gen dla dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD), enzymu katalizującego syntezę kwasu γ-aminomasłowego (GABA). Zaobserwowano, że u pacjentów z chP degeneracja neuronów dopaminergicznych prowadzi do zmian w zwojach podstawy, co z kolei daje efekt w postaci spadku aktywności receptorów GABA-ergicznych i ich odpowiedzi na kwas γ-aminomasłowy. U osób z chP funkcja jądra podwzgórzowego nasila się głównie z powodu spadku transmisji GABA-ergicznej z gałki bladej (Nutt i wsp. 2005).

W 2003 roku rozpoczęto I fazę badań klinicznych z wykorzystaniem wektora AAV2-GAD (NCT00195143). Do badania zakwalifikowano 12 pacjentów (11 mężczyzn i 1 kobieta) w wieku 56-60 lat z nasilonymi objawami chP. Uczestnicy badania otrzymali następujące dawki wektora AAV2-GAD: $1\times10^{11}$ vg/pacjent – 4 osoby; $3\times10^{11}$ vg/pacjent – 4 osoby; $1\times10^{12}$ vg/pacjent – 4 osoby. Pomiaru i oceny czynności motorycznych dokonywano za pomocą skali UPDRS. Wśród uczestników badania nie zaobserwowano działań niepożądanych związanych z zastosowaną terapią. Stwierdzono poprawę czynności motorycznych po stronie ciała przeciwnej do miejsca podania wektora już po 3 miesiącach od zabiegu, poprawa ta utrzymywała się do końca obserwacji. Analiza PET wykonana przed rozpoczęciem testów oraz po ich zakończeniu nie wykazała zmian tempa przemian lewodopy do dopaminy w obrębie badanej półkuli (Kaplitt i wsp. 2007). U dwóch pacjentów pojawiły się przeciwciała anty-AAV2. Zasugerowano, że brak odpowiedzi ze strony układu immunologicznego u pozostałych pacjentów wskazuje na bezpieczeństwo stosowania terapii. Autorzy badania podkreślają jednak, że mała ilość uczestników badania i brak grupy kontrolnej nie pozwalają wysuwać daleko idących wniosków, nie można też całkowicie wykluczyć efektu placebo. Jednak poprawa funkcji motorycznych oraz wyniki analizy PET wskazują na pozytywne efekty terapii. Stąd też w 2008 roku rozpoczęto II fazę badań klinicznych z wektorem AAV2-GAD (NCT00643890) podawanym bilateralnie do jądra podwzgórzowego. Do badania zakwalifikowano 45 osób w wieku 35–75 lat ze zdiagnozowaną, zaawansowaną chP. Spośród zakwalifikowanych pacjentów 22 osoby otrzymały wektor AAV2-GAD ($1\times10^{12}$ vg/pacjent), natomiast u 23 osób przeprowadzono operację pozorowaną.

Po 6 miesiącach od rozpoczęcia badania zaobserwowano istotne różnice pomiędzy obiema grupami. Różnice dotyczyły wyników, jakie uzyskali pacjenci poddani ocenie wg skali UPDRS: u pacjentów z grupy otrzymującej AAV2-GAD zaobserwowano istotną poprawę w porównaniu do grupy z podaniem pozorowanym. Dla grupy AAV2-GAD współczynnik zmniejszył się o 8,1 pkt ($p < 0{,}0001$), w grupie poddanej zabiegowi pozorowanemu – o 4,7 pkt ($p = 0{,}003$). W obu grupach pojawiły się działania niepożądane o łagodnym lub umiarkowanym przebiegu i były związane z zabiegiem chirurgicznym (zawroty głowy, nudności). Nie odnotowano obecności przeciwciał anty-AAV2 u pacjentów, którzy otrzymali AAV2-GAD. Mimo poprawy funkcji motorycznych większość pacjentów skarżyła się na nieznaczną poprawę czynności dnia codziennego oraz jakości życia (LeWitt i wsp. 2011).

W badaniach nad wykorzystaniem terapii genowej w chP badany jest również gen dla interleukiny-10 (IL-10). Odkąd wykazano, że u pacjentów z chP dochodzi do pobudzenia komórek układu immunologicznego we krwi obwodowej, stwierdzono obecność takich komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz zaobserwowano, że dochodzi do aktywacji komórek odpowiedzi immunologicznej w istocie czarnej i prążkowiu, zwrócono uwagę na możliwy udział czynników immunologicznych w rozwoju zmian patologicznych prowadzących do wystąpienia objawów chP (Wullner i Klockgether 2003; McGeer i wsp. 2001). W badaniach przeprowadzonych *post mortem* w mózgach chorych na chP stwierdzono aktywację komórek mikrogleju, wykazano również zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych między innymi: TNFα, IFNγ, IL1β (Hirsch i wsp. 2003). Obecnie uważa się, że hamowanie reakcji zapalnej towarzyszącej procesom neurodegeneracji skutkuje zmniejszeniem stopnia degeneracji neuronów. Potencjalnym endogennym czynnikiem mającym taki wpływ jest interleukina-10. IL-10 jest jedną z kluczowych cytokin przeciwzapalnych; uczestniczy w procesach immunologicznych, wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamujący wpływ na wytwarzanie cytokin prozapalnych. Interleukina-10 nie przekracza nieuszkodzonej bariery krew-mózg, dlatego konieczne jest docelowe wprowadzenie jej do OUN. Dobrą alternatywą dla podań domózgowych IL-10 jest wprowadzenie wektora z genem IL-10, co jest w stanie zapewnić długotrwałą, stałą ekspresję tej cytokiny w wybranym obszarze. W naszej pracowni prowadzone są badania z zastosowaniem wektora wirusowego – AAV2 jako środka służącego do transferu terapeutycznego genu IL-10 do układu nigro-striatalnego w mysim modelu choroby Parkinsona indukowanym podaniem 1metyl-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP; związek, który wywołuje behawioralne, biochemiczne i neuropatologiczne zmiany w obszarze układu nigro-striatalnego, przypominające chorobę Parkinsona). Wstępne wyniki wskazują, że podanie wektora z genem dla IL-10

przed intoksykacją MPTP, a w konsekwencji modyfikacja reakcji zapalnej poprzez nasilenie ekspresji cytokin przeciwzapalnych (IL-10) w obszarze degeneracji neuronów dopaminergicznych, skutkuje zmniejszeniem zmian zwyrodnieniowych układu nigro-striatalnego (mniejsze spadki stężenia dopaminy, wyższa ekspresja hydroksylazy tyrozynowej w porównaniu do grupy poddanej wyłącznie intoksykacji MPTP). Badania z zastosowaniem wektora AAV2-hIL-10 w szczurzym modelu choroby Parkinsona indukowanym 6-hydroksydopaminą (6-OHDA) prowadzone przez Johnston i wsp. również wykazały zmniejszenie uszkodzenia w obrębie układu nigrostriatalnego wywołanego neurotoksyną (Johnston i wsp. 2008). Obiecujące wyniki badań uzyskane w ramach tych projektów przyczynią się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów neuroprotekcyjnych i być może w przyszłości znajdą zastosowanie w opracowaniu nowych, skutecznych strategii terapeutycznych w chP.

**Choroba Alzheimera**

Farmakoterapia stosowana obecnie w chA ma na celu jedynie objawowe leczenie zaburzeń pamięci i funkcji poznawczych, i dlatego duże nadzieje budzi możliwość zastosowania terapii genowej (Khairallah i Kassem 2011). Białkiem, którego zwiększona ekspresja jest szczególnie pożądana, jest czynnik wzrostu neuronów (NGF, ang. *Nerve Growth Factor*). NGF odpowiedzialny jest za prawidłową morfologię i czynność neuronów, stymuluje ich różnicowanie oraz ma pozytywny wpływ na przeżywalność komórek (Olson 1993). Badanie I fazy, wykorzystujące wektor AAV kodujący gen dla NGF (CERE-110) zostało rozpoczęte w 2004 roku przez firmę Ceregene (NCT00087789) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00087789). W badaniu uczestniczyło 12 pacjentów, podzielonych na 3 grupy. Do badania kwalifikowani byli pacjenci z łagodną bądź umiarkowaną chA, pomiędzy 50 a 80 rokiem życia. Pacjentom każdej z grup podawano wektor bilateralnie poprzez 4 (dwie grupy pacjentów) bądź 6 (jedna grupa) otworów w czaszce. Łączna dawka CERE-110 to $2{,}0\times10^{10}$ vg/pacjent dla pierwszej grupy, $1{,}0\times10^{11}$ vg/pacjent dla drugiej grupy, $2{,}0\times10^{11}$ vg/pacjent dla trzeciej grupy. Badanie zostało zakończone, wciąż jednak brak opublikowanych wyników badania; jednakże musiały one świadczyć o bezpieczeństwie stosowanej terapii i być na tyle obiecujące, że w 2009 roku rozpoczęto II fazę badań z wykorzystaniem tego samego wektora wirusowego (NCT00876863). Badanie jest randomizowane, z podwójną ślepą próbą. Wciąż trwa rekrutacja pacjentów do badania. Uczestnicy będą podzieleni na 2 grupy. Pacjentom z pierwszej grupy zostanie podany stereotaktycznie wektor AAV2-NGF w dawce $2{,}0\times10^{11}$ vg/pacjenta. U pacjentów z drugiej grupy zostanie przeprowadzony zabieg stereotaktyczny pozorujący podanie wektora (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00876863; http://www.ceregene.com/alzheimers.asp).

**Stwardnienie zanikowe boczne**

Terapia genowa jest także potencjalną szansą dla pacjentów chorych na stwardnienie zanikowe boczne (ALS; ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). W chwili obecnej brak skutecznej farmakoterapii tej jednostki chorobowej (Rowland i Shneider 2001). Dowiedziono, że główną przyczyną rozwoju choroby jest zmiana konformacyjna białka dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1). Zmiana ta prowadzi do utraty kontroli oddziaływań międzybiałkowych, a w konsekwencji do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów w komórkach (głównym składnikiem złogów jest β-amyloid – podejrzewany o generowanie syntezy wolnych rodników, podobnie jak zmutowana α-synukleina w chorobie Parkinsona). Przyjmuje się, że za toksyczne działania białka odpowiada wzrost, a nie utrata aktywności, co przyczynia się do rozwoju stresu oksydacyjnego (Cudkowicz i wsp. 1997). Ciągła i postępująca degeneracja neuronów w ALS prowadzi do śmierci komórek, a przez to dochodzi do utraty kontroli pracy mięśni.

Kilka lat temu zaczęto rozważać zastosowanie białka EAAT2 jako potencjalnego czynnika, który mógłby zahamować proces chorobowy. EAATs (ang. *Excitatory Amino Acid Transporters*) to białka odpowiedzialne za transport aminokwasów pobudzających. Cała rodzina EAATs składa się z 5 białek, każde z nich ma specyficzne właściwości fizjologiczne i różną dystrybucję w centralnym układzie nerwowym. Białko EAAT2 jest głównie zlokalizowane w astrocytach (u gryzoni funkcjonuje pod nazwą GLT-1). Do funkcji tego białka należy regulacja stężenia i transport glutaminianu w przestrzeni pozakomórkowej. Od czasu kiedy stwierdzono znacznie podwyższony poziom glutaminianu u pacjentów z ALS, zaczęto łączyć to zjawisko z możliwym spadkiem poziomu białka EAAT2. Dokładna analiza HPLC potwierdziła znaczne obniżenie stężenia EAAT2. U 60–70% pacjentów z ALS odnotowano 30–90% spadek ilości EAAT2 zarówno w korze ruchowej, jak również w obrębie rdzenia kręgowego (Tanaka i wsp. 1997; Rothstein i wsp. 1995).

Podejmowane były próby leczenia i hamowania objawów choroby poprzez podania antyoksydantów lub bezpośrednio do naczyń wieńcowych białka EAAT2. Nie przyniosło to zamierzonego efektu, ze względu na ograniczone możliwości pokonania bariery krew-

-mózg. Dlatego też wzięto pod uwagę możliwość zastosowania terapii genowej. Jako nośnik genu zaproponowano wektor wirusowy AAV2. Wstępne badania wykazały, że wektor ten transdukował jedynie neurony w rdzeniu kręgowym, natomiast nie stwierdzono praktycznie żadnej transdukcji astrocytów. Zaobserwowano natomiast, że po podaniu wektora do mięśni wykazuje on zdolność przenikania do zakończeń nerwowych i wstecznego transportu do neuronów w rdzeniu kręgowym. Próby podania wektora z EAAT2 bezpośrednio do rdzenia kręgowego również nie dały praktycznie żadnej transdukcji astrocytów. Możliwe, że w przypadku tego schorzenia bardziej odpowiedni okazałby się wektor lentiwirusowy (Azzouz i wsp. 2000).

Przeprowadzono jedno badanie kliniczne z wykorzystaniem wektora AAV2-EAAT2 (US-0380) (http://www.abedia.com/wiley/record_detail.php?ID=380). Do chwili obecnej nie zostały jednak opublikowane wyniki tego badania.

**Choroba Canavana**

Jedną z pierwszych prób klinicznego zastosowania wektorów AAV do transferu genu do komórek mózgu jest terapia choroby Canavana. Jest to rzadko występująca leukodystrofia, dziedziczona w sposób autosomalnie recesywny, z początkiem w okresie prenatalnym. Jej przyczyną są mutacje w genie ASPA, kodującym N-acetyloaspartazę – enzym katalizujący rozkład kwasu N-acetyloasparaginowego (NAA) do asparaginianu i octanu. Efektem deficytu enzymatycznego, pojawiającego się u chorych na chorobę Canavana, jest akumulacja NAA w mózgu oraz innych tkankach, co w konsekwencji skutkuje postępującym zwyrodnieniem gąbczastym istoty białej i szarej, współistniejącym z rozlaną demielinizacją (Matalon i Michals-Matalon 2000; Baslow i wsp. 1997).

Obecnie nie ma skutecznej metody leczenia tego schorzenia, stosuje się jedynie leczenie objawowe. Czas życia pacjentów wynosi zwykle do 10 lat (Kumar i wsp. 2006). W związku z brakiem możliwości farmakologicznego leczenia choroby Canavana zaczęto poważnie rozważać zastosowanie terapii genowej. Próby, polegające na neurochirurgicznym podawaniu genu dla N-acetyloaspartrazy, wydają się być obiecujące (Leone i wsp. 2000). W efekcie w 2000 roku rozpoczęto I fazę badań klinicznych z wektorem wirusowym AAV2-ASPA (I.N.D.-9119). Według protokołu badania do terapii zakwalifikowano 21 pacjentów pomiędzy 3 a 96 miesiącem życia z pewnym rozpoznaniem choroby Canavana, opartym na kryteriach biochemicznych oraz wynikach badań genetycznych (Janson i wsp. 2002). Na pełne wyniki badań trzeba jeszcze poczekać. Opublikowane w 2006 roku wyniki, dotyczące 10 pacjentów, są obiecujące i potwierdzają bezpieczeństwo stosowanej terapii. Pacjentów zakwalifikowano do dwóch grup otrzymujących: $8\times10^{11}$vg/pacjenta (I grupa) oraz $1\times10^{12}$ vg/pacjenta (II grupa). U pacjentów nie odnotowano znaczących statystycznie różnic w stężeniach badanych cytokin (IL2, IL4, IL5, IL8, IL10, IL13, INF$\gamma$ oraz TNF$\alpha$). U większości pacjentów (7/10) nie zauważono pojawienia się odpowiedzi immunologicznej po podaniu wektora. U dwóch pacjentów zauważono niski, natomiast u trzeciego umiarkowanie wysoki poziom przeciwciał anty-AAV2 (McPhee i wsp. 2006).

**Późna dziecięca neuronalna lipofuscynoza ceroidowa**

Intensywne prace prowadzone są również nad wykorzystaniem wektorów AAV w leczeniu późnej dziecięcej neuronalnej lipofuscynozy ceroidowej (choroba Jansky'ego-Bielschowsky'ego**,** ceroidolipofuscynoza neuronalna typu 2, LINCL, ang. *Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis*). Jest to choroba neurodegeneracyjna, spowodowana mutacjami w genie CLN2, kodującym tripeptydylo-peptydazę I. Mutacja ta powoduje nadmierne odkładanie się złogów lipofuscyny wewnątrz neuronów (w zdrowych komórkach powinno dochodzić do trawienia i usunięcia tego związku z komórki). Przyczynia się to do stopniowego obumierania komórek nerwowych (Santavuori 1988). Choroba ta ujawnia się w późnym okresie niemowlęcym i daje objawy w postaci napadów padaczkowych, hipotonii mięśniowej, ataksji móżdżkowej, upośledzenia umysłowego i postępującego zaburzenia widzenia, prowadzącego do ślepoty. Czas życia pacjentów to zwykle 8–12 lat (Worgall i wsp. 2008). Obecnie brak skutecznej farmakoterapii tego schorzenia, stąd duże nadzieje budzi terapia genowa. Aktualnie trwają 3 badania kliniczne (prowadzone przez zespół naukowców z nowojorskiego Weill Cornell Medical College), których celem jest wprowadzenie do mózgu prawidłowej wersji genu CLN2 za pomocą wektorów AAV2. Pierwszą z prób klinicznych rozpoczęto w 2004 roku (NCT00151216). Jest to I faza badań klinicznych, obejmująca pacjentów w wieku od 3 do 18 lat z pewnym rozpoznaniem choroby, wcześniej nieleczonych z wykorzystaniem terapii genowej (Crystal i wsp. 2004). Opublikowane do chwili obecnej wyniki sugerują, że zastosowana terapia spowolniła postęp choroby. Wyniki te dotyczą dziesięciorga dzieci, którym podawano wektor AAV2-CLN2 ($1{,}8–3{,}2\times10^{12}$ vg/pacjenta; wektor podawany dokomorowo poprzez

6 otworów w czaszce, na dwie głębokości). Nie zaobserwowano żadnych poważnych działań niepożądanych, które można byłoby z całą pewnością przypisać podaniom wektora. U 4 uczestników badania stwierdzono pojawienie się krótkotrwałej humoralnej odpowiedzi immunologicznej po podaniu wektora (Worgall i wsp. 2008). Podsumowując: u uczestników badania odnotowano istotne statystycznie spowolnienie postępu choroby ocenianego za pomocą skali Weill-Cornell'a. Dało to podstawy do zainicjowania kolejnych badań klinicznych. W dwóch rozpoczętych w 2010 roku badaniach w celu zwiększenia wydajności transferu genu CLN2 postanowiono wykorzystać wektor AAV serotypu rh10. Pierwsze z tych badań jest na etapie I fazy (NCT01161576), docelowo zostanie włączonych 16 pacjentów w wieku 3–18 lat z pewnym rozpoznaniem choroby, którzy posiadają jedną z pięciu najczęściej występujących mutacji genu CLN2 i otrzymują średnio 6–10 punktów w skali Weill-Cornella. Ośmiu pacjentów otrzyma dawkę $9{,}0\times10^{11}$ vg/pacjenta i jeśli dawka ta będzie dobrze tolerowana, to w przypadku kolejnych ośmiu pacjentów zostanie zwiększona do $1{,}8\times10^{12}$ vg/pacjenta (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01161576). Drugie z rozpoczętych w 2010 roku badań z wykorzystaniem wektora AAVrh10-CLN2 to badanie fazy I/II (NCT01414985) mające być niejako rozszerzeniem badania opisanego powyżej. Do badania zostanie włączonych 8 chorych. Kryteria kwalifikacji są mniej rygorystyczne – uczestnikami mogą zostać pacjenci, u których występuje dowolna mutacja genu CLN2 i którzy uzyskują 0–10 punktów w skali Weill-Cornella. Planowane jest również zmniejszenie dawki wektora do $9\times10^{11}$ vg/pacjenta, aby możliwe było skrócenie czasu operacji, a tym samym zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia potencjalnych skutków ubocznych (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01414985). Oba badania są na etapie rekrutacji pacjentów.

## PODSUMOWANIE

Wirusy AAV są coraz szerzej stosowane jako wektory w terapii genowej. Na szczególną uwagę zasługuje potencjalne zastosowanie tych wirusów w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Pomimo braku spektakularnych efektów prowadzonych badań klinicznych uzyskane wyniki są obiecujące i stanowią solidny fundament do projektowania i prowadzenia kolejnych badań.

Praca powstała w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr N N401 0364 33.

## PIŚMIENNICTWO


1. Atchison RW, Castro BC, Hammon WM. Adenovirus-associated defective virus particles. Science 1965; 149: 754–756.
2. Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC i wsp. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. Hum Mol Genet 2000; 9: 803–811.
3. Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL i wsp. Long-term clinical improvement in MPTP- lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. Mol Ther 2006; 14: 564–570.
4. Bartus RT, Herzog C, Chu Y i wsp. Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. Mov Disord 2011: 26: 27–36.
5. Baslow MH, Resnik TR. Canavan disease. Analysis of the nature of the metabolic lesions responsible for development of the observed clinical symptoms. J Mol Neurosci 1997; 9: 109–125.
6. Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adenoassociated virus. Bioessays 1995; 17: 237–245.
7. ClinicalTrials.gov, http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00087789 [data cytowania 20.12.2011].
8. ClinicalTrials.gov, http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00876863 [data cytowania 20.12.2011].
9. ClinicalTrials.gov, http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985517 [data cytowania 11.01.2012].
10. ClinicalTrials.gov, http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01161576 [data cytowania 20.12.2011].
11. ClinicalTrials.gov, http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01414985 [data cytowania 20.12.2011].
12. ClinicalTrials.gov, http://www.abedia.com/wiley/record_detail.php?ID=380 [data cytowania 20.12.2011].
13. ClinicalTrials.gov, http://www.ceregene.com/alzheimers.asp [data cytowania 20.12.2011].
14. Crystal RG, Sondhi D, Hackett NR i wsp. Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Hum Gene Ther 2004; 15: 1131–1154.
15. Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE i wsp. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1997; 41: 210–221.
16. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A i wsp. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature 1996; 380: 252–255.
17. Ghosh A, Yue Y, Duan D. Efficient transgene reconstitution with hybrid dual AAV vectors carrying the minimized bridging sequences. Hum Gene Ther 2011; 22: 77–83.
18. Gonçalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. Virol J 2005; 2: 43.
19. Herzog CD, Dass B, Gasmi M i wsp. Transgene expression, bioactivity, and safety of CERE-120 (AAV2-neurturin) following delivery to the monkey striatum. Mol Ther 2008; 62: 1737–1744.
20. Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E i wsp. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci 2003; 991: 214–228.
21. Janson Ch, MCPhee S, Bilaniuk L i wsp. Clinical Protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. Hum Gene Ther 2002; 13: 1391–1412.
22. Jaźwa A, Rutkowski A, Gołda S. Optymalizacja otrzymywania wektorów AAV. Biotechnologia 2007; 3: 141–156.
23. Johnston LC, Su X, Maguire-Zeiss K i wsp. Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease. Mol Ther 2008; 16: 1392–1399.

24. Kaplitt MG, Feigin A, Tang Ch i wsp. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. Lancet 2007; 369: 2097–2105.
25. Kaplitt MG, Pfaff DW. Viral vectors for gene delivery and expression in the CNS. Methods 1996; 10: 343–350.
26. Khairallah MI, Kassem LA. Alzheimer's disease: current status of etiopathogenesis and therapeutic strategies. Pak J Biol Sci 2011; 14: 257–272.
27. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J i wsp. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. Science 2000; 290: 767–773.
28. Kumar S, Mattan NS, de Vellis J. Canavan disease: a white matter disorder. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2006; 12: 157–165.
29. Leone P, Janson CG, Bilianiuk L i wsp. Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease. Ann Neurol 2000; 48, 27–38.
30. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA i wsp. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. Lancet Neurol 2011; 10: 309–319.
31. Marks Jr WJ, Bartus RT, Siffert J i wsp. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. Lancet Neurol 2010; 9: 1164–1172.
32. Marks Jr WJ, Ostrem JL, Verhagen L i wsp. Safety and tolerability of intraputaminal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2–neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. Lancet Neurol 2008; 7: 400–408.
33. Matalon RM, Michals-Matalon K. Spongy degeneration of the brain, Canavan disease: biochemical and molecular findings. Front Biosci 2000; 5: D307–D311.
34. McCown TJ. Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. Curr Gene Ther 2005; 5: 333–338.
35. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG.. Inflammation in Parkinson's disease. Adv Neurol 2001; 86: 83–89.
36. McPhee SWJ, Janson CG., Li C i wsp. Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. J Gene Med 2006; 8: 577–588.
37. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 158: 97–129.
38. Nutt JG, Wooten G.F. Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. N Engl J Med 2005; 353: 1021–1027.
39. Olson L. NGF and the treatment of Alzheimer's disease. Exp Neurol 1993; 124: 5–15.
40. Resnik TR. Canavan disease. Analysis of the nature of the metabolic lesions responsible for development of the observed clinical symptoms. J Mol Neurosci 1997; 9: 109–125.
41. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI i wsp. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1995; 38: 73–84.
42. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 2001; 344: 1688–1700.
43. Rutkowski A, Jaźwa A, Józkowicz A i wsp. Wektory AAV w terapii genowej. Biotechnologia 2007; 3: 33–44.
44. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's Disease. Lancet 2004; 363: 1783–1793.
45. Santavuori P, Neuronal ceroid lipofuscinosis in childhood. Brain Dev 1988; 10: 80–83.
46. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S i wsp. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J Virol 2008; 82: 1399–1406.
47. Sun L, Li J, Xiao X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. Nat Med 2000; 6: 599–602.
48. Tanaka K, Watase K, Manabe T i wsp. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science 1997; 276: 1699–1702.
49. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR i wsp. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. Hum Gene Ther 2008; 19: 463–474.
50. Wullner U, Klockgether T. Inflammation in Parkinson's disease. J Neurol 2003; 250 (Suppl 1): 135–138.
51. Yan Z, Zhang Y, Duan D i wsp. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 6716–6721.

*Adres korespondencyjny:*
*Ilona Joniec-Maciejak*
*Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej*
*ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa*
*tel./fax 22 826 21 16*
*e-mail: ilona.joniec@wum.edu.pl*