

Genová terapie v radiační onkologii

Gene therapy in radiation oncology

Büchler T.

Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice, Praha

Souhrn

Východiska: Genová terapie je cílená změna genomu v cílových buňkách s léčebným záměrem. Genetický materiál se do buňky přenáší pomocí virových nebo nevirálních vektorů. V současnosti již existují metody pro vysoce přesnou, specifickou editaci genomu. Klinická aplikace genové terapie u pacientů léčených radioterapií se zaměřuje na zvýšení účinku radioterapie (tedy usmrcování nádorových buněk) a na minimalizaci poškození normálních tkání. Radiace a genová terapie mohou mít synergický účinek – radioterapie určuje čas a místo aktivace genového konstruktů a může zvýšit efektivitu genového přenosu. Existují rovněž strategie s přenosem genů zvyšující radiosenzibilitu cílové tkáně. Základní strategie genové terapie v onkologii zahrnují přenos genů pro zvýšení citlivosti nádoru na farmakoterapii nebo radioterapii, kompenzaci ztraceného nebo deregulovaného onkogenu/antionkogenu, blokování exprese onkogenu za použití antisense oligonukleotidů a zvýšení imunogenicity nádoru za účelem navození nebo stimulace protinádorové imunity (genová imunoterapie). **Cíle:** Cílem krátkého přehledového článku je poskytnout informace o strategiích a možnostech kombinací genové terapie a radioterapie. **Závěr:** Různé typy genové terapie a radioterapii lze kombinovat za účelem zvýšení lokoregionálního protinádorového účinku a snížení toxicity. Všechny aplikace genové terapie v kombinaci s radioterapií však zatím zůstávají experimentální.

Klíčová slova

radioterapie – genová terapie – editace genu – cílená genová oprava

Summary

Background: Gene therapy is a targeted alteration of the genome with therapeutic intent. Genetic material is transferred to the target cell by viral or non-viral vectors. Several methods for highly accurate and specific genome editing have been developed. Clinical applications of gene therapy in patients receiving radiotherapy aim at enhancing the effect of radiotherapy and minimizing damage to normal tissues. The effects of radiation and gene therapy may be synergistic. Radiotherapy determines the time and place of gene construct activation and can increase the efficiency of gene transfer. Some gene therapies increase the radiosensitivity of the target tissue. Basic strategies for gene therapy in oncology include gene transfer to increase tumor sensitivity to pharmacotherapy or radiotherapy, compensate/control the lost or deregulated oncogenes, block oncogene expression using antisense oligonucleotides, and increase tumor immunogenicity in order to induce or stimulate anti-tumor immunity. **Objectives:** The aim of this short review is to provide the information on strategies and possibilities of combinations of gene therapy and radiotherapy. **Conclusions:** Various types of gene therapy and radiotherapy can be combined to increase the locoregional antitumor effect and reduce toxicity. However, all applications of gene therapy in combination with radiotherapy currently remain experimental.

Key words

radiotherapy – genetic therapy – gene editing – targeted gene repair

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Onkologická klinika 1. LF UK
a Thomayerovy nemocnice
Václavská 800
140 59 Praha
e-mail: tomas.buchler@ftn.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 2. 2020

Přijato/Accepted: 15. 6. 2020

doi: 10.14735/amko2020516

Úvod

Genová terapie znamená zavedení genetického materiálu do buněk za léčebným účelem. Cílem je, aby se kompenzovaly nebo opravily abnormální geny nebo aby se v buňce vytvořil nový protein, který má v léčebné strategii prospěšný účinek (tab. 1) [1]. V současnosti již existují registrované léčebné metody používané v onkologii založené na genové imunoterapii – onkolytická viroterapie [2].

Genová terapie a radioterapie mají potenciálně synergický účinek, protože mají různé mechanismy účinku a zaměřují se na různé části buněčného cyklu. Genovou terapií je možné zvýšit radiosenzibilitu tkáně a naopak radioterapií zvýšit expresi přeneseného genu. Radioterapie je využívána pro nastartování a prostorovou determinaci exprese přenesených genů v přístupu, který využívá radiaci indukovatelné promotory [3,4].

Genová terapie je zaměřena na somatické buňky, změny genomu jsou tedy nehereditární. Genová terapie zaměřená na lidské zárodečné buňky je v současnosti ve většině zemí zakázána.

Přenos genů a vektory

K přenosu genů do buňky slouží vektory na bázi virů nebo neviróvé. K přenosu genů může docházet buď mimo tělo (*ex vivo*) s následným podáním modifikovaných buněk pacientovi, nebo přímo v těle nemocného po aplikaci vektoru s daným genovým konstruktem (*in vivo*). Protože se dosud nepodařilo vyřešit problém selektivního nebo alespoň preferenčního přenosu genů do nádorových buněk, byly v preklinických i velmi oje-

diněných klinických studiích kombinující genovou terapii s radioterapií vektory podávány intratumorálně (nebo u preklinických experimentů se transfer provedl *ex vivo*, zpravidla do xenograftu nádoru) [3,6].

Viry, které se pro přenos genů používají, jsou modifikovány tak, aby nezpůsobily infekci a zároveň preferenčně napadaly cílové buňky a ne ostatní buňky těla. Vazba a vstup viru do buňky je zprostředkován proteinovou obálkou na povrchu viru. Pro účely genové terapie je možné buď omezit, nebo naopak rozšířit rozsah buněk, které jsou vhodné pro transdukcí vektorem genové terapie. Viry, ve kterých byly endogenní virové obalové proteiny nahrazeny buď obalovými proteiny z jiných virů, nebo chimérickými proteiny, se označují jako pseudotypované viry.

K přenosu genů lze použít i atenuované bakterie, které po endocytóze do buňky uvolní genový konstrukt. Kromě toho lze pro transfer, ač s nižší účinností, použít fyzikální nebo chemické metody bez živých organismů (tab. 2) [1,5].

Editace genomu

Nové technologie umožňují modifikaci (editaci) specifického místa genomu v cílové buňce. Tyto metody umožňují vyřazení (knock-out) určitého genu nebo zavedení nové genetické informace (např. opravu poškozeného genu). Teoreticky tedy tyto metody umožňují opravu onkogenních mutací v nádorových nebo i nenádorových buňkách. Byly již klinicky využity jednak k výrobě modifikovaných protinádorových lymfocytů, jednak k opravě here-

Tab. 1. Strategie protinádorové genové terapie v onkologii [1,5].

Vložení genu pro zvýšení citlivosti nádoru na farmakoterapii nebo radioterapii (tzv. suicide gene).

Vložení genu, který by kompenzoval ztrátu nebo deregulaci onkogenů/ antionkogenů.

Blokování exprese onkogenu za použití tzv. antisense oligonukleotidů.

Zvýšení imunogenicity nádoru za účelem navození nebo stimulace protinádorové imunity (genová imunoterapie).

ditárních onemocnění kůže nebo kostní dřeně [7–9].

Systém CRISPR/Cas9

Genový konstrukt CRISPR (clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit – clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR asociované geny – CRISPR-associated genes) je systém pro cílené vnášení genetických změn do eukaryotických buněk založený na prokaryotickém imunitním systému. Do eukaryotických buněk je tento genový konstrukt vnesen např. pomocí lenti-viru. Sekvence RNA, která je součástí konstruktů, specificky rozpozná komplementární sekvenci DNA a enzym Cas9 tuto DNA v cílovém místě rozštěpí. Podle typu experimentu lze docílit vyštěpení části DNA, a tím i likvidace daného genu nebo vnesení nové genetické informace do místa zlomu [10–12].

Tab. 2. Vektory používané pro přenos genů [1,3,5].

Typ vektoru	Příklady	
neviróvé	subcelulární	elektroporace, lipozomy a další nanočástice
	bakteriální	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i>
	ssDNA viry	parvovirus
viróvé	dsDNA viry	adenoviry
		herpesviry (modifikovaný herpes simplex)
	ssRNA viry	lentiviry (modifikované viry HIV-1, HIV-2 a další)
	dsRNA viry	reoviry

Tab. 3. Aktivní studie kombinující virolytickou terapii a radioterapii podle [26].

Název studie	Indikace	Genová terapie	Fáze	Číslo studie
SBRT and oncolytic virus therapy before pembrolizumab for metastatic TNBC and NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic triple-negativní karcinom prsu	adenovirus kódující herpetickou tymidinkinázu	2	NCT03004183
Chemoradiation with enadenotucirev as a radiosensitiser in locally advanced rectal cancer	karcinom rekta	enadenotucirev – modifikovaný adenovirus s imunostimulačními geny	1	NCT03916510
HSV G207 alone or with a single radiation dose in children with progressive or recurrent supratentorial brain tumors	maligní supratentoriální nádory	G207 – virus herpes simplex modifikovaný tak, aby se množil jen v dělicích se buňkách	1	NCT02457845

HSV G207 – onkolytický virus herpes simplex, NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic, SBRT – stereotaktická radioterapie, TNBC – triple-negativní karcinom prsu

Metoda TALEN

Metoda TALEN (efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům – transcription activator-like effector nucleases) nerozeznává cílovou sekvenci pomocí RNA, ale pomocí speciální sekvence aminokyselin. Tato sekvence tedy funguje podobně jako transkripční aktivátory. Samotná modifikace DNA probíhá podobně, jak je popsáno výše [13].

Potenciální aplikace genové terapie v radiční onkologii

Klinické aplikace genové terapie u pacientů léčených radioterapií se zaměřují na zvýšení účinku radioterapie (tedy usmrcování nádorových buněk) a na minimalizaci poškození normálních tkání. Všechny aplikace genové terapie v kombinaci s radioterapií zatím zůstávají experimentální.

Využití promotorů indukovatelných záření v kombinaci s terapeutickými geny

Přístup využívá promotorů genů, které jsou exprimovány v reakci na ionizující záření. Expozice buněk ionizujícím zářením indukuje poškození DNA přímou interakcí s DNA a vytvářením reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS), což vede k transkripční aktivaci různých genů a k následné změně v jejich expresi. Dosud bylo identifikováno několik genů aktivovaných zářením nebo radiací generovanými ROS (např. geny rodiny *jun-fos*). Vesměs

se jedná o geny odpovědi na oxidační stres. Promotory těchto záření indukovatelných genů lze využít k řízení exprese terapeutických genů [4,14–17].

Příkladem využití této strategie je transkripční faktor rychle odpovídající na buněčný stres EGR1. Promotor EGR1 je možné kombinovat s terapeutickými geny v jednom konstruktivním použitelném pro genovou terapii. Po aplikaci záření dochází díky tomuto promotoru reaguujícímu na záření k zvýšené expresi žádaného „downstream“ proteinu [18,19].

Příkladem je kombinace promotoru EGR1 s genem pro tymidinkinázu pocházejícím z viru herpes simplex. Ta mění gancyklovir na cytotoxické produkty, především gancyklovir-5'-trifosfát. Pokud tedy pacientovi podáme gancyklovir, bude jej tymidinkináza v cílových buňkách měnit na cytotoxický metabolit. Protože tymidinkináza bude exprimována jen v ozářené tkáni, dochází k synergickému účinku radiace a genové terapie. Radioterapie v tomto případě určuje čas a místo cytotoxického působení metabolitů gancykloviru. Protože se tyto produkty mohou přes mezery spoje (gap junctions) šířit do buněk v okolí, dochází k tzv. bystander efektu a není nutná 100% účinnost transfekce nádorových buněk [18,19].

Manipulace genů radiční rezistence

Nejvíce zkoumaným přístupem je obnovení aktivity genu p53. Mutace nebo delece p53 je v nádorech častá, zhoršuje

buněčnou odpověď na poškození DNA, zabráňuje apoptózu a je silným prediktorem radiorezistence. Obnovení aktivity p53 pomocí virových vektorů kódujících p53 významně zvyšuje citlivost nádorových buněk na ozáření. V modelech nádorů s deficiencí p53 bylo v experimentu použito metody genové smyčky s pozitivní zpětnou vazbou (positive feedback genetic circuit). Příkladem je konstrukt složený z promotoru E6 citlivého na záření, promotoru R4 spouštěného proteinem p53 a samotného proteinu p53. Radiace aktivuje expresi p53 aktivací promotoru E6. Nově syntetizovaný p53 pak vazbou na promotor R4 zvyšuje svoji vlastní expresi pozitivní zpětnou vazbou. Tím dochází k vysoké produkci p53 a obnovení radiosenzitivity buněk [19,20].

Přenos genu vysokoafinitního membránového receptoru

Tento přístup se využívá v kombinaci s léčbou ligandy vázanými na radioizotopy. Genová terapie může zvýšit koncentraci produktu cílového genu na povrchu buněk, např. somatostatínového receptoru. Ten je pak cílem radiofarmaka, jehož účinnost se takto zvyšuje [21].

Modifikace mikroprostředí nádoru

Kombinace genové terapie s přenosem genu *TNF- α* s radioterapií vede k aditivnímu až synergickému zvýšení protinádorové účinnosti léčby. *TNF- α* hraje dů-

ležitou roli v protinádorové imunitní odpovědi a je inhibátorem nádorové angiogeneze [22].

Radioterapie v kombinaci s onkolytickou viroterapií

Intratumorální onkolytická viroterapie je novou modalitou imuno-onkologické léčby. Onkolytické viry se selektivně replikují v nádorových buňkách. Mají přímou onkolytickou aktivitu a také indukují imunitní odpovědi proti sobě i proti nádorovým buňkám. Lze využít DNA a RNA viry (herpetické, paramyxoviry, adenoviry a další), které jsou obvykle geneticky modifikovány (např. přenosem genů pro cytokiny nebo odstraněním genů chránících virus před imunitním systémem). Podávají se injekcí přímo do nádorového ložiska, ale imunitní odpověď působí i na vzdálené metastázy. Ukazuje se, že konkomitantní aplikace záření může zvýšit míru infekce nádorových buněk virem, jeho replikaci a genovou expresi [23]. Tato modalita genové terapie je dosud jediná, která byla zkoušena i klinicky. V malých studiích fáze I–II byli takto léčeni pacienti s karcinomem prostaty, hlavy a krku, gliovými nádory mozku, sarkomy a nemalobuněčným plicním karcinomem. Několik studií zařazovalo pacienty s dostupným nádorem bez omezení jeho typu [24].

Přehled aktivních studií kombinujících virolytickou terapii a radioterapii je uveden v tab. 3.

Nežádoucí účinky genové terapie v kombinaci s radioterapií

Mezi nejčastější vedlejší účinky po genové terapii patří přechodná horečka, symptomy podobné chřipce a přechodná elevace jaterních testů. Tyto příznaky jsou způsobeny imunitní reakcí proti vektoru. V dosud provedených klinických studiích s malým počtem pacientů nebyly zaznamenány specifické nežádoucí účinky pro genovou terapii podávanou konkomitantně s radioterapií a lokální nežádoucí účinky radioterapie odpovídaly očekáváním [6,24].

Při genové terapii, kdy dochází k integraci viru a/nebo genového konstruktů do hostitelské DNA (např. při použití retrovirů jako vektoru), může dojít k náhodné nežádoucí mutaci se změnou exprese onkogenů nebo antionkogenů a vzniku malignit. V klinické studii s genovou terapií kombinované imunodeficiencí, kde se použil retrovirový vektor, došlo k případům leukemie následkem inzerční mutagenese [25].

Závěr

Preklinické studie ukazují, že radiace zvyšuje absorpci a replikaci viru v nádorové tkáni a expresi transgenů. Mezi zářením a genovou terapií může docházet k synergickým interakcím bez závažné celkové či lokální toxicity. Rozvoj genové terapie nádorů je v současnosti limitován omezeným vychytáváním vektorů v nádorové tkáni po systémovém podání, relativně nízkou expresí transgenů v cílových buňkách a v neposlední řadě vysokou cenou této léčby.

Literatura

1. Das SK, Menezes ME, Bhatia S et al. Gene therapies for cancer: strategies, challenges and successes. *J Cell Physiol* 2015; 230(2): 259–271. doi: 10.1002/jcp.24791.
2. Chesney J, Puzanov I, Collichio F et al. Randomized, open-label phase ii study evaluating the efficacy and safety of talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced, unresectable melanoma. *J Clin Oncol* 2018; 36(17): 1658–1667. doi: 10.1200/JCO.2017.73.7379.
3. Kaliberov SA, Buchsbaum DJ. Chapter seven – cancer treatment with gene therapy and radiation therapy. *Adv Cancer Res* 2012; 115: 221–263. doi: 10.1016/B978-0-12-398342-8.00007-0.
4. Kamensek U, Sersa G. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiol Oncol* 2008; 42(3): 115–135.
5. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther* 2014; 2: 27. doi: 10.1186/2052-8426-2-27.
6. Teh BS, Aguilar-Cordova E, Vlachaki MT et al. Combining radiotherapy with gene therapy (from the bench to the bedside): a novel treatment strategy for prostate cancer. *Oncologist* 2002; 7(5): 458–466. doi: 10.1634/theoncologist.7-5-458.
7. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-Cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2531–2544. doi: 10.1056/NEJMoa1707447.
8. Eichstadt S, Barriga M, Ponakala A et al. Phase 1/2a clinical trial of gene-corrected autologous cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI insight* 2019; 4(19): e130554. doi: 10.1172/jci.insight.130554.

9. Mamcarz E, Zhou S, Lockey T et al. Lentiviral gene therapy combined with low-dose busulfan in infants with SCID-X1. *N Engl J Med* 2019; 380(16): 1525–1534. doi: 10.1056/NEJMoa1815408.
10. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
11. Zatloukalova P, Krejcir R, Valik D et al. CRISPR-Cas9 as a tool in cancer therapy. *Klin Onkol* 2019; 32 (Suppl 3): S13–S18. doi: 10.14735/amko20193513.
12. M. Simicek M, Growkova K, Hajek R. CRISPR in research and treatment of multiple myeloma. *Klin Onkol* 2019; 30 (Suppl 2): S68–S74. doi: 10.14735/amko20172568.
13. Miller JC, Tan S, Qiao G et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011; 29(2): 143–148. doi: 10.1038/nbt.1755.
14. Kufe D, Weichselbaum R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(4): 326–329. doi: 10.4161/cbt.2.4.495.
15. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP et al. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(6): 2419–2422. doi: 10.1073/pnas.90.6.2419.
16. Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme VP et al. Gene therapy targeted by ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24(3): 565–567. doi: 10.1016/0360-3016(92)91075-x.
17. Nuyts S, Van Mellaert L, Barbe S et al. Insertion or deletion of the Cheo box modifies radiation inducibility of Clostridium promoters. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4464–4470. doi: 10.1128/aem.67.10.4464-4470.2001.
18. Datta R, Rubin E, Sukhatme V et al. Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CarG elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(21): 10149–10153. doi: 10.1073/pnas.89.21.10149.
19. Lin M, Huang J, Shi Y et al. Influential factors and synergies for radiation-gene therapy on cancer. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015; 2015: 313145. doi: 10.1155/2015/313145.
20. Mao LW, Wang WD, Miao GQ. Inhibitory effects of wt-p53 regulated by radioinducible positive feedback genetic circuit on transplanted lung adenocarcinoma in nude mice. *Immunol J* 2010; 26(6): 473–476.
21. Buchsbaum DJ. Imaging and therapy of tumors induced to express somatostatin receptor by gene transfer using radiolabeled peptides and single chain antibody constructs. *Semin Nucl Med* 2004; 34(1): 32–46. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2003.09.005.
22. Chung TD, Mauceri HJ, Hallahan DE et al. Tumor necrosis factor- α -based gene therapy enhances radiation cytotoxicity in human prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 1998; 5(6): 344–349.
23. Adusumilli PS, Stiles BM, Chan M-K et al. Radiation therapy potentiates effective oncolytic viral therapy in the treatment of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005; 80(2): 407–409. doi: 10.1016/j.athoracsur.2005.01.048.
24. Toucheffeu Y, Vassaux G, Harrington KJ. Oncolytic viruses in radiation oncology. *Radiother Oncol* 2011; 99(3): 262–270. doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.078.
25. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3132–3142. doi: 10.1172/JCI35700.
26. U. S. National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. [online]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>.