

Piotr Kopiński

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski, Katedra Fizjologii i Patofizjologii

Komentarz do publikacji:

PERLMUTTER, DAVID H. *CURRENT AND EMERGING TREATMENTS FOR ALPHA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY. GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY. 2016; 12.7: 446*

Adres korespondencyjny:

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski,
ul. Herlinga Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
e-mail: pkopinski@afm.edu.pl

Alfa-1-antytrypsyna (A1AT) jest białkiem ostrej fazy, glikoproteina (52 kDa), kodowaną przez gen inhibitora proteaz (protease inhibitor, PI), umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 14 (14q31-32.3). Gen obejmuje 7 egzonów, z których cztery pełnią funkcje kodujące. A1AT syntetyzowana przez hepatocyty, działa jak silny inhibitor proteaz serynowych. Głównym celem A1AT jest elastaza neutrofilowa, uwalniana podczas zapalenia w wysokich stężeniach przez granulocyty obojętnochłonne. Gdy aktywność enzymu nie jest dostatecznie zrównoważona przez czynność A1AT, dochodzi do miejscowej destrukcji tkanki.

Niedobór A1AT (A1ATD) jest autosomalną recesywną chorobą genetyczną, objawiającą się niskimi stężeniami A1AT w surowicy. Do objawów wady należą: wczesna rozedma płuc, choroba wątroby i (rzadko) wielonarządowe zapalenie naczyń. Polimorfizm genu PI jest znaczny, poznano przynajmniej 100 odmian haplotypowych. Powiązано je z różnymi stężeniami surowiczymi A1AT i różną aktywnością inhibicyjną białka: prawidłowy allel oznaczono literą M,

częstym powodem niedoboru A1AT jest obecność allelów S i Z, pełny obraz niedoboru występuje u recesywnej homozygoty ZZ.

Omawiany artykuł pióra profesora Dawida Perlmuttera, nieprzypadkowo zamieszczony w renomowanym czasopiśmie *Hepatology* (dodatek: *Advances in Hepatology*) zwraca uwagę w przystępnej, wręcz poglądowej formie, na niedoceniany aspekt kliniczny zespołu niedoboru A1AT, jakim są – obok patologii płucnych – choroby wątroby, tj. marskość, rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*), a nawet rak z komórek przewodów żółciowych (*cholangiocarcinoma*). Produktami niektórych alleli genu PI są bowiem nieprawidłowe białka podlegające podczas obróbki potranslacyjnej wadliwemu fałdowaniu i wytrącaniu się w hepatocytach w postaci strątu. Uszkadza to komórki wątroby i prowadzi do marskości narządu, także w przypadkach, gdy nie obserwuje się rozedmy płuc (dzięki kompensacyjnemu działaniu drugiego, prawidłowego allelu, u heterozygot). Dotyczy to między innymi dzieci, nawet niemowląt. Częstość występowania chorób wątroby, powiązana z mutacjami genu PI jest zdaniem autora zaniżona, zwłaszcza gdy uwzględni się współwystępowanie w populacji interferujących czynników hepatotoksycznych, takich jak nadużywanie alkoholu i stłuszczenie mięszu.

Leczeniem z wyboru jest przeszczep wątroby, u części chorych jest on jednak z różnych przyczyn trudny lub niemożliwy do wykonania. Pomocniczym celem terapii jest opóźnienie rozwoju marskości u chorych. Nowe podejście polega na wdrożeniu leków, które w hepatocytach sprzyjają tzw. autofagii; termin oznacza zdolność komórki do samotrąwienia zbędnych organelli lub makromolekuł – w odniesieniu do niedoboru A1AT autor ma na myśli wewnątrzkomórkową degradację złogów nieprawidłowego białka. Skuteczna jest karbamazepina, stosowana od lat w chorobach OUN. Trwają poszukiwania bardziej wydajnych leków wspomagających autofagię (ang. *autophagy enhancing drugs*). W modelach zwierzęcych próbuje się między innymi technik antysensowych (odmiana terapii genowej) oraz terapii komórkowych, w których komórki macierzyste osobników z prawidłowym genem PI, różnicuje się w hepatocyty i wszczepia do wątroby chorych zwierząt.

Komentując ten bardzo wartościowy artykuł poglądowy pragnę zwrócić uwagę na kilka zagadnień.

Niedobór A1AT opisywany wyjściowo jako choroba autosomalna recesywna, jest nią w samej rzeczy tylko z punktu widzenia sztanarowego elementu zespołu chorobowego, jakim jest rozedma płuc. W wątrobie jest to zaburzenie o dziedziczeniu tzw. negatywnym dominującym, czyli do pojawienia się objawów chorobowych wystarczy defekt tylko jednego z dwóch allelów, oczywiście pod warunkiem, że dana mutacja nie spowoduje całkowitego zniesienia syntezy białka. O ile szacuje się, że tylko u 50% chorych z rozedmą płuc wywołaną niedoborem A1AT rozwija się marskość, o tyle liczne przypadki marskości o nie-

jasnej etiologii mogą być spowodowane heterozygotycznym genotypem A1AT (i mogą nie dawać objawów ze strony układu oddechowego). W populacji może to być zatem częsta przyczyna marskości; podejrzewając ten zespół, należałoby w naszym kraju tak pogłębić działania diagnostyczne, jak ma to miejsce w odczyźnie autora omawianego artykułu. Rozstrzygające byłoby wykonanie, pamiętając o wszystkich przeciwwskazaniach i możliwych powikłaniach, biopsji narządu w placówkach o wystarczającym zapleczu laboratoryjnym: konieczna byłaby możliwość zbadania obecności strąków nieprawidłowej izoformy A1AT w hepatocytach. Dotyczyłoby to zwłaszcza produktu allelu Z.

W moim przekonaniu, autor nie do końca docenił obiecującego kierunku terapii eksperymentalnych niedoboru A1AT, jakimi są próby terapii genowej. I tak, aktualnie kontynuowane są doświadczenia z terapią genetyczną A1AT *in vivo*; z reguły jest to tzw. suplementacyjna strategia terapii genowej (wyjątki polegające na strategii supresorowej, dotyczą właśnie hepatocytów i zostaną omówione niżej). Próbuje się w niej odnieść efekt leczniczy poprzez wprowadzenie genu kodującego A1AT do komórek i uzyskanie pożądanego stężenia aktywnej postaci białka w osoczu. Działania takie mogą zapobiec rozwojowi powikłań płucnych, ale nie wątrobowych. Poza tym można je zastąpić suplementacją parenteralną preparatów ludzkiego białka A1AT.

Głównym, praktycznie jedynym rozważanym obecnie narzędziem terapii suplementacyjnej są rekombinowane wektory wirusowe, które kodują jako transgen – cDNA genu A1AT. Terapie genowe A1AT obejmują z reguły stosowanie tych wektorów na trzech poziomach eksperymentalnych: 1) hodowle komórkowe ludzkich linii ustalonych (jako modele komórek i tkanek, które następnie mogłyby zostać poddane *in vivo* terapii suplementacyjnej transgenem A1AT); 2) zwierzęce modele doświadczalne (zwykle u gryzoni); 3) chorzy jako podmiot badań klinicznych.

Zaznaczyły się, w pewnym uproszczeniu, cztery kierunki badań:

Po pierwsze, użyto wektorów wyprowadzonych z wirusów towarzyszących adenowirusom (Adeno-associated virus, AAV) do transfekcji transgenem dla A1AT komórek mięśni szkieletowych. Wektory AAV charakteryzują się skuteczną transfekcją, wysoką ekspresją transgeny i długotrwałym utrzymywaniem się produktu w transferowanych komórkach. Są w powszechnym użyciu, jako pozbawione efektów ubocznych, czyli karcynogenezy, mutacji insercyjnych i ostrych odczynów układu immunologicznego gospodarza. Ich wadą jest mała pojemność konstruktyw: transfekcja komórek docelowych z zasady naśladuje cykl życiowy danego wirusa, stąd rozmiar wektorów i ich pojemność liczona ilością rekombinowanych zasad ma wielkość ograniczoną. W odniesieniu do A1AT nie jest to jednak problemem, gdyż cDNA genu mieści się w wektorze. Wytwarzanie przeciwciał neutralizujących przez układ immunologiczny gospodarza można ograniczyć rozsądną immunosupresją, jak już to czyni się w analogicznej sytuacji klinicznej – u chorych z niedoborem lipazy lipoproteinowej (LLp). Jedy-

ne dopuszczone do badañ klinicznych leki terapii genowej w niedoborze A1AT dotyczą wlaŝnie wektorów AAV. Jednak w wykonanych dotąd pojedynczych badaniach klinicznych wzrost ekspresji białka w osoczu dotyczył tylko części chorych i nie zabezpieczył ich przed rozwojem rozedmy płuc.

Wciz jednak ten kierunek terapii pozostaje obiecujący u chorych z niedoborem A1AT. Od czasu wspomnianych wyżej badañ dokonał się istotny postęp terapii genowych. Preparat o nazwie *Glybera*, zatwierdzony przez FDA i odpowiednie instytucje Unii Europejskiej, skutecznie poprawia stan chorych w innej recesywnej chorobie monogenowej, jaką jest niedobór lipazy lipoproteinowej skutkujący m.in. hiperchylomikronemi, akumulacj lipidów w narządach wewnętrznych oraz groźnymi nawrotami ostrego zapalenia trzustki. Terapia opiera się na podawaniu wlaŝnie wektora wirusa AAV – domięśniowo raz na trzy miesiące – który w tym przypadku koduje transgen ludzkiej LLp. Wykorzystuje się tutaj wyjątkową zdolnoŝć tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej do absorpcji DNA (komórki tej tkanki, praktycznie jako jedyne w warunkach *in vivo* są w stanie absorbowa „nagie” cząsteczki DNA, nawet plazmidy, tym bardziej więc podatne są na transfekcj wektorami wirusowymi).

Niezadowalająca skutecznoŝć transfekcji mięśni prążkowanych transgenem A1AT zaowocowała eksperymentami transfekcyjnymi z użyciem innych komórek – jak makrofagów i fibroblastów (zwłászcza pierwszych z nich). Są one w organizmie naturalnym dodatkowym ŝródłem A1AT, stąd przypuszczalnie, naturalna niejako ekspresja A1AT pochodząca z tych komórek, jest w warunkach doŝwiadczalnych istotnie wyŝsza, niŝ w próbach terapii genowej z użyciem mięśni prążkowanych. Kluczem do zrozumienia korzyŝci związanych z zastosowaniem tych komórek w suplementacji A1AT jest wlaŝnie „miejsce” ich stosowanie: dotchawiczo, a zwłászcza do jamy opłucnowej. Dzięki temu A1AT moŝe w relatywnie wysokim stężeniu hamowa rozedm płuc. Obiecujące wydają się tu badania przedkliniczne. Takie zastosowanie transfekowanych komórek okreŝla się jako technik *ex vivo* terapii genowej, gdyŝ komórki pobiera od chorego, hoduje, transfekuje, selekcjonuje i wprowadza do organizmu modelowych zwierząt. W sumie, w miejsce jednolitej terapii za pomocą zatwierdzonego preparatu (konstruktu inŝynierii genetycznej), planuje się często postulowaną indywidualizacj leczenia, co jednak utrudnia standaryzacj i znacznie podnosi koszty postpowañ terapeutycznych. Jak dotąd nie jest jasne, jaka byłaby wydajnoŝć tych działañ u chorych ludzi.

Oba powyŝsze kierunki badawczo-terapeutyczne mają zasadniczą wad. Mog wprawdzie przeciwdziała rozpadowi tkanki łącznej w płucach i zapobiega rozedmie oraz jej następstwom, ale nie powstrzymuj ewentualnej marskoŝci wątroby. Wypada krótko przypomnieć, ŝe patofizjologia marskoŝci u tych chorych jest następująca: produkcja nieprawidłowych kopii białka, brak ich wydzielania na zewnątrz hepatocytu, zaleganie polimerów wadliwych kopii A1AT, uszkodzenie komórki, przebudowa marska mięszu.

Stąd trzeci kierunek badań: Transfekcje komórek wątroby (hepatocytów) wektorami wirusowymi.

Należy zaznaczyć, że hepatocyty wykorzystuje się już od wielu lat jako dogodny cel komórkowy transfekcji terapeutycznych. Oprócz AAV, możliwe jest stosowanie innych wektorów wirusowych, jak gammaretro- i lentiwirusów. Wątroba jest naturalnym narządem docelowym terapii genowej niedoboru A1AT, gdyż to ona syntetyzuje i wydziela główne ilości tego białka. Samo dostarczenie wektora może odbywać się np. drogą krążenia wrotnego. W doświadczalnych próbach terapii genowej wprowadzono jedną cenną, oczywistą w przypadku hepatocytów, dodatkową modyfikację. Wektory są więc tak konstruowane, by powstały dwa transkrypty: jeden, typowo suplementujący czynność defektywnego genu (jak w dwóch opisanych wyżej kierunkach działań), drugi, jako szeroko rozumiana cząsteczka swoistego oligonukleotydu antysensowego (siRNA, rybozymu lub ostatnio mikroRNA) – blokująca i degradująca mRNA dla nieprawidłowej kopii omawianego białka (PIZ). To właśnie taką strategię terapeutyczną miał na myśli Profesor Perlmutter w swej publikacji. Jest to więc próba połączenia w jednym wektorze terapii genowej suplementacyjnej i supresorowej. Wyniki badań przedklinicznych są bardzo obiecujące. Pomocny jest postęp ostatnich lat w zakresie konstruowania coraz wydajniejszych wektorów, podnoszenie skuteczności transfekcji i wprowadzanie techniki ekspresji kilku transkryptów z jednego wektora. Takie działanie musi jednak, w drodze żmudnych eksperymentów przedklinicznych, rozwiązać wątpliwości co do realnego podniesienia stężenia A1AT w osoczu do wartości chroniących tkankę płucną. Co do drugiego celu (tych samych!) stosowanych wektorów, to wypada zauważyć, że celem zapobieżenia marskości wątroby konieczne będzie prawdopodobnie skuteczne i wydajne transfekowanie większości hepatocytów. Oznacza to podawanie terapeutycznego transgenu w bardzo wysokim mianie, wyższą groźbę powikłań (nawet karcynogenezy, tym bardziej, że akumulacja nieprawidłowych kopii białka w hepatocytach może promować ten proces) i oczywiste problemy z powtarzanymi transfuzjami wektora do krążenia wrotnego. Łatwiej przecież podawać okresowo zastrzyki domięśniowe.

O czwartym kierunku badań wspominał także autor. Rozwijając nieco przyczynkowy fragment omawianego artykułu wypada wspomnieć, że idzie w nim o stosowanie komórek macierzystych o potencji mezenchymalnej (ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej), transfekowanych wektorami wirusowymi kodującymi A1AT. I znowu należy tu odróżnić bardzo obiecujące wyniki badań przedklinicznych od realnych w najbliższych latach prób klinicznych terapii genowej niedoboru A1AT. W tym miejscu wypada poprzestać na konkluzji, że komórki macierzyste umiemy izolować, hodować, transfekować wektorami wirusowymi (retrowirusy, AAV, konstrukty HSV) oraz stosować *ex vivo*. Możliwe więc, że w niedalekiej przyszłości zostaną one użyte do zastąpienia chorych

hepatocytów, zapobieżenia marskości wątroby i do fenotypowej poprawy chorych z niedoborem A1AT.

Podsumowując ten fragment komentarza uważam, że obiecujące w perspektywie najbliższych lat techniki terapii genowej niedoboru A1AT dotyczą dwóch pierwszych wymienionych technik, czyli użycie wektorów wirusowych (głównie AAV) do wprowadzania transfekcji cDNA dla genu A1AT do mięśni lub do opłucnej. Punktem odniesienia jest sukces analogicznego pomysłu opisanego wyżej, jakim jest lek terapii genowej, *Glybera*.

Dodatkowo, w miarę rozwoju technik inżynierii genetycznej, należy zmieścić do kompleksowej naprawy hepatocytów, co bardziej przybliży nas do rzeczywistego wyleczenia ludzi chorych na niedobór A1AT (zwłaszcza w drodze opisanej wyżej terapii suplementacyjno-supresorowej, być może także dzięki użyciu komórek macierzystych). Działania takie mogą być użyteczne w znacznie szerszej licznie grupie osób z zaburzeniami wątroby, które genotypowo są heterozygotami i formalnie nie chorują na niedobór alfa-1-antytrypsyny.