



Genterapi ved kreft

TEMA

EIVIND HOVIG

Email: ehovig@radium.uio.no

OLA MYKLEBOST

Avdeling for tumorbiologi

STEINAR AAMDAL

Fagområdet klinisk kreftforskning

ERLEND B. SMELAND

Det Norske Radiumhospital

0310 Oslo

Avdeling for immunologi

Kreft er en folkesykdom og både antall nye krefttilfeller, og antall personer som dør av kreft, vil øke i de kommende årene. Det har vært en kunnskapseksplosjon når det gjelder vår forståelse av kreft og kreftutvikling de siste årene, og nye behandlingsprinsipper basert på denne kunnskapen prøves ut. Kreft skyldes endringer i gener (arveanlegg), og det er derfor en besnærende tanke å korrigere gendefektene i kreftceller ved hjelp av genterapi. Genterapi kan også tenkes benyttet for å styrke immunapparatet for å bekjempe kreftcellene, eller til å gjøre kreftcellene mer mottakelige for kjemoterapi og stråling. Internasjonalt er ca. 70 % av studiene som er igangsatt innen genterapi, rettet mot kreft. De to første genterapistudiene som er godkjent i Norge, gjelder også denne sykdomskategori. Foreløpig er seks pasienter i Norge behandlet med genterapi. De fleste studiene til nå er tidlige kliniske utprøvinger som primært er innrettet på å studere sikkerhet, anvendelighet og toksisitet. I flere av disse fase I- og II-studiene er det imidlertid også vist delvis tilbakegang av kreftsvulstene, og i sjeldne tilfeller komplett tilbakegang, selv om varig helbredelse ennå ikke er vist (dvs. mer enn fem års overlevelse). I enkelte studier, blant annet ved bruk av TP53-genterapi, er det sett effekter på svulstenes størrelse hos over halvparten av pasientene. Til nå er det kun påbegynt to fase III-studier og en fase II/III-studie, men resultatene fra disse er ennå ikke publisert. I tillegg er det startet en rekke nye studier basert på forbedringer av tidligere protokoller og/eller kombinasjoner med andre behandlingsstrategier. Det må und

erstrekes at de fleste kreftpasientene som er inkludert i genterapistudier til nå er pasienter med langtkommen sykdom, og at disse ikke representerer de pasienter som vil ha størst nytte av en slik behandling. Resultatene for enkelte av prinsippene som utprøves, må derfor ansees som lovende, selv om den kliniske betydningen må dokumenteres i større

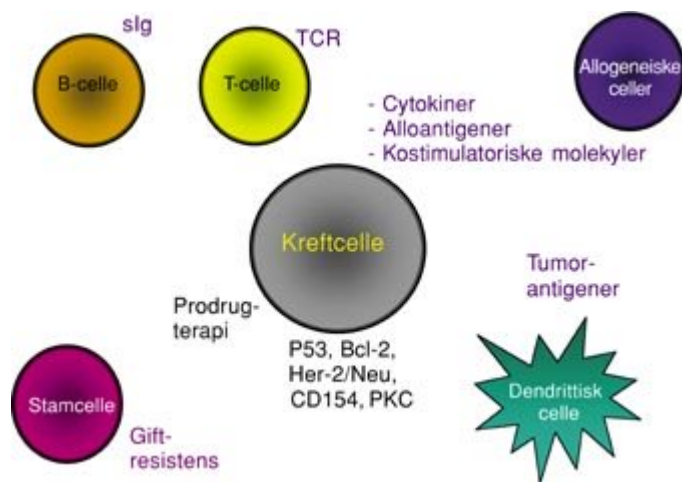
Kreft er den nest hyppigste dødsårsaken i Norge og antall nye krefttilfeller forventes å øke betydelig i de nærmeste årene (1). Det har vært en gradvis bedring i prognosen for kreftpasienter. Mens ca. 30 % overlevde fem år uten tilbakefall for 30 år siden, er femårsoverlevelsen nå ca. 52 prosent. Likevel vil dødeligheten øke i de kommende årene pga. økt krefthyppighet. Det er lite som tyder på omfattende forbedringer av overlevelse for kreftpasienter basert på modifikasjoner av dagens tradisjonelle behandlingsmetoder. Derfor er det stor interesse for å utvikle nye behandlingsstrategier basert på den biologiske kunnskapseksplorasjonen vedrørende kreft og kreftutvikling som har funnet sted de siste tiårene (2).

Strategier for kreftterapi

Kreftceller har et unormalt vekstmønster der regulering av cellevekst og -modning er kommet ut av kontroll. De molekylære mekanismene som leder til kreftutvikling, er i stor grad kartlagt i løpet av de siste årene. Kreftutvikling er en flertrinnsprosess som involverer endringer (mutasjoner) i gener som koder for molekyler som styrer cellevekst, celledød og DNA-reparasjon. Det er særlig tre sett av gener som er mutert i kreftceller. Onkogener (kreftgener) er gener som normalt stimulerer cellevekst, og disse blir overaktivert i kreftceller. Tumorsuppressorgener (bremsegener) hemmer normalt cellevekst, og blir inaktivert i kreftceller slik at celledelingen kommer ut av kontroll. I tillegg kan gener som normalt er med på å reparere skader i DNA, bli mutert i kreftceller. Vanligvis må det skje endringer i flere gener (4–10 ulike) for at en kreftsvulst skal utvikle seg. Hvilke sett av gener som er involvert, kan variere fra pasient til pasient. Noen genforandringer er hyppig forekommende i kreftsvulster, slik som mutasjoner i tumorsuppressorgenet TP53, som forekommer i om lag 50 % av alle krefttyper.

Et karakteristisk trekk ved kreft er evnen til fjernspredning (metastasing). Ved de fleste kreftformer er det spredning av kreften som tar livet av pasienten. Faren for metastasing er minst tidlig i forløpet, når svulstene er små. I prinsippet bør derfor en helbredende terapi av potensielt metastaserende kreft være systemisk, dvs. lik tilførsel i hele kroppen. Det setter store krav til effektiv målsøking og genoverføring.

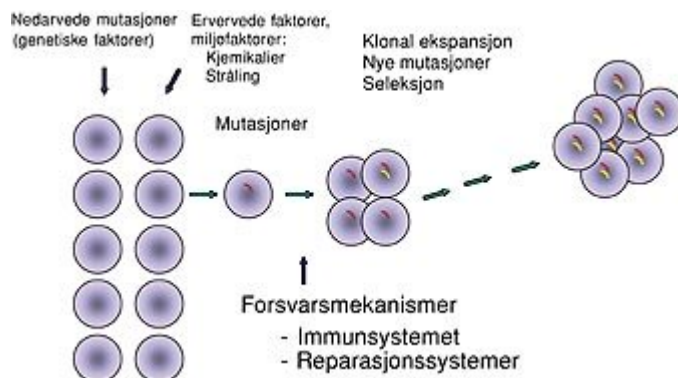
Flere genterapiforsøk siktes mest inn på å korrigere gendefektene i kreftcellene ved enten å tilføre kreftcellene gener som er inaktivert i svulsten (eksempel TP53), eller ved å hemme funksjonen av overaktiverede gener (fig 1). Selv om dette er teoretisk attraktive strategier, har det vist seg at effektiv genoverføring til alle kreftcellene i en pasient er vanskelig å oppnå med dagens metodologi, ikke minst fordi kreftsvulster er heterogene.



Figur 1 Skjematiske eksempler på genterapistrategier ved kreft (celletyper og målgener)

En annen strategi består i å overføre et gen som spalter og aktiverer et inaktivt stoff til en aktiv cellegift (medikamentaktivering) (fig 1). Konsentrasjonen av cellegiften blir derfor særlig stor i svulstområdet. Dette prinsippet utprøves bl.a. i behandling av hjernesvulster.

Kreftutviklingen vil påvirkes av ulike faktorer i kroppen (fig 2). Immunsystemet har i prinsippet evne til å gjenkjenne kreftceller som kroppsfremmede. Men når en kreftsvulst utvikler seg, vil den unnsnippe immunsystemet ved hjelp av ulike mekanismer. Imidlertid er det vist gjennom de senere årene at kroppens immunrespons mot kreftceller kan styrkes. Immunterapi ved kreft har således et klart potensial, og det er stor internasjonal aktivitet på dette feltet. En rekke genterapiforsøk tar sikte på å stimulere immunresponsen mot kreftcellene (fig 1).



Figur 2 Skjematisk modell av kreftutvikling, med enkelte viktige påvirkningsfaktorer

En vesentlig fordel med immunterapi er at man benytter spesifisiteten i immunsystemet for å drepe kreftcellene, og at genoverføring skjer til immunceller og ikke direkte til kreftcellene.

Når først immunsystemet blir aktivert, vil effektene kunne forsterkes gjennom kaskadeeffekter og potensielt ha effekt i hele kroppen og over lang tid. Man er således ikke avhengig av en optimal genoverføring til alle kreftcellene. Dermed er det ikke nødvendig at genoverføringen er 100 % effektiv eller at genet er lenge uttrykt.

I enkelte genterapi protokoller tar man sikte på å beskytte de cellene i kroppen som er mest følsomme for cellegift, nemlig blodcellene. Her overføres gener som motvirker effekten av cellegifter til stamceller i beinmarg som gir opphav til alle celler i blod. Dermed tåler disse høyere cellegiftkonsentrasjoner, og man kan gi høyere doser uten at beinmargsfunksjonen ødelegges.

Kliniske studier

Strategier for genterapi protokoller ved kreft kan inndeles i følgende tre hovedgrupper: terapi rettet direkte mot kreftceller, immunogenterapi og beskyttelse av normalceller.

Medikamentaktivering (prodrug). Introduksjon av "selvmordsgener" er den tilnærminingsmåten som er best studert både in vitro og in vivo, og omfatter de langt største pasientgruppene til nå. "Selvmordsgener" er en klasse gener som produserer proteiner med negative seleksjonsegenskaper, f.eks. ved at de kan omdanne et promedikament til en aktiv giftig substans. Det vanligst benyttede genet koder for enzymet tymidinkinase fra herpes simplex-virus (HSV-TK). Dette enzymet er normalt ikke til stede i humane celler, og det omdanner meget effektivt medikamentet gancyklovir (GCV) til et stoff som er giftig for delende celler.

For å få levert tilstrekkelig mengde av tymidinkinasegenet i svulstene, må celler (oftest museceller) i kultur infiseres med retrovirusvektor inneholdende genet for tymidinkinase og implanteres i målorganet. Der fortsetter cellene å produsere virus som integreres i celler som deler seg. Genoverføringseffektiviteten er imidlertid fremdeles lav (<10 % av kreftcellene), men pga. "naboeffekt" ("bystander"-effekt) vil også ikke-infiserte tumorceller kunne gå til grunne. Denne naboeffekten skyldes muligens kanaler mellom tumorcellene og gjør at det toksiske produktet av gancyklovir overføres til ikke-genmodifiserte tumorceller. Andre mekanismer bak denne "naboeffekten" er også foreslått, og økt forståelse for dette fenomenet kan føre til bedre effekt av denne formen for genterapi. De fremmede, virusproduserende cellene blir raskt brutt ned in vivo.

Man har antatt at en slik strategi, som angriper alle delende celler i nærheten av produsentcellene, er mest anvendelig i hjernen der det nesten bare er kreftcellene som deler seg. De første kliniske forsøk med denne strategien var derfor rettet mot hjernesvulster, og startet i desember 1992. Siden den gang er ca. 50 fase I/II-studier startet, som til sammen involverer mellom 250 og 300 pasienter. Siden overføringen viser seg å være meget lokal, er strategien også tatt i bruk ved en rekke andre kreftformer. Et titalls studier er også startet på pasienter med eggstokkkreft, hvor vektoren injiseres i bukhulen. En av disse protokollene benytter seg av injeksjon av inaktiverte, virusproduserende humane eggstokkkreftceller. Et økende antall studier ser imidlertid ut til å benytte seg av adenovirus som har en langt høyere overføringseffektivitet, men hvor bivirkningene foreløpig er større.

Så langt er resultatet av retrovirusbehandling av ca. 30 pasienter med hjernesvulst publisert (3, 4). Prosedyren har bare effekt hos pasienter med liten tumormasse, og overføringseffektiviteten er meget lav. Den mest betydelige rapporterte bivirkningen var hjerneødemer. En større fase III-studie, som inkluderer 246 pasienter, er nylig avsluttet. En første offentliggjøring fra studien (First international symposium on genetic anticancer agents (Rainov, N.G., Amsterdam 8 – 9 mars, 2000)) rapporterte at det ikke var noen forskjell i median progresjonsfri overlevelse mellom gruppene etter 12 måneder. I halvparten av de tilgjengelige residivbiopsiene kunne genoverføring påvises. To dødsfall som kunne knyttes til behandlingen, ble registrert. Pga. faglige innvendinger avsto Statens helsetilsyn å inkludere norske pasienter i denne studien.

Også gen/medikamentsystemet cytosin-deaminase (CD) er benyttet. Dette omdanner medikamentet 5-fluorocytosin (5FC) til det toksiske 5-fluorouracil (5FU). Bare én protokoll på pasienter med levermetastaser fra tarmkreft er publisert, men ingen resultater foreligger foreløpig.

En videre utvikling av "prodrugstrategien" er å benytte vevsspesifikke promotere for å målrette behandlingen mot kreftcellene. En pågående fase-I-undersøkelse benytter et adenoviruskonstrukt med tymidin-kinase (og gancyklovir) under kontroll av osteocalcinpromoteren. Denne promoteren aktiverer normalt transkripsjon i differensierte osteoblaster, men det er vist at transkripsjon også forekommer i flere svulsttyper. I fase-I-studien er dette utnyttet ved behandling av skjelettmetastaser ved prostatakreft (5).

GENOVERFØRING RETTET MOT ONKOGENER, TUMORSUPPRESSORGENER OG SIGNALMOLEKYLER

For å gjenopprette viktige prosesser som er forstyrret, kan man i kreftceller enten tilføre

gener som er defekte (tumorsuppressorgener), eller introdusere gener som regulerer og/eller hemmer aktiverte onkogener eller signalmolekyler.

TUMORSUPPRESSORGENER

p53-proteinets funksjon er spesielt viktig for kontroll av cellesyklus, initiering av DNA-reparasjon etter skade, opprettholdelse av genomisk stabilitet og induksjon av programmert celledød (apoptose). Injeksjon av retrovirus eller adenovirus med *TP53* i dyremodeller resulterer i tilbakegang av en rekke forskjellige svulsttyper, som ikke-småcellet lungekreft, leukemi, hjernesvulster, brystkreft, eggstokkreft, tarmkreft og nyrekreft (6, 7). Flere prekliniske studier og tidlige fase I-studier har vist effektiv genoverføring og lite bivirkninger. Adenovirusvektorer hvor *TP53*-genet er under kontroll av en cytomegaloviruspromoter ser ut til å være de mest effektive. Veksthemmingen er vist å være selektiv for celler med normal p53-produksjon. Innføring av TP53 i cellelinjer fra eggstokkreft har også vist en økt sensitivitet for kjemoterapi og stråleterapi som førte til økt apoptose. En "naboeffekt" tilsvarende den som er demonstrert ved HSV-TK "selvmordsgenterapi" er observert i flere studier. Det synes som en innføring av normalt p53 øker kjemosensitiviteten og radiosensitiviteten selv i svulster som ikke har TP53-mutasjon, eller hvor bare en liten fraksjon av cellene er mutert, sannsynligvis gjennom induksjon av apoptose (8). En fase I-studie viste at TP53 i en viral vektor kombinert med cisplatin, gav klinisk effekt i ikke-småcellet lungekreft ved direkte injeksjon av virus i svulsten (9).

Ca. 20 kliniske fase I/II-studier er i gang, og hovedsakelig ved ikke-småcellet lungekreft og eggstokkreft. Gjentatte injeksjoner direkte i svulsten tolereres godt, og tilbakegang eller stabilisering av tumormassen er observert i opptil halvparten av pasientene. Det må dog poengteres at responsene hovedsakelig er knyttet til de injiserte svulstene, og at det bare i enkelte tilfeller er observert tilbakegang av ikke-injiserte metastaser. Noen pasienter utvikler antistoffer mot adenovirusvektoren, og man finner også virusstimulert lymfocytproliferasjon, men ingen p53-relatert immunologisk reaksjon. Ved endobronkial injeksjon av virus til svulster innen rekkevidde for slik behandling var effekten betydelig (10). En større multisenter fase II/III-studie som skal inkludere 360 ovariekreftpasienter er satt i gang. Her randomiseres pasienter til behandling enten med kjemoterapi alene eller kjemoterapi + intraperitoneal injeksjon av adenovirusvektor med p53 i bukhulen. Per i dag er to norske pasienter inkludert i denne studien. Resultater av denne studien er ennå ikke publisert.

BRCA1 er et annet tumorsuppressorgen som ofte er mutert eller inaktivert både ved arvelig bryst- og eggstokkreft, men også somatisk i sporadiske tilfeller av disse kreftformene. Prekliniske studier har vist at overuttrykk av *BRCA1* kan gi veksthemming. Intraperitoneal injeksjon av retrovirusvektor som uttrykker *BRCA1* hemmer vekst av eggstokkreft. En fase I-studie som omfatter 12 ovariekreftpasienter, viste stabilisering av tumorstørrelse hos åtte av 12 pasienter og tilbakegang av svulstene hos tre (11). Imidlertid ble en oppfølgende fase II-studie avbrutt på grunn av manglende effekt (12). Fase I-studier med *BRCA1* med andre kreftformer, som prostatakreft og brystkreft, er også i gang. Av andre tumorsuppressorgener er det bare retinoblastomgenet som har nådd til fase I-studier.

ONKOGENER

Ett av de onkogenene som hyppigst er uttrykt i en rekke forskjellige kreftformer, som eggstokkreft, brystkreft, lungekreft og tykktarmskreft, er *Her-2/Neu/c-erbB2*. Genet koder for en vekstfaktorreseptor, og overuttrykk skyldes i hovedsak at genet er amplifisert (20–100 ganger). Prekliniske studier har vist at intracellulært uttrykk av antistoff rettet mot den ekstracellulære delen av *c-erbB2* hemmer tumorvekst. I en dyremodell av eggstokkreft, der genet for antistoff mot *c-erbB2* (scFv) er overført, er både tumorreduksjon og forlenget overlevelse vist. Kliniske fase I-studier på både bryst- og eggstokkreft er satt i gang ved bruk av denne strategien, men ingen resultater foreligger ennå. De siste årene er det utviklet antistoffer rettet mot den ekstracellulære delen av *c-erbB2*, og slike antistoffer utprøves nå i

pasientbehandling (Herseptin). Denne strategien synes meget lovende. Her er det imidlertid snakk om immunterapi og ikke genterapi.

En annen angrepsvinkel for å motvirke effekten av *c-erbB2*-overuttrykk, er bruk av virusproteinet E1A. En fase I-studie (13), hvor det er benyttet intraperitoneal injeksjon av E1A-genet i plasmidform pakket inn i et kation-liposom-kompleks, er nylig avsluttet, men resultater er ennå ikke publisert. En multisenter fase II-studie er påbegynt og foreløpige resultater viser liten toksisitet og stabilisering av sykdom. Det er også indikasjoner på at kombinasjonsbehandling av taxol og E1A vil kunne være en effektiv behandlingsform. Også andre kreftformer enn de med *c-erbB2*-overuttrykk vil bli inkludert, siden det nylig er vist at E1A-proteinet har en serie ulike cellulære angrepspunkter (14).

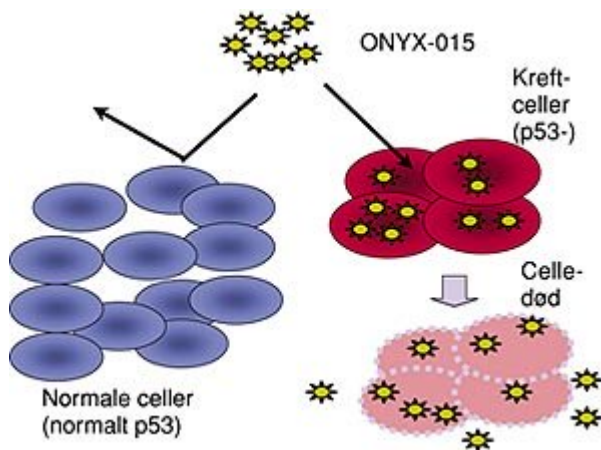
Nedregulering av andre onkogener er også forsøkt, men ved andre strategier enn ved ren genoverføring (se antisens- og ribozymbehandling).

ONKOLYTISKE "SMARTE" VIRUS

Det er mulig å konstruere virus som infiserer og dreper bare kreftceller, en strategi som kanskje ikke er genterapi i vanlig forstand. I motsetning til de fleste typiske strategier benytter man da replikasjonskompetente virus, som kan formere seg i kreftcellene, og etter at cellen ødelegges, slipper nye virus ut og kan infisere naboceller. På denne måten kan i prinsippet en enkelt injeksjon sentralt i tumor føre til en dominoeffekt som utsletter alle kreftcellene, men stopper ved normale celler (15). Slike virus kalles noe misvisende ofte for "smarte virus". En mer dekkende betegnelse vil være onkolytiske virus. Som for andre virusbaserte strategier er det et problem at partiklene ikke kan diffundere særlig langt i solid vev, så øyer av kreftceller som ligger bare litt atskilt kan være umulige å nå. Immunrespons vil være et større problem enn ved andre teknikker, fordi viruset trenger tid til å spre seg.

En av prototypene for slike strategier er det såkalte dl1520-adenoviruset (ONYX-015) (16, 17). Dette viruset er allerede under klinisk utprøving i kombinasjon med kjemoterapi. En fase II-studie viste nylig lovende resultater ved bruk av dette onkolytiske viruset i kombinasjon med cisplatin og 5-fluorouracil ved behandling av tilbakefall av plateepitelkarsinomer på halsen (18).

Adenovirus må blokkere aktiviteten til p53 og pRB for å kunne replikere i cellene. Fordi dl1520-adenoviruset har fått inaktivert E1B-55k-proteinet, kan det ikke blokkere p53 og replikere i normale celler. Kreftceller med inaktivert p53 derimot, kan infiseres og lyses av det modifiserte viruset (fig 3). Virkeligheten er mer komplisert, bla. fordi intakt p53 kan inaktiveres indirekte, og virusets livssyklus kan påvirkes av andre faktorer i kreftcellene (19). Det har vist seg at også behandling av krefttilfeller med normalt p53 kan gi tilsvarende effekt. Nylig er en forklaring på dette fenomenet blitt klarlagt (20). Det viser seg også at andre deler av signalveier der p53 inngår kan være defekte. Det arbeides med forskjellige strategier for å omgå disse problemene (19, 21).



Figur 3 Skjematisk modell for genterapi rettet mot p53-proteinet

Mens reovirus ikke er kjent å gi sykdom hos mennesker og ikke dreper normale celler i kultur, viser det seg at de kan lysere kreftceller med et overaktivt onkogen, kalt ras (19). I prekliniske studier har man oppnådd meget lovende resultater (22, 23), og det arbeides nå med å få tillatelse til klinisk utprøving.

Både herpesvirus og parvovirus, som kan være patogener for mennesker, er også tatt i bruk (15). Et hovedtrekk er at siden proliferasjonskompetente virus benyttes, blir sikkerheten viktigere enn ved andre typer genterapi. Onkolytiske virus kan også benyttes for å overføre immunstimulerende eller "prodrug"-aktiverende gener, som vil kunne gi betydelig "naboeffekt" på deler av svulsten som ikke lyseres.

ANTISENS- OG RIBOZYMBEHANDLING

Geners aktivitet kan hemmes ved å innføre såkalte antisensmolekyler i cellene. Dette er nukleinsyrer som er komplementære til den kodende sekvensen, og kan blokkere genet ved å binde seg passivt, eller kan ødelegge gentranskriptene ved å kutte dem i to (ribozymer). Antisens- og ribozymbehandling er blitt benyttet i relativt liten grad i kliniske kreftstudier. Hittil er det startet omtrent ti fase I-studier med bruk av antisens rettet mot ulike onkogener eller signalmolekyler, og da oftest i kombinasjon med andre former for konvensjonell eller genterapirelatert behandling.

Det er publisert resultater fra to studier med bruk av antisens mot BCL-2. BCL-2 spiller normalt en viktig rolle i regulering av celledød, og er deregulert i en del kreftformer. I en studie av lymfomer ble det påvist økt celledød og delvis regresjon av svulstvev hos to av ni pasienter (24). Nylig ble det dessuten publisert en fase II-studie ved melanom, der det hos seks av 14 pasienter ble vist tilbakegang av svulsten (25).

En fase II-studie er nylig påbegynt der det benyttes et kjemisk modifisert antisensmolekyl rettet mot proteinkinase C α for behandling av pasienter med malignt melanom (føflekkreft) og ikke-småcellet lungekreft. Antisensmolekylet er administrert intravenøst. Resultatene fra fase I-studier viste effekter på tumorvekst hos et par av pasientene. Det Norske Radiumhospital deltar i denne studien, og per desember 2000 var seks pasienter inkludert.

Av pågående studier med plasmider som produserer antisensmolekyler inne i kreftcellene, kan nevnes antisensbehandling mot insulinlik veksfaktor I ved glioblastom, antisens-c-myc ved prostatakraft og brystkreft, og antisens-c-fos intrapleuralt og intraperitonealt ved brystkreft. Studier med bruk av antisens mot epidermal vekstfaktorreseptor og mot TGF- β 2 er også startet. En pågående kombinasjonsbehandling med introduksjon av nytt gen i kombinasjon, med nedregulering med antisensmolekyler av et annet gen, pågår også. Kronisk myelogen leukemi skyldes en translokasjon mellom genene bcr og abl i hematopoetiske stamceller. For å helbrede pasienten må alle celler som inneholder denne translokasjonen fjernes. Dette er svært vanskelig å oppnå ved konvensjonell behandling. I den pågående fase I-studie benyttes et retrovirus som inneholder genet for kjemoterapiresistensfaktoren dihydrofolat-reduktase, koblet til en antisenssekvens mot translokasjonsgenet. Hensikten her er å kombinere kjemoterapiresistens til de normale cellene, samtidig som de resterende tumorcellene blir nedregulert for det transformerende translokasjonsgenet (26).

En av de angrepsvinklene som ligger nærmest kliniske studier, er sannsynligvis bruk av ribozym for nedregulering av angiogenesefaktoren VEGF, et protein som er implisert i metastaseprosessen.

Immunogenterapi

I flere eksisterende genterapistudier benyttes ulike prinsipper for å stimulere immunforsvaret. Hensikten er å gjøre kreftcellene mer immunogene slik at det spesifikke immunapparatet, dvs. T- og B-lymfocytter stimuleres. Det uspesifikke immunapparatet kan

også stimuleres til å bidra i bekjempelsen av kreftceller. En oversikt over prinsippene for de eksisterende studiene innen immunogenterapi ved kreft er gitt i tabell 1.

Tabell 1 Prinsipper for immunogenterapistudier	
Type genprodukt	Gen overført
Cytokiner	IL-2, IL-4, IL-6/sIL6-R, IL-7, IL-12, TNF, IFN- γ , IFN- β , GM-CSF, lymfotaktin
Alloantigener/xenoantigener (vevsforlikelighetsantigener)	HLA-B7, HLA-A2, HLA-B13, H2-K(k)
Virusantigener	Humant papillomavirus (HPV E6 og E7)
Tumorantigener	MUC-1, MART-1, Gp100, CEA, PSA, HPV, tyrosinase, idiotype
Celleinteraksjonsmolekyler	CD80 (B7.1), CD154 (CD40L)
Modifiserte antistoffmolekyler og T-cellereseptorer	sFv, TCR Ab, CC49-Zeta TCR

CYTOKINER

Cytokiner er naturlig forekommende proteiner som virker som kommunikasjonsmolekyler mellom celler. Cytokiner spiller en viktig rolle ved å regulere aktiviteten til immunforsvaret og har vist til dels betydelige effekter mot kreft i dyremodeller. Behandling med cytokiner vanskeligjøres ved at mange har betydelige bivirkninger, medfører høye kostnader og gir begrensede effekter hos mennesker når de er applisert på denne måten. Ved å benytte celler som er transfektert (DNA innført kunstig) i kultur med ett eller flere cytokingener for så å injiseres i tumor, kan man oppnå en høy lokal produksjon av cytokinet. Flere ulike celletyper er benyttet, slik som autologe (kroppsegne) og allogene (fra andre individer) tumorceller, fibroblaster, autologe lymfocytter og dendrittiske celler (antigenpresenterende celler). Autologe kreftceller er vanskelige å få transfektert i tilstrekkelig antall, og trenden går mot økende bruk av dendrittiske celler (D1-celler). Cytokinene kan påvirke kreftcellene på ulike måter, både direkte og indirekte. Det er flere fase II-studier som er påbegynt med bruk av cytokingener, og i flere studier er det observert økt spesifikk antitumor-immunitet og i noen tilfeller lokal tumorregresjon hos enkelte pasienter (IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ) (16 – 25). Flere av de nyere protokollene benytter kombinasjoner av flere cytokiner.

ALLOANTIGENER

Fremmede vevsforlikelighetsantigener (alloantigener) er svært potente til å stimulere en immunrespons. Ved å overføre gener for alloantigener til svulstene, enten ved direkte injeksjon i svulsten av DNA i kompleks med liposomer, eller via celler som er transfektert med slike gener, kan man oppnå både en anti-alloantigen respons, men også en respons mot andre tumorantigener. En serie studier har benyttet liposommediert transfeksjon av HLA-B7-genet til pasienter som mangler HLA-B7 (93 prosent av den såkalte kaukasiske rase mangler HLA-B7). Flere fase II-studier og en fase III-studie, der HLA-B7 genterapi kombineres med kjemoterapi, er også i gang. Ved behandling av malignt melanom (føflekkreft) og ulike karsinomer er det oppnådd vellykket genoverføring og uttrykk. Flere pasienter har fått reduksjon av svulststørrelsen (27 – 41). Hos noen få pasienter har man også oppnådd regresjon av andre svulster enn dem som var injisert.

TUMORANTIGENER

I løpet av de siste årene er en rekke molekyler som uttrykkes av kreftceller og som kan medføre spesifikk immunrespons identifisert. Flere kliniske studier er påbegynt der man benytter adenovirale eller vacciniavirus-baserte vektorer for å overføre gener som koder for kjente tumorantigener (CEA, MART-1, gp100, MUC-1 m.fl.) Hovedsakelig er in vivo-behandling benyttet. De fleste av disse protokollene er i en tidlig fase. Spesifikk antitumor T-cellerespons er bl.a. vist ved intradermal injeksjon av CEA-genet i en vacciniavirus-vektor, dog hos et lite antall pasienter (42). Nyere protokoller benytter dels transfeksjon av dendrittiske celler med gener som koder for tumorantigener, og dels benyttes også

immunisering med nakent DNA (DNA-vaksinasjon).

CELLEINTERAKSJONSMOLEKYLER

Celleinteraksjonsmolekyler spiller en viktig rolle for en effektiv immunrespons. Det er gjort prekliniske og tidlige kliniske forsøk på å overføre celleinteraksjonsmolekyler til svulstceller for å øke cellenes immunogenisitet. I en nylig publisert undersøkelse ved kronisk lymfatisk leukemi ble genet for CD40-ligand (CD154) overført til kreftceller som så ble satt tilbake til pasientene (43). Resultatene viste økt ekspresjon av kostimulatoriske molekyler på kreftcellene (inkludert en naboeffekt på ikke-transfekterte celler *in vivo*), økte nivåer av immunstimulatoriske cytokiner i plasma samt reduksjon i andel leukemiceller i blod og i lymfeknutestørrelse.

MODIFISERTE ANTISTOFF/TCR-GENER

Enkelte studier har benyttet genkonstrukt av immunglobulin (antistoff)- eller T-celle-reseptorgener. Et interessant prinsipp består i å benytte sFv (single chain Fragment variable) av tumoridiotypen ved B-celle neoplasier. I en B-cellesvulst uttrykker alle kreftcellene et identisk immunglobulinmolekyl. Dette vil derfor representere et unikt tumorantigen (idiotype). Antiidiotypebaserte strategier har hatt en viss klinisk suksess ved lymfekreft av B-celletype, og det er startet genterapistudier basert på idiotypiske sFv genkonstrukt. Bruk av sFv genfragmenter alene gir beskjeden immunrespons, men prekliniske data fra mus, der sFv er koblet til en del av tetanustoksingenet, har vist meget lovende resultater (44). En klinisk studie basert på dette prinsippet er nylig startet, og det planlegges at DNR skal delta i denne studien. Prekliniske forsøk med kobling av sFv til kjemokiner har også gitt interessante resultater.

Beskyttelse av normalceller

Høydose kjemoterapi etterfulgt av autolog beinmarg/stamcelle-transplantasjon, benyttes for utvalgte pasienter hvor annen terapi har liten sannsynlighet for å lykkes. Best effekt av høydose kjemoterapi oppnås ved høye repeterte doser, men med fare for pancytopeni (lavt nivå av blodceller) assosiert med livstruende infeksjoner. For å motvirke dette har man forsøkt flere strategier for å overføre gener til beinmarg/stamceller i den hensikt å gjøre disse resistente mot de kjemoterapiregimene som benyttes. De gener som har vært benyttet, er først og fremst det såkalte "multidrug resistance"-genet (MDR1-genet) og genet for et reparasjonenzym, O⁶ metylguanin-DNA-metyltransferase (MGMT). *In vitro*-studier har vist effektiv genoverføring til stamceller *ex vivo*. De fleste fase I-studiene viser imidlertid liten eller ingen genoverføring av de transplanterte cellene *in vivo*. Et titalls fase I- og fase I/II-studier er i gang. Disse involverer ca. 50 pasienter med eggstokkreft, hjernesvulster og lymfekreft. Konklusjonene foreløpig er at det er store problemer med å oppnå effektiv *in vivo*-overføring til stamceller, og forekommer overføring, varer den i svært kort tid (45). Andre gener utprøves preklinisk, men det er derfor tvilsomt om denne strategien er fornuftig å anvende i fremtiden. De nyeste data på høydosebehandling av de store kreftformene som brystkreft og eggstokkreft, viser imidlertid at høydosebehandlingen har mindre effekt enn tidligere antatt.

Konklusjon og trender

For genterapi rettet mot tumorsuppressorgener eller onkogener er strategiene som baserer seg på å tilføre et normalt TP53-gen til svulster hvor dette genet er inaktivert, de mest lovende. Resultatene av de større pågående fase II/III-studiene blir viktige for videre veivalg innen denne terapiformen. Effekten av kombinasjon med annen konvensjonell behandling, som kjemoterapi og/eller strålebehandling, blir også viktig å evaluere fordi kombinasjonsbehandlingen kan se ut til å gi synergistiske effekter. Identifisering av nye tumorsuppressorgener som viser seg å være inaktivert i et større antall svulster, vil også etter hvert gi langt flere kandidater for denne type behandling.

De fleste immunterapiprotokollene er tidlige utprøvinger, og for de fleste av disse foreligger ikke publiserte resultater. Ex vivo-studier har dominert bildet, men i det siste er det kommet en økende andel in vivo-studier. Flere av studiene har vist akseptabel genoverføring, og spesifikk immunrespons er rapportert i flere studier. Partielle tumorresponser er oppnådd i noen studier, og eventuell stabilisering av sykdomsutvikling, uten at effektene kan sies å være dramatiske. Stort sett er det observert lokale effekter på tumor (delvis tilbakegang av størrelsen), men i enkelttilfeller er det også observert tilbakegang av fjernmetastaser. De fleste studier har vist beskjedne bivirkninger. Spredning av replikasjonskompetente virus til miljøet er ikke observert. De fleste pasientene som er inkludert i disse tidlige studiene har hatt langtkommen, metastaserende kreft, og har i tillegg vært gjennombehandlet med cellegift. Både stor tumorbyrde og en redusert allmentilstand er ugunstige faktorer med tanke på optimal immunterapi, men foreløpig foreligger ikke data fra pasienter i tidlig fase med små tumorvolumer. Et annet problem er hvordan spesifikk immunrespons skal måles, selv om det er gjort forbedringer i det siste, bl.a når det gjelder påvisning av antigenspesifikke T-celler. Videre trender inkluderer blant annet bruk av terapeutiske kreftvaksiner basert på DNA-vaksinasjon og genoverføring til dendrittiske celler, som er meget potente antigenpresenterende celler. Videre utprøves i stigende grad kombinasjonsbehandling.

Det er rapportert lovende prekliniske data i dyreforsøk av en kombinasjon av prodrug genterapi og stråleterapi. Det er likevel klart at strategien med innføring av selvmordsgener krever betydelig preklinisk innsats før den kan karakteriseres som lovende. Overførings effektiviteten må økes, enten ved å øke kommunikasjonen mellom tumorcellene eller ved å benytte andre vektorsystemer som adenovirus eller modifiserte lentivirus. Bivirkninger av adenovirus må overvinnes, f. eks. ved bruk av nyere generasjoner virus.

Ved ekstern levering av antisensmolekyler vil lokalisering og omsetning av molekylene både intracellulært og i kroppen være avhengig av molekylene kjemiske struktur. Kunstige modifiseringer som hittil er under utprøving har bestått av kjemisk modifiserte antisensmolekyler. Trolig vil også antisensmolekyler modifisert på flere andre kjemiske måter snart komme til klinisk utprøving. Fosforotioatmolekyler er generelt lite toksiske, og normalt sees hovedsakelig "immunstimulatoriske" effekter.

Det knytter seg også forventninger til bruk av angiogenesehemmere i kreftbehandling (46). Eksperimentelle undersøkelser tyder på at både vekst av primærtumor, innvekst og metastasering av kreftceller krever nydanning av blodkar. Karynydanning kan eksperimentelt hindres ved bruk av hemmere, og modulering av angiogenese er vist å kunne gi tumorregresjon i dyremodeller. En mulig strategi er å tilføre angiogenesehemmere ved hjelp av genterapi.

LITTERATUR:

1. Norges offentlige utredninger. Norsk kreftplan – omsorg og kunnskap. NOU 1997: 20. Oslo: Statens forvaltningstjeneste, Seksjon statens trykning, 1997.
2. Genterapi – status og fremtidige muligheter innen klinisk medisin. SMM-rapport nr. 1/2000 (www.sintef.no/smm).
3. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 1997; 3: 1354 – 61.
4. Maria BL, Friedman T. Gene therapy for pediatric brain tumors. *Semin Pediatr Neurol* 1997; 4: 333 – 9.
5. Koeneman KS, Kao C, Ko SC, Yang L, Wada Y, Kallmes DF et al. Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J Urol* 2000 18: 102 – 10.
6. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 763 – 71.

7. Tong XW, Kieback DG, Ramesh R, Freeman SM. Molecular aspects of ovarian cancer. Is gene therapy the solution? *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 109 – 33: VIII.
8. Horio Y, Hasegawa Y, Sekido Y, Takahashi M, Roth JA, Shimokata K. Synergistic effects of adenovirus expressing wild-type p53 on chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 537 – 44.
9. Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, Connors D, Mack M, Doerksen L et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 609 – 22.
10. Weill D, Mack M, Roth J, Swisher S, Proksch S, Merritt J et al. Adenoviral-mediated p53 gene transfer to non-small cell lung cancer through endobronchial injection. *Chest* 2000; 118: 966 – 70.
11. Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC et al. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1 [published erratum appears in *Nat Genet* 1998; 19: 102]. *Nat Genet* 1996; 12: 298 – 302.
12. Tait DL, Obermiller PS, Hatmaker AR, Redlin-Frazier S, Holt JT. Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1708 – 14.
13. Xing X, Zhang S, Chang JY, Tucker SD, Chen H, Huang L et al. Safety study and characterization of E1A-liposome complex gene-delivery protocol in an ovarian cancer model. *Gene Ther* 1998; 5: 1538 – 44.
14. Ueno NT, Bartholomeusz C, Herrmann JL, Estrov Z, Shao R, Andreeff M et al. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 250 – 9.
15. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996; 274: 373 – 6.
16. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997; 3: 639 – 45.
17. Hall AR, Dix BR, O'Carroll SJ, Braithwaite AW. p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med* 1998; 4: 1068 – 72.
18. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000; 6: 879 – 85.
19. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 1998; 17: 3351 – 62.
20. Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, Biederer CH, Hann BC, Lipner EM et al. Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat Med* 2000; 6: 1128 – 33.
21. Nishizaki M, Fujiwara T, Tanida T, Hizuta A, Nishimori H, Tokino T et al. Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1015 – 23.
22. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2559 – 63.
23. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 1998; 282: 1332 – 4.
24. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P et al. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1997; 349: 1137 – 41.
25. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet*. 2000 18; 356: 1728 – 33.
26. Zhao RC, McIvor RS, Griffin JD, Verfaillie CM. Gene therapy for chronic myelogenous leukemia (CML): a retroviral vector that renders hematopoietic progenitors methotrexate-resistant and CML progenitors functionally normal and nontumorigenic in vivo. *Blood* 1997; 90: 4687 – 98.

27. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998; 4: 321 – 7.
28. Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR et al. A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 1997; 80: 401 – 12.
29. Ellem KA, O'Rourke MG, Johnson GR, Parry G, Misko IS, Schmidt CW et al. A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44: 10 – 20.
30. Simons JW, Jaffee EM, Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA et al. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res* 1997; 57: 1537 – 46.
31. Bowman L, Grossmann M, Rill D, Brown M, Zhong WY, Alexander B et al. IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. *Blood* 1998; 92: 1941 – 9.
32. Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R, Robbins PD, Elder E, Haluszczyk C et al. Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 1996; 795: 440 – 54.
33. Rochlitz CF, Jantschkeff P, Bongartz G, Dietrich PY, Quiquerez AL, Schatz C et al. Gene therapy with cytokine-transfected xenogeneic cells in metastatic tumors. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 531 – 7.
34. Mackiewicz A, Rose-John S. More about genetically modified tumour vaccines. *Gene Ther* 1999; 5: 147 – 8.
35. Nemunaitis J, Bohart C, Fong T, Meyer W, Edelman G, Paulson RS et al. Phase I trial of retroviral vector-mediated interferon (IFN)-gamma gene transfer into autologous tumor cells in patients with metastatic melanoma. *Cancer Gene Ther* 1998; 5: 292 – 300.
36. Moller P, Sun Y, Dorbic T, Alijagic S, Makki A, Jurgovsky K et al. Vaccination with IL-7 gene-modified autologous melanoma cells can enhance the anti-melanoma lytic activity in peripheral blood of patients with a good clinical performance status: a clinical phase I study. *Br J Cancer* 1998; 77: 1907 – 16.
37. Stopeck AT, Hersh EM, Akporiaye ET, Harris DT, Grogan T, Unger E et al. Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 341 – 9.
38. Hui KM, Ang PT, Huang L, Tay SK. Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 1997; 4: 783 – 90.
39. Nabel GJ, Gordon D, Bishop DK, Nickoloff BJ, Yang ZY, Aruga A et al. Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15388 – 93.
40. Gleich LL, Gluckman JL, Armstrong S, Biddinger PW, Miller MA, Balakrishnan K et al. Alloantigen gene therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a phase-I trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 1097 – 104.
41. Rubin J, Galanis E, Pitot HC, Richardson RL, Burch PA, Charboneau JW et al. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. *Gene Ther* 1997; 4: 419 – 25.
42. Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, Richmond E, Pedicano JE, Zhu MZ et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol* 1999; 17: 332 – 7.
43. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96: 2917 – 24.
44. King CA, Spellerberg MB, Zhu D, Rice J, Sahota SS, Thompson AR et al. DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nat Med* 1998; 4: 1281 – 6.

45. Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C et al. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1998; 16: 165–72.
46. Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999; 58: 17–38.
-

Publisert: 7. september 2016. Tidsskr Nor Legeforen. DOI:

© Tidsskrift for Den norske legeforening 2020. Lastet ned fra tidsskriftet.no