

Terapia genowa w chorobie wieńcowej. Badanie VIF-CAD

Gene therapy for coronary artery disease. VIF-CAD study

Krzysztof Kukula¹,
Maciej Dąbrowski¹,
Zbigniew Chmielak¹,
Jacek Kądziera¹,
Mirosław Skwarek¹,
Mariusz Kłopotowski¹,
Lidia Chojnowska¹,
Maciej Matecki²,
Przemysław Janik²,
Adam Witkowski¹,
Witold Rużyłło¹

¹ Instytut Kardiologii, Warszawa

² Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2003 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Witolda Rużyłło grant na realizację projektu badawczego pt. „Terapeutyczna angiogeneza w zaawansowanej chorobie wieńcowej („no-option patients”) z zastosowaniem *phVEGF-A165/FGF* (pVIF) podawanego metodą przeszskórną. Badanie z podwójnie ślepą próbą.

Streszczenie

Pomimo rozwoju technik rewaskularyzacji i postępu w zakresie leczenia farmakologicznego, niektórych pacjentów z chorobą wieńcową, ze względu na zaawansowanie zmian miażdżycowych, nie można skutecznie leczyć żadną ze standardowych metod. W takich przypadkach nadzieję na poprawę ukrwienia mięśnia sercowego i ustąpienie dolegliwości dławicowych wiąże się z terapią genową. W poniższej pracy omówiono metody terapeutycznej angiogenezy oraz jej dotychczasowe wykorzystanie w chorobie wieńcowej ze szczególnym uwzględnieniem badania VIF-CAD.

Słowa kluczowe: terapia genowa • angiogeneza • choroba wieńcowa • VEGF • bFGF • VIF-CAD

Summary

Despite constant progress in revascularization methods and pharmacotherapy, some patients with disseminated coronary artery disease cannot be effectively treated using standard modalities. Other, novel therapies are being investigated. Of these, gene therapy holds great promise. It may enhance collateral circulation, leading to ischemic symptom resolution. This paper describes briefly current experience with gene therapy in refractory coronary disease, concentrating on the design of the VIF-CAD clinical trial.

Key words: gene therapy • angiogenesis • coronary artery disease • VEGF • bFGF • VIF-CAD

Wpłynęło: 24-01-2011

Zaakceptowano: 26-01-2011

Opublikowano: 30-03-2011

Adres do korespondencji:

dr med. Krzysztof Kukula,
Instytut Kardiologii, Klinika
Kardiologii i Angiologii
Interwencyjnej, Samodzielna
Pracownia Hemodynamiki,
ul. Alpejska 42,
04-628 Warszawa,
e-mail: kkukula@ikard.pl,

WSTĘP

Terapia genowa w chorobach, dla których brak obecnie leczenia przyczynowego, budzi od szeregu lat duże zainteresowanie badaczy [1–3]. Niestety, pokładane w niej nadzieje pozostają w dużej mierze niespełnione. W kardiologii główny nurt badań nad terapią genową dotyczy leczenia zaawansowanej choroby niedokrwiennej serca z zastosowaniem genów dla czynników wzrostu naczyń [4–9]. Pomimo rozwoju technik rewaskularyzacji i postępu w zakresie leczenia farmakologicznego, ze względu na zaawansowanie zmian miażdżycowych od 5 do 12% pacjentów z chorobą wieńcową, nie można skutecznie leczyć żadną ze standardowych metod [10,11]. Terapeutyczne wzmocnienie procesu angiogenezy w obrębie mięśnia sercowego mogłoby polepszyć krążenie oboczne, prowadząc do ustąpienia objawów dławicowych [1]. We wcześniejszych próbach doświadczalnych wykazano, że stymulacja tkanek czynnikami wzrostu naczyń, takimi jak VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*; naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), FGF (ang. *fibroblast growth factor*; czynnik wzrostu fibroblastów), HGF (ang. *hepatocyte growth factor*; czynnik wzrostu hepatocytów) indukuje proces angiogenezy [2,8,9]. Aktywne formy czynników wzrostu naczyń mają krótki okres półtrwania we krwi, charakteryzując się też nasilonymi działaniami niepożądanymi przy zastosowaniu ogólnoustrojowym. Dlatego obecne badania koncentrują się na próbach wywołania angiogenezy w wyniku transfekcji komórek mięśnia sercowego genami dla czynników wzrostu naczyń.

RODZAJE STOSOWANYCH SUBSTANCJI ANGIOGENNYCH

Ze względu na spodziewaną skuteczność, w badaniach najczęściej wykorzystuje się VEGF, a zwłaszcza jego najaktywniejszą formę zawierającą 165 aminokwasów (VEGF-A165) oraz FGF, a głównie zasadową formę FGF (bFGF, czyli FGF-2). Aby doszło do transfekcji, geny podaje się albo w postaci plazmidu (najmniejsza skuteczność transfekcji, ale prawdopodobnie największe bezpieczeństwo), w sprzężeniu z wektorem wirusowym lub w postaci liposomalnej. Prowadzone są również prace nad innymi, nowymi metodami transfekcji [3].

Generalnie można wyróżnić pięć różnych metod podania genów do mięśnia sercowego. Pierwsza z nich, najprostsza, to podanie dowieńcowe. Druga – poprzez układ żylny serca, za pomocą odwróconej perfuzji. Trzecia forma polega na bezpośrednim podaniu do mięśnia sercowego od strony nasierdžia (najczęściej operacyjnie, ale również poprzez cewnik z igłą wprowadzony do układu żylnego, z wykorzystaniem nakłucia mięśnia od strony zewnętrznej

poprzez żyłę). Czwarta, to podanie bezpośrednie do mięśnia od strony wsierdžia za pomocą specjalnego cewnika. Wreszcie piąta, to podanie roztworu zawierającego geny do światła lewej komory podczas operacji kardiochirurgicznej, przy zamkniętym odpływie krwi z lewej komory [12]. Jakkolwiek pierwsze próby tego typu leczenia były zachęcające, badania kontrolowane nie wykazały jednoznacznie jego skuteczności [4–9]. Poniżej przedstawiamy krótki przegląd dotychczasowych prac.

BADANIA EKSPERYMENTALNE

Badania kliniczne poprzedzone były licznymi eksperymentami na zwierzętach lub preparatach tkankowych [13–16]. Wykazano w nich, że stymulacja za pomocą czynników wzrostu prowadzi do rozwoju drobnych naczyń krążenia obocznego lub przypominających je struktur.

BADANIA KLINICZNE

Kolejnym krokiem w badaniach nad terapeutyczną angiogenezą w sercu były pierwsze próby kliniczne. Większość z nich przeprowadzono bez grupy kontrolnej i bez randomizacji. Najważniejsze scharakteryzowano w Tabeli 1.

Kliniczne badania kontrolowane dotyczące terapii genowej i leczenia choroby wieńcowej czynnikami wzrostu naczyń stanowią jak dotąd nieliczną grupę. Przedstawione poniżej podsumowanie obejmuje większość z nich.

W 2001 roku Vale i wsp. opublikowali rezultaty badania, w którym wzięło udział jedynie 6 pacjentów, ale było to pierwsze badanie z zastosowaniem transendokardialnego podania plazmidu u ludzi [4].

W tym samym roku Kleiman i wsp. przedstawili wyniki pracy, w której stosowali FGF-2 podawany dowieńcowo u pacjentów z chorobą wieńcową bez możliwości rewaskularyzacji. W ciągu 6 miesięcy obserwacji nie wykazano różnicy w porównaniu do placebo [25].

W randomizowanym badaniu o akronimie FIRST, z podwójnie ślepą próbą, również podawano dowieńcowo rekombinowany FGF-2. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami. Pacjenci leczeni FGF-2 wykazywali tendencję do hipotensji [5].

W badaniu AGENT obejmującym 79 pacjentów (także randomizowanym, z podwójnie ślepą próbą) stosowano gen dla FGF-4 połączony z wektorem adenowirusowym (Ad5-FGF4), podawanym dowieńcowo [6]. W grupie badanej zaobserwowano polepszenie tolerancji wysiłku.

Tabela 1. Wybrane badania kliniczne bez randomizacji, w których wykazywano potencjalną skuteczność terapeutycznej angiogenezy w chorobie niedokrwiennej serca.

Badanie	Czynnik wzrostu i wektor	Sposób podania	Główne kryterium włączenia	Czas obserwacji	Wyniki
Losordo [17]	VEGF-A165, plazmid	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	10 tygodni	Poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Rosengart [18]	VEGF 121, wektor adenowirusowy	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	1 miesiąc	Poprawa w SPECT, klasy CCS i tolerancji wysiłku
Laham [19]	FGF-2	Podanie dowieńcowo	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	1-6 miesięcy	Poprawa tolerancji wysiłku, wzrost grubości i lokalnej kurczliwości mięśnia sercowego w MR, poprawa jakości życia
Symes [20]	VEGF-A 165, plazmid	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji, klasa CCS III i IV	3 miesiące	Poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Hedman [21]	VEGF 121, wektor adenowirusowy	Dowieńcowo	Choroba wieńcowa, podanie w czasie angioplastyki	6 miesięcy	Zmniejszenie odsetka restenozy w stencie
Unger [22]	FGF-2	Dowieńcowo	Stabilna choroba wieńcowa	1 miesiąc	Wzrost średnicy tętnic nasierdziowych
Schumacher [23]	FGF-1	Od zewnątrz do miokardium	Trójnaczyniowa choroba wieńcowa z istotnymi zmianami w obwodowym odcinku GPZ	Od 12 tygodni do 3 lat	Nasilenie angiogenezy w okolicy dystalnej GPZ, poprawa w SPECT, zmniejszenie zapotrzebowania na nitraty
Seiler [24]	GM-CSF	Podskórnie i dowieńcowo	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	2 tygodnie	Wzrost wskaźnika przepływu wieńcowego; zmniejszenie zmian w EKG po inflacji balonu w tętnicy wieńcowej

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; CCS – klasa czynnościowa wg Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego; MR – rezonans magnetyczny; GM-CSF – czynnik wzrostu linii granulocytarnej i mieloidalnej; GPZ – gałąź przednia zstępująca, SPECT – badanie izotopowe metodą tomografii emisyjnej, EKG – elektrokardiogram.

Do podobnego badania – AGENT-2 – włączono 52 pacjentów. Poprawę ukrwienia oceniano w badaniu SPECT. W zakresie globalnej perfuzji nie uzyskano istotnej statystycznie poprawy [7].

AGENT-3 i AGENT-4 to kolejne badania z wektorem adenowirusowym dołączonym do FGF-4, podawanym dowieńcowo, do których planowano włączyć po kilkuset pacjentów. Rekrutację przerwano, gdy okazało się, że nie ma szans na osiągnięcie istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych [26].

Losordo i wsp. opublikowali badanie, w którym stosowano plazmid VEGF-2 podawany transendokardialnie [27]. Wzięło w nim udział 19 pacjentów. Zaobserwowano tendencję do zmniejszenia dolegliwości dławicowych oraz wydłużenia czasu wysiłku.

Euroinject One to randomizowane badanie z podwójnie ślepą próbą, w którym zastosowano transendokardialne podanie plazmidu kodującego VEGF-A165 przy użyciu systemu NOGA [28]. Do

badania włączono 80 pacjentów. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych, ale wykazano regionalną poprawę kurczliwości w obszarze podania plazmidu. Ponadto, zarówno w ocenie badaniem SPECT, jak i systemem NOGA zaobserwowano regionalną poprawę perfuzji mięśnia sercowego [29].

VIVA, to randomizowane badanie z podwójnie ślepą próbą, w którym zastosowano aktywny rekombinowany VEGF u 178 pacjentów, początkowo podawany dowieńcowo, a następnie dożylnie [11]. Do 60 dnia nie zaobserwowano różnic między grupą badaną a placebo. Po 120 dniach obserwacji wystąpiła tendencja do poprawy w zakresie tolerancji wysiłku w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej.

W niedawno opublikowanym badaniu NORTHERN stosowano znacznie wyższe dawki plazmidu kodującego VEGF niż w badaniu Euroinject One [30]. Mimo to w grupie badanej w porównaniu z kontrolną nie zaobserwowano poprawy ani w zakresie perfuzji ocenianej w badaniu izotopowym, ani

w zakresie objawów klinicznych. Badanie to pokazało jednak, że zastosowanie wysokich dawek plazmidu kodującego VEGF jest bezpieczne. Rodzi to nowe możliwości eksperymentalne, gdyż jednym z podstawowych problemów terapii genowej jest skuteczność transfekcji komórek „*in vivo*”.

Z powyższych danych wynika, że nie ma jak dotąd jasnej odpowiedzi na pytanie, czy terapia genowa choroby wieńcowej może być skuteczna przy użyciu obecnie stosowanych metod. Z tego względu w Instytucie Kardiologii w Warszawie zaplanowano i przeprowadzono badanie VIF-CAD, którego protokół i założenia przedstawiono poniżej.

BADANIE VIF-CAD

Badanie VIF-CAD było współfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji RP oraz Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny (obecnie Naukowa Fundacja Polpharmy). Zastosowano w nim plazmid dwucistronowy kodujący naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) [31]. Głównym punktem końcowym była ocena perfuzji mięśnia sercowego w badaniu izotopowym metodą tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (SPECT). Poza monitorowaniem leczenia, metoda ta umożliwia również zlokalizowanie docelowego obszaru mięśnia sercowego dla podania plazmidu. Dla weryfikacji wyników SPECT oraz dla poszerzenia diagnostyki o ocenę segmentalnej kurczliwości lewej komory (która powinna ulec zwiększeniu w następstwie poprawy ukrwienia) zaproponowano równoległą ocenę wymienionych parametrów metodą rezonansu magnetycznego (MR).

W badaniu zastosowano metodę bezpośredniego podania plazmidu do mięśnia sercowego. Wydaje się ona najskuteczniejszym sposobem podania genów dla czynników wzrostu, gdyż straty podanego preparatu są wtedy najmniejsze.

Jak wcześniej wspomniano, stosowane są trzy metody transfekcji komórek: podawanie „nagiego” plazmidu zawierającego odpowiedni fragment kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), kompleksu liposomalnego zawierającego plazmid lub użycie wektora wirusowego. Pierwsze dwie metody są stosunkowo proste technicznie, ale mało skuteczne – przy ich użyciu do komórek dociera poniżej 1% podanego DNA. Jednak DNA wprowadzone w ten sposób do komórek nie integruje się z genomem, co podnosi bezpieczeństwo transfekcji i sprawia, że wprowadzony gen dla czynnika wzrostu podlega ekspresji jedynie przez pewien ograniczony czas, z reguły 4–6 tygodni. Bardziej efektywne jest

użycie wektora wirusowego. W przypadku komórek nie proliferujących, takich jak kardiomiocyty, w grę wchodzi głównie użycie wektora adenowirusowego lub AAV (ang. adeno-associated virus). Wektor adenowirusowy może jednak powodować efekt cytopatyczny, reakcję zapalną i wywoływać odpowiedź immunologiczną. Z tego względu w badaniu VIF-CAD zdecydowano o zastosowaniu plazmidu.

Pacjenci

Do badania włączono 52 pacjentów, z których 33 przydzielono losowo do grupy leczonej, a 19 otrzymało plazmid placebo (grupa kontrolna). W chwili rekrutacji wszyscy chorzy pozostawali w III lub IV klasie CCS (bólę dławicowe przy małym wysiłku lub w spoczynku), otrzymywali optymalne leczenie farmakologiczne zgodne z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i nie kwalifikowali się do rewaskularyzacji metodami standardowymi. Frakcja wyrzucania lewej komory u każdego chorego wynosiła powyżej 35%, a w badaniu SPECT z dipirydamolem wykazano istotne odwracalne zaburzenia perfuzji. Charakter zmian w naczyniach wieńcowych chorych kwalifikowanych do badania wykluczał możliwość dalszej rewaskularyzacji za pomocą angioplastyki lub pomostowania naczyń wieńcowych (zapis badania angiograficznego chorych był każdorazowo oceniany przez kardiologa interwencyjnego i kardiochirurga). Z badania wykluczano chorych ze złą funkcją skurczową lewej komory (EF <35% stwierdzoną w echokardiografii lub wentrykulografii), po świeżo przeżytym zawale mięśnia sercowego (<3 tygodnie), pacjentów z chorobą nowotworową, autoimmunologiczną lub ciężką chorobą ogólną, pacjentki w wieku rozrodczym, jak również chorych nie wyrażających zgody na udział w badaniu.

Metodyka

Głównym punktem końcowym badania były zmiany w ukrwieniu mięśnia sercowego, oceniane w badaniach SPECT i MR, wykonanych po 5 miesiącach od zabiegu, w porównaniu do wyników badań wyjściowych. Niestety, na skutek niedostatecznej ilości i jakości danych nie można było w sposób wiarygodny ocenić punktu końcowego związanego z oceną MR. Oceniono porównawczo jedynie badania SPECT.

Drugorzędowymi punktami końcowymi badania były: a) zmiana wydolności wieńcowej oceniana w teście wysiłkowym EKG, b) zmiana ukrwienia miokardium lub powstanie nowych kolaterali widocznych w badaniu angiograficznym, c) poprawa kliniczna w zakresie tolerancji wysiłku i jakości życia, d) wystąpienie poważnych sercowych objawów niepożądanych (MACE), tj. zgonu, zawału serca

oraz hospitalizacji z powodów kardiologicznych – ocena wyników obserwacji odległej, e) zmiana stężenia FGF i VEGF w surowicy, f) monitorowanie ewentualnych działań niepożądanych, związanych z podaniem plazmidu, g) monitorowanie zdarzeń mogących mieć związek z nadmiernym działaniem VEGF lub FGF w miejscu i poza miejscem podania.

Badanie perfuzji mięśnia sercowego Tc-99m-MIBI SPECT

Badanie techniką SPECT wykonywano w spoczynku (po podaniu nitrogliceryny) i w wysiłku (po podaniu i.v. dipirydamolu), stosując protokół 2-dniowy (0,3 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku) lub 1-dniowy (0,11 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku). Warunki akwizycji badań SPECT: matryca 64×64, kąt rotacji gammakamery – 180 stopni, liczba projekcji – 68, kolimator – niskoenergetyczny wysokorozdzielczy. Czas akwizycji jednej projekcji w protokole 2-dniowym wynosi 25 sek, w protokole 1-dniowym – 52 sek. w spoczynku i 13 sek., w wysiłku. Warunki rekonstrukcji badań SPECT: filtr przed-rekonstrukcyjny Butterwortha o częstotliwości odcięcia równej 0,4 częstotliwości Nyquista i o rzędzie równym 7. Stosowano MIBI produkcji OBRI-POLATOM (Świerk, Polska).

Klonowanie bicistronowego wektora pVIF

Konstrukt pVIF jest plazmidowym wektorem ekspresyjnym kodującym czynniki o charakterze angiogennym. Wklonowana kasetka jest dwucistronowa. Zawiera ona: gen kodujący VEGF165 (pubmed X62568), sekwencję IRES (na podstawie matrycy wklonowanej do wektora pIRES-EGFP, clontech, cat. #6064-1) oraz sekwencję kodującą bFGF (pubmed E02544). Sekwencja IRES pochodzi z wirusa encephalomyocarditis (ECMV) i zapewnia translację dwóch wklonowanych genów na bazie jednej bicistronowej sekwencji mRNA. W kasce sekwencje VEGF, jak i FGF poprzedzane są przez sekwencje sygnałowe umożliwiające sekrecję powstałych białek VEGF i FGF. Schemat kasety ekspresyjnej w wektorze pVIF:

5' - 3'

CMV	ATG	Igk	VEGF	TGA	IRES	ATG	Igk	bFGF	TGA
-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----	------	-----

CMV – promotor, ATG – trójka startowa, TGA – trójka terminalna, Igk – sekwencja sygnałowa, VEGF – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu, bFGF – zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu, IRES – sekwencja wiązania do rybosomów.

Klonowanie przeprowadzono na lepkie końce, zgodnie z ramką odczytu od trójki ATG, wykorzystano

odczynniki firmy Amersham, wektor amplifikowano w bakterii *E.coli* szczepu DH5α, izolację przeprowadzono zestawem EndoFree Plasmid Mega Kit firmy Qiagen. Ważniejsze cele klonowania wektora pVIF:

- wektor zaindukuje w warunkach *in vivo* powstanie bardziej dojrzałych i ustabilizowanych naczyń krwionośnych w porównaniu z wektorem kodującym tylko VEGF, tym samym terapia genowa (próby na pacjentach) przyniesie bardziej efektywną i szybszą poprawę stanu klinicznego pacjenta,
- iniekcja wektora dwucistronowego wiąże się bezpośrednio z wprowadzeniem mniejszej dawki endotoksyn niż w sytuacji podania dwóch jednogennych wektorów, niweluje się tym samym niebezpieczeństwo poważnych powikłań (wstrząs, stany gorączkowe),
- iniekcja wektora dwucistronowego to również mniejsza dawka samego DNA, choć raczej nie spotyka się doniesień o toksyczności samego DNA,
- koszt uzyskania jednego wektora dwucistronowego – izolacja, oczyszczanie, badanie poziomu endotoksyn jest mniejszy niż dwóch wektorów jednogennych.

Do klonowania wektora pVIF wykorzystano dwa wektory posiłkowe: pSEC/VEGF oraz pusty wektor pSEC. Wektor pSEC/VEGF sklonowano wcześniej, jest to ekspresyjny wektor plazmidowy kodujący izoformę VEGF165. Zawiera on sekwencję sygnałową umożliwiającą wyrzut białka VEGF poza komórkę. Tok postępowania był następujący:

- subklonowanie sekwencji IRES z wektora pMIG/ IRES do wektora pSEC/VEGF,
- wklonowanie sekwencji bFGF do wektora pSEC,
- subklonowanie kasety ATG – Igk – bFGF z wektora pSEC/bFGF do wektora pSEC/VEGF/IRES.

Sekwencję IRES amplifikowano reakcją PCR na matrycy sekwencji wklonowanej do wektora pMIG. Startery do PCR zaprojektowano tak, aby wносиły miejsca rozpoznawalne przez restryktazy EcoRI i NotI:

RBS-1: 5'- AAGAATTCCAATTCCGCCCTCTCCCT -3'

RBS-2: 5'- AAGCGGCCGCTTGTGGCAAGCTTATCATC -3'

Produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono EcoRI i NotI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC/VEGF również trawiono EcoRI i NotI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C.

Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/VEGF/IRES.

Sekwencję kodującą bFGF amplifikowano na bazie cDNA z komórek linii HUVEC (ang. human umbilical vein endothelial cell). Startery zaprojektowano z miejscami restrykcyjnymi dla EcoRI i XhoI: HbF-1: 5'- ATGAATTCGCCAGCATTGCCCCGAGGAT -3' HbF-2: 5'- TTCTCGAGATTCAGCTCTTAGCAGACAT -3'

Produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono EcoRI i XhoI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC również trawiono EcoRI i XhoI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C. Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/FGF.

Z wektora pSEC/FGF przeklonowano kasetę ATG – Igk – FGF do wektora pSEC/VEGF/IRES. Fragment ten amplifikowano reakcją PCR. Zaprojektowano nowy starter – wprowadzający miejsce dla NotI oraz wykorzystano starter HbF-2. Sekwencja startera sens: Not_Igk: 5'-AAGCGGCCGCACCATGGAGACAGACACA-3'

Dalej postępowano podobnie jak wcześniej: produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono NotI i XhoI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC/VEGF/IRES również trawiono enzymami NotI i XhoI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C. Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/VEGF/IRES/FGF (pVIF).

Piśmiennictwo:

1. Buschmann I, Schaper W: The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*, 2000; 190: 338–42

Powstały konstrukt został poddany szczegółowej analizie restrykcyjnej – stosowano różne kombinacje restryktaz; przeprowadzono również kilka reakcji PCR w oparciu o różne zestawy starterów, jak również sekwencjonowano konstrukt. Wszystkie analizy potwierdziły prawidłowe klonowanie – otrzymano wektor z bicistronową kasetą ekspresyjną VEGF/IRES/FGF:

5'- -3'

CMV	ATG	Igk	VEGF	TGA	IRES	ATG	Igk	bFGF	TGA
-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----	------	-----

Procedura podania plazmidu pVIF

Pacjentów biorących udział w badaniu, spełniających kryteria włączenia i nie spełniających kryteriów wyłączenia standardowo przygotowywano do zabiegu cewnikowania serca. Przy użyciu systemu NOGA wykonywano mapowanie lewej komory w celu określenia jej geometrii oraz obszaru, do którego powinien być wstrzyknięty plazmid [32]. Mapa zawierała średnio 77 ± 20 punktów. Następnie cewnik mapujący wymieniano na cewnik infuzyjny MYO-STAR z dodatkowym kanałem zakończonym cienką wysuwaną igłą. Plazmid podawano do wyznaczonego wcześniej obszaru w całkowitej dawce 0,5 mg w 1 ml, w 5 porcjach o objętości 0,2 ml. Jednorazowo przez cewnik infuzyjny podawano 0,2 ml roztworu plazmidu. Proces pojedynczego wstrzyknięcia plazmidu do niedokrwionego mięśnia sercowego trwał od 20 do 40 sekund. Ufiksowanie igły w miokardium monitorowano pod kontrolą fluoroskopii oraz na podstawie rejestracji pobudzeń dodatkowych komorowych.

PODSUMOWANIE

Badanie VIF-CAD zostało zakończone, a jego dokładne wyniki oraz ich analiza zostaną ogłoszone drukiem [32]. W ogólnym podsumowaniu wyników badania należy stwierdzić, że:

- terapia genowa za pomocą plazmidu dwucistronowego VEGF/FGF nie przyniosła poprawy w zakresie głównego punktu końcowego, czyli perfuzji mięśnia sercowego ocenianej metodą SPECT,
- osiągnięto istotną statystycznie poprawę w zakresie dwóch drugorzędowych punktów końcowych: tolerancji wysiłku ocenianej za pomocą próby wysiłkowej EKG oraz objawów klinicznych choroby wieńcowej ocenianej za pomocą skali Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego (CCS),
- nie stwierdzono działań niepożądanych związanych z podaniem plazmidu w ciągu rocznego okresu obserwacji.

3. Rissanen TT, Yla-Herttuala S: Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther*, 2007; 15: 1233–47
4. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE i wsp.: Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2001; 103: 2138–43
5. Simons M, Annex BH, Laham RJ i wsp.: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomised, controlled clinical trial (FIRST). *Circulation*, 2002; 105: 788–93
6. Grines CL, Watkins MW, Helmer G i wsp.: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 2002; 105: 1291–97
7. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ i wsp.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad 5 FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42: 1339–47
8. Morishita R, Aoki M, Hashiya N i wsp.: Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr Gene Ther*, 2004; 4: 199–206
9. Ware JA, Simons M: Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Med.*, 1997; 3: 158–64
10. Epstein SE, Fusch S, Zhou Y i wsp.: Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *J Cardiovasc Res*, 2001; 49: 532–42
11. Henry TD, Annex BH, McKendall GR i wsp.: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 2003; 107: 1359–65
12. Melo LG, Pachori AS, Kong D i wsp.: Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J*, 2004; 18: 648–63
13. Satake S, Kuzuya M, Ramos MA i wsp.: Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 244: 642–46
14. Mooradian DL, Diglio CA: Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta 1 on rat heart endothelial cell anchorage-dependent and independent growth. *Exp Cell Res*, 1990; 186: 122–29
15. Goto F, Goto K, Weindel K i wsp.: Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest*, 1993; 69: 508–17
16. Yue X, Tomanek RJ: Effects of VEGF(165) and VEGF(121) on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001; 280: H2240–47
17. Losordo DW, Vale PR, Symes JF i wsp.: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998; 98: 2800–4
18. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR i wsp.: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*, 1999; 100: 468–74
19. Laham RJ, Chronos NA, Pike M i wsp.: Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36: 2132–39
20. Symes JF, Losordo DW, Vale PR i wsp.: Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*, 1999; 68: 830–36
21. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M i wsp.: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation*, 2003; 107: 2677–83
22. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE i wsp.: Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 2000; 85: 1414–19
23. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU i wsp.: Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*, 1998; 97: 645–50
24. Seiler C, Pohl T, Wustmann K i wsp.: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 2001; 104: 2012–17
25. Kleiman NS, Califf RM: Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36: 310–25
26. Grines CL: The AGENT clinical trials programme. *Eur Heart J*, 2004; 6(Suppl.E): E18–23
27. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC i wsp.: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2002; 105: 2012–18
28. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A i wsp.: Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*, 2005; 45: 982–88
29. Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S i wsp.: NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation*, 2005; 112(9 Suppl.): I157–65
30. Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D i wsp.: VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther*, 2009; 17: 1109–15
31. Malecki M, Swoboda P, Jastrzębski Z i wsp.: *In vivo* study of angiogenic plasmid preparations-the bicistronic plasmid as a new type of drug for vascular diseases. *Acta Pol Pharm*, 2004; 61: 289–95
32. Kukula K, Chojnowska L, Dabrowski M i wsp.: Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J*, (w druku). *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*