

Urška Kamenšek¹, Gregor Serša²

Cepljenje *in situ* z genskim elektroprenosom za zdravljenje raka

In Situ Vaccination by Gene Electrotransfer for Cancer Treatment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cepljenje, rak, genski elektroprenos, plazmidi, elektroporacija, dejavnik tumorske nekroze α , interlevkin-12

Rak je skupina sistemskih bolezni, ki jim je skupna motnja v delovanju imunskega sistema. Različni imunoterapevtski pristopi stremijo k sprožitvi oz. ponovni sprožitvi ali pa k pospešitvi delovanja imunskega sistema v boju proti raku. Eden izmed bolj robustnih tovrstnih pristopov je t. i. cepljenje *in situ*, kjer z različnimi ablacijskimi načini zdravljenja sprožimo imunski odziv proti tumorskim antigenom, ki se sprostijo iz umirajočih rakavih celic. Da bi dosegli sistemski in trajen odgovor, je te načine zdravljenja treba združiti s takimi, ki pospešujejo delovanje bolnikovega imunskega sistema. Na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana se ukvarjamo z obliko genskega zdravljenja, t. i. genskim elektroprenosom, ki je primeren tako za sprožitev cepljenja *in situ* kot tudi za pospešitev imunskega sistema. Pred kratkim smo na mišjem modelu raka dokazali, da lahko cepljenje *in situ* dosežemo z genskim elektroprenosom plazmidnih vektorjev z zapisom za dejavnik tumorske nekroze α in za interlevkin-12. V prihodnje želimo opisan pristop in podobne načine zdravljenja, ki temeljijo na genskem elektroprenosu, pripeljati do klinične uporabe. Tu pa ostaja odprto vprašanje priprave plazmidnih vektorjev v kakovosti, primerni za klinično uporabo, in izbora ustreznih bolnikov, ki jim bo takšen pristop kar najbolj koristil.

ABSTRACT

KEY WORDS: vaccination, cancer, gene electrotransfer, plasmids, electroporation, tumor necrosis factor α , interleukin-12

Cancer is a group of systemic diseases that involve malfunctions of the immune system. Different types of immunotherapy aim to reactivate or stimulate anticancer immunity. A more robust immunotherapeutic approach is a so-called *in situ* vaccination, where various local ablative therapies are used to induce a specific immune response against tumor antigens released from dying tumor cells. To achieve a systemic and durable response, these therapies need to be combined with immune adjuvants. At the Department of Experimental Oncology, at the Institute of Oncology in Ljubljana, we are exploring a form

¹ Dr. Urška Kamenšek, univ. dipl. biol., Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; ukamensek@onko-i.si

² Prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol., Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

of gene therapy called gene electrotransfer, which can be used to induce *in situ* vaccination and stimulate the immune response. Recently, we proved the effectiveness of concomitant gene electrotransfer of plasmid vectors encoding tumor necrosis factor α and interleukin-12 in a mouse melanoma tumor model. In this approach, the tumor necrosis factor α acts as a local ablative therapy and interleukin-12 as an immunological adjuvant. In the future, we want to bring this and similar gene electrotransfer approaches into clinical practice. But first we have to tackle the problem of clinical grade plasmid vector design and selection of appropriate patients that would benefit the most from the proposed approach.

UVOD

Trenutni postopki za zdravljenje raka so lahko zelo učinkoviti, ampak v mnogih primerih ne uspejo popolnoma ozdraviti bolezni. Zasevki so odgovorni za več kot 90 % vseh smrti zaradi raka (1). Da bi pozdravili razsejano bolezen, bi moral imunski sistem prepoznati in odstraniti rakave celice po celem telesu. Čeprav pri rakavih bolnikih najdemo imunske celice, uperjene proti tumorskim antigenom, nam dejstvo, da rak kljub temu vznikne, pove, da je imunski sistem zatajil (2, 3). Idealno zdravljenje bi torej moralo sprostiti tumorske antigene in hkrati pustiti imunskemu sistemu, da se bori proti rakavim celicam. Izkoriščanje bolnikovega lastnega imunskega sistema za boj proti raku je trenutno najbolj obetavno in tudi uspešno onkološko področje. Eden izmed bolj robustnih tovrstnih pristopov je t. i. cepljenje *in situ* (angl. *in situ* vaccination), kjer z različnimi ablacijskimi načini zdravljenja sprožimo imunski odziv proti tumorskim antigenom, ki se sprostijo iz umirajočih rakavih celic. Da bi dosegli sistemski in trajen odgovor, je takšno zdravljenje treba združiti z zdravljenjem, ki pospešuje delovanje bolnikovega lastnega imunskega sistema ali pa preprečuje imunsko zavrtje.

Na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana se ukvarjamo z obliko genskega zdravljenja, imenovanega genski elektrotransfer, ki je primeren tako za sprožitev cepljenja *in situ* kot tudi za pospešitev imunskega sistema (4).

V članku je podrobneje opisan postopek genskega elektrotransfera s poudarkom na plazmidnih vektorjih, ki jih pri tem uporabljamo. Prizadevamo si namreč pripraviti lastne plazmidne vektorje nove generacije, s katerimi želimo zagotoviti boljše ciljanje in učinkovitost zdravljenja, predvsem pa skladnost z varnostnimi priporočili glede uporabe antibiotikov pri klinično uporabnih plazmidih. Na koncu je opisana še uporaba genskega elektrotransfera za cepljenje *in situ*.

IMUNOLOŠKO ZDRAVLJENJE RAKA

Rak je skupina sistemskih bolezni, ki jim je skupna motnja v delovanju imunskega sistema. V procesu nastanka in razvoja raka se tumorske celice uspejo izogniti prepoznavanju in odstranitvi s strani imunskega sistema (5–7). Različni pristopi imunološkega zdravljenja stremijo k sproženju oz. ponovnem sproženju ali pa k pospešitvi delovanja imunskega sistema v boju proti raku (8, 9). Trenutno v predkliničnih in kliničnih raziskavah preizkušajo številne takšne pristope (10, 11). Nekaj jih je že odobrenih za klinično uporabo: od protiteles, ki delujejo kot zaviralci imunskih kontrolnih točk (npr. ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab), do različnih vrst celičnega zdravljenja, kot so npr. celično cepivo Provenge in zdravljenje z gensko spremenjenimi celicami T, ki izražajo himerne antigenske receptorje (angl. *chimeric antigen receptor T-cell*, CAR-T). Med te spadajo npr. Kymriah® in Yescarta® (12).

Imunološka narava protirakavih načinov zdravljenja

Z uspehom novih imunoloških pristopov je postalo tudi jasno, da je imunski sistem vpleten v protirakavo delovanje nekaterih klinično uveljavljenih terapij raka, kot sta radioterapija in kemoterapija (13). Pravzaprav mora prav vsako resnično uspešno zdravljenje imeti tudi vpliv na imunski sistem. S tem lahko pojasnimo popolne ozdravitve po tovrstnem zdravljenju, za katere je potrebno uničenje čisto vseh rakavih celic. Učinki so namreč vidni tudi na tistih celicah, ki niso bile neposredno izpostavljene zdravljenju, kar imenujemo posredovani (angl. *bystander*) učinek, včasih pa izginejo tudi oddaljeni nezdravljeni zasevki, kar imenujemo oddaljeni (angl. *abscopal*) učinek. Predlagan mehanizem teh učinkov je, da zdravljenje sproži posebno imunogeno obliko celične smrti, ki nato sproži imunski odziv proti rakavim celicam (14–17).

Izraz imunogena celična smrt so vpeljali v zadnjem desetletju, da bi z njim označili posebno funkcionalno obliko programirane celične smrti, ki lahko povzroči nastanek vnetnega odziva brez prisotnosti patogenov (17, 18). Pri imunogeni celični smrti se iz umirajočih celic hkrati s tumorskimi antigeni sprošča cela vrsta imunospodbujevalnih sporočevalcev nevarnosti oz. t. i. s poškodbo povezanih molekularnih vzorcev (angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) (19). DAMP so v bistvu običajne znotrajcelične molekule, ki se sprostijo iz celice ali se izpostavijo na celični membrani pri imunogenih oblikah celične smrti. Tri izmed teh molekul so izbrali kot najpomembnejše označevalce imunogene celične smrti: kalretikulini, izpostavljeni na celični membrani, kromatinska beljakovina HMGB1 (angl. *high mobility group box 1*) in zunajcelični ATP (18). Kot zelo pomemben DAMP lahko nastopa tudi DNA, sproščena iz jeder umirajočih celic (20–22).

Sposobnost proženja imunogene celične smrti so že pripisali nekaterim ustaljenim

terapijam raka, kot so npr. kemoterapevtiki docetaksel, paklitaksel, doksorubicin in radioterapija (10, 23). Rakave celice po uporabi teh vrst zdravljenja torej umirajo z imunogeno obliko celične smrti, kar lahko privede do nastanka sistemskega pridobljenega imunskega odziva proti tumorskim antigenom, sproščenim iz umirajočih celic. Takšno zdravljenje torej pravzaprav deluje kot nekakšno cepivo (23–25).

CEPLJENJE *IN SITU*

Med načini imunološkega zdravljenja raka, ki so se razvili v zadnjih desetletjih, je tudi terapevtsko cepljenje, namenjeno zdravljenju že prisotne bolezni. Razvoj protirakavih terapevtskih cepiv temelji na dejstvu, da rakave celice izražajo tumorske antigene, ki jih lahko uporabimo kot tarče za prapravo cepiv. Običajno terapevtsko cepljenje za zdravljenje raka je obrazloženo kot dostava izbranih tumorskih antigenov, proti katerim lahko telo sproži pridobljeni imunski odziv (26). Čeprav se sliši zelo obetavno, se pristop v klinični uporabi ni izkazal za uspešnega, predvsem zaradi pomanjkanja vsesplošnih tumorskih antigenov in zapletenosti ter cene priprave posamezniku prilagojenih cepiv *ex vivo* (27, 28).

Na podlagi zgoraj opisanih imunoloških učinkov uveljavljenih terapij raka so se pojavile ideje, da bi ta pojav izkoristili za cepljenje, tako da bi z zdravljenjem izzvali imunski odziv neposredno v novotvorbi, *in situ* (15, 28). Tako bi lahko izkoristili številne bolnikove lastne tumorske antigene in ne samo nekaterih izbranih, kot pri običajnih terapevtskih cepivih. Za pristop se je prijel izraz cepljenje *in situ*. Glavna prednost pristopa je, da izkoriščamo bolnikove lastne tumorske antigene, zato bi bil pristop lahko primeren za zdravljenje različnih tipov raka.

Za cepljenje *in situ* so primerne predvsem različne vrste lokalnega ablacijskega zdravljenja, od dobro uveljavljene radioterapije do novejših pristopov, kot so onko-

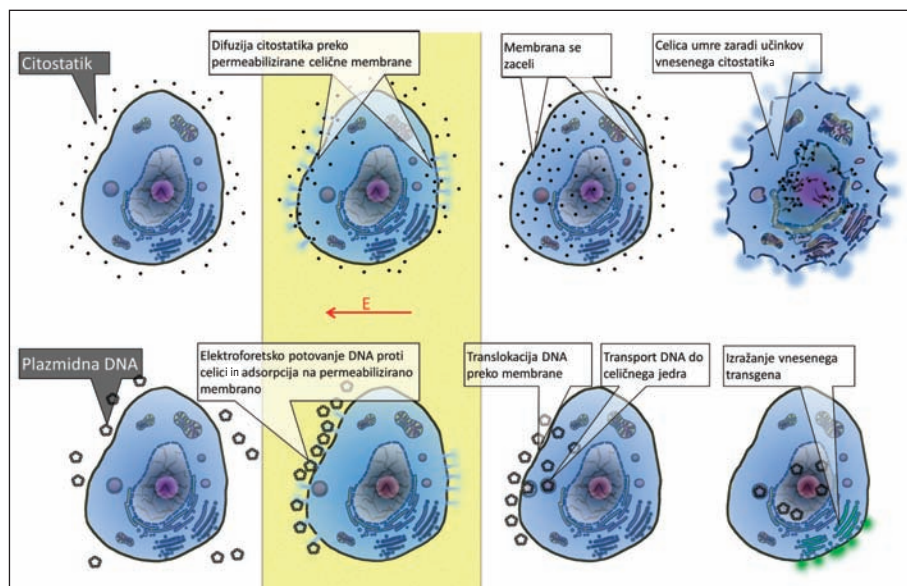
litični virusi, radiofrekvenčna- in krioablacija itd. (28–30). V naši raziskovalni skupini smo pred nekaj leti predlagali, da bi lahko za cepljenje *in situ* uporabili elektrokemoterapijo, s katero se že vrsto let ukvarjamo (25).

Elektrokemoterapijo smo na Onkološkem inštitutu med prvimi na svetu izvajali pri kliničnem delu, sedaj pa je že priznan lokalni ablacijski način zdravljenja, ki se izvaja v 160 zdravstvenih središčih širom Evrope (31, 32). Postopek temelji na uporabi elektroporacije, ki je fizikalni postopek, kjer z dovajanjem kratkih visokonapetostnih električnih pulzov lokalno omogočimo prehajanje molekul, za katere je sicer celična membrana slabo prepustna (33). Pri elektrokemoterapiji so te molekule različni kemoterapevtiki oz. citostatiki, predvsem cisplatin in bleomicin, lahko pa vnašamo tudi genski material, kar imenujemo genski elektro-prenos (slika 1).

Imunološki spodbujevalci pri cepljenju *in situ*

Kot pri podobnih ablacijskih zdravljenjih je v protirakavo delovanje elektrokemoterapije

vpleten imunski sistem, kar dokazuje večja učinkovitost zdravljenja na imunsko odzivnih miših v primerjavi z imunsko zavrtimi (34). Dokazano je tudi povečano vdiranje antigen predstavitevnic celic na mesto zdravljenja (35, 36). Vendar pa v kliničnem delu ostaja elektrokemoterapija še vedno lokalni ablacijski postopek s sicer zelo visoko lokalno učinkovitostjo, toda brez dokazane sistemske učinkovitosti (37). Podobno velja za ostale načine zdravljenja, ki so jih predlagali za cepljenje *in situ* (38). Zgoraj opisani imunološki učinki ustaljenih terapij raka so namreč redek pojav: npr. oddaljeni učinek je dobro dokumentiran samo po radioterapiji (39, 40). To pomeni, da je cepljenju *in situ* treba dodati spodbujevalce imunskega sistema, ali pa, če je že prišlo do imunskega zavrtja, antagonist zavrtja. Z istim namenom se v protokolih običajnega terapevtskega cepljenja pogosto uporabljajo različni imunološki spodbujevalci, najpogosteje citokini, ki vodijo nastali imunski odziv v pravo smer (41). Eden izmed najpogosteje uporabljenih imunoloških spodbujevalcev je citokin interleukin-12 (IL-12),



Slika 1. Elektrokemoterapija in genski elektro-prenos (26). E - električno polje.

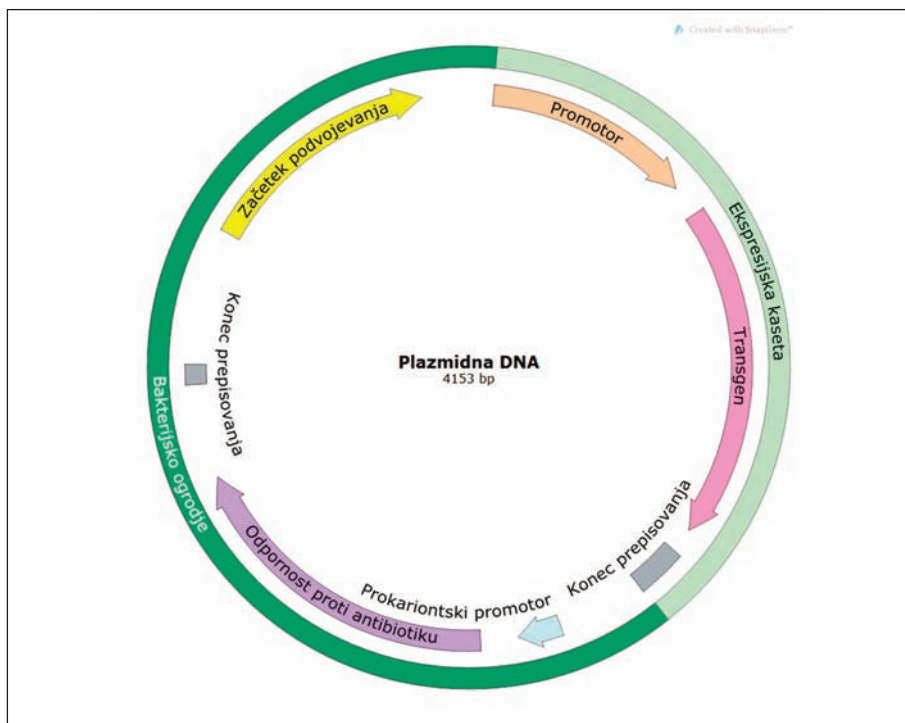
eden najučinkovitejših načinov za njegov vnos pa je že omenjeni genski elektroprenos (42–45).

GENSKI ELEKTROPRENOS

Genski elektroprenos je oblika genskega zdravljenja, ki je opredeljena kot vnos genov, t. i. transgenov, v celice bolnika za doseganje zdravilnega učinka (46–48). Gensko zdravljenje delimo glede na vektorje za vnos genov na virusne pristope (t. i. transdukcija) in nevirusne pristope (t. i. transfekcija). Druga delitev genskega zdravljenja pa je glede na način dostave: na postopke *ex vivo* in *in vivo*. Pri postopkih *ex vivo* celice, odvzete iz bolnikov, gensko spremenimo v celični kulturi in jih nato vrnemo nazaj v telo bolnikov. Pri postopkih *in vivo* pa zdravljenje izvedemo z neposrednim vnosom genske-

ga materiala v telo. Genski elektroprenos je najuspešnejši nevirusni postopek genskega zdravljenja, ki omogoča lokalno *in vivo* dostavo genskega materiala v tkiva, kot so koža, mišice in tudi novotvorbe (4, 49).

Postopek genskega elektroprenosa omogoča dva načina genskega zdravljenja, sistemsko in lokalno zdravljenje. Kadar želimo sistemsko izražanje, lahko transferiramo mišice ali kožo, ki potem delujejo kot biološke tovarne za proizvodnjo transgena (50, 51). Takšen sistemski način je obetaven za proizvodnjo citokinov in cepljenje z DNA (angl. *DNA vaccination*). Po drugi stani pa nam postopek genskega elektroprenosa zaradi prostorske natančnosti, ki jo zagotavlja elektroporacija, omogoča tudi lokalni način, ki je primeren za ciljanje rakavih celic ali žilja novotvorbe. Uspešnost



Slika 2. Sestava plazmidnih vektorjev. Ekspresijsko kaseto sestavljajo promotor, transgen, zaporedje za konec prepisovanja in poliadenilacijsko zaporedje. Bakterijsko ogrodje je sestavljeno iz mesta za začetek podvojevanja (angl. *origin of replication*, ORI) in gena za odpornost proti antibiotiku s svojim promotorjem in zaporedjem za konec prepisovanja. Bp – bazni par.

tako lokalnega kot sistemskega načina je bila že dokazana v številnih predkliničnih raziskavah, tako da je postopek trenutno že v fazi kliničnega preizkušanja v ZDA (52–56).

Vektorji za transgene pri genskem elektroprenosu so plazmidi, ki imajo nizko integracijsko zmogljivost (se ne vključijo v DNA), zato je izražanje transgenov po genskem elektroprenosu prehodne narave, kar je varnejše in pri uporabi za cepljenje in gensko zdravljenje raka pravzaprav zaželeno (48).

PLAZMIDNI VEKTORJI

Plazmidi so krožna, dvoverižna, episomalna DNA, ki je naravno prisotna v bakterijah. Gensko spremenjene bakterije izkoriščamo za namnožitev velikih količin plazmidne DNA za uporabo v genskem zdravljenju (57, 58). Plazmidna DNA je obstojna na sobni temperaturi, njeno izdelovanje je poceni in varno v primerjavi z izdelovanjem virusnih vektorjev.

Zgradba plazmidnih vektorjev ima lahko velik vpliv na mesto in dinamiko izražanja transgena (57). Poleg tega je pri pripravi plazmidov, ki so namenjeni klinični uporabi, treba upoštevati tudi varnostna priporočila nadzornih agencij, kot sta Evropska agencija za zdravila (European Medicines Agency, EMA) in ameriška Uprava za živila in zdravila (Food and Drug Administration, FDA). Na tržišču je omejen nabor terapevtskih plazmidov za zdravljenje raka. Zato se v naši raziskovalni skupini ukvarjamo s pripravo lastnih plazmidov, tako da preurejamo in spreminjamo različne sestavne dele glede na predvideno uporabo plazmida. Glavne sestavne dele plazmidnih vektorjev lahko delimo na ekspresijsko kaseto, ki nosi naš transgen, in bakterijsko ogrodje, ki ga potrebujemo za proizvodnjo plazmidov v bakterijah (slika 2).

Gen za odpornost proti antibiotiku

Bakterijsko ogrodje nosi zapis za selekcijski označevalec, ki je običajno gen za odpornost proti antibiotiku, kar je pri klinični upo-

rabi lahko sporno (58–60). Obstaja namreč tveganje za horizontalni prenos odpornosti na okoljske in komenzalne mikroorganizme ter tveganje za alergijski odziv na ostanke antibiotika, ki se uporablja pri proizvodnji plazmidov (60, 61). Zato nadzorni agenciji, odgovorni za licenciranje zdravil, EMA in FDA, priporočata izogibanje genom za odpornost ali vsaj uporabo odpornosti proti takšnim antibiotikom, ki se ne uporabljajo za zdravljenje ljudi (62, 63). Tako plazmid, ki se uporablja v ameriških kliničnih raziskavah, vsebuje gen za odpornost proti kanamicinu, ki se za zdravljenje ljudi praktično ne uporablja (54).

Da bi zadostili varnostnim priporočilom, so znanstveniki razvili številne nadomestne načine za pripravo plazmidov, ki ne temeljijo na selekciji z antibiotikom. Eden takšnih načinov je operator-represorska titracija (ORT), ki jo je razvilo podjetje CobraBio (Keele, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske) (64). ORT temelji na dopolnitvi avksotrofije (tj. nezmožnost organizma za izdelovanje določene snovi, ki jo potrebuje za svojo rast) pri posebnem mutiranem sevu bakterij *Escherichia coli*. Vnos plazmidov v bakterije razreši avksotrofijo, saj omogoči izražanje manjkajoče esencialne aminokislina. ORT so uporabili za pripravo plazmidov za cepljenje z DNA proti virusu HIV in plazmida s protiangiogenim delovanjem (angl. *antiangiogenic metargidin peptide*, AMEP), ki so ga preizkusili v edini evropski klinični raziskavi genskega elektroprenosa (65, 66). ORT uporablja tudi naša raziskovalna skupina in smo z njo pripravili že več plazmidov (67–71). Poleg očitnih varnostnih prednosti so plazmidi, pripravljani na ta način, tudi manjši, kar zagotavlja večjo uspešnost transfekcije in manjšo imunogenost, saj je zmanjšan bakterijski del plazmida (72, 73).

Ekspresijska kasetna

Dejavni del plazmidnega vektorja je ekspresijska kasetna s transgenom in nadzorno

regijo, tj. promotor, ki nadzoruje izražanje transgena. Promotor naj bi podpiral dolgotrajno izražanje transgena ali pa vsaj nadzorovano izražanje (57). V preteklosti je večina plazmidov vsebovala citomegalovirusni (CMV) promotor. Zdaj pa vemo, da CMV-promotor včasih ne zagotavlja dolgotrajnega izražanja, saj je zaradi virusnega izvora dovzeten za transkripcijsko utišanje v evkariontskih celicah (74). To smo pokazali tudi na Oddelku za eksperimentalno onkologijo v eni izmed raziskav genskega elektroprenosa (75). Poleg tega se izražanje pod nadzorom CMV-promotorja sproži tudi v stresnih pogojih, npr. po obsevanju. Zato se zadnje čase namesto virusnih promotorjev vedno bolj uporabljajo celicam lastni promotorji (76).

Primerna zamenjava za virusne promotore s stalnim izražanjem (konstitutivni promotorji) so promotorji celičnih hišnih genov (angl. *housekeeping genes*), ki se stalno izražajo v vseh tkivih telesa. Sem spadajo npr. promotor gena za podaljševalni dejavnik 1 α (angl. *elongation factor 1 α* , EF-1 α), za ubikvitin C ali za fosfoglicerat kinazo 1 (57). V pristopu, imenovanem transkripcijsko ciljanje, pa uporabimo promotore genov, ki se izražajo samo v nekaterih tkivih (tkivno specifični promotorji) ali postanejo dejavni pod vplivom določenih zunanjih ali notranjih dejavnikov (inducibilni promotorji). Med tkivno specifične promotore spada npr. promotor gena za endoglin, ki se izražale v žilah, med inducibilnimi promotori pa je najbolj znan tetraciklin-inducibilni promotor (angl. *tetracycline responsive element*, TRE) (57, 77–81).

Na Oddelku za eksperimentalno onkologijo smo preizkusili že več tkivno specifičnih promotorjev (67). Za najuspešnejšega oz. najbolj uporabnega za potrebe genskega elektroprenosa se je izkazal kolagenski promotor (68, 80). Ta promotor namreč omogoča specifično izražanje v fibroblastih, kar je ustrezno, kadar želimo izražanje v koži ali kadar ciljamo rakavo mikrookolje.

Preizkusili smo tudi inducibilni promotor gena za od ciklina odvisni kinazni inhibitor 1 (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, CDKN1A), bolj znanega kot p21. Gen p21 se povišano prepisuje ob genotoksičnem stresu, zato je njegov promotor uporaben, kadar želimo združiti gensko zdravljenje s kemoterapijo ali radioterapijo (81, 82).

Glavni del ekspresijske kasete je zapis za transgen, tj. gen, katerega izražanje želimo koristiti v zdravstvene namene. Izberemo jih lahko iz štirih različnih razredov (tabela 1). Lahko delamo zamenjavo ali popravilo okvarjenih genov, ker pa je rak posledica številnih mutacij, ta pristop ni vedno najbolj smiseln in učinkovit. Primernejši so pristopi, pri katerih sprožimo smrt rakavih celic. To lahko dosežemo z neposrednim ciljanjem rakavih celic s transfekcijo samomorilskih ali citotoksičnih genov (genska kemoterapija), posredno s ciljanjem rakavega žilja (žilno ciljano gensko zdravljenje), ali pa še bolje, s sprožitvijo protirakavega imunskega odziva (gensko imunološko zdravljenje). Pristopi slednjega vključujejo cepljenje z DNA, torej vnos zapisa za različne tumorske antigene, in transfekcijo imunospodbujevalnih citokinov (83–85). Najbolje raziskan in najpogosteje uporabljen citokin za genski elektroprenos je IL-12 (54, 86, 87). Tega preizkušamo tudi v naši raziskovalni skupini.

GENSKI ELEKTROPRENOS INTERLEVKINA-12

IL-12 je vnetni citokin, ki spodbuja prirojeni in pridobljeni imunski odziv ter ga vodi v smer nastanka celic T-pomagalk 1 (angl. *helper T-cells 1*, Th1). Posledično vodi v sprožitev delovanja citotoksičnih limfocitov T in naravnih celic ubijalk, ki so še posebej pomembne za razvoj imunskega odziva proti rakavim celicam (88, 89). IL-12 deluje tudi protiangiogeno in spodbuja nastanek kemokinov, zato je nujno, da ga dostavimo samo v novotvorbo (42, 90). To so dokazali v prvih kliničnih raziskavah, kjer se je sistemski vnos rekombinantnega IL-12

Tabela 1. Delitev transgenov za različne vrste genskega zdravljenja (81). p53 – beljakovina 53 (angl. *protein 53*), CTS1 – himerni tumorski zaviralec 1 (angl. *chimeric tumor suppressor 1*), anti-Bcl-2 – utišanje gena za B-celični limfom 2 (angl. *B-cell lymphoma 2*), anti-survivin – utišanje gena za survivin, HSV-tk – timidinska kinaza virusa herpes simpleks (angl. *herpes simplex virus thymidine kinase*), CD – citozinska deaminaza, CD/HSV-tk – združen gen za citozinsko deaminazo in timidinsko kinazo virusa herpes simpleks (angl. *cytosine deaminase/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene*), HRP – hrenova peroksidaza (angl. *horseradish peroxidase*), IAA – indolocetna kislina (angl. *indol-3-acetic acid*), iNOS – inducibilna sintaza dušikovega oksida (angl. *inducible nitric oxide synthase*), TNF- α – dejavnik tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α*), anti-VEGF – utišanje gena za žilni rastni dejavnik (angl. *vascular endothelial growth factor*), sFlt-1 – topna mačjemu McDonoughovemu sarkomu podobna tirozin kinaza 1 (angl. *soluble feline McDonough sarcoma-like tyrosine kinase 1*), anti-endoglin – utišanje gena za endoglin, IL-12 – interlevkin-12, IFN- α – interferon α , GM-CSF – granulocitne in monocitne kolonije spodbujajoči dejavnik (angl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), PSA – za prostato specifični antigen, MAGE – gen melanomskega antigena (angl. *melanoma antigen gene*).

Strategija genske terapije	Transgeni
Zamenjava ali popravilo okvarjenih genov	p53, CTS1, anti-Bcl-2, anti-survivin
Genska kemoterapija	HSV-tk, CD, CD/HSV-tk; HRP, IAA, iNOS, TNF- α
Žilno ciljano gensko zdravljenje	anti-VEGF, sFlt-1, anti-endoglin, TNF- α , IL-12
Gensko imunološko zdravljenje	IL-12, TNF- α , IFN- α , GM-CSF, tumorski antigeni: PSA, MAGE

izkazal za škodljivega (91–93). Genski elektroprenos je tako popoln za dostavo IL-12 neposredno v novotvorbe (lokalna dostava), kar so dokazali v številnih predkliničnih raziskavah (87). Lokalna dostava IL-12 z genskim elektroprenosom je dosegla že klinično fazo preizkušanja v ZDA. V prvi klinični raziskavi na bolnikih z razsejanim melanomom so pokazali, da je pristop varen in tudi učinkovit, tako lokalno kot tudi sistemsko, saj so zabeležili celo oddaljeni učinek na nezdravljene zasevke drugje na telesu (52, 54). Pristop se zdaj razvija naprej za zdravljenje drugih tipov površinskih novotvorb in združeno s pembrolizumabom (94). Poleg tega je pristop pred kratkim od FDA pridobil položaj zdravila sirote za zdravljenje razsejanega melanoma, ki ni primeren za kirurško zdravljenje (95).

Zanimivo je, da kljub veliki učinkovitosti omenjenega pristopa IL-12 ni neposredno škodljiv za rakave celice in deluje izključno preko sprožitve in pospešitve imunskega odziva (89). Zato je genski elektroprenos IL-12 uporaben tudi za dodajanje k cepivom (43–45). Trenutno poteka kar nekaj kliničnih raziskav, v katerih

preizkušajo genski elektroprenos IL-12 za spodbujanje imunološkega odziva k cepivom za aids in hepatitis (96). Seveda pa je genski elektroprenos IL-12 ustrezen tudi kot imunološki spodbujevalec k cepljenju *in situ*.

CEPLJENJE IN SITU Z GENSKIM ELEKTROPRENOSOM

Za uspešno cepljenje *in situ* potrebujemo lokalno ablacijsko zdravljenje, ki ga lahko opravimo z genskim elektroprenosom gena s citotoksičnim produktom. V naši raziskavi smo se odločili za gen za dejavnik tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α). TNF- α je ime očitno dobil po sposobnosti, da povzroča nekrozo novotvorb. Kasneje so znanstveniki določili, da povzroča apoptozo rakavih celic, zdaj pa postaja jasno, da celice v prisotnosti TNF- α v bistvu umirajo z nekroptozo, ki je imunogena oblika programirane celične smrti. Sicer pa je TNF- α imunospodbujevalen citokin in je kot tak trenutno tudi v uporabi v kliničnem delu v obliki rekombinantne beljakovine (97). Poleg spodbujanja imunskega odziva ima tudi močno neposredno protirakavo delovanje preko citotoksičnega učinka na ra-

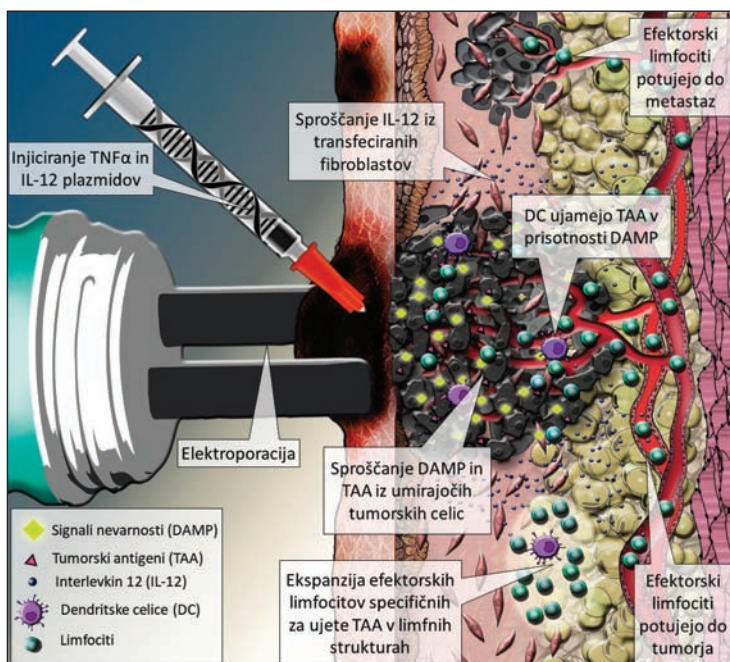
kave celice in žilnorazdiralnih učinkov (98). Sistemska dostava TNF- α je škodljiva, zato se trenutno rekombinantni TNF- α v kliničnem delu uporablja samo za izolirano perfuzijo udov za zdravljenje napredovanih rakov na okončinah (99–101). V preteklosti so preizkusili tudi že dostavo TNF- α , omejeno na novotvorbo z različnimi pristopi genskega zdravljenja (102, 103). Med njimi se je za najučinkovitejšega izkazal TNFerade® (GenVec Inc.), adenovirusni vektor za izražanje TNF- α pod nadzorom inducibilnega promoterja, ki se aktivira z radioterapijo. TNFerade® je prišel do tretje faze kliničnih raziskav za zdravljenje raka trebušne slinavke, vendar je bila njegova učinkovitost prenizka, da bi prišel v splošno klinično uporabo. Lokalna dostava v novotvorbo pa je možna tudi z genskim elektroprenosom.

Prednost genskega elektroprenosa je, da lahko vnašamo več genov hkrati (104, 105). To pomeni, da lahko hkrati s TNF- α vnašamo

tudi gen za spodbujevalca imunskega odziva. V naši raziskavi smo izbrali že preizkušen IL-12. Dodatna prednost uporabe genskega elektroprenosa za cepljene so imunospodbujevalni učinki same DNA, ki jo vnašamo v celice (106). Kot že omenjeno, DNA lahko deluje kot pomemben DAMP, še posebej tuja DNA. V naši raziskovalni skupini v sodelovanju s kolegi z univerze Old Dominion University v Norfolkku v ZDA namreč ugotavljamo, da gre velik del uspešnosti genskega elektroprenosa dejansko pripisati sprožitvi imunskega odziva proti vneseni tuji DNA in ne samo izražanju terapevtske beljakovine (107, 108). Poleg vnašanja tuje DNA pa sproščanje DAMP lahko povzroči že tudi sama elektroporacija (109–111).

DOKAZ KONCEPTA

Naša hipoteza je, da lahko uspešno cepljenje *in situ* dosežemo s hkratnim elektroprenosom genov za TNF- α in IL-12 (slika 3).



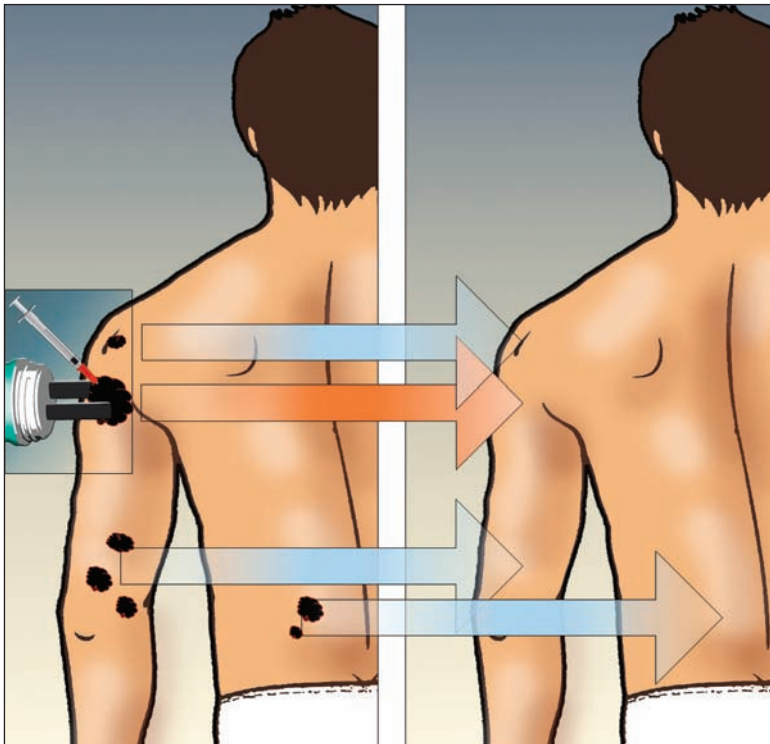
Slika 3. Prikaz cepljenja *in situ* s hkratnim elektroprenosom genov TNF- α in IL-12. DAMP – sporočevalci nevarnosti (angl. *damage-associated molecular pattern*), TAA – tumorski antigeni (angl. *tumor-associated antigens*), DC – dendritske celice, IL-12 – interleukin-12, TNF- α – dejavnik tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α*).

Pri tem naj bi genski elektroenos TNF- α igral vlogo lokalnega ablacijskega zdravljenja, ki povzroči cepljenje *in situ* proti tumorskim antigenom, sproščenim iz ubitih celic, genski elektroenos IL-12 pa kot spodbujevalec imunskega odziva, ki sproženi imunski odziv pospeši in razširi v sistemski ter trajen odziv (slika 4).

Predviden potek dogodkov po genskem elektroenosu TNF- α in IL-12 je prikazan na sliki 3: izražanje TNF- α v rakavih celicah povzroči umiranje celic z imunogeno obliko celične smrti, kar pomeni, da se hkrati sproščajo tumorski antigeni in DAMP. Tumorske antigene ujamejo dendritske celice, ki jih pritegnejo DAMP in IL-12, ki se izraža iz transfeciranih celic. Dendritske celice nato potujejo v bezgavke, kjer sprožijo namnoževanje efektorskih limfocitov proti pred-

stavljenim tumorskim antigenom. Nastale imunske celice potem po krvi potujejo v novotvorbo in v oddaljene zasevke, kjer napadejo rakave celice.

Hipotezo smo do sedaj preizkusili na mišjem tumorskem modelu melanoma (112). Rezultati so potrdili izvedljivost pristopa, saj smo v zdravljenih novotvorbah dokazali izražanje obeh citokinov, kar je povzročilo izrazit zaostanek v rasti novotvorb v zdravljeni skupini, podaljšano preživetje in skoraj 80 % popolnih ozdravitev. Sprožitev protirakavega imunskega odziva je potrdil obsežen vdor efektorskih limfocitov v zdravljene novotvorbe in namnoževanje efektorskih limfocitov v bezgavkah. Vse ozdravljene živali so tudi zavrnile nastanek novotvorb po ponovnem izzivu z rakavimi celicami 100 dni po izginotju novotvorb



Slika 4. Sistemski učinki po lokalnem zdravljenju. Pri bolniku z razsejano boleznijo z lokalnim zdravljenjem primarne novotvorbe sprožimo sistemski imunski odziv proti rakavim celicam in s tem uničenje zasevkov ter popolno ozdravitev bolnika.

(primerljivo petletnemu preživetju pri lju-deh), kar nakazuje na nastanek imunskega spomina. Poleg tega je pri vseh ozdravljennih miših na mestu, kjer je bila novotvorba, prišlo do razbarvanja dlake oz. vitiliga. To je lokalni avtoimunski odziv, ki je pravzaprav dokaz uspešnosti cepljenja *in situ*, saj je očitno prišlo do razširitve imunskega odziva proti rakavim celicam, ki vsebujejo veliko melanina, na normalne melanocite (113).

ODPRTA VPRAŠANJA

Učinkovitost cepljenja *in situ* s hkratnim genskim elektroprenosom TNF- α in IL-12 smo torej dokazali, vendar za zdaj samo na enem tumorskem modelu, tj. mišjem melanomu. Odprto ostaja vprašanje, ali je pristop učinkovit tudi na drugih mišjih modelih raka in pa predvsem, na katere tipe človeškega raka je možen prenos tega znanja. Ker pri cepljenju *in situ* izkoriščamo lastne tumorske antigene, ima pristop načeloma možnost za učinkovitost proti različnim tipom raka.

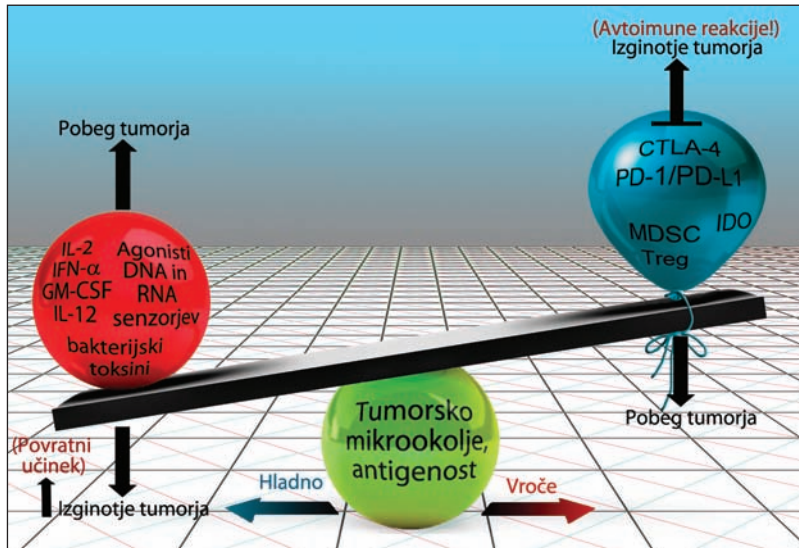
Na uspešnost imunološkega zdravljenja na splošno vpliva predvsem antigenost novotvorbe (tj. sposobnost povzročiti pridobljen imunski odziv) in njeno mikrookolje (114, 115). V zadnjem desetletju se je pojavila preprosta delitev novotvorb glede na mikrookolje v »hladne« in »vroče« na podlagi ravni vdora imunskih celic v novotvorbo, kar odraža, ali imunski sistem prepozna in se bori proti novotvorbi ali ne (116). Vroči tumorji vsebujejo veliko število imunskih celic, hladni pa malo. Vdor imunskih celic v novotvorbo je posledica njene tujosti oz. antigenosti, ki pa je odvisna od mutacijskega bremena. Novotvorbe z visokim bremenom so močno spremenjene, zato jih imunski sistem lažje zazna in vanje vdre več imunskih celic. Takšne novotvorbe lahko skozi postopek imunskega preurejanja (angl. *immunoediting*) hitro postanejo imunsko zavrte oz. sekundarno hladne (5). Po drugi strani pa so lahko novotvorbe tudi intrinzično hladne, ker imajo nizko mutacij-

sko breme in jih imunski sistem niti ne zazna. Zapletena je tudi določitev antigenosti novotvorbe, ki ne vključuje samo mutacijskega bremena, ampak tudi morebitne spremembe, ki so skozi proces imunskega preurejanja naredile novotvorbo manj antigeno. Najbolj znana prilagoditev visoko mutiranih novotvorb je npr. zmanjšano izražanje poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda 1 (angl. *major histocompatibility complex class 1*, MHC 1) na rakavih celicah in s tem skrivanje mutiranih antigenov, t. i. neoantigenov, pred imunskim sistemom (117).

Z zdravljenjem, kot je cepljenje *in situ*, ki izkorišča lastne tumorske antigene, tako ne moremo pozdraviti novotvorb, ki so intrinzično hladne. Primerna pa je za novotvorbe z velikim številom neoantigenov. Če takšna novotvorba ne vsebuje veliko imunskih celic, je smiselno dodati spodbujevalce imunskega odziva. Če pa novotvorba z velikim številom neoantigenov vsebuje malo imunskih celic, ker je očitno že postala sekundarno hladna, je smiselno združeno zdravljenje z zaviralci imunskih kontrolnih točk (slika 5) (118). S podobnimi dvomi se zdravniki soočajo tudi pri ostalih pristopih imunološkega zdravljenja. Danes se zato veliko pozornosti na področju imunoonkologije namenja iskanju ustreznih napovednih dejavnikov, ki bodo onkologom v pomoč pri odločanju o zdravljenju (119).

ZAKLJUČEK

Cepljenje *in situ* je oblika terapevtskega cepljenja, pri kateri izkoristimo bolniku lastne tumorske antigene, tako da z zdravljenjem sprožimo imunski odziv neposredno v novotvorbi. Na Oddelku za eksperimentalno onkologijo smo predlagali in tudi dokazali, da lahko cepljenje *in situ* dosežemo z genskim elektroprenosom TNF- α in IL-12, kjer TNF- α igra vlogo lokalnega ablacijskega zdravljenja, ki povzroči cepljenje *in situ* proti tumorskim antigenom, sproščeni iz ubitih rakavih celic, genski elektro-



Slika 5. Izbor imunološkega zdravljenja glede na vrsto novotvorbe (111). IL-2 – interlevkin-2, IFN- α – interferon α , GM-CSF – granulocitne in monocitne kolonije spodbujajoči dejavnik (angl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-12 – interlevkin-12, CTLA-4 – antigen citotoksičnih limfocitov T 4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), PD-1 – beljakovina programirane celične smrti 1 (angl. *programmed cell death protein 1*), PD-L1 – ligand beljakovine programirane celične smrti 1 (angl. *programmed cell death protein ligand 1*), IDO – indolamin 2,3-dioksigenaza, MDSC – mieloidne zaviralne celice (angl. *myeloid-derived suppressor cells*), Treg – regulatorni limfocit T (angl. *regulatory T-cells*).

prenos IL-12 pa je spodbujevalec imunskega odziva, ki že sproženi imunski odziv pospeši in razširi v sistemski ter trajen odziv.

Genski elektrotransnos je najuspešnejši način lokalnega vnosa genov, zapisanih na plazmidih, *in vivo*, ki se hitro približuje klinični uporabi (54). Uporaben je tako za cepljenje kot tudi lokalno ciljanje zaradi prostorske natančnosti, ki jo zagotavlja elektroporacija. Slednja ima že dolgo zgodovino klinične uporabe v elektrokemoterapiji (32). Plazmide je po drugi strani treba šele vpejljati v klinično uporabo, pri čemer moramo upoštevati stroge zahteve nadzornih agencij. Pripraviti moramo plazmide brez genov za odpornost proti antibiotikom in pripravljeni morajo biti v pogojih t. i. dobre proizvodne prakse. Zato želimo v naši raziskovalni skupini v sodelovanju z drugimi slovenskimi znanstveniki in industrijo ustvariti ploščad za prenos znanja, ki bo povezovala strokovnjake z različnih področij: strokovnjake, ki

načrtujejo nove plazmide, strokovnjake, ki proizvajajo te plazmide v klinični kakovosti, strokovnjake, ki načrtujejo elektroporatorje, in strokovnjake, ki vse to preizkušajo v predkliničnih raziskavah. Naš skupen cilj bo pripeljati pristop do klinične uporabe, kjer bomo lahko z lokalnim zdravljenjem primarne novotvorbe sprožili sistemski imunski odziv proti rakavim celicam in s tem uničenje zasevkov ter popolno ozdravitev bolnika (slika 4).

VIRI FINANCIRANJA

Raziskave so bile izvedene v okviru projekta J3-4259, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost republike Slovenije v sklopu programa P3-0003. Delo je potekalo v sklopu LEA-EBAM (Francosko-slovenski združeni evropski laboratorij za aplikacije pulznih električnih polj v biologiji in medicini). Naložbo sta sofinancirala Republika Slovenija in Evropski sklad za regionalni razvoj.

LITERATURA

1. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6 (6): 449–58.
2. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, et al. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12 (1): 337–65.
3. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018; 32 (19–20): 1267–84.
4. Young JL, Dean DA. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet*. 2015; 89: 49–88.
5. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21 (2): 137–48.
6. Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P, et al. The immune system – is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008; 20 (2): 101–12.
7. Ochslein AF. Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol*. 2005; 27 (1): 19–35.
8. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011; 480 (7378): 480–9.
9. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017; 541 (7637): 321–30.
10. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Onco-target*. 2014; 5 (24): 12472–508.
11. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape. *Ann Oncol*. 2018; 29 (1): 84–91.
12. European Medicines Agency: First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union: development of Kymriah and Yescarta supported through PRIME [internet]. 2018 [citirano 2018 Dec 6]. Dosegljivo na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union_en.pdf
13. Zitvogel L, Kroemer G. Introduction: the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20 (5): 501–3.
14. den Brok MH, Suttmuller RP, van der Voort R, et al. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2004; 64 (11): 4024–9.
15. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Cancer is not just a disease of a tissue: it is a host disease. How to reactivate host defense against tumors using conventional therapies of cancer? *Ann Endocrinol*. 2008; 69 (2): 151–2.
16. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20 (5): 504–11.
17. Ghiringhelli F, Apetoh L, Housseau F, et al. Links between innate and cognate tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19 (2): 224–31.
18. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunol*. 2014; 3 (9): e955691.
19. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res*. 2008; 68 (11): 4026–30.
20. He S, Mao X, Sun H, et al. Potential therapeutic targets in the process of nucleic acid recognition: opportunities and challenges. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36 (1): 51–64.
21. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, et al. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 2: 168.
22. Dempsey A, Bowie AG. Innate immune recognition of DNA: a recent history. *Virology*. 2015; 479–80: 146–52.
23. Deplanque G, Shabafrouz K, Obeid M. Can local radiotherapy and IL-12 synergise to overcome the immunosuppressive tumor microenvironment and allow »in situ tumor vaccination«? *Cancer Immunol Immunother*. 2017; 66 (7): 833–40.
24. Pierce RH, Campbell JS, Pai SI, et al. In-situ tumor vaccination: bringing the fight to the tumor. *Hum Vaccines Immunother*. 2015; 11 (8): 1901–9.
25. Serša G, Teissie J, Čemažar M, et al. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64 (10): 1315–27.
26. Stevenson FK, Ottensmeier CH, Rice J. DNA vaccines against cancer come of age. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22 (2): 264–70.

27. Jacobs JJ, Snackey C, Geldof AA, et al. Inefficacy of therapeutic cancer vaccines and proposed improvements. Casus of prostate cancer. *Anticancer Res.* 2014; 34 (6): 2689–700.
28. Hammerich L, Binder A, Brody JD. In situ vaccination: cancer immunotherapy both personalized and off-the-shelf. *Mol Oncol.* 2015; 9 (10): 1966–81.
29. Bartlett DL, Liu Z, Sathaiyah M, et al. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer.* 2013; 12 (1): 103.
30. Nierkens S, den Brok MH, Ruers TJ, et al. Radiofrequency ablation in cancer therapy: tuning in to *in situ* tumor vaccines. In: Keisari Y, ed. *Tumor ablation: effects on systemic and local anti-tumor immunity and on other tumor-microenvironment interactions.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 39–59.
31. Miklavčič D, Mali B, Kos B, et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online.* 2014; 13 (1): 29.
32. Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors –current status: basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. *Semin Oncol.* 2019; 46 (2): 173–91.
33. Kotnik T, Rems L, Tarek M, et al. Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annu Rev Biophys.* 2019; 48: 63–91.
34. Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, et al. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochem Bioenerg.* 1997; 43 (2): 279–83.
35. Roux S, Bernat C, Al-Sakere B, et al. Tumor destruction using electrochemotherapy followed by CpG oligodeoxynucleotide injection induces distant tumor responses. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57 (9): 1291–300.
36. Gerlini G, Sestini S, Di Gennaro P, et al. Dendritic cells recruitment in melanoma metastasis treated by electrochemotherapy. *Clin Exp Metastasis.* 2013; 30 (1): 37–45.
37. Mali B, Jarm T, Snoj M, et al. Antitumor effectiveness of electrochemo-therapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2013; 39 (1): 4–16.
38. Wennerberg E, Lhuillier C, Vanpouille-Box C, et al. Barriers to radiation-induced *in situ* tumor vaccination. *Front Immunol.* 2017; 8 (10): 229.
39. Rödel F, Frey B, Multhoff G, et al. Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer Lett.* 2015; 356 (1): 105–13.
40. Reynders K, Illidge T, Siva S, et al. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev.* 2015; 41 (6): 503–10.
41. Lim YT. Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease. *Clin Exp Vaccine Res.* 2015; 4 (1): 54–8.
42. Lasek W, Zagodzón R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63 (5): 419–35.
43. Jacobson JM, Zheng L, Wilson CC, et al. The safety and immunogenicity of an interleukin-12-enhanced multiantigen DNA vaccine delivered by electroporation for the treatment of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016; 71 (2): 163–71.
44. Fournillier A, Frelin L, Jacquier E, et al. A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Infect Dis.* 2013; 208 (6): 1008–19.
45. Jalah R, Patel V, Kulkarni V, et al. IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques. *Hum Vaccines Immunother.* 2012; 8 (11): 1620–9.
46. Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, et al. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16034.
47. Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. *Science.* 2018; 359 (6372): 4672.
48. Elsabahy M, Nazarali A, Foldvari M. Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions. *Curr Drug Deliv.* 2011; 8 (3): 235–44.
49. Rosazza C, Haber Meglič S, Zumbusch A, et al. Gene electrotransfer: a mechanistic perspective. *Curr Gene Ther.* 2016; 16 (2): 98–129.
50. Gothelf A, Gehl J. Electroporation-based DNA delivery technology: methods for gene electrotransfer to skin. *Methods Mol Biol.* 2014; 1143: 115–22.
51. Lambricht L, Lopes A, Kos S, et al. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016; 13 (2): 295–310.

52. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26 (36): 5896–903.
53. Cha E, Daud A. Plasmid IL-12 electroporation in melanoma. *Hum Vaccin Immunother*. 2012; 8 (11): 1734–8.
54. Canton DA, Shirley S, Wright J, et al. Melanoma treatment with intratumoral electroporation of tavokinogene telseplasmid (pLL-12, tavokinogene telseplasmid). *Immunotherapy*. 2017; 9 (16): 1309–21.
55. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2015; 386 (10008): 2078–88.
56. Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, et al. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One*. 2011; 6 (5): e19252.
57. Tolmachov O. Designing plasmid vectors. *Methods Mol Biol*. 2009; 542: 117–29.
58. Husain SR, Han J, Au P, et al. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Ther*. 2015; 22 (12): 554–63.
59. Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, et al. New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol Ther*. 2011; 19 (11): 1942–9.
60. Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens*. 2015; 4 (2): 157–81.
61. Solensky R. Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003; 24 (3): 201–19.
62. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [internet]. 2018 [citirano 2018 Dec 6]. Dosegljivo na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf
63. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. *Biotechnol Law Rep*. 2007; 26 (6): 641–8.
64. Cranenburgh RM, Hanak JA, Williams SG, et al. *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (5): 26.
65. Cranenburgh RM. Operator-repressor titration: stable plasmid maintenance without selectable marker genes. In: Schleef M, ed. *Minicircle and miniplasmid DNA vectors: the future of nonviral and viral gene transfer*. New Jersey: Wiley; 2013. p. 7–21.
66. Spanggaard I, Snoj M, Cavalcanti A, et al. Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: safety and efficacy results of a phase I first-in-man study. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013; 24 (3): 99–107.
67. Kamenšek U, Tešić N, Serša G, et al. Constructing clinically applicable plasmids for cancer gene therapy. In: Jarm T, Kramar P, eds. *1st World congress on electroporation and pulsed electric fields in biology, medicine and food & environmental technologies*. Vol 53. Singapur: Springer; 2016. p. 313–6.
68. Kamenšek U, Tešić N, Serša G, et al. Tailor-made fibroblast-specific and antibiotic-free interleukin 12 plasmid for gene electrotransfer-mediated cancer immunotherapy. *Plasmid*. 2017; 89: 9–15.
69. Tešić N, Kamensek U, Serša G, et al. Evaluation of smooth muscle γ actin promoter suitability for tissue-specific gene delivery of interleukin-12. In: Jarm T, Kramar P, eds. *1st World congress on electroporation and pulsed electric fields in biology, medicine and food & environmental technologies*. Vol 53. Singapur: Springer; 2016. p. 317–20.
70. Kamenšek U, Tešić N, Serša G, et al. Clinically usable interleukin 12 plasmid without an antibiotic resistance gene: functionality and toxicity study in murine melanoma model. *Cancers*. 2018; 10 (3): 60.
71. Lamprecht Tratar U, Kos S, Kamenšek U, et al. Antitumor effect of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding interleukin-12 in canine melanoma model. *Cancer Gene Ther*. 2018; 25 (9–10): 260–73.
72. Hornstein BD, Roman D, Arévalo-Soliz LM, et al. Effects of circular DNA length on transfection efficiency by electroporation into HeLa cells. *PLoS One*. 2016; 11 (12): e0167537
73. Sum CH, Wettig S, Slavev RA. Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy. *Curr Gene Ther*. 2014; 14 (4): 309–29.
74. Brooks AR, Harkins RN, Wang PY, et al. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med*. 2004; 6 (4): 395–404.
75. Kamenšek U, Serša G, Vidic S, et al. Irradiation, cisplatin and 5-azacytidine up-regulate cytomegalovirus promoter in tumors and muscles: implementation of noninvasive fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol*. 2011; 13 (1): 43–52.

76. Gill DR, Pringle IA, Hyde SC. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther.* 2009; 16 (2): 165–71.
77. Scott SD, Joiner MC, Marples B. Optimizing radiation-responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy. *Gene Ther.* 2002; 9 (20): 1396–402.
78. Robson T, Hirst DG. Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2003; 2003 (2): 110–37.
79. Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, et al. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med.* 1995; 1 (8): 786–91.
80. Kos S, Tešič N, Kamenšek U, et al. Improved specificity of gene electrotransfer to skin using pDNA under the control of collagen tissue-specific promoter. *J Membr Biol.* 2015; 248 (5): 919–28.
81. Kamenšek U, Serša G. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiol Oncol.* 2008; 42 (3): 115–35.
82. Kamenšek U, Serša G, Čemažar M. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Mol Cancer.* 2013; 12 (1): 136.
83. Tüting T, Storkus WJ, Lotze MT. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med.* 1997; 75 (7): 478–91.
84. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018; 359 (6382): 1350–5.
85. Rosenberg SA. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res.* 1991; 51 (18): 5074–9.
86. Yamashita YI, Shimada M, Hasegawa H, et al. Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model. *Cancer Res.* 2001; 61 (3): 1005–12.
87. Čemažar M, Jarm T, Serša G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Curr Gene Ther.* 2010; 10 (4): 300–11.
88. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13: 251–76.
89. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2015; 22 (2): 237–46.
90. Jinushi M, Tahara H. Cytokine gene-mediated immunotherapy: current status and future perspectives. *Cancer Sci.* 2009; 100 (8): 1389–96.
91. Cohen J. IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science.* 1995; 270 (5238): 908.
92. Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R, et al. Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 795: 440–54.
93. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood.* 1997; 90 (7): 2541–8.
94. ClinicalTrials.gov: interleukin 12 electroporation | cancer [internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [citirano 2018 Dec 6]. Dosegljivo na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=interleukin+12+electroporation&cond=cancer>
95. Immuno-oncology news: Metastatic melanoma therapy candidate ImmunoPulse IL-12 wins FDA orphan drug status [internet]. Philadelphia: Immuno-Oncology News; c2013–2020 [citirano 2018 Dec 6]. Dosegljivo na: <https://immuno-oncologynews.com/2017/06/13/oncosecs-metastatic-melanoma-therapy-candidate-pil-12-granted-fda-orphan-drug-status/>
96. ClinicalTrials.gov: Interleukin 12 electroporation vaccine [internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [citirano 2018 Dec 6]. Dosegljivo na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=interleukin+12+electroporation+vaccin&cntry=&state=&city=&dist=>
97. van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.* 2006; 11 (4): 397–408.
98. Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA Jr, et al. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget.* 2011; 2 (10): 739–51.
99. Hoekstra HJ, Veerman K, van Ginkel RJ. Isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: melphalan or TNF-melphalan perfusion? *J Surg Oncol.* 2014; 109 (4): 338–47.
100. van Ginkel RJ, Thijssens KMJ, Pras E, et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and melphalan for locally advanced soft tissue sarcoma: three time periods at risk for amputation. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14 (4): 1499–506.
101. Hayes AJ, Neuhaus SJ, Clark MA, et al. Isolated limb perfusion with melphalan and tumor necrosis factor alpha for advanced melanoma and soft-tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14 (1): 230–8.
102. Herman JM, Wild AT, Wang H, et al. Randomized phase III multi-institutional study of TNFerade biologic with fluorouracil and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: final results. *J Clin Oncol.* 2013; 30 (15): 886–94.

103. Hernandez J, Cooper J, Babel N, et al. TNFalpha gene delivery therapy for solid tumors. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10 (6): 993–9.
104. Qin W, Dion SL, Kutny PM, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics.* 2015; 200 (2): 423–30.
105. Lambrecht L, Vanvarenberg K, De Beuckelaer A, et al. Coadministration of a plasmid encoding HIV-1 gag enhances the efficacy of cancer DNA vaccines. *Mol Ther.* 2016; 24 (9): 1686–96.
106. Herrada AA, Rojas-Colonelli N, Gonzalez-Figueroa P, et al. Harnessing DNA-induced immune responses for improving cancer vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8 (11): 1682–93.
107. Bošnjak M, Jesenko T, Kamenšek U, et al. Electrotransfer of different control plasmids elicits different antitumor effectiveness in B16.F10 melanoma. *Cancers.* 2018; 10 (2): 37.
108. Kamenšek U, Rols MP, Čemažar M, et al. Visualization of nonspecific antitumor effectiveness and vascular effects of gene electro-transfer to tumors. *Curr Gene Ther.* 2016; 16 (2): 90–7.
109. Rols MP, Teissié J. Electroporability of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J.* 1990; 58 (5): 1089–98.
110. Calvet CY, Famin D, André FM, et al. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *Oncoimmunology.* 2014; 3 (4): e28131.
111. Kamenšek U, Kos S, Serša G. Adjuvant immunotherapy as a tool to boost effectiveness of electrochemotherapy. In: Miklavčič D, ed. *Handbook of electroporation.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 1–16.
112. Kamenšek U, Čemažar M, Lamprecht Tratar U, et al. Antitumor in situ vaccination effect of TNF α and IL-12 plasmid DNA electrotransfer in a murine melanoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2018; 67 (5): 785–95.
113. Teulings H, Limpens J, Jansen SN, et al. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2015; 33 (7): 773–81.
114. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125 (2): 272–83.
115. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, et al. Cancer immunology: the »cancer immunogram«. *Science.* 2016; 352 (6286): 658–60.
116. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the »Immunoscore« in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014; 232 (2): 199–209.
117. Becker JC, Andersen MH, Schrama D, et al. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62 (7): 1137–48.
118. Makkouk A, Weiner GJ. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res.* 2015; 75 (1): 5–10.
119. Insight from Dana-Farber cancer institute: Enhancing Immunotherapy: the race to make cold tumors hot [internet]. Boston: Dana-Farber Cancer Institute; 2018 [citirano 2018 Dec 12]. Dosegljivo na: <https://blog.dana-farber.org/insight/2018/06/enhancing-immunotherapy-race-make-cold-tumors-hot/>