

Gensko zdravljenje raka

Cancer gene therapy

Nina Kočevar, Maja Čemažar, Gregor Serša

Povzetek: Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni. Velik delež raziskav poteka na raku, saj imajo trenutne metode zdravljenja omejeno učinkovitost in neželene učinke. V prispevku najprej na kratko predstavimo osnovne principe genskega zdravljenja. Sledi opis glavnih dostavnih sistemov, ki jih delimo na virusne in nevirusne ter glavnih pristopov genskega zdravljenja pri raku. Te lahko razdelimo na imunološke, kjer izkoriščamo imunski sistem za pobijanje rakavih celic preko antigenskih, stimulatornih in kostimulatornih molekul, ter molekularne, kjer izkoriščamo inaktivacijo onkogenov, vstavitve tumorje zaviralnih genov, uporabo interferenčne RNA, encime za aktivacijo zdravil, onkolične viruse, inhibicijo angiogeneze in vstavitve genov za odpornost na zdravila v hematopoetske celice.

Ključne besede: rak, gensko zdravljenje, virusni vektorji, nevirusni vektorji, pristopi za zdravljenje

Abstract: Gene therapy uses genes to treat diseases. Large amount of research is based on cancer because current methods for cancer treatment have limited efficiency and unwanted side effects. In the following article we first present the basic principles of gene therapy. Next, we describe the main delivery systems, which are viral and non-viral, and then the main therapeutic strategies of cancer gene therapy. These can be divided into immunological, where we take advantage of the immune system for cancer cell killing through antigenic, stimulatory and co-stimulatory molecules, and molecular, where we take advantage of oncogene inactivation, tumor suppressor gene insertion, RNA interference, prodrug activating enzymes, oncolytic viruses, angiogenesis inhibition and insertion of drug resistance genes in hematopoietic progenitors.

Keywords: cancer, gene therapy, viral vectors, nonviral vectors, therapeutic strategies

1 Uvod

Rak je bolezen, oziroma skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic v različnih organih, brez fiziološke funkcije za ta organ (1). Tumor, ki nastaja, okvarja fiziološke funkcije organa, zaradi invazivnosti tumorskih celic pa nastajajo oddaljeni zasevki oz. metastaze. Uporabljajo se različni pristopi zdravljenja (kirurško zdravljenje, radioterapija, kemoterapija), med novejšje pa spada gensko zdravljenje. Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni (2). Prvotno so z njim poskušali zdraviti pogoste monogenske bolezni krvnih celic, kot sta beta talasemija in anemija srpastih celic (3). Njihove molekularne mehanizme so namreč dobro razumeli, tarčne celice pa so bile lahko dostopne za odvzete, gensko manipulacijo v samem laboratoriju in za ponoven vnos v bolnika. V primerjavi z ustaljenim zdravljenjem teh bolezni, presaditvijo hematopoetskih matičnih celic primernih darovalcev, je gensko zdravljenje teoretično omogočalo možnost uporabe vsem bolnikom. Zanj namreč ni bilo potrebno iskati primernih darovalcev, saj so celice za gensko manipulacijo lahko odvzeli samim bolnikom. Tako so se izognili iskanju primernih darovalcev in s tem povezanim imunološkim oviram. Nato se je težišče v sredini 80-ih let prejšnjega stoletja prestavilo na veliko redkejše bolezni hude kombinirane imunske pomanjkljivosti (SCID, angl. *severe combined immunodeficiency disease*), nastale zaradi okvare v encimu adenozin deaminazi (ADA) (3). Ravno ta bolezen je postala tarča prve odobrene klinične študije z genskim zdravljenjem pri dveh otrocih leta 1990, študija pa je dala zagon še novim

raziskavam (4). Tako je število poskusov z genskim zdravljenjem slabo desetletje strmo naraščalo, vse do smrti 18-letnega bolnika leta 1999 zaradi vnetne reakcije na adenovirusni vektor ter razvoja levkemiji podobne klonalne proliferacije limfocitov pri dveh otrocih leta 2002 (4). Po zaustavitvi takrat potekajočih in novih planiranih študij, ter ugotavljanju vzrokov nastanka neželenih učinkov, dandanes njihovo število spet počasi narašča in izvajajo se študije uporabe genskega zdravljenja pri različnih boleznih.

V prispevku bomo najprej na kratko pojasnili osnovne principe genskega zdravljenja, nato pa opisali glavne dostavne sisteme in pristope pri genskem zdravljenju raka. Uporabo le-tega v praksi bomo osvetlili s primeri kliničnih študij, ki so bile objavljene v zadnjih letih v znanstvenih revijah ali v podatkovnih zbirkah.

2 Osnovni principi genskega zdravljenja

V splošnem lahko pri genskem zdravljenju za popravilo okvarjenih genov uporabljamo različne pristope (2):

- Nespecifična vstavitve delujočega gena za zamenjavo nedelujočega.
- Zamenjava nedelujočega gena z delujočim s homologno rekombinacijo.
- Popravilo nedelujočega gena z reverzno mutacijo.
- Sprememba v uravnavanju določenega gena.

Pri zdravljenju rakavih bolezni lahko z genskim zdravljenjem popravimo oz. zamenjamo genetske okvare, značilne za rakave celice, npr. z zamenjavo tumorje zaviralnega gena ali z onemogočanjem izražanja onkogenega. Poleg tega pa lahko tudi sprožimo smrt tarčnih tumorskih celic, npr. z gensko usmerjeno kemoterapijo, z ojačitvijo imunskega odziva ali s ciljanjem tumorskega žilja (5). Dostava genetskega materiala lahko poteka na dva načina (6): *in vivo* ali *ex vivo*. V prvem primeru DNA dostavimo neposredno v tarčne celice tkiva bolnika, kot so nedavno to naredili na primer Matsumoto in sodelavci (7). V svoji pilotski študiji so 5 bolnikom z napredovanim melanomom injicirali kationske liposome z genom za humani interferon (HuIFN) v kožo ali podkožno. Pogoji za tako dostavo je, da so celice lahko dostopne in da vektor za prenos omogoča specifično okužbo, integracijo in izražanje željenega gena (6). V drugem primeru pa gen za zdravljenje vstavimo v celice *ex vivo*, čemur sledi presaditev modificiranih celih v tarčno tkivo. Na ta način so Hacein-Bey-Abina in sodelavci v celice kostnega mozga prenesli retrovirusni vektor, ki je nosil zapis za gen za skupno verigo petih citokinskih receptorjev, in jih vnesli v 5 bolnikov z na kromosom X-vezano hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo (8). Pri tem načinu je posebej pomembna izbira celic za manipuliranje: morajo biti lahko dostopne, dolgo časa preživeti *in vivo*, sposobne izražati transgen v visokih količinah dalj časa ter ne smejo izzvati imunskega odziva (6). V poštev tako pridejo transformirane celične linije, avtologne primarne celične kulture, ki niso imunogene in imajo znižano tveganje za maligno transformacijo ali zarodne celice, ki imajo potencial se popolnoma inkorporirati v katerokoli gostiteljevo tkivo in se transformirati v zrelo celico organa.

Ključnega pomena za gensko zdravljenje je dostava želenega gena v celice. Za to uporabljamo različne tipe vektorjev, ki jih v grobem razdelimo na virusne in nevirusne (2, 9). Virusni ostajajo najpogostejši; do sedaj so jih raziskovalci uporabili v približno dveh tretjinah kliničnih študij z genskim zdravljenjem (4). V odobrenih, še trajajočih ali zaključenih kliničnih študijah z genskim zdravljenjem se za dostavne sisteme najpogosteje uporabljajo adenovirusi (24,1% oz. 370 študij), sledijo jim retrovirusi (21,2% oz. 326 študij), gola/plazmidna DNA (24,1% oz. 370 študij), virus vakcinije (18,1% oz. 278 študij), lipofekcija (7,1% oz. 109 študij), adenovirusom pridruženi virus (4,4% oz. 67 študij) in virus herpesa simpleksa (3,3% oz. 51 študij) (10).

Gensko zdravljenje lahko cilja somatske ali zarodne celice. Le v drugem primeru pride do prenosa spremembe na potomce, je pa tovrstno zdravljenje vprašljivo (predvsem etično) za izvedbo pri večjih živalih in ljudeh (2).

3 Gensko zdravljenje raka

Zaenkrat je največ kliničnih študij genskega zdravljenja, približno dve tretjini, usmerjenih v gensko zdravljenje raka (4). Gensko zdravljenje raka je pomemben nov pristop zdravljenja raka, ki temelji na ciljanem in specifičnem zdravljenju, podobno kot zdravljenje s tarčnimi zdravili. Cilj obeh pristopov je čim bolj specifično ciljati tumorske celice in čim manj prizadeti ne-maligne normalne celice. Ustaljena zdravljenja raka, kot sta radioterapija in kemoterapija, ne izpolnjujeta vseh teh pogojev, kar mnogokrat vodi do lokalnih in sistemskih neželenih učinkov. Gensko zdravljenje raka verjetno ne bo v prvih fazah klinične uporabe uporabljeno kot samostojno zdravljenje, ampak v kombinaciji z radioterapijo in kemoterapijo. Zato je potrebno gensko zdravljenje

prilagoditi kombinaciji z radio in kemoterapijo, tako prostorsko kot časovno. Eden od takih pristopov je nadzor izražanja vnesenega transgena z ionizirajočim sevanjem ali s citostatiki (6).

Pri vsakem genskem zdravljenju je poglobitnega pomena varen in učinkovit vnos genskega materiala, od bolezni pa je odvisno, koliko časa mora le-ta vzdržati v celicah (9). Tako je ponekod zaželeno čim daljše izražanje genov, druge pa je zadosti že kratko obdobje. Večina načinov za gensko zdravljenje raka spada k slednjim. Pri dostavi genov za zdravljenje je pomembno tudi, ali bomo genski material vnesli sistemsko ali lokalno (t. i. ciljana dostava). Odločitev je odvisna od lokacije oz. dostopnosti tumorja in prisotnosti oddaljenih zasevkov ter samih sposobnosti dostavnih sistemov (11). Kar nekaj tipov tumorjev je pripravnih za direktno injiciranje (npr. melanom) ali druge načine lokalne aplikacije (npr. peritonealno injiciranje za rak jajčnikov) genov za zdravljenje. Pri oddaljenih zasevkih, na primer, pa pride v poštev vnos materiala v krvni obtok in ciljanje določenega mesta. Tu se lahko zatakne. Dostavni sistemi morajo namreč v krvi preživeti nevarnost razgradnje in celične obrambne mehanizme, ko pridejo do izbranega tkiva se morajo specifično vezati na tarčne celice, ko so enkrat v celici, pa se morajo tam izogniti še znotrajceličnim oviram. Kot že omenjeno, delimo dostavne sisteme na virusne in nevirusne (Preglednica 1).

3.1 Virusni dostavni sistemi

Virusi so naravno razviti za infekcijo celic in vnos svojega genskega materiala vanje (9). Pri genskem zdravljenju se uporablja t. i. virusne vektorje, ki so laboratorijsko spremenjeni, tako da so odstranjeni geni za njihovo patogenost (npr. oviranje virusnega razmnoževanja z odstranitvijo strukturnih genov). Kot dostavni sistemi veljajo virusni vektorji za bolj učinkovite kot nevirusni, a jih pesti vprašanje varnosti. Poleg tega so omejeni kar se tiče velikosti vključka in jih je težko proizvajati. V uporabi za gensko zdravljenje raka prevladujejo adenovirusni in retrovirusni vektorji, vektor virusa vakcinije, adenovirusom pridruženi virusni vektorji ter vektor virusa herpesa simpleksa.

3.1.1 Adenovirusni vektorji

Adenovirusni vektorji so najpogosteje uporabljeni vektorji za dostavo genov (12). Sami adenovirusi imajo dvoverižni DNA genom, ki se ne integrira v gostiteljev kromosom, tako da je tudi izražanje gena za zdravljenje prehodno. Lahko okužijo tako deleže se kot nedeleže se celice. Za vstop v tarčno celico se vežejo na celični receptor CAR (angl. *coxsackie and adenovirus receptor*) in dalje z $\alpha\beta$ integrini. Največ adenovirusnih vektorjev je narejenih na osnovi serotipa 5. Obstaja več generacij replikacijsko okvarjenih virusov, katerim izbrišemo gene zgodnjih (E1A, E2B, E2A, E2B, E3, E4) in/ali poznih (L1, L2, L3, L4, L5) regij. Prva generacija replikacijsko okvarjenih virusov ne vsebuje regije E1 ter včasih E3, druga ima poleg tega inaktivirano ali izbrisano regijo E2 in/ali E4, tretja (angl. *high-capacity, gutless, helper-dependent*) pa ima izbrisane vse virusne gene z izjemo ITR (angl. *inverted terminal repeat*) in signalov za pakiranje virusnih delcev. Adenovirusni vektorji omogočajo vključevanje malo večjih kosov DNA kot retrovirusni, njihova glavna slabost pa je, da so zelo imunogeni. To se je izkazalo za usodno pri 18-letnem bolniku z okvaro v ornitin transkarbamilazi, ki je sodeloval v pilotski študiji genskega zdravljenja (4). Številne klinične študije so vseeno pripeljale do tega, da so oktobra 2003 kitajske oblasti za zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu odobrile uporabo rekombinantnega adenovirusnega vektorja s kaseto za

Preglednica 1: Pregled glavnih dostavnih sistemov in njihova uporaba v kliničnih študijah pri genskem zdravljenju raka. Podatki so povzeti po zbirkah *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* in *ClinicalTrials.gov* (10, 29).

Table 1: An overview of main gene delivery systems and their application in clinical trials for cancer gene therapy. The data were collected from databases *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* and *ClinicalTrials.gov* (10, 29).

	KLINIČNE RAZISKAVE	PRISTOPI ZA ZDRAVLJENJE	IDENTIFIKACIJSKA ŠTEVILKA ŠTUDIJE
VIRUSNI VEKTORJI			
Adenovirusni vektorji	Rak dojke, rak prostate, rak prostate, gliom, rak jajčnikov in peritonealne votline, rak jeter, rak glave in vratu, rak mehurja, rak pljuč	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, vnos tumorje zaviralnega gena, zdravljenje z onkolitičnim virusom	NCT00849459, CA-001, NCT00583492, BE-018, NCT00003450, NCT00003147, DE-072, NCT00109655, US-470
Retrovirusni vektorji	Nevroblastom, rak pljuč, gliom, melanoma, rak jajčnikov, rak trebušne slinavke, rak dojke	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, vnos tumorje zaviralnega gena, zmanjševanje toksičnosti kemoterapije	NCT00186862, CN-002, DE-014, UK-005, US-339, UK-106, CA-008
Vektor virusa vakcinije	Rak dojke, melanom	Imunoterapija, vnos tumorje zaviralnega gena	NCT00003761, BE-011, CH-020
Adenovirusom pridruženi virusni vektorji	Melanom, rak prostate	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom	CH-025, JP-014
Vektor virusa herpesa simpleksa	Rak želodca, gliom, rak debelega črevesa, rak glave in vratu	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, zdravljenje z onkolitičnim virusom	UK-096, FR-034, NCT00012155, UK-066
NEVIRUSNI VEKTORJI			
Gola DNA	Rak glave in vratu, melanom, rak ledvic	Imunoterapija	DE-010, CH-045, NCT00096629
Elektroporacija	Melanom	Imunoterapija	NCT00323206
Kationski lipidi	Melanom, levkemija, različni solidni tumorji, rak jajčnikov	Imunoterapija, siRNA, vnos tumorje zaviralnega gena	CA-004, NCT00860522, NCT00938574, US-415
Kationski polimeri	Različni solidni tumorji	siRNA	NCT00689065

izražanje človeškega *p53* (Gendicine™), ki je tako postal prvi komercializiran proizvod za gensko zdravljenje (13). Poleg omenjenega tipa pa obstajajo tudi replikacijsko kompetentni (onkolitični) adenovirusi, ki se razmnožujejo specifično v tarčnih tumorskih tkivih (9).

3.1.2 Retrovirusni vektorji

Retrovirusni vektorji so bili prvi dostavni sistemi uporabljeni v genskem zdravljenju (14). Genom retrovirusa sestavlja dve identični enoverižni RNA molekuli, iz katerih lahko s svojo reverzno transkriptazo napravijo dvoverižne DNA kopije, ki se integrirajo v genom gostitelja. Ravno ta lastnost, ki omogoča stabilen genski prenos, pa je hkrati njihova glavna slabost: v francoski študiji na kromosom X-vezane hude kombinirane imunske pomanjkljivosti se je namreč po začetnem navdušenju pri dveh otrocih pojavila levkemija podobna klonalna proliferacija limfocitov, saj naj bi se retrovirusni vektor integriral v bližino promotora protoonkogenega LMO2 (4). Z izjemo lentivirusov (HIV) se retrovirusi ne morejo razmnoževati v nedeležih se celicah (14). Izbira tarčnih celic je vezana na tip proteinov ovojnice virusa in na njim ustrezne gostiteljske receptorje. Večina vektorjev izhaja iz mišjega virusa levkemije (angl. *Moloney murine leukemia virus*), ki mu odstranimo večino genoma (gene *gag*, *pol* in *env*), da ostanejo le ponovitve LTR (angl. *long*

terminal repeat) in signal za pakiranje, vanj pa lahko vključimo do 8 kb tuje DNA. Taki virusi so replikacijsko okvarjeni in za svoje razširjanje potrebujejo mediatorske celice, ki dopolnjujejo manjkajoče virusne funkcije. Poleg retrovirusov z okvarjeno replikacijo so v uporabi, podobno kot pri adenovirusih, tudi onkolitični virusi (9).

3.1.3 Vektor virusa vakcinije

Virus vakcinije, ki spada v družino poksvirusov, je sodeloval pri izbrisu črnih koz in je zato najdlje uporabljen virus pri ljudeh (15). Ima dvoverižni DNA genom. Tekom življenjskega cikla lahko tvori tri oblike infektivnih delcev, ostane pa v citoplazmi od vstopa v celico do izstopa novonastalih virusov, tako da ne pride do integracije v gostiteljev genom. Okuži lahko tako deleže se kot nedeleže se celice (9). O samem receptorju za vstop znanstveniki niso enotnega mnenja, vendar pa virus lahko okuži različne celične linije (15). Ravno zaradi njihove zgodovine obstaja veliko različnih sevov, ki so za funkcijo rekombinantnih vektorjev različno obdelani: sev Ankara, na primer, je klasično oslabilen s pasažami v fibroblastih piščančjih embrijev, dalje sta tu z delecijami modificirana seva NYVAC in Lister itd. Zaradi velikega genoma ima možnost prenosa velikega vključka (vsaj 25 kb). Poleg replikacijsko okvarjenih je tudi tu za gensko zdravljenje raka možno uporabiti onkolitične viruse.

3.1.4 Adenovirusom pridruženi virusni vektorji

Adenovirusom pridruženi virusi so mali parvovirusi z enoverižnim DNA genomom, ki potrebujejo pri infekciji in replikaciji pomoč drugega virusa (adenovirusa ali herpesvirusa) (16). Če le-tega ni, vzpostavijo latentno infekcijo in se bodisi integrirajo v genom na specifično mesto (domnevno naj bi imeli preferenco za transkripcijsko aktivne regije kromatina) bodisi vztrajajo kot episom. Okužijo lahko tako deleče se kot nedeleče se celice. Serotip 2 (AAV2) uporablja heparin sulfat proteoglikane kot primarne receptorje ter receptorje za fibroblastni rastni faktor 1 (ang. *fibroblast growth factor 1*) in $\alpha_v\beta_5$ integrine kot koreceptorje in tako lahko dostopa do različnih tipov tkiv (17). Ravno na njegovi osnovi so bili narejeni prvi vektorji, danes pa skoraj za vsak organ obstaja preferenčni serotip (16). Genom adenovirusom pridruženih virusov vsebuje dva odprta bralna okvirja, *Rep* in *Cap*, ki ju za gensko zdravljenje odstranimo in tako kot vektorji zadržijo le neprevedena zaporedja ITR. Ena izmed glavnih slabosti adenovirusom pridruženih virusnih vektorjev (poleg učinka nevtralizirajočih protiteles) je, da vanje lahko vključimo manj kot 5 kb DNA (9).

3.1.5 Vektor virusa herpesa simpleksa

Virus herpesa simpleksa je iz družine herpesvirusov in ima velik dvoverižni DNA genom (18). Tekom svojega življenjskega cikla ima latentno fazo v obliki episoma in se tako ne integrira v gostiteljski genom. Okuži lahko deleče se in nedeleče se celice. Virus je po naravi nevrotropen (latentna faza poteka v živčnih celicah), kar lahko izkoriščamo pri dostavi genov v možganske tumorje (9). V vektor ga preoblikujemo z odstranitvijo nekaterih sekvenc, izraženih med zgodnjo infekcijo, kot so ICP0, ICP4, ICP27, ICP22. Zaradi velikega genoma lahko sprejme večje vključke kot ostali pogosto uporabljeni virusni vektorji, in sicer do skoraj 40 kb. Poleg replikacijsko okvarjene različice je zelo uporaben tudi kot onkolitični virus in se po odstranitvi nekaterih genov (gen za timidinsko kinazo, ICP34,5, ICP6...) selektivno razmnožuje le še v delečih se tumorskih celicah (17, 18).

Zgoraj naštetih skupine virusnih vektorjev v genskem zdravljenju raka prevladujejo. V manjši meri se raziskujejo tudi virus atipične kokošje kuge, virus vezikularnega stomatitisa, reovirus, poliovirus, virus ošpic itd. (17).

3.2 Nevirusni dostavni sistemi

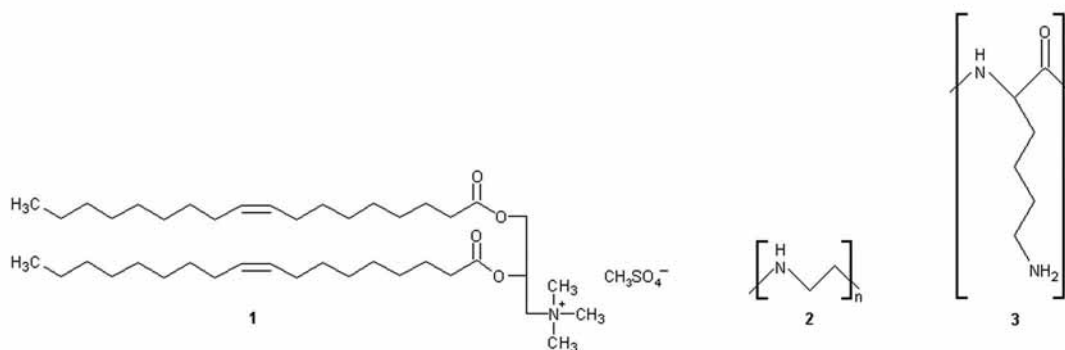
Nekatere slabosti virusnih dostavnih sistemov, kot sta npr. varnost ali proizvodnja na veliko, pridejo do manjšega izraza pri nevirusnih dostavnih sistemih (9). V tej kategoriji za uporabo v genskem zdravljenju raka prevladujejo gola DNA kot posebna enota ter kationski lipidi in polimeri (Slika 1). Prva je bila uspešno uporabljena za direktno injiciranje v tumorje ali kot DNA cepivo, vendar pa jo organizem lahko hitro odstrani (9). Za zaščito in za zmanjšanje velikosti oz. kompleksnosti lahko DNA »vgradimo« v kationske nevirusne dostavne sisteme, kot so kationski lipidi in kationski polimeri (11). Ti z negativno nabito DNA interagirajo preko elektrostatskih interakcij, neto naboj celega kompleksa pa ostane pozitiven, kar v nadaljnji stopnji omogoči učinkovito interakcijo z negativno nabitimi celičnimi membranami in internalizacijo, ki v glavnem poteka z endocitozo (9). Kationske nevirusne vektorje sicer pesti slabša učinkovitost v primerjavi z virusnimi in so odvisni od svojih fizikalno-kemijskih lastnosti, vendar pa jih z lahkoto modificiramo, npr. za zmanjšanje nespecifičnih interakcij s sestavinami krvi ali za ciljanje receptorjev na površini tarčne celice (11).

3.2.1 Gola DNA

Golo DNA lahko neposredno uporabimo za vnos, če jo vnesemo blizu bolezenskega mesta in stran od elementov, ki bi jo utegnili razgraditi (19). Tako jo v krvi, na primer, ogrožajo nukleaze (11). V pomoč pri dostavi nam je lahko elektroporacija – fizikalna metoda za dostavo različnih molekul v celice z aplikacijo kontroliranih zunanjih električnih polj, ki začasno povečajo propustnost celične membrane (20). Z njo so proučevali uporabo različnih genov za zdravljenje in pristopov. Še posebej primerna je za dostavo genov, ki ciljajo na tumorsko žilje, saj že metoda sama po sebi deluje žilno razdiralno. V letošnjem letu bomo pričeli tudi na Onkološkem inštitutu v Ljubljani s klinično študijo z uporabo elektroporacije kot dostavnega sistema za antiangiogen gen pri zdravljenju kožnih metastaz melanoma v okviru evropskega projekta Angioskin.

3.2.2 Kationski lipidi

Kationski lipidi so najbolj proučevani izmed nevirusnih vektorjev (19). Pri fiziološkem pH so pozitivno nabiti in se vežejo z DNA preko



Slika 1: Primer kationskega lipida DOTAP oz. *N*-[1-(2,3-dioleoiloksi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonijevega metilsulfata (1) ter kationskih polimerov poli(etilenimina) (2) in poli(L-lizina) (3).

Figure 1: An example of the cationic lipid DOTAP or *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate (1) and cationic polymers poly(ethyleneimine) (2) and poly(L-lysine) (3).

elektrostatskih interakcij. Vsi vsebujejo hidrofobno skupino, ki je lahko iz enega ali dveh maščobnokislinskih ali 12-18 C-atomskih alkilnih ostankov ali holesterolnega dela ter aminoskupino: hidrofobni del omogoči v vodnem mediju ureditev v dvoslojne vezikle (liposome), aminoskupina pa veže DNA in kondenzira v t.i. lipoplekse. Tekom razvoja so jih modificirali na različne načine, npr. z dodatkom nevtralnih lipidov, kot je holesterol, za povečanje učinkovitosti ali s polietilenglikolom za podaljšanje časa kroženja v krvi (9). V uporabi je tudi mešanica liposom/protamin/DNA: protamin je peptid, ki kondenzira DNA, preden se le-ta poveže s kationskimi lipidi. Liposomi tako reagirajo z že kondenzirano DNA, pri čemer nastane manjši kompleks, ki najverjetneje podaljša čas kroženja v krvi in olajša endocitozo (9).

3.2.3 Kationski polimeri

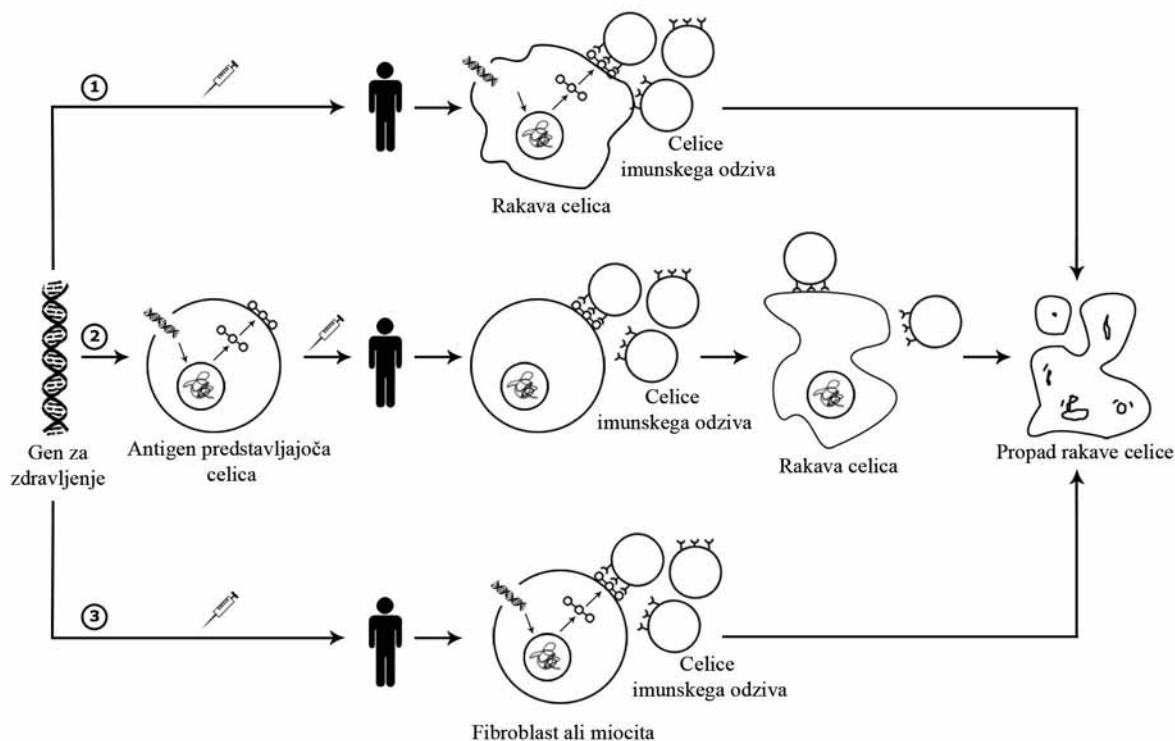
Kationski polimeri imajo prav tako pri fiziološkem pH pozitiven naboj, s katerim elektrostatsko privlači negativno nabito DNA v t.i. polipeks (19). Kot prvega so za gensko zdravljenje uporabili poli(L-lizina). V nasprotju s kationskimi lipidi je tu veliko dela potekalo na ligandih, ki bi olajšali celični privzem. Prav tako so raziskovalci nekatere L-lizine v polipeksu zamenjali s cisteinskimi ali triptofanskimi ostanki in s tem povečali učinkovitost prenosa ter polipekse prekrili s hidrofilnimi

polimeri za preprečitev opsonizacije s plazemskimi proteini. Poleg poli(L-lizina) je najbolj proučevan linearen ali razvejan poli(etilenimin) (9), v to skupino pa spadajo tudi hitosani, dendrimeri in reducibilni polikationi (9).

Zgoraj opisane kategorije prevladujejo v skupini nevirusnih dostavnih sistemov, raziskuje pa se tudi dostava genov s kationskimi peptidi, z različnimi kombinacijami omenjenih vektorjev (npr. lipopolipeksi), z različnimi nanodelci, z gensko pištolo, z ultrazvokom itd. (10, 19, 21).

3.3 Pristopi k zdravljenju

Razvoj raka je povezan s številnimi spremembami na genskem nivoju. Zaradi njegove kompleksne narave gensko zdravljenje na tem področju vsebuje različne pristope. Njihova razdelitev je težka, ker se med seboj prepletajo. Ena izmed možnosti je delitev na imunološke (Slika 2) in molekularne (Slika 3) (22), posamezne pristope pa lahko tudi kombiniramo z že obstoječimi metodami zdravljenja, npr. z radioterapijo (5). Kombinacija radioterapije, kot lokalnega zdravljenja, in promotorjev, katerih delovanje sprožimo z ionizirajočim sevanjem, lahko omogoči nadzorovano izražanje genov za zdravljenje v tumorju (t.i. transkripcijsko ciljanje) in s tem prispeva k zmanjšanju toksičnosti za normalno tkivo.



Slika 2: Shematski pregled imunološkega pristopa pri genskem zdravljenju raka. Gen za imunostimulacijo lahko vnesemo v tumorske celice (1), z in vitro manipulacijo usposobimo antigen predstavljajoče celice aktivno predstaviti tumorski antigen (2) ali neposredno vnesemo DNA cepivo z antigen-kodirajočimi geni (3).

Figure 2: A schematic overview of the immunological approach in cancer gene therapy. The gene coding for the immunostimulatory molecule can be inserted in cancer cells (1), the antigen presenting cells can be manipulated in vitro to enable them of active tumor antigen presentation (2) or DNA vaccine with the antigen coding gene can be directly injected (3).

V nadaljevanju prispevka bomo na kratko opisali glavne pristope genskega zdravljenja raka in uporabo le-teh v praksi osvetlili s primeri kliničnih študij, ki so bile objavljene v zadnjih letih v znanstvenih revijah ali v podatkovnih zbirkah.

3.3.1 Imunološki pristop

Rakave celice so po naravi imunogene, vendar pa so se sposobne izogibati imunskemu sistemu. To lahko počnejo zaradi izločanja imunosupresivov, znižanega izražanja antigenov ali molekul pglavitnega histokompatibilnostnega sistema in pomanjkanja kostimulacije (22). Posledično imunski odziv organizma ni dovolj za prepoznavanje in ubijanje tumorskih celic. Gensko zdravljenje, ki spreminja imunski odziv bolnika (imunoterapija), lahko izkoristimo kot spodbudo T celični imunosti, raziskuje pa se tudi celična in DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni.

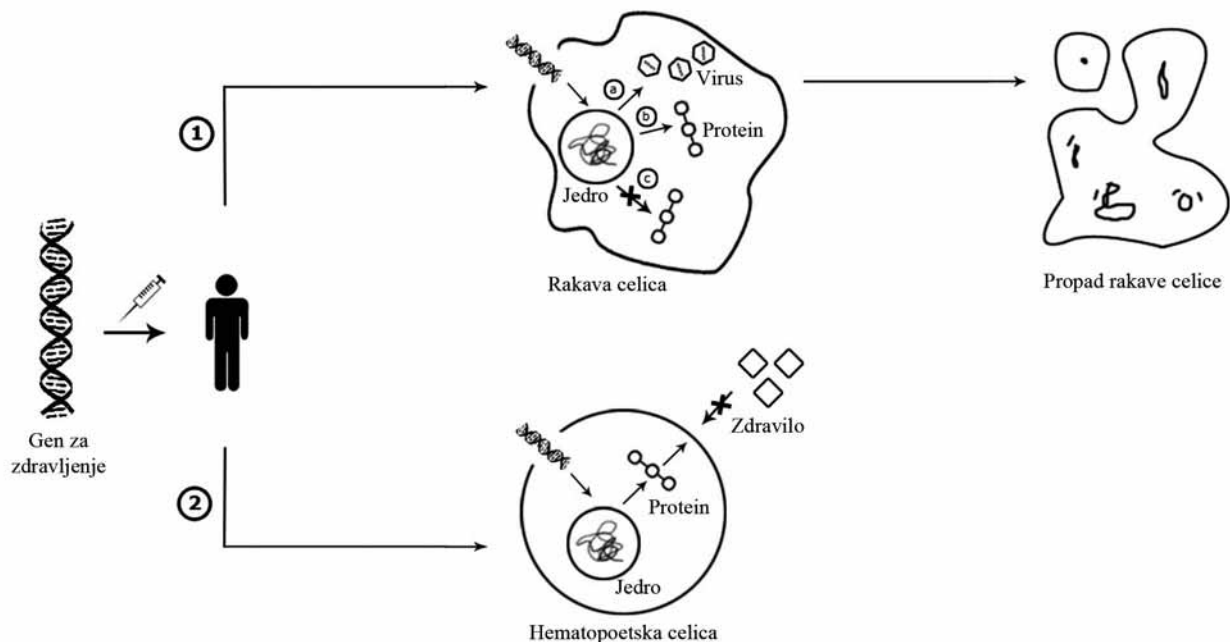
3.3.1.1 Prenos gena za imunostimulacijo

Ena izmed možnosti imunološkega pristopa je prenos gena za imunostimulacijo (npr. citokini), pri čemer se aktivirajo predvsem T limfociti in naravne celice ubijalke (22). Daud in sodelavci (23) so ta princip uporabili pri bolnikih z metastatskim melanomom, in

sicer z elektroporacijskim vnosom gena za interleukin-12 (*IL-12*). Gre za prvo klinično študijo za dostavo plazmidne DNA z *in vivo* elektroporacijo na ljudeh. Na 24 bolnikih so v svoji klinični študiji I. faze ugotovili, da je postopek varen in ga bolniki dobro prenašajo. Še posebej pa je vredno izpostaviti, da ima metoda potencial tudi za zdravljenje oddaljene bolezni. Pri nekaj vključenih bolnikih so se poleg lezij, v katere so injicirali plazmid, zmanjšale tudi oddaljene, nezdravljene lezije. Pri polovici teh bolnikov so opazili sistemski odziv na gensko zdravljenje, bodisi v obliki stabilizirane bolezni bodisi kot zmanjšanje nezdravljenih lezij, pri treh bolnikih pa celo popolno regresijo oddaljenih lezij.

3.3.1.2 Celična cepiva

Druga možnost genskega zdravljenja, ki spreminja imunski odziv bolnika, je *in vitro* manipulacija antigen predstavljajočih celic, da so sposobne aktivne predstavitve tumorskega antigena (22). Ta princip so uporabili Di Nicola in sodelavci (24), ko so z virusom vakcinije prenesli v dendritične celice tirozinazo (antigen, povezan z melanomom). Genetsko modificirane dendritične celice so nato injicirali v 6 bolnikov z metastatskim melanomom. S klinično študijo I. faze so pokazali, da je takšno cepljenje varno in učinkovito spodbuja T celično



Slika 3: Shematski pregled molekularnega pristopa pri genskem zdravljenju raka. Če gen za zdravljenje vnesemo v rakave celice (1), te propadejo zaradi razmnoževanja onkolitičnega virusa (1a), zaradi izražanja tumorja zaviralnega gena, encima za aktivacijo zdravila ali inhibitorja angiogeneze (1b) ali zaradi inhibicije izražanja onkogene ali induktorja angiogeneze (1c). Če gen za zdravljenje vnesemo v normalne (hematopoetske) celice, te sintetizirajo protein za odpornost na zdravilo (2).

Figure 3: A schematic overview of the molecular approach in cancer gene therapy. If the therapeutic gene is inserted in cancer cells (1), cell death occurs due to propagation of the oncolytic virus (1a), due to expression of the tumor suppressor gene, prodrug activating enzyme or angiogenic inducer (1b) or due to inhibition of expression of the oncogene or angiogenic inhibitor (1c). If the therapeutic gene is inserted in normal (hematopoietic) cells, they synthesize the drug resistance protein (2).

posredovan odziv na tirozinazo, pri 1 bolniku pa so opazili tudi delni odgovor na zdravljenje v obliki zmanjšanja podkožne metastaze.

3.3.1.3 DNA cepiva

Poleg zgoraj omenjenih možnosti se raziskuje tudi neposredna DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni, kar so storili npr. Conry in sodelavci (25). Na 17 bolnikih z metastatskim kolorektalnim karcinomom so preizkušali kombinacijo gena za karcinoembrionalni antigen (CEA, angl. *carcinoembryonic antigen*), kot tumorskega antigena, in gena za površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) kot pozitivno kontrolo imunskega odziva. Metoda se je izkazala za varno, bolniki so jo dobro prenašali, objektivnih kliničnih odgovorov pa pri tej skupini niso opazili, tako da bodo potrebne dodatne raziskave.

3.3.2 Molekularni pristop

Za tumorje je značilno spremenjeno izražanje nekaterih genov, za kar so lahko krive tudi mutacije. Te spremembe lahko izkoristimo za gensko zdravljenje z molekularnim pristopom in tako na različne načine ciljamo onkogene, tumorje zaviralne gene, gene vpletene v angiogenezo itd. Poleg tega lahko za zdravljenje uporabimo tudi viruse, ki se selektivno razmnožujejo v rakavih celicah (onkolitični virusi) in gene, ki pretvarjajo neaktivna zdravila v aktivna (samomorilski geni). Cilj omenjenih možnosti je zaustavitev celičnega cikla ali programirana celična smrt (apoptoza) (22).

3.3.2.1 Onkogeni in tumorje zaviralni geni

Ena glavnih genskih skupin, vpletenih v nastanek raka, je skupina onkogenov. Na njihovo biološko aktivnost lahko vplivamo s t.i. anti-onkogeni (protismiselni oligonukleotidi, angl. *antisense oligonucleotides*), ki se vežejo na mRNA preko parjenja baz in tako inhibirajo onkogeno aktivnost (22). Tak je na primer G3139, 18-merni fosforotioatni protismiselni oligodeoksinukleotid, ki se veže na mRNA človeškega antiapoptotskega proteina Bcl-2 (26). Liu in sodelavci so ga proučevali v kombinaciji s karboplatinom in paklitakselom na 46 bolnikih z različnimi tipi čvrstih tumorjev. Ugotovili so, da lahko G3139 varno kombinirajo s standardnimi dozami obeh kemoterapevtikov. Prav tako so opazili znižanje mRNA Bcl-2 v perifernih mononuklearnih celicah in v tumorskih biopsijah.

Raziskuje se tudi anti-onkogene, ki se vežejo na zaporedje v DNA (antigenski oligonukleotidi, angl. *antigene oligonucleotides*) z vodikovimi vezmi in tako inhibirajo onkogeno aktivnost (22). Carbone in sodelavci (27) so proučevali uporabnost 11-mernega antigenskega oligonukleotida, bogatega z gvanini in timini, ki se veže na sekvenco blizu promotorja P2 onkogene *c-myc* in z njimi tvori tripleks. Za povečanje njegove stabilnosti so antigenski oligonukleotid konjugirali z daunomicinom, ki interkalira v DNA. Ugotovili so, da kompleks inhibira transkripcijo *in vitro* in zmanjša aktivnost promotorja in zniža endogeno izražanje *c-myc* v celičnih linijah raka dojke in raka prostate. Kliničnih študij za uporabo pri genskem zdravljenju raka zaenkrat še ni.

Druga velika skupina, vpletena v nastanek raka, je skupina tumorje zaviralnih genov (22). Ti nadzorujejo delitev celice in jo lahko, če je potrebno, usmerijo v apoptozo. Za gensko zdravljenje lahko prenesemo divji tip proteina v celice z mutiranim genom in tako nadomestimo njegovo funkcijo. Glavni predstavnik tumorje zaviralnih genov je *p53*, ki je mutiran v skoraj 40% rakov. Na principu vstavitve

divjega tipa *p53* deluje že omenjeni Gendicine™ (13). Gre za rekombinantni adenovirus, ki ima regijo E1 zamenjano s kaseto za izražanje človeškega *p53*. V klinični študiji I. faze so ga preizkušali na 12 bolnikih z rakom glave in vratu. Po uspešnih rezultatih so ga v klinični študiji II/III. faze pri 135 bolnikih uporabili v kombinaciji z radioterapijo in ugotovili očitni sinergistični učinek. V teku je tudi klinična študija IV. faze (13). Zanimivo je, da so izvedene študije v obliki raziskovalnih člankov opisane le v kitajščini in da je v angleščini dostopen le pregledni članek, ki na kratko povzema te rezultate (13).

3.3.2.2 Uporaba interferenčne RNA

V posebno skupino pristopov lahko uvrstimo uporabo interferenčne RNA. Princip delovanja temelji na komplementarnosti med kratkimi dvoverižnimi RNA (mikro RNA (miRNA), kratke interferenčne RNA (siRNA)) in tarčno mRNA, kar vodi v utišanje izbranega gena (28). V grobem razdelimo kratke dvoverižne RNA molekule na tiste, ki jih sintetiziramo v laboratoriju in jih vnašamo v celice z dostavnimi sistemi (siRNA) in na endogene miRNA, ki nastanejo s prepisom iz DNA molekule.

Ena izmed možnosti uporabe so siRNA, ki nastanejo s procesiranjem iz daljše dvoverižne RNA, in jih vnesemo v celice v obliki plazmidne DNA, ki nosi zapis za daljšo dvoverižno RNA molekulo. Za svoje delovanje se priključijo v multiencimski kompleks RISC-a (angl. *RNA-induced silencing complex*) in argonava 2, kjer se najprej odstrani njihova smiselna veriga. Tako nastane aktiviran kompleks, ki ga protismiselna veriga siRNA vodi do komplementarne mRNA tarčnih genov in ga veže nanjo. To mRNA naposled argonava 2 razreže. SiRNA so že v I. fazi kliničnih testiranj (29). Tako se npr. na različnih solidnih tumorjih preizkuša varnost in učinkovitost CALAA-01. Aktivna učinkovina v CALAA-01 je siRNA, ki inhibira rast tumorjev preko znižanja izražanja podenote M2 ribonukleotidne reduktaze (29, identifikacijska številka NCT00689065).

V sklop interferenčnih RNA spadajo tudi male nekodirajoče miRNA (30), ki nastanejo s prepisom iz DNA. Njihova funkcija je predvsem uravnavanje izražanja proteinov. Povezali so jih z različnimi boleznimi, med drugim tudi z onkogenim ali tumorje zaviralnim vplivom pri raku, kadar so deli DNA, ki kodirajo za miRNA mutirani ali se drugače nepravilno izražajo. Tako na primer mutirana oblika miRNA ne razgrajuje mRNA tarčnega onkogene, kar vodi v povečano izražanje tega onkoproteina. Gre za novejša področja, kjer še ni kliničnih testiranj v genskem zdravljenju raka. MiRNA se pri svojem delovanju, podobno kot siRNA, vežejo v multiencimski kompleks in dalje s protismiselno verigo na mRNA tarčnega gena. Njihova vezava lahko vodi bodisi v blokiranje prevajanja tarčne mRNA bodisi v njeno razgradnjo. Tako so Tsang in sodelavci (31) na različnih celičnih kulturah ugotovili, da miR-18a* cilja onkogen *K-Ras* in ima morda tumorje zaviralni vpliv. Zato bi lahko bila uporabna pri zdravljenju raka. Poleg tega se da miRNA tudi utišati, kot so to storili Lu in sodelavci s komplementarnimi oligonukleotidi (32). Na celičnih kulturah so proučevali možnost utišanja treh onkogenih miRNA z enim samim večtarčnim oligonukleotidnim inhibitorjem in dobili spodbudne rezultate. Pred uporabo v genskem zdravljenju raka pri ljudeh pa bodo seveda potrebne še nadaljnje raziskave.

3.3.2.3 Samomorilski geni

Naslednji pristop uporablja t.i. samomorilske gene (22). Tu gre za pretvorbo neaktivne substance z neselskimi encimi v fiziološko aktivno (citotoksično) obliko. Eden izmed najbolj proučevanih sistemov

je timidinska kinaza iz virusa herpesa simpleksa, ki fosforilira in s tem aktivira ganciklovir. Slednji preko apoptotskih in neapoptotskih mehanizmov uniči rakavo celico. Važen je tudi učinek na sosednje celice (angl. *bystander effect*): toksični metaboliti se preko medceličnih stikov ali apoptotskih veziklov prenesejo iz gensko spremenjenih celic v sosednje, gensko nespremenjene. Ta lastnost je koristna, če gre za širjenje v rakave celice in škodljiva, če gre za širitev v normalne celice. Na podoben princip deluje tudi citozin deaminaza iz *Escherichie coli*, ki pretvarja fluorocitozin v fluorouracil, ta pa inhibira sintezo DNA in RNA. Veliko dela z uporabo samomorilskih genov je opravljenega na gliomih, v zadnjem času pa potekajo študije tudi na raku prostate. Tako so Nasu in sodelavci (33) v klinični študiji I. faze 8 bolnikom v prostato injicirali adenovirusni vektor s timidinsko kinazo, temu pa je sledila intravenozna administracija ganciklovirja. S študijo so potrdili varnostni profil takega pristopa zdravljenja, rezultati pa kažejo tudi na morebiten protirakav učinek sodeč po znižanju nivoja serumskega prostatičnega specifičnega antigena (PSA) bolnikov.

3.3.2.4 Onkolitični virusi

Virusni vektorji za uporabo pri genskem zdravljenju raka so lahko replikacijsko okvarjeni ali replikacijsko selektivni (onkolitični). Slednji imajo naravno ali umetno vgrajeno sposobnost tumorske selektivnosti (34). Na ta način so se sposobni razmnoževati in uničiti le tumorske celice, brez ogrožanja normalnih. Novembra 2005 so kitajske oblasti odobrile prvo onkolitično gensko zdravljenje raka z uporabo genetsko modificiranega adenovirusa H101 za zdravljenje raka nosno-žrelnega prostora v kombinaciji s kemoterapijo. Gre za rekombinantni adenovirus serotipa 5, ki ima izbrisan gen za *E1B-55kD* in krajši segment v regiji E3. Zato naj ne bi mogel inaktivirati p53 v normalnih celicah z učinkovito razmnoževanje (35). Tumorske celice pa imajo dostikrat mutiran p53 in naj bi posledično bile dovzetne za virusno razmnoževanje in citopatske učinke. Tudi v tem primeru so objave kliničnih študij z izjemo pilotske študije II. faze (35) dostopne le v kitajščini, v angleščini pa zgolj povzete v referenci (34). V klinični študiji I. faze so na 15 bolnikih z različnimi tipi raka ugotovili, da je H101 varen za injiciranje v tumor, zaznali pa so tudi zmanjšanje tumorja pri 3 bolnikih. Ko so opravili še klinično študijo II. faze so ugotovili, da onkolitični virus deluje bolje v kombinaciji s kemoterapijo. To ugotovitev so potrdili na študiji III. faze, kjer so bolnike z rakom glave in vratu zdravili bodisi s kombinacijo H101 in kemoterapije bodisi s kemoterapijo samo.

3.3.2.5 Angiogeneza

Angiogeneza je tvorba novih žil iz že obstoječih in je, med drugim, potrebna za rast tumorjev (36). Brez nje težko zrastejo več kot 2-3 mm. En izmed pristopov genskega zdravljenja raka je ciljanje na gene, povezane z angiogenezo. To lahko dosežemo na dva načina, in sicer z inhibicijo njenih aktivatorjev ali z vstavitvijo njenih inhibitorjev. Primer prve možnosti je klinična študija I. faze Wenga in sodelavcev (37). Za zdravljenje so uporabili Angiozyme, prvi sintetični ribocim testiran kot dejavnik za zdravljenje pri ljudeh. Cilja in razreže mRNA receptorja za žilni rastni dejavnik 1 (VEGFR-1) in s tem zniža njegovo izražanje. V ocenjevanju zdravljenja so na 28 bolnikih s solidnimi tumorji ugotovili, da je uporaba ribocima varna. Poleg tega se je bolezen pri sedmih bolnikih stabilizirala za vsaj 6 mesecev, 2 bolnika pa sta kazala znake manjšega odziva. V letošnjem letu bomo pričeli tudi na Onkološkem

inštitutu v Ljubljani s klinično študijo z uporabo elektroporacije kot dostavnega sistema za antiangiogen gen pri zdravljenju kožnih metastaz melanoma v okviru evropskega projekta Angioskin.

Našteti in opisani pristopi prevladujejo v genskem zdravljenju raka. Poleg teh pa lahko gensko zdravljenje koristi tudi drugače, npr. z zmanjšanjem neželenih učinkov kemoterapije z vstavitvijo genov za odpornost v hematopoetske celice (22).

4 Sklep

Gensko zdravljenje je zadnja desetletja predmet številnih raziskav, velik delež pa se jih opravlja na raku. Pri njem je velikega pomena, kako dostavimo želeni gen za zdravljenje. V preteklih letih so raziskovalci veliko truda vlagali v razvijanje novih in spreminjanje starih dostavnih sistemov. Pričakujemo lahko, da bo v prihodnosti uspešno zdravljenje raka z genskim zdravljenjem vključevalo predvsem kombinacije, bodisi z že obstoječimi metodami zdravljenja bodisi z različnimi pristopi genskega zdravljenja. Na vsaj delno uporabnost tovrstnega zdravljenja kaže odobritev kitajskih oblasti za uporabo rekombinantnega adenovirusnega vektorja s kaseto za izražanje človeškega *p53* pri zdravljenju raka glave in vratu ter za uporabo genetsko modificiranega onkolitičnega adenovirusa H101 pri zdravljenju raka nosno-žrelnega prostora. Več o koristi in delovanju omenjenih zdravil kot tudi o dolgoročnih neželenih učinkih in varnosti na širši populaciji, pa nam bodo povedale šele postmarketinške klinične raziskave.

5 Literatura

1. Serša G. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farm Vestn* 2009; 60 (2): 43-47.
2. Human genome project information http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml
3. Kohn DB, Candotti F. Gene therapy fulfilling its promise. *Editorial. N Eng J Med* 2009; 360 (5): 518-521.
4. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J Gene Med* 2007; 9 (10): 833-842.
5. Kamensek U, Sersa G. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiol Oncol* 2008; 42 (3): 115-135.
6. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 2004; 80 (948): 560-570.
7. Matsumoto K, Kubo H, Murata H, Uhara H, Takata M, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Tomita Y, Kageshita T, Kawakami Y, Mizuno M, Yoshida J, Saida T. A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38 (12): 849-856.
8. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Eng J Med* 2002; 346 (16): 1185-1193.
9. El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94 (1): 1-14.
10. Podatkovna zbirka kliničnih študij Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (*Journal of Gene Medicine*): <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>.
11. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with nonviral gene delivery systems. *Drug Discov Today*. 2002; 7 (8): 479-485.
12. Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells* 2008; 25(4): 462-466.
13. Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 2005; 16 (9): 1016-1027.
14. Rainov NG, Ren H. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy – what have we learned? *J Neurooncol* 2003; 65 (3): 227-236.

15. Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 2005; 11 (2): 180-185.
16. Coura R dos S, Nardi NB. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Viro J* 2007; 4: 99. doi:10.1186/1743-422X-4-99.
17. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006; 208 (2): 299-318.
18. Latchman DS. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7 (5): 415-418.
19. Brown MD, Schätzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2001; 229 (1-2): 1-21.
20. Cemazar M, Sersa G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9 (6): 554-562.
21. Prokop A, Davidson JM. Gene delivery into cells and tissues. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering, third edition. Academic Press, 2007: 493-515.
22. El-Aneel A. Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 2004, 498: 1-8.
23. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AL, Sondak VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina JL, Heller R. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26 (36): 5896-5903.
24. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Mortarini R, Baldassari P, Guidetti A, Gallino GF, Del Vecchio M, Ravagnani F, Magni M, Chaplin P, Cascinelli N, Parmiani G, Gianni AM, Anichini A. Boosting T Cell-Mediated Immunity to Tyrosinase by Vaccinia Virus-Transduced, CD34⁺-Derived Dendritic Cell Vaccination. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (16): 5381-5390.
25. Conry RM, Curiel DT, Strong TV, Moore SE, Allen KO, Barlow DL, Shaw DR, LoBuglio AF. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (9): 2782-2787.
26. Liu G, Kolesar J, McNeel DG, Leith C, Schell K, Eickhoff J, Lee F, Traynor A, Marnocha R, Alberti D, Zwiebel J, Wilding G. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic correlative study of the antisense Bcl-2 oligonucleotide G3139, in combination with carboplatin and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (9): 2732-2739.
27. Carbone GM, McGuffie E, Napoli S, Flanagan CE, Dembech C, Negri U, Arcamone F, Capobianco ML, Catapano CV. DNA binding and antigene activity of a daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeting the P2 promoter of the human c-myc gene. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (8): 2396-2410.
28. De Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6 (6): 443-453.
29. Podatkovna zbirka kliničnih študij ClinicalTrials.gov (U.S. National Institutes of Health): <http://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
30. Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics. *Cancer Res* 2009; 69 (2): 393-395.
31. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis* 2009; 30 (6): 953-959.
32. Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (3): e24.
33. Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, Manabe D, Thompson TC, Kumon H. Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-1K gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther* 2007; 15 (4): 834-840.
34. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7 (2): 141-148.
35. Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (24): 3634-3638.
36. Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MC. Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (43): 6941-6948.
37. Weng DE, Masci PA, Radka SF, Jackson TE, Weiss PA, Ganapathi R, Elson PJ, Capra WB, Parker VP, Lockridge JA, Cowens JW, Usman N, Borden EC. A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2005; 4 (6): 948-955.