

Novosti pri zdravljenju z gensko terapijo

New developments in gene therapy

Katarina Sedej,¹ Primož Rožman²

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva 20, Ljubljana

² Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Katarina Sedej,
e: katarina.sedej@gmail.com

Ključne besede:

genska terapija; dedne genetske bolezni; vektorji pri genski terapiji; krvotvorne matične celice; napredno zdravljenje

Key words:

gene therapy; inherited genetic disease; vectors for gene therapy; hematopoietic stem cells; advanced therapies

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 802–13

Prispelo: 30. jan. 2014,
Sprejeto: 20. avg. 2014

Izvleček

Genska terapija je zdravljenje genetskih bolezni s prenosom genetskega materiala v celice. V ta namen največkrat uporabljajo virusne vektorje, obstajajo pa tudi nevirusne metode vnosa genov v celice, ki so večinoma manj učinkovite. Po uspešnih začetkih leta 1990 se je razvoj genske terapije upočasnil zaradi hudih stranskih učinkov adenovirusnih vektorjev in ko je več otrok med genskim zdravljenjem zbolelo za levkemijo. Danes poteka mnogo raziskav, ki ugotavljajo klinično uspešnost genskega zdravljenja pri zdravljenju raka, monogenetskih genetskih in srčno-žilnih bolezni. Na področju dednih genetskih bolezni so se v zadnjih letih pokazali prvi uspehi zdravljenja pri bolnikih z imunskimi pomanjkljivostmi, Leberjevo dedno amavrozo, talasemijo in adrenolevkodistrofijo. Pred kratkim je bilo v Evropi odobreno tudi prvo zdravljenje za gensko zdravljenje, in sicer za zdravljenje redke genetske bolezni pomanjkanja lipoprotein lipaze. Kaže, da bo gensko zdravljenje kljub zastojem v 90. letih prejšnjega stoletja ponovno prišlo v ospredje naprednega zdravljenja.

Abstract

Gene therapy is the treatment of genetic disorders by introducing genetic material into cells. For this purpose, viral vectors and non-viral methods for introducing genes into cells are used, the later being in general less effective. After the enthusiastic beginnings in 1990, gene therapy came to a standstill due to side effects of adenoviral vectors during gene therapy and when several patients developed leukemia. Nowadays, many studies are testing clinical efficacy of gene therapy to cure cancer, monogenetic disorders and cardiovascular diseases. In last few years we witnessed successful treatments of some patients with severe immune deficiency, Leber's congenital amaurosis, thalassaemia and adrenoleukodystrophy. Recently, approval of the first gene therapy by European authorities was reported. It seems that gene therapy, regardless of the relative delay in the 90's, is coming into forefront of advanced therapies.

Uvod

S pojmom »gene therapy, humans, 5 years« smo našli v podatkovni bazi PubMed-NCBI dne 14. 11. 2013 kar 60.085 objavljenih člankov. Število objav vsako leto raste. Očitno postaja genska terapija vse bolj zanimiva tema medicinske in druge strokovne javnosti. Namen članka je predstaviti trenutno stanje na tem področju na podlagi analize uspešnosti genskega zdravljenja iz obstoječe znanstvene literature.

Genska terapija je vrsta naprednega zdravljenja, pri kateri z različnimi tehnika-

mi genske manipulacije (GM) umestimo genetski material, ki je v obliki nukleinskih kislin DNA ali RNA, v celice osebe, ki ima določene gene okvarjene.^{1,2,3} Če zdravi gen prenesemo v spolne celice, se dedna sprememba prenaša na potomce, kadar pa ga prenesemo v somatske celice, se sprememba ne deduje. Obstaja več načinov sprememb okvarjenega gena. Primera sta naključna ali ciljana vstavev zdravega gena v genom bolnika. Tarčne gene lahko z gensko manipulacijo vključimo, izključimo ali utišamo.¹

Postopek GM lahko poteka *in vivo* ali *in vitro*. Pri genski terapiji *in vivo* vnesejo DNA neposredno v celice tarčnega tkiva. Tarčne celice morajo biti dostopne za infuzijo virusa, vektor pa mora specifično okužiti celice, se integrirati v genom in izražati terapevtski gen v tarčnih celicah v učinkoviti količini in daljši čas. Ponavadi to poteka z virusnim vektorjem.

Pri genski terapiji *ex vivo* bolniku najprej odvzamejo določeno količino celic, jih namnožijo v celičnih kulturah, terapevtski gen prenesejo v te celice in potem celice v tarčno tkivo. Spremenjene celice nato sintetizirajo in sproščajo zaželenne proteine v lokalno okolje.⁴

Metode genske terapije

Obstaja več metod, s katerimi skušamo z vnosom genetskega materiala v celice zdraviti dedne ali pa pridobljene bolezni (Tabela 1).

Insercijska genska terapija se največ uporablja pri dednih boleznih, pri katerih v genom osebe, ki ima določene gene okvarjene, vključimo normalen gen, ki bo nadomestil nefunkcionalni oziroma okvarjen gen. Za uspešno gensko terapijo je potrebna učinkovita vstavitev terapevtskega gena na ustrezno tarčno mesto v kromosomu, ne da bi pri tem povzročili poškodbo celice, onkogeno mutacijo ali imunsko reakcijo.¹

Pri genski kemoterapiji v bližino tumorja dostavimo gen z zapisom za encim, ki pretvori predzdravilo v aktivno zdravilo. Genski produkt v tumorju pretvarja predzdravilo v zdravilo, ki uničuje tumorske celice, visoki odmerki zdravila nastajajo samo v tumorju, kar pomeni manj stranskih učinkov za druga tkiva. Primer je prenos gena za herpes simpleks timidin kinazo, ki katalizira pretvorbo predzdravila ganciklovir v aktivno obliko, kar povzroči smrt tumorskih celic.⁵

Pri genski imunoterapiji vnašajo zapise za proteine patogenov, alergenov, tumorjev ali normalne človeške proteine za namen profilakse ali zdravljenja infekcijskih bolezni, alergij, raka in avtoimunskih bolezni. Značilnost tumorja je, da proizvaja molekule,

ki zavrejo imunski sistem ali pa zmanjša izražanje svojih antigenov ali antigen predstavitevni molekul. Eden od načinov tumorske imunoterapije je prenos genov za imunostimulatorne citokine, ki zavirajo tumorsko rast, v tumorske celice.⁶

Antiangiogena genska terapija je prav tako zanimiva na področju zdravljenja raka. Za rast tumorja je potrebna tvorba novih žil. Prenos genov za produkte, ki zavirajo tvorbo novih žil, v tumor, lahko vodi v razpad tumorja. Med drugim se raziskuje prenos gena za endostatin in interlevkin 12.⁷

Načini vnosa genov v celice

Zdrave gene lahko vnesemo v tarčne celice na več načinov, in sicer z virusnimi vektorji (ti so lahko retrovirusi, adenovirusi, adenovirusom podobni vektorji, virusi herpesa, lentivirusi, poxvirusi, virusi Epstein-Barr) in nevirusnimi metodami vnosa genov (z mehansko, električno, ultrazvočno, hidrodinamsko ali lasersko energijo, z liposomi ali kationskimi polimeri ter s plazmidi).

Prenos tuje DNA v celice evkariontskega prejemnika imenujemo transfekcija. Transdukcija pa je prenos gena iz ene v drugo bakterijo z bakteriofagom, ki je vrsta virusa.¹

Virusne metode

Kadar za gensko terapijo uporabijo virusne vektorje, virusni genom najprej spremenijo z delecijo nekaterih predelov, da postane nenevaren. Za prenos genskega materiala lahko uporabimo različne viruse. Največkrat uporabljajo retrovirusne vektorje. Zmožni so predreti jedrne membrane celic, ki se delijo in se integrirati samo v genom delečih se celic. Omejitve pri njihovi uporabi so nizka učinkovitost transfekcije *in vivo*, imunogenost in tveganje za aktiviranje onkogenov ali inaktivacijo tumorskih supresorskih genov. Naslednja skupina so adenovirusi, ki so zelo infektivni in jih uporabljajo za prenos genov v deleče in nedeleče se celice za široko paleto tkiv. Adenovirusom podobni virusi (adeno-associated viruses) imajo podobne lastnosti kot adenovirusi, a so zaradi manjše replikacije in patogenosti varnejši. Virusi

skupine herpes imajo nevrotropne lastnosti in jih uporabljajo za vnos genov v živčne celice, rakave celice in tumorje. Lentivirusi so podvrsta retrovirusov, ki so zelo uporabni, ker učinkovito inficirajo deleče in nedeleče se celice, dalj časa izražajo transgen, imajo nizko imunogenost in lahko nosijo velike transgene. Za poxviruse je značilna visoka ekspresija transgenov, uporabljajo jih predvsem pri terapiji raka. Viruse Epstein-Barr uporabljajo za izražanje velikih fragmentov DNA, v tarčnih celicah pa ta virus za vedno ostane v latentnem stanju.

Slabosti virusnih metod so še vedno precejšnja imunogenost, ki lahko povzroči vnetni odziv, tvorba toksinov, potencialna insercijska mutageneza in omejitve učinkovitosti zaradi malega števila celic, v katere na ta način uspemo vnesti transgen.⁸

Nevirusne metode vnosa genov

Poleg prenosa z naravnimi vektorji – virusi – lahko dednino v celice vnesemo tudi s fizikalnimi in kemičnimi metodami ter s plazmidi.

S fizikalnimi metodami naredimo z mehansko, električno, ultrazvočno, hidrodinamsko ali lasersko energijo prehodne pore v celični membrani. S tem omogočimo vstop DNA v tarčne celice.

Kemični pristop za vnos genetskega materiala je uporaba negativno nabitih nukleinskih kislin, povezanih s polikationskimi nanomernimi delčki, ki so lahko kationski liposomi ali kationski polimeri. Ti kompleksi ponavadi vstopijo v celico z endocitozo. Njihova prednost je nizka toksičnost in an-

tigenost, dolgotrajno izražanje, manjše tveganje za nastanek insercijske onkogeneze, njihova slabost pa je še vedno slaba učinkovitost takšnega sistema.⁸

Med nevirusne metode prenosa genov v celice pa spada tudi vbrizganje plazmidne DNA. Plazmidi so naravno prisotni v bakterijah. Pri njih omogočajo horizontalni prenos genov. Sestavljeni so iz gole DNA in nimajo genov za prenos genetskega materiala v novega gostitelja. Za prenos je potrebna mehanska energija ali pa pomoč gostitelja.¹ Metoda vbrizgavanja plazmidne DNA je sama po sebi slabo učinkovita, zato jo izboljšajo s fizikalnimi metodami, kot je elektroporacija. Pri elektroporaciji z električnimi pulzi povečajo prehodnost membran in na tak način lahko vnesejo plazmide v celice različnih tkiv, kot so skeletna mišica, koža in jetra.^{9,10}

Začetki genske terapije

Z gensko terapijo pri človeku so začeli v 90. letih prejšnjega stoletja z velikimi pričakovanji. Prvi prenos tujega gena pri človeku je leta 1989 izvedel Rosenberg s sodelavci, ki je s pomočjo retrovirusnega vektorja vnesel gen z odpornostjo za neomicin v limfocite, ki so infiltrirali tumor pri bolnikih z melanomom, nato pa te limfocite vbrizgal v bolnike. Gen z odpornostjo za neomicin je bil gen označevalec. Ko je dokazal prisotnost in izražanje gena v limfocitih bolnikov brez stranskih učinkov, je s tem prikazal varnost uporabe retrovirusnega prenosa gena kot primerno metodo za vstavljanje novih genov pri človeku.¹¹

Tabela 1: Načini genske terapije (ref. 1, 5, 6, 7).

Načini genske terapije	Primer
Nadomestitev okvarjenega gena	Prenos gena za adenin deaminazo v krvotvorne matične celice kostnega mozga pri dedni bolezni imunske pomanjkljivosti pomanjkanja adenin deaminaze.
Genska kemoterapija	Prenos gena za encim, ki spremeni predzdravilo v aktivno obliko zdravila (herpes simpleks virus timidin kinaza in predzdravilo ganciklovir).
Genska imunoterapija	Prenos genov za imunostimulatorne citokine (IL-2, IFN-gama) v tumorske celice, da bi okrepi imunski odziv.
Antiangiogenska genska terapija	Prenos genov za produkte, ki zavirajo tvorbo novih žil v tumorju (IL-12, endostatin).

Prvi odobreni primer genske terapije je bil leta 1990 pri dveh deklicah s hudo imunsko pomanjkljivostjo zaradi pomanjkanja encima adenin deaminaze. Za vektor so uporabili retrovirus in prenesli gen za adenin deaminazo v celice T. Učinek je bil na žalost le kratkotrajen.¹²

Leta 1992 so v Italiji opisali prvo zdravljenje z gensko spremenjenimi matičnimi celicami. S pomočjo retrovirusa so prenesli gen za adenin deaminazo v periferne limfocite in krvotvorne matične celice dveh bolnikov s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo. Dosegli so izboljšanje imunske funkcije, še naprej pa je bilo potrebno nadomestno encimsko zdravljenje.¹²

Leta 1999 je bil 18-letni fant Jesse Gelsinger, ki so ga zdravili zaradi pomanjkanja ornitin transkarbamilaze, deležen genske terapije, pri kateri so mu z adenovirusnim vektorjem vnesli zdrav gen ornitin transkarbamilaze. Fant je umrl zaradi hude vnetne reakcije na adenovirusni vektor.¹²

Leta 2000 je nastalo tudi poročilo o uspešnem zdravljenju desetih otrok s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo, vezano na kromosom X, vendar sta leta 2002 dva od njih razvila levkemiji podobno stanje, kar je bilo povezano z integracijo retrovirusnega vektorja blizu protoonkogenega promotorja. Ti primeri so za nekaj časa povzročili upad kliničnih raziskav s področja genske terapije.^{12,13}

Klinične raziskave v genski terapiji danes

Po podatkih Clinicaltrials.gov v svetu 14. novembra 2013 poteka ali pa je že končanih preko 2940 kliničnih študij s področja genske terapije, med katerimi se skrivajo tudi genetske epidemiološke in diagnostične študije.

V letu 2012 so klinične raziskave na področju genske terapije potekale na 5 celinah, največ raziskav v Ameriki (65 %) in v Evropi (28 %). V Evropi največ raziskav poteka v Angliji (11 %), nato ji sledijo Nemčija, Francija, Švica in Nizozemska. Najbolj uporabljeni virusni vektorji so adenovirusi (23 % raziskav), med pogostejšimi so še retrovirusi, virus vakcinije, poxvirus, adenovirusom

podobni virusi, virusi herpes simplex in lentivirus. Največ raziskav je bilo še v fazi 1 preizkušanja.¹⁴

Največ raziskav poteka na področju zdravljenja raka (64 %), nato na področjih dednih monogenih (8,7 %) in kardiovaskularnih bolezni (8,4 %). Do sedaj so imeli največ uspeha prav na področju zdravljenja monogenih bolezni. Na tem področju poteka največ raziskav na področju cistične fibroze in sindromov hude kombinirane imunske pomanjkljivosti.¹⁵

V nadaljevanju bomo opisali le najbolj razširjene vrste genskega zdravljenja, ki danes že potekajo (glej tudi Tabeli 2 in 3).

Napredek genske terapije pri zdravljenju dednih bolezni

Bolezni primarne imunske pomanjkljivosti

Do danes je znanih več kot 170 genov, ki lahko povzročijo primarno imunsko pomanjkljivost.¹⁶ Nekatere od teh bolezni lahko zdravijo z gensko terapijo.

Pomanjkanje adenozin deaminaze (ADA) je avtosomna recesivna oblika hude kombinirane imunske pomanjkljivosti (SCID). Adenozin deaminaza je encim, ki je potreben za metabolizem purina in je nujen za razvoj, preživetje in funkcijo limfocitov.¹⁷ Za prizadete otroke so značilni zastoj v razvoju, motnje imunskega odziva in ponavljajoče okužbe. Toksične koncentracije purinskih metabolitov lahko povzročijo jetrne, skeletne, nevrološke, vedenjske spremembe in senzorinevralno naglušnost. Aiuti s sodelavci je v letu 2009 poročal o varnem in uspešnem zdravljenju teh bolnikov. Desetim bolnikom, starim 0,6 do 5,6 let, so po nemieloablativnem kondicioniranju z busulfanom vbrizgali avtologne CD34+ krvotvorne matične celice iz kostnega mozga, ki so bile transficirane z vektorjem, ki je vseboval adenin deaminazo. Pri devetih otrocih je prišlo do ponovne vzpostavitve imunske funkcije in zaščite pred hudo okužbo.¹⁸ Do zdaj so z gensko terapijo in krvotvornimi matičnimi celicami v različnih kliničnih študijah po svetu učinkovito zdravili več kot 30 oseb s to boleznijo, največ v Milanu.

Pri večini je prišlo do ponovne vzpostavitve imunske funkcije, podporno zdravljenje z nadomeščanjem encima večinoma ni bilo potrebno, do stranskih učinkov povezanih z mutagenezo pa ni prišlo.^{15,19}

Nekoliko drugače je pri zdravljenju na kromosom X-vezane hude kombinirane imunske pomanjkljivosti, ki jo povzročijo mutacije v genu za gama podenoto receptorja za interlevkin 2 (IL-2), ki kodira gama verigo citokinskih receptorjev za interlevkine 2,4,7,9,15 in 21. Posledica teh mutacij je odsotnost celic T in naravnih celic ubijalk, celice B pa so nefunkcionalne.²⁰ Te bolnike običajno zdravijo s presaditvijo skladnih alogenskih krvotvornih matičnih celic. V Franciji so v letih 1999–2002 zdravili devet bolnikov, ki niso imeli HLA-identičnega dajalca, s prenosom genov za gama-verige v avtologne CD34+ celice kostnega mozga s pomočjo retrovirusa. Po 10 letih so opazovali, da je genska terapija pri večini popravila imunsko pomanjkljivost, vendar pa se je zaradi insercijske mutageneze pri 4 od 9 bolnikov razvila akutna levkemija, eden je zaradi tega umrl. Večina otrok, tudi trije, ki so preživeli levkemijo, so lahko živeli normalno v nezaščitenem okolju in se borili z

mikroorganizmi brez škodljivih posledic.²¹ Poleg teh 9 bolnikov je bil na podoben način zdravljen še en bolnik v Avstraliji in 10 bolnikov v Angliji. Eden od bolnikov iz Anglije je razvil T-celično levkemijo, vendar pa so pri njem uspešno dosegli remisijo. Danes poteka multinacionalna študija v Ameriki, Franciji in Angliji, ki uporablja varnejši vektor in je zaenkrat zelo uspešna.^{15,22}

Wiskott-Aldrich sindrom (WAS) je še ena na kromosom X vezana imunska pomanjkljivost, ki nastane zaradi pomanjkanja proteina WAS. Ta je pomemben pri premikanju in pritrjevanju krvotvornih matičnih celic. Za bolezen so značilni mikrotrombocitopenija, imunska pomanjkljivost, ekcem in nagnjenost k avtoimunskim boleznim in limfomu. V Nemčiji so s pomočjo gamaretrovirusnega vektorja prenesli gen za protein WAS v krvotvorne matične celice kostnega mozga in periferne krvi in jih nato presadili 10 bolnikom. Pri devetih od desetih bolnikov je prišlo do kliničnega izboljšanja, vendar pa so štirje zboleli zaradi akutne levkemije.^{23,24}

Tabela 2: Najpogostejše bolezni, pri katerih potekajo raziskave genskega zdravljenja (15, 47).

Bolezni primarne imunske pomanjkljivosti	Pomanjkanje adenozin deaminaze, na kromosom X vezana huda kombinirana imunska pomanjkljivost, Wiskott-Aldrichov sindrom, kronična granulomatozna bolezen.
Rak	Ne-drobnocelični karcinom pljuč, levkemija, limfom, rak prostate, rak jeter, sarkom, nevroblastom, maligni gliom, tumorji glave in vratu, rak trebušne slinavke, mezoteliom, rak dojke, maligni melanom, rak jajčnika, karcinom kože, multipli mielom, rak debelega črevesa in rektuma.
Bolezni srca in ožilja	Bolezen koronarnih žil, kongestivno srčno popuščanje, angina pectoris.
Bolezni krvi	Hemofilija A in B, talasemija beta, anemija srpastih celic, Fanconijeva anemija.
Bolezni živčnega sistema	Levodistrofija, Parkinsonova bolezen, Battenova bolezen, Alzheimerjeva bolezen.
Bolezni oči	Leberjeva kongenitalna amavroza, horoideremija, degeneracija makule.
Bolezni shranjevanja	Tay-Sachsova bolezen, Pompejeva bolezen.
Bolezni mišic	Mišične distrofije.
Infekcijske bolezni	Okužba z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (HIV), citomegalovirusom, adenovirusom, virusom Epstein-Barr, hepatitisom B in C.
Drugo	Bulozna epidermoliza, artritis, sladkorna bolezen tipa 1, cistična fibroza, družinska hiperholesterolemija, pomanjkanje encima lipoprotein lipaze.

Leberjeva kongenitalna amavroza

Leberjeva kongenitalna amavroza je dedna bolezen, ki povzroči značilno distrofijo mrežnice in zgodnjo izgubo vida. Navadno se deduje avtosomno recesivno, do mutacij pa prihaja v 15 različnih genih. V 10 % se nahaja mutacija v genu za specifični protein mrežničnega pigmentnega epitela RPE 65. Leta 2010 so znanstveniki iz Italije poročali o izboljšanju vida pri 3 osebah s to boleznijo, ki je vztrajalo še 1,5 leta po vnosu pod mrežnico adenovirusom podobnih vektorjev, ki so nosili gen RPE 65. Zaključili so, da je tako zdravljenje varno in učinkovito.²⁵

Na kromosom X vezana adrenolevkodistrofija

Na kromosom X vezana adrenolevkodistrofija je huda smrtna genetska demielinizirajoča bolezen, ki nastane zaradi pomanjkanja transportnega proteina, ki je zapisan na genu ABCD1. Presaditev alogenskih krvotvornih matičnih celic lahko ustavi napredovanje demielinizirajočih lezij v možganih, če jo opravijo v zgodnjem obdobju bolezni. Pri genski terapiji z lentivirusnim vektorjem »popravijo« bolnikove lastne krvotvorne matične celice. Na tak način je skupina iz Pariza zdravila dva bolnika, pri katerih se je že razvila progresivna demielinizacija možganov in nista imela ustreznih darovalcev. Avtologne KMC so pridobili iz periferne krvi, jih *ex vivo* »popravili« z lentivirusnim vektorjem in ponovno vbrizgali bolnikoma po mieloablativnem kondicioniranju. Demielinizacija se je po 14 oziroma 16 mesecih ustavila in v 3 letih spremljanja ni več napredovala.²⁶

Talasemija

Talasemija beta je monogenska krvna bolezen, do katere pride zaradi zmanjšane ali odsotne tvorbe beta verig hemoglobina. Zaradi hude anemije so potrebne redne transfuzije krvi, zaradi večjega tveganja za virusne okužbe in kopičenja železa pa lahko pride tudi do sekundarne hemokromatoze in odpovedi organov. Edini način ozdravljenja je bil do nedavnega presaditev alogenskih krvotvornih matičnih celic zdra-

vega dajalca. Iz Pariza poročajo o uspešni presaditvi avtolognih gensko spremenjenih krvotvornih matičnih celic 18-letnemu bolniku s hudo obliko talasemije beta. Vanje so pred tem z lentivirusnim vektorjem prenesli zdrav gen za beta globin. Sedaj je minilo že več kot 5 let od prenosa gena in fant, ki je od tretjega leta starosti potreboval redne transfuzije krvi, le-teh ne potrebuje več.^{27,28,29}

Pomanjkanje lipoprotein lipaze

Lipoprotein lipaza je ključni encim pri razgradnji lipoproteinov, bogatih s trigliceridi, ki nastanejo po jedi. Ob pomanjkanju ali okvari tega encima se ti lipoproteini kopičijo v plazmi, kar privede do hude hipertrigliceridemije. Pomanjkanje lipoprotein lipaze je redka avtosomno recesivna bolezen, ki se pogosto pokaže že v otroštvu s hudimi bolečinami v trebuhu, ponavljajočimi se vnetji trebušne slinavke in hiranjem. V Amsterdamu so z adenovirusom podobnim vektorjem vnesli kopije funkcionalnega gena za lipoprotein lipazo v mišične celice bolnikov in dokazali manjšo incidenco vnetij trebušne slinavke in znake kliničnega izboljšanja do dve leti po posegu.³⁰ 2. novembra 2012 je Evropska agencija za zdravila uradno odobrila gensko terapijo za zdravljenje pomanjkanja lipoprotein lipaze, imenovano »Glybera«, kar je prva odobrena genska terapija.³¹

Cistična fibroza

Bolezen nastane zaradi mutacij v genu za protein CFTR (*angl.* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein), ki je kloridni kanal v epitelih celicah. Posledica pa je moten očišček in obstrukcija z viskoznim izločkom v žlezah dihal, prebavil in rodil. Življenjska doba teh bolnikov je še vedno močno skrajšana, zato je bilo vse od odkritja gena za cistično fibrozo v letu 1989 mnogo raziskav posvečenih genski terapiji, ki bi ozdravila bolezen. Pri večini študij sta bila tarčni organ za vnos gena nos ali pljuča. Vendar pa se je izkazalo, da imajo pljuča močne obrambne mehanizme, ki zelo otežujejo učinkovit prenos gena. Že normalna plast sluzi, ki obdaja zdrav respiratorni epitel, zavira prenos genov. Pri bolnikih pa je ta sluz še obilnejša in bolj viskozna. Poleg

fizičnih ovir je velika ovira imunski odgovor pljuč, ovira so tudi nevtralizirajoča protitelesa proti virusnim proteinom, ki so se razvila med prejšnjo infekcijo kot tudi celični in humoralni odgovor po administraciji virusnega vektorja. Do danes so ugotovili, da je virusni prenos gena bolj učinkovit kot

nevirusni, a večina virusnih vektorjev povzroči spremljajoči imunski odgovor, ki moti izražanje gena ob ponovnem dajanju. Zato niso primerni za bolezen, ki zahteva doživljenjsko izražanje proteina. Več upov polagajo v lentiviruse, za katere so dokazali, da učinkovito prenesejo gen v pljučno tkivo.

Tabela 3: Nekatero uspešnejše klinične študije genskega zdravljenja pri človeku.

Bolezen	Vektor, prenešen gen	Št. bolnikov	Celična tarča	Izid	Ref.
Pomanjkanje adenozin deaminaze	Retrovirusni vektor z genom za adenozin deaminazo	10	Infuzija avtolognih KMC, ki so bile transducirane z vektorjem	Povrnitev imunske funkcije in zaščita pred hudo okužbo pri 9/10 bolnikov	18
Na kromosom X vezana huda kombinirana imunska pomanjkljivost	Retrovirusni vektor, gen za skupno gama verigo	9	Infuzija avtolognih KMC, ki so bile transducirane z vektorjem	8 otrok je lahko živel normalno v nezaščitenem okolju, 4 otroci so zboleli za akutno levkemijo, od teh je eden umrl	19
Wiskott-Aldrich sindrom	Retrovirusni vektor, gen za protein WAS	10	Infuzija transduciranih KMC	Pri 9 bolnikih klinično izboljšanje, 4 dobili levkemijo	23, 24
Leberjeva kongenitalna amavroza	Adenovirusom podobni virus z genom za protein mrežničnega pigmentnega epitela RPE 65	3	Subretinalna administracija vektorja	Pri vseh 3 bolnikih subjektivno in objektivno izboljšanje vida 1,5 leta po posegu	25
Na kromosom X vezana adrenoleukodistrofija	Lentivirusni vektor, gen ABCD1	2	Infuzija »popravljenih« avtolognih KMC	Zaustavitev demielinizacije možganov pri obeh bolnikih	26
Talasemija beta	Lentivirusni vektor z genom za globin beta	1	Transplantacija genetsko spremenjenih avtolognih krvotvornih matičnih celic	Pri bolniku niso bile več potrebne transfuzije krvi	27, 28
Pomanjkanje lipoprotein lipaze	Adenovirusu podoben virus, gen za lipoprotein lipazo	27	Vbrizganje vektorja v mišico bolnika	Pri večini bolnikov znižana srednja plazemska koncentracija trigliceridov na tešče	30
Hemofilija B	Adenovirusu podoben virus, gen za človeški faktor strjevanja IX	6	Infuzija vektorja v periferno veno bolnikov	Po 6–16 mesecih štirje niso potrebovali profilakse, pri dveh pa je bil čas med nadomeščanjem faktorja strjevanja daljši	36
Refraktorna kronična limfocitna levkemija	Lentivirusni vektor, ki izraža himerni receptor za antigen celic B, CD 19	1	Infuzija avtolognih celic T s spremenjenim himernim receptorjem za antigen	Remisija še 10 mesecev po zdravljenju	38
Metastatski melanom, metastatski sarkom sinovijskih celic	Retrovirusni vektor z genom za receptor celic T za antigen NY ESO-1, ki ga izražajo celice tumorja	17	Infuzija avtolognih celic T, ki so izražale receptorje celic T usmerjene proti NY ESO-1	Klinični odgovor pri 4/6 bolnikov s sarkomom in 5/11 bolnikov z melanomom	39

Potrebne pa bodo še določene raziskave, da bi ugotovili, ali bo genska terapija lahko dolgoročno klinično izboljšala bolezen pljuč pri cistični fibrozi.^{32,33}

Hemofilija

Hemofilija je dedna, na kromosom X vezana recesivna bolezen, ki jo povzroči pomanjkanje ali odsotnost faktorjev strjevanja VIII (hemofilija A) oziroma IX (hemofilija B). Glede na aktivnost faktorjev strjevanja se bolezen lahko izrazi kot težka, srednja ali lahka stopnja. Za težko hemofilijo so značilne spontane krvavitve v sklepe, mišice, prebavila, sečila in centralni živčni sistem, kar je povezano z visoko obolevnostjo in smrtnostjo. Bolezen zdravijo z nadomeščanjem faktorjev strjevanja, vendar pa nekateri bolniki razvijejo inhibitorje proti tem faktorjem.³⁴ Mnogi bolniki prejemajo profilaktično nadomestno zdravljenje s koagulacijskimi faktorji za preprečevanje krvavitev. V zadnjem desetletju so naredili velik napredek pri iskanju protokola, ki bi z gensko terapijo ozdravil bolnike s hemofilijo. Največja ovira, ki jo je potrebno preseči, je imunski odgovor na transgen in vektor.³⁵ Nathwani in sodelavci so leta 2011 šestim bolnikom s težko hemofilijo B vbrizgali adenovirusom podoben virus s transgenom človeškega faktorja IX. Dosegli so, da štirje bolniki po 6–16 mesecih niso potrebovali profilaktičnega zdravljenja, pri dveh pa se je podaljšal čas med dvema odmerkoma pri profilaktičnem nadomestnem zdravljenju s faktorjem IX. Pri dveh bolnikih je prišlo do povišanja jetrnih encimov, ki pa je izzvenelo po jemanju kortikosteroidov.³⁶ Eden od vzrokov, da je zdravljenje hemofilije A z gensko terapijo še vedno v začetnih fazah raziskovanja, je tudi izjemna velikost gena za faktor VIII, ki meri več kot 180.000 baznih parov.^{23,35}

Zdravljenje raka z gensko terapijo

Genska terapija se uporablja tudi pri zdravljenju rakavih bolezni.

Za zdravljenje raka uporabljajo vstavljane tumorskih zaviralnih genov, imunoterapijo,

virusno posredovano onkolizo in terapijo s predzdravilom. Tumorske zaviralne gene nadzorujejo delitev celice, njihove mutacije pa najdemo pri rakavih boleznih. Tumorske zaviralne gene za p53 je mutiran v 40 % rakavih boleznih in eden od načinov zdravljenja raka je vstavev gena za izražanje človeškega p53 s pomočjo adenovirusnega vektorja in tako nadomestitev njegove funkcije v celicah z mutiranim genom. Od tumorskih zaviralnih genov uporabljajo tudi gene BRCA-1, Fus-1 in endostatin.

Rakave celice se lahko na različne načine izogibajo imunskemu sistemu bolnika, zato z imunoterapijo poskušajo okrepiti celični in humoralni odgovor na tumorske antigene pri bolnikih s tumorjem. Za ta namen lahko gen za imunostimulacijsko molekulo vnesejo v tumorske celice. Tumorske celice nato izražajo imunostimulacijske molekule in spodbudijo aktivnost limfocitov T in naravnih celic ubijalk. Imunski sistem bolnika ojačajo lahko tudi tako, da genetsko spremenijo antigen predstavitevne celice, tako da izražajo tumorski antigen in predstavijo tumorski antigen imunskemu sistemu bolnika. Še en način spodbuditve imunskega sistema bolnika je z DNA cepivom, s katerim v bolnika neposredno vnesejo gen z zapisom za tumorski antigen.

Pri virusno posredovani onkolizi uporabljajo viruse, ki imajo naravno ali umetno vgrajeno sposobnost tumorske selektivnosti, zaradi česar specifično okužijo celice tumorja, se v njih delijo in jih uničijo.

Pri terapiji s predzdravilom pa prenesejo gene, ki kodirajo encime za pretvorbo predzdravila v citotoksično zdravilo, kar se zgodi samo v tumorju in okolici tumorja. Tako so bolnikom z rakom prostate v prostato vbrizgali adenovirusni vektor s timidinsko kinazo, ki aktivira ganciklovir. Bolnikom so nato v žilo vbrizgali ganciklovir, po čemer je prišlo do znižanja prostatičnega specifičnega antigena v serumu.^{15,37}

Genetska obdelava avtolognih celic T, po kateri na svoji površini izražajo protitelesa, ki so specifična za novi antigen, npr. antigene rakave celice, je eden od načinov zdravljenja raka. Pri neoplazmah celic B so uporabili kot antigen, specifičen za tumor, protein CD19, ki ga izražajo normalne in

maligne celice B in tudi prekurzorji celic B. Znanstveniki so poročali o remisiji pri bolnikih z malignomi celic B po zdravljenju s spremenjenimi celicami T. Bolniku s kronično limfocitno levkemijo so s pomočjo lentivirusnega vektorja avtologne celice T genetsko spremenili, tako da so na svoji površini izražale receptorje, ki so bili usmerjeni proti antigenu CD19. Dosegli so razpad tumorskih celic in popolno remisijo še vsaj 10 mesecev po zdravljenju.^{23,38}

Z gensko terapijo pa so bili uspešni tudi pri zdravljenju metastatskega melanoma in sarkoma sinovijskih celic. V klinični študiji so uporabili antigen NY ESO-1, ki je izražen pri 80 % bolnikov s sarkomom sinovijskih celic in 25 % bolnikov z melanomom. Bolnikom z metastatskim melanomom in sarkomom sinovijskih celic, katerih tumorji so izražali NY ESO-1, so vbrizgali avtologne celice T, ki so bile genetsko spremenjene tako, da so izražale receptorje celic T, usmerjene proti NY ESO-1. Uporabili so retrovirusni vektor, ki je kodiral receptor celic T za omejeni antigen. Klinični odgovor so dosegli pri štirih od šestih bolnikov s sarkomom in pri petih od enajstih bolnikov z melanomom. Pri dveh bolnikih z melanomom je prišlo do popolne regresije, ki je vztrajala še po enem letu opazovanja.³⁹

Zdravljenje bolezni srca in ožilja z gensko terapijo

Na področju bolezni srca in ožilja najdemo klinične študije, ki so posvečene anemiji kronične ledvične bolezni, angini pectoris, stenozi koronarnih arterij, kritični ishemijski uda, intermitentnim klavdikacijam, srčni odpovedi, miokardni ishemijski, bolezni perifernega žilja, pljučni hipertenziji in venskimi razjedami. Večina študij je posvečena terapevtski angiogenezi za povečanje toka krvi v ishemična področja.¹⁵

Zdravljenje nekaterih drugih bolezni z gensko terapijo

Po svetu potekajo ali pa so bile že zaključene študije možnega zdravljenja številnih drugih bolezni z gensko terapijo. Raziskoval-

jejo zdravljenje infekcijskih bolezni, kot so HIV, okužba s citomegalovirusom, tetanusom, adenovirusom, nevroloških bolezni, kot so amiotrofična lateralna skleroza, multipla skleroza, nevrološki zapleti sladkorne bolezni, miastenija gravis, Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen. Nekaj študij je bilo posvečenih zdravljenju nekaterih očesnih bolezni in zdravljenju osteoartritisa in ulceroznega kolitisa.¹⁵ (glej tudi Tabeli 2 in 3)

Napredek na področju genske terapije v Sloveniji

Tudi v Sloveniji raziskovalci sledijo razvoju naprednega zdravljenja. Poteka kar nekaj predkliničnih raziskav, pokazali pa so se tudi prvi uspehi na področju kliničnega preizkušanja genskega zdravljenja.

Že leta 2001 so raziskovalci Onkološkega inštituta v Ljubljani objavili, da so s pomočjo plazmidnega vektorja prenesli gen za humani faktor tumorske nekroze alfa in ustvarili genetsko spremenjene tumorske celice, ki so prehodno izražale biološko aktiven produkt gena. Ocenili so, da bi take celice lahko uporabili kot tumorsko cepivo.⁴⁰

Uspešno razvijajo nevirusne metode vnosa genskega materiala v celice. Med drugim so merili učinkovitost prenosa genov *in vivo* in *in vitro*, in sicer injekcijo plazmide DNA, asistirano z elektroporacijo, dostavo kompleksov liposom-DNA, vektor, usmerjen na integrin in kombinacijo teh metod. Uporabili so 4 različne modele tumorjev (mišji melanom, podganji karcinosarkom, mišji sarkom in človeški karcinom mehurja). Ocenili so, da so nekatere nevirusne metode vnosa genov izvedljive in učinkovite.⁴¹ Preizkušajo tudi elektrogensko terapijo. Zaenkrat so na predkliničnem področju zdravili kožne tumorje mastocitov pri psih z injekcijo plazmidne DNA z genom za človeški interlevkin 12 v tumor, po čemer so lokalno delovali z električnimi pulzi. Dosegli so lokalno izražanje transgena, sistemsko sproščanje proteina in zmanjšanje tumorjev.⁴²

Nevirusna metoda prenosa genov je tudi magnetofekcija, pri kateri z magnetnim poljem v celice prenašajo nukleinske kisline, vezane na magnetne nanodelce. Raziskoval-

na skupina Onkološkega inštituta v Ljubljani je pripravila magnetne nanodelce z modificirano površino za imunogeno terapijo mišjega adenokarcinoma. Prenos plazmidne DNA za imunostimulacijski citokin interleukin IL-12 v tumor je imel pomemben protitumorski učinek, zato menijo, da ima magnetofekcija visok potencial za klinične raziskave genske terapije raka s spodbujanjem imunskega odziva.⁴³

Raziskovalci iz Onkološkega inštituta v Ljubljani so skupaj z onkološkima centroma iz Danske in Francije sodelovali pri prvi študiji genskega električnega prenosa plazmidne DNA antiangiogenega metargidin peptida (AMEP) v kožni melanom pri ljudeh. AMEP je močan zaviralec nastajanja novih žil, rasti tumorja in nastanka metastaz. Plazmid so vbrizgali v tumor, nato pa v tumor vstavili igelno elektrodo, ki je proizvajala električne pulze. Ugotovili so, da je bil tak prenos plazmida antiangiogenega metargidin peptida varen, brez resnih stranskih učinkov, kožne lezije, v katere so prenesli plazmidno DNA pa se niso povečevale v opazovanem času.⁴⁴

Zaključki

V zadnjih letih je bilo na področju genskega zdravljenja dednih genetskih bolezni uspešno zdravljenih manjše število bolnikov s hudimi genetskimi boleznimi, za kate-

re ni bilo dostopno boljše zdravljenje. Zelo uspešni so bili pri zdravljenju bolnikov s primarno imunsko pomanjkljivostjo zaradi pomanjkanja adenozin deaminaze, pomagali pa so med drugim bolnikom z X1-SCID, Leberjevo kongenitalno amavrozo, adreno-levkodistrofijo in talasemijo beta. Pokazalo se je, da je vnos gena v pljuča pri cistični fibrozi zelo težaven. Velik napredek pričakujemo po tem, ko je Evropska komisija pred kratkim odobrila prvo gensko zdravljenje pomanjkanja lipoprotein lipaze. Trenutno poteka veliko število kliničnih raziskav, zato bomo verjetno v naslednjih letih pričali novim metodam za zdravljenje genskih bolezni z genskim zdravljenjem in dostopnosti genskega zdravljenja večjemu številu bolnikov s hudimi genskimi okvarami, ki povzročajo veliko umrljivost in obolevnost. Zaenkrat so stroški za zadostno izdelavo medicinskega produkta pri naprednem zdravljenju in za farmakološke in toksikološke raziskave še zelo veliki.⁴⁵ Pri tem pa je pomembna tudi varnost in učinkovitost novih metod zdravljenja. Bojijo se namreč horizontalnega prenosa genov, s čimer bi bakterije v našem okolju postale odporne na antibiotike.⁴⁶ Prav zato Evropska agencija za ocenjevanje medicinskih produktov večinoma ne dovoljuje uporabe genov z rezistenco za antibiotike, ki se uporabljajo kot geni označevalci pri vnosu plazmidne DNA pri nevirusni genski terapiji.

Literatura

1. Rožman P, Jež M. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo)–Pojmovnik. Ljubljana: Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije; 2010.
2. O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 2006; 7 (4): 261–76.
3. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013; 5 (11): 1642–61.
4. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 2004; 80: 560–70.
5. Rajab K, Nelson P, Keung EZ, Conrad C. Suicide Gene Therapy against Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013; 4: 187.
6. Liu M, Acres B, Balloul JM, Bizouarne N, Paul S, Slos P, Squiban P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 Suppl 2: 14567–71.
7. Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MC. Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (43): 6941–8.
8. Nayerossadat N, Maedeh T, Abas Ali P. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 27.
9. Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS, Draghia-Akli R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther* 2006; 6(2): 243–73.
10. Murakami T, Sunada Y. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Curr Gene Ther* 2011; 11(6): 447–56.
11. Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323(9): 570–8.

12. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol* 2011; 29(2): 121–8.
13. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *J Gene Med* 2004; 6: 597–602.
14. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial. Dosegljivo na: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>.
15. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *J Gene Med* 2013; 15(2): 65–77.
16. Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M, Boes ML, van de Corput L, Renner ED. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013. Dosegljivo na: www.science-direct.com
17. Candotti F, Shaw KL, Muul L, Carbonaro D, Sokolic R, Choi C, et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood* 2012; 120(18): 3635–46.
18. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2009; 360(5): 447–58.
19. Aiuti A, Roncarolo MG. Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 682–9.
20. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3143–50.
21. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2010; 363(4): 355–64.
22. Herzog RW. Gene Therapy for SCID-X1: Round 2. *Mol Ther* 2010; 18(11): 1891.
23. Nihuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood* 2013; 122(9): 1556–64.
24. Rivat C, Santilli G, Gaspar HB, Thrasher AJ. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Hum Gene Ther* 2012; 23(7): 668–75.
25. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Benniselli JL, et al. Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol Ther* 2010; 18(3): 643–650.
26. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Bougnères P, Schmidt M, Kalle CV, et al. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 2012; 507: 187–98.
27. Roselli EA, Mezzadra R, Frittoli MC, Maruggi G, Biral E, Mavilio F, et al. Correction of beta-thalassemia major by gene transfer in hematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO Mol Med* 2010; 2(8): 315–28.
28. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012. Dosegljivo na: <http://perspective-inmedicine.cshlp.org>
29. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGa2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* 2010; 467: 318–22.
30. Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23(4): 310–20.
31. Gruber K. Europe gives gene therapy the green light. *Lancet* 2012; 380(9855):e10.
32. Griesenbach U, Alton EW. Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease. *Curr Pharm Des* 2012; 18(5): 642–62.
33. Davies JC, Alton EW. Gene therapy for cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7(6): 408–14.
34. Knoke K, Berntorp E. New treatments in hemophilia: insights for the clinician. *Ther Adv Hematol* 2012; 3(3): 165–75.
35. Scott DW, Lozier JN. Gene therapy for haemophilia: prospects and challenges to prevent or reverse inhibitor formation. *Br J Haematol* 2012; 156(3): 295–302.
36. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365: 2357–65.
37. Kočevar N, Čemažar M, Serša G. Gensko zdravljenje raka. *Farm Vestn* 2010; 61: 14–22.
38. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725–33.
39. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011; 29(7): 917–24.
40. Novaković S, Cegovnik U, Menart V, Galvani V, Wraber B. Construction of an expression cassette with hTNF-alpha gene for transient expression of the gene in mammalian cells. *Anticancer Res* 2001; 21(1A): 365–71.
41. Cemazar M, Sersa G, Wilson J, Tozer GM, Hart SL, Grosel A, Dachs GU. Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther* 2002; 9(4): 399–406.
42. Pavlin D, Cemazar M, Cör A, Sersa G, Pogacnik A, Tozon N. Electrogenic therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol*; 45(1): 31–9.
43. Prijic S, Prosen L, Cemazar M, Scancar J, Romih R, Lavrencak J, Bregar VB, Coer A, Krzan M, Znidarsic A, Sersa G. Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma. *Biomaterials* 2012; 33(17): 4379–91.
44. Spanggaard I, Snoj M, Cavalcanti A, Bouquet C, Sersa G, Robert C, Cemazar M, Dam E, Vasseur B, Attali P, Mir LM, Gehl J. 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.

45. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013; 5 (11): 1642–61.
46. Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, Pr at V. New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol Ther* 2011; 19 (11): 1942–9.
47. ClinicalTrials.gov avg 2012. Dosegljivo na: clinicaltrials.gov