

Genska terapija raka

Šestić, Lorian

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:088757>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-06-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Loriana Šestić

GENSKA TERAPIJA RAKA

Završni rad

Split, 2020

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „GENSKA TERAPIJA RAKA“ izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Željane Fredotović. U radu sam primijenio/la metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristio/la literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo/la u završnom radu na uobičajen, standardan način citirao/la sam i povezo/la s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Loriana Šestić

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Željane Fredotović, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije (*univ. bacc. biol. et chem.*).

Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za Biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

GENSKA TERAPIJA RAKA

Loriana Šestić

SAŽETAK

Genska terapija već je dugi niz godina okrenuta borbi protiv raka i osmišljavanju novih načina i pristupa liječenja. Temelji se na unosu gena ili genskih segmenata s ciljem modifikacije stanica raka. Napredak je ostvaren razvojem virusnih i nevirusnih vektora kao nosača gena, te raznim mehanizmima djelovanja genske terapije poput utišavanja onkogeni, zamjena tumor supresorskih gena, popravak gena i imunoterapija. Jedna od prednosti genske terapije je upravo selektivno ciljanje i eliminacija tumorskih stanica čime se postiže jako mala toksičnost za okolna tkiva i organe. Još uvijek su prisutni problemi po pitanju konstrukcije idealnog vektora koji bi omogućio popravak genskih mutacija i imao najmanju moguću toksičnost za pacijenta. Trenutno aktualna nanotehnologija ima bitnu ulogu u konstrukciji novih i efikasnih nevirusnih vektora u genskoj terapiji. Postoji velik broj kliničkih ispitivanja sa tek nešto uspješnim rezultatima te malim brojem odobrenih i dostupnih terapija. Aktiviranje imunološkog odgovora protiv tumorskog tkiva (imunoterapija) jedna je od tehnika koja pokazuje obećavajuće rezultate. Iako ima brojne prednosti, mogućnosti genske terapije ograničene su zbog toksičnosti, efikasnosti i dostupnosti za komercijalnu upotrebu.

Ključne riječi: Genska terapija, vektori, prijenos gena, popravak gena, nanotehnologija, imunoterapija

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 25 stranica, 3 grafičkih prikaza i 67 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Željana Fredotović, *docent*

Ocjenjivači: Dr. sc. Željana Fredotović, *docent*

Dr. sc. Elma Vuko, *docent*

Dr.sc. Nives Kević, *docent*

Rad prihvaćen: [rujan] [2020.]

Basic documentation card

Thesis

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

CANCER GENE THERAPY

Loriana Šestić

ABSTRACT

For many years gene therapy has been focused on fighting cancer and devising new ways and approaches for treatment. It is based on gene or gene segments transfer with the aim of modifying cancer cells. Progress has been made by development of viral and non-viral vectors as gene carriers, and various mechanisms of action such as oncogene silencing, replacement of tumor suppressor genes, gene repair and immunotherapy. One of the advantages of gene therapy is selective targeting and elimination of tumor cells, thus achieving very little toxicity to the surrounding tissues and organs. There are still problems with the construction of an ideal vector that would allow repair of gene mutations and have the least possible toxicity for the patient. Currently, nanotechnology plays an important role in the construction of new and effective non-viral vectors in gene therapy. There are large number of clinical trials with only few successful results and a small number of approved and available therapies. Activating the immune response against tumor tissue (immunotherapy) is one of the methods with promising results. Although it has numerous advantages, the possibilities of gene therapy are limited due to toxicity, efficiency and availability for commercial use.

Key words: gene therapy, vectors, gene transfer, gene repair, nanotechnology, immunotherapy

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 25 pages, 3 figures, and 67 references

Original language: Croatian

Mentor: *Željana Fredotović, Ph.D. Assistant Professor*

Reviewers: *Željana Fredotović, Ph.D. Assistant Professor*

Elma Vuko, Ph.D. Assistant Professor

Nives Kević, Ph.D. Assistant Professor

Thesis accepted: [September] [2020]

SADRŽAJ

1. RAK- KOMPLEKSNA GENETIČKA BOLEST	1
2. ŠTO JE GENSKA TERAPIJA	2
3. SUSTAV ZA PRIJENOS GENA KOD GENSKE TERAPIJE	4
3.1. Virusni vektori.....	4
3.1.1. Retrovirusi.....	5
3.1.2. Lentivirusi.....	5
3.1.3. Adenovirusi	6
3.1.4. Bakulovirusi	6
3.1.5. Herpes-simplex virus (HSV)	7
3.1.6. Adeno-asocirani virusi (AAV)	7
3.2. Ne virusni vektori: Nanočestice	8
3.2.1. Zlatne nanočestice	9
3.2.2. Liposomi.....	10
3.2.3. Egzosomi	10
4. MEHANIZMI GENSKE TERAPIJE RAKA	11
4.1. Utišavanje onkogeno	11
4.2. Zamjena tumor supresorskih gena.....	12
4.3. Popravak gena	12
4.4. Genski usmjerena enzimsko terapija (GDEPT).....	13
4.5. Imunoterapija.....	14
4.5.1. Tumorska cjepiva	15
4.5.2. CAR-T stanična terapija	15
4.5.3. Citokini	16
5. PROBLEMI I BUDUĆNOST GENSKE TERAPIJE	18
6. ZAKLJUČAK	19
7. LITERATURA	20

1. RAK- KOMPLEKSNA GENETIČKA BOLEST

Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije, rak je drugi po redu uzroka smrti u svijetu. Upravo ta kompleksna genetska bolest 2018. godine uzrokovala je smrt oko 9,6 milijuna ljudi. Gledajući na svjetskoj razini uzrok smrti 1 od 6 ljudi je upravo rak (WHO).

Rak je bolest koju karakterizira ubrzana i nekontrolirana proliferacija stanica koje imaju mogućnost širenja po čitavom organizmu. Onkogeni su geni koji u pretjeranoj ekspresiji dovode do maligne transformacije stanica. Uglavnom su to mutirane verzije normalnih staničnih gena (protoonkogeni) zaduženih za kontrolu stanične diobe, inhibiciju apoptoze i diferencijaciju. Proteini ekspimirani od strane onkogeni imaju ulogu u signalnoj transdukciji ili pak kao transkripcijski faktori aktivirani tim procesom. Signalna transdukcija je proces u kojem stanica signal koji primi prevodi u promjenu genske ekspresije koja rezultira staničnim odgovorom (Jackson i sur., 2018). Prvi dokaz da su onkogeni usko povezani s nastankom tumorskih tvorbi dao je pokus prijenosa gena Coopera i Weinberga 1981.godine.

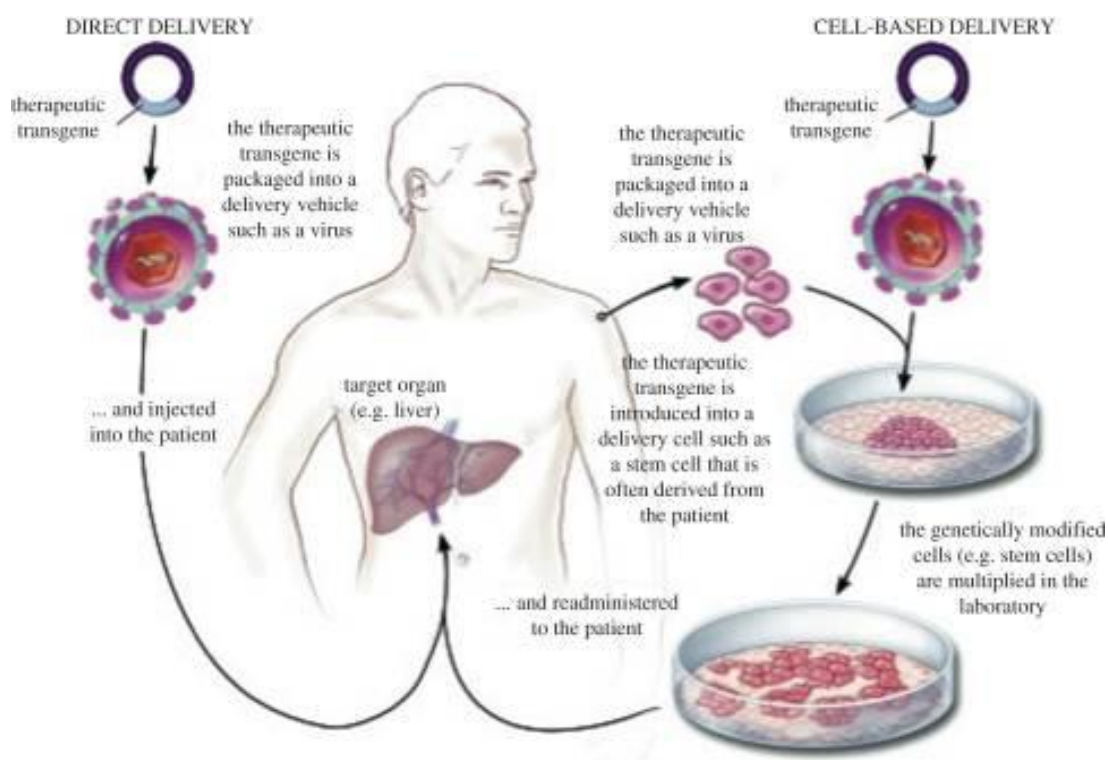
Osim onkogeni glavnu ulogu u nastanku raka imaju i tumor-supresorski geni, točnije njihova inaktivacija čime dolazi do prestanka regulacije stanične diobe. Inaktivirani tumor-supresor geni prisutni su kod svih oblika raka. Gubitak funkcije događa se uslijed mutacije bitne regije proteina ili prestankom ekspresije (Jackson i sur., 2018). Dva tumor-supresorska gena kodiraju retinoblastoma (RB) i TP53 proteine koji djeluju kao kontrolne točke i reguliraju staničnu proliferaciju ili pokreću programiranu staničnu smrt (Hanahan i Weinberg, 2011).

Kako bi se podržao rast tumora i njegovo metastaziranje, stanice raka imaju sposobnost angiogeneze tj. stvaranja novih krvnih žila što zadovoljava potrebu tumorskih stanica za kisikom i hranjivim tvarima. Tijekom nekontrolirane proliferacije angiogeneza je gotovo uvijek aktivirana (Hanahan i Folkman, 1996). Mutacija protoonkogeni i tumor supresor gena kao posljedica epigenetskih promjena dovodi do neprirodnog slaganja kromatina i netočne ekspresije više različitih gena (Jackson i sur., 2018).

2. ŠTO JE GENSKA TERAPIJA

Genska terapija je postupak unošenja gena, genskih segmenata ili oligonukleotida modificirajući stanice raka s ciljem liječenja bolesti. Geni koji nose informaciju stvaraju protein koji se eksprimira unutar stanice. Napredak genske terapije usmjeren je na somatske stanice što osigurava da se genetske modifikacije ne prenose na potomstvo. Ključni elementi genske terapije su materijal koji se prenosi, metoda prijenosa i tip ciljane stanice na koju djeluje terapijski gen (Davila i Enciso, 2011).

Genska terapija ima dva pristupa: *in vivo* i *ex vivo* (Slika 1). Kod *in vivo* pristupa djeluje se direktno na ciljane stanice injektiranjem vektora koji sadrži terapijski gen. U *ex vivo* pristupu prikupljene stanice tumora se uzgajaju u kulturi pod kontroliranim uvjetima te genetski modificiraju uvođenjem novog gena u genom stanice te se takve vraćaju u pacijenta (Amer, 2014).



Slika 1. *In vivo* i *ex vivo* strategija za unos gena. Na lijevoj strani je *in vivo* ili direktni unos koji uključuje terapijski gen direktno injektiran u pacijenta. Na desnoj strani je *ex vivo* pristup u kojem su stanice tumora sakupljene, uzgojene u kulturi i genetski modificirane unošenjem novog gena i vraćene u pacijenta (Preuzeto iz Zwaka, 2009).

Prednost *ex vivo* pristupa je mogućnost provjere učinkovitosti pretvorenih stanica prije njihovog unosa u pacijenta. Iako je manje invazivan i tako prikladniji za liječenje raka, *in vivo* pristup zahtjeva opsežne pretrage kako bi se procijenila učinkovitost i sigurnost transgena (van Haasteren i sur., 2018). Tehnika koja se najčešće koristi u genskoj terapiji je rekombinantna DNA tehnologija. Temelji se na unosu gena od interesa u vektor, koji može biti virusni ili ne virusni te u obliku nanočestica (Goncalves i Paiva, 2017).

3. SUSTAV ZA PRIJENOS GENA KOD GENSKE TERAPIJE

Virusni i ne virusni vektori zaslužni su za uspjeh genske terapije. Unosom DNA i RNA posredstvom vektora u stanice pacijenta provedeni su brojni klinički pokusi sa znatnim uspjesima za gensku terapiju (Keeler i sur., 2017). Nukleinska kiselina ne može sama ući u citoplazmu stanice gdje se događa transkripcija i genomska modifikacija. Također, nakon određenog vremena se raspada i nije funkcionalna. Upravo taj problem rješavaju vektori kao sustavi prijenosa gena. Od brojnih vektora upravo virusni vektori su najučinkovitiji za gensku terapiju (Lukashev i Zamyatnin, 2016).

Dva načina kojima transgeni ulaze u stanicu su transfekcija i transdukcija. Pojam transdukcije se odnosi na prijenos genetskog materijala u stanicu posredstvom virusnih vektora za razliku od transfekcije koja označava prijenos DNA bez upotrebe virusnog vektora (Kantor i sur., 2014). Kako bi metoda za prijenos gena bila uspješna treba biti onemogućena razgradnja stranog gena. Također, vektor se treba ugraditi u stanicu koja je meta genske terapije. Naposljetku, ne bi smjelo doći do nikakvih nuspojava (Gao i sur., 2007).

3.1. Virusni vektori

Virusi se odlikuju mogućnošću prijenosa genetskog materijala u točno određene stanice te ih to čini povoljnim prijenosnicima u genskoj terapiji (Akbulut i sur., 2015). Mogu biti jednolančani ili dvolančani u ovisnosti sadrže li RNA ili DNA. Građa virusa i njegov proteinski sloj omogućava mu vezivanje za specifičan receptor i štiti ga od razgradnje staničnim enzimima (Amer, 2014).

Virusni vektori imaju mogućnost pročišćenja, stabilnosti i umnažanja kako bi se modificirani gen ugradio u točno određeno tkivo bez rizika zaraze tim istim virusom (Thomas i sur., 2003). Danas postoji veliki broj virusnih vektora.

3.1.1. Retrovirusi

Genetski materijal retrovirusa je ribonukleinska kiselina. Ugrađen u stanicu vrši transkripciju pomoću enzima *reverzne transkriptaze* kako bi se mogao integrirati (*integraza*) u ciljanu stanicu (Jin i sur., 2008). Iako su prvi upotrebljavani, retrovirusni vektori danas se malo koriste u genskoj terapiji. Odlika retrovirusnih vektora je njihova visoka učinkovitost i stabilnost kojom se ugrađuju u stanice domaćina (Edelstein et al. , 2007).

Prva uspješna genska terapija retrovirusnim vektorima bila je tretman X-vezane teške kombinirane imunodeficijencije (X-SCID), gdje su pokazali mogućnosti, ali i probleme u borbi protiv nasljednih metaboličkih bolesti (Anson, 2004). Jedan od glavnih nedostataka retrovirusa je enzim integraza koja genetski materijal nasumično raspoređuje u genom stanice. Može se dogoditi da se transgen ugradi blizu staničnog gena te ga na taj način blokira ili preekscitira (Martínez i Delgado, 2011).

3.1.2. Lentivirusi

Lentivirusni vektori su retrovirusi koji sadrže jednolančanu RNA. Prednosti koje ih čine raznovrsnim alatom za prijenos gena su uspješnosti transdukcije i stabilna integracija transgena u stanicu sa dugotrajnom genskom ekspresijom (Akbulut i sur., 2015). Lentivirusni vektori za razliku od drugih retrovirusnih vektora u mogućnosti su transducirati i stanice koje nisu u staničnoj diobi npr. dendritičke stanice (Liechtenstein, 2013).

Lentivirusni vektori najčešće izolirani iz virusa ljudske imunodeficijencije (HIV) ili virusa imunodeficijencije kod majmuna (SIV) sličnih su karakteristika kao onkogeni retrovirusi, ali s dodatkom gena koji imaju ulogu u replikaciji virusa. Bitno je uklanjanje zaraznih dijelova virusa genetičkim inženjerstvom kako bi se dobio modificirani lentivirus (Breckpot i sur., 2007).

3.1.3. Adenovirusi

Adenovirusi su otkriveni u laboratoriju pri pokušaju uzgoja adenoidnog (limfatičnog) tkiva (Rowe i sur., 1953). Infekcije adenovirusom su blage, ali kod imunosuprimiranih bolesnika mogu biti smrtonosne. Virus izoliran iz majmuna najčešće se koristi za klinička ispitivanja i istraživanja. Ovi virusi ne ugrađuju vlastitu genomsku DNA u stanicu domaćina što umanjuje rizik nastanka mutacija (Zhang i Zhou, 2016).

Adenovirusni vektori jedni su od najučinkovitijih prijenosnika gena u stanice. Najviše korišten vektor je tip 5 (Ad5) (Nicklin i sur., 2005). U usporedbi s drugim virusnim vektorima adenovirusni su jako imunogeni te su tako u mogućnosti prouzročiti urođene i stečene imunološke odgovore u stanicama (Zhang i Zhou, 2016). Mogu dovesti do infekcije stanica koje jesu ili nisu u diobi. Rekombinantni adenovirusni vektori zbog svoje velike moći transdukcije, transgenske ekspresije i tropizma (sposobnost virusa da se umnožava samo u stanicama određenih tkiva domaćina) imaju široku primjenu. Adenovirusi posredstvom Ad proteina ulaze u stanicu vezujući se za koksakivirusni i adenovirusni receptor (CAR). Vezanje Ad vektora za CAR receptor odlučujući je faktor za staničnu selektivnost virusa (Ura i sur., 2014).

Prvi Ad vektor korišten za klinička ispitivanja je ONYX-015 kojem nedostaje genska regija koja kodira za E1B-55K, protein bitan za replikaciju adenovirusa u normalnim stanicama. Na taj način infekcija normalnih stanica ovim vektorom dovodi do odgovora p53 tumor supresor gena koji obustavlja rast stanica i replikaciju. Tumorske stanice nemaju p53 gen i replikacija se događa normalno (Ries i Korn, 2002). Ovaj vektor ispitan je za rak prostate, gušterače, debelog crijeva i jajnika (Wold i Toth, 2013).

3.1.4. Bakulovirusi

Laka manipulacija, veličina, pročišćavanje i mogućnost unošenja velikih DNA segmenata osobine su bakulovirusa. Njihova nemogućnost replikacije u stanicama sisavaca i nisko toksično djelovanje na stanice čini ih ozbiljnim kandidatom za prijenos gena (Airenne i sur., 2013). Hepatociti su bile prve ne-insektne stanice koje su podvrgnute transdukciji bakulovirusima (Hofman i sur., 1995). Aktivacija promotora homolognom regijom u

genetskom materijalu bakulovirusa sisavaca jedan je od faktora koji ima utjecaj na uspješnost transdukcije i stupanj genske ekspresije (Hu, 2006).

Autographa californica višestruki je nukleopolihedrovirus (AcMNPV) koji sadrži kružnu dsDNA u proteinskoj ljusci. Za gensku terapiju od posebne važnosti je sposobnost AcMNPV-a da izazove imunološki odgovor u stanici domaćina. AcMNPV kao antiangiogeno sredstvo koristi se za liječenje raka prostate i jajnika u modelnim organizmima (Airenne i sur., 2013).

3.1.5. Herpes-simplex virus (HSV)

Herpes-simplex virus sadrži dsDNA (150 kb) i kodira za više od 70 gena. HSV je prvi virus formiran kao onkolitički vektor u borbi protiv raka (Ma i sur., 2018). Martuza i suradnici (1991.) pokazali su kako se herpes simplex virus tipa 1 sa mutacijom u genu za timidin kinazu replicira u stanicama raka i kao takav može pomoći u liječenju tumora mozga. Rekombinantni virus prvotno je napravljen za cijepljenje protiv HSV-1 i HSV-2 dok su tek naknadno razmatrani kao sustavi za prijenos gena. Blokiranjem ekspresije virusnog gena u ranim stadijima ili korištenjem mutanta kojima nedostaje neurovirulentni gen γ 34.5 smanjuje se toksičnost herpes simplex virusa (Jacobs i sur., 1999).

Tri tipa HSV-1 vektora koji se koriste su amplikoni, replikacijski defektni i replikacijski kompetentni vektori (Manservigi, 2010). HSV ima znatne prednosti koje ga čine dobrim prijenosnim sustavom poput brze replikacije i mogućnosti infekcije više stanica raka kao i veliki genom koji se dodatkom transgena lako modificira. Glikoproteini herpes simplex virusa mogu se modificirati za pronalazak tumorskih stanica (Ma i sur., 2018).

3.1.6. Adeno-asocirani virusi (AAV)

Adeno-asocirani virus pripada porodici *Parvoviridae* i sadrži jednolančanu DNA veliku 4.8 kb. Adenovirusi odlikuju se ovisnošću o drugim virusima pomagačima za replikaciju i infekciju- dependovirusi. Jedna od prednosti AAV je da transgen mogu integrirati u ljudski kromosom 19 u obliku provirusa za mirovanje u slučaju nedostatka pomoćnog virusa (Park i sur., 2008).

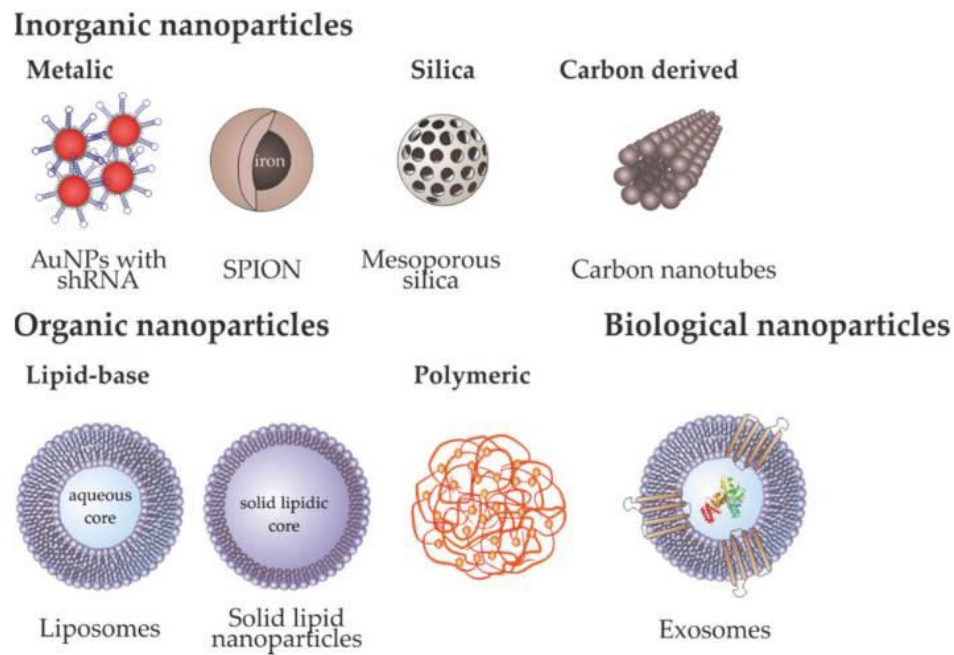
Od dosad navedenih vektora, AAV je jedan od najbližih idealnom vektoru iako postoje neki problemi poput ograničenog kapaciteta terapijskog gena, purifikacije i imunosti na AAV kod ljudi (Park i sur., 2008). Kako bi se odabrao određeni AAV vektor za prijenos gena potrebno je poznavati na koje stanice je usmjerena terapija, sigurnost gena ugrađenog u vektor te korištenje tkivno specifičnih promotora (Naso i sur., 2017).

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) protein je koji ima ulogu signalizacije i regulacije angiogeneze kod rasta i širenja tumora. U istraživanju objavljenom 2012. godine AAV2 je korišten kao vektor kako bi se postigla dugotrajna ekspresija VEGF-Trap proteina u modelnom organizmu. Rezultati su pokazali da se AAV2-VEGF-Trap može koristiti kao inhibitor primarnog rasta tumora dojke i spontanih plućnih metastaza u miša oboljelog od 4T1 tumora dojke (Lu i sur., 2012).

3.2. Ne virusni vektori: Nanočestice

Čestice veličine 1-100 nm nazivaju se nanočesticama. Interes o upotrebi nanočestica kao vektora za gensku terapiju raste iz dana u dan. Jedna od glavnih prednosti ovih prijenosnih sustava je efekt poboljšane permeabilnosti i retencije (EPR). Taj efekt omogućava nanonositeljima akumuliranje u tumorskim tkivima u puno većim koncentracijama nego li kod normalnih tkiva. Druga prednost je ta što mogu zaštititi RNAi molekule od razgradnje enzimima i imunološkog odgovora. Nadalje, zbog svoje veličine prijenos preko stanične membrane je uspješniji u odnosu na druge vektore (Xin i sur., 2017).

Kationski lipidi, kao na primjer Transfectam i biokompatibilni polimeri korišteni su za unutarstanično unošenje nukleinske kiseline zbog njihove djelotvornosti transfekcije i lake masovne produkcije. Međutim njihov mali kapacitet, niska efikasnost ciljanja gena i limitirano *in vivo* praćenje ograničava njihovu kliničku upotrebu kao ne virusni vektori (Mendes i sur., 2017). Kako ne bi došlo do imunološkog prepoznavanja nanočestica i kako bi se duže zadržale u krvotoku, predstavljen je proces u kojem nanočestice maskiraju svoju površinu sa polietilenglikolnim slojem (Singh i sur., 2018). Nanočestice kao prijenosnici gena mogu se svrstati u 3 glavne skupine: anorganske, organske i biološke nanočestice (Slika 2).



Slika 2. Podjela nanočestica koje se koriste za dostavu gena. Primjer za metalne nanočestice su zlatne nanočestice povezane sa shRNA za utišavanje gena. Ostali primjeri anorganskih nanočestica su superparamagnetične željezov oksid nanočestice (SPION), silika nanočestice i ugljikove nanocjevčice. U organske nanočestice spadaju liposomi, nanočestice od čvrstih lipida i polimerne nanočestice. U biološke nanočestice spadaju egzozomi izlučeni od strane eukariotskih stanica (Preuzeto iz Roma-Rodrigues i sur., 2020).

3.2.1. Zlatne nanočestice

Anorganske nanočestice (NPs) jedne su od obećavajućih nevirusnih vektora za prijenos gena. Zlatne nanočestice nisu toksične su za stanicu, biokompatibilne su, promjenjive veličine i izravne djelotvornosti (Patil i sur., 2019). Promjenjiva veličina i ostale karakteristike mogu kontrolirati otpuštanje lijekova na različite lokacije (Pang i Liang, 2019). Dokazano je kako zlatne nanočestice imaju odgovarajući kapacitet prijenosa kao vektori za nekodirajuću DNA i siRNA te se lako ugrađuju u stanicu i tako omogućuju obustavljanje genske ekspresije (Mendes i sur., 2017). Mnoga istraživanja provedena su korištenjem upravo AuNPs pokazavši tako njihovu moć detekcije jako malih tumora što je od velike važnosti za ranu dijagnozu bolesti (Peng i Liang, 2019).

3.2.2. Liposomi

Liposomi su organske nanočestice. Sastoje se od jednoslojnih ili višeslojnih fosfolipida koji imaju hidrofobne i hidrofilne interakcije s vodom. Glavne prednosti liposoma kao vektora su biokompatibilnost, biorazgradivost, mala veličina i niska toksičnost što ih čini uspješnima u terapiji raka (Alavi i sur., 2017). Modifikacije površina liposoma slojem polietilenglikola (PEG) čine ih povoljnima za prijenos lijekova. Felgner i suradnici (1987) razvili su prijenos gena kationskim liposomima pri čemu dolazi do inhibicije Grb2 proteina i smanjenja proliferacije bcr-abl stanica pozitivnih na leukemiju. Također, Zuo i suradnici (2019) su koristili liposome povezane sa EGF proteinom za prijenos p53 tumor supresorskog gena u miša s rakom jajnika.

3.2.3. Egzosomi

Egzosomi su biološke vezikule za prijenos lijekova u terapiji raka. zbog svoje netoksičnosti i neimunogenosti (Mashouri i sur., 2019). Relativno su stabilni vektori, imaju mogućnost modifikacije i fuzije s plazma membranama stanica što im omogućava direktan ulaz u stanicu. Direktna modifikacija egzosoma može se postići lipofekcijom, elektroporacijom i inkubacijom. Porozna struktura egzosoma pogoduje elektroporaciji. Interesni lijek zajedno s egzosomima se stavlja u otopinu uz primjenu električnog polja, što omogućava lijeku da prođe kroz njegove pore (Gilligan i Dwyer, 2017).

4. MEHANIZMI GENSKE TERAPIJE RAKA

Kad dođe do prijenosa genetskog materijala u ciljanu stanicu i njegove ugradnje u DNK jezgre, uneseni gen može izazvati utišavanje, modifikacije, smanjenje količine staničnih komponenata ili popravak ciljanog staničnog gena. U ovisnosti o jačini genske ekspresije, gen „samoubojica“ (eng. suicide gene) može dovesti do smrti stanice i tumorske nekroze ili do umanjenog staničnog rasta sa regresijom tumora kao posljedicom utišavanja gena. Promjene u genima mogu dovesti do poboljšane reakcije na kemoterapiju ili radijaciju. Popravak ciljanog gena može spriječiti dodatne komplikacije i malignosti. U budućnosti ove bi se metode mogle primijeniti kao prevencija nasljednih malignih oboljenja (Amer, 2014). Trenutna istraživanja imaju naglasak na uvođenje gena u tumorske stanice kako bi blokirali ekspresiju onkogeni i angiogenezu ili potaknuli imunološki odgovor protiv tumorskog tkiva (Akbulut i sur., 2015).

4.1. Utišavanje onkogeni

Ciljanje onkogeni u središtu je istraživanja lijekova protiv raka. Tirozin kinazni inhibitori onkogeni korišteni su za liječenje raznih oblika raka. Strategija utišavanja onkogeni je usmjerena na inhibiciju gena na mRNA razini. Za utišavanje onkogeni (RAS, MYC, BCL-2) najčešće se koriste mali oligonukleotidi ili RNA inhibitori poput siRNA, shRNA ili miRNA (Akbulut i sur., 2015). Postoji povezanost između uloge genske ekspresije i apoptoze. Različiti tipovi aktiviranih mRNA onkogeni mogu biti inhibirani RNAi tehnologijom i zaustaviti rast različitih tumora (Xin i sur., 2017).

MDR1 je gen koji je zaslužan za rezistenciju na tumorsku kemoterapiju. Za promjenu ovog gena dvije molekule siRNA konstruirane su kako bi inhibirale MDR1 ekspresiju. siRNA par korišten je za liječenje stanica ljudskog raka gušterače i raka želuca. Mala interferirajuća RNA (siRNA) uspješno je inhibirala 91% MDR1 na razini mRNA i proteina. Smanjena je i otpornost na kemoterapijski lijek daunorubicin u oba slučaja bolesti (Nieth i sur., 2003). Aktivirana mutacija u RAS onkogeni dovodi do stanične proliferacije i inhibicije apoptoze. Sun i suradnici (2009) objavili su istraživanje u kojem su ciljali RAS onkogen koristeći shRNA za liječenje stanica primarnog raka jetre (hepatom) kod ljudi.

4.2. Zamjena tumor supresorskih gena

Tumor supresorski geni u normalnim uvjetima inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora. Gubitak funkcije tumor supresorskih gena ima važnu ulogu u nastanku malignih oboljenja stoga su upravo ovi geni meta u genskoj terapiji raka.

RB1 je tumor supresorski gen inaktivan kod različitih vrsta raka. Ispitivanja su pokazala da adenovirusom posredovan (Ad)-RB94 prijenos gena dovodi do potiskivanja rasta karcinoma mokraćnog mjehura, glave i vrata, gušterače i jednjaka u *in vitro* i *in vivo* uvjetima kod ljudi (Liu i sur., 2015). Drugi bitan tumor supresorski gen je p53. 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća transfekcija ljudskih tumorskih stanica divljim tipom p53 gena uzrokovala je njihovu apoptozu i inhibiciju staničnog rasta. SiRNA može se koristiti kao aktivator p53 u tumorima u kojima normalni p53 gen nije aktivan zbog ekspresije negativnih regulatornih proteina (Lane i sur., 2010). Glavni pristupi kojima se cilja p53 u stanicama raka su uvođenje divljeg tipa p53 ili selektivno uništenje mutiranog p53 gena u stanicama raka (Morrism i Chan, 2015).

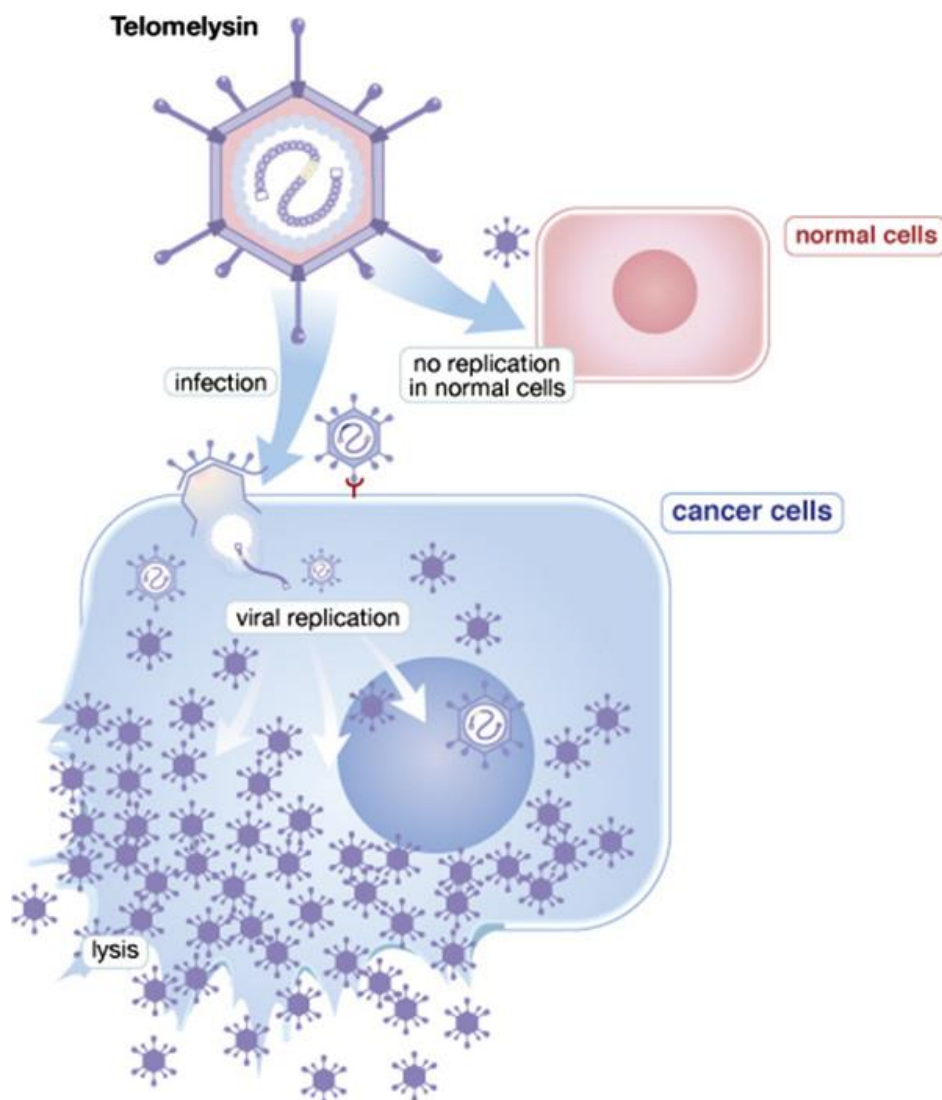
4.3. Popravak gena

Tri glavne nukleaze korištene za popravak gena su nukleaze s cinkovim prstima (ZFN), efektorska nukleaza nalik transkripcijskim aktivatorima (TALEN) i CRISPR/Cas9 sistem (Maeder i Gersbach, 2016). Mogućnost nukleaza poput ZFN i TALEN da proizvedu dvostruki prekid na točno određenom mjestu u genomu donijelo je optimizam za terapijsku translaciju i direktni genomski inženjering. Popravak gena pomoću ZFN može se postići njegovim vezivanjem za lentivirusni vektor (Cai i sur., 2014). CRISPR-Cas 9 je nov i efektivan alat za popravak gena. Njegova jednostavnost korištenja i moćno djelovanje privukli su brojne znanstvenike u utrku za korištenje ovog sistema u humanim genskim terapijama (Liu i sur., 2017). Geni za humani papiloma virus (HPV) gube funkciju primjenom CRISPR-Cas 9 sistema inducirajući tako apoptozu i inhibirajući rast stanica raka maternice (Hu i sur., 2014).

4.4. Genski usmjerena enzimski terapija (GDEPT)

Tumor specifično ciljanje gena koji metaboliziraju lijekove i korištenje prolijeka koji je preinačen u citotoksični agens djelovanjem transduciranih enzima zove se genski usmjerena enzimski terapija (GDEPT) ili genska terapija „samoubojstva“ (Akbulut i sur., 2015). U odnosu na druge načine genske terapije u kojima samo stanice koje primaju terapijske gene podliježu apoptozi ili nekrozi, u slučaju GDEPT terapijski se efekt i citotoksičnost širi i na susjedne stanice (Karjoo i sur., 2016). Uspješnost ovog pristupa leži u selektivnoj ekspresiji samoubilačkog enzima primarno u tumorskim stanicama. Nadalje, prolijek kao i samoubilački enzim ne bi trebali biti toksični prema normalnim stanicama (Ardiani i sur., 2012). Gen „ubojica“ može ući u stanicu na više načina. Prvi način je efekt izravnog „ubojstva“, gdje dolazi do prijema samoubilačkog gena (engl. suicide gene) u tumorske stanice (Slika 3). Efekt promatrača je drugi način u kojem dolazi do eliminiranja ne-transduciranih stanica skupa s transduciranim stanicama. Citozin deaminaza (CD) i herpes simplex virus timidin kinaza (HSV-TK) najviše su istraživani u terapiji „samoubilačkih gena“ (Sun et al., 2019). Ispitani su neoplastični BALB/c miševi sa unesenim genom za herpes simplex virus timidin kinazu. Miševi su izloženi herpes timidin kinaznom specifičnom supstratu- gancikloviru koji je djelovanjem na tumorske stanice kod BALB/c miševa inducirao kompletnu regresiju tumora (Moolten, 1986). Citozin deaminaza, enzim prisutan kod bakterija i gljiva, pretvara ne toksični 5-fluorocitozin u toksični 5-fluorouracil. Primjenom enzimskih sistema s imunomodulacijskim citokinima dolazi do povećane efikasnosti terapije. Dodatak IL-2 (interleukin-2) vektora HSV-TK vektoru dovelo je do antitumorske imunosti (Chen i sur., 1995). Također kombiniranjem interleukina IL-12 i IL-18 sa citozin deaminazom došlo je do redukcije RM1 raka prostate i plućnih metastaza kod miševa što se pokazalo boljim nego primjenom pojedinačnih tretmana (Khatri i sur., 2009).

Ljudska telomeraza u velikom postotku aktivna je u većini tumora bez obzira na podrijetlo tkiva i povezana je s ekspresijom ljudske telomerazne reverzne transkriptaze (hTERT). Pomoću Ad5 vektora (telomelysin, OBP-301) (Oncolys BioPharma) tumorske stanice s ekspimiranom telomerazom u mogućnosti su aktivirati hTERT promotor što dovodi do ekspresije i replikacije gena u tumorskim stanicama i smrti stanice karcinoma (Fujiwara, 2011).



Slika 3. Genetski modificiran adenovirusni vektor u ulozi gena „samoubojstva“. Telomelizin inficira stanice raka i u njima se replicira, uslijed čega dolazi do smrti i lize stanice (Preuzeto iz Amer, 2014).

4.5. Imunoterapija

Imunološki sustav najbitniji je obrambeni mehanizam protiv raka ili novotvorine (kancerogeni tumor). Nastanak raka uz prije navedeno uključuje i bijeg tumorskih stanica od imunološke reakcije. Glavni cilj imunoterapije je kontrola ili eliminacija zloćudnih tumora pojačavanjem imunološkog odgovora domaćina na tumorske antigene (Martínez-Dávila i Delgado-Enciso, 2011). Kako bi došlo do nekroze stanica tumora dovoljan broj imunskih stanica sa visokom moći razlučivanja tumorskih antigena treba biti umetnut u tumorsku stromu. Također, na mjestu tumora dolazi do aktivacije imunskih stanica sa mehanizmima za nekrozu stanica ili sekrecije citokina za uništenje tumora (Rosenberg i sur., 2004).

Imunogenska terapija usmjerena je na unos gena u ciljane stanice tumora kako bi se potakla antitumorska imunost kod ljudi. Najčešće korišteni pristupi u imunogennoj terapiji su genska terapija citokinima, terapija tumorskim cjepivima i terapija kimernih antigenskih receptora (CAR-T) (Sun i sur., 2019).

4.5.1. Tumorska cjepiva

Tumorska cjepiva djeluju na tumor putem imunološkog sustava i tako uzrokuju dugoročan imunološki odgovor. Cjepiva su podijeljena na osnovi antigena predstavljenih imunom sustavu. Kod nestaničnih cjepiva pacijentima je direktno ubrizgan tumorski antigen koji dolazi u kontakt sa antigen prezentirajućim stanicama (APC) domaćina kako bi došlo do imunološkog odgovora. Stanična cjepiva sastoje se od APC i tumor antigena unesenih *ex vivo*. Unos u domaćina cijepljenjem dovodi do prezentiranja antigena i pojačanja odgovora tumor specifičnih T stanica (Srinivasan i sur., 2017).

Dendritičke stanice (DC) su najjače antigen prezentirajuće stanice u ljudskom organizmu (Sun i sur., 2019). Sipuleucel-T odobren je od strane FDA 2010. godine za liječenje raka prostate. Dendritičke stanice su uklonjene iz periferne krvi, aktivirane i kao takve vraćene u pacijenta (Handy i sur., 2018).

Većina tumorskih cjepiva korištena su kako bi se pokušao zaustaviti rast već formiranih tumora. Nekoliko ispitivanja provedeno je s cjepivima prije napretka raka (Patel i sur., 2017). Cjepiva protiv virusa hepatitisa B (HBV) ili humanog papiloma virusa (HPV) polučila su znatan uspjeh u prevenciji raka jetre i maternice (Lowy i Schiller, 2006).

4.5.2. CAR-T stanična terapija

Novi tip ciljane genske terapije je CAR-T stanična terapija. U ovom pristupu dolazi do ekspresije kimernih antigenskih receptora u T limfocitima koje se prenose natrag u pacijenta kako bi uništili antigen povezane tumorske stanice (Sun i sur., 2019). Stanice sa prezentiranim antigenom će biti napadnute od strane CAR. Prema tome, najizravnije i najuspješnije nadilaženje toksičnosti tumora bez ugrožavanja efikasnosti je ciljanje tumor specifičnih antigena eksprimiranih isključivo na tumorskim stanicama. Problem je što su za većinu CAR

meta tumorski antigeni (TAA) koji su osim na tumorskim stanicama izraženi i u normalnim „bystander“ stanicama (Wang i sur., 2017). Pristupi unošenja CAR transgena mogu biti ne virusni genski prijenosi ili virusna transdukcija (Dai i sur., 2016). Zhong i suradnici (2010) kreirali su treću generaciju kimernih antigenskih receptora. Unijeli su proizvedene T stanice u imunodeficientnog miša sa tumorom. Rezultati su pokazali bolju aktivaciju T stanica zbog pojačanog djelovanja puta protein kinaze B koji pomaže u regulaciji staničnog ciklusa.

Trenutno ima preko 20 objavljenih kliničkih ispitivanja uz korištenje CAR modificiranih T stanica za akutnu limfoblastičnu leukemiju, kroničnu limfoblastičnu leukemiju, multipli mijelom, limfom ili akutnu mijeloidnu leukemiju (Dai i sur., 2016). Kimerni antigen receptor modificirana T stanična terapija protiv CD19 (B-limfocitni antigen) pokazala se uspješnom u liječenju recidiva i otpornosti akutne limfoblastične leukemije (ALL). CD19 usmjeren kimerni antigen receptor (CTL019) transduciran lentivirusnim vektorom povezan je s visokim postotkom remisije do 24 mjeseca čak i kod pacijenata sa neuspješnom transplatacijom matičnih stanica (Maude i sur., 2016). Nadalje, Wang i suradnici (2017) su testirali CAR usmjeren protiv CD133 (antigen-glikoprotein, dio transmembranskih glikoproteina na staničnim izbočenjima) pokazavši tako antitumorsku imunost koja bi mogla doprinjeti u dugoročnoj kontroli bolesti.

4.5.3. Citokini

Citokini su građeni kao polipeptidi ili glikoproteini molekulske težine ispod 30 kDa. Njihova uloga je omogućavanje različitim tipovima stanica rast, diferencijaciju i upalne ili protuupalne signale. Do otpuštanja citokina najčešće dolazi tijekom određenog vremenskog razloga kao odgovor na podražaj. Aktivnost citokina u cirkulaciji je kratkog vijeka zbog njihovog ograničenog vremena poluživota. Iznimka su citokini poput interleukina-7 (IL-7) ili hematopoetskih faktora rasta koji se kontinuirano i ravnotežno proizvode u krvi. Ciljane stanice imaju na svojim staničnim membranama receptore visokog afiniteta za citokine. Vezivanjem dolazi do pokretanja unutarstaničnog signaliziranja kojem je posljedica modifikacija gena na razini transkripcije (Berraondo i sur., 2019).

Cutreru i suradnici (2015) su u svojem istraživanju o sigurnosti i efikasnosti genske terapije interleukina 12 ciljanog na tumor dokazali da se plazmidna DNA sa ttIL12 citokinom može sigurno i djelotvorno primijeniti za liječene i neliječene metastatske lezije. Nadalje, IL-2 ključni je citokin u promicanju širenja stanica ubojica (NK) i T limfocita. Unošenje ovog

citokina u visokim dozama odobreno je za liječenje metastatskog karcinoma bubrega i melanoma (Berraondo i sur., 2019). Još jedan citokin, faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF), značajan je stimulator hematopoeze. koji može potaknuti staničnu proliferaciju, sazrijevanje i funkciju anitgen prezentirajućih stanica (APCs). IL-12 i GM-CSF korišteni u kombinaciji pokazali su jači i djelotvorniji učinak u terapiji raka (Choi i sur., 2012).

5. PROBLEMI I BUDUĆNOST GENSKJE TERAPIJE

Na svjetskoj razini trenutno se odvija više od 600 kliničkih ispitivanja genske terapije. Veliki postotak ovih ispitivanja posvećen je upravo malignim oboljelima i provodi se na pacijentima u završnoj fazi bolesti. Većina ispitivanja su u prvoj ili drugoj fazi dok je jako mali broj ispitivanja u trećoj fazi (Razi Soofiyani i sur., 2013). Događale su se mnoge pogreške tijekom kliničkih ispitivanja. Jedan takav slučaj dogodio se 1999. godine u kojem je pacijent, prema službenoj istrazi, umro zbog imunološke reakcije na adenovirusni vektor kojim je unesen gen za ornitin dekarboksilazu. Iako je genskom terapijom omogućen direktan popravak ili zamjena gena, sveprisutan je problem toksičnosti i djelotvornosti iste jer se jaki imunološki odgovor na unesene genetski modificirane viruse javlja kod brojnih pacijenata. Iz godine u godinu na tržište izlaze novi vektori za gensku terapiju koji bi omogućili sigurniji i efikasniji prijenos u ciljane stranice. Sva ispitivanja genske terapije danas prolaze više provjera i regulacija od strane Nacionalnog instituta zdravlja (NIH) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) (Cotrim i Baum, 2008). Korištenje novih molekularnih oružja poput interferirajuće DNA i CRISPR-Cas9 sustava ciljne korekcije mutiranog gena trebalo bi omogućiti napredak u genskoj terapiji koji uključuje utvrđivanje raspodjele sadržaja vektora i rizika za karcinogenezu (Keeler i sur., 2017).

6. ZAKLJUČAK

Rak ili novotvorina je jedna od bolesti sa najvišom stopom smrtnosti. Brojni znanstvenici diljem svijeta svakodnevno tragaju za lijekom protiv ove kompleksne genetičke bolesti. Genska terapija svakako je sadašnjost, ali i budućnost u liječenju onkoloških bolesnika. Ovaj terapijski pristup u liječenju raka sve se češće primjenjuje najvećim dijelom još uvijek samo na eksperimentalnoj razini. Razvoj virusnih i nevirusnih vektora kao prijenosnika gena omogućilo je uvođenje zdravog gena u stanice i poboljšanje kvalitete života oboljelih. Ograničenja koje imaju virusni vektori riješena su razvojem nanotehnologije i nanočestica. Različitim mehanizmima postignuto je uvođenje gena u stanice pacijenta s ciljem blokiranja ekspresije onkogeni ili stvaranja imunološkog odgovora. Budućnost genske terapije je u kombinaciji tehnika koje ona nudi sa uobičajenim pristupima u borbi protiv raka poput kirurškog liječenja, kemoterapije i radioterapije. Genska terapija je nažalost cijenom još uvijek nepristupačna za veliku većinu ljudske populacije.

7. LITERATURA

Airenne KJ, Hu YC, Kost TA, et al. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Mol Ther.* 2013;21(4):739-749. doi:10.1038/mt.2012.286

Akbulut H, Ocal M, Sonugur G. *Cancer Gene Therapy.* 2015; 1-36. doi:10.5772/61775

Alavi M, Karimi N, Safaei M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(1):3-9. doi:10.15171/apb.2017.002

Amer, M.H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol and Cell Ther.* 2014; 2, 27. doi:10.1186/2052-8426-2-27

Ardiani A, Johnson AJ, Ruan H, Sanchez-Bonilla M, Serve K, Black ME. Enzymes to die for: exploiting nucleotide metabolizing enzymes for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2012;12(2):77-91. doi:10.2174/156652312800099571

Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2019;120(1):6-15. doi:10.1038/s41416-018-0328-y

Cai Y, Bak RO, Mikkelsen JG. Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *Elife.* 2014;3:e01911. doi:10.7554/eLife.01911

Chen SH, Chen XH, Wang Y, et al. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(7):2577-2581. doi:10.1073/pnas.92.7.2577

Choi KJ, Zhang SN, Choi IK, Kim JS, Yun CO. Strengthening of antitumor immune memory and prevention of thymic atrophy mediated by adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF. *Gene Ther.* 2012;19(7):711-723. doi:10.1038/gt.2011.125

Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):97-103. doi:10.1177/0192623307309925

Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(7):d439. doi:10.1093/jnci/d439

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med.* 2007;9(10):833-842. doi:10.1002/jgm.1100

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7413-7417.

doi:10.1073/pnas.84.21.7413

Fujiwara T. A novel molecular therapy using bioengineered adenovirus for human gastrointestinal cancer. *Acta Med Okayama*. 2011;65(3):151-162. doi:10.18926/AMO/46626

Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*. 2007;9(1):E92-E104. doi:10.1208/aapsj0901009

Gilligan KE, Dwyer RM. Engineering Exosomes for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1122. doi:10.3390/ijms18061122

Gonçalves GAR, Paiva RMA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017;15(3):369-375. doi:10.1590

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-364. doi:10.1016/s0092-8674(00)80108-7

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncol*. 2018;14(10):907-917. doi:10.2217/fon-2017-0531

Hu YC. Baculovirus vectors for gene therapy. *Adv Virus Res*. 2006;68:287-320. doi:10.1016/S0065-3527(06)68008-1

Hu Z, Yu L, Zhu D, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:612823. doi:10.1155/2014/612823

Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem*. 2018;62(5):643-723. doi:10.1042/EBC20170053

Jacobs A, Breakefield XO, Fraefel C. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part II. Vector systems and applications. *Neoplasia*. 1999;1(5):402-416. doi:10.1038/sj.neo.7900056

Jin X, Yang YD, Li YM. Gene therapy: regulations, ethics and its practicalities in liver disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(15):2303-2307. doi:10.3748/wjg.14.2303

Kantor B, Bailey RM, Wimberly K, Kalburgi SN, Gray SJ. Methods for gene transfer to the central nervous system. *Adv Genet*. 2014;87:125-197. doi:10.1016/B978-0-12-800149-3.00003-2

Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;99(Pt A):113-128. doi:10.1016/j.addr.2015.05.009

Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clin Transl Sci*. 2017;10(4):242-248. doi:10.1111/cts.12466

Khatri A, Husaini Y, Ow K, Chapman J, Russell PJ. Cytosine deaminase-uracil phosphoribosyltransferase and interleukin (IL)-12 and IL-18: a multimodal anticancer interface marked by specific modulation in serum cytokines. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2323-2334. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2039

Lane DP, Cheok CF, Lain S. p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(9):a001222. doi:10.1101/cshperspect.a001222

Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*. 2017;266:17-26. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.012

Liu F, Li Q, Zhang P, Chen F, Cheng Y. Role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of human non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3349-3353. doi:10.3892/mmr.2015.3227

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1167-1173. doi:10.1172/JCI28607

Lu L, Luo ST, Shi HS, et al. AAV2-mediated gene transfer of VEGF-Trap with potent suppression of primary breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastases by long-term expression. *Oncol Rep*. 2012;28(4):1332-1338. doi:10.3892/or.2012.1915

Lukashev AN, Zamyatnin AA Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(7):700-708. doi:10.1134/S0006297916070063

Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther.* 2016;24(3):430-446. doi:10.1038/mt.2016.10

Martínez-Dávila, I.A. & Delgado-Enciso, Ivan. Gene therapy for cancer treatment. *New Approaches in the Treatment of Cancer.* 2011; 173-202.

Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science.* 1991;252(5007):854-856. doi:10.1126/science.1851332

Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2019;18(1):75. doi:10.1186/s12943-019-0991-5

Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [published correction appears in *N Engl J Med.* 2016 Mar 10;374(10):998]. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1507-1517. doi:10.1056/NEJMoa1407222

Mendes R, Fernandes AR, Baptista PV. Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer-The Case for Combined Delivery?. *Genes (Basel).* 2017;8(3):94. doi:10.3390/genes8030094

Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 1986;46(10):5276-5281.

Morris LG, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer.* 2015;121(9):1357-1368. doi:10.1002/cncr.29140

Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017;31(4):317-334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5

Nicklin SA, Wu E, Nemerow GR, Baker AH. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol Ther.* 2005;12(3):384-393. doi:10.1016/j.ymthe.2005.05.008

Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 2003;545(2-3):144-150. doi:10.1016/s0014-5793(03)00523-4

Park K, Kim WJ, Cho YH, et al. Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Front Biosci.* 2008;13:2653-2659. doi:10.2741/2872

Patil S, Gao YG, Lin X, et al. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5491. doi:10.3390/ijms20215491

Peng J, Liang X. Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(18):e15311. doi:10.1097/MD.00000000000015311

Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):249-255. doi:10.5681/apb.2013.041

Ries S, Korn WM. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer.* 2002;86(1):5-11. doi:10.1038/sj.bjc.6600006

Roma-Rodrigues C, Rivas-García L, Baptista PV, Fernandes AR. Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano?. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):233. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/pharmaceutics12030233

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10(9):909-915. doi:10.1038/nm1100

Singh P, Pandit S, Mokkalapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1979. Published 2018 Jul 6. doi:10.3390/ijms19071979

Srinivasan VM, Ferguson SD, Lee S, Weathers SP, Kerrigan BCP, Heimberger AB. Tumor Vaccines for Malignant Gliomas. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):345-357. doi:10.1007/s13311-017-0522-2

Sun W, Shi Q, Zhang H, et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discov Med.* 2019;27(146):45-55.

Sun HX, He HW, Zhang SH, et al. Suppression of N-Ras by shRNA-expressing plasmid increases sensitivity of HepG2 cells to vincristine-induced growth inhibition. *Cancer Gene Ther.* 2009;16(9):693-702. doi:10.1038/cgt.2009.14

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-358. doi:10.1038/nrg1066

Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2014;2(3):624-641. doi:10.3390/vaccines2030624

van Haasteren J, Hyde SC, Gill DR. Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(9):959-972. doi:10.1080/14712598.2018.1506761

Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):53. doi:10.1186/s13045-017-0423-1

World Health Organization, www.who.int/health-topics/cancer (pristupljeno 28.7.2020).

Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13(6):421-433. doi:10.2174/1566523213666131125095046

Xin Y, Huang M, Guo WW, Huang Q, Zhang LZ, Jiang G. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol Cancer*. 2017;16(1):134. Published 2017 Jul 28. doi:10.1186/s12943-017-0683-y

Zhang C, Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(8):2064-2074. doi:10.1080/21645515.2016.1165908

Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*. 2010;18(2):413-420. doi:10.1038/mt.2009.210

Zuo L, Zhang F, Xu Y. Anti-EGF antibody cationic polymeric liposomes for delivery of the p53 gene for ovarian carcinoma therapy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(1):205-211.

Zwaka TP: Use of genetically modified stem cells in experimental gene therapies. In: Templeton NS (Eds.). *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, third edition. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, FL.2009;731-6. doi:10.1201/9780849387999.ch34