

Terapia genowa jest nową metodą terapii, znaną w klinice od co najmniej 1990 r., kiedy to przeprowadzono pierwszą próbę kliniczną. Dotyczyła ona leczenia wrodzonej choroby – ciężkiego niedoboru odporności, spowodowanego mutacją w genie dezaminazy adenozyminy (ang. severe combined immunodeficiency, SCID/ADA) przez transfer prawidłowej formy genu ADA do limfocytów pacjentów. Od tego czasu liczba protokołów klinicznych wzrosła do ok. 900. Dotyczą one przede wszystkim chorób nowotworowych, wrodzonych defektów genetycznych, chorób naczyniowo-sercowych oraz chorób infekcyjnych. Efektywny transfer genów możliwy jest głównie dzięki nośnikom genów – wektorom. Obecnie wykorzystywane są głównie wektory retrowirusowe i adenowirusowe, choć nagi lub kapsułkowany w lipidach plazmidowy DNA również znajduje zastosowanie. Najczęściej geny terapeutyczne wprowadza się do wątroby, mięśni szkieletowych, serca, centralnego układu nerwowego, płuc, skóry, trzustki i komórek krwi, np. limfocytów. Transfer genów obejmuje bezpośrednie iniekcje do badanej tkanki lub podania dożylnie, dotętnicze, domięśniowe, donosowe, dojamowe, doskórne.

Najczęściej pierwsze próby kliniczne terapii genowej są przeprowadzane w sytuacjach, kiedy żadna z tradycyjnych metod leczenia – farmakoterapia czy chirurgia, nie przynosi oczekiwanych efektów. Niekiedy terapia genowa jest jedyną formą pomocy ciężko chorym pacjentom. Duże nadzieje obecnie wiąże się z wykorzystaniem metody transferu genów w leczeniu schorzeń naczyniowo-sercowych. Angiogenna terapia genowa wykorzystuje geny kodujące białka o charakterze proangiogennym. Wprowadzenie genów angiogennych w obszar niedokrwiowej tkanki indukuje powstanie w niej nowych naczyń krwionośnych i poprawia tym samym stan kliniczny pacjenta. Pierwsze próby kliniczne angiogennej terapii genowej, wykorzystujące genowe konstrukty kodujące naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu zostały już przeprowadzone również w Polsce.

Słowa kluczowe: terapia genowa, próby kliniczne.

# Terapia genowa w klinice

## Gene therapy in the clinic

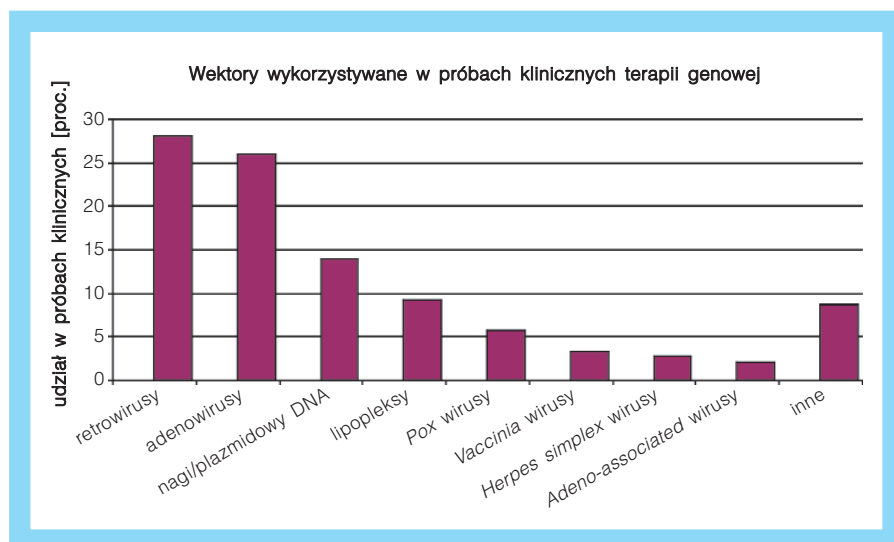
Maciej Małecki, Przemysław Janik

Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

### PRÓBY KLINICZNE

Terapia genowa jest metodą terapii wykorzystującą geny kodujące białka terapeutyczne. Transfer genów do komórki modyfikuje jej funkcje lub nierzadko, głównie w przypadku komórek nowotworowych, może prowadzić do ich śmierci. Geny wprowadzane są do komórek w systemie *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* za pomocą nośników wirusowych i niewirusowych. Wektory wykorzystywane w próbach klinicznych pokazano na ryc. Większość prób klinicznych terapii genowej, z ponad 900 wykonanych na świecie, dotyczy chorób nowotworowych. Stanowią one ponad 60 proc. wszystkich protokołów klinicznych. W dalszej kolejności próby kliniczne obejmują choroby monogenowe, choroby naczyniowe i infekcyjne. Zdecydowa-

na większość protokołów obejmuje badania I i II fazy. Terapia genowa w klinice to przede wszystkim prace prowadzone w Stanach Zjednoczonych Ameryki, gdzie jak dotychczas wykonano ponad 65 proc. wszystkich prób klinicznych na świecie. W Europie najwięcej prób przeprowadzono w Wielkiej Brytanii, Niemczech i Szwajcarii. Łącznie w tych państwach wykonano ponad 180 badań, co stanowi ok. 20 proc. wszystkich prób klinicznych przeprowadzonych na świecie. W Polsce próby kliniczne terapii genowej obejmują głównie nowotwory i choroby sercowo-naczyniowe. W światowych bazach danych, jak dotychczas, figurują 3 polskie próby kliniczne. Dotyczą one prób terapii genowej nowotworów skóry, centralnego układu nerwowego oraz przewodu po-



Ryc. Wektory wykorzystywane w próbach klinicznych terapii genowej na świecie. Ponad 50 proc. wszystkich prób klinicznych jest prowadzonych z użyciem wektorów konstruowanych w oparciu o retrowirusy i adenowirusy [2]

Fig. Vectors used in gene therapy clinical trials in the world. Generally, the clinical trials are performed with retroviral and adenoviral vectors [2]

*Gene therapy is thought as a novel method of therapy. The first clinical trial was performed in 1990. The correction of genetic monogenic disorder, severe combined immunodeficiency by retrovirus transfer of normal adenosine deaminase gene to the lymphocytes of patients was well described. So far, the number of clinical trials has rapidly increased. Cancer, monogenic diseases, vascular and infectious diseases are the main targets of clinical gene therapy. The sufficient gene transfer is possible using effective vectors. The retroviral and adenoviral vectors are most frequently used in the clinic but very often the naked/plasmid DNA is also useful. Mostly the therapeutic genes are transferred into the liver, skeletal muscles, heart, central nervous system, lungs, skin, pancreas and blood cells. The genes are administered directly to target tissues or indirectly by intravenous or intramuscular injections. Quite often gene therapy is the only method for no option patients who are not suited to conventional therapies. Many hopes are linked with the gene therapy of vascular diseases and application of various expression vectors encoding angiogenic factors for the treatment of heart or hind limb ischemia. Overexpression of angiogenic genes, for example vascular endothelial growth factor (VEGF) or fibroblast growth factor (FGF) cause the formation of new vessels and improve the clinical state of patients. The first clinical trials of angiogenic gene therapy with the plasmid encoding vascular endothelial growth factor have been also performed in Poland.*

*Key words: gene therapy, clinical trials.*

karmowego [1, 2]. Oprócz tego prowadzone są również próby kliniczne angiogennej terapii genowej chorób sercowo-naczyniowych [3].

## WĄTROBA

W dość licznych badaniach klinicznych terapii genowej wykorzystuje się wątrobę. Jest to narząd, w którym zachodzą podstawowe procesy metaboliczne oraz miejsce syntezy wielu białek, czynników o dostępności i znaczeniu ogólnoustrojowym. Nieprawidłowe funkcjonowanie wątroby jest przyczyną wielu chorób metabolicznych. Wątroba jest rozpatrywana jako narząd, który po genetycznej korekcie może przywracać prawidłową funkcję wielu procesów biologicznych oraz może być traktowany jako bioreaktor białek sekrecyjnych o charakterze terapeutycznym. Wątroba to narząd dobrze ukrwiony, segmentowany, homogenny (ponad 70 proc. komórek wątroby to hepatocyty), o dużej zdolności do regeneracji. Z tych względów wiele badań terapii genowej jest poświęconych doskonaleniu metod transferu genów do komórek wątroby [4–6]. Główne aplikacje terapeutyczne terapii genowych wątroby to bezpośrednio choroby metaboliczne wątroby (np. rodzinna hipercholesterolemia, spichrzanie glikogenu, niedobór transkarbamylazy ornitynowej) [6–8] oraz defekty metabolizmu wątroby, których efekty objawiają się poza wąt-

trobą (np. defekty hemostazy, np. hemofilia A, B) [9, 10]. Wektory wykorzystywane w terapii genowej wątroby podsumowano w tab. 1.

Nierzadko w badaniach wykorzystuje się strategię *ex vivo*. Postępowanie *ex vivo* obejmuje:

- ▶ resekcję fragmentu wątroby,
- ▶ hodowlę hepatocytów w warunkach *in vitro*,
- ▶ transdukcję hepatocytów terapeutycznymi genami,
- ▶ transplantację modyfikowanych komórek,
- ▶ ocenę efektywności, skuteczności strategii [5].

## CENTRALNY UKŁAD NERWOWY

Terapia genowa chorób centralnego układu nerwowego (CUN) jest zabiegiem bardzo złożonym. Trudności w transferze genów do mózgu, rdzenia kręgowego czy narządów zmysłów wynikają zarówno z niedoskonałości obecnych wektorów, jak i w dużej mierze z ograniczeń związanych z obecnością naturalnych barier anatomiczno-fizjologicznych, których pokonanie wiąże się z koniecznością przeprowadzania zaawansowanych zabiegów chirurgicznych. Geny terapeutyczne mogą być wprowadzane do CUN drogą bezpośredniej iniekcji do tkanki nerwowej lub przez podanie ogólnoustrojowe, np. donaczyniowe. Jak wynika z danych literaturowych, najczęściej geny wprowadzane są do

**Tab. 1. Typy wektorów wykorzystywanych do transferu genów do wątroby. W przypadku wektorów wirusowych krytycznym parametrem warunkującym wydajną transdukcję hepatocytów jest miano wirusa, np. optymalne dla wektorów wirusów związanych z adenowirusami (AAV) –  $10^{13}$  pt/kg, adenowirusowych –  $10^{12}$  pt/kg, lentiwirusowych –  $10^{11}$  pt/kg, (pt – cząstka wirusowa)**  
**Table 1. Types of vectors used in gene transfer to liver. The titration of the viral stock is a crucial parameter for the efficient transduction of hepatocytes e.g. for adeno-associated viral vectors (AAV) optimum seems to be  $10^{13}$  pt/kg, adenoviral vectors:  $10^{12}$  pt/kg and for lentiviral vectors:  $10^{11}$  pt/kg, where pt means a virus particle**

### Wektory wykorzystywane do wprowadzania genów do wątroby

- ▶ nośniki syntetyczne  
Lipoplexy,  
Poliplexy,
- ▶ nagi/plazmidowy DNA,
- ▶ nośniki wirusowe – wektory konstruowane w oparciu o:  
retowirusy,  
adenowirusy,  
wirusy związane z adenowirusami,  
lentiwirusy,  
wirusy opryszczki,  
wirusy zapalenia wątroby

komórek hipokampa, prążkowiec, istoty czarnej, neurogleju, komórek przysadki, śródbłonka i do fibroblastów [11, 12]. Wiele prób przeprowadza się techniką *ex vivo*. Geny, które najczęściej są wykorzystywane w próbach terapii genowej CUN to gen hydroksylazy tyrozynowej, geny neurotrofin (czynnik wzrostu nerwów, NGF, glejopochodny czynnik wzrostu nerwów, GDNF, mózgowopochodny czynnik wzrostu nerwów, BDNF), geny antyapoptotyczne (Bcl-2), geny transporterów glukozy [11–13]. Postęp w próbach terapii genowej, dotyczący również CUN, związany jest bardzo często z możliwością przeprowadzania badań na zwierzętach – z istnieniem opracowanego wcześniej modelu zwierzęcego badanej choroby. Warto wspomnieć, iż dość zaawansowane badania terapii genowej, np. chorób neurodegeneracyjnych wynikają właśnie z możliwości badań tych schorzeń na zwierzętach laboratoryjnych. Postępowanie terapeutyczne (metodami terapii genowej) w chorobie Parkinsona to przede wszystkim próby transferu genu hydroksylazy tyrozynowej bezpośrednio do prążkowiec [14–16]. Enzym ten jest odpowiedzialny za przekształcanie tyrozyny w DOPA – prekursor dopaminy. Wiele badań prowadzonych jest z użyciem nośników wirusowych (głównie wektorów z wirusów związanych z adenowirusami – AAV2, AAV5, lentiwirusów, adenowirusów). W większości wymagają one jednak wysokich mian wirusa i wykonania skomplikowanych zabiegów chirurgicznych, a ich efektywność najczęściej jest niska z powodu lokalnej, ograniczonej do miejsca podania, ekspresji transgenów [17]. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być, opisana niedawno przez Zhanga i wsp. [16], procedura transferu genów do CUN przez podanie donaczyniowe. Autorzy donoszą, iż podana dożylnie, immunoliposomalna kapsułka zawierająca plazmidowy konstruktor z wklonowanym genem hydroksylazy tyrozynowej, efektywnie przenika przez barierę krew-mózg i dostaje się do prążkowiec, w którym ulega ekspresji. Wykazano, iż aktywność hydroksylazy w prążkowiec po *i.v.* podaniu konstruktów genowych wzrasta po-

nadsiedmiokrotnie [16]. W przypadku chorób neurodegeneracyjnych bardzo często prowadzone są próby wykorzystania genów kodujących wspomniane wcześniej czynniki neurotroficzne, np. NGF, GDNF, BDNF. Neuroprotektoryjne własności, np. NGF, wykorzystuje się w próbach terapii genowej choroby Alzheimera [13]. Terapia genowa CUN to również badania, próby transferu genów terapeutycznych do narządów zmysłów, np. do oka w przypadku retinopatii [18, 19], czy do ucha w próbach korekty funkcji narządu Cortiego [20].

## MIĘŚNIE

Tkanka mięśniowa odgrywa w próbach terapii genowej ważną rolę. Budowa histologiczna mięśni (wielojądrowe syncytia komórkowe), ich fizjologia oraz łatwość i dostępność dla przeprowadzenia manipulacji genetycznych sprawiają, iż zmodyfikowane genetycznie mięśnie mogą być traktowane jako potencjalne bioreaktory terapeutycznych białek, działających nie tylko lokalnie w tkance mięśniowej, ale również i ogólnoustrojowo [21]. Unikalność mięśni odzwierciedla się również w mnogości wykorzystywanych technik transferu genów. Prace obejmują wektory wirusowe, jak

i niewirusowe; możliwe jest również efektywne wprowadzanie genów metodą elektrotransferu *in vivo* [22]. Prowadzone są próby uczynienia z mięśni szkieletowych bioreaktorów czynników, np. antynowotworowych oddziałujących ogólnoustrojowo na oddalony guz nowotworowy czy też, np. hipoglikemicznych [21]. W doświadczeniach opublikowanych przez Grosa i wsp. efekt hipoglikemiczny wykazano po transfekcji mięśni szkieletowych genem insuliny [23], zaś Otaegui i wsp. podobny efekt uzyskali przez transfer mięśni genem glukokinazy [24]. Prace badawcze z terapii genowej mięśni dotyczą również prób klasycznej terapii genowej chorób monogenowych mięśni, np. dystrofii mięśniowej Duchenne (DMD) [25]. DMD jest przykładem dziedzicznej choroby monogenowej, związanej z mutacją genu dystrofiny. Ograniczenia terapii genowej DMD wynikają m.in. z trudności skonstruowania optymalnego wektora, który mógłby efektywnie eksprimować dużych rozmiarów cDNA dla dystrofiny (ok. 14 kbp) i jednocześnie wydajnie i bezpiecznie infekować komórki mięśniowe. Ostatnie badania podkreślają skuteczność transferu genów, np. mikrodystrofiny przez wektory AAV2/1 [25–27].

**Tab. 2. Najczęściej wykorzystywane w próbach terapii genowej geny kodujące białka o charakterze proangiogennym. Większość prób dotyczy genów VEGF, FGF, HGF**  
**Table 2. Common proangiogenic genes used in gene therapy trials. Basically, the trials are performed with VEGF, FGF and HGF genes**

Geny proangiogenne wykorzystywane w próbach angiogennej terapii genowej
naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF),
fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF),
hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF),
angiogenina,
angiopoetyna,
proliferyna,
plytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF),
czynnik indukowalny przez hipoksję (HIF),
transformujący czynnik wzrostu (TGF),
czynnik nekrozy nowotworów (TNF),
interleukina 8 (IL-8),
Del-1, Cyr 61, PR39

## SERCE

Angiogenna terapia genowa, terapeutyczna angiogeneza [28–30] jest próbą wykorzystania genów kodujących białka o charakterze proangiogennym w leczeniu schorzeń naczyniowo-sercowych. Wśród genów, które dominują w próbach klinicznych wyróżnić można przede wszystkim naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) [31], fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF) [32] oraz hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF) [33]. Geny o charakterze angiogennym (tab. 2.) wprowadza się do niedokrwionych obszarów serca, kończyn, głównie w postaci nagiego DNA lub w nośnikach wirusowych (np. adenowirusowych, wirusów związanych z adenowirusami, AAV). Terapeutyczna angiogeneza z zastosowaniem preparatów genowych sprowadza się do prób stymulacji procesu powstania nowych naczyń krwionośnych przez wprowadzany w miejsce niedokrwienia gen proangiogeny. Zakłada się, iż powstające naczynia krwionośne (kapilary) wezmą udział w tworzeniu krążenia obocznego w niedokrwionej tkance; tym samym poprawie ulegnie stan kliniczny pacjenta [28]. Doniesienia o pierwszych próbach klinicznych angiogennej terapii genowej, również w Polsce, są już dostępne w literaturze. Prace wskazują, iż transfer genów proangiogennych do niedokrwionych tkanek jest skuteczną metodą indukcji neowaskularyzacji w tych tkankach i poprawia stan kliniczny pacjenta [3, 28–33]. Ważnym podkreślenia jest również fakt, iż metoda terapeutycznej angiogenezy bardzo często nie konkuruje z chirurgią czy farmakoterapią, ale jest jedyną metodą leczenia dla wielu pacjentów cierpiących na choroby sercowo-naczyniowe.

## PŁUCA

Mukowiscydoza – wrodzona choroba monogenowa, spowodowana mutacją genu kodującego białko – regulator przewodzenia (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), jest przedmiotem dość licznych badań z terapii genowej [34–38]. Mutacje w genie CFTR są

przyczyną nieprawidłowego, zaburzonego transportu jonów chlorkowych z komórek. Choroba przede wszystkim dotyka komórek nabłonka drzewa oskrzelowego, jelit, trzustki, przewodów żółciowych, nasieniowodów. Charakterystycznym, klinicznym objawem mukowiscydozy jest zalegająca w drogach oddechowych gęsta, śluzowata wydzielina, utrudniająca prawidłową wentylację płuc i będąca doskonałym środowiskiem dla rozwoju chorobotwórczych mikroorganizmów. Terapia genowa mukowiscydozy to próby transferu prawidłowego genu CFTR do komórek, np. nabłonkowych drzewa oskrzelowego. Wykorzystywane są wektory wirusowe, jak i niewirusowe, głównie lipidy kationowe. Preparaty genowe wprowadza się głównie przez nos w postaci aerozolu [35, 36]. Jak do tej pory przeprowadzono ok. 30 prób terapii genowej mukowiscydozy. Z wektorów wirusowych wykorzystywano głównie adenowirusy, wektory wirusów związanych z adenowirusami. O ile efekty niepożądane infekcji wirusowych w przeprowadzonych próbach były raczej niewielkie i szybko przemijające (ból głowy, kaszel, dreszcze, niewielka gorączka), to jednak efekt terapeutyczny był niezadowalający – niska efektywność transferu genu i jego ekspresji. Generalnie, jak dotychczas, próby terapii genowej mukowiscydozy nie są zadowalające. Prowadzone są prace nad nowymi nośnikami i metodami transferu genów; dość duże nadzieje wiąże się też z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych [34, 38].

## SKÓRA

Skóra jest największym organem ciała. Z uwagi na dostępność, łatwość iniekcji oraz monitorowania przebiegu i efektywności genetycznych manipulacji, jest interesującym obiektem dla terapii genowej. Główne aplikacje terapii genowej skóry to próby korekty wrodzonych defektów monogenowych, terapia nowotworów skóry [1] oraz badania wykorzystania populacji komórek skóry, które po wprowadzeniu terapeutycznych genów staną się źródłem terapeutycznych białek, wykorzystywanych w próbach systemowego leczenia

chorób, np. nowotworowych [39–41]. Obecnie znane są próby *genoterapii* jak dotąd nieuleczalnych chorób monogenowych, np. *epidermolysis bullosa* przez transdukcję keratynocytów czy fibroblastów prawidłowym genem kolagenu VII [42], czy próby terapii *xeroderma pigmentosum* przez transfer genów odpowiedzialnych za naprawę DNA [43]. W przypadku wrodzonych chorób monogenowych optymalnym rozwiązaniem wydaje się być wprowadzanie genów terapeutycznych do epidermalnych komórek macierzystych skóry. Wiąże się to z koniecznością zastosowania wektorów wirusowych; wykorzystywane są głównie wektory retrowirusowe i lentiwirusowe.

## PODSUMOWANIE

Terapia genowa jest nową metodą terapii. Z wielu względów nie przypomina ona tradycyjnych metod leczenia. Wykorzystuje geny. Większość protokołów klinicznych terapii genowej obejmuje eksperymentalną terapię nowotworów oraz próby leczenia wrodzonych chorób monogenowych, chorób naczyniowych i infekcyjnych. Wątroba, mięśnie szkieletowe, serce, centralny układ nerwowy, płuca, skóra stanowią główny cel transferu genów terapeutycznych. Znane są również próby transferu genów do limfocytów w próbach terapii genowej złożonych niedoborów odporności [44, 45] oraz próby leczenia, np. cukrzycy, za pomocą genów insuliny czy glukokinazy [23, 24]. Szerokie wykorzystanie terapii genowej w warunkach klinicznych wymaga dalszych badań. Wydaje się, iż postęp w pierwszej kolejności uzależniony jest od tempa rozwoju inżynierii genetycznej oraz związany jest z przebiegiem prac normujących szeroko rozumiane aspekty bioetyczne i prawne metod terapii opartych na transferze genów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Mackiewicz A, Kapcinska M, Wiznerowicz M, et al. *Immunogene therapy of human melanoma. Phase I/II clinical trial*. Adv Exp Med Biol 1998; 451: 557-60.
2. The Journal of Gene Medicine, www.wiley.co.uk

3. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, Teresinska A, Firek B, Janik P, Religa Z. *Gene therapy of coronary artery disease with phvegf165 – early outcome*. Kardiol Pol 2003; 59: 373-84.
4. Liu F, Lei J, Vollmer R, Huang L. *Mechanism of liver gene transfer by mechanical massage*. Mol Ther 2004; 9: 452-7.
5. Di Campli C, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Review article: a medicine based on cell transplantation – is there a future for treating liver diseases?* Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 473-80.
6. Ferry N. *Gene therapy and liver diseases*. Gastroenterol Clin Biol 2003; 27: 288-90.
7. Yarmush ML, Banta S. *Metabolic engineering: advances in modeling and intervention in health and disease*. Annu Rev Biomed Eng 2003; 5: 349-81.
8. Cheng SH, Smith AE. *Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders*. Gene Ther 2003; 10: 1275-81.
9. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. *Gene therapy for the hemophilias*. J Thromb Haemost 2003; 1: 1550-8.
10. Couto LB, Pierce GF. *AAV-mediated gene therapy for hemophilia*. Curr Opin Mol Ther 2003; 5: 517-23.
11. Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. *Gene transfer to the nervous system: prospects for novel treatments directed at diseases of the aging nervous system*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2003; 58: M1111-8.
12. Tinsley R, Eriksson P. *Use of gene therapy in central nervous system repair*. Acta Neurol Scand 2004; 109: 1-8.
13. Tuszynski MH, Blesch A. *Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease*. Prog Brain Res 2004; 146: 441-9.
14. Mochizuki H, Mizuno Y. *Gene therapy for Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl. 2003; 65: 205-13.
15. Burton EA, Glorioso JC, Fink DJ. *Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease*. Gene Ther 2003; 10: 1721-7.
16. Zhang Y, Calon F, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM. *Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism*. Hum Gene Ther 2003; 14: 1-12.
17. Glorioso JC, Mata M, Fink DJ. *Therapeutic gene transfer to the nervous system using viral vectors*. J Neurovirol 2003; 9: 165-72.
18. Lai YK, Rolling F, Baker E, Rakoczy PE. *Kinetics of efficient recombinant adeno-associated virus transduction in retinal pigment epithelial cells*. Exp Cell Res 2001; 267: 184-92.
19. Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, Paleolog E, Baker A, Thrasher AJ, Ali RR. *Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1*. Gene Ther 2002; 9: 320-6.
20. Ishimoto S, Kawamoto K, Kanzaki S, Raphael Y. *Gene transfer into supporting cells of the organ of Corti*. Hear Res 2002; 173: 187-97.
21. Goldspink G. *Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003; 17: 211-22.
22. Fattori E, La Monica N, Ciliberto G, Toniatti C. *Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery*. Somat Cell Mol Genet 2002; 27: 75-83.
23. Gros L, Riu E, Montoliu L, Ontiveros M, Lebrigand L, Bosch F. *Insulin production by engineered muscle cells*. Hum Gene Ther 1999; 10: 1207-17.
24. Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jimenez R, Bosch F. *Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia*. Hum Gene Ther 2000; 11: 1543-52.
25. Van Deutekom JC, van Ommen GJ. *Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy*. Nat Rev Genet 2003; 4: 774-83.
26. Athanasopoulos T, Fabb S, Dickson G. *Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review)*. Int J Mol Med 2000; 6: 363-75.
27. Athanasopoulos T, Graham I, Perez N, et al. *Recombinant adeno-associated virus (RAAV) 2/1 microdystrophin vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD)*. 2<sup>nd</sup> European Conference & Practical Course Towards clinical gene therapy: pre-clinical gene transfer assessment Bellaterra, Spain 2004; Abstract book: p. 44.
28. Harjai KJ, Chowdhury P, Grines CL. *Therapeutic angiogenesis: a fantastic new adventure*. J Interv Card 2002; 15: 223-37.
29. Yla-Herttuala S, Alitalo K. *Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth*. Nat Med 2003; 9: 694-9.
30. Malecki M, Janik P. *Terapia genowa – próby zastosowań klinicznych*. Terapia angiogenenna. Ordynator Leków 2002; 5: 8-12.
31. Malecki M, Janik P. *Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i jego potencjalne aplikacje terapeutyczne w zmianach naczyniowych i nowotworach*. Pol Przegl Chir 1999; 71: 1291-7.
32. Garcia-Martinez C, Opolon P, Trochon V, et al. *Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor*. Gene Ther 1999; 6: 1210-21.
33. Jurchyszyn A, Wolska-Smoleń, Skotnicki AB. *Czynnik wzrostu hepatocytów: od diagnostyki do zastosowań klinicznych*. Przegląd Lek 2003; 60: 425-32.
34. Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW. *Update on gene therapy for cystic fibrosis*. Curr Opin Mol Ther 2003; 5: 489-94.
35. Emerson M, Renwick L, Tate S, et al. *Transfection efficiency and toxicity following delivery of naked plasmid DNA and cationic lipid-DNA complexes to ovine lung segments*. Mol Ther 2003; 8: 646-53.
36. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, et al. *Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial*. Chest 2004; 125 (2): 509-21.
37. Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, et al. *Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study*. Hum Gene Ther 2003; 14: 1079-88.
38. Brown M. *Gene therapy trials for cystic fibrosis*. Drug Discov Today 2002; 7: 788-9.
39. Paller AS. *Genetic disorders of skin: a decade of progress*. Arch Dermatol 2003; 139: 74-7.
40. Hoeller D, Petrie N, Yao F, Eriksson E. *Gene therapy in soft tissue reconstruction*. Cells Tissues Organs 2002; 172: 118-25.
41. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. *A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo*. Hum Gene Ther 2002; 13: 959-68.
42. Chen M, Kasahara N, Keene DR, et al. *Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa*. Nat Genet 2002; 32: 670-5.
43. Magnaldo T. *Xeroderma pigmentosum: from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy*. Expert Opin Biol Ther 2004; 4: 169-79.
44. Engel BC, Kohn DB. *Gene therapy for inborn and acquired immune deficiency disorders*. Acta Haematol 2003; 110: 60-70.
45. Culver KW, Anderson WF, Blaese RM. *Lymphocyte gene therapy*. Hum Gene Ther 1991; 2: 107-9.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**dr med. **Maciej Małecki**

Zakład Biologii Komórki

Centrum Onkologii – Instytut

im. Marii Skłodowskiej-Curie

ul. Roentgena 5

02-781 Warszawa

e-mail: mahan@poczta.wp.pl

tel. +48 22 546 26 21