

Terapia genowa to nowa metoda leczenia wielu chorób za pomocą preparatów genowych. W ponad 20 proc. prób klinicznych przeprowadzonych na świecie wykorzystano preparaty plazmidowe – plazmidowe wektory ekspresyjne (system niewirusowy). Preparat genowy przypomina układ klasycznego leku w klasycznej farmakoterapii: DNA – terapeutyczny gen wydaje się być „substancją czynną” zaś wektor jest jej nośnikiem. Wektor plazmidowy pełni funkcję ochronną wobec wprowadzanego genu, a przede wszystkim umożliwia wnikanie genu do tkanek i warunkuje jego ekspresję. Preparaty plazmidowe najczęściej uzyskuje się metodą lizy alkalicznej transformowanych bakterii *Escherichia coli*, a do oczyszczania wykorzystuje się metody chromatograficzne. Wektory przeznaczone do prób klinicznych muszą być wytwarzane w warunkach aseptycznych, zgodnie z wymogami GMP. Uzyskane preparaty poddaje się badaniom *in vitro*, jak i *in vivo* – wykonywane są badania, których celem jest określenie jakości preparatu, jego czystości i aktywności biologicznej. Produkty farmakopealne mogą być wykorzystane w warunkach klinicznych. Z udziałem ekspresyjnych plazmidów przeprowadzanych jest wiele badań eksperymentalnych i klinicznych terapii genowych. Wektory plazmidowe wprowadza się do tkanek prawidłowych, ale i również, np. do guzów nowotworowych. Wklonowane w plazmidach geny kodują białka o charakterze terapeutycznym, które decydują o efekcie leczniczym. Najwięcej prowadzonych badań dotyczy chorób nowotworowych. W terapii nowotworów wykorzystuje się głównie geny, których białkowe produkty wykazują aktywność przeciwnowotworową poprzez efekt immunomodulujący, proapoptotyczny i antyangiogeny.

Słowa kluczowe: wektory plazmidowe, terapia genowa, nowotwory.

Preparaty plazmidowe w terapii genowej

Plasmid preparations in gene therapy

Maciej Małecki

Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Warszawie

WPROWADZENIE

Terapia genowa jest nową metodą leczenia chorób, znaną w klinice od ponad 10 lat [1]. Mimo że jest to strategia wynikająca z osiągnięć najnowszych metod badawczych w naukach biologicznych – z inżynierii genetycznej, to jednak pewne jej elementy są wspólne i podobne do tych, jakie spotyka się w standardowych metodach terapeutycznych, np. w farmakoterapii. Większość preparatów leczniczych klasycznej farmakoterapii jest zbudowana na zasadzie substancja czynna/nośnik. Połączenie tych dwóch faz wnoszą określoną postać leku, która ma swoiste właściwości terapeutyczne i farmakokinetyczne. Jak dotychczas liczba postaci leków jest ogromna – od prostych układów roztworów leczniczych, maści, proszków, czopków – do bardziej wyszukanych – tabletek wielofazowych czy systemów terapeutycznych [2]. Charakteryzując terapię genową można dostrzec, iż ten typ leczenia również (najczęściej) opiera się na wykorzystaniu układu substancja czynna/nośnik. W przypadku terapii genowej *substancją czynną* jest DNA – gen kodujący terapeutyczne białko, zaś nośnikiem jest wektor, np. plazmid, wirus. System transferu genów opiera się na wykorzystaniu układu nośnika, który nie tylko ułatwia, umożliwia wnikanie genów do docelowych tkanek,

narządów, ale również warunkuje i jest zazwyczaj niezbędny do ekspresji terapeutycznych genów w miejscach transfekcji [3, 4]. Analogicznie do standardowych postaci leków, nośniki genów pełnią również funkcję ochronną dla genów terapeutycznych (substancji czynnych). Jak dotychczas system nośników genów zasadniczo dzieli się na wirusowy i niewirusowy. Nierzadko wyodrębnia się grupy tzw. inteligentnych nośników genów [5]. Dotyczą one przede wszystkim transferu genów w systemie niewirusowym. W fazie badań są, np. układy, w których geny terapeutyczne uwalniane są z systemu nośnikowego w odpowiedzi na określone pH środowiska, temperaturę czy światło [5, 6]. W transferze genów za pomocą wirusów wykorzystuje się głównie metody oparte na retrowirusach, adenowirusach czy wirusach związanych z adenowirusami (AAV) [7]. Jest to bardzo wydajny system przenoszenia genów i większość prób klinicznych jest oparta na tym systemie (ryc. 1.). Próby kliniczne (i wiele badań eksperymentalnych) są prowadzone również w oparciu o system niewirusowy, który obejmuje zarówno metody oparte na bezpośrednim transferze tzw. nagiego DNA (np. plazmidowego), jak i na wprowadzaniu materiału genetycznego połączonego z nośnikiem, np. lipidowym. W obu przypadkach nie-

Plasmid vectors are commonly used preparations in gene therapy trials. Over 20% of all clinical trials were performed with plasmids (non-viral system). Gene preparations very often look like a standard drug product described in classical pharmacology. DNA, a therapeutic gene, seems to be an active substance of the drug and the vector is a carrier of the therapeutic gene. Plasmid vector allows for the efficient transfer and expression of genes. Gene therapy plasmid production is not different from the production of other vectors. Generally, the plasmid preparations are isolated from transformed Escherichia coli bacteria in the basic conditions, and the chromatography methods are very useful for further efficient purification of the plasmid vectors. The clinical product must be manufactured in compliance with GMP in facilities authorized by national regulatory agencies. The quality of the isolated plasmid must be determined in various biochemical, microbiological, toxicological and pharmacological analysis performed in vitro as well as in vivo. Clinical grade plasmid preparation can be used in the clinical conditions only. Plasmid preparations are widely used in gene therapy applications. Cancer gene therapy as well the classical gene therapy – correction of genetic defects – require plasmids. In the cancer gene therapy very often the immunostimulatory, proapoptotic and antiangiogenic genes are cloned into vectors and transfected in vivo.

Key words: plasmid vectors, gene therapy, cancer.

zbędne jest przygotowanie genu terapeutycznego, czyli klonowanie wektora ekspresyjnego. Metody niewirusowe budzą duże zainteresowanie, z uwagi na bezpieczeństwo ich stosowania w klinice i stosunkowo niski koszt preparatyki.

PLAZMIDY

Plazmidy, wg definicji dostępnych w źródłach akademickich, to koliste cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji w komórkach gospodarza – niezależnej od replikacji chromosomów [8–10]. Plazmidy są elementami genetycznymi naturalnie występującymi, np. w bakteriach, grzybach. Przyjmuje się, że naturalne plazmidy nie niosą genów metabolizmu podstawowego mikroorganizmów. Ich obecność warunkuje określone cechy funkcjonalno-fenotypowe gospodarza, które nierzadko stanowią o atrakcyjności biologicznej, ekologicznej mikroorganizmu. Są to najczęściej: oporność na chemiczne substancje toksyczne środowiska (w tym również i antybiotyki), oporność na promieniowanie ultrafioletowe, zdolność do degradacji zanieczyszczeń środowiskowych, zdolność, np. do wiązania azotu atmosferycznego [9–11]. Plazmidy są małymi elementami pozachromosomowymi, z reguły są to cząsteczki koliste, zbudowane z dwuniciowego DNA. Wielkość naturalnych plazmidów mieści się w zakresie od 200 do 100 000 pz, zaś wielkość konstruowanych metodami inżynierii genetycznej rekombinowanych wektorów plazmidowych wynosi na ogół ok. 10 000 pz [12]. Dla potrzeb inżynierii genetycznej dzieli się plazmidy na nieekspresyjne i ekspresyjne, czyli umożliwiające ekspresję wklonowanego do wektora genu. W terapii genowej wykorzystywane są plazmidy ekspresyjne. Pozwalają one na otrzymanie dużych ilości mRNA kodującego białko terapeutyczne. Plazmidy ekspresyjne zawierają kasetę ekspresyjną. Podstawowe elementy kasety ekspresyj-

nej to promotor – sekwencja DNA wektora rozpoznawana przez polimerazę RNA komórki gospodarza i umożliwiająca transkrypcję wklonowanego genu. Promotor jest elementem plazmidu, który w sposób bezpośredni warunkuje jego skuteczność w warunkach *in vivo*. Najczęściej w rekombinowanych wektorach stosuje się silne promotory pochodzenia wirusowego, np. CMV, SV40, LTR, bakteriofagowego, np. SP6, T7. Wśród promotorów często wyróżnia się promotory specyficzne tkankowo (np. tyrokinazowy; melanocyty), indukowane (np. przez hipoksję), selektywne dla nowotworów (np. alfa-fetoproteinowy; guzy wątroby) oraz regulowane (np. przez cykl komórkowy; komórki proliferujące) [13]. Wektor ekspresyjny to również: 1) terminująca kasetę ekspresyjną sekwencja poliadenylacji – stabilizująca powstałe mRNA i chroniąca przed komórkowymi nukleazami; 2) silne bakteryjne bądź wirusowe replikony, umożliwiające wysokokopijną replikację wektora w komórkach bakteryjnych; najczęściej wykorzystywane replikony to: Cal EI, pMB1, SV40; 3) sekwencje markerowe – bardzo często są to geny oporności na antybiotyki, cytostatyki (np. geny oporności na ampicylinę, neomycynę, chloramfenikol, tetracyklinę, bleomycynę) lub geny, których produkty białkowe mają właściwości fluorescencji pod wpływem światła (GFP, RFP) [14]. Obecność sekwencji markerowych umożliwia przeprowadzenie selekcji transformowanych klonów prokariotycznych (bakteryjnych) lub stransfekowanych klonów eukariotycznych. Elementy markerowe wektorów plazmidowych to również elementy, które ułatwiają analizy biochemiczne, molekularne białek powstałych na matrycy klonowanych genów. Metodami, np. chromatograficznymi, technikami hybrydacyjnymi można analizować powstałe białka. Wektory takie zawierają rozpoznawalne przez określone przeciwciała fragmenty

białek komórkowych (np. myc) lub zupełnie syntetyczne krótkie peptydy, np. powtórzenia histydyn umożliwiające analizę rekombinowanego białka, np. na kolumnach niklowych. Wektory ekspresyjne mogą być również wyposażone w sekwencje, które dodatkowo wpływają, np. na sekrecję syntetyzowanych białek – np. sekwencje sygnałowe (np. Igk) lub sekwencje kodujące białka wirusowe, ułatwiające translokację ekspresowanych białek poza komórkę i do sąsiednich komórek (np. VP22) [15].

W zależności od liczby klonowanych genów wektory ekspresyjne można dzielić na monocistronowe i policistronowe. W wektorach policistronowych zawarte są najczęściej sekwencje łącznikowe (np. IRES, AP1), które umożliwiają powstanie kilku białek na matrycy jednego mRNA [16]. Oprócz opisanych podstawowych elementów budulcowych konstrukty nowszych generacji zawierają różne elementy o charakterze regulacyjnym, które zwiększają ekspresję klonowanych genów, stabilizują powstałe transkrypty, np. sekwencja WPRE stabilizująca powstałe transkrypty mRNA [17]. Bardzo często nowo klonowane wektory plazmidowe mają zminimalizowaną liczbę immunostymulujących dinukleotydów CpG [18-20].

PLAZMIDY – UZYSKIWANIE

Preparaty plazmidowe wykorzystywane w próbach terapii genowej najczęściej otrzymuje się z bakterii *Escherichia coli* wcześniej transformowanych badanym wektorem. Markery selekcyjne plazmidów pozwalają na selekcję klonów i uzyskiwanie pożądanego preparatu. W zależności od charakteru badań i przeznaczenia wektora skala uzyskiwania plazmidów i związane z nią procedury preparatyki mogą się różnić, choć można omawiać charakterystyczne etapy wspólne. W tab. 1. przedstawiono zakresy produkcji plazmidów i ich przeznaczenie. Więk-

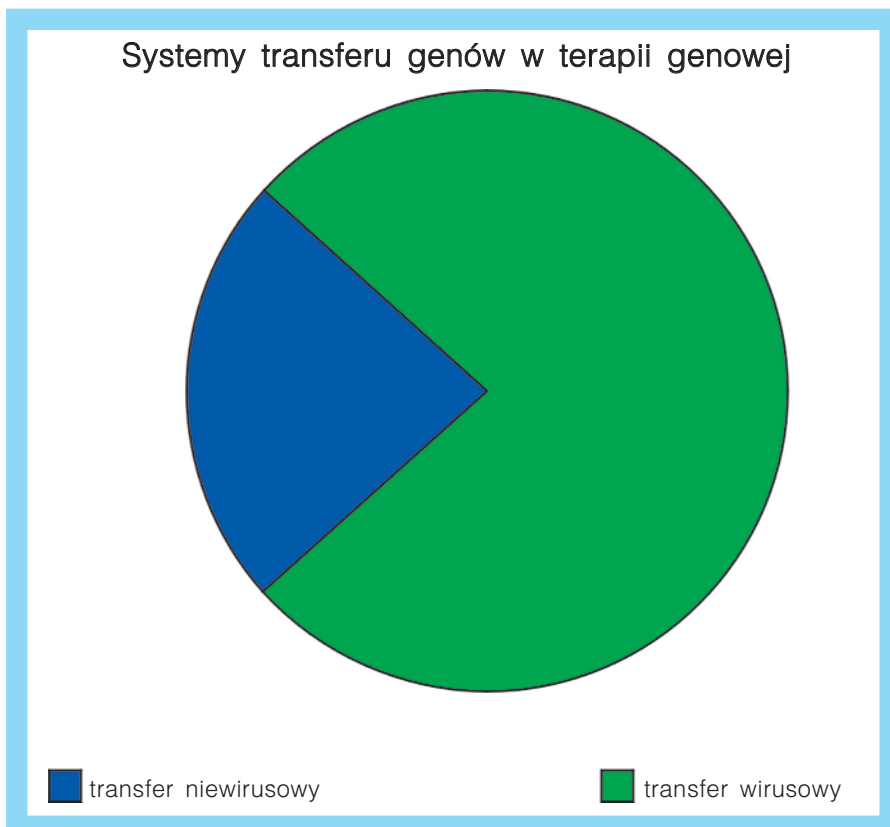
Tab. 1. Przybliżona skala produkcji plazmidów [12, zmienione]
Table 1. Approximate plasmid production scale [12, modified]

Produkcja genowych preparatów plazmidowych	
ilość	przeznaczenie
0,01–10 mg	badania eksperymentalne
10–100 mg	przedkliniczne badania na zwierzętach
100–1 000 mg	faza I-II
1–5 g	faza III
>? g	dostępność komercyjna

Tab. 2. Preparaty genowe przeznaczone do prób klinicznych terapii genowej – dyrektywy Unii Europejskiej [23]
Table 2. Gene therapy products - European Union directives [23]

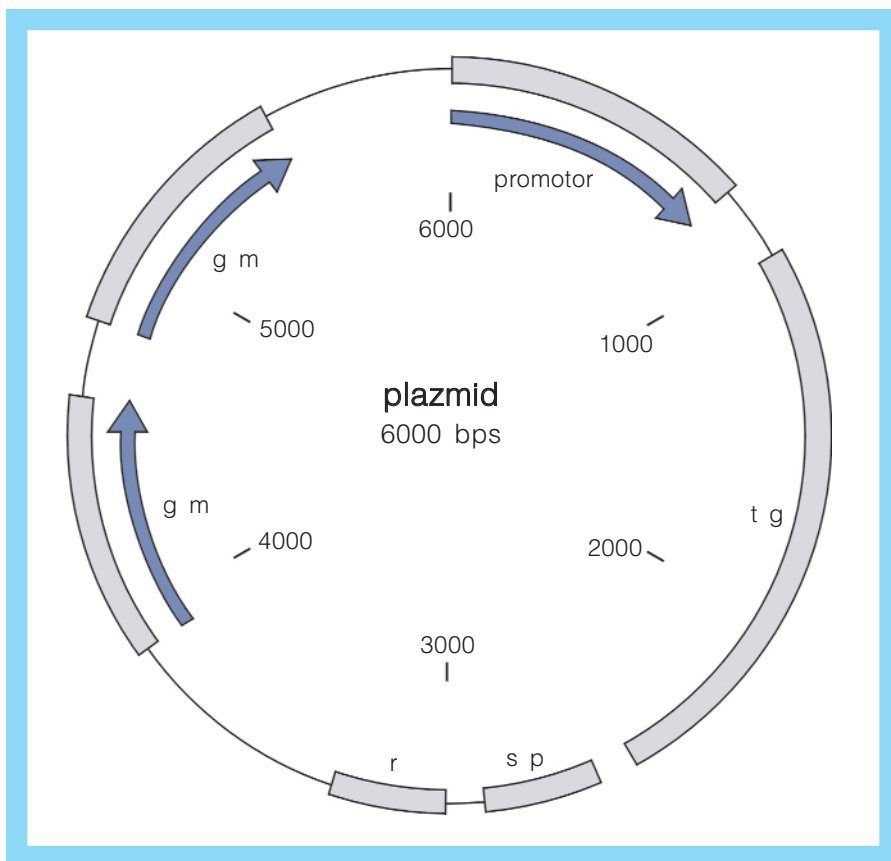
Unia Europejska wobec preparatów przeznaczonych do prób klinicznych terapii genowej (<i>Clinical Trials Directives</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • Wszystkie próby kliniczne (fazy I, II, III) w Unii Europejskiej muszą być zatwierdzone przez odpowiednie organy prawa i wykonane zgodnie z zasadami GCP. • Materiał kliniczny (produkt leczniczy) musi być przygotowany zgodnie z zasadami GMP, w pracowniach do wytwarzania zatwierdzonych przez odpowiednie organy prawa. • Materiał kliniczny (produkt leczniczy) importowany spoza Unii Europejskiej musi być wytwarzany zgodnie z wymogami GMP. • Produkt leczniczy do prób klinicznych musi być wprowadzany do użytku przez osoby do tego celu wykwalifikowane.

Systemy transferu genów w terapii genowej



Ryc. 1. Systemy transferu genów wykorzystywane w próbach terapii genowej na świecie [1]. W ponad 20 proc. wszystkich prób klinicznych na świecie geny wprowadza się za pomocą wektorów plazmidowych (system niewirusowy)

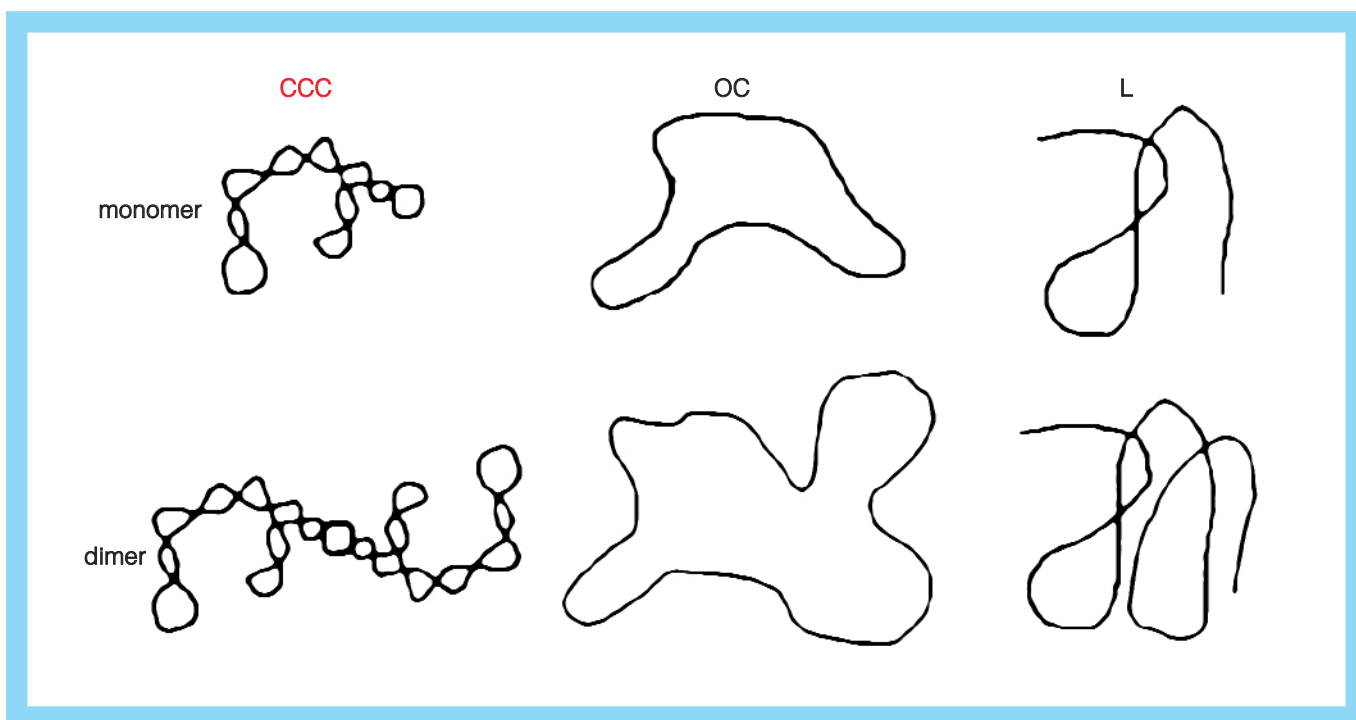
Fig. 1. Gene transfer systems used in gene therapy trials worldwide [1]. In over 20% of all clinical trials genes are transferred by plasmid vectors (non-viral system)



Ryc. 2. Schemat budowy ekspresyjnego wektora plazmidowego. Plazmid ekspresyjny zawiera kasetę ekspresyjną (promotor, gen terapeutyczny, sekwencja poliadenylacji) oraz geny markerowe. t g – terapeutyczny gen; s p – sekwencja poliadenylacji; r – replikon; g m – gen markerowy

Fig. 2. Schematic map of expression plasmid vector. The expression plasmid mainly contains expression cassette and marker genes. t g – therapeutic gene; s p – polyadenylation sequence; r – replicon; g m – marker gene

szkość procedur izolacji plazmidów z bakterii wykorzystuje metodę lizy bakterii w warunkach alkalicznych, precypitację w środowisku kwaśnym i dalsze etapy izolacji/oczyszczania zależne od skali produkcji. Najnowsze systemy izolacji/oczyszczania plazmidów opierają się na metodach chromatograficznych. W przypadku preparatyki plazmidów ważnym podkreślenia jest, że istnieją różne formy topologiczne plazmidów (ryc. 3.), a ich występowanie wiąże się przede wszystkim z jakością procedury izolacji. Postacią najbardziej oczekiwaną (o najwyższej aktywności biologicznej) jest postać superzwinięta, czyli dwuniciowa, kowalentnie zamknięta forma *ccc* (ang. *covalently closed circular*; ryc. 3.). Oprócz *ccc* w preparatach plazmidowych mogą być obecne formy *oc* (ang. *open circular*), *l* (ang. *linear form*). Postacie *ccc*, *oc*, jak i *l* mogą ponadto występować w formie nie tylko monomerów, ale również i dimerów, multimerów [21, 22]. Jakość preparatu (utożsamiana



Ryc. 3. Postacie topologiczne plazmidów. CCC – forma superzwinięta – dwuniciowa, kowalentnie zamknięta; OC – forma częściowo otwarta; L – forma linearna [21, zmienione]

Fig. 3. Topology variants of plasmids. CCC – supercoiled – double stranded, covalently closed circular; OC – open circular variant; L – linear form [21, modified]

z procentem formy *ccc*) jest bezpośrednio zależna od przebiegu procedury izolacji plazmidu.

GMP I PREPARATY PLAZMIDOWE

Preparaty plazmidowe, jak i wszystkie inne preparaty wykorzystywane w próbach klinicznych terapii genowej (plazmidy, wirusy, komórki) wg wytycznych Unii Europejskiej muszą być wytwarzane zgodnie z zasadami dobrej praktyki wytwarzania GMP (ang. *Good Manufacturing Practice*) (tab. 2.). Postępowanie GMP obejmuje zarówno procesy wytwarzania plazmidów, jak i ich pakowania, przechowywania, transportu i sprawdzania jakości. Preparaty plazmidowe przygotowane do prób klinicznych muszą posiadać pełną dokumentację, uwzględniającą wyniki szeregu badań biochemicznych, mikrobiologicznych, toksykologicznych, farmakokinetycznych, prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i na zwierzętach laboratoryjnych [23]. Podstawowe badania, którym poddaje się preparaty plazmidowe, zebrano w tab. 3. Ścisła charakterystyka jakości i czystości otrzymanego preparatu plazmidowego jest niezbędna do jego wykorzystania w warunkach klinicznych. Wpływa ona nie tylko na efektywność terapeutyczną badanego preparatu, ale również, a może przede wszystkim, na bezpieczeństwo jego stosowania u pacjentów.

PLAZMIDY W BADANIACH EKSPERYMENTALNYCH

Plazmidy są preparatami genowymi, które wykorzystuje się w próbach terapii genowej bardzo szeroko. Zarówno wirusowy, jak i niewirusowy system transferu genów operuje plazmidami [3, 24, 25]. W przypadku strategii wirusowej plazmidy niezbędne są do otrzymania rekombinowanych wektorów wirusowych. Są one nośnikami genów wirusowych, które dalej składane są w rekombinowane

Tab. 3. Preparaty plazmidowe przeznaczone do prób klinicznych terapii genowej – badania podstawowe.

Table 3. Clinical plasmid preparations – quality control

Plazmidy: badania przedkliniczne <i>in vitro</i> i na zwierzętach	
<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
stężenie DNA	toksykologia
ogólna czystość	farmakokinetyka
homogenność	aktywność biologiczna/efekt terapeutyczny
tożsamość	
czystość biochemiczna	
czystość mikrobiologiczna	
stabilność	
aktywność biologiczna	

cząstki wirusowe, najczęściej w systemie eukariotycznych komórek pakujących. W systemie niewirusowym plazmidy podaje się w postaci nagiego DNA w roztworze, np. soli fizjologicznej lub nierzadko łączy się z nośnikami, np. lipidowymi (kationowe lipidy), które ułatwiają wnikanie plazmidowego DNA do komórek w warunkach *in vitro* i *in vivo* [26, 27]. Preparaty plazmidowe wykorzystywane się w próbach terapii genowej bezpośrednio – nagi DNA plazmidowy wprowadza się bezpośrednio do określonej tkanki, narządu. Przykładem takiej strategii jest terapia genowa, wykorzystująca geny terapeutyczne, których białkowe produkty mają charakter angiogeny (angiogenna terapia genowa) [28]. Plazmidy proangiogenne (koduujące np. VEGF, HGF) wprowadza się bezpośrednio w miejsce niedokrwionej tkanki na drodze iniekcji roztworu plazmidowego DNA. Badania kliniczne wskazują, iż transfer plazmidów angiogennych, np. w obszar niedokrwionej kończyny czy serca, wymusza powstawanie sieci nowych naczyń krwionośnych, poprawia przepływ krwi i stan kliniczny pacjenta [28, 29]. Wskazuje się, że strategia angiogennej terapii genowej może być skuteczna w klinice oraz że transfer nagiego DNA do tkanki wydaje się być efektywną drogą podania preparatu genowego. Niemniej jednak warto podkreślić, iż mimo pozytywnych efektów lecze-

nia nagimi plazmidami skuteczność terapeutyczna tych samych genów w nośnikach wirusowych jest znacznie wyższa. Jednak względy większego bezpieczeństwa stosowania plazmidów nad rekombinowanymi wektorami wirusowymi sprawia, że preparaty plazmidowe mają w określonych stanach chorobowych cenną wartość terapeutyczną [28].

Znane są próby terapii genowej chorób nowotworowych za pomocą transferu nagiego DNA [3, 24]. W badaniach wykorzystuje się strategię bezpośredniej iniekcji preparatów do guzów nowotworowych, bądź wprowadza się plazmidy np. do tkanki mięśniowej, traktując stransfekowane wówczas mięśnie jako potencjalne bioreaktory białek terapeutycznych. W pierwszym przypadku (bezpośrednie podanie do guza) obserwuje się z reguły niewielki efekt terapeutyczny, głównie z uwagi na niską efektywność transferu genów i ograniczoną do miejsca podania ekspresję białka terapeutycznego [24]. Wzrost guzów mysiego mięsaka (L1) traktowanych plazmidowym konstruktem kodującym inhibitor angiogenezy – sFLT-1 jest zahamowany o ok. 20–30 proc. w porównaniu do grupy kontrolnej [30]. Natomiast dość skutecznym wydaje się być podanie *i.m.* plazmidów kodujących terapeutyczne białka o aktywności systemowej. Po transfekcji tkanki mięśniowej plazmidem obserwuje się efekt systemowy – wzrost terapeutycznego białka

we krwi i ograniczenie wzrostu guzów nowotworowych, zlokalizowanych z dala od miejsca podania [24, 31].

Stransfekowane mięśnie wydają się być doskonałym bioreaktorem terapeutycznych białek nie tylko bezpośrednio o charakterze antynowotworowym. Znane są również próby skutecznego *i.m.* transferu genów kodujących, np. białka układu hemostazy [32], czy genów kodujących białka biorące udział w regulacji gospodarki węglowodanowej ustroju (insulina, glukokortykoidy) [33, 34].

Transfer nagiego plazmidowego DNA to również wiele badań, dotyczących prób modulowania odpowiedzi immunologiczną ustroju na antygeny, czyli badania nad szczepionkami, np. antynowotworowymi [35], antyinfekcyjnymi (np. przeciw grypie, WZW, wściekliznie, gruźlicy) [36]. Plazmidy kodujące fragmenty białek o charakterze antygenów. wprowadza się, np. do mięśni szkieletowych, skóry w celu immunizacji ustroju.

Transfer nagiego DNA plazmidowego do tkanek to nie tylko próby wprowadzania plazmidów jedynie na drodze iniekcji. Szereg badań wskazuje, że efekt transfekcji może być bardzo efektywnie wzmocniony przez zwiększającą chwilowo przepuszczalność błon komórkowych napięcie elektryczne, czyli zastosowanie elektrotransferu. Mimo że tradycyjnie elektrotransfer przeprowadza się przez przyłożenie elektrod do tkanki uprzednio ostrzykniętej plazmidem, to znane są również próby, w których elektropuls przeprowadza się po systemowym (*i.v.*) podaniu wektora plazmidowego. W badaniach Liu i Huanga [37] wykazano, iż elektropulsy przyłożone bezpośrednio do wątroby efektywnie zwiększają transfer genów reporterowych wprowadzonych do zwierząt systemowo w postaci nagiego plazmidowego DNA. Próby wykorzystania metody elektrotransferu *in vivo* w terapii ge-

nowej stają się coraz bardziej dokumentowane i wskazują, że metoda skutecznie podnosi efektywność transferu i ekspresji genów zarówno reporterowych, jak i terapeutycznych do wielu tkanek, np. do skóry, mięśni, wątroby [38, 39]. Również nierzadko wskazuje się, iż elektrotransfer *in vivo* nagiego DNA może służyć wprowadzaniu genów terapeutycznych bezpośrednio do guzów nowotworowych. W badaniach, np. Hellera i Coppoli [40] wykazano, że elektrotransfer jest wysoce skutecznym sposobem transferu genów do guzów B16 u myszy. Zastosowanie elektropulsów zwiększało nawet kilkudziesięciokrotnie transfer i ekspresję genów reporterowych w guzach nowotworowych. Do komórek czerniaka efektywnie wprowadzano drogą elektrotransferu również geny terapeutyczne, np. IL12, IL18, prowadząc do ograniczenia wzrostu guzów [41]. W badaniach Cichonia i wsp. [31] wykazano, iż elektrotransfer jest efektywną metodą transferu genów zarówno do prawidłowych tkanek, jak i do guzów nowotworowych (B16/F10/). Wykorzystując elektrotransfer *in vivo*, autorzy wykazali zwiększoną skuteczność terapii antyangiogennej (konstrukt plazmidowy kodujący endostatynę) [31]. Yamashita i wsp. [42] natomiast wykazali, że po elektrotransferze genu IL12 dochodzi do ograniczenia wzrostu raka wątroby (badania przeprowadzono na podskórnie zaszczepionych guzach). Podobne wyniki otrzymano również w badaniach dotyczących raka jelita grubego [43]. Wprowadzanie nagiego plazmidowego DNA kodującego IL12 bezpośrednio do guzów na zasadzie iniekcja/elektroporacja efektywnie ograniczało ich wzrost [43].

PODSUMOWANIE

Terapia genowa jest dynamicznie rozwijającą się metodą leczenia wielu chorób. Ograniczone zastosowanie, jak dotąd, metod transferu

genów w terapii wynika przede wszystkim z ułomności nośników terapeutycznych genów – wektorów. Plazmidy mogą efektywnie wprowadzać geny do określonych tkanek, decydując tym samym o efekcie terapeutycznym. Odpowiednio przygotowane – zgodnie z wymogami farmakopealnymi – preparaty plazmidowe kodujące białka terapeutyczne mogą być traktowane jako nowa postać leku, w której *substancją czynną* jest gen. Preparaty plazmidowe jako nowe leki muszą spełniać wiele wymogów, przede wszystkim bezpieczeństwa. Wiąże się to z koniecznością przeprowadzenia szeregu badań biochemicznych, toksykologicznych i farmakokinetycznych przed przystąpieniem do prób klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. The Journal of Gene Medicine, www.wiley.co.uk
2. Janicki S, Fiebig A (red). *Farmacja stosowana*. PZWL 2001.
3. Greco O, Scott SD, Marples B, Dachs GU. *Cancer gene therapy: delivery, delivery, delivery*. Front Biosci 2002; 7: d1516-24.
4. Jain RK. *The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics*. Nature Med 1998; 4: 655-7.
5. Dincer S, Turk M, Cimen E, et al. *Gene delivery with stimuli-responsive polymers. 3rd European Conference & Practical Course: Advanced Methods for Industrial Production, Purification, and Characterization of Gene Vectors*. Evry, France 2004. Conference Book: p. 18.
6. Dincer S, Tuncel A, Piskin E. *A potential gene delivery vector: N-isopropylacrylamide-ethyleneimine block copolymers*. Macromol Chem Phys 2002; 203: 1460-5.
7. Małecki M. *Wirusowe strategie w terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (AAV)*. Postępy Biol Komórki 2004; 31: 47-57.
8. Kur J. *Podstawy inżynierii genetycznej*. Politechnika Gdańska 1994.
9. Turner PC, McLennan AG, Bates AD i wsp. *Biologia molekularna*. PWN, Warszawa 1999.
10. Węgleński P (red.). *Genetyka molekularna*. PWN, Warszawa 1995.

11. Bartosik D. *Stabilność plazmidów bakteryjnych*. Postępy Biochem 2001; 47: 138-45.
12. Lemmens R. *RNase free purification process for supercoiled plasmid DNA*. 3rd European Conference & Practical Course Advanced Methods for Industrial Production, Purification, and Characterization of Gene Vectors. Evry, France 2004. Conference Book.
13. Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R. *Gene therapy designer promoters for tumour targeting*. TIG 2000; 16: 174-81.
14. Śliwińska E. *Białko zielonej fluorescencji (GFP) – ekologiczny marker transformacji genetycznej i narzędzie do obserwacji procesów w żywej komórce*. Biotechnologia 2002; 56: 129-35.
15. Elliot G, O'Hare P. *Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins*. Gene Ther 1999; 6: 149-51.
16. Vagner S, Galy B, Pironnet S. *Irresistible IRES*. EMBO reports 2001; 21: 893-8.
17. Johansen J, Tornoe J, Moller A, Johansen TE. *Increased in vitro and in vivo transgene expression levels mediated through cis-acting elements*. J Gene Med 2003; 5: 1080-9.
18. Krieg AM, Davis HL. *Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA*. Curr Opin Mol Ther 2001; 3: 15-24.
19. Reyes-Sandoval A, Ertl HCJ. *CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses*. Mol Ther 2004; 9: 249-61.
20. Bird AP. *CpG rich islands and the function of DNA methylation*. Nature 1986; 321: 209-13.
21. Schleef M, Schmidt T. *Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications*. J Gene Med 2004; 6: S45-53.
22. Friehs K. *Plasmid copy number and plasmid stability*. Adv Biochem Engin/Biotechnol 2004; 86: 47-82.
23. Wisner M. *GMP production and quality control for gene therapy products*. 3rd European Conference & Practical Course: Advanced Methods for Industrial Production, Purification, and Characterization of Gene Vectors. Evry, France 2004. Conference Book.
24. Herwijer H, Wolff JA. *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy*. Gene Ther 2003; 10: 453-8.
25. Nabel GJ. *Development of optimized vectors for gene therapy*. Proc Nat Acad Sci USA 1999; 96: 324-6.
26. Templeton NS. *Liposomal delivery of nucleic acids in vivo*. DNA Cell Biol 2002; 21: 857-67.
27. Langner M. *Liposomowe nośniki materiału genetycznego*. Postępy Biochem 1998; 44: 299-305.
28. Yla-Herttuala S, Alitalo K. *Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth*. Nat Med 2003; 9: 694-99.
29. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, et al. *Gene therapy of coronary artery disease with phveg165 – early outcome*. Kardiol Pol 2003; 59: 373-84.
30. Małecki M, Jastrzębski Z, Przybyszewska M i wsp. *Antyangiogenna terapia genowa: próby wykorzystania rozpuszczalnej formy receptora FLT-1*. Adv Clin Exp Med 2004; 13: 227-33.
31. Cichoń T, Jamroz L, Glogowska J, et al. *Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: inhibition of primary tumor growth and metastatic spread*. Cancer Gene Ther 2002; 9: 771-7.
32. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. *Gene therapy for the hemophilias*. J Thromb Haemost 2003; 1: 1550-8.
33. Gros L, Riu E, Montoliu L, et al. *Insulin production by engineered muscle cells*. Hum Gene Ther 1999; 10: 1207-17.
34. Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, et al. *Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia*. Hum Gene Ther 2000; 11: 1543-52.
35. Kowalczyk DW, Wysocki PJ, Mackiewicz A. *Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes*. Acta Biochem Pol 2003; 50: 613-24.
36. Gendaszewska E. *Szczepionki DNA*. Postępy Biochem 1998; 44: 117-23.
37. Liu F, Huang L. *Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA*. Gene Ther 2002; 9: 1116-9.
38. Heller L, Lucas ML. *Delivery of plasmid DNA by in vivo electroporation*. Gene Ther Biol 2000; 5: 50-5.
39. Gollins H, McMahon J, Wells KE, et al. *High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle*. Gene Ther 2003; 10: 504-12.
40. Heller L, Coppola D. *Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumor effect*. Gene Ther 2002; 9: 1321-5.
41. Kishida T, Asada H, Satoh E, et al. *In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice*. Gene Ther 2001; 8: 1234-40.
42. Yamashita YI, Shimada M, Hasegawa H, et al. *Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model*. Cancer Res 2001; 61: 1005-12.
43. Tamura T, Nishi T, Goto T, et al. *Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer*. Hum Gene Ther 2001; 12: 1265-76.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Maciej Małecki**
 Zakład Biologii Komórki
 Centrum Onkologii – Instytut
 im. Marii Skłodowskiej-Curie
 ul. Roentgena 5
 02-781 Warszawa
 tel. +48 22 546 26 21
 e-mail: mahan@poczta.wp.pl