



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ: ΥΠΕΡ & ΚΑΤΑ, ΠΡΟ-ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ
ΔΟΚΙΜΕΣ»

ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΠΑΝΤΟΠΙΚΟΥ
ΠΤΥΧΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ ,2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ασπασία Τσέζου..... (Επιβλέπουσα)
Βασιλική Γκρέτση..... (Συνεπιβλέπουσα)
Μαρία Τζέτη..... (Συνεπιβλέπουσα)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.α Προβλήματα με υπάρχουσες θεραπείες.....	11
2.ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	12
2.α Γιατί γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο.....	13
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	14
3.1 Βιολογικοί μέθοδοι.....	14
3.1.α Ιικοί φορείς.....	14
3.1.α.i DNA- ιοί.....	14
3.1.α.ii RNA-ιοί.....	20
3.1.β Μη ιικοί φορείς.....	22
3.1.γ Παρεμβολή RNA (RNAi).....	24
3.1.γ.i micro RNAs (miRNAs).....	26
3.2. Χημικές μέθοδοι.....	29
3.2.α Πολυμερή, Λιποσώματα, Πεπτίδια.....	29
3.3 Φυσικές μέθοδοι.....	29
3.3.α Ηλεκτροπόρωση.....	29
3.3.β Γονίδιο όπλο («gene gun»).....	30
3.3.γ Μαγνητικά νανοσωματίδια.....	30
3.3.δ Μικροέγχυση.....	31
3.3.ε Υπέρηχοι.....	31
4 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	32
4.1.α Μονοπάτια επιδιόρθωσης.....	33
4.1.β Μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση.....	34
4.1.γ Μονοπάτια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση.....	36
4.2 Διόρθωση γονιδίου.....	39
4.3 Ογκολυτική ιοθεραπεία.....	40
4.4 Μοριακή χημειοθεραπεία.....	41
4.4.α Δεαμινάση της κυτοσίνης/ 5- φλουοκυτοσίνη.....	42
4.4.β Κινάση της θυμιδίνης (TK)/ ganciclovir.....	44

4.5 Ανοσορύθμιση.....	45
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Βασιλική Γκρέτση Ερευνήτρια Γ' Ε.Κ.Ε.Τ.Α και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας για την πολύτιμη βοήθεια της, τις συμβουλές και την υπομονή της. Χωρίς την συμβολή της δεν θα είχε ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα σε Ευρώπη και Αμερική και είναι υπεύθυνός για το θάνατο περισσότερο από 8 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι μία πολυπαραγοντική νόσος που ξεκινά από τον μετασχηματισμό ενός μόνο κυττάρου και χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, διήθηση και μετάσταση, ενώ περιλαμβάνει πολλά στάδια εξέλιξης. Οι βασικές θεραπείες για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι η αφαίρεση των όγκων με χειρουργική επέμβαση και ακολούθως ακτινοθεραπεία ή/και διάφορα σχήματα χημειοθεραπείας, πάντα ανάλογα με το στάδιο της νόσου και το είδος του όγκου. Ωστόσο οι έντονες παρενέργειες που προκαλεί η μη στοχευμένη δράση καθώς και η αντίσταση που εμφανίζουν πολύ συχνά τα καρκινικά κύτταρα στις θεραπείες αυτές (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία), καθιστούν επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής μίας διαφορετικής, αποτελεσματικής θεραπείας που θα δρα στοχευμένα και επιλεκτικά μόνο στα κύτταρα του όγκου. Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μία τέτοια προσέγγιση καθώς στοχεύει στην διόρθωση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν απορυθμιστεί στον καρκίνο με την μεταφορά των κατάλληλων γονιδίων στα κύτταρα- στόχους. Για την επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας σημαντικό ρόλο παίζει η σωστή μεταφορά των γονιδίων είτε με ειδικούς βιολογικούς φορείς (ιούς, βακτήρια), είτε με χημικές μεθόδους (λιποσώματα, πολυμερή), με φυσικές μεθόδους (μικροέγχυση, χρήση υπερήχων, μαγνητικά νανοσωματίδια κ.α) ή με μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Για την γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο στοχεύονται κυρίως μονοπάτια της νέο- αγγειογένεσης, της επιδιόρθωσης καθώς και της απόπτωσης. Σε άλλες προσεγγίσεις γίνεται προσπάθεια επιδιόρθωσης του μεταλλαγμένου γονιδίου με εισαγωγή του φυσιολογικού αντιγράφου ή λύση των καρκινικών κυττάρων με την βοήθεια ογκολυτικών ιών, ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού ενάντια στα κύτταρα του όγκου. Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι και η εφαρμογή μοριακής χημειοθεραπείας, με χρήση προφαρμάκου που είναι τοξικό αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με γονίδια που το μετατρέπουν στην ενεργή τοξική μορφή του καθώς και στα γειτονικά κύτταρα μέσω διάχυσης (bystander effect). Μελετώντας τη βιβλιογραφία και τις πιο πρόσφατες επιστημονικές μελέτες σχετικά με πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο, μπορεί κανείς να συμπεράνει πώς αν και πολλές από τις προσεγγίσεις είναι ελπιδοφόρες, ωστόσο η γονιδιακή θεραπεία έναντι του καρκίνου έχει πολύ δρόμο ώσπου να τεθεί σε ευρεία κλινική εφαρμογή καθώς τα

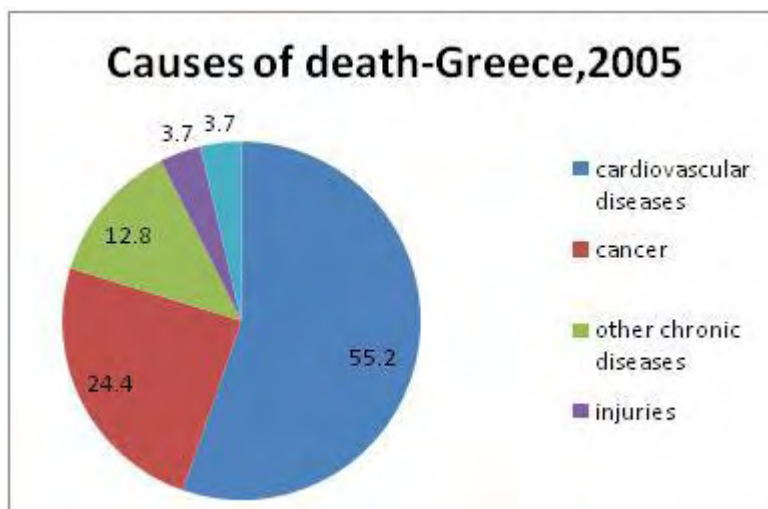
αποτελέσματα δεν είναι τόσο ενθαρρυντικά, προκύπτουν πολλές παρενέργειες, και μπορεί να φανεί αποτελεσματική σε μικρό αριθμό ασθενών με συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Επίσης, φαίνεται ότι πολλές φορές δεν είναι αποτελεσματική από μόνη της αλλά σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Επομένως, οι διεθνείς ερευνητικές προσπάθειες στον τομέα του καρκίνου πρέπει να ενταθούν με απώτερο σκοπό τη διασαφήνιση των εμπλεκόμενων στην καρκινογένεση μοριακών μηχανισμών και άρα την ανεύρεση πιο ειδικών γονιδίων-στόχων για εφαρμογή αποτελεσματικότερων πρωτοκόλλων γονιδιακής θεραπείας.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι η κύρια αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες οικονομικά χώρες και η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες (World health organization, 2008). Τα κρούσματα του αυξάνονται διαρκώς κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, ως αποτέλεσμα της γήρανσης του πληθυσμού και της υιοθέτησης ενός τρόπου ζωής που ενοχοποιείται για την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου όπως το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, και οι "δυτικού" τύπου διατροφικές συνήθειες (Ahmentin et al, 2011).

Δεδομένα από το project Globocan του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>) δείχνουν ότι το 2012 υπήρχαν παγκόσμια 14,1 εκατομμύρια νέα κρούσματα καρκίνου, 8,2 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο και 32,6 εκατομμύρια άνθρωποι που ζουν με την συγκεκριμένη νόσο. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι 57 % (8 εκατομμύρια) νέα κρούσματα, 65 % (5,3 εκατομμύρια) θάνατοι και 48% (15,6 εκατομμύρια) περιπτώσεις που έχει διαγνωστεί ο καρκίνος. Επίσης, καταγράφηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στους άντρες συγκριτικά με τις γυναίκες κατά ένα ποσοστό σχεδόν 25 %.

Στην Ελλάδα, όπως και σε όλη την Ευρώπη, ο καρκίνος είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Εικόνα 1.1). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2005, καταγράφηκαν περίπου 29.000 θάνατοι από καρκίνο, ενώ 10.000 από τις περιπτώσεις αναφέρονται σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 70 ετών (Wille, 2000).



Εικόνα1.1: Αιτίες θανάτου στην Ελλάδα για το 2005 (Wille, 2000).

Ο καρκίνος ξεκινά από τον μετασχηματισμό ενός και μόνο κυττάρου χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, διήθηση, και μετάσταση και περιλαμβάνει πολλά στάδια εξέλιξης (Shishodia et al 2003). Αυτή η δυναμική διαδικασία ενεργοποιείται από διάφορους καρκινογόνους και φλεγμονώδεις παράγοντες. Η όλη διαδικασία ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες, προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, από διάφορες κινάσες, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και την κυκλοοξυγενάση 2 (COX2) και από άλλους μοριακούς μηχανισμούς της(Shishodia et al 2003, J Wang and M. J Leonardo 2000, B. B Aggarwal and S Shishodia 2000).

Οι κλασικοί τρόποι θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου ποικίλουν ανάλογα με το είδος του καρκίνου, το στάδιο της ασθένειας και την παρουσία ή μη μεταστάσεων. Συνήθως περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση του όγκου και ένα συνδυασμό από κύκλους ακτινοθεραπείας-χημειοθεραπείας. Αυτές οι θεραπείες , όταν εφαρμόζονται είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό, μπορούν να επηρεάσουν και να καταστείλουν την ανάπτυξη του όγκου, ακόμα και να θεραπεύσουν . Για πολλούς στερεούς όγκους , όπως στον καρκίνο του παχέως εντέρου, οι βελτιωμένες μέθοδοι για έγκαιρη διάγνωση και ο συνδυασμός θεραπειών έχουν αυξήσει σημαντικά τον μέσο όρο επιβίωσης των ασθενών .

Ωστόσο, όταν ο όγκος έχει κάνει μετάσταση , η θεραπεία γίνεται πιο περίπλοκη. Ακόμη και σε αυτές τις περιπτώσεις , οι τρέχουσες στρατηγικές θεραπείας μπορούν να παρατείνουν τον χρόνο ζωής, κάνοντας τον καρκίνο περισσότερο ένα χρόνια νόσημα. Παρόλα αυτά, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις για τους περισσότερους τύπους

καρκίνου, όπως για παράδειγμα στο γλοιοβλάστωμα , στους οποίους ο συνδυασμός της πρόωρης διάγνωσης, η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία δεν μπορούν να παρατείνουν την επιβίωση των ασθενών περισσότερο από 1 με 2 έτη (Schewach, 2009).

Χημειοθεραπεία

Η σύνθεση του DNA αποτελεί πρωταρχικό στόχο για ένα μεγάλο αριθμό χημειοθεραπευτικών στον καρκίνο, και ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών από αυτών των φαρμάκων είναι η ικανότητά τους είτε άμεσα είτε έμμεσα να προκαλέσουν βλάβες στο DNA . Η ικανότητα ωστόσο των καρκινικών κυττάρων να αντιλαμβάνονται την βλάβη και να την επιδιορθώνουν μπορεί να μετριάσει την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Τα κύτταρα περιέχουν επίσης μια σειρά από « σημεία ελέγχου » που μπορούν να διακόψουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, ως απόκριση στην παρουσία μίας DNA βλάβης, Και σε αυτή την περίπτωση ανάλογα με το πώς θα ανταποκριθεί το σημείο ελέγχου στην βλάβη του DNA που επάγεται από την χημειοθεραπεία θα διαμορφωθεί και η τοξικότητα του φαρμάκου.

Υπάρχουν πολλές κλάσεις χημειοθεραπευτικών παραγόντων που συνοπτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

α) μουστάρδες αζώτου: **αλκυλιωτικοί παράγοντες** που προσθέτουν ομάδες αλκυλίου στις βάσεις του DNA, προκαλώντας βλάβη στο DNA και οδηγώντας τελικά στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

β) **αντιμεταβολίτες (ανάλογα πουρινών και πυριμιδών)** που παρεμβαίνουν στη σύνθεση ή/και μιμούνται πρόδρομα μόρια του DNA, καταστέλλοντας την αντιγραφή ή προκαλώντας λάθη κατά την σύνθεση του DNA, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο.

γ) Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA λόγω της ικανότητάς τους να χαλαρώνουν το αρνητικά υπερελικοειδές DNA. Ως εκ τούτου , αναστολή αυτής της κατηγορίας ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα την θανάτωση των διαιρούμενων κυττάρων .

δ) Φυσικά προϊόντα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Οι αλατοχονδρίνες και E7389, μπορούν να αποτελέσουν μία νέα, σημαντική κατηγορία πιθανών φαρμάκων . Αυτές οι νέες ενώσεις παρεμβαίνουν στην δυναμική των μικροσωληνίσκων, μια διαδικασία που καθιέρωσε φάρμακα όπως την ταξόλη στην θεραπεία του καρκίνου. Οι βαριολίνες και συναφή

αλκαλοειδή είναι ενώσεις που επιτίθενται σε κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες , ένα σχετικά νέο στόχο των αντικαρκινικών φάρμακα, εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση την μεταγραφή και άλλες πτυχές της κυτταρικής ρύθμισης (Schewach, 2009).

ε) Στα μέσα της δεκαετίας το '60 ξεκίνησε η ιδέα της συνδυασμένης θεραπείας η οποία οδήγησε σε μεγάλη βελτίωση της έκβασης των ασθενών, ειδικά σε λευχαιμίες στις οποίες η χορήγηση συνδυαστικών χημειοθεραπευτικών παρείχε καλύτερα αποτελέσματα. Μέχρι και σήμερα σχεδόν όλα τα χημειοθεραπευτικά σχήματα συνεπάγονται την χρήση κοκτέιλ φαρμάκων (Schewach, 2009).

Ακτινοθεραπεία

Από την άλλη μεριά η θεραπεία με ακτινοβολία των καρκινικών κυττάρων έχει αναπτυχθεί εντυπωσιακά τα τελευταία χρόνια καθώς είναι αποτελεσματική στον τοπικό έλεγχο του όγκου και με ελάχιστη τοξικότητα στους γύρω φυσιολογικούς ιστούς, στοχεύοντας τα κύτταρα απευθείας καταστρέφοντας το DNA. Στην ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται ιονίζουσα ακτινοβολία η οποία πηγάζει είτε εξωτερικά με την χρήση γραμμικών επιταγχνυτών ή με ακτίνες X και γ, είτε εσωτερικά με την χρήση ραδιοϊσότοπων. Έκθεση των κυττάρων σε κλινικά ελεγχόμενες δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας προκαλεί ένα ευρύ φάσμα καταστροφών DNA όπως σπασίματα στην μία ή και στις 2 αλυσίδες (DSB), καταστροφή σε μία βάση, απυριμιδικές/ απουρινικές περιοχές όπως επίσης και σταυροειδείς δεσμούς μεταξύ DNA-πρωτεϊνών. Η ακτινοβολία προκαλεί επίσης βλάβες σε κυτταρικά μακρομόρια (όπως υπεροξειδωση λιπιδίων) λόγω της παραγωγής ενεργού O₂ (ROS) από τα μιτοχόνδρια. Η κυτταρική ανταπόκριση σε αυτές τις κυτταρικές βλάβες που προκαλεί η ακτινοβολία γίνεται με το συντονισμό και την συμμετοχή επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA καθώς επίσης και των μηχανισμών που συμμετέχουν σε άλλα κυτταρικά γεγονότα όπως ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση. Η ακτινοθεραπεία είναι γενικά τοπική μέθοδος μη επεμβατική και δεν προκαλεί συστηματική τοξικότητα όπως συμβαίνει με την χημειοθεραπεία (Shimura, 2011).

1 α Προβλήματα με υπάρχουσες θεραπείες

Η δυσκολία στη θεραπεία του καρκίνου με χημειοθεραπεία έγκειται στο γεγονός ότι τα καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα έχουν πολλές ομοιότητες. Αν και τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεταλλαγμένα γονίδια τα οποία με την σειρά τους κωδικοποιούν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση ή/και συμβάλλουν στην ογκογένεση, ο όγκος και τα φυσιολογικά κύτταρα μοιράζονται το ίδιο DNA και τα ίδια κύρια μεταβολικά μονοπάτια. Έτσι, οι παραδοσιακές χημειοθεραπευτικές ενώσεις εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA ή την κυτταρική διαίρεση στα καρκινικά κύτταρα αλλά μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε φυσιολογικά διαιρούμενα κύτταρα, οδηγώντας σε σοβαρές παρενέργειες όπως τοξικότητα στον μυελό των οστών και στο γαστρεντερικό σύστημα (Schewach, 2009). Δεδομένου λοιπόν ότι στην χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται φάρμακα που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, μία ακόμα σημαντική επιπλοκή της επεξεργασίας του πρωτογενούς όγκου είναι η εμφάνιση δευτερογενούς καρκίνου που μπορεί να προκύψει από τη γενετοξική δραστηριότητα των φαρμάκων σε υγιή κύτταρα (Pui and Relling, 2004, Califano et al, 1996). Για παράδειγμα, σε κλινικές μελέτες φάνηκε ότι ασθενείς με καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων στο κεφάλι και τον τράχηλο είχαν προδιάθεση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων ύστερα από χορήγηση αντικαρκινικής, φαρμακευτικής αγωγής, η οποία μπορεί να υποβοηθήσει την δευτερογενή ογκογένεση (Desai et al, 2012). Ένα επιπλέον μειονέκτημα της μεθόδου της χημειοθεραπείας είναι η αντίσταση που μπορεί να εμφανίσουν τα καρκινικά κύτταρα απέναντι στην δράση της. Η κατάσταση αυτή μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς, όπως η θετική ρύθμιση των αντλιών για τα φάρμακα, (όπως η P-γλυκοπρωτεΐνη και η πολυφαρμακευτική αντίσταση που σχετίζεται με την πρωτεΐνη MDR - 1) οι οποίες αυξάνουν την έξοδο των φαρμάκων από το κύτταρο (Grossman and Altieri, 2001, Helmbach et al, 2001). Παρόμοια αποτελέσματα αντίστασης έχουν αναφερθεί λόγω παραγόντων αποτοξίνωσης (όπως η γλουταθειόνη / γλουταθειόνη S τρανσφεράση,) που συνδέονται με αδρανοποίηση αλκυλιωτικών φαρμάκων. Σε άλλα φάρμακα, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποφεύγουν τη βλάβη του DNA ρυθμίζοντας αρνητικά τον στόχο του φαρμάκου (Withoff et al, 1996, Larsen and Skladanowski, 1998). Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός με τον οποίο το καρκινικό κύτταρο μπορεί να αντιμετωπίσει την γενετοξική δράση των χημειοθεραπευτικών είναι η υπερενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης

του DNA , είτε με υπερέκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης είτε με ενίσχυση των ενζύμων που αφαιρούν της βλάβες στο DNA(π.χ αλκυλίωση) (Rass et al , 2001).

Παρά τις πρόσφατες βελτιώσεις των φαρμάκων για χημειοθεραπεία γίνεται σαφές από τα παραπάνω πως θα πρέπει να σχεδιαστούν φάρμακα και προσεγγίσεις θεραπείας, που να στοχεύουν εκλεκτικά μόνο τα καρκινικά κύτταρα ώστε να μειωθούν στο ελάχιστο οι σοβαρές παρενέργειες που προκαλεί η μη επιλεκτική δράση των σύγχρονων χημειοθεραπευτικών παραγόντων (όπως είναι η ναυτία και ο εμετός, η απώλεια των μαλλιών και η αδυναμία που συνδέεται με πολλά χημειοθεραπευτικά).

Η ακτινοβολήση, αν και θεωρείται πιο «στοχευμένη θεραπεία» αφού με την πρόοδο της τεχνολογίας στοχεύει ειδικά τα κύτταρα του όγκου, ωστόσο συνδέεται συχνά με την εμφάνιση τοπικής υποτροπής ή και μετάστασης ωφειλόμενης στην ανάπτυξη αντίσταση των κυττάρων στην ακτινοβολία πιθανόν λόγω απόπτωσης, απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και αναστολής των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Γίνεται λοιπόν όλο και πιο προφανές από κλινικές μελέτες συμβατικής ακτινοθεραπείας, ότι οι συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν περισσότερες πιθανότητες επιτυχίας προφανώς λόγω του ότι στις συνδυαστικές θεραπείες γίνονται στόχοι διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια των καρκινικών κυττάρων.

2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια νέα μέθοδο για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών και διαταραχών που έχουν γενετική βάση. Οι στρατηγικές της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνουν το χειρισμό (μεταφορά, τροποποίηση, εξάλειψη) γονιδίων που συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών υπεύθυνων για την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών.

Για να υπάρξουν ωστόσο αξιόλογα πειραματικά και κλινικά αποτελέσματα, απαιτούνται κατάλληλοι μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς. Τα θεραπευτικά γονίδια μπορούν να μεταφερθούν στους ιστούς στόχους μέσω “οχημάτων” του γονιδίου που συνήθως ορίζονται ως «φορείς». Οι συνηθέστεροι φορείς που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι οι

ρετροϊοί, οι αδενοϊοί και οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (adenoassociated viruses, AAV) οι οποίοι μπορούν να χορηγηθούν είτε απευθείας στα όργανα-στόχους είτε με ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, ενδορινική ή ενδοογκική ένεση.

Ο αριθμός των κλινικών δοκιμών για γονιδιακή θεραπεία έχει αυξηθεί ραγδαία. Ωστόσο, δεν έχουν λυθεί ακόμα κάποιοι περιορισμοί όπως η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης και η σταθερή και μακροχρόνια έκφραση του γονιδίου. Συνεπώς, η προσοχή εστιάζεται στην εκτίμηση νέων στρατηγικών μεταφοράς γονιδίου. Πολλές προσδοκίες γεννά η ενδορινική μεταφορά του γονιδίου για τη θεραπεία ασθενειών. Η ενδορινική χορήγηση θεραπευτικών γονιδίων αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες μορφές γονιδιακής θεραπείας σε πνευμονικές διαταραχές (όπως η κυστική ίνωση, οι διαταραχές α1 - αντιτρυψίνης και ο καρκίνος), μέσω της εισπνοής του γονιδιακού παρασκευάσματος, καθώς πειραματικά αποτελέσματα και κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι η γονιδιακή μεταφορά με πλασμιδιακούς φορείς ή ανασυνδυασμένους ιούς είναι επιτυχής στα κύτταρα της αναπνευστικής οδού (K Podolska et al 2012).

2α Γιατί γονιδιακή θεραπεία στο καρκίνο

Εβδομήντα χρόνια μετά την πρώτη αναφορά της χρήσης χημειοθεραπείας ως βασική θεραπεία για τον καρκίνο οι διάφορες κακοήθειες εξακολουθούν να αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου σε ενήλικους και παιδιά στις Η.Π.Α (American Cancer Society, 2013). Ο μεγάλος αριθμός των ατόμων με καρκίνο αποδεικνύει την αναγκαιότητα εφαρμογής νέων προσεγγίσεων για την πρόληψη και θεραπεία αυτής της επιθετικής νόσου

Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την εισαγωγή γενετικού υλικού (DNA, RNA, siRNA ή αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια) μέσα στα κύτταρα για να διορθώσουν τη κυτταρική δυσλειτουργία ή για να προσδώσουν νέες λειτουργίες στα κύτταρα ώστε να θεραπεύσουν ή να καθυστερήσουν την εξέλιξη της νόσου (Pfeifer and Verma, 2001). Η γνώση που έχει αποκτηθεί από το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος και η αύξηση της ικανότητας

του γονιδιακού χειρισμού έχει ανοίξει δρόμους για νέες προοπτικές στην γονιδιακή θεραπεία. Οι ερευνητές είναι πλέον σε θέση να αναγνωρίσουν πολλά γονίδια και τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται και έχουν απορυθμιστεί στον καρκίνο. Με την γονιδιακή θεραπεία δίνεται η δυνατότητα να στοχεύονται αυτά τα μονοπάτια σαν θεραπεία στην υποκείμενη νόσο.

3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Αν και η επιστημονική κοινότητα δεν έχει ακόμα καταλήξει στην επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών γονιδίων, φαίνεται να υπάρχει ένας κοινά αποδεκτός τύπος φορέων που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια (Vile et al 2000). Ανεξάρτητα από την στρατηγική που χρησιμοποιείται κάθε φορά η γονιδιακή θεραπεία βασίζεται κυρίως στην χρήση γενετικά τροποποιημένων ιών που ουσιαστικά μεταφέρουν το διαγονίδιο στα καρκινικά κύτταρα όπου και θα εκφραστεί είτε προσωρινά είτε μακροπρόθεσμα ανάλογα με τον φορέα.

Οι πιο κοινοί ιικοί φορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου μέχρι σήμερα είναι οι αδενοϊοί (AD), οι αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί (AAV) και οι ρετροϊοί (λεντιϊοί, ερπητοϊοί, ιός της ευλογιάς) (Kaliberon and. Buchsbaum 2012).

3.1 Βιολογικοί μέθοδοι

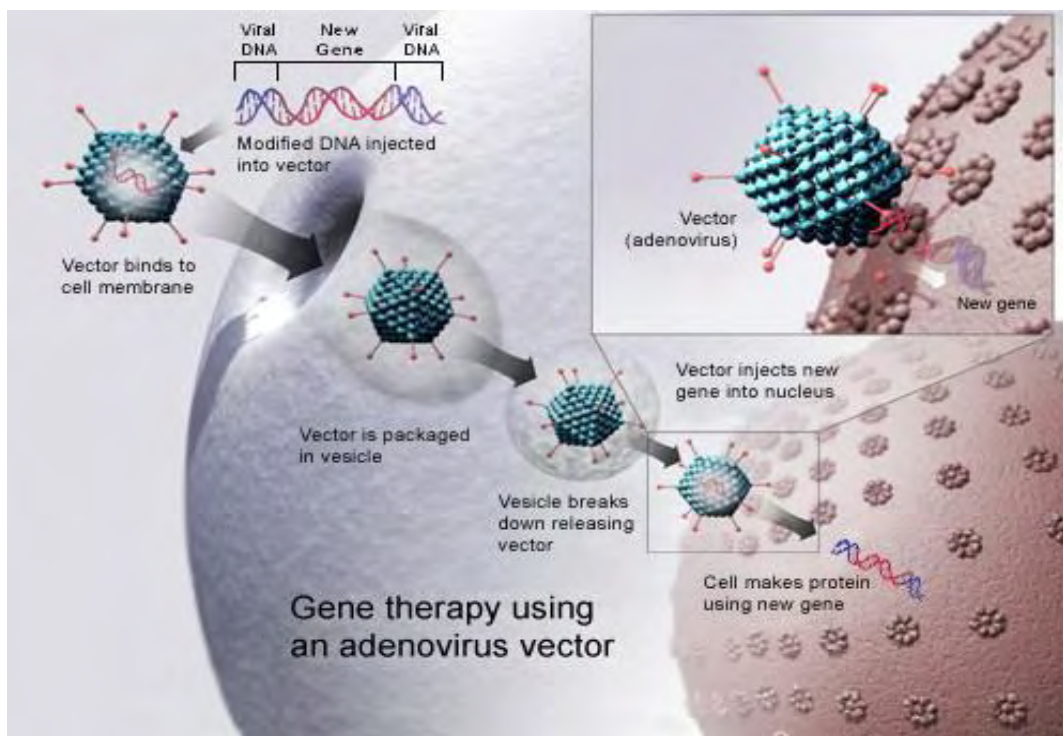
3.1 α Ιικοί Φορείς

3.1.α1 DNA ΙΟΙ

Αδενοϊοί (Ads)

Οι αδενοϊοί ανήκουν στην οικογένεια Adenoviridae η οποία αποτελείται από 51 ορότυπους. Οι ανθρώπινοι αδενοϊοί είναι ιοί χωρίς περίβλημα με γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA 36 kb περίπου που περικλείονται από ένα καψίδιο εικοσαεδρικών πρωτεϊνών (Εικόνα 3.1) (Fabry et al.,2005, Reddy et al, 2010; Saban, et al,2006) και εισέρχονται στα κύτταρα -στόχους με

ενδοκύττωση. Οι αδενοϊοί μολύνουν τα κύτταρα μέσω σύνδεσης μίας ιικής πρωτεΐνης του καψιδίου με ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (υποδοχέας Coxsackie και Ad υποδοχέας (CAR)) (Franceschi, 2008). Η CAR είναι μια πρωτεΐνη 46 kDa μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών και εμπλέκεται στο σχηματισμό των στενών συνδέσεων (Coyne and Bergelson, 2006, Philipson and Pettersson, 2004). Μόλις το ιοσωμάτιο του Ad προσκολληθεί στο κύτταρο, ξεκινούν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κυτταρικές ιντεγκρίνες συμπεριλαμβανομένων των $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ (Wickham, et al, 1993), $\alpha\beta_1$ (Li et al., 2001), $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ και (Davison et al, 1997) και πρωτεΐνες του καψιδίου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επάγουν κυτταρικές αποκρίσεις που οδηγούν σε μεταβολές του κυτταροσκελετού που βοηθούν στην εσωτερίκευση του ιού (Li et al,1998) Σύνδεση με την α_v ιντεγκρίνη έχει ως αποτελέσματα την ενδοκυττάρωση του σωματιδίου του ιού μέσω ενός κυστιδίου καλυμμένου με κλαθρίνη. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης με αποτέλεσμα την είσοδο του λοιμογόνου παράγοντα στο κύτταρο ξενιστή μέσω των ενδοσωμάτων. Μόλις ο ιός εισέλθει επιτυχώς στο κύτταρο ξενιστή, το ενδόσωμα γίνεται πιο όξινο, προκαλώντας το διαχωρισμό των συστατικών του καψιδίου. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν στην απελευθέρωση του ιοσωματίου στο κυτταρόπλασμα. Το ιικό DNA κατευθύνεται τελικά στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων για ιική αντιγραφή (Εικόνα 3.1)(Meier et al, 2002).



Εικόνα 3.1: Στάδια γονιδιακής μεταφοράς με χρήση αδενοϊού (http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy)

Στην γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιούνται για γονιδιακή μεταφορά κυρίως οι ανθρώπινοι ορότυποι B, C και D. Οι αδενοϊοί Ad2 και Ad5 της ομάδας C είναι τα πιο μελετημένοι. Στην πρώτη γενιά αδενοϊικών φορέων που αναπτύχθηκε έγινε διαγραφή της E1 περιοχής ώστε να μειωθεί η ανοσολογική απόκριση, αλλά έγινε απαραίτητη η συμμόλυνση με άλλους ιούς ώστε να μπορέσουν να αναπαραχθούν. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκε η δεύτερη γενιά φορέων με απαλοιφή της E2 ή E4 περιοχής, αλλά εξακολουθούσε να υπάρχει έντονη ανοσοαπόκριση. Τελικά αναπτύχθηκαν οι φορείς τρίτης γενιάς ή εξαρτώμενοι από βοηθό αδενοϊοί οι οποίοι δεν διαθέτουν καμμία ιική κωδικοποιούσα περιοχή για αυτό και χρειάζονται έναν αδενοϊού βοηθό που να μεταφέρει όλες τις κωσικοποιούσες περιοχές. In vitro η ανοσοαπόκριση με αυτούς τους ιούς είναι ιδιαίτερα μειωμένη σε σύγκριση με τους αδενοϊούς πρώτης και δεύτερης γενιάς ενώ παραμένουν αποτελεσματικοί στη διαμόλυνση σε πολλούς τύπους κυττάρων. Σήμερα, οι τρίτης γενιάς αδενοϊοί χορηγούνται σε διάφορα όργανα, όπως το ήπαρ, τους μυς ή το κεντρικό νευρικό σύστημα έχοντας υψηλά επίπεδα και μακροχρόνια έκφραση του διαγονιδίου σε τρωκτικά και πρωτεύοντα (Alba et al, 2005).

Οι Ads μπορούν να μετασχηματίσουν διαιρούμενα και μη κύτταρα και σε αντίθεση με τους ρετροϊούς και παρβοϊούς δεν ενσωματώνονται στο κυτταρικό γονιδίωμα επομένως δεν

ενέχεται κίνδυνος μεταλλαξογένεσης λόγω τυχαίας ενσωμάτωσης του. Οι εξαρτώμενοι από βοηθό, υψηλής ικανότητας Ad φορείς στερούνται πλήρως όλων των ιικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται εκτός από τις ιικές περιοχές ITRs και τα σήματα πακεταρίσματος, ώστε να καθίστανται πιο ασφαλείς συγκριτικά με τους Ads πρώτης γενιάς. Στους φορείς Ads μπορεί να ενσωματωθεί ένθεμα DNA μέχρι 30 kb ενώ γενικά χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα μεταγωγής, εύκολη παραγωγή και σχετικά ευκολία στον χειρισμό τους. Αυτοί οι φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί στην γονιδιακή μεταφορά για βασικές μελέτες λειτουργίας γονιδίων και για γονιδιακή θεραπεία σε διάφορες γενετικές ασθένειες αλλά και το καρκίνο. Αδενοϊοί ελεγχόμενης αντιγραφής (CRAds) με E1A καθοδηγούμενη από ογκοειδικούς εκκκινητές έχουν μελετηθεί σαν ογκολυτικοί ιοί (Kaliberon and. Buchsbaum 2012).

Ένα σημαντικό πρόβλημα με τους Ads φορείς είναι η υψηλή ανοσογονικότητα σε συνδυασμό με προφλεγμονώδεις αντιδράσεις που περιορίζουν την διαγονιδιακή έκφραση και εμποδίζουν την συστηματική επαναχορήγηση τους (Bauerschmitz et al, 2002). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η επαγόμενη από τους Ad ανοσοαπόκριση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία χρόνιων ασθενειών αλλά και στον καρκίνο όταν επιδιώκεται η ρύθμιση και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα καρκινικά κύτταρα (Kaliberon and. Buchsbaum 2012).

Παρόλο που οι Ad φορείς έχουν δείξει εντυπωσιακή ασφάλεια και αποτελεσματικότητα σε προκλινικές δοκιμές, σε κλινικές μελέτες, δεν έχει παρατηρηθεί θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Έτσι, οι προσπάθειες έχουν στραφεί στον σχεδιασμό ενός βασικού φορέα που να ειδικεύεται στην μεγιστοποίηση της γονιδιακής μεταφοράς, μετασχηματίζοντας μόνο τους κυτταρικούς πληθυσμούς- στόχους. Επιτεύγματα στην τεχνολογία στόχευσης κυττάρων με μετασχηματισμένους Ad φορείς έχουν αναπτυχθεί σταθερά και υπόσχονται μεγάλη θεραπευτική επιτυχία για την θεραπεία του καρκίνου (Beatty and Curiel, 2012).

Αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί (AAV)

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (AAV) είναι φυσικώς απαντώμενοι παρβοϊοί με μονόκλωνο DNA που μολύνουν τους ανθρώπους αλλά και άλλα πρωτεύοντα θηλαστικά. Ο άγριου τύπου AAV δεν έχει συσχετιστεί με καμία γνωστή ασθένεια ή παθολογική κατάσταση στον άνθρωπο, παρουσιάζει μία φυσική ανικανότητα αντιγραφής και απαιτεί την παρουσία ενός βοηθητικού ιού όπως έναν αδενοϊό για να αναπαραχθεί. Έχει επίσης δειχθεί *in vitro* ότι έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σταθερά στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία (ορίζεται AAVS1) στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19 με μικρό κίνδυνο να ενσωματωθεί κάπου τυχαία εντός του γονιδιώματος. Για αυτούς τους λόγους, ο AAV έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον, λόγω των δυνατοτήτων του να αξιοποιηθεί ως φορέας γονιδιακής θεραπείας . Για την χρήση του AAV στην γονιδιακή θεραπεία απαιτείται η εξάλειψη του γονιδίου *rep* από τον φορέα, δεδομένου ότι κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού DNA και στην ειδική ενσωμάτωσή του. Στο γονιδίωμα του φορέα τα γονίδια *rep* και *cap* αντικαθίστανται από το θεραπευτικό διαγονίδιο και έναν υποκινητή που είναι απαραίτητος για την καθοδήγηση της μεταγραφής. Αυτή η «κασέτα» πλαισιώνεται από ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις (ITR) που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του μονόκλωνου DNA του φορέα σε δίκλωνο με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης του κυττάρου- ξενιστή. Οι AAV- φορείς αποτελούν τους πιο απλούς φορείς γονιδιακής θεραπείας, που περιέχουν μόνο το διαγονίδιο που πλαισιώνεται από τις δύο μη - κωδικοποιούσες ιογενείς ITRs περιοχές , και περικλείονται από ένα καψίδιο που αποτελείται από τρεις δομικές πρωτεΐνες τις VP1, 2, και 3 (Ferreira et al, 2014). Στην γενιά των AAV - φορέων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για γονιδιακή θεραπεία στον άνθρωπο έχει μειωθεί σημαντικά ο κίνδυνος παρεμβατικής μεταλλαξογένεσης. Επίσης συγκεκριμένη ή τυχαία ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή με την παρουσία βοηθητικού ιού έχει σαν αποτέλεσμα την μακρόχρονη έκφραση του διαγονιδίου. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα των AAV ιών είναι ότι παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα μεταγωγής ανεξάρτητα από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στον οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, επιμολύνοντας το ίδιο αποτελεσματικά τόσο κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία όσο και διαιρούμενα κύτταρα (Zaiss et al, 2002).

Σημαντικοί περιοριστικοί παράγοντες στη χρήση των AAV φορέων είναι η ικανότητα ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα μικρού τμήματος DNA περίπου 4 Kb, η αναγκαιότητα Ad ή

ερπητοϊού βοηθό, για επιτυχή μετασχηματισμό και τέλος η αυξημένη πιθανότητα μετάλλαξης λόγω ενσωμάτωσης του στο γονιδίωμα του κυττάρου του όγκου (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή γίνεται μόνο στην περίπτωση που απουσιάζει ο βοηθητικός ιός που απαιτείται για την αναπαραγωγή του. Αν ο βοηθητικός ιός είναι παρών, τότε ο AAV μπορεί να εμπλακεί σε λυτική αναπαραγωγή και να απελευθερωθεί από το κύτταρο χωρίς ενσωμάτωση (Ponnazhagan et al, 2001) .

Ερπητοϊοί

Οι ερπητοϊοί, συμπεριλαμβανομένου και του ιού του απλού έρπητα HSV₁, έχουν αποσπάσει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της ικανότητας τους να αντιγράφονται στον πυρήνα ως λανθάνοντα επισώματα και να σκοτώνουν διαιρούμενα και μη κύτταρα του όγκου. Έχουν επίσης την ικανότητα να μεταφέρουν γονίδια τα οποία μπορούν να είναι μεγάλου μεγέθους και σε κύτταρα του ΚΝΣ (Chiocca et al, 1990, Wade-Martins et al, 2001). Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι HSV1 φορέων για γονιδιακή μεταφορά: Οι ανασυνδυασμένοι φορείς και τα amplicons. Οι πρώτοι είναι HSV1 στους οποίους έχουν διαγραφεί τα ιικά γονίδια που είναι απαραίτητα για την αντιγραφής τους (Frampton et al, 2005). Η δεύτερη κατηγορία είναι πλασμίδια που περιέχουν γονίδια αντιγραφής του HSV1, σήματα πακεταρίσματος, και ενίοτε ένα γονίδιο του HSV1, όπως το ICP0, για να βελτιωθεί η έκφραση (Saeki et al, 2001). Μία άλλη κατηγορία είναι ο ογκολυτικός HSV 1 (oHSV1), του οποίου έχουν διαγραφεί μερικά από τα ιικά γονίδια ή/και έχουν χρησιμοποιηθεί ογκοειδικοί υποκονητές για να οδηγήσουν στην επιλεκτική έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την αντιγραφή του HSV (Aghi et al, 2008). Εξασθενημένοι HSV ιοί που προέρχονται από μεταλλάξεις και έχουν ικανότητα αντιγραφής προσφέρουν δυνατότητα ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα με ένθεμα μήκους που φτάνει μέχρι και τις 40 Kb. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης με άγριου τύπου HSV ιών στην γονιδιακή θεραπεία είναι μικρή και παροδική ενώ προκαλείται έντονη ανοσοαπόκριση, με σοβαρά συμπτώματα (Marconi et al, 1996).

3.1 .α2 RNA IOI

Η γονιδιακή μεταφορά με την χρήση ρετροϊών πραγματοποιείται με αλληλεπίδραση μεταξύ του ιικού φακέλου και του κατάλληλου υποδοχέα που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια του κυττάρου-στόχου. Οι ρετροϊοί είναι μικροί RNA ιοί που διαθέτουν μόνο γονίδια που απαιτούνται για την αντιγραφή και τις μακριές επαναλαμβανόμενες τερματικές περιοχές (LTRs) στις οποίες ενσωματώνεται το θεραπευτικό γονίδιο αντικαθιστώντας ορισμένα γονίδια που κωδικοποιούν το καψίδιο, την γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου ή την αντίστροφη μεταγραφή. Σε αντίθεση με τους αδενοϊικούς φορείς, οι ρετροϊοί μολύνουν τα κύτταρα στόχους μέσω της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου (Cevher et al, 2012).

Οι ρετροϊοί εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για γονιδιακή μεταφορά ωστόσο πρόσφατα αποτελέσματα γονιδιακής θεραπείας με χρήση ρετροϊών, προβληματίζουν σχετικά με την πιθανότητα παρεμβατικής μεταλλαξογένεσης (Hacein et al, 2003).

Οι ρετροϊοί ως φορείς μπορούν να μετασχηματίσουν και διαιρούμενα και αδρανή κύτταρα. Τα πλεονεκτήματα χρήσης των ρετροϊικών φορέων για γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο είναι η μακρόχρονη έκφραση του διαγονιδίου κατά την ενσωμάτωση του στα καρκινικά κύτταρα-στόχους, η χαμηλή ανοσογονικότητα και η δυνατότητα που προσφέρουν να χρησιμοποιούνται και για την έκφραση διαγονιδίων στα νευρικά κύτταρα. Ωστόσο, οι ρετροϊοί εμφανίζουν χαμηλή αποτελεσματικότητα στον μετασχηματισμό και ικανότητα μόλυνσης μόνο των κυττάρων που βρίσκονται στο στάδια της μίτωσης (Adamina et al, 2005).

Λεντιοί

Είναι μονόκλωνοι RNA ιοί οι οποίοι μπορούν να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των κυττάρων του ξενιστή να αντιγράφονται σταθερά σε όλους τους κυτταρικούς απογόνους να επιτρέπουν την μακρόχρονη έκφραση του διαγονιδίου, να μετασχηματίζουν διαιρούμενα και μη κύτταρα και να επιδρούν ακόμα και σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα (Pfeifer et al, 2000) Οι λεντιοί μπορούν να αλληλεπιδρούν με τον μηχανισμό πυρηνικής εισόδου του κυττάρου στόχου και να διαχειρίζονται την ενεργή μεταφορά των απαραίτητων συμπλόκων για την ενσωμάτωση τους (PIC) μέσω των νουκλεοπορινών (Cevher et al, 2012). Στον

Πίνακα 3.1 περιγράφονται τα βασικά χαρακτηριστικά των ιικών φορέων τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα τους.

Πίνακας 3.1: Συστήματα ιικής γονιδιακής μεταφοράς			
Ιικός παράγοντας μεταφοράς	Μηχανισμοί μεταφοράς	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αδενοϊός	Ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα	<ul style="list-style-type: none"> Χαρακτηρίζεται από σταθερότητα και υψηλή ικανότητα μεταγωγής Μη ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή 	<ul style="list-style-type: none"> Πρωτεΐνες καψιδίου προκαλούν έντονη φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση Βραχύβια έκφραση
Ρετροϊός	Αλληλεπίδραση ιικού φακέλου με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων	<ul style="list-style-type: none"> Μακροχρόνια έκφραση διαγονιδίου Ικανότητα διαμόλυνσης και νευρικών κυττάρων Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή Χαμηλή ανοσογονικότητα 	<ul style="list-style-type: none"> Μειωμένη ικανότητα διαμόλυνσης Χαμηλοί τίτλοι του ιού Αστάθεια
Λεντιός	Αλληλεπίδραση με μηχανισμούς εισόδου στο πυρήνα του κυττάρου- στόχου μέσω των νουκλεοπορινών	<ul style="list-style-type: none"> Μολύνει διαιρούμενα και μη κύτταρα Επίδραση ακόμα και σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα Μακροχρόνια έκφραση Χαμηλή ανοσοαπόκριση 	<ul style="list-style-type: none"> Αδυναμία συγκέντρωσης Χαμηλή διαγονιδιακή δραστηριότητα στα κύτταρα των μυών και του ήπατος
Αδενοσυσχετιζόμενος ιός	Όλες οι εσωτερικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν απομακρύνονται και είναι απαραίτητη η συν-μόλυνση με έναν ιό βοηθό.	<ul style="list-style-type: none"> Έκφραση μεγάλης διάρκειας Υψηλή σταθερότητα, αποτελεσματικότητα και ασφάλεια Χαμηλή ανοσογονικότητα οι 3^{ης} γενιάς 	<ul style="list-style-type: none"> Ικανότητα ενσωμάτωσης μικρού κομματιού DNA
HSV	Κλωνοποίηση του θεραπευτικού γονιδίου σε πλασμίδιο που περιέχει τον HSV και μόλυνση με τον HSV	<ul style="list-style-type: none"> Μεγάλη ικανότητα κλωνοποίησης ξένων γονιδίων Μπορεί να ενσωματώσει μεγάλο αριθμό γονιδίων 	<ul style="list-style-type: none"> Απενεργοποιεί τα περισσότερα γονίδια στην λανθάνουσα φάση

3.1 β Μη ιικοί φορείς

Βακτηριακοί φορείς

Η προοπτική της χρήσης βακτηρίων ως φορείς στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου φαίνεται από τον αυξανόμενο αριθμό και την ποικιλία των μελετών που έχουν διεξαχθεί για τα βακτήρια. Τα βακτήρια παρουσιάζουν μία επιλεκτική προτίμηση αποικισμού στα κύτταρα του όγκου που πιθανόν να σχετίζεται με μοναδικά χαρακτηριστικά του όγκου που τον διαχωρίζουν από τους υγιείς ιστούς. Παράγοντες όπως η ακανόνιστη παροχή αίματος, η τοπική ανοσολογική καταστολή, η φλεγμονή και η μοναδική παροχή θρεπτικών συστατικών (π.χ πουρίνες) σε όγκους φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο (Yu et al, 2008). Η βακτηριακή είσοδος στο περιβάλλον του όγκου διευκολύνεται από τη διαρροή του αγγειακού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ανώμαλη επιτάχυνση του μεταβολισμού και υπέρμετρο πολλαπλασιασμό που οδηγεί σε ανισορροπία προσφοράς και κατανάλωσης οξυγόνου γεγονός που προκαλεί ανάπτυξη υποξίας (Harada et al, 2009). Η υποξική φύση των στερεών όγκων ενισχύει την ανάπτυξη των αναερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων. Επιπλέον, αυτές οι περιοχές με χαμηλό οξυγόνο και υψηλή πίεση θεωρούνται ότι αποκρύπτονται από το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς οι βακτηριακοί μηχανισμοί εκκαθάρισης εκεί έχουν σε μεγάλο βαθμό ανασταλλεί (Pawelec et al, 2003). Οι νεκρωτικές περιοχές είναι επίσης πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά που ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα βακτήρια με ικανότητα εισβολής μπορούν να εσωτερικεύονται και να αναπαράγονται εντός των κυττάρων του όγκου, ενώ αντίθετα τα μη επεμβατικά βακτήρια αναπτύσσονται εξωτερικά των κυττάρων εντός όμως του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Baban et al, 2010).

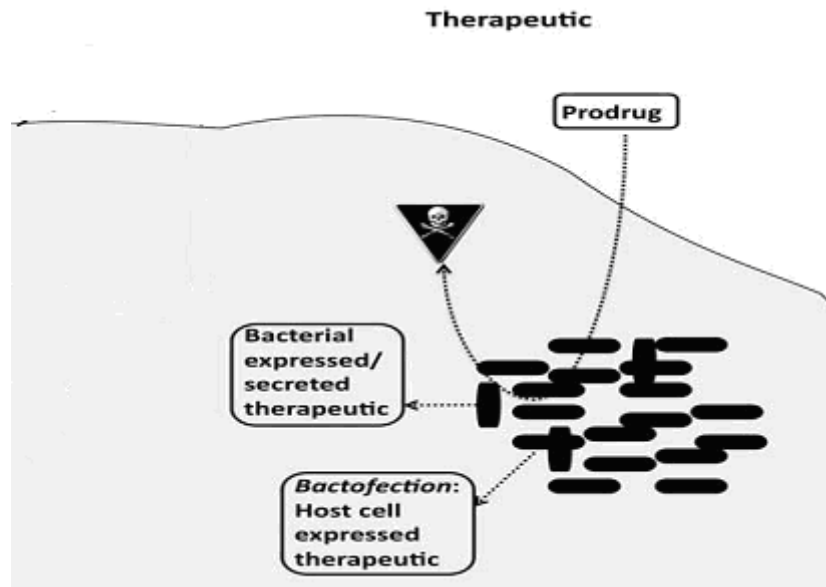
Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για γενετική τροποποίηση των βακτηριακών γονιδιωμάτων και μετασχηματισμό των βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA που να περιέχει το θεραπευτικό γονίδιο. Το παραπάνω επιτρέπει τη δημιουργία βακτηρίων που (i) εκφράζουν άμεσα θεραπευτικά γονίδια, και / ή (ii) εσωτερικεύονται αποτελεσματικά στα κύτταρα του όγκου και απελευθερώνουν το θεραπευτικό νουκλεϊκό οξύ το οποίο θα εκφραστεί στη συνέχεια στα καρκινικά κύτταρα. Το ίδιο βακτήριο μπορεί να τροποποιηθεί γενετικά ώστε να συν- εκφράζει ένα γονίδιο αναφοράς που θα χρησιμοποιείται για in vivo εντοπισμό και τον βαθμό εξάπλωσης των βακτηρίων. Ο γενετική παρέμβαση των βακτηρίων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών με παρεκκλίνουσες

διατροφικές ανάγκες ή εξασθενημένα και συνεπώς μη παθογόνα (Chronin et al, 2012) .

Μέχρι σήμερα, στα γένη των βακτηρίων που έχουν αξιοποιηθεί ως οχήματα μεταφοράς γονιδίων περιλαμβάνονται η Salmonella, Escherichia, Listeria, Clostridium και Bifidobacterium (Cronin et al,2012, Fujimori 2008, Zhao et al 2005, Zhou et al, 2011, Tangney et al, 2010). Αυτά τα βακτήρια μπορούν να μεταφερθούν στα σημεία του όγκου με διάφορους τρόπους όπως με ενδο-ογκική έγχυση , με ενδοφλέβια ένεση ή σε ορισμένες περιπτώσεις από το στόμα (Cronin et al, 2012) .

Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα διαφορετικών βακτηριακών στελεχών να δρουν τοπικά, να παράγουν θεραπευτικούς παράγοντες και να μεσολαβούν σε μεγάλο βαθμό στην αποτελεσματική και ειδική θεραπευτική ανταπόκριση (Pewelec et al, 2003).

Οι στρατηγικές που εφαρμόζονται στη γονιδιακή θεραπεία με τη χρήση βακτηρίων είναι πολλές και στοχεύουν στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων, είτε άμεσα (π.χ. χρησιμοποιώντας γονίδια «αυτοκτονίας»), είτε έμμεσα, όπως η ανοσοθεραπεία που βασίζεται στην θανάτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της παρέμβασης των διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Tangney et al, 2003). Τα βακτήρια που εισχωρούν στους όγκους μπορούν να εσωτερικεύονται στα καρκινικά κύτταρα και να μεταφέρουν το θεραπευτικό-γονίδιο για την έκφρασή του στα κύτταρα του ξενιστή (Εικόνα 3.2). Αντίθετα, τα βακτήρια που δεν έχουν την ικανότητα να εισχωρούν μέσα στους όγκους κατασκευάζονται για να εκκρίνουν θεραπευτικές πρωτεΐνες εξωκυτταρικά, τοπικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Tangney et al, 2010). Αυτή η προσέγγιση « κυτταρικής θεραπείας » είναι κατάλληλη για έμμεσες θεραπευτικές στρατηγικές όπως οι μέθοδοι αναστολής της αγγειογένεσης και η ανοσοθεραπεία (Cronin et al, 2012).



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση γονιδιακής θεραπείας με βακτηριακό φορέα (www.nature.com/cgt)

Οι βακτηριακοί φορείς παρουσιάζουν εξίσου πλεονεκτήματα με άλλους φορείς όπως ασφάλεια, ευκολία χειρισμού και παραγωγής. Παρόλο που τα μη παθογόνα βακτήρια δεν έχουν ακόμη τεθεί σε κλινικές δοκιμές στο πλαίσιο της ειδικής στόχευσης των όγκων, οι υπάρχουσες γνώσεις δείχνουν ότι αποτελούν κατάλληλο σύστημα φορέων για κλινική χρήση (Cronin et al, 2012).

Ενώ υπάρχουν σημαντικά οφέλη από τη χρήση βακτηριακών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου είναι απολύτως σαφές πως υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα που συνδέονται με τη χρήση τους. Όπως συμβαίνει και με τους άλλους φορείς η ισορροπία μεταξύ της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας είναι το κλειδί της επιτυχίας. Όσον αφορά την ασφάλεια, παρά τη χρήση εξασθενημένων βακτηριακών στελεχών σε μελέτες γονιδιακής θεραπείας που χρησιμοποιήθηκαν παθογόνα στελέχη, παραμένει έντονη η ανησυχία για πιθανή επαγωγή μίας ανοσο-μεσολαβούμενης τοξικής απόκρισης του ξενιστή λόγω της επιμόλυνσης. Για τον λόγο αυτό ανακαλύφθηκαν μη παθογόνα στελέχη που στοχεύουν ειδικά τους στερεούς όγκους. Τα όχι και τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα που υπάρχουν μέχρι σήμερα από την γονιδιακή θεραπεία βακτηριακών στρατηγικών στη φάση I / II των κλινικών δοκιμών έχουν εμποδίσει την περαιτέρω εξέλιξη της παρούσας μεθόδου (Heppner F, Mose ,1978, Nemunaitis et al, 2003).

3.1.γ Παρεμβολή RNA (RNAi)

Η παρεμβολή του RNA (RNAi) είναι ένας μετα- μεταγραφικός μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης ο οποίος επιτυγχάνεται με αναστολή της μετάφρασης των πρωτεϊνών στόχων ή με άμεσο κατακερματισμό του mRNA (Caplen, 2004, Dorsett and Tuschl,

2004, Shankar et al, 2005). Η RNAi ρυθμίζει την έκφραση σημαντικών γονιδίων που καθορίζουν την μοίρα και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Έχει φανεί ότι η εισαγωγή ξένου δίκλωνου RNA μπορεί να ενεργοποιήσει τον κατακερματισμό ενδογενών RNA με ομόλογες αλληλουχίες (Fire et al, 1998). Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται ως RNAi και έχει συσχετιστεί με φαινόμενα αποσιώπησης όπως μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση στα φυτά και καταστολή στους μύκητες. Μηχανιστικά όταν δίκλωνο RNA εισάγεται στο κυτταρόπλασμα υπόκεινται επεξεργασία από μία RNAση III την Dicer η οποία διασπά το μακρύ δίκλωνο RNA σε μικρότερα κομμάτια των 21-28 ζευγών νουκλεοτιδίων. Αυτά τα δίκλινα RNA αναφέρονται ως μικρά περιεμβαλόμενα RNAs (siRNAs) και μεταφέρουν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσιώπησης RNA (RISC) σε έναν ομόλογο mRNA στόχο το οποίο υπόκεινται ενδονουκλεοτική διάσπαση από την slicer ένα ένζυμο του συμπλόκου και αποσιωπάται. Η διάσπαση αυτή είναι εξαιρετικά ειδική και επίσης πολύ αποτελεσματική, επειδή ο αντινοσηματικός κλώνος του dsRNA προστατεύεται μέσα στο συγκρότημα RISC και ως εκ τούτου μπορεί να παραμείνει για τον κατακερματισμό επιπλέον αντιγράφων του mRNA στόχου. Αν και αρχικά υπήρχε η άποψη ότι για αποτελεσματική RNAi απαιτείται σχεδόν πλήρης ομολογία της αλληλουχίας σε όλο το μήκος του mRNA, τώρα φαίνεται πως μόνο επτά συνεχόμενα συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων αρκούν ώστε να ενεργοποιηθεί η RNAi αποσιώπηση (Jackson and Linsley, 2004). Ωστόσο, νουκλεϊκά οξέα που κατασκευάζονται ή έχουν ενδογενή ικανότητα γονιδιακής αποσιώπησης μπορεί να έχουν επίδραση και σε γονίδια που δεν θεωρούνται στόχοι λόγω ομοιότητας της αλληλουχίας του DNA (Scherr and Eder, 2004). Ο βαθμός αυτού του φαινομένου εξαρτάται από τον τρόπο αποσιώπησης και την σταθερότητα του υβριδικού μορίου (mRNA/ siRNA). Εάν τα siRNAs δεν είναι σωστά επιλεγμένα υπάρχει ο κίνδυνος κατακερματισμού ή αναστολή της έκφρασης ενός μη επιλεγμένου mRNA. Έχει βρεθεί σε μελέτες κατώτερων οργανισμών πως δεν παρατηρείται μη στοχευμένη παρεμβολή όταν εισάγεται ολόκληρο το dsRNA σε αντίθεση με τα συνθετικά siRNAs. Αυτό πιθανόν να εξηγείται από το γεγονός ότι τα siRNAs προκύπτουν ενδογενώς από την διάσπαση των dsRNAs από την Dicer και το σύμπλοκο RISC τα οποία πιθανώς διαθέτουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης που προστατεύουν από την δημιουργία siRNAs που θα μπορούσαν να αποσιωπήσουν ενδογενή γονίδια. Αλγόριθμοι και software είναι διαθέσιμα για επιλογή siRNA αλληλουχιών στόχων με μειωμένο το φαινόμενο της μη στοχευμένης παρεμβολής (Boese et al, 2005) καθώς επίσης και εξελιγμένες εφαρμογές σύγκρισης αλληλουχιών ώστε να μειωθεί η πιθανότητα αυτού του φαινομένου (Pai et al, 2006).

Με την εξελισσόμενη τεχνολογία υψηλής απόδοσης για αναγνώριση του γονιδιακού προφίλ των καρκινικών κυττάρων (Ameyar et al, 2005 Leung and Whittaker, 2005), έχουν αποκαλυφθεί τα περισσότερα γονίδια που είναι απορυθμισμένα στον καρκίνο. Η RNAi τεχνολογία έχει εφαρμοστεί κυρίως για να ανασταλλεί η έκφραση των κυρίαρχων μεταλλαγμένων ογκογονιδίων, των γονιδιακών ενισχύσεων, των μετατοπίσεων και των ιογενών ογκογονιδίων προκειμένου να διευκρινιστεί η λειτουργία τους και η αλληλεπίδραση τους με άλλα γονίδια σε βασικά κυτταρικά μονοπάτια. Η κατανόηση που αποκτήθηκε από την μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων έχει συμβάλει στην συστηματική αναζήτηση νέων φαρμακευτικών στόχων, που έχει βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των υφιστάμενων χημειοθεραπευτικών παραγόντων και την αποσιώπηση γονιδίων που προκαλούν αντίσταση στις θεραπείες (Pai et al, 2006).

Παρόλο που έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός ογκογενετικών στόχων σε κρίσιμα κυτταρικά μονοπάτια, και η γονιδιακή αποσίωπηση μέσω RNAi είχε θετικά αποτελέσματα *in vitro* και σε προκλινικά μοντέλα ζώων, η μετάφραση των ευρημάτων αυτών σε κλινικές εφαρμογές παραμένει μια ακόμα πρόκληση. Η θεραπεία με RNAi μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυναμικά σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και/ή ανοσοθεραπεία. Όπως και με αυτές τις μορφές θεραπείας, έτσι και με την RNAi θα χρειαστούν πολλαπλά δοσολογικά σχήματα ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους η RNAi ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων έχει γίνει πιο ξεκάθαρη δίνοντας την δυνατότητα να ξεπεραστούν πολλά από τα εμπόδια που υπάρχουν. Προς το παρόν αυτό το σύστημα μπορεί να αξιοποιηθεί σαν ένα ισχυρό εργαλείο συμπληρωματικό στη θεραπεία πολυτροπικών κακοηθειών (Pai et al, 2006).

.

3.1 γι microRNAs (miRNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια κατηγορία ενδογενών RNAs που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και λειτουργούν ως ρυθμιστές του ανθρώπινου γονιδιώματος (Bartel, 2004). Η συχνή ανώμαλη έκφραση και λειτουργική επίπτωση των miRNAs σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες έχουν θέσει αυτά τα μικρά κυτταρικά μόρια ως στοχους πολλών φαρμάκων (Calin and Croce, 2006, Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Ιδίως στον καρκίνο ορισμένα miRNAs πληρούν βασικά κριτήρια

για να αποτελέσουν ιδανικό θεραπευτικό μέσο για καταστολή των όγκων. Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφθεί 1400 miRNAs στον άνθρωπο δίνοντας την δυνατότητα δημιουργίας μιας νέας κατηγορίας φαρμάκων που λειτουργεί με ένα νέο μηχανισμό δράσης. Η λειτουργία ενός θεραπευτικού miRNA βασίζεται στην καταλυτική διαδικασία του φυσικού miRNA, η οποία περιλαμβάνει ένα μονόκλωνο RNA 15-22 νουκλεοτιδίων που εισέρχεται στο κυτταροπλασματικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο RNA που προκαλείται από το σύμπλοκο RISC για υβριδισμό με mRNAs που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες και καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου (Bartel,2004). Ατελής σχηματισμός ζευγών βάσεων μεταξύ των miRNAs και mRNAs επιτρέπει τα miRNAs να ρυθμίζουν ένα ευρύ , αλλά παρ 'όλα αυτά συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων. Κατά συνέπεια, ένα miRNA μπορεί να ρυθμίσει πολλαπλά ογκογονίδια και ογκογόνα μονοπάτια. Δεδομένου ότι ο καρκίνος είναι μια ετερογενής νόσος που δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς με στόχο ένα μεμονωμένο γονίδιο ενδιαφέροντος (Check Hayden, 2008, Jones et al, 2008, Parsons et al, 2008) τα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν το κλειδί για θεραπευτική επιτυχία .

Ανάλογα με τη λειτουργία του miRNA και την κατάσταση του ιστού που νοσεί, υπάρχουν δύο προσεγγίσεις στην ανάπτυξη θεραπειών που βασίζονται στα miRNA: α) χρήση ανταγωνιστών και β) χρήση μιμητών. Οι δύο αυτές προσεγγίσεις μοιράζονται ομοιότητες μεταξύ τους αλλά και με άλλες θεραπείες ωστόσο, είναι αρκετά διαφοροποιημένες, ώστε οι miRNA μιμητές και ανταγωνιστές να θεωρηθούν διαφορετικά εργαλεία για την εξερεύνηση της παθογένειας των ασθενειών του ανθρώπου.

α) Οι miRNA ανταγωνιστές δημιουργούνται για την αναστολή των miRNAs που υπερεκφράζονται στην ανθρώπινη ασθένεια (gain of function). Η πιο κοινή στρατηγική για την απώλεια λειτουργίας ενός ενδογενούς miRNA επιτυγχάνεται μέσω μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με συμπληρωματικές αλληλουχίες ως προς το miRNA στόχο. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια είναι χημικώς τροποποιημένα ώστε να αυξηθεί η συγγένεια τους με τα ενδογενή miRNA και να το απομονώσουν σε μια διαμόρφωση που να μην μπορεί να υποστεί επεξεργασία από το σύμπλοκο RISC. Παραδείγματα ανταγωνιστών miRNA είναι anti-miRs, antagomiRs και κλειδωμένα νουκλεϊνικά οξέα (Hutvagner et al, 2005 2005, Meister et al, 2004,Orom et al, 2006, Bader et al, 2010).

β) Αντίθετα , οι miRNA μιμητές χρησιμοποιούνται για να αποκαταστήσουν miRNAs που υπο-εκφράζονται (loss of function) . Η προσέγγιση αυτή , η οποία είναι επίσης γνωστή και ως θεραπεία αντικατάστασης miRNA, έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς παρέχει μια νέα ευκαιρία για ογκοκαταστολή (Bader et al, 2010).

Στο πλαίσιο αυτό, η αντικατάσταση miRNA θυμίζει την κοινή μέθοδο γονιδιακής θεραπείας ωστόσο, το χαμηλό μοριακό βάρος των miRNAs επιτρέπει την μεταφορά των θεραπευτικών miRNAs ως μικρά δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια και όχι σε μορφή ιικών φορέων που χρησιμοποιείται συνήθως στην γονιδιακή θεραπεία (Takeshita et al, 2010, Wiggins et al, 2010). Έτσι, η τεχνική εφαρμογή της miRNA αντικατάστασης είναι πιο στενά συνδεδεμένη με εκείνη των siRNAs καθώς και τα δύο απαιτούν την ενζυματική λειτουργία του κυτταρικού RISC για να είναι καταλυτικά ενεργά (Πίνακας 1). Ενώ τα siRNA που έχουν σχεδιαστεί για να καταστείλουν ένα μόνο mRNA ενδιαφέροντος, οι miRNA μιμητές στοχεύουν πολλαπλά μετάγραφα, περιέχοντας έτσι ένα μοναδικό μηχανισμό δράσης που ευνοεί την ανάπτυξη φαρμάκων που μπορούν να τεθούν σε θεραπευτική εφαρμογή. Οι πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια και τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από τα miRNAs μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους, την παρακολούθηση των ενεργειών τους και τον σχεδιασμό κλινικών δοκιμών. Μέσα σε μια δεκαετία, τα miRNAs έχουν μπει δυναμικά σε προγράμματα ανάπτυξης θεραπειών. Αυτή η ταχεία πρόοδος αντανakλά την σημασία των miRNAs για θεραπευτική παρέμβαση στον καρκίνο. Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία για τις θεραπευτικές δυνατότητες, αυτών των μορίων παραμένει η πρόκληση παραγωγής άμεσα διαθέσιμων φαρμάκων. Το βασικό πρόβλημα που πρέπει να λυθεί ώστε να χρησιμοποιηθούν τα miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο είναι η επιτυχής χορήγηση τους, κάτι που έχει εμποδίσει την πρόοδο των σχετικών αντινοσηματικών siRNA στη θεραπευτική. Ωστόσο, η πρόσφατη κλινική επιτυχία των τεχνολογιών χορήγησης (Alnylam Pharmaceuticals., 2011) και η συνεχής εμφάνιση νέων δείχνουν ότι οι miRNA θεραπείες για τον καρκίνο είναι μέσα στη σφαίρα των δυνατοτήτων. Τα miRNAs φαίνεται ότι μπορούν να λειτουργήσουν σε διάφορους τύπους καρκίνου, αναστέλλουν ειδικά την μετάσταση (Ma et al, 2010, Takeshita et al, 2009, Liu et al, 2011) και ο στόχος είναι να αξιοποιηθούν για θεραπεία όταν δεν υπάρχουν ή είναι ανεπαρκείς οι υπόλοιπες θεραπευτικές επιλογές.

3.2 Χημικές μέθοδοι

3.2.α Πολυμερή, λιποσώματα, πεπτίδια

Παρά την τροποποίηση των διάφορων ιικών φορέων σε μία προσπάθεια βελτίωσης της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της γονιδιακής θεραπείας παραμένουν ακόμα πολλοί περιορισμοί όπως το μέγεθος ένθεσης γενετικού υλικού, η δυσκολία πολλαπλασιασμού και οι τοξικές παρενέργειες (κυρίως λόγω ανοσογονικής και ογκογενετικής δραστηριότητας). Για το λόγο αυτό οι επιστήμονες έχουν στραφεί στη χρήση μη βιολογικών συστημάτων μεταφοράς γονιδίων όπως χρήση λιποσωμάτων, κατιονικών πολυμερών και πεπτιδίων. Με αυτή την προσέγγιση το ανασυνδιασμένο DNA συνδέεται σε θετικά φορτισμένες λιπιδιακές διπλοστιβάδες, κατιονικά πολυμερή ή πεπτίδια και μπορούν να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα είτε με ενδοκύτωση είτε με σύντηξη στην κυτταρική μεμβράνη (Kaliberon and. Buchsbaum 2012).

Τα σύμπλοκα DNA/ πρωτεΐνης έχουν αναπτυχθεί με την χρήση συνθετικών ή φυσικών πεπτιδίων με τα οποία γίνεται η γονιδιακή μεταφορά σε στρατηγικές στόχευσης κυττάρων. Πολυμερή όπως το PEG χρησιμοποιούνται και για να αυξηθεί ο χρόνος ημιζωής του θεραπευτικού γονιδίου λόγω αδυναμίας του γονιδίου να φτάσει στα κύτταρα στόχους. Το PEG όταν αναμειχθεί με νουκλεϊκά οξέα αποτρέπει την αναγνώριση τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Ogris et al, 1999) ενώ αυξάνει και το υδροδυναμικό μέγεθος τους μειώνοντας έτσι την περίπτωση απόρριψης τους από τα νεφρά (Persengien et al, 2004)

Σε αντίθεση με τους ανασυνδυασμένους ιούς, αυτά τα μη ιικά συστήματα μεταφοράς έχουν μικρό κόστος, απλή παραγωγή, το γονίδιο ένθεσης μπορεί να είναι μεγάλου μεγέθους και δεν παρουσιάζονται παρενέργειες καθώς έχουν μικρή ή καθόλου ανοσογονικότητα. Ωστόσο τα μη βιολογικά συστήματα προσφέρουν προσωρινή έκφραση του διαγονιδίου, ενώ η αποτελεσματικότητα και η ειδικότητα της γονιδιακής μεταφοράς είναι μικρότερη συγκριτικά με τους ιικούς φορείς (Glover et al, 2005).

3.3 Φυσικές μέθοδοι

3.3.α Ηλεκτροπόρωση

Είναι μέθοδος στην οποία διανοίγονται μικροί πόροι στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, με την εφαρμογή μικρών ηλεκτρικών ερεθισμάτων (περίπου 10 ns). Οι πόροι που παράγονται έχουν μέγεθος περίπου 10 nm και μέσω αυτών μπορούν να εισέλθουν τμήματα DNA εντός των κυττάρων .

Τα ηλεκτρόδια που παράγουν παλμούς τοποθετούνται *in situ* σε όργανα-στόχους ενώ η ηλεκτροπώρωση εξαρτάται από τα ηλεκτρικά ερεθίσματα, τη συγκέντρωση και την ποσότητα του DNA. Η μέθοδος αυτή βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματική κυρίως στην επιμόλυνση μυών, σε όγκους εγκεφάλου και αλλού (Gehl et al, 2003). Ωστόσο, το μειονέκτημα της είναι η καταστροφή των κυττάρων λόγω της θερμότητας που παράγεται από την εφαρμογή υψηλής τάσης.

3.3.β Γονίδιο όπλο (Gene gun)

Στην μέθοδο «γονίδιο- όπλο» η οποία ονομάζεται επίσης και βαλλιστική μεταφορά του DNA ή βομβαρδισμός με σωματίδια επικαλυπτόμενα με DNA, το DNA επικαλύπτεται με μικροσωματίδια χρυσού, βολφράμιου ή άργυρου και κατευθύνονται σε έναν ιστό- στόχο με συγκεκριμένη ταχύτητα με την βοήθεια ενός πεπιεσμένου αδρανές αερίου όπως το ήλιο. Αυτά εισάγονται λίγα χιλιοστά εντός των κυττάρων με ορμή και απελευθερώνουν το DNA μέσα στο κύτταρο. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζεται κάποιος υποδοχέας ώστε να εισέλθουν τα μικροσωματίδια μέσα στο κύτταρο, το μέγεθος του DNA δεν είναι περιοριστικό και η παραγωγή των μεταλλικών σωματιδίων είναι σχετικά απλή. Ωστόσο μειονεκτούν στο γεγονός ότι προκαλούν έντονη ανοσολογική απόκριση (Cevher et al, 2012).

3.3.γ Μαγνητικά νανοσωματίδια

Για την επιτυχή μεταφορά φαρμάκων ή θεραπευτικών γονιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί ειδικά μαγνητικά νανοσωματίδια διαμέτρου συνήθως 5-20 nm φτιαγμένα με βάση το σίδηρο (πιο συχνά με μαγνητη ή μαγκεμίτη), με τα οποία δημιουργείται συνήθως ένα σύμπλοκο με μία πλατφόρμα μεταφοράς προκειμένου να εγκλειστεί σ' αυτά το κατάλληλο γονίδιο ή φάρμακο και να το προσλάβουν στη συνέχεια τα κύτταρα. Στις μεθόδους μεταφοράς που έχουν χρησιμοποιηθεί μαγνητικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται πολυμερή, μικροί και μη μικροί μεταφορείς. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και τεχνικές για αποτελεσματική συγκρότηση του συμπλόκου, συμπεριλαμβανομένου υδροφοβικές (Namiki et al, 2009) και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Zheng et al, 2009).

Για *in vivo* στόχευση το σύμπλοκο νανοσωματίδιο- θεραπευτικό γονίδιο εγχύεται ενδοφλέβια, ενδοαρτηριακά ή ενδοπεριτονεϊκά και ένας εξωτερικός μαγνήτης (συνήθως ένας μικρός μαγνήτης από σπάνια γαία) συνδέεται κοντά στην περιοχή του στόχου ώστε να δημιουργήσει τοπικό μαγνητικό πεδίο. Καθώς το φάρμακο κυκλοφορεί το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο επιδρά στο νανοσωματίδιο (και κατά συνέπεια και στο ενσωματωμένο γονίδιο) και το προσελκύει στον περιβάλλοντα ιστό (Mikhaylov et al 2011). Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μεταφοράς τα

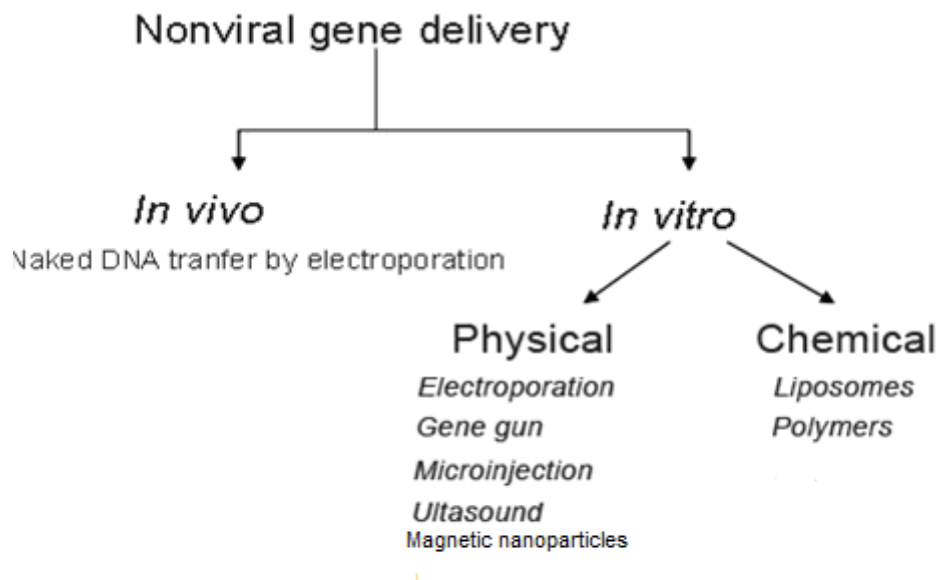
νανοσωματίδια παρέχουν μια σειρά από πλεονεκτήματα στην μεταφορά του γονιδίου καθώς ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, αφού παρέχουν σχετική ασφάλεια και ευελιξία. Η στοχευμένη <<μαγνητική μεταφορά>> προσφέρει μία πιθανή λύση στην απουσία εξειδίκευσης άλλων μεθόδων καθώς τα θεραπευτικά γονίδια μέσω της ενσωμάτωσης τους στα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να κατευθύνονται σε συγκεκριμένες περιοχές του όγκου ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωσή τους και να μειωθεί η έκθεση στο υπόλοιπο σώμα (Charles et al 2012).

3.3.δ Μικροέγχυση

Η μικροέγχυση είναι μία διαδικασία με την οποία εισάγονται ουσίες στο εσωτερικό των κυττάρων σε μικροσκοπικό ή οριακά μακροσκοπικό επίπεδο χρησιμοποιώντας μία γυάλινη πιπέτα και ένα εξειδικευμένο οπτικό μικροσκόπιο που ονομάζεται μικροεπεξεργαστής. Η κυτταρική και η πυρηνική μεμβράνη διαπερνάται με μια απλή μηχανική διαδικασία χρησιμοποιώντας βελόνα διαμέτρου 0,5-5 μm (<http://en.wikipedia.org/wiki/Microinjection>) Η τεχνολογία αυτή ωστόσο, είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και επίπονη ενώ προσβάλλει μικρό αριθμό κυττάρων ανά πείραμα. Νεότερες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί και απαιτούν λιγότερο χρόνο, είναι όμως πολύ ακριβείς (<http://www.lib.store.yahoo.net/lib/yhst-131428861332406/How to Choose the Optimal Gene Delivery Method.pdf> 1-10.).

3.3.ε Υπέρηχοι

Η μεταφορά των γονιδίων με την μεσολάβηση υπερήχων βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματική μέθοδος. Οι υπέρηχοι εφαρμόζονται σε μικροφουσαλίδες που περιέχουν τροποποιημένο πλασμίδιο. Τα αποτελέσματά του εξαρτώνται από την ποσότητα του DNA που έχει ενσωματωθεί, τον χρόνο εφαρμογής των κυμάτων υπερήχων, την συχνότητα, κλπ. (Cevher et al, 2012.) Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρόσδεση του πλασμιδίου σε κατιονικές μικροφουσαλίδες είναι πιο αποτελεσματική από ό,τι σε ουδέτερες μικροφουσαλίδες για την μεταφορά γονιδίων (Wang et al, 2012). Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αλλά με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα γνωστοί (Delalande et al, 2012). Στην Εικόνα 3.3 συνοψίζονται όλοι οι μη ιικοί φορείς.



Εικόνα 3.3 Μη ιικά μεταφορικά συστήματα γονιδίων (Manjila et al, 2014)

4 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Για την εμφάνιση του καρκίνου μπορεί να ενοχοποιηθεί η δυσλειτουργία ενός ή περισσότερων γονιδίων. Η γονιδιακή θεραπεία προσφέρει την δυνατότητα να αντιμετωπιστεί άμεσα η βασική αιτία εμφάνισης του καρκίνου μέσω της θετικής ή αρνητικής ρύθμισης των γονιδίων στόχων και ως εκ τούτου παρέχεται ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών για γονιδιακή θεραπεία (Kole et al, 2012 Li et al, 2006 Sonia and Verma, 2000). Τα θεραπευτικά γονίδια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στη γονιδιακή θεραπεία όπως γονίδια <<αυτοκτονίας>> ή γονίδια που προκαλούν ανοσοαπόκριση (όπως ανοσογόνα αντιγόνα και κυτοκίνες) έχουν σχεδιαστεί να σκοτώνουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα (Moolten, 1994).

Λαμβάνοντας υπόψη την γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται στους ανθρώπινους όγκους ειδικά στα τελικά στάδια εξέλιξης τους, η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να διακόπτεται από την παρεμβολή σηματοδοτικών μονοπατιών που να οδηγούν τελικά στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό ο <<γονιδιακός στόχος>> πρέπει να χρησιμοποιεί μονοπάτια που να είναι κεντρικά στην επιβίωση των κυττάρων έτσι ώστε να είναι δυνατόν να καταστραφούν τα καρκινικά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών (Maroelli et al, 1999, Yu et al 1996). Εκτός από την θανάτωση των κυττάρων-στόχων της γονιδιακής θεραπείας είναι δυνατή και η θανάτωση γειτονικών κυττάρων με

μεθόδους που περιλαμβάνουν τη μεταφορά τοξικού μεταβολίτη τοπικά μεταξύ των κυττάρων (Moolten, 1994) την καταστολή της αγγειογένεσης (Bouvet *et al*, 1998, Liu *et al* 1999) και την θανάτωση των κυττάρων που προκαλείται στα γειτονικά κύτταρα λόγω επαφής τους με κύτταρα που πεθαίνουν (Frank *et al*, 1998).

Παρακάτω παρατίθενται τα βασικά μονοπάτια τα οποία στοχεύονται αυτή τη στιγμή στις περισσότερες προκλινικές και κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

4.1 α Μονοπάτια επιδιόρθωσης

Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία πυροδοτεί μία σειρά από σηματοδοτικά μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA στα οποία πιθανόν οφείλεται η εγγενής αντίσταση που παρουσιάζουν πολλοί ασθενείς στην ακτινοθεραπεία (Chen *et al*, 2005, Fischer and Meese, 2007, Kauffmann *et al* 2008, Munshi *et al*, 2005 Rass and Reichrach, 2008).

Είναι γνωστό ότι τα μονοπάτια ομόλογου και μη ομόλογου ανασυνδυασμού εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA που έχει εκτεθεί σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ώστε να αναπτυχθεί μία στρατηγική γονιδιακής θεραπείας που να παρεμβαίνει στα βασικά επιδιορθωτικά μονοπάτια θραύσης και των δύο αλυσίδων του DNA (DSB). Την τελευταία δεκαετία έχουν χρησιμοποιηθεί siRNAs που καταστέλλουν την έκφραση των BRCA2 και Rad51 (Li *et al*, 2003, Yu *et al*, 2008) καθώς επίσης και των Ku70 και Ku80 (Li *et al*, 2003, Nimura *et al*, 2007) τα οποία συμμετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης με ομόλογο και μη ανασυνδυασμό αντιστοίχως. Πρόσφατα για την ευαισθητοποίηση των όγκων στη ακτινοθεραπεία έχουν χρησιμοποιηθεί μικρά, τροποποιημένα, δίκλωνα, μόρια DNA (siDNA) τα οποία μιμούνται την DSB βλάβη, στρατολογώντας το Ku70/ Ku80/ DNA-PKcs σύμπλοκο επιδιόρθωσης. Η DNA-PK κινάση φωσφορυλιώνει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA όπως οι H2AX, Rpa32, Chk1, Chk2, Nbs1, και η p53 με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η επιδιόρθωση του DNA (Berthault *et al.*, 2011, Quanz *et al.*, 2009).

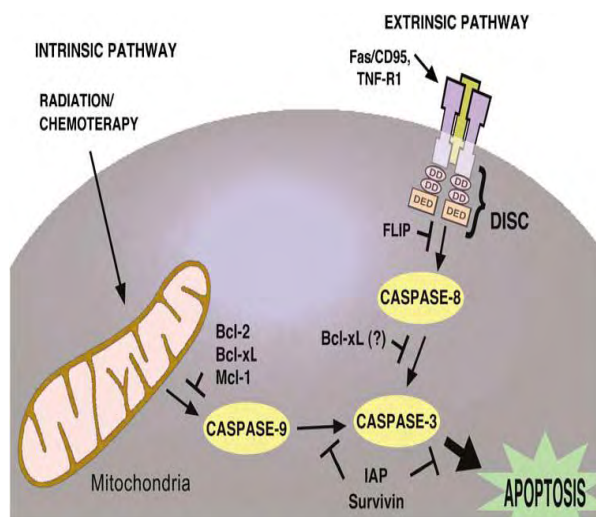
Θεραπείες επιδιόρθωσης γονιδίου σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία έχουν χρησιμοποιηθεί και σε περιπτώσεις αναστολής του μονοπατιού επιδιόρθωσης-αφαίρεσης μίας βάσης (BER) που είναι υπεύθυνη για επιδιόρθωση του DNA που έχει υποστεί οξειδωση ή αλκυλίωση.

Εμβολιασμός όγκου με αδenoϊό Ad5/F35 φορέα που εκφράζει siRNA ενάντια στην ανθρώπινη απουρινική / απυριμιδινική ενδονουκλεάση (APE1), ένα σημαντικό ένζυμο στο μονοπάτι BER, σε συνδυασμό με ακτινοβολία είχε σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων σε καρκίνο του παχέος εντέρου (Xiang et al., 2008). Έχει επίσης φανεί ότι η αναστολή της πολυ (ADP-ριβόζη) πολυμεράσης-1 ένζυμο, το οποίο παίζει ζωτικό ρόλο στη σηματοδότηση για DNA-βλάβη και στην ρύθμιση του BER μονοπατιού, βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των ασθενών με BRCA1 ή BRCA2 μετάλλαξη σε κύτταρα όγκων (Ratnam and Low, 2007).

4.1β Μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση

Ο δεσμός που συνδέει την διαδικασία της απόπτωσης με τους μηχανισμούς κυτταρικής επιτήρησης, (δηλαδή, τα σημεία ελέγχου) παρέχει προστασία έναντι της ανάπτυξης καρκίνου (Hanahan and Weinberg, 2000). Απορρύθμιση στα μονοπάτια της απόπτωσης (Henggartner, 2000) με παράλειψη καταστροφής κυττάρων που φιλοξενούν κάποια βλάβη στο DNA, ιικές μολύνσεις, ή ανωμαλίες στη μιτωτική άτρακτο συνδέονται με την έναρξη και την εξέλιξη καρκίνου (Reed, 1999), και μεταλλάξεις σε προαποπτωτικά γονίδια μπορούν να προσδώσουν αυξημένη διήθηση στον όγκο και αντίσταση στην θεραπεία (Soengas et al, 2001). Στην Εικόνα 4.1 απεικονίζονται σχηματικά τα αποπτωτικά μονοπάτια που μπορούν να γίνουν στόχοι της γονιδιακής θεραπείας. Μεταξύ

των ρυθμιστικών μορίων των μονοπατιών της απόπτωσης, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 εμπλέκονται στον έλεγχο της μιτοχονδριακής ομοιόστασης, κυρίως για απελευθέρωση κυτοχρώματος C (Kroemer and Reed, 2000), ενώ τα μέλη της οικογένειας του αναστολέα της



Εικόνα 4.1: Πρωτεΐνες κλειδιά που συμμετέχουν στην απόπτωση και μπορούν να στοχευτούν στην γονιδιακή θεραπεία (Pai et al, 2006)

απόπτωσης (IAP) ελέγχουν στον κυτταρικό θάνατο την καταστολή της επεξεργασίας και της καταλυτικής δραστηριότητας των κασπασών, που είναι οι εκτελεστές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των κυττάρων (Deveraux and Reed, 1999). Ο ρόλος των IAP πρωτεϊνών στον καρκίνο έχει επισημανθεί πρόσφατα με την ταυτοποίηση του γονιδίου της Survivin (Ambrosini et al, 1997). Η Survivin είναι ένα δομικά μοναδικό μόριο της οικογένειας των IAP πρωτεϊνών που

εκφράζεται κατά την μίτωση με ένα κυκλο- εξαρτώμενο τρόπο και αποτελεί βασικό συστατικό της μιτωτικής συσκευής (Li et al, 1998) . Η αυξημένη έκφραση αυτής της πρωτεΐνης που παρατηρήθηκε στα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα της οποίας τα επίπεδα ήταν πολύ χαμηλά (Ambrosini et al, 1997, Valculescu et al, 1999) πιθανόν να ευθύνεται για την αναστολή της απόπτωσης και του ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης (Reed and Bischoff, 2000). Σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές η παρουσία της Survivin συσχετίστηκε με μειωμένους αποπτωτικούς δείκτες *in vivo*, αυξημένη συνολική επιβίωση κυττάρων, κακή πρόγνωση, καθώς και αυξημένους ρυθμούς υποτροπής (Monzo et al, 1999, Swana et al, 1999, Tanaka et al, 2000, Adida et al, 2000, Kato et al, 2001). Μοριακοί ανταγωνιστές της Survivin συμπεριλαμβανομένου αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων ή έκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής με ανασταλτική δράση (dominant negative mutant) οδηγούν σε αυθόρμητη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Li et al, 1999, Chen et al, 2000), και *in vivo* (Grossman et al, 2001), και ενίσχυση του χημο-επαγόμενου κυτταρικού θανάτου (Olie et al, 2000).

Σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός με απώλεια ικανότητας αντιγραφής που κωδικοποιεί μία φωσφορυλιωμένη ελαττωματική survivin με Thr34 → Ala μετάλλαξη (pAd - T34A) προκάλεσε αυθόρμητη απόπτωση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, χωρίς τοξικότητα για τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα και ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου σε τρία μοντέλα ξενομοσχεύματος καρκίνου του μαστού, *in vivo*. Φορείς- αδενοϊοί που στοχεύουν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και / ή της απόπτωσης έχουν ερευνηθεί ως προς την καταλληλότητα τους για γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου μόνοι τους ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της (Schreiber et al, 1999, Gurnani et al, 1999, Arafat et al, 2000, Griffith et al, 2000, Steinwaerder et al, 2001). Σε αυτό το πλαίσιο, υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα με την χρήση ενός ογκολυτικού επιλεκτικά αντιγραφόμενου αδενοϊού (ONYX-015) από τον οποίο έχει αφαιρεθεί το γονίδιο E1B (Bischoff et al, 1996), ως αγωγή σε ασθενείς με καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με χημειοθεραπεία (Khuri et al, 2000). Παρόμοια παραδείγματα είναι επίσης η ενδοογκική μεταφορά του WT αδενοϊού που κωδικοποιεί την p53 σε ασθενείς με μη –μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα για την αποκατάσταση του σημείου ελέγχου των λειτουργιών της απόπτωσης ή/και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου (Swisher et al, 1999, Weill et al, 2000) . Η αδενοϊική στόχευση του μονοπατιού της survivin μπορεί να είναι κατάλληλη για γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι, η έκφραση της pAd - T34A ήταν επαρκής να επάγει άμεσα απόπτωση σε πέντε διαφορετικούς τύπους

καρκινικών κυττάρων χωρίς να είναι απαραίτητη η ακεραιότητα του μονοπατιού της p53 και χωρίς να επηρεάζεται από την έκφραση άλλων αναστολέων απόπτωσης σε κύτταρα του όγκου. Επίσης, ο αριθμός των κυττάρων που μπήκαν σε απόπτωση επαγόμενη από Pad- T34A ήταν συγκρίσιμος με την ταξόλη και πολύ πιο μεγάλος από την αντριαμυκίνη, βασικά χημειοθεραπευτικά στον καρκίνο. Τρέχοντα πρωτόκολλα για γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου συνήθως περιλαμβάνουν και χημειοθεραπεία. Πολλά δεδομένα δείχνουν ότι χορήγηση pAd - T34A με ταξόλη, ενισχύει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, και ίσως το σημαντικότερο, η έκφραση της pAd - T34A δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων.

Για την αντικαρκινική δράση της PAD - T34A *in vivo*, χρησιμοποιήθηκαν ζωικά μοντέλα με πλήρη ανοσοανεπάρκεια. Σε ένα πρώτο μοντέλο ξеноμοσχεύματος όγκου, όλα τα ζώα που έλαβαν κύτταρα MCF- 7(καρκινικά κύτταρα μαστού) μολυσμένα *ex vivo* με pAd - T34A δεν δημιούργησαν όγκους για 21 ημέρες. Στη συνέχεια άρχισαν να αναπτύσσονται αργά μικροί όγκοι σε 8 από τα 15 ζώα που εξετάστηκαν. Αυτό πιθανόν να ωφείλεται στον αναμενόμενο χρόνο ημιζωής των αδενοϊικών φορέων *in vivo* (Hamada et al, 1996) ή εναλλακτικά στην εκ νέου είσοδο των MCF-7 κυττάρων, στον κυτταρικό κύκλο. Σε ένα δεύτερο μοντέλο ξеноμοσχεύματος χορηγήθηκε ενδο-ογκικά ένεση Pad- T34A η οποία ανέστειλε την ανάπτυξη των ήδη παρόντων όγκων κατά περίπου 40 % (Nielsen et al, 1997, Heise et al, 1999). Αναλύσεις των αποτελεσμάτων έδειξαν ότι η αναστολή ανάπτυξης των όγκων ωφείλεται σε μαζική απόπτωση *in situ* και στην απώλεια των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, εξηγώντας έτσι την μείωση της ανάπτυξης του όγκου.

Συνοπτικά, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι Pad- T34A μπορεί να παρέχει μια νέα προσέγγιση για γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο, προάγοντας επιλεκτικά την κυτταρική απόπτωση των κυττάρων του όγκου, χωρίς να επηρεάζει τους φυσιολογικούς ιστούς, και ενδεχομένως ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (Nicholson, 2000).

4.1γ Μονοπάτια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία με την οποία νέα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από προϋπάρχοντα αγγεία και περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ), τη μετανάστευση, και τον κατακερματισμό της

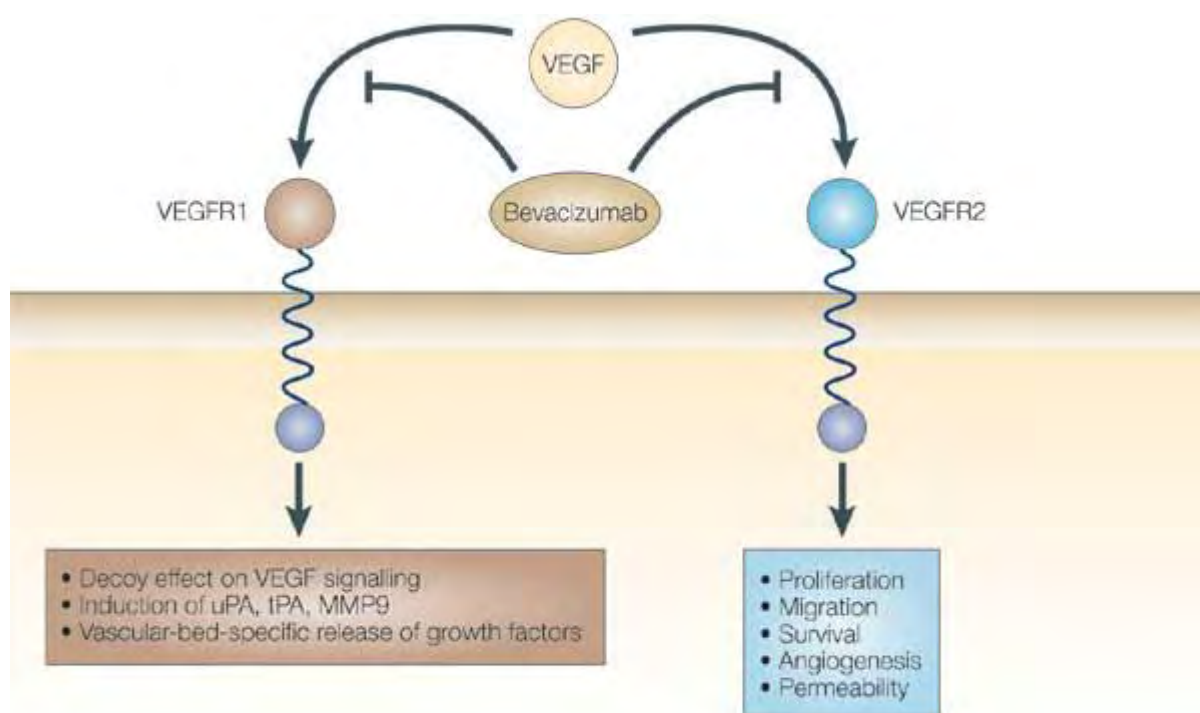
βασικής μεμβράνης για τον σχηματισμό νέου αυλού (Volpert et al, 1997). Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκληθεί ως απόκριση στην φυσιολογική ανάπτυξη σε υποξικές συνθήκες, σε τραυματισμούς, και νεοπλασίες. Ο σχηματισμός νέων αγγείων ενορχηστρώνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και αιμοπετάλια τα οποία αποκρίνονται σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, πρωτεΐνες και πρωτεολυτικά ένζυμα (Folkman J, Klagsbrun 1987, Ribatti et al, 2000).

Η αγγειογένεση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Προκειμένου, τα κύτταρα του όγκου να ξεκινήσουν την αγγειογένεση, αναπτύσσουν αρχικά αγγειογενετικό φαινότυπο μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται "αγγειογενετικός διακόπτης" (Bergers and Benjamin, 2003). Αυτός ο «διακόπτης» προωθεί την ογκογονικότητα των κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης των ογκογονιδίων, αρνητικής ρύθμισης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και έκφρασης/σηματοδότησης αγγειογενετικών μονοπάτιων (Dameron et al, 1994 , Satchi-Fainaro et al, 2004 , Takano et al, 2010).

Κάθε στάδιο της αγγειογένεσης παρέχει μια ευκαιρία για θεραπευτική παρέμβαση . Η αγγειογένεση η οποία επάγεται κυρίως από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) αποτελεί νέο στόχο για θεραπεία στον καρκίνο. Στις στρατηγικές που βασίζονται στην αναστολή της αγγειογένεσης περιλαμβάνονται η αναστολή της οδού σηματοδότησης του VEGF , η αναστολή της σύνδεσης μεταξύ του VEGF και των υποδοχέων του και η αναστολή της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος του VEGF (Kaliberon et al , 2005, Shi et al , 2003, Yang et al, 2002). Άλλοι προ-αγγειογενετικοί παράγοντες που υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση για αναστολή της αγγειογένεσης είναι ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF), ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF), αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF), αγγειοποιητίνες, και πολλές χημειοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας CXC χημειοκινών. Εναλλακτικά επιδιώκεται η θετική ρύθμιση παραγόντων που αναστέλλουν την αγγειογένεση, όπως: η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), η ενδοστατίνη και η αγγειοστατίνη (Sathornsumetee et al, 2008, Takano et al, 1996).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μεταξύ των μορίων- στόχων που απαριθμούνται, ένα από τα πιο καλά μελετημένα είναι ο VEGF, ο οποίος χρησιμοποιείται και στην κλινική πράξη στη θεραπεία του γλοιώματος. Πιο συγκεκριμένα, έχει εγκριθεί η εφαρμογή ενός εξανθρωπισμένου μονοκλωνικού αντισώματος (bevacizumab) το οποίο δεσμεύει το VEGF -A για να εμποδίσει την ενεργοποίηση του υποδοχέα (Εικόνα 4.2). Το bevacizumab ήταν ο πρώτος κλινικά διαθέσιμα αναστολέας αγγειογένεσης , που

φαίνεται να επιβραδύνει την ανάπτυξη του όγκου και να παρατείνει τη μέση επιβίωση των ασθενών (Los et al, 2007 , Rini BI and Rathmell, 2007). Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε το bevacizumab να χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις γλοιοβλαστώματος με μειωμένη ανταπόκριση ή ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε άλλες θεραπείες. Εκτός από τους όγκους του ΚΝΣ, το bevacizumab είναι εγκεκριμένο από τον FDA για παράλληλη χρήση με άλλα φάρμακα ή θεραπείες για θεραπεία σε μεταστατικού καρκίνου των νεφρών και του παχέος εντέρου και σε ορισμένες περιπτώσεις μη - μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Los et al, 2007).



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 4.2: Μηχανισμός αναστολής αγγειογένεσης μέσω ενός μονοκλωνικού αντι- VEGF αντισώματος(http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n12/fig_tab/nrd1601_F1.html)

Μια ακόμα προσέγγιση στόχευσης του VEGF, είναι για παράδειγμα , με τη χρήση τόσο ιικών όσο και μη ιικών φορέων που να κωδικοποιούν τον διαλυτό υποδοχέα του VEGF. Θεραπεία με χορήγηση αδενοϊού που κωδικοποιεί τον sKDR , κάτω από τον έλεγχο του ανθρώπινου VEGF υποκινητή, είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αναστολή πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων αγγειακών ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων. In vivo μελέτες έχουν δείξει σημαντική αναστολή ανάπτυξης όγκων DU145 σε ποντίκια που έλαβαν συνδυασμό ακτινοθεραπείας και διαμόλυνσης

με AdVEGF-sKDR (Kaliberon et al, 2005). Άλλες ιατρικές θεραπείες με αντιαγγειογενετική δραστηριότητα περιλαμβάνουν την χρήση μορίων- αναστολέων κινασών. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις θεραπείες βρίσκονται στο στάδιο κλινικών δοκιμών και δεν έχουν εγκριθεί ακόμα για χρήση.

Παρόλα αυτά σε ογκούς στους οποίους επικρατεί υποξία παρατηρείται αντίσταση σε αντιαγγειογενετικές θεραπείες (Takano et al, 2010). Η υποξία επάγει θετική ρύθμιση του διεγέρσιμου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF1α), ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά τον VEGF. Ως εκ τούτου, οι αντι-VEGF θεραπείες μπορεί να μην λαμβάνουν υπόψη την έκφραση αυτού του παράγοντα σε υποξικές περιοχές. Ως εκ τούτου, είναι σαφές ότι θεραπείες μονόπλευρες που εστιάζουν μόνο σε ένα μόριο οδηγούν τελικά σε αντίσταση στις αντι-αγγειογενετικές θεραπείες (Gatson et al, 2012).

4.2 Διόρθωση γονιδίου

Η γονιδιακή θεραπεία που βασίζεται στην αντικατάσταση ενός ελαττωματικού γονιδίου περιλαμβάνει την χρήση ιικών φορέων που θα επαναφέρουν την λειτουργία του <<άγριου τύπου>> γονιδίου για διόρθωση του φαινοτύπου. Ωστόσο, στην προσέγγιση αυτή υπάρχουν στοιχειομετρικοί περιορισμοί που δεν επιτρέπουν την διόρθωση όλων των μεταλλαγμένων γονιδίων που βρίσκονται στο κάθε καρκινικό κύτταρο. Μπορούν παρόλα αυτά να χρησιμοποιηθούν κοινές μεταλλάξεις όπως η καταστολή της p53 ή του πρωτοογκογονιδίου KRas ως θεραπευτικοί στόχοι (Kerr, 2003).

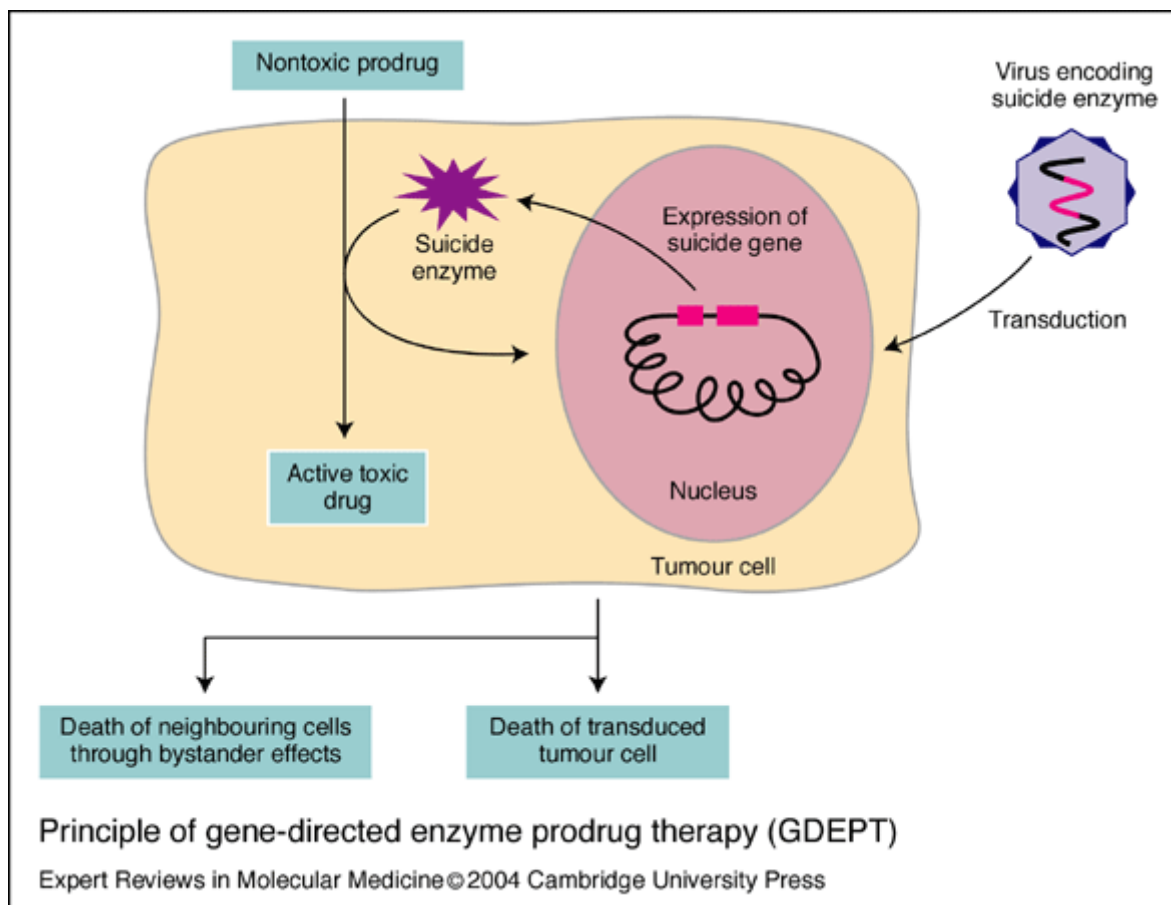
Υπάρχουν *in vivo* και *in vitro* δεδομένα που δείχνουν ότι έκθεση καρκινικών κυττάρων σε ανασυνδυσμένο αδενοϊό που κωδικοποιεί την άγριου τύπου p53 είχαν εμφανή μείωση του πολλαπλασιασμού τους ενώ σε πειραματικές μελέτες με ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς που φέραν ξενομόσχευμα του όγκου και τους έγινε ενδοογκική έγχυση αντίστοιχου αδενοϊού είχαν αυξημένη επιβίωση (Harris et al, 1996). Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι αντικατάσταση της p53 ευαισθητοποίησε τα κύτταρα σε κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως η 5- φλουουρακίλη (5-FU), ενδεχομένως λόγω ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών (Opalka et al, 2002). Προκλινικές τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να χορηγηθούν αδενοϊοί που κωδικοποιούν την p53 χωρίς ιδιαίτερη τοξικότητα και αναστολή ανάπτυξης των φυσιολογικών κυττάρων (Venook et al, 1998).

4.3 Ογκολυτική ιοθεραπεία

Εδώ και τρείς δεκαετίες κλινικών δοκιμών έχει χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα εξασθενημένων ογκολυτικών ιών (με ικανότητα αντιγραφής) όπως αδενοϊοί, ο ιός της δαμαλίτιδας και της παρωτίτιδας, μυξοϊοί και ο ιός του Δυτικού Νείλου για θεραπεία κατά του καρκίνου (Kirn and McCormick, 1996). Οι ειδικοί αυτοί ιικοί φορείς σκοτώνουν εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα και πλεονεκτούν έναντι άλλων προσεγγίσεων γονιδιακής θεραπείας λόγω της ικανότητας αύξησης του αριθμού τους μέσα στα μολυσμένα κύτταρα και στην δυνατότητα των ιικών απογόνων να μολύνουν και να καταστρέφουν μέσω λύσης γειτονικά κύτταρα μέσα στην μάζα του όγκου (Kaliberon and Buchsbaum 2012). Η κατανόηση των ιικών γονιδίων που είναι απαραίτητοι για την αντιγραφή, οδήγησε σε επιτυχείς προσπάθειες κατασκευής ιών με εκλεκτικότητα αντιγραφής μόνο σε κύτταρα του όγκου (Kerr, 2003). Έλλειψη του αδενοϊκού γονιδίου E1A-CR2 το οποίο αδρανοποιεί τα μέλη της οικογένειας RB, προσδίδει επιλεκτικότητα αντιγραφής του ιού σε καρκινικά κύτταρα με ελαττωματικό το RB μονοπάτι (Smith and Chiocca, 2000). Με απώλεια του E1B γονιδίου το οποίο φυσιολογικά προσδένεται και αναστέλλει την p53 σε σύμπλοκο με την E4ORF6 πρωτεΐνη παράγεται ένας αδενοϊός (dl1520), ο οποίος προτιμά να αντιγράφεται σε κύτταρα καρκινικά με μεταλλάξεις ή έλλειψη της p53 (Bischoffel et al, 1996). Ο dl1520 ιός μπορεί να παρουσιάσει κάποια p53 ανεξάρτητη ικανότητα αντιγραφής αλλά γενικά υπάρχει μία σταθερή και σημαντική καταστροφή καρκινικών κυττάρων έναντι των φυσιολογικών (Kerr, 2003). Ο παραπάνω ιός έχει χορηγηθεί σε περισσότερους από 300 ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου (όπως σε πνεύμονα, κεφάλι και τράχηλο). Σε κλινικές δοκιμές καρκίνου του παχέως εντέρου (CRC) στις οποίες χορηγήθηκε ο dl1520 ιός σε ηπατικά μεταστατικά CRC οζίδια φάνηκε ότι ήταν δυνατή η μεταφορά του dl1520 ιού και ασφαλής και θα μπορούσε να συνδυαστεί με την συμβατική χημειοθεραπεία in vivo παρά την ισχυρή ανοσοαπόκριση του ξενιστή (Kerr, 2003). Ένας άλλος ογκολυτικός ιός ο G207, ο οποίος είναι ένας εξασθενημένος HSV ιός με ικανότητα αντιγραφής, που στερείται και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου ICP34.5 (RL1) και περιέχει ένα ένθεμα LacZ μέσα στο ICP6 (UL39) γονίδιο, δίνει μια νέα τροπή στη θεραπεία του καρκίνου λόγω της ικανότητας του να αντιγράφεται επιλεκτικά εσωτερικά και να προκαλεί λύση των καρκινικών κυττάρων με ελάχιστη τοξικότητα για τους φυσιολογικούς ιστούς. Ο G207 αναστέλλει σημαντικά μόνος του ή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία την αύξηση του όγκου σε ανθρώπινους καρκίνους κεφαλής και τραχήλου και σε όγκους του προστάτη σε μοντέλα ξеноμοσχεύματος (Kim et al, 2005, Walker et al, 1999).

4.4 Μοριακή Χημιοθεραπεία (θεραπεία «αυτοκτονίας»)

Μία από τις προσεγγίσεις της γονιδιακής θεραπείας που ερευνάται εκτενώς είναι αυτή της μοριακής χημιοθεραπείας ή αλλιώς «ενζυμική θεραπεία γονιδιοστοχευμένης αυτοκτονίας» (GDEPT). Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει την μεταφορά ενός ένζυμου που έχει κυτταροτοξική δράση η οποία προέρχεται από μετατροπή ενός ανενεργού προφαρμάκου σε έναν τοξικό για τα κύτταρα μεταβολίτη (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Πιο συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα μετασχηματίζονται με φορείς που περιέχουν γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο το οποίο όταν μεταγράφεται μπορεί να μετατρέψει ένα ανενεργό μη τοξικό προφάρμακο σε μία δραστική κυτταροτοξική ουσία (Εικόνα 4.3) (Kerr, 2003). Η στοχευμένη έκφραση του ενζύμου αποτρέπει την συστηματική τοξικότητα και οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου μόνο μέσα στον όγκο. Βασική προϋπόθεση στην μοριακή χημιοθεραπεία είναι το ενεργό ένζυμο να απουσιάζει ή να εκφράζεται ελάχιστα σε κύτταρα θηλαστικών, ώστε να περιορίζεται η ενζυμική δράση μόνο στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί και στα γειτονικά κύτταρα που περιβάλλουν τον όγκο, μέσω διάχυσης του μεταβολίτη φαρμάκου, εμφανίζοντας έτσι το «φαινόμενο γειννίαςσης»(Bystander effect) (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Βασικά σημεία είναι επίσης το αρχικά ανενεργό προφάρμακο να είναι τελείως αδρανές, η δραστική κυτταροτοξίνη που θα προκύπτει να είναι βραχύβια (με λίγα sec χρόνο ημιζωής) και να μπορεί να διαχέεται από τα κύτταρα χωρίς όμως να εισέρχεται στην κυκλοφορία και να προκαλεί παρενέργειες (Kerr, 2003).



Εικόνα 4.3: Μηχανισμός δράσης θεραπείας αυτοκτονίας

(http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_18/S146239940400818Xsup008.htm)

4.4 α δεαμινάση της κυτοσίνης/ 5 φλουοκυτοσίνη

Ένα από τα πιο ελπιδοφόρα συστήματα μοριακής χημειοθεραπείας είναι αυτό της δεαμινάσης της κυτοσίνης/ 5 φλουοκυτοσίνη (CD/5-FC) που έχει μελετηθεί διεξοδικά την τελευταία δεκαετία. Το CD είναι ένα ένζυμο που περιέχεται στην ζύμη ή σε βακτήρια και έχει την ικανότητα να μετατρέπει τον αντιμυκητιακό παράγοντα 5 FC σε έναν ισχυρό χημειοθεραπευτικό παράγοντα τον 5- φλουουρακίλη (5- FU). Βασικό στοιχείο είναι ότι το ένζυμο CD βρίσκεται μόνο στους προκαρυώτες και τους μύκητες αλλά όχι στους ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Ο αντιμυκητιακός παράγοντας 5- FC χρησιμοποιείται κυρίως για την θεραπεία μόλυνσης από κρυπτόκοκκο και Candida και απαιτεί την δράση του μυκητιακού ενζύμου CD. Ο 5-FU είναι ένας ανταγωνιστής πυριμιδινών στον οποίο το άτομο υδρογόνου στην C-5 θέση της ουρακίλης αντικαταστάθηκε με φθόριο. Δεδομένου ότι η δομή του 5-FU είναι παρόμοια με εκείνη της ουρακίλης, ο 5-FU μπορεί να μετατραπεί σε βιολογικά δραστικούς μεταβολίτες όπως, 5-φθορο-2'-δεοξουριδίνη 5'-μονοφωσφορικό

(FdUMP) ή 5 -φθοροουριδίνης 5'-τριφωσφορική καθώς και να μεταβολίζεται σε μία αδρανή μορφή, όπως 5-φθορο-β-αλανίνη, αμμωνία, και CO₂, από τις ίδιες αναβολικές και καταβολικές οδούς, όπως εκείνες που ακολουθεί η ουρακίλη. Η τριφωσφορική 5-φθοροουρακίλη ενσωματώνεται σε RNA και παρεμβαίνει στην επεξεργασία του, ενώ η FdUMP σχηματίζει σύμπλοκα τα οποία διακόπτουν τελικά την σύνθεση DNA. Το γονίδιο *codA* που κωδικοποιεί το βακτηριακό CD (BCD) ένζυμο έχει κλωνοποιηθεί από *Escherichia coli* σε φορείς ευκαριωτικής έκφρασης και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για GDEPT in vitro σε ινοβλάστες ποντικού πριν από δύο σχεδόν δεκαετίες (Mullen et al, 1994).

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μοριακής χημειοθεραπείας με CD/5-FU είναι η ισχυρή επίδραση του στα γειτονικά κύτταρα καθώς η 5-FU είναι ένα μικρό μη φορτισμένο μόριο το οποίο μπορεί να διαχέεται και να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες (Hoganson et al, 1996, Nishihara et al, 1998, Trinh et al, 1995). Το φαινόμενο γεινίασης μπορεί να θεωρηθεί ως διεύρυνση της κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα καθώς τα μη μετασχηματισμένα γειτονικά κύτταρα μπορούν να σκοτωθούν μέσω της μεταφοράς του 5-FU μεταβολίτη από γειτονικά κύτταρα που εκφράζουν το CD ένζυμο. Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και αν λίγα μόνο καρκινικά κύτταρα εκφράζουν το CD γονίδιο μπορεί να επιτευχθεί η εξάλειψη του όγκου. Το φαινόμενο της γεινίασης είναι πολύ σημαντικό καθώς, καθίσταται δύσκολη η επιμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς που περιέχουν το CD γονίδιο. Γενικά, οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στους θεραπευτικούς παράγοντες που σχετίζονται με την κυτταροτοξικότητα μπορούν να διακριθούν σε 2 ομάδες, στην τοπική ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης και στην απομακρυσμένη δραστηριότητα γεινίασης. Το φαινόμενο γεινίασης μπορεί να εμφανιστεί είτε μέσω διάχυσης ενός διαλυτού χημειοθεραπευτικού φαρμάκου όπως, το 5-FU για να θανατωθούν και τα γειτονικά κύτταρα (Huber et al, 1994, Kuriyama et al., 1998), είτε μέσω μεταφοράς του τοξικού προϊόντος μεταξύ των διακενών (Dilber et al., 1997; Elshami et al., 1996) ή μέσω αποπτωτικών μηχανισμών (Freeman et al, 1993).

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του συστήματος CD/5-FU βασίζεται σε κλινικές και προκλινικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι εκτός από θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να συμβάλλει και στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην ακτινοβολία (Kambara et al, 2002, Kievit et al, 2000, Kim et al, 1998). Ενδογενείς διαφορές ως προς την ευαισθησία για το 5-FU και την ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να συμβάλλει στην συνολική αποτελεσματικότητα της μοριακής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι (Lawrence et al, 1997, Miller and Kinsella, 1992). Ο 5-FU φαίνεται ότι προκαλεί

κυτταρικό θάνατο στην φάση S της κυτταρικής διαίρεσης όταν τα κύτταρα εμφανίζουν μια σχετική ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία (McGinn and Lawrence, 2001). Επιπλέον, ο συνδυασμός ευαισθητοποίησης κυττάρων στην ακτινοβολία και η αξιοποίηση του 5-FU μπορεί να έχει αποτέλεσμα σε κύτταρα που προχωρούν λανθασμένα στην φάση S λόγω μη σωστής επιδιόρθωσης της DNA βλάβης που προκλήθηκε από την ιονίζουσα ακτινοβολία. Η απώλεια ελέγχου της φάσης S στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να παρέχει και την μοριακή βάση για επιλεκτικό θάνατο των καρκινικών μόνο κυττάρων (Davis et al, 1995, Lawrence et al, 1996).

Αναλύσεις καμπυλών επιβίωσης έχουν δείξει σημαντικά αποτελέσματα μείωσης των καρκινικών κυττάρων όταν χρησιμοποιείται η 5-FU θεραπεία με υψηλής έντασης ακτινοβολία (Pederson et al, 1997, Stackhouse et al, 2000). Επιπρόσθετα σε προκλινικές μελέτες που έχει χρησιμοποιηθεί CD ένζυμο ζύμης αλλά και σε κλινικές μελέτες, σε άτομα με καρκίνο του προστάτη στους οποίους χορηγήθηκε αδενοϊός με ικανότητα αντιγραφής που εκφράζει το CD ένζυμο και χρήση ακτινοβολίας τα αποτελέσματα ήταν θετικά (Freytag et al, 2002, 2007).

4.4.β Κινάση θυμιδίνης (TK)/ ganciclovir

Ένα άλλο καλά μελετημένο σύστημα γονιδίου «αυτοκτονίας» / προφαρμάκου για θεραπεία κατά του καρκίνου είναι η χρήση κινάσης θυμιδίνης του απλού έρπητα HSV με αντιικά φάρμακα όπως το ganciclovir ή ανάλογα του (όπως το acyclovir και valacyclovir) (Eastam et al, 1996). Η κινάση θυμιδίνης φωσφορυλιώνει το ganciclovir και παράγεται το φωσφο-ganciclovir το οποίο μεταβολίζεται επιπλέον από κινάσες σε τριφωσφορικό το οποίο αναστέλλει την σύνθεση DNA λόγω ανταγωνισμού με το dGTP (Kerr, 2003). Η ενσωμάτωση του στις θέσεις γουανίνης στις νεοσχηματιζόμενες αλυσίδες DNA προκαλεί πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης και εκλεκτικό θάνατο των διαιρούμενων κυττάρων με αποπτωτικούς μηχανισμούς (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Μελέτες σε ποντικούς έχουν δείξει ότι υπάρχει έντονο το φαινόμενο της γεινίασης στη θεραπεία με ganciclovir καθώς, η ανάπτυξη του όγκου μειώθηκε σημαντικά σε μοντέλα ποντικών με καρκίνο του παχέως εντέρου (CRC) παρόλο που μόνο στο 10% των κυττάρων εκφράζονταν η HSV-TK (Burrows et al, 2002).

Σε κλινικές μελέτες φάσης I η χορήγηση αντιγραφόμενου- ελλειματικού αδενοϊού που κωδικοποιεί την HSV-TK πρωτεΐνη σε οζίδια CRC σε συνδυασμό με σταδιακή χορήγηση ganciclovir ολοκληρώθηκε με ήπιες σχετικά παρενέργειες και αν και δεν υπήρχε αντικειμενική ανταπόκριση του όγκου, ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών

ήταν 11-15 μήνες έναντι των μαρτύρων που ο μέσος όρος επιβίωσης ήταν 9-12 μήνες (Sung et al, 2001).

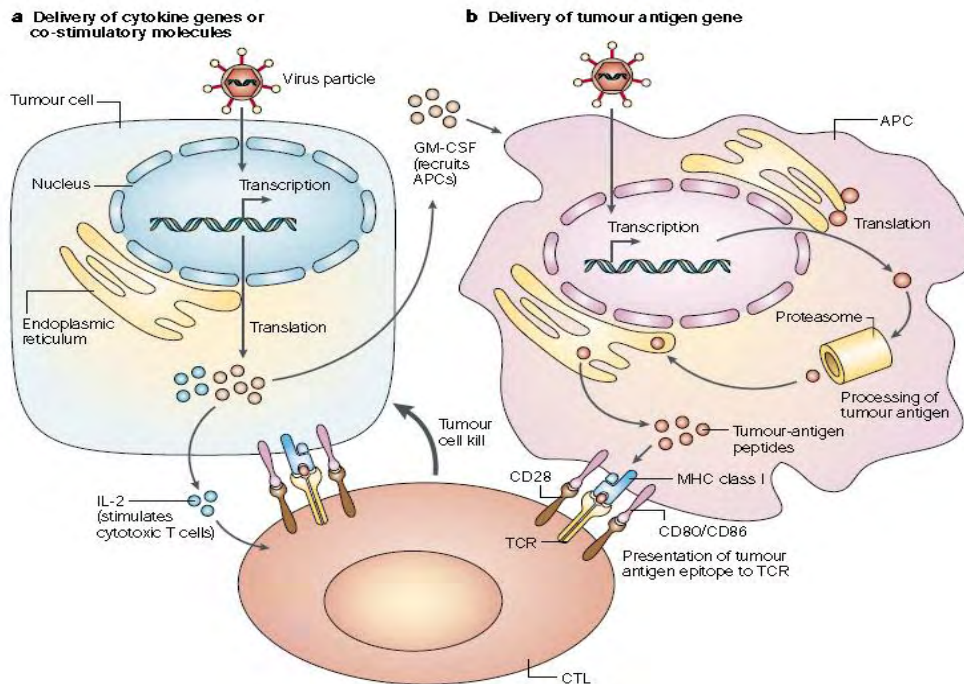
4.5 Ανοσορύθμιση

Η ανοσοθεραπεία βασίζεται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ενάντια στα καρκινικά κύτταρα με την συμμετοχή κυτοκινών και ενεργοποιημένων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Η ανοσορύθμιση αντιπροσωπεύει μία προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου στην οποία επαγωγή αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης οδηγεί στην θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν μία σειρά από μοναδικές ιστοειδικές πρωτεΐνες που μπορούν δυνητικά να λειτουργήσουν ως αντιγόνα-στόχοι για γονιδιακή ανοσοθεραπεία (Kaliberon and Buchsbaum 2012). Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός των ογκοσυσχετιζόμενων πρωτεϊνών που μπορεί να αναγνωρισθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων δείχνοντας έτσι ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλή ανοσογονικότητα. Πολλά στοιχεία αποδεικνύουν και δείχνουν ότι η ακτινοβολία μπορεί να επάγει φλεγμονή και έκφραση προφλεγμονοδών κυτταροκινών του ξενιστή όπως της IL1b και του TNFα μέσω της ρύθμισης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Apetoh et al, 2007, Hallahan et al 1989, Ishihara et al, 1993).

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί προσεγγίσεις που βασίζονται στα δενδριτικά κύτταρα (Chakravarty et al, 1999, Demaria et al, 2004, Nikitina and Gabilovich, 2001, Teich-Tennenbaum et al, 2003), στην στόχευση toll-like διαμεμβρανικών υποδοχέων με CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια (Jahrsdarker and Weiner, 2008, Kriegs, 2004, Mason et al, 2005, Yuan et al 2011), στον εμβολιασμό τροποποιημένων αυτόλογων κυττάρων του όγκου (Chakraborty et al, 2004, Lumnitzky et al, 2002) και στις κυτοκίνες.

Στις ανοσογονιδιακές μεθόδους βασικός στόχος είναι εκτός από τοπική ανοσοαπόκριση, να παράγεται και ένα γενικό σήμα ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού που να μπορεί να ενισχύεται και να διαδίδεται μέσω της διακίνησης λεμφοκυττάρων από το αγγειακό σύστημα και τους ιστούς, ώστε τα καρκινικά κύτταρα να εκτίθενται στον κυτταροτοξικό παράγοντα ακόμα και σε θέσεις απομακρυσμένες από την περιοχή του εμβολιασμού του γονιδιακού φορέα. Γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η παρουσία κυτοκινών (Kerr,2003). Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που παράγονται μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων ή άλλων κυττάρων και χρησιμοποιούνται στην ανοσοθεραπεία για να

ενισχύσουν τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς απευθείας ενάντια στους όγκους. Οι κυτοκίνες μπορούν να επάγουν ένα καταρράχτη ενεργοποίησης πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού και να αυξήσουν την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση. Η ιντερλευκίνη 2 (IL₂) παράγεται από ενεργά Τα λεμφοκύτταρα και είναι η πρώτη κυτοκίνη που έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία (Bray et al, 2003, Formenth, 2010, Hilman et al, 2004). Άλλες κυτοκίνες που χρησιμοποιήθηκαν με σημαντικά αποτελέσματα ήταν η IL-3 (Chiang et al, 2000, Oh et al, 2004) η IL-4 (Iwadate et al, 2003) η IL-12 (Lohr et al, 2000, Nishitani et al, 2000, Oh et al, 2004, Yung et al 2004) η IL-24 (Emdad et al., 2006, Yacoub et al., 2008, Yang et al., 2009), και ο TNF-α (Gridley et al., 2004, Weichselbaum et al., 1994, 2002). Στην Εικόνα 4.4 απεικονίζονται δύο πιθανές προσεγγίσεις ανοσογονιδιακής θεραπείας οι οποίες περιλαμβάνουν τη διέγερση του κυτταρικού ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Στην α) περίπτωση έχει γίνει επιμόλυνση μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων με γονίδια που κωδικοποιούν μία ποικιλία κυτοκινών (όπως η ιντερλευκίνη- 2 (IL -2)) ή συν-διεγερτικών μορίων (όπως τα CD80 και CD86) . Τα διαγονίδια αυτά αυξάνουν την ανοσογονικότητα των αυτόλογων κυττάρων του όγκου, τα οποία ενδεχομένως να εμφανίσουν μια σειρά από ογκοειδικά αντιγόνα στην επιφάνειά τους και να αυξήσουν την πιθανότητα ενεργοποίησης ογκοειδικών κυτταροτοξικών Τ - λεμφοκυττάρων (CTL). Στην b περίπτωση έχει γίνει ex vivo επιμόλυνση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC) με γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ογκοειδικό αντιγόνο (όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο , CEA) , το οποίο παρουσιάζεται από μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I σε CTLs αντιγονο-ειδικά μέσω του υποδοχέα των Τ-κυττάρων (TCR) . Ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να αναζητήσουν και να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν CEA στην επιφάνεια τους



Εικόνα 4.4: Άνοσογονιδιακές προσεγγίσεις στον καρκίνο (Kerr, 2003)

Σε προχωρημένα στάδια καρκίνου (παχέως εντέρου), έχει φανεί μία αρνητική ρύθμιση στην έκφραση του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξης I. (MHC I) με αποτέλεσμα να ξεφεύγουν τα καρκινικά κύτταρα από το ανοσοποιητικό σύστημα(Kerr, 2003). Μετά από δοκιμές σε ασθενείς με μελάνωμα που είχαν θετικά αποτελέσματα(Nabel et al,1993), ολοκληρώθηκε μελέτη φάσης I στην οποία πλασμίδιο που κωδικοποιούσε το γονίδιο HLAB7 ενέθηκε σε ηπατικά μεταστατικά οζίδια (καρκίνου παχέως εντέρου) σε ασθενείς αρνητικούς στην έκφραση του HLA-B7. Από τους 15 ασθενείς που πήραν μέρος στην μελέτη στους 12 υπήρχε μετάγραφο HLA-B7 ή η αντίστοιχη πρωτεΐνη ύστερα από βιοψία του όγκου. Συνολικά το 50% των σθενών είχαν ειδική HLA-B7 T λεμφοκυττάρων ανοσοαπόκριση(CTL). Υπήρξαν βέβαια κάποιες παρενέργειες χωρίς όμως να έχει καταγραφεί υποχώρηση του όγκου(Rutin et al, 1997).

Γενικά, οι ανοσογονιδιακές θεραπείες είναι αποτελεσματικές στην κλινική πράξη συνήθως όταν οι ασθενείς βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου, και διατηρούν ακόμα σωστή την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Melcher et al, 1997).

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στις μέρες μας, λόγω της μεγάλης προόδου των θεραπειών κατά του καρκίνου, έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση της επιβίωσης των ασθενών. Η ελάττωση των τοξικογενετικών παρενεργειών των διαφόρων θεραπειών αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους στόχους στην αναζήτηση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων και πρωτοκόλλων θεραπείας (Minicucci et al, 2014).

Ο δρόμος που ακολουθείται από την έρευνα μέχρι την εισαγωγή ενός νέου φαρμακευτικού σκευάσματος στην αγορά συνήθως είναι μακρύς και ακολουθεί πολλά στάδια *in vitro* μελετών, προκλινικών μελετών αλλά και κλινικών δοκιμών. Κατά μέσο όρο, μόνο το 8% του συνόλου των δοκιμαζόμενων φαρμάκων στον καρκίνο που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές φάσης I θα τεθούν τελικά στην αγορά, ενώ ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι το ποσοστό αποτυχίας ενός φαρμάκου κατά του καρκίνου στη φάση III των κλινικών δοκιμών είναι 50% (Reichert and Wenger, 2008). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς που συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές στον καρκίνο συνήθως έχουν φτάσει στο τελικό στάδιο της νόσου κάτι που σαφώς επηρεάζει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα των δοκιμαζόμενων κλινικών πρωτοκόλλων ή θεραπευτικών σκευασμάτων.

Αν και ο αριθμός κλινικών δοκιμών για γονιδιακή θεραπεία έχει αυξηθεί ραγδαία τις τελευταίες δύο δεκαετίες, παραμένει ακόμα μία πειραματική μέθοδος. Προς το παρόν, τα διαθέσιμα κλινικά γονιδιακά παρασκευάσματα και οι μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς δεν εγγυώνται την αποτελεσματική μεταφορά των θεραπευτικών γονιδίων στον ιστό-στόχο και την μακροπρόθεσμη σταθερότητα και έκφραση του γονιδίου.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει εκτενής πειραματική έρευνα ως αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού περιγραφόμενων θεραπευτικών γονιδίων και φορέων (K Podolska et al 2012). Πιθανόν, η γονιδιακή θεραπεία να είναι πιο αποτελεσματική σε συνδυασμό με ήδη υπάρχουσες κλινικές θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία (Heise et al, 1999). Ένας σημαντικός αριθμός στοιχείων υποδεικνύουν ότι έχει σημαντικά αποτελέσματα ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με φαρμακευτική, ανοσολογική και ακτινοθεραπευτική προσέγγιση αφού καταστρέφονται περισσότερα καρκινικά κύτταρα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Vile et al 2000). Συγκεκριμένα για το συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας και ακτινοθεραπείας μπορεί να ξεπεράσει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοβολία, μέσω της χρήσης ακτινο-επαγόμενων εκκινητών σε συνδυασμό με

θεραπευτικά γονίδια που οδηγούν τελικά σε ακτινο- ευαισθητοποίηση των κυττάρων (Kaliberon and. Buchsbaum 2012). Ωστόσο, προς το παρόν, οι νεότερες θεραπείες στοχεύουν κυρίως στο να μειώσουν το ποσό του υγιούς ιστού που εκτίθενται σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, κυρίως με την έκθεση σε χαμηλότερης έντασης ακτινοβολία (Hall and Wu, 2003).

Η γονιδιακή θεραπεία αν και φαντάζει μία ιδανική προσέγγιση στην θεραπεία κατά του καρκίνου στην πραγματικότητα έχει ακόμα πολύ δρόμο μέχρι να τεθεί σε κλινική εφαρμογή. Για να είναι αποτελεσματική και κυρίως ασφαλής για τους ασθενείς, θα πρέπει αρχικά να ανακαλυφθεί ένα “τελειος” γονιδιακός φορέας ο οποίος δεν θα προκαλεί ανοσογονικότητα, δεν θα μεταλλάσσεται, θα δρα με απόλυτη ειδικότητα μόνο στα καρκινικά κύτταρα, δεν θα προκαλεί μεταλλάξεις των υγιών κυττάρων, θα επιτρέπει την μακρόχρονη έκφραση του θεραπευτικού διαγονιδίου, θα είναι εύκολη η μεταφορά του στα κύτταρα στόχους και επίσης θα είναι απλός και οικονομικός ο χειρισμός του. Ένας τέτοιος φορέας δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί!

Ένα επιπλέον περιοριστικό σημείο στην κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι η ίδια η πολυπλοκότητα της νόσου. Για την ανάπτυξη του καρκίνου απαιτείται η συμμετοχή και η απορρύθμιση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών και γονιδίων διαφορετικών για κάθε καρκινικό τύπο κυττάρων αλλά και για τον κάθε ασθενή καθιστώντας αδύνατη την ολική ρύθμιση τους. Στην πραγματικότητα οι υπάρχουσες προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας μπορούν να εφαρμοσθούν σε πολύ λίγους ασθενείς με συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των κυττάρων τους και όχι στο σύνολο των ατόμων που νοσούν. Επίσης, όλες οι προσεγγίσεις στην γονιδιακή θεραπεία όπως φάνηκε από την περιγραφή τους σε προηγούμενα κεφάλαια παρουσιάζουν δυσκολίες και εμπόδια στην εφαρμογή τους, πολλές εμφανίζουν παρενέργειες στους ασθενείς ενώ καμία δεν είναι αποτελεσματική από μόνη της αλλά μπορεί να δράσει συνεργατικά με ήδη υπάρχουσες θεραπείες (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία).

Οι παραπάνω λόγοι αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην ανάπτυξη φαρμάκων που βασίζονται στην γονιδιακή θεραπεία, καθώς οι διάφορες εταιρίες δεν δύναται εύκολα να επενδύσουν στην έρευνα μίας θεραπείας με όχι και τόσο ενθαρρυντικά αποτελέσματα μέχρι σήμερα, η οποία θα είναι αποτελεσματική μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών και θα απαιτεί να συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους θεραπείας.

Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι είμαστε ακόμα μακριά από το να τεθεί η γονιδιακή θεραπεία σε ευρεία κλινική εφαρμογή και να αποτελέσει μία ασφαλή και κυρίως αποτελεσματική θεραπεία. Ωστόσο, οι ερευνητικές προσπάθειες είναι απαραίτητο να συνεχιστούν ιδιαίτερα σε *in vitro* και προ-κλινικό επίπεδο και μόνο όταν τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά πρέπει να συνεχιστούν σε επίπεδο κλινικών δοκιμών!

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adida, C., et al. 2000. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 96:1921–1925
- Aghi M, Visted T, Depinho RA, Chiocca EA. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene*. 2008; 27:4249–4254. [PubMed: 18345032]
- Alba R, Bosch A and Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy *Gene Therapy: Gene therapy* (2005); 12:18–27
- Ali M, Lemoine NR, Ring CJA. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Therapy*1994;1: 67–384.
- Alnylam Pharmaceuticals. Dana-Farber Cancer Institute presentation: RNAi in man -ALN-VSP. 2011, <http://www.alnylam.com>
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3:917–921
- Ameyar-Zazoua M, Guasconi V, Ait-Si-Ali S. siRNA as a route to new cancer therapies. *Expert Opin Biol Ther*2005;5: 221–224
- Anonymous. Microinjection. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microinjection> [Last accessed on 2012 Nov 27]
- Arafat, W.O., et al. 2000. An adenovirus encoding proapoptotic Bax induces apoptosis and enhances the radiation effect in human ovarian cancer. *Mol. Ther.* 1:545–554
- Available from: [http://www.lib.store.yahoo.net/lib/yhst-131428861332406/How to Choose the Optimal Gene Delivery Method.pdf](http://www.lib.store.yahoo.net/lib/yhst-131428861332406/How%20to%20Choose%20the%20Optimal%20Gene%20Delivery%20Method.pdf) 1-10. [Last accessed on 2012 Nov 27]
- Bader A., Brown D., Stoudemire J et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer: *Gene therapy* 2011; 18: 1121-1126
- Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*2010;70: 7027–7030.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*2004;116: 281–297

Beatty M. S and Curiel D. T. Adenovirus strategies for tissue specific targeting: *Adv. Cancer Res.* 2012; 115: 39-67

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401–10. [PubMed: 12778130]

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401–410. [PubMed: 12778130]

Bischoff, J. R. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumour cells. *Science* 274, 373–376 (1996).

Bischoff, J.R., et al. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 274:373–376

Boese Q, Leake D, Reynolds A, Read S, Scaringe SA, Marshall W Set al. Mechanistic insights aid computational short interfering RNA design. *Methods Enzymol* 2005;392: 73–96.

Bouvet Met al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 1998;58: 2288–2292

Burrows, F. J. et al. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterisation of bystander killer mechanisms in transfected tumour cells. *Cancer Gene Ther.* 9, 87–95 (2002)

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56:2488-2492 [PMID: 8653682]

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 857–866

Caplen NJ. Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Therapy* 2004;11: 1241–1248.

Cevher E, Sezer AD, Çağlar ES. Gene delivery systems: Recent progress in viral and non-viral therapy. In: Sezer AD, editor. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems.* Intech; 2012. p. 337-470.

Check Hayden E. Cancer complexity slows quest for cure. *Nature* 2008;455:148

Chen, J., et al. 2000. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*. 2:235–241

Chen, J., et al. 2000. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*. 2:235–241

Chiocca EA, Choi BB, Cai WZ, DeLuca NA, Schaffer PA, DiFiglia M, Breakefield XO, Martuza RL. Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants. *New Biol*. 1990; 2:739–746. [PubMed: 2178004]

Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 2006; 124:119–131. [PubMed: 16413486]

Cronin M, Akin AR, Collins SA, Meganck J, Kim JB, Baban CK et al. High resolution in vivo bioluminescent imaging for the study of bacterial tumor targeting. *PLoS One* 2012;7: e30940.

Cronin M, Stauton R.M, Francis K. P et al. Bacterial vector for imaging and cancer gene therapy: a review: *Cancer gene therapy* 2012; 19: 731-740

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994; 265:1582–1584. [PubMed: 7521539]

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994; 265:1582–1584. [PubMed: 7521539]

Davison E, Diaz RM, Hart IR, Santis G, Marshall JF. Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *Journal of Virology*. 1997;71:6204–6207. [PubMed: 9223518]

Delalande A, Postema M, Mignet N, Midoux P, Pichon P. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: Recent advances and ongoing challenges. *Ther Deliv* 2012;3:1199-215.

Desai B, Gadhia P. Chromosomal rearrangements in lymphocytes of head and neck squamous cell carcinoma treated with chemotherapeutic agents. *Neoplasma*2012; 59: 463-468
[PMID: 22489702 DOI: 10.4149/neo_2012_059]

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239–252

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239–252

Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3: 318–329

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*2006;6: 259–269

Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, et al. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *The EMBO Journal.* 2005; 24:1645–1654. [PubMed:15861131]

Ferreira V., Petry H. and Salmon F. Immune responses to AAV-vectors, the Glybera example from bench to bedside: Clinical trial article 2014; (5) 82: 1-14

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*1998;391: 806–811.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235:442–447. [PubMed: 2432664]

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235:442–447. [PubMed: 2432664]

Frampton AR Jr, Goins WF, Nakano K, Burton EA, Glorioso JC. HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene Ther.* 2005;12:891–901. [PubMed: 15908995]

Franceschi RT, Ge C. Gene Delivery by adenoviruses. *Methods Mol Biol* 2008;455:137-47.

Frank DK, Frederick MJ, Liu TJ, Clayman GL. Bystander effect in the adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy model of human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*1998;4: 2521–2528

Fujimori M. [Anaerobic bacteria as a gene delivery system for breast cancer therapy]. *Nippon Rinsho*2008;66: 1211–1218

Gatson N, Chiocca E.A and Kaur B. Anti-angiogenic gene therapy in the treatment of malignant gliomas: *Neurosci Lett* 2012; 527 (2) : 62- 70

Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003;177:437-47

Gilbertson R. Mapping cancer origins: *Cell* 2011; 145 (1): 25-29

Griffith, T.S., Anderson, R.D., Davidson, B.L., Williams, R.D., and Ratliff, T.L. 2000. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosisinducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis. *J. Immunol.* 165:2886–2894

Grossman, D., Kim, P.J., Schechner, J.S., and Altieri, D.C. 2001. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:635–640.

Gurnani, M., Lipari, P., Dell, J., Shi, B., and Nielsen, L.L. 1999. Adenovirus-mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44:143–151

Hamada, K., et al. 1996. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *cancer Res.* 56:3047–3054

Hamada, K., et al. 1996. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res.* 56:3047–3054

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57–70

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57–70

Harris, M. P. et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer inhibits growth of human tumour cells expressing mutant p53 protein. *Cancer Cell Ther.* 3, 121–130 (1996)

Heise Cet al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Med*1999;3: 639–645

Heise C et al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Med*1999;3: 639–645.

Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M., and Kirn, D.H. 1999.

Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res.* 59:2623–2628

Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M., and Kirn, D.H.

1999. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res.* 59:2623–2628

Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770–776

Heppner F, Mose JR. The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic *Clostridium*. *Acta Neurochir (Wien)*1978;42: 123–125.

Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*2004;2:E98

Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet*2004;20: 521–524

Jemal A., Bray F. Center M. M. et al. Global cancer statistics: *Cancer J. Clin.* 2011; 61: 69-90

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321: 1801–1806

Kaliberov S. A and Buchsbaum D. J. Cancer treatment with gene therapy and radiation therapy: *Adv. Cancer Res* 2012; 115: 221-263

Kato, J., et al. 2001. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int. J. Cancer.* 95:92–95

Kato, J., et al. 2001. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int. J. Cancer.* 95:92–95

Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer: *Nature reviews* 2003; 3(1): 615-621

- Khuri, F., et al. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* 6:879–995
- Kirn, D. H. & McCormick, F. Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol. Med. Today* 2, 519–527 (1996)
- Kole R, Krainer AR and Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(2):125-140
- Kroemer, G., and Reed, J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6:513–519
- Kroemer, G., and Reed, J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6:513–519
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan Met al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 2005; 438: 685–689.
- Larsen AK and Skladanowski A. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 257–274
- Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 222–239.
- Li C., Li L., and Kiate A.C. Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles: *Oncotarget* 2012; 3: 356-368
- Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L and Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*. 2006; 5(18):2103-2109
- Li E, Brown SL, Stupack DG, Puente XS, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *Journal of Virology*. 2001; 75:5405–5409. [PubMed: 11333925]
- Li, F., et al. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 396:580–584
- Li, F., et al. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 396:580–584
- Li, F., et al. 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1:461–466

Li, F., et al. 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1:461–466

Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011;17: 211–215.

Liu Y et al. Systemic gene delivery expands the repertoire of effective antiangiogenic agents. *JBiolChem* 1999;274: 13338–13344

Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist.* 2007; 12:443–450.
[PubMed: 17470687]

Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist.* 2007; 12:443–450. [PubMed: 17470687]

Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson E et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol* 2010;28:341–347.

Manjila S. B., Baby J. N., Bijn E. N et al. Novel gene delivery systems: *International journal of pharmaceutical investigation* 2013; 3(1): 1-5

Marcelli M et al. Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59: 382–390

Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997;22: 355–358.

Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, et al. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *The Journal of Cell Biology.* 2002; 158:1119–1131. [PubMed: 12221069]

Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 2004;10: 544–550

Melcher AA, Garcia-Ribas I, Vile RG. Gene therapy for cancer – managing expectations. *Br Med J* 1997;315: 1604–1607

Mesri M, Wall N. R, Li J. et al. Cancer gene therapy using a Survivin mutant adenovirus : J. Clin. Inves 2001; 108: 981-990

Mikhaylov G, Mikac U, Magaeva AA, Itin VI, Naiden EP, Psakhye I, Babes L, Reinheckel T, Peters C, Zeiser R, Bogyo M, Turk V, Psakhye SG, Turk B and Vasiljeva O. Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. Nat Nanotechnol. 2011; 6(9):594-602

Minicucci E. M., Silva G. N. and Salvadori D. M., Relationship between head and neck cancer therapy and some genetic endpoints: World J. Clin. Oncol.2014; 5(2): 93-102

Monzo, M., et al. 1999. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. J. Clin. Oncol. 17:2100–2104

Moolten FL. Drug sensitivity ('suicide') genes for selective cancer chemotherapy. Cancer Gene Ther 1994;1: 279–287

Nabel, G. J. et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90, 11307–11311 (1993).

Namiki Y, Namiki T, Yoshida H, Ishii Y, Tsubota A, Koido S, Nariai K, Mitsunaga M, Yanagisawa S, Kashiwagi H, Mabashi Y, Yumoto Y, Hoshina S, Fujise K and Tada N. A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery. Nat Nanotechnol. 2009; 4(9):598-606

Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz Cet al. Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. Cancer Gene Ther 2003;10: 737–744

Nemunaitis, J., et al. 2001. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J. Clin. Oncol. 19:289–298

Nicholson, D.W. 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature. 407:810–816

Nielsen, L.L., et al. 1997. Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. Cancer Gene Ther. 4:129–138.

- Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R and Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 1999; 6(4):595-605.
- Olie, R.A., et al. 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 60:2805–2809
- Opalka, B., Dickopp, A. & Kirch, H. C. Apoptotic genes in cancer therapy. *Cells Tissues Organs* 172, 126–132 (2002)
- Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 2006; 372: 137–141
- Pai S. I, Lin Y.Y, Macaes B et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer: *Gene therapy* 2006; 13: 464-477
- Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 399–415
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321: 1807–1812.
- Persengiev SP, Zhu X and Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 2004; 10(1):12-18
- Pfeifer A, Kessler T, Silletti S, Cheresch DA, Verma IM. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 2000; 97:12227–12232. [PubMed: 11035804]
- Philipson L, Pettersson RF. The coxsackie-adenovirus receptor—A new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2004; 273:87–111. [PubMed: 14674599]
- Ponnazhagan S., Curiel D. T., Shaw D.R, Siegal G. P. Adeno-Associated Virus for Cancer Gene therapy: American association for cancer research, 2001; 61: 6313-6321

Pui CH, Relling MV. Can the genotoxicity of chemotherapy be predicted?

Lancet2004; 364: 917-918 [PMID: 15364174

Rass K, Gutwein P, Welter C, Meineke V, Tilgen W and

Reichrath J. (2001).Histochem. J., 33,459–467

Reed, J.C. 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. J. Clin. Oncol.

17:2941–2953

Reed, J.C., and Bischoff, J.R. 2000. BIRing chromosomes through cell

division: and survivin' the experience. Cell. 102:545–548

Reichert JM, Wenger JB. Development trends for new cancer therapeutics

and vaccines.Drug Discov Today2008;13:30–37

Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a

historical review. Gen Pharmacol. 2000; 35:227–231. [PubMed: 11888677

Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. Hematopoiesis and

angiogenesis: a link between two apparently independent processes. J

Hematother Stem Cell Res. 2000; 9:13–19. [PubMed:10738967

Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo

chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-

angiogenesis. Curr Pharm Biotechnol. 2000; 1:73–82.

[PubMed: 11467363

Rini BI, Rathmell WK. Biological aspects and binding strategies of vascular

endothelial growth factor in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;

13:741s–746s. [PubMed: 17255303]

Rubin, J. et al. Phase I study of immunotherapy of hepatic

metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer

of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. Gene

Ther.4, 419–425 (1997)

Saeki Y, Fraefel C, Ichikawa T, Breakefield XO, Chiocca EA. Improved

helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an

ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome.

Mol Ther. 2001; 3:591–601. [PubMed: 11319922]

Satchi-Fainaro R, Puder M, Davies JW, Tran HT, Sampson DA, Greene AK, Corfas G, Folkman J. Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470. *Nat Med.* 2004;

10:255–261. [PubMed: 14981512]

Sathornsumetee S, Cao Y, Marcello JE, Herndon JE 2nd, McLendon RE, Desjardins A, Friedman HS, Dewhirst MW, Vredenburgh JJ, Rich JN. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J Clin Oncol.* 2008; 26:271–278. [PubMed: 18182667]

Scherr M, Eder M. RNAi in functional genomics. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6: 129–135

Schewach D. S. Introduction to Cancer Chemotherapeutics: Chemical Reviews, 2009; 109 (7): 2859-2861

Schreiber, M., Muller, W.J., Singh, G., and Graham, F.L. 1999. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21 (WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene.* 18:1663–1676.

Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *Jama* 2005;293: 1367–1373.

Smith, E. R. & Chiocca, E. A. Oncolytic viruses as novel anticancer agents: turning one scourge against another. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9, 311–327 (2000)

Soengas M. S. and Lowe S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance: *Oncogene* 2003; 22: 3138–3151

Soengas, M.S., et al. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 409:207–211

Somia N and Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet.* 2000; 1(2):91-99

Steinwaerder, D.S., et al. 2001. Tumor specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector. *Nat. Med.* 7:240–243

Sung, M. W. et al. Intratumoural adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal

Swana, H.S., Grossman, D., Anthony, J.N., Weiss, R.M., and Altieri, D.C. 1999. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 341:452–453

Swisher, S.G., et al. 1999. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:763–771.

Takano S, Yamashita T, Ohneda O. Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. *J Oncol.* 2010; 2010:351908. [PubMed: 20414463]

Takano S, Yoshii Y, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, Nose T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res.* 1996; 56:2185–2190. [PubMed: 8616870]

Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 2010;18: 181–187

Tanaka, K., et al. 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 6:127–134

Tangney M, van Pijkeren JP, Gahan CG. The use of *Listeria monocytogenes* as a DNA delivery vector for cancer gene therapy. *Bioeng Bugs* 2010; 1: 284–287

Tangney M. Gene therapy for cancer: dairy bacteria as delivery vectors. *Discov Med* 2010;10: 195–200

Velculescu, V.E., et al. 1999. Analysis of human transcriptomes. *Nat. Genet.* 23:387–388

Venook, P. et al. Gene therapy of colorectal liver metastasis using recombinant adenovirus encoding wt p53(SCH58500) via hepatic artery infusion: a phase I study. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 431 (1998)

Vile R.G, Russell S.J and Lemoine NR. Cancer gene therapy: Hard lessons and new courses : *Gene therapy* 2000; 7: 2-8

Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene.* 1997; 14:1495–1502. [PubMed: 9136993]

Wade-Martins R, Smith ER, Tyminski E, Chiocca EA, Saeki Y. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol.* 2001;19:1067–1070. [PubMed: 11689853]

Wang DS, Panje C, Pysz MA, Paulmurugan R, Rosenberg J, Gambhir SS, et al. Cationic versus neutral microbubbles for ultrasound-mediated gene delivery in cancer. *Radiology* 2012;264:721-32

Weill, D., et al. 2000. Adenoviral-mediated p53 gene transfer to nonsmall cell lung cancer through endobronchial injection. *Chest.* 118:966–970

Weill, D., et al. 2000. Adenoviral-mediated p53 gene transfer to nonsmall cell lung cancer through endobronchial injection. *Chest.* 118:966–970

Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown Det al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010;70: 5923–5930

Withoff S, De Jong S, De Vries EG and Mulder NH. (1996). *Anticancer Res.*, 16,1867–1880.

Yacoub A, Hamed H, Emdad L, Dos Santos W, Gupta P, Broaddus WC, et al. MDA-7/IL-24 plus radiation enhance survival in animals with intracranial primary human GBM tumors. *Cancer Biology & Therapy.* 2008; 7:917–933. [PubMed: 18376144]

Yang DC, Elliott RL, Head JF. Gene targets of antisense therapies in breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2002; 6:375–385. [PubMed: 12223074]

Yang Y, Liu SZ, Fu SB. Anti-tumor effects of pNEgr-mIL-12 recombinant plasmid induced by Xirradiation and its mechanisms. *Biomedical and Environmental Sciences.* 2004; 17:135–143.

Yang YJ, Chen DZ, Li LX, Sheng QS, Jin ZK, Zhao DF. Targeted IL-24 gene therapy inhibits cancer recurrence after liver tumor resection by inducing tumor cell apoptosis in nude mice. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 2009; 8:174–178. [PubMed: 19357032]

Yoshida D, Kim K, Noha M, Teramoto A. Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2006; 76:13–21. [PubMed:16136272]

Yu D, Sekine E, Fujimori A, Ochiya T, Okayasu R. Down regulation of BRCA2 causes radiosensitization of human tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Science*. 2008; 99:810–815. [PubMed: 18377429]

Yu JS et al. Retroviral delivery and tetracycline-dependent expression of IL-1beta-converting enzyme (ICE) in a rat glioma model provides controlled induction of apoptotic death in tumor cells. *Cancer Res*1996;56: 5423–5427

Yuan S, Qiao T, Chen W. CpG oligodeoxynucleotide 1826 enhances the Lewis lung cancer response to radiotherapy in murine tumor. *Cancer Biotherapy & Radio-pharmaceuticals*. 2011; 26:203– 20

Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*. 2002; 76:4580–4590. [PubMed: 11932423]

Zhao M, Yang M, Li XM, Jiang P, Baranov E, Li S et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*2005;102: 755–760.

Zheng X, Lu J, Deng L, Xiong Y and Chen J. Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery. *Int J Pharm*. 2009; 366(1-2):211-217

Zhou S, Zhang M, Wang J. Tumor-targeted delivery of TAT-Apoptin fusion gene using *Escherichia coli* Nissle 1917 to colorectal cancer. *Med Hypotheses*2011;76: 533–534

Ιστοσελίδες

http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_18/S146239940400818Xsup008.htm

www.nature.com/cgt