

# DNA vakcine za zdravljenje raka

## DNA vaccines for cancer treatment

Kos Špela<sup>1</sup>, Serša Gregor<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Korespondenca: prof. dr. Gregor Serša

Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

E-mail: GSersa@onko-i.si

Poslano / Received: 17.9.2018

Sprejeto / Accepted: 26.11.2018

doi:10.25670/oi2019-005on

### POVZETEK

DNA vakcine predstavljajo obetaven pristop imunoterapije raka, predvsem zaradi njihove enostavnosti, stabilnosti in varnosti. DNA vakcine temeljijo na vnosu plazmidne DNA z zapisom za enega ali več tumorskih antigenov, udeleženih v nastanku, napredovanju ali zasevanju rakavih celic. Z vnosom DNA vakcine spodbudimo imunski odziv usmerjen proti tumorskemu antigenu, kar potencialno vodi do uničenja rakavih celic. Kljub številnim prednostim DNA vakcin pred klasičnimi vakcinami njihovo uporabo v humani kliniki omejuje prešibak antigen-specifični imunski odziv. Za izboljšanje imunogenosti DNA vakcin se razvoj osredotoča na optimizacijo sestave plazmidne DNA, raziskovanje novih tumorskih antigenov, razvoj novih dostavnih sistemov in sočasna uporaba adjuvantnih in imunomodulatornih molekul. Tovrstni pristopi so del številnih kliničnih raziskav na področju imunoterapije raka in predstavljajo korak bližje k izboljšanju imunogenosti DNA vakcin, učinkovitejšemu uničenju rakavih celic in lažjemu prenosu DNA vakcinacije v humano klinično prakso.

**Ključne besede:** DNA vakcine, dostavni sistemi, tumorski antigeni, imunogenost, klinična praksa

### ABSTRACT

*DNA vaccination has emerged as a promising immunotherapeutic approach against cancer due to its simplicity, stability, and safety. DNA vaccines for cancer immunotherapy are designed to deliver one or several genes encoding tumor antigens, thereby eliciting an immune response against antigens that play a central role in tumor initiation, progression or metastasis. Despite all advantages, DNA vaccines face challenges in inducing potent antigen-specific immune response in humans, which limits the successful translation from preclinical models to the clinic. Different strategies to enhance immunogenicity of DNA vaccines against tumor antigens are used, for example optimization of plasmid structure, search for new tumor antigens, development of new delivery systems and utilization of molecular adjuvants and immunomodulatory signals. These very promising approaches are employed in numerous clinical trials and hold promise for increasing the immunogenicity of cancer DNA vaccines, enhancing cancer eradication and contributing to easier translation of DNA vaccination into human clinical use.*

**Key words:** DNA vaccines, delivery methods, tumor antigens, immunogenicity, clinical practice

### UVOD

Edward Jenner je z odkritjem prve vakcine proti črnim kozam leta 1796 postavil mejnik za nadaljnji razvoj vakcinacije. Napredek na področju vakcinacije je poleg črnih koz vodil do skorajšnjega izginotja nekaterih v preteklosti smrtnih bolezni, kot so oslovski kašelj, poliomielitis, davica in tetanus. Naslednji izziv za raziskovalce predstavlja razvoj vakcin proti avtoimunskim boleznim, infekcijskim boleznim, kot so AIDS, hepatitis C, influenza in malarija, ter nenazadnje vakcin za zdravljenje raka. Klasične vakcine, dostopne za zdravljenje nekaterih naštetih bolezni, sestavljajo živi oslavljeni patogeni, uničeni patogeni, podenote virusov in virusom podobni delci. Klasične vakcine pogosto ne dosegajo pričakovanja varnosti in učinkovitosti ali ne zagotavljajo zmožnosti priprave v potrebnih količinah. Tako se pojavljajo potrebe po razvoju novih vrst vakcin, med katerimi obetavne predklinične rezultate dosegajo t. i. DNA vakcine. DNA vakcine za zdravljenje

raka nosijo genski zapis za tumorske antigene, ki so značilni za posamezno vrsto tumorja in igrajo ključno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Večino DNA vakcin sestavlja plazmidna DNA, t.j. krožna dvoverižna DNA, z zapisom za tumorski antigen proti kateremu želimo usmeriti specifični imunski odziv. Vnos plazmidne DNA v tarčne celice vodi do izražanja zelenega proteinskega antigena in izpostavitvi proteina antigen predstavitevni celicam. Te potujejo v regionalne limfne vozle in tam predstavijo antigen limfocitom T, kar zagotovi aktivacijo tako humoralnega kot celičnega imunskega odziva. Aktivacija imunskega odziva usmerjenega proti zelenemu antigenu zapisanemu na plazmidni DNA tako vodi do uničenja tumorskih celic (Slika 1) (1,2). DNA vakcine se odlikujejo po enostavnosti za pripravo, cenovni ugodnosti, dolgotrajni obstojnosti, specifičnosti imunskega odziva proti zelenemu antigenu, možnosti večje proizvodnje ter ne predstavljajo tveganja za razvoj okužbe (1).

Pri zagotavljanju optimalnega delovanja DNA vakcin ključno vlogo igra izbor tumorskega antigena, optimalna sestava plazmidne DNA, uporaba varne in učinkovite metode vnosa genske informacije do tarčnih celic. Pomembno je tudi ustrezno dodajanje genetskih adjuvantov ali kombiniranih terapij za doseganje pričakovane imunogenosti.

V nadaljevanju so predstavljeni ključni koraki pri zagotavljanju uspešnosti DNA vakcin, možnosti izboljšav in pregled dosedanjih rezultatov.

## TUMORSKI ANTIGENI

Napredek v razvoju genetske tehnologije je omogočil identifikacijo številnih novih tumorskih antigenov, proti katerim lahko usmerimo imunoterapijo raka z uporabo DNA vakcin (3,4). Eden izmed prvih odkritih tumorskih antigenov je antigen MAGE-A1, ki ga uvrščamo v skupino **antigenov raka testisov** (5). Ti so obetavni kandidati za sestavo protitumorskih vakcin, saj so izraženi le na določenih tumorskih celicah in imunsko privilegiranih zarodnih celicah in ne na zdravih somatskih celicah. Med antigene raka testisov uvrščamo vedno več novo odkritih antigenov, kot so NY-ESO-1, SSX, HORMADI, CXorf61 in ACTL8 (3,5). Tovrstne antigene lahko najdemo tudi pri raki drugih etiologij, kot na primer pri melanomu, glioblastomu in pljučnem karcinomu (5).

Naslednja skupina tumorskih antigenov, ki lahko služijo kot DNA vaccine, so **prekomerno izraženi lastni proteini**. Primer iz te skupine je onkoprotein HER2, ki je tipično povečano izražen pri raku dojke. Izražanje tovrstnih antigenov je močno povečano pri tumorskih celicah različnih tkiv, kar sproži prepoznavo antigenov s strani limfocitov T ter vodi do specifičnega protitumorskega odziva. Nasprotno je izražanje **diferencijskih antigenov** tkivno specifično, a dostikrat v nižjih količinah prisotno tudi v zdravem tkivu. Tako je izražanje antigenov GPI00, tirozinaze in melan-A/MART-1 prisotno pri melanomu in v manjših količinah tudi v zdravih melanocitih. Med ostale diferencijske antigene uvrščamo še PSA izraženega pri raku prostate, mamoglobin-A pri raku dojke ter karcinoembrionski antigen (CEA) v primeru raka debelega črevesa (4).

Med vsemi tumorskimi antigeni so **tumorsko-specifični antigeni** najbolj imunogeni. Tumorsko-specifični antigeni so posledica somatskih točkovnih mutacij in so izraženi zgolj pri tumorskih celicah brez izražanja na zdravem tkivu. Tipični predstavniki tumorsko-specifičnih antigenov nastanejo z mutacijo in posledično aktivacijo onkogenov (RAS, BRAF) ali inaktivacijo tumor supresorskih genov (CDK4, p53). Kljub visoki imunogenosti je uporaba DNA vakcin s tumorsko-specifičnimi antigeni omejena v klinični praksi zaradi nepopolnega poznavanja njihove vloge pri razvoju in napredovanju bolezni. Mutirani tumorsko-specifični antigeni namreč pogosto igrajo ključno vlogo pri onkogenih procesih, preživetju, rasti in celični delitvi. V izogib zapletom je natančno poznavanje njihove vloge tako ključno pred uporabo DNA vaccine z zapisom za tumorsko-specifični antigen.

Kljub številnim uspehom predkliničnih študij s področja DNA vakcin še vedno poteka iskanje idealnega antigena, ki bi bil visoko imunogen, z dobro poznano vlogo in bi bil izražen zgolj na tumorskih celicah (4). Večina poznanih tumorskih antigenov je v manjši meri prisotna na zdravih tkivih in jih imunski sistem prepozna kot lastne antigene. Na ta način se tovrstni tumorski antigeni izognejo imunski prepoznavi in uničenju (6). Pomemben korak pri razvoju DNA vakcin je iskanje rešitve, kako zaobiti imunsko toleranco in spodbuditi imunski odziv proti tumorskemu antigenu zapisanemu znotraj DNA vaccine.

## DOSTAVNE METODE ZA VNOS TUMORSKIH ANTIGENOV V TARČNE CELICE

Glavna tarčna organa za vnos DNA vakcin sta mišica in koža (7). Mišice so »tovarna« proteinov, ki zagotavlja stabilno in dolgotrajno izražanje DNA vaccine in sintezo transgenega proteina. Kot tarčni organ za vnos DNA vakcin vse večji pomen dobiva tudi koža. Prednost kože je prisotnost številnih intradermalnih antigen predstavitev celic, ki zagotovijo učinkovit antigen specifičen imunski odziv proti vnesenemu antigenu. Vnos DNA vakcin v tarčno tkivo zagotovimo z uporabo primerne dostavne sistema. V obeh primerih, intramuskularnem in intradermalnem vnosu, samo injiciranje plazmidne DNA v tarčne celice dostikrat ni dovolj učinkovito, saj večina injicirane plazmidne DNA ostane zunajcelično, kjer je izpostavljena razgradnji z endogenimi nukleazami (2). Tako je potreben razvoj novih dostavnih sistemov, ki bi zagotovili vnos plazmidne DNA v celice in s tem izboljšali učinkovitost DNA vakcinacije. V razvoju in uporabi so številne dostavne metode, ki jih lahko razdelimo med virusne in ne-virusne metode vnosa (8).

## VIRUSNE METODE VNOSA

V prvo skupino uvrščamo metode, ki kot nosilce za vnos genov v tarčne celice uporabljajo viruse, ki nosijo zapis za terapevtski gen. Te nosilce imenujemo virusni vektorji. Z uporabo virusnih vektorjev izkoristimo njihovo naravno sposobnost za infekcijo celic ter prenos genskega materiala v okužene celice. Med bolj raziskane virusne vektorje za namen genske terapije uvrščamo adenovirusne vektorje, adenovirusom pridružene virusne vektorje, retrovirusne vektorje, vektor virusa herpes simpleksa, lentivirusni vektorji in vektor virusa vaccine (9). Za namen DNA vakcinacije so v uporabi virusni vektorji z odstranjenimi geni, ki bi sicer vodili v nenadzorovano razmnoževanje. Tako pridobljeni virusi predstavljajo visoko učinkovit sistem vnosa genskega materiala v tarčne celice, a še vedno z nekaterimi ključnimi pomanjkljivostmi z vidika varnosti. Razvije se lahko močna imunogenost samega virusnega vektorja in možnost pojavljanja insercijske mutageneze, t.j. vključevanje genskega materiala v genom tarčne celice in posledično nastajanje novih mutacij, ki lahko sprožijo nadaljnje onkogene procese. Tako še vedno ostaja vprašanje, kako zagotoviti učinkovit virusni sistem vnosa, ki bo hkrati tudi dovolj varen (8).

## NE-VIRUSNE METODE VNOSA

V primeru ne-virusnih metod se namesto virusnega vektorja kot nosilka transgena uporablja plazmidna DNA. Ne-virusni dostavni sistemi se kljub dostikrat slabši učinkovitosti v primerjavi z virusnimi vektorji odlikujejo po boljši varnosti, lažji dostopnosti in pripravi, manjši imunogenosti samega vektorja in možnosti vnosa večjih vključkov v plazmidno DNA (8). Ne-virusne metode vnosa lahko razdelimo na fizikalne metode (kot so elektroporacija, magnetofekcija, sonoporacija ...) in kemijske metode vnosa (med katere uvrščamo kationske lipide, kationske polimere ...). Poglavitne ne-virusne metode so naštetje in opisane v Tabeli 1 (2).

Metoda	Opis metode	Ref.
<b>Ne-virusne fizikalne metode vnosa</b>		
Magnetofekcija	Nanodelci obdani s plazmidno DNA z zapisom za DNA vakcino vstopajo v celico s pomočjo zunanjšega magnetnega polja.	(10)
Sonoporacija	Kratkotrajna permeabilizacija celične membrane in vnos plazmidne DNA v celice s pomočjo ultrazvoka.	(11)
Genska pištola	Vnos zlatih delcev obdanih s plazmidno DNA v celico z uporabo plina pod visokim tlakom. Metoda se večinoma uporablja za intradermalni vnos plazmidne DNA.	(2,12)
Elektroporacija	Aplikacija električnih pulzov, ki povzročijo nastanek por v celični membrani in vstopanje plazmidne DNA v tarčne celice. Elektroporacija predstavlja enega bolj obetavnih metod vnosa za namen vakcinacije v kliniki, saj poleg vnosa molekul pripomore k izboljšani imunogenosti DNA vakcin. Elektroporacija tako spodbuja nastanek vnetnih citokinov, privablja antigen predstavitevne celice ter limfocite T do tarčnih celic.	(13,14)
Mikroigle	Vnos plazmidne DNA v kožo s pomočjo sistema tankih igel (dolžine od 25 do 2000 µm), ki dosežejo genski vnos v želeno plasti kože.	(15)
<b>Ne-virusne kemijske metode vnosa</b>		
Liposomi	Liposomi so lipidni vezikli sestavljeni s hidrofilno sredico, kamor se veže plazmidna DNA, ter obdani s hidrofobnim ogrodjem, ki omogoča učinkovito prehajanje genskega materiala v tarčne celice. Liposome delimo na anionske, kationske ali nevtralne, med katerimi so kationski lipidi najširše zastopani.	(16)
Kationski polimeri	Uporaba biorazgradljivih polimerov (kot so protonirani poliamini), ki vežejo negativno nabito DNA znotraj nanodelcev, kar omogoči varen in učinkovit vnos želenih genov tarčne celice.	(17)
Peptidi, ki prehajajo celično membrano	Vnos plazmidne DNA s pomočjo kratkih peptidov, ki se vežejo na plazmidno DNA in omogočajo lažji vstop tovrstnih kompleksov v tarčne celice.	(2,18)

Tabela 1: Metode ne-virusnega vnosa genskega materiala v celico.

## MOŽNE IZBOLJŠAVE IMUNOGENOSTI DNA VAKCIN

Kljub spodbudnim rezultatom študij s področja DNA vakcin na živalskih modelih in v veterinarski klinični praksi, uporaba DNA vakcin pri ljudeh vzbudi zgolj šibak imunski odziv. Za uspešen prenos DNA vakcinacije v klinično uporabo pri ljudeh je tako ključno izboljšati imunogenost DNA vakcin. Izboljšave DNA vakcin potekajo tako na področju virusnih kot ne-virusnih metod vnosa genov. Če se osredotočimo na raziskave na področju plazmidne DNA za vnos DNA vakcin, so le te usmerjene k izboljšavam imunogenosti na različnih korakih, od iskanja novih tumorskih antigenov, optimizacije sestave in zaporedja plazmidne DNA, izboljšav dostavnih metod vnosa plazmidne DNA v tarčne celice, optimizacije protokolov injiciranja, raziskovanje novih adjuvantnih molekul in iskanje novih kombiniranih terapij. Najuspešnejši premik k boljšimi imunogenosti DNA vakcin je bil dosežen z navedenimi izboljšavami (6):

Sočasni vnos plazmidne DNA z zapisom za tumorski antigen in plazmidne DNA z zapisom za citokin ali kostimulatorno molekulo. Sočasni vnos adjuvantov, t. j. plazmidna DNA z zapisom za imunomodulatorno molekulo, okrepi imunski odziv usmerjen proti tumorskemu antigenu, za katerega nosi zapis DNA vakcina. S tovrstno metodo zagotovimo izražanje in delovanje adjuvanta na mestu injiciranja DNA vakcine ter se hkrati izognemo sistemski toksičnosti. Med najpogostejše adjuvante uvrščamo plazmidno DNA z zapisom za citokine, kot so GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 in IL-18 (6). Vnos citokinov spodbuja proliferacijo limfocitov T in naravnih celic ubijalk, privablja antigen predstavitevne celice na mesto aplikacije DNA

vakcine in vpliva na njihovo zorenje. Poleg citokinov uvrščamo med možne adjuvante tudi plazmidno DNA z zapisom za kemokine, ki bistveno prispevajo k potovanju levkocitov. Med kostimulatornimi molekulami je najbolj raziskana molekula CD40, izražena na limfocitih B in antigen predstavitvenih celicah. CD40 se veže z ligandom CD40L na površini limfocitov T. Njuna povezava omogoči zorenje antigen predstavitvenih celic in spodbuja nastanek citotoksičnih limfocitov T. Na ta način dodajanje kostimulatornih molekul vpliva na izboljšano imunogenost DNA vakcin in uničenje tumorskih celic (7,19).

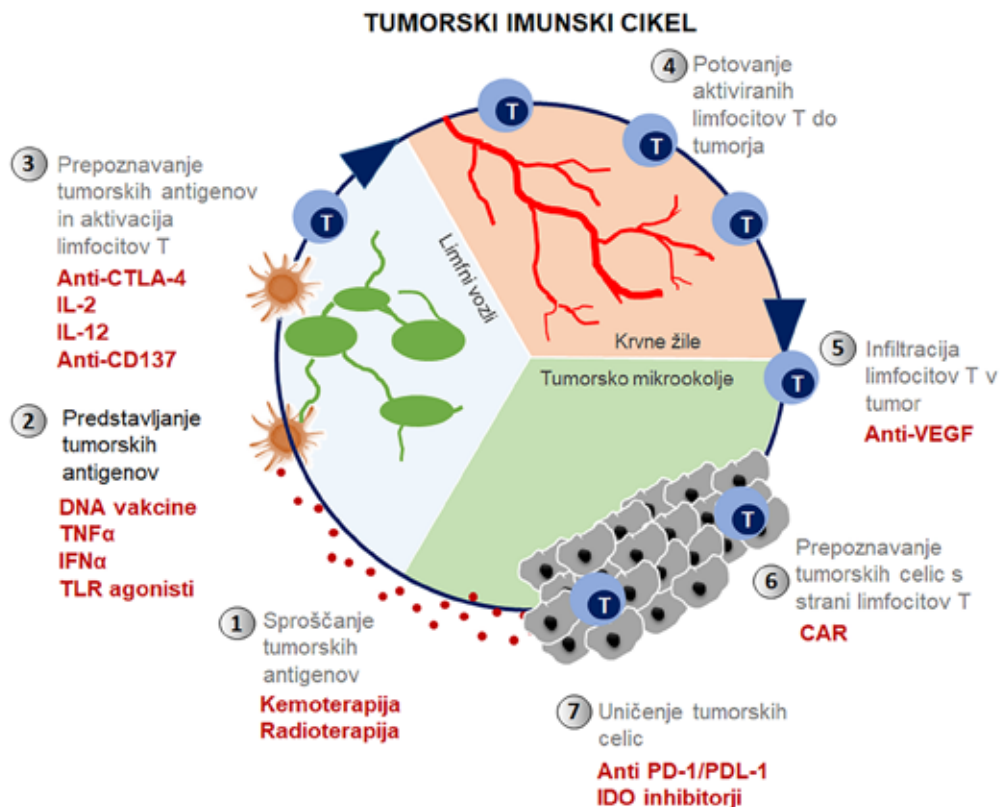
Optimizacija tumorskih antigenov in vključevanje imunogenih epitopov. Spajanje DNA zapisa za tumorske antigene z DNA zapisom za bakterijske ali virusne produkte poleg vnosa antigena zagotovi tudi t.i. signal za nevarnost, kar bistveno izboljša imunogenost vakcine, vpliva na potovanje celic in stimulira prirojeno imunost. Vključevanje močno imunogenega genskega segmenta, kot je fragment C tetanusnega toksina, v plazmidno DNA z zapisom za tumorski antigen močno poveča nastanek citotoksičnih limfocitov T usmerjenih proti tumorskemu antigenu in dokazano zavre rast tumorskih celic. Podobne rezultate izkazujejo tudi klinične študije, ki preučujejo DNA vakcine z vgrajenim herpesvirusnim VP22 fragmentom in fragmentom Pseudomonas eksotoksina A (6,20).

Vpliv na regulatorne mehanizme, ki zavirajo imunski odziv. Učinkovit imunski odziv za svoje protitumorsko delovanje ne zahteva le imunske aktivacije, vendar tudi zmanjšanje zaviralnih elementov imunskega sistema. Znano je, da DNA vakcine spodbujajo imunske aktivacije, a je njihova učinkovitost zaradi

razvoja imunosupresije v tumorskem mikrookolju lahko omejena. Za premagovanje imunosupresivnega okolja, zlasti pri bolnikih z napredovalimi oblikami raka, v klinično uporabo vstopa vse več protiteles za zaviranje imunskih kontrolnih točk (angl. immune checkpoints). Uporaba zaviralcev imunskih kontrolnih točk (angl. immune checkpoint inhibitors), usmerjenih proti CTLA-4 (s citotoksičnimi limfociti povezan antigen 4) ter proti PD-1/PDL-1 (protein 1 programirane celične smrti), kaže izjemen uspeh pri zdravljenju onkoloških bolnikov (21). Imunske kontrolne točke so ključne pri aktivaciji limfocitov T in imunskem uravnavanju. Ob dodatku zaviralcev imunskih kontrolnih točk lahko aktivacija imunskega sistema poteka nemoteno, kar vodi do zmanjšane rasti tumorja. Kljub spodbudnim rezultatom se nekateri bolniki ne odzivajo na terapijo z zaviralci imunskih kontrolnih točk, predvsem zaradi pomanjkanja limfocitov T v tumorju. Ta zaplet lahko preprečimo s sočasnim dodajanjem protitumorskih vakcin. Kombinacija vakcinacije in inhibicije kontrolnih točk dodatno izboljša imunogenost in sinergistično prispeva k izboljšanju protitumorskega odziva. Tovrstna kombinacija z zaviralci imunskih kontrolnih točk in protitumorskih DNA vakcin že kaže dobre rezultate v vse večjem številu predkliničnih testiranj (22–24).

Aktivacija imunskega odziva proti endogenim antigenom s postopkom in situ vakcinacije (25). Kot opisano, z DNA vakcinami vnesemo zunanji vir tumorskih antigenov, proti katerim sprožimo prepoznavo in aktivacijo imunskega sistema.

Da bi se izognili omejitvi slabe imunogenosti eksogenih tumorskih antigenov, se uveljavlja pristop in situ vakcinacije, ki v nasprotju običajnim pristopom DNA vakcinacije temelji na razkritju in prepoznavi endogenih antigenov. Razkritje endogenih tumorskih antigenov dosežemo z ablativno metodo, kot sta obsevanje ali elektrokemoterapija, prepoznavanje antigenov pa okrepiamo s sočasnim vnosom genetskih adjuvantov. Ena izmed tovrstnih kombinacij združuje in situ vakcinacijo doseženo s pomočjo elektrokemoterapije in gensko terapijo z IL-12. V tej kombinaciji elektrokemoterapija povzroči uničenje tumorja in izpostavitve tumorskih antigenov okolici, med tem ko genska terapija z IL-12 pospeši prepoznavo antigenov in aktivacijo imunskega sistema proti sproščenim tumorskim antigenom. Izvedljivost predpostavljenega modela je bila dokazana v klinični študiji na lastniških psih z mastocitomi, pri katerih je kombinacija elektrokemoterapije z gensko terapijo z vnosom IL-12 vodila do visokega odstotka ozdravljenih tumorjev in preprečila ponovitev ter razvoj oddaljenih metastaz (26). Podobno so opisani številni primeri, pri katerih je radioterapevtsko zdravljenje tumorja vodilo do zmanjšanja oddaljene metastaze (27), verjetno prav preko mehanizma, preko katerega je obsevanje delovalo kot in situ vakcinacija (Slika 1). Nove raziskave tako povezujejo različne pristope in kombinacije terapij, ki stremijo k zagotavljanju optimalnega delovanja vakcin in okrepitvi imunskega odziva proti tumorskim antigenom.



Slika 1: Tumorski imunski cikel in možna prijemališča za nove tarče (28). Iz uničenih tumorskih celic se sproščajo tumorski antigeni (št. 1), ki jih antigen predstavljene celice predstavijo limfocitom T (št. 2). Aktivirani antigen-specifični limfociti T (št. 3) iz limfnih vozlov potujejo do tumorja (št. 4 in 5), kjer prepoznajo tumorski antigen (št. 6) in vodijo do uničenja tumorskih celic (št. 7). Vsi koraki tumorskega cikla predstavljajo možna prijemališča za nove tarče v imunoterapiji raka. Imunogenost in učinkovitost DNA vakcin, ki igrajo glavno vlogo pri vnosu in predstavljanju antigenov, lahko tako povečamo s sočasnim dodajanjem različnih adjuvantov, imunomodulatornih molekul in kombiniranih terapij (označenih z rdečo), ki vplivajo na različne korake imunskega cikla. Razlaga kratic: TNF $\alpha$  – tumorje nekrotizirajoči faktor alfa; IFN $\alpha$  – interferon alfa; TLR agonisti – agonisti toličnih receptorjev (ang. toll-like receptors); Anti-CTLA-4 – terapija usmerjena proti s citotoksičnimi limfociti povezanemu antigenu 4; IL-2 – interleukin 2; IL-12 – interleukin 12; Anti-CD137 – terapija usmerjena proti molekuli CD137 (molekula iz družine receptorjev tumorskega nekrotizirajočega faktorja); Anti-VEGF – terapija usmerjena proti vaskularnemu endotelijskemu rastnemu faktorju; CAR – himerni antigeni receptor; Anti-PD-1/PDL-1 – terapija usmerjena proti proteinu 1 programirane celične smrti in njegovemu ligandu; IDO – indolamin 2,3-dioksigenaza.

## KLINIČNE ŠTUDIJE

Kot že omenjeno, DNA vaccine izkazujejo obetavne rezultate pridobljene na živalskih modelih, pri katerih spodbudijo močno aktivacijo T in B celičnega odziva. Za uporabo v veterinarski medicini so registrirane štiri DNA vaccine, eno od teh za zdravljenje melanoma pri psih. Nasprotno je aktivacija imunskega sistema pri ljudeh po uporabi DNA vakuin šibka, kar omejuje njihovo uporabo v humani klinični praksi. Tako ni bila s strani regulatornih organov do sedaj odobrena še nobena DNA vakcina za zdravljenje raka pri ljudeh. Zaradi številnih prednosti DNA vakuin kljub temu še vedno ostaja močno zanimanje za DNA vakcinacijo tudi pri zdravljenju ljudi. V fazo I/II kliničnih raziskav vstopajo številne DNA vaccine, ki v dosedanjih študijah izkazujejo varnost in opazno aktivacijo imunskega sistema. Večina DNA vakuin znotraj kliničnih študij je usmerjena proti onkovirusnih antigenov, v večini primerov proti HPV antigenom. Sledijo jim DNA vaccine proti antigenom melanoma in antigenom raka prostate (7). Med možnimi dostavnimi metodami je skoraj v polovici študij zastopana elektroporacija. Poleg tega so tekoče študije usmerjene k izboljšavam imunogenosti DNA vakuin in vpeljujejo številne kombinacije z ostalimi imunoterapijami, nove adjuvante, izboljšane dostavne metode ter nove predstavnike tumorskih antigenov. Študije stremijo k zagotavljanju varnosti in učinkovitosti DNA vakuin ter doseganju pričakovane imunogenosti tudi v humani kliniki (29).

## ZAKLJUČEK

Zaradi svojih številnih prednosti so DNA vaccine obetavne za zdravljenje raka. Hiter napredek na področju DNA vakcinacije je doprinesel številne izboljšave, predvsem na področju iskanja novih antigenov, izboljšanju dostavnih metod in iskanju kombiniranih terapij. Izboljšave predstavljajo korak bližje k uveljavljanju DNA vakuin ne le v veterinarski klinični praksi, ampak tudi v humani medicini.

## LITERATURA

1. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 776–88.
2. Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, Wijesundara DK. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine* 2016; 34: 5488–94.
3. Yang B, Jeang J, Yang A, Wu TC, Hung C-F. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10: 3153–64.
4. Srinivasan R, Wolchok JD. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J Transl Med* 2004; 2: 12.
5. Yao J, Caballero OL, Yung WKA, Weinstein JN, Riggins GJ, Strausberg RL, et al. Tumor Subtype-Specific Cancer-Testis Antigens as Potential Biomarkers and Immunotherapeutic Targets for Cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 371–379.
6. Stan R, Wolchok JD, Cohen AD. DNA Vaccines Against Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006; 20: 613–636.
7. Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Pappa A, Chlichlia K. DNA vaccines to attack cancer: Strategies for improving immunogenicity and efficacy. *Pharmacol Ther* 2016; 165: 32–49.
8. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 27.
9. Kočevar N, Čemažar M, Serša G. Gensko zdravljenje raka. *Slov Farm Vestn.* 2010; 61: 14–22.
10. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; 9: 102–109.
11. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol* 2013; 3: 39–44.
12. Aravindaram K, Yang NS. Gene Gun Delivery Systems for Cancer Vaccine Approaches. *Methods Mol Biol* 2009; 542: 167–178.
13. Sardesai NY, Weiner DB. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 421–429.
14. Gothelf A, Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8: 1694–702.
15. Pearton M, Saller V, Coulman SA, Gateley C, Anstey AV, Zarnitsyn V, et al. Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *J Control Release* 2012; 160: 561–569.
16. Balazs DA, Godbey W. Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv* 2011; 2011: 326497.
17. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 2011; 9: 55.
18. Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2730–6.

19. Shaw DR, Strong T V. DNA vaccines for cancer. *Front Biosci* 2006; 11: 1189–1198.
20. Hung CF, Cheng WF, Hsu KF, Chai CY, He L, Ling M, et al. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res* 2001; 61: 3698–3703.
21. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1974–1982.
22. Duperret EK, Wise MC, Trautz A, Villarreal DO, Ferraro B, Walters J, et al. Synergy of Immune Checkpoint Blockade with a Novel Synthetic Consensus DNA Vaccine Targeting TERT. *Mol Ther* 2017; 26: 435–445.
23. Lopes A, Vanvarenberg K, Pr at V, Vandermeulen G. Codon-Optimized P1A-Encoding DNA Vaccine: Toward a Therapeutic Vaccination against P815 Mastocytoma. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2017; 8: 404–415.
24. Kleponis J, Skelton R, Zheng L. Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biol Med* 2015; 12: 201–208.
25. Pierce RH, Campbell JS, Pai SI, Brody JD, Kohrt HE. In-situ tumor vaccination: Bringing the fight to the tumor. *Hum Vaccin Immunother* 2015; 11: 1901–1909.
26. Cemazar M, Ambrozic Avgustin J, Pavlin D, Sersa G, Poli A, Krhac Levacic A, et al. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2016; 15: 641–654.
27. Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev* 2015; 41: 503–510.
28. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 2013; 39: 1–10.
29. Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 108–120.



**OPENeP**

**Okolje, kjer je  
varnost pacientov  
na prvem mestu.**

