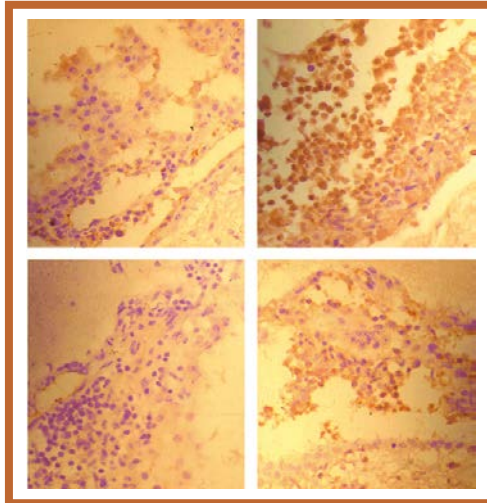


Studia Physiologica  
20/2012

Sáfrány Géza

# Agydaganatok kezelése génterápiával





*Studia Physiologica*  
Fasciculus 20

# **Agydaganatok kezelése génterápiával**

*Sáfrány Géza*



A kötet megjelenését a Semmelweis Egyetem Piramis Projekt (TÁMOP-4.2.3/08/1/KMR-2008-0003) és a Studia Physiologica Alapítvány támogatása tette lehetővé

Sorozatszerkesztő: *Nagy Zoltán*

Nyelvi lektor: *Kékesi Violetta*

Címlapkép: A daganatellenes immunválasz tanulmányozása immunhisztokémiai módszerekkel. Magyarázat a 17. ábra szövegében.

© *Sáfrány Géza, 2012*

**ISSN 1219-2791**

**ISBN 978-963-331-271-1**

A könyv szerzői jogi oltalom és kizárólagos kiadói felhasználási jog alatt áll. Bármely részének vagy egészének mindennemű többszörözése kizárólag a sorozatszerkesztő, a szerző és a kiadó előzetes írásbeli engedélye alapján jogszerű.

	Simmelweis Kiadó
	1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
	<a href="http://www.semmelweiskiado.hu">www.semmelweiskiado.hu</a>

Felelős kiadó: dr. Tancos László igazgató

Tördelőszerkesztő: Békésy János

Borítóterv: Tancos László

SKD: 417

Nyomda: Akaprint Kft.

## Bevezetés

Kora gyermekkoromtól kezdve orvos szerettem volna lenni, jóllehet nem volt korábban orvos, vagy akár egészségügyi dolgozó sem a családban. Ez a gimnáziumi évek alatt csak annyit változott, hogy kutatóorvossá kívántam válni. Kezdetben úgy gondoltam, hogy a gyógyító és a tudományos tevékenységet együtt is lehet végezni. A Pécsi Orvostudományi Egyetemen az első évfolyam alatt azonban dr. Juhász Péternek, biológia gyakorlat vezetőmnek köszönhetően megfertőzött a molekuláris biológia. A második évfolyam kezdetén tudományos diákkörösként kezdtem el dolgozni az Egyetem Biológiai Intézetében, Péter szárnyai alatt. Baráti irányításával ismerkedtem meg a biológiai kutatásokkal, nélküle valószínűleg, másképpen alakult volna pályafutásom.

Az egyetem elvégzése után ugyanott, a Prof. Tigyi András által vezetett Biológiai Intézetben kezdtem dolgozni. 1982-ben kerültem jelenlegi munkahelyemre az Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézetbe (OSSKI). Azóta tart szakmai és baráti kapcsolatom Professzor Hídvégi Egonnal. Egon laboratóriumában dr. Financsek István vezetésével ismerkedtem meg a génsébeszet, az igazi molekuláris biológiai alapjaival, miközben az emberi riboszóma RNS gének szerkezetét, működését tanulmányoztuk. Ezt a munkát folytattam másfél évig, 1985-86-ban a Tokió Egyetem Orvosi Fakultásának, 1. számú Biokémiai Intézetében, Prof. Muramatsu irányítása alatt, valamint hazatérésem után immár önállóan az OSSKI-ban is. Tudományos szakterületem gyakorlatilag változatlan maradt az 1990-ben kezdődő közel három éves amerikai tanulmányutam alatt is, ahol Professzor Perry laboratóriumában – Fox Chase Cancer Center, Philadelphia – feladatomban a riboszóma fehérje gének működésének molekuláris szintű tanulmányozása volt.

Szakmai érdeklődésem Amerikából való hazatérésem után - köszönhetően részben az OSSKI sugaras háttérének – vett éles fordulatot. A külföldön elsajátított molekuláris metodikákat az ionizáló sugárzás biológiai hatásainak tanulmányozására és új daganattellenes, főleg génterápiás modalitások kidolgozására kezdtem alkalmazni. Utóbbi területen végzett munkámról, nevezetesen az agydaganatok génterápiás kezeléséről szeretnék a következőkben áttekintést adni. Először röviden ismertetek néhány génterápiás alapfogalmat, az emberi sejtekbe történő génbevitel lehetséges módozatait és a génbevitelre alkalmazható vektor molekulákat. Ezt követően az irodalmi adatok tükrében ismertetem saját, illetve pontosabban fogalmazva az általam vezetett munkacsoport kísérletes agydaganatok kezelésében elért eredményeit.

## A génterápia fogalma, kezdeti lépések

Génterápián valamilyen idegen, működőképes genetikai anyag emberi sejtekbe való terápiás célú bevitelét értjük. Génterápia segítségével helyreállíthatunk egy veleszületett metabolikus hibát, megváltoztathatunk, vagy kijavíthatunk egy szerzett genetikai

rendellenességet és adott esetben egy addig még nem létező, új funkciót adhatunk a módosított sejtnek.

A génterápia klinikai alkalmazásának a kezdetei az 1980-as évek végére, az 1990-es évek elejére tehetőek. Egyes értelmezések szerint az első klinikai génterápiás kezelést Rosenberg és munkatársai (1) végezték, amikor is áttétes daganatos betegeket kezeltek IL-2 és tumor-infiltráló limfociták kombinációjával. Vizsgálataik bizonyították, hogy mesterséges módon, a beteg saját sejtjeinek felhasználásával kiváltható egy daganatellenes immunválasz, de ebben az esetben a betegnek beadott sejtek genetikai módosítása még nem történt meg. Valójában az első tényleges génterápiás kezelést, genetikailag módosított sejtekkel Culver, Anderson, Blaese és munkatársaik végezték 1990-ben (2). Egy immunhiányos megbetegedésben (adenozin-deamináz, ADA hiány) szenvedő négy éves kislány, Ashanti deSilva limfocitáiba vitték be *ex vivo* körülmények között egy retrovírus alapú vektor segítségével az ADA gént, majd a genetikailag módosított sejteket visszajuttatták a betegbe. Mivel a módosított sejtek nem osztódó limfociták voltak, az immunrendszer helyreállítása csak időleges volt.

Jelenleg a világon 1843 regisztrált génterápiás protokoll áll klinikai bevezetés alatt (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). A klinikai eljárások több mint 60%-a a daganatos megbetegedések génterápiás úton történő gyógyítását szolgálja. Emellett a klinikai protokollok mintegy 8-8% célozza meg monogénikus öröklődő megbetegedések, fertőző megbetegedések és ischaemiás megbetegedések terápiáját. A legtöbb génterápiás protokoll (1174) az Amerikai Egyesült Államokban van regisztrálva, emellett jelentősebb számú klinikai bevezetési eljárás folyik az Egyesült Királyságban (203), Németországban (81), Franciaországban (53) és Svájcban (50).

Már itt, a bevezetőben is hangsúlyozni szeretném, hogy a génterápia jelenleg csak egy biztató lehetőség az orvostudományban. A génterápiás eljárások jól működnek állatkísérletes rendszerekben, de a jelentős klinikai eredmények még váratnak magukra. Ez abban is tükröződik, hogy jelenleg csak 67 génterápiás eljárás érte el a fázis III. klinikai vizsgálati szintet, és mindössze 2 eljárás folyik a fázis IV. klinikai vizsgálati szinten (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Mindkét fázis IV. klinikai vizsgálatot Kinában jegyezték be.

## **A génterápia típusai, génbevitelre alkalmazott eljárások**

Génterápiával mind a testi, mind pedig az ivarsejteket módosíthatjuk. Az emberi ivarsejtek genetikai módosítása gyakorlatilag az összes fejlett államban tiltott. Ennek hátterében részben az áll, hogy el akarjuk kerülni azt, hogy az emberi genomot, egyes emberek genetikai tulajdonságait öncélúan megváltoztassák. A másik ok, hogy az ivarsejtek hosszú távú genetikai módosításához olyan vektorokat kell alkalmazni, amelyek integrálódnak a genomba. Mivel az integráció helye jelenleg még nem kiszámítható, így a generációkkal későbbi következményeket sem ismerjük. Mivel ivarsejti génterápiát

jelenleg nem végeznek, a továbbiakban kizárólag a szomatikus génterápiával foglalkozunk.

A génterápia során szomatikus, testi sejtekbe való génbevitel három módon valósítható meg. Az *ex vivo* génterápia során a szervezetből eltávolított sejteket génszélesztési úton módosítják, és ezeket a sejteket juttatják be a gyógyítandó betegbe. A módosított sejtek származhatnak közvetlenül a kezelendő betegből, de más emberekből is. A módszer egyik előnye az, hogy így lehetővé válik a genetikailag módosított sejtek mesterséges körülmények közötti felszaporítása. Emellett, a kezelendő betegbe való bejuttatás előtt lehetséges ezen sejtek vizsgálata, jellemzése, azonosítása is. Az *ex vivo* eljárás hátránya jelentős munkaigényessége és az, hogy nem minden sejt tenyészhető *in vitro* körülmények között. Ezt az eljárást alkalmazzák elsősorban az öröklődő genetikai megbetegedések génterápiája során, pl. a csontvelői őssejtek genetikai módosítására, de a daganatok génterápiájában is alkalmazzák (3-6).

A génterápia során a génbevitel ideális módja az lenne, amikor a terápiás gént közvetlenül a betegbe juttatják (*in vivo* génterápia). Az *in vivo* génterápia kétféleképpen valósítható meg. A ma még gyakoribb esetben a terápiás gént hordozó vektor molekulát közvetlenül a célterületbe pl. daganat, ischaemiás régió juttatják. Optimális esetben a vektor molekulát a vérkeringésbe juttatják, az megkeresi a célterületet és csak ott fejti ki hatását (3-6).

### *Génbevitelre alkalmazott vektor molekulák*

A génterápia eredményességét nagymértékben az dönti el, hogy milyen hatásokkal sikerül az adott gént bevinnünk a célsejtekbe és a bevitt génről tartósan képződnek-e a megfelelő fehérje molekulák. A génterápia során általában nem szükséges a teljes, intronokból és exonokból álló gént bevinnünk a kezelendő sejtekbe, elegendő a mRNS-nek megfelelő DNS szakasz, az ún. komplementer DNS (cDNS) bejuttatása. Ezt a komplementer DNS-t olyan szabályozó szekvenciákkal (promoter) kell ellátnunk, amelyek lehetővé teszik, hogy a bevitt DNS-ről megfelelő RNS-ek, majd fehérjék keletkezzenek. Az sejtbe való eredményes bejuttatás érdekében a komplementer DNS-t egy hordozó DNS molekulába (vektor) kell beépíteni. A vektor molekula igen gyakran plazmid DNS.

Ha DNS-t, pl. plazmidba klónozott terápiás gént adunk közvetlenül *in vitro* növekvő sejtekhez, azt a sejtek gyakorlatilag sosem veszik fel. Érdekes módon, megfigyelték azonban, hogy ha az *in vivo* génterápia során tisztított plazmid molekulákat injekciónak emberbe, akkor az injekciós hely környezetében található izomsejtek, endotel sejtek, jóllehet alacsony hatásokkal, de képesek a plazmid molekulák felvételére és a terápiás gén időleges átírására. Ezt az eljárást alkalmazzák elsősorban a kardiális és perifériális ischaemiás megbetegedések génterápiája során.

Az emlős sejtekbe történő *in vitro* génbevitel klasszikus módszere a kalcium-foszfát koprecipitációs eljárás. Az így bevitt DNS túlnyomó többsége lebomlik a citoplazmában, egy kis részük azonban bekerül a sejtmagba és a terápiás gének átíródnak. Az így bevitt génről az esetek többségében a génátírás ideiglenes. Ennek egyik oka a plazmidok

gyors sejten belüli lebomlása, a másik pedig az emlős sejtek szaporodása. A sejtosztódás során a sejt szám rohamosan nő, és mivel a plazmidok általában nem képesek az emlős sejtekben való szaporodásra, nem kerülnek át az utódsejtekbe. A kalcium-foszfát alapú génbevitel jelentős hátránya a rendkívül alacsony hatásfok. A kezelt sejteknek mindössze 1-10%-a veszi fel és fejezi ki az idegen gént. A kalcium-foszfátos módszer megfelelő módosításával (szelekciós markerek alkalmazása) lehetőség van a bevitt gén tartós működtetésére is. Ekkor a sejtbe bevitt plazmid beépül, integrálódik a sejt DNS-ébe. Az integrálódott DNS a sejtosztódás során átkerül az utódsejtekbe, és ez által működése állandósul. Az un. tartós génbevitel hatásfoka azonban két nagyságrenddel kisebb az ideiglenes génbevitel hatásfokánál is. A kalcium-foszfát koprecipitáció mellett több un. fizikális eljárás is alkalmazható az emlős sejtekbe való génbevitelre. A teljesség igénye nélkül megemlíthető az elektroporézis, a mikroinjekció és a DEAE-dextránt alkalmazó módszer. A génbevitel hatásfoka tovább növelhető speciális ágensek használatával, mint pl. liposzómák, különböző emulziók, fehérjék, vagy kationos polimerek, a génbevitel hatásfoka azonban sohasem éri el a száz százalékot (3-6).

### *Vírus alapú génterápiás vektorok*

A hagyományos génbeviteli eljárások alacsony hatásfoka miatt kezdődött el a vírus alapú vektorrendszerek kifejlesztése. A vírusok vektor molekulaként való felhasználását az teszi lehetővé, hogy bizonyos szerkezeti módosítás után idegen gének klónozhatók beléjük. A terápiás gén beillesztését követően a genetikai úton módosított vírus „normális” fertőzési folyamattal kerül be a sejtekbe, ezáltal célba juttatva a terápiás gént. Vírusvektorok használatával akár száz százalékos génbeviteli hatásfok is elérhető. A vírusvektorok jelentőségét mutatja, hogy a jelenleg folyó klinikai génterápiás eljárások túlnyomó többsége valamilyen vírusvektort használ. Lényegében bármely vírusból készíthető a génterápiában alkalmazható vektor molekula, így alkalmaznak retro-, adeno-, lenti-, adeno-associated-, herpes simplex-, vakcinia-, stb. alapú vírus vektorokat. A vírusvektorok közül jelenleg a legelterjedtebbek a retro- és az adeno-vírus alapú vektorok, ezért velük részletesebben is foglalkozunk (3-6).

### *Retro- és lentivírus alapú vektorok*

A retrovírusok genomja 8-10 ezer nukleotid hosszú diploid pozitív láncú RNS-molekula, amely három gént (*gag*, *pol*, *env*) hordoz. A *gag* gén a vírus belső szerkezeti fehérjéit (mátrix, capsid, nucleocapsid), a *pol* gén a vírus genom átírásáért, integrációjáért felelős enzimeket (reverz transzkriptáz, integráz, proteáz), az *env* gén pedig a vírus külső burok fehérjéit kódolja. A sejtbe bekerülő vírus RNS-t először a vírus genom által kódolt reverz transzkriptáz enzim kétláncú DNS-é alakítja át. A keletkezett vírus DNS integrálódik, beépül a megfertőzött sejt DNS-ébe. A vírus integrálódását a DNS molekula két végén elhelyezkedő ismétlődő DNS szekvenciák (LTR) segítik elő. A továbbiakban, adott esetben hosszú látencia idő után a fertőzött sejt RNS szintetizáló rendszere készíti az integrálódott DNS-ből a vírus RNS-t és a vírus fehérjéket és új fertőzőképes vírus alakul



ki. A retrovírus vektorok kialakításának leggyakoribb kiindulási pontja az egér leukémia vírus (MuLV). A vektort a vírus kétláncú DNS-t tartalmazó változatából (provírus) készítik. Az első, második generációs vírusvektorok előállításánál a nagyfokú biztonság volt az elsődleges, mindenképpen ki kellett küszöbölni új, fertőzőképes vírusok kialakulását. A vektor készítés során a provírusból eltávolították a fehérjéket kódoló részeket (*gag*, *pol*, *env*) és ezek helyére illesztették be a terápiás gént. A megfelelő vírus fehérjék hiánya miatt a módosított vírus emberi és egyéb emlős sejtekben szaporodásra képtelen, így tovaterjedő fertőzést nem tud okozni. A szaporodásra való képtelenségük miatt a retrovírus vektorok felszaporítása, előállítása speciális, genetikai úton módosított sejtvonalakban, úgynevezett, pakoló sejtekben történik, amelyek termelik a hiányzó (*gag*, *pol*, *env*) vírus fehérjéket.

A génterápiás alkalmazás során a tisztított vírusvektort, vagy a vírust termelő pakoló sejteket keverik össze az *ex vivo* kezelendő sejtekkel, vagy injekciózzák be közvetlenül a betegbe. A retrovírus alapú vektorok előnye, hogy aránylag rövidek, így viszonylag könnyű a terápiás gén beillesztése. A retrovírus integrálódik a genomba ezért stabil, hosszú távú gén-kifejeződést eredményez. A retrovírus alapú vektorok egyik jelentős hátránya, hogy a genomba való integráció helye nem számítható ki előre. Ha a vírus integráció pl. egy protoonkogént kódoló régióba történik, akkor az az onkogén aktivációjához, az érintett sejt malignus transzformációjához vezethet. Egy másik hátrány, hogy bár a fertőzés során a retrovírusok áthatolnak a sejtmembránon, de képtelenek átjutni a sejtmag membránra. Emiatt retrovírusokkal kizárólag csak osztódó sejteket lehet megfertőzni, mivel a sejtosztódás során a maghártya időlegesen eltűnik (3-6).

A retrovírus alapú vektorok említett hátrányai miatt fejlesztették ki a lenti-vírus alapú vektorokat, amelyek leggyakoribb kiindulási alapja az emberi HIV vírus. A lenti-vírusok a retrovírusokhoz hasonlóan RNS vírusok. A génterápiás alkalmazásuk során előnyük, hogy a genomba való integrációjuk helye részben specifikus. Emellett a lenti-vírusok nyugalmi állapotban lévő sejtekbe is képesek bejutni (5-6).

### *Adenovírus alapú vektorok*

A vírus alapú vektorok közül jelenleg leggyakrabban az adenovírus alapú vektorrendszereket használják terápiás génbevitelre. Az adenovírus egy közönséges humán patogén, élete során az emberek túlnyomó többsége átesik valamilyen adenovírus fertőzésen. Az adenovírus genomja harminchatezer bázispár hosszúságú lineáris, kétláncú DNS-ből áll. A vírus genom un. korai, és késői géneket kódol. A vírusfertőzés során az adenovírus sejtfelszíni receptorokhoz (coxackie-adenovírus receptor) kötődve jut be a sejtekbe. A sejtbe került vírus könnyen áthatol a magmembránon is, így nyugalmi állapotban lévő sejteket is megfertőz. Az adenovírus sejtben belüli szaporodásához mind a vírus által kódolt, mind pedig celluláris fehérjék is szükségesek. A sejtbe való bejutás után a vírus gének közül először az un. korai gének íródnak át (elsőként az E1A és E1B), mely fehérjék feltétlenül szükségesek a késői gének átírásához. Az E1A és E1B fehérjék nélkül a vírus nem képes a sejtekben való szaporodásra. Az első generációs adenovírus alapú vektorok kialakítása során az E1A és az E1B géneket eltávolítják a vírus

genomból, és helyükre illesztik be a terápiás gént. Ennek következtében a vírus nem képes az emberi sejtekben való szaporodásra, fenntartása, előállítás csak speciális, az E1A és E1B fehérjét termelő (HEK293) sejtvonalakban történhet. Az adenovírus vektorok kiválóan használhatók mind az *ex vivo*, mind pedig az *in vivo* génterápia során. Az adenovírus alapú vektorok előnye a retrovírusokkal szemben, hogy a legtöbb sejtet sokkal nagyobb hatásokkal fertőzik, és amint azt már említettük képesek nyugalmi állapotban lévő sejtekbe is bejuttatni a terápiás gént. Az adenovírus alapú vektorok nem integrálódnak a genomba, így csak ideiglenes génbevitelre alkalmasak, viszont így onkogén aktiválódást, malignus transzformációt sem okoznak. Az adenovírus alapú vektorok alkalmazásának legjelentősebb hátránya az, hogy a legtöbb ember élete során már átesett adenovírus fertőzést, így bennük adenovírus elleni immunitás alakult ki. Ez esetenként meggátolhatja a terápiás gén bevitelét, és/vagy toxikus immunreakciókat válthat ki (3-6).

### *Új típusú vektorrendszerek*

A vírusvektorok fejlesztése folyamatos. Az első-második generációs vírusvektorok fejlesztése során az egyik alapvető megoldandó feladat a vírus vektor szaporodásának kizárása volt. Az elmúlt időben klinikai vizsgálatok sora bizonyította ezeknek a vírusvektoroknak a biztonságosságát. Az is bebizonyosodott, hogy a vektor molekulák szaporodásképtelensége a daganatterápia során ahhoz vezet, hogy a daganatsejteknek csak kis része veszi fel a terápiás gént, így a génterápia hatásfoka alacsony lesz. Emiatt megkezdődött a harmadik-negyedik generációs feltételes replikációra, szaporodásra képes vírusvektorok kifejlesztése. Ezeket a vírusvektorokat olyan szabályozó szekvenciákkal látják el, amely csak bizonyos célsejtekben teszi lehetővé szaporodásukat, normál, egészséges sejtekben nem. Adott esetben így lehetővé válik, hogy a vektort pl. intravénás injekcióval juttassuk a kezelendő betegbe. A vektor a terápiás génnel együtt a szervezet legtöbb sejtjébe bejuthat, de mivel ott nem képes szaporodásra egy idő után lebomlik. A célsejteket elért vektor-molekulákban a szaporodást elindító szabályozó szekvenciák bekapcsolódnak, a vírusvektor elszaporodik és a terápiás gén kifejti hatását (3-6).

## Daganatos megbetegedések génterápiája

A klinikai bevezetés alatt álló génterápiás eljárások túlnyomó többsége valamilyen daganatos megbetegedés kezelését kísérli meg. Eddig több mint húszezer beteg esetében alkalmaztak valamilyen génterápiás eljárást és a betegek kb. kétharmada daganatos betegségben szenvedett. A daganatos betegségek génterápiája során leginkább az alábbi megközelítési módokat alkalmazzák: valamilyen gyógyszer-érzékenyítő génnek a daganatos sejtekbe juttatása; az immunrendszer daganatelleni aktiválása, daganatok kialakulásában szerepet játszó gének működésének szelektív befolyásolása és a daganatos sejtek elpusztítása onkolitikus vírusok segítségével.

A daganatos megbetegedések kísérleti génterápiájának területén az általam vezetett munkacsoport is jelentős eredményeket ért el, ezért először saját, agydaganatok kezelésére vonatkozó állatkísérletes eredményeinket ismertetem az irodalmi adatok tükrében (7-10). Ezt követően kitérek arra, hogy a daganatok génterápiás kezelése során milyen fontosabb eljárások kerültek különböző fázisú klinikai alkalmazásra.

### *Agydaganatok génterápiája állatkísérletes rendszerben*

Munkacsoportunk sajátossága, hogy új daganatterápiás eljárások kidolgozása mellett az ionizáló sugárzás biológiai hatásait, beleértve a sugárzás terápiás hatását is tanulmányozza. Ezért kézenfekvő volt, hogy a különböző génterápiás eljárások daganat ellenes hatását sugárterápiával kombinációban vizsgáljuk. A daganatok közül az egyik legrosszabb prognózisú daganattípust, az agydaganatokat választottuk modellként. A malignus agydaganatok leggyakoribb formája a glioblastoma multiforme, amely rendkívül gyors növekedéssel és invazív természettel jellemezhető. A gliomák nem adnak áttéteket, de lokális növekedésük szinte minden esetben korai elhalálózáshoz vezet. A gliomák konvencionális kezelése műtéti eltávolításból és az azt követő sugár-, esetleg kemoterápiából áll. Sajnos, a legmodernebb kezelési eljárások alkalmazása esetén is a betegek 95%-a meghal a diagnózist követő egy éven belül (11-15). A rossz prognózis mindenképpen szükségessé teszi új terápiás eljárások alkalmazását és a klinikumba történő bevezetését. A génterápia egy alapvetően új kezelési lehetőség az agydaganatok terápiájában, de munkánk kezdetekor igen kevés irodalmi adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a génterápiás eljárások mennyire kombinálhatók sugárterápiával (16-17). A daganat elleni génterápiás eljárások közül elsősorban két protokoll keltette fel érdeklődésünket. Az egyik, az immunrendszer specifikus aktivációja az adott daganat ellen citokinek segítségével (18-19), a másik a daganatok kemoterápiás szerek iránti érzékenységének a növelése, úgynevezett gyógyszer-érzékenyítő génekkel (16, 17, 20, 21). Kezdeti eredményeink alapján végül egy teljesen új megközelítést is alkalmaztunk, nevezetesen megkíséreltük agydaganatok sugárérzékenységét fokozni a génterápia eszközeivel (10).

## *Egér agytumor modell kialakítása, jellemzése*

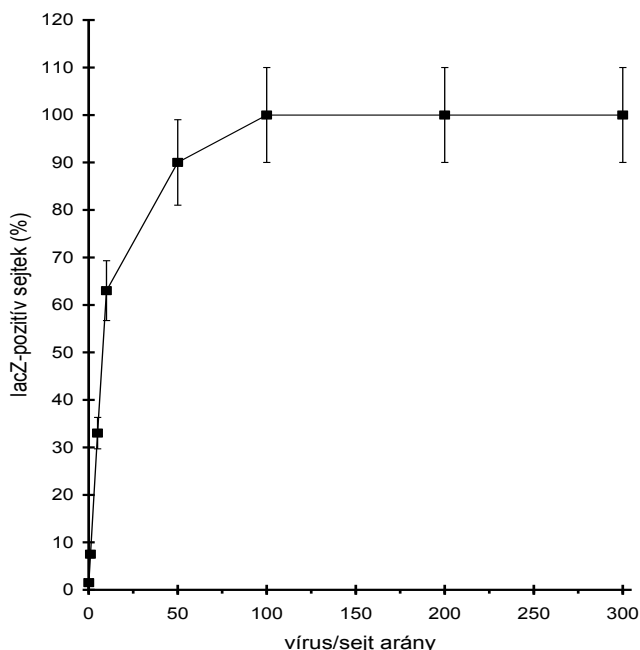
Kísérletes agydaganatokkal végzett munkánk kezdetén gondot okozott, hogy nem állt rendelkezésünkre egy megbízható egér agydaganat modell. A több munkacsoport által is használt GL261 egér gliomát kis tumor darabok intrakraniális és szubkután transzplantációjával tartották fent állatról, állatra való átoltással (22). Az 1990-es évek elején egyidejűleg több laboratóriumban, beleértve a sajátunkat is, sikerült *in vitro* növe sejttenyészetet kialakítani a daganatból (7-9, 23-27). Részletes jellemzést a GL261 tumor modellről azonban csak mi publikáltunk (7, 28). *In vitro* körülmények között a sejtek gyorsan nőnek, kontakt-gátlással nem rendelkeznek. *In vivo* körülmények között a sejtek agresszív növekedést mutatnak mind az eredeti C57Bl6 egér gazda törzsön, mind pedig C57Bl6 és DBA2 egerek F1 hibridjein (Hídvégi és munkatársai, nem publikált adatok). Intrakraniális transzplantációt követően 100 sejt is elegendő ahhoz, hogy a gazda állatokat megölje. Az állatok pusztulása ebben az esetben, átlagosan a tumor transzplantáció utáni 70. nap környékén történik. Tízezer sejt transzplantációja után az egerek 3-4 hét alatt pusztulnak el (7). Más szerzők adatai is az intrakraniális GL261 tumor agresszív növekedésére utalnak (25-27, 29). Az egér 4C8 (30), valamint a patkány C6 (31, 32) gliomák növekedése kevésbé gyors. A C6 modell esetében még az agytumor spontán regresszióját is leírták (33), ezt mi sosem tapasztaltuk a GL261 modell esetében.

Az *in vitro* növe GL261 sejtek meglehetősen sugárérzékenyek, 2 Gy besugárzás hatására a sejtpusztulás mértéke eléri az 50%-ot, és 20 Gy besugárzást gyakorlatilag egyetlen sejt sem él túl. Érdekes módon, az intrakraniálisan növe tumor sugárrezisztenciája nagyobbak tűnik: 4-6 Gy lokális tumor besugárzás hatására az állatok túlélése csak mérsékelten javul (7). Humán adatok is arra utalnak, hogy a glioma sejtek „belső” sugárérzékenysége nem feltétlenül felel meg az *in vivo* tumor növekedésnek, és ez a tulajdonság állhat az emberi gliomák sugárrezisztenciájának a hátterében (34, 35).

Tanulmányoztuk a génterápiában gyakran alkalmazott adeno- és retrovírus alapú vektorok fertőzésének a határfokát GL261 sejtekben. A GL261 sejtek nagy határfokkal fertőzhetők adenovírus alapú vektorral: 10 vírus/sejt arányú fertőzésnél a sejtek közel 70% tartalmazza a vírust, míg 100 vírus/sejt arányú fertőzésnél az összes sejt vektorhordozó lesz (1. ábra).

Más glioma sejtek esetében az adenovírus vektorok fertőzőképessége kisebb. Száz vírus/sejt arányú fertőzésnél az emberi eredetű U373 glioma sejtek 75%-a, patkány C6 és 9L glioma sejtek 25, illetve 10%-a tartalmazza csak a vírust. Adataink szerint a retrovírus vektorok fertőzési hatékonysága igen alacsony (<5-10%) (7). Egér astrocytoma SMA-560 sejtek esetén a retrovírus vektorok fertőzési hatékonysága elérheti a 30%-ot is (36).

GL261 sejtekben jelenlévő onkogén elváltozásokat tanulmányozva megállapítottuk, hogy mind a p53, mind pedig a K-ras gén mutációt hordoz. A p53 mutációk jelenléte igen gyakori emberi agydaganatokban és általában a rossz prognózis jele (37, 38). K-ras mutációk általában alacsony frekvenciával vannak jelen emberi gliomákban (39). Nem zárható ki, hogy a GL261 tumor esetében a K-ras mutáció annak következtében alakult ki, hogy a tumort kémiai karcinogénnel indukálták. A GL261 sejtekben megemelkedett a myc onkogén expressziója is. Myc aktiváció meglehetősen ritka emberi agydaganatok-



**1. ábra. Adenovírus alapú vektorok génbeviteli hatásfokának tanulmányozása Gl261 sejteken.**

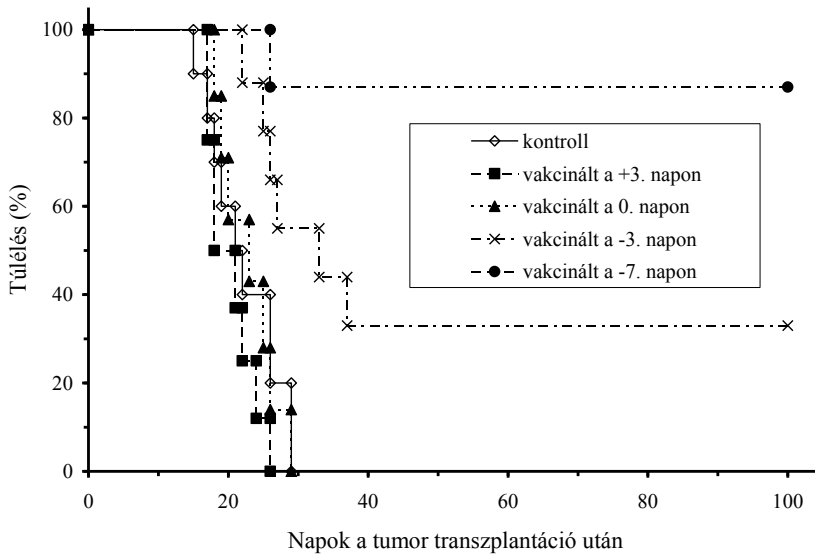
Gl261 sejteket különböző vírus/sejt arányban fertőztünk  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kódoló rekombináns adenovírus vektorral. A  $\beta$ -galaktozidáz gént tartalmazó sejteket X-Gal pufferben festettük meg.

ban, ám bár néhány esetben szintén kimutatták a myc onkogén fokozott expresszióját és amplifikációját (40), valamint a fehérje fél-életidejének meghosszabbodását is (41).

Egy kísérletes tumor modellnél igen fontos az alkalmazott sejtek immunrendszert aktiváló hatásának a mértéke. Amennyiben a sejtek jelentős daganatellenes immunaktivitást kiváltó képességgel rendelkeznek, ez jelentősen befolyásolhatja a különböző ágensekkel végzett terápia eredményességét. Az immunaktiváló hatásban fontos szerepe lehet az MHCI, MHCII antigének jelenlétének, valamint a ko-stimulátor molekulák (B7-1, B7-2) expressziójának is. Erős invazív hatással rendelkező humán gliomákban az MHCI és MHCII expresszió csökken (42). Patkány C6 és 9L glioma sejtekben is minimális az MHC szint (43, 44). Újabban kimutatták, hogy emberi glioblasztómából kialakított sejt kultúrákban, a folyamatos átoltások során nő az eredeti daganathoz viszonyítva az MHCI és MHCII antigének, valamint a B7-2 receptor sejt felszíni expressziója (45). Kutató csoportunk a Gl261 sejtekben MHCII antigén expressziót nem tudott kimutatni. Az MHCI expresszió azonban fokozódott a kontroll egér agyban mérthez viszonyítva. Különböző citokinek MHC expresszióra való hatását tanulmányozva megállapítottuk, hogy csak az IFN $\gamma$  fokozta az MHCI, és aktiválta az MHCII expressziót. Az IFN- $\gamma$  MHC antigén expressziót növelő hatását korábban más glioma sejtekben is kimutatták (23, 36, 46, 47). Adataink szerint besugárzás hatására nem változott Gl261 sejtekben az MHC antigének expressziója. Hasonló eredményeket publikáltak patkány 9L gliomára vonatkozóan is (47). Ezzel szemben emberi és egér melanoma sejtekben letális dózisu ionizáló

sugárzás fokozhatja az MHC szintet (48). Alacsony, de jól kimutatható mértékű B7-1 és B7-2 expressziót találtunk Gl261 sejtekben. B7 expresszió, egyébként nincs jelen egészséges egér agyban. B7 expressziót korábban nem találtak emberi gliomákból kialakított sejtvonalakban sem (49).

A Gl261 sejtek képesek egy kismértékű daganatellenes immunreakció kiváltására besugárzott sejtekkel transzplantált C57Bl6 egerekben. Vizsgálataink szerint, ha a tumor sejtek transzplantációja előtt 3-7 nappal az egereket előkezeltük, besugárzással előlt Gl261 sejtekkel, akkor az egerek egy részében nem eredt meg a daganat (2. ábra).



**2. ábra. Agydaganatos egerek túlélése, besugárzott daganatsejtekkel való elő-vakcinációt követően.** Az egereket Gl261 sejtek intrakraniális oltása előtt vagy után különböző időpontokban szubkután oltással vakcináltuk 20 Gy  $\gamma$ -sugárzással előlt Gl261 sejtekkel.

Ez nyilvánvalóan a daganatsejtek elleni immunaktiváció következménye. Véleményünk szerint az immunaktivációban szerepet játszhat a Gl261 sejtekben jelenlévő megemelkedett MHCI expresszió, valamint a B7 ko-stimulátor molekulák jelenléte is. Meg kell említeni, hogy a jelenleg használatos állati tumor modellek többsége is immunaktiváló hatással bír. Blume és munkatársai már 1974-ben leírták, hogy patkány 9L glioma sejtek erős immunrendszert aktiváló hatással rendelkeznek (50). Előlt sejtekkel előkezelt patkányok 89% visszautasította az intrakraniálisan, vagy szubkután transzplantált daganatsejteket. A C6 patkány glioma modell is immunogén (51). Más patkány glioma sejtek (F98, CNS-1, RG2) jóval kisebb mértékű immunrendszert aktiváló hatással rendelkeznek (52-54).

A Gl261 sejtek ellen kialakult immunitás, tartós. Ha besugárzással előlt Gl261 sejtekkel előimmunizált, vagy a GM-CSF (granulocita-makrofág colonia stimuláló faktor) termelő vakcinákkal meggyógyított egerekbe (ld. később) 6 hónappal később Gl261 sejteket transzplantáltunk, a daganat nem eredt meg. Hasonló eredményekre jutottak Plautz és munkatársai is, amikor Gl261 agydaganatot hordozó egereket kezeltek nyirok-

csomókból izolált, és *in vitro* felszaporított T-limfocitákkal. Ha a kezelés eredményeként meggyógyult állatokba 60 nappal később GL261 sejteket transzplantáltak, a daganat nem eredt meg (25). Leírták, hogy hosszú távú daganatellenes memória alakult ki GL261 tumoros egerekben IFN $\beta$  kezelés hatására is (55). A hosszú távú memória szintén kimutatható 9L sejtekkel kialakított patkány glioma modellben (56).

Végül, szeretném hangsúlyozni, hogy jóllehet a GL261 tumor sejtek kétségtelenül rendelkeznek egy mérsékelt immunaktiváló hatással, de elő-vakcinálás hiányában - még kis transzplantált sejtszám esetén is - az összes tumor megered. Emellett, ha az állatokat a tumor transzplantáció napján, vagy néhány nappal később vakcináltuk besugárzással osztódásra képtelenné tett GL261 sejtekkel, szintén az összes daganat növekedésnek indult. Ez azt sugallja, hogy elő-vakcinálás hiányában az aktiválódó immunrendszer nem tudja felvenni a versenyt a rohamos daganatnövekedéssel. Adataink azt bizonyítják, hogy a GL261 egér glioma modell alkalmazása igen hasznos lehet a legkülönbözőbb ágensek terápiás hatásainak tanulmányozása során, a mérsékelt immunaktiváló hatást, annak lehetőségét, azonban feltétlenül figyelembe kell venni az eredmények értékelésénél.

#### *Egér agydaganatok génterápiája gyógyszer-érzékenyítő génekkel*

Az agydaganatok jövőbeni kezelésében jelentős lehet a daganatok kemoterápiás szerekkkel szembeni érzékenységeinek a fokozása, gyógyszer-érzékenyítő gének daganatsejtbe való bejuttatásával. A kemoterápiás szerek iránti génterápiás érzékenyítés alapja az, hogy a legtöbb daganatellenes szer önmagában nem hatásos, nem toxikus a sejtekre. Ezek a gyógyszerek a sejtekben metabolikus aktiváción mennek keresztül és csak a metabolit rendelkezik citotoxikus hatással. Ha a metabolikus enzimeket szelektív módon be tudjuk juttatni a daganatsejtekbe, akkor ott a kemoterápiás szer fokozott helyi aktivációja megy végbe. Ezáltal a szisztémásan adott kemoterápiás gyógyszerek daganaton belüli lokális koncentrációja jelentősen megnő és fokozott terápiás hatás érhető el. Az eljárás segítségével elsősorban a primer daganat gyógyítható. A leggyakrabban használt gyógyszer-érzékenyítő eljárás a timidin kináz/ganciclovir rendszert alkalmazza. A ganciclovir a *herpes simplex* vírus elleni gyógyszer, amely önmagában nem toxikus emberi sejtekre, mivel az emlős sejtek nem képesek toxikus metabolitot készíteni belőle. Ezzel szemben egy, a herpes simplex vírus által kódolt enzim, a timidin kináz igen erősen toxikus származékká alakítja. Ganciclovir (GC) kezelést követően így csak a herpes vírus által fertőzött sejtek pusztulnak el. A génterápiás eljárás során a kezelendő daganatsejtbe beviszik a herpes simplex vírus timidin kináz (TK) génjét. A TK enzim foszforilálja a ganciclovirt és a keletkező metabolit gátolja a DNS polimerázokat. A gátlás hatására a TK gént tartalmazó sejtek elpusztulnak (57-59).

A GC/TK rendszer jól működött patkány agydaganat modell rendszerekben (21, 59-61), de nem bizonyult hatásosnak a klinikai kipróbálás során (63-68). Az eredménytelenség magyarázata az alacsony génbeviteli hatásfokban, a kemoterápiával szembeni rezisztencia kifejlődésében és a kevésbé hatékony „bystander” hatásban keresendő (17, 69-74). A bystander, vagy más néven „szomszédsági” hatás során a TK tartalmú sej-

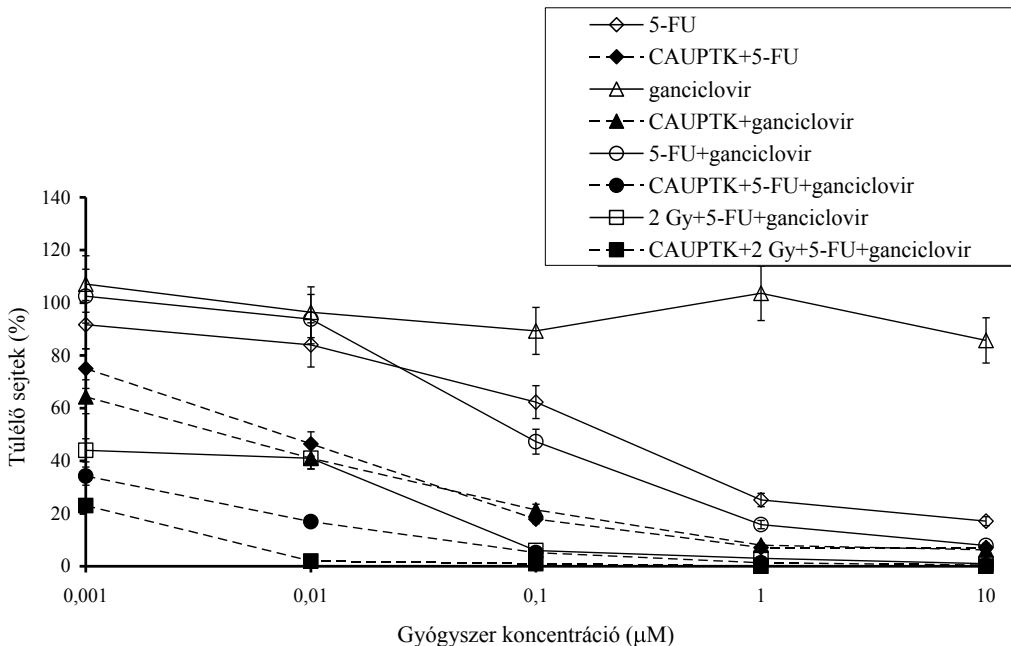
tekben metabolikus aktiváción átesett ganciclovir átkerül a szomszédos, TK gént nem tartalmazó sejtekbe is, azok pusztulását okozva. Úgy gondoltuk, hogy a gyógyszer-rezisztencia kiépülése és a bystander hatás esetleg módosítható, ha nem egy, hanem egyszerre kettő gyógyszer-érzékenyítő gént juttatunk a daganatsejtekbe és a ganciclovir mellett az egyik leggyakrabban használt kemoterápiás szerre az 5-fluorouracilra (FU) is megpróbáljuk fokozottan érzékenyvé tenni a glioma sejteket. Emlős sejtekben az FU először nukleozid-fluorouridin-né metabolizálódik az uridin-foszforiláz enzim hatására, majd 5-fluoro-2'-uridine-5'-monofoszfáttá (FUMP) foszforilálódik az uridin-kináz enzim segítségével. Az FUMP beépülhet az RNS-be FUTP-n keresztül, vagy tovább metabolizálódhat FdUMP-vé. Az FdUMP erős gátló hatással rendelkezik a timidilát szintáz enzimre, amely kulcsfontosságú a dTMP szintézise során. A dTMP a DNS szintézis egyik prekursor molekulája (20, 21, 75). Sajnos mind az FU iránti rezisztencia, mind pedig az FU toxikus mellékhatásai iránti érzékenység jellemző a daganat terápiában. Két lehetőség kínálkozik ennek a problémának a megoldására. Az egyik, hogy az FU-t a nem-toxikus 5-fluorocitozinból (5-FC) készítjük a daganatsejten belül. Az 5-FC lebontására az emlős sejtek nem képesek, de a daganatsejtekbe bejuttathatjuk, az 5-FC metabolikus aktivációjára képes bakteriális, vagy élesztő eredetű citozin-deamináz (CD) enzim génjét (21, 57). Az 5-FC/CD rendszert sikeresen alkalmazták kísérletes kolorektális tumorok (76, 77), valamint patkány és humán glioblasztóma xenograftok terápiájára (57, 78). A másik lehetőség, az *E. coli* uracil-foszforibozil-transzferáz (UPRT) gén daganatsejtekbe való bejuttatása. Az UPRT enzim az FU-t közvetlenül, és igen eredményesen FUMP-vé alakítja (20, 75).

A GC/TK és az FU/UPRT rendszer együttes hatásának tanulmányozására kialakítottunk egy olyan adenovirális vektorrendszert (AdexCA-UPTK), amely mind az FU-ra érzékenyítő UPRT gént, mind pedig a ganciclovirre érzékenyítő *Herpes simplex* vírus timidin-kináz gént tartalmazta. Vizsgáltuk, hogy e gének bevitele, hogyan befolyásolja a megfelelő kemoterápiás szerek hatását agydaganatos egerekben. Külön hangsúlyt fektettünk az eljárás sugárterápiával való kombinálására. Utóbbi azért is jelentős, mert jól ismert az FU sugárérzékenyítő hatása (76, 77, 79, 80).

Vizsgálataink során először *in vitro* körülmények között tanulmányoztuk a két gyógyszer-érzékenyítő gént tartalmazó kombináció hatását. Megfigyeltük, hogy a GC önmagában nem toxikus a gyógyszer-érzékenyítő géneket nem tartalmazó sejtekre, mivel emlős sejtekben nincs olyan enzim, amely a metabolikus aktiváció első lépését el tudja végezni. Az AdexCA-UPTK fertőzött sejtekben a GC toxicitása a koncentráció függvényében nő (3. ábra). Az FU önmagában is citotoxikus hatással bír, mivel emlős sejtek képesek az aktiválására. Az UPRT enzimet kódoló AdexCA-UPTK hatására azonban erősen nő az FU sejtpusztító hatása is.

A vírust nem tartalmazó sejtekben a kombinált GC+FU kezelés hatása lényegében megegyezett az FU egyedüli hatásával. A gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó sejtekben azonban lényegesen kifejezettebb sejtpusztulás figyelhető meg (3. ábra). Végül a gyógyszer-érzékenyítő génterápia és a besugárzás együttes hatását tanulmányoztuk. A 2 Gy sugárdózissal kezelt, vírust nem tartalmazó sejtek mintegy 45%-a élte túl a sugárhatást. A gyógyszer-érzékenyítő gének hiányában alacsony FU és GC kon-





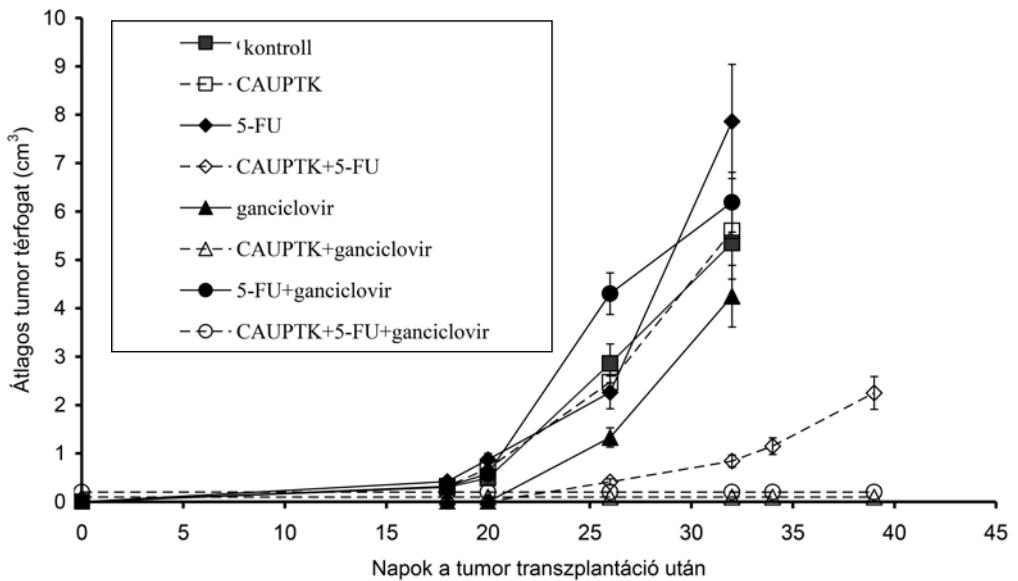
**3. ábra. GL261 sejtek GC, FU és ionizáló sugárzásra való érzékenységének változása gyógyszer-érzékenyítő gének hatására.** GL261 sejteket 100 vírus/sejt arányban fertőztük AdexCA-UPTK vírussal, citotoxicitás assay-vel tanulmányoztuk FU, GC és sugár-érzékenységüket. A sugárhatóást 2 Gy sugárdózissal való besugárzás után követtük nyomon.

centrációknál (0,001 - 0,01 µM) nem láttunk fokozott citotoxikus hatást besugárzásra. A gyógyszer-érzékenyítő gének jelenlétében azonban a besugárzás és FU+GC együttes hatására 0,01 µM gyógyszer koncentrációnál az összes sejt elpusztult (3. ábra).

A gyógyszer-érzékenyítő gének hatását *in vivo* modellen is tanulmányoztuk. A vizsgálatok során kísérleti egerekbe vad típusú, illetve az AdexCA-UPTK vírust tartalmazó sejteket transzplantáltuk szubkután, vagy intracraniális oltással. A vírust tartalmazó sejtek *in vivo* növekedése szubkután körülmények között megkülönböztethetetlen volt a vírust hordozó sejtektől (4. ábra).

Kontroll állatokban a daganat növekedése nem változott lényegesen sem FU, sem GC, sem pedig FU+GC kezelés hatására. A gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó daganatok kezelése során az FU-nak jelentős daganatnövekedést gátló hatása volt. GC és GC+FU kezelés hatására pedig az állatok meg is gyógyultak (4. ábra).

Hasonló eredményeket kaptunk intracraniális daganatot hordozó egerekben is, ahol a kemoterápiás szerek hatását jelentősen befolyásolhatja a vér-agy gát. A vírust tartalmazó daganatok növekedése megegyezett a vírust nem hordozó daganatok progressziójával. A gyógyszer-érzékenyítő gének hiányában egyik kemoterápiás szernek sem volt kimutatható daganatnövekedést gátló hatása. A gyógyszer-érzékenyítő géneket hordozó csoportban FU kezelés hatására az agydaganatos egerek 10-20%-a, GC kezelés hatására pedig 40-50%-a gyógyult meg. A legerősebb daganatnövekedés-gátló hatást a kombinált FU+GC kezelés mutatta, az agydaganatos egerek 60-80%-a tumor-mentes

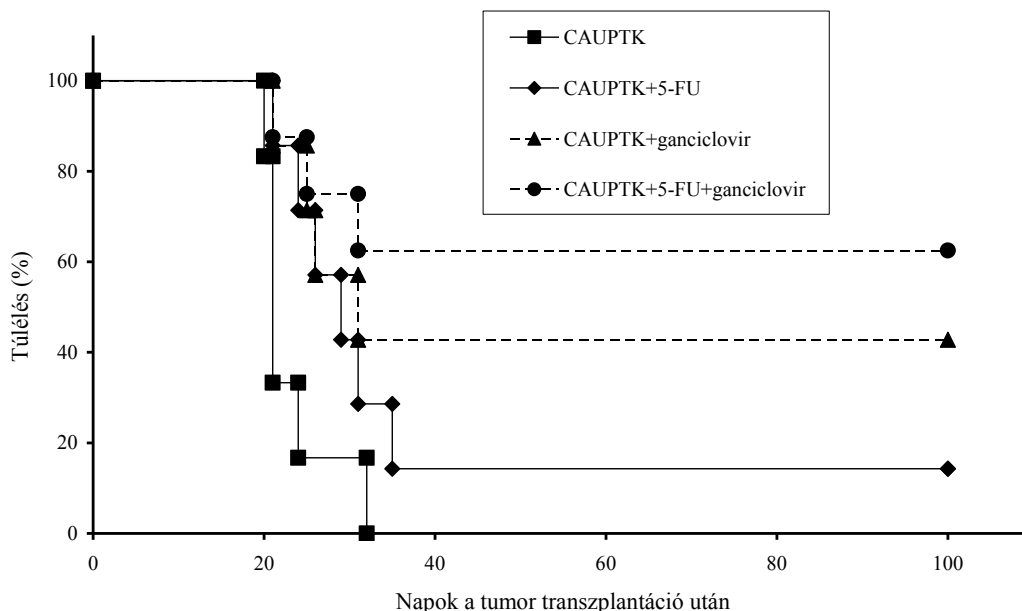


**4. ábra. Tumor növekedés gátlás gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó szubkután daganatokban.** Gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó Gl261 sejteket transzplantáltunk szubkután oltással C57Bl6 egerekbe. Az állatokat egyszeri intraperitoneális oltással FU-val (10 mg/kg), GC-vel (5 mg/kg), vagy a kettő kombinációjával kezeltük, mértük a daganat növekedését.

lett (5. ábra), alátámasztva az *in vitro* eredményeket, miszerint a legjelentősebb citotoxikus hatással a kombinált kezelés bír.

A kombinált gyógyszer-érzékenyítő rendszerek kedvező terápiás hatásait patkány 9L (57) és C6 (81) modellekben is kimutatták a GC/TK és az FC/CD rendszerek alkalmazásával. Korábban említettem, hogy az FC/CD rendszer az 5-fluoro-citozint (FC) alakítja át toxikus terméké az élesztő eredetű citozin-deamináz (CD) enzim segítségével. Aghi és munkatársai szerint a GC/TK és az FC/CD kombináció esetében a két rendszer szinergizmusa azért következik be, mert a GC foszforilációja nő a CD rendszerben keletkező FU hatására (57). Érdekes módon, újabban Moriuchi és munkatársai azt publikálták, hogy a GC/TK és az FC/CD rendszerek kombinációjával a terápiás hatás rosszabb, mint az egyes modalitások egyedüli alkalmazásakor (82). Véleményük szerint vagy az FdUMP TK általi foszforilációja csökkenti az FC/CD rendszer citotoxicitását, vagy pedig a TK által foszforilált GC toxikus hatása csökken egy CD általi deamináció következtében. Mindenesetre az általunk alkalmazott FU/UPRT és GC/TK kombináció lényegesen jobb hatással bír, mint az egyedüli rendszerek. Ennek egyik oka az lehet, hogy a CD általi GC deamináció nem következhet be a munkacsoportunk által alkalmazott kombinációban.

A gyógyszer-érzékenyítő génterápia klinikai alkalmazása során a terápiás gént hordozó vektort közvetlenül a daganatba kell injektálni. Mivel az első és második generációs vírus vektorok szaporodásra képtelenek az emlős sejtekben, nagy valószínűséggel csak az injekciós szűrőcsatorna körüli szövetrészekbe kerül be a terápiás gén. Ezért igen jelentős szerepe lehet a terápia hatáskörének alakításában a bystander hatásnak.

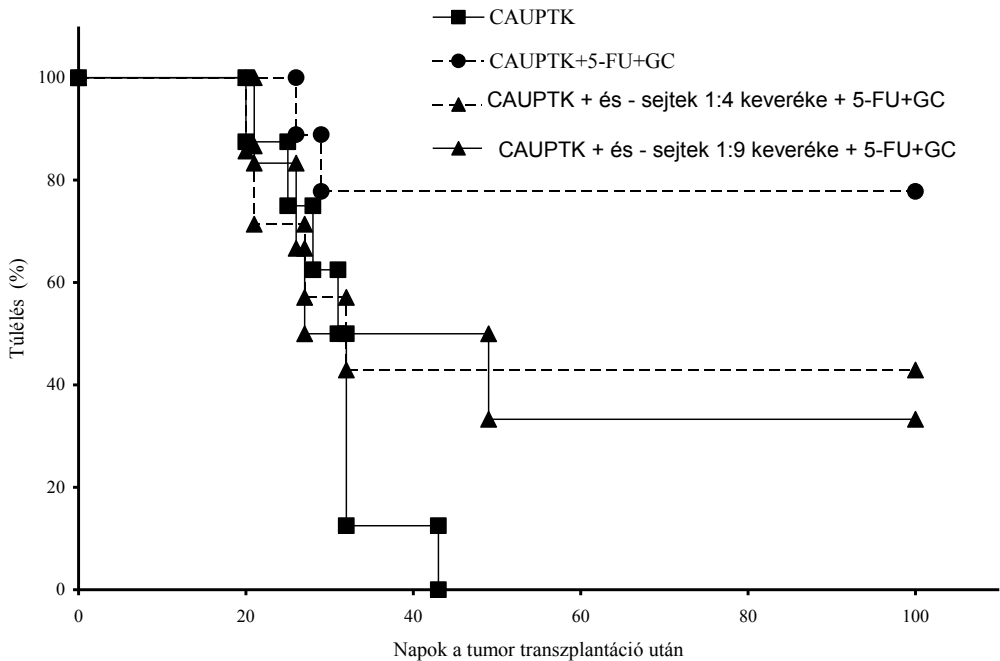


**5. ábra. Tumor növekedés gátlás gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó agydaganatokban.** Gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó GI261 sejteket transzplantáltunk intrakraniális oltással C57Bl6 egerekbe. Az állatokat egyszeri intraperitoneális oltással FU-val (10 mg/kg), GC-vel (5 mg/kg), vagy a kettő kombinációjával kezeltük.

A bystander hatás során, a génterápiás kezeléssel módosított sejtek kommunikálnak a környezetükben jelenlévő daganatsejtekkel. A kommunikáció révén toxikus metabolitok kerülhetnek még a távoli környezetben lévő sejtekbe is, és ennek hatására az érintett sejtek elpusztulhatnak (82-85). Vizsgálataink szerint, a GC/TK és az FU/UPRT rendszerek kombinációja esetén jelentős bystander hatással kell számolni: a GI261 agydaganatot viselő egerek 30-40%-a akkor is meggyógyult, ha a daganatsejteknek csak 10%-a hordozta a terápiás géneket (6. ábra).

Itt szeretnénk megemlíteni, hogy a bystander hatás mellett, a gyógyszer-érzékenyítő géneket nem tartalmazó daganatsejtek elpusztításához az immunrendszer is hozzájárulhat. Ekkor, első lépésként az immunrendszer a terápiás gén ellen aktiválódik. Ennek hatására egy következő lépésben a teljes daganat elleni immunaktiváció is kialakulhat, függetlenül attól, hogy a daganatsejtek hordozzák-e az adott terápiás gént, vagy sem (86).

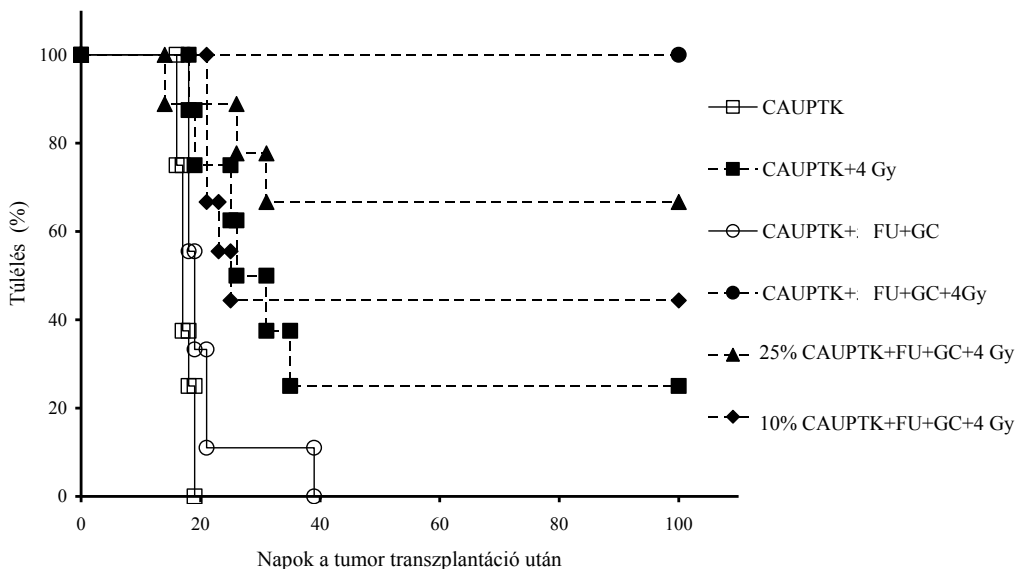
Alapvető kérdés, hogy a gyógyszer-érzékenyítő génterápia hogyan használható az agydaganatok terápiájában jelentős szerepet betöltő sugárterápiával kombinációban. Több kedvező együttthatás is valószínűsíthető. A sugárterápia elpusztíthatja a daganatos sejtek jelentős részét, nagyobb eséllyel adva, a kisebb tumor méret révén a gyógyszer-érzékenyítő géneket hordozó vírus vektorok penetrációjára. Kisebb tumor méret esetén a bystander hatás is jelentősebb lehet. Emellett, több, a gyógyszer-érzékenyítő génterápiában alkalmazott kemoterápiás ágensnek sugárérzékenyítő hatása is lehet (pl. FU). Az FC/CD rendszerről korábban többen is bizonyították a sugárérzékenyítő hatást fejnyaki



**6. ábra. A gyógyszer-érzékenyítő génterápia bystander hatása.** C57Bl6 egerekbe gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó és azt nem tartalmazó sejtek különböző keverékeit transzplantáltuk intrakraniálisan. Az állatokat FU+GC kezelésnek vetettük alá és követtük a túlélést.

(80), kolorektális (76, 87) és 9L (88) kísérletes tumor modellekben. Saját vizsgálataink azt bizonyítják, hogy az FU/UPRT és GC/TK rendszerek külön-külön és együttesen is jól kombinálhatók lokális tumor besugárzással. *In vitro* körülmények között a TK és UPRT enzimeket hordozó GI261 sejtekben a besugárzás mintegy három nagyságrenddel fokozta az FU és a GC együttes citotoxikus hatását (3. ábra). *In vivo* körülmények között a GI261 tumort hordozó állatok esetében is igen kedvező hatást láttunk a génterápia és a sugárterápia kombinációjától. A kombinált terápia abban az esetben is hatásosnak bizonyult, ha a daganatsejteknek csak 25, illetve 10%-a volt vírushordozó, ekkor 60-70, illetve 40-50%-os túlélési értékeket kaptunk (7. ábra).

Az eddig ismertetett vizsgálataink során olyan daganatokat kezeltünk, ahol a daganatsejtek eleve tartalmazták a gyógyszer-érzékenyítő géneket. Ez természetesen távol áll a klinikai helyzettől, arra viszont alkalmas, hogy tanulmányozzuk, hogy optimális körülmények között működik-e a rendszer. Vizsgálataink során megpróbáltunk a klinikai szituációhoz hasonló vizsgálatot is beállítani. C57Bl6 egerekbe szubkután oltással olyan GI261 sejteket transzplantáltunk, amelyek nem tartalmazták a gyógyszer-érzékenyítő géneket. Három és 10 nappal a tumor sejtek transzplantációja után a daganatba közvetlenül beinjekcióztuk a gyógyszer-érzékenyítő géneket kódoló AdexCA-UPTK vírust és az állatokat 5-5 napon keresztül FU+GC-vel kezeltük. Tanulmányoztuk a lokális sugárterápiával való kombináció eredményességét is (2-2 Gy a daganatsejt transzplantáció utáni 3. és 10. napon). A vírus injekció nem befolyásolta a daganat növekedését.



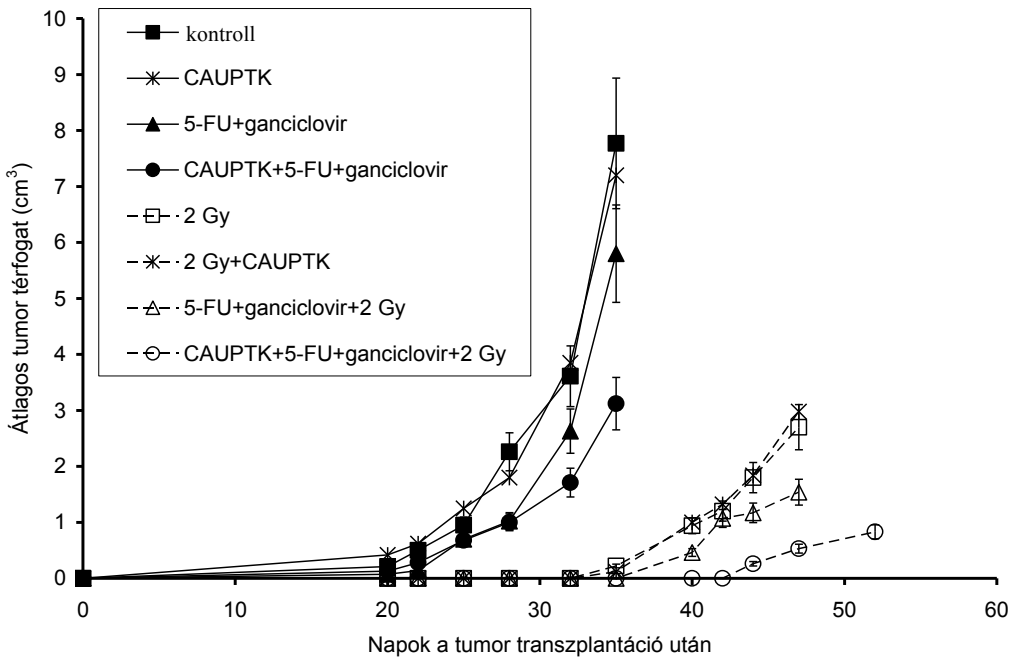
**7. ábra. Gyógyszer-érzékenyítő génterápia és tumor besugárzás kombinációja agydaganatos egerek kezelésére.** Az agydaganatot  $1 \times 10^5$  sejt intrakraniális transzplantációjával alakítottuk ki.

A transzplantációra használt sejtek 100, 25 és 10%-a tartalmazta a gyógyszer-érzékenyítő géneket. Az állatokat FU+GC és 4 Gy lokális besugárzás kombinációival kezeltük és követtük a túlélést.

Önmagában az FU+GC kezelés mérsékelt daganat ellenes hatással bírt, a terápiás hatást azonban jelentősen növelte a gyógyszer-érzékenyítő gének közvetlen daganatba való injekciója (8. ábra). A lokális besugárzásnak önmagában is jelentős tumor növekedés gátló hatása volt. A daganat sugárérzékenységét nem növelte a gyógyszer-érzékenyítő géneket hordozó vírus jelenléte. A lokális besugárzás és az FU+GC kezelés kombinációja jelentős terápiás hatással bírt. A legjobb daganatellenes hatást akkor értük el, ha a besugárzást és az FU+GC kezelést a gyógyszer-érzékenyítő gének jelenlétében végeztük el. Az eredmények azt sugallják, hogy a két gyógyszer-érzékenyítő génnel végzett génterápia és a lokális besugárzás kombinációja ígéretes lehet agydaganatok kezelése során.

A terápiás eredmények valószínűleg még tovább is javíthatók harmadik generációs, a daganatsejtekben specifikus szaporodásra képes vírusvektorok alkalmazásával (89-97). Besugárzás hatására aktiválódó promoterek segítségével azt is el lehet érni, hogy a génterápiás vektor csak a sugárzással kezelt daganatsejtekben aktiválódjon; ez teljesen új irányt nyithat a daganatok génterápiájában (98-107).

Saját eredményeinket összefoglalva, elmondhatjuk, hogy a két gyógyszer-érzékenyítő gént tartalmazó génterápiás rendszer sokkal kedvezőbb hatással bír, mint ha csak egy terápiás gént alkalmaznánk.



**8. ábra. A gyógyszer-érzékenyítő génterápia és a lokális tumor besugárzás hatása a daganatnövekedésre.** A szubkután daganatokat gyógyszer-érzékenyítő géneket nem tartalmazó GI261 sejtek oltásával alakítottuk ki. Három és 10 nappal a transzplantációt követően  $1 \times 10^9$  AdexCA-UPTK vírust injektáltunk a daganatba. Az állatokat FU+GC-vel kezeltük 5 napon keresztül, majd 2 nap szünet után még egyszer 5 napon át. Egyes csoportokban a kemoterápiás kezelést lokális tumor besugárzással egészítettük ki (2 Gy röntgen-sugárzás a 3. és a 10. napon).

### *A daganatellenes immun-válasz aktiválása génterápiás eljárással*

Régi megfigyelés, hogy a kezelhetetlennek tűnő daganatos betegek egy igen kis része váratlanul meggyógyul. Az ilyen esetek jelentős részének a háttérben nagy valószínűséggel a daganatellenes immunválasz aktiválódása áll. Ismert, hogy az immunrendszer sejtjei különböző citokinek segítségével kommunikálnak egymással. Feltételezték, hogy amennyiben daganatsejtekbe citokinek kódoló géneket juttatunk be, a lokálisan termelődő citokinek növelik a daganatsejtek immunogenitását és ezáltal aktiválhatják a szervezet immunrendszerét a daganat ellen. Ezt követően az aktiválódott immunrendszer eltávolíthatja a primer daganatban, valamint a metasztázisokban jelenlévő daganatsejteket is. A citokin kódoló gének daganatsejtekbe való bejuttatására két eljárás lehetséges. Az egyik az ún. *in vivo*, vagy *in situ* terápia. Ebben az esetben a citokinek kódoló géneket valamilyen vektor molekula segítségével közvetlenül a daganatba injektáljuk. A daganatsejtek felveszik és kifejezik a citokin géneket. Az eljárás hátránya, hogy nagymennyiségű vírusvektor kerül közvetlenül a betegbe. A daganatsejtek genetikai módosítása *in vitro* körülmények között is megtörténhet. Ekkor a betegből műtéti úton eltávolítjuk a daganat jelentős részét, és a daganatból primer sejt kultúrát készítünk. Az *in vitro* növekvő daganatsejtekbe juttatjuk be a megfelelő citokin gént,

majd a daganatsejteket a sejtosztódás leállítására céljából nagy dózisu ionizáló sugárzással besugarazzuk. A besugarazott, de még néhány napig citokint termelő sejteket mintegy vakcinaként, intrakután, vagy szubkután injekcióval visszajuttatjuk ugyanabba a betegbe, amelyből az eredeti daganatot eltávolítottuk. Az eljárástól azt várjuk, hogy a vakcináció hatására az immunrendszer aktiválódik a daganat ellen (108, 109).

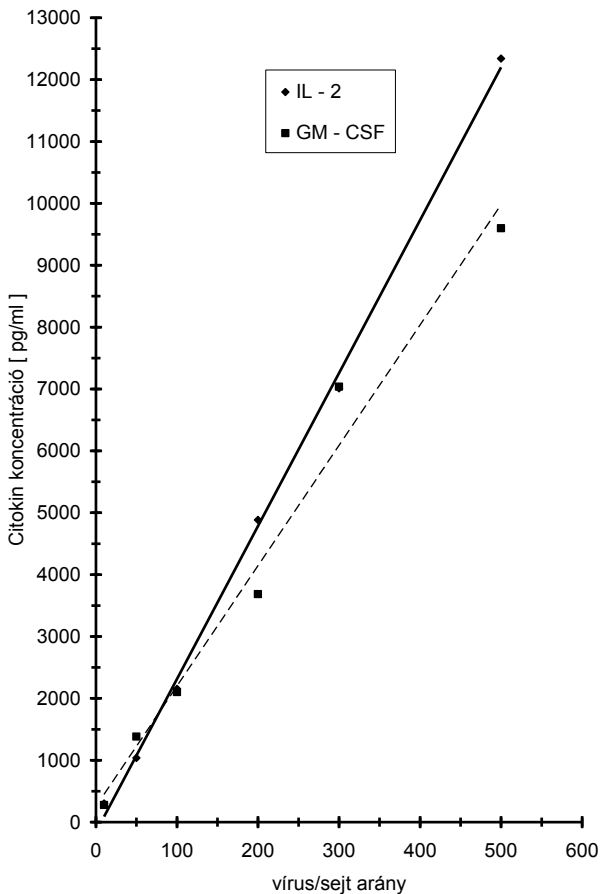
Jól ismert, hogy a központi idegrendszer immunológiai szempontból különleges hely. Több tényező is hozzájárulhat ehhez: az agyi erek endoteljeinek szerkezete gátolja a makromolekulák, vírusok, sejtes elemek bejutását az agyba (vér-agy gát); a limfikus rendszer hiánya; az MHC molekulák expressziójának a nem megfelelő volta. Ezek a tényezők gátolhatják az eredményes daganatellenes immunválasz kialakulását az agyban. Mindezek ellenére vannak arra vonatkozó bizonyítékok, hogy a T-limfociták átjuthatnak a vér-agy gáton és eredményes, daganatnövekedést gátló immunválaszt közvetíthetnek (110, 111).

A fentiek alapján úgy döntöttük, hogy tanulmányozzuk azt, hogy a citokin termelő autológ daganatsejtekkel végzett immunizációnak milyen lehetőségei vannak agydaganatok kezelésében, és hogy ez az immunaktivációs terápia hogyan kombinálható sugárterápiával. Irodalmi előzmények alapján több munkacsoport is tanulmányozta a különböző immunaktivációs lehetőségek terápiás hatását kísérletes intrakraniális daganatokban. Az alkalmazott tumor modellek magukba foglalták az intracerebrálisan transzplantált melanomákat (112-114), valamint patkány (115-123) és egér (124-129) glioma sejteket. Az immunstimuláló géneket a legkülönbözőbb génbeviteli eljárásokkal (retrovírusok, vakcinia vírus, plazmidok és liposzómák) juttatták a célba vett sejtekbe.

Érdekes módon, munkánk kezdetéig egyetlen munkacsoport alkalmazott csak adenovírus alapú vektorrendszert agydaganatok kezelésére (130). Véleményünk szerint, daganatos megbetegedések kezelése során az adenovírus alapú vektorrendszernek jelentős előnyei lehetnek más génbeviteli eljárásokkal szemben, mivel a génbevitel határfoka adenovírusok alkalmazása esetén jóval magasabb. Az adenovírus vektorok nem csak egér, hanem emberi glioblastóma sejtekbe is képesek nagy hatásokkal bejuttatni a terápiás gént (Sáfrány és munkatársai, nem publikált adatok). Egy másik jelentős előnye az adenovírus vektoroknak, hogy a transzdukciónál alkalmazott vírus/sejt arány függvényében változik az egy sejtbe bejutott vektormolekulák, és így a terápiás gének száma. Ezáltal könnyen változtatható a terápiás gén, esetünkben a különböző citokinek sejten belüli koncentrációja (9. ábra).

A vakcinációra használt sejteket a sejtosztódás gátlása céljából nagy dózisu ionizáló sugárzással kezeltük. Vizsgáltuk, hogyan alakul a 10, illetve 20 Gy dózissal besugarazott sejtek citokin termelése. A 10. ábrán megfigyelhető, hogy a besugarazott sejtek citokin termelése közel egy hétig lényegében azonos a nem besugarazott kontroll sejtekével.

Az agydaganatos állatok immunrendszerét autológ, citokin termelő sejtekkel végzett vakcinációval kívántuk a daganat ellen aktiválni. Fontos, hogy a vakcinált állatokban hogyan alakul a sejtek citokin termelése. Ennek tanulmányozására GI261 sejteket egér GM-CSF-et kódoló adenovírus vektorral fertőztünk és huszonnégy órával a fertőzés után a sejteket 20 Gy  $\gamma$ -sugárzással kezeltük. A sejtek által termelt citokin szint változtatása céljából a besugarazott, citokin termelő sejteket, különböző arányban kevertük cito-



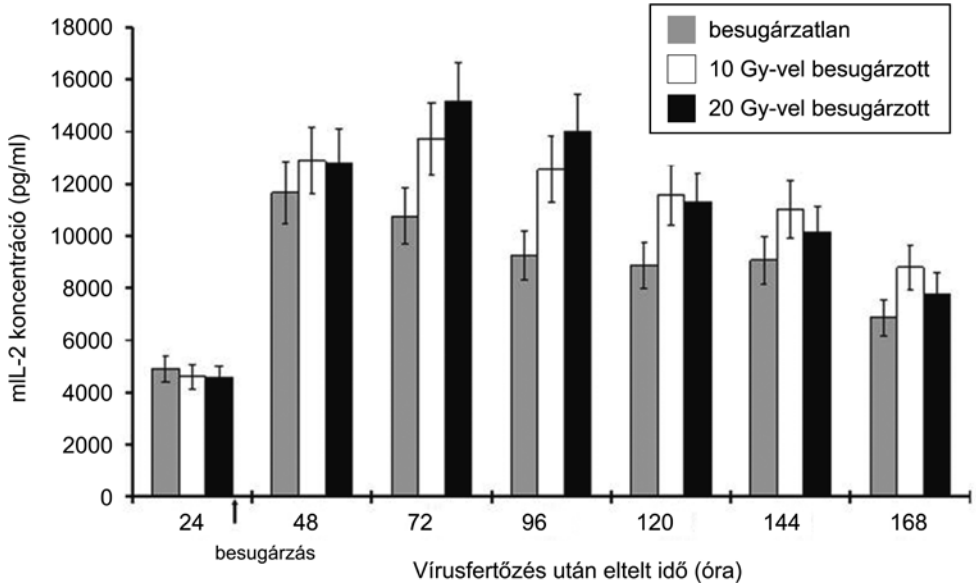
**9. ábra. Citokin termelés rekombináns adenovírusal fertőzött egér Gl261 sejtekben.** Gl261 sejteket fertőztünk különböző vírus/sejt arányban GM-CSF-et vagy IL-2-t kódoló adenovírus vektorokkal. 24 órával a fertőzés után meghatároztuk a citokin szinteket a sejt kultúra médiumban

sejt arányú fertőzéssel készített vakcinák által termelt citokinek mennyisége arányos volt a fertőzési aránnyal. Negyvennyolc órával a vírusfertőzés után a citokin termelő sejteket 20 Gy  $\gamma$ -sugárzással besugaroztuk. A vakcinák terápiás hatásának vizsgálatára agydaganatos egereket szubkután oltottunk a citokinek termelő sejtekkel. Vizsgálatainkban a citokinek igen széles skáláját alkalmaztuk (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, GM-CSF, LIF, LT, TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$ ) vakcina készítésre. Rajtuk kívül senki sem tanulmányozta ennyi különböző citokin terápiás hatását. Az IL-6-ot, IL-7-et, TNF $\alpha$ -át illetve LT-t termelő vakcinák esetében semmilyen szignifikáns terápiás hatást nem észleltünk agydaganatos egerekben. Eredményeink alapján főleg az IL-2, IL-4, IL-12 és GM-CSF termelő autológ daganatsejtek használhatók igen eredményesen agydaganatok kezelésére. Ez megegyezik más daganattípusoknál találtakkal, miszerint GM-CSF (113-114, 125, 127), IL-4 (112, 115, 116, 119, 122), IL-12 (118, 121) és IL-2 (118, 120, 128, 130) daganatsejtekben történő termeltetése az immunrendszer daganatellenes válaszreakcióját válthatja ki. Eredményeink azt is mutat-

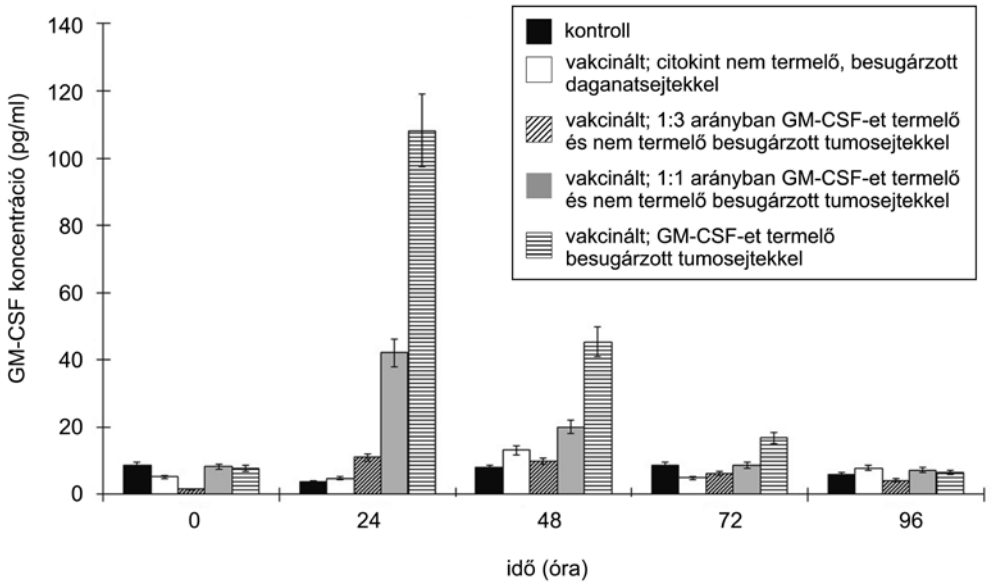
kineket nem termelő, de szintén besugarozott sejtekkel és a különböző arányú keverékekkel egészséges egereket vakcináltunk. A vakcinációt követően, különböző időpontokban a vérben mértük az egyes citokinek szintjét. A legmagasabb citokin szint 24 órával a sejtek szubkután oltása után figyelhető meg. A vér citokin szintje 3-4 nappal a vakcinálás után tér vissza a normális alapszintre (11. ábra).

A következőkben azt tanulmányoztuk, hogy a citokin termelő, autológ daganatsejtekkel végzett vakcinációs eljárás alkalmas-e az immunrendszer terápiás szintű aktivációjára, agydaganatos egerek gyógyítására. A vizsgálatok során agydaganat indukciójának céljából C57Bl6 egerekbe intrakraniálisan Gl261 sejteket oltottunk. A vakcina készítéséhez a sejtenyészetben növekvő Gl261 sejteket különböző citokinek kódoló adenovírus alapú vektorral fertőztük, különböző (10, 50, 100, 200, 300) vírus/sejt arányban. A különböző vírus/sejt

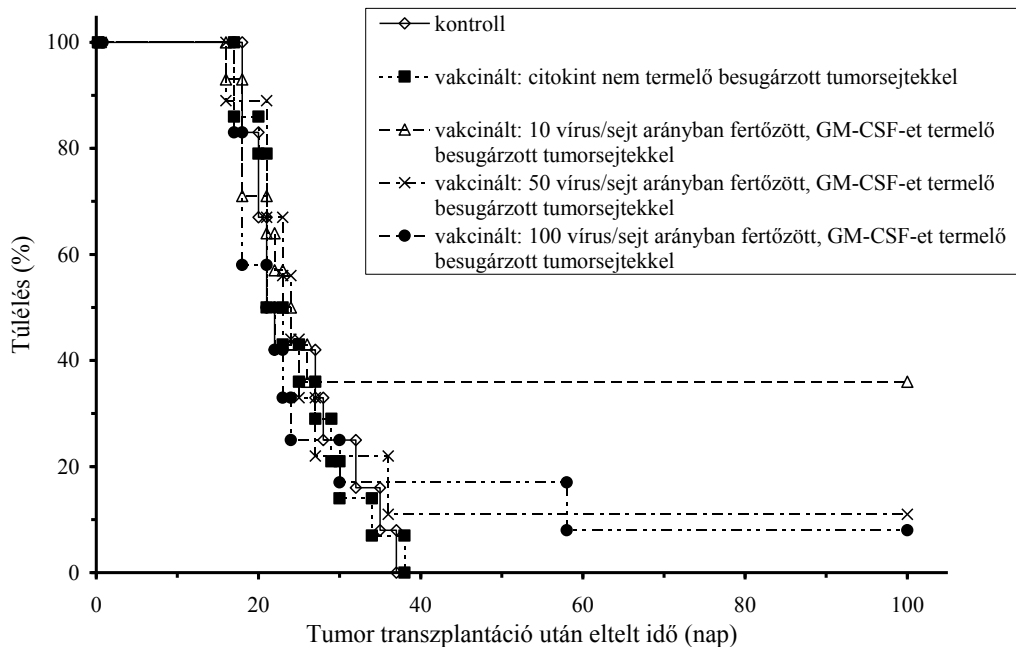




**10. ábra. IL-2 termelés rekombináns adenovíussal fertőzött egér glioma 261 sejt kultúrában.** GI261 sejteket fertőztünk 200 vírus/sejt arányban egér IL-2-t termelő adenovíussal. 24 órával a fertőzés után a sejteket 10, ill. 20 Gy gamma-sugárzással kezeltük. A besugárzás után különböző időpontokban mértük a sejt kultúra médiumában az IL-2 mennyiségét.



**11. ábra. Citokinek koncentrációjának alakulása GM-CSF-et termelő GI261 sejtekkel való vakcináció után, C57Bl6 egerek vérében.** GI261 sejteket 300 vírus/sejt arányban fertőztünk GM-CSF-et kódoló adenovírus vektorral. 24 órával a fertőzés után a sejteket 20 Gy  $\gamma$ -sugárzással besugárztuk. A sejteket különböző arányban kevertük besugárzott, GM-CSF-et nem termelő sejtekkel (1:1 és 1:3), majd egészséges egereket vakcináltunk  $1 \times 10^6$  sejttel. A vakcinált állatoktól közvetlenül az oltás előtt, majd az oltás után 24, 48, 72 és 96 órával vért vettünk és mértük a GM-CSF koncentrációt az állatok vérplazmájában.

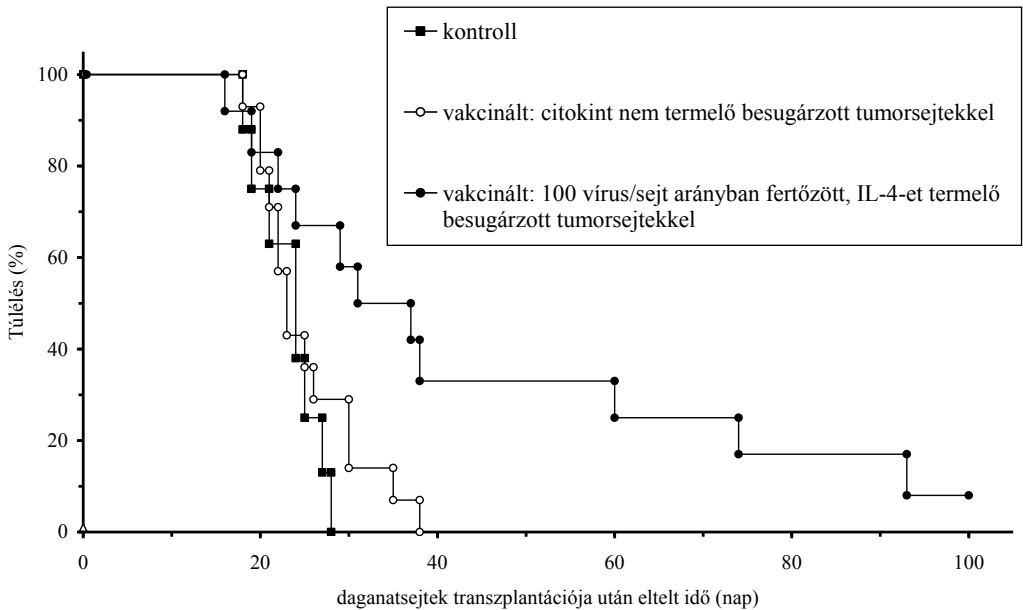


**12. ábra. Agydaganatos egerek túlélése GM-CSF-et termelő daganatsejtekkel történő vakcinálás után.** GL261 sejteket különböző vírus/sejt arányban fertőztünk GM-CSF-et kódoló adenovírus vektorral. 48 óra múlva egymillió sejtet használtunk vakinációra

ták, hogy az IL-2-t termelő vakcina esetében a daganatellenes hatás kevésbé függött a citokin termelés szintjétől. A GM-CSF-et termelő sejtekkel végzett vakináció esetén a 10 vírus/sejt arányú fertőzéssel készített vakcina az agydaganatos egerek mintegy 35%-át meggyógyította (12. ábra). Az 50 és 100 vírus/sejt aránnyal készített vakcinák csak kisebb mértékben javították az agydaganatos egerek túlélési esélyeit (12. ábra). Az ennél magasabb vírus/sejt arányban készített vakcinának terápiás hatása önmagában nem volt (ld. később).

Az IL-4 esetében a 100 vírus/sejt arányban készített vakcinának volt a legkedvezőbb daganatellenes hatása (13. ábra). Eredményeink bizonyítják, hogy a sejtek által termelt citokin szint alapvetően befolyásolja a citokin termelő sejtekkel végzett immunaktivációs terápia hatásosságát. Minden citokinnél csak egy jól körülhatárolt koncentráció eredményezte a daganatos állatok gyógyulását, az optimális mennyiség különböző volt az egyes tanulmányozott citokinek esetében.

A citokin koncentráció és a terápiás hatás összefüggésének tudományos háttere nem teljesen tisztázott. Ismert, azonban, hogy egy adott citokin a legkülönbözőbb immunrendszeri hatásokat befolyásolhatja és különböző célsejtek esetén eltérő az optimális szint (131). Nagy valószínűséggel csak meghatározott célsejtek aktivációja vezet el egy hatásos daganatellenes immunreakcióhoz. Az optimálistól eltérő citokin szintnek immun-gátló hatása is lehet (131). Véleményünk szerint a jelenleg is folyó, immunaktiváción alapuló klinikai génterápiás bevezető eljárások (132-135) sikertelenségért jelentős részben a nem-optimális citokin szint lehet a felelős. Állatkísérletes rendszerekben



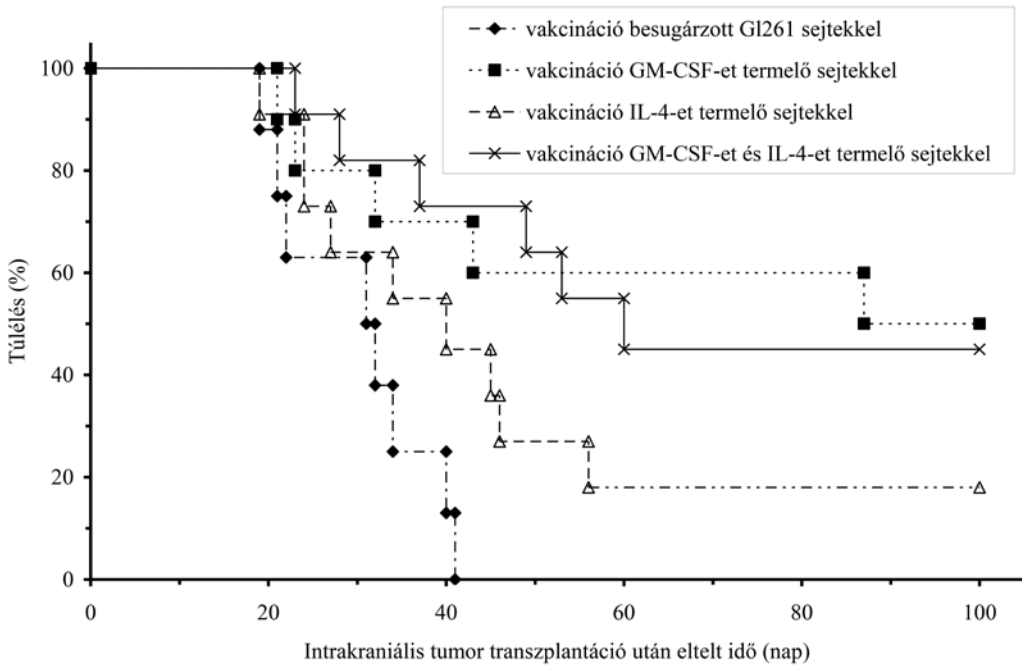
**13. ábra. Agydaganatos egerek túlélése autológ, IL-4-et termelő, besugárzott daganatsejtekkel való vakcinálás után**

viszonylag könnyű az optimális citokin szintek beállítása. Daganatos betegek kezelése során, az állatkísérletekben optimálisnak talált citokin mennyiségtől teljesen eltérő szintek lehetnek hatásosak.

Wakimoto és munkatársai adatai arra utalnak, hogy intrakraniálisan transzplantált egér B16 melanoma esetében kedvezőbb daganatellenes hatás érhető el, ha az immunrendszert aktiváló vakcina mind GM-CSF-et, mind pedig IL-4-et termel (112). Az egyes modalitásokra optimális citokinszintet alkalmazva, az általunk használt Gl261 glioma modellben nem nőtt a terápiás hatás, ha a vakcina a GM-CSF mellett IL-4-et is termelt (14. ábra). Nem lehet azonban kizárni, hogy szuboptimális citokin koncentrációk esetén a mindkét citokint termelő vakcina eredményesebb lehet, mint a csak IL-4-et, vagy GM-CSF-et termelő autológ daganatsejtek.

Vizsgálataink során megpróbáltuk tisztázni azt is, hogy az immunrendszer mely sejtjei játszanak szerepet a daganatellenes immunválasz kialakításában. A citotoxikus T limfociták aktiválódásának vizsgálatára egészséges egereket GM-CSF-et, vagy IL-4-et termelő, illetve citokineket nem termelő, 20 Gy sugárdózissal besugárzott Gl261 sejtekkel vakcináltunk. A vakcináció után, különböző időpontokban az állatokat túlaltattuk és lépükből limfocitákat izoláltunk. Citotoxicitás assay-vel tanulmányoztuk az izolált limfociták sejtölő hatását Gl261 sejtekre vonatkozóan. A 15. ábrán megfigyelhető, hogy GM-CSF-et, illetve IL-4-et termelő vakcinák hatására létrejött a citotoxikus T limfociták daganatsejtek elleni aktivációja, a vakcinált állatokból származó limfociták képesek a Gl261 sejtek elpusztítására.

Az irodalomban ellentmondó adatok vannak a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> limfocita szubpopulációk szerepére vonatkozóan. Néhány szerző azt sugallja, hogy mindkét sejtípusnak



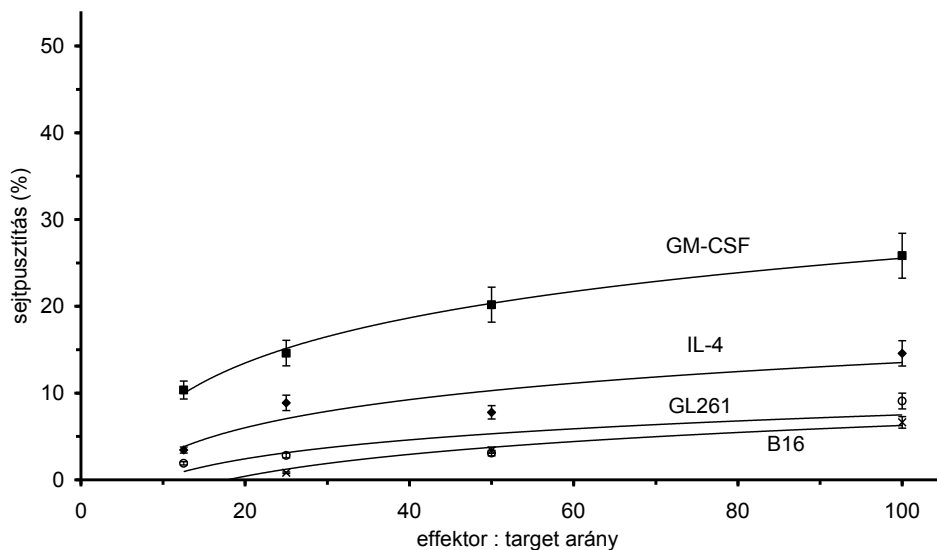
**14. ábra. Agydaganatos egerek túlélése GM-CSF-et, és IL-4-et termelő sejtekkel végzett kombinált vakcináció hatására**

fontos szerepe van (112, 114, 115, 120). Mások vagy csak a  $CD4^+$  (116), vagy csak a  $CD8^+$  (113, 123, 124, 126) sejtek jelentőségét erősítették meg.

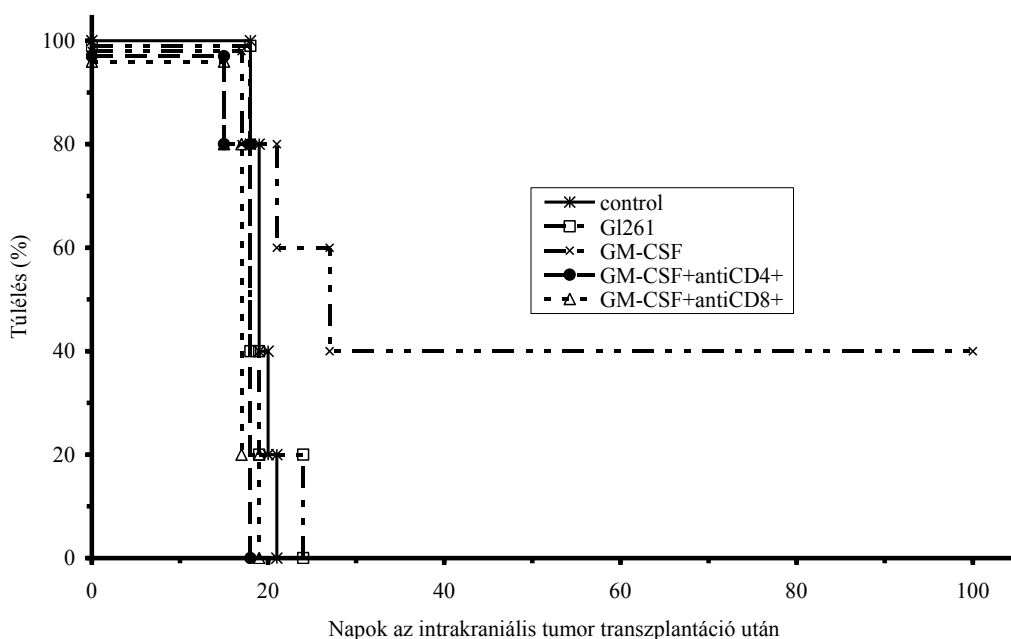
Saját adataink szerint mindkét sejttípusnak alapvető szerepe van - legalábbis a GM-CSF-et termelő sejtekkel végzett immunaktiváció esetében. Agydaganatos egerek előkezelése  $CD4^+$ , és  $CD8^+$  elleni antitestekkel teljesen megszüntette a GM-CSF termelő sejtekkel végzett vakcináció daganatellenes hatását (16. ábra).

A  $CD4^+$ , és  $CD8^+$ , limfociták daganatellenes immunválaszban betöltött jelentős szerepére utal az is, hogy 10 nappal az agydaganatos egerek GM-CSF-et termelő sejtekkel való kezelése után, az agydaganat erősen beszűrődött, mind  $CD4^+$ , mind pedig  $CD8^+$  limfocitákkal (17. ábra). Azt is meg kell említenünk azonban, hogy ugyanezen időpontban az IL-2, IL-4, vagy IL-12-vel kezelt egerek agytumorjaiban csak  $CD4^+$  infiltrációt tudtunk kimutatni. Azt nem tudjuk kizárni, hogy más, későbbi időpontokban a  $CD8^+$  sejtek jelenléte is kimutatható lett volna.

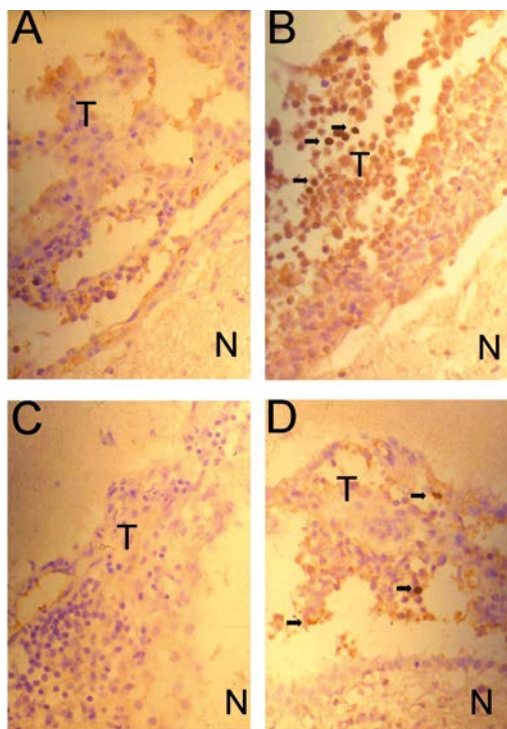
Vizsgálataink talán legfontosabb eredménye az volt, hogy bizonyítottuk, hogy a daganatellenes immunválaszt aktiváló génterápia jól kombinálható lokális sugárterápiával. Rajtuk kívül, újabban több munkacsoport is kimutatta, hogy a különböző génterápiás eljárásokat jól lehet együtt alkalmazni tumor besugárzással. Egy kiválasztódó angiosztatín-szerű molekulát kódoló adenovírus alapú vektor közvetlen glioma xenograftokba történő injekciójának csekély daganatelleni hatása volt. Amikor azonban, ezt a terápiás modalitást lokális tumor besugárzással kombinálták, szinergista hatás volt megfigyelhető (136). Glioma sejtek sugárérzékenysége jelentősen növelhető volt



**15. ábra. Citotoxikus T limfociták aktivációja GL261 sejtek ellen citokin termelő daganatsejtekkel végzett vakcináció hatására.** Az egészséges egereket GM-CSF-et, IL-4-t, vagy semmilyen citokint sem termelő (GL261) sejtekkel vakcináltuk. Három héttel később tanulmányoztuk az egerekből izolált limfociták (effektor) toxikus hatását GL261 sejtekkel (target) szemben. B16 – a vakcináció GM-CSF-et termelő sejtekkel történt, a célsejtek B16 melanoma sejtek voltak



**16. ábra. CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> limfociták szerepe a daganatellenes immunválaszban.** Agydaganatos egereket vakcináltunk GM-CSF termelő sejtekkel és nyomon követtük az állatok túlélését. Az antiCD4<sup>+</sup> és antiCD8<sup>+</sup> jelölt kísérletekben a GL261 sejtek intrakraniális transzplantációja előtt az állatokat előkezeltük CD4<sup>+</sup>, illetve CD8<sup>+</sup> elleni antitestekkel



**17. ábra. A daganatellenes immunválasz tanulmányozása immunhisztokémiai módszerekkel.**

Agydaganatos egereket besugárzott GI261 sejtekkel (A és C), vagy besugárzott GM-CSF termelő sejtekkel (B és D) vakcináltunk. Az állatokból a vakcináció utáni 10. napon eltávolítottuk a daganatot, és tanulmányoztuk a CD4<sup>+</sup> (A és B), valamint a CD8<sup>+</sup> sejtek (C és D) jelenlétét. Az ábrán a nyilak a daganatban jelenlévő CD4<sup>+</sup> és a CD8<sup>+</sup> sejteket mutatják

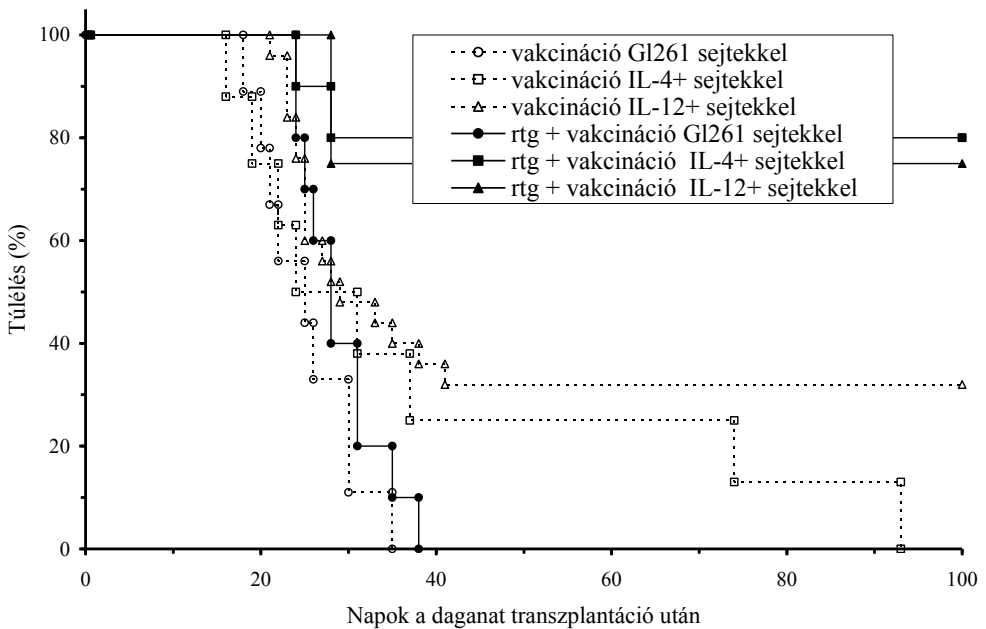
hogy önmagában sem a GM-CSF-et termelő sejtekkel végzett vakcináció, sem pedig a lokális besugárzás nem hosszabbította meg jelentősen az agydaganatos egerek túlélését (19. ábra).

A legegyszerűbb magyarázat a besugárzás és a vakcinációs terápia szinergista hatására az lehet, hogy a lokális besugárzás következtében jelentősen csökken a daganatsejtek száma. Ezt követően az immunrendszer sokkal eredményesebben tudja eltávolítani a kisszámú túlélő sejtet. Az agydaganatos állatokban valószínűleg verseny alakul ki a daganat növekedése és az immunrendszer aktivációja között. Kisszámú daganatsejt esetén a verseny nagyobb valószínűséggel a daganatellenes immunválasz javára dől el. Emellett azt sem tudjuk kizárni, hogy a besugárzás hatására elpusztuló daganatsejtek-ből olyan immunogén molekulák szabadulhatnak ki, amelyek tovább fokozzák, elősegítik az immunrendszer daganat elleni aktivációját. Talán a legvalószínűbb magyarázat a két eseménysor kombinációja.

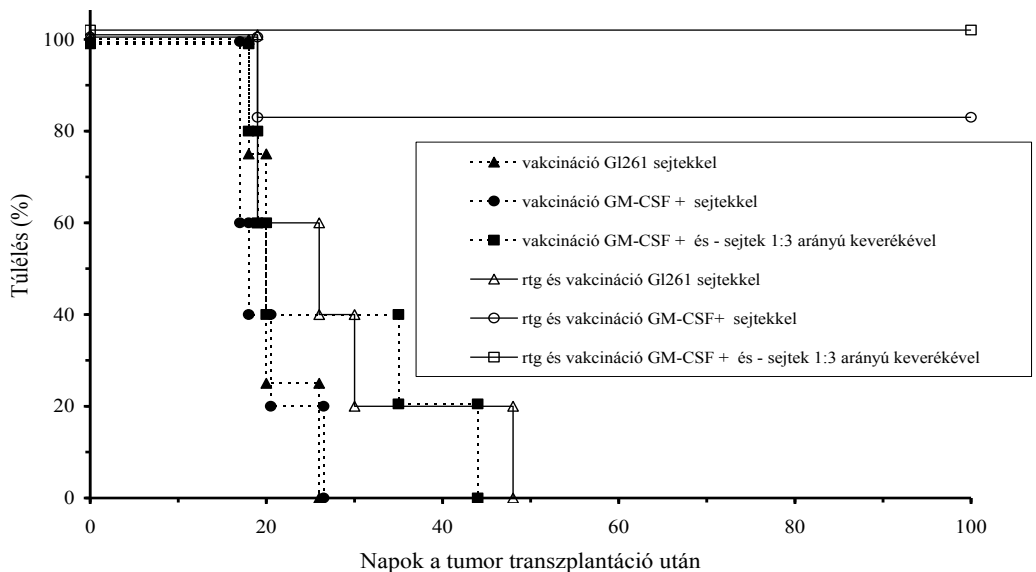
továbbá a vadttípusú p53 gén sejtekbe juttatásával (137-139). A p53 fehérje sugárérzékenyítő hatása valószínűleg az apoptózist növelő mechanizmuson alapul, de szerepet játszhat a hatásban az is, hogy a p53 fehérje gátolja az érképződést. Két munkacsoport adatai is arra utalnak, hogy lokális besugárzás és a TNF $\alpha$  kódoló vektor együttes terápiás alkalmazásával a daganatnövekedés jelentősen lelassul (140, 141).

Saját vizsgálataink szerint, az IL-4 termelő sejtekkel végzett vakcinációs terápia az agydaganatos egerek egy részénél jelentősen megnövelte a túlélést. A fejre adott 6 Gy lokális sugárterápia önmagában nem növelte az állatok élettartamát. Az IL-4-et termelő sejtekkel végzett vakcinációs terápia és a lokális sugárterápia kombinációjának hatására az agydaganatos egerek közel 80%-ánál teljes gyógyulás volt tapasztalható (18. ábra). Lényegében hasonló eredményeket kaptunk IL-12- termelő sejtekkel végzett vakcinációt követően is (18. ábra).

A GM-CSF-et termelő vakcina esetén a besugárzással való szinergista hatás még akkor is megfigyelhető volt, amikor olyan kísérleti feltételeket alakítottunk ki,



**18. ábra. Agydaganatos egerek kombinált kezelése citokin termelő sejtekkel és lokális besugárzással.** GI261 sejtek intrakraniális transzplantációja után az állatok fejét 6 Gy röntgen sugárzással kezeltük. Ezt követően az egereket IL-4, vagy IL-12 termelő, besugárzott GI261 sejtekkel vakcináltuk. A vakcina készítéséhez a GI261 sejteket 100 vírus/sejt arányban fertőztük IL-4-et, és 200 vírus/sejt arányban IL-12-kódoló adenovírus vektorokkal.



**19. ábra. Agydaganatos egerek kombinált kezelése GM-CSF-et termelő sejtekkel és lokális besugárzással.** GI261 sejtek intrakraniális transzplantációja után az állatok fejét 6 Gy röntgen-sugárzással kezeltük. Ezt követően az egereket GM-CSF-et termelő, és azt nem-termelő, besugárzott GI261 sejtek különböző arányú keverékével vakcináltuk. A vakcina készítéséhez a GI261 sejteket 200 vírus/sejt arányban fertőztük GM-CSF-et kódoló adenovírus vektorokkal

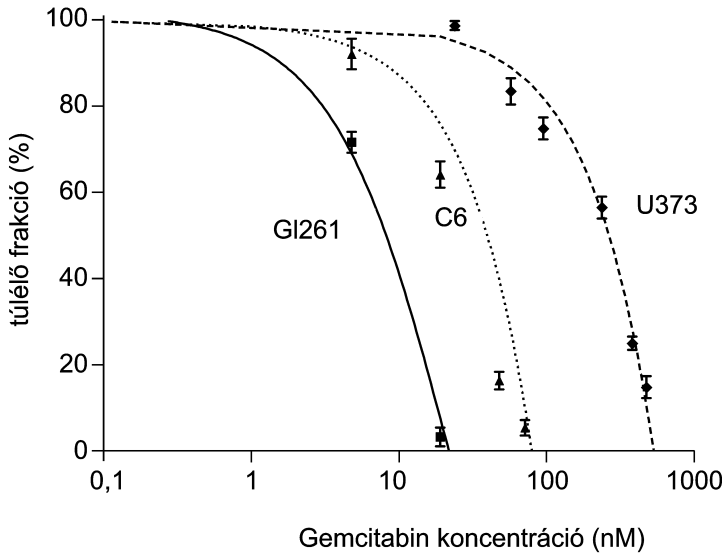
## A daganatok sugárérzékenységeinek fokozása génterápiával

A daganatterápiában jelentős gondot okoz a daganatok sugárrezisztenciája, a malignus gliomák a leginkább sugár-rezisztens tumorok közé tartoznak (145, 146). A gyógyszer-érzékenyítő génekkel végzett génterápiás munkánk során felvetődött, hogy hasonló eljárással a daganatok sugárérzékenységét is növelni lehetne. Arra gondoltunk, hogy ha találunk olyan sugárérzékenyítő anyagokat, amelyek metabolikus aktiváción mennek át a sejtekben, akkor, ha a metabolikus aktivációban szerepet játszó géneket bevisszük a daganatsejtekbe, ez meg fogja növelni az adott ágensek jelenlétében a daganat sugárérzékenységét. A szakirodalmat áttekintve kezdetben két sugárérzékenyítő ágensre koncentráltunk. Az egyik a tirapazamin, amely egy új generációs hipoxiás sugárérzékenyítő szer, azaz oxigén hiányában – a nagy daganatok hipoxiásak – fokozza a sejtek sugárérzékenységét. Irodalmi adatok szerint a tirapazamin metabolikus aktivációjában a nitrogén-oxid-szintáz, valamint a NADPH reduktáz enzimek is szerepet játszhatnak. Ezen enzimeket adenovírus alapú vektorba klónoztuk, és tanulmányoztuk, hogy a génbevitel fokozza-e a sejtek válaszreakcióit sugárhatásra. Ezzel sajnos pozitív eredményre nem jutottunk. Ezt követően a gemcitabinra koncentráltunk. A gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxicitidin) a deoxicitidin pirimidin analógja. A sejtekbe való bejutás után a gemcitabint a deoxicitidin kináz (dCK) enzim foszforilálja, ezáltal gemcitabin-monofoszfát keletkezik, amelyet más sejten belüli kinázok gemcitabin-difoszfáttá és –trifoszfáttá alakítanak tovább (147). A difoszfát forma gátolja a ribonukleotid-reduktáz enzimet, ezáltal csökkenti a deoxinukleotidok szintjét a sejten. Ez a DNS szintézis gátlásához vezet. A trifoszfát származék beépül a DNS-be és, ezáltal blokkolja a további DNS replikációt. A gemcitabinnak daganat-növekedést gátló hatása van több tumor típus esetében is (148), rutinszerűen alkalmazzák a hasnyálmirigy daganatok terápiájára. Jól ismert a gemcitabin sugárérzékenyítő hatása is (149, 150). A gemcitabint sugárterápiával való kombinációban alkalmazzák malignus gliomák és egyéb agytumorok kezelésére is (151-154). Fentiek alapján úgy döntöttünk, hogy a dCK gént adenovírus alapú vektorba klónozzuk és tanulmányozzuk, hogy a dCK gén glioma sejtekbe való bevitel befolyásolja-e a glioma sejtek gemcitabin és sugárérzékenységét (10).

Vizsgálataink során először különböző, sejt kultúrában növő glioma sejtek (GI261 egér glioma, U373 humán glioma és C6 patkány glioma) alap dCK szintjét és gemcitabin iránti érzékenységét tanulmányoztuk. Az alap dCK szintek jelentős különbséget mutattak: a GI261 glioma dCK szintje 16-szor magasabb volt a C6 glioma sejtekben kimutatott alap dCK szintnél. Ugyancsak jelentős különbségek mutatkoztak a gemcitabin érzékenységben. A GI261 sejtek igen érzékenyek bizonyultak, míg az U373 sejtek viszonylag rezisztensek voltak. Több irodalmi adat arra utal, hogy a sejtek alap dCK szintje és gemcitabin érzékenysége között összefüggés található (155-157). Más adatok ennek ellentmondanak, és azt sugallják, hogy pl. a sejten belüli ribonukleotid-reduktáz és deoxicitidin-deamináz szintek is befolyásolják a gemcitabin iránti érzékenységet (158),



159). Esetünkben a GI261 és az U373 sejtek viszonylatában a gemcitabin érzékenység arányos volt a sejtek dCK szintjével, míg a C6 sejtek jóval érzékenyebbek voltak annál, mint ami elvárható lett volna dCK szintjük alapján (20. ábra).



**20. ábra. Gemcitabin citotoxikus hatása különböző glioma sejtvonalakban.** A sejteket növekvő koncentrációban gemcitabinnal kezeltük, majd 3 nappal később meghatároztuk a túlélő sejtek arányát. GI261 – egér glioma, C6 – patkány glioma, U373 – humán glioma

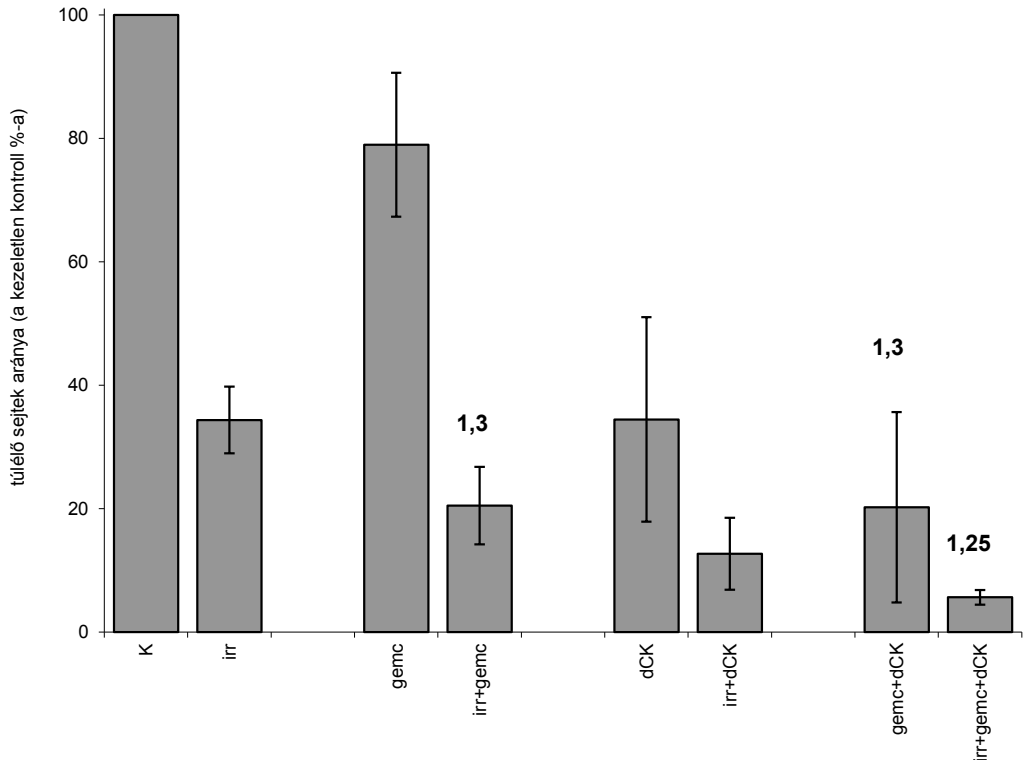
Meg kell jegyeznünk, hogy a C6 sejtekben az alacsony dCK szintek mellett magas timidin-kináz 2 aktivitást találtunk, amely egyes szerzők szerint szintén képes a gemcitabin foszforilálására (160).

A gemcitabin sugárérzékenyítő hatásának mechanizmusa nem teljesen tisztázott. A legvalószínűbb lehetőség az, hogy a gemcitabin kezelés gátolja a DNS szintézist, kimeríti a sejten belüli dATP szintet és ezek együttes hatásaként a sugárzás indukálta DNS károsodások rosszul javítódnak ki (161-165). A gemcitabin sugárérzékenyítő hatásának tanulmányozására GI261, C6 és U373 sejteket különböző koncentrációjú gemcitabinnal kezeltünk, majd 24 órával később a sejteket 4 Gy gamma-sugárzással besugáraztuk. A gemcitabin szinergista módon növelte GI261 sejtek sugárérzékenységét. C6 és U373 sejtek esetében csak additív hatást láttunk. A különböző erősségű sugárérzékenyítő hatás nyilvánvalóan azzal van összefüggésben, hogy a GI261 sejtekben mértük a legmagasabb alap dCK szintet. Az irodalmi adatok is arra utalnak, hogy magasabb sejten belüli dCK szint esetén erősebb a sugárérzékenyítő hatás (166).

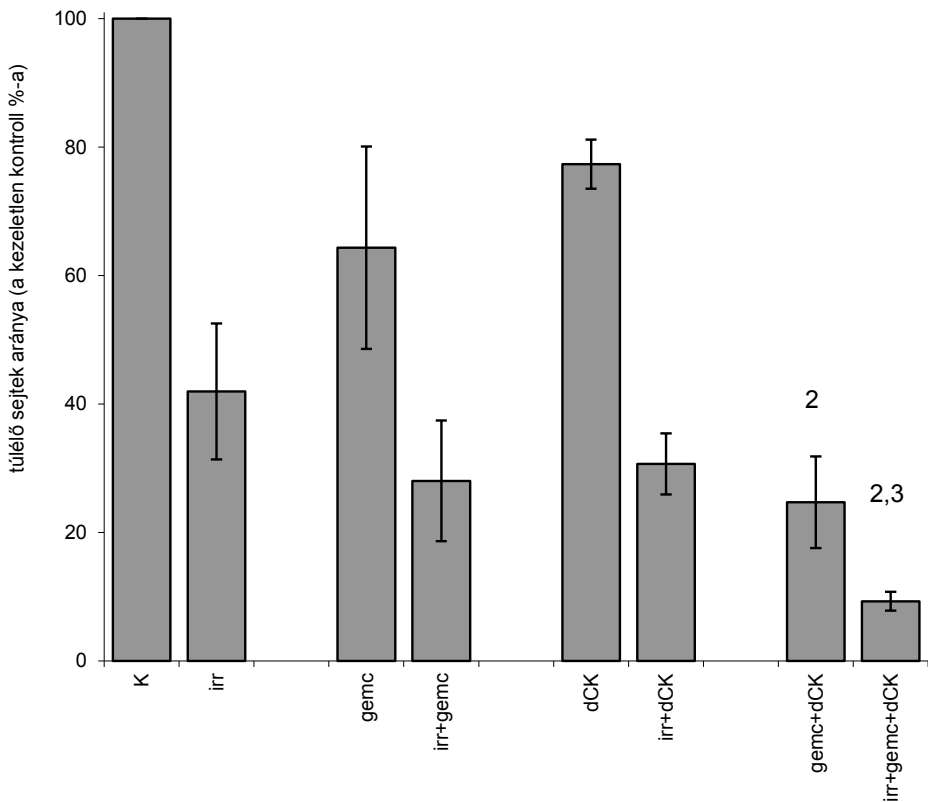
Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a sejten belüli dCK szint emelése a génterápia eszközeivel fokozza-e a gemcitabin közvetlen toxikus és sugárérzékenyítő hatását. A vizsgálatokhoz a humán dCK gént egy adenovírus vektorba klónoztuk, majd a dCK-t tartalmazó vektorral (Ad-HudCK) GI261, C6 és U373 sejteket fertőztünk különböző vírus/sejt arányban. Egy nappal az Ad-HudCK fertőzést követően a sejteket gemcitabinnal kezeltük, majd újabb 24 óra elteltével 4 Gy dózissal besugárazásnak vetettük alá. A kom-

binált hatást 7 nappal a génbevitel után mértük. Megállapítottuk, hogy mindhárom glioma sejtvonalban a dCK szint növekedése egyenes arányban áll a bevitt dCK gén kópiaszámával. A dCK enzim túltermelése önmagában is toxikusnak bizonyult mindhárom sejtvonalban (21., 22. és 23. ábra). Az eredményeink azt is egyértelműsítették, hogy a dCK túltermelés minden esetben, bár különböző mértékben, de szinergista módon fokozta a gemcitabin közvetlen citotoxikus hatását. A legkevésbé a GI261 sejteken fokozódott a gyógyszer hatása, 1,3 szorosára nőtt az additív hatáshoz képest (21. ábra). A másik két sejtvonalban lényegesen nagyobb volt az érzékenyítés mértéke: 2-szeres a C6 (22. ábra) és 3,4-szeres az U373 (23. ábra) sejtek esetében. Hasonlóképpen, a gemcitabin sugárérzékenyítő hatása fokozódott a dCK génbevitel hatására: a szinergizmus mértéke 1,25-szörös volt a GI261 sejteken, 2,3-szeres a C6 és 3,6-szoros az U373 sejtekben.

Kísérleti adataink részben megegyeznek az irodalmi adatokkal. Több munkacsoport tanulmányozta a dCK túltermelődés hatását *in vitro* körülmények között különböző nukleozid analógok toxicitására vonatkozóan. Legtöbbször azt írták le, hogy a dCK enzim aktivitásának növelése fokozza az adott drog toxicitását. Hapke és munkatársai



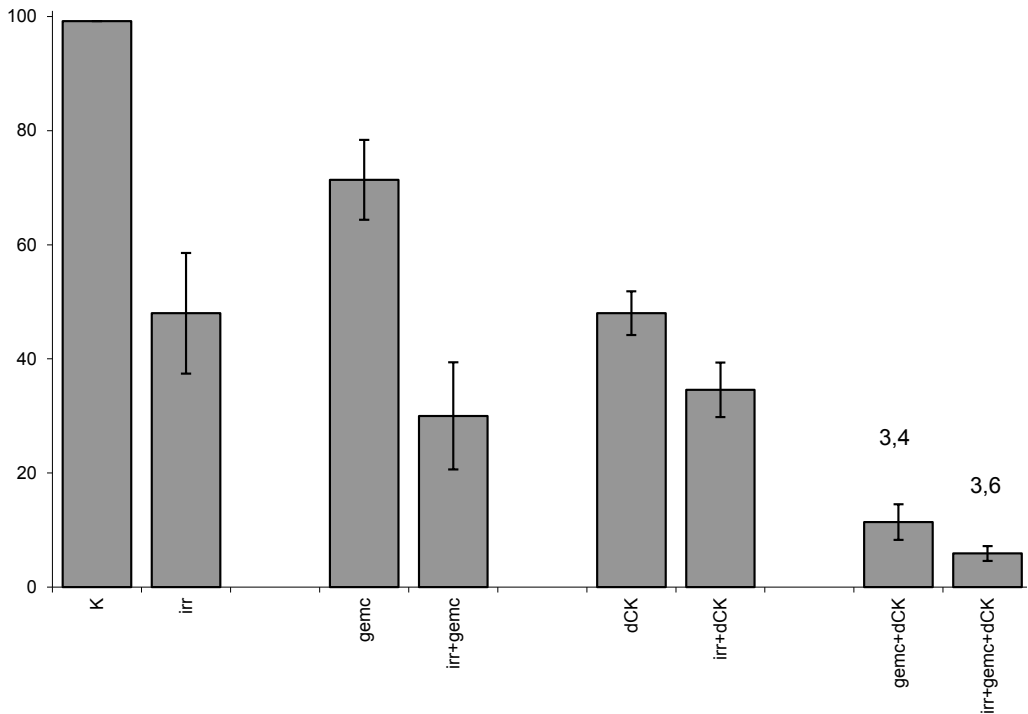
**21. ábra. Deoxycitidin-kináz génbevitel hatása egér GI261 glioma sejtek gemcitabin és sugárérzékenységre.** A sejteket 20 vírus/sejt arányban fertőztük Ad-HudCK adenovírus vektorral. 24 órával később a sejtekhez 5 nM gemcitabint adtunk, majd újabb 24 óra elteltével 4 Gy gamma-sugárzással besugárztuk. A túlélő sejtek arányát citotoxicitás assay-vel mértük 7 nappal a génbevitel követően. Az oszlopok fölé írt számok a szinergista hatás mértékét mutatják. K – kontroll, irr – besugárzás; gemc – gemcitabin; dCK – dCK gén bevitel



**22. ábra. Deoxicitidin-kináz génbevétel hatása patkány C6 glioma sejtek gemcitabin és sugárérzékenységére.** A sejteket 300 vírus/sejt arányban fertőztük Ad-HudCK adenovírus vektorral. 24 órával később a sejtekhez 25 nM gemcitabint adtunk, majd újabb 24 óra elteltével 4 Gy gamma-sugárzással besugárztuk. A túlélő sejtek arányát citotoxicitás assay-vel mértük 7 nappal a génbevétel követően. Az oszlopok fölé írt számok a szinergista hatás mértékét mutatják. K – kontroll, irr – besugárzás; gemc – gemcitabin; dCK – dCK gén bevitele

retrovírus vektor segítségével juttatták be a dCK gént különböző daganatos sejtvonalakba és négy nukleozid analóg toxicitását tanulmányozták. Eredményeik alapján szoros összefüggés volt a dCK enzim szint és az 1- $\beta$ -D-arabinofuranozilcitozin (AraC), a 2-kloro-2'-deoxiadenozin (CdA) és a 2-fluoro-9- $\beta$ -D-arabinofuranoziladenin (FAraA) toxicitása között, de csak minimális összefüggést láttak a gemcitabin vonatkozásában (167). Beauséjour és munkatársai azt igazolták, hogy dCK túlexpresszió fokozta az AraC és 5-aza-2'-deoxicitidin (5-Aza-CdR) toxicitását emberi A-549 és egér NIH 3T3 sejtekben, de érdekes módon gemcitabinnal szemben rezisztensebbé váltak a sejtek (168).

Végül, tanulmányoztuk, hogyan befolyásolja a dCK túltermelés a kombinált gemcitabin kezelés és lokális sugárterápia együttes hatását egér GI261 és patkány C6 *in vivo* tumor modellekben. Erre vonatkozóan jelenleg is kevés adat található az irodalomban. Manome és munkatársai leírták, hogy amennyiben retrovírus vagy adenovírus vektor segítségével dCK gént juttattak patkány 9L glioma sejtekbe az AraC iránti érzékenység mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között nőtt (169). Blackstock és munkatársai retrovírus alkalmazták a dCK gén HT29 sejtekbe való bejuttatására. A dCK-t tartalmazó

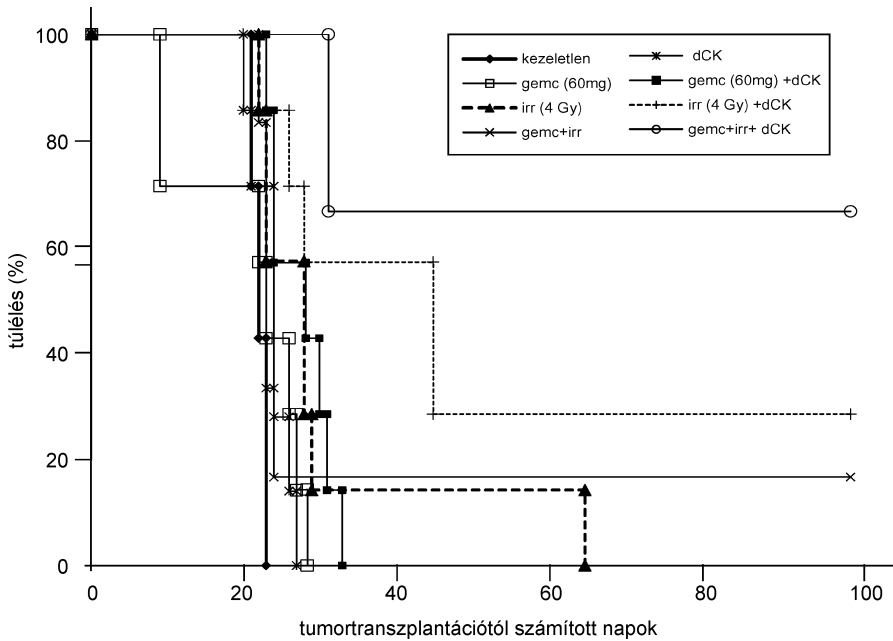


**23. ábra. Deoxicitidin-kináz génbevétel hatása humán U373 glioma sejtek gemcitabin és sugárérzékenységére.** A sejteket 100 vírus/sejt arányban fertőztük Ad-HudCK adenovírus vektorral. 24 órával később a sejtekhez 250 nM gemcitabint adtunk, majd újabb 24 óra elteltével 4 Gy gamma-sugárzással besugárztuk. A túlélő sejtek arányát citotoxicitás assay-vel mértük 7 nappal a génbevétel követően. Az oszlopok fölé írt számok a szinergista hatás mértékét mutatják. K – kontroll, irr – besugárzás; gemc – gemcitabin; dCK – dCK gén bevitele

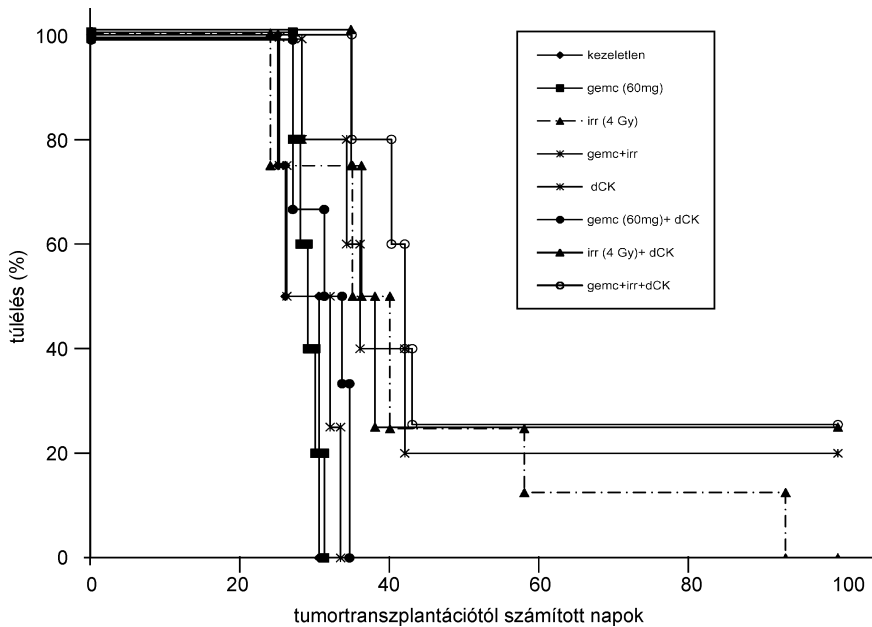
HT29 xenograftok regresszióját írták le gemcitabin kezelés hatására (170). Végül Vernejoul és munkatársai jelentették, hogy a dCK és uridin-monofoszfát gén együttes bevitele hörcsögökben növekvő emberi hasnyálmirigy tumorba fokozza a gemcitabin érzékenységet (171).

Saját adataink azt mutatják, hogy a hármas kombináció *in vivo* terápiás hatás jóval kifejezettebb a patkány C6 (24. ábra), mint az egér Gl261 modell (25. ábra) esetében. Ez teljes mértékben megegyezik az *in vitro* adatokkal.

A gemcitabinnak önmagában nem volt tumor növekedést gátló hatása az alkalmazott koncentrációban. Ennek ellenére a dCK-t túltermelő C6 tumor esetében a gemcitabinnak kifejezett sugárérzékenyítő hatása volt, ami a daganatos állatok megnövelt túlélésében is megfigyelhető volt. Érdekes módon, a dCK túltermelés önmagában is sugárérzékenyítő hatással bírt. Eredményeink megerősítik azokat az irodalmi adatokat, amelyek arra utalnak, hogy a gemcitabin még olyan koncentrációknál is sugárérzékenyítő hatással bír, ahol önmagában nincs jelentős citotoxikus hatása.



**24. ábra. Deoxicitidin kináz bevitel, gemcitabin kezelés és lokális sugárterápia együttes hatása C6 gliomát hordozó patkányok túlélésére.** A patkányokba intrakraniális oltással vad típusú, illetve dCK gént tartalmazó C6 glioma sejteket transzplantáltunk. Az állatokat Gemcitabinnal (gemc) és lokális sugárterápiával (irr) kezeltük, nyomon követtük az állatok túlélését



**25. ábra. Deoxicitidin kináz bevitel, gemcitabin kezelés és lokális sugárterápia együttes hatása GL1261 gliomát hordozó egerek túlélésére.** Egerekbe intrakraniális oltással vad típusú, illetve dCK gént tartalmazó C6 glioma sejteket transzplantáltunk. Az állatokat Gemcitabinnal (gemc) és lokális sugárterápiával (irr) kezeltük, nyomon követtük az állatok túlélését

Befejezésül megállapíthatjuk, hogy vizsgálataink bizonyították, hogy a gemcitabine közvetlen citotoxikus és sugárérzékenyítő hatása is jelentős mértékben fokozható a metabolikus aktivációjában szerepet játszó dCK gén sejtekbe való bejuttatásával. Az eljárás eredményessége valószínűleg tovább fokozható tumor specifikus replikációra, és gén-kifejeződésre alkalmas vektorokkal. A terápiás eredményeket az is javíthatja, ha sikerül olyan dCK mutánsokat előállítani, és a daganatsejtekbe bejuttatni, amelyek még eredményesebben képesek a gemcitabine foszforilációját elvégezni.

## Részleges sikerek emberi daganatok génterápiájában

A következő fejezetben - a teljesség igénye nélkül - szeretném röviden összefoglalni azokat a klinikai bevezetési eljárási eredményeket, amelyek személyes véleményem alapján mérföldkövet jelentettek a daganatos megbetegedések génterápiájában.

Agydaganatos betegek génterápiájára a leggyakrabban a már említett ganciclovir/timidin kináz rendszert alkalmazták. A kezdeti I-II. fázisú klinikai bevezetési eljárások tisztázták, hogy sem a retro-, sem pedig az adenovírus alapú génterápia nem jár lényeges kockázatokkal (63-66). Az ígéretes kezdetek után egy több európai neuro-onkológiai centrumot is magába foglaló klinikai III. fázisú vizsgálatot végeztek 1996-1998 között (67). A TK gént egy retrovírus alapú vektor hordozta. A génterápiás kezelés során a vírustermelő pakoló sejteket a műtét végén közvetlenül injektálták a reziduális tumorba, illetve a műtéti területre. A retrovírus terápia után 14 nappal kezdték a betegeket ganciclovirrel kezelni, emellett a betegek a kontroll csoport terápiájának megfelelően lokális sugárterápiában is részesültek. A retrovírusokról említettük, hogy csak osztódásban lévő sejteket képesek megfertőzni. A génterápia során azt várták, hogy a retrovírus vektor csak az osztódó daganatsejteket fertőzi meg, nem jut be a nyugalmi állapotban lévő normál agyi sejtekbe. A kontroll csoportba és a génterápiás csoportba is egyaránt 124-124 olyan glioblasztomás beteget vontak be, akiket előtte még más terápiás eljárással nem kezeltek. A vírus terápia mellékhatásai nem voltak jelentősek. Sajnos a génterápiás csoport kezelési eredményei megegyeztek a kontroll csoportéval az átlagos, illetve a progresszió-mentes túlélés viszonylatában (67). A negatív eredményeket lényegében azzal magyarázták, hogy a retrovírus vektor nem jutott be a daganatsejtek túlnyomó többségébe, így a ganciclovir nem tudta daganatellenes hatását kifejteni. Ugyanakkor egy Finnországban indított, jelenleg is nyitott I-II. fázisú klinikai bevezetési eljárás kezdeti eredményei arra utalnak, hogy ha a TK gént adenovírus vektorban alkalmazzák, akkor az eredmények jobbak, 17 génterápiás kezelésben részesült beteg esetében az átlagos túlélés 70,6 hétre nőtt a 19 tagú kontroll csoport 39 hetes átlagos túlélésével szemben (66, 68). Sajnos újabb közölt adatok nem állnak rendelkezésre.

Jelenleg egy olyan génterápiás termék létezik, a Gendicine, amelyet 2003-ban, daganatok rutin kezelésére elfogadtak, mégpedig Kínában (172, 173). A Gendicine egy olyan adenovírus, amely a vad típusú p53 tumor szuppresszor gént hordozza. A p53 génterápia elméleti alapját az adja, hogy a legtöbb daganatban mutáns p53 gén található. Amennyiben a p53 gén vad típusú változatát visszajuttatjuk a daganatba, akkor a daganat korlátlan növekedése leáll. A kínai szerzők kezdetben fej-nyaki daganatok kezelésére alkalmazták az eljárást sugárterápiával kombinációban. Adataik szerint az esetek 64%-ban komplett, 29%-ban részleges remissziót értek el, szemben a csak sugárterápiával kezelt betegek 19%-os és 60%-os megfelelő adataival. Személyes véleményem szerint az eredmény „szépséghibája” az, hogy sem a Gendicine-kezelt, sem pedig a kontroll csoportban nem fordult elő progresszív betegség, ami azt valószínűsíti, hogy lényegében mérsékelten rosszindulatú daganatokat kezeltek. A kínai kollégák a Gen-

dicine-t III-IV. fázisú klinikai bevezetési eljárás keretében hasonló sikerrel alkalmazzák hepatocelluláris carcinomák (174), valamint pajzsmirigy és szájüregi daganatok kezelésére is (66). Érdemes megemlíteni, hogy egy a p53 tumor szuppresszor gént kódoló hasonló adenovírus vektor II/III fázisú klinikai bevezetési eljárás alatt állt az Egyesült Államokban és Európában is, azonban a viszonylag kedvező eredmények ellenére a terápiás alkalmazása lényegében leállt (175).

A daganatellenes génterápia igen ígéretes ágát képezik az onkolitikus vírusok (176, 177). Érdekes módon több olyan állati (Newcastle betegség-, reo-, parvo vírus) és emberi vírus (kanyaró, mumpsz, herpesz, vakcinia, adenovírus, stb.) is létezik, amelyek sokkal jobban szaporodnak daganatsejtekben, mint normál emberi sejtekben. Ezek, az ún. onkolitikus vírusok preferenciálisan pusztítják el a daganatsejteket. Az onkolitikus adenovírusok egy speciális típusa az ONYX-15, amelyet mesterségesen alakítottak ki vad típusú adenovírusból. Az adenovírus vektorok jellemzésekor említettem, hogy a vírusfertőzést követően két korai gén, az E1A és az E1B íródik át, ezek kapcsolják be a többi vírus gén transzkripcióját. Az E1A és E1B fehérjéknek emellett az is a feladatuk, hogy a megfertőzött sejtek védekezési mechanizmusát kikapcsolják, és a sejteket a vírus fehérjék átírására, a vírus szaporodásának elősegítésére kényszerítsék. Az adenovírus korai fehérjéi közül az E1A a retinoblasztoma, az E1B pedig a p53 tumor szuppresszor fehérjéhez kapcsolódik, ezáltal inaktíválja azokat. Amennyiben az inaktiváció nem sikeres, akkor a vírus szaporodása, sejtpusztító hatása nem alakul ki. Készítettek egy olyan módosított adenovírust (ONYX-15), amelyből eltávolították az E1B fehérjének megfelelő génszakaszt. Ez a módosított vírus nem tud normál sejtekben szaporodni, mivel a p53 fehérje meggátolja a vírus szaporodását. A daganatok jelentős részében azonban a p53 mutációkat hordoz, így ezekben a daganatsejtekben az ONYX-15 vírus szaporodóképes és ki tudja fejteni onkolitikus hatását. Az ONYX vírus daganatellenes hatásához igen jelentős reményeket fűztek, több klinikai bevezetési eljárásban is kipróbálták, de átütő eredményeket nem értek el (91-96, 178-180). Áttörést újra csak a kínai kollégák jelentettek. Kínában egy, az ONYX-15-höz hasonló E1B hiányos adenovírust (H101) hivatalosan is regisztráltak fej-nyaki tumorok kezelésére. A kínai adatok szerint a H101 kemoterápiával való kombinációban a fej-nyaki tumoros betegek esetén 79%-ban bizonyult hatásosnak, szemben a csak kemoterápia 40%-os hatásfokával. A H101 vírus mindössze annyiban különbözik az ONYX-15-től, hogy nagyobb deléciót hordoz az E3 génben. A vizsgálatot végzők szerint az is hozzájárulhatott a H101-el elért jobb terápiás eredményekhez, hogy a kezelés mellékhatásaként kialakuló lázat nem kezelték. A H101 szabadalmát birtokló cég minden eshetőségre számítva megvette az ONYX-15 szabadalmát is (181-184).

A daganatellenes génterápiás eljárások jelentős része a szervezet immunrendszerét próbálja aktiválni az adott daganat ellen. Az esetek többségében, különböző citokin (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, stb.) géneket juttatnak vagy a beteg daganatsejtjeibe, vagy sejtkultúrából származó allogénikus daganatsejtekbe és a citokin termelő sejtekkel, az általunk korábban ismertetett módon vakcinálják a betegeket (122, 126, 132-135, 185, 186). Napjainkig több mint 70, ezen az elven alapuló klinikai bevezetési eljárást regisztráltak, de közülük csak 10 érte el a klinikai III. fázist. Érdekes módon mind a 10,



egymással részben átfedő klinikai protokoll, az állatkísérletes rendszerben általunk is leghatásosabbnak bizonyult GM-CSF citokint alkalmazza a daganatellenes immunitás aktiválására (66). A GM-CSF alapvető szerepet játszik a daganatellenes immunitásban szerepet játszó dendritikus sejtek aktiválásában (187, 188). Itt szeretném megjegyezni, hogy a dendritikus sejtek alkalmazása egyre jobban terjed a daganat terápiaiban (189, 190). A klinikai III. fázist elért immunrendszer-aktiváló hatáson alapuló daganat ellenes eljárások közül véleményem szerint az OncoVex-GM-CSF vektort alkalmazó protokoll a legígéretesebb, amelyet jelenleg fej-nyaki tumorok és melanomák kezelésére alkalmaznak (66, 191). Az OncoVex-GM-CSF vektor egyesíti az onkolitikus és a daganatellenes immunaktiváló génterápia kedvező tulajdonságait, mivel az immunaktiváló GM-CSF citokin gént az onkolitikus hatással bíró *Herpes simplex* vírusba klónozták. Melanomák kezelése során a vírus vektort nagy dózisban, ismételt kezeléseknél közvetlenül a daganatba injektálják. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy mind a közvetlen kezelésben részesült daganat, mind pedig a távoli lokalizációban, illetve a metasztázisokban jelenlévő daganat is visszafejlődik, vagy remisszióba kerül. Az eddig publikált adatok szerint 50 kezelt beteg közül 26 esetben értek el teljes, vagy részleges választ (191). A kezdeti eredmények fej-nyak tumorok esetében is biztatóak.

Befejezésül azt szeretném megjegyezni, hogy a daganatos megbetegedések génterápiás kezelését igen nagy reményekkel indították az 1990-es években. Sajnos, viszonylag nagyszámú beteg kezelése után is csak azt lehet elmondani, hogy a daganatos megbetegedések génterápiája nagy jövő előtt áll, de az eddig elért eredmények szerények.

## A génterápia kockázatai

A génterápia klinikai alkalmazása során vagy közvetlenül a beteg sejtjeit módosítjuk genetikai úton, vagy *in vitro* körülmények között módosított sejteket használunk. A genetikailag módosított ágensek használata miatt jelentkezik egy bizonyos kockázati tényező, mind a beteg esetében, mind pedig a beteg közvetlen környezetére vonatkozóan is. A kockázat csökkentésére bizonyos szabályokat feltétlenül be kell tartanunk a génterápia alkalmazása során. Az egyik legfontosabb szabály, hogy génterápiát mindig csak indokolt esetben alkalmazzunk. A másik, hogy a génterápiában alkalmazott vektorok, elsősorban a vírusvektorok mindig a legszigorúbb ellenőrzésen essenek át a felhasználás előtt. Génterápiás eljárást eddig több mint húszezer beteg esetében alkalmaztak. A kezelt betegekben eddig minimális számú mellékhatás jelentkezett. Az első komolyabb mellékhatást 1995-ben írták le, amikor is a cisztás fibrózisban károsult gént adenovírus alapú vektor segítségével juttatták be a kezelt betegek tüdejébe. Ekkor egy betegben tüdőgyulladásos tünetek léptek fel, amely kezelésre gyógyult (142). Igazán súlyos, életet veszélyeztető, halálhoz vezető mellékhatásokat két protokoll esetén jelentettek. Az első, bizonyítottan génterápia következtében bekövetkezett haláleset 1999-ben fordult elő. Philadelphiában végeztek génterápiás kezelést öröklött májbetegségben, ornitin-transzkarbamiláz (OTCD) hiányban szenvedő betegeken. Az OTCD gént hordozó adenovírus vektort nagy dózisban, infúzióval juttatták a betegbe. A vektor ellen heves immunreakció alakult ki, ami disseminált intravasculáris coagulációhoz (DIC) és akut respiratorikus distresszindrómához, végül pedig a beteg halálához vezetett (143). Az adenovírus alapú génterápiás kezeléseket időlegesen leállították, de miután más génterápiás klinikai bevezetési eljárások során hasonlóan súlyos mellékhatásokat nem észleltek, szigorított feltételekkel újra engedélyezték. Rendkívül súlyos mellékhatás, leukémia alakult ki egy X kromoszómához kötött, öröklött immunhiányos megbetegedés (X-SCID) génterápiás kezelése során. Az X-SCID betegség a citokin receptor közös gamma (CRKGL) láncának öröklött károsodása miatt alakul ki. A betegség a génterápia mellett csak csontvelő transzplantációval kezelhető, kétséges kimenettel. Az eljárás során a betegekből begyűjtött csontvelői őssejtekbe retrovírus alapú vektor segítségével vitték be az ép (CRKGL) gént. Több, mint tíz éves követés során a betegek immunhiányos megbetegedése meggyógyult. Sajnos azonban négy betegben leukémia, illetve leukémia-szerű tünetek alakultak ki. A leukémia kialakulásának egyértelmű oka az volt, hogy a kezelés során alkalmazott retrovírus vektor az LMO2 onkogén közelében integrálódott a genomba és azt aktiválta. A leukémiás betegek közül egy halálozott el (144). A klinikai protokollt leállították, majd kivizsgálás után újra engedélyezték módosított feltételekkel.

A génterápiának, mint minden kezelési eljárásnak nyilvánvalóan meg vannak a maga kockázatai. Eddig közel 20.000 kezelés során két elhalálozás volt és további három leukémiás megbetegedés alakult ki. Ha ezt összevetjük pl. a kemoterápiás és sugárterápiás

kezelések kockázataival, akkor azt kell mondanunk, hogy a bizonyított kockázat nem jelentős. Ettől függetlenül génterápiás kezelést csak rendelkezésre álló kezelési eljárások hiányában, abszolút indikáció esetén, szigorú feltételek alapján szabad engedélyezni.

# Összefoglalás

Génterápián idegen, működőképes genetikai anyag emberi sejtekbe való terápiás célú bevitelét értjük. Génterápiával testi és ivarsejtek is módosíthatók, de emberi ivarsejtek genetikai módosítása a legtöbb államban tiltott. A génterápia eredményességét az dönti el, hogy milyen hatásokkal sikerül az adott gént bevinnünk a célsejtekbe. Emberi sejtekbe történő terápiás célú, nagyhatásfokú génbevitelre jelenleg túlnyomó többségében vírus (retro-, adeno-, lenti-, adeno-associated-, herpes simplex-, vakcinia-, stb.) vektorokat alkalmazunk. Az első-második generációs vírusvektorok nem képesek emlős sejtekben való szaporodásra. A klinikai bevezetési eljárásokban ma még kevésbé alkalmazott harmadik-negyedik generációs vírusvektorok alkalmasak a célsejtekben való specifikus replikációra.

Saját állatkísérletes munkánk során kialakítottunk és jellemeztünk egy egér agy-tumor (GI261) modellt, majd tanulmányoztuk, hogy gyógyszer-érzékenyítő génekkel végzett génterápia eredményesen kombinálható-e sugárterápiával. GI261 sejtekbe adenovírus vektor segítségével bejuttattuk a *Herpes simplex* vírus timidin kináz (TK) és az *E. coli* uracil-foszforibozil-transzferáz (UPRT) génjeit, amelyek ganciklovir (GC), illetve 5-fluoruracil (FU) iránt érzékenyítik a sejteket. *In vitro* kísérletek során a TK és az UPRT géneket tartalmazó GI261 sejtek érzékenysége jelentős mértékben nőtt GC, FU és kombinált GC+FU kezelés hatására. A sejtpusztulás mértéke majdnem két nagyságrenddel fokozódott, ha a GC+FU kezelést besugárzással kombináltuk. *In vivo* vizsgálatok során a gyógyszer-érzékenyítő gének jelenléte ugyancsak jelentősen fokozta a GC+FU kezelés daganatnövekedést gátló hatását, mind bőralatti, mind pedig intracranialis daganatok esetén. A lokális sugárterápiával történő kombináció tovább növelte a GC+FU kezelés hatékonyságát.

Vizsgálataink során génterápiás-immunterápiás eljárást dolgoztunk ki agydaganatok kezelésére citokin termelő, autológ daganatsejt-vakcinák alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy IL-2-t, IL-4-et, IL-12-t és GM-CSF-et termelő daganatsejteket használva vakcinációra az agydaganatos egerek 20-50%-a meggyógyul. A vakcináció hatására citotoxikus T limfociták aktiválódtak a daganatsejtek ellen és kimutatható volt az agydaganat CD4+ és CD8+ sejtekkel való infiltrációja is. A vakcinációs terápiát lokális sugárterápiával kombinálva jelentős szinergista hatást figyeltünk meg, az agytumoros állatok 70-100%-a meggyógyult.

A gemcitabin egy olyan kemoterápiás szer, amely fokozza egyes daganatok sugárérzékenységét is. A gemcitabin sejten belüli metabolikus aktivációjáért a deoxycitidin-kináz (dCK) enzim a felelős. Daganatsejtek gemcitabin és sugárérzékenységének fokozására a dCK gént adenovírus alapú vektorba klónoztuk, majd különböző *in vitro* növény agydaganat sejtekbe juttattuk. Megállapítottuk, hogy a dCK túltermelés növelte a sejtek gemcitabin érzékenységét, és fokozta a gemcitabin sugárérzékenyítő hatását. Agydaganatos egerekben és patkányokban vizsgálva a dCK génbevitel hatását, kimu-

tattuk, hogy az eredményesebbé teszi a gemcitabin terápia hatását és fokozza a daganatok sugárérzékenységét is.

Jelenleg a világon 1843 regisztrált génterápiás protokoll áll klinikai bevezetés alatt, az eljárások >60%-a daganatos megbetegedések génterápiás úton történő gyógyítását szolgálja. Sajnos a jelentős klinikai eredmények még váratnak magukra: jelenleg csak 67 génterápiás eljárás érte el a III. fázisú és mindössze kettő a IV. fázisú klinikai vizsgálati szintet. Jelenleg egy olyan génterápiás termék a Gendicine létezik, amelyet daganatok rutin kezelésére elfogadtak. A Gendicine a p53 tumor szuppresszor gént hordozó adenovírus, amellyel Kínában, igen óvatosan kezelendő adatok alapján, fejnyaki daganatoknál 64%-ban komplett, 29%-ban pedig részleges remissziót értek el. A daganatellenes génterápia ígéretes ágát képezik az onkolitikus vírusok. Véleményem szerint jelenleg a legígéretesebb daganatellenes génterápiás eljárás az, amely az onkolitikus és a daganatellenes immunaktiváló génterápia kedvező tulajdonságait egyesíti. A fejnyaki daganatok és melanomák kezelésére III. fázisú klinikai bevezetési eljárás alatt álló OncoVex-GM-CSF vektor váza az onkolitikus *Herpes simplex* vírus, amelybe a daganatellenes immunválaszt aktiváló GM-CSF citokint klónozták. A daganatok génterápiás kezelése valószínűleg nagy jövő előtt áll, de az eddigi eredmények szerények.

# GENE THERAPY OF BRAIN CANCER

Géza Sáfrány

„Frédéric Joliot-Curie” National Research Institute for Radiobiology  
and Radiohygiene, Budapest

Gene therapy means the introduction of foreign, functional genetic substances into human cells with a therapeutic aim. With gene therapy both somatic and germ cells might be modified, but the genetic modification of human gametes is prohibited in most countries. The efficiency of gene therapy is decided by the efficacy of the gene delivery into target cells. Currently, mostly high capacity viral vectors (retro-, adeno-, lenti-, adeno-associated-, herpes simplex-, vaccinia-, etc.) are applied for gene delivery into human cells. The first and second generational virus vectors are not capable for replication in mammalian cells. The third and fourth generation virus vectors, hardly applied in ongoing clinical trials currently, these are able to replicate in specific target cells.

We have developed and characterized a mouse brain tumor (G1261) model, and investigated whether gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) could be efficiently combined with radiation therapy. The *Herpes simplex* thymidine kinase (TK) and the *E. coli* uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) genes sensitizing the cells to ganciclovir (GC) and 5-fluorouracil (FU), respectively, were introduced into G1261 glioma cells by an adenoviral vector. *In vitro* experiments proved that the presence of TK and UPRT genes in G1261 cells significantly increased their sensitivity to GC, FU and combined GC+FU treatments. The extent of cell death was increased almost by two orders of magnitude, if the GC+FU treatment was combined with radiation therapy. *In vivo* studies demonstrated that in the presence of drug sensitizing genes the tumor growth-inhibitory effect of GC+FU treatment was significantly improved both in subcutaneous and intracranial tumors. The combination of GDEPT with local tumor irradiation further potentiated treatment efficacy.

We also developed a combined gene therapy – immunotherapy approach to treat experimental brain tumors with cytokine producing, autologous tumor cell vaccines. We found that 20-50% of the brain tumor bearing mice were cured off the tumors when treated with IL-2, IL-4, IL-12 or GM-CSF producing tumor cells. The cytokine producing vaccines activated cytotoxic T lymphocytes against the tumor cells and the heavy infiltration of brain tumors with CD4+ and CD8+ lymphocytes were detected as well. We observed a significant synergistic tumor growth inhibitory effect when vaccination treatment was combined with local radiation therapy; actually 70-100% of the tumor bearing animals recovered.

Gemcitabine is a chemotherapeutic agent that also enhances radiation sensitivity of certain tumors and the deoxycytidine kinase (dCK) gene is responsible for the metabolic

activation of gemcitabine. To enhance gemcitabine and radiation sensitivity of tumor cells the dCK gene was cloned into an adenovirus-based vector, and was introduced into various *in vitro* growing brain tumor cells. We found that the overproduction of dCK within the cells increased their sensitivity to gemcitabine and the radiosensitizing effect of gemcitabine was also potentiated. We demonstrated that dCK gene transfer in brain tumor bearing rats and mice will improve the direct therapeutic and the radiosensitizing effects of gemcitabine.

At present, there are 1843 registered gene therapy clinical trials in the world and more than 60% of the trials try to cure cancer. Unfortunately, the clinical results are modest, only 67 trials reached clinical phase III and only 2 trials is undergoing on phase IV level. Currently, there is only one gene therapy product, Gendicine that is adopted for the routine treatment of cancer in China. Gendicine carries the p53 tumor suppressor gene in an adenoviral-based vector. The Chinese data claiming 64% complete and 29% partial responses in head and neck tumor patients should be treated with extreme care. In my opinion, the most promising current anti-cancer gene therapy protocol is the one that combines the favorable properties of the oncolytic and anti-tumor immune-activating gene therapies. The OncoVex-GM-CSF construct which is applied in clinical phase III trials against head and neck tumors, as well as metastatic melanomas carries the immune-activating GM-CSF cytokine in an oncolytic *Herpes simplex* backbone. The treatment of cancer with gene therapy has a potentially great future, but the results so far are modest.

## Köszönetnyilvánítás

A könyvben ismertetett saját tudományos eredmények nyilvánvalóan nem jöhettek volna létre a hivatkozott saját közleményekben megnevezett munkatársak felelősségteljes munkája nélkül. Az esetek többségében saját szerepem a munka irányítására, az anyagi források előteremtésére korlátozódott. Ez úton szeretnék minden munkatársamnak köszönetet mondani. A jelentős számú közreműködő közül dr. Lumniczky Katalint szeretném névszerint kiemelni, aki az összes felhasznált saját közleményben társszerzőként működött közre.



# Irodalom

- [1] Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al: Experience with the Use of High-Dose Interleukin-2 in the Treatment of 652 Cancer Patients. *Ann Surg.* 210: 474-484, 1989
- [2] Culver, KW, Osborne WR, Miller AD, et al: Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplantation proceedings.* 23: 170-171, 1991
- [3] *The Internet book of gene therapy* (ed: RE Sobol and KJ Scanlon) Appleton and Lange, Connecticut, USA, 1995
- [4] *Gene Therapy of Cancer* (ed: KK Hunt, SA Vorburger, SG. Swisher) Humana Press, Totowa, NJ, 2007
- [5] Sáfrány G: *A génterápia génebévészeti alapjai és jelenlegi helyzete.* pp. 235-257. A „Genom” (szerk: Hídvégi EJ), Széplalom Könyvműhely, Budapest, 2003
- [6] Sáfrány G: A vasculáris génterápia és csontvelőőssejt-terápia. pp. 336-344. In: *Atherosclerosis* (szerk: Császár A) Synergo Kiadó és Marketing Kft, Budapest, 2004
- [7] Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, et al: Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for glioblastoma therapy. *Cancer Science.* 97: 546-553, 2006
- [8] Désaknai S, Lumniczky K, Ésik O, et al: Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med.* 5: 377-385, 2003
- [9] Lumniczky K, Désaknai S, Mangel L, et al: Local tumor irradiation augments the anti-tumor effect of cytokine producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9: 44-52, 2002
- [10] Szatmári T, Huszty G, Désaknai S, et al: Adenoviral vector transduction of the human deoxycytidine kinase gene enhances the cytotoxic and radiosensitizing effect of gemcitabine on experimental gliomas. *Cancer Gene Ther.* 15: 154-164 2008
- [11] DeAngelis LM: Brain tumours. *N Engl J Med.* 344: 114-23, 2001
- [12] Glioma Meta-analysis Trialists Group. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systemic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 359: 1011-1118, 2002
- [13] Legler JM, Gloeckler Ries LA, et al: Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst.* 91: 1382-1390, 1999
- [14] Shoenberg BS: *Oncology of the Nervous System.* (ed: Walker MD) Martinus Nijhoff, Boston, 1-30, 1983
- [15] Mahaley MS, Mettlin C, Natarajan N, et al: National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J Neurosurg.* 71: 826-836, 1989
- [16] Horsman MR, Bohm L, Margison GP, et al: Tumor radiosensitizers – current status of development of various approaches: report of an International Atomic Energy Agency meeting. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64: 551-561, 2006
- [17] Lumniczky K and Sáfrány G: Cancer gene therapy: combination with radiation therapy and the role of the bystander cell killing in the anti-tumor effect. *Pathol Oncol Res.* 12: 118-124, 2006
- [18] Shawler DL, Fakhrai H, Van Beveren C, et al: Gene therapy approaches to enhance antitumor immunity. *Adv Pharmacol.* 40: 309-337, 1997
- [19] *Cytokine-induced tumor immunogenicity.* (eds: Forni G, Foa R, Santoni A, Frati L) Academic Press, San Diego, CA, USA, 1994

- [20] Inaba M, Sawaa H, Sadata A, Hamada H: Circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by uracil phosphoribosyltransferase gene transduction. *Jpn J Cancer Res.* 90: 349-354, 1999
- [21] Aghi M, Hochberg F, Breakfield X: Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med.* 2: 148-164, 2000
- [22] Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP: Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res.* 30: 2394-2400, 1970
- [23] Akbasak A, Oldfield EH, Saris SC: Expression and modulation of major histocompatibility antigens on murine primary brain tumor in vitro. *J Neurosurg.* 75: 922-929, 1991
- [24] Herrlinger U, Kramm CM, Johnston KM, et al: Vaccination for experimental gliomas using GM-CSF-transduced glioma cells. *Cancer Gene Ther.* 4: 345-352, 1997
- [25] Plautz GE, Touhalisky JE, Shu S: Treatment of murine gliomas by adoptive transfer of ex vivo activated tumor-draining lymph node cells. *Cellular Immunol.* 178: 101-107, 1997
- [26] Yu JS, Burwick JA, Dranoff G, Breakefield XO: Gene therapy for metastatic brain tumors by vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor cells. *Hum Gene Ther.* 10: 1065-1072, 1997
- [27] Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J: Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon- $\beta$  gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Ther.* 6: 1626-1633, 1999
- [28] Désaknai S, Lumniczky K, Hidvégi EJ, et al: Treatment of brain tumors with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines. *Adv Exp Med Biol.* 495: 369-372, 2001
- [29] Glick RP, Lichtor T, Kim TS, et al: Fibroblasts genetically engineered to secrete cytokines suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine glioma in vivo. *Neurosurgery* 36: 548-555, 1995
- [30] Weiner NE, Pyles RB, Chalk CL et al: A syngeneic mouse glioma model for study of glioblastoma therapy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58: 54-60, 1999
- [31] San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F: Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol.* 7: 299-304, 1989
- [32] Li Y, Owusu A, Lehnert S: Treatment of intracranial rat glioma model with implant of radiosensitizer and biomodulator drug combined with external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58: 519-527, 2004
- [33] Vince GH, Bendszus M, Schweitzer T, et al: Spontaneous regression of experimental gliomas – an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model. *Exp Neurol.* 190: 478-485, 2004
- [34] Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, et al: Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 25: 243-249, 1993
- [35] Taghian A, Dubois W, Budach W, et al: In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 32: 99-104, 1995
- [36] Sampson JH, Ashley DM, Archer GE, et al: Characterization of a spontaneous murine astrocytoma and abrogation of its tumorigenicity by cytokine secretion. *Neurosurgery* 41: 1365-1373, 1997
- [37] Sidransky D, Mikkelsen T, Schwachheimer K, et al: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 355: 846-847, 1999
- [38] Ishii N, Tada M, Hamou MF, et al: Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. *Oncogene* 18: 5870-5880, 1999
- [39] Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689, 1989

- [40] Trent J, Meltzer P, Rosenblum M, et al: Evidence for rearrangement, amplification and expression of c-myc in a human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci. USA* 83: 470-473, 1986
- [41] Shindo H, Tani E, Matsumoto T, et al: Stabilization of c-myc protein in human glioma cells. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 86: 345-352, 1993
- [42] Zagzag D, Salnikow K, Chiriboga L, et al: Downregulation of major histocompatibility antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest.* 85: 328-341, 2005
- [43] Oshiro S, Liu Y, Fukushima T, et al: Modified immunoregulation associated with interferon-gamma treatment of rat glioma. *Neurol Res.* 23: 359-266, 2001
- [44] Wen PY, Lampson MA, Lampson LA: Effects of  $\gamma$ -interferon on major histocompatibility complex antigen expression and lymphocytic infiltration in the 9L gliosarcoma brain tumor model: implications for strategies of immunotherapy. *J Neuroimmunol.* 36: 57-68, 1992
- [45] Anderson RC, Elder JB, Brown MD, et al: Changes in the immunologic phenotype of human malignant glioma cells after passaging in vitro. *Clin Immunol.* 102: 84-95, 2002
- [46] Oshiro S, Fukushima T, Tomonaga M, Black KL: Response of MHC class-1 antigen on rat glioma cells to cytokines. *Anticancer Res.* 20: 605-610, 2000
- [47] Wen P, Loeffler JS, Morris JH, Lampson LA: The effects of irradiation on major histocompatibility complex expression and lymphocytic infiltration in the normal rat brain and the 9L gliosarcoma brain tumor model. *J Neuroimmunol.* 27: 239-244, 1990
- [48] Abdel-Wahab Z, Dar MM, Hester D, et al: Effect of irradiation on cytokine production, MHC antigen expression, and vaccine potential of interleukin-2 and interferon-gamma gene-modified melanoma cells. *Cell Immunol.* 171: 246-254, 1996
- [49] Parney IF, Farr-Jones MA, Chang LJ, Petruk KC: Human glioma immunobiology in vitro: implications for immunogene therapy. *Neurosurgery* 46: 1169-1177, 2000
- [50] Blume MR, Wilson CB, Vasquez DA: Immune Response to a transplantable intracerebral glioma in rats. In: *Recent Progress in Neurologic Surgery.* (Eds: Sane K, Ishii S, LeVay D) Amsterdam, Excerpta Medica, 129-134, 1974
- [51] Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, et al: Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* 259: 94-97, 1993
- [52] Tzeng JJ, Barth RF, Orosz GC, James SM: Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. *Cancer Res.* 51: 2373-2378, 1991
- [53] Kruse CA, Molleston MC, Parks EP, et al: A rat glioma model, CNS-1, with invasive characteristics similar to those of human gliomas: a comparison to 9L gliosarcoma. *J Neurooncol.* 22: 191-200, 1994
- [54] Tzeng JJ, Barth RF, Clendenon NR, Gordon WA: Adoptive immunotherapy of a rat glioma using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2. *Cancer Res.* 50: 4338-4343, 1990
- [55] Natsume A, Tsujimura K, Mizuno M, et al: IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma. *J Neurooncol.* 47: 117-124, 2000
- [56] Smilowitz HM, Joel DD, Slatkin DN, et al: Long-term immunological memory in the resistance of rats to transplanted intracerebral 9L gliosarcoma (9LGS) following subcutaneous immunization with 9LGS. *J Neurooncol.* 46: 193-203, 2000
- [57] Aghi M, Kramm CM, Chao T, et al : Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-Fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst.* 90: 370-380, 1998
- [58] Takamiya Y, Short MP, Ezzedine ZD, et al: Gene therapy of malignant brain tumors: a rat glioma line bearing the herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene and wild type retrovirus kills other tumor cells. *J Neurosci Res.* 33: 493-503, 1992

- [59] Maron A, Gustin T, Le Roux A, et al : Gene therapy of rat C6 glioma using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Long-term follow-up by magnetic resonance imaging. *Gene Ther.* 3: 315-322, 1996
- [60] Chen SH, Shine HD, Goodman JC, et al: Gene therapy for brain tumors: Regression of experimental gliomas by adenovirus mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3054-3057, 1994
- [61] Izquirdo M, Cortes M, Felipe P, et al: Long-term rat survival after malignant brain tumor regression by retroviral gene therapy. *Gene Ther.* 2: 66-69, 1995
- [62] Crystal RG, Harvey BG, Wisnivesky JP, et al: Analysis of risk factors for local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of comorbid conditions. *Hum Gene Ther.* 13: 65-100, 2002
- [63] Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E, et al: Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther.* 2: 195-203, 2000
- [64] Shand N, Weber F, Mariani L, et al : A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum Gene Ther.*10: 2325-2335, 1999
- [65] Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, et al: A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther.* 9: 2595-2604, 1998
- [66] The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/gen-med/clinical/>.
- [67] Rainov NG: A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther.* 20: 2389-2401, 2000
- [68] Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, et al: AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther.* 10: 967-972, 2004
- [69] Dilber MS, Gahrton G: Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Int Med.* 249: 359-367, 2001
- [70] van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W, et al: Influence of the bystander effect on HSV-TK/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther.* 2: 307-322, 2002
- [71] Namba H, Iwadate Y, Kawamura K, et al : Efficacy of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy is influenced by the expression of connexin43 in the target cells. *Cancer Gene Ther.* 8: 414-420, 2001
- [72] Kim YG, Bi W, Feliciano ES, et al: Ganciclovir-mediated cell killing and bystander effect is enhanced in cells with two copies of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Ther.* 7: 240-246, 2000
- [73] Princen F, Robe P, Lechanteur C, et al : A cell type-specific and gap junction-independent mechanism for the herpes simplex virus-1 thymidine kinase gene/ganciclovir-mediated bystander effect. *Clin Cancer Res.* 5: 3639-3644, 1999
- [74] Drake RR, Pitlyk K, McMasters RA, et al: Connexin-independent ganciclovir-mediated killing conferred on bystander effect-resistant cell lines by a herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing colon cell line. *Mol Ther.* 2: 515-523, 2000
- [75] Kanai F, Kawakami T, Hamada H, et al: Adenovirus mediated transduction of escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res.* 58: 1946-1951, 1998

- [76] Kievit E, Nyati MK, Ng E: Yeast cytosine deaminase improves radio sensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal xenografts. *Cancer Res.* 60: 6649-6655, 2000
- [77] Buchholz DJ, Lepek KJ, Rich TA, et al: 5-fluorouracil-radiation interactions in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 32: 1053-1058, 1995
- [78] Miller CR, Williams CR, Buchsbaum DJ, Gillespie GY: Intratumoral 5-fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas. *Cancer Res.* 62: 773-780, 2002
- [79] Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J: Dependence of 5-fluorouracil-mediated radio sensitization on DNA directed effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 29: 519-523, 1994
- [80] Hamstra DA, Rice DJ, Pu A, et al : Combined radiation and enzyme/prodrug treatment for head and neck cancer in an orthotopic animal model. *Radiat Res.* 152: 499-507, 1999
- [81] Chang JW, Lee H, Kim E, et al: Combined antitumor effects of an adenoviral cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene in rat C6 glioma. *Neurosurgery* 47: 931-938, 2000
- [82] Moriuchi S, Wolfe D, Tamura M, et al: Double suicide gene therapy using a replication defective herpes simplex virus vector reveals reciprocal interference in a malignant glioma model. *Gene Therapy* 9: 584-591, 2002
- [83] Erbs P, Regulier E, Kintz J, et al: In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* 60: 3813-3822, 2000
- [84] Huber BE, Austin EA, Richards CA, et al: Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene; significant anti-tumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8302-8306, 1994
- [85] Denning C, Pitts JD: Bystander effects of different enzyme-prodrug systems for cancer gene therapy depend on different pathways for intercellular transfer of toxic metabolites, a factor that will govern clinical choice of appropriate regimens. *Hum Gene Ther.* 8: 1825-1835, 1997
- [86] Freeman SM, Abboud CN, Whatenby KA, et al: The „bystander effect“: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53: 5274-5283, 1993
- [87] Gabel M, Kim JH, Kolozsvary A, et al: Selective in vivo radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells transduced with the E. coli cytosine deaminase (CD) gene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 41: 883-887, 1998
- [88] Kim JH, Kolozsvary A, Rogulski K, et al: Selective radiosensitization of 9L glioma in the brain transduced with double suicide fusion gene. *Cancer J Sci Am.* 4: 364-369, 1998
- [89] Nanda D, Vogels R, Havenga M, et al: Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res.* 61: 8743-8750, 2001
- [90] Ichikawa T, Chiocca EA: Comparative analyses of transgene delivery and expression in tumors inoculated with a replication-conditional or –defective viral vector. *Cancer Res.* 61: 5336-5339, 2001
- [91] Hann B, Balmain A.: Replication of an E1B 55-kilodalton protein-deficient adenovirus ONYX-015 is restored by gain-of-function rather than loss-function p53 mutants. *J Virol.* 77: 11588-11595, 2003
- [92] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al : 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: 897-885, 2000
- [93] Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, et al: Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus ONYX-015 in cancer patients: safety, feasibility and biology activity. *Gene Ther.* 8: 746-759, 2001

- [94] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, et al: In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res.* 60: 1193-1196, 2000
- [95] Georger B, Grill J, Opolon P, et al : Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl 1520 ONYX-015 in human malignant glioma xenografts. *Br J Cancer* 89: 577-584, 2003
- [96] Lin E, Nemunaitis J: Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.* 11: 643-664, 2004
- [97] Robson T, Hirst DG: Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol.* 110-137, 2003
- [98] Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP., et al : Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med.* 1: 786-791, 1995
- [99] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al: Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells. *Cancer Res.* 54: 4266-4269, 1994
- [100] Stanziale SF, Petrowsky H, Joe JK, et al: Ionizing radiation potentiates the antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex virus G207 by upregulating ribonucleotide reductase. *Surgery* 132: 353-359, 2002
- [101] Chastel C, Jiricny J, Jaussi R: Activation of stress-responsive promoters by ionizing radiation for deployment in targeted gene therapy. *DNA Repair* 3: 201-215, 2004
- [102] Manome Y, Kunieda T, Wen PY, et al : Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iodo-deoxyuridine. *Hum Gene Ther.* 9: 1409-1417, 1998
- [103] Weichselbaum RR, Kufe DW, Hellman S, et al: Radiation-induced tumour necrosis factor- $\alpha$  expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy. *Lancet Oncol.* 3: 665-671, 2002
- [104] Joki T, Nakamura M, Ohno T: Activation of the radiosensitive EGR-1 promoter induces expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and sensitivity of human glioma cells to ganciclovir. *Hum Gene Ther.* 6: 1507-1513, 1995
- [105] Worthington J, Robson T, O'Keeffe M, Hirst DG: Tumour cell radiosensitization using constitutive CMV and radiation inducible WAF1 promoters to drive the iNOS gene: a novel suicide gene therapy. *Gene Ther.* 9: 263-269, 2002
- [106] Worthington J, McCarthy HO, Barrett E, et al: Use of the radiation-inducible WAF1 promoter to drive iNOS gene therapy as a novel anti-cancer treatment. *J Gene Med.* 6: 673-680, 2004
- [107] Marples B, Greco O, Joiner MC, Scott SD: Radiogenetic Therapy: Strategies to overcome tumour resistance. *Curr Pharm Design.* 9: 2105-2112, 2003
- [108] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3539-3543, 1993
- [109] Allione A, Consalvo M, Nanni P, et al : Immunizing and curative potential of replicating and nonreplicating murine mammary adenocarcinoma cells engineered with interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, tumor necrosis factor alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and gamma-interferon gene or admixed with conventional adjuvants. *Cancer Res.* 54: 6022-6026, 1994
- [110] Inoue M, Plautz GE, Shu S: Treatment of intracranial tumors by systemic transfer of superantigen-activated tumor-draining lymph node T cells. *Cancer Res.* 56: 4702-4708, 1996
- [111] Parney IF, Hao C, Petruk KC: Glioma Immunology and Immunotherapy. *Neurosurgery* 46: 778-792, 2000
- [112] Wakimoto H, Abe J, Tsunoda R, et al: Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Res.* 56: 1828-1833, 1996

- [113] Sampson JH, Archer GE, Ashley DM, et al: Subcutaneous vaccination with irradiated, cytokine-producing tumor cells stimulates CD8+ cell-mediated immunity against tumors located in the immunologically privileged central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10399-10404, 1996
- [114] Yu JS, Burwick JA, Dranoff G, Breakefield XO: Gene therapy for metastatic brain tumors by vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor cells. *Hum Gene Ther.* 8: 1065-1072, 1997
- [115] Benedetti S, Bruzzone MG, Pollo B, et al: Eradication of rat malignant gliomas by retroviral-mediated, in vivo delivery of the interleukin 4 gene. *Cancer Res.* 59: 645-652, 1999
- [116] Giezeman KM, Okada H, Brisette-Storkus CS, et al : Cytokine gene therapy of gliomas: induction of reactive CD4+ T cells by interleukin-4-transfected 9L gliosarcoma is essential for protective immunity. *Cancer Res.* 60 : 2449-2457, 2000
- [117] Chen B, Timiryasova TM, Andres ML, et al : Evaluation of combined vaccinia virus-mediated antitumor gene therapy with p53, IL-2, and IL-12 in a glioma model. *Cancer Gene Ther.* 7: 1437-1447, 2000
- [118] Chen B, Timiryasova TM, Haghghat P, et al: Low-dose vaccinia virus-mediated cytokine gene therapy of gliomas. *J Immunother.* 24: 46-57, 2001
- [119] Saleh M, Jonas NK, Wiegman A, Stylli SS: The treatment of established intracranial tumors by in situ retroviral IFN-gamma transfer. *Gene Ther.* 7: 1715-1724, 2000
- [120] Iwadata Y, Tagawa M, Namba H, et al : Immunological responsiveness to interleukin-2-producing brain tumors can be restored by concurrent subcutaneous transplantation of the same tumors. *Cancer Gene Ther.* 7: 1263-1269, 2000
- [121] DiMeco F, Rhines LD, Hanes J, et al : Paracrine delivery of IL-12 against intracranial 9L gliosarcoma in rats. *J Neurosurg.* 92: 419-427, 2000
- [122] Okada H, Giezeman-Smits KM, Tahara H, et al: Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 plus HSVtk tumor vaccine. *Gene Ther.* 6: 219-226, 1999
- [123] Saleh M, Wiegman A, Malone Q, et al : Effect of in situ retroviral interleukin-4 transfer on established intracranial tumors. *J Natl Cancer Inst.* 91 : 438-445, 1999
- [124] Aoki T, Tashiro K, Miyatake SI, et al : Expression of murine interleukin 7 in a murine glioma cell line results in reduced tumorigenicity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3850-3854, 1992
- [125] Herrlinger U, Kramm CM, Johnston KM, et al: Vaccination for experimental gliomas using GM-CSF-transduced glioma cells. *Cancer Gene Ther.* 4: 345-352, 1997
- [126] Natsume A, Tsujimura K, Mizuno M, et al : IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma. *J Neurooncol.* 47 : 117-124, 2000
- [127] Herrlinger U, Jacobs A, Quinones A, et al : Helper virus-free herpes simplex virus type 1 amplicon vectors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-enhanced vaccination therapy for experimental glioma. *Hum Gene Ther.* 11: 1429-1438, 2000
- [128] Glick RP, Lichtor T, de Zoeten E, et al: Prolongation of survival of mice with glioma treated with semiallogeneic fibroblasts secreting interleukin-2. *Neurosurg.* 45: 867-874, 1999
- [129] Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J: Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferone-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Ther.* 6: 1626-1633, 1999
- [130] Donson AM, Foreman NK: Adenovirus mediated gene therapy in a glioblastoma vaccine model; specific antitumor immunity and abrogation of immunosuppression. *J Neurooncol.* 40: 205-214, 1998
- [131] The cytokine handbook. (ed: Thomson AW) New York, NY: Academic Press; 1994

- [132] Palmer DH, Young LS, Mautner V: Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends in Biotech.* 24: 76-82, 2006
- [133] Laheru D, Jaffe EM: Immunotherapy for pancreatic cancer – science driving clinical progress. *Nat Rev Cancer* 5: 459-467, 2005
- [134] Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S: Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther.* 12: 585-598, 2005
- [135] Lawler SE, Peruzzi PP, Chiocca EA: Genetic strategies for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther.* 13: 225-233, 2006
- [136] Griscelli F, Li H, Cheong C, et al : Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6698-6703, 2000
- [137] Gridley DS, Andres ML, Li J, et al : Evaluation of radiation effects against C6 glioma in combination with vaccinia virus-p53 gene therapy. *Int J Oncol.* 13: 1093-1098, 1998
- [138] Broaddus WC, Liu Y, Steele GT, et al. Enhanced radiosensitivity of malignant glioma cells after adenoviral p53 transduction. *J. Neurosurg.* 91. 997-1004. 1999
- [139] Badie B, Goh CS, Klaver J, et al : Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther.* 6: 155-162, 1999
- [140] Li J, Andres ML, Fodor I, et al : Evaluation of pGL1-TNF-alpha therapy in combination with radiation. *Oncol Res.* 10: 379-387, 1998
- [141] Staba MJ, Mauceri HJ, Kufe DW, et al: Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft. *Gene Ther.* 5: 293-300, 1998
- [142] Crystal RG, Mastrangeli A, Sanders A, et al: Clinical Protocol Evaluation of Repeat Administration of a Replication Deficient, Recombinant Adenovirus Containing the Normal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator cDNA to the Airways of Individuals with Cystic Fibrosis. *Hum Gene Ther.* 6: 667-703, 1995
- [143] Raper SE, Chirmule N, Lee FS et al: Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 80: 148-158, 2003
- [144] Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A et al: Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 363(4): 355-364, doi: 10.1056/NEJMoa1000164, 2010
- [145] Short SC: External beam and conformal radiotherapy in the management of gliomas. *Acta Neurochir (Suppl)* 88: 37-43, 2003
- [146] Irie N, Matsuo T, Nagata I: Protocol of radiotherapy for glioblastoma according to the expression of HIF-1. *Brain Tumor Pathol.* 21: 1-6, 2004
- [147] Hertel LW, Kroin JS, Misner JW, Tustin JM: Synthesis of 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl nucleotides. *J Org Chem* 53: 2406-2409, 1988
- [148] Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, et al: Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine. *Cancer Res.* 50: 4417-4422, 1990
- [149] Lawrence TS, Davis MA, Hough A, Rehemtulla A: The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res.* 7: 314-319, 2001
- [150] Pauwels B, Korst AEC, Pattyn GGO, et al: The relation between deoxycytidine kinase activity and the radiosensitizing effect of gemcitabine in eight different human tumor cell lines. *BMC Cancer* 6: 142, 2006
- [151] Gertler Sz, MacDonald D, Goodyear M, et al: NCIC-CTG phase II study of gemcitabine in patients with malignant glioma (IND94). *Ann Oncol.* 11: 315-318, 2000
- [152] Weller M, Streffer J, Wick W, et al: Preirradiation gemcitabine chemotherapy for newly diagnosed glioblastoma. A phase II study. *Cancer* 91: 423-427, 2001



- [153] Protzel C, Zimmermann U, Asse E, et al.: Gemcitabine and radiotherapy in the treatment of brain metastases from transitional cell carcinoma of the bladder: a case report. *J Neurooncol.* 57: 141-145, 2002
- [154] Maraveyas A, Sgouros J, Upadhyay S, et al.: Gemcitabine twice weekly as a radiosensitizer for the treatment of brain metastases in patients with carcinoma: a phase I study. *Br J Cancer* 92: 815-819, 2005
- [155] Kroep JR, Loves WJP, van der Wilt CL, et al.: Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther.* 1: 371-376, 2002
- [156] Bergman AM, Pinedo HM, Jongasma AP, et al.: Decreased resistance to gemcitabine (2',2'-difluoro-deoxycytidine) of cytosine arabinoside-resistant myeloblastic murine and rat leukemia cell lines: role of altered activity and substrate specificity of deoxycytidine kinase. *Biochem Pharmacol.* 57: 397-406, 1999
- [157] van Bree C, Kreder NC, Loves WJP, et al.: Sensitivity to ionizing radiation and chemotherapeutic agents in gemcitabine-resistant human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 54: 237-244, 2002
- [158] Goan YG, Zhou B, Hu E, et al.: Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2-2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res.* 59: 4204-4207, 1999
- [159] Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL: Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 42: 373-378, 1998
- [160] Wang L, Munch-Petersen B, Herrstrom SA, et al.: Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett.* 443: 170-174, 1999
- [161] Shewach DS, Hahn TM, Chang E, et al.: Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 54: 3218-3223, 1994
- [162] Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, et al.: Radiosensitization of pancreatic cancer cell by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 34: 867-872, 1996
- [163] Milas L, Fujii T, Hunter N, et al.: Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Res.* 59: 107-114, 1999
- [164] Rosier JF, Bruniaux M, Husson B, et al.: Role of 2'-2' difluorodeoxycytidine (gemcitabine)-induced cell cycle dysregulation in radio-enhancement of human head and neck squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol.* 70: 55-61, 2004
- [165] Cividalli A, Livdi E, Ceciarelli F, et al.: Combined use of gemcitabine and radiation in mice. *Anticancer Res.* 21: 307-312, 2001
- [166] Grégoire V, Rosier JF, De Bast M, et al.: Role of deoxycytidine kinase (dCK) activity in gemcitabine's radioenhancement in mice and human cell lines in vitro. *Radiother Oncol.* 63: 329-338, 2002
- [167] Hapke DM, Stegmann APA, Mitchell BS: Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res.* 56: 2343-2347, 1996
- [168] Beauséjour CM, Gagnon J, Primeau M, Momparler RL: Cytotoxic activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside in cells transduced with deoxycytidine kinase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 1478-1484, 2002
- [169] Manome Y, Wen PY, Dong Y, et al.: Viral vector transduction of the human deoxycytidine kinase cDNA sensitizes glioma cells to the cytotoxic effects of cytosine arabinoside in vitro and in vivo. *Nat Med.* 2: 567-553, 1996

- [170] Blackstock AW, Lightfoot H, Case LD, et al: Tumor uptake and elimination of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine) after deoxycytidine kinase gene transfer: correlation with in vivo tumor response. *Clin Cancer Res.* 7: 3263-3268, 2001
- [171] Vernejoul F, Ghénassia L, Souque A, et al: Gene therapy based on gemcitabine chemosensitization suppresses pancreatic tumor growth. *Mol Ther.* 14: 758-767, 2006
- [172] Shi J, Zheng D: An update on gene therapy in China. *Curr Opin Mol Ther.* 11(5): 547-553, 2009
- [173] Huang PI, Chang JF, Kirn DH, Liu TC: Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers. *Drug Discov Today.* 14(11-12): 570-578, 2009 doi: 10.1016/j.drudis.2009.03.008. Epub 2009 Mar 17. Review. PubMed PMID: 19508919
- [174] Chen S, Chen J, Ma G, et al: Clinical therapeutic effect and biological monitoring of p53 gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2011 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21217397
- [175] INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy--introgen, RPR/INGN 201. Review. *Drugs R D.* 8(3): 176-187, 2007
- [176] *Viral Therapy of Human Cancer* (ed: Sinkovics J), M. Dekker, NY, 2005
- [177] Shah AC, Benos D, Gillespie GY, Markert JM: Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. Review. *J Neurooncol.* 65(3): 203-226, 2003
- [178] Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, et al: Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin Cancer Res.* 9(2):693-702, 2003
- [179] Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, et al: A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther.* 10(5): 958-966, 2004
- [180] Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, et al: Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Ther.* 12(5): 437-445, 2005
- [181] Lu W, Zheng S, Li XF, et al: Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol.* 10(24): 3634-3638, 2004
- [182] Garber K: China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 98(5): 298-300, 2006
- [183] Kasuya H, Takeda S, Shimoyama S, et al: Oncolytic virus therapy--foreword. *Curr Cancer Drug Targets.* 7(2): 123-125, 2007
- [184] Yu W, Fang H: Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. Review. *Curr Cancer Drug Targets.* 7(2): 141-148, 2007
- [185] Mackensen A, Veelken H, Lahn M, et al: Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts. *J Mol Med (Berlin).* 75(4): 290-296, 1997
- [186] Jantscheff P, Herrmann R, Spagnoli G, et al: Gene therapy with cytokine-transfected xenogenic cells (Vero-IL-2) in patients with metastatic solid tumors: mechanism(s) of elimination of the transgene-carrying cells. *Cancer Immunol Immunother.* 48(6):321-330, 1999
- [187] Zhan Y, Xu Y, Lew AM: The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: more than a hematopoietic growth factor. Review. *Mol Immunol.* 52(1): 30-37. 2012, doi: 10.1016/j.molimm.2012.04.009. Epub 2012. May 14.
- [188] van de Laar L, Coffey PJ, Woltman AM: Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. Review. *Blood.* 119(15): 3383-3393, 2012, doi: 10.1182/blood-2011-11-370130. Epub 2012. Feb 8.
- [189] Finkelstein SE, Fishman M: Clinical opportunities in combining immunotherapy with radiation therapy. *Front Oncol.* 2: 169, 2012, doi: 10.3389/fonc.2012.00169. Epub 2012. Nov 26.

- [190] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L: Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol.* 2012. Nov 12.
- [191] Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 27(34): 5763-5771, 2009, doi: 10.1200/JCO.2009. 24.3675.



Dr. Sáfrány Géza 1955-ben született. Általános orvosi diplomáját a Pécsi Orvostudományi Egyetemen kapta 1979-ben, summa cum laude fokozattal. 1986-ban Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi szakvizsgát tett. Az orvostudomány kandidátusa címet 1993-ban, az MTA Doktora fokozatot 2008-ban nyerte el. 2003-ban habilitált a Semmelweis Egyetemen.

Az egyetem elvégzése után a POTE Biológiai Intézetében kezdett dolgozni. 1982-ben került az Országos „Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézetbe (OSSKI), ahol több vezető pozíciót is betöltött.

2011 júniusától az Intézet főigazgató főorvosa. Az OSSKI-ban kezdetben az emlős riboszóma RNS gének szerkezetét tanulmányozta. Ezt a témát folytatta, 1985-86-ban Japánban, a Tokió Egyetem Orvosi Fakultásának 1. számú Biokémiai Intézetében. 1990-1993 között az Egyesült Államokban, Philadelphiában, a Fox Chase Cancer Centerben dolgozott. Szakterülete az emlős riboszóma fehérje gének szerkezetének vizsgálata volt. Hazatérése után kezdte tanulmányozni az ionizáló sugárzás biológiai hatásait, munkatársaival kezdetben a prenatális besugárzás daganatkeltő hatását, a sugárzás okozta daganatkeletkezés molekuláris biológiai szintű mechanizmusát vizsgálták. A teljes genomot lefedő DNS chip segítségével vizsgálták a sugárhatásra kialakuló gén-expressziós változásokat és azonosítottak 20 konszenzus sugárválasz gént. Jelenleg egyik fő érdeklődési köre a kis sugárdózisok egészségségi hatásainak tanulmányozása.

1996-tól vizsgálja munkatársaival a gén- és sugárterápia kombinálásának lehetőségeit. Az elsők között tanulmányozták az immunrendszert aktiváló génterápia és a sugárterápia kombinált daganatellenes hatását egér agydaganat modellen, valamint a gyógyszer-érzékenyítő génterápia és a sugárterápia együttes hatását is. Eljárást dolgoztak ki agydaganatok sugárérzékenységének fokozására a génterápia eszközeivel. Jelen monográfia génterápiás vizsgálataik eredményét foglalja össze az irodalmi adatok tükrében.



A kiadvány megjelenését  
a TÁMOP-4.2.3/08/1/KMR-2008-0003

Semmelweis Egyetem Piramis Projekt  
támogatta



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
[www.ujszechenyiterv.gov.hu](http://www.ujszechenyiterv.gov.hu)  
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.