

GENSKO LIJEČENJE U PEDIJATRIJI

JASMINKA PAVELIĆ*

Općenito, gensko liječenje znači unos rekombinantnih nukleinskih kiselina, DNA ili RNA, sense ili antisense, in vivo ili ex vivo, u tjelesne ili spolne stanice, sa svrhom nadomještanja učinaka aktivnosti mutiranog gena ili usporavanja ili dokidanja bolesti. Mogućnost primjene genskog liječenja je veoma široka, a najčešće se provodi u području onkologije kroz nekoliko različitih pristupa: a) molekularnu kemoterapiju, b) genetičku imunoterapiju, c) nadomještanje učinaka mutacija. Svi problemi vezani uz gensko liječenje, naravno, nisu riješeni. Najveći su problem vektori, tj. način isporuke gena u ciljnu stanicu. Najčešće se kao vektori upotrebljavaju virusi koji nemaju sposobnost umnažanja. I neviralni vektori, tzv. "gola" DNA ili RNA zatvorena u lipidne vakuole, također se mnogo koriste. Međutim, bez obzira koji se prijenosni sustav koristi mora zadovoljavati 4 glavna svojstva: specifičnost, učinkovitost, dugotrajna ekspresija transgena i mora biti siguran za oboljelog. Nažalost, sve ove osobitosti još uvijek nisu potpuno riješene i predstavljaju glavne prepreke u potpuno sigurnom i uspješnom genskom liječenju. U liječenju djece oboljele od tumora u kliničkom je istraživanju faze I nekoliko studija. Iako zasada nema posebnog kliničkog uspjeha, poboljšanja tehnologije prijenosa gena, bolje razumijevanje mehanizama progresije tumora i izbjegavanje imunološkog nadzora otvara nove perspektive za liječenje djece, možda čak i kombiniranom primjenom genskog liječenja i standardne kemoterapije.

Deskriptori: GENSKO LIJEČENJE, PEDIJARIJA, TUMORI

Razvitkom rekombinantne tehnologije DNA širom su otvorena vrata brojnim probojima u medicini. Jedan od njih je i gensko liječenje - "upotreba gena kao lijeka" - kojim se terapijski gen isporučuje organizmu u svrhu liječenja nasljednih i stečenih bolesti. Djelokrug primjene ovog, još uvijek novog načina liječenja, je veoma širok. Uključuje, teoretski, liječenje svih oboljenja koja imaju osnovu u oštećenju gena, monogenskih i poligenih, uključujući i rak ali i različitih zaraznih bolesti kao što je na primjer AIDS.

Što je gensko liječenje?

Općenito, gensko liječenje znači unos rekombinantnih nukleinskih kiselina, DNA ili RNA, *sense* ili *antisense*, *in vivo* ili *ex vivo*, u tjelesne ili spolne stanice, sa svrhom nadomještanja

učinaka aktivnosti mutiranog gena ili usporavanja ili dokidanja bolesti. Mogućnost primjene genskog liječenja je veoma široka, a najčešće se provodi u području onkologije kroz nekoliko različitih pristupa: a) molekularnu kemoterapiju, b) genetičku imunoterapiju, c) nadomještanje učinaka mutacija.

STRATEGIJE GENSKOG LIJEČENJA

Molekularna kemoterapija obuhvaća nekoliko različitih pristupa od kojih je najznačajniji unos gena za toksin u stanice tumora. Ovaj pristup zamišljen je kao mogućnost selektivnog uništavanja stanica tumora. Kod molekularne kemoterapije postoji mogućnost selektivnog, specifičnog unosa gena za toksin samo u stanice tumora (1, 2). Najčešće primjenjivan pristup je unos gena za timidin kinazu iz virusa herpes simpleks (HSV-tk) u stanice tumora; enzim pretvara netoksični protuvirusni lijek ganciklovir, u toksični oblik te tako izaziva uništenje (samoubojstvo) stanica tumora (3, 4). U stanice tumora mogu se unositi i geni čiji će produkti dovesti do

pojačanog djelovanja konvencionalne kemoterapije.

Slijedeći pristup je imunoterapija tumora (1). Svrha je pojačati imunološku reakciju protiv tumora unosom gena u stanice tumora ili stanice imunološkog sustava. U ovom su području genskog liječenja dendritične stanice zauzele centralno mjesto (5). Ingestijom i preradom antigena dendritične stanice aktiviraju citotoksične i pomoćničke limfocite T, limfocite T-ubojice, ali i limfocite B. Dendritične stanice uzimaju se iz organizma oboljelog i *in vitro* vakciniraju specifičnim antigenom stanica tumora. Procesiranjem antigena, sintezom glavnog lokusa tkivne snošljivosti i ispoljavanja receptora za citokine, aktivirane dendritične stanice, vraćene u oboljelog, potiču imunološki odgovor domaćina.

I konačno, pristup nadomještanja učinaka mutacija odnosi se na onkogene (genskim ih se liječenjem nastoji inaktivirati upotrebom sintetskih *antisense* molekula DNA i RNA ili pak upotrebom protutijela koja inhibiraju

*Institut "Ruđer Bošković", Zagreb
Zavod za molekularnu medicinu

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić
10002 Zagreb, Bijenička cesta 54
E-mail: jpavelic@irb.hr

funkciju mutiranog proteina) i supresorske gene (u stanice se unosi funkcionalna kopija mutiranog supresorskog gena) (6-8). Bez obzira na odabir svi se oblici genskog liječenja svode na modificiranje genoma ciljnih stanica sa svrhom terapijskog probitka.

Prijenosni sustavi

Svi problemi vezani uz gensko liječenje, naravno, nisu riješeni. Najveći su problem vektori, tj. način isporuke gena u ciljnu stanicu. Najčešće se kao vektori upotrebljavaju virusi koji nemaju sposobnost umnažanja. I neviralni vektori, tzv. "gola" DNA ili RNA zatvorena u lipidne vakuole, također se mnogo koriste (9). S obzirom da lipidne strukture i sama DNA ne mogu izazvati imunološku reakciju organizma, u tom su pogledu bolji od virusnih vektora. Izgleda zapravo da su kationski liposomi metoda izbora prijenosa gena. Gotovo su netoksični za organizam, lako se pripremaju, a načini unosa u organizam su gotovo neograničeni, što uvelike doprinosi rješavanju problema učinkovitosti transfekcije.

Ipak, pri upotrebi liposoma veliki problem čine specifičnost i trajanje ekspresije transgena s obzirom da se ne integrira u genom ciljne stanice. Međutim, bez obzira koji se prienosni vektor koristi mora zadovoljavati četiri glavna svojstva: specifičnost, učinkovit prienos gena, dugotrajna ekspresija transgena, mora biti siguran za oboljelog. Nažalost, sve su ove osobitosti još uvijek nepotpuno riješene i predstavljaju glavne prepreke u potpuno sigurnom i uspješnom genskom liječenju. Kada npr. govorimo o specifičnosti potrebno je naglasiti da su stanice u koje treba isporučiti transgen često nedovoljno poznate ili teško dostupne, pa je stoga specifična transfekcija otežana. Ovo je osobito naglašeno u genskom liječenju bolesti krvotvornog tkiva.

Problem učinkovitog prijenosa gena i razine ekspresije transgena izraženi su naročito prilikom kliničke primjene genskog liječenja. Niska razina ekspresije zahtjeva povećanje doze vektora ili češće unošenje što nas pak dovodi do novih problema - imunološkog reagiranja domaćina i

sigurnosti genskog liječenja. Iako za sve oblike genskog liječenja dugotrajna ekspresija transgena nije nužna, najčešće je ipak potrebna. Dužina trajanja ekspresije transgena različita je i ovisi o transgenu, načinu prijenosa i ciljnom tkivu. Na primjer, mnogi adenoviralni vektori omogućuju ekspresiju transgena kroz samo 2 do 3 tjedna. Suprotno tome, transgen unesen u ciljno tkivo adeno-združenim virusnim vektorom ne eksplicira se kroz nekoliko prvih tjedana nakon unosa, ali je potom ekspresija visoka i dugotrajna. Sigurnost domaćina u odnosu na moguće neželjene učinke koji su posljedica unosa viralnih vektora osnovni je preduvjet kliničke primjene i predstavlja jedno od glavnih pitanja etičnosti genskog liječenja.

Virusni sustavi za prienos gena

Virusi su prikladni za prienos gena jer su evolucijski oblikovani tako da ulaze u stanicu domaćara i u njoj ekspliciraju svoje gene. Retrovirusi se najdulje upotrebljavaju kao prienosnici u genskom liječenju (10). Prednost uporabe tih virusa, nad drugima, jest sposobnost stabilne ugradnje u genom replicirajućih stanica domaćina. Ugrađeni se gen prenosi u sve buduće generacije zaraženih stanica. No, retrovirusi imaju i neke nedostatke. Npr. mogu se ugraditi u kromosome različitih tipova stanica pa stoga nisu visoko specifični za željeni tip stanica domaćina.

Nadalje, zbog nasumične ugradnje retrovirusne DNA u genom domaćina moguća je opasnost od oštećenja važnih gena domaćina, aktivacije onkogenih ili oštećenja tumor supresorskih gena. Uz retroviruse slijedeći najeksploatiraniji virusni vektori izvode se iz adenovirusa (11). Lako zaražavaju stanice čovjeka i proizvode velike količine željenog proteina. Razmjerno su sigurni, iako često aktiviraju neželjeni imunološki odgovor. Adenovirusi se ne ugrađuju u genom ciljne stanice pa nema opasnosti od oštećenja vitalnih gena stanice. Međutim, adenovirusima uneseni geni samo su privremeno aktivni (ostaju u epizomalnom obliku pa se mogu izgubiti iz stanica koje nastaju diobom zaražene stanice), pa se u kroničnih bolesnika liječenje mora periodički ponavljati.

KLINIČKA ISKUSTVA

Nadomješavanje učinaka mutacija

Pristup genskog liječenja kada se nadomještava učinak mutacija odnosi se na onkogene i tumor supresorske gene. U odraslih su osoba odobreni neki klinički protokoli ovakvog oblika liječenja koji uključuju korekciju mutacije tumor supresorskog gena *p53* u tumorima glave i vrata i karcinomima bronha (12-14). Odgovarajući pristup liječenja djece koja boluju od tumora zasada ne postoji. Za potpuno rješenje primjene ovog oblika liječenja bit će potrebno razriješiti neke dodatne probleme kao što su unos terapijskog gena u velik broj ciljnih stanica primarnog, ali i metastatskog tumora.

Nije zanemariva ni činjenica da unos jednog terapijskog gena možda ne rješava uništenje svih stanica tumora pri čemu preostale, netretirane stanice, predstavljaju potencijalnu opasnost relapsa bolesti. I naposljetku, s obzirom da mnoge mutacije uzrokuju pojačanu aktivnost gena (onkogeni aktivacija) i dominantni fenotip, liječenje zahtjeva blokiranje gena ili njegovog proteinskog produkta ribozimima, *antisense* RNA ili siRNA (15, 16).

Molekularna kemoterapija

Koncept se osniva na uvođenju, u stanicu tumora, gena čiji produkt pretvara neki netoksični spoj u toksičan, te tako pokreće mehanizam samoubojstva ciljne stanice. Najviše upotrebljavani sustav koristi gen za timidin kinazu virusa herpes kompleks (HSV-tk). Uvođenjem gena HSV-tk u stanice tumora, te dodatkom ganciklovira, dolazi do stvaranja GCV-monofosfata kojeg endogene stanične kinaze dalje fosforiliraju do citotoksičnog trifosfata. Za vrijeme replikacije, DNA polimeraza pogrešno umeće ovaj trifosfat na mjesto gvanidina čime se dokida sinteza rastućeg lanca DNA što dovodi do smrti stanice (17-20).

Zdravo tkivo je pri tom zaštićeno jer se toksični ganciklovir ugrađuje samo u DNA proliferirajućih stanica (21). Ganciklovir uzrokuje značajno povlačenje tumora čak i kada je, u

ukupnoj masi neoplastičnih stanica, samo mali broj vektorom transformiranih stanica. Pojava se objašnjava "bystander" učinkom - prelaskom fosforiliranog ganciklovira iz vektorom transformiranih stanica u susjedne netransformirane stanice. Osim sustava HSV-tk danas se rabi još barem dvadesetak različitih sličnih sistema od kojih su brojni i u kliničkim istraživanjima (22, 23).

Idealan model ovog oblika genskog liječenja predstavljaju tumori mozga koji metastaziraju veoma rijetko pa je glavni, i jedini cilj liječenja, primarni tumor. Ipak, jedno od ograničenja liječenja je činjenica da se terapeutski gen može unositi samo lokalno. Na odraslim su osobama ovim pristupom učinjena brojna istraživanja pa postoje i brojni klinički protokoli (24-26). Suprotno tome, postoji samo jedan primjer kliničke primjene ovog oblika liječenja u djece. Radilo se o progresivnom supratentorialnom tumoru mozga (27). U studiju je bilo uključeno dvanaestero djece. Nakon kirurškog odstranjenja glavne mase tumora nastavljeno je gensko liječenje sustavom HSV-tk/ganciklovir. Nažalost, u jedanaestero djece nije opažen nikakav probitak. U samo jednog djeteta remisija bolesti trajala je 18 mjeseci.

Nedavno je učinjen i klinički pokus liječenja retinoblastoma koji se uobičajeno liječi kirurški i/ili kemoterapijom. Metodom genskog liječenja, upotrebom terapeutskog gena HSV-tk ugrađenog u adenoviralni vektor, liječena su tri mala pacijenta. U dvoje je opažena značajna regresija tumora (a i vid je bio očuvan) do godine dana nakon provedenog liječenja. Ovaj se način liječenja danas provodi uglavnom za monolateralni retinoblastom.

Poticanje rezistencije na lijekove

Koncept liječenja pojačavanjem učinaka doze lijeka već se dugo razmatra u modernoj pedijatrijskoj onkologiji. Smatra se da se davanjem veće doze citotoksičnog lijeka tijekom dužeg vremenskog perioda može izliječiti veći broj oboljelih. Nažalost, za brojne je pedijatrijske zloćudne bolesti pokazano da ne podliježu ovim očekivanjima. Iz

tih je razloga proizašla ideja genskog liječenja kojim bi se zdrave stanice zaštitile od učinaka povećanih doza, npr., kemoterapeutika, dok bi istovremeno nezaštićene zloćudne stanice trebale reagirati na citostatike.

Najčešće upotrebljavan gen poticanja rezistencije na lijekove je *multidrug resistance-1* gen (MDR-1). Produkt gena djeluje kao pumpa koja iz stanica izbacuje višak lijeka i time sprječava nakupljanje malih toksičnih molekula, ali i molekula citostatika kao što su npr. mitoksantron i daunorubicin. Glavni toksični učinak ovih citostatika očituje se na progenitorskim stanicama hematopoetskog sustava pa je u ovom pristupu liječenja cilj unijeti terapeutski gen upravo u te stanice. U odobrenim kliničkim pokusima uz terapeutski se gen uvodi i tretman stanica fibronektinom i čimbenikom rasta hematopoetskog tkiva te češće ponavljanje tretmana. Rezultati su zadovoljavajući (28).

Osim gena MDR-1 po istom se principu koriste i drugi geni, kao npr. bakterijski gen za nitroreduktazu (štiti stanice od štetnog djelovanja tiotepa), te mutirani gen za dihidrofolat reduktazu koji štiti stanice od djelovanja metotreksata (29, 30). Ipak, i u ovom obliku liječenja postoje neki problemi. Osim zdravih stanica vektori mogu zaraziti i zloćudne pa se time potiče otpornost onih stanica koje zapravo moraju biti uništene. Nadalje, zaštite li se hematopoetske stanice još uvijek ostaje niz nezaštićenih organa (pluća, crijeva, koža) koji trpe štetu od visokih doza kemoterapeutika. Zasad nema odobrenih kliničkih pokusa ovog oblika liječenja tumora u djece.

Geni biljezi

Princip ovog oblika liječenja je unos gena nečovječjeg podrijetla u domaćinove T-limfocite ili hematopoetske stanice. Jednostavnom detekcijom gena ili njegovog produkta omogućeno je i praćenje sudbine stanica u kojima se gen nalazi (31). Očito je da u ovom slučaju gen nema izravan terapeutski učinak već daje informacije o ponašanju i sudbini ciljnih stanica. Ovaj se postupak veoma često koristi za obilježavanje matičnih stanica koštane

srži za vrijeme autolognih transplantacija. Na taj se način određuje udio zloćudnih stanica, u transplantatu, koje će eventualno doprinijeti relapsu bolesti (32).

Hematopoetske se stanice koštane srži obično obilježavaju retroviralnim vektorom koji nosi gen rezistencije na neomicin. Tako se za vrijeme relapsa može odrediti da li se gen biljeg nalazi u zloćudnim stanicama. Upotreba ovog modela započela je 1991. godine; primijenjen je u liječenju transplantacijom stanica koštane srži oboljelih od različitih tumora, kao što su npr. akutna mijeloidna leukemija, kronična mijeloidna leukemija, akutna limfoblastična leukemija, neuroblastom, limfom (32-35).

U jednom je kliničkom pokusu provedenom na dvanaestero djece s akutnom mijeloidnom leukemijom četvero doživjelo relaps. U tri od ta četiri djeteta gen-biljeg nalazio se u zloćudnim stanicama što je nedvojbeno potvrdilo da su zloćudne stanice, zaostale u transplantatu koštane srži, bile uzrokom relapsa bolesti (31). Nalazom gena-biljega u zdravim hematopoetskim stanicama potvrđeno je da je upravo transplantat koštane srži bio zaslužan za dugoročnu rekonstituciju koštane srži nakon transplantacije (36). U jednom je kliničkom pokusu zabilježeno čak desetgodišnje preživljene transplantata (37).

Imunoterapija

Osniva se na činjenici da stanice tumora ispoljavaju tumor specifične antigene koji su meta imunološke reaktivnosti organizma. Ovakvi su antigeni naročito brojni na stanicama tumora djece; isti tumori često ispoljavaju i onkofetalne i antigene specifične za pojedine periode razvitka jedinke, a kojih nema u zdravim stanicama djece (38, 39). Jedan od najčešćih pristupa genskog liječenja je pojačavanje imunogeničnosti slabih tumor specifičnih antigena i ojačavanje populacije prekursorskih limfocita T koji te antigene prepoznaju.

Kako su za pokretanje i provođenje imunološke reakcije ključni različiti kemokini i citokini onda je jedan od najčešće primjenjivanih načina

ojačavanja imunološke reakcije na slabe tumor specifične antigene pojačavanje ekspresije jednog ili više citokina unutar stanica tumora. Ovdje se dakle radi o vakcinaciji stanica tumora, ili zdravih imunokompetentnih stanica, genima za citokine. U tom se smislu često koristi gen za limfotaktin koji pomaže prezentaciju npr. GM-CSF, gen za TNF, odnosno interleukin 7 koji pojačavaju aktivnost CD4-stanica, gen za γ interferon koji pojačava ekspresiju antigena glavnog lokusa tkivne snošljivosti klase I odnosno gen za interleukin 2 koji pojačava reaktivnost limfocita T (40-45).

Opisanim su načinom u kliničkom pokusu tretirani neuroblastomi djece transducirani adenoviralnim vektorom s genom za interleukin 2. U pokusu autologne transplantacije pacijenti su primili 8 potkožnih injekcija stanica vlastitog tumora. Više od polovine pacijenata stvaralo je specifična protutijela, a specifični citotoksični limfociti T atakirali su stanice neuroblastoma. Od 10 pacijenata pet ih je reagiralo na tumor (46). U pokusu alogene transplantacije imunološke stanice nisu izazvale vidljivu specifičnu reakciju; samo je jedan pacijent pokazao djelomičnu reakciju (47). U obje je studije značajan broj djece pokazao dobru reaktivnost na naknadno liječenje etopozidom. Ovo međudjelovanje između genske imunoterapije i niske doze kemoterapeutika opažena je također i u brojnim liječenjima odraslih osoba s tumorom.

Slijedeći pokus liječenja neuroblastoma temelji se na podacima dobivenim u pokusima na životinjama; pokazano je da kombinacija T-limfotaktina (Lptn) i interleukina 2 ubrzava i pojačava imunološku reakciju na staničnu liniju neuroblastoma (40). Slično tome, oboljele su osobe primile ili autolognu vakcinu ili alogeničnu s genima za interleukin 2 i Lptn (48). U alogenoj grupi po prvi se je puta mogla vidjeti specifična antitumorska imunološka reakcija, a dva su pacijenta ušla u potpunu remisiju. U pokusu autologne transplantacije uspjeh nije bio veći nego kad je primijenjen samo gen za interleukin 2.

Što se tiče tumora hematopoetskog tkiva klinički su pokusi u fazi I.

Autologne su stanice mijeloblastične leukemije transducirane genom za GM-CSF. Ovakvi su pokusi nedavno prošireni i na akutnu mijeloičnu leukemiju u djece (43). U tijeku su i klinički pokusi gdje se kombiniraju geni za CD 40 ligand i gen za IL-2 u imunološkom liječenju akutne limfoblastične leukemije. U nekoliko je studija pokazana iskoristivost adoptivnog prijenosa citotoksičnih limfocita T usmjerenih na viralne i tumorske antigene. Upotrebom gen-biljega u takvim se pokusima moglo pratiti preživljenje i mjesta naseljavanja T-limfocita, ali se također može odrediti da li oni posreduju, npr. GVH (*graft versus host*) reakciju.

Na primjer, Epstein Barr virus posttransplantacijska limfoproliferativna bolest (PTLD) je komplikacija uzrokovana proliferacijom EBV-inficiranih limfocita B i javlja se u 5-30% pacijenata koji prime koštanu srž osiromašenu limfocitima T od ne posve srodnih davaoca. Nekoliko je grupa autora istraživalo isplativost stvaranja davaočevih EBV specifičnih citotoksičnih limfocita T za liječenje ove bolesti (49-52).

Biagi i suradnici načinili su takve, davaočeve, limfocite i upotrijebili ih za profilaksu i liječenje EBV-PTLD u pacijenata nakon transplantacije hematopoetskih stanica (53). Tijekom sedam godina 56-tero djece koja su primila koštanu srž osiromašenu limfocitima T tretirano je, profilaktički, s EBV-CTL. Dvadesetšestero djece primilo je CTL sa genom rezistencije na neomicin. Niti jedno od 56-tero djece koja su primila EBV-CTL nije razvilo PTLD. U netretirane djece PTLD se razvija u 11,5% slučajeva (54). Gen-biljeg bio je prisutan u stanicama još 78 mjeseci nakon početka liječenja (55). Ovakav se oblik liječenja proširuje sada i na pacijente koji primaju transplantat solidnog organa. Djeca su posebno osjetljiva na PTLD jer su češće seronegativna za vrijeme transplantacije (56).

Adoptivna imunoterapija EBV pozitivne Hodgkin-ove bolesti

Stanice limfoma pozitivne na EBV u sindromu posttransplantacijske

limfoproliferativne bolesti ispoljavaju širok spektar EBV-antigena i podložni su imunoterapiji. Što je, međutim, s Hodgkinovom bolesti i nazofaringealnim tumorima koji ispoljavaju znatno uži spektar antigena? Više od 80% djece sa EBV-Hodgkinovom bolesti može se liječiti, ali je tretman za one koji su u relapsu ograničen. Štoviše, dugotrajno praćenje preživjelih od Hodgkinove bolesti pokazuje povećan rizik razvitka sekundarnog tumora (57). Nefatalne posljedice bolesti, kao npr. promijenjen somatski rast, sterilnost i bolesti pluća, također, mogu ozbiljno ugroziti kvalitetu života preživjelih pacijenata (58). Poželjno je stoga da se razviju novi oblici liječenja koji bi mogli poboljšati remisiju i smanjiti kasnije komplikacije.

Biagi i suradnici tretirali su 13 pacijenata s EBV-Hodgkinovom bolesti upotrebom EBV specifičnih citotoksičnih limfocita T (53). Pet pacijenata s minimalnom rezidualnom bolesti nakon autologne transplantacije koštane srži osjećalo se dobro kroz narednih 2 do 21 mjesec nakon infuzije citotoksičnih limfocita T (59). U osam pacijenata tretiranih za vrijeme akutne faze bolesti injekcijom citotoksičnih limfocita T s EBV-specifičnim genom biljegom gen-biljeg nađen je i u stanicama tumora, ali i u stanicama perifernog optoka krvi, čak devet mjeseci nakon tretmana (59).

Iako su ovo obećavajući rezultati ni jedan pacijent s agresivnim relapsom Hodgkinove bolesti nije bio izliječen. Ovo je možda posljedica manjka specifičnosti EBV-specifičnih citotoksičnih limfocita T za imunosubdominantne antigene LMP1 i LMP2 koji se nalaze na stanicama Hodgkinovog tumora. Osim toga, ovi tumori luče imunosupresivne citokine i kemokine koji remete funkciju citotoksičnih limfocita T (60). Oba se problema mogu riješiti prijenosom gena (61, 62).

Adoptivna imunoterapija EBV pozitivnih nazofaringealnih karcinoma

Usprkos dobrog općeg preživljenja nakon konvencionalne terapije ove bolesti u djece, dugoročnije praćenje

pacijenata pokazalo je, uz način liječenja vezani, mortalitet (63, 64).

ZAKLJUČAK

Slobodno možemo ustvrditi da je za nama razdoblje velikih, donekle neispunjenih očekivanja od genskog liječenja, posebice genskog liječenja djece oboljelih od tumora. Slijedi razdoblje postupnog rješavanja ključnih problema vezanih uz gensko liječenje, a to su isporuka gena, regulacija aktivnosti gena i izbjegavanje imunološkog odgovora. Tek nakon rješavanja ovih problema, a ona se naziru, gensko će liječenje dobiti pravo mjesto u kliničkoj medicini, mjesto koje mu pripada kao novom konceptu liječenja.

Zahvala

Ovaj rad potpomognut je financijski, sredstvima projekta broj 0098092 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

LITERATURA

- Gomez-Navarro J, Curiel DT, Douglas JT. Gene therapy for cancer. *Eu. J. Cancer* 1999; 35: 867-85.
- Bilbao G, Contreras JL, Curiel DT. Advances in cancer gene therapy. *Exp. Opin. Ther. Patents* 1999; 9: 711-35.
- McNeish IA, Searle PF, Young LS i sur. Gene corected enzyme prodrug therapy for cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 26: 173-84.
- Boulikas T. Cancer gene therapy and immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 1996; 9: 941-54.
- Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene. Ther.* 2000; 7: 2-8.
- Clayman GL. The current status of gene therapy. *Sem. Oncol* 2000; 27: 39-43.
- Rossi JJ. Therapeutic antisense and ribozymes. *Br. Med. Bull.* 1995; 51: 217-25.
- Strachan T, Read AP. Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches. U: human molecular genetics. BIOS Scientific Publishers, Oxford, Velika Britanija, 1996; 551-88.
- Prince HM. Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathol.* 1998; 30: 335-47.
- Wivel NA, Wilson JM. Methods of gene delivery. *Hem. Oncol. Clin. North. Am.* 1998; 12: 483-501.
- Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 1999; 6: 113-38.
- Horowitz J. Adenovirus-mediated p53 gene therapy: overview of preclinical studies and potential clinical application. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1999; 1: 500-9.
- Merritt JA, Roth JA, Logothetis CJ. Clinical evaluation of adenoviral-mediated p53 gene transfer: review of NGN 201 studies. *Semin. Oncol.* 2001; 28: 105-14.
- Balint EE, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer* 2001; 85: 1813-23.
- Watanabe T, Sullenger BA. Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 8490-4.
- Komata T, Kondo Y, Koga S i sur. Combination therapy of malignant glioma cells with 2-5A-antisense telomerase RNA and recombinant adenovirus p53. *Gene Ther.* 2000; 7: 2071-9.
- Anderson WF. Gene therapy for cancer. *Hum. Gene. Ther.* 1994; 5: 1-2.
- Cheng Y, Grill SP, Dutschman GE i sur. Metabolism of 9 - (1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, a new anti-herpes virus compound, in herpes simplex virus-infected cells. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 12460-4.
- Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends Genet.* 1994; 10: 174-8.
- Culver KW, Vickers TM, Lamsam JL i sur. Gene therapy for solid tumors. *Brit. Med. Bull.* 1995; 51: 192-204.
- Kuriyama S, Nakatani T, Masui K i sur. Evaluation of prodrugs ability to induce effective ablation of cells transduced with viral thymidine kinase gene. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2623-8.
- Beltinger C, Uckert W, Debatin KM. Suicide gene therapy for pediatric tumors. *J. Mol. Med.* 2001; 78: 598-612.
- Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T i sur. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir - induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 8699-704.
- Nanda D, Vogels R, Havenga M i sur. Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res.* 2001; 61: 8743-50.
- Bansal K, Engelhard HH. Gene therapy for brain tumors. *Curr. Oncol. Rep.* 2000; 2: 463-72.
- Engelhard HH. Gene therapy for brain tumors: the fundamentals. *Surg. Neurol.* 2000; 54: 3-9.
- Packer RJ, Raffel C, Villablanca JG i sur. Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration. *J. Neurosurg.* 2000; 92: 249-54.
- Moscow JA, Huang H, Carter C i sur. Engraftment of MDR1 and NeoR gene-transduced hematopoietic cells after breast cancer chemotherapy. *Blood* 1999; 94: 52-61.
- Plumb JA, Bilsland A, Kakani R i sur. Telomerase-specific suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase sensitize human cancer cells to the pro-drug CB1954. *Oncogene* 2001; 20: 7797-803.
- Allay JA, Galipeau J, Blakley RL i sur. Retroviral vectors containing a variant dihydrofolate reductase gene for drug protection and in vivo selection of hematopoietic cells. *Stem Cells* 1998; 16 (suppl 1): 223-33.
- Brenner MK, Rill DR, Holladay MS i sur. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993; 342: 1134-7.
- Brenner M, Mirro J Jr, Hurwitz C i sur. Autologous bone marrow transplant for children with AML in first complete remission: use of marker genes to investigate the biology of marrow reconstitution and the mechanism of relapse. *Hum. Gene Ther.* 1991; 2: 137-59.
- Santana VM, Brenner MK, Ihle J i sur. A phase I trial of high-dose carboplatin and etoposide with autologous marrow support for treatment of stage D neuroblastoma in first remission: use of marker genes to investigate the biology of marrow reconstitution and the mechanism of relapse. *Hum. Gene Ther.* 1991; 2: 257-72.
- Cornetta K, Tricot G, Broun ER i sur. Retroviral-mediated gene transfer of bone marrow cells during autologous bone marrow transplantation for acute leukemia. *Hum. Gene Ther.* 1992; 3: 305-18.
- Deisseroth AB, Kantarjian H, Talpaz M i sur. Autologous bone marrow transplantation for CML in which retroviral markers are used to discriminate between relapse which arises from systemic disease remaining after preparative therapy versus relapse due to residual leukemia cells in autologous marrow: a pilot trial. *Hum. Gene Ther.* 1991; 1: 359-76.
- Brenner MK, Rill DR, Heslop HE i sur. Gene marking after bone marrow transplantation. *Eur. J. Cancer* 1994; 30: 1171-6.
- Rill DR, Sycamore DL, Smith SS i sur. Long term in vivo fate of human hemopoietic cells transduced by moloney-based retroviral vectors. *Blood* 2000; 96: 844.
- Rousseau RF, Bollard CM, Heslop HE. Gene therapy for paediatric leukaemia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2001; 1: 663-74.
- Rousseau RF, Hirschmann-Jax C, Takahashi S i sur. Cancer vaccines. *Hematol. Oncol. Clin North. Am.* 2001; 15: 741-73.
- Dilloo D, Bacon K, Holden W i sur. Combined chemokine and cytokine gene

- transfer enhances antitumor immunity. Nat. Med. 1996; 2: 1090-5.
41. Soiffer R, Lynch T, Mihm M i sur. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95: 13141-6.
 42. Nelson WG, Simons JW, Mikhak B i sur. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. Cancer Chemother. Pharmacol. 2000; 46(suppl): 67-72.
 43. DeAngelo DJ, Dranoff G, Galinsky I i sur. A Phase I study of vaccination with lethally irradiated, autologous myeloblasts engineered by adenoviral-mediated gene transfer to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 2001; 98: 463.
 44. Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S i sur. Exogenous expression of mouse interferon gamma cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 9456-60.
 45. Leiming T, Foreman N, Rill D i sur. Immunomodulatory effects of human neuroblastoma cells transduced with a retroviral vector encoding interleukin-2. Cancer Gene Ther. 1994; 1: 253-8.
 46. Bowman L, Grossmann M, Rill D i sur. IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. Blood 1998; 92: 1941-9.
 47. Bowman LC, Grossman M, Rill D i sur. Interleukin-2 gene - modified allogeneic tumor cells for treatment of relapsed neuroblastoma. Hum. Gene Ther. 1998; 9: 1303-11.
 48. Brenner MK, Heslop H, Krance R i sur. Phase I study of chemokine and cytokine gene-modified autologous neuroblastoma cells for treatment of relapsed/refractory neuroblastoma using an adenoviral vector. Hum. Gene Ther. 2000; 11: 1477-88.
 49. Rooney CM, Smith CA, Ng CYC i sur. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. Lancet 1995; 345: 9-13.
 50. Regn S, Raffegerst S, Chen X i sur. Ex vivo generation of cytotoxic T lymphocytes specific for one or two distinct viruses for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant. Bone Marrow Transplant. 2001; 27: 53-64.
 51. O'Reilly RJ, Small TN, Papadopoulos E i sur. Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. Immunol. Rev. 1997; 157: 195-216.
 52. Gustafsson A, Levitskiy V, Zou JZ i sur. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cell. Blood 2000; 95: 807-14.
 53. Biagi E, Bollard C, Rousseau R i sur. Gene therapy for pediatric cancer: state of the art and future perspectives. J. Biomed. Biotechnol. 2003; 1: 13-24.
 54. Heslop HE, Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. Immunol. Rev. 1997; 157: 217-22.
 55. Bollard C, Onishi H, Huls M i sur. Long-term follow-up of patients who received EBV-specific CTLs for the prevention or treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. Biol. Blood Marrow Transplant. 2001; 7: 61.
 56. Claviez A, Tiemann M, Wagner HJ i sur. Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disease after bone marrow transplantation mimicking graft-versus-host disease. Pediatr. Transplant. 2000; 4: 151-5.
 57. Beaty O 3rd, Hudson MM, Greenwald C i sur. Subsequent malignancies in children and adolescents after treatment for Hodgkin's disease. J. Clin. Oncol. 1995; 13: 603-9.
 58. Aisenberg AC. Problems in Hodgkin's disease management. Blood 1999; 93: 761-79.
 59. Bollard C, Gahn B, Aguilar L i sur. Cytotoxic T lymphocyte therapy for EBV + Hodgkin disease. Blood 2000; 96: 576.
 60. Poppema S, Potters M, Visser L i sur. Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease. Ann. Oncol. 1998; 9 (suppl 5): 21-4.
 61. Gahn B, Siller-Lopez F, Pirooz AD i sur. Enhanced immune response to the Epstein-Barr virus (EBV) antigen LMP2a using recombinant adenovirus transduced dendritic cells: a potential strategy for EBV-positive Hodgkin's lymphoma. Blood 2000; 96 (suppl 1): 829.
 62. Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH i sur. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. Eur. J. Immunol. 2001; 31: 947-58.
 63. Werner-Wasik M, Winkler P, Uri A i sur. Nasopharyngeal carcinoma in children. Med. Pediatr. Oncol. 1996; 26: 352-8.
 64. Pao WJ, Hustu HO, Douglass EC i sur. Pediatric nasopharyngeal carcinoma: long term follow-up of 29 patients. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1989; 17: 299-305.

Summary

GENE THERAPY FOR PEDIATRIC DISEASES

J. Pavelić

Gene therapy is "the use of genes as medicine". It involves transfer of a therapeutic recombinant nucleic acid, DNA or RNA, sense or antisense, in vivo or ex vivo, into somatic or germ cells, in order to repair genetic fault. Thus it may be used to replace a faulty gene, or to introduce a new gene whose function is to cure or to favorably modify the clinical course of the disease. Several approaches are currently in use: a) molecular chemotherapy, b) genetic immunotherapy, c) the use of corrective gene to overcome the genetic abnormalities. Gene therapy is a very young and experimental. Therefore there are still many hurdles preventing researchers for developing fully successful gene therapy. The main hurdle is the gene delivery. The most commonly vectors in use are nonreplicating viruses derived from retro and adeno viruses. Indeed, nonviral vectors, like "naked" DNA or RNA incorporated into lipid vacuoles are also of great importance. Several gene therapy applications have already been reported for pediatric cancer patients in preliminary phase I studies. Although no major clinical success has yet been achieved, improvements in gene delivery technologies and a better understanding of mechanisms of tumor progression and immune escape have opened new perspectives for the cure of pediatric cancer by combining gene therapy with standard available treatments.

Descriptors: GENE THERAPY, PEDIATRIC CANCER