

Genska terapija v onkologiji, prvi razvojni koraki v Sloveniji

Gene therapy in oncology,
first steps of development in Slovenia

Čemažar Maja^{1, 2}, Jesenko Tanja^{1, 3}, Bošnjak Maša^{1, 4},
Markelc Boštjan^{1, 5}, Kamenšek Urška^{1, 6}, Kranjc Brezar
Simona^{1, 3}, Kos Špela¹, Lampreht Tratar Urša¹, Žnidar
Katarina¹, Renčelj Andrej¹, Matkovič Urška¹, Valant Teja¹,
Levpušček Kristina^{1, 3}, Modic Živa^{1, 3}, Komel Tilen^{1, 3},
Božič Tim^{1, 3}, Kešar Urša^{1, 3}, Starešinič Barbara^{1, 3}, Uršič
Valentinuzzi Katja^{1, 6}, Savarin Monika^{1, 2}, Strojjan Primož^{1, 3},
Gašljevič Gorana¹, Ota Maja¹, Grošelj Aleš⁷, Jamšek Črt⁷,
Hudej Rosana⁸, Peterka Matjaž⁸, Smrekar Frenk⁹,
Hubad Barbara⁹, Hosta Marjan¹⁰, Kužnik Jaka¹⁰, Hosta
Lojze¹⁰, Miklavčič Damijan¹¹, Reberšek Matej¹¹, Cvetkoska
Aleksandra¹¹, Zajc Anja¹¹, Dermol-Černe Janja¹¹, Tozon
Nataša¹², Milevoj Nina¹², Nemeč Svete Alenka¹², Serša
Gregor^{1, 5}

¹Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

²Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola

³Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁴Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

⁵Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

⁶Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

⁷Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁸Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo (COBIK), Mirce 21, 5270 Ajdovščina

⁹JAFRAL d.o.o., Stegne 13A, 1000 Ljubljana

¹⁰Iskra PIO, Trubarjeva c. 5, 8310 Šentjernej

¹¹Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana

¹²Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

Korespondenca: prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

E-mail: gserša@onko-i.si

Poslano / Received: 10.4.2022

Sprejeto / Accepted: 17.4.2022

doi:10.25670/oi2022-002on

IZVLEČEK

Genska terapija postaja čedalje bolj zanimiva tudi v onkologiji. Med aplikacijami je morda najzanimivejša imunostimulacija. Pripravimo lahko plazmidno DNA, ki nosi zapis za različne imunostimulatorne molekule, ki jih vnesemo v celice tumorjev ali normalnih tkiv. Ta tkiva postanejo proizvajalci teh molekul, ki lahko delujejo lokalno ali pa se izločajo tudi sistemsko v krvni obtok. Ker plazmidna DNA ne prehaja celične membrane, so potrebni dostavni sistemi, virusni ali nevirusni. V naših študijah uporabljamo predvsem nevirusni dostavni sistem – elektroporacijo.

Interleukin 12 (IL-12) je eden od zanimivih citokinov, za katerega je znano protitumorsko delovanje s spodbujanjem imunskega odziva in antiangiogenim delovanjem. Namen projekta SmartGene.si je bil pripraviti plazmid z zapisom za interleukin 12 (plazmid phIL12) in pripraviti vse potrebno za njegovo klinično testiranje za zdravljenje kožnih tumorjev. V konzorciju smo združili moči s partnerji z akademskega in industrijskega področja. Treba je bilo pripraviti plazmid za uporabo v humani onkologiji po zahtevah Evropske agencije za zdravila (EMA). Za prijavo klinične študije na Javno agencijo za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) smo morali izvesti tudi vse neklinične raziskave o varnosti in učinkovitosti zdravila. Nato je bilo treba razviti postopek priprave zdravila, zagotoviti primerne prostore za pripravo in izvedbo postopka priprave zdravila.

V treh letih smo dosegli vse te zastavljene cilje in dobili dovoljenje za izvajanje klinične študije na kožnih tumorjih, ki ga je izdala JAZMP na osnovi pozitivnega mnenja Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko. Zdaj poteka klinična študija faze I preizkušanja plazmida phIL12 na kožnih tumorjih glave in vratu z namenom preveriti varnost in sprejemljivost genskega elektro-prenosa plazmida v tumorje. Cilj študije je prav tako določiti primeren odmerek zdravila, ki bi ga v nadaljnji klinični študiji uporabili kot adjuvantno zdravljenje k ablativnim terapijam, kot sta radioterapija ali elektrokemoterapija.

Ključne besede: Genska terapija, interleukin 12, plazmidna DNA, genski elektro-prenos, klinična študija faze I, kožni tumorji glave in vratu

ABSTRACT

Gene therapy is also attracting interest in oncology. Probably the most interesting approach is immunostimulation. Plasmid DNA can be constructed, which is coding for a specific immunostimulatory molecule, which is then delivered into the cells, either in tumour or normal tissue. The transfected tissue then becomes the producer of the molecules encoded in the plasmid. The product is then released from the cells, either locally or systemically into the bloodstream. Since plasmids have hampered transport through the plasma membrane, delivery systems are needed that are either viral or non-viral. In our studies we predominantly use the non-viral transfection system, based on electroporation of the cells.

Interleukin 12 (IL-12) is a cytokine with well-known anti-tumour and anti-angiogenic function. Therefore, in the SmartGene.si project we wanted to construct a plasmid DNA which is coding for IL-12 (plasmid phIL12), and perform all the necessary testing and prepare the documentation for its clinical testing in the treatment of skin tumours. The SmartGene.si consortium comprises partners from academia and industry. In the project it was necessary to prepare the plasmid according to the European Medicinal Agency (EMA) recommendations. For the application for the study approval submitted to the Agency for Medical Products and Medical Devices of the Republic of Slovenia (JAZMP), it was necessary to perform pharmacological, pharmacokinetic, and efficiency testing of phIL12. Thereafter, we had to develop the process

and the facility, and prepare the drug.

During the last three years, we have achieved all the goals and obtained the approval of the JAZMP for clinical testing of the product phIL12 in humans. We also obtained the approval of the National Ethics Committee. Currently, we are testing phIL-12 in a Phase I clinical protocol on head and neck skin tumours, with the aim to test the safety and feasibility of intratumoral gene electrotransfer of the plasmid phIL12. Another goal of the study is to determine a suitable dose of plasmid that could be used in future studies as adjuvant treatment to ablative therapies such as radiotherapy or electrochemotherapy.

Keywords: Gene therapy, interleukin 12, plasmid DNA, gene electrotransfer, clinical study Phase I, head and neck skin tumours

UVOD

Genska terapija je zelo širok pojem, ki se tesno prepleta tudi s pojmom celično zdravljenje. Cilj obeh je namreč popraviti ali odpraviti neposreden vzrok genetskih bolezni bodisi na ravni molekule DNA bodisi na ravni celične populacije. Gensko terapijo lahko najširše definiramo kot terapijo, s katero vnašamo v celice nukleinske kisline (DNA ali RNA) s terapevtskim namenom. Evropska agencija za zdravila (EMA) definira medicinski produkt za gensko zdravljenje kot »medicinski produkt za napredno zdravljenje«, če izpolnjuje naslednja pogoja:

- vsebuje zdravilno učinkovino, ki vsebuje ali je sestavljena iz rekombinantne nukleinske kisline, ki se uporablja pri ljudeh za urejanje, popravljanje, nadomestitev, dodajanje ali odstranitev genskega zaporedja
- njegov zdravilni, preprečevalni ali diagnostični učinek zadeva neposredno zaporedje rekombinantne nukleinske kisline, ki ga vsebuje, ali proizvod izražanja genov tega zaporedja.

Zdravila za gensko zdravljenje pa po definiciji EMA ne vključujejo cepiv proti nalezljivim boleznim.

Poleg tega EMA definira še dve vrsti terapije. Prva je somatsko celično zdravljenje, ki vključuje celice ali tkiva, ki so jim bile spremenjene biološke lastnosti. Druga pa vključuje celice oz. tkiva, ki niso namenjena uporabi za iste osnovne funkcije v telesu. Uporabljajo se za zdravljenje, diagnozo ali preventivo bolezni. Poleg celičnega obravnava tudi zdravljenje s tkivnim inženirstvom, ki vključuje celice ali tkiva, spremenjena tako, da se lahko uporabljajo za popravilo, obnovitev ali zamenjavo človeškega tkiva. Med genska zdravljenja se tako uvrščajo tudi cepiva DNA, kadar se uporabljajo za zdravljenje kroničnih nenalezljivih bolezni.

GENSKA TERAPIJA IN DOSTAVNI SISTEMI

Gensko terapijo lahko razvrstimo v dve kategoriji: gensko zdravljenje spolnih in zarodnih celic ter gensko zdravljenje somatskih celic. Pri genskem zdravljenju spolnih celic se vneseni genski material prenese na naslednje generacije, torej postane deden. V večini držav je gensko zdravljenje spolnih celic prepovedano, ker bi s tem spreminjali človeške lastnosti. Pri somatskem genskem zdravljenju se genski material vključi v specifične tarčne (nereproduktivne) celice in se ne prenaša na potomce. Pri takem zdravljenju je učinek genskega zdravljenja omejen na posameznika, ki je gensko zdravljenje prejel.

Ker celice nimajo razvitih transportnih mehanizmov za vnos nukleinskih kislin v celice in ker tuje nukleinske kisline pomenijo »signal nevarnosti« za celico, je za vnos nukleinskih kislin v celice

treba uporabiti vektorje oz. nosilce. Za to se največkrat uporabljajo virusni vektorji, ker imajo specifične mehanizme za vstop v celice, poleg njih pa se uporabljajo tudi nevirusni vektorji, pri katerih dodatno uporabljamo kemične ali fizikalne načine vnosa v tarčne celice.

Pri uporabi virusov kot vektorjev za vnos genske informacije je treba virusom najprej odstraniti patogene gene, ki so odgovorni za razvoj bolezni, in te nadomestiti z zaporedjem DNA ali RNA, ki ga želimo vnesti v celice. Ohraniti pa je treba gene, ki so odgovorni za vstop v celice. Tako pripravljenim virusom rečemo virusni vektorji. Najpogosteje se uporabljajo retrovirusni vektorji, ki se vgradijo v genom gostitelja, adenovirusni vektorji, ki ostanejo episomalno, torej je transdukcija prehodna, adeno-povezani virusni vektorji, ker so majhni in neimunogeni, ter herpes simpleks virusni vektorji zaradi svoje trofičnosti do živčnega tkiva. Z virusnimi vektorji pa je povezano kar nekaj slabosti, ki vključujejo akutno imunsko reakcijo (predvsem pri adenovirusnih vektorjih), insercijsko mutagenozo (retrovirusni in adeno-povezani vektorji), citotoksičnost (herpes simpleks virusni vektorji), omejeno velikost vključkov (retrovirusni, lentivirusni in adeno-povezani vektorji) ter zahtevno proizvodnjo in z njo povezane velike stroške. Zato se vedno bolj uporabljajo nevirusni načini dostave genskega materiala v tarčne celice. Večinoma se pri nevirusnih načinih uporablja plazmidna DNA – plazmidni vektor, katerega prednost je ta, da nismo omejeni z velikostjo genskega vključka, kar je značilnost virusnih vektorjev. Ker pa plazmidni vektor v nasprotju z virusnimi vektorji sam ne vstopa v celice, ga je treba vnesti s kemičnim ali fizikalnim načinom dostave.

Med kemične dostavne sisteme uvrščamo najrazličnejše molekule, ki naj bi: i) zamaskirale negativni naboj nukleinske kisline; ii) kondenzirale molekulo DNA in jo s tem zmanjšale; iii) zaščitile molekulo DNA pred razgradnjo s citoplazmatskimi nukleazami. Najpogosteje se kot kemični nosilci uporabljajo različni polikationi (kationski lipidi ali polimeri), ki se povežejo z DNA ali jo obkrožijo (enkapsulacija DNA), ali pa se molekula DNA adsorbira na nosilce (npr. superparamagnetni nanodelci). Med fizikalne načine dostave genskega materiala pa uvrščamo metode, pri katerih uporabljamo mehansko, ultrazvočno, električno, hidrodinamsko ali na laserju temelječo (svetlobno) energijo, s katero začasno destabiliziramo oz. poškodujemo celične membrane in s tem omogočimo prenos nukleinskih kislin v celično notranjost. Med najbolj razširjene fizikalne vnosne sisteme spada elektroporacija, ki se že uporablja v kliničnih študijah (1, 2). Po vnosu v evkariontske celice plazmidni vektorji prav tako ostajajo zunaj kromosomov in se ne vgradijo v genom, zato je izražanje vnesenih genov prehodne narave, kar je varnejše in pri zdravljenju raka ali DNA cepljenju pravzaprav zaželeno.

ZNAČILNOSTI PLAZMIDNIH VEKTORJEV, PRIMERNIH ZA KLINIČNO UPORABO

Plazmidi so majhne krožne zunajkromosomske dvoveržne molekule DNA, naravno prisotne v bakterijah, s katerimi si bakterije, prek horizontalnega prenosa, izmenjujejo koristne genske informacije, kot je odpornost proti antibiotikom. Za gensko terapijo uporabljamo umetno sestavljene plazmide, tako imenovane plazmidne vektorje, ki jih namnožimo v gensko spremenjenih bakterijah, običajno so to različni sevi bakterij *Escherichia coli* (3). Plazmide pripravljamo z molekularnim kloniranjem, ki vključuje nabor metod, pri katerih fragmente DNA vzamemo iz izvornega organizma in vstavimo oz. kloniramo v izbrani plazmidni vektor. Za uporabo v genski terapiji potem plazmidno DNA izoliramo iz gostiteljskih bakterij ter jo pripravimo v ustrezni kakovosti in v zahtevani čistosti. Izdelovanje

plazmidne DNA je poceni in varno v primerjavi z izdelovanjem virusnih vektorjev, prednost plazmidne DNA pa je tudi njena obstojnost na sobni temperaturi.

Glavne sestavne dele plazmidnih vektorjev lahko razdelimo na ekspresijsko kaseto, ki nosi zapis za izbrani terapevtski gen, in bakterijsko ogrodje, ki ga potrebujemo za proizvodnjo plazmidov v bakterijah. Bakterijsko ogrodje nosi zapis za selekcijski označevalec, ki je navadno gen za odpornost proti antibiotiku, kar pa je pri klinični uporabi nezaželeno (4, 5). Obstaja namreč tveganje za horizontalni prenos odpornosti na okolijske in komenzalne mikroorganizme ter tveganje za alergijski odziv na ostanke antibiotika, ki se uporablja pri proizvodnji plazmidov (6, 7). Zato nadzorni agenciji, odgovorni za licenciranje zdravil, EMA in FDA, priporočata izogibanje genom za odpornost ali vsaj uporabo odpornosti proti takšnim antibiotikom, ki se ne uporabljajo za zdravljenje ljudi.

Da bi izpolnili omenjena varnostna priporočila, so znanstveniki razvili številne alternativne načine za pripravo plazmidov, ki ne temeljijo na selekciji z antibiotikom (6). Eden takšnih načinov je operator-represorska titracija (ORT) (8), ki jo je razvilo podjetje CobraBio in smo jo uspešno implementirali v naše laboratorije (9–11). Pri tehnologiji ORT uporabljamo poseben mutiran sev *Escherichia coli*, ki ni zmožen preživeti brez plazmidov, ki omogočijo izražanje manjkajoče esencialne aminokisline. Poleg prej omenjenih varnostnih prednosti so plazmidi pripravljani tako, tudi manjši, kar zagotavlja večjo uspešnost transfekcije (12) in manjšo imunogenost, saj je zmanjšan ravno bolj imunogen bakterijski del plazmida (6, 13).

Aktivni del plazmidnega vektorja je ekspresijska kaseto s transgenom in promotorjem, ki nadzoruje njegovo izražanje (14). Promotor naj bi podpiral dolgotrajno izražanje transgena ali pa vsaj nadzorovano izražanje. V preteklosti je večina plazmidov vsebovala citomegalovirusni (CMV) promotor, ki pa ne zagotavlja dolgotrajnega izražanja, saj je zaradi virusnega izvora dozeten za transkripcijsko utišanje v evkariontskih celicah. Primerna zamenjava za virusne promotore so promotorji celičnih hišnih genov (angl. housekeeping genes), ki se stalno izražajo v vseh tkivih telesa (14). V pristopu, imenovanem transkripcijsko ciljanje, pa uporabimo promotore genov, ki se izražajo samo v nekaterih tkivih (tkivno specifični promotorji) ali postanejo dejavni pod vplivom določenih zunanjih ali notranjih dejavnikov (inducibilni promotorji) (16). Za našo klinično študijo smo izbrali inducibilni promotor gena za od ciklina odvisni kinazni inhibitor 1 (angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1, CDKN1A), bolj znan kot p21 (19). Gen p21 se povišano prepisuje ob genotoksičnem stresu, inducira pa se tudi v tumorsko specifičnih razmerah, kot je hipoksija (20, 21). Promotor p21 je tako zelo primeren za prostorski in časovni nadzor nad izražanjem pri zdravljenju raka, še posebej kadar gensko terapijo kombiniramo s kemoterapijo ali radioterapijo (22–24).

Glavni del ekspresijske kasete je zapis za transgen, torej gen, katerega izražanje želimo izkoristiti v terapevtske namene. Terapevtske gene, primerne za zdravljenje raka, lahko razdelimo v štiri kategorije. Lahko delamo zamenjavo ali popravilo okvarjenih genov (popravljalna genska terapija), ker pa je rak posledica številnih mutacij, ta pristop ni vedno najbolj smiseln in učinkovit. Bolj primerni so tisti, pri katerih sprožimo smrt rakavih celic. To lahko dosežemo z neposrednim ciljanjem rakavih celic s transfekcijo samomorilskih ali citotoksičnih genov (citoredukcijska genska terapija), posredno s ciljanjem rakavega žilja (žilno-ciljana genska terapija), ali pa še bolje, s sprožitvijo protirakavega imunskega odziva (genska imunoterapija). Pristopi slednjega vključujejo cepljenje z DNA, torej vnos zapisa za različne tumorske antigene in vnos imunospodbujevalnih citokinov. Najbolje raziskan in najpo-

gosteje uporabljen citokin za genski elektroprenos je interlevkin 12 (IL-12), ki ga že leta uspešno preizkušamo tudi sami in smo ga zato tudi izbrali za našo klinično študijo.

PREDKLINIČNE ŠTUDIJE S PLAZMIDI Z ZAPISOM ZA IL-12

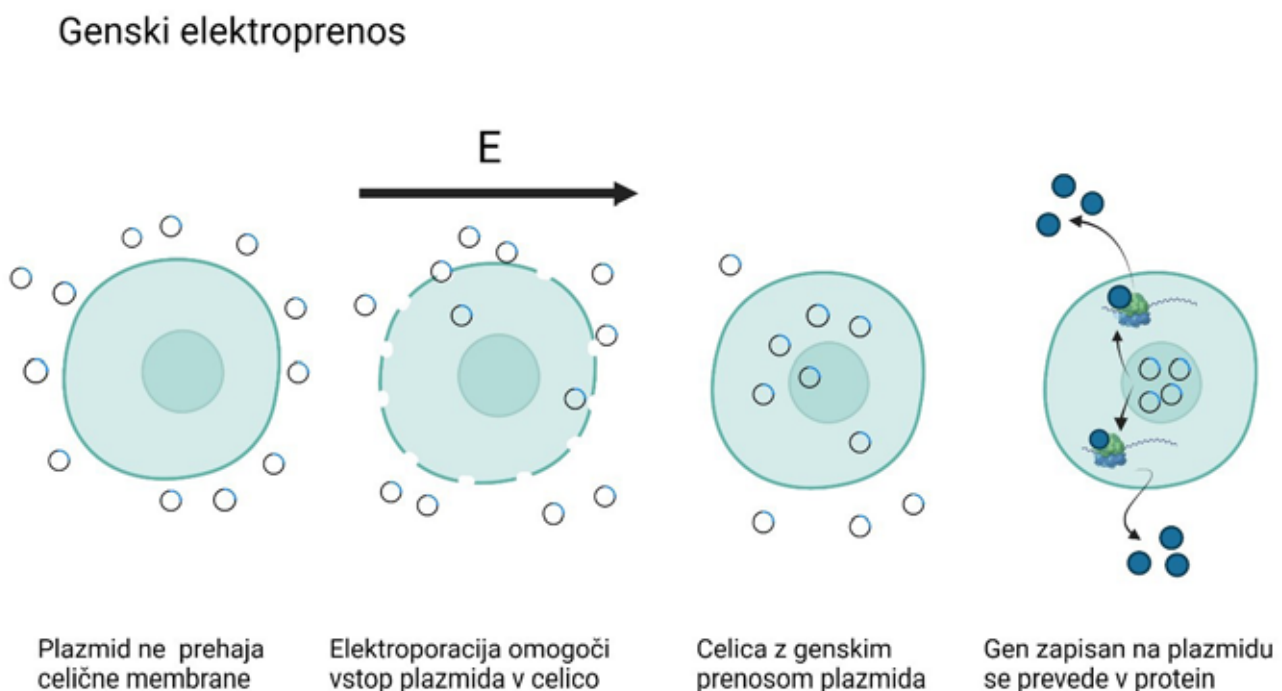
IL-12 je topen vnetni citokin, ki ga proizvajajo fagociti in dendritične celice kot odgovor na antigene. IL-12 so odkrili leta 1989. Izolirali so ga iz s forbol diester aktivirane Epstein-Barr transformirane linije človeških limfoblastoidnih celic B RPMI 8866 in ga poimenovali spodbujevalni dejavnik celic naravnih ubijalk. Že takoj so bile prepoznane tri aktivnosti IL-12: indukcija proizvodnje IFN- γ , povečanje citotoksičnosti naravnih celic ubijalk in okrepitev mitogenega odziva celic T. IL-12 je heterodimer, sestavljen iz dveh podenot, 35 kDa lahke verige (znane tudi kot p35-IL-12) in 40 kDa težke verige (znane kot p40-IL-12). Leto pozneje, 1990, je bil IL-12 neodvisno opisan kot »dejavnik zorenja citotoksičnih limfocitov«, leta 1991 pa je bilo predlagano, da se za novoodkrit citokin uporabi oznaka IL-12. Kmalu zatem so bili klonirani človeški in mišji geni za IL-12, kar je spodbudilo nadaljnje študije o terapevtski učinkovitosti rekombinantnega IL-12 pri različnih modelih tumorjev, vključno z metastazami (25–30).

Protitumorska učinkovitost IL-12 je večplastna in še vedno ni povsem pojasnjena. Sestavljena je iz indukcije proizvodnje IFN- γ , ki povzroči infiltracijo citotoksičnih limfocitov T in celic naravnih ubijalk (NK) v tumorje, ki izkazujejo citolitične aktivnosti proti rakavim celicam. Poleg tega ima IL-12 antiangiogeno delovanje prek indukcije interferon inducibilnega proteina-10 (IP10) in monokina Mig. Poleg tega IL-12 poveča odziv celic T pomagalk, kar vodi do aktivacije specifičnega odziva celic B.

Dobro protitumorsko in protimetastatsko delovanje IL-12 je bilo dokazano na številnih predkliničnih modelih tumorjev. IL-12 so v začetnih študijah uporabljali v obliki rekombinantnega proteina. Po začetnih kliničnih študijah, kjer so bili opaženi hudi neželeni učinki, so terapijo z rekombinantnim IL-12 opustili in začeli se iskati novi načini, kako pripeljati IL-12 na področje tumorja.

Genska terapija je omogočila izboljššan način aplikacije IL-12 in s tem tudi izboljšano delovanje. V različnih študijah sta bili ocenjeni varnost in protitumorska učinkovitost intratumorske genske terapije z IL-12. Za gensko terapijo z IL-12 so uporabljali različne dostavne sisteme, ki vključujejo injiciranje gole plazmidne DNA, adenovirusne ali druge virusne vektorje, fizikalne načine vnosa plazmidnega vektorja s pomočjo genske pištole ali elektroporacije ter druge kemične načine vnosa (31). V ZDA potekajo tudi že klinične študije in prvi rezultati so zelo obetavni, tudi v kombinaciji z zaviralci imunskih kontrolnih točk (32, 33). Kot omenjeno zgoraj, se na Oddelku za eksperimentalno onkologijo že leta ukvarjamo z gensko terapijo z IL-12. Pripravili smo različne plazmidne vektorje, ki smo jih testirali na različnih tumorskih modelih (Slika 1). V sodelovanju z Veterinarsko fakulteto Univerze v Ljubljani sodelavci z Onkološkega inštituta Ljubljana izvajajo gensko terapijo z IL-12 v kombinaciji s kirurgijo in elektrokemoterapijo na tumorjih pri psih ljubljencek. Dokazali smo, da je terapija varna in zelo učinkovita ter da v nekaterih primerih deluje tudi na oddaljene tumorje (34). Za translacijo v humano medicino pa smo se odločili zato, da bi pripravili plazmidni vektor za produkcijo IL-12, ki bi bil pod nadzorom inducibilnega promotora gena p21 in brez gena za antibiotično rezistenco. Tako smo sestavili zdravilo, plazmid phIL12, ki nosi zapis za produkcijo sicer naravno prisotnega proteina IL-12 z znanim protitumorskim delovanjem.

Slika 1: Shematski prikaz delovanja genske terapije. E – električna poljska jakost.



KAKO SMO ZDRUŽILI MOČI

V letu 2017 se je pripravljala pametna specializacija, S4, na Ministrstvu za izobraževanje znanost in šport (MIZŠ) v sodelovanju s Službo Vlade Republike Slovenije za razvoj in evropsko kohezijsko politiko (SVRK). Namen pametne specializacije je bil izbrati prioriteta področja in dejavnost za Slovenijo kot prioriteta področja, na katerih se pričakujejo največji premiki, ki so potrebni za nadaljnji razvoj gospodarstva. Nastala so Strateška razvojno-inovacijska partnerstva (SRIP) za posamezna področja, med drugimi je bil ustanovljen SRIP medicina. V SRIP-u medicina so bila izoblikovana posamezna prednostna področja, in sicer translacijska medicina, aktivno in zdravo staranje, biofarmaceutika, naravna zdravila in kozmetika ter zdravljenje raka.

Pri pripravi SRIP-ov in področij delovanja so potekale intenzivne razprave. V razpravo so se vključili skoraj vsi vidni predstavniki raziskovalnih institucij, laboratorijev. Mnogo raziskovalcev je predstavljalo svoje ideje in svoje dejavnosti. V razpravo in v SRIP-e so bili vključeni tudi deležniki iz industrije in gospodarstva. Tako so se začele vzpostavljati vezi med akademskim področjem in industrijo, saj so se prvič skupaj dobili predstavniki obeh strani in se začeli pogovarjati. Predvsem smo morali po področjih izluščiti tematike, ki bodo prebojne in zanimive v prihodnosti. Tako smo na področju onkologije imeli številne sestanke. Med drugimi smo mi predstavili svoje ideje in jih argumentirali s svojimi predkliničnimi rezultati (32, 34). Ideja SRIP-ov pa je bila tudi, da morajo tehnologije in pristopi preiti iz Technological Readiness Level (TRL) 3 vsaj v TRL 6 ali več. Za tak preboj pa je potrebna klinična študija. V okviru področja onkologija smo tako izluščili in predlagali dve prioriteta področji, in sicer gensko in celično terapijo, ter razvoj na področju protonske terapije.

Na osnovi priprave dokumentacije SRIP-a medicina je Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport pripravilo razpis »Spodbujanje izvajanja raziskovalno-razvojnih projektov (TRL 3-6)«, na katerega smo se prijavi. Naša ideja je bila, da bi zdravilo phIL12 pripravili tako, da bi bilo primerno za uporabo v klinični raziskavi, in bi začeli izvajati klinično študijo. Za to pa je bilo treba sestaviti konzorcij, v katerem bi združili predklinične in biotehnoške laboratorije z uporabniki v kliniki. Zato smo se združili partnerji s specifičnimi znanji v projektu SmartGene.si z naslovom »Nova generacija genske terapije za zdravljenje raka: od genov do proizvodnje in klinike« (Slika 2). Vodilna ustanova je bila Onkološki inštitut Ljubljana, kjer imamo zmogljivosti za konstrukcijo plazmidov ter testiranje teh v nekliničnih in kliničnih študijah. COBIK, zasebni raziskovalni zavod kot biotehnoški center ima znanje in izkušnje pri razvoju proizvodnih procesov kompleksnih bioloških molekul, pri čemer imajo znanja razvijati in optimizirati biotehnoške procese. Iskra PIO je industrijski deležnik, ki ima izkušnje s pripravo čistih prostorov za pripravo biotehnoških zdravil, Jafral ima izkušnje s proizvo-

Slika 2: Logotip projekta SmartGene.si; Nova generacija genske terapije za zdravljenje raka: od genov do proizvodnje in klinike.



dnjo bioloških zdravil, Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani pa s pripravo generatorjev električnih pulzov. Klinični partner na ravni veterine je bila Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, kjer že imajo izkušnje z elektrokemoterapijo in genskim zdravljenjem v veterinarski onkologiji. Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (ORL) pa že ima izkušnje z elektrokemoterapijo, kar je prvi pogoj za zasnovo klinične študije genske terapije.

Vsi ti partnerji smo skupaj zasnovali projekt SmartGene.si, v katerem naj bi na koncu projekta začeli klinično študijo prve genske terapije v Sloveniji na osnovi lastnega znanja in z lastnim zdravilom, zasnovanim in proizvedenim v Sloveniji. Na razpisu nam je uspelo in pridobili smo sredstva MIZŠ in strukturalnih skladov EU. Na koncu projekta leta 2021 nam je uspelo doseči vse zastavljene cilje in začeli smo zdravljenje prvih bolnikov z zdravilom phIL12. Tako smo sestavili platformo za razvoj, testiranje in uvajanje v klinično prakso podobnih zdravil, ki bi jih še lahko razvili.

PRIPRAVA DOKUMENTACIJE ZA KLINIČNO ŠTUDIJO

Dokumentacija za začetek klinične študije faze I z novim zdravilom je bila obsežna. Plazmid, ki nosi zapis za citokin IL-12, ki je v našem primeru poimenovan plazmid phIL12, spada v kategorijo zdravil za napredno zdravljenje (Advanced Therapy Medicinal Product- ATMP) kot genska terapija.

Za pravilno usmeritev pri razvoju takšnega zdravila se v Evropi priporoča posvet z EMA za pridobitev njihovega znanstvenega nasveta zaradi lažje poznejše registracije zdravila. Po znanstveni nasvet smo se obrnili skupaj s proizvajalci/razvijalci našega zdravila phIL12 znotraj konzorcija SmartGene.si, kjer smo pripravili dosje s podatki o kakovosti zdravila, neklinični študiji in kliničnem protokolu. Po prvem spletnem sestanku smo pripravili dodatne obrazložitve in prilagoditev protokolov, ki smo jih predstavili odboru za ATMP zdravila. Končni znanstveni nasvet EMA smo prejeli v letu 2020 in na njegovi podlagi začeli pripravljati vso dokumentacijo, potrebno za odobritev klinične študije. Pripravili smo klinični protokol, za katerega smo pridobili soglasje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko. Skupaj s proizvajalci/razvijalci zdravila smo pripravili dosje o zdravilu v preizkušanju (IMP), ki vsebuje vse podrobnosti o zdravilu phIL12. Na Ministrstvo za okolje in prostor smo prijavi namerno sproščanje GSO o okolje ter operacijsko dvorano na kliniki ORL vpisali v register za delo z gensko spremenjenimi organizmi kot zaprti sistem.

Za izdelavo brošure za raziskovalca smo potrebovali ključne neklinične podatke o učinkovitosti, farmakodinamiki, farmakokinetiki ter varnosti zdravila. Za to smo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo zasnovali in izvedli neklinično študijo na miših, za katero smo pridobili mnenje etične komisije za poskuse na živalih in dovoljenje Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (U34401-6/2020/5). Zaradi biološke neaktivnosti humanega IL-12 v miših (humani IL-12 se ne veže na mišji receptor za IL-12) smo na podlagi znanstvenega nasveta EMA konstruirali še plazmid pmIL12, ki ima gen za humani IL-12 zamenjan z mišjim genom za IL-12 (plazmid pmIL12). Preizkušana phIL12 in pmIL12, ki sta se uporabljala za neklinično testiranje, sta imela enake specifikacije kot phIL12, ki se uporablja v klinični študiji. Študijo smo načrtovali v skladu z znanstvenim nasvetom EMA, Pravilnikom o dobri laboratorijski praksi ter naslednjimi smernicami: EMA/CAT/80183/2014 (Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products); EMA/CAT/852602/2018

(Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials); EMA/CHMP/GTWP/125459/2006 (Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products); EMA/CPMP/ICH/286/1995 (ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals); EMA/CHMP/ICH/646107/2008 (ICH guideline S9 on nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals); EMA/273974/2005 (Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors); CPMP/BWP/3088/99 (Note for Guidance on the Quality, Pre-clinical and Clinical aspects of gene transfer medicinal products); CPMP/SWP/1042/99 Rev 1 Corr (Guideline on repeated dose toxicity); Reflection paper: Expectations for Biodistribution (BD) Assessments for Gene Therapy (GT) Products. Z neklinično študijo smo pridobili vse potrebne dokaze o izražanju, biološki aktivnosti ter potenci produkta IL-12, učinkovitosti zdravljenja na mišjih tumorjih, nastanku imunskega odziva v tumorjih, biodistribuciji in času zadrževanja zdravila po različnih tkivih in organih ter njegov varnostni profil (35, 36). Za pridobitev podatkov smo procesirali in shranili 9213 različnih vzorcev. V študiji je sodelovalo 22 raziskovalcev, med katerimi jih je pet izvajalo stalni nadzor nad izvajanjem študije. Na podlagi vse predložene dokumentacije nam je JAZMP v septembru 2021 izdala odločbo o odobritvi kliničnega preizkušanja faze I.

Postopek in časovni potek pridobivanja potrebne dokumentacije v sklopu projekta sta predstavljena v Sliki 3.

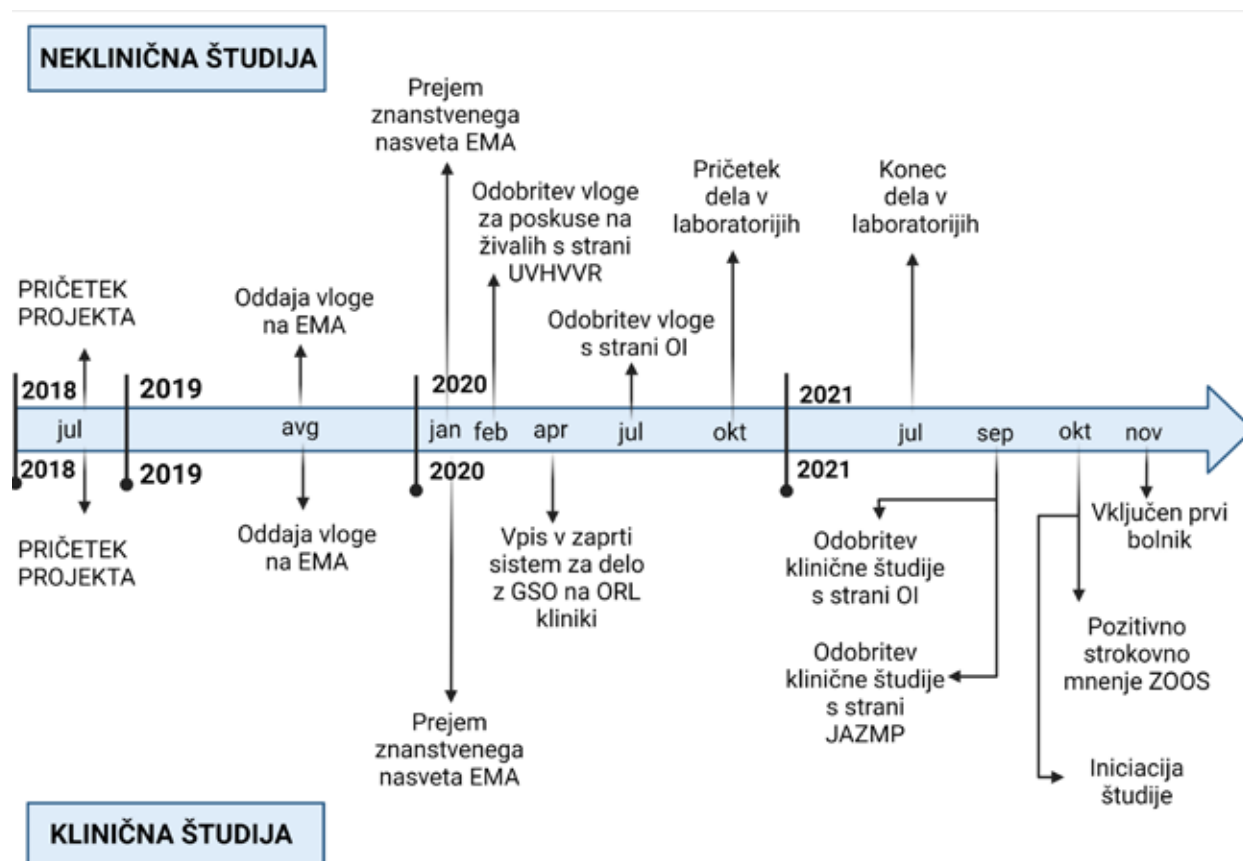
NAMEN, CILJI IN IZVEDBA KLINIČNEGA PREIZKUŠANJA FAZE I

Vse priprave na neklinični ravni in priprava dosjeja o zdravilu so bile osnova za pripravo protokola klinične študije. Glede na novo zdravilo, ki je v kategoriji ATMP, je bilo treba zasnovati klinični protokol, ki bo zagotovil varnost in izvedljivost genske terapije tumorjev z genskim elektroprenosom.

Izbor tumorjev je bil poseben izziv. Treba je bilo zagotoviti najboljše možno zdravljenje bolnikom v študiji, hkrati pa preveriti varnost in sprejemljivost zdravljenja. Zato smo se odločili za bazalnocelični karcinom, ki je operabilen in na področju glave in vratu. Zaradi razmeroma počasne rasti tovrstnega tumorja je interval 30 dni, ki smo ga predvideli od zdravljenja z genskim elektroprenosom pHIL12 in zadnje kontrole v klinični študiji, sprejemljiv in ne povečuje nevarnosti zaradi napredovanja bolezni. Če v 30 dneh ne bi prišlo do popolnega odgovora na terapijo, je predvidena kirurška ekscizija tumorjev (Slika 4).

Študija je zasnovana kot intervencijska s tremi odmerki učinkovine pHIL12 vsakič v skupini s tremi bolniki. Vsak naslednji odmerek ima višjo koncentracijo učinkovine. V študiji sledimo v primarnem cilju varnost zdravljenja in sprejemljivost zdravljenja. Pomemben del študije pa sta tudi farmakokinetika in farmakodinamika zdravljenja, pri čemer bomo merili količino učinkovine lokalno, v tumorju po genskem elektroprenosu, morebitno sproščanje v krvni obtok in spremljali imunske parametre v tumorju in v cirkulirajočih imunskih celicah. Za to bomo ob kontrolnih pregledih odvzemali kri in tkivne vzorce tumorja. Končni cilj je iz vseh zbranih podatkov izbrati najprimernejši odmerek učinkovi-

Slika 3: Postopek in časovni potek pridobivanja potrebne dokumentacije od pričetka projekta julija 2018 do vključitve prvega bolnika v novembru 2021. EMA: Evropska agencija za zdravila; UVHVVR: Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin; OI: Onkološki inštitut Ljubljana; GSO: gensko spremenjeni organizmi; KME: Komisija za medicinsko etiko; JAZMP: Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke; ZOOS: Znanstveni odbor za namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje izdelkov na trg.

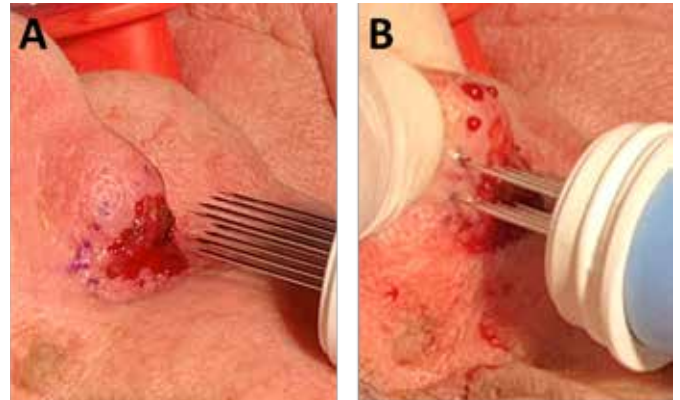


ne pHIL12 za nadaljnje klinične študije v kombiniranem zdravljenju z ablativnimi načini.

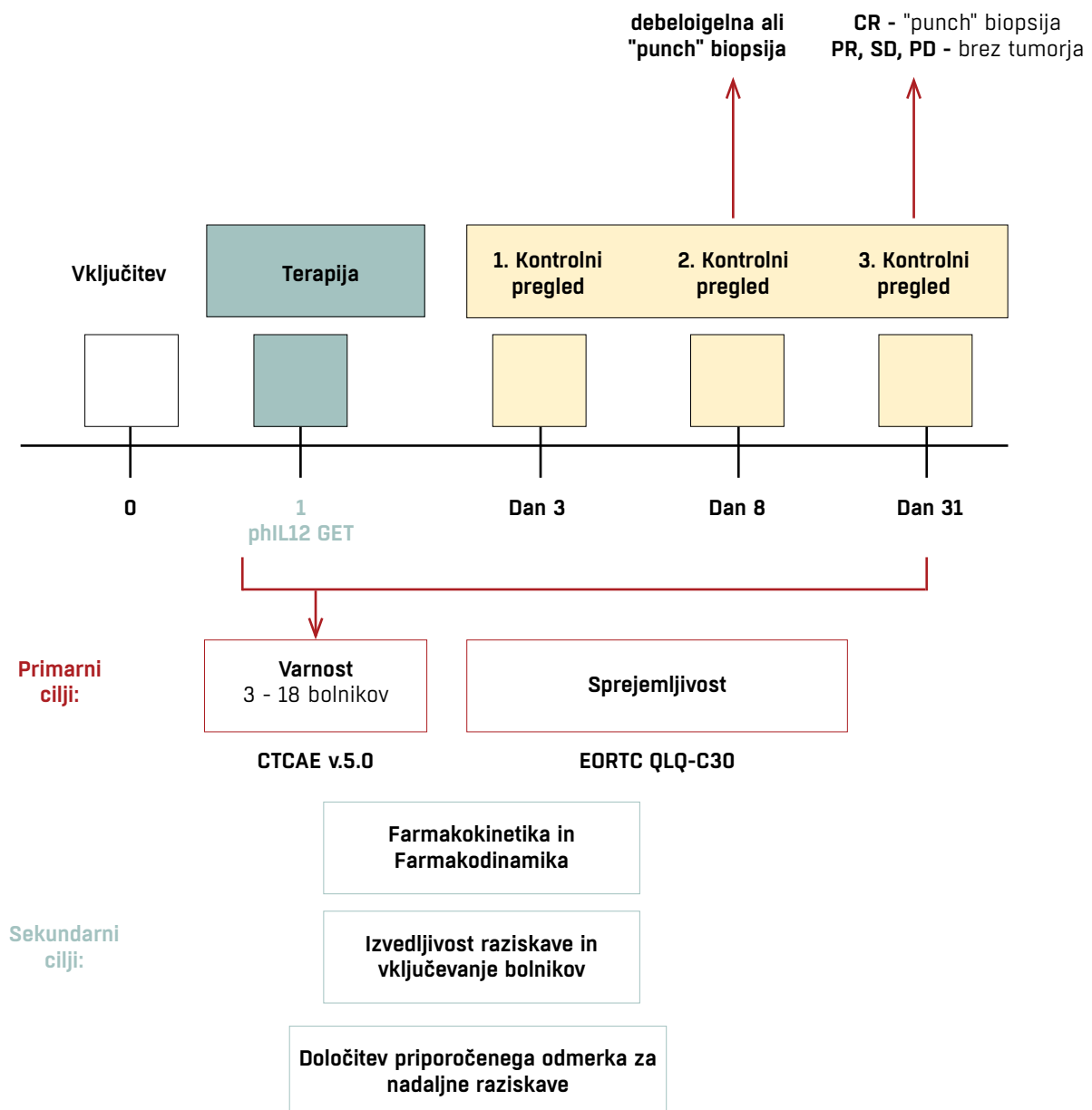
Zdravljenje je predvideno kot enkratno, za dostavni sistem bo uporabljena elektroporacija. Za varno in učinkovito dostavo plazmidne DNA bomo uporabili generator električnih pulzov IGEA s.r.l. iz Italije, ki je certificiran za izvajanje elektrokemoterapije in tudi genskega elektroprenosa. Naša študija je tudi prva v Evropi, ki bo uporabila genski elektroprenos za zdravljenje tumorjev.

V študijo so bili vključeni že trije bolniki z bazalnoceličnim karcinomom (Slika 5). Pri najnižjem odmerku nismo opazili nobenih neželenih učinkov

Slika 5: Izvajanje genske terapije z zdravilom pHIL12. pHIL12 injiciramo intratumorsko in počakamo 5 minut, da se plazmidna DNA razporedi po tumorju (A). Nato z vzporednimi igelnimi elektrodami dovedemo električne pulze na tumor, vključno z varnostnim robom (B).



Slika 4: Shema klinične študije SmartGene.si s primarnimi in sekundarnimi cilji.



UPORABA GENESKE TERAPIJE V PRIHODNOSTI

Klinična študija bi morala pokazati varnost in tudi učinek na spodbujanje lokalnega imunskega odgovora. Številne druge neklinične in tudi sorodne klinične študije, ki so se izvedle v ZDA, so pokazale dober učinek lokalnega spodbujanja imunskega odziva s plazmidno DNA z zapisom za IL-12.

V zadnjem času čedalje več študij nakazuje na pozitiven učinek kombiniranega zdravljenja lokalnih terapij z ablativnim delovanjem in sočasnega imunskega zdravljenja. Taki pristopi so bili opaženi pri kombinaciji radioterapije in zaviralcev imunskega odziva, kot tudi kombinaciji elektrokemoterapije in zaviralcev imunskega odziva. Posebno je zanimiva študija elektrokemoterapije in pembrolizumaba pri napredovalem melanomu s kožnimi metastazami. V tej študiji se nakazuje učinek elektrokemoterapije kot vakcinacije in situ, saj se je pokazala interakcija z učinkom pembrolizumaba tako na lokalni ravni kot tudi na oddaljenih metastazah in celokupnem preživetju bolnikov (37).

V prihodnosti bo mesto genskega elektro prenosa phIL12 najverjetneje v kombinirani terapiji z ablativnimi terapijami, podobno kot z zaviralci imunskih kontrolnih točk. Posebno mesto bi lahko imela kombinacija genske terapije s phIL12 in radioterapije. Druga kombinacija pa je z elektrokemoterapijo, pri kateri se uporablja ista tehnologija, vendar za dostavo citostatikov. V tem primeru bi lahko hkrati izvedli elektrokemoterapijo in genski elektro prenos phIL12 v tumorje in spremenili lokalni učinek elektrokemoterapije v lokoregionalnega ali celo sistemskega z dodatnim učinkom phIL12.

ALI LAHKO RAZVIJAMO ŠE DRUGA PODOBNA ZDRAVILA?

Konzorcij partnerjev v projektu SmartGene.si je pokazal, da v slovenskem prostoru lahko združimo ljudi in različne deležnike z različnih področij k doseganju novih ciljev in uvajanju novih tehnologij z lastnim znanjem. Vsi deležniki, partnerji so tvorno sodelovali, zato smo v treh letih dosegli vse zastavljene cilje v projektu. Industrijski partner Iskra PIO je razvil in pripravil

inovativen koncept modularnih čistih prostorov – SmartCon, ki omogočajo proizvodnjo v skladu s standardi dobre proizvodne prakse, ki so zahtevani za proizvodnjo zdravil (Slika 6). JAFRAL je proizvedel klinični material v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP) in pridobil certifikat GMP za proizvodnjo ATMP kliničnega materiala. Akademski partner Fakulteta za elektrotehniko je pripravila generator električnih pulzov, primernih za transfekcijo kože (Slika 6). SmartGene generator električnih pulzov (38) za transfekcijo celic kože generira električne pulze amplitude 560 V in dolžine 100 μ s. Pulze v 18 sekvencah po štiri pulze dovede med šestimi elektrodami. Elektrode so neinvazivne in za večkratno uporabo. Izdelane so iz medicinskega nerjavečega jekla in snemljive za lažjo sterilizacijo in enostavno zamenjavo.

Drugi partnerji pa so sodelovali pri pripravi, testiranju in začetku kliničnega preizkušanja faze I. Pridobili smo ogromno novega znanja in izkušenj, ki jih lahko s pridom izkoristimo za doseganje novih ciljev. Ustvarjena tako imenovana platforma je lahko začetek novih zdravljenj z naprednimi zdravili, kot so učinkovine na osnovi tehnologij DNA ali RNA na področju raka, pa morda tudi na področju preventive in zdravljenja drugih bolezni.

Slika 6: V okviru projekta Smartgene.si so bili razviti čisti prostori GMP za pripravo zdravil za napredno zdravljenje (A) in generator električnih pulzov za transfekcijo celic kože (B).

A



B



LITERATURA

1. Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, et al. High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy. *Radiology* 2020;295(2): 254–72.
2. Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavcic D. Membrane Electroporation and Electroporabilization: Mechanisms and Models. *Annu Rev Biophys* 2019;48:63–91.
3. Gill DR, Pringle IA, Hyde SC. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther* 2009;16(2): 165–71.
4. Husain SR, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Ther* 2015;22(12): 554–63.
5. Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, Pr at V. New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol Ther* 2011;19(11): 1942–9.
6. Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens* 2015;4(2): 157–81.
7. Solensky R. Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;24(3): 201–19.
8. Cranenburgh RM, Hanak JAJ, Williams SG, Sherratt DJ. Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res* 2001;29(5): 26.
9. Kamensek U, Tesic N, Sersa G, Cemazar M. Clinically usable interleukin 12 plasmid without an antibiotic resistance gene: Functionality and toxicity study in murine melanoma model. *Cancers (Basel)* 2018;10(3): 60.
10. Lampreht Tratar U, Kos S, Kamensek U, Ota M, Tozon N, Sersa G, et al. Antitumor effect of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding interleukin-12 in canine melanoma model. *Cancer Gene Ther* 2018;25(9–10): 260–73.
11. Savarin M, Kamensek U, Znidar K, Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of a Novel Plasmid for Simultaneous Gene Electrotransfer-Mediated Silencing of CD105 and CD146 in Combination with Irradiation. *Int J Mol Sci* 2021;22(6): 1–18.
12. Hornstein BD, Roman D, Ar valo-Soliz LM, Engevik MA, Zechiedrich L. Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. *PLoS One* 2016;11(12): e0167537.
13. Sum C, Wettig S, Slavcev R. Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy. *Curr Gene Ther* 2014;14(4): 309–29.
14. Tolmachov O. Designing plasmid vectors. *Methods Mol Biol* 2009;542: 117–29.
15. Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 1990;91(2): 217–23.
16. Monta o-Samaniego M, Bravo-Estupi an DM, M endez-Guerrero O, Alarc n-Hern andez E, Ib a ez-Hern andez M. Strategies for Targeting Gene Therapy in Cancer Cells With Tumor-Specific Promoters. *Front Oncol* 2020;10: 605380.
17. Kos S, Tesic N, Kamensek U, Blagus T, Cemazar M, Kranjc S, et al. Improved Specificity of Gene Electrotransfer to Skin Using pDNA Under the Control of Collagen Tissue-Specific Promoter. *J Membr Biol* 2015;248(5): 919–28.
18. Kamensek U, Tesic N, Sersa G, Kos S, Cemazar M. Tailor-made fibroblast-specific and antibiotic-free interleukin 12 plasmid for gene electrotransfer-mediated cancer immunotherapy. *Plasmid* 2017;89: 9–15.
19. Harada K, Ogden GR. An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol* 2000;36(1): 3–7.
20. Worthington J, McCarthy HO, Barrett E, Adams C, Robson T, Hirst DG. Use of the radiation-inducible WAF1 promoter to drive iNOS gene therapy as a novel anti-cancer treatment. *J Gene Med* 2004;6(6): 673–80.
21. McCarthy HO, Worthington J, Barrett E, Cosimo E, Boyd M, Mairs RJ, et al. p21(WAF1)-mediated transcriptional targeting of inducible nitric oxide synthase gene therapy sensitizes tumours to fractionated radiotherapy. *Gene Ther* 2007;14(3): 246–55.
22. Kamensek U, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Mol Cancer* 2013;12(1): 136.
23. Kamensek U, Sersa G. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiol Oncol*. 2008;42(3): 115–35.
24. Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, et al. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med* 1995;1(8): 786–91.
25. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2): 133–46.
26. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170(3): 827–45.
27. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YCE, Quinn PM, Wolitzky AG, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(17): 6808–12.
28. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 1991;88(10): 4143–7.
29. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Diczig M, Lowe L, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991;146(9): 3074–81.
30. Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, et al. Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 1992;148(11): 3433–40.
31. Sachdev S, Poto nik T, Rems L, Miklavcic D. Revisiting the role of pulsed electric fields in overcoming the barriers to in vivo gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry* 2022;144: 107994.
32. Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer Electrogenic Therapy with Interleukin-12. *Curr Gene Ther* 2010;10(4): 300–11.

33. Algazi AP, Twitty CG, Tsai KK, Le M, Pierce R, Browning E, et al. Phase II Trial of IL-12 Plasmid Transfection and PD-1 Blockade in Immunologically Quiescent Melanoma. *Clin Cancer Res* 2020;26(12): 2827–37.
34. Cemazar M, Ambrozic Avgustin J, Pavlin D, Sersa G, Poli A, Krhac Levacic A, et al. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2017;15(2): 641–54.
35. Kos S, Bosnjak M, Jesenko T, Markelc B, Kamensek U, Znidar K, et al. Non-Clinical In Vitro Evaluation of Antibiotic Resistance Gene-Free Plasmids Encoding Human or Murine IL-12 Intended for First-in-Human Clinical Study. *Pharmaceutics* 2021;13(10): 1739.
36. Serša G, Čemažar M, Markele B, Bošnjak M, Gašljević G, Tozon N, et al. Zaključno poročilo študije za neklinično testiranje zdravila za gensko zdravljenje phIL12. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2021.
37. Campana LG, Peric B, Mascherini M, Spina R, Kunte C, Kis E, et al. Combination of Pembrolizumab with Electrochemotherapy in Cutaneous Metastases from Melanoma: A Comparative Retrospective Study from the InspECT and Slovenian Cancer Registry. *Cancers (Basel)* 2021;13(17): 4289.
38. Pirc E, Reberšek M, Miklavčič D. Dosimetry in Electroporation-Based Technologies and Treatments. V: Markov M, urednik. *Dosimetry in Bioelectromagnetic*. Boca Raton: CRC Press, 2017: 233–68.

© Avtor(ji). To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0.

© The author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0. International License (CC-BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>