



ONKOLOŠKI INŠTITUT
INSTITUTE OF ONCOLOGY
LJUBLJANA

Gensko zdravljenje raka z uporabo elektroporacije

prof. dr. Maja Čemažar

mcemazar@onko-i.si

14.4.2022 Univerza v Novi Gorici, dvorec Lanthieri, Vipava

Zgodovina OI

1937

Z odlokom uprave Dravske banovine je bil ustanovljen Banovinski inštitut za raziskovanje in zdravljenje novotvorb. Sprejem prvih bolnikov v prenovljene prostore šempetrske kasarne (danes stavba A) je bil **1. avgusta 1938**. V prvem letu obstoja je imel inštitut 28 bolniških postelj, na zdravljenje pa je sprejel 718 bolnikov.

1946

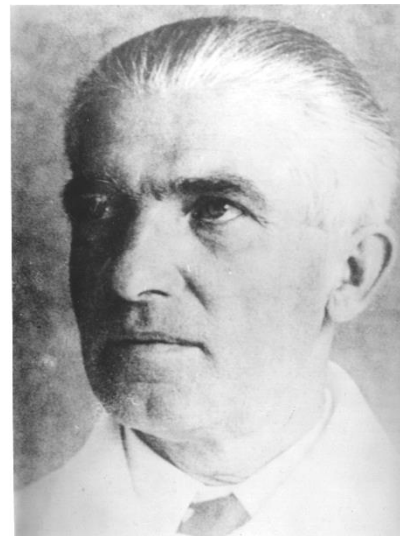
Preimenovanje v Onkološki inštitut.

1947

Ustanovitev Katedre za onkologijo in radioterapijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

1950

Izdana uredba o obveznem prijavljanju rakavih obolenj v Sloveniji in ustanovljen Register raka za Slovenijo.



Doc.dr. Cholewa



Onkološki inštitut Ljubljana – stavba B

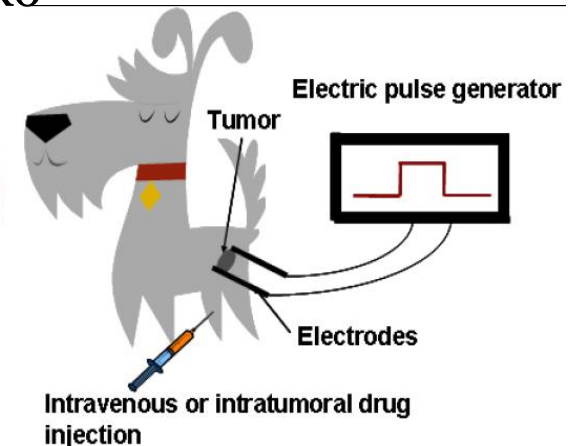
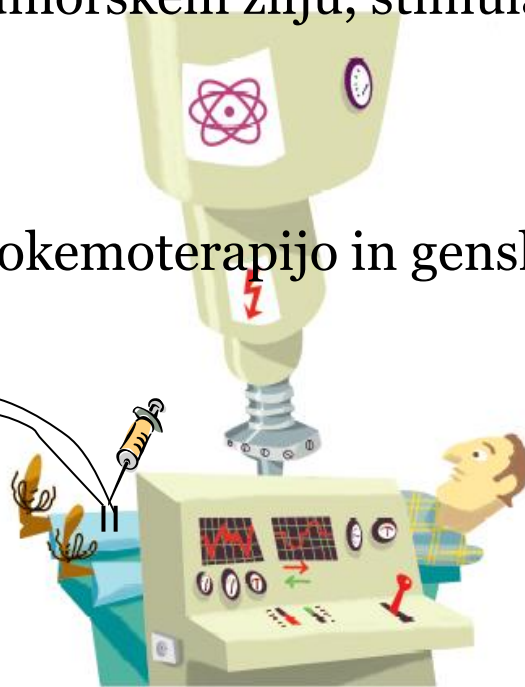


- **Oddelek za eksperimentalno onkologijo**, v stavbi B, v kleti klet; površina 340 m², od tega sterilni laboratorijski del 180 m²
- Registrirani kot uporabniška organizacija za delo s poskusnimi živalmi. Živalski laboratorij obsega 90m²
- Registrirani za delo z gensko spremenjenimi organizmi (bakterije, celice, živali), varnostni razred 2.
- Registrirani za delo z zaprtimi viri ionizirajočega sevanja (terapevtski rentgenski aparat za obsevanje celic, tkiv in živali)



Glavna raziskovalna področja

- Specifična tarčna zdravljenja čvrstih tumorjev
- Dostavni sistemi:
 - Elektroporacija
 - drugi dostavni sistemi (eritrociti, bakteriofagi)
- Terapevtski pristopi
 - Genska terapija: usmerjena proti tumorskem žilju, stimulacija imunskega odziva
 - Elektrokemoterapija
 - Radioterapija v kombinaciji z elektrokemoterapijo in gensko terapijo

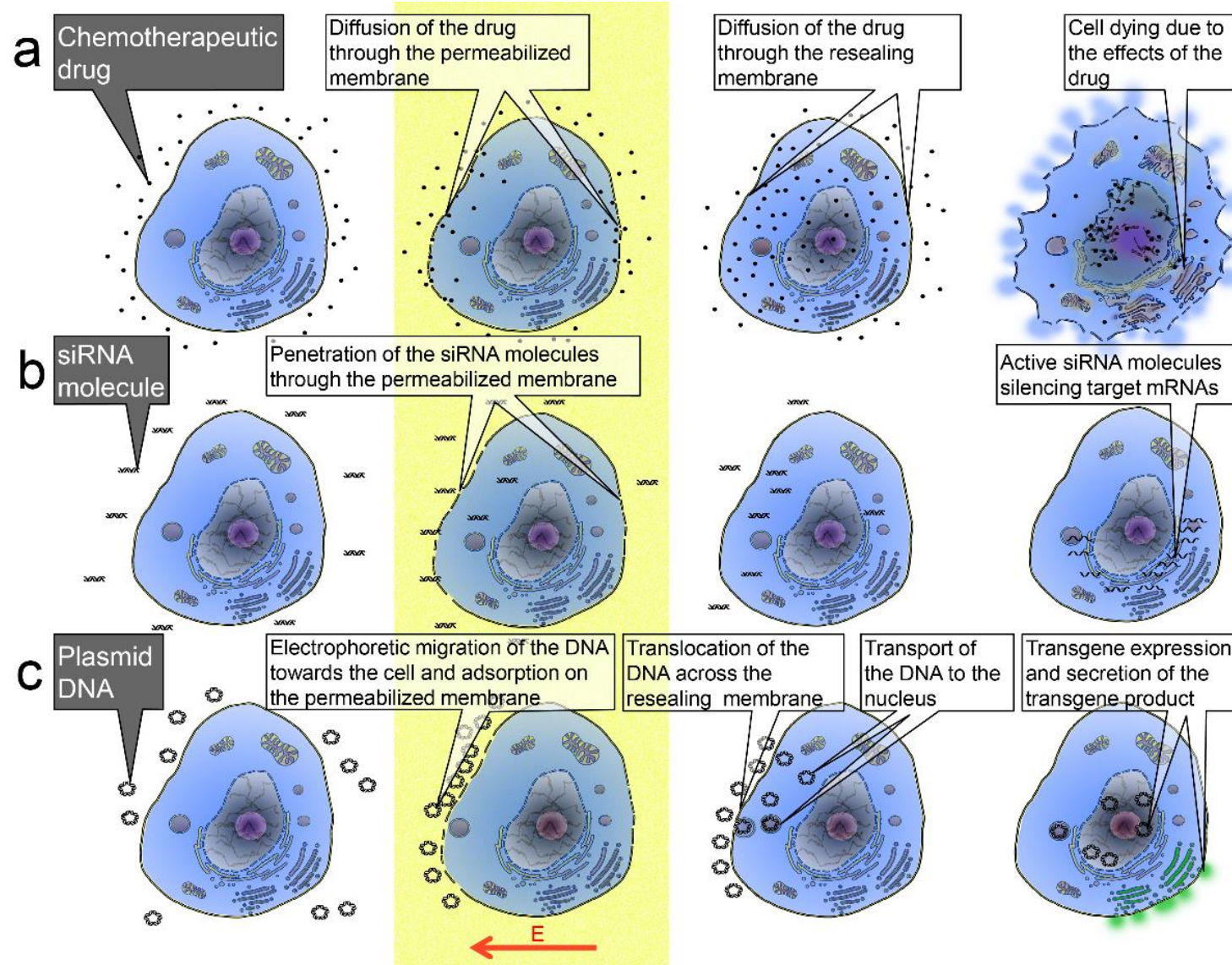


Vsebina

- Kaj je elektroporacija in kje se uporablja v medicini
- Nekaj na splošno o genski terapiji in
o genski terapiji pri zdravljenju raka
- Genski elektroprenos
- Projekt SmartGene.si
- Klinična študija faze I genske terapije z interleukinom 12
pri bolnikih z bazalno celičnim karcinomom



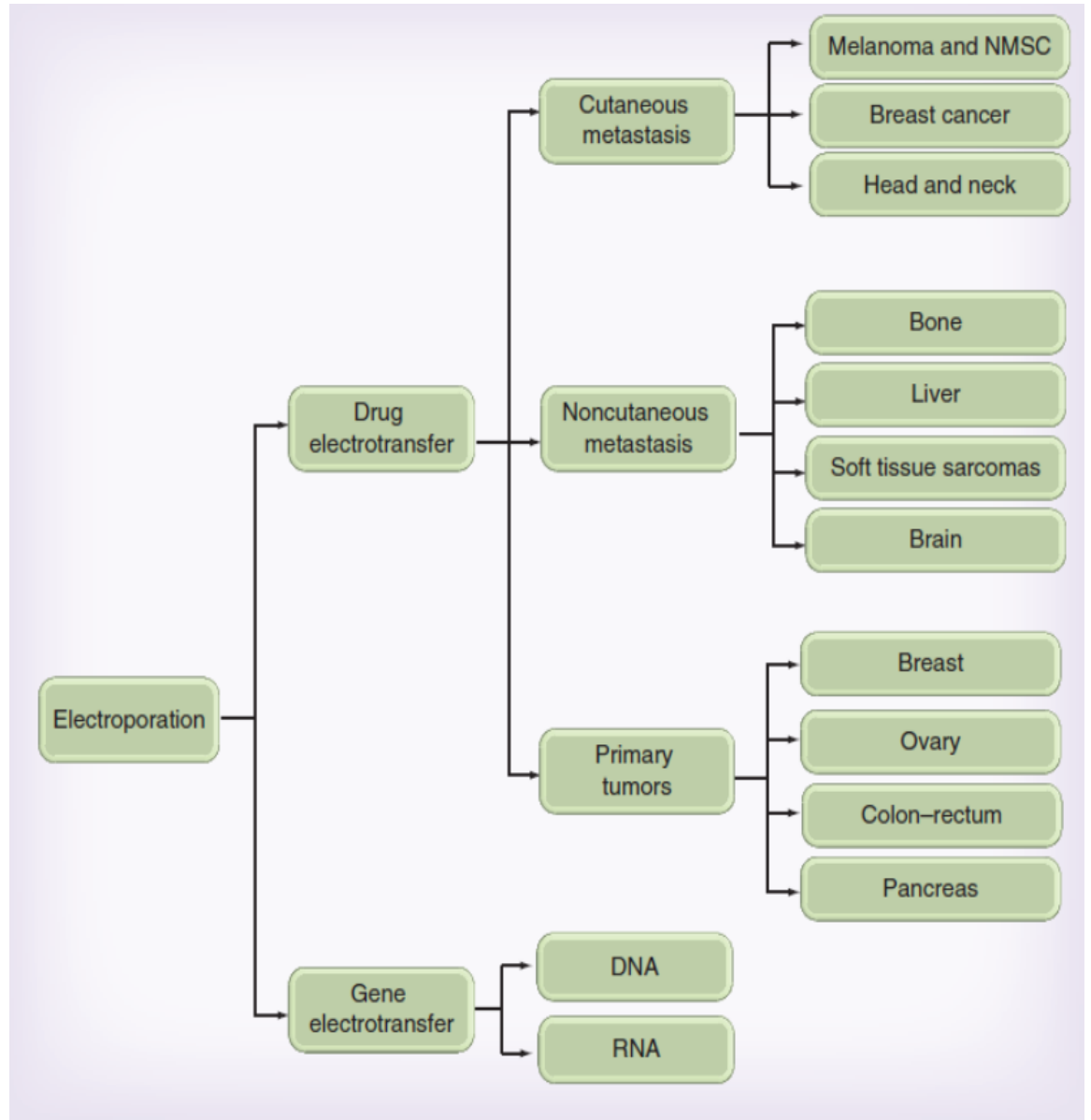
Reverzibilna elektroporacija za vnos zdravil in nukleinskih kislin



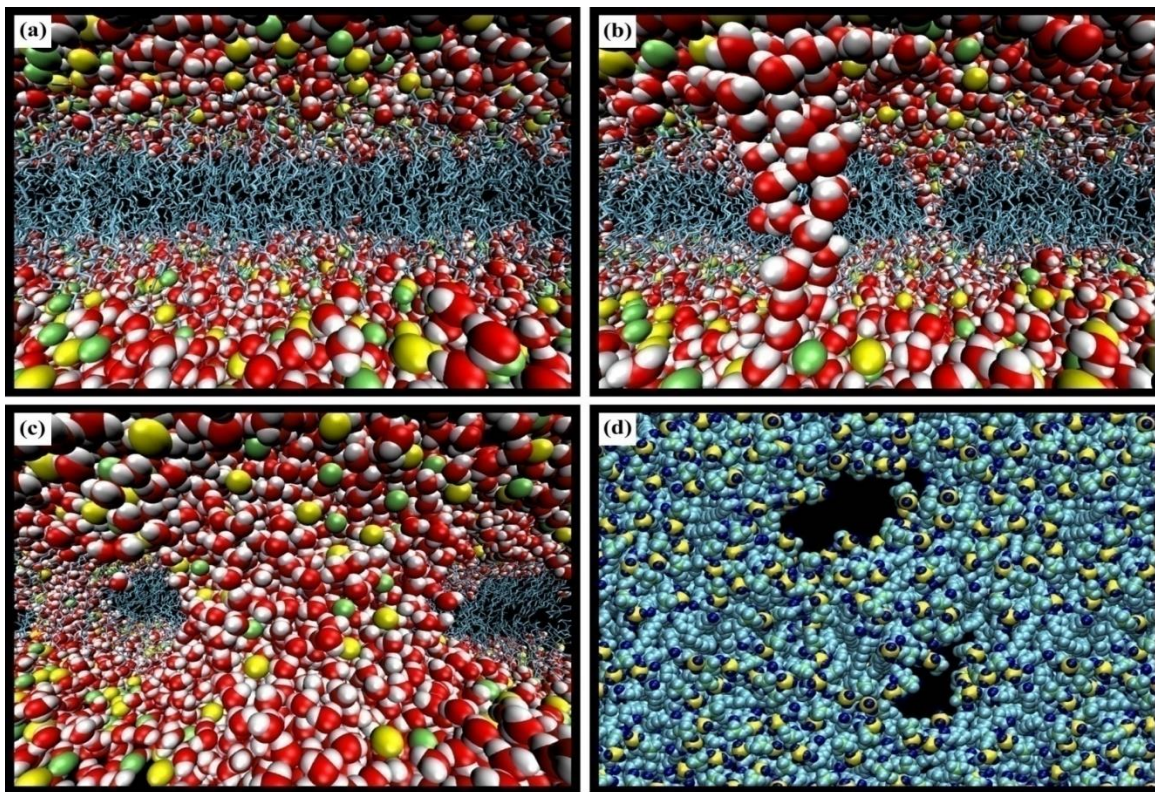
Uporaba elektroporacije v medicini

Elektrokemoterapija: uporaba elektroporacije za povečanje učinka kemoterapevtikov

Genski elektroprenos: uporaba elektroporacije za vnos terapevtskih nukleinskih kislin v celice



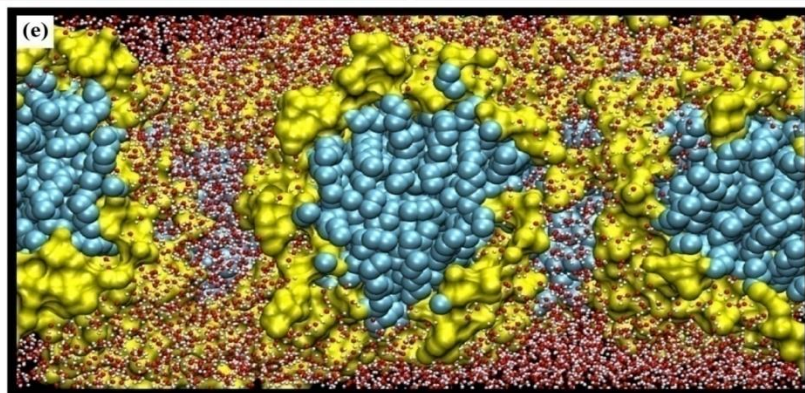
Atomistična simulacija nastanka por v membrani



(a) Membrana v mirovanju

(b) Zgodnji časi po elektroporaciji

(c) in (d) pore



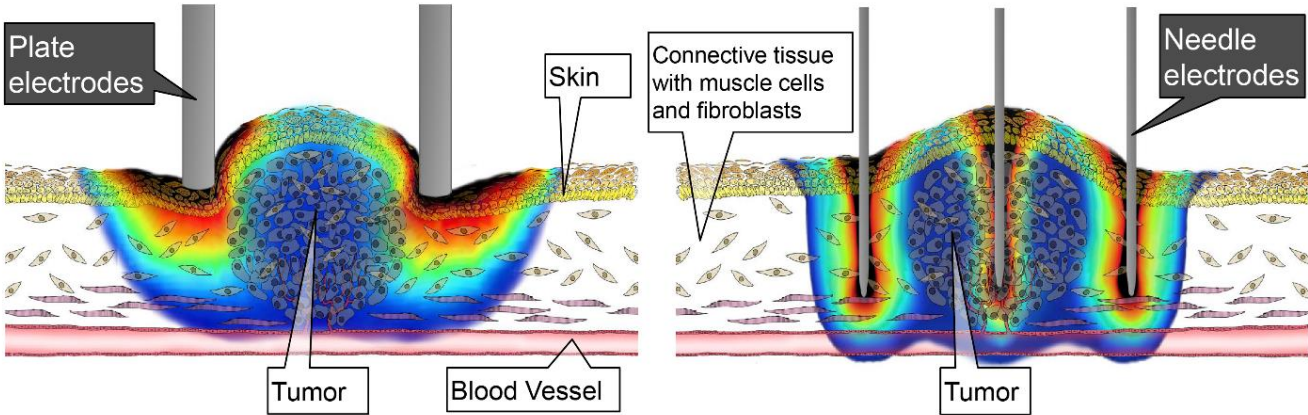
Velikost pore = $f(\text{dolžina pulza, moč polja})$

Pore se stabilizirajo zaradi prisotnosti hidrofilnih glav fosfolipidov v membrani

Slika: Mounir Tarek



Elektroporacija: elektrode in razporeditev električnega polja

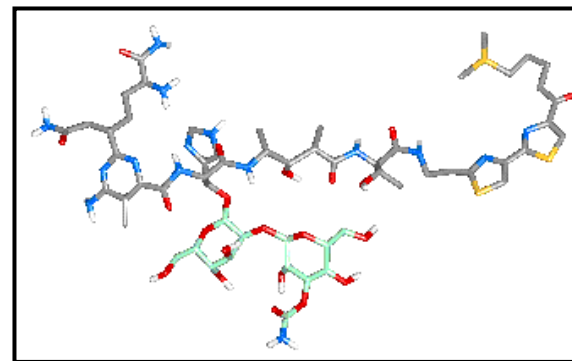


$E < E_{rev}$	$E_{rev} \leq E \leq E_{irrev}$	$E > E_{irrev}$
Area not effected by electroporation	Area of reversible electroporation – cell permeabilization	Area of irreversible electroporation – cells damaged by irreversible electroporation, thermal effect and pH change

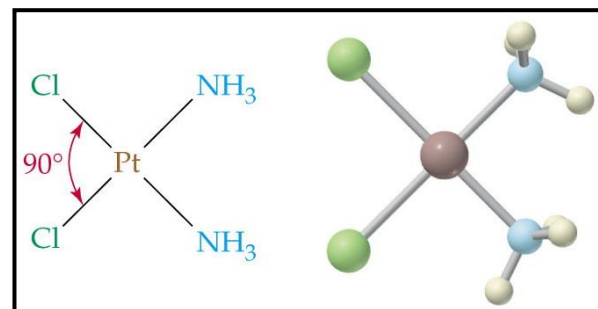


Elektrokemoterapija: povečanje citotoksičnosti določenih kemoterapevtikov

- Učinkovita za zdravila, ki so hidrofilna in imajo omejen transport preko plazmaleme
- Trenutno se uporabljata:
 - Bleomicin (BLM)
 - Cisplatin (CDDP)



BLM



CDDP

Elektrokemoterapija - postopek

b1 Clinical photograph showing a patient's skin with a ruler and a small incision.

b2 Clinical photograph showing a healthcare professional injecting a drug into the patient's skin.

b3 Clinical photograph showing the injection site after the drug is administered.

b4 Clinical photograph showing the application of an electrode to the skin for electrochemotherapy.

b5 Clinical photograph showing the skin after the procedure, with a visible lesion.

a Schematic diagram illustrating the mechanism of action of electrochemotherapy. The diagram shows a cell membrane being disrupted by electric pulses (EP), allowing drug molecules (blue dots) to enter the cell. After the membrane reseals, the drug is entrapped inside the cell, leading to cell death.

after injection drug surrounds the cells

formation of pores after EP — drug enters the cells

membrane resealing — drug entrapped inside the cells

drug kills the cells

time

electric pulses



Malignni melanom –
kožne metastaze
ECT s CDDP i.t.,
ploščate elektrode,
enkratna aplikacija



Popolni odgovor že 17 let



Limb sparing treatment of bleeding melanoma recurrence by electrochemotherapy

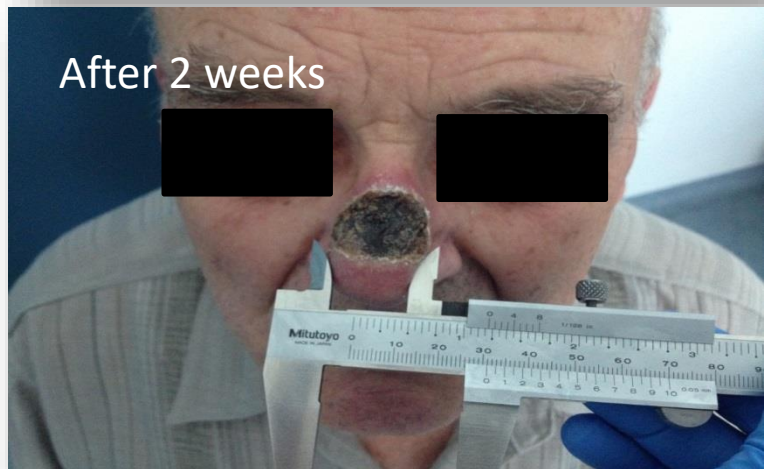
Marko Snoj, Maja Cemazar, Tinkara Srnovrsnik, Snezna Paulin Kosir, and Gregor Sersa

Elektrokemoterapija
za zdravljenje
krvavečih tumorjev



Bazalno celični karcinom

ECT-BLM i.v.; plate electrodes, single application



Kožne metastaze melanoma

ECT with BLM i.v., hexagonal electrodes, single application



Sersa G et al. EJC Suppl 2006



Intraoperative Electrochemotherapy of Colorectal Liver Metastases

IBRAHIM EDHEMOVIC, MD, MSc,¹ ERIK BRECELJ, MD, PhD,¹ GORANA GASLJEVIC, MD,¹
MAJA MAROLT MUSIC, MD, PhD,¹ VOJKA GORJUP, MD, PhD,² BARBARA MALI, PhD,³ TOMAZ JARM, PhD,³
BOR KOS, PhD,³ DENIS PAVLIHA, PhD,³ BILJANA GRGAR KUZMANOV, MD, PhD,¹ MAJA CEMAZAR, PhD,¹
MARKO SNOJ, MD, PhD,¹ DAMIJAN MIKLAVCIC, PhD,³ ELДАР M. GADZIJEV, MD, PhD,^{1**}
AND GREGOR SERSA, PhD^{1*}

¹Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

²University Medical Center Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

European Journal of Surgical Oncology 44 (2018) 651–657



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

European Journal of Surgical Oncology

journal homepage: www.ejso.com

Consensus Statement

Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study

Mihajlo Djokic^a, Maja Cemazar^{b, c}, Peter Popovic^d, Bor Kos^e, Rok Dezman^d,
Masa Bosnjak^b, Martina Niksic Zakelj^b, Damijan Miklavcic^e, Stojan Potrc^f,
Borut Stabuc^g, Ales Tomazic^a, Gregor Sersa^{b, h, *}, Blaz Trotovsek^{a, **}

^a University Medical Centre Ljubljana, Department of Abdominal Surgery, Zaloska 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^b Institute of Oncology Ljubljana, Department of Experimental Oncology, Zaloska 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^c University of Primorska, Faculty of Health Sciences, Polje 42, SI-6310 Izola, Slovenia

^d University Medical Centre Ljubljana, Institute of Radiology, Zaloska 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^e University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Trzaska 25, Ljubljana SI-1000, Slovenia

^f University Clinical Centre Maribor, Department of Abdominal Surgery, Ljubljanska ulica 5, SI-2000 Maribor, Slovenia

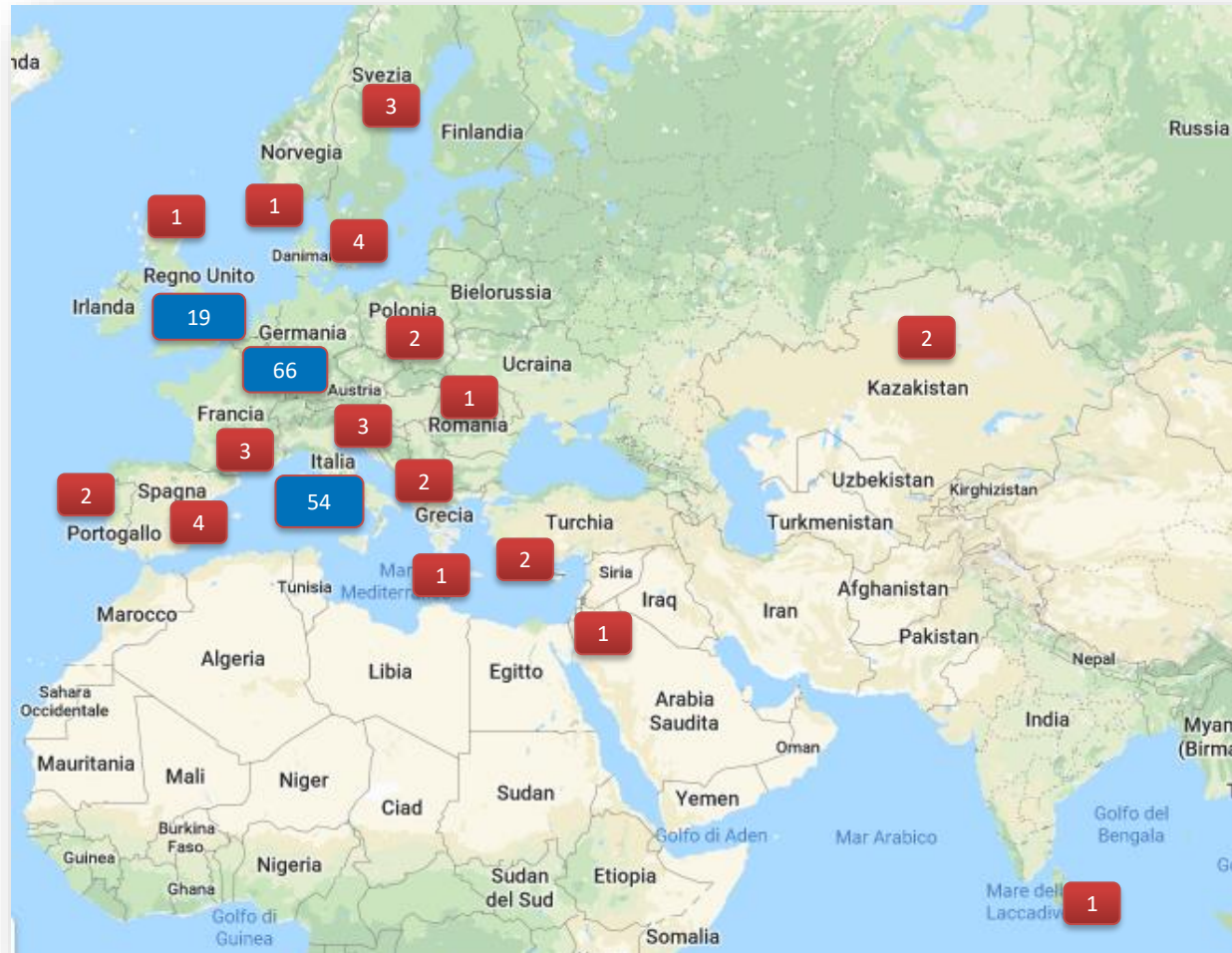
^g University Medical Centre Ljubljana, Department of Gastroenterology, Zaloska 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^h University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences, Zdravstvena pot 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenia



Centri, kjer se uporablja elektrokemoterapija

Up to date 03-2022



- **182 ECT centres**

- ECT omenjena v nacionalnih smernicah

- metastatski melanom

- rak dojke

- primarni bazalno celični

- karcinom (BCC)

- recidivni ali metastatski

- BCC & ploščatocelični

- karcinom

- kožni angiosarkom



Elektrokemoterapija v veterinarski medicini

uporablja se za zdravljenje tumorjev pri psih, mačkah,
konjih in eksotičnih živalih



Electrochemotherapy: Potentiation of Local Antitumour Effectiveness of Cisplatin in Dogs and Cats

NATASA TOZON¹, GREGOR SERSA² and MAJA CEMAZAR²

Electrochemotherapy Compared to Surgery for treatment of Canine Mast Cell Tumours

VERONIKA KODRE¹, MAJA CEMAZAR², JANI PECAR³, GREGOR SERSA²,

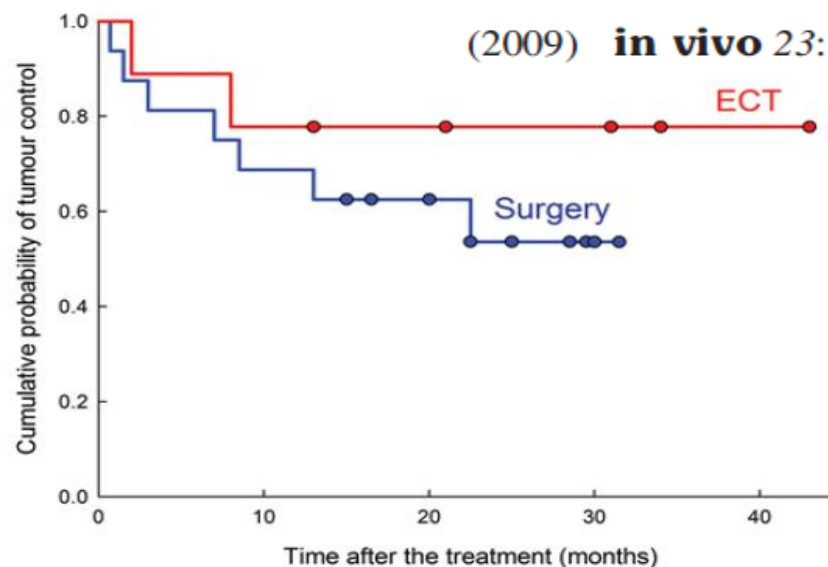


Figure 2. Kaplan Meier survival curves for tumour regression for patients treated with surgery and ECT with cisplatin. Circles represent censored data. At the end of the study 7 dogs were still in CR of ECT treated group and 8 dogs treated by surgery.



Figure 3. Patient No. 18 with tumour nodule in the hind leg before and 4 and 8 weeks after ECT treatment. After treatment in some cases superficial scab is formed, that fell off within 8 week. The tumour completely regressed and the dog is free of disease for more than 3.5 years.

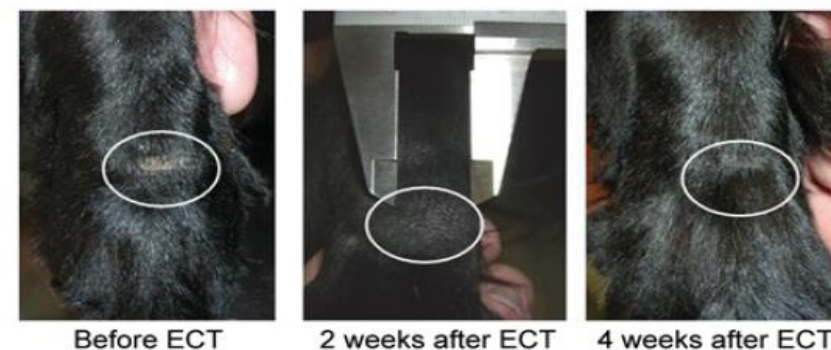
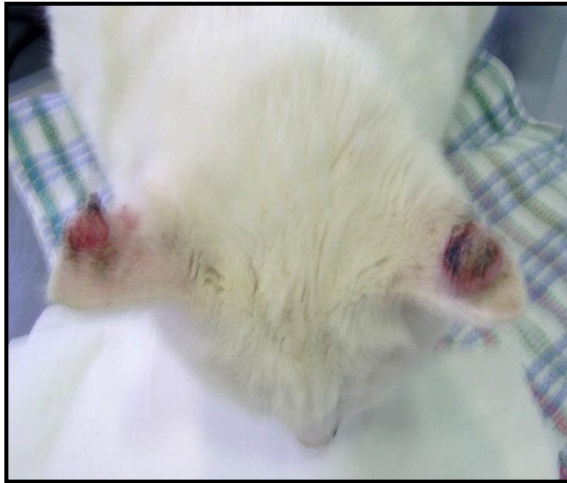


Table II. Tumour volumes, histology and response to treatment in dogs



Elektrokemoterapija v veterini – ploščato celični karcinom pri mački



Original Article



jms
Journal of Feline Medicine and Surgery

Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats

Journal of Feline Medicine and Surgery
2014, Vol. 16(4) 291–299
© ISFM and AAEP 2013
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1098612X13507071
jms.com
SAGE

Natasa Tozon¹, Darja Pavlin¹, Gregor Sersa², Tanja Dolinsek²
and Maja Cemazar²



Pred terapijo

3 mesece po terapiji



Elektrokemoterapija s cisplatinom na sarkoidih pri konjih

pred



po 6 mesecih



pred



po 8 tednih



Tamzali Y, et al, *Equine Vet J.* 2012
Tozon N et al, *Veterinary Records*, 2016



University of Ljubljana
Veterinary Faculty



Gekon – ploščato celični karcinom (SCC)



- 15 let stara gekonka Lizika
- Ploščatocelični karcinom
- Glede na lokacijo – kirurgija zelo zahtevna
- CR po ECT 0.5 mg i/t cisplatina
- Neželeni učinki → anoreksija, izguba krempljev



Lokacija tumorja



Dan 4 lokalna nekroza



12 mesecev – popolni odgovor



Gensko zdravljenje



Genetske bolezni - bolezni, ki so posledica poškodb v posameznikovi DNA molekuli

- Mutacija v posameznem genu: cistična fibroza, hemofilija A, anemija srpastih celic
- Aneuploidije: Downov sindrom, Turnerjev sindrom...
- Bolezni, ki nastanejo kot posledica večih mutacij: Alzheimerjeva bolezen, rak



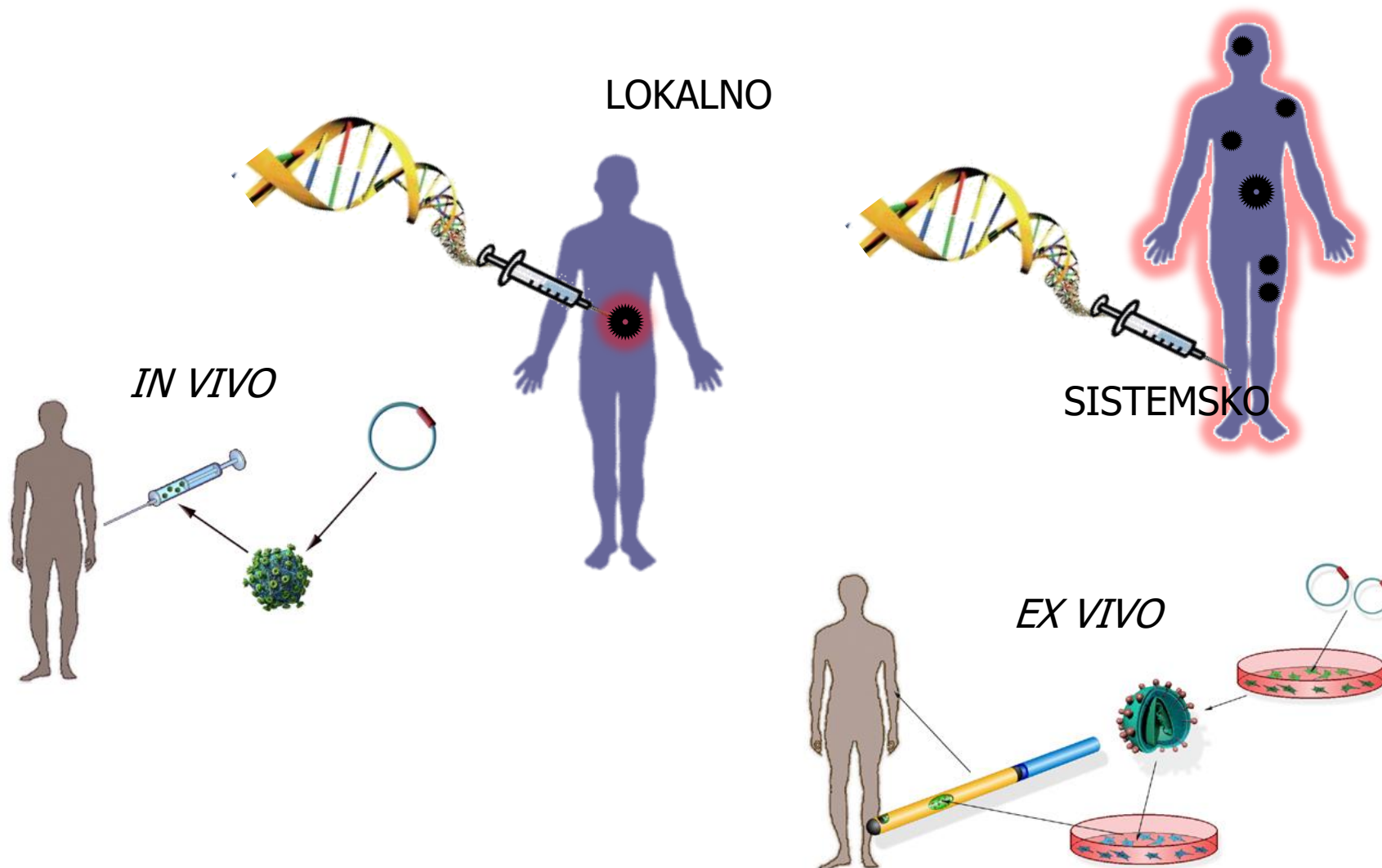
Zakaj genska terapija?

- Ker zdravimo izvor bolezni, ne simptome
- Ker zdravimo bolezni z minimizirano toksičnostjo, ker pride samo do izražanja terapevtskega proteina preko celične „mašinerije“
- Ker ima potencial, da preprečimo/eliminiramo dedne bolezni (npr. cistična fibroza)
- Ker ima potencial, da ozdravimo srčne bolezni ali pa raka



Kako jo izvajamo?

Vnos genskega materiala v celice s terapevtskim namenom



Vrste genskega zdravljenja

- Zdravljenje somatskih celic: genski material se 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.
- Zdravljenje spolnih in zarodnih celic: vnešeni **genski material se prenese na naslednje generacije** in s tem postane deden. V večini držav je gensko zdravljenje zarodnih celice prepovedano, ker bi s tem spreminjali človeške lastnosti.



Definicija genskega zdravljenja (EMA):

- medicinski produkt za gensko zdravljenje je »medicinski produkt za napredno zdravljenje«, ki mora izpolnjevati naslednji lastnosti:
 - Vsebuje gene, ki vodijo to terapevtskega, profilaktičnega ali diagnostičnega učinka.
 - Delujejo tako, da se v telo vnesejo „rekombinantni“ geni, ponavadi za zdravljenje, genetskih bolezni, raka ali kronične bolezni.
- CELIČNO zdravljenje: tako zdravljenje vključuje celice ali tkiva, katerim so bile spremenjene biološke lastnosti ali celice oz. tkiva, ki niso namenjena uporabi za iste osnovne funkcije v telesu. Uporabljajo se za zdravljenje, diagnozo ali preventivo bolezni.
- Zdravljenje s TKIVNIM-INŽENIRSTVOM: celice ali tkiva, ki so bila spremenjena tako, da se lahko uporabljajo za popravilo, obnovitev ali zamenjavo človeškega tkiva





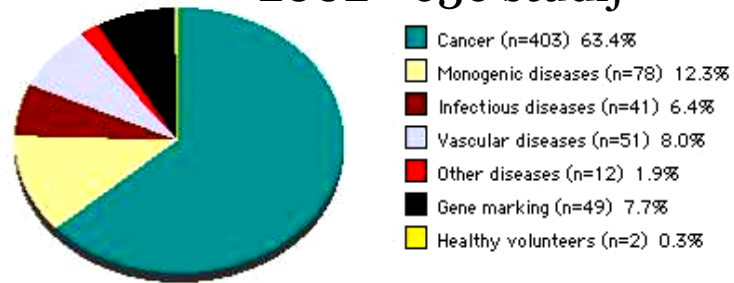
Začetki: 1.gensko zdravljenje

- 14.9.1990 je bila Ashanti DeSilva zdravljena za SCID – sindrom hude kombinirane imunske pomanjkljivosti
- Pomanjkanje adenozin deaminaze (zdravljenje z tedenskimi injekcijami)
- Postopek genskega zdravljenja:
 - Odvzem limfocitov, vstavitev manjkajočega gena, injiciranje nazaj v bolnico
- Njen imunski sistem se je okrepil –
žal pa je bil efekt prehodnega značaja

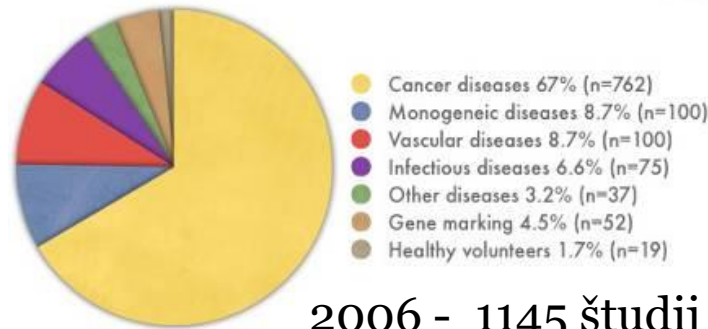


Rast števila kliničnih študij

2002 - 636 študij



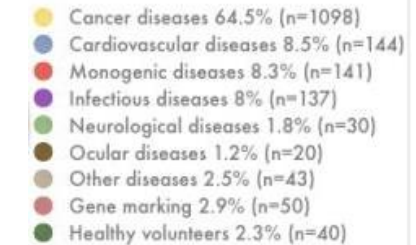
The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002
www.wiley.co.uk/genmed



2006 - 1145 študij

The Journal of Gene Medicine, © 2006 John Wiley and Sons Ltd
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

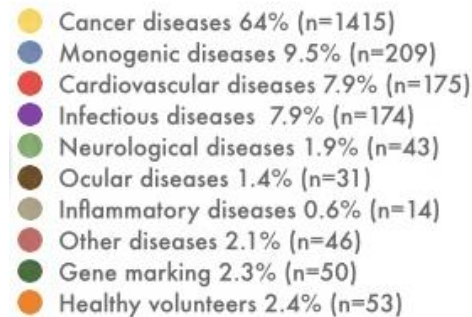
Therapy Clinical Trials



2011 - 1703 študij

and Sons Ltd
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

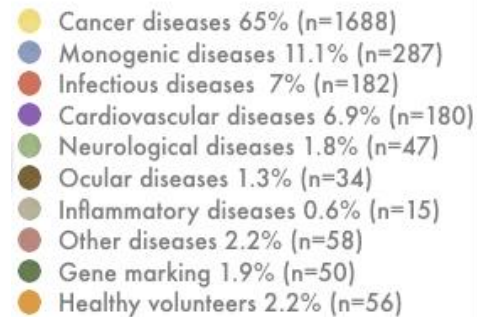
Therapy Clinical Trials



2015 - 2210 študij

and Sons Ltd
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

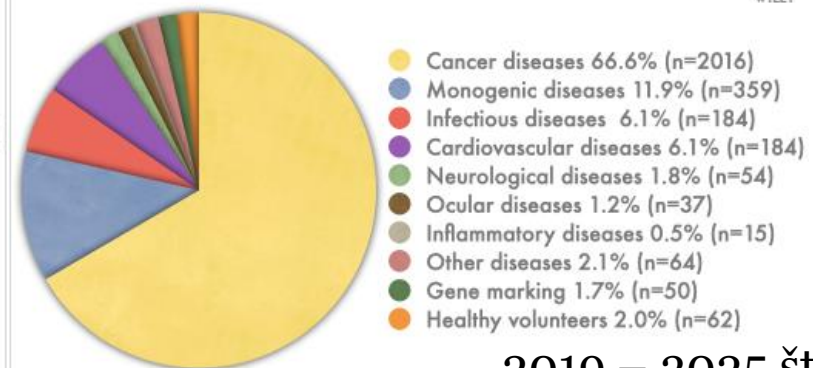
Therapy Clinical Trials



2017 - 2597 študij

and Sons Ltd
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



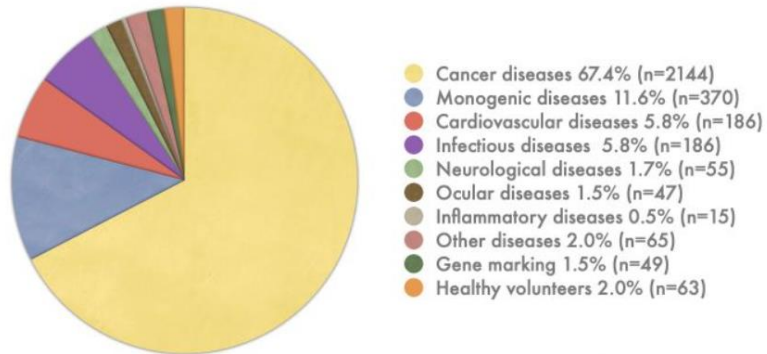
2019 - 3025 študij

The Journal of Gene Medicine, © 2019 John Wiley and Sons Ltd



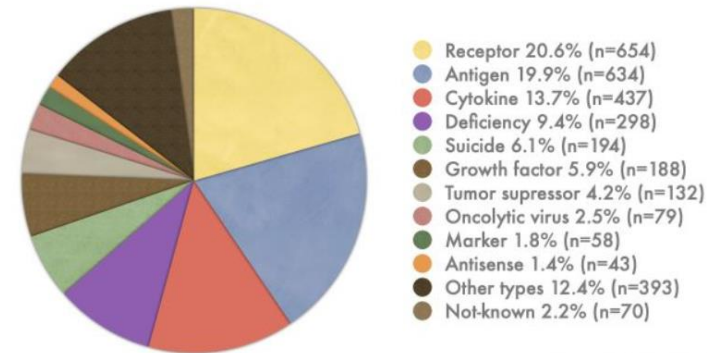
Genska terapija 2021 – 3180 študij

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



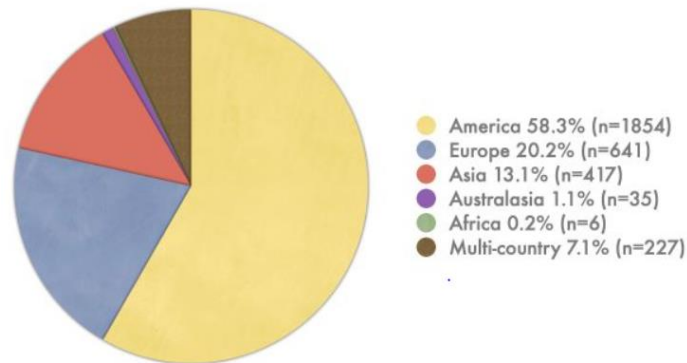
Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials



Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials
By Continent



Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials
By Country



Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD



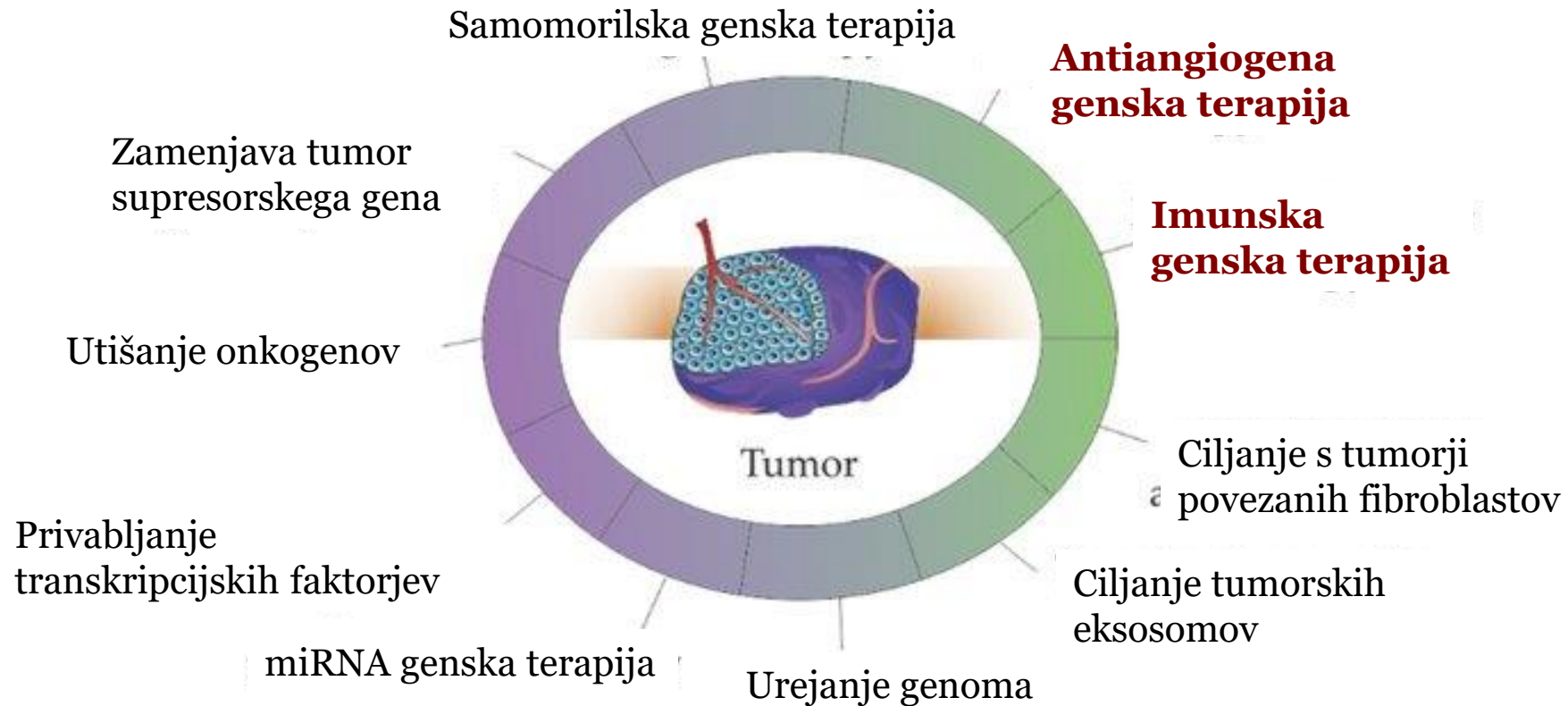
Odobrena genska zdravljenja

- 2003: Odobrena (na Kitajskem) prva genska terapija za izražanje p53 v ploščato celičnih tumorjih v področju glave in vratu (Gendicine, adenovirus, i.t.)
- 2005: Oncorine™, ki je adenovirusni vektor, ki je podvaja samo v celicah, ki nimajo divjega tipa proteina p53. Uporablja se v kombinaciji s kemoterapijo za zdravljenje tumorjev nosne votline.
- 2011: Odobrena (v Rusiji) prva ne-virusna genska terapija za zdravljenje periferne ishemije (Neovasculgen, gola plazmidna DNA, i.m.)
- 2012: Glybera, ki je adenovirusni vektor, ki nosi zapis za lipoproteinsko lipazo, ki se izraža v mišičnem tkivu in se uporablja za zdravljenje hude pomanjkljivosti lipoproteinske lipaze. Prva odobritev EMA-e.
- T-vec: onkolitični virus je bil v ZDA odobren leta 2015 za zdravljenje neoperabilnega melanoma
- 2016: Odobrena (EMA) prva *ex vivo* genska terapija za zdravljenje ADA-SCID (Strimvelis, *ex vivo*, avtologne HSC (hematopoetske matične celice), γ -retrovirus)
- 2017: Odobrena (FDA) prva *in vivo* genska terapija za zdravljenje slepote (Luxturna, AAV2, subretinal)
- 2017: Odobreni (FDA) prvi dve terapiji z gensko spremenjenimi T celicami (CAR-T, chimeric antigen receptor T cell) za zdravljenje levkemije (Kymriah in Yescarta, avtologne T celice, γ -retrovirus)
- 2019: Odobrena (FDA) genska terapija za zdravljenje spinalne mišične atrofije (Zolgensma, AAV, i.v. - motorični nevroni)



Kris Zudich.
[Uredništvo/wikipedia.org,](https://www.wikipedia.org/)
[zolgensma.com](https://www.zolgensma.com)-Foto: [pixabay.com](https://www.pixabay.com)

Genska terapija raka -strategije



Genski elektroprenos

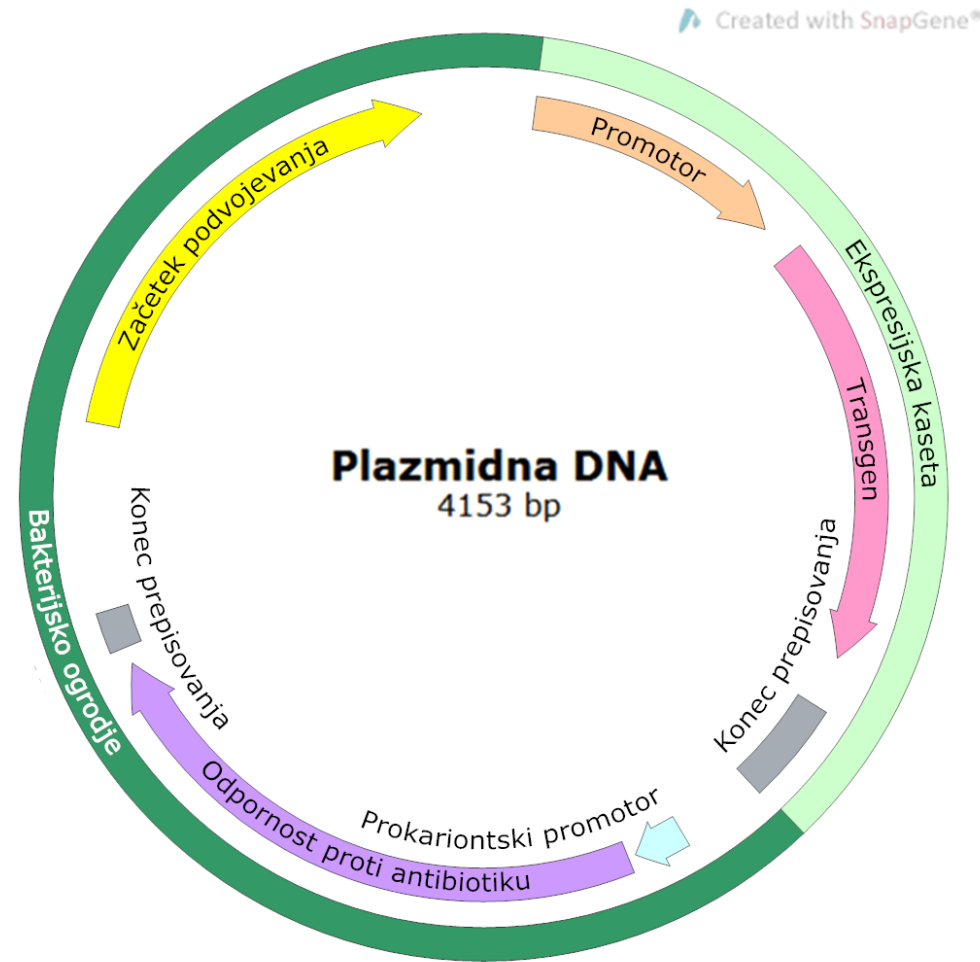
- **Optimizacija vnosa v različna tkiva** (primerjava z drugimi načini vnosa, različni parametri električnih pulzov, časovna odvisnost, dozna odvisnost, histološke lastnosti...)
- **Testiranje terapevtskega učinka** (*p53, K-ras, IL-12, MCAM, Endoglin...*)



Sestava plazmidnih vektorjev

Bakterijsko ogrodje

- Začetek podvojevanja (ORI)
- Seleksijski marker (gen za odpornost proti antibiotiku) prokariontski promotor, poliadenilacijski signal
- Mesto za kloniranje (MCS)



Ekspresijska kasetna

- Promotor
- Transgen
- Poliadenilacijski signal



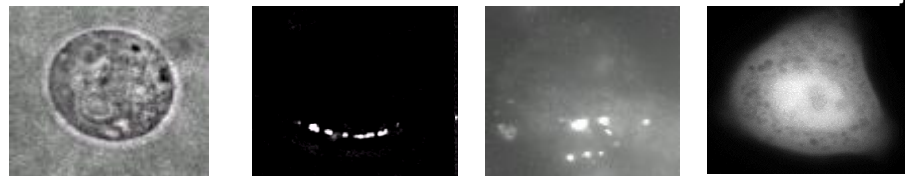
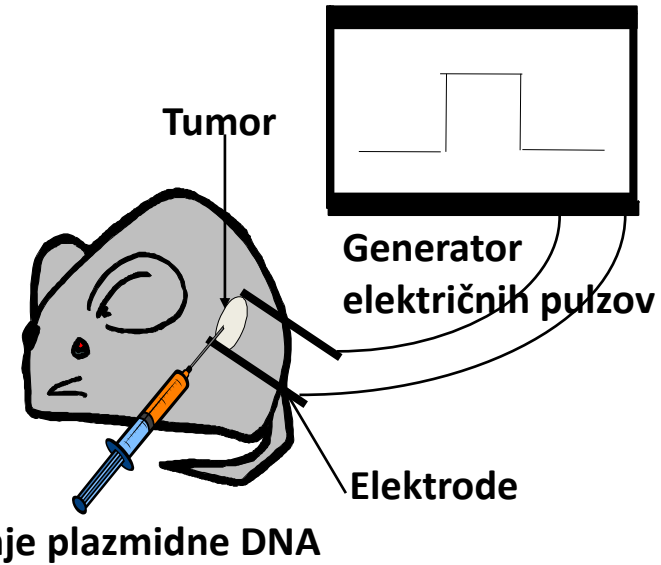
Princip uporabe elektroporacije za gensko terapijo – genski elektroprenos



Injiciranje DNA



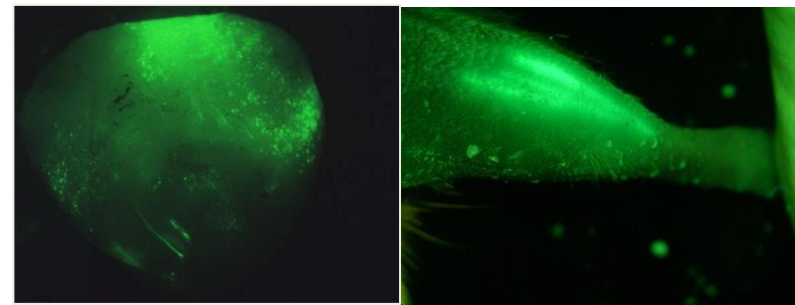
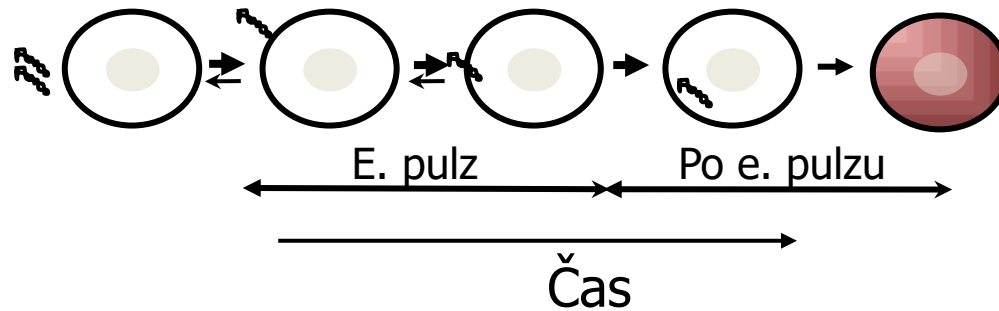
Generator Električnih pulzov



Izražanje poročevalskega proteina

Permeabilizacija in elektroforeza

Insercija Translokacija Izražanje



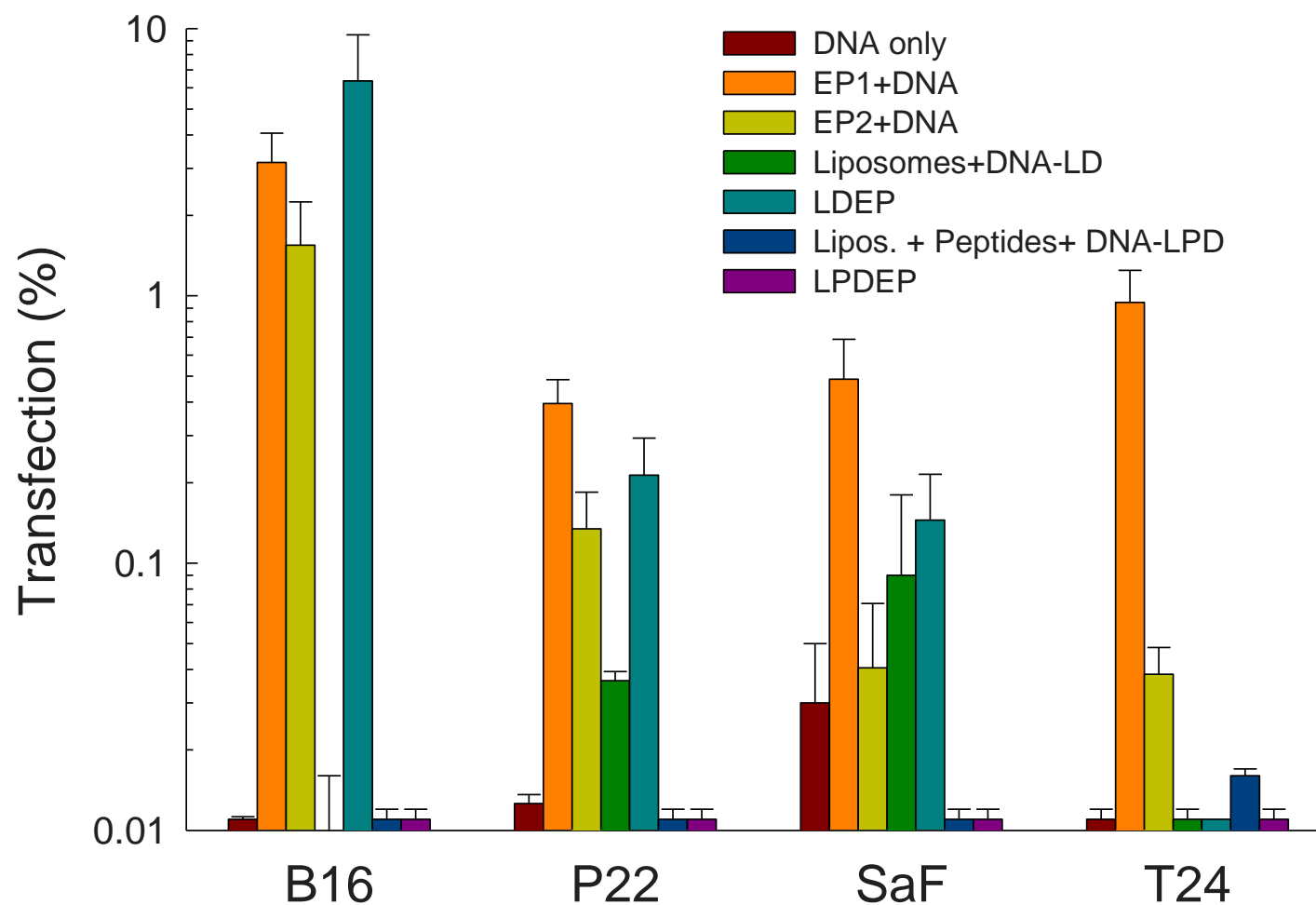
tumor

mišica



Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector

Maja Cemazar,^{1,2} Gregor Sersa,² John Wilson,¹ Gillian M Tozer,¹ Stephen L Hart,³ Alenka Grosel,² and Gabi U Dachs¹



Research article

Open Access

Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy – spatial and time dependent distribution

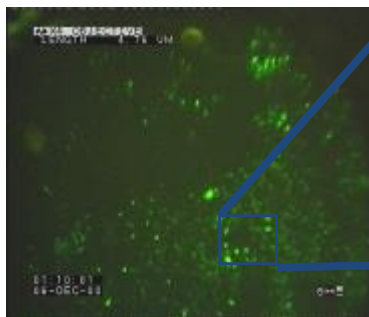
Maja Cemazar*¹, Ian Wilson², Gabi U Dachs^{2,3}, Gillian M Tozer^{2,4} and Gregor Sersa¹



Pre x 4



Pre EP epi x 4



2 days epi x 4



2 days epi x 20

Rat No. 7



Elektroporacija (600 V/cm, 5 ms, 1 Hz, 8 pulses) tumorjev poveča izražanje GFP (40 µg pEGFP-N1)

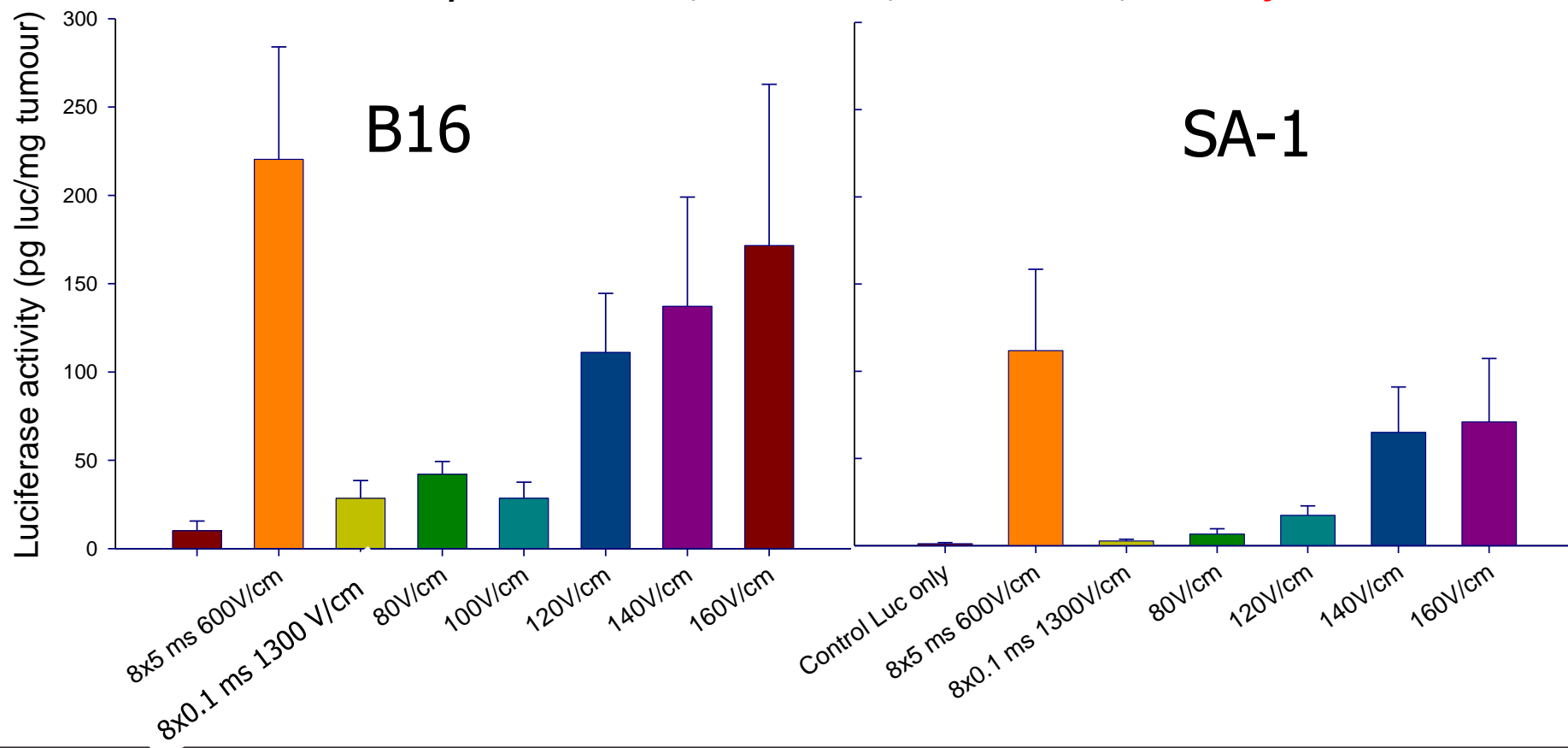
ORIGINAL ARTICLE

Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice

M Cemazar^{1,5}, M Golzio^{2,3,5}, G Sersa¹, P Hojman^{2,4}, S Kranjc¹, S Mesojednik¹, M-P Rols^{2,3} and J Teissie^{2,3}

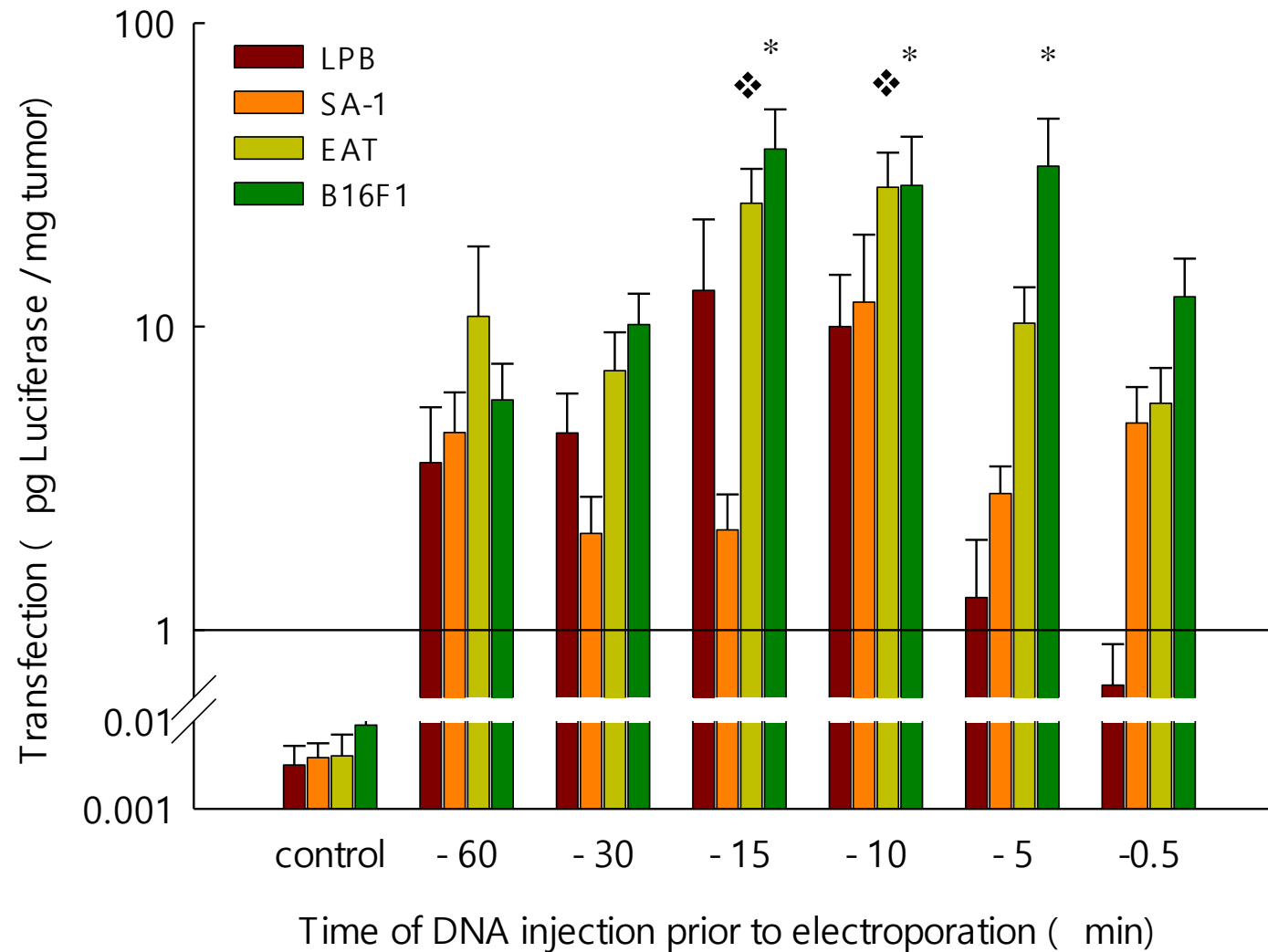
Luciferazna aktivnost v odvisnosti of amplitude LV pulza

1HV+8LV; HV: 1x0.1 ms, 1200 V/cm; LV: 8x 50 ms, naraščajoča V

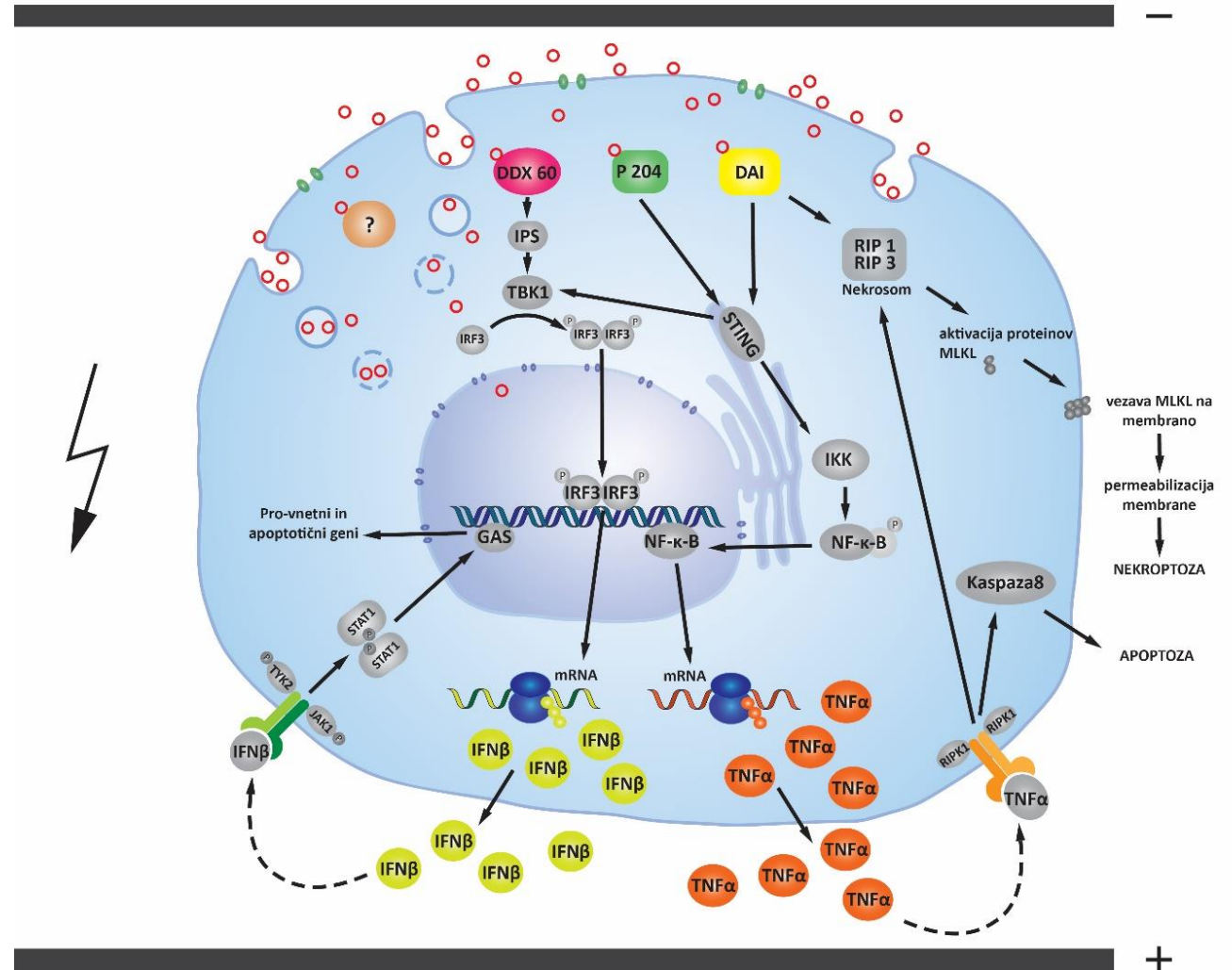
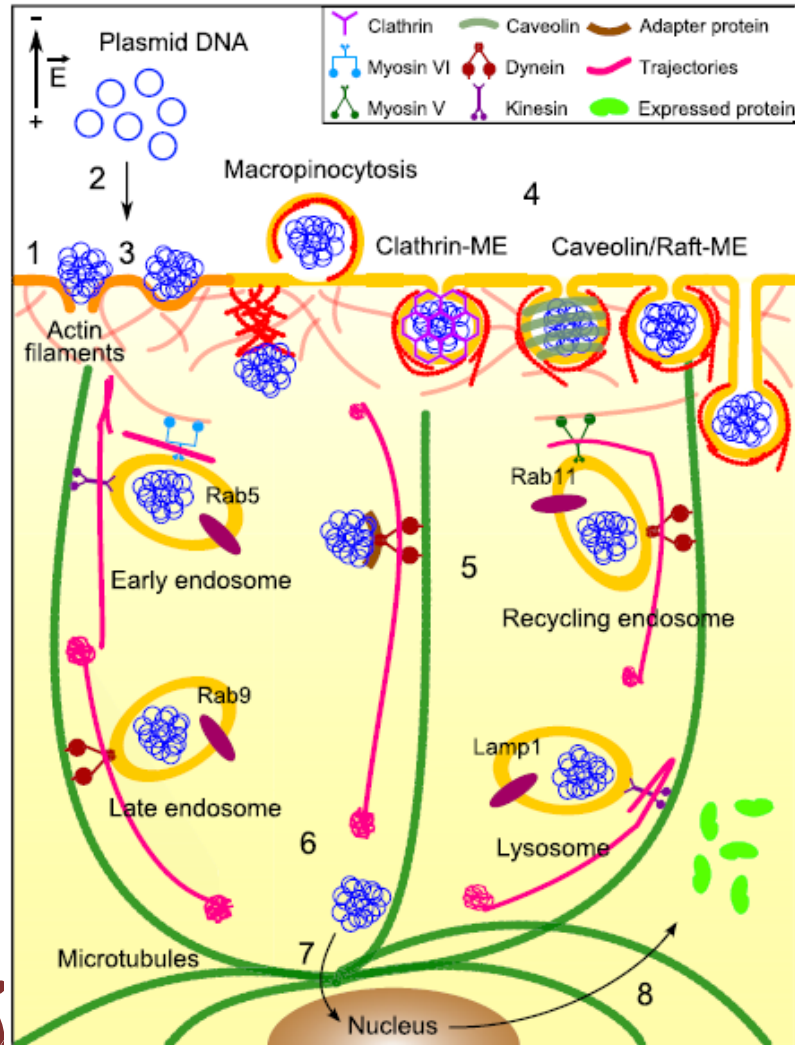


Sequence and Time Dependence of Transfection Efficiency of Electrically-Assisted Gene Delivery to Tumors in Mice

Maja Cemazar^{1,*}, Darja Pavlin², Simona Kranjc¹, Alenka Grosel¹, Suzana Mesojednik¹ and Gregor Sersa¹



Vstop DNA molekule v celice in njena usoda znotraj: aktivacija DNA senzorjev

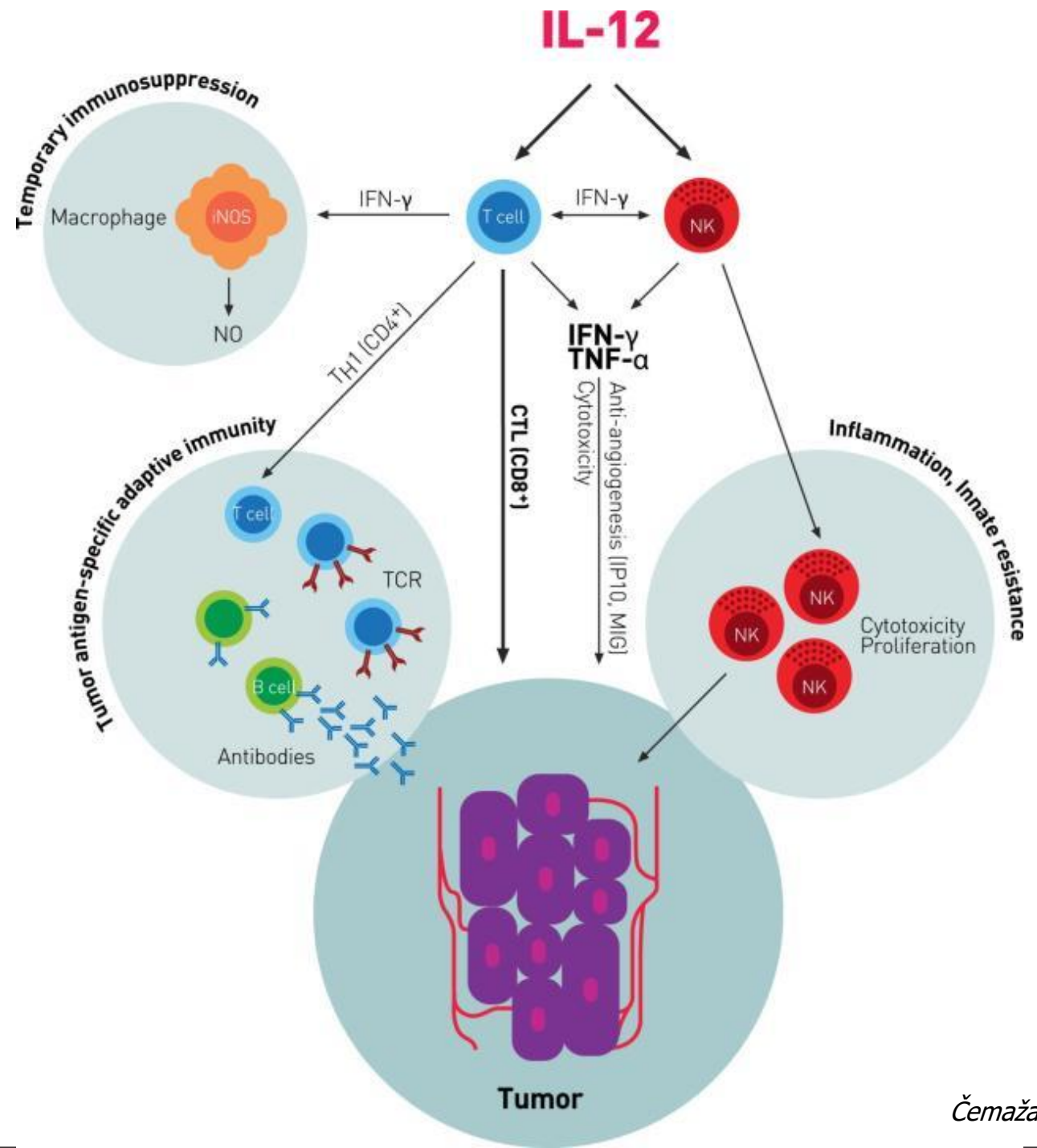


Golzio M. et al. PNAS 2002; 99: 1292-1297.
Rosazza C. et al Current Gene Therapy 2016; 16:98-129.

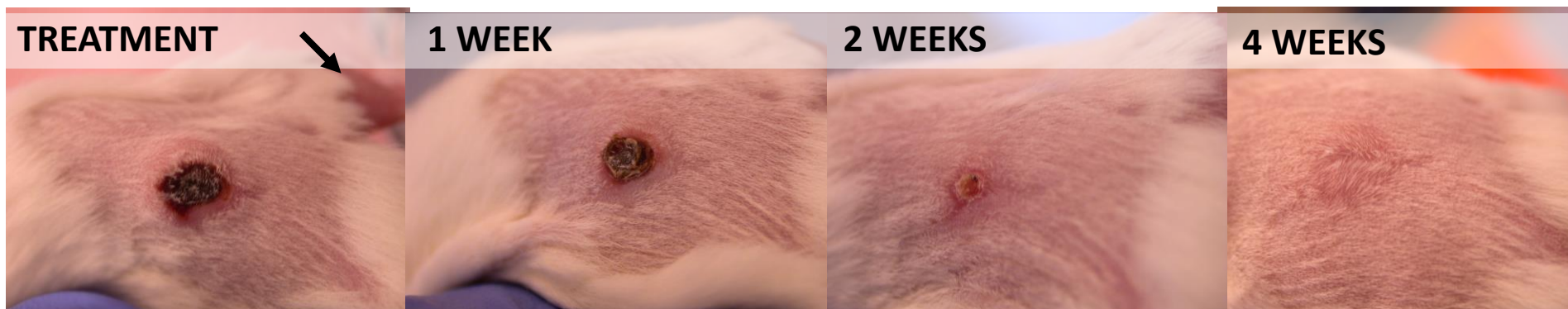
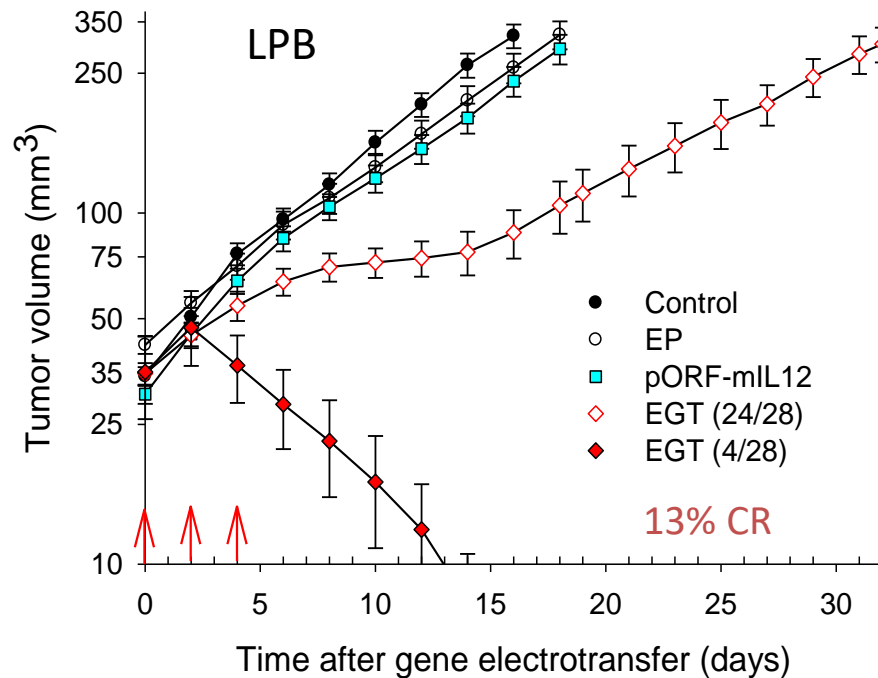
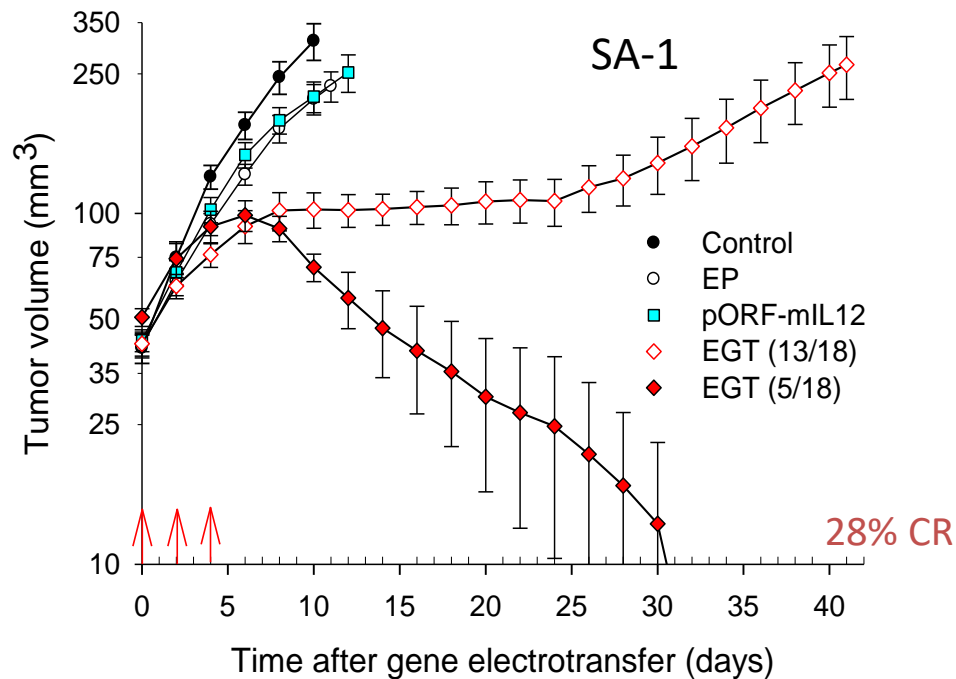
Žnidar et al Oncotarget. 2018 Apr 10;9(27):18665-18681.

Protitumorsko delovanje interleukina-12 (IL-12)

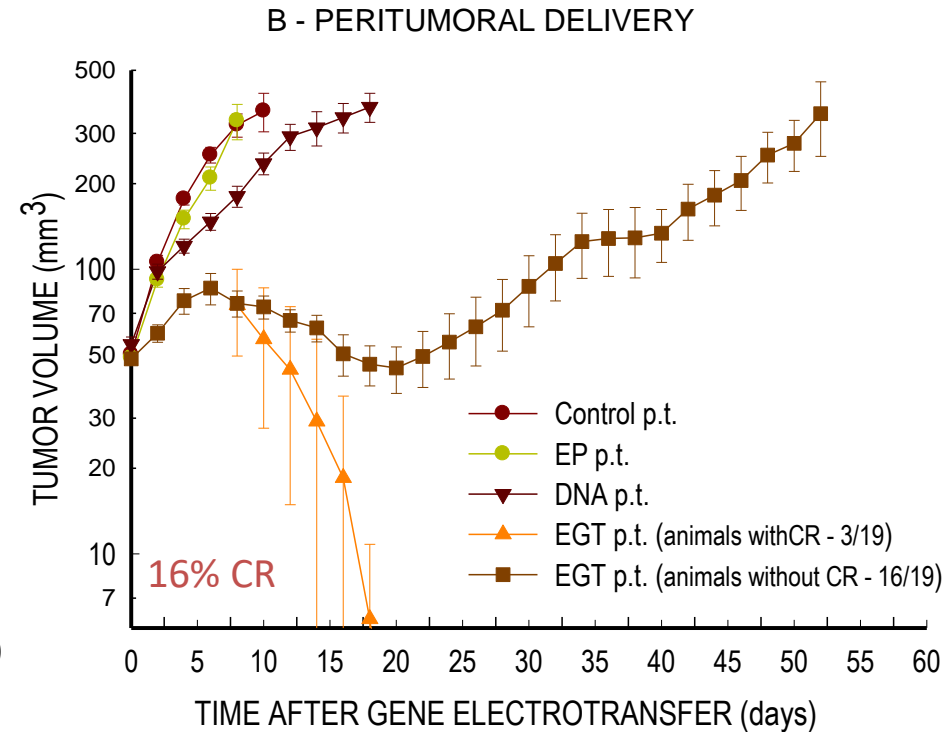
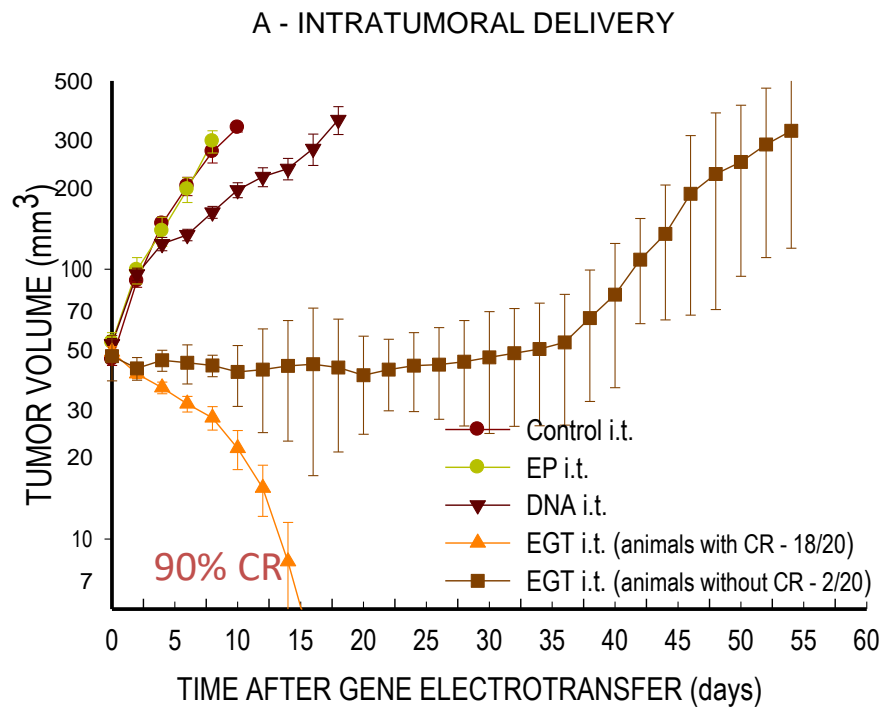
IL-12 nima direktnega citotoksičnega učinka, ampak deluje protitumorsko preko $\text{IFN}\gamma$ in $\text{TNF}\alpha$, in tako aktivira obe roki imuskega odziva – prirojen in pridobljen imunski odziv. Poleg tega deluje tudi anti-angiogeno.



Protitumorski učinek *mIL-12* genskega elektrotransferja v mišico na podkožne tumorje miši



Protitumorsko delovanje of *mIL-12* genskega elektroprenosa; primerjava intra in peritumoralnega injiciranja



Intratumoral EGT resulted in high level of complete responses (18/20 tumors) with significant inhibition of tumor growth in the remaining 2 tumors.

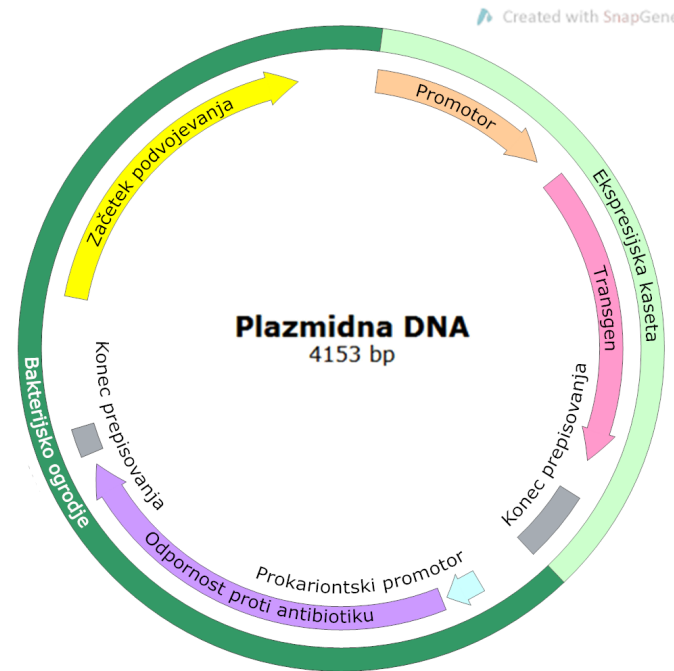
Peritumoral EGT resulted in lower complete response rate (3/19 tumors), with remaining 16/19 showing significant delay in tumor growth.



Gen za odpornost proti antibiotiku

Potreben za selekcijo in produkcijo plazmidne DNA v bakterijah

- Tveganje za horizontalen genski prenos na okolijske in komenzalne bakterije
- Tveganje alergijskih reakcij na ostanek antibiotika uporabljenega v proizvodnji plazmidne DNA
- Priporočila regulatornih agencij EMA (Evropska agencija za zdravila) in FDA (Uprava ZDA za hrano in zdravila):
 - Izogibanje uporabi genov za odpornost proti antibiotikom pri pripravi klinično uporabnih plazmidov
 - Uporaba takšnih, ki niso v uporabi za zdravljenje človeških bolezni - npr. kanamicin



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH



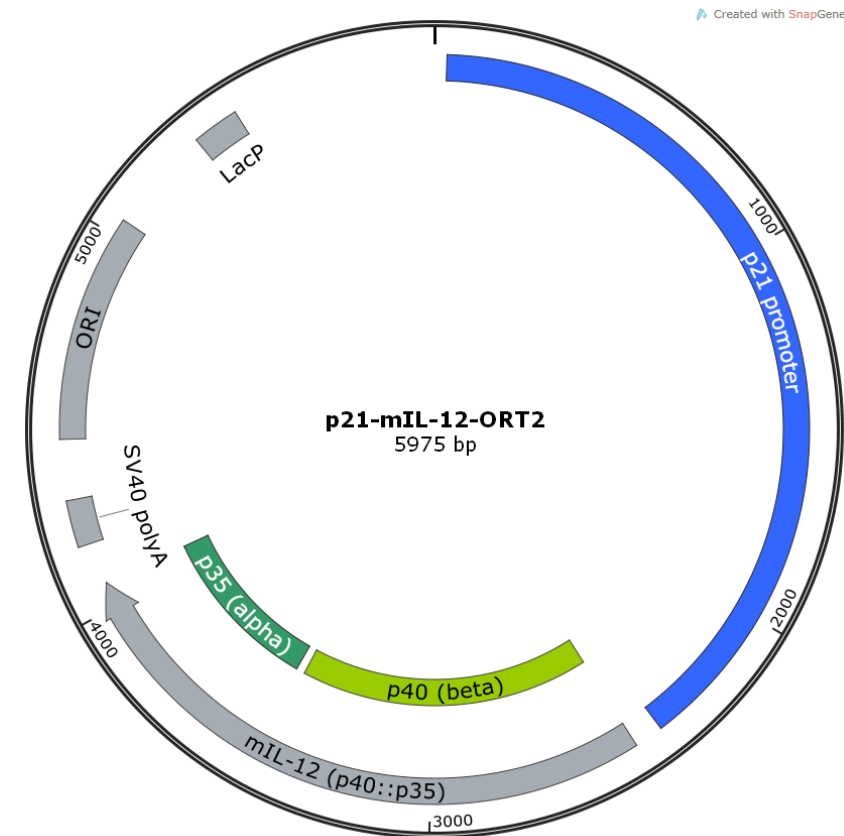
Plazmid z zapisom za IL-12

Pripravljen imamo plazmid z zapisom za IL-12, ki ima dobro protitumorsko učinkovitost, tako za miši, pse in ljudi.

Prednosti plazmida so:

Plazmid z ORT tehnologijo, ki ne potrebuje dodajanja antibiotikov.

Izražanje IL-12 je pod kontrolo tumorsko specifičnega in z genotoksičnim stresom (radio-, kemoterapija) inducibilnega promotorja p21.





REPUBLIC OF SLOVENIA
MINISTRY OF EDUCATION,
SCIENCE AND SPORT



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL
DEVELOPMENT FUND
INVESTING IN YOUR FUTURE



Nova generacija genske terapije za zdravljenje raka: od genov do proizvodnje

A new gene based cancer treatment modality with a paradigm shift in immunotherapy.

2018 – 2021



Javni razpis „Spodbujanje izvajanja raziskovano-razvojnih projektov (TRL 3-6)“

Prednostno področje: Zdravje-medicina

Prednostno podpodročje: Zdravljenje raka

Opis vloge partnerjev, njihova ekspertiza



- **Onkološki inštitut Ljubljana** je celovit center za zdravljenje raka, ki obsega bolnišnico, specializirano za onkologijo, in predklinični oddelek za raziskave rakavih obolenj.



- **COBIK** je zasebni raziskovalni zavod na področju biotehnologije. Ima ekspertizo na področju bioprocenstva, razvoja analitskih in diagnostičnih metod, razvoja antibakterijskih učinkovin in razvoja cepiv.



- **JAFRAL d.o.o.** je podjetje, ki ponuja proizvodnjo biomolekul po naročilu ter izvaja pogodbene raziskave na področju razvoja bioloških zdravil.



- **ISKRA PIO d.o.o.** je družba za projektiranje in izdelavo opreme za čiste in čistilne tehnologije.



- **Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko** preučuje biofizikalne mehanizme elektroporacije, njene aplikacije v biologiji biotehnologiji in medicini ter razvoj elektrod in sistemov za generiranje pulzov.

Sodelujoči izvajalci projekta, njihova **ekspertiza**



- **Univerzitetni klinični center Ljubljana, Oddelek za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo** je klinična in raziskovalna ustanova na področju zdravljenja raka v področju glave in vratu z bogatimi kliničnimi izkušnjami zdravljenja z elektrokemoterapijo.
- **Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Klinika za male živali** je klinična ustanova za zdravljenje malignih tumorjev pri psih in mačkah, ki ima veliko izkušenj tudi z elektrokemoterapijo in gensko terapijo.



CILJI SmartGene.si PROJEKTA



- **Konstrukcija in testiranje** plazmidnega vektorja za IL-12 in novih plazmidnih DNA vektorjev s terapevtskimi geni



- **Inovativen terapevtski pristop** s kombinacijo elektrokemoterapije (ECT) in terapije z genskim elektroprenosom (GET)



- **Nova naprava za elektroporacijo** za prenos plazmidne DNA v celice kože



- **Inovativen proces proizvodnje** plazmidne DNA



- „Smart“ **GMP proizvodnih prostorov**



- **GMP proizvodnja** plazmidne DNA

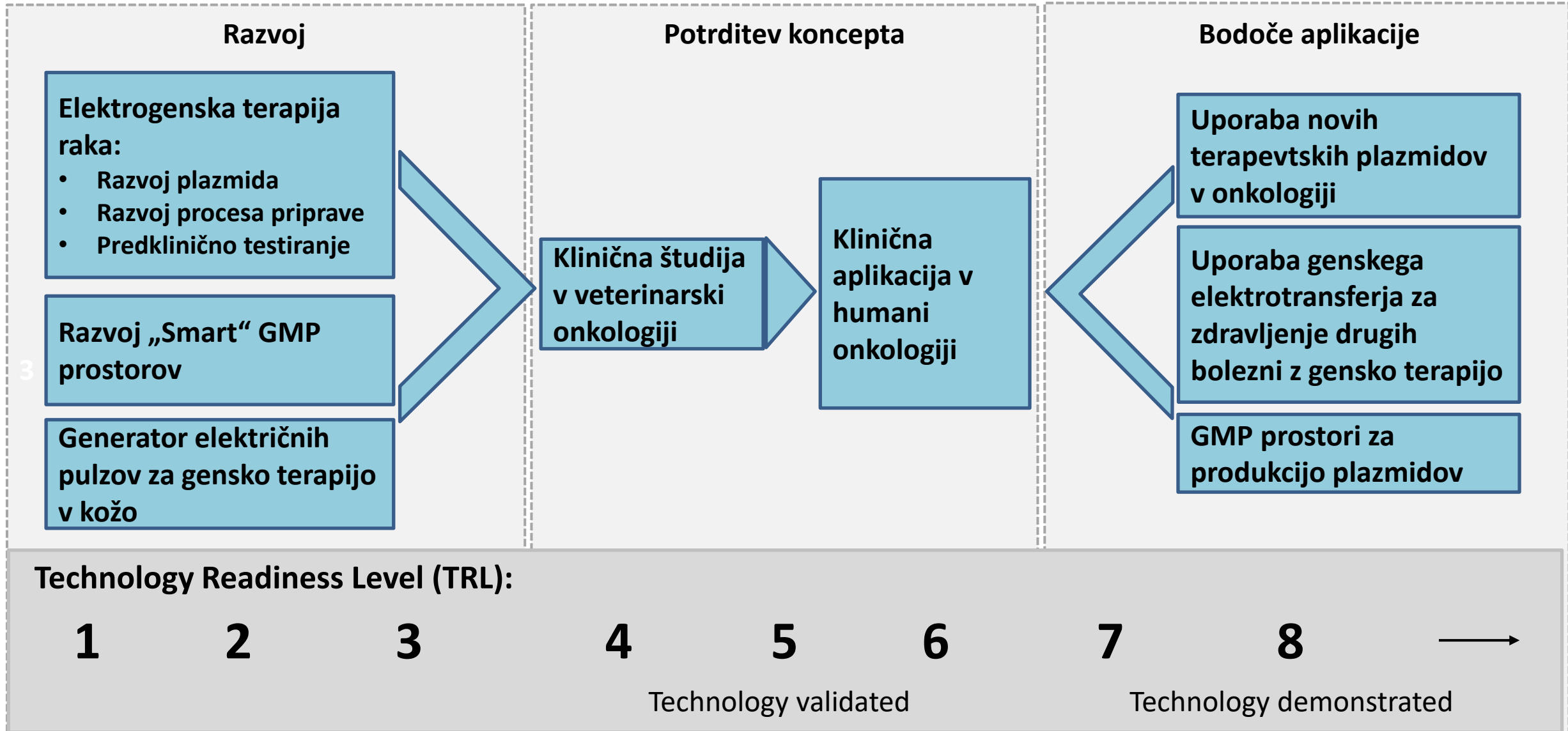


- **Klinična študija**



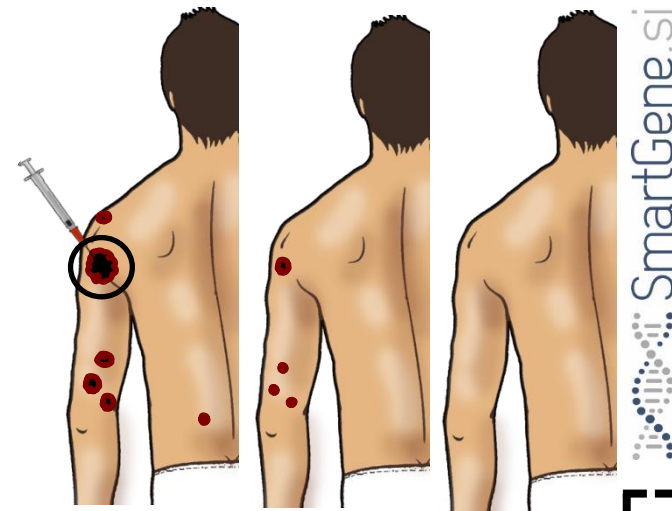
- **Translacijska raziskovalna platforma** na področju zdravljenja raka

CILJI PROJEKTA SmartGene.si



Namen projekta – translacija v kliniko

- PRENOS GENESKE TERAPIJE V KLINIKO



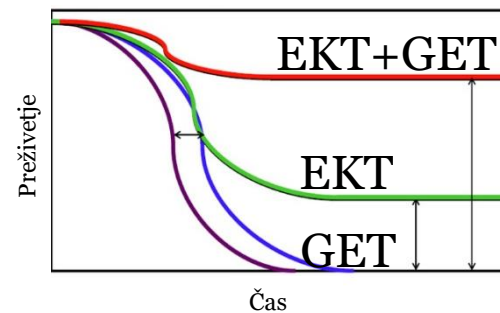
standardno
zdravljenje

klinične študije
faze I/II

in vivo raziskave na
laboratorijskih živalih



in vitro raziskave

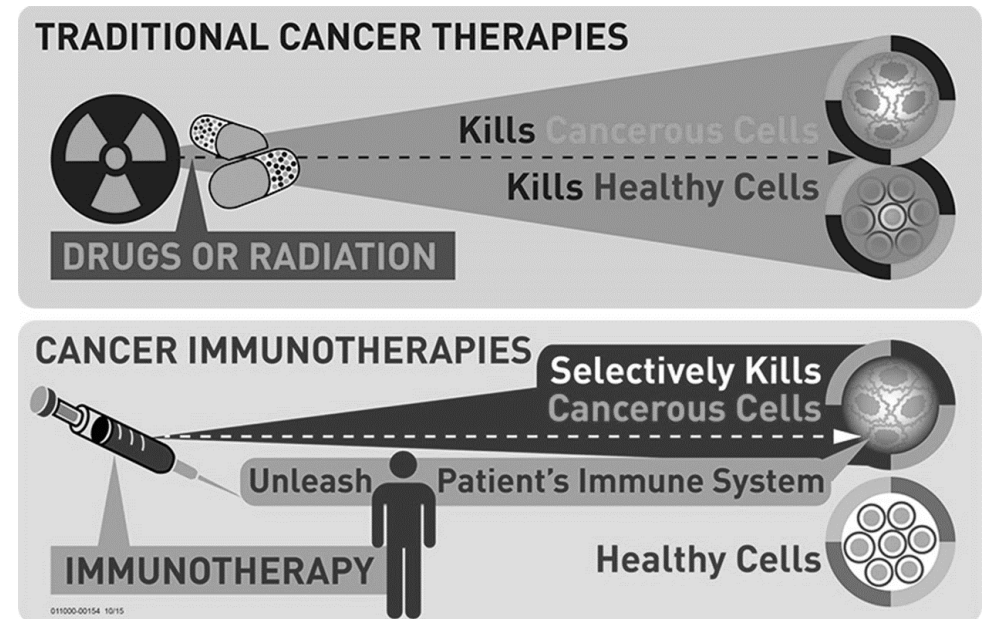
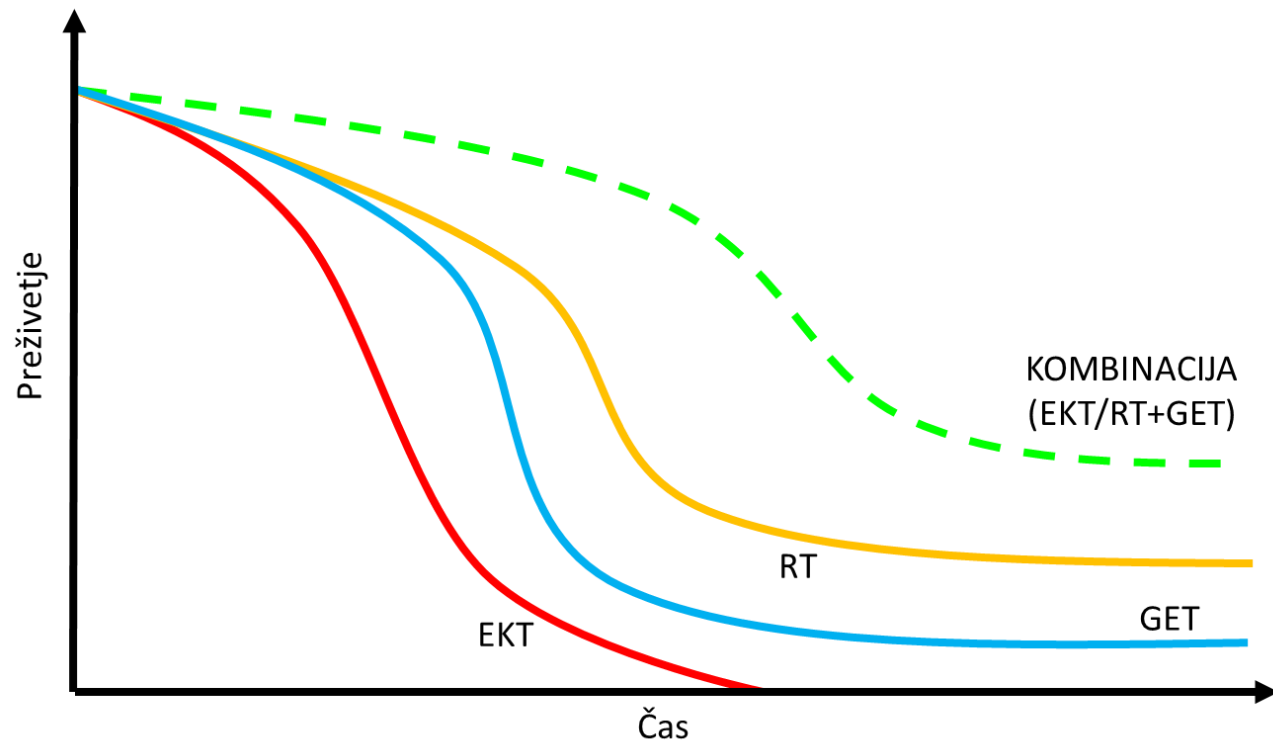


Čas

Preživetje

Čas

Najnovejša strategija je kombinacija ablativnih terapij, kot sta elektrokemoterapija in radioterapija z imunoterapijo



CILJI IMUNOTERAPIJE:

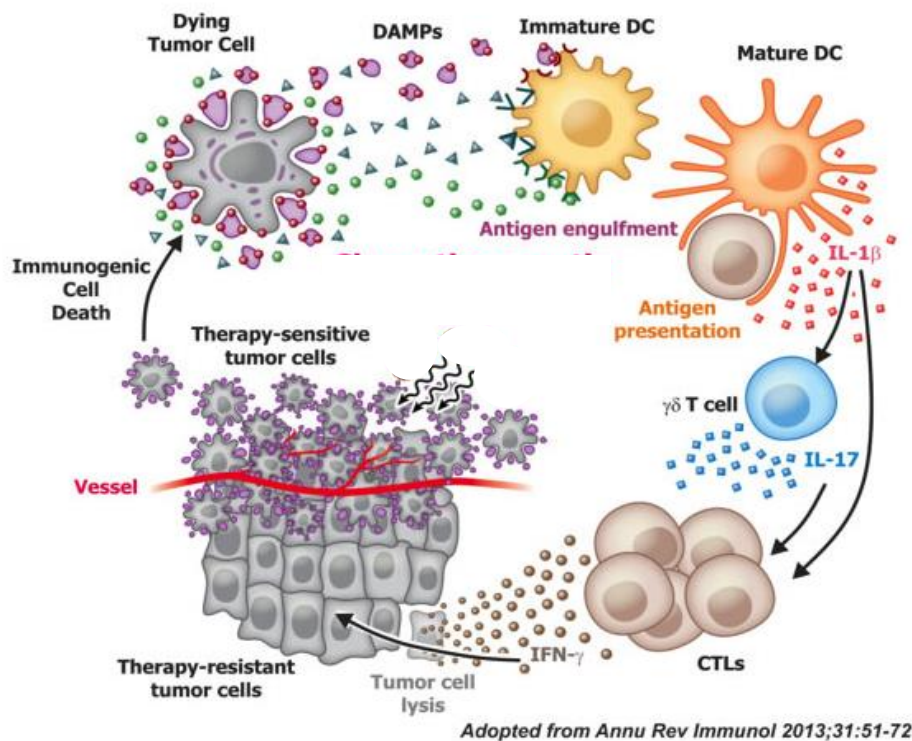
- ✓ Spodbujanje lokalnega odgovora tumorja
- ✓ Sistemski učinek
- ✓ Rezultat: povečanje preživetja bolnikov

EKT spodbudi tudi lokalni imunski odgovor, tako kot radioterapija

EKT inducira imunogeno celično smrt.



Problem: Kako nadgraditi lokalne ablativne tehnike, kot sta EKT in RT, v sistemska zdravljenja?



NAŠA IDEJA: Kombinacija EKT ali RT z lokalno gensko terapijo, ki bi imela sistemski učinek na oddaljene tumorje

Razviti nov terapevtski pristop za zdravljenje raka na osnovi kombinacije:

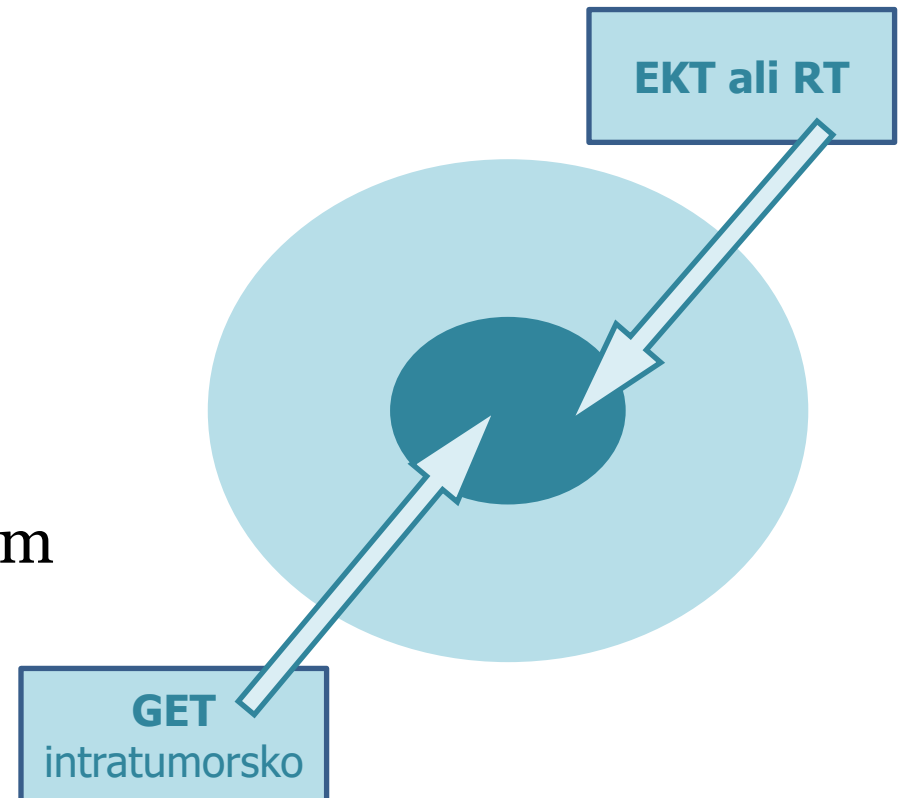
Lokalne ablativne tehnike

Elektrokemoterapija (EKT)

Radioterapija (RT)

Genska imunoterapija

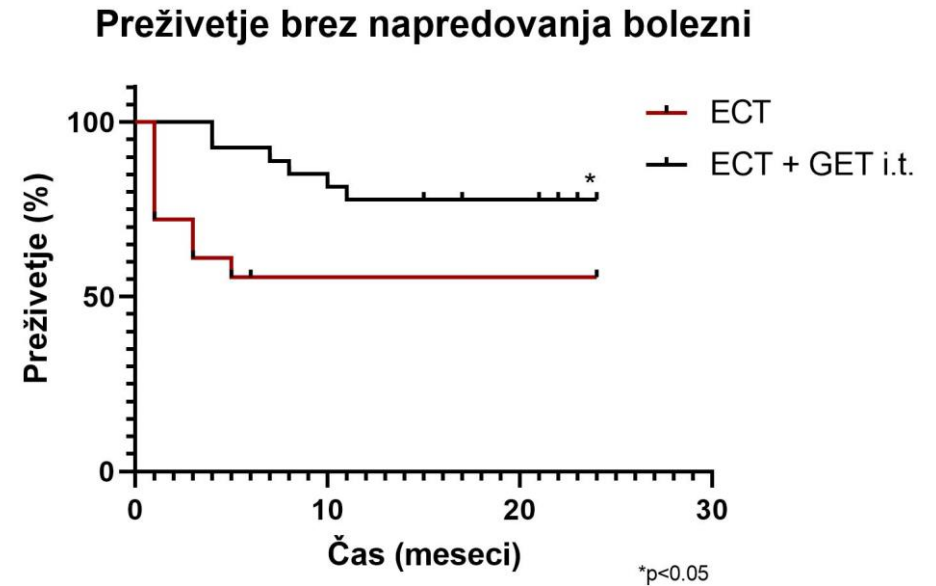
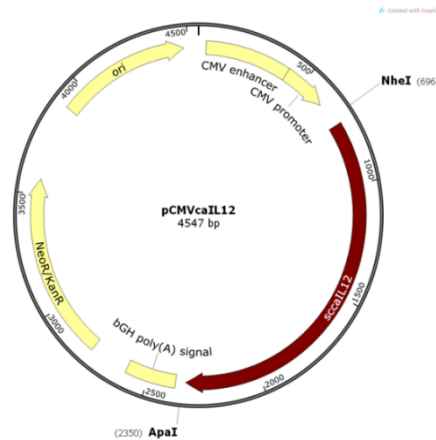
Genski elektroprenos (GET) plazmida z zapisom za IL-12





Inovativen terapevtski pristop s kombinacijo elektrokemoterapije (EKT) in terapije z genskim elektroporenosom (GET)

- Predklinično testiranje v veterinarski medicini.
- Intratumoralna aplikacija plazmidne DNA (pCMVcaIL-12).
- 25 psov s kožnim tumorjem (mastocitom).



Terapija: intratumoralna aplikacija cisplatina in plazmida pCMVcaIL-12, električni pulzi 1300 V/cm, 100 μ s, 5 kHz.

CILJI SmartGene.si projekta

- Konstrukcija in testiranje plazmidnega vektorja za IL-12 in novih plazmidnih DNA vektorjev s terapevtskimi geni



- Inovativen terapevtski pristop s kombinacijo elektrokemoterapije (ECT) in terapije z genskim elektroprenosom (GET)



- Nova naprava za elektroporacijo za prenos plazmidne DNA v celice kože

- Inovativen proces proizvodnje plazmidne DNA



- „Smart“ GMP proizvodnih prostorov



Clean visions.

- GMP proizvodnja plazmidne DNA



- Klinična študija



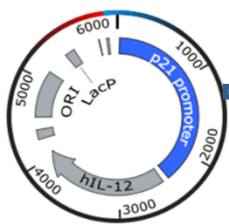
univerzitetni
klinični center ljubljana
University Medical Centre Ljubljana



- Translacijska raziskovalna platforma na področju zdravljenja raka

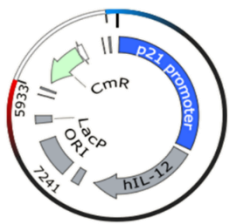
Priprava plazmida za izražanje humanega IL-12

ORT oblika plazmida
 Selekcija klonov
 Odstranitev gena za AB rezistenco
 X-mark oblika plazmida



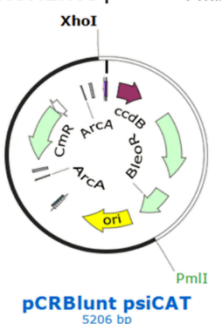
p21-hIL-12-ORT
6054 bp

DELETE BASES
Remove 5933 .. 7241



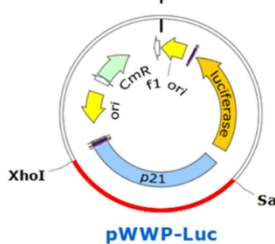
p21-hIL-12-Xmark
7363 bp

INSERT TWO FRAGMENTS
Replace XhoI - PmlI



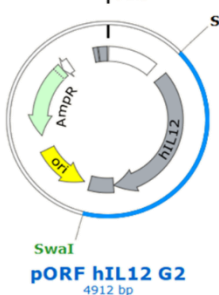
pCRBlunt psiCAT
5206 bp

Insert SalI - XhoI



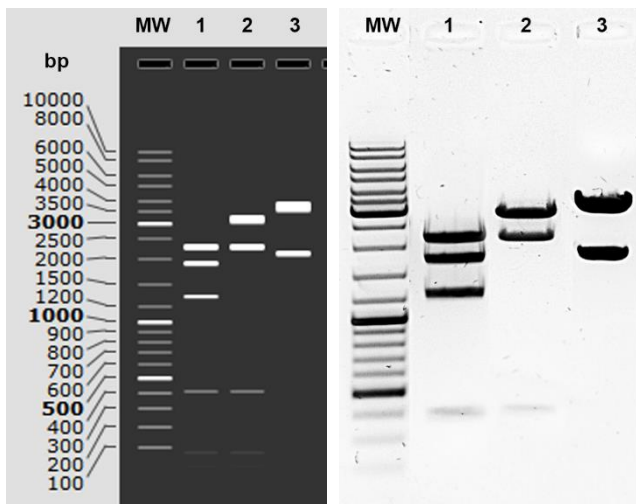
pWWP-Luc
8041 bp

Insert SalI - SmaI



pORF hIL12 G2
4912 bp

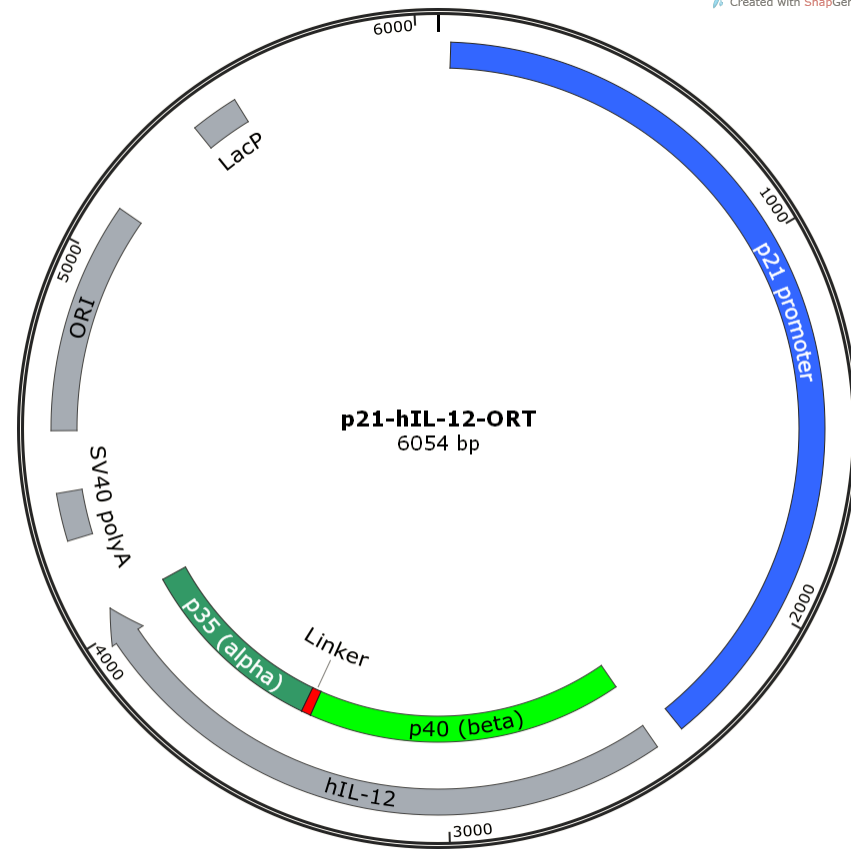
Potrditev z restrikcijsko analizo



Sekveniranje in anotacija



Created with SnapGene™



p21-hIL-12-ORT
6054 bp

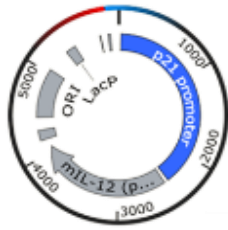
X-mark ogrodje

Izvor zapisa za p21 promotor

Izvor zapisa za fuzijski gen hIL-12

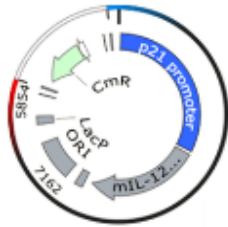
Priprava plazmida za izražanje mišjega IL-12

ORT oblika plazmida
 Selekcija klonov
 Odstranitev gena za AB rezistenco
 X-mark oblika plazmida



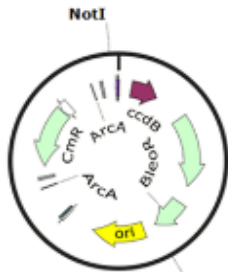
p21-mIL-12-ORT
5975 bp

DELETE BASES
Remove 5854 .. 7162



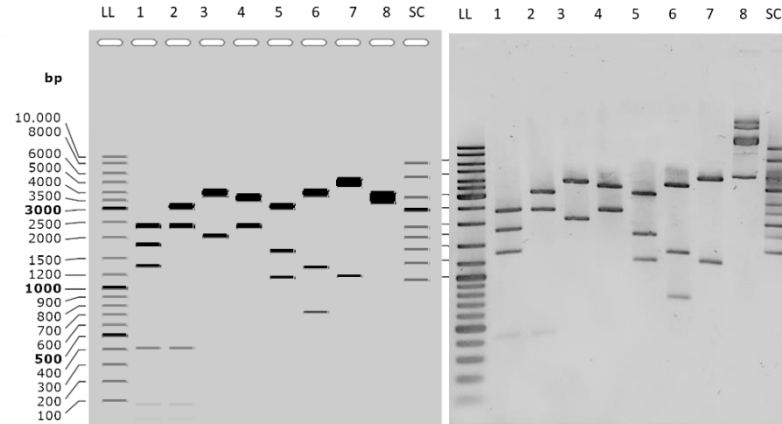
p21-mIL-12-Xmark
7284 bp

INSERT TWO FRAGMENTS
Replace NotI - PmlI



pCRBlunt psiCAT
5206 bp

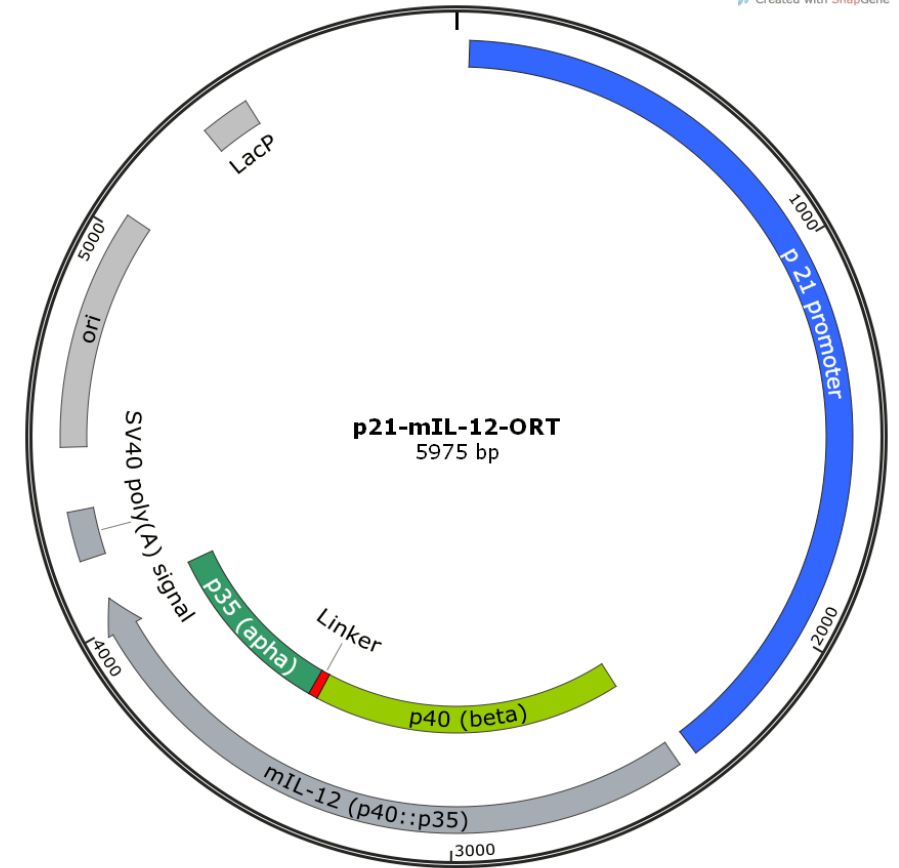
→ Potrditev z restrikcijsko analizo →



→ Sekveniranje in anotacija



Created with SnapGene™



X-mark ogrodje

+ Izvor zapisa za fuzijski gen mIL-12 + Izvor zapisa za p21 promotor

Ne-klinična študija za odobritev klinične študije faze I

Zasnovana na podlagi:

- Smernic EMA za napredna zdravljenja

- 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),
- EMEA/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),
- EMEA/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, Preclinical 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.

- Znanstvenega nasveta

EMA/CHMP/SAWP/19705/2020 na podlagi naših vprašanj in predstavitev/sestanka z eksperti na EMA-i.

- Pravilnika o načelih dobre laboratorijske prakse (Uradni list RS, št. [38/00](#) in [2/04](#))



14.1.2020

Ne-klinična študija SMG-01

Vodja študije: prof. Maja Čemažar

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, OIL

Glavna raziskovalca:

dr. Maša Bošnjak, mag. farm.; poverjena faza študije: izvedba *in vitro* testiranja

dr. Boštjan Markelc, univ. dipl. biol.; poverjena faza študije: izvedba *in vivo* testiranja

Oddelek za patologijo, OIL

Glavna raziskovalka: dr. Gorana Gašljević, dr. med.; poverjena faza študije: izvedba histopatološkega testiranja

Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Glavna raziskovalka: prof. Nataša Tozon, dr. vet. med.; poverjena faza študije: izvedba preiskav krvne slike in biokemijskih parametrov



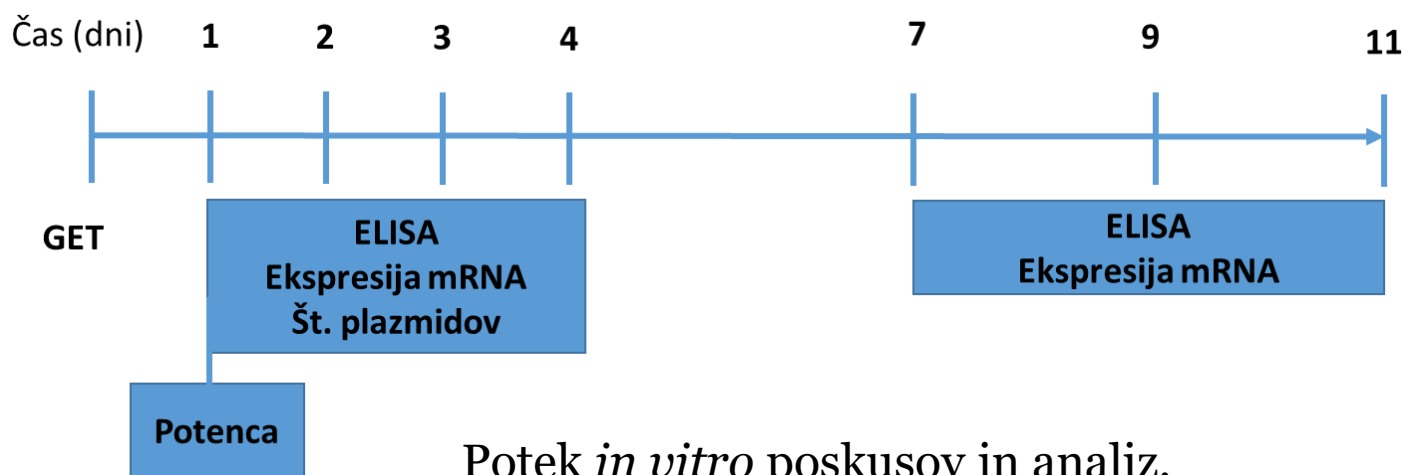
Oseba za zagotavljanje kakovosti: dr. Tanja Jesenko, univ. dipl. biokem.,

Ne-klinična študija SMG-01

Z *in vitro* študijami smo določili **biološko aktivnost (potenca)** proteinov, ki nastajata iz plazmidov pHIL12 in pmIL12, **stopnjo izražanja transgenov** in **število kopij plazmidne DNA v celicah**.

Vse *in vitro* študije s pHIL12 so bile izvedene **na humani celični liniji** ploščatoceličnega karcinoma žrela FaDu

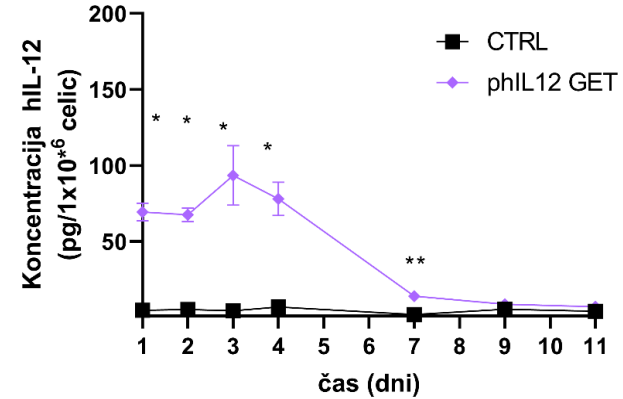
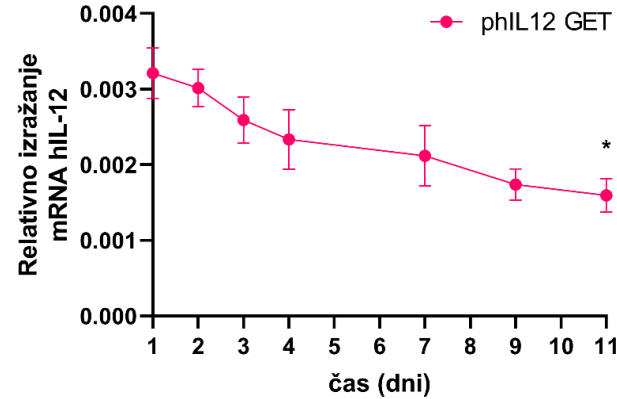
Vse *in vitro* študije s pmIL12 so bile izvedene **na mišji celični liniji** raka debelega črevesa CT26



Ne-klinična študija SMG-01

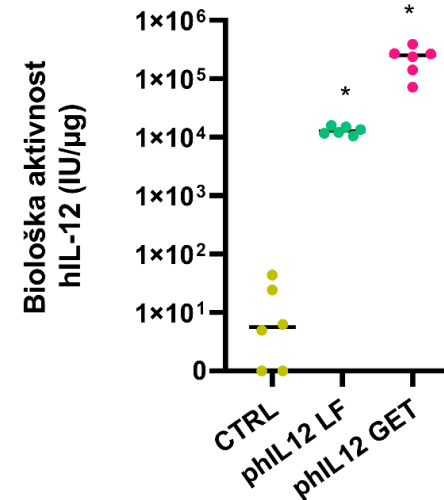
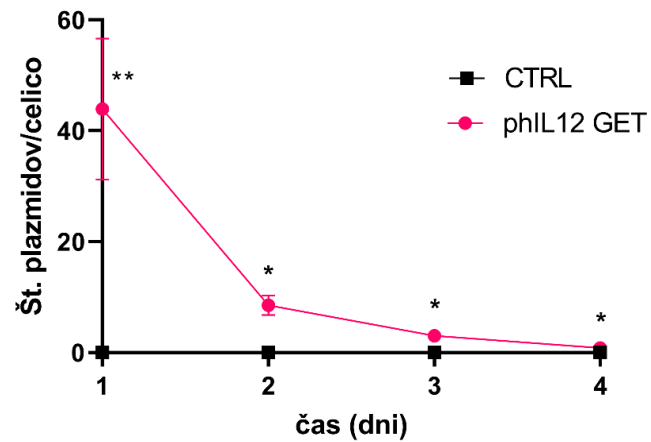
In vitro študije s pHIL12 na humani celični liniji FaDu

Stopnja izražanj
mRNA



Stopnja
izražanja:
proteini

Število kopij
plazmida



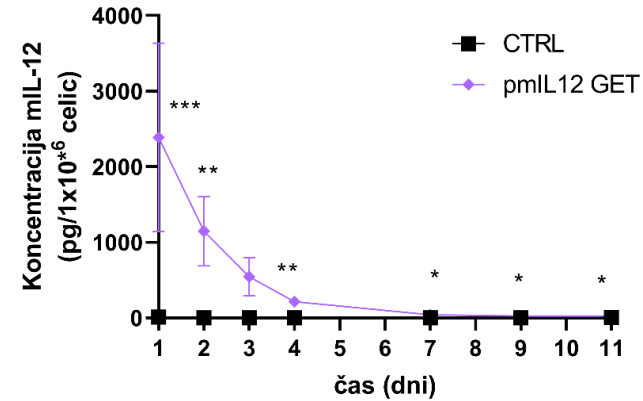
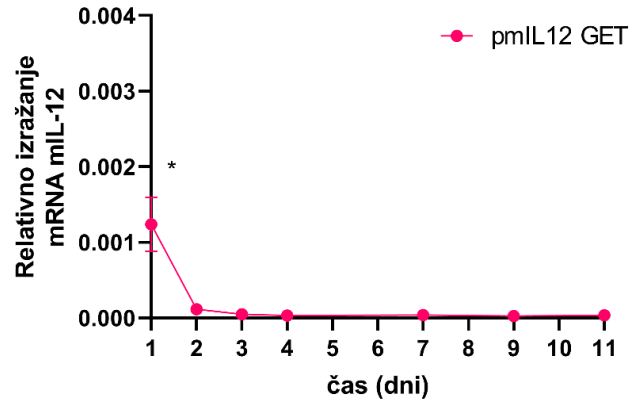
Biološka
aktivnost



Ne-klinična študija SMG-01

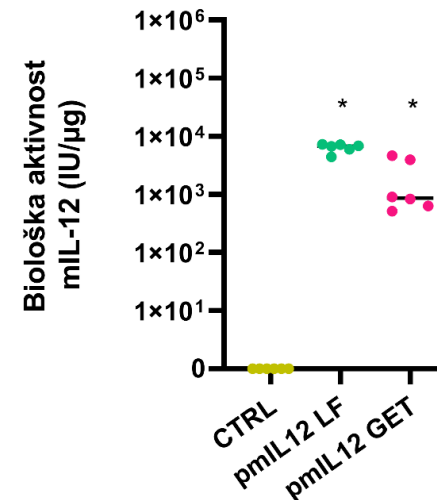
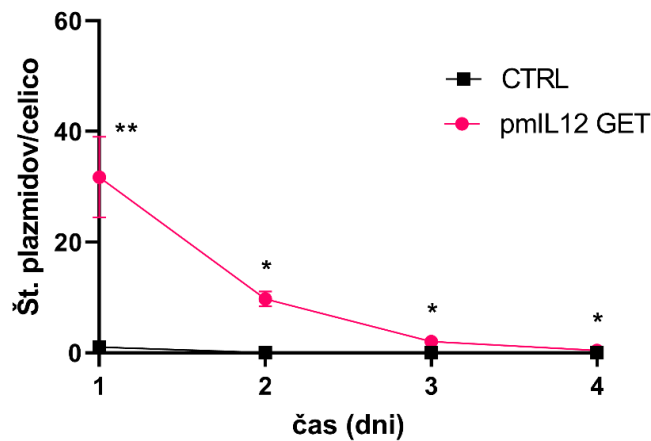
In vitro študije s pmIL12 na mišji celični liniji CT26

Stopnja izražanj
mRNA



Stopnja
izražanja:
proteini

Število kopij
plazmida



Biološka
aktivnost

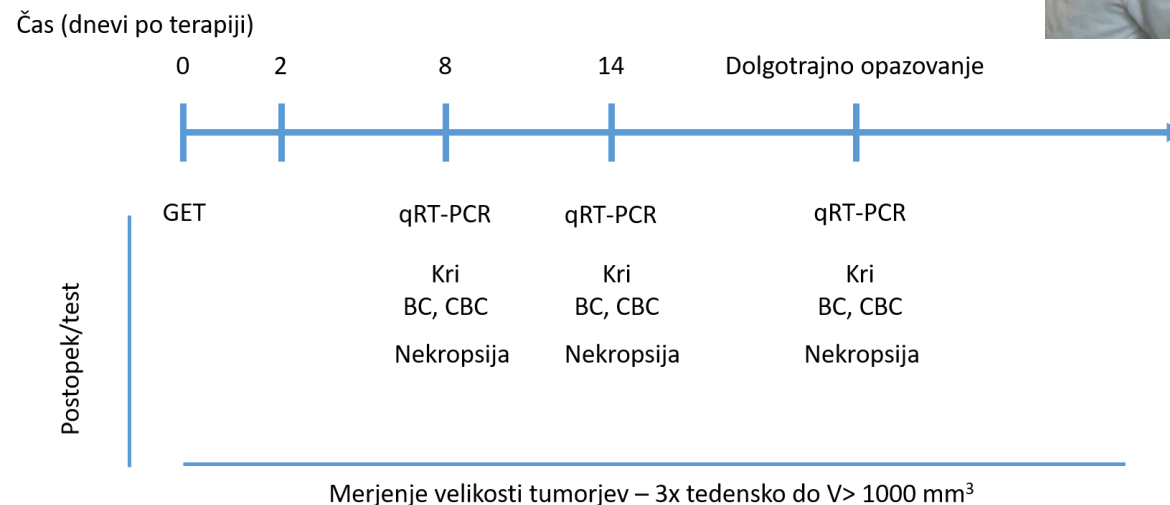


Ne-klinična študija SMG-01

Z *in vivo* študijami smo določili učinkovitost zdravila, farmakokinetiko, toksičnost, toleranco in imunogenost plazmida pmIL12. Študije so bile izvedene na mišjih tumorjih CT26.

	Skupine (skupno število)	Doza	Št miši/skupino			Dolgotrajno opazovanje
			Časovna točka (dnevi po zadnji terapiji)			
			2	8	14	
1	Naivne miši	0	10	5	0	
2	CTRL	0	10	15	0	6
3	pmIL12 nizka doza	0.5 mg/mL	10	15	10	12
4	pmIL12 srednja doza	1 mg/mL	10	15	10	12
5	pmIL12 visoka doza	2 mg/mL	10	15	10	12

Potek *in vivo* poskusov in analiz.



Vse študije smo izvedli na samcih in samicah.

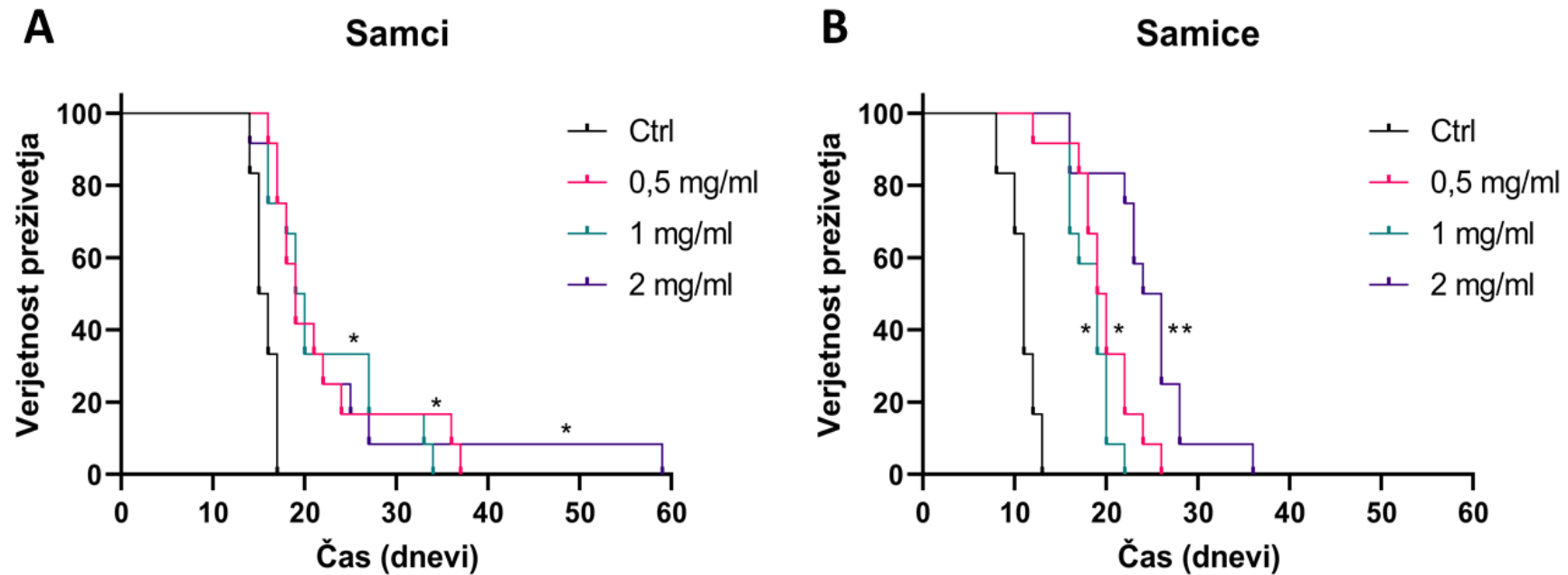
V študiji smo uporabili 220 miši vsakega spola.



Ne-klinična študija SMG-01

Farmakodinamika

Učinkovitost delovanja plazmida pmIL12 na laboratorijskih živalih glede na dozo



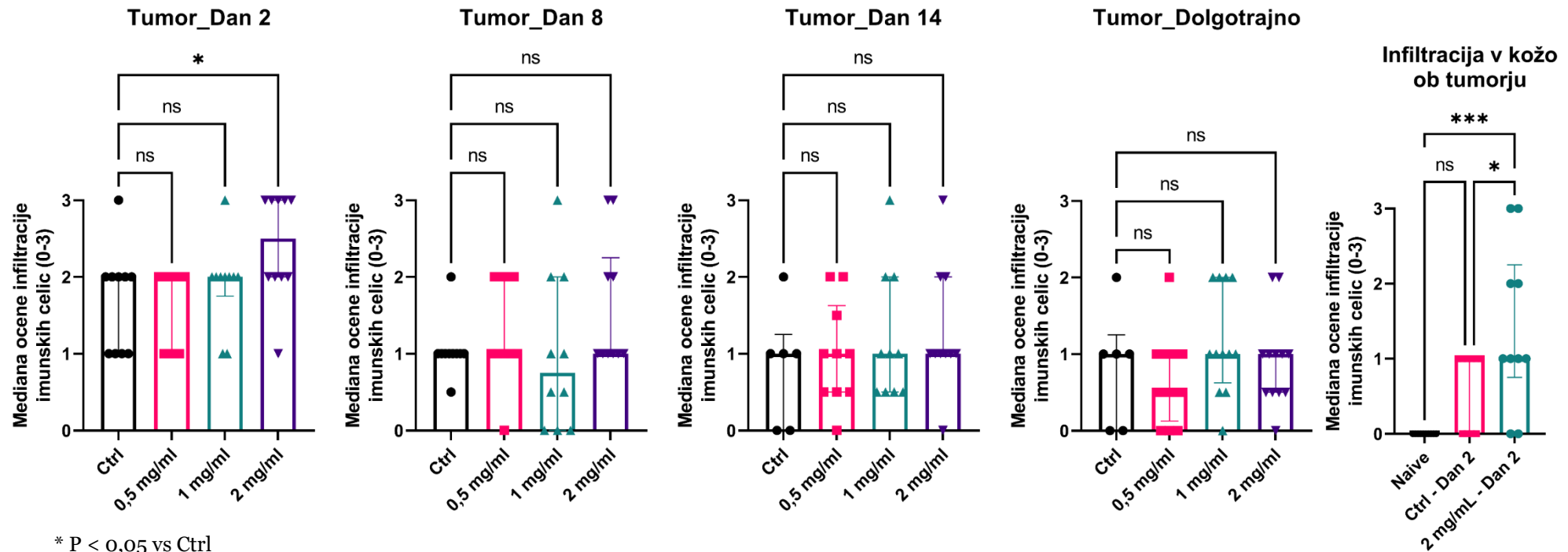
* - $P < 0,05$ vs Ctrl, ** - $P < 0,05$ vs Ctrl, 0,5 mg/ml in 1 mg/ml.



Ne-klinična študija SMG-01

Farmakodinamika

Infiltracija imunskih celic v tumor po vnosu plazmida pmIL12



* P < 0,05 vs Ctrl

*P < 0,05 vs Naive

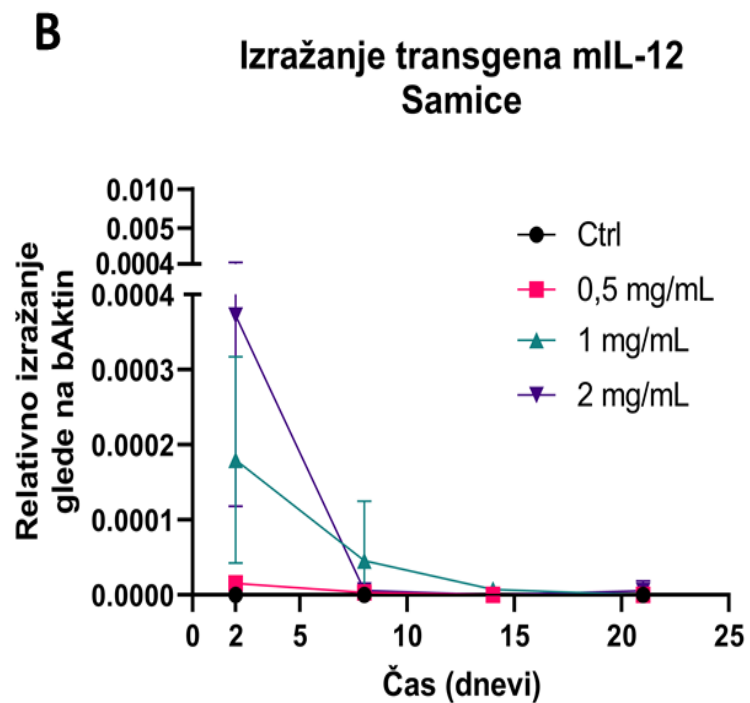
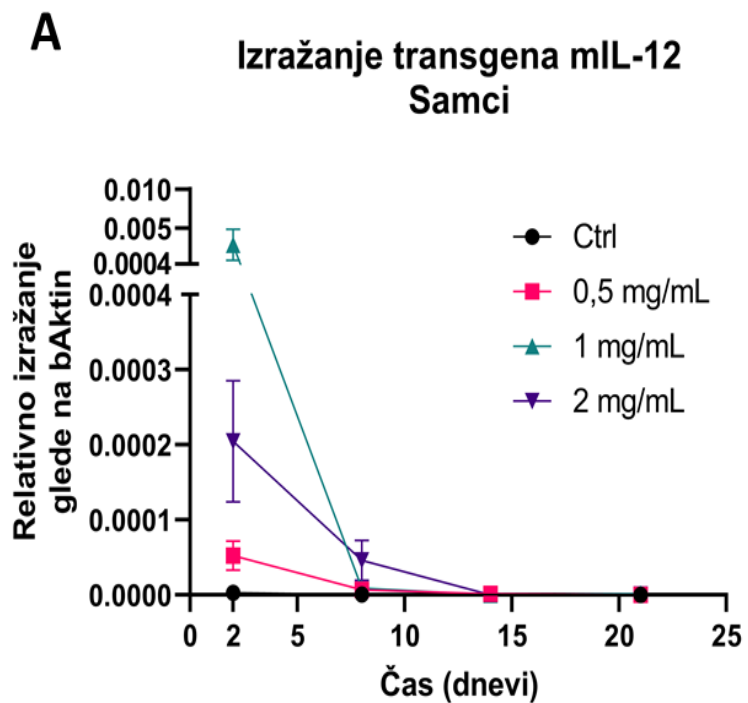
*** P < 0,001 vs Naive



Ne-klinična študija SMG-01

Farmakokinetika

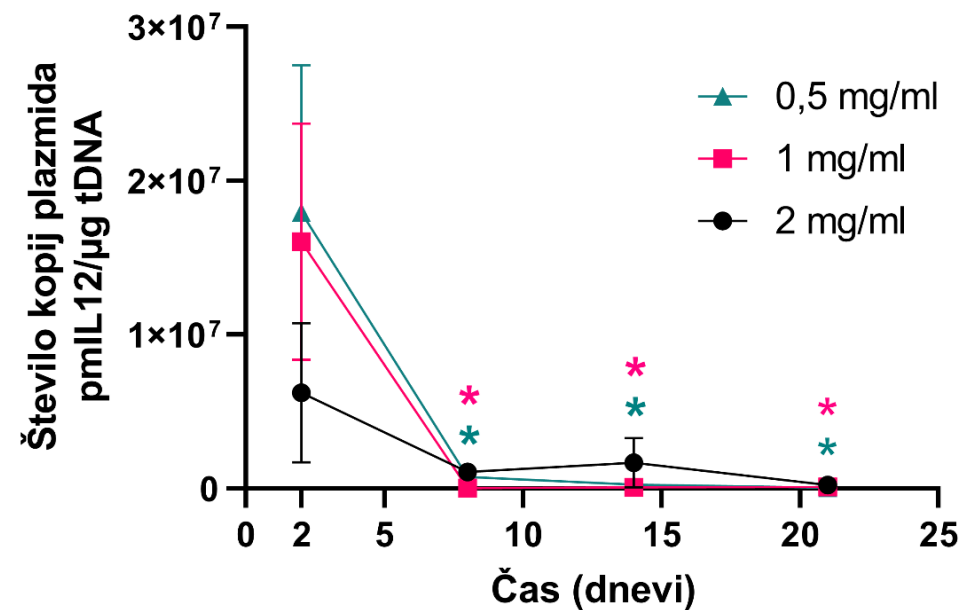
Kinetika izražanja transgena v tumorjih



Ne-klinična študija SMG-01

Farmakokinetika

Prisotnost števila kopij plazmida v koži nad in okoli tumorja



* - P < 0,05 vs Dan 2 0,5 mg/ml, * - P < 0,05 vs Dan 2 1 mg/ml.

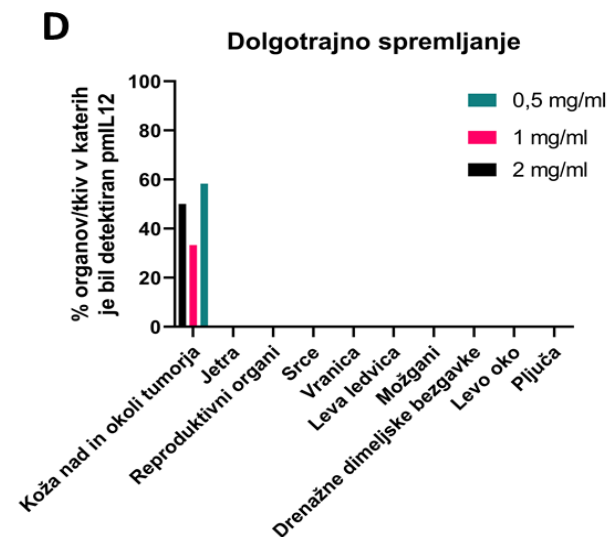
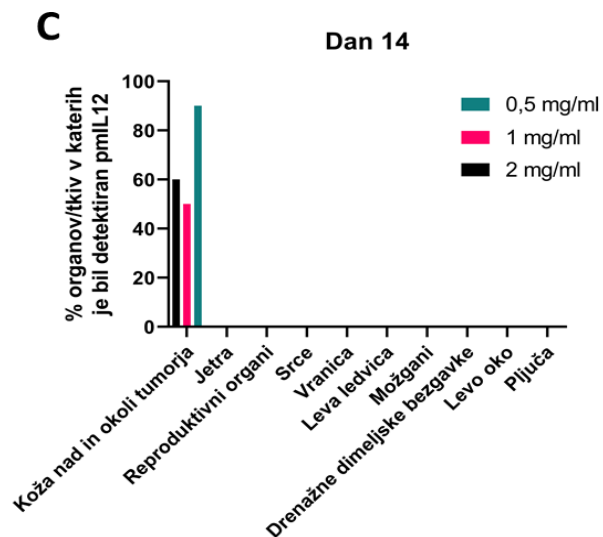
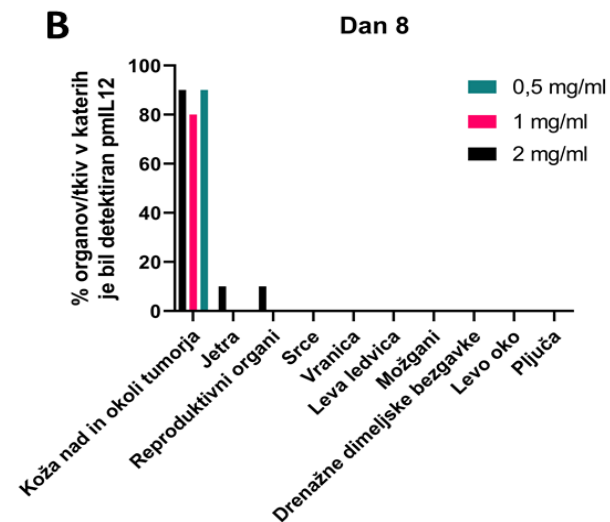
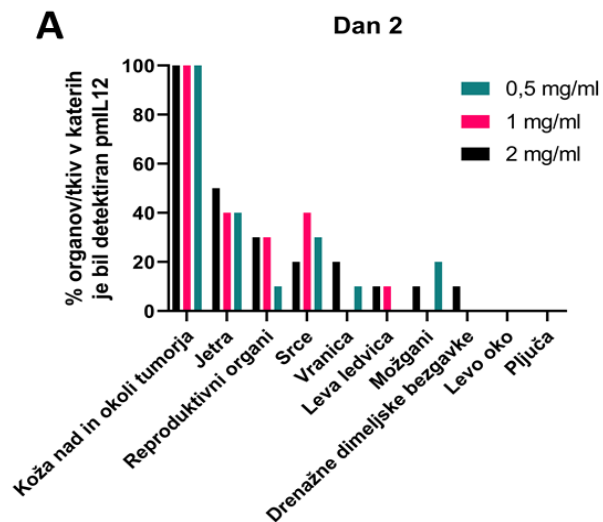


Ne-klinična študija SMG-01

Farmakokinetika

Distribucija plazmida pmIL12 po organih

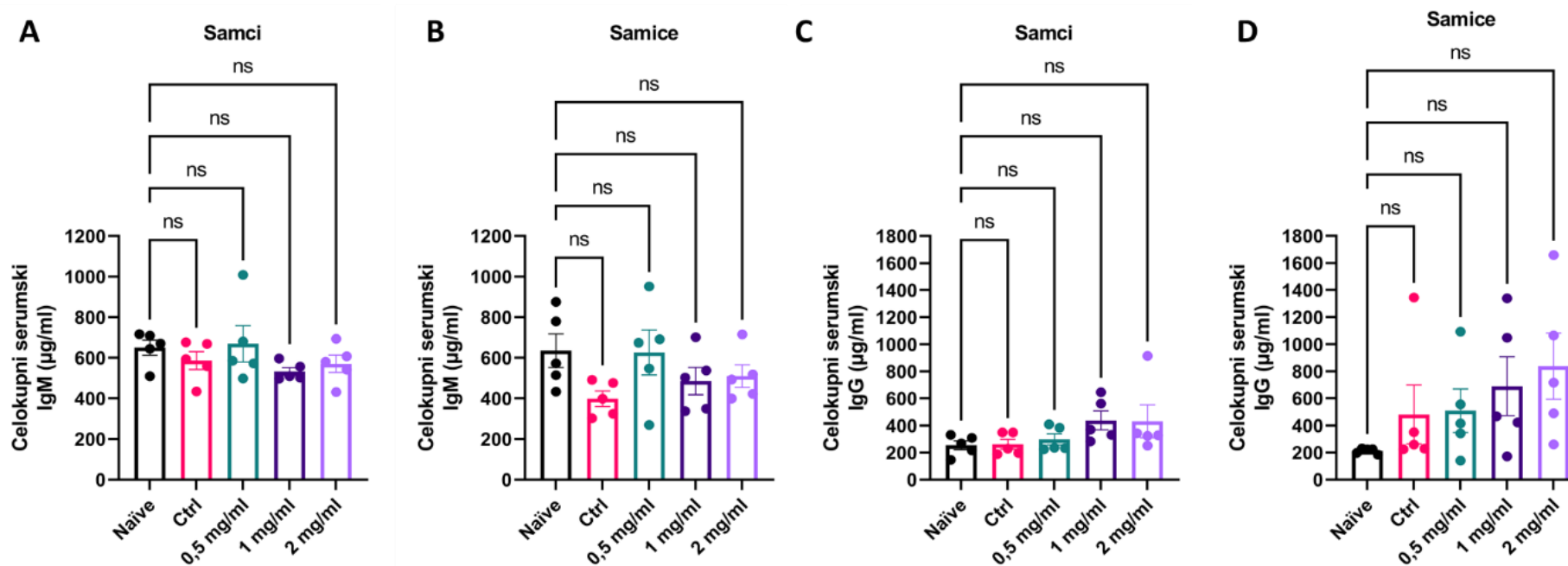
Zaporedna številka	Organ/tkivo	Trajanje zadrževanja pmIL12
1	Koža nad in okoli tumorja	dolgotrajno
2	Jetra	8 dni
3	Reprodukтивni organi	8 dni
4	Srce	2 dni
5	Vranica	2 dni
6	Leva ledvica	2 dni
7	Možgani	2 dni
8	Drenažne dimeljske bezgavke	2 dni
9	Levo oko	Ni bil zaznan
10	Pljuča	Ni bil zaznan



Ne-klinična študija SMG-01

Imunogenost

Celokupna serumska količina IgM in IgG protiteles po vnosu plazmida



Ne-klinična študija SMG-01

Toksikologija

Krvna slika, biokemija in histopatologija v mejah normale

Organi na katerih je bila opravljena histopatološka analiza.

Zaporedna številka	Organ/tkivo
1	Koža nad in okoli tumorja
2	Jetra
3	Reproduktivni organi
4	Srce
5	Vranica
6	Leva ledvica
7	Možgani
8	Drenažne dimeljske bezgavke
9	Levo oko
10	Pljuča

Parametri, ki smo jih določevali z analizo krvi.

	CBC	BC
Zaporedna številka	Parameter	Parameter
1	WBC	Glukoza
2	RBC	Sečnina
3	HGB	Kreatinin
4	HCT	Celokupne beljakovine
5	MCV	Albumini
6	MCH	Holesterol
7	MCHC	Žolčne kisline
8	CHCM	Kalcij
9	RDW	Anorganski fosfat
10	HDW	Alanin aminotransferaza (ALT)
11	PLT	Aspartat aminotransferaza (AST)
12	MPV	Alkalna fosfataza (AP)
13	CH	Kreatinin kinaza (CK)
14	PCT	gama-glutamil transpeptidaza (GGT)
15	%NEUT	Natrij
16	%LYMPH	Kalij
17	%MONO	Klorid
18	%EOS	Celokupne beljakovine
19	%BASO	
20	%LUC	
21	#NEUT	
22	#LYMPH	
23	#MONO	
24	#EOS	
25	#BASO	
26	#LUC	



Zaključki - Ne-klinična študija SMG-01

Oddaja prve vloge na EMA: Avgust 2019

Prvi Online sestanek z EMA: September 2019

Sestanek v Amsterdamu na EMA: 14. 01. 2020

Oddaja vloge za poskuse na živalih na UVHVVR: 06. 02. 2020

Odobritev vloge za poskuse na živalih: 26. 02. 2020

Številka dovoljenja: U3401-6/2020/9

Oddaja vloge na KSOPKR: 24.06. 2020

Odobritev vloge na KSOPKR: 2.7.2020

Trajanje dela v laboratorijih: Oktober 2020 – Maj 2021

Število udeleženi raziskovalcev: 22

Število novih obrazcev ter SOP-jev: 103

Število shranjenih in procesiranih vzorcev:

- ***in vitro* študije: 1655**

- ***in vivo* študije: 7558**



CILJI SmartGene.si projekta

- Konstrukcija in testiranje plazmidnega vektorja za IL-12 in novih plazmidnih DNA vektorjev s terapevtskimi geni
- Inovativen terapevtski pristop s kombinacijo elektrokemoterapije (ECT) in terapije z genskim elektroporenosom (GET)
- Nova naprava za elektroporacijo za prenos plazmidne DNA v celice kože
- Inovativen proces proizvodnje plazmidne DNA
- „Smart“ GMP proizvodnjih prostorov
- GMP proizvodnja plazmidne DNA
- **Klinična študija**
- Translacijska raziskovalna platforma na področju zdravljenja raka



ONKOLOŠKI INŠTITUT
INSTITUTE OF ONCOLOGY
LJUBLJANA

Genska imunoterapija pri BCC: Klinična študija faze I

§ Klinična študija

- Priprava protokola za fazo I.
- Tri naraščajoče doze plazmida z zapisom za IL-12 (phIL12).
- Aplikacija v monoterapiji.
- Protokoli, pripravljani po zahtevah Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME) in Komisije za protokole na Onkološkem inštitutu Ljubljana (KSOPKR).
- Evropska agencija za zdravila (EMA) poda mnenje o primernosti klinične študije (EMA/CHMP/SAWP/19705/2020).
- Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) izda dovoljenje za izvajanje klinične študije.
- Prijava študije v dve svetovni bazi kliničnih študij ClinicalTrials.gov in ISRCTN register.
- Iniciacija študije - oktober 2021.



ClinicalTrials.gov

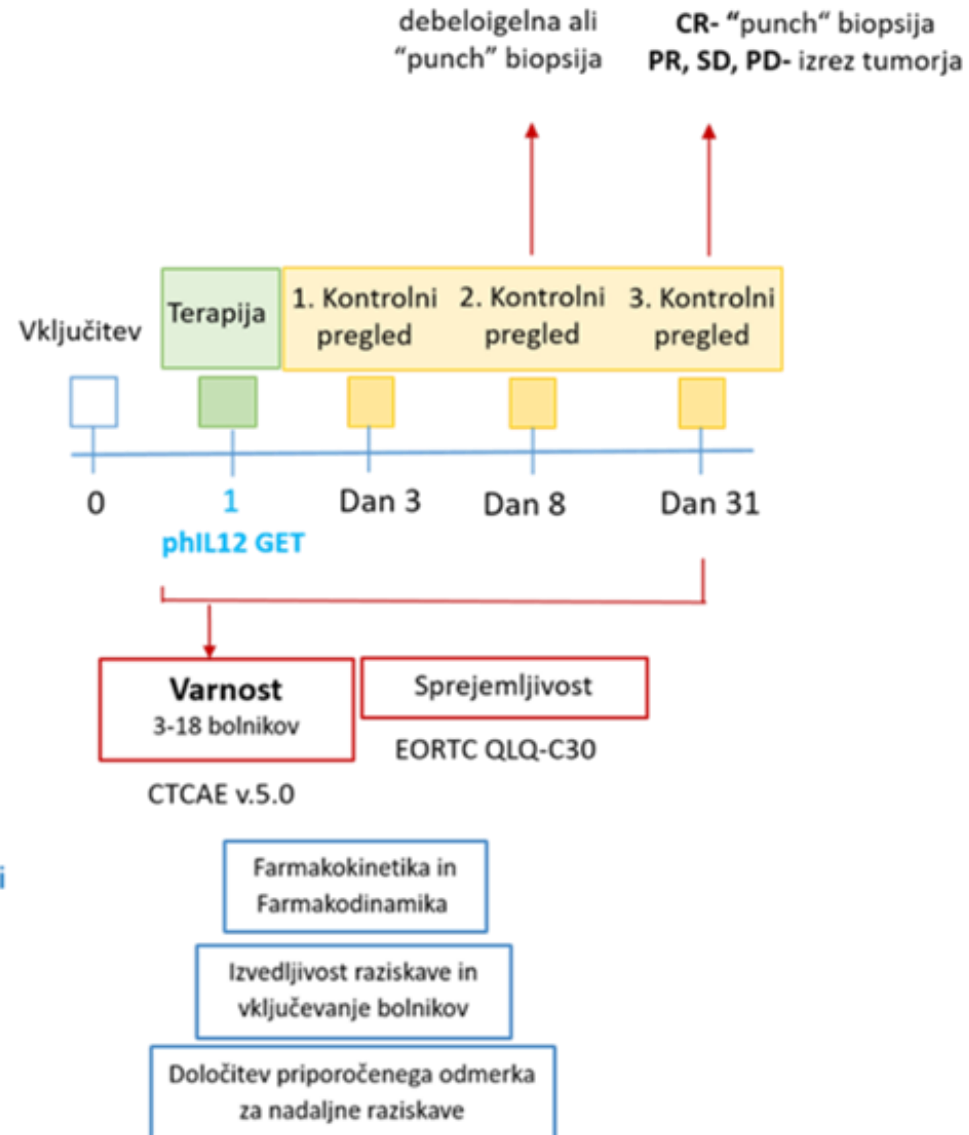
ISRCTN
registry

§ Klinična študija

Shema postopkov klinične študije faze I; genska terapija s phIL12

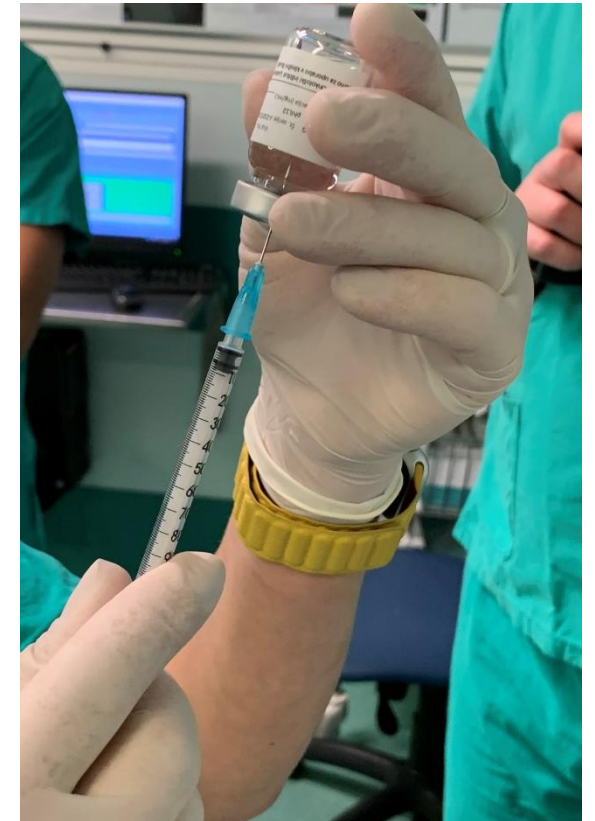
Bazalno celični karcinom (BCC) na glavi ali vratu
Enkratna terapija z GET IL-12

Cilji:
Varnost
Izvedljivost



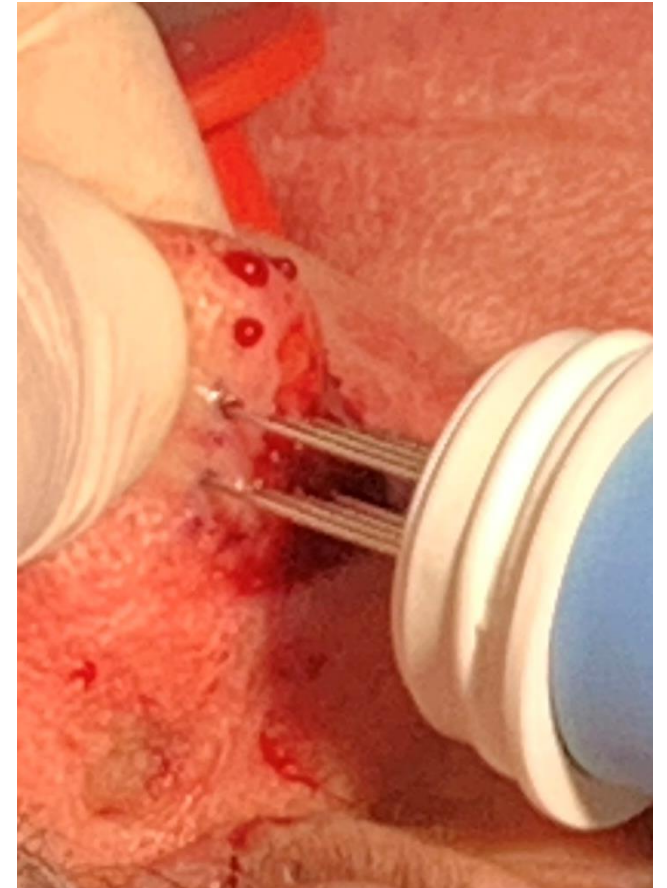
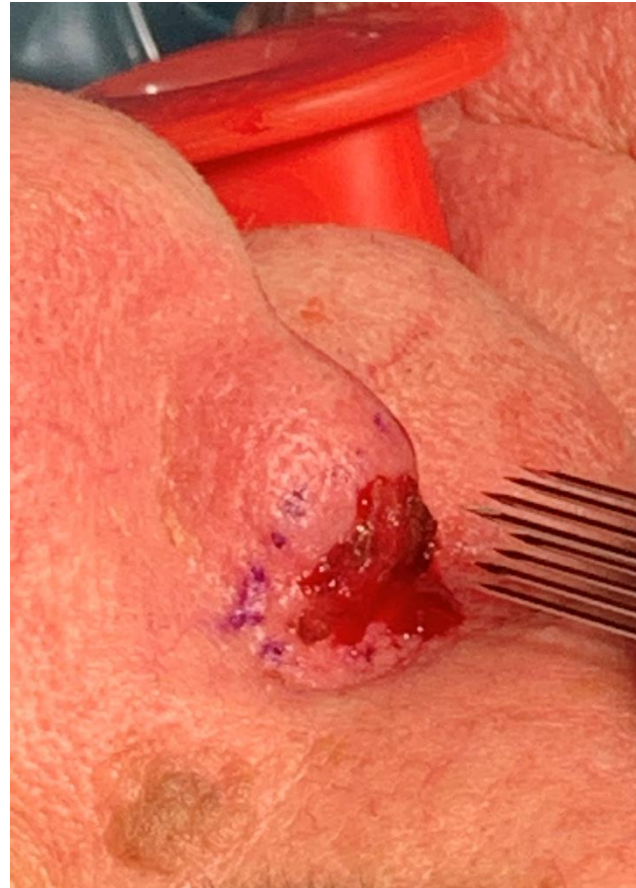
Postopek zdravljenja: Priprava plazmida za injiciranje

- Plazmid je pripravljen po GMP postopku, ki je odobren od JAZMP
- Redčenje in priprava raztopine plazmida v brizgi za injiciranje poteka v kirurški sobi, ki je registrirana za delo z GSO



Postopek zdravljenja: Aplikacija električnih pulzov – genski elektroprenos

- Električne pulze se dovede s pomočjo vzporedno igelnih elektrod in pulze generira v IGEA generatorju
- Električne pulze se dovede tolikokrat da se pokrije celoten volumen tumorja



Varnost in učinkovitost

- Pri prvem pacientu nismo zabeležili stranskih učinkov do 10. dneva po terapiji
- 31. dan po terapiji je bil tumor še prisoten – kirurška odstranitev tumorja

Prestudy visit (day 0)



Before treatment (day 1)



2 days after treatment (day 3)



7 days after treatment (day 8)



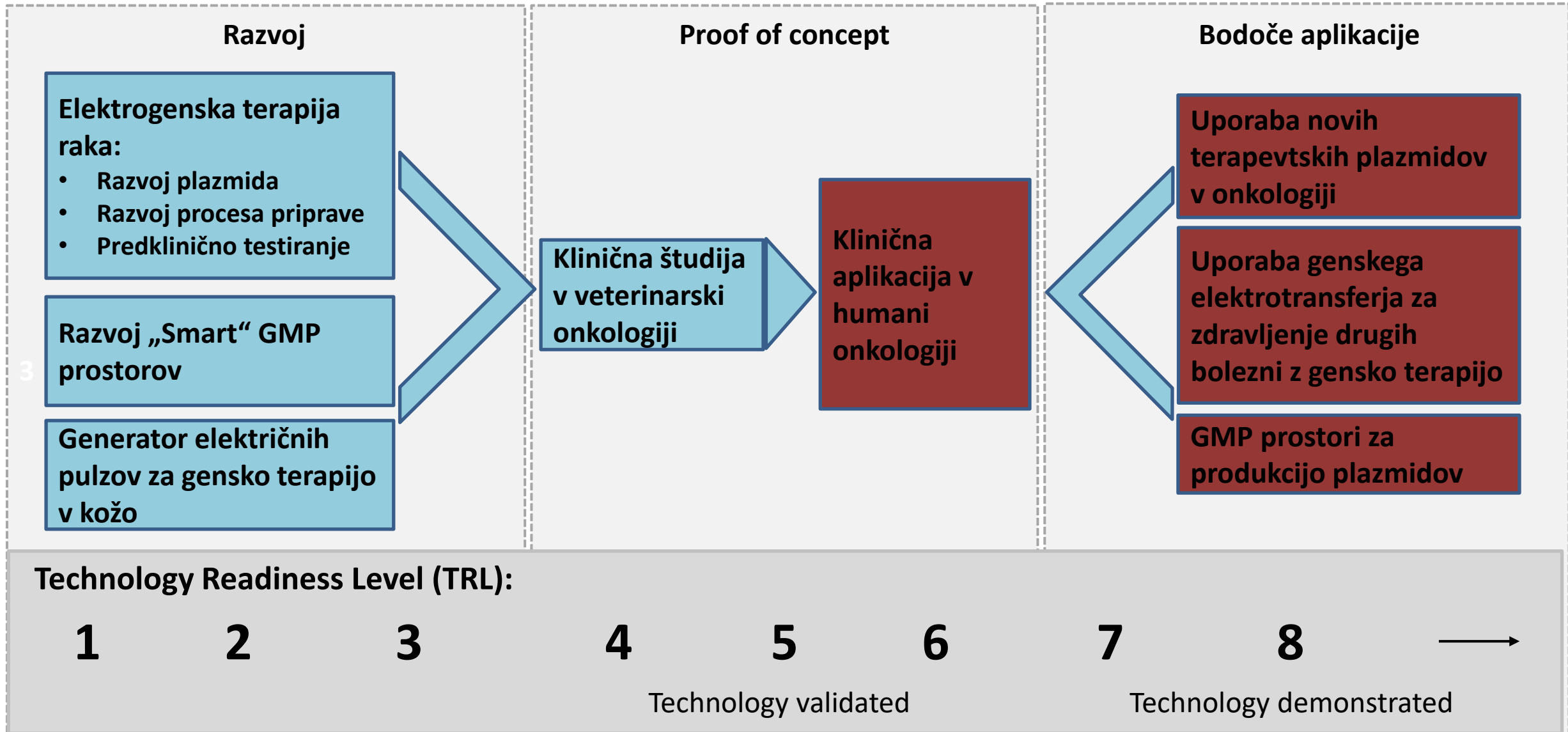
30 days after treatment (day 31)



Ekipa v kirurški dvorani



KAKO OD TU NAPREJ: SmartGene.si



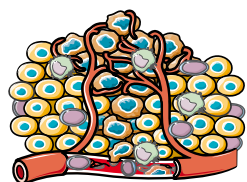
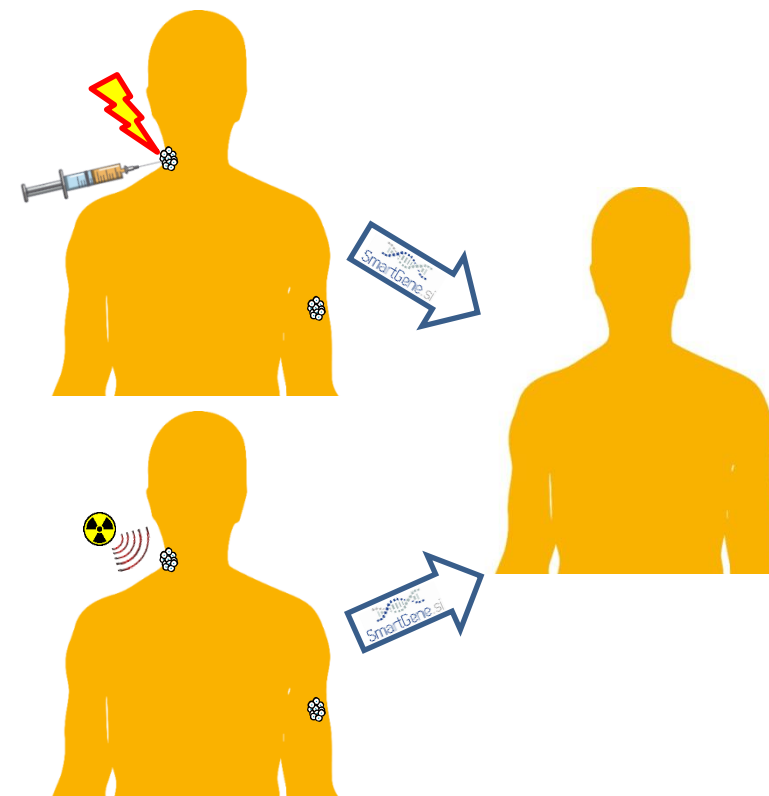
Uporaba v kombinirani terapiji

Kombinacija

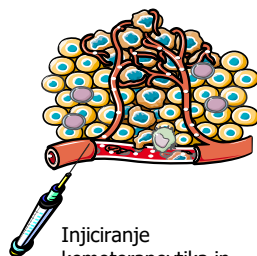
Lokalna ablativna terapija (EKT / RT)
GET plazmida za IL-12 intratumorsko

Cilj

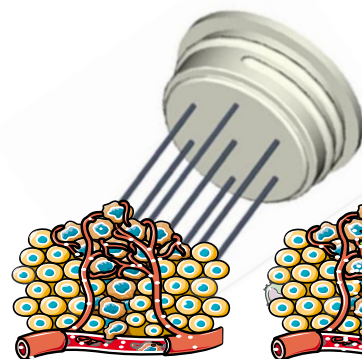
Transformirati lokalno terapijo v loko-regionalno ali sistemsko



Tumor pred zdravljenjem



Injiciranje
kemoterapevtika in
plazmidne DNA



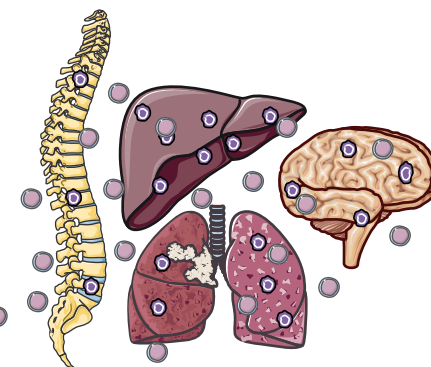
Aplikacija električnih pulzov



Bleomicin ubije celice
IL-12 se izloča iz celic



Umiranje tumorskih
celic zaradi direktnega
in posrednega
imunskega odziva

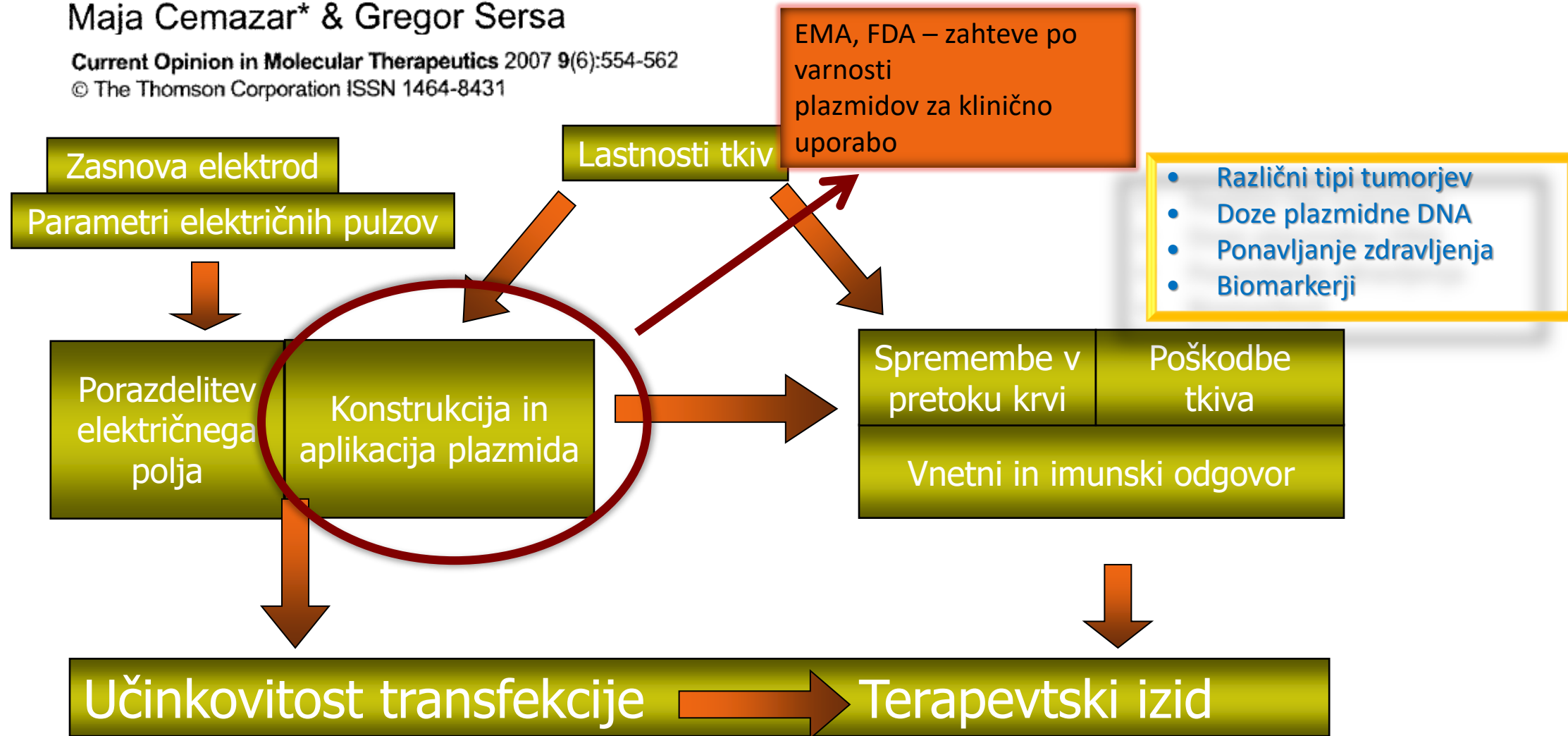


Imunsko delovanje na oddaljene metastaze – abskopalni učinek

Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues

Maja Cemazar* & Gregor Sersa

Current Opinion in Molecular Therapeutics 2007 9(6):554-562
© The Thomson Corporation ISSN 1464-8431



Current Pharmaceutical Design, 2006, 12, 3817-3825

3817



Electrically-Assisted Nucleic Acids Delivery to Tissues *In Vivo*: Where Do We Stand?

M. Cemazar^{1,2}, M. Golzio¹, G. Sersa², MP. Rols¹ and J. Teissié^{1,*}

Institute of Oncology Ljubljana



University of Primorska, Faculty of Health Sciences



ARRS



EBAM European Associated Laboratory (LEA)



COST TD 1104



Bilateral project SI-USA, SI-FR

NIH R01 CA196796 (NCI)



EU projects:

Cliniporator,

ESOPE,

 Angioskin,
Trans2Care

