

Piotr Zaleski*¹, Paweł Wawrzyniak¹, Agnieszka Sobolewska¹,
Grażyna Płucienniczak¹

¹Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2016 r.
Zaakceptowano w lutym 2017 r.

1. Wstęp. 2. Naturalna modyfikacja DNA jako przeszkoda w stosowaniu plazmidów w terapii genowej. 3. Bezpieczeństwo użycia plazmidowego DNA. 4. Wprowadzenie pDNA do komórek eukariotycznych. 5. Los plazmidowego DNA po wprowadzeniu do komórek eukariotycznych. 6. Terapie genowe bazujące na pDNA. 7. Inne kierunki rozwoju terapii genowych opartych na plazmidowym DNA. 7.1 Baktiofekcja. 7.2. Alternatywna terapia genowa (Alternative Gene Therapy – AGT). 7.3. Hydrożele. 7.4. Minikoliste DNA. 7.5. Minicircle DNA. 8. Podsumowanie

Plasmids – vectors for gene therapy

Abstract: The first confirmed transfer of genetic material in human was performed in 1990. Ever since, gene therapy was considered to be one of the best promising treatments of genetic diseases. The *sine qua non* of successful gene therapy are efficient genetic vectors. Recently, the most frequently used vectors in clinical trials for genetic therapies are virus-based and plasmid-based. A range of features makes plasmids useful for gene therapy, however, they have also some characteristics which make it difficult to consider plasmids as ideal vectors. The main goal of this article is to address and describe these unfavourable factors.

1. Introduction. 2. Natural modification of DNA as an obstacle to the use of plasmids for gene therapy. 3. Plasmid DNA usage safety. 4. Plasmid DNA entry into eucaryotic cells. 5. Post-entry fate of plasmid DNA in eucaryotic cells. 6. pDNA-based gene therapies. 7. Alternative routes of development of pDNA-based gene therapies. 7.1. Bactiofection. 7.2. Alternative Gene Therapy – AGT. 7.3. Hydrogels. 7.4. DNA minicircles. 7.5. DNA ministrings. 8. Summary

Słowa kluczowe: plazmidy, terapia genowa, wektory

Key words: plasmids, gene therapy, vectors

1. Wstęp

Jednym z celów badań dotyczących genetyki mikroorganizmów jest wykorzystanie bakteryjnych mobilnych elementów genetycznych (MEG) w biotechnologii lub medycynie. W obydwu dziedzinach najczęściej wykorzystywaną w tych celach grupą bakteryjnych MEG są plazmidy. Stanowią one teoretycznie doskonały materiał do konstruowania narzędzi terapii genowych oraz szczepionek. Występują powszechnie, a ich naturalna zdolność do stabilnego utrzymywania się w komórkach bakteryjnych znacznie ułatwia i przyspiesza ich genetyczne modyfikowanie. Stosunkowo łatwe i tanie jest uzyskiwanie dużych ilości plazmidowego DNA (pDNA) [55]. Zastosowanie wektorów bakteryjnych w biologii molekularnej i biomedycynie zostało wcześniej opisane w pracy Staworzyńskiej i wsp. w 2011 roku [81].

Pierwsze doniesienia o możliwości wykorzystania plazmidowego DNA w terapiach genowych sięgają roku 1990, kiedy to Wolff i wsp. wykazali, że domięśniowe podanie plazmidowego DNA spowodowało ekspresję kodowanego genu (trans genu) [98]. Spowolnienie rozwoju skutecznych terapii genowych zostało spowodowane

przez różne czynniki np. ostre reakcje zapalne na wektory stosowane w terapiach genowych, karcenogenezę czy ograniczony efekt terapeutyczny [83]. Obecnie istnieje szereg jednostek chorobowych, dla których prowadzi się badania kliniczne z wykorzystaniem terapii genowej opartej o plazmidowy DNA np.: nowotwory (czerniak złośliwy, rak trzustki, rak piersi), choroby serca (choroba niedokrwienności kończyn, schorzenia naczyń wieńcowych), choroby zakaźne (HIV, zapalenie wątroby typu B), dziedziczne choroby jednogenu (płasawica Huntingtona, hemofilia) [32, 55].

Wektory wykorzystywane w terapiach genowych można podzielić bazując na trzech kryteriach zaproponowanych przez Ehrhardt i wsp. w 2008 roku. Po pierwsze podział według formy podawanego DNA na: „nagi” DNA lub cząsteczki wiruso-podobne (VLP – virus like particles). Drugie kryterium podziału to zdolność do pozostawania (retencji) w jądrze komórkowym, według którego wektory można pogrupować na te bez zdolności do retencji, na wektory integrujące do chromosomów oraz na wektory pozostające jako pozachromosomowe elementy na terenie jądra. Trzeci sposób podziału to uwzględnienie sposobu utrzymywania się wektorów w komórce (zdolność do replikacji):

* Autor korespondencyjny: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościeńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 378 62 29; e-mail: zaleskip@iba.waw.pl

- integrujące – czyli włączające się w określone miejsce w chromosomowym DNA komórek gospodarza i korzystające z komórkowych mechanizmów replikacji; głównie wektory pochodzenia wirusowego (retrowirusowego lub lentiwirusowego) [25, 85]
- episomalne – czyli pozostające jako niezależne pozachromosomowe elementy na terenie jądra komórkowego; głównie wektory pochodzenia adenowirusowego lub plazmidowego z replikonem wirusowym [25]
- wektory bez zdolności do replikacji – wektory bazujące na plazmidach bez replikonu wirusowego, których liczba kopii po podaniu stopniowo spada w miarę kolejnych podziałów komórkowych; wektory te zapewniają jedynie przejściową ekspresję kodowanego transgenu [25]

Jednak to właśnie ta ostatnia grupa wektorów jest często wykorzystywana w praktyce klinicznej, mimo że pozbawiona zdolności do replikacji w komórkach docelowych i retencji na terenie jądra komórkowego [25]. Konwencjonalny wektor terapeutyczny bazujący na pDNA składa się z dwóch głównych modułów: bakteryjnego i ekspresyjnego. Moduł bakteryjny to fragment wektora zawierający wszystkie elementy niezbędne do utrzymywania się wektora w komórce bakteryjnej. Są to origin replikacji (preferowane są origin typu theta bez białka replikacyjnego np. ColE1) oraz marker umożliwiający selekcję komórek niosących plazmid. Druga część wektora to moduł ekspresyjny. Moduł ten umożliwia ekspresję genu terapeutycznego w docelowych komórkach eukariotycznych. Podstawowymi elementami tego modułu będą sekwencja promotora oraz gen terapeutyczny (GOI – gene of interest). Moduł ten jednak może być dodatkowo uzupełniany o 5'UTR (rejon 5' nie ulegający translacji), introny, fragment poliadenylowy oraz fragment genu kodujący peptyd sygnałny. Peptyd sygnałny zapewnia właściwe kierowanie zsyntetyzowanego białka [68].

Oddzielnym zagadnieniem jest dostarczenie na teren komórki narzędzi do edycji genomu. Przykładem takiego układu może być coraz powszechniej wykorzystywany system – CRISPR/Cas9 [70], którego podstawowa zaleta to możliwość wprowadzania celowanych zmian w genomie. Sam system CRISPR/Cas9 i dynamiczny rozwój jego wykorzystania to temat na oddzielną pracę. W kontekście tego opracowania należy jednak wspomnieć, że komponenty układu CRISPR/Cas9 wymagają wektorów do dostarczenia ich do komórek docelowych. Do tego celu można wykorzystywać modyfikowane wektory pochodzenia wirusowego lub jeden z szeregu nie-wirusowych systemów dostarczania leków (non-viral drug delivery systems).

Niniejsza praca poświęcona jest jednak problemom związanym z wykorzystaniem plazmidów jako wektorów do terapii genowych.

2. Naturalna modyfikacja DNA jako przeszkoda w stosowaniu plazmidów w terapii genowej

Metylacja jest najpowszechniejszym typem naturalnej modyfikacji materiału genetycznego. Została wykryta u przedstawicieli wszystkich grup organizmów od Archebakterii poprzez wirusy aż do kręgowców czy roślin kwiatowych [14]. Metylacja DNA to reakcja przeniesienia grupy metylowej z donora S-adenozyl-L-metioniny (AdoMet) na zasady DNA znajdujące się w specyficznym kontekście genetycznym [37]. Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzną grupę enzymów – metylotransferazy DNA (metylazy DNA).

W przypadku organizmów prokariotycznych wykryto trzy reakcje metylacji dotyczące zasad DNA (metylacja: cytozyny do C5-metylocytozyny; cytozyny do N4-metylocytozyny; adeniny do N6-metyloadeniny) [1]. Natomiast w przypadku organizmów eukariotycznych, u których stwierdzono występowanie metylowanych zasad w DNA, mamy do czynienia przede wszystkim z modyfikacją cytozyny do C5-metylocytozyny [1] oraz wykrywaną u niższych eukariotów metylacją adeniny do N6-metyloadeniny [78]. Wynikająca z rozbieżności prokariotycznych i eukariotycznych systemów modyfikacji DNA różnica w metylacji określonych zasad w DNA stanowi jedną z barier w wykorzystaniu plazmidów do celów terapeutycznych u ludzi. Zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych metylacja DNA dotyczy zawsze zasad znajdujących się w charakterystycznym kontekście genetycznym (tzw. sekwencji rozpoznawanej przez daną metylazę). W przypadku wyższych kręgowców (np. ssaków) występuje tylko metylacja cytozyny do C5-metylocytozyny i to głównie w kontekście dinukleotydu cytozyna-guanina (CpG). Ponadto, rozmieszczenie metylowanych miejsc CpG jest nierównomierne w poszczególnych genomach ssaczy. Około 60–80% miejsc CpG pozostaje zmetylowanych [46], możliwe jest jednak odnalezienie regionów bogatych w miejsca CpG pozbawione metylacji. Są to wyspy CpG (CGIs) [21]. Obecność takich miejsc ma znaczenie w regulacji ekspresji genów, szczególnie w kontekście długookresowej represji transkrypcji (wyciszenie ekspresji) [41]. W organizmach prokariotycznych metylacja DNA związana jest przede wszystkim z systemami restrykcji-modyfikacji, a metylacja DNA odpowiedzialna za regulację ekspresji genów opiera się głównie na metylacji adeniny do N6-metyloadeniny (metylazy typu Dam i CCRm) [15]. Dużo słabiej poznana jest rola metylacji cytozyny (C5-metylocytozyny) w fizjologii bakterii [78]. Materiał genetyczny pochodzenia bakteryjnego stanowi sygnał alarmowy dla układu immunologicznego organizmów wyższych. Receptory komórek układu immunologicznego rozpoznają obce, związane z patogenami wzory molekularne np. lipopolisacharydy powierzchniowe

Tabela I

Liczba sześci nukleotydowych sekwencji potencjalnie immunogennych – tzw. miejsc CpG o odmiennym wzorze metylacji w komórkach bakteryjnych i w komórkach eukariotycznych (wiersze górne); liczebność miejsc CpG o znanym efekcie immunostymulującym (dolne wiersze) w plazmidach znalezionych w szczepie *K. pneumoniae* 287-w i w popularnych wektorach plazmidowych (szczegóły w tekście)

Sekwencje potencjalnie immunogenne (ISS)	pIGRK	pIGMS31	pIGMS32	pUC19	pBR322
RRCGY	0	2	43	14	27
GTCGY	2	0	21	6	11
RRCGT	0	2	17	9	15
Całkowita liczba potencjalnych sekwencji ISS	2	4	81	29	53
Immunostymulujące miejsca CpG (CpG-S)					
AACGTT (CpG-S) ¹	0	0	1	2	4
GACGTT (CpG-S) ¹	0	1	5	1	1
Całkowita liczba CpGs	0	1	6	3	5

¹ – sekwencje, których efekt immunostymulacyjny został oznaczony przez Krieg i wsp. [52]

lub kwasy nukleinowe (receptory TLR3, TLR7/8 i TLR9 związane z organellami wewnątrzkomórkowymi: retikulum endoplazmatycznym, endosomami i lizosomami) [77]. TLR9 to receptor rozpoznający DNA zawierający niemetylowane miejsca CpG [5]. Historia wykrycia motywów CpG, ich charakterystyka oraz określenie roli w odróżnianiu swoich komórek od komórek patogenów została wyczerpująco opisana w pracy Arthura M. Kriega z 2002 roku [51]. Podsumowując, w DNA bakteryjnym występują niemetylowane dinukleotydy cytozyna-guanina (CpG). Motywy CpG pozostają natomiast w znacznej większości zmetylowane w przypadku DNA komórek eukariotycznych. Immunostymulacyjny efekt bakteryjnego DNA na komórki eukariotyczne został wykryty w roku 1984 przez Tokunagę i wsp. [86]. Przyczyną immunostymulacji komórek odpornościowych w zetknięciu z DNA bakteryjnym jest stopień metylacji miejsc CpG oraz występowanie niemetylowanych dinukleotydów CpG położonych w charakterystycznym kontekście genetycznym. Pierwsze doniesienia dotyczące tego zjawiska sugerowały, że sekwencjami immunostymulacyjnymi (immunostimulatory sequences – ISS) są motywy złożone według poniższego schematu: puryna-puryna-CG-pyrimidyna-pyrimidyna [53]. Opierając się na tym schemacie udowodniono, że najbardziej immunostymulacyjnie działa na komórki ludzkie sekwencja 5'-GTCGTT [39].

Identyfikacja ISS pozwoliła na wykorzystanie inżynierii genetycznej w celu zredukowania liczby motywów CpG w obrębie danego plazmidu. Skutkowało to znacznym obniżeniem indukcji cytokin prozapalnych [102]. Dlatego też, konstruowano wektory pDNA, w których duże fragmenty naturalnego plazmidu zostały zamienione na syntetyczne fragmenty pozbawione motywów CpG [101]. Drugim kierunkiem jest poszukiwanie naturalnych plazmidów o niskim procencie par GC w DNA. Plazmidy takie jak np. wyizolowane ze szczepu *Klebsiella pneumoniae* 287-w pIGMS31 (32,7% GC) i pIGRK

(33,4% GC) [79] będą bowiem z natury pozbawione immunogennych miejsc CpG. W porównaniu do popularnie stosowanych wektorów plazmidowych czy nawet innych plazmidów izolowanych z tego samego szczepu (pIGMS32) posiadają one znacznie mniejszą liczbę miejsc potencjalnie immunogennych (Tab. I).

Wykazano, że nawet obecność jednego miejsca CpG może być wystarczająca do wywołania odpowiedzi zapalnej. Możliwe jest osiągnięcie przedłużonej ekspresji transgenu bez wywoływania odpowiedzi zapalnej na bazie wektorów pozbawionych miejsc CpG (CpG-free vector) [44, 64]. Zostało to potwierdzone poprzez badania nad wektorami o obniżonej zawartości miejsc CpG, które były w stanie zapewniać przedłużoną ekspresję kodowanego transgenu [64, 60]. Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia wskazujące, że całkowite usunięcie miejsc CpG może wpływać na obniżenie poziomu transkrypcji genu, którego wyrażanie jest celem terapeutycznym [6]. Ekspresja transgenu może być wyciszana poprzez obecność elementów pochodzących z bakteryjnych plazmidów [13]. Wykazano również, że istotne dla ekspresji transgenu jest nie tyle usuwanie wszystkich miejsc CpG, co optymalizowanie częstości wykorzystywanych kodonów (codon usage optimization) [50].

Istnienie związku metylacji DNA z aktywacją odporności wrodzonej stanowi znaczącą przeszkodę przy stosowaniu opartych na pDNA terapii genowych, których celem ma być podtrzymanie długotrwałego poziomu ekspresji transgenu. Z drugiej strony może być zaletą przy immunizacji opartej na pDNA [29].

3. Bezpieczeństwo użycia plazmidowego DNA

Wektory adenowirusowe, wektory retrowirusowe oraz plazmidy są najpowszechniej wykorzystywanymi wektorami dostarczającymi geny (gene delivery

vectors) w próbach klinicznych nowych terapii genowych [96]. Istnieje podział na zwolenników stosowania w terapiach genowych wektorów pochodzenia wirusowego (viral gene delivery systems) [27, 70] oraz badaczy twierdzących, że stosowanie takich wektorów jest ryzykowne. Ci drudzy poszukują innych sposobów wydajnego dostarczania egzogennej materiału genetycznego np. „nagiego DNA” (naked DNA) często w postaci odpowiednio przygotowanego plazmidu, jako części niewirusowych narzędzi transferu genów (non-viral gene delivery systems). Definicja ta obejmuje również inne formy terapeutycznych kwasów nukleinowych np.: krótki informujący RNA (siRNA), antysensowne oligonukleotydy czy mikroRNA (miRNA), czyli cząsteczki ingerujące w ekspresję genów na poziomie post-transkrypcyjnym lub translacyjnym [94]. Za stosowaniem plazmidowego DNA w terapii genowej przemawia szereg argumentów. Po pierwsze wektory konstruowane na bazie retrowirusów mogą powodować mutacje insercyjne w procesie integracji do genomowego DNA [38]. Drugim zagrożeniem przy stosowaniu wektorów pochodzenia wirusowego może być odtwarzanie się cząsteczek wirusowych ponownie zdolnych do replikacji [9]. Obawa przed mutacjami insercyjnymi jest nadal jedną z głównych przeszkód przy stosowaniu wektorów integrujących. Zjawisko to obserwowano w przypadku ich długiego stosowania [11, 12, 22] lub gdy mutacje insercyjne łączyły się z nabytymi mutacjami somatycznymi [43]. Wektory plazmidowe nie kodują innych antygenów niż sam produkt transgenu. To daje przewagę nad wektorami wirusowymi, przeciwko którym może być kierowana odpowiedź immunologiczna, szczególnie w przypadku konieczności kolejnych podań. Ponadto, wektory wywodzące się z powszechnych ludzkich patogenów mogą napotykać przeciwciała indukowane przez uprzednie infekcje, co będzie interferowało z samą terapią (transferem genu) [72].

Istotnym zagadnieniem jest stopień czystości podawanego pDNA. Podawanie domięśniowo u myszy niektórych preparatów pDNA powodowało martwicę mięśni oraz ich późniejszą regenerację. Z kolei inne preparaty DNA nie powodowały żadnych zmian. Zjawisko to nie miało związku z sekwencją plazmidu, jego wielkością czy kodowanymi genami. Wykazano, że wynikało to z równoczesnego podawania fragmentów bakteryjnego DNA genomowego, którym zanieczyszczony był pDNA. Dlatego też kluczowe w terapii genowej z wykorzystaniem pDNA jest dopracowanie procedur izolacji i oczyszczania [55, 99].

Jeszcze inną kwestią jest konstrukcja wektorów plazmidowych z zastosowaniem markerów selekcyjnych innych niż geny oporności na antybiotyki. Zastosowanie genów oporności na antybiotyki nie jest akceptowane w badaniach klinicznych ze względu na ryzyko

rozprzestrzeniania się genów opornościowych w środowisku na drodze horizontalnego transferu genów [90]. Kwestie wykorzystania markerów selekcyjnych i wykorzystania antybiotyków przy projektowaniu i wykorzystywaniu DNA w terapii ludzi są opisywane i regulowane przez odpowiednie organy kontrolne: WHO (Światową Organizację Zdrowia) [95], EMA (Europejską Agencję Leków) [28] czy FDA (amerykańska Agencja Żywności i Leków) [89]. Organizacje te są zgodne, co do zakazu stosowania genów kodujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe, zaś generalna wytyczna zaleca bardzo ostrożne i przemyślane stosowanie markerów selekcyjnych wykorzystujących oporność na antybiotyki. Stosowanie terapii opartych na transferze materiału genetycznego jest również opisane w Europejskiej Farmakopei [26]. Same wytyczne dotyczące dobrych markerów selekcyjnych używanych do konstrukcji plazmidowych wektorów do terapii genowych zostały zaproponowane przez Vandermeulen i wsp., w 2011 roku [90] i są to:

- Plazmid nie powinien zapewniać żadnej korzyści gospodarzowi, a w przypadku horizontalnego transferu genów nie może dotyczyć komórek biorcy – ten warunek w zasadzie wyklucza wykorzystanie genów oporności na antybiotyki
- Marker selekcyjny nie powinien znacznie zwiększać wielkości całego plazmidu oraz nie powinien indukować odpowiedzi immunologicznej
- Marker nie może być toksyczny dla komórek eukariotycznych
- Stabilne utrzymywanie plazmidu nie może być związane z występowaniem szkodliwych dla komórek eukariotycznych czynników, lub bardzo czułe metody muszą być stosowane w celu potwierdzenia ich całkowitego usunięcia
- Ilość uzyskiwanego plazmidowego DNA musi być wydajna bez względu na wielkość prowadzonej hodowli bakteryjnej.

W świetle takich założeń optymalizacja wektorów zarówno do terapii genowych jak i do szczepionek DNA to również proces zastępowania markerów selekcyjnych opartych na genach kodujących oporność na antybiotyki. Szereg strategii bazujących na modyfikowaniu zarówno plazmidów jak i szczepów bakteryjnych został opracowany na przestrzeni ostatnich lat. Są to np.: systemy pCor/pFAR (bazujące na plazmidach z dziką wersją niezbędnego dla komórki genu zmutowanego w chromosomie bakterii); minikoliste DNA (koliście zamknięta kasetka ekspresyjna pozbawiona szkieletu plazmidowego); technologia pORT (plazmid niosący miejsce operatorowe wiążące represor, przy braku plazmidu represor blokuje ekspresję kluczowego genu w chromosomie zmodyfikowanego szczepu bakteryjnego); selekcje bazujące na oddziaływaniach RNA/RNA [68]. Wybór układów uzależniających

szczep bakteryjny od niesionego plazmidu, a niebazujących na antybiotykooporności został szczegółowo omówiony w pracy Wright'a i wsp. [100]. Pewne jest, że wszystkie te strategie będą preferowane w celu dalszego ograniczania rozprzestrzeniania się genów antybiotykooporności [68].

Wektory nie-wirusowe, które mają wejść do użytku komercyjnego i stosowania klinicznego muszą być dobrze scharakteryzowane pod kątem skalowania procesu ich produkcji i długoterminowego przechowywania. Zaletą plazmidowych wektorów jest łatwość i niski koszt ich produkcji na dużą skalę. Sytuacja ta może ulec zmianie wraz ze wzrostem skomplikowania tych wektorów np. dołączania elementów stabilizujących czy specyficznych względem celu ligandów kierujących [92].

Zagadnieniem nadal słabo poznanym jest kwestia pozostawiania i akumulacji biomateriałów w organizmie. Postuluje się, że taka sytuacja może indukować stany zapalne, a nawet być toksyczna [92].

4. Wprowadzenie pDNA do komórek eukariotycznych

Metody wprowadzania egzogenego materiału genetycznego do tkanek, organów czy komórek w terapii genowej można podzielić na dwa główne rodzaje: wirusowe metody transferu materiału genetycznego (viral gene delivery methods) i nie-wirusowe metody transferu materiału genetycznego (non-viral gene delivery methods). Każda z metod wykorzystywanych do transferu egzogenego materiału genetycznego staje się przedmiotem rozlicznych opracowań. Poniżej przytoczono wybrane pozycje:

- metoda hydrodynamiczna [8]
- działo genowe [47]
- elektroporacja plazmidowym DNA [62]
- sonoporacja [87]
- metody chemiczne jak np. łączenie pDNA z lipidami kationowymi [88]

Metodyka wprowadzania nie-wirusowego materiału genetycznego do komórek eukariotycznych jest przedmiotem wyczerpującego opracowania z 2013 roku [94]. Z tej pracy zaczerpnięto i rozwinięto Tabelę II podsumowującą nie-wirusowe metody transferu materiału genetycznego stosowane w terapiach genowych.

Sam dobór odpowiedniej metody wprowadzania egzogenego materiału genetycznego (transfekcji) do komórek eukariotycznych jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników. Dodatkową komplikacją jest również wybór konformacji transfekowanego DNA. Generalnie kuliście zamknięte cząsteczki DNA wykazują wyższą efektywność transfekcji, natomiast liniowe fragmenty DNA (np. plazmidy poddane działaniu endonukleaz restrykcyjnych) wykazują lepszą sta-

bilność w eksperymentach *in vivo* i *in vitro*. Dodatkowo eksperymentalnie wykazano, że transfekcja kompleksami liniowy DNA-liposom zachodzi z niższą wydajnością i wymaga dodatkowych zabiegów, na przykład neutralizacji ujemnego ładunku obecnego na powierzchni błon komórkowych [93]. Liniowe fragmenty DNA są wykorzystywane do uzyskania stabilnych linii komórkowych po transfekcji, jeśli nie powiodła się transfekcja z wykorzystaniem kuliście zamkniętej cząsteczki DNA. Takie podejście może zwiększyć nawet o 3 rzędy częstość integracji chromosomowej egzogenego fragmentu DNA. Wykazano, że liniowe fragmenty DNA znacznie łatwiej integrują do chromosomu [82].

5. Los plazmidowego DNA po wprowadzeniu do komórek eukariotycznych

Dla skutecznej terapii genowej niezwykle ważny jest los wprowadzonego, egzogenego materiału genetycznego w obrębie transfekowanej komórki lub w tkankach/organach będących celem terapii.

Wprowadzenie plazmidowego DNA domięśniowo u świń powodowało pojawienie się pDNA w krwiobieg, ale na stosunkowo niskim poziomie, około 10% całego podanego pDNA, przy czym najwyższe stężenie osiągnięte było 15 minut po podaniu, a następnie drastycznie spadało [36]. Wykazano również, że plazmidowy DNA znajdujący się w krwiobieg jest dosyć szybko degradowany przez nukleazy znajdujące się we krwi: 20,9% po 10 minutach od domięśniowej iniekcji, 34% po godzinie, 86,6% po jednym dniu i prawie całkowite usunięcie (97,8%) po jednym tygodniu [104].

Wykorzystanie egzogenego pDNA w terapii genowej, lub jako części szczepionki wymaga ekspresji genu sklonowanego na plazmidzie. Najkorzystniejsze jest dostarczenie i skumulowanie DNA w jądrze komórkowym. Nie jest to jednak łatwe do osiągnięcia, z powodu powolnego wnikania „nagiego DNA” czy kompleksów lipidowo-DNA (lipopleksów) do komórki. Ponadto, wprowadzany materiał genetyczny może być przechwytywany przez przedziały endolizosomalne i degradowany w lizosomach [57]. Plazmidowy DNA musi pokonać trzy główne bariery: błonę komórkową, cytoplazmę oraz błonę jądrową [29]. Na drodze pasywnej dyfuzji do jądra przenikać mogą jedynie cząsteczki o ciężarze molekularnym do 45 kDa (co przekłada się na wielkość około 300 par zasad). Cząsteczki większe (a tu zaliczyć trzeba większość wektorów plazmidowych) wnikać mogą jedynie w czasie podziału mitotycznego, kiedy to błona jądrowa przejściowo traci swą integralność. Należy jednak pamiętać, że transfekcja *in vivo* dotyczy głównie komórek wolno dzielących się lub już w pełni zróżnicowanych [92]. Ponadto, plazmidowy DNA jest wrażliwy na działanie nukleaz cytoplazmatycznych,

Tabela II
Podsumowanie nie-wirusowych metod transferu materiału genetycznego w terapiach genowych, na podstawie [94]

Metoda wprowadzenia materiału genetycznego	Zasada aplikacji	Główne zalety metody	Ograniczenia
Metody fizyczne			
Mikroiniekcja	wykorzystanie mikropipety do bezpośredniego wprowadzenia materiału genetycznego do pojedynczej komórki	Prosta, efektywna, powtarzalna, umożliwia wprowadzenie DNA wielkocząsteczkowych	Nie ma zastosowania do transfekcji dużej liczby komórek
Iniekcja igłowa	proste nastrzyknięcie DNA bezpośrednio w obręb docelowej tkanki (mięsień, wątroba, skóra, mózg)	Prosta i bezpieczna	Niska wydajność
Iniekcja ciśnieniowa	DNA wprowadzany jest w postaci zawiesiny wstrzelwanej pod ciśnieniem	Bez-igłowa, łatwa do kontrolowania, bezpieczna	Niska wydajność, czasem zdarzają się przypadki uszkodzenia tkanek
Strzelba genowa	Opłaszczony DNA cząstki metali ciężkich zostają pod ciśnieniem wstrzelone na kilka mm w głąb tkanki	Bezpieczna i wydajna	Uszkadza tkanki
Elektroporacja	Wykorzystanie impulsu prądu elektrycznego powodującego powstanie przejściowych nanoporów w błonie komórkowej docelowych komórek	Bardzo wydajna, powtarzalna, ukierunkowany transfer genów, daje możliwość wprowadzania DNA wielkocząsteczkowego	Ograniczenia zasięgu podania uniemożliwia stosowanie na dużej powierzchni; wymaga ingerencji chirurgicznej w przypadku stosowania organów wewnętrznych; stabilność genomowego DNA może być zaburzona na skutek stosowania wysokiego napięcia
Sonoporacja	Wykorzystuje ultradźwięki do wywołania przejściowego stanu przepuszczalności błon komórkowych	Bezpieczna, nieinwazyjna, zdolna do wprowadzania DNA do organów wewnętrznych bez ingerencji chirurgicznej; możliwa do stosowania przy przekraczaniu bariery krew-mózg	Niska wydajność
Hydrodynamiczny transfer genów	Wykorzystuje wysokie ciśnienie hydrostatyczne jako siłę wprowadzającą materiał genetyczny do organów wewnętrznych	Prosta, powtarzalna, bardzo wydajna (szczególnie w przypadku stosowania do komórek wątroby)	Iniekcja wymaga dużej objętości, co ogranicza stosowanie kliniczne
Wmasowanie	Dożylne podanie DNA a następnie mechaniczne masowanie organu docelowego powodujące lekkie uszkodzenie błon umożliwiające transfer DNA	Prosta i bezpieczna	Niska wydajność; wykazane tylko w przypadku komórek wątroby
Metody chemiczne			
Lipidy kationowe	Wykorzystanie kompleksów związków chemicznych i DNA do tworzenia liposomów, które mogą być wchłonięte przez komórki	Łatwe do przygotowania, tanie, wysoka wydajność <i>in vitro</i>	Toksyczna; niska wydajność <i>in vivo</i>
Polimery kationowe	Tworzenie kompleksów polimeru kationowego z DNA – (polipleksu) wchłanianego przez komórkę i uwalnianego w jej wnętrzu	Łatwe do przygotowania i modyfikowania, tania, bardzo wydajna	Toksyczna, niektóre polimery nie są biodegradowalne

co daje okres półtrwania pDNA w niektórych liniach komórkowych tylko do 1–2 godzin [57].

Stosowanie elektroporacji umożliwiło monitorowanie rozprzestrzeniania się znakowanego DNA w komórce [35, 74]. Egzogenny pDNA wprowadzony na teren komórki w zależności od wielkości może zachować

prawie niezmienną mobilność (około 3 do 4 razy mniejszą niż w wodzie), lecz dotyczy to tylko małych cząsteczek (w zakresie 500–750 Da). Mobilność w cytoplazmie gwałtownie spada wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki, w związku z tym mobilność wolnych plazmidów w cytoplazmie praktycznie nie istnieje [20].

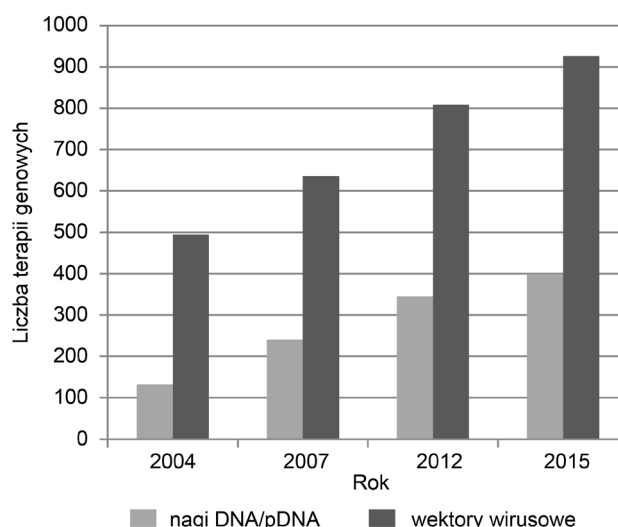
Dlatego też, aby plazmidowy DNA mógł być transportowany przez cytoplazmę musi wykorzystywać szkielet mikrotubulowy oraz białka z nim związane [91]. Niedawno wykazano oddziaływania pomiędzy pDNA wprowadzonym do komórki na drodze elektroporacji a dyneinami (białkami motorycznymi) [4]. Jednak pDNA nie wiąże się bezpośrednio z tymi białkami lecz pośrednio poprzez dodatkowe białka. Plazmidowy DNA jest w komórce aktywnie transportowany bazując na mikrotubulach – szybki transport. Natomiast powolny transport aktywny plazmidowego DNA odbywa się wzdłuż filamentów aktynowych [74].

Zagadnienie wydajnego wnikania materiału genetycznego do komórek eukariotycznych wymaga opracowania nowych metod monitorowania tego procesu np. metod bazujących na cytometrii przepływowej. Metody te są wykorzystywane przy projektowaniu i testowaniu biomateriałów (np. polimeru 447) dla nowej generacji nie-wirusowych wektorów do transferu genów (next-generation non-viral gene delivery vectors) [7].

Oddzielną kwestią jest stabilność ekspresji transgenu, co stanowi samo w sobie cel terapii. Od ponad dwudziestu lat znane są raporty pokazujące, że po wprowadzeniu „nagiego DNA” do mięśni, mózgu czy wątroby niektóre plazmidy mogą pozostawać w formie episomalnej (nie włączając się do chromosomowego DNA komórek gospodarza) dając niski poziom ekspresji nawet przez 6 miesięcy [45, 97, 103]. W związku z tym dokładne zrozumienie mechanizmów stojących za wyciszaniem ekspresji z episomalnych wektorów jest niezbędne do tworzenia skutecznych terapii opartych na wektorach nie-wirusowych. Stosowane są różne sposoby mające na celu przedłużenie czasu, w jakim transgen jest ekspresjonowany. Przykładem może być konstrukcja układu złożonego promotora/wzmacniacza (enhancera) w otoczeniu minigeny dla ludzkiego czynnika IX. W ten sposób ekspresję tego czynnika utrzymano w mysich komórkach wątroby przez 18 miesięcy. Było to pierwsze doniesienie o utrzymującej się ekspresji na poziomie terapeutycznym [63].

6. Terapie genowe bazujące na pDNA

Według informacji uzyskanych z bazy danych dostępnej na stronie The Journal of Gene Medicine Clinical Trial [32] prowadzonych w tej chwili jest ponad 2000 prób klinicznych dotyczących terapii genowych z czego około 18% (prawie 400) wykorzystuje wektory oparte na pDNA. Tym samym pDNA jest trzecim najczęściej wykorzystywanym w terapiach genowych typem wektora (po wektorach adenowirusowych i wektorach retrowirusowych). Dynamikę przyrostu terapii genowych wchodzących w fazę badań klinicznych prezentuje Rys. 1.



Rys. 1. Przyrost ilości terapii genowych w fazie badań klinicznych opartych na wektorach

Uwzględniono wektory wirusowe (Adeno+Retro- wirusowe) oraz wektory „nagi”/plazmidowy DNA na przestrzeni lat 2004–2015. Na podstawie prac [23–24, 32–33].

Dynamika wzrostu terapii genowych opartych na bazie „nagiego DNA” i plazmidowego DNA (pDNA) szczególnie widoczna była w latach 2004–2012 [23–24, 32–33].

W ciągu ostatniej dekady opublikowano szereg raportów dotyczących poszczególnych etapów badań klinicznych dla różnych jednostek chorobowych. Badania na modelach zwierzęcych prowadzone były przykładowo dla: choroby niedokrwiennej kończyn [49], choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego [76], choroby Parkinsona w modelu wykorzystującym małpy naczelnne [48]. Ważniejsze jest jednak, że prowadzi się badania kliniczne nad terapiami genowymi opartymi o zastosowanie plazmidowego DNA u ludzi. Dostępne są raporty z badań klinicznych dotyczących cukrzycy z polineuropatią [73]. W 2013 roku ukazało się pierwsze opracowanie dotyczące leczenia czerniaka skóry poprzez bezpośrednie wstrzykiwanie plazmidowego DNA kodującego gen dla antyangiogenego peptydu metargidyny (AMEP) w miejsca zmian nowotworowych [80]. Plazmidowy DNA był wykorzystywany zwłaszcza w próbach leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego ze względu na możliwość wprowadzania pDNA do mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych [84]. Podawanie domięśniowe zostało wykorzystane w leczeniu bolesnych neuropatii obwodowych u chorych z cukrzycą. Podawany był pDNA (VM202) niosący gen HGF-X7 dla dwóch izoform czynnika wzrostu hepatocytów (HGF). Badania te dotyczyły fazy 1/2 badań klinicznych [2]. Ten sam plazmid VM202 również ekspresjonujący HGF został dwa lata wcześniej wykorzystany w fazie I badań klinicznych dotyczących bezpieczeństwa stosowania pDNA do leczenia pacjentów z chorobą niedokrwinną kończyn [40]. Ekspresja genu dla HGF umożliwiła rów-

niez leczenie chorób tętnic obwodowych (peripheral arterial disease – PAD). W tych próbach klinicznych wykorzystano komercyjny plazmid pVAX1 jako wektor do klonowania genu dla HGF [61].

Podjęto również szereg prób wykorzystania genu dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor – VEGF) w terapiach genowych skierowanych na leczenie schorzeń niedokrwiennych. Terapie polegały głównie na iniekcjach pDNA kodującego gen dla VEGF bezpośrednio do rejonu zawału mięśnia sercowego. Przeprowadzono ponad 20 prób klinicznych, które wykazywały poprawę ukrwienia rejonów zmienionych chorobowo, ale tylko na wczesnych etapach terapii [34]. Podobnie można podsumować wyniki przeprowadzanej w Polsce próby klinicznej wykorzystania plazmidu pVIF kodującego dwa geny: dla VEGF i dla czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor – FGF) do leczenia choroby niedokrwiennej serca. Pomimo odczuwalnej przez pacjentów poprawy, nie wykazano istotnych zmian ukrwienia mięśnia sercowego [54].

Według aktualnych doniesień z bazy danych badań klinicznych, w Polsce prowadzone są badania nad pięcioma terapiami genowymi bazującymi na plazmidowym DNA. Są to badania nad terapiami w leczeniu guzów układu pokarmowego; guzów mózgu, raka sromu oraz dwa programy dotyczące leczenia chorób kardiologicznych [32].

7. Inne kierunki rozwoju terapii genowych opartych na plazmidowym DNA

Oprócz wspomnianych w tej pracy metod terapii genowych opartych na pDNA podejmowane są też badania mające na celu znalezienie odmiennych sposobów podawania pDNA lub wytwarzania nowych wydajniejszych form terapeutycznego DNA. Każde z prezentowanych poniżej podejść może być przedmiotem oddzielnej pracy przeglądowej i stąd ograniczanie tematu tylko do zasygnalizowania odmiennych ścieżek badawczych.

7.1. Baktofekcja

Baktofekcja to wykorzystywanie żywych bakterii do bezpośredniego transferu materiału genetycznego do docelowego organizmu, organu lub tkanki [30, 69]. Taka metoda wykorzystana była do eksperymentalnej terapii w modelu nowotworowym opartej na podawaniu szczepu *Salmonella* niosącego plazmidy ekspresujące geny dla różnych cytokin [3]. Wykazano jednak, że baktofekcja jest bardziej wydajna w przypadku podawania genetycznie modyfikowanego szczepu *Escherichia coli* do błon śluzowych okrężnicy lub płuc [10, 56]

7.2. Alternatywna terapia genowa (Alternative Gene Therapy – AGT)

Innym sposobem wykorzystania szczepów bakteryjnych w terapiach genowych jest tzw. alternatywna terapia genowa (AGT). Polega ona na wykorzystaniu genetycznie modyfikowanych szczepów bakteryjnych do ekspresji i wydzielania terapeutycznych białek bezpośrednio w organizmie gospodarza [30]. Niezwykle istotne w tym kontekście były badania Loessnera i wsp., które wykazały możliwość regulowania ekspresji genu dla terapeutycznego białka z plazmidu *in vivo* [58].

7.3. Hydrożele

Hydrożele to trójwymiarowe, usieciowane układy polimerów, które mogą być wykonane z dowolnego polimeru rozpuszczalnego w wodzie. Ta dowolność daje możliwość wykorzystania ich szerokich własności fizyko-chemicznych. Ponadto hydrożele mogą być formowane w różne postacie: płytki, powłoki, filmy, mikro i nano cząsteczki. Dlatego też hydrożele znalazły szerokie zastosowanie w praktyce klinicznej i biomedycynie doświadczalnej: do tworzenia implantów biomedycznych, w inżynierii tkankowej, bionanotechnologii oraz do opracowywania nowych sposobów podawania leków. Porowata struktura umożliwia, bowiem lokowanie np. leku w matrycy żelowej, a następnie planowe jego uwalnianie ze znaną dynamiką zależną od współczynnika dyfuzji. Ponadto powolna elucja pozwala na zachowanie lokalnie wysokiego stężenia uwalnianego preparatu w otaczających tkankach nawet przez dłuższy czas [42]. Bazując na tym zjawisku, wykorzystanie hydrożeli do terapii genowych polega właśnie na kontrolowanym w czasie wydzielaniu terapeutycznego materiału genetycznego do otaczającego środowiska. Tym samym zapewnia się przedłużoną ekspresję transgenu, zmniejsza się ilość koniecznych dawek i obniża się toksyczność terapii dla innych organów (niebędących bezpośrednimi celami terapii) [16–17].

7.4. Minikoliste DNA

Inne proponowane podejście to wykorzystanie syntetycznych, małych, kolistych zamkniętych cząsteczek DNA czyli mcDNA (minicircle DNA vectors) uzyskiwanych na bazie pDNA. Dotychczas oczyszczanie wektorów mcDNA było procesem bardzo pracochłonnym oraz wieloetapowym, polegającym na wycinaniu i oczyszczaniu odpowiednio przygotowanych fragmentów plazmidów. Jednak wykorzystanie systemów rekombinacyjnych pochodzenia prokariotycznego (głównie fagowego) znacznie usprawniło cały proces [67]. Darquet i wsp., w dwóch pracach z lat 1997 i 1999 po raz pierwszy wykazali, że

zastosowanie mcDNA pozwalało na uzyskanie znacznie wyższego poziomu ekspresji transgenu w porównaniu z macierzystym plazmidem, lub z innym wektorem niosącym ten sam transgen [18–19]. Według badaczy mcDNA powinno zapewniać ciągłą i specyficzną względem celu (in-targeted) ekspresję transgenu [31]. Ponadto, mcDNA łatwiej jest wprowadzać do komórek eukariotycznych uznanych za trudno transformowalne np. neuronalne komórki macierzyste (neural stem cells – NCS), w porównaniu do pDNA [59]. Jako główne zalety mcDNA uznaje się fakt, że nie posiadają fragmentów pochodzenia bakteryjnego (origin replikacji, marker selekcyjny), są mniej immunogenne oraz mniejsze [66].

7.5. Mininici DNA

Podobny kierunek rozwoju prezentuje poszukiwanie bardziej wydajnych wektorów do transferu genów. Konstruuje się mini nici DNA (DNA ministrings), czyli małe, liniowe, kowalennie zamknięte fragmenty DNA zawierające jedynie transgen, a pozbawione zupełnie sekwencji pochodzenia bakteryjnego. Są to w zasadzie tylko kasety ekspresyjne. Postuluje się, że takie terapie mogą być bezpieczniejsze od tych wykorzystujących plazmidy i inne koliste wektory DNA [65]. W przypadku komórek wolno-dzielących się mininici DNA są lepiej pobierane (większa wydajność transfekcji) oraz wykazują wyższy poziom ekspresji genu terapeutycznego. Uważa się, że mininici DNA są bezpieczniejsze w stosowaniu ze względu na swoją niższą immunogenność oraz znacznie mniejszą tendencję do integracji do genomu gospodarza [65].

8. Podsumowanie

Począwszy od pionierskich eksperymentów z końca lat 80. XX wieku, które umożliwiły przeprowadzenie pierwszego oficjalnie potwierdzonego transferu materiału genetycznego u ludzi [75] terapia genowa jest uważana za jeden z najlepiej rokujących sposobów leczenia chorób o podłożu genetycznym. Koniecznym warunkiem dostarczania materiału genetycznego do miejsc objętych terapią są wydajne wektory. W tej chwili najpowszechniej wykorzystywane są wektory pochodzenia wirusowego oraz plazmidowy DNA. Szereg cech plazmidów stanowi o ich przydatności w terapii genowej, niemniej istnieje kilka przeszkód uniemożliwiających traktowanie plazmidów jako wektorów idealnych. Główne bariery zostały omówione w niniejszej pracy, a najważniejszy wniosek płynący ze studiowania zaprezentowanych źródeł to konieczność poszukiwania kolejnych sposobów na modyfikowanie plazmidowego

DNA oraz dalsze badania w kierunku znalezienia sposobu na wydajne dostarczanie terapeutycznego materiału genetycznego do docelowych komórek.

Piśmiennictwo

- Ahmad I., Rao D.N.: Chemistry and biology of DNA methyltransferases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **5–6**, 361–380 (1996)
- Ajrout-Driss S., Christiansen M., Allen J.A., Kessler J.A.: Phase 1/2 open-label dose-escalation study of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with painful diabetic peripheral neuropathy. *Mol. Ther.* **21**, 1279–1286 (2013)
- Agorio C., Schreiber F., Sheppard M., Mastroeni P., Fernandez M., Martinez M.A., Chabalgoity J.A.: Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J. Gene Med.* **9**, 416–423 (2007)
- Badding M.A., Lapek J.D., Friedman A.E., Dean D.A.: Proteomic and functional analyses of protein-DNA complexes during gene transfer. *Mol. Ther.* **21**, 775–785 (2013)
- Barber G.N.: Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* **243**, 99–108 (2011)
- Bauer A.P., Leikam D., Krinner S., Notka F., Ludwig C., Langst G., Wagner R.: The impact of intragenic CpG content on gene expression. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3891–3908 (2010)
- Bishop C.J., Majewski R.L., Guiriba T.-R.M., Wilson D.R., Bhise N.S., Quiñones-Hinojosa A., Green J.J.: Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry. *Acta Biomater.* **37**, 120–130 (2016)
- Bonamassa B., Hai L., Liu D.: Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* **28**, 694–701 (2011)
- Broeke A.V., Burny A.: Retroviral vector biosafety: lessons from sheep. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 9–12 (2003)
- Castagliuolo I., Beggiao E., Brun P., Barzon L., Goussard S., Manganeli R., Grillot-Courvalin C., Palu G.: Engineered *E. coli* delivers therapeutic genes to the colonic mucosa. *Gene Ther.* **12**, 1070–1078 (2005)
- Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Burgess S.M., Venditti C.P.: Genotoxicity in mice following AAV gene delivery: a safety concern for human gene therapy? *Mol. Ther.* **24**, 198–201 (2016)
- Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Trivedi N.S., Carrillo-Carrasco N., Senac J.S., Wu W., Hoffmann V., Elkahloun A.G., Burgess S.M., Venditti C.P.: Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880 (2015)
- Chen Z.Y., He C.Y., Meuse L., Kay M.A.: Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements *in vivo*. *Gene Ther.* **11**, 856–864 (2004)
- Cheng X.: DNA modification by methyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 4–10 (1995)
- Collier J.: Epigenetic regulation of the bacterial cell cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 722–729 (2009)
- Costa D., Valente A.J.M., Miguel M.G., Queiroz J.: Plasmid DNA hydrogels for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**, 257–264 (2014)
- Costa D., Valente A.J.M., Miguel M.G., Queiroz J.: Plasmid DNA microgels for drug/gene co-delivery: A promising approach for cancer therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **442**, 181–190 (2014)

18. Darquet A.M., Cameron B., Wils P., Scherman D., Crouzet J.: A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* **4**, 1341–1349 (1997)
19. Darquet A.M., Rangara R., Kreiss P., Schwartz B., Naimi S., Delaère P., Crouzet J., Scherman D.: Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 209–218 (1999)
20. Dauty E., Verkman A.S.: Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J. Biol. Chem.* **280**, 7823–7828 (2005)
21. Deaton A.M., Bird A.: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011)
22. Donsante A., Vogler C., Muzyczka N., Crawford J.M., Barker J., Flotte T., Campbell-Thompson M., Daly T., Sands M.S.: Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* **8**, 1343–1346 (2001)
23. Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J.: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J. Gene Med.* **9**, 833–842 (2007)
24. Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J., Edelstein R.M.: Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 – an overview. *J. Gene Med.* **6**, 597–602 (2004)
25. Ehrhardt A., Haase R., Schepers A., Deutsch M.J., Lipps H.J., Baiker A.: Episomal vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **8**, 147–161 (2008)
26. European Pharmacopea 8.0., Chapter 5.14. 705–716 (2014)
27. Escors D., Breckpot K.: Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **58**, 107–119 (2010)
28. European Medicines Agency (EMA): Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. Doc. Ref. EMA/273974/2005, (2005)
29. Faurez F., Dory D., Le Moigne V., Gravier R., Jestin A.: Biosafety of DNA vaccines: new generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmid after injection. *Vaccine*, **28**, 3888–3895 (2010)
30. Gardlik R., Behuliak M., Palffy R., Celec P., Li C.J.: Gene therapy for cancer: bacteria-mediated anti-angiogenesis therapy. *Gene Ther.* **18**, 425–431 (2011)
31. Gaspar V., de Melo-Diogo D., Costa E., Moreira A., Queiroz J., Pichon C., Correia I., Sousa F.: Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 353–379 (2015)
32. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (28.10.2016)
33. Ginn S.L., Alexander I.E., Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J.: Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* **15**, 65–77 (2013)
34. Giacca M., Zacchigna S.: VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Ther.* **19**, 622–629 (2012)
35. Golzio M., Teissie J., Rols M.-P.: Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1292–1297 (2002)
36. Gravier R., Dory D., Laurentie M., Bougeard S., Cariolet R., Jestin A.: *In vivo* tissue distribution and kinetics of a pseudorabies virus plasmid DNA vaccine after intramuscular injection in swine. *Vaccine*, **25**, 6930–6938 (2007)
37. Gromova E.S., Khoroshaev A.V.: Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA. *Mol. Biol.* **37**, 260–272 (2003)
38. Haccin-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M. i wsp.: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**, 415–419 (2003)
39. Hartmann G., Krieg A.M.: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* **164**, 944–953 (2000)
40. Henry T.D., Hirsch A.T., Goldman J., Wang Y.L., Lips D.L., McMillan W.D., Duval S., Biggs T.A., Keo H.H.: Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene Ther.* **18**, 788–794 (2011)
41. Hernando-Herraez I., Garcia-Perez R., Sharp A.J., Marques-Bonet T.: DNA methylation: insights into human evolution. *PLoS Genet.* DOI:10.1371/journal.pgen.1005661 (2015)
42. Hoare T.R., Kohane D.S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, **49**, 1993–2007 (2008)
43. Howe S.J., Thrasher A.J. i wsp.: Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* **118**, 3143–3150 (2008)
44. Hyde S.C., Gill D.R. i wsp.: CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* **26**, 549–551 (2008)
45. Jiao S., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L., Wolff J.A.: Persistence of plasmid DNA and expression in rat brain cells *in vivo*. *Exp. Neurol.* **115**, 400–413 (1992)
46. Jones P.A., Takai D.: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068–1070 (2001)
47. Kitagawa T., Iwazawa T., Robbins P., Lotze M., Tahara H.: Advantages and limitations of particle-mediated transfection (gene gun) in cancer immuno-gene therapy using IL-10, IL-12 or B7-1 in murine tumor models. *J. Gene Med.* **5**, 958–965 (2003)
48. Koike H., Ishida A., Hayashi T., Shimamura M., Mizuno S., Nakamura T., Iida H., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.: Injection of HGF plasmid cDNA to prevent manifestation of Parkinson disease: a preclinical study using a primate model. *Open Gene Ther. J.* **2**, 38–44 (2009)
49. Koike H., Morishita R., Iguchi S., Aoki M., Matsumoto K., Nakamura T., Yokoyama C., Tanabe T., Ogihara T., Kaneda Y.: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *FASEB J.* **17**, 779–781 (2003)
50. Kosovac D., Wild J., Ludwig C., Meissner S., Bauer A.P., Wagner R.: Minimal doses of a sequence-optimized transgene mediate high-level and long-term EPO expression *in vivo*: challenging CpG-free gene design. *Gene Ther.* **18**, 189–198 (2011)
51. Krieg A.M.: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760 (2002)
52. Krieg A.M., Wu T., Weeratna R., Efler S.M., Love-Homan L., Yang L., Yi A.K., Short D., Davis H.L.: Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12631–12636 (1998)
53. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 6546–6549 (1995)
54. Kukuła K., Rużyłło W. i wsp.: Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am. Heart J.* **161**, 581–589 (2011)
55. Lara A.R., Ramirez O.T.: Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods Mol. Biol.* **824**, 271–303 (2012)
56. Larsen M.D., Griesenbach U., Goussard S., Gruenert D.C., Geddes D.M., Scheule R.K., Cheng S.H., Courvalin P., Grillo-Courvalin C., Alton E.W.: Bactofection of lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo* using a genetically modified *Escherichia coli*. *Gene Ther.* **15**, 434–442 (2008)

57. Lechardeur D., Sohn K.-J., Haardt M., Joshi P.B., Monck M., Graham R.W., Beatty B., Squire J., O'Brodovich H., Lukacs G.L.: Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 482–497 (1999)
58. Loessner H., Endmann A., Leschner S., Westphal K., Rohde M., Miloud T., Hämmerling G., Neuhaus K., Weiss S.: Remote control of tumour-targeted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression *in vivo*. *Cell Microbiol.* **9**, 1529–1537 (2007)
59. Madeira C., Rodrigues C.A., Reis M.S., Ferreira F.F., Correia R.E., Diogo M.M., Cabral J.M.: Nonviral gene delivery to neural stem cells with minicircles by microporation. *Biomacromolecules*, **14**, 1379–1387 (2013)
60. Magnusson T., Haase R., Schleef M., Wagner E., Ogris M.: Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhanced combinations. *J. Gene Med.* **13**, 382–391 (2011)
61. Makino H., Aoki M., Hashiya N., Yamasaki K., Azuma J., Sawa Y., Kaneda Y., Ogihara T., Morishita R.: Long-term follow-up evaluation of results from clinical trial using hepatocyte growth factor gene to treat severe peripheral arterial disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2503–2509 (2012)
62. Marshall W.G., Boone B.A., Burgos J.D., Gografe S.I., Baldwin M.K., Danielson M.L., Larson M.J., Caretto D.R., Cruz Y., Ferraro B., Heller L.C., Ugen K.E., Jaroszeski M.J., Heller R.: Electroporation-mediated delivery of a naked DNA plasmid expressing VEGF to the porcine heart enhances protein expression. *Gene Ther.* **17**, 419–423 (2010)
63. Miao C.H., Thompson A.R., Loeb K., Ye X.: Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer *in vivo*. *Mol. Therapy*, **3**, 947–957 (2001)
64. Mitsui M., Nishikawa M., Zang L., Ando M., Hattori K., Takahashi Y., Watanabe Y., Takakura Y.: Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. *J. Gene Med.* **11**, 435–443 (2009)
65. Nafissi N., Alqawlaq S., Lee E.A., Foldvari M., Spagnuolo P.A., Slavcev R.A.: DNA ministrings: highly safe and effective gene delivery vectors. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, DOI: 10.1038/mtna.2014.16 (2014)
66. Nafissi N., Foldvari M.: Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front. Neurosci.* **9**, 355 DOI: 10.3389/fnins.2015.00355 (2015)
67. Nafissi N., Slavcev R.: Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2841–2851 (2014)
68. Oliveira P.H., Mairhofer J.: Marker-free plasmids for biotechnological applications-implications and perspectives. *Trends Biotechnol.* **31**, 539–547 (2013)
69. Palfy R., Hodossy J., Behuliak M., Resko P., Radvansky J., Celec P.: Bacteria in gene therapy: bactofection versus alternative gene therapy. *Gene Ther.* **13**, 101–105 (2006)
70. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F.: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013)
71. Rauschhuber C., Noske N., Ehrhardt A.: New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 2–9 (2012)
72. Reyes-Sandoval A., Ertl H.C.: CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Mol. Ther.* **9**, 249–261 (2004)
73. Ropper A.H., Gorson K.C., Gooch C.L., Weinberg D.H., Pieczek A., Ware J.H., Kershen J., Rogers A., Simovic D., Schratzberger P., Kirchmair R., Losordo D.: Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized, double-blinded trial. *Ann. Neurol.* **65**, 386–393 (2009)
74. Rosazza C., Buntz A., Ries T., Woll D., Zumbusch A., Rols M.P.: Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation. *Mol. Therapy*, **21**, 2217–2226 (2013)
75. Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.J., Culver K., Miller A.D., Blaese R.M., Anderson W.F.: Gene transfer into humans — immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990)
76. Saeed M., Martin A., Ursell P., Do L., Bucknor M., Higgins C.B., Saloner D.: MR assessment of myocardial perfusion, viability, and function after intramyocardial transfer of VM202, a new plasmid human hepatocyte growth factor in ischemic swine myocardium. *Radiology*, **248**, 107–118 (2008)
77. Saitoh S-I., Miyake K.: Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* **227**, 32–43 (2009)
78. Sanchez-Romero M.A., Cota I., Casadesus J.: DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**, 9–16 (2015)
79. Smorawska M., Szuplewska M., Zaleski P., Wawrzyniak P., Maj A., Plucienniczak A., Bartosik D.: Mobilizable narrow host range plasmid as natural suicide vectors enabling horizontal gene transfer among distantly related bacterial species. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 76–82 (2012)
80. Spanggaard L., Gehl J. I. wsp.: Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: safety and efficacy results of a phase I first-in-man study. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **24**, 99–107 (2013)
81. Staworzyńska M.J., Stachowiak R., Bielecki J.: Zastosowanie wektorów bakteryjnych w biologii molekularnej i w medycynie. *Post. Mikrobiol.* **50**, 3–16 (2011)
82. Stuchbury G., Münch G.: Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*, **62**, 189–194 (2010)
83. Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y.: Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs from plasmid DNA vector. *Front. Biosci.* **4**, 133–141 (2012)
84. Taniyama Y., Azuma J., Kunugiza Y., Iekushi K., Rakugi H., Morishita R.: Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr. Top. Med.Chem.* **12**, 1630–1637 (2012)
85. Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A.: Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003)
86. Tokunaga T., Suganuma T. i wsp.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer. Inst.* **72**, 955–962 (1984)
87. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi S., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M.: Sonoporation: gene transfer using ultrasound. *World J. Methodol.* **3**, 39–44 (2013)
88. Tros de Ilarduya C., Sun Y., Düzgüneş N.: Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 159–170 (2010)
89. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (FDA): Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. (1998)
90. Vandermeulen G., Marie C., Scherman C., Preat V.: New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol. Therapy*, **19**, 1942–1949 (2011)
91. Vaughan E.E., Geiger R.C., Miller A.M., Loh-Marley P.L., Suzuki T., Miyata N., Dean D. A.: Microtubule acetylation

- through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol. Ther.* **16**, 1841–1847 (2008)
92. Villate-Beitia I., Puras G., Zarate J., Agirre M., Ojeda E., Pedraz J.L.: First insights into non-invasive administration routes for non-viral gene therapy (w) *Gene Therapy – Principles and Challenges*, red. D. Hashad, InTech, Rijeka, 2015, s. 145–177
93. von Groll A., Levin Y., Barbosa M.C., Ravazzolo A.P.: Linear DNA Low Efficiency Transfection by Liposome Can Be Improved by the Use of Cationic Lipid as Charge Neutralizer. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1220–1224 (2006)
94. Wang W., Li W., Ma N., Steinhoff G.: Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **14**, 46–60 (2013)
95. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 66th Report, Annex 2. WHO Press, Geneva, 2015, s. 93–130
96. Wirth T., Parker N., Yla-Herttuala S.: History of gene therapy. *Gene*, **525**, 162–169 (2013)
97. Wolff J.A., Ludtke J., Acsadi G., Williams P., Jani A.: Long-term persistence and plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.*, **1**, 363–369 (1992)
98. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, **247**, 1465–1468 (1990)
99. Wooddell C.I., Subbotin V.M., Sebestyén M.G., Griffin J.B., Zhang G., Schleef M., Braun S., Huss T., Wolff J.A.: Muscle damage after delivery of naked plasmid DNA into skeletal muscles is batch dependent. *Human Gene Therapy*, **22**, 225–235 (2011)
100. Wright O., Stan G-B., Ellis T.: Building-in biosafety for synthetic biology. *Microbiology*, **159**, 1221–1235 (2013)
101. Yew N.S., Zhao H., Przybylska M., Wu I-H., Tousignant J. D., Scheule R.K., Cheng S, H. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression *in vivo*. *Mol. Therapy*, **5**, 731–738 (2002)
102. Yew N.S., Zhao H., Wu H-L, Song A., Tousignant J.D., Przybylska M., Cheng S.H.: Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol. Therapy*, **1**, 255–262 (2000)
103. Zhang G., Song Y.K., Liu D.: Long-term expression of human alpha 1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther.* **7**, 1344–1349 (2000)
104. Zhang H.Y., Sun S.H., Guo Y.J., Chen Z.H., Huang L., Gao Y.J., Wan B., Zhu W.J., Xu G.X., Wang J.J.: Tissue distribution of a plasmid DNA containing epitopes of foot-and-mouth disease virus in mice. *Vaccine*, **23**, 5632–5640 (2005)