

Genska terapija - temeljni principi, klinička primjena i budućnost

Glavan, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:197967>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I POSTDIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINA

Tomislav Glavan

GENSKA TERAPIJA – TEMELJNI PRINCIPI, KLINIČKA PRIMJENA I BUDUĆNOST

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I POSTDIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINA

Tomislav Glavan

GENSKA TERAPIJA – TEMELJNI PRINCIPI, KLINIČKA PRIMJENA I BUDUĆNOST

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nina Pereza, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana 21.6.2023. na Medicinskom fakultetu u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.
2. prof. dr. sc. Smiljana Ristić, dipl. ing.
3. doc. dr. sc. Sanja Dević Pavlić, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 47 stranica, 5 slika, 4 tablice, 75 literaturnih navoda.

Sadržaj rada

| | |
|---|----|
| Popis skraćenica i akronima: | 5 |
| Uvod | 1 |
| Definicija genske terapije | 2 |
| Svrha rada..... | 3 |
| Prijenos genetičkog materijala u stanice (transfekcija) | 3 |
| Pristupi u genskoj terapiji..... | 14 |
| Dodavanje gena..... | 16 |
| Utišavanje gena | 18 |
| Uređivanje gena | 20 |
| Metode eliminacije stanica | 23 |
| Genska terapija u kliničkoj praksi | 24 |
| Hemofilija | 24 |
| Beta-talasemija..... | 26 |
| Transtiretinska amiloidoza | 28 |
| Melanom | 30 |
| Rasprava | 31 |
| Zaključci | 33 |
| Sažetak | 35 |
| Summary | 36 |
| Literatura | 37 |
| Životopis | 46 |

Popis skraćenica i akronima:

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

FDA – Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drugs Administration*)

NIH – Nacionalni instituti za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

ASO – antisense oligonukleotid (engl. *antisense oligonucleotide*)

siRNA – mala interferirajuća RNK (engl. *small interfering RNA*)

shRNA – kratka RNK ukosnica (engl. *short hairpin RNA*)

RISC – RNK-induciran utišavajući kompleks (engl. *RNA-induced silencing complex*)

CRISPR/Cas9 – engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system 9*

ZFN – engl. *zinc-finger nuclease*

TALEN – engl. *transcription activator-like effector nuclease*

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

GVHD – reakcija presatka protiv primatelja (engl. *graft-versus-host disease*)

DEAE – dietilaminoetil celuloza

AAV – adeno-asocirani virus (engl. *adeno-associated virus*)

NHEJ – nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*)

HDR – popravak usmjeren pomoću homologne DNK (engl. *homology directed repair*)

SŽS – središnji živčani sustav

Uvod

Ljudski genom sadrži između 20 000 i 25 000 gena koji kodiraju proteine odgovorne za izvršavanje bioloških procesa (1,2). Geni su podložni promjenama koje mogu uzrokovati veoma širok raspon bolesti. Takve promjene nazivamo varijantama sekvence, prethodno nazivane mutacije ili polimorfizmi. Neke od tih promjena nastaju u tjelesnim stanicama i njih zovemo somatskim mutacijama. Somatske mutacije nastaju spontano ili pod utjecajem mutagena i akumuliraju se u stanicama s vremenom. Većina nema značajan učinak na zdravlje, ali nekada mogu poremetiti ključne biološke funkcije. Akumulirana genetička oštećenja pridonose starenju i pojavi tumora (3). Druge su mutacije nasljedne i prenose se kroz generacije. Prisutne su u svim stanicama osobe, a njihov učinak ovisi o zadaći zahvaćenog gena. Neke genetičke bolesti nastaju zbog novonastalih (*de novo*) mutacija u spolnim stanicama roditelja. Kada takve spolne stanice sudjeluju u oplodnji, posljedica može biti spontani pobačaj ili rođenje ploda s genetičkom bolesti koja se može iskazati rano u djetinjstvu ili kasnije tijekom života. Iako se često smatraju rijetkima, genetičke bolesti danas ima oko 300 milijuna ljudi. Polovica tih pacijenata su novorođenčad i djeca (1,2). Smatra se da je globalna incidencija genetičkih bolesti u novorođenčadi čak 5,3 %. (4) Prema Informativnom centru za genetičke i rijetke bolesti (engl. *Genetic and Rare Disease Information Centre, GARD*), sastavnice američkih Nacionalnih instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health, NIH*), danas postoji više od 7000 rijetkih bolesti, a za njih 80 % odgovorni su disfunkcionalni geni (1).

Velik broj genetičkih bolesti ima lošu prognozu, budući da su terapijske mogućnosti vrlo ograničene. Terapijski postupci poput kronične farmakoterapije, operativnih zahvata, nadomjesne terapije (enzimoterapije), kemoterapije i radioterapije ne liječe podležeci problem

genetičkih pogrešaka, već se samo uklanjaju ili ublažavaju simptome i sprečavaju progresiju bolesti. Navedeni postupci imaju privremeni učinak zbog čega je potrebna kronična terapija koja ograničava kvalitetu života i često ima brojne nuspojave (1). S druge strane, genska terapija nudi potencijalno trajno rješenje za liječenje i prevenciju genetičkih bolesti. Na primjer, neke monogenske enzimopatije poput Gaucherove bolesti zahtijevaju redovite infuzije zdravih enzima (engl. *enzyme replacement therapy*, ERT) za sprječavanje simptoma i progresije bolesti, dok genska terapija omogućuje trajnu ekspresiju vlastitog, endogenog enzima nakon uvođenja gena u stanice pacijenta (2).

Definicija genske terapije

Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) definira gensku terapiju kao biološki medicinski proizvod koji ispunjava dva kriterija:

- a) sadrži aktivnu supstancu koja sadrži ili se sastoji od rekombinantne nukleinske kiseline koja se primjenjuje u ljudima s ciljem regulacije, popravka, nadomještanja, dodavanja ili brisanja genske sekvence.
- b) njen terapijski, profilaktički ili dijagnostički učinak izravno se odnosi na rekombinantnu sekvencu nukleinske kiseline koju sadrži ili na proizvod genske ekspresije te sekvence (5).

Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) definira gensku terapiju kao proizvod koji posreduje svoj učinak transkripcijom i/ili translacijom prenesenog genetičkog materijala i/ili integracijom u genom domaćina u obliku nukleinskih kiselina, virusa ili genetički modificiranih mikroorganizama (5). Iz navedenih definicija može se zaključiti da je glavni cilj genske terapije unos vanjskih nukleinskih kiselina u domaćina s ciljem

ispravljanja genetičke pogreške. Iako osnovni princip zvuči jednostavno, genska terapija ima izuzetno velik broj izazova i iziskuje složeno dizajniranje visoko specifičnih nukleinskih kiselina i mehanizama isporuke za njihovu uspješnu ekspresiju u ciljnim stanicama. Nakon brojnih pokušaja i neuspjeha tijekom zadnjih 30 godina, genska terapija napokon polako ali sigurno izlazi iz domene eksperimentalnog i pronalazi svoje mjesto u kliničkoj praksi. To se odražava u brojnim kliničkim istraživanjima i sve većem broju odobrenih genskih terapeutika. (2,6,7)

Svrha rada

Svrha rada je opisati temeljne principe genske terapije, odnosno njen mehanizam djelovanja i kliničku primjenu. Biti će prikazani odobreni genski terapeutici s kratkim opisom bolesti za koje se koriste. Na kraju će biti osvrt na klinička istraživanja i što se može očekivati u budućnosti genske terapije.

Prijenos genetičkog materijala u stanice (transfekcija)

Genska se terapija s obzirom na stanični milje može odvijati *in vivo* ili *ex vivo*. *Ex vivo* ili „izvan živog tijela“ podrazumijeva izdvajanje stanica ili tkiva iz pacijenta, genetičku modifikaciju i kultivaciju izdvojenih stanica ili tkiva izvan tijela i zatim vraćanje istih u tijelo pacijenta, intravenski ili transplantacijom (2). Ovaj način genske terapije stoga je moguće izvoditi samo na stanicama koje se mogu učinkovito izolirati iz pacijentova tijela, preživjeti i kultivirati u *in vitro* uvjetima. *Ex vivo* genska terapija najčešće se izvodi na hematopoetskim matičnim stanicama, ali je uspješno provedena i na raznim drugim stanicama, poput limfocita, makrofaga, hepatocita, epidermalnim matičnim stanicama, fotoreceptorskim stanicama retine i dr. (8). Genetičkom modifikacijom

hematopoetskih matičnih stanica *ex vivo* uspješno su liječene primarne imunodeficijencije, hemoglobinopatije i monogenske metaboličke bolesti (9). Prije otkrića genske terapije za izlječenje istih korištene su alogene hematopoetske matične stanice koštane srži. Međutim, to zahtijeva histokompatibilnoga donora, donosi rizik od razvoja bolesti presatka protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*, GVHD) i često zahtijeva dugoročnu imunosupresivnu terapiju (8). Korištenje autolognih, genetički modificiranih stanica sprječava ove neželjene posljedice, budući da stanice tada izražavaju samo protein koji nedostaje, ali ne i ostale aloantigene koji mogu potaknuti imunosnu reakciju odbacivanja. Tako su u liječenju lizosomskih bolesti nakupljanja korištene alogene hematopoetske matične stanice jer se mogu diferencirati u stanice mijeloidne loze koje su sposobne infiltrirati središnji živčani sustav pacijenta i izražavati enzim koji nedostaje za metaboliziranje i odstranjivanje toksičnih nakupljenih produkata. Na taj način nadomještaju tkivne makrofage središnjeg živčanog sustava i sprječavaju progresiju bolesti. Klinička istraživanja u kojima su korištene genetički modificirane autologne hematopoetske matične stanice bila su uspješno provedena. Glavna područja primjene bila su liječenje metakromatske leukodistrofije, X-vezane adrenoleukodistrofije i mukopolisaharidoze. S većom su učinkovitošću ulazile u SŽS i izražavale željeni enzim od alogenh hematopoetskih matičnih stanica (9). Matične stanice bazalnog sloja epidermisa također predstavljaju privlačnu metu za korištenje *ex vivo* genske terapije. Genetičkom modifikacijom i zamjenom bazalnih epidermalnih stanica svi keratinociti koji potječu od njih izražavaju protein koji nedostaje. Na ovaj način su postignuti veliki uspjesi u liječenju bulozne epidermolize (8).

In vivo pristup trenutno zauzima glavno mjesto u genskoj terapiji. *In vivo* ili „u živom tijelu“ podrazumijeva primjenu genskog terapeutika direktno u tijelo pacijenta, njegovu distribuciju u

tkiva, transfekciju ciljnih stanica i genetičku modifikaciju tih stanica (1). Da bi se to ostvarilo, potrebno je zadovoljiti dva glavna preduvjeta: genetički materijal treba opstati u tijelu dok ne dođe do svog cilja i treba selektivno genetički modificirati ciljne stanice, odnosno pokazivati određeni stanični tropizam. Rani eksperimenti pokazali su da direktna injekcija čiste DNK u organizam nije uspješna. Osim što je ulazak nukleinskih kiselina u stanice neuspješan zbog negativnog naboja i veličine molekule DNK ili RNK, egzogene nukleinske kiseline na svome putu do ciljnog tkiva nailaze na brojne prepreke u vidu ubikvitarnih nukleaza koje se nalaze u krvi u brojnim tkivima, ekskrecije putem bubrega i imunskog sustava (10). Krvne nukleaze nespecifično cijepaju i razgrađuju egzogene nukleinske kiseline, a urođeni i specifični imunski sustav ih prepoznaju i uklanjaju pomoću specifičnih receptora na T i B limfocitima te receptora za prepoznavanje uzoraka (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) na stanicama urođenog imunskog sustava (2). Nadalje, „gole“ nukleinske kiseline ne mogu selektivno ulaziti u željene stanice, jer ne prepoznaju specifične stanice, odnosno njihove receptore. Ove se prepreke donekle mogu izbjeći direktnom *in situ* injekcijom genskog terapeutika u željeno tkivo, što nije uvijek moguće (npr. moždano tkivo). Stanica također treba internalizirati strane nukleinske kiseline, što se postiže endocitozom ili povećanjem propusnosti stanične membrane (11). Jednom kada se nađe unutar stanice, ponovno nailazi na neprijateljski milje zbog staničnih endonukleaza koje ju potencijalno mogu razgraditi (1). Dok je za egzogenu RNK dovoljno da stigne u citoplazmu stanice za postizanje svojeg učinka, DNK se iz citoplazme stanice treba preseliti u jezgru i biti eksprimirana u dovoljnoj mjeri. Različite metode prijenosa gena razvijene su da riješe navedene probleme transfekcije stanica.

Ključni problem genske terapije od samoga početka njenog razvoja bio je unos genetičkog materijala (DNK ili RNK) u stanice. Danas postoje mnogi načini koji to omogućuju i dijele se na biološke i nebiološke metode. Nebiološke metode mogu se još dodatno podijeliti na fizikalne i kemijske. Da bi prijenos bio uspješan potrebno je zadovoljiti nekoliko preduvjeta. Prvo, genetički materijal koji se želi unijeti u stanicu treba biti izoliran i umnožen. Potrebno je osigurati da sadrži samo gene od interesa, bez drugih neupotrebljivih ili potencijalno štetnih sekvenci. Danas je to uvelike olakšano pomoću metoda baziranih na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (12). Zatim je potrebno odabrati metodu prijenosa gena. Dok je kod fizikalnih i nekih kemijskih metoda dovoljno imati „gole“ nukleinske kiseline, biološke i ostale kemijske metode zahtijevaju proizvodnju specifičnih prijenosnika čiji je cilj zaštititi genetički materijal koji prenose i dopremiti ga do ciljnih stanica (10). Ti se prijenosnici zovu vektori.

Fizikalne metode pretežno se temelje se na povećanju propusnosti stanične membrane pomoću primjene fizičke sile. Membrana postaje propusna za velike i negativno nabijene molekule poput DNK, ali često na račun ozljede znatnog broja stanica. To predstavlja i glavni nedostatak ovih metoda, budući da se izgubi vijabilnost velikog broja stanica u koje se namjerava unijeti genetički materijal. *In vivo* primjena općenito je ograničena, a i kada se koriste *in vivo*, genski materijal neselektivno ulazi u sve stanice tkiva. S druge strane, ove su metode u velikoj mjeri jednostavne, jeftine, pouzdane i imaju veliki kapacitet prijenosa transgena. Katkada se koriste u kombinaciji s kemijskim i biološkim metodama u svrhu povećanja njihove učinkovitosti (13,14). Neke od glavnih fizikalnih metoda prijenosa su elektroporacija ili elektropermeabilizacija, biološka balistika (engl. *biolistics* ili *gene gun*), mikroinjekcija, laserska transfekcija, ultrazvučna transfekcija ili

sonoporacija, hidrodinamična transfekcija i magnetofekcija (10). Većina fizikalnih metoda zasad je ograničena na pretklinička istraživanja i nema značajnu kliničku primjenu (15).

Tablica 1. Kratak opis, prednosti i nedostaci fizikalnih metoda prijenosa gena.

| Fizikalna metoda transfekcije | Opis | Prednosti | Nedostaci |
|---|--|--|--|
| Elektroporacija (10,14,16,17) | Električni impulsi destabiliziraju staničnu i jezgrinu membranu, povećavajući njihovu propusnost | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> primjena moguća • Jednostavnost | <ul style="list-style-type: none"> • Oštećenje stanica • <i>In vivo</i> primjena ograničena |
| Mikroinjekcija (10,14,16,17) | Genetički materijal se direktno unosi u stanicu mikropipetom | <ul style="list-style-type: none"> • Vijabilnost stanica očuvana • Zagarantiran selektivan prijenos gena u stanicu | <ul style="list-style-type: none"> • Metoda je dugotrajna za veći broj stanica i tehnički se teško izvodi • Općenito ima samo <i>ex vivo</i> primjenu, <i>in vivo</i> primjena ograničena samo na dermis |
| Biološka balistika (10,14,16,17) | Poseban uređaj (tzv. <i>gene gun</i>) pod velikim pritiskom ispucaava i isporučuje mikroprojekte zлата ili volframa obložene s DNK direktno u stanicu | <ul style="list-style-type: none"> • Manje oštećenje stanica | <ul style="list-style-type: none"> • Slaba i kratkotrajna ekspresija transgena |
| Laserska transfekcija (10,14,16,17) | Energija iz lasera se koristi za stvaranje mikropora na stanicama (optoporacija) ili oslobađanje genetičkog materijala iz fotosenzitivnih čestica (fotokemijska internalizacija) | <ul style="list-style-type: none"> • Manje oštećenje stanica | <ul style="list-style-type: none"> • Uglavnom ograničeno na <i>ex vivo</i> primjenu |
| Ultrazvučna transfekcija (sonoporacija) (10,14,16,17) | Mehanička sila ultrazvučnih valova povećava propusnost stanične membrane | <ul style="list-style-type: none"> • Moguća <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> primjena • Sigurno, neinvazivno i jednostavno | <ul style="list-style-type: none"> • Slaba učinkovitost • Oštećenje stanica (iako u manjoj mjeri u odnosu na elektroporaciju) |
| Hidrodinamična transfekcija (10,14,16,17) | Ubrizgavanjem genetičkog materijala stvara se visoki hidrodinamički tlak koji povećava propusnost kapilara u tkivu, što omogućuje dostavu DNK do stanica u parenhimu | <ul style="list-style-type: none"> • Sigurno i jednostavno • Jeftino • Ne zahtijeva posebne instrumente, kemikalije ili ostale komponente | <ul style="list-style-type: none"> • Uspješnost ovisi o tkivu – količini kapilara i njihovoj vrsti • Samo <i>in vivo</i> primjena |
| Magnetofekcija (10,14,16,17) | Paramagnetične čestice željezovog oksida koje su obložene genskim materijalom ulaze u stanice uz pomoć elektromagnetskog polja | <ul style="list-style-type: none"> • Korisno za transfekciju stanica u koje je teško unijeti genetički materijal | <ul style="list-style-type: none"> • Pretežno samo <i>in vitro</i> primjena |

Pod kemijske metode prijenosa gena spadaju neke od najstarijih, ali i najnovijih metoda transfekcije. Ovdje se različite kemijske supstance kombiniraju s genetičkim materijalom i formiraju komplekse koji su sposobni ući u ciljne stanice. Primjeri su transfekcija pomoću kalcij-fosfata, transfekcija pomoću DEAE dekstrana, kationski lipidi, lipidne nanočestice, polimeri,

peptidi i anorganske nanočestice (10). Transfekcija na temelju DEAE-dekstrana i kalcij fosfatnog medija koji se sastoji od DNA, kalcijevog klorida (CaCl₂) i fosfatnog pufera najstarije su kemijske metode prijenosa gena u stanice (10,18). Lipidne nanočestice, koje su predstavljaju najpopularnije nevirusne vektore, biti će još detaljnije opisane zbog svoje *in vivo* primjene u kliničkoj praksi.

Tablica 2. Kratak opis, prednosti i nedostaci kemijskih metoda prijenosa gena.

| Kemijska metoda transfekcije | Opis | Prednosti | Nedostaci |
|--|---|---|--|
| Kalcij-fosfat (10,19) | Mikroprecipitati kalcijevog fosfata i DNK snažno se vežu na negativno nabijenu površinu stanične membrane i potiču endocitozu. | <ul style="list-style-type: none"> • Jeftino • Jednostavno • Sigurno | <ul style="list-style-type: none"> • Isključivo <i>in vitro</i> primjena • Neučinkovita i privremena ekspresija transgena |
| DEAE dekstran (10,20) | Pozitivno nabijeni DEAE-dekstran velike molekularne težine služi kao most između negativno nabijene stanične membrane i negativno nabijene molekule DNK. DEAE-dekstran/DNK kompleks endocitozom ulazi u stanicu. | <ul style="list-style-type: none"> • Učinkovita ekspresija transgena | <ul style="list-style-type: none"> • Polimer je citotoksičan • Privremena ekspresija transgena • Isključivo <i>in vitro</i> primjena |
| Liposomi i kationski lipidi (lipid-based) (10,21,22) | Kationski lipidi su amfilne molekule koje se sastoje od pozitivno nabijene glave i poveznice (engl. <i>linker</i>) koja ju kovalentno veže s hidrofobnim repom. Pozitivno nabijena glava elektrostatski veže negativno nabijenu DNK i staničnu membranu. Kompleksi kationskih lipida i DNK u kombinaciji s drugim vrstama lipida tvore lipidne nanočestice koje endocitozom ulaze u stanicu. | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> i <i>ex vivo</i> primjena • Jednostavna sinteza • Niska imunogeničnost • Veći kapacitet „pakiranja“ genetičkog materijala u odnosu na virusne vektore | <ul style="list-style-type: none"> • Pojedine formulacije su nestabilne i/ili citotoksične • Niska učinkovitost transfekcije u usporedbi s virusnim vektorima • Neselektivan ulazak u stanice bez dodatnih modifikacija vektora |
| Polimeri i peptidi (10,18) | Mogu biti biološki nerazgradivi (polietilenimin, poliamidoamin, polivinilimidazol) ili biorazgradivi (chitosan, poli-beta aminoesteri, poli-L-lizin, poli-L-arginin). Pozitivno su nabijeni i elektrostatski vežu DNK s kojom u kompleksu endocitozom ulaze u stanicu. | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> primjena • Visok kapacitet prijenosa | <ul style="list-style-type: none"> • Citotoksičnost |
| Anorganske nanočestice (10,17,18,23) | Ovdje spadaju nanočestice zlata (AuNPs), silikonske nanočestice, ugljikove nanocjevčice, amfipatski fulereni, nanočestice od poluvodiča (engl. <i>quantum dots</i>); nanočestice zlata najviše su korištene. | <ul style="list-style-type: none"> • Stabilniji od organskih čestica • <i>In vivo</i> i <i>ex vivo</i> primjena • Visok kapacitet prijenosa • Složeno korištenje | <ul style="list-style-type: none"> • Zbog svoje biološke nerazgradivosti mogu se akumulirati unutar stanica i imati citotoksični učinak |

Konačna, a vjerojatno i najznačajnija skupina metoda temelji se na biološkim vektorima. Vektori mogu biti virusi, bakterije (baktorefekcija) i egzosomi (10). Virusni vektori daleko su najčešće korišteni i većina se kliničkih istraživanja (oko 70%), ali i odobrenih lijekova za gensku terapiju temelji na njima (2). Virusni vektori biti će još detaljnije opisani jer predstavljaju najčešće korištene vektore u genskoj terapiji.

Tablica 3. Kratak opis, prednosti i nedostaci bioloških metoda prijenosa gena.

| Biološka metoda transfekcije | Opis | Prednosti | Nedostaci |
|--|--|--|--|
| Baktorefekcija (10,24,25) | Modificirane bakterije koje nose plazmidni transgen (najčešće roda <i>Escherichia</i> , <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i>) fagocitozom ulaze u stanice, bivaju razorene i otpuštaju plazmide; osim fagocitozom, ekstracelularne bakterije potencijalno mogu unijeti i plazmide u stanice konjugacijom | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> primjena • Lokalizirana aktivacija imunskog sustava može pridonijeti u genskoj terapiji tumora • Mogućnost zaustavljanja genske terapije antibioticima • Visok kapacitet prijenosa • Jednostavna primjena • Niska cijena sinteze | <ul style="list-style-type: none"> • Pretjerana imunosna aktivacija • Niska učinkovitost transfekcije • Mehanizam transfekcije još nije u potpunosti jasan • Privremena ekspresija transgena |
| Transfekcija pomoću egzosoma (10,15,26) | Mikrovezikule veličine 30-100 nm koriste se kao vehikul za prijenos gena; egzosomi nastaju pupanjem membrane kasnih endosoma nakon čega se otpuštaju u ekstracelularni prostor | <ul style="list-style-type: none"> • Moguća <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> primjena • Nisu imunogeni • Lagano prelaze biološke prepreke (uključujući krvo-moždanu barijeru) • Dugačak poluživot u plazmi i tkivu, mali klirens • Stanični tropizam | <ul style="list-style-type: none"> • Skupa sinteza • Slabo okarakterizirani |
| Virusni vektori (2,10,27,28) | Modificiranim virusima je uklonjen originalni genom koji ima daje patogenost i sposobnost replikacije, umjesto njega sadrže transgen koji se želi unijeti u stanicu. | <ul style="list-style-type: none"> • Moguća privremena i trajna ekspresija transgena • Moguća <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> primjena • Učinkovita ekspresija transgena • Stanični tropizam | <ul style="list-style-type: none"> • Imunogeničnost • Inercijska mutageneza • Općenito mali kapacitet za prijenos genetičkog materijala |

Unatoč brojnim načinima transfekcije stanica, savršena metoda i dalje ne postoji. U teoriji, idealni vektor imao bi sve od sljedećih karakteristika: 1) mogućnost *in vivo* i *ex vivo* primjene, 2)

sposobnost zaštite genetičkog materijala od svih izvanstaničnih i unutarstaničnih čimbenika, 3) visoka učinkovitost transfekcije stanica, 4) sposobnost stabilne i trajne ekspresije transgena ukoliko je potrebno, 5) visok kapacitet pakiranja genetičkog materijala, 6) nije toksičan za stanice, 7) ne aktivira imunski sustav, nije kancerogen i siguran je za primjenu, 8) jeftin, jednostavan za sintezu i može se proizvoditi u većim količinama, 9) specifično prenosi transgen samo u stanice od interesa (1).

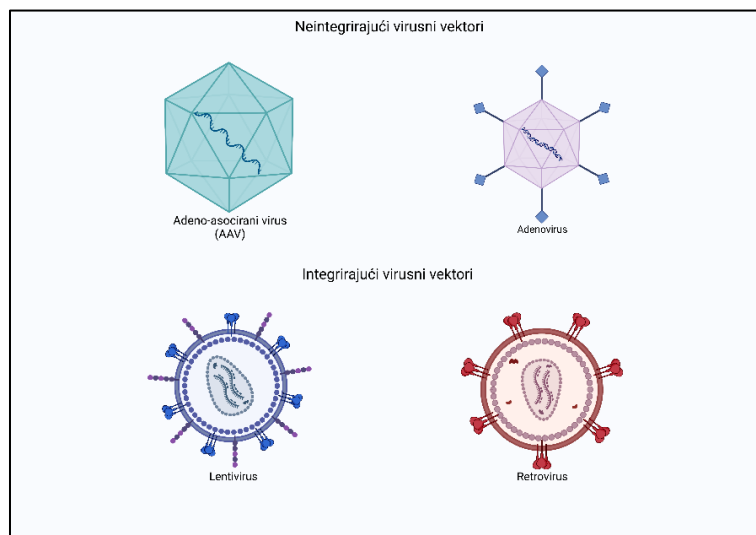
Takav vektor (tzv. *one size fits all*) zasada ne postoji. Svaka trenutno dostupna metoda prijenosa transgena ima svoje prednosti, ali i negativne strane koje joj ograničavaju kliničku primjenu. Ipak, virusni vektori i dalje dominiraju u svijetu genske terapije. Glavni razlozi su visoka učinkovitost transfekcije, ciljan prijenos gena u željene stanice, odnosno stanični tropizam, veća sposobnost modifikacije vektora ovisno o primjeni i mogućnost privremene ili trajne ekspresije transgena (27). S druge strane, najveći nedostaci virusnih vektora su sklonost aktivaciji urođenog i stečenog imunskog sustava, toksičnost, insercijska mutageneza, složena sinteza koja otežava proizvodnju vektora u većim količinama i relativno slabija sposobnost pakiranja genetičkog materijala zbog male veličine vektora (10,11,27). Pokretanje imunске reakcije na virusni vektor ograničava ponavljano primjenu i može imati potencijalno smrtonosne posljedice. Nasumično umetanje transgena na neželjena, ranjiva mjesta u genomu pacijenta poput protoonkogeni i tumorsupresorskih gena može dovesti do razvoja malignih bolesti (16). Iako su manje popularni zbog slabije učinkovitosti transfekcije i mogućnosti samo privremene ekspresije transgena, nevirusni vektori rješavaju neke od problema (27). Pokazuju slabu ili nikakvu imunogenost zbog čega se mogu ponavljano primjenjivati i imaju bolji sigurnosni profil. Kapacitet pakiranja genetičkog materijala nije ograničen što omogućuje prijenos velikih transgena. Lakše se sintetiziraju što

smanjuje troškove proizvodnje i omogućuje proizvodnju u većim količinama (11,29,30). Zbog ovih se prednosti nevirusni vektori intenzivnije proučavaju kao privlačna jeftinija i sigurnija alternativa u odnosu na virusne vektore. Vektori temeljeni na lipidnim nosačima trenutno predstavljaju najčešće korištene i najuspješnije nevirusne vektore (21).

Virusi su unutarstanični paraziti koji su evolucijom kroz milijune godina usavršili svoju sposobnost inficiranja stanica, preživljavanja u unutarstaničnoj sredini te korištenja staničnih komponenti za umnažanje vlastitog genoma i tvorbu novih virusnih čestica (31). Njihova infektivna priroda čini ih savršenim kandidatima za vektore u genskoj terapiji. Dosad 40 godina sabranog znanja i iskustva u vezi s virusnim vektorima dovelo je do pojave prvih učinkovitih genskih terapeutika (28). Trenutno najčešće korištene vrste virusa u genskoj terapiji su adenovirusi, adeno-asocirani virusi (*adeno-associated virus*, AAV), lentivirusi i retrovirusi (27). Ostale rjeđe korištene vrste virusnih vektora koje se zasada koriste samo u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima su herpes simplex virus, virus vakcinije i poksvirus (30). Svaki virusni vektor sastoji se od 3 glavne komponente: virusne kapside i/ili ovojnice, transgena i regulatorne sekvence. Virusna kapsida i lipidna ovojnica odgovorne su za zaštitu genetičkog materijala koji se prenosi i određuju stanični tropizam putem receptora koji se nalaze na njihovoj površini. Transgen predstavlja terapijski gen koji se genskom terapijom namjerava eksprimirati u stanici. Regulatorne sekvence su tzv. pojačivači (engl. *enhancers*), promotori i pomoćni elementi koji osiguravaju stabilnu kontrolu ekspresije transgena (28). Svi geni u virusnom genomu koji omogućavaju replikaciju i patogenost virusa moraju biti uklonjeni (10). Ovo je ključan korak u svakoj strategiji koja uključuje virusne vektore jer se time uklanja glavni izvor potencijalnih štetnih učinaka.

Tablica 4. Osnovne karakteristike najčešće korištenih virusnih vektora.

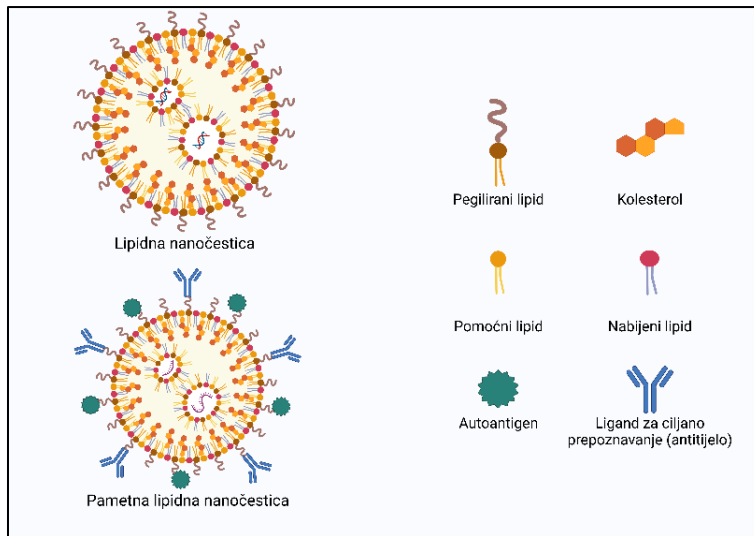
| Vrsta virusnog vektora | AAV (17,23,30,32,33) | Adenovirus (17,23,30,32,33) | Lentivirus (17,23,30,32,33) | Retrovirus (17,23,30,32,33) |
|------------------------------|---|---|--|--|
| Genoma | Jednolančana DNK (ssDNA) | Dvolančana DNK (dsDNA) | Jednolančana RNK | Jednolančana RNK |
| Kapacitet | ≈ 5 kb maksimalno | 8-30 kb | ≈ 9 kb | ≈ 9 kb |
| Integracija u genom domaćina | Rijetko, transgen najčešće u obliku episoma | Rijetko, transgen najčešće u obliku episoma | Da | Da |
| Ekspresija transgena | Trajna | Kratkotrajna | Dugoročna | Dugoročna |
| Poticanje imunosne reakcije | Slabo | Snažno | Slabo | Slabo |
| Glavna ograničenja | Mali kapacitet | Potiče imunosnu reakciju | Veći rizik insercijske mutagenoze | Veći rizik insercijske mutagenoze i može transficirati samo stanice koje se dijele |
| Glavne prednosti | <ul style="list-style-type: none"> Minimalna patogenost i imunogenost Dugotrajna ekspresija transgena | <ul style="list-style-type: none"> Učinkovita transfekcija stanica Veliki kapacitet | <ul style="list-style-type: none"> Dugotrajna ekspresija transgena Transgen perzistira u stanicama nakon njihove diobe | <ul style="list-style-type: none"> Dugotrajna ekspresija transgena Transgen perzistira u stanicama nakon njihove diobe |



Slika 1. Najčešće korišteni virusni vektori u genskoj terapiji. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>).

Paralelno s razvojem virusnih vektora došlo je do velikih napredaka u korištenju vektora baziranih na lipidima. Ova se vrsta vektora pokazala najuspješnijom nakon virusnih vektora i svoj klinički potencijal nedavno pokazala u vidu učinkovitih mRNA cjepiva protiv SARS-CoV-2 virusa. U kliničkim istraživanjima lipidni vektori korišteni su za prijenos siRNA i mRNA molekula, dok su u

pretkliničkim istraživanjima uspješno korišteni za transport antisense oligonukleotida, microRNA, DNA i CRISPR/Cas9 enzima za gensko uređivanje (22). Uspješan razvoj ovih vektora zahtijeva opsežno znanje fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih lipidnih komponenti. Trenutno najsloženiji i najuspješniji lipidni vektori odobreni od strane FDA su lipidne nanočestice koje sadrže 4 ključne vrste lipida: ionizirani lipidi, pomoćni lipidi (poput 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfokolina), kolesterol i pegilirani lipidi. Optimizacijom udjela pojedinih komponenti u navedenom „lipidnom koktelu“ mijenjaju se karakteristike lipidnih vektora: uspješna formacija nanočestica, veličina, stabilnost, naboj, ulazak u stanice i unutarstanično otpuštanje iz endosoma (18,22). Istraživanja su pokazala da promjena naboja lipidnih nanočestica utječe na njihovu biodistribuciju i omogućuje određeni stupanj tropizma za određeno tkivo. Dodavanjem tzv. SORT (*Selective ORgan Targeting*) molekula, koje su u suštini ionizirani lipidi različite jačine naboja, mijenja se ukupni vanjski naboj lipidnih nanočestica. Pozitivno nabijene nanočestice sklone su nakupljanju u plućima, negativno nabijene čestice u slezeni, a neutralne čestice u jetri (22). Međutim, ovaj mehanizam još uvijek nije dovoljan za precizan stanični tropizam i sprječavanje nakupljanja vektora u drugim organima. Stoga su razvijene tzv. pametne lipidne nanočestice, koje na svojoj površini sadrže ligande, receptore ili antitijela koji se specifično vežu na željenu vrstu stanica. Tako su anti-CD4 antitijela korištena za transfekciju pomagačkih limfocita T, molekule transferina za transfekciju tumorskih stanica koje pojačano izražavaju transferinski receptor i MAdCAM-1 receptori za transfekciju leukocita koji izražavaju ligand $\alpha 4\beta 7$ integrin i migriraju u sluznicu crijeva. Osim liganda za vezanje, pametne lipidne nanočestice mogu sadržavati vlastite antigene u svrhu otežanog prepoznavanja od strane imunskog sustava (22,31).



Slika 2. Sastav lipidnih nanočestica. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>).

Pristupi u genskoj terapiji

U genskoj terapiji mogu se transficirati dvije osnovne vrste stanica: stanice zametne linije (engl. *germline*) i somatske stanice. Genska terapija stanica zametne linije još se zove i nasljedna genska terapija (engl. *heritable gene therapy*). Genetički modificirane stanice zametne linije embrija u naknadnim mitozama prenose modificirani genetički materijal na stanice kćeri, te za razliku od genske terapije somatskih stanica, genetičke se promjene prenose na potomstvo genetički modificiranog pojedinca. Istraživanja koja se bave ovom metodom genske terapije ili su zabranjena ili im je uskraćeno financiranje u brojnim zemljama iz sigurnosnih i etičkih razloga (34). Veliki skandal koji je uzdrmao svjetsku biomedicinsku zajednicu dogodio se 2018., kada je He Jiankui, kineski znanstvenik koji se bavio istraživanjem genetičkog uređivanja na sveučilištu u Shenzhenu u ženu implantirao embrij koji je bio prethodno genetički modificiran da ne izražava CCR5, stanični receptor za HIV. Njegov čin izazvao je mnogobrojne osude iz cijelog svijeta zbog

nepoštivanja nacionalnih zakona i međunarodnih akademskih etičkih standarda (35). Uz gensku terapiju zametnih stanica navode se sljedeći bioetički problemi: uplitanje u prirodni tok i „nepoštivanje“ molekule DNK kao temelja ljudskog nasljeđa, nedostatak mogućnosti informiranog pristanka djeteta i budućih generacija genetički modificiranog pojedinca, percepcija roditelja da su nemarni ako se ne odluče za genetičku modifikaciju djece, komodifikacija djece (tzv. „dizajnerske bebe“), stvaranje društvenog pritiska za modifikaciju djece (djeca se genetički modificiraju da održe korak sa svojim vršnjacima), pogoršanje društvene nejednakosti, potencijal za eugeničke primjene nametnute od strane države, potencijal za kriminalnu primjenu i brojni drugi. Genska terapija zametnih stanica može se koristiti iz tri glavna razloga: 1) sprječavanje prijenosa genskih varijanti za koje se nedvosmisleno zna da su povezane s ozbiljnom bolešću ili stanjem, 2) smanjenje vjerojatnost razvoja ozbiljne bolesti ili stanja (npr. prevencija aterosklerotske bolesti smanjenjem razine kolesterola pomoću genetičke inaktivacije PCSK9 receptora), 3) poboljšanje fizioloških funkcija čovjeka preko granica tipičnih ljudskih sposobnosti, tzv. poboljšanje, engl. *enhancement* (npr. povećanje mišićne mase) (34).

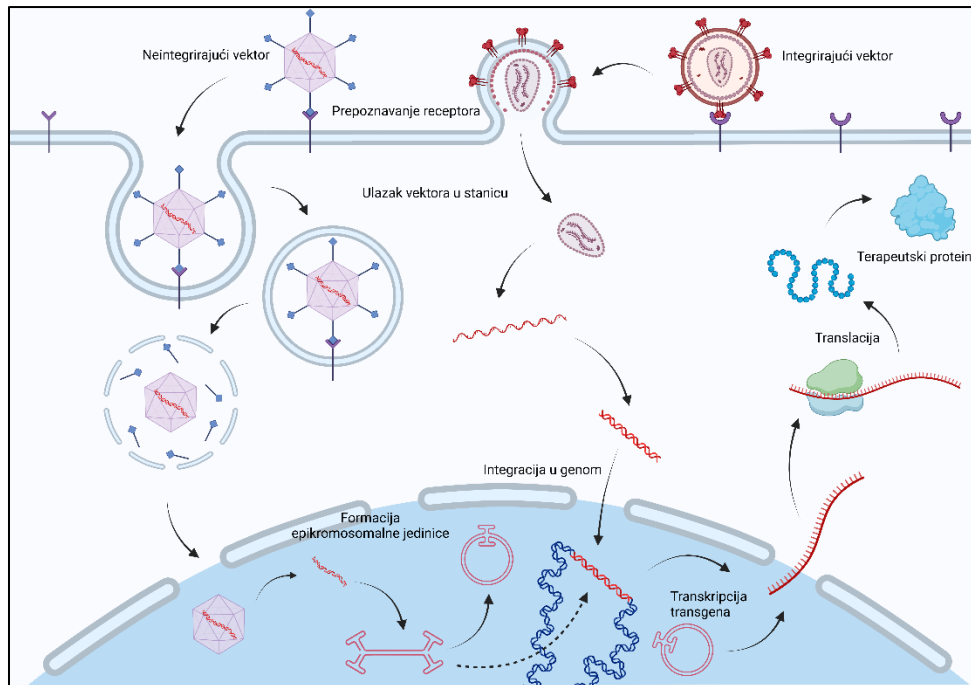
Poboljšanje se gotovo univerzalno smatra neetičnim korištenjem genske terapije, dok genska terapija u svrhu prevencije predstavlja sivu zonu i ponekad ju je teško razlučiti od poboljšanja. Sprječavanje prijenosa ozbiljnih genetičkih bolesti smatra se najmanje problematičnom indikacijom za gensku terapiju zametnih stanica, međutim i ovdje postoje bioetičke dileme. Iako je tehnologija genske terapije značajno napredovala, i dalje postoji značajan rizik stvaranja nepovratne i nepredvidive štete genetički modificiranim pojedincima i njihovom potomstvu, što predstavlja veliki rizik u odnosu na korist od takvih procedura. Navedeni rizik je neopravdan ako se uzme u obzir da danas postoji alternativa u vidu *in vitro* fertilizacije s preimplantacijskom

dijagnostikom embrija, kojom se mogu probrati oni embriji koji nemaju patogene varijante sekvence (34,36). S druge strane, pojedine bolesti smatraju se vrlo pogodnima za ovu metodu genske terapije, posebno one koje se manifestiraju u vrlo ranoj dobi djeteta, kada genska terapija somatskih stanica ne bi dovela do poboljšanja zbog već prisutnih trajnih oštećenja (npr. Tay-Sachsova bolest). Stoga su različite akademske institucije predložile posebne smjernice za provođenje ovoga oblika genske terapije, ali samo pod uvjetom dokazane koristi i stroge kontrole od strane regulatornih tijela (34,37). S druge strane, genska terapija somatskih stanica u punom je zamahu. Glavni pristupi u genskoj terapiji somatskih stanica su dodavanje ili dopuna gena (engl. *gene addition* ili *gene supplementation*), utišavanje gena (engl. *gene silencing*), uređivanje ili popravak gena (engl. *gene editing*, *gene repair*) i eliminacija stanica (engl. *cell elimination*) koja se pretežno koristi u genskoj terapiji tumora (2,29,32).

Dodavanje gena

Dodavanje gena je metoda genske terapije namijenjena liječenju bolesti kod kojih je glavni patogenetski mehanizam odsutnost gena, nedostatak izražavanja produkta ili stvaranje nefunkcionalnog produkta određenog gena. Drugim riječima, dodavanjem gena nastoji se kompenzirati delecija gena ili varijanta sekvence koja je dovela do gubitka njegove funkcije (engl. *loss-of-function mutation*) (38). Ovo ju čini prikladnom za liječenje monogenских, najčešće autosomno recesivnih ili X-vezanih recesivnih bolesti. Transgen koji se nastoji eksprimirati u ciljnim stanicama je divljeg tipa (engl. *wild type*) ili „pojačana” varijanta mutiranog gena. Iako se teoretski sve metode transfekcije mogu koristiti u ovu svrhu, u kliničkoj praksi i kliničkim istraživanjima najčešće su korišteni virusni vektori. Svi virusni vektori imaju sličan mehanizam

ulaska u stanice koji uključuje vezanje za određeni receptor na staničnoj membrani, staničnu internalizaciju vektora fuzijom ili pakiranje u endosome te bijeg iz endosoma u citoplazmu nakon njegove razgradnje (1,10,31). Nakon ovih početnih koraka postoje ključne razlike među pojedinim vektorima. Integrirajući vektori, u koje spadaju retrovirusi i lentivirusi, direktno ugrađuju transgen u DNK domaćina, čime transgen postaje trajan dio domaćinova genoma (31). Neintegrirajući vektori poput adenovirusa i adeno-povezanih virusa dostavljaju transgen u citoplazmu ili jezgru kao posebnu jedinicu odvojenu od domaćinova genoma (28). Ova epikromosomalna jedinica ili episom nalazi se u obliku kružne dvolančane molekule DNK nalik na plazmid. Ipak, u 0.1% slučajeva i ovdje se transgen integrira u DNK domaćina – npr. za AAV vektor uobičajena pozicija integracije je AAVS1 lokus na 19. kromosomu (10,28,31). Episomi se kao odvojene jedinice postepeno gube tijekom staničnih dioba budući da nisu u sklopu kromosomske DNK. Glavna implikacija ovoga je da transfekcija stanica koje se brzo dijele pomoću neintegrirajućih vektora dovodi do ubrzanog gubitka episoma i ekspresije transgena, dok integrirajući vektori osiguravaju stabilnu ekspresiju i u stanicama koje se dijele i u stanicama koje se ne dijele (31,33). Stoga je za transfekciju dugoživućih, postmitotičkih stanica (npr. fotoreceptori oka, neuroni, kardiomiociti) prikladna uporaba neintegrirajućih vektora poput AAV, dok je za transfekciju stanica koje intenzivno ulaze u mitozu (hematopoetske i druge matične stanice) potrebna uporaba integrirajućih vektora poput lentivirusa (32).



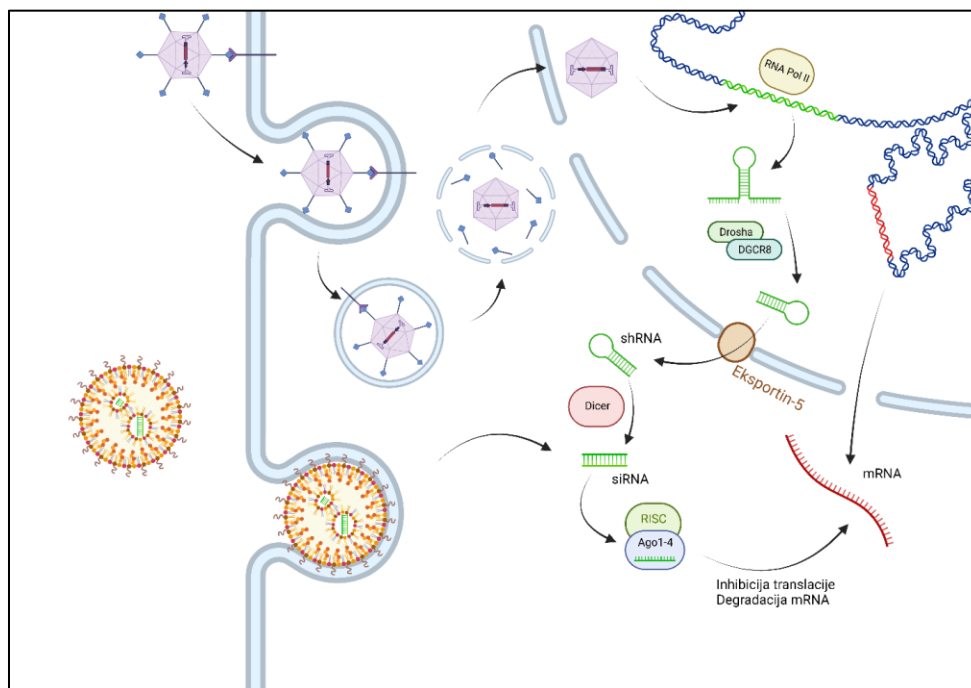
Slika 3. Dodavanje gena pomoću integrirajućih i neintegrirajućih vektora. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>).

Utišavanje gena

Utišavanje gena je metoda genske terapije kod koje se nastoji ukloniti ili smanjiti ekspresija nekoga gena. Koristi se u liječenju bolesti kod kojih je proteinski produkt nekoga gena prekomjerno izražen i/ili toksičan zbog svojih svojstava. Utišavanje gena pronalazi svoju svrhu u terapiji pojedinih autosomno dominantnih bolesti (npr. Huntingtonova bolest, transtiretinska amiloidoza, obiteljska adenomatozna polipoza), ali i terapiji stečenih bolesti poput infekcija (hepatitis B, RSV), metaboličkih bolesti (hiperkolesterolemija), neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza), tumora i dr. (39–41). Gen se može utišati na dva načina: pretranskripcijski i posttranskripcijski. Pretranskripcijsko utišavanje gena uključuje metode genskog uređivanja kojima se nastoji izbrisati cijeli određeni gen ili njegov dio iz genoma

osobe. Još zove se terapija gubitka funkcije (engl. *loss-of-function therapy*) ili *knockdown* gena (17,32). Posttranskripcijsko utišavanje gena usmjereno je inhibiciji i razgradnji mRNA određenog gena, sprječavajući translaciju u protein. Molekule kojima se to postiže su antisense oligonukleotidi (engl. *antisense oligonucleotides*, ASO), male interferirajuće RNK (engl. *small interfering RNA*, siRNA) i RNK ukosnice (engl. *short hairpin RNA*, shRNA). Sve predstavljaju RNK molekule male duljine koje sadrže sekvencu komplementarnu onoj na mRNA koju nastoje utišati (39). U odnosu na metodu dodavanja gena, ovdje su nevirusni vektori češće korišteni od virusnih (40). Antisense oligonukleotidi su sintetske jednolančane molekule RNK duljine 12-30 nukleotida koje se po principu komplementarnosti vežu za mRNA, čime se inhibira translacija ili potiče degradacija pomoću endogenih nukleaza poput RNK-aze H1 (39,41). siRNA se prvotno nalazi u obliku dvolančane RNK (dsRNA) koja se internalizira i dostavlja u citoplazmu. U citoplazmi je prepoznata od strane Dicer ribonukleaze, koja ju cijepa u siRNA duljine 21-23 nukleotidna para (42). Dvolančana siRNA potom formira RNA-induciran utišavajući kompleks (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC) kombinirajući se s Dicer, Ago-2 (*Argonaute-2*) i TRBP (*Transactivating Response RNA Binding Protein*) proteinima. RISC postaje aktivan uklanjanjem jednog lanca siRNA molekule, nakon čega je sposoban prepoznati i razgraditi komplementarne mRNA (40). Antisense oligonukleotidi i siRNA mogu kratkotrajno utišavati određeni gen jer nakon određenog vremena degradiraju. shRNA je obećavajuća alternativa kojom se može osigurati dugoročno utišavanje gena. Cilj je transficirati stanicu i ugraditi gen za shRNA u genom domaćina (42). Jednom ugrađen, shRNA je prepisana s gena uz pomoć RNK polimeraza II i III. Endogeno sintetizirana pre-shRNA potom prolazi kroz niz koraka kojom se prerađuje do siRNA, konačno formirajući RISC. Ukratko,

metodom shRNA osigurava se dugoročna endogena produkcija siRNA, čime se izbjegava potreba za ponavljajućom primjenom egzogene siRNA (43).

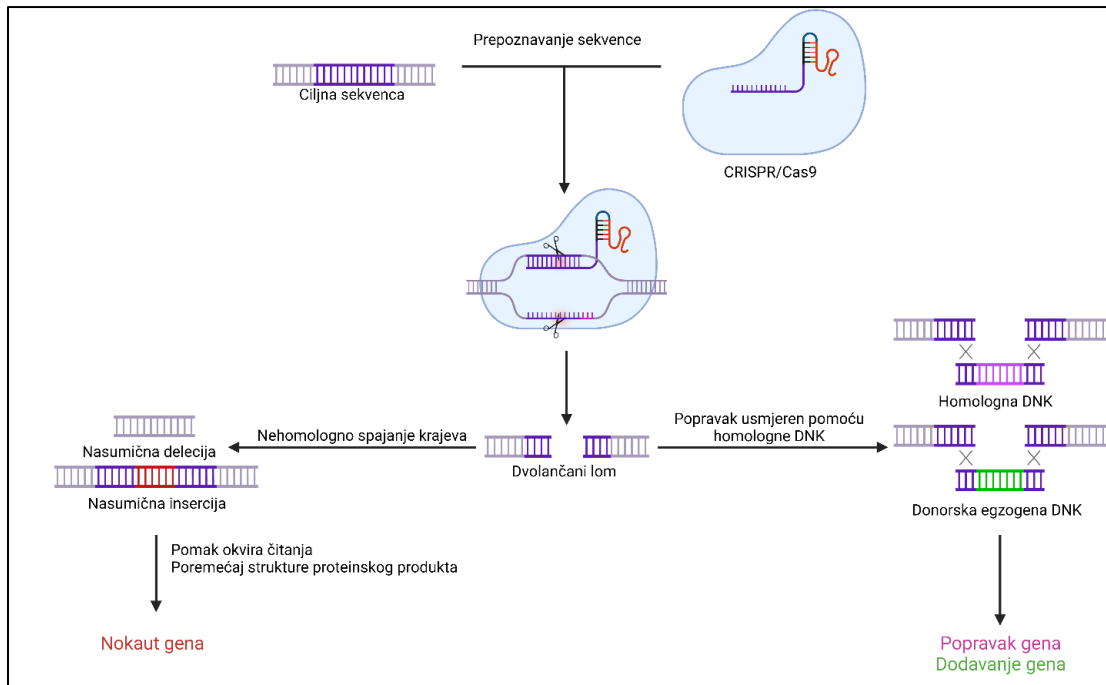


Slika 4. Utišavanje gena pomoću siRNA i shRNA. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>).

Uređivanje gena

Uređivanje gena omogućuje izmjenu DNK sekvence gena, čime se utjecati na ekspresiju proteina, ali i strukturu proteinskog produkta na genomskoj razini (2). Izvodi se pomoću pomoću posebnih nukleaza koje mogu prepoznati specifičnu sekvencu na molekuli DNK i izazvati dvolančane lomove na njoj. Glavne nukleaze koje se koriste za tu svrhu su ZFN (engl. *zinc-finger nuclease*), TALEN (engl. *transcription activator-like effector nuclease*) i CRISPR/Cas9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system 9*) (44). Uređivanje gena odvija se u 3 koraka - prvo nukleaza prepoznaje određenu sekvencu genomske DNA i stvara dvolančane

lomove, zatim u području loma dolazi do nasumične zamjene nukleotida ili se uvodi nova specifična sekvenca pomoću donorske DNA koja služi kao predložak, te konačno slijedi popravak induciranih dvolančanih lomova (23). Popravak dvolančanih lomova se kod eukariota može izvršiti nehomolognim spajanjem krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) i popravak usmjeren pomoću homologne DNK (engl. *homology directed repair*, HDR) (17,44,45). Prvi oblik popravka sklon je greškama i često dovodi do stvaranja nasumičnih insercija i delecija, dok potonji omogućuje precizan popravak na mjestu loma. HDR stoga predstavlja poželjniji oblik popravka lomova, međutim nije potpuno pouzdan i puno se rjeđe odvija u odnosu na NHEJ (17). Konačan rezultat uređivanja gena može biti nokaut gena, delecija gena, popravak gena ili dodavanje gena. Nokaut se postiže stvaranjem nasumičnih insercija i delecija koje nastaju kao posljedica NHEJ i remete strukturu proteina ili izazivaju pomak okvira čitanja (engl. *frameshift*). Delecija gena moguća je uz indukciju dva dvostruka loma s obje strane sekvence koja se nastoji izbrisati. Za popravak gena nužan je HDR, pri čemu se sekvenca na homolognom, zdravom kromosomu koristi kao predložak za popravak. Dodavanje gena iziskuje uporabu donorske egzogene DNK koja se umeće na mjesto loma (17,32). U usporedbi s dodavanjem gena pomoću integrirajućih virusnih vektora, ovdje se gen ubacuje na specifično mjesto u genomu, dok se kod integrirajućih virusnih vektora gen ubacuje na nasumično područje u genomu, donoseći sa sobom veći rizik od insercijske mutageneze (46).



Slika 5. Uređivanje gena pomoću CRISPR/Cas9 tehnologije. Ishod ovisi o vrsti popravka dvolančanih lomova na DNK – nehomologno spajanje krajeva dovodi do nokauta gena, dok popravak usmjeren pomoću homologne DNK omogućuje popravak ili dodavanje gena. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>).

Da bi se izbjeglo izazivanje dvolančanih lomova s nepouzdanim popravkom, istražuje se nova CRISPR/Cas9 tehnologija koja zahtijeva samo jednolančane lomove ili uopće ne koristi lomove jer njihov popravak nije sklon pogreškama. Tu spada uređivanje pojedinačnih nukleotida (engl. *base editing*), što omogućuje korekciju polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), koji su odgovorni za najveći broj genetičkih bolesti. Ovo se postiže deaktivacijom nukleazne aktivnosti Cas9 proteina i fuzijom enzima citidin deaminaze ili adenozin deaminaze na Cas9. Navedene deaminaze posreduju četiri moguće supstitucije - citozin u timin, timin u citozin, adenin u gvanin i gvanin u adenin, što je teoretski dovoljno za korekciju više od

70% SNP-ova koji izazivaju bolest. 2019. osmišljena je tzv. *prime editing* metoda genskog uređivanja, napredna inačica kojom se može vršiti insercija, delecija i svih 12 mogućih nukleotidnih konverzija (tj. moguća je također konverzija iz purinskih u pirimidinske baze i obratno) (45).

Metode eliminacije stanica

Metode eliminacije stanica pretežno se koriste u liječenju tumora. Temelje se na infekciji tumorskih stanica onkotropnim virusima koji induciraju staničnu smrt, smanjuju vaskularizaciju tumora, pokreću ili pojačavaju imunosnu reakciju domaćina na tumor (2,47). Stoga se još zove onkolitička viroterapija. Onkolitički virusi specifično su modificirani da inficiraju tumorske stanice (onkotropizam), a istovremeno budu nevirulentni za zdrave stanice domaćina. Kada se nađu u tumorskom tkivu, izazivaju smrt stanica i stimuliraju proupalnu reakciju koja potiče imunosni sustav da prepozna tumorske antigene i pokrene specifičnu imunosnu reakciju usmjerenu na tumorske stanice. Modificirani herpes simplex virus 1, virus ospica, adenovirus, coxsackie virus, reovirus i vakcinija virus trenutno su najistraživaniji mediji za onkolitičku viroterapiju (48). Iako predstavlja potencijalno moćnu strategiju za liječenje tumora, jedna vrsta onkolitičkog virusa često nije dovoljna za eliminaciju bolesti zbog heterogenosti i kompleksnosti tumorskih stanica. Međutim, onkotropni virusi mogu se koristiti kao adjuvantna terapija i povećati efikasnost imunoterapije kada se obje koriste u kombinaciji (47,48).

Genska terapija u kliničkoj praksi

Broj odobrenih genskih terapeutika povećava se iz godine u godinu. FDA je dosada za tržište odobrila 28 proizvoda iz područja stanične i genske terapije (49). EMA proizvode temeljene na genima, stanicama i tkivima svrstava u kategoriju medicinskih proizvoda za naprednu terapiju (engl. *advanced therapy medical products*, ATMP). Dosad je EMA za tržište odobrila 25 ovakvih proizvoda (50). Osim Europe i Sjedinjenih Američkih Država, genska terapija se intenzivno istražuje i u ostatku svijeta, posebice u Kini, gdje je provedeno gotovo 30 % svih kliničkih istraživanja vezanih uz gensku terapiju. Budući da je broj odobrenih genskih terapeutika u svijetu značajno velik i prelazi granice opsega ovoga rada, u narednim će odlomcima biti opisana samo genska terapija koja dobro ilustrira prethodno opisane osnovne pristupe u genskoj terapiji i koju su odobrile FDA i EMA.

Hemofilija

Hemofilija je X-vezana recesivna bolest uzrokovana mutacijama u *F8* ili *F9* genu koje dovode do manjka ili disfunkcije faktora zgrušavanja i sklonosti krvarenju. Hemofilija A predstavlja poremećaj faktora zgrušavanja VIII, a hemofilija B poremećaj faktora zgrušavanja IX. Oba faktora igraju ključnu ulogu u intrinzičnom putu zgrušavanja (51). Incidencija hemofilije A je 1 : 5 000 živorođene muške djece, a incidencija hemofilije B 1 : 25 000 živorođene muške djece. Iako se radi o dvije genetički i biokemijski različite bolesti, u kliničkoj slici ne postoje značajne razlike (52). Bolest se najčešće prezentira kao spontano krvarenje ili krvarenje nakon neznatne mehaničke traume. Težina kliničke slike ovisi o rezidualnoj aktivnosti faktora VIII i IX. Ako je aktivnost veća od 5 %,

hemofilija je blaga i krvarenje se javlja samo nakon umjerene traume i kirurških postupaka. Aktivnost od 1 do 5 % je umjerena hemofilija, kod koje se krvarenje javlja nakon blage traume i manjih kirurških postupaka. Teška hemofilija javlja se kada je aktivnost manja od 1 % i tada se javljaju spontana krvarenja. U teškoj hemofiliji pacijenti se mogu prezentirati širokom paletom simptoma i znakova nastalih kao posljedica teškog unutarnjeg krvarenja koje može zahvatiti brojne organe, poput zglobova, mišića, mozga, jetre, slezene, bubrega i raznih mekih tkiva (53). Više od polovice pacijenata s hemofilijom ima aktivnost faktora manju od 1 % (52). Trenutni zlatni standard u liječenju hemofilije je profilaksa temeljena na redovitoj infuziji koncentrata faktora zgrušavanja u svrhu održavanja aktivnosti faktora iznad 1 %. Bolest se može relativno dobro kontrolirati navedenom terapijom i redovita primjena osigurava normalan životni vijek, ali ima brojne nedostatke. Oba faktora imaju kratak poluvijek u plazmi, što zahtijeva infuzije faktora 2-3 puta tjedno. Osim toga, koncentracija egzogeno unesenih faktora značajno fluktuiraju – nakon infuzije je visoka, a zatim ubrzo pada na niske razine. Redovite infuzije su skupe i znatno ograničavaju kvalitetu života pacijenta, a fluktuacije u koncentraciji mogu dovesti do akutnih krvarenja i dugoročnih posljedica poput artropatije (52,54). Metode dodavanja gena predstavljaju novi obećavajući korak u liječenju hemofilije, budući da omogućavaju stabilnu endogenu ekspresiju faktora VIII i IX, čime se uklanjaju problemi vezani uz farmakokinetiku i neekonomičnost kronične terapije koncentratima faktora zgrušavanja. Genska terapija odobrena za liječenje hemofilije temelji se na AAV vektorima koji sadrže transgen za faktore zgrušavanja VIII i IX (55). Za liječenje hemofilije A 2022. godine odobren je valoctogene roxaparvovec (AAV5-hFVIII-SQ, komercijalno ime *Roctavian*) od strane EMA-e. Ovaj genski terapeutik sadrži modificirani transgen za faktor VIII s promotorom specifičnim za jetru koji je zapakiran u virusni vektor AAV5. Budući da

normalan transgen premašuje kapacitet pakiranja vektora, ovdje je modificiran na način da ne sadrži B-domenu, što mu smanjuje duljinu i omogućuje pakiranje u vektor, a istovremeno neznatno utječe na funkciju proteinskog produkta (52). Treća faza kliničkog istraživanja (NCT03370913) pokazala je visoku učinkovitost terapije – 90,3 % sudionika nije imalo krvarenja ili je imalo manje krvarenja u odnosu na profilaksu faktorom VIII dvije godine nakon terapije. Potreba za infuzijom faktora VIII smanjila se za 98,6 % tijekom prve godine i 83,8 % tijekom druge godine (56). Za gensku terapiju hemofilije B u studenom 2022. godine FDA je odobrila etranacogene dezaparvovec (AMT-061, komercijalno ime *Hemgenix*). Radi se o AAV5 vektoru koji sadrži transgen za faktor IX s Padova varijantom i promotorom specifičnim za jetru (54). Padova varijanta (R338L) ima 5-8 puta veću specifičnu aktivnost u odnosu na divlji tip (51). Kliničko istraživanje u 2b fazi (NCT03489291) pokazalo je veliki uspjeh u liječenju teške hemofilije kod troje pacijenata koji su imali krvarenja unatoč profilaktičkoj infuziji faktora IX. Tijekom 26 tjedana nakon jedne infuzije genskog terapeutika pacijenti nisu trebali nadomještanje faktora IX, niti je bilo značajnih krvarenja. Prosječna aktivnost faktora IX 26 tjedana nakon infuzije iznosila je 47 % (54). U HOPE-B studiji (NCT03569891) u kojoj je sudjelovalo 54 pojedinaca učestalost godišnjih krvarenja smanjila se za 64 % nakon jedne infuzije u odnosu na standardnu profilaksu faktorom IX. 98 % pacijenata više nije koristilo profilaksu, a potrošnja faktora IX smanjila se za 97 % (57).

Beta-talasemija

Beta-talasemija je jedna od najčešćih monogenских bolesti s heterogenom kliničkom prezentacijom. Karakterizira ju autosomno recesivni tip nasljeđivanja. Najčešće uzročne varijante su točkaste mutacije u promotorskoj regiji ili regijama prekrajanja *HBB* gena koji kodira beta-

globinski lanac. Varijante mogu rezultirati u smanjenoj (tzv. β^+ alel) ili odsutnoj (tzv. β^0 alel) produkciji beta-globinskog lanca. Ovisno o kliničkoj slici beta-talasemija se opisuje kao beta-talasemija major ili Cooleyeva anemija, beta-talasemija intermedia i beta-talasemija minor koja predstavlja status asimptomatskog nositelja jednog defektnog alela (58). Kod osoba s intermedijarnim oblikom beta-talasemije postoji rezidualna produkcija beta-globinskih lanaca. Prvi simptomi javljaju se obično nakon 2. godine života. Anemija je blaga, s razinama hemoglobina između 7 i 10 g/dL i transfuzije krvi obično nisu potrebne (59). Beta-talasemija major predstavlja najteži oblik bolesti s početkom simptoma između 6 mjeseci i 2 godine života. Prisutna je teška anemija s razinom hemoglobina ispod 7 g/dL, razvojem srčanog zatajenja i kaheksijom. Anemija nastaje zbog neefikasne eritropoeze i naglašene hemolize. Unatoč prilagodbenoj ekspanziji koštane srži eritropoeza je neefikasna zbog spajanja alfa-globinskih lanac u tetramere koji formiraju inkluzijska tjelešca. Inkluzijska tjelešca se potom vežu za staničnu membranu i izazivaju njeno oksidativno oštećenje s posljedičnom apoptozom eritrocitnih prekursora. Ekspanzija koštane srži dovodi do stanjivanja kortikalnog dijela dugih kostiju, patoloških prijeloma, deformiteta kostiju lubanje i zastoja u rastu. Ekstramedularna hematopoeza odgovorna je za razvoj splenomegalije. Terapijske su mogućnosti ograničene i za preživljavanje su nužne kronične transfuzije eritrocita ili alogena transplantacija koštane srži, a obje opcije sa sobom donose niz rizika. Preopterećenje željezom česta je komplikacija kroničnih transfuzija koja se može manifestirati dijabetesom, tamnom pigmentacijom kože (tzv. brončani dijabetes), hipopituitarizmom, hipoparatiroidozom, hipotireozom, cirozom jetre i kardiomiopatijom. Kelatori željeza ovdje se koriste kao preventivna i terapijska mjera. Osim sekundarne hemokromatoze, prisutni su i rizici vezani uz transfuziju poput infekcija patogenima koji se prenose krvlju (hepatitis

B virus, hepatitis C virus, HIV i dr.) (58,59). Alogena transplantacija koštane srži dosada je bila jedini način izlječenja beta-talasemije, ali zahtijeva histokompatibilnoga donora, donosi rizik od odbacivanja presatka ili razvoja bolesti presatka protiv primatelja i zahtijeva dugoročnu imunosupresivnu terapiju (60). Betibeglogene autotemcel (komercijalno ime *Zynteglo*) predstavlja novu potencijalno kurativnu terapijsku mogućnost za pacijente koji su ovisni o redovnim transfuzijama. Radi se o *ex vivo* genskoj terapiji kod koje se u izolirane autologne hematopoetske matične stanice integrira modificirani *HBB* gen pomoću lentivirusnog vektora. Nakon izolacije stanica pacijent se podliježe mijeloablativnoj terapiji. Modificirane hematopoetske stanice koje sadrže integrirani funkcionalni gen za beta-globinski lanac potom se intravenski vraćaju u pacijenta. Budući da je terapija originalno bila namijenjena i za liječenje bolesti srpastih eritrocita, *HBB* gen modificiran je na način da sadrži T87Q supstituciju, varijantu koja inhibira polimerizaciju srpastog hemoglobina. Betibeglogene autotemcel je 2019. odobrila EMA, a 2022. FDA za liječenje pedijatrijskih i odraslih pacijenata kojima su potrebne redovite transfuzije eritrocita (58,61). U kliničkom istraživanju treće faze (NCT02906202) 20 od 22 pacijenata više nije bilo ovisno o transfuzijama nakon terapije (61).

Transtiretinska amiloidoza

Nasljedna transtiretinska amiloidoza je rijetka autosomno dominantna nasljedna bolest uzrokovana mutacijama u *TTR* genu koji kodira transtiretin. Transtiretin je homotetramerni protein koji ima ulogu nosača tiroksina i retinol-vezajućih proteina u plazmi. Od dosad preko 130 otkrivenih mutacija, mutacije krivog smisla (engl. *missense*) najčešće su odgovorne za narušavanje

normalne konformacije transtiretina koji se potom odlaže u različita tkiva u obliku fibrilarnih snopova beta amiloidnih ploča (62). Mutirani transtiretin uglavnom se nakuplja u perifernom živčanom sustavu i srcu, a u manjoj mjeri u mozgu, bubrezima, mišićima i koži. Najčešće zabilježena patogena varijanta je V30M koja je endemski prisutna u određenim područjima (Portugal, Japan, Cipar, Švedska) i može biti povezana s ranim razvojem bolesti (prije 50. godine) ili kasnim razvojem bolesti (nakon 50. godine). Ostale varijante najčešće dovode do kasnijeg razvoja bolesti (63). S obzirom na fenotip bolest možemo podijeliti na 3 glavna oblika: neurološki (najčešći), kardijalni i miješani. Međutim, s vremenom svi na kraju poprimaju miješani oblik. Istražene su genotipsko-fenotipske korelacije i za pojedine je varijante poznato koji oblik bolesti uzrokuju (npr. za kardijalni oblik su karakteristične V122I i L111M, a za neurološki S50R i A97S) (64). Ipak, transtiretinska amiloidoza je sistemska bolest s brojnim kliničkim manifestacijama. U ranom obliku bolesti, kod kojeg su zahvaćena mala živčana vlakna, tipični su neuropatska bol, parestezije, poremećaji osjeta boli i temperature koji počinju u stopalima i šire se proksimalno. S vremenom se još javljaju poremećaj osjeta dodira, dubokog osjeta i motorike. U kasnom obliku, u kojem su od početka osim manjih još zahvaćena i velika živčana vlakna, odmah se javljaju poremećaji u svim modalitetima osjeta i poremećaji motorike sa slabošću i ranom atrofijom mišića počevši u distalnim dijelovima ekstremiteta. U oba oblika česta je autonomna disfunkcija u vidu erektilne disfunkcije, gastrointestinalnih simptoma, disurije, ortostatske sinkope, hipohidroze i kserostomije. Zahvaćenost srca karakterizirana je sinoatrijskim blokovima, atrioventrikularnim blokovima, blokovima grana i hipetrofičkom infiltrativnom kardiomiopatijom. Ukoliko se ne liječi, transtiretinska amiloidoza dovodi do smrtnog ishoda nakon 7 do 10 godina od početka bolesti. Progresija je obično brža u kasnom obliku bolesti (62–64). Prije razvoja genske

terapije, ublažavanje simptoma i ortotopna transplantacija jetre bili su jedine opcije u liječenju transtiretinske amiloidoze. Kasnije su razvijeni stabilizatori transtiretina (tafamidis meglumine) koji suprimiraju formaciju amiloidnih fibrila. Revoluciju u liječenju transtiretinske amiloidoze pružile su metode posttranskripcijskog utišavanja gena pomoću antisense oligonukleotida i siRNA. 2018. EMA i FDA odobrile su inotersen (komercijalno ime *Tegsedi*), 2'-O-metoksietil-modificirani *antisense* oligonukleotid koji prepoznaje i hibridizira se s 3' UTR regijom transtiretinske mRNA (mutiranu i divlji tip), dovodeći do njene razgradnje preko ribonukleaze H i sprječavajući translaciju transtiretina (65). NEURO-TTR studija (NCT01737398), kliničko istraživanje u trećoj fazi, pokazala je značajno bolju kontrolu neuropatije inotersenom u odnosu na placebo (65,66). Iste je godine bio odobren patisiran (komercijalno ime *ONPATTRO*), genski terapeutik koji se sastoji od dvolančane siRNA uklopljene u lipidnu nanočesticu koja ju dostavlja do hepatocita. siRNA usmjeruje RISC kompleks na 3' UTR regiju transtiretinske mRNA koji ju potom degradira (67). APOLLO studija (NCT01960348) također je pokazala značajno bolju kontrolu neuropatske bolesti patisiranom u odnosu na placebo (68).

Melanom

Talimogene laherparepvec ili T-VEC (komercijalno ime *Imlygic*) je prvi onkolitički virus odobren 2015. od strane FDA, a zatim i u Europi za liječenje melanoma u uznapredovalom stadiju, kada je tumor neresektabilan. T-VEC je genetički modificirani herpes simplex virus 1 (HSV-1) koji se selektivno replicira u tumorskim stanicama, lizira tumorske stanice i potiče razvoj imunskog odgovora na tumor. U genom virusa ubačen je gen za faktor stimulacije rasta granulocita i

makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), što potiče njegovu lokalnu produkciju. GM-CSF privlači dendritičke stanice ključne za započinjanje sistemske imunosne reakcije na tumor. Nadalje, iz genoma su uklonjeni ICP34.5 i ICP47 geni prisutni u virusu divljeg tipa. Delecija ICP34.5 smanjuje patogenost virusa i omogućava onkotropizam, a delecija ICP47 pojačava prezentaciju HSV antigena na inificiranim stanicama (69,70). TEC-V se primjenjuje *in situ*, izravnim ubrizgavanjem u tumorske lezije. OPTiM studija (NCT00769704) usporedila je klinički učinak T-VEC i GM-CSF terapije u liječenju površinskih melanoma. T-VEC je pokazao bolju učinkovitost i bio dobro toleriran (71,72). Osim u liječenju melanoma, postoje naznake da bi T-VEC mogao imati primjenu i u liječenju drugih solidnih tumora. Klinička istraživanja provedena su na skvamoznim tumorima glave i vrata, tumorima dojke i sarkoma mekih tkiva, gdje je T-VEC korišten u kombinaciji s kemoterapijom, radioterapijom i imunoterapijom. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdila uloga T-VEC u kombinaciji s drugim terapijskim modalitetima (71).

Rasprava

Genska terapija predstavlja novo obećavajuće područje biomedicine koje je u zadnjem desetljeću doživjelo eksplozivan napredak. Brojne su naznake da će se ovaj pozitivan trend nastaviti i u budućnosti. Prvo kliničko istraživanje vezano uz gensku terapiju provedeno je 1988. (NCT00001234) u Sjedinjenim Američkim Državama. Procjenjuje se da je u cijelom svijetu u periodu između 1988. i 2020. provedeno 2106 kliničkih istraživanja genske terapije. Tijekom prvih 20 godina ovog perioda (1988.-2008.) provedeno je tek 17,8 % svih istraživanja, dok je u sljedećih 10 godina (2009.-2019.) bilo provedeno preostalih 82,2% istraživanja. Broj istraživanja drastično

se povećava što govori u prilog velikom potencijalu i zainteresiranosti za gensku terapiju. Farmaceutska industrija financira 40,3 % svih kliničkih istraživanja, sveučilišta i bolnice 26,5 %, a institucije i centri 33,2 % (2). Prosječno trajanje kliničkog istraživanja za gensku terapiju nasljednih bolesti iznosi 3,5 godine, a za gensku terapiju tumora 5 godina (27). FDA procjenjuje da će do 2025. godišnje odobravati 10-20 genskih terapeutika ovisno o njihovoj kliničkoj uspješnosti (73). Međutim, put od kliničkog istraživanja do gotovog, odobrenog genskog terapeutika je složen i dugačak. Postoje brojne financijske prepreke, etički problemi, tehnička ograničenja i problemi vezani uz sigurnost i učinkovitost genskih terapeutika. Prosječna cijena genske terapije iznosi između 1 i 2 milijuna dolara po dozi (74). Tako je npr. cijena *Zyntegla* 1,8 milijuna dolara, a cijena *Zolgensma* 2,1 milijuna dolara. Iznimno visoke cijene predstavljaju veliki financijski teret za zdravstvene sustave i stavljaju u pitanje isplativost genske terapije. Farmaceutska industrija opravdava visoke cijene genske terapije navodeći složenu sintezu ovih lijekova, dugotrajan razvojni proces, visoke troškove vezane uz proizvodnju i rigorozne smjernice postavljenih od strane regulatornih tijela (2). Visoke cijene također su određene izuzetno malim tržištem za ove lijekove zbog prirode genetičkih bolesti – kada se gledaju u cjelini, genetičke bolesti nisu rijetka pojava, ali su vrlo heterogene i brojne. Na sličan problem se nailazi kod genske terapije stečenih bolesti poput tumora. Tumori su heterogene građe, sastavljeni od genetički različitih stanica koje se konstantno mijenjaju sakupljajući nove mutacije. Genska terapija iziskuje jedinstveni genski terapeutik sa specifičnom nukleinskom kiselinom za svaku genetičku bolest. Većina ozbiljnih genetičkih bolesti koje zahtijevaju gensku terapiju su rijetke (tzv. *orphan diseases*), s prevalencijom manjom od 1 : 2 000 (u SAD definirano kao nacionalna prevalencija manja od 200 000). Prema procjenama NIH, kao cjelina rijetke bolesti predstavljaju značajan javnozdravstveni

problem jer pogađaju do 25 milijuna osoba u SAD (74). Budući da ne postoji jedinstveni pristup za njihovo liječenje, potreban je razvoj stotina složenih genskih terapeutika koji bi bili korišteni od strane malog broja pacijenata. Očekuje se da će se cijene genske terapije smanjiti optimizacijom i razvojem genske terapije koja ne mora biti personalizirana u velikoj mjeri. Nadalje, iako je genska terapija izvorno namijenjena kao kurativna mjera koja se primjenjuje jednom u životu, ovo još tehnički često nije moguće. Stoga se učinkovitost i isplativost genske terapije analizira i uspoređuje s konvencionalnom farmakoterapijom istih bolesti. Daljnja istraživanja su potrebna da bi se smanjio ovaj nesrazmjer između troškova razvoja genske terapije i njene djelotvornosti. Ipak, pojedine studije pokazuju da je genska terapija već sada znatno isplativa. Tako modeli isplativosti genske terapije za hemofiliju B pokazuju da je genska terapija značajno isplativija od profilakse faktorom VIII (75).

Zaključci

Za mnoge ljude genetičke bolesti nose značajan morbiditet i dovode do rane smrti. Donedavno su terapijske mogućnosti za ove bolesti bile vrlo ograničene i sastojale se uglavnom od terapije nadomještanja enzima i metabolita, suportivnih mjera, simptomatske terapije i palijativne skrbi. Nakon dugog niza godina genska terapija konačno nudi rješenje za ove bolesti, tretirajući sam uzrok na molekularnoj razini. Put do kliničke primjene bio je vrlo dugačak i uključivao više od 50 godina interdisciplinarnog istraživanja iz različitih biomedicinskih područja. U zadnjem desetljeću broj je kliničkih istraživanja značajno porastao i dao pozitivne rezultate, što je rezultiralo odobravanjem prvih genskih terapeutika na tržištu. Da bi imala širu kliničku primjenu, genska

terapija mora savladati niz prepreka etičke, sigurnosne i financijske prirode. Etički problemi koji se susreću u genskoj terapiji uglavnom su vezani uz genetičku modifikaciju zametnih stanica. U slučaju genske terapije zametnih stanica genetičke promjene ne ostaju samo u pojedincu na koji se podliježu genskoj terapiji, već se prenose i na njegovo potomstvo. Najznačajniji sigurnosni problemi genske terapije su nuspojave koje nastaju kao posljedica izazivanja snažnog, potencijalno smrtonosnog imunosnog odgovora na vektore i nepredvidiva insercijska mutageneza koja može dovesti do razvoja zloćudnih bolesti. Učinkovitost genske terapije ovisi o mnogo faktora i potrebno je još vremena dok se postigne idealni cilj kurativne terapije koja se primjenjuje jednom tijekom života. Neučinkovita transfekcija, problemi kapaciteta vektora, imunosni sustav i različiti genetički mehanizmi stoje na putu učinkovite ekspresije transgena. Osim toga, veliki troškovi razvoja i proizvodnje genske terapije određuju visoku cijenu koja predstavlja financijski teret za pacijente i zdravstvene sustave. Rješavanje ovog problema zahtijeva suradnju između proizvođača, liječnika i regulatornih tijela.

Genska terapija je trenutno jedno od najuzbudljivijih biomedicinskih područja koje doživljava veliki napredak. Uz metode dodavanja gena, utišavanja gena i eliminacije zloćudnih stanica pomoću genetički modificiranih mikroorganizama, sljedeći korak u genskoj terapiji je klinička primjena genskog uređivanja koje ima golemi potencijal u liječenju gotovo svih vrsta genetičkih bolesti. Osim izazivanja promjena u strukturi kodirajuće DNK, postoje još šire mogućnosti kontrole gena na epigenetičkoj razini. Gotovo 98 % ljudske DNK je nekodirajuće i predstavlja regulatorne elemente koji utječu na ekspresiju kodirajuće DNK. Epigenetika je još uvijek slabo istražena područje koje predstavlja poveznicu između okoliša i ljudskog genoma. Za većinu stečenih bolesti se smatra da uključuje epigenetičke promjene koje se akumuliraju tijekom života. Ipak, ni

komparativno sitni dio DNK koji kodira proteine još nije u potpunosti istražen. Još uvijek se pronalaze novi geni i istražuje njihova funkcija. Od gotovo 25 000 poznatih gena, za skoro jednu trećinu se ne zna koja im je funkcija. Iz navedenoga možemo zaključiti da unatoč brojnim uspjesima, područje genske terapije se još uvijek nalazi na početku još dugačkog puta.

Sažetak

Cilj rada je opisati mehanizam djelovanja i kliničku primjenu genske terapije. Genska terapija je biološki medicinski proizvod s aktivnom supstancom koja se sastoji od rekombinantne nukleinske kiseline i primjenjuje se u ljudima s ciljem regulacije, popravka, nadomještanja, dodavanja ili brisanja genske sekvence. Prijenos egzogenog genetičkog materijala u stanice ili transfekcija se može odvijati *in ex vivo* ili *in vivo*. *Ex vivo* pristup uključuje izdvajanje stanica ili tkiva iz pacijenta, genetičku modifikaciju i kultivaciju izdvojenih stanica ili tkiva izvan tijela i zatim vraćanje istih u tijelo pacijenta. *In vivo* pristup podrazumijeva primjenu genskog terapeutika direktno u tijelo pacijenta, njegovu distribuciju u tkiva, transfekciju ciljnih stanica i genetičku modifikaciju tih stanica. Metode transfekcije mogu biti fizikalne, kemijske i biološke. Većina genske terapije koja se danas primjenjuje u kliničkoj praksi za transfekciju stanica koristi kemijske (nebiološke) i biološke vektore u obliku lipidnih nanočestica i virusa. Vektori su prijenosnici genetičkog materijala koji štite i dopremaju nukleinske kiseline do ciljnih stanica. Cilj genske terapije može biti dodavanje gena, utišavanje gena, uređivanje gena ili eliminacija tumorskih stanica. Dodavanje gena je metoda genske terapije namijenjena liječenju bolesti kod kojih nedostaje izražavanje produkta gena ili se stvara nefunkcionalni produkt. Utišavanjem gena nastoji se ukloniti ili smanjiti

ekspresija nekog gena jer njegov produkt prekomjerno izražen i/ili toksičan. Uređivanje gena omogućuje izmjenu DNK sekvence gena, čime se utjecati na ekspresiju proteina, ali i strukturu proteinskog produkta na genomskoj razini. Metoda eliminacije tumorskih stanica temelji se na primjeni onkotropnih virusa koji induciraju staničnu smrt ili pojačavaju imunosnu reakciju domaćina na tumor.

Summary

The goal of this review is to describe the mechanism of action and clinical applications of gene therapy. Gene therapy is a biological medical product which contains an active substance consisting of recombinant nucleic acid that is used in humans with the goal of regulating, repairing, replacing, adding or deleting the gene sequence. The transfer of exogenous genetic material into cells or transfection can take place *ex vivo* or *in vivo*. The *ex vivo* approach involves extracting cells or tissue from the patient, genetically modifying and cultivating the extracted cells or tissue outside the body and then returning them to the patient's body. The *in vivo* approach involves the application of gene therapeutics directly into the patient's body, distribution to tissues, transfection of target cells and genetic modification of these cells. Transfection methods can be physical, chemical and biological. Most gene therapy products used in clinical practice today use chemical (non-biological) and biological vectors in the form of lipid nanoparticles and viruses for transfection. Vectors are carriers of genetic material that protect and deliver nucleic acids to target cells. The aim of gene therapy can be to add genes, silence genes, edit genes or eliminate tumor cells. Gene addition is a method of gene therapy intended for the treatment of

diseases in which the expression of the gene product is lacking or a non-functional product is created. The goal of gene silencing is to remove or reduce the expression of a gene because its product is overexpressed and/or toxic. Gene editing makes it possible to change the DNA sequence of a gene, thereby influencing protein expression, as well as the structure of the protein product at the genomic level. The method of eliminating tumor cells is based on the application of oncotropic viruses that induce cell death or enhance the host's immune response to the tumor.

Literatura

1. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, i ostali. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol.* 2019; 9: 297.
2. Alhakamy NA, Curiel DT, Berkland CJ. The era of gene therapy: From preclinical development to clinical application. *Drug Discov Today.* 2021; 26(7): 1602–19.
3. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science.* 2015; 349(6255): 1483–9.
4. Verma IC, Puri RD. Global burden of genetic disease and the role of genetic screening. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2015; 20(5): 354–63.
5. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttua S. History of gene therapy. *Gene.* 2013; 525(2): 162–9.
6. Wang D, Wang K, Cai Y. An overview of development in gene therapeutics in China. *Gene Ther.* 2020; 27(7–8): 338–48.

7. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018; 359(6372) :eaan4672.
8. Wu X, He X, Liu F, Jiang X, Wang P, Zhang J, i ostali. Development and clinical translation of ex vivo gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022; 20: 2986–3003.
9. Tucci F, Scaramuzza S, Aiuti A, Mortellaro A. Update on Clinical Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Inherited Monogenic Diseases. *Mol Ther*. 2021; 29(2): 489–504.
10. Sayed N, Allawadhi P, Khurana A, Singh V, Navik U, Pasumarthi SK, i ostali. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci*. 2022; 294: 120375.
11. Grigsby CL, Leong KW. Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery. *J R Soc Interface*. 2010; 7(Suppl 1): S67–82.
12. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays Biochem*. 2019; 63(4): 457–68.
13. Pereyra AS, Mykhaylyk O, Lockhart EF, Taylor JR, Delbono O, Goya RG, i ostali. Magnetofection Enhances Adenoviral Vector-based Gene Delivery in Skeletal Muscle Cells. *J Nanomedicine Nanotechnol*. 2016; 7(2): 364.
14. Du X, Wang J, Zhou Q, Zhang L, Wang S, Zhang Z, i ostali. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Deliv*. 2018; 25(1): 1516–25.

15. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Kandimalla R, Wallen M, Tyagi N, i ostali. Exosome-mediated delivery of RNA and DNA for gene therapy. *Cancer Lett.* 2021; 505: 58–72.
16. Ra R. Gene therapy: An updated overview on the promising success stories. *Malays J Pathol.* 2020;
17. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018; 25(1): 1234–57.
18. Zu H, Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS J [Internet].* 2021; 23(4).
19. Lo CW, Lin T, Ueno M, Romero-Lopez M, Maruyama M, Kohno Y, i ostali. Optimization and Characterization of Calcium Phosphate Transfection in Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019; 25(9): 543–52.
20. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. DEAE-Dextran Transfection. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018; 2018(7).
21. Ponti F, Campolungo M, Melchiori C, Bono N, Candiani G. Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. *Chem Phys Lipids.* 2021; 235: 105032.
22. Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022; 188: 114416.

23. Biagioni A, Laurenzana A, Margheri F, Chillà A, Fibbi G, so M. Delivery systems of CRISPR/Cas9-based cancer gene therapy. *J Biol Eng.* 2018; 12: 33.
24. Johnson SA, Ormsby MJ, McIntosh A, Tait SWG, Blyth K, Wall DM. Increasing the bactofection capacity of a mammalian expression vector by removal of the f1 ori. *Cancer Gene Ther.* 2019; 26(7): 183–94.
25. Celec P, Gardlik R. Gene therapy using bacterial vectors. *Front Biosci-Landmark.* 2017; 22(1): 81–95.
26. Duan L, Xu L, Xu X, Qin Z, Zhou X, Xiao Y, i ostali. Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy. *Nanoscale.* 2021; 13(3): 1387–97.
27. Arabi F, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomed Pharmacother.* 2022; 153: 113324.
28. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6: 53.
29. Maestro S, Weber ND, Zabaleta N, Aldabe R, Gonzalez-Aseguinolaza G. Novel vectors and approaches for gene therapy in liver diseases. *JHEP Rep.* 2021; 3(4): 100300.
30. Arjmand B, Larijani B, Sheikh Hosseini M, Payab M, Gilany K, Goodarzi P, i ostali. The Horizon of Gene Therapy in Modern Medicine: Advances and Challenges. U: Turksen K, urednik. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 8.* Cham: Springer International Publishing; 2019. str. 33–64. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; sv. 1247).

31. Butt MH, Zaman M, Ahmad A, Khan R, Mallhi TH, Hasan MM, i ostali. Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy: A Review. *Genes*. 2022; 13(8): 1370.
32. Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med*. 2019; 70(1): 273–88.
33. Chen YH, Keiser MS, Davidson BL. Viral Vectors for Gene Transfer. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2018; 8(4): e58.
34. Collier BS. Ethics of Human Genome Editing. *Annu Rev Med*. 2019; 70(1): 289–305.
35. Cyranoski D, Ledford H. Genome-edited baby claim provokes international outcry. *Nature*. 2018; 563(7733): 607–8.
36. Tang R, Xu Z. Gene therapy: a double-edged sword with great powers. *Mol Cell Biochem*. 2020; 474(1–2): 73–81.
37. Wolf DP, Mitalipov PA, Mitalipov SM. Principles of and strategies for germline gene therapy. *Nat Med*. 2019; 25(6): 890–7.
38. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18(5): 358–78.
39. Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, i ostali. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol*. 2021; 905: 174178.

40. Nikam RR, Gore KR. Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. *Nucleic Acid Ther.* 2018; 28(4): 209–24.
41. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci.* 2019; 42: 385–406.
42. Haiyong H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018; 1706: 293–302.
43. Acharya R. The recent progresses in shRNA-nanoparticle conjugate as a therapeutic approach. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 104: 109928.
44. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24): 9604.
45. Wang SW, Gao C, Zheng YM, Yi L, Lu JC, Huang XY, i ostali. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Mol Cancer.* 2022; 21: 57.
46. Roth TL, Marson A. Genetic Disease and Therapy. *Annu Rev Pathol.* 2021; 16: 145–66.
47. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer.* 2018; 6: 140.
48. Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccines Immunother.* 2020; 16(10): 2389–402.
49. Research C for BE and. Approved Cellular and Gene Therapy Products. FDA [Internet]. 17. travnja 2023. [citirano 14. svibnja 2023.]; Dostupno na: <https://www.fda.gov/vaccines->

blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products

50. EMA. Advanced therapy medicinal products: Overview [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [citirano 16. svibnja 2023.]. Dostupno na:
<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>
51. Leebeek FWG, Miesbach W. Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues. *Blood*. 2021; 138(11): 923–31.
52. Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2019; 2019(1): 1–8.
53. Mehta P, Reddivari AKR. Hemophilia. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 26. travnja 2023.]. Dostupno na:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551607/>
54. Von Drygalski A, Giermasz A, Castaman G, Key NS, Lattimore S, Leebeek FWG, i ostali. Etranacogene dezaparvovec (AMT-061 phase 2b): normal/near normal FIX activity and bleed cessation in hemophilia B. *Blood Adv*. 2019; 3(21): 3241–7.
55. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, i ostali. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther*. 2021; 29(2): 464–88.

56. Ozelo MC, Mahlangu J, Pasi KJ, Giermasz A, Leavitt AD, Laffan M, i ostali. Valoctocogene Roxaparvovec Gene Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2022; 386(11): 1013–25.
57. Heo YA. Etranacogene Dezaparvovec: First Approval. *Drugs*. 2023; 83(4): 347–52.
58. Asghar AA, Khabir Y, Hashmi MR. Zynteglo: Betibeglogene autotemcel – An innovative therapy for β - thalassemia patients. *Ann Med Surg*. 2022; 82: 104624.
59. Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, Khan M, Tahir HM, Mumtaz S, i ostali. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol Genet Genomic Med*. 2021; 9(12): e1788.
60. Jaing TH, Chang TY, Chen SH, Lin CW, Wen YC, Chiu CC. Molecular genetics of β -thalassemia. *Medicine (Baltimore)*. 2021; 100(45): e27522.
61. Locatelli F, Thompson AA, Kwiatkowski JL, Porter JB, Thrasher AJ, Hongeng S, i ostali. Betibeglogene Autotemcel Gene Therapy for Non- β^0/β^0 Genotype β -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2022; 386(5): 415–27.
62. Manganelli F, Fabrizi GM, Luigetti M, Mandich P, Mazzeo A, Pareyson D. Hereditary transthyretin amyloidosis overview. *Neurol Sci*. 2022; 43(Suppl 2): 595–604.
63. Tozza S, Severi D, Spina E, Iovino A, Aruta F, Ruggiero L, i ostali. The neuropathy in hereditary transthyretin amyloidosis: A narrative review. *J Peripher Nerv Syst*. 2021; 26(2): 155–9.
64. Adams D, Koike H, Slama M, Coelho T. Hereditary transthyretin amyloidosis: a model of medical progress for a fatal disease. *Nat Rev Neurol*. 2019; 15(7): 387–404.

65. Benson MD, Dasgupta NR, Monia BP. Inotersen (transthyretin-specific antisense oligonucleotide) for treatment of transthyretin amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag.* 2019; 9(1): 25–30.
66. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, i ostali. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018; 379(1): 22–31.
67. Hoy SM. Patisiran: First Global Approval. *Drugs.* 2018; 78(15): 1625–31.
68. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, i ostali. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018; 379(1): 11–21.
69. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers.* 2021; 13(6): 1383.
70. Salloum A, Koblinski J, Bazzi N, Zeitouni NC. Talimogene Laherparepvec in Non-Melanoma Cancers. *J Clin Aesthetic Dermatol.* 2021; 14(11): 18–25.
71. Kaufman HL, Shalhout SZ, Iodice G. Talimogene Laherparepvec: Moving From First-In-Class to Best-In-Class. *Front Mol Biosci.* 2022; 9: 834841.
72. Andtbacka RHI, Collichio F, Harrington KJ, Middleton MR, Downey G, Öhrling K, i ostali. Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III–IV melanoma.

J Immunother Cancer. 2019; 7: 145.

73. Koulianos K. Gene therapy and US healthcare: Rationalizing the price of promise. Mol Ther. 2021; 29(10): 2887–8.

74. Richardson M, Rind D, Beaudoin FL, Pearson SD, Campbell JD. The Fair Price For One-Time Treatments; How Can We Overcome Existing Market Price Distortions? Health Aff Forefr [Internet]. [citirano 17. svibnja 2023.]; Dostupno na: <https://www.healthaffairs.org/doi/10.1377/forefront.20230117.110613/full/>

75. Bolous NS, Chen Y, Wang H, Davidoff AM, Devidas M, Jacobs TW, i ostali. The cost-effectiveness of gene therapy for severe hemophilia B: a microsimulation study from the United States perspective. Blood. 2021; 138(18): 1677–90.

Životopis

Tomislav Glavan rođen je 2. travnja .1998. u Rijeci. Osnovnu školu i opću gimnaziju pohađao je u Crikvenici. Nakon završenog gimnazijskog obrazovanja 2017. je upisao Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Tijekom studija je pokazao zanimanje za znanstveni i klinički rad. Vršio je dužnosti demonstratora dvije godine na Katedri za anatomiju i dvije godine na Katedri za histologiju i embriologiju. Povremeno je volontirao za neprofitnu udrugu studenata medicine CroMSIC od 2019. godine. Aktivo je sudjelovao je na studentskom kongresu NeuRi 2021. gdje je predstavio prikaz slučaja "*Obesity*,

deformities, cognitive deficit and developmental delay in five patients with BDNF gene mutation; a case report". Tijekom COVID pandemije 2021. je volontirao na hitnom prijemu KBC Sušak i KBC Rijeka. 2022. je aktivno sudjelovao na 10. Kongresu farmakologije s posterom "*Exploration of the antioxidative and anti-inflammatory effects of Aronia melanocarpa extract in an in vitro model of Parkinson's disease*". U kolovozu 2022. je sudjelovao na studentskoj razmjeni u klinici za *in vitro* fertilizaciju iVF Riga (Riga, Latvija). Dobio je 4 dekanove nagrade za izvrsnost i jednu za volontiranje tijekom COVID pandemije. Trenutno Tomislav obavlja svoju šestu godinu studija u sklopu Erasmus razmjene na Karlovom sveučilištu u Pragu.