

Genska terapija i njezina primjena u kliničkoj medicini

Šarčević, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:344166>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Andrea Šarčević

Genska terapija i njezina primjena u kliničkoj medicini

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Tamare Nikuševe-Martić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Tamara Nikuševa-Martić

Popis korištenih kratica

engl. – engleski

ADA SCID – teška kombinirana imunodeficijencija uzrokovana manjkom adenozin deaminaze (engl. *adenosine deaminase severe combined immunodeficiency*)

AuNP – zlatne nanočestice (engl. *Au nanoparticles*)

CAR – Cocksackie / Adenovirusni receptor

CAR19 – kimerični antigenski receptor za CD19 (engl. *Chimeric Antigen Receptor to CD19*)

CCRP – CC kemokinskog receptora 5 (engl. *C-C chemokine receptor type 5*)

CRISPR/cas9 – engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*

DHFR – dihidrofolat reduktaza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DOPE – dioleil-fosfatidiletanolamin (engl. *dioleoylphosphatidylethanolamine*)

GM-CSF – faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

gRNA – RNA vodič (engl. *guide RNA*)

GVHD – bolest presatka protiv primatelja, (engl. *graft versus host disease*)

HAT medij – hipoksantin-aminopterin-timidin medij (engl. *hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HGPRT – hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaze

HDR – popravak vođen homologijom (engl. *homology-directed repair*)

HMW – niska molekularna težina (engl. *high molecular weight*)

HSC – hematopoetske matične stanice (engl. *haematopoietic stem cells*)

HSV – herpes simplex virus

HSV-TK – timidin kinaza herpes simplex virusa

Kb – kilobaza

LMW – niska molekularna težina (engl. *low molecular weight*)

LNGFR – faktor rasta živaca niskog afiniteta (engl. *human low affinity nerve growth factor receptor*)

LTR – dugo terminalno ponavljanje (engl. *long terminal repeat*)

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)

MLV – virus mišje leukemije (engl. *murine leukemia virus*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

miRNA – mikro RNA

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

PEG – polietilenglikol

PEI – polietilenimin

PLL – poli-L-lizin

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNP – ribonukleoproteinski kompleks

RSV – Rous sarkoma virus (engl. *Rous sarcoma virus*)

siRNA – kratka interferirajuća RNA (engl. *short interfering RNA*)

SV40 – engl. *simian virus 40*

SŽS – središnji živčani sistem

TALEN – efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (engl. *transcription activator- like effector nuclease*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

UTMD – ultrazvučna ciljana destrukcija mikromjehurića (eng. *ultrasound targeted microbubble destruction*)

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

ZFN – nukleaze cinkovih prstiju (engl. *zinc finger nuclease*)

SADRŽAJ

1.	SAŽETAK	
2.	SUMMARY	
3.	UVOD	1
4.	POVIJEST GENSKJE TERAPIJE	2
4.1	RAZVOJ IDEJE UPOTREBE GENA KAO TERAPIJE	2
4.2	RAZVOJ METODA UNOSA DNA U STANICU	3
4.3	PRVI POKUŠAJI PRIMJENE GENSKJE TERAPIJE NA LJUDIMA	3
4.4	NOVA KLINIČKA ISTRAŽIVANJA I NOVI PROBLEM – INSERCIJAKA MUTAGENEZA	6
4.5	METODE CILJANE INTEGRACIJE GENA.....	6
5.	TEMELJNI PRINCIPI GENSKJE TERAPIJE	9
5.1	DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA	9
5.2	VRSTE GENSKOG MATERIJALA	10
6.	METODE PRIJENOSA NUKLEINSKIH KISELINA.....	11
6.1	VIRUSNI VEKTORI.....	13
6.1.1.	Adenovirusi	13
6.1.2	Retrovirusi	14
6.1.3	Adeno-povezani virusi.....	16
6.2	FIZIKALNE METODE	17
6.2.1	Mikroigla.....	17
6.2.2	Genski pištolj	18
6.2.3	Elektroporacija i nukelofekcija	19
6.2.4	Sonoporacija	20
6.2.5	Fotoporacija	21
6.2.6	Magnetopracija.....	22
6.3	KEMIJSKE METODE	23
6.3.1	Kationski lipidi.....	23
6.3.2	Kationski polimeri	25
7.	ODOBRENA GENSKA TERAPIJA U SVIJETU	26
8.	ZAHVALE.....	31
9.	LITERATURA	32
10.	ŽIVOTOPIS.....	42

1. Sažetak

Genska terapija i njezina primjena u kliničkoj medicini

Andrea Šarčević

Pojam 'genska terapija' obično se odnosi na umetanje genskog materijala u stanicu radi pružanja terapijskog učinka. Prvobitno je proučavana kao način liječenja životno ugrožavajućih poremećaja (npr. karcinoma i kongenitalnih poremećaja) otpornih na uobičajeno liječenje. Međutim, genska terapija danas se razmatra i za mnoga stanja koja nisu opasna po život, za ona stanja koja utječu na kvalitetu života pacijenta.

1990. godine objavljena je prva klinička studija koja je koristila prijenos gena. Budući da je pokazala da je prijenos gena posredovan virusima siguran i praktičan, dovela je do pokretanja mnogih drugih studija. Od početka razvoja do danas, odobreno je više od 4000 kliničkih ispitivanja širom svijeta.

Cilj ovog rada je prikazati podrijetlo i trenutni doseg genske terapije. Rad sažima povijest, osnovne strategije i alate genske terapije, te donosi pregled odobrenih lijekova genske terapije.

Ključne riječi: genska terapija, genski transfer, virusni vektori

2. Summary

Gene therapy and application in clinical medicine

Andrea Šarčević

The term ‘gene therapy’ typically refers to insertion of a genetic material into cell to provide therapeutic effect. It was originally studied as a way to treat life-threatening disorders (e.g. cancers or congenital disorders) refractory to conventional treatment. However, gene therapy nowadays is considered for many non–life-threatening conditions, those affecting a patient’s quality of life.

In 1990 the first clinical study using gene transfer was reported. Since it showed that viral gene transfer was safe and practical, it led to the launch of many other studies. From the beginning of development until today, more than 4000 clinical trials have been approved worldwide.

This paper aims to review the origins and current reach of gene therapy. It summarizes the history, basic strategies and tools of gene therapy, and provides an overview of approved gene therapy drugs.

Key words: gene therapy, gene transfer, viral vectors

3. Uvod

Ljudski genom sadrži oko 19 000 gena koji kodiraju široki spektar proteina čija se uloga kreće od gradivnih elemenata stanice pa sve do glavnih dionika svih bioloških procesa neophodnih za život (1). Iako genetski kod ostaje velikim dijelom nepromijenjen kroz generacije, može doći do nastanka grešaka u obliku mutacija, delecija ili poremećaja u redosljedju gena (2). Ove genetske promjene dovode do izmijenjenog izgleda i funkcije proteina, što rezultira bolešću.

Pojam genska terapija obuhvaća sve postupke tijekom kojih se u stanici nekog organizma ciljano modificira genetski materijal, sa svrhom postizanja terapijskog učinka ili prevencije bolesti. Veliki potencijal i zainteresiranost za razvoj ove terapije zasnovani su na činjenici da ona djeluju na sami uzrok patofiziološkog poremećaja, ispravljajući greške na razini gena.

Povijest razvoja ove vrste terapije traje već više od šezdeset godina, a temelj za početak istraživanja bila su saznanja o mogućnostima identifikacije i prijenosa gena. Na samim počecima podloga razvoja genske terapije bila je njezina primjena u liječenju životno ugrožavajućih bolesti (npr. cistična fibroza, karcinomi) za koje u tom trenutku nije postojalo adekvatno konvencionalno liječenje (3). U današnje vrijeme svjedoci smo toga da se istraživanja učinka genske terapije okreću i prema onim bolestima koje nisu opasne po život, u ovom slučaju sa svrhom poboljšanja kvalitete života oboljele osobe.

U ovom radu bit će prikazana povijest i tijek razvoja genske terapije, vrste i do sada istražene metode primjene genske terapije te pregled trenutno odobrenih lijekova na bazi genske terapije.

4. Povijest genske terapije

4.1 Razvoj ideje upotrebe gena kao terapije

Razvoju genske terapije prethodila su otkrića na području molekularne biologije i mikrobiologije. Jedno od početnih znanja iz područja mikrobiologije za razvoj genske terapije ponudio je britanski bakteriolog Frederick Griffith koji se bavio proučavanjem *S. Pneumoniae*.

On je 1928. objavio rad u kojemu je opisao transformaciju virulentnog u nevirulentni soj pneumokoka. Ovo je otkriće potaklo niz istraživanja na području mikrobiologije kojima je bio cilj razlučiti način na koji je informacija o patogenosti prešla iz inaktiviranog u živi soj. Već nakon nekoliko godina transformacija je uspješno obavljena *in vitro* (4). Jedna od prekretnica bila je 1944. godina kada su Avery i McCarty objavili da je tvar koja je uzrokovala transformaciju deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*, DNA) (5). Pošto je većina znanstvenika u to vrijeme smatrala da su proteini zaslužni za prijenos genetičke informacije, ovo je otkriće dramatično promijenilo poglede na molekularnu biologiju i DNA je postala središte mnogih istraživanja. Narednih je godina Lederberg sa svojim suradnicima otkrio još dva načina prijenosa gena između bakterija uz do tada poznatu transformaciju, a za svoj rad na području bakterijske genetike bio je nagrađen i Nobelovom nagradom 1958. godine. U radu kojega je 1947. godine objavio zajedno s Tatumom opisao je konjugaciju između bakterija (6), a nekoliko godina kasnije u suradnji sa Zinderom otkriva transdukciju koju opisuje kao način prijenosa genskog materijala između dviju bakterija posredovanu bakteriofagom (7). Otkriće da bakteriofagi mogu poslužiti kao alat za prijenos gena potaklo je mnoga istraživanja, a iz toga se pojavila i ideja da bi u istu svrhu mogli poslužiti i eukariotski virusi koji bi prenosili gene u ljudske stanice.

Prije nego bi se takve ideje ostvarile, bilo je potrebno pronaći medij koji bi služio za selekciju stanica s prisutnom monogenskom promjenom. Szybalskijevom i Szybalskijevoj je prvima pošlo za rukom selekcionirati genetički modificirane stanice na temelju njihova fenotipa, a to je ostvareno pomoću HAT medija (8). Svoje su istraživanje temeljili na činjenici da je enzim dihidrofolat reduktaza (DHFR) potreban stanici za sintezu purina, gradivne jedinice nukleinskih kiselina. U slučaju da je ovaj enzim u stanici inhibiran, ona nije u stanju preživjeti, osim ako je u stanici aktivan alternativni put sinteze purina preko enzima hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaze (HGPRT). Dakle, kada se HGPRT(+) i HGPRT(-) stanice ljudske koštane srži bile pohranjene na mediju u kojem se nalazio inhibitor DHFR-a (HAT medij), preživjele su samo HGPRT(+) stanice. U sljedećim koracima ovim istraživačima ne samo da je

pošlo za rukom održati na životu HGPRT(-) stanice tako što im je prenesena izoliranu DNA iz HGPRT(+) stanica, već su dokazali i da su transformirane stanice kćeri naslijedile prenesene gene. Ovo je bio prvi put da je postignut prijenos gena u stanice sisavaca, te je postavljena revolucionarna ideja o mogućnosti ispravljanja genetskih grešaka unosom funkcionalnih gena.

4.2 Razvoj metoda unosa DNA u stanicu

Szybalska i Szybalski su u svojem istraživanju ustanovili da je uspješnost prijenosa DNA ovisna o količini vanjske DNA kojoj su ciljne stanice bile izložene (8). To je dovelo do nastojanja razvoja učinkovitijih metoda prijenosa DNA. Primijećeno je da se prijenos nukleinskih kiselina može povećati njihovim vezanje za proteine, primjerice stvaranjem kompleksa s metiliranim albuminom jer je tada DNA stabilnija i otpornija na hidrolitički utjecaj različitih enzima unutar stanice (9).

Desetak godina nakon saznanja o tome da fagi mogu biti prijenosnici gena između bakterija, otkriveno je da se na sličan način mogu naslijediti i genske mutacije nastale zbog insercije virusnog genskog materijala posljedično infekciji (10). U svom je istraživanju Temin zarazio kulturu stanica pilećeg embrija Rous sarcoma virusom (RSV) za kojeg se znalo da u odraslih kokoši izaziva pojavu sarkoma. Zaražene stanice postale su analogne stanicama kokošnjeg sarkoma, a ustanovljeno je da se mogu dijeliti, prilikom čega se nastavlja sinteza virusnih proteina. To je otkriće bilo toliko revolucionarno zato što su RSV zapravo RNA virusi, što bi značilo da je morao postojati neki način putem kojega je ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic acid*, RNA) prešla u DNA kako bi se integrirala u genom stanice pilećeg embrija. Takvo se saznanje strogo suprotstavljalo u to vrijeme aktualnoj središnjoj dogmi molekularne biologije koja postavlja put genetske informacije u smjeru DNA preko RNA do proteina (11). Iako kontroverzno, njegovo otkriće uskoro potvrđuje i otkriće insercije gena nekih virusa u kromosome (12).

4.3 Prvi pokušaji primjene genske terapije na ljudima

Iako skromnog znanja o mogućnostima modifikacije genskog materijala u virusima, istraživanja su se nastavila u tom smjeru, a Rogers i suradnici su prvi prešli s testiranja na životinjama na eksperiment na ljudima. U toj studiji pacijenticama koje su imale deficit arginaze injiciran je Shope papiloma virus. U istraživanjima prije ovoga je zamijetio da tumori

kože u zeca koje uzrokuje Shope papilloma virus pokazuju visoku razinu aktivnosti arginaze, zbog čega je vjerovao da taj virus ima sposobnost sinteze toga enzima (13). Nažalost, eksperiment nije uspio, stanje pacijentica se nije poboljšalo, a razine arginina u serumu ostale su jednake. Kasnije kada se genom ovog virusa sekvencionirao, ustanovljeno je da virus nije u mogućnosti sintetizirati arginazu (14).

Otkriće restrikcijskih enzima dovelo je u sedandestim godinama do napretka u istraživanjima o mogućnosti modifikacije gena i njihova prijenosa u ljudske stanice. Posljedično tome, došlo je do prvih koraku u razvoju tehnologije rekombinantne DNA. Istražene su nove metode i uspješno je konstruirana rekombinantna DNA molekula *in vitro* spajanjem niza različitih DNA molekula. Berg i suradnici uspjeli su konstruirali virusni vektor koji je osim nasljednog materijala Simian Virus 40 (SV40) sadržavala i kružnu molekulu DNA bakterijskog virusa lambda, koja je u sebi sadržavala i bakterijski gen za metabolizam galaktoze (15). Dobiveni virusni vektor mogao je prenijeti strani odsječak DNA u stanice sisavaca.

Jedan od prvih gena povezanih s bolešću koji je bio proučen bio je gen za humani β -globulin. Uskoro je prikazano, uz pomoć nove metode kemijskog prijenosa gena pomoću kalcijevog fosfata, da se gen za globin može uspješno prenijeti u stanice sisavaca (16). Iako su tadašnje metode prijenosa genskog materijala bile daleko od razine efikasnosti koja bi bila potrebna za potencijalnu primjenu na pacijentima, ubrzo je napravljen još jedan neuspjeli pokušaj primjene genske terapije na ljudima koji je kasnije postao poznat pod nazivom 'afera Cline'. Potaknuti pozitivnim rezultatima uspješnosti prijenosa gena u kulturu stanica mišje koštane srži (17) i samo djelomične repopulacije koštane srži nakon unosa transformiranih stanica u miševu (18), Cline i suradnici 1980. godine provode prvu kliničku studiju u kojoj pokušavaju liječiti pacijente koji pate od β -talasemije pomoću nove vrste terapije. β -talasemija je monogenska bolest u kojoj je prisutan defekt u sintezi hemoglobina zbog mutacije za β -globulinski lanac. Ovo se stanje, ako je prisutno u homozigonom obliku, prezentira teškom anemijom i jedino tada dostupno liječenje bile su česte primjene transfuzija krvi. Stanice koštane srži dvaju pacijenata sa β -talasemijom bile su *in vitro* transficirane rekombinantnim plazmidom koji je sadržavao gen za ljudski β -globulin, te su naknadno vraćene u krvotok tih pacijenata. Iako za to nije dobio odobrenje etičkog povjerenstva, Cline je izvršio eksperiment, koji na kraju nije pokazao klinički uspjeh, a rezultati istraživanja nisu objavljeni u cijelosti (19).

Prva studija kojoj je uvođenje stranih gena odobreno na ljudima, objavljena je 1990. godine. U ovoj se studiji nije radilo o pravoj genskoj terapiji, nego je namjera studije bilo

praćenje limfocita u infiltraciji tumorskog procesa. U limfocite ekstrahirane iz krvi osoba oboljelih od metastatskog melanoma uz pomoć retrovirusnog vektora uveden je gen za rezistenciju na neomicin koji je služio kao marker, a limfociti su naknadno ponovno vraćeni u krvotok pacijenata. Cilj je bio razjasniti *in vivo* distribuciju i preživljenje limfocita, te uvidjeti postoji li korelacije između infiltracije limfocita i regresije tumorskog procesa (20). Ovo je istraživanje pokazalo da je metoda transdukcije pomoću retrovirusnih vektora sigurna i praktična metoda prijenosa gena u ljudske stanice, te je zbog svoje uspješnosti dovelo do kliničke studije u kojoj su tumori infiltrirani s *ex vivo* modificiranim limfocitima kojima je ugrađen gen za ekspresiju TNF- α (engl. *tumor necrosis factor*). Rezultati ove studije otkrili su da tumori nisu rasli na mjestu ubrizgavanja limfocita (21) čime je dokazan terapijski uspjeh i postavljen prvi pravi temelj za uvođenje genske terapije u kliničku medicinu.

Iduće značajno kliničko istraživanje objavljeno je 1995. godine, a njegova svrha bila je ispitati mogućnost primjene genske terapije u liječenju teške kombinirane imunodeficijencije uzrokovane manjkom adenzin deaminaze (engl. *adenosine deaminase severe combined immunodeficiency*, ADA-SCID). Dvije djevojčice s prisutnim deficitom ovoga enzima primile su terapiju vlastitim limfocitima kojima je prethodno *in vitro* ugrađen gen za sintezu adenzin deaminaze (22). Kod jedne je pacijentice primijećen privremeni odgovor na terapiju, dok je odgovor kod druge pacijentice bio daleko manji. Budući da je prva pacijentica istovremeno sa genskom terapijom primala nadomjesnu enzimatsku terapiju polietilen glikol adenzin deaminazom, istinski učinak genske terapije kod ove pacijentice bio je upitan i postao je tema za raspravu.

Iako prve studije na ljudima nisu postigle učinak, genska je terapija privukla mnogo pažnje zbog svog velikog potencijala uz ogromna očekivanja, sve dok se nije dogodio neuspjeh koji joj je donio negativnu reputaciju. Osamnaestogodišnji Jesse Gelsinger koji je bio dio kliničkog ispitivanja učinka genske terapije kod djelomičnog nedostatka ornitin transkarbamilaze preminuo je četiri dana nakon primitka visoke doze adenovirusne terapije. Adenovirusni vektor kojim je u studiji pokušana zamjena defektnog gena za ornitin transkarbamilazu, izazvao je kod Gelsingera tešku imunoreakciju koja je uzrokovala multiorganskog zatajenje i smrt (23). Ovo je bio prvi slučaj u kojemu je postojala direktna poveznica između primitka virusne vektorske terapije i smrti pacijenta, stoga je privukao veliku medijsku pažnju i doveo do revizije postojećih kontrola kliničkih studija.

4.4 Nova klinička istraživanja i novi problem – insercijska mutageneza

Srećom za područje genske terapije ubrzo nakon navedenog incidenta ponovno dolazi do objave izvješća o uspješno provedenoj kliničkoj studiji. Cavazzana-Calvo i suradnici donose rezultate studije u kojoj sudjeluju dva dječaka koja pate od X vezane teške kombinirane imunodeficijencije (SCID-X1) zbog koje su osuđeni na život u izolaciji (24). Zbog mutacije gena koji kodira γc podjedinicu receptora za citokine, oboljelima nedostaje cirkulirajućih T limfocita i prirodnih stanica ubojica (NK stanica), a limfociti B su slabo funkcionalni. Uz pomoć retrovirusnih vektora koji su sadržavali gen koji oboljelima nedostaje, limfociti pacijenata su obrađeni *ex vivo* i vraćeni u krvotok. Terapija je pokazala obećavajuće znakove učinkovitosti, s uspješnom korekcijom defekta T limfocita i djelomičnom obnavljanjem loze NK stanica i B limfocita. Nažalost, ubrzo nakon početnog uspjeha, u naknadnim ispitivanjima razvila se leukemija u troje od jedanaest liječenih bolesnika. Ovo je bio prvi slučaj da se razvoj maligne bolesti mogao direktno povezati s primjenom genske terapije. Problem je bio u tome što se terapijska DNA prenesena retrovirusom nasumično ugrađuje u genom ciljnih stanica, te se stoga može ugraditi i u blizini nekog gena koji kodira za protein koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, te može utjecati na njegovu aktivnost i dovesti do maligne transformacije stanice. Ovaj proces nazvan je insercijska mutageneza i postao je veliki problem genske terapije. Integracija terapijskog gena u staničnu DNA inače je poželjna zato što to znači da će se dostavljeni gen naslijediti i biti eksprimiran u idućim generacijama stanica koje se dijele. U teoriji bi to značila doživotan učinak genske terapije, stoga se nije odustalo od vektora koji dovode do integracije u genom, već se razvijaju metode kojima se insercijska mutageneza pokušava zaobići. Jedan od načina kojima se smanjuje opasnost od nastanka insercijske mutageneze uporaba je samo-inaktivirajućih vektora kojima se uklanjaju promotori i pojačivači iz LTR regije virusne DNA. Drugi način je upotreba obitelji proteina koje dovode do ciljane integracije gena na unaprijed određeno mjesto u genomu.

4.5 Metode ciljane integracije gena

Nedavno je pokrenut novi val u razvoju genske terapije, a temelji se na ciljanom uređivanju genoma (engl. *targeted genome editing*). Neke od trenutno najučinkovitijih metoda za postizanje ciljane integracije terapijskog gena u genom stanice temelje se na cijepanju genoma na specifičnom mjestu koje je posredovano nukleazama cinkovih prstiju (engl. *zinc*

finger nuclease – ZFN), meganukleazama, efektorskim nukleazama nalik aktivatoru transkripcije (engl. *transcription activator-like effector nuclease* – TALEN) ili korištenjem sustava CRISPR/Cas9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*) (25). Zajedničko svojstvo ovim tehnikama je posjedovanje domene koja veže specifičan slijed DNA, te nukleaze koja cijepa molekulu DNA na unaprijed definiranom mjestu. Cijepanjem dvostruke uzvojnice DNA dolazi do aktivacije mehanizama popravka DNA, od kojih su dva najčešća nehomologno sparivanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) i popravak vođen homologijom (engl. *homology-directed repair*, HDR).

NHEJ je prevladavajući put za popravak DNA nakon cijepanja dvostruke uzvojnice u stanicama sisavaca. U NHEJ putu dolazi do direktne ligacije razdvojenih krajeva DNA, bez potrebe za homolognim predloškom. NHEJ je neprecizan i stoga sklon nastajanju pogrešaka, a najčešće se događaju delecijske ili insercijske pogreške koje dovode do pomaka okvira čitanja DNA sekvence i posljedičnog gubitka funkcije proteina. Ovaj je put popravka dakle koristan kod ciljne inaktivacije specifičnog gena, primjerice ovim se načinom može inaktivirati štetni gen kod monogenских bolesti.

Za razliku od NHEJ, HDR se oslanja na homolognu rekombinaciju prilikom koje se kao predložak za popravak oštećenog dijela DNA koristi neoštećena sestrinska kromatida, te se ne događa tijekom cijelog staničnog ciklusa, već pretežito tijekom S i G2 faze (26). Primijenimo li istovremeno stranu DNA sekvencu, možemo dovesti do umetanja stranog gena u genom stanice, jer će upravo ta sekvenca poslužiti kao predložak. Osim upute za gen kojega želimo integrirati u genom, strana DNA sekvenca mora sadržavati krajeve koji su homologni prerezanim krajevima stanične DNA. Nuklearni enzimi vežu DNA sekvencu i ona tada postaje predložak s kojega se prepisuje redoslijed nukleotida za popravak DNA. Najčešće se u svrhu dostave strane DNA koriste ne integrirajući vektori poput adeno-povezanih virusa (engl. *Adeno-associated virus*, AAV) ili lentivirusnih vektora s nedostatkom integraze. U pretkliničkim studijama, HDR je iskorišten za pretvorbu mutirane sekvence u normalnu ili za ubacivanje terapijskog transgena na željeno mjesto, bilo da nadopuni funkciju gena koji nedostaje ili pruži nove značajke ciljnim stanicama (26). Kako bi se put popravka usmjerio prema HDR putu, osmišljene su neke metode poput upotrebe inhibitora enzima NHEJ puta, zaustavljanje ciklusa u S i G2 fazi, modifikacija Cas9, te modifikacijom homologne regije (27).

CRISPR/Cas9 tehnologija je dovela do revolucije u području uređivanja genoma specifičnih za sekvence zahvaljujući svojoj visokoj preciznosti, jednostavnosti i fleksibilnosti. Sustav CRISPR/Cas9 sastoji se od dvije glavne komponente: Cas9 nukleaze i RNA vodiča specifičnog za sekvencu (gRNA). Oni zajedno tvore vrlo stabilni ribonukleoproteinski kompleks (RNP). Jednom kada se određena DNA regija podudara s gRNA koja nosi Cas9, ciljane DNA se cijepa dvostrukim prekidom. Cas9 RNP kompleks može se uvesti u stanice izravno i djelovati odmah nakon što uđe u stanicu bez transkripcije i translacije. Za razvoj CRISPR/Cas9 tehnike uređivanja genoma dodijeljena je Nobelova nagrada za kemiju 2020. godine Emmanuelle Charpentieru i Jennifer Doudnau. Njihovo je otkriće posebno važno za gensku terapiju jer se ovom metodom može uređivati više gena od jednom (28), što premješta fokus s monogenetskih bolesti na kompleksnije bolesti.

Prvo kliničko ispitivanje ciljanog uređivanja genoma provedeno je na HIV pozitivnim pacijentima pomoću autolognih CD4 T limfocita modificiranih pomoću ZFN tako da je trajno onemogućen gen *CCR5* (29). *CCR5* je glavni koreceptor virusa humane imunodeficijencije (HIV) pomoću kojega virus ulazi u limfocite T. Ova je studija pokazala uspješnost u vidu smanjene detekcije virusne DNA u krvi ispitanika, a poluživot modificiranih stanica nakon primitka terapije bio je 48 tjedana (29). ZFN metoda uređivanja genoma koristi se i za istraživanja liječenja raka vrata maternice, hemofilije B i mukopolisaharidoza (26). Tehnologija TALEN korištena je za modifikaciju limfocita T umetanjem gena za kimerični antigenski receptor (engl. *Chimeric antigen receptor to CD19*, CAR19) čiji produkt pospješuje prepoznavanje malignih stanica i uništavanje od strane T limfocita. Ovaj je sustav prvi puta korišten za liječenje 11-mjesečnog djeteta s B-staničnom akutnom limfoblastičnom leukemijom i pokazao se uspješnim (30). TALEN tehnologija se također koristi za korekciju gena *COL7A1* kod oboljelih od bulozne epidermolize (31). Prvo kliničko ispitivanje u kojemu je korištena CRISPR/Cas9 tehnologija odobreno je u Kini u bolesnika s rakom pluća, a u tijeku su ispitivanja za liječenje karcinoma prostate, mjehura i bubrega (32).

Najnovije dostignuće iz listopada 2019. godine zasluga je znanstvenika sa Broad Institut MIT-a i Harvarda koji su razvili tehniku primarnog uređivanja genoma (engl. *prime editing*). Nova tehnika omogućava olakšano umetanje, brisanje gena i uređivanje točkastih mutacija bez lomljenja oba lanca DNA ili korištenja predložaka DNA (33). U tehnici primarnog uređivanja postoje 3 glavne komponente: Cas9 enzim, zatim reverzna transkriptaza i RNA vodič. Vodič RNA je pegRNA (engl. *prime editing guide RNA*) na kojemu se nalaze sekvenca komplementarna ciljnoj DNA, te sekvenca koja služi kao predložak za uređivanje genoma.

PegRNA tvori kompleks sa Cas9 i reverznom transkriptazom. Nakon što pegRNA dovede kompleks do ciljne sekvence DNA, Cas9 reže samo jedan lanac DNA. Enzim reverzna transkriptaza čita pegRNA, koristi ga kao predložak i kreira DNA komplementarnu toj RNA. Radi se o novoj, još nedovoljno istraženoj tehnici, no pošto ne zahtjeva lom oba lanca DNA kao što je to slučaj u CRISPR/Cas metodi, očekuje se manje potencijalnih neželjenih ishoda, te su položena velika očekivanja u implementaciju ove metode u uređivanje i ljudskog genoma.

5. Temeljni principi genske terapije

5.1 Definicija i klasifikacija

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) gensku je terapiju definirala kao tehniku koja modificira gene neke osobe za liječenje ili izlječenje bolesti te da genska terapija može djelovati na nekoliko mehanizama: zamjena gena koji izaziva bolest zdravom kopijom gena, inaktivacija gena koji uzrokuje bolest i koji ne funkcionira ispravno, te uvođenje novog ili modificiranog gena u tijelo za pomoć u liječenju bolesti (34).

Na temelju vrste stanica kojima se vrši modifikacija gena, genska se terapija može podijeliti u dvije kategorije: genska terapija zametnih stanica i somatska genska terapija. Razlika između ova dva pristupa je u tome što se genetskom modifikacijom somatskih stanica ne ostvaruje prijenos genetskog materijala na sljedeće generacije, dok se u genskoj terapiji zametnih stanica terapijski ili modificirani gen prenosi na sljedeću generaciju. Potencijal terapije zametnih stanica uspješno je demonstriran kod miševa, štakora, kunića, ovaca, goveda, koza i svinja (2), ali ne i kod ljudi zbog etičkih razloga, nedostatka naprednih alata i društvenog konsenzusa (35).

Metode klasificiranja genske terapije uključuju sortiranje prema vrsti bolesti (genetska bolest nasuprot složenom stečenom poremećaju), prema karakteristikama prijenosnika gena (integrirajući nasuprot neintegrirajućim vektorima), te dostavlja li se vektor *in vivo* (izravno u pacijenta) ili *ex vivo* (u uzgojenim stanicama uzetim od pacijenta koje se potom transplantiraju natrag). Primjerice, prilikom uvođenja genetskog materijala u matične stanice, presudno je koristiti integrirajuće vektore kako bi se donirana DNA ugradila u genom matične stanice, replicirala i tako prosljedila svim stanicama kćerima. Kod *in vivo* genske terapije, često se cilja na dugovječne postmitotičke stanice. U tim se stanicama, budući da se više ne dijele, može

postići dugotrajna ekspresija sve dok je vanjska DNA stabilizirana u stanici u obliku episomalne DNA koja može eksprimirati protein do kraja životnog vijeka stanice.

5.2 Vrste genskog materijala

U genskoj terapiji upotrebljavaju se različiti oblici nasljednog materijala. Na samim je počecima genska terapija označavala unos gena kojega u stanici nedostaje ili je neispravan, u obliku DNA molekule. Danas korištena terapija na bazi DNA uključuje plazmide, antisense oligonukleotide, DNA aptamere i DNA enzime. Razvojem molekularne biologije i pronalaskom mehanizma utišavanja gena, počele su se koristiti ribonukleinske kiseline uglavnom u obliku male interferirajuće RNA (siRNA) i mikro RNA (miRNA). Osim njih još se koriste i antisense RNA, ribozimi, RNA mamci i RNA aptameri. Unatoč prisutnim strukturnim i funkcionalnim razlikama između DNA i RNA, obje molekule su negativno nabijene i stoga se uz pomoću istih mehanizama mogu isporučiti stanici. Za uspješan učinak dovoljno je da RNA dospije u citoplazmu, dok će DNA ostvariti svoj učinak tek ulaskom u staničnu jezgru. Molekule RNA su više lomljive i veća je vjerojatnost da će biti razgrađene nego DNA molekule, stoga su potrebne relativno visoke doze za postizanje željene razine utišavanja gena.

Plazmid je dvolančane molekula DNA visoke molekulske mase koja sadrži transgen koji kodira specifični protein. Na molekularnoj razini, molekule plazmidne DNA mogu se smatrati predlijekovima koji nakon stanične internalizacije i ulaska u jezgru, koriste aparat za transkripciju i translaciju DNA u stanici za biosintezu terapijskog proteina (36). Mehanizam djelovanja plazmidne DNA zahtijeva ulazak plazmida u jezgru nakon ulaska u citoplazmu. Pored liječenja genetskih bolesti, plazmidi se mogu koristiti kao DNA cjepiva za genetsku imunizaciju (37).

Antisense oligonukleotidi su pojedinačni lanci DNA ili RNA koji mogu selektivno inhibirati ekspresiju pojedinog proteina. Antisense oligonukleotidi interagiraju i tvore kompleks s komplementarnim mRNA ili pre-mRNA te inhibiraju njezinu translaciju ili obradu, posljedično inhibirajući biosintezu proteina. Antisense oligonukleotidi mogu aktivirati enzim RNase H1, koji cijepa mRNA na mjestu vezanja (38), ili mogu fizički blokirati translaciju ili druge korake u obradi mRNA i transportu do sinteze proteina. Antisense lijekovi su korisni u ranoj fazi produkcije proteina koji uzrokuje nastanak bolesti i teoretski se mogu primijeniti za

brojne bolesti kod kojih osnovna patofiziologija uključuje prekomjerno izražavanje određenog proteina.

Glasnička RNA (mRNA) kao sredstvo kojim se donosi uputa za sintezu terapijskog proteina, ima niz prednosti pred DNA posredovanom terapijom. Naime, translacija mRNA se događa u citoplazmi, stoga ne postoji obaveza ulaska u staničnu jezgru što znači i aktivnost u ne dijelećim stanicama. Osim toga, ovim načinom isporuke genske upute nema opasnosti od nastanka insercijske mutageneze (39).

RNA interferencija (RNAi) je posttranskripcijski mehanizam utišavanja gena kroz preoblikovanje kromatina, inhibiciju translacije proteina ili izravnu razgradnju mRNA (40). Utišavanje gena može biti posredovano malim regulatornim RNA: microRNA i siRNA. MicroRNA (miRNA) je kratka jednolančana RNA molekula čija dužina može biti 21-25 nukleotida, a prvi je puta opisana 1993. godine. Ta je molekule djelomično komplementarne sa ciljnom mRNA molekulom, a glavna joj je funkcija smanjenje ekspresije gena zaustavljanjem transkripcije, cijepanjem mRNA i skraćivanjem poli-A repova. SiRNA (od engl. *Small interfering RNA*) mala je dvolančana molekula RNA veličine 21-23 nukleotida i komplementarna je mRNA na koju se veže s većom specifičnošću te dovodi do njezinog cijepanja.

RNA i DNA aptameri su jednolančani, odnosno dvolančani segmenti nukleinske kiseline koji mogu izravno interagirati s proteinima (41). Aptameri ometaju molekularnu funkcije proteina povezanih s bolešću ili onih koji sudjeluju u transkripciji ili translaciji. Aptameri su poželjniji od antitijela u inhibiciji proteina zbog njihove specifičnosti, neimunogenosti i stabilnosti formulacija farmaceutskih proizvoda (42).

6. Metode prijenosa nukleinskih kiselina

Čestice s nukleinskim kiselinama kojima želimo obavljati gensku terapiju moraju ispuniti mnoge uvjete za uspješan genski transfer. Pod metodama genskog transfera podrazumijevamo način kojim se nukleinska kiselina dostavlja do stanice u njezinu citoplazmu ili jezgru. U grubo, postoje dva pristupa u dostavljanju terapijskih gena eukariotskoj stanici: virusna metoda i nevirusna metoda. U prvoj metodi se kao vektor koristi virus kojemu se genom modificira tako da se uklone virusni geni koji ga čine patogenim, a ostave oni koji su mu

potrebni da prenesu nukleinsku kiselinu u ciljnu stanicu (43). Ovaj način prijenosa gena nazivamo transdukcijom, efikasnost prijenosa gena je veća nego kod nevirusne metode, ali je sigurnost niža. Obje metode, virusna i nevirusna imaju svojih različitih prednosti, pa se nastavlja njihov paralelan razvoj.

Sustavi za dostavu gena posredovani virusima koriste sposobnost virusa da ubrizgaju svoju nukleinsku kiselinu unutar stanica domaćina, ali i njihovu sposobnost da unutar domaćina dovedu do replikacije vlastitog genetskog materijala. Također, prednost virusa je u tome što ima takvu strukturu koja sprječava razgradnju nukleinskih kiselina putem staničnih enzima, što ga čini učinkovitim načinom isporuke gena (43). Iako transfekcija posredovana virusima može pružiti vrlo učinkovitu i održivu ekspresiju transgena, glavni nedostaci ove metode su imunogenost i toksičnost. Virusni vektori su najčešće korišteni vektori u genskoj terapiji, a među najpoznatije ubrajamo retroviruse, adenoviruse (tipovi 2 i 5), adeno povezane viruse, herpes viruse, poks viruse, ljudski pjenasti virus (engl. *Human foamy virus*, HFV) i lentiviruse (43).

Nevirusne metode, u koje ubrajamo fizikalne i kemijske metode, smatraju se sigurnijima od virusnih metoda, no trenutno su puno manje učinkovite u prijenosu gena, stoga se i rjeđe koriste u istraživanjima. Dostava gena pomoću fizikalnih metoda, privlači sve veću pozornost posljednjih godina, prvenstveno zbog jednostavnosti postupka. Ove metode obično koriste fizikalnu silu za prevladavanje membranske barijere stanica i olakšavanje unutarstaničnog prijenosa gena. Prednost ove metode je što se fragment DNA ili plazmid koji sadrže transgen izravno dopremaju u stanice bez uključivanja drugih tvari koje bi mogle biti citotoksične ili imunogene, kao što se to obično viđa u virusnim ili kemijskim vektorima (44). Fizikalne metode mogu se primjenjivati za *in vitro* i *in vivo* dostavu gena, a temelje se na djelovanju mehaničke, električne, ultrazvučne, hidrodinamičke ili laserske energije (45). Među kemijske metode ubrajamo upotrebu sintetskih ili prirodnih spojeva koji zajedno s nukleinskim kiselinama preko elektrostatskih interakcija stvaraju nanočestice. Njihova uloga je zaštita nukleinskih kiselina od razgradnje nukleazama, te omogućiti unos gena u ciljnu stanicu. Najčešće korištene kemijske metode su one zasnovane na lipidima i polimerima iskorištava. Loša strana nevirusnih metoda je njihova manja učinkovitost transfera gena u odnosu na virusne vektore, no ovaj se problem aktivno pokušava riješiti upotrebom novih spojeva i tehnika. Izostanak integracije terapijske DNA u domaćinov genom i posljedično ograničeno trajanje terapijskog učinka drugi je problem na koji nailazimo upotrebom ovih vektora.

6.1 Virusni vektori

6.1.1. Adenovirusi

Adenovirusi su uglavnom respiratorni DNA virusi sa širokim staničnim tropizmom zbog kojega mogu privremeno transducirati veliki broj staničnih tipova. Ovi su virusi prvi prilagođeni za genski transfer, a trenutno je poznato više od 100 vrsta različitih serotipova (45). Najčešće korišteni serotipovi adenovirusa u genskoj terapiji, tip 2 i 5, uspješno prenose gene u stanice koje se dijele, te u stanice koje se ne dijele. Oni ulaze u ciljne stanice vežući se za Coxsackie / Adenovirusni receptor (CAR) (46). Nakon vezanja na CAR, adenovirus se internalizira putem endocitoze posredovane integrinom, nakon čega slijedi aktivni transport do jezgre, gdje se njegova dvolančana DNA ne ugrađuje u genom, nego ostaje prisutna u obliku episomalne DNA koja se epizodno eksprimira (47).

Do danas su se razvile tri generacije adenovirusnih vektora u svrhu dostave genske terapije. Prva generacija adenovirusnih vektora proizvedena je tako da je uklonjen dio gena potrebnih za replikaciju virusa, a kapacitet prijenosa terapijske DNA bio je ograničen na 8,2 Kb. Ovi vektori su pokazali snažne, potencijalno opasne, imunološke reakcije koje su u kliničkim studijama dovele i do smrtnog ishoda (slučaj Jesse Gelsingera). To je bio poticaj za proizvodnju nove generacije vektora kojima je uklonjen još veći dio virusnog genoma čime se stvorio prostor za prijenos transgena veličine do 14 Kb (48). Ta je druga generacija vektora pokazala manju ekspresiju terapijskog gena, a imunogenost i toksičnost su i dalje ostali prisutan problem. U trećoj je generaciji adenovirusnih vektora uklonjena većina virusnog genoma, što je dovelo do smanjenja imunogenosti, no ujedno i do nemogućnosti samostalne replikacije i ovisnosti o prisutnosti pomoćnih virusa. Dobra strana je što se u trećoj generaciji kapacitet prijenosa gena povećao na 36 Kb, zbog čega se ova generacije vektora naziva i " adenovirusni vektori visokog kapaciteta"(2).

1992. godine prvi je put korišten adenovirusni vektor prve generacije za isporuku gena za alfa-1 antitripsin (A1AT) u endotelne stanice kod kojih je postojao manjak alfa-1 antitripsina (49). U drugoj studiji, vektor iste generacije korišten je za isporuku gena A1AT u tkivo pluća (50). Kasnije su, koristeći adenovirusne vektore, učinjeni brojni pokušaji isporuke disfunkcionalnih ili deficitarnih gena, koji su bili odgovorni za nekoliko ljudskih genetskih bolesti i stanja. Cistična fibroza jedna je od takvih genetskih bolesti kod koje gen CFTR postaje nefunkcionalan zbog mutacije. Adenovirusni vektor korišten je za isporuku CFTR gena u

plućno tkiva (51). Te su se studije suočile s nekoliko izazova, uključujući humoralnu i staničnu imunost na adenovirusne vektore nakon ponovljene primjene vektora, staničnu citotoksičnost i onkogenezu (52). Ova su ispitivanja izazvala ozbiljnu zabrinutost za sigurnost korištenja adenovirusnih vektora u genskoj terapiji i rezultirala naglim padom njihove upotrebe. Ipak; razlozi su tih problema opsežno proučavani i riješeni konstrukcijom novih generacija adenovirusnih vektora koje su pobudile novu nadu u isporuci gena zasnovanoj na adenovirusnim vektorima i dovele do niza novih kliničkih istraživanja. S druge strane, pojačana imunogenost, kao loša strana prethodnih generacija, iskorištena je tako da postane upravo benefit. Naime, ti su se vektori počeli koristiti u proizvodnji antigenskih cjepiva gdje je pojačana reakcija stanične i humoralne imunosti poželjna. U prilog ovome ide i nedavno otkrivena homologija proteina adenovirusa i virusa hepatitisa C, što ima značajne implikacije u uporabi adenovirusnih vektora za razvoj cjepiva, posebno protiv virusa hepatitisa C (53). Upravo zbog povećane imunogenosti ovaj se vektor rjeđe primjenjuje u sistemskim genskim terapijama, te sve češće svoje mjesto pronalazi u lokalnim genskim terapijama različitih bolesti. Pokazao je obećavajuće rezultate u liječenju raka, te je u stvari jedna od prvih odobrenih genskih terapija upravo Gendicin, adenovirusni lijek koji se koristi u liječenju raka.

Zbog velike raširenosti adenovirusa među ljudima veliki dio populacije posjeduje protutijela od prijašnjih infekcija, koja neutraliziraju učinak adenovirusa i smanjuju uspješnost genske terapije i cjepiva. Ovome se problemu pokušalo doskočiti sve češćom upotrebom adenovirusa čimpanzi koji su dovoljno slični ljudskima da imaju sposobnost zaraziti humane stanice, no s druge strane uspješno izbjegavaju djelovanje postojećih protutijela.

6.1.2 Retrovirusi

Retrovirusi su skupina virusa čiji se genom sastoji od dvije molekule jednolančane RNA. Ovi virusi pomoću enzima reverzne transkriptaze, čiju genetsku uputu nose u svome genomu, prevode virusnu RNA u DNA, a potom se nastala DNA integrira u genom stanica domaćina čime se omogućava kontinuirana ekspresija terapijskog gena. Dvije najčešće korištene vrste retrovirusa su gamaretrovirus i lentivirus. Gamaretrovirusni vektori mogu unijeti terapijske gene samo u proliferirajuće stanice i stoga su idealni za ciljanje stanica raka. Loša strana gamaretrovirusa je što imaju široki tkivni tropizam, zbog kojeg postoji mogućnost transdukcije neželjenih stanica (2). Glavna razlika između gamaretrovirusa i lentivirusa je to što lentivirusi mogu zaraziti i stanice koje se ne dijele. U genskoj terapiji najkorišteniji

lentivirus je virus humane imunodeficijencije (HIV), a najčešće korišteni gamaretrovirus je virus mišje leukemije (engl. *Murine Leukemia Virus*, MLV) (2).

Najznačajniji propusti retrovirusa su nedostatak stanične specifičnosti i mogućnost insercijske mutageneze (54). Enzim integraza ubacuje kopije retrovirusnog genoma u kromosome stanice domaćina, ali postoji rizik od umetanja kopije genoma na nepovoljno mjesto kao što je gen za supresiju tumora ili onkogen, što dovodi do insercijske mutageneze. Gamaretrovirusni vektori imaju tendenciju integriranja u blizini regija regulatornih gena, te je upravo u studiji u kojoj je vektor dolazio iz ove porodice virusa, prvi puta i otkrivena insercijska onkogeneza (slučaj pojave leukemija nakon liječenja SCID-X1). Jedno od rješenja ovog problema je korištenje samo-inaktivirajućih retrovirusnih vektora koji su transkripcijski neaktivni. Korištenje inhibitora integraze kojim se izbjegava integracija u domaćinski genom, nukleaza cinkovih prstiju ili uključivanje određenih sekvenci poput kontrolne regije β -globinskog lokusa za usmjeravanje mjesta integracije na određena kromosomska mjesta, još je jedan način za smanjenje rizika (2). Najnoviji pristup u rješavanju ovog problema je integracija gena na ciljno mjesto u genomu pomoću CRISPR/CAS9 sustava (55). Međutim, potrebne su daljnje studije kako bi se riješilo ovo pitanje dizajniranjem specifičnih vektora i razumijevanjem učestalosti insercijske mutageneze te uloge ostalih uključenih čimbenika. Unatoč tome, do danas je provedeno preko 500 kliničkih ispitivanja genske terapije korištenjem retrovirusa (2). Rezultati ispitivanja genske terapije na bazi lentivirusa u Francuskoj za β -talasemiju pokazali su da jedan pacijent nije trebao primiti transfuziju krvi tijekom punih 16 mjeseci (56). Zabilježena je još jedna uspješna uporaba lentivirusnog vektora u kliničkom ispitivanju za liječenje X-vezana adrenoleukodistrofije zbog nedostatka gena ABCD1 (57). U ovoj studiji, progresivna cerebralna demijelinizacija kod dva pacijenta uspješno je blokirana tijekom 14-16 mjeseci nakon lentivirusne isporuke divljeg tipa ABCD1 u CD34 + stanice *ex vivo* (57). Ovi rezultati napravili su dobru podlogu za provedbu više kliničkih ispitivanja upotrebe lentivirusnih vektora za gensku terapiju, no ograničenost trajanja učinka terapije i dalje se pokušava razumjeti i unaprijediti. Danas je u svijetu odobreno nekoliko genskih terapija temeljenih na retrovirusima o kojima će govora biti kasnije.

6.1.3 Adeno-povezani virusi

Adeno-povezani virusi (engl. *Adeno-associated virus*, AAV) sposobni su transducirati širok raspon tipova stanica koje se dijele i ne dijele. Ime su dobili po tome što se u stanicima

domaćina mogu reproducirati samo ako se stanica istovremeno zarazi pomoćnim virusom kao što je adenovirus ili herpesvirus. Još se nazivaju i dependoparvovirusima, a dobar su izbor za vektor jer je poznata točka integriranja u ljudskom kromosomu. AAV ubacuje terapijski gen u domaćinov genom na točno određenom mjestu na q kraku 19. kromosoma izbjegavajući insercijsku mutagenezu (58). Više od 70% integracije transgena događa se na ovome mjestu, međutim, temeljni mehanizam kojim do toga dolazi ostaje nepoznat (2). Zbog integracije gena u domaćinov genom, osigurana je trajna ekspresija gena. Na primjer, intramuskularna ekspresija gena koji izražava koagulacijski faktor IX u jednog je ispitanika ustrajala više od 10 godina tijekom kliničkog ispitivanja, no cirkulirajuće razine faktora IX su bile subterapijske (59). Otkriveno je da se virusna DNA ugrađuje i u mitohondrijsku DNA stanica, što bi također moglo predstavljati rizik, ali i moguću prednost za razvoj terapije mitohondrijskih bolesti (60). Iako je AAV vektor nepatogen i siguran, te je jedan od najčešće korištenih vektora za dostavu gena u prekliničkim i kliničkim studijama, njihova potencijalna primjena u genskoj terapiji ograničena je nemogućnošću isporuke terapijskog gena većeg od 4,9 Kb, imunogenošću proteina kapside i prisutnošću raširenog anti-AAV imuniteta u ljudskoj populaciji.

Svih do danas izoliranih 13 AAV serotipova ne koriste isti receptor na površini stanice domaćina za ulaz u stanicu (61), što čini AAV vrlo korisnim sustavom za transdukciju određenog tipa stanica ili tkiva. Na primjer, AAV1 prikazuje visoku učinkovitost transdukcije mišića, neurona, srca i pigmentnog epitela mrežnice. Dokazano je da AAV2 može zaraziti mnoge vrste stanica raka, neurone, pigmentni mrežnički epitel i fotoreceptorske stanice. Uz to, AAV2 je jedini serotip koji može izvršiti isporuku gena stanicama bubrega. Dok AAV6 pokazuje snažni tropizam za srce, a učinkovit je i u zarazi epitelnih stanica dišnih putova, AAV7 ima veći sklonost za jetra. Tropizam AAV se dodatno usavršio miješanjem proteina kapside jednog ili više serotipova s genomom drugog serotipa. Na primjer, serotip AAV2 / 5, koji transducira neurone učinkovitije od roditeljskog AAV2, proizveden je pakiranjem genoma AAV2 u proteine AAV5 kapside (2). Također je proizveden i AAV-DJ serotip koji se sastoji od hibridne kapside stvorene miješanjem kapsidnih proteina osam različitih AAV serotipova. Ovo je učinilo AAV-DJ učinkovitijim za transdukciju *in vitro* od bilo kojeg drugog divljeg serotipa i visoko zaraznim za široki raspon tkiva *in vivo* (2). Hibridni vektori su korisni i za izbjegavanje imunološkog odgovora, budući da izmiču učinku neutralizirajućih protutijela koje posjeduje više od 50% odrasle ljudske populacije. Ranije je u jednom kliničkom istraživanju zamijećen pad ekspresije gena dostavljenog AAV vektorom. U toj su studiji terapijske razine faktora IX u krvi održavane 4-9 mjeseci nakon *in vivo* primjene genske terapije (62).

Pretpostavljeno je da je privremena ekspresija gena uzrokovana aktivacijom memorijskih CD8⁺ T stanica protiv proteina kapside AAV-a zbog prijašnjih infekcija istim ili antigeno sličnim virusom. Neutralizirajuća protutijela se osim modifikacijom kapside, te tvorbom hibridnih vektora, mogu prevladati primjenom većih doza vektora, te lokaliziranom dostavom terapije, primjerice putem katetera u imunopovlaštena područja kao što je središnji živčani sustav (2). U mnogim istraživanjima se pokazalo da se odgovor T stanica može umanjiti primjenom imunosupresivnih lijekova, te da je bolja opcija intramuskularna primjena lijeka nego intravenska jer je u mišićima izražena samo niska razina antigena MHC klase I (63).

Jedna od prvih odobrenih genskih terapija u svijetu, i prva odobrena u Europi, lijek Glybera, počiva na AAV-u. AAV vektori se trenutno koriste u više od 200 kliničkih studija za liječenje širokog spektra bolesti i poremećaja širom svijeta. Nedavno se za liječenje genetski uzrokovane sljepoće počeo koristiti također lijek na bazi AAV-a, Luxturna, a uskoro se očekuje ulazak na tržište još jednog lijeka genske terapije posredovane AAV-om, također za liječenje oftalmološkog poremećaja čija se klinička ispitivanja nalaze u završnoj fazi (64). U novije je vrijeme razvijen AAV-CRISPR / Cas9 sustav za izvođenje *in vivo* uređivanja genoma čime su se još više proširile terapijske mogućnosti (65).

6.2 Fizikalne metode

6.2.1 Mikroigla

Najjednostavnija fizikalna metoda prijenosa gena je izravno ubrizgavanje DNA pomoću mikroinjekcije u ciljno tkivo. Devedesetih su godina Wolff i suradnici izvijestili o uspješnom transferu gena u mišje mišićne stanice putem ove metode (66). Iako je nedvojbeno prijenos gena bio uspješna, ekspresija gena je bila niska i većinom lokalizirana na području kojim je prošla mikroigla. Iz ovog razloga se radilo na unaprjeđenju tehnike u smislu da se poveća broj igala, a smanji njihov promjer. Danas se koriste mikroigle sastavljene od mnoštva manjih igala koje čine mrežu i pričvršćene su na zajedničku bazu, a visina im se kreće u rasponu 25-2000 μ m (67). Vrhovi ovih igala su različitih oblika, a dimenzije su unutar mikronskog raspona, no naravno još uvijek dovoljno velike za prolaz molekula koje želimo dostaviti tkivu (68). Postoji više vrsta mikroigala temeljeno na njihovim osobitostima, a dvije osnovne kategorije su čvrste igle i šuplje igle. Dostava terapijskih tvari putem čvrstih igala odvija se u dva koraka, u prvom koraku čvrste igle rade pore u staničnoj membrani, a u drugom koraku terapijska tvar difuzijom

ulazi u novonastale mikrokanale (68). Čvrste igle mogu biti i omotane terapijskom tvari (engl. *coated solid microneedles*), te se u tom slučaju proces sastoji samo od jednog koraka. S druge strane postoje i šuplje mikroigle kod kojih terapijska tvar izlazi kroz kanal na vrhu igle. Mikroigle mogu biti izrađene od biorazgradljivog materijala kao što su šećeri i/ili polimeri, te se nakon aplikacije ne moraju vaditi iz tkiva jer spontano dolazi do njihove razgradnje (69).

Kliničke studije u kojima se lijekovi primjenjuju korištenjem mikroigala provode se za liječenje psorijaze, karcinoma kože, karcinom prostate, karcinom dojke (68), ali i posljedica infarkta miokarda (70). Posebice se ističe široko prihvaćena ideja primjene ove metode na koži. Putem mikroigle se transdermalno može primijeniti široki asortiman lijekova, poput lijekova male molekularne težine, oligonukleotida, DNA, peptida, proteina i inaktiviranih virusa. Ovom se metodom mogu učinkovito dostaviti nukleinske kiseline u kožu, u svrhu liječenja genetskih poremećaja kože, karcinoma, hiperproliferativnih bolesti, te za cijeljenje rana (68). Prednosti transdermalne primjene genske terapije u odnosu na intravensku su svakako izbjegavanje učinka prvog prolaska kroz jetru, ali i veliko područje preko kojega se lijek može dostaviti. Ovim se načinom može primijeniti lokalna i sistemska terapija. Zbog jednostavnog korištenja, ali i niske cijene proizvodnje, mikroigle imaju potencijala da postanu samoadministrirajuća metoda čime bi se poboljšala suradljivost pacijenata (68).

6.2.2 Genski pištolj

Sistem biolističke isporuke čestica, izvorno je bio namijenjen za prijenos gena kod biljaka. Kasnije je modificiran tako da se genetski transfer može vršiti u stanice sisavaca *in vivo* i *in vitro* (71), a dobio je još nazive bombardiranje DNA česticama ili genski pištolj. Postupak dostave genskog materijala ovim putem sastoji se od vezanja makromolekula kao što su DNA, siRNA ili mRNA za neki teški metal poput zlata ili volframa, te se zatim taj kompleks pod velikim pritiskom uz pomoć helija ili visokonaponskog električnog pražnjenja ispaljuje u ciljne stanice (71). Genskim se pištoljem dostava gena može izvršiti u stanicama koje se dijele, kao i u onima koje se ne dijele, a najčešće tkiva u kojima se koristi su koža, sluznice te tumorsko tkivo. Iako je ova tehnika pouzdana i brza, zahtijeva skupu opremu, uzrokuje fizičko oštećenje uzoraka i zahtijeva velik broj stanica. Kako bi se smanjila ozljeda tkiva, genski pištolj se može kombinirati s mikroiglama čime se smanjuje pritisak kojim se čestice dostavljaju u tkivo (72).

Dostava gena putem genskog pištolja pogodna je za neke teže dostupne stanice, poput neurona ili trepetljivikavih stanica unutarnjeg uha (73). Trenutno se primjenjuje u istraživanjima

u svrhu dostave DNA cjepiva kod neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (74) te kod infektivnih bolesti, a koristi se i u istraživanjima primjene genske terapije za liječenje karcinoma jajnika(44).

6.2.3 Elektroporacija i nukleofekcija

Elektroporacija je metoda temeljena na energiji električne struje koja uzrokuje kratkotrajno povećanje propusnosti stanične membrane nakon kojega se membrana brzo ponovno zatvori. Djelovanje električnog polja na staničnoj membrani dovodi do razdvajanja naboja i stvaranja prolaznih pora u fosfolipidnom dvosloju kroz koje mogu proći molekule koje želimo dostaviti stanici. Neuman i suradnici su unos gena ovom metodom prvi izveli *in vitro* na mišjim stanicama 1982. godine (75), a već je 1991. uspješno obavljena *in vivo* transfekcija gena (76). Efikasnost dostave gena ovisi o parametrima primijenjenog električnog impulsa – frekvenciji, intenzitetu i trajanju impulsa. Prilagođavanjem ovih parametara razvijeni su protokoli za primjenu elektroporacije na različitim stanicama, pa tako i ljudskim, od kojih se danas najviše istraživanja provode na stanicama kože, mišića, jetre, prostate i pluća. Istraživanje provedeno 2005. godine spojilo je primjenu intravenske genske terapije i elektroporaciju. Najme u tom je istraživanju miševima intravenski dostavljena gola plazmidna DNA (pDNA), a potom su električni impulsi primijenjeni na lateralni dio lijevog režnja jetre. Ustanovljeno je da je ekspresija transgena i prisutnost pDNA povećana upravo u hepatocitima koji su bili zahvaćeni djelovanjem električkog polja, što je bio dokaz da elektroporacija može dovesti do lokalne genske terapije nakon sistemske primjene nukleinske kiseline (77). Kliničko istraživanje prve faze u kojem se ova kombinacija metoda dostave genske terapije isprobala na ljudima, objavljeno je 2008. godine i pokazalo je veliki uspjeh. Dvadeset i četiri bolesnika sa neresektabilnim melanomom su primila intratumorsku injekciju pDNA koja je nosila uputu za sintezu interleukina 12 (IL-12), a potom je na tumoru lokalno primijenjena elektroporacija kako bi pDNA predominantno ušla u melanomske stanice (78). Iako se radilo o metastatskim bolestima, u većine se bolesnika dogodila stagnacija progresije bolesti, a u nekih je došlo do regresije primarnog tumora te se smanjio broj metastaza.

Osim za liječenje melanoma, trenutno se provodi niz kliničkih istraživanja u kojima se evaporacijom primjenjuje genska terapija. Neka od njih bave se istraživanjem liječenja raka prostate, planocelularnog karcinoma glave i vrata, te primjenom DNA cjepiva u žena sa cervikalnom intraepitelnom neoplazijom uslijed infekcije humanim papiloma virusom.

Jedan od nedostataka elektroporacije bilo je nepostojanje mehanizma kojim bi nukleinska kiselina ušla iz citoplazme u jezgru stanice, pošto je jezgrina ovojnica propusna samo u razdoblju diobe stanice, no tome se doskočilo pronalaskom nukleofekcije. Nukleofekcija je podvrsta elektroporacije u kojoj se koriste otopine s reagensima specifičnim za različite vrste stanica, te im se dostavljaju električni impulsi specifičnog intenziteta što rezultira unosom nukleinskih kiselina u jezgru neovisno o diobi stanice (79). Ova se metoda već uspješno koristi u brojnim vrstama stanica uključujući keratocite, matične stanice dobivene iz koštane srži, endotelne stanice, stanice glioblastoma i melanocite, a njezina najveća prednost je povećana efikasnost dostavi nukleinskih kiselina stanici, uz smanjenje staničnog oštećenja (79).

6.2.4 Sonoporacija

Sonoporacija kao tehnika isporuke gena razvijena je devedesetih godina, a temelji se na ultrazvukom posredovanom privremenom povećanju propusnosti stanične membrane (80). Biofizikalni učinci ultrazvuka uključuju stvaranje kavitacija, tlaka zračenja i mikrostrujanja (81). Kavitacija je pojava mjehurića zraka u tkivu koji se pod utjecajem ultrazvučnih valova smanjuju i povećavaju, a kod vrlo visokih intenziteta dolazi do pucanja mjehurića. Kolaps mjehurića uzrokuje nastajanje sitnih pora u staničnoj membrani kroz koje molekule mogu slobodno difundirati i ući u citoplazmu stanice.

Kako bi se efikasnost unosa molekula u stanicu povećala, uz sonoporaciju su se počela koristiti kontrastna sredstva. Kontrasna sredstva se sastoje od mikromjehurića veličine 1 do 10 μ m ispunjenih plinom, a okruženih stabilizirajućom ovojnicom od proteina, lipida, surfaktanta ili biokompatibilnih polimera (82). Ova unaprijeđena sonoporacija nazvana je ultrazvučna ciljana destrukcija mikromjehurića (eng. *ultrasound targeted microbubble destruction* – UTMD). Mikromjehurići ujedno mogu poslužiti i kao nositelj terapijskog gena, a ustanovljeno je da pozitivno nabijeni mikromjehurići ostvaruju veću efikasnost u prijenosu genskog materijala (83). Provedeno je nekoliko studija na životinjama koje su pokazale da ultrazvuk u kombinaciji s mikromjehurićima može dostaviti angiogene gene u ishemijsku regiju miokarda i pojačati ekspresiju čimbenika povezanih s angiogenezom te tako poboljšati opskrbu miokarda krvlju nakon infarkta (84)(85). Zadnjih su se godina počele koristiti kontrastna sredstva još manjih, nanočestica. U usporedbi s klasičnim mikromjehurićima, nanočestice mogu prolaziti kroz krvne žile te se zadržavati u tumorskom tkivu (86). Horie i suradnici su uz

pomoć ultrazvuka i nanočestica u kompleksu s DNA koja je nosila gensku uputu za TNF- α liječili solidne tumore u miševa (87). Rezultati su pokazali smanjenu gustoću tumorskih žila nakon lokalne genske terapije i inhibiciju tumorskog rasta.

Nedavno je otkriveno da se pomoću UTMD metode može neinvazivno i reverzibilno prijeći krvno-moždana barijera, čime se lijekovi mogu ciljano dostaviti u SŽS. Na temelju toga otkrića, trenutno su aktivne brojne studije koje istražuju terapijski učinak isporuke gena posredovane ultrazvukom kod bolesti SŽS-a (88), poput glioma, Parkinsonove bolesti i Alzheimerove bolesti.

Iako isporuka gena posredovana ultrazvukom ima široku primjenu u istraživanjima na životinjama, još uvijek postoji dug put do njezine primjene kod ljudi. Za razliku od energije dijagnostičkog ultrazvuka, u genskoj terapiji se primjenjuje ultrazvučni valovi većeg intenziteta. Istraživanja su pokazala da ozbiljni kavitacijski učinci mogu dovesti do puknuća membrane, puknuća DNA, fragmentacije jezgre, oštećenja endotelnih stanica, oštećenja mikrovaskularnog sustava, hemolize, te ozljede miokarda (89). Potrebno je provesti više istraživanja kako bi se ultrazvučni parametri optimizirali tako da se povećala učinkovitost transfekcije gena, a smanje štetne nuspojave na normalna tkiva i organe.

6.2.5 Fotoporacija

Fotoporacija, još nazvana i optoporacija, je metoda unosa molekula u stanicu koja se temelji na stvaranju prolaznih pora na staničnoj membrani uslijed djelovanja kontinuiranog ili impulsnog laserskog svjetla (90). Tsukakosi i suradnici su prvi objavili studiju o uspješno provedenoj transfekciji normalne stanice bubrega štakora 1984. godine (91). Upotrijebili su ultraljubičasti nanosekundarni laser veličine zrake 0,5 μm i laserskom energijom od 1 mJ, a u ciljane su stanice unijeli DNA koja je nosila Ecogpt gen. Njihovi su rezultati dokazali da se pomoću ove metode u jednom minuti mogu modificirati 103 stanice. U usporedbi s ručnim fizikalnim metodama postignuta je deseterostruka učinkovitost transfekcije, a stopa uspješnosti povećana je za tri reda veličine u usporedbi s kemijskim metodama. Kasnije su se za transfekciju DNA u stanice počeli koristiti femtosekundarni laseri i pokazali su bolju učinkovitost, te nižu citotoksičnost (92). Femtosekundni laser je izuzetno pogodan za ciljano dostavljanje gena u jednu stanicu, što su prvi dokazali Antkowiak i suradnici koji su pomoću ovog tipa lasera uspješno prenijeli plazmidnu DNA u jednu odabranu neuronsku stanicu (93).

Osim toga što se pomoću lasera terapija može dostaviti samo jednoj odabranoj stanici, Barrett i suradnici uspjeli su mRNA uvesti u specifični dio stanice. Oni su pomoću fentosekundarnog lasera mRNA posebno dostavili u regiju dendrita, a posebno u tijelo neurona štakora (94). Otkrili su da mRNA dostavljena u dendrite izaziva staničnu smrt, dok mRNA unesena u tijelo neurona to ne izaziva, s čime su skrenuli pozornost na važnost utjecaja dendritičkog okoliša na funkciju proteina.

Danas se u fotoporaciji koriste još mikrosekundni laser i laser s kontinuiranim valovima, a svaki laser pokazuje različit mehanizam kojim dolazi do nastanka pora od kojih su najznačajniji fototermalni, fotomehanički i fotokemijski procesi. Učinkovitost transfekcije ovisi o intenzitetu energije, trajanju impulsa i broju impulsa. Raznolikost valne duljine lasera također može utjecati na učinkovitost transfekcije, stoga se u optoporaciji koriste laseri različitih valnih duljina, od 193 nm do 2808 nm. Ustanovljeno je da se valne duljine iz područja bliskog infracrvenom zračenju, poput 800 nm ili 1064 nm, najprikladnije za optoporaciju u kliničkoj primjeni (95).

Prije više od deset godina je ustanovljeno da se nanočestice mogu koristiti u kombinaciji s laserom kao bi se potenciralo nastajanje pora. Iako se od tada u tu svrhu najviše koriste zlatne nanočestice – AuNP, primjeri drugih nanomaterijala poput nanočestica titana i nanomatrijala na bazi ugljika trenutno se istražuju. Fotoporacija udružena s nanočesticama može dovesti do velike propusnosti stanične membrane pri nižim laserskim energijama, stoga se laserski snop može proširiti da istovremeno pokrije veći broj stanica. 2012. godine je objavljeno da je gola DNA uspješno unesena u melanomske ljudske stanice pomoću nanočestica zlata i lasera, uz to je dokazana puno veća učinkovitost transfekcije s vrlo niskom toksičnošću uporabom ove metode u usporedbi s konvencionalnom lipofekcijom (96).

Zaključno, mogućnost transfekcije odabranih stanica u staničnoj kulturi jedinstvena je za fotoporaciju naspram drugih metoda dostave genske terapije. Posebna važnost fotoporacije leži u također jedinstvenoj mogućnosti za prostorno kontroliranu isporuku terapije unutar pojedine stanice.

6.2.6 Magnetoporacija

Magnetoporacija je proces dostave nukleinske kiseline u stanicu pomoću utjecaja magnetskog polja, a prvi put je znanstveno opisana 2000. godina. Egzogene nukleinske kiseline

miješaju se s reagensom da bi stvorile kompleks biomolekule i magnetskog reagensa. Tada se kompleks isporučuje u stanicu pod djelovanjem sile magnetskog polja. Postoji mišljenje da se pod utjecajem magnetskog polja ubrzavaju endocitoza i pinocitoza stanične membrane, no neki znanstvenici smatraju da je mehanizam nastanka pora sličan onome u elektroporaciji. Prema Faradayevom zakonu, magnetsko polje inducira nastanak električnog polja, koje onda izaziva promjene u transmembranskom potencijalu, a do perforacije stanične membrane dolazi kada transmembranski potencijal dosegne određeni prag (97). Iako postoje izvještaji o uspješnoj primjeni magnetoporacije *in vitro* i *in vivo* u srčanom tkivu, skeletnim mišićima, tumoru jetre, mišjim mioblastima i mišjem mozgu, veliki problem u daljnjem razvoju ove metode predstavlja toksičnost magnetskih reagensa.

6.3 Kemijske metode

6.3.1 Kationski lipidi

Negativno nabijene nukleinske kiseline pomoću elektrostatskih interakcija s pozitivno nabijenim kationskim lipidima tvore stabilne komplekse koje nazivamo lipopleksi. Svi kationski lipidi dijele svojstvo da spontano tvore male sferne čestice - liposome, koje se sastoje od jednog ili više koncentričnog lipidnog dvosloja. Od prvog monovalentnog kationskog lipida, DOTAP-a, kojega su sintetizirali Felgner i sur. 1987. godine (98), stotine novih kationskih lipida prijavljeni su za dostavu gena *in vitro* ili *in vivo*. Rutinski način pripreme lipopleksa je miješanje otopine plazmidne DNA i liposoma u odgovarajućem puferu.

Mehanizam isporuke gena pomoću lipidnih sustava uključuje 4 koraka: interakciju između kationskih čestica i stanične površine, endocitozu posredovanu endosomima, oslobađanje DNA iz endosoma, te translokaciju DNA u jezgru. Kako bi ostvarile interakciju sa staničnom površinom, kationske čestice sadrže razne ligande koji su kovalentno vezani za lipide, a neki od njih pojačali su učinkovitost vektora čak 1000 puta (45). Ligandi uključuju proteine, antitijela, ugljikohidrate, peptidne ligande i vitamine. Primijećeno je da većinu lipidnih čestica nakon endocitoze u ranim endosomima razgrade nukleaze iz lizosoma. Rješenje toga problema pronađeno je u dodatku tzv. 'pomoćnih lipida' koji omogućavaju bijeg iz endosoma. Najčešće korišteni pomoćni lipidi su dioleil-fosfatidiletanolamin (engl. *dioleoylphosphatidylethanolamine* – *DOPE*) i kolesterol (99). Oni onemogućavaju fuziju

membrane s lizosomima i tako štite česticu od razgradnje, što posljedično dovodi do povećanja efikasnosti transfekcije.

Do danas je lipofekcija uspješno primijenjena u životinja za isporuku DNA i RNA različitim vrstama stanica, uključujući tumorske stanice, epitelne stanice dišnih putova, endotelne stanice, hepatocite, mišićne stanice i druge, direktno u tkivo ili intravenskom primjenom. Međutim, velika prepreka za praktičnu uporabu lipofekcije *in vivo* je kratko zadržavanje lipopleksa u cirkulaciji zbog preuzimanja od strane Kupfferovih stanica jetre i makrofaga u slezeni, što smanjuje dostavu terapije u ciljne organe (100). Ovaj je problem prevladan modifikacijom površine liposoma pomoću hidrofilnih i neutralno nabijenih polimera poput polietilen glikola (PEG). PEG-modificirani liposomi imaju bolju održivost unutar krvotoka, a pokazali su veliki potencijal u terapiji karcinoma pomoću siRNA. Međutim, PEG-modificirani liposomi imaju manju učinkovitost transfekcije zbog smanjenog kontakta lipidne čestice sa staničnom membranom te zbog inhibicije endosomnog bijega. Kako bi se zaobišli ovi problemi dizajnirani su uvjetno difuzibilni PEG-lipidni kompleksi, koji posjeduju razne oblike pH osjetljivih kemijskih veza zbog kojih se PEG u kiselom mediju endosoma odvajaju od lipopleksa (101). Osim toga moguća rješenja su i konjugacija liganda specifičnih za stanicu na distalne krajeve PEG-a ili lipopleksi s kraćim alkilnim lancima koji u cirkulaciji postupno otpuštaju PEG.

Lipofekcija se smatra potencijalno dobrom metodom u liječenju tumora, pretežito zbog svojstva lipopleksa da se nakupljaju na mjestima s povećanom propusnošću stijenke krvnih žila. Za još učinkovitije ciljanje tumora, testirane su složene lipidne strukture presvučene receptorskim ligandima ili monoklonalnim protutijelima. Pokazalo se da su lipopleksi obilježeni folatom učinkoviti za *in vitro* i *in vivo* dostavu tzv. suicidalne genske terapije do stanica raka koje prekomjerno proizvode folatni receptor (102). Ova se strategija pokazala učinkovitom i u kliničkoj studiji provedenoj na pacijentima koji su imali različite solidne tumore na čijoj je površini eksprimiran transferinski receptor. U tumorsko su tkivo dostavljeni lipopleksi koji su sadržavali tumor supresorski gen p53, a na površini su imali ugrađeno protutijelo na transferinski receptor (103). Osim u liječenju tumora, lipopleksi su značajni i u dostavi DNA cjepiva. Nedavna klinička ispitivanja procijenila su učinkovitost DNA cjepiva protiv gripe, denge i genitalnog HSV.

Dobra strana lipofekcije je to što izbjegava nedostatke poput insercijske mutageneze i težih imunoloških reakcija koje se javljaju u virusnih vektora. Jedan od daljnjih ciljeva u

razvoju ove metode je pronalazak mehanizma ugradnje DNA u genom za postizanje dugotrajne ekspresije gena.

6.3.2 Kationski polimeri

Na sličan način kao kationski lipidi, i iduća skupina kemijskih vektora koje nazivamo kationskim polimerima, zajedno s nukleinskim kiselinama tvore komplekse. Radi se o pozitivno nabijenim molekulama raznovrsnih kemijskih struktura, a kompleksi koje tvore nazivaju se polipleksi. Najranija ispitivanja izvedena su korištenjem vektorskih svojstava poli-L-lizina (PLL). Ovaj polimer je imao lošu učinkovitost transfekcije zbog smanjenog kapaciteta za uništavanje endosomskih membrana, te je *in vivo* pokazao značajnu citotoksičnost (104). Brojne modifikacije PLL-a, uglavnom one koje sadržavaju polietilen glikol (PEG), su pojačale prijenos gena *in vivo* i smanjile toksičnost. PEG-ilirani PLL testiran je kao vektor za liječenje cistične fibroze i pokazao je određene dokaze o sigurnosti i djelotvornosti (45).

Najšire proučavani kationski polimer je polietilenimin (PEI), a prvi je puta upotrijebljen kao vektor za genski transfer 1995. godine (105). Ovaj polimer s velikom gustoćom neprotoniranih amino skupina ima snažan puferski potencijal u širokom rasponu pH što ga čini učinkovitim „protonskom spužvom“. Naime radi se o tome da preko membrane uz pomoć protonske pumpe u endosome ulaze protoni, a za njima i kloridni ioni. Neprotonirane amino skupine na sebe vežu protone, a kloridni ioni povećavaju osmotski tlak, što dovodi do pucanja endosoma (105). To svojstvo je presudni čimbenik za učinkovito oslobađanje nukleinske kiseline iz endosoma tijekom transfekcije. PEI je moguće proizvesti u razgranatim i linearnom obliku pri čemu su obje vrste polimera učinkovite u transfekciji gena, no linearni je oblik pokazao ipak bolju gensku ekspresiju, a smatra se da je razlog tome njegova lakša disocijacija u citoplazmi i to što u većoj mjeri ulazi u jezgru (106). Negativna karakteristika PEI-a je njegova *in vivo* toksičnost koja se očituje produkcijom citokina i izazivanjem nespecifičnog upalnog odgovora nakon sistemske primjene. Toksičnost ovog polimera može se smanjiti primjenom polimera manje molekulske mase (engl. *low molecular weight*, LMW PEI <10 kDa), iako su se oni pokazali manje učinkovitim kao sredstvo za transfekciju od njihove veće varijante (engl. *high molecular weight*, HMW PEI) (107). Istraživana je strategija koja se sastojala u konverziji LMW PEI u HMW PEI povezivanjem s biorazgradivim vezama. Poanta je bila omogućiti transficiranim stanicama da pretvore HMW PEI u fragmente LMW PEI koji se mogu lakše eliminirati iz citoplazme (108). Izvršene su i kovalentne i nekovalentne modifikacije PEI

sa šećerima, peptidima i lipidima radi poboljšanja njegovih fizikalno-kemijskih svojstava i povećanja specifičnosti za određeni tip stanica. Kao i kod lipofekcije, PEG se često koristi za neutralizaciju prekomjernog pozitivnog naboja, smanjenje citotoksičnosti te odgodu eliminacije iz krvotoka (109).

Pronađen je još jedan put u rješavanju problema citotoksičnosti, a to je upotreba biorazgradivih polimera. Glavni benefit biorazgradivih kationskih polimera je smanjenje akumulacije polimera u tretiranim tkivima i smanjena toksičnost. Biorazgradivi polimeri mogu biti prirodnog ili sintetičkog podrijetla. Neki od najčešće korištenih prirodnih biorazgradivih polimera uključuju hitozan, hijaluronsku kiselinu, dekstran, albumin i želatinu. Što se tiče biorazgradivih sintetičkih polimera, oni u svojoj polimernoj okosnici posjeduju hidrolitički labilne kemijske veze. Te kemijske veze mogu biti esterske, karbonate, amidne ili uretanske, te ih sukladno tome nazivamo poliesteri, polikarbonati, poliamidi i poliuretani (110). Hitozan i njegovi derivati se trenutno proučavaju za dostavu genske terapije na životinjskim modelima za liječenje karcinoma, dijabetesa, osteoartritisa, bolesti rožnice, kao i u dostavi DNA cjepiva. Izvješća o *in vivo* dostavi siRNA posredovanoj hitozanom su pokazala zanimljiv napredak terapije utišavanja gena u liječenju raka (111). Osim toga hitozan je jedan od popularnih komponenata tzv. složenih vektora za dostavu genske terapije. Složeni vektori su komponirani od anorganskih čestica koje prenose DNA i biorazgradivih polimera koji oblažu njihovu površinu. Jedna od mogućnosti koja se razvila konstrukcijom ovih vektora je i oralni način dostave genske terapije. Pokazalo se da u dostavi složenih vektora oralnim putem, hitozanski omotač može spriječiti razgradnju nukleinske kiseline u kiselom okruženju. Kang i sur. razvili su složeni vektor kombiniran od čestica zlata, derivata hitozana, te nanočestica taurokolne kiseline koji tvore kompleks sa siRNA Akt2 onkogenom, u svrhu liječenja jetrenih metastaza kolorektalnog karcinoma oralnom primjenom (112). Osim što je smanjena razgradnja nukleinske kiseline u gastrointestinalnom traktu, olakšan je aktivni transport kroz enterocite i pojačana je selektivna akumulacija u jetrenim metastazama kolorektalnog karcinoma.

7. Odobrena genska terapija u svijetu

Prvi lijek temeljen na genskoj terapiji američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je odobrila 1998. godine pod imenom **Vitravene** (fomivirsena). Radi se o vrsti antisense oligonukleotida za lokalno liječenje citomegalovirusnog

retinitisa kod imunokomprimitiranih pacijenata koji se primjenjivao putem intraokularne injekcije. Proizvođač je zbog niske potražnje za lijekom povukao lijek s europskog tržišta 2002. godine, a u SAD-u 2006. godine.

Državna agencija za hranu i lijekove u Kini je 2003. odobrila **Gendicine**, lijek za liječenje planocelularnog karcinom glave i vrata putem intratumorske injekcije. Radi se o rekombinantnom adenovirusnom vektoru koji eksprimira protein p53, kojega nedostaje tumorskim stanicama, a važan je u održavanju genetske stabilnosti stanice. Ista je agencija dvije godine kasnije odobrila **Oncorine**, genetički modificirani adenovirusi onkolitički lijek koji ciljano napada i uništava maligne stanice, za liječenje kasnog stadija karcinom nazofarinksa.

Filipinski ured za hranu i lijekove je 2007. odobrio **Rexin-G** kao lijek za liječenje sarkoma mekih tkiva i osteosarkoma. Njegovo djelovanje temeljeno je na retroviralnom vektoru koji sadrži gen za mutirani oblik ljudskog ciklina G1 koji se nakon intravenske primjene eksprimira uz pomoć LTR promotora i dovodi do zaustavljanja staničnog rasta tumorskih stanica (113). Inače, ciklin G1 je prekomjerno izražen u mnogim vrstama karcinoma, a proizvod ovoga gena važan je u kontroli početnog dijela staničnog ciklusa koji je ključan za rast stanice.

Rusko Ministarstvo zdravstva je 2011. odobrilo **Neovasculogen**, plazmid s genom za vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) koji potiče neovaskularizaciju. Koristi se u liječenju periferne vaskularne bolesti i kritične ishemije udova.

Napokon, 2012. godine odobrena je prva genska terapija u Europskoj uniji. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) dala je zeleno svjetlo za stavljanje na tržište lijeka **Glybera** (alipogene tiparvovec), generičkog imena alipogen tiparvovec. Radi se o rekombinantnom AAV koji se koristi u liječenju pacijenata sa nedostatkom lipoproteinske lipaze. Nažalost, zbog ekstremno niske potražnje za lijekom (učestalost ove bolesti ne prelazi jedan na milijun ljudi) i visoke cijene proizvodnje zbog koje je terapija za jednog pacijenta koštala približno jedan milijun eura, 2017. godine je odlučeno da se lijek povlači s tržišta.

Translarna (ataluren) je EMA uvjetno odobrila za liječenje DMD uzrokovane besmislenom mutacijom u genu za distrofin, kod pokretnih pacijenata u dobi od 2 godine ili starijih. Iako uvjetno odobren od 31. srpnja 2014., tek kasnije mu je proširena dobna indikacija. Približno 10-15% pacijenata oboljelih od DMD ima besmisleni mutaciju, a ova mala molekula omogućuje čitanje mutacijom uzrokovanog stop-kodona i sintezu distrofina. Primjenjuje se oralno.

Imlygic (talimogene laherparepvec), genetski modificirani herpes simplex virus tipa 1 (HSV1) koji nosi gensku informaciju za faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (114), 2015. godine odobrile su FDA i EMA. Ovaj se lijek primjenjuje lokalno, injekcijom u području neresektabilnog melanoma, a djeluje tako da inficirane stanice melanoma proizvode protein GM-CSF koji potiče imunski sustav bolesnika da prepozna i uništi stanice melanoma.

Nakon 2015. godine genska terapije ulazi u novu fazu razvoja, te se novi lijekovi temeljeni na genskoj terapiji odobravaju sve češće od strane regulatornih agencija. Tako ih je u 2016. godini odobreno čak četiri. **Zalmoxis** je lijek odobren od strane EMA-e, a koristio se u kao adjuvantna terapija kod odraslih pacijenata koji su prolazili transplantaciju haploidentičnih hematopoetskih matičnih stanica. U toku transplacije donorski T-limfociti se *ex vivo* genetski modificiraju uz pomoć retroviralnog vektora koji nosi gen za skraćeni oblik ljudskog receptora za faktor rasta živaca niskog afiniteta (engl. *human low affinity nerve growth factor receptor*, LNGFR), a taj gen služi za selekciju transduciranih stanica. Limfocitima se prenosi i gen za timidin kinazu virusa herpes simplex tip 1 (HSV-TK Mut2) koji ih učini osjetljivima na ganciklovir i valganciklovir. Radi se o „samoubilačkom genu“, jer bi u slučaju da dođe do bolesti presatka protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*, GVHD) služio za uništavanje T-limfocita. Nažalost, proizvođač Zalmoxisa je odlučio 2019. godine povući uvjetnu dozvolu za stavljanje lijeka u promet nakon što su rezultati treće faze kliničkih ispitivanja pokazali da lijek ne donosi nikakvu korist za preživljavanje bez bolesti (115).

Idući lijek odobren od strane EMA-e 2016. godine bio je **Strimvelis**, on se i danas primjenjuje i učinkovito djeluje na povećanje stope preživljavanja onih bolesnika koji boluju od ADA-SCID, a nije ih moguće liječiti presađivanjem koštane srži jer za njih nije pronađen podudarni darivatelj. Lijek Strimvelis sadrži stanice dobivene iz bolesnikove koštane srži, s time da neke od autolognih CD34+ stanica prije presađivanja budu transducirane retrovirusnim vektorom koji kodira sekvencu cDNA humane adenozin deaminaze.

Spinraza (nusinersen) je sintetički antisense oligonukleotidni lijek koji je indiciran u oboljelih od spinalne mišićne atrofije (SMA) u kojoj je nedostatna proizvodnja proteina koji se naziva „protein za preživljenje motoričkih neurona“ (engl. *survival motor neuron SMN*), a neophodan je za preživljenje i normalnu funkciju motoričkih neurona. Protein SMN sastavljen je od dva gena, SMN1 i SMN2. Bolesnicima sa SMA-om nedostaje gen SMN1, ali imaju gen SMN2 koji uglavnom proizvodi kratki SMN protein koji ne funkcionira dobro kao protein pune

duljine. SMN2 gen dostavljen putem Spinraze intratekalnom injekcijom u donji dio leđa omogućuje proizvodnju proteina pune duljine, što dovodi do ublažavanja progresije simptoma bolesti.

Exondys 51 (eteplirsen) prvi je lijek temeljen na genskoj terapiji za Duchenneovu mišićnu distrofiju (DMD) koji je odobrila FDA 2016. Pacijenti s DMD-om ne proizvode protein distrofin. Ovaj lijek omogućuje preskakanje egzona 51 i tako potiče proizvodnju skraćenog oblika distrofina, što dovodi do ublažavanja simptoma bolesti. Lijek je učinkovit samo kod 13% oboljelih kojima izuzimanje egzona 51 djeluje povoljno na postojeću mutaciju. EMA nije odobrila stavljanje Exondys 51 na tržište u Europi, navodeći ograničenja studije koja uključuju malu populaciju na kojoj je istraživanje rađeno, te neuspjeh u usporedbi s placebo.

Tri lijeka genske terapije odobrena su od strane FDA 2017. godine, a od strane EMA-e 2018. godine. **Kymriah** i **Yescarta** sadrže bolesnikove autologne T-limfocite koji su genetski modificirani tako da stvaraju CAR19. CAR19 može vezati CD19 koji se nalazi na malignim stanicama i tako dovesti do njihovog uništavanja te uklanjanja malignoma iz organizma. Kymriah je indiciran za liječenje akutne limfoblastične leukemije (engl. *Acute Lymphoblastic Leukaemia*, ALL) B-stanica u djece i mladih odraslih osoba do 25 godina u kojih rak nije reagirao na prethodno liječenje, vratio se dva ili više puta ili se vratio nakon transplantacije matičnih stanica; te kod difuznog B-velikostaničnog limfoma u odraslih u kojih se rak vratio ili nije reagirao nakon dva prethodna liječenja ili više njih (116). Yescarta je također indiciran u terapiji difuznog B-velikostaničnog limfoma, te primarnog mediastinalnog B-velikostaničnog limfoma.

Luxturna je lijek koji se primjenjuje za liječenje odraslih osoba i djece s gubitkom vida uzrokovanim nasljednom retinalnom distrofijom u kojoj je mutiran gen *RPE65*. Radi se o *in vivo* terapiji zasnovanoj na AAV-u koji sadržava ispravne kopije gena *RPE65*. Nakon što se lijek dostavi injekcijom u stražnji dio svakog oka, virus prenosi gen *RPE65* u stanice mrežnice i omogućuje im da proizvode enzim koji nedostaje.

Onpatro je postao je prvi lijek temeljen na siRNA koji je dobio odobrenje FDA i EMA u kolovozu 2018. (117). **Tegsedi**, antisense RNA lijek, odobrila je EMA u srpnju 2018., a FDA u listopadu 2018. Onpatro i Tegsedi su indicirani za liječenje polireuropatije uzrokovane nasljedne nasljednom transtiretin amiloidozom (117). Radi se o bolesti u kojoj se proteini amiloidi nakupljaju u tkivima, uključujući i oko živaca. SiRNA u slučaju Onoattroa i antisense

RNA Tegsedia djeluju tako da inhibiraju sintezu transtiretina u jetri čime se smanjuje stvaranje amiloida i ublažavaju simptomi bolesti.

2019. godine je EMA odobrila i **Zynteglo**, lijek indiciran za liječenje bolesnika s β -talasemijom ovisnom o transfuziji (engl. *transfusion-dependent β -thalassaemia*, TDT) koji nemaju β^0/β^0 genotip i koji su pogodni za transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica (engl. *haematopoietic stem cell*, HSC), ali nije dostupan srodni davatelj HSC stanica s podudarnim ljudskim leukocitnim antigenima (HLA). Zynteglo je obogaćena stanična populacija genetski modificiranih autolognih CD34⁺ stanica koja sadrži hematopoetske matične stanice transducirane lentivirusnim vektorom s genom koji kodira β^{A-T87Q} -globin.

FDA je 2019., a EMA 2020. godine odobrila još jedan lijek za liječenje SMA, ovoga puta za djecu s dijagnozom SMA tipa 1 (najteža vrsta) ili onih koji imaju najviše 3 kopije drugog gena SMN2. Riječ je o lijeku **Zolgensma** koji se temelji na rekombinantnom AAV-u koji sadrži funkcionalni gen *SMN1*.

Evrysdi (risdiplam) je 7. kolovoza 2020. odobren od strane FDA za liječenje SMA. 26. ožujka 2021. odobren je i od EMA-e. Indiciran je u bolesnika u dobi od 2 mjeseca i starijih koji imaju kliničku dijagnozu SMA tipa 1, tipa 2 ili tipa 3 ili jednu do četiri kopije gena SMN2. To je mala molekula, modifikator prekrajanja pre-mRNA SMN2 gena. Za razliku od drugih modifikatora prekrajanja, primjerice, nusinersena, ovaj lijek se primjenjuje oralno, što osim praktičnosti i sigurnosti primjene, otvara i mogućnost djelovanja na druga tkiva u kontekstu SMA kao višesustavnog poremećaja.

25. veljače 2021. godine FDA je odobrila **Amondys 45** (casimersen) za liječenje Duchenneove mišićne distrofije (DMD) kod pacijenata koji imaju potvrđenu mutaciju gena DMD koja je podložna preskakanju egzona 45. Ovo je prva ciljana terapija koju je odobrila FDA za pacijente s ovom vrstom mutacije. Otprilike 8% bolesnika s DMD-om ima mutaciju koja je podložna preskakanju egzona 45.

8. Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Tamari Nikuševoj-Martić na strpljenju, razumijevanju, profesionalnom vodstvu i stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada. Također zahvaljujem članovima Stručnog povjerenstva za ocjenu diplomskog rada, prof.dr.sc. Ljiljani Šerman i doc.dr.sc. Frani Paiću, na vremenu uloženom u čitanje i ocjenjivanje rada.

Najveće hvala mojim roditeljima Hrvoju i Marini, te sestri Ani na pružanju neizmjerne podrške, ljubavi, motivacije i razumijevanja tijekom cjelokupnog obrazovanja. Hvala Marinu koji me podržavao i vjerovao u mene od samoga početka studija.

Za kraj hvala mojim djedovima Mirku i Stipi, bakama Ani i Jelki, ostaloj rodbini i mojim prijateljima što su uvijek bili tu kada je bilo potrebno pružiti riječi podrške, te udijeliti mudre savjete.

9. Literatura

1. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, i sur. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet.* 2014;23(22):5866–78.
2. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, i sur. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol.* 2019;9:297.
3. Cotrim AP, Baum BJ. Gene Therapy: Some History, Applications, Problems, and Prospects. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):97–103.
4. Sia RHP, Dawson MH. In vitro transformation of pneumococcal types: II. the nature of the factor responsible for the transformation of pneumococcal types. *J Exp Med.* 1931;54(5): 701–710.
5. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J Exp Med.* 1944;79(2): 137–158.
6. Tatum EL, Lederberg J. Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1947; 53(6): 673–684.
7. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol.* 1952;64(5): 679–699.
8. Szybalska EH, Szybalski W. Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48(12):2026-34.
9. Cocito C, Prinzie A, De Somer P. Uptake by mammalian cells of nucleic acids combined with a basic protein. *Experientia.* 1962;18:218-20.
10. Temin HM. Separation of morphological conversion and virus production in Rous sarcoma virus infection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1962;27:407-14.
11. Crick F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature.* 1970;227(5258):561-3.
12. Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(4).
13. Rogers S, Lowenthal A, Terheggen HG, Columbo JP. Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *J Exp Med.*

- 1973;137(4).
14. Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Z Kinderheilkd.* 1975;119(1):1-3.
 15. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(10):2904-9.
 16. Mulligan RC, Berg P. Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;78(4).
 17. Mercola K, Stang H, Browne J, Salser W, Cline M. Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science.* 1980;208(4447).
 18. Mercola KE, Bar-Eli M, Stang HD, Slamon DJ, Cline MJ. Insertion of new genetic information into bone marrow cells of mice: comparison of two selectable genes. Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;397:272-280
 19. Beutler E. The Cline affair. *Mol Ther.* 2001;4(5):396-7.
 20. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N Engl J Med.* 1990;323(9):570-8.
 21. Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M, Hwu P, Yannelli JR, Yang JC, et al. The Development of Gene Therapy for the Treatment of Cancer. *Ann Surg.* 1993;218(4):455-64.
 22. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science.* 1995;270(5235).
 23. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature.* 1999;401(6753):517-8.
 24. Cavazzana-Calvo M. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science.* 2000;288(5466):669-72.

25. Belete TM. The Current Status of Gene Therapy for the Treatment of Cancer. *Biol Targets Ther.* 2021;15:67-77.
26. Cornu TI, Mussolino C, Cathomen T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med.* 2017;23(4):415–23.
27. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, i sur. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet.* 2019;9:691.
28. Campa CC, Weisbach NR, Santinha AJ, Incarnato D, Platt RJ. Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts. *Nat Methods.* 2019;16(9):887–93.
29. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, i sur. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014;370(10):901–10.
30. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, i sur. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2017;9(374):eaaj2013.
31. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, i sur. TALEN-based Gene Correction for Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther.* 2013;21(6):1151–9.
32. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature.* 2016;535(7613):476–7.
33. Anzalone A V., Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, i sur. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019;576(7785):149–57.
34. What is Gene Therapy?. U.S. Food and Drug Administration. [pristupljeno 12.06.2021]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>
35. Hildt E. Human Germline Interventions—Think First. *Front Genet.* 2016;7:81.
36. Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;44(2–3):153–66.
37. Johnston SA, Talaat AM, McGuire MJ. Genetic Immunization. *Arch Med Res.* 2002;33(4):325–9.

38. Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27(2):70–7.
39. Tang X, Zhang S, Fu R, Zhang L, Huang K, Peng H, i sur. Therapeutic Prospects of mRNA-Based Gene Therapy for Glioblastoma. *Front Oncol.* 2019 Nov 8;9:1208.
40. Caplen NJ. Gene Therapy Progress and Prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Ther.* 2004;11(16):1241–8.
41. Stull RA, Szoka FC. Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res.* 1995;12(4):465–83.
42. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem.* 1999;45(9):1628-50.
43. Huang Y, Liu X, Dong L, Liu Z, He X, Liu W. Development of Viral Vectors for Gene Therapy for Chronic Pain. *Pain Res Treat.* 2011;2011:968218.
44. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceutical Medicine.* 2011;25(5):293-306.
45. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. 2012;1(2):1–11.
46. Bergelson JM. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997;275(5304):1320–3.
47. Hirata RK, Russell DW. Design and Packaging of Adeno-Associated Virus Gene Targeting Vectors. *J Virol.* 2000;74(10):4612–20.
48. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 2005;12(S1):S18–27.
49. Lemarchand P, Jaffe HA, Danel C, Cid MC, Kleinman HK, Stratford-Perricaudet LD, i sur. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(14):6482–6.
50. Davies J. Prospects for gene therapy in lung disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(3):272–8.
51. Griesenbach U, Ferrari S, Geddes DM, Alton EFWF. Gene Therapy Progress and Prospects: Cystic fibrosis. *Gene Ther.* 2002;9(20):1344–50.
52. Bramson J, Hitt M, Gauldie J, Graham F. Pre-existing immunity to adenovirus does not

- prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther.* 1997;4(10):1069–76.
53. Singh S, Kumar R, Agrawal B. Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. In: *Adenoviruses* [Internet]. IntechOpen. 2019. [pristupljeno 12.05.2021.].

Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/adenoviruses/adenoviral-vector-based-vaccines-and-gene-therapies-current-status-and-future-prospects>
 54. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm.* 2014;459(1–2):70–83.
 55. Knopp Y, Geis FK, Heckl D, Horn S, Neumann T, Kuehle J, i sur. Transient Retrovirus-Based CRISPR/Cas9 All-in-One Particles for Efficient, Targeted Gene Knockout. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2018;13:256–74.
 56. Kaiser J. Thalassemia Treatment Succeeds, With a Caveat. *Science.* 2009;11;326(5959):1468–9.
 57. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, i sur. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science.* 2009;326(5954):818–23.
 58. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, i sur. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 1991;10(12):3941–50.
 59. Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozzi F, i sur. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood.* 2012;119(13):3038–41.
 60. Kaepfel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, i sur. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med.* 2013;19(7):889–91.
 61. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-Associated Virus Biology. *Methods Mol Biol.* 2011;807:1-23.
 62. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJE, i sur. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006;12(3):342–7.
 63. Ertl HCJ, High KA. Impact of AAV Capsid-Specific T-Cell Responses on Design and

- Outcome of Clinical Gene Transfer Trials with Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors: An Evolving Controversy. *Hum Gene Ther.* 2017;28(4):328–37.
64. Abbouda A, Avogaro F, Moosajee M, Vingolo EM. Update on Gene Therapy Clinical Trials for Choroideremia and Potential Experimental Therapies. *Medicina (B Aires)*. 2021;57(1):64.
 65. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, i sur. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186–91.
 66. Wolff J, Malone R, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, i sur. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990;247(4949):1465–8.
 67. Donnelly RF, Singh TRR, Woolfson AD. Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Deliv.* 2010;17(4):187–207.
 68. Chen W, Li H, Shi D, Liu Z, Yuan W. Microneedles As a Delivery System for Gene Therapy. *Front Pharmacol.* 2016;7:137.
 69. Chen B, Wei J, Tay FEH, Wong YT, Iliescu C. Silicon microneedle array with biodegradable tips for transdermal drug delivery. *Microsyst Technol.* 2008;14(7):1015–9.
 70. Tang J, Wang J, Huang K, Ye Y, Su T, Qiao L, i sur. Cardiac cell-integrated microneedle patch for treating myocardial infarction. *Sci Adv.* 2018;4(11):eaat9365.
 71. O'Brien J, Lummis SCR. An improved method of preparing microcarriers for biolistic transfection. *Brain Res Protoc.* 2002 Aug;10(1):12–5.
 72. Zhang D, Das DB, Rielly CD. Potential of microneedle-assisted micro-particle delivery by gene guns: a review. *Drug Deliv.* 2014;21(8):571–87.
 73. Belyantseva IA. Helios® Gene Gun-Mediated Transfection of the Inner Ear Sensory Epithelium. 2009;493:103-23.
 74. Davtyan H, Ghochikyan A, Movsesyan N, Ellefsen B, Petrushina I, Cribbs DH, i sur. Delivery of a DNA Vaccine for Alzheimer's Disease by Electroporation versus Gene Gun Generates Potent and Similar Immune Responses. *Neurodegener Dis.* 2012;10(1–4):261–4.
 75. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1(7):841–5.
 76. Titomirov A V., Sukharev S, Kistanova E. In vivo electroporation and stable transformation

- of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1991;1088(1):131–4.
77. Sakai M, Nishikawa M, Thanaketsaisarn O, Yamashita F, Hashida M. Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation. *Gene Ther.* 2005;12(7):607–16.
78. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, i sur. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(36):5896–903.
79. Han SY, Gai W, Yancovitz M, Osman I, Di Como CJ, Polsky D. Nucleofection is a highly effective gene transfer technique for human melanoma cell lines. *Exp Dermatol.* 2008;17(5):405–11.
80. Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. Ultrasound-Mediated Transfection of Mammalian Cells. *Hum Gene Ther.* 1996;7(11):1339–46.
81. O'Brien WD. Ultrasound–biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1–3):212–55.
82. Tomizawa M. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol.* 2013;3(4):39.
83. Chen Z, Du M, Yan F. Recent Advances about Local Gene Delivery by Ultrasound. In: *Gene Expression and Control* [Internet]. IntechOpen. 2019. [pristupljeno 14.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/gene-expression-and-control/recent-advances-about-local-gene-delivery-by-ultrasound>
84. Zhang M, Yu W-Z, Shen X-T, Xiang Q, Xu J, Yang J-J, i sur. Advanced Interfere Treatment of Diabetic Cardiomyopathy Rats by aFGF-Loaded Heparin-Modified Microbubbles and UTMD Technique. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016;30(3):247–61.
85. Zhao Y-Z, Tian X-Q, Zhang M, Cai L, Ru A, Shen X-T, i sur. Functional and pathological improvements of the hearts in diabetes model by the combined therapy of bFGF-loaded nanoparticles with ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Control Release.* 2014;186:22–31.
86. Güvener N, Appold L, de Lorenzi F, Golombek SK, Rizzo LY, Lammers T, i sur. Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations. *Methods.* 2017;130:4–13.

87. Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of antitumor effects following tumor necrosis factor- α gene delivery using nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci.* 2011;102(11):2082–9.
88. Huang Q, Deng J, Wang F, Chen S, Liu Y, Wang Z, i sur. Targeted gene delivery to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood–brain barrier disruption. *Exp Neurol.* 2012;233(1):350–6.
89. Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1–3):314–30.
90. Xiong R, Samal SK, Demeester J, Skirtach AG, De Smedt SC, Braeckmans K. Laser-assisted photoporation: fundamentals, technological advances and applications. *Adv Phys X.* 2016;1(4):596–620.
91. Tsukakoshi M, Kurata S, Nomiya Y, Ikawa Y, Kasuya T. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Appl Phys B Photophysics Laser Chem.* 1984;35(3):135–40.
92. Tirlapur UK, König K. Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature.* 2002;418(6895):290–1.
93. Antkowiak M, Torres-Mapa ML, Witts EC, Miles GB, Dholakia K, Gunn-Moore FJ. Fast targeted gene transfection and optogenetic modification of single neurons using femtosecond laser irradiation. *Sci Rep.* 2013;3(1):3281.
94. Barrett LE, Sul J-Y, Takano H, Van Bockstaele EJ, Haydon PG, Eberwine JH. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor. *Nat Methods.* 2006;3(6):455–60.
95. Yao C-P, Zhang Z-X, Rahmanzadeh R, Huettmann G. Laser-Based Gene Transfection and Gene Therapy. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2008;7(2):111–9.
96. Baumgart J, Humbert L, Boulais É, Lachaine R, Lebrun J-J, Meunier M. Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells. *Biomaterials.* 2012;33(7):2345–50.
97. Jakutavičiūtė M, Ruzgys P, Tamošiūnas M, Maciulevičius M, Šatkauskas S. Physical Methods for Drug and Gene Delivery Through the Cell Plasma Membrane. 2017;227:73-92.
98. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, i sur. Lipofection: a highly

- efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(21):7413–7.
99. Slivac I, Guay D, Mangion M, Champeil J, Gaillet B. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(1):105–18.
100. Sakurai F, Terada T, Yasuda K, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. The role of tissue macrophages in the induction of proinflammatory cytokine production following intravenous injection of lipoplexes. *Gene Ther.* 2002;9(16):1120–6.
101. Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2012;163(3):267–76.
102. Duarte S, Faneca H, Lima MC. Folate-associated lipoplexes mediate efficient gene delivery and potent antitumoral activity in vitro and in vivo. *Int J Pharm.* 2012;423(2):365–77.
103. Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis D, Bedell C, Edelman G, Barve M, i sur. Phase I Study of a Systemically Delivered p53 Nanoparticle in Advanced Solid Tumors. *Mol Ther.* 2013;21(5):1096–103.
104. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem Rev.* 2009;109(2):259–302.
105. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, i sur. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(16):7297–301.
106. Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kurska M, i sur. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 2001;3(4):362–72.
107. Kunath K. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release.* 2003;89(1):113–25.
108. Lee YS, Kim SW. Bioreducible polymers for therapeutic gene delivery. *J Control Release.* 2014;190:424–39.
109. Merdan T, Kopeček J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(5):715–58.

110. Chen C-K, Huang P-K, Law W-C, Chu C-H, Chen N-T, Lo L-W. Biodegradable Polymers for Gene-Delivery Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2131-2150.
111. Ragelle H, Vandermeulen G, Pr at V. Chitosan-based siRNA delivery systems. *J Control Release*. 2013;172(1):207–18.
112. Kang SH, Revuri V, Lee S-J, Cho S, Park I-K, Cho KJ, i sur. Oral siRNA Delivery to Treat Colorectal Liver Metastases. *ACS Nano*. 2017;11(10):10417–29.
113. Gordon EM, Hall FL. Rixin-G, a targeted genetic medicine for cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(5):819–32.
114. Ott PA, Hodi FS. Talimogene Laherparepvec for the Treatment of Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(13):3127–31.
115. Zalmoxis (nalotimagene carmaleucel) Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union [Internet]. EMA 2019. [pristupljeno 15.05.2021.] Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-zalmoxis-withdrawal-marketing-authorisation-european-union_en.pdf
116. Ali S, Kjekken R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, et al. The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*. 2020;25:e321–e327
117. Chakradhar S. Treatments that made headlines in 2018. *Nat Med*. 2018;24(12):1785–7.

10. Životopis

Rođena sam 4.5.1996. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla sam u Osnovnoj školi Sveta Klara gdje sam po završetku školovanja primila priznanje za učenicu generacije. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u zagrebačkoj XV. gimnaziji koju sam 2014. godine završila s odličnim uspjehom, te upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Na fakultetu imam odličan prosjek ocjena, zbog kojega sam u akademskoj godini 2016./2017. bila dobitnica državne STEM stipendije. Za vrijeme studija bila sam demonstrator na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju (u ak. god. 2018./2019. i 2019./2020.), te aktivni član Studentske sekcije za radiologiju i član Studentske sekcije za anesteziologiju. Aktivno govorim engleski jezik, te posjedujem osnovno znanje njemačkog jezika.