

# Genska i farmakološka terapija molekulama pratiteljima

---

**Hnojčik, Silvija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:105:201762>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2023-10-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Silvija Hnojčik**

**Genska i farmakološka terapija  
molekulama pratiteljima**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Silvija Hnojčik**

**Genska i farmakološka terapija  
molekulama pratiteljima**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za pedijatriju, Zavodu za neonatologiju i intenzivno liječenje pod vodstvom doc. dr. sc. Maria Ćuka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

## Popis korištenih kratica

- ADA SCID – teška kombinirana imunodeficijencija uzrokovana manjkom adenzin deaminaze (engl. *adenosine deaminase severe combined immunodeficiency*)
- CpG – mjesta u sekvenci DNA na kojima gvanin slijedi citozin u 5' – 3' smjeru
- 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 – granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- 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*)
- HPRT – hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza
- HPV – humani papiloma virus (engl. *human papilloma virus*)
- HR – homologna rekombinacija
- HSV-TK – timidin kinaza herpes simplex virusa
- Kb – kilobaza
- LTR – dugo terminalno ponavljanje (engl. *long terminal repeat*)
- MLV – virus mišje leukemije (engl. *murine leukemia virus*)
- NHEJ – nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*)
- PC – farmakološki pratitelji (engl. *pharmacological chaperones*)
- PEG – polietilenglikol
- PEI – polietilenimin
- PLL – poli-L-lizin
- PTD – proteinska transdukcijska domena (engl. *protein transduction domain*)
- RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
- RSV – Rous sarkom virus (engl. *Rous sarcoma virus*)

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

SV40 – engl. *simian virus 40*

SŽS – središnji živčani sustav

TALEN – nukleaze efektori slični aktivatorima transkripcije (engl. *transcription activator-like effector nuclease*)

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

UTMD – ultrazvučno posredovana destrukcija mikromjehurića (engl. *ultrasound mediated microbubble destruction*)

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

LNGFR – engl. *human low affinity nerve growth factor receptor*

## **SADRŽAJ**

- 1. SAŽETAK**
- 2. SUMMARY**
- 3. UVOD**
- 4. POVIJEST GENESKE TERAPIJE**
  - 4.1 POČETAK GENESKE TERAPIJE – MJESTO GENESKE INFORMACIJE**
  - 4.2 PRIJENOS GENESKE INFORMACIJE**
  - 4.3 ORUĐA GENESKE TERAPIJE**
  - 4.4 PRVE KLINIČKE STUDIJE**
  - 4.5 PROBLEM INSERCIJSKE MUTAGENEZE**
  - 4.6 CILJANA MODIFIKACIJA GENOMA**
- 5. OSNOVE GENESKE TERAPIJE**
  - 5.1 GENESKA TERAPIJA SOMATSKIH I GERMINATIVNIH STANICA**
  - 5.2 PRISTUP *IN VIVO* I *EX VIVO***
  - 5.3 VRSTA PRENESENOG GENESKOG MATERIJALA**
- 6. METODE GENESKOG TRANSFERA**
  - 6.1 NEVIRALNI GENESKI TRANSFER**
    - 6.1.1 FIZIKALNE METODE**
    - 6.1.2 KEMIJSKE METODE**
  - 6.2 VIRALNI GENESKI TRANSFER**
    - 6.2.1. ADENOVIRALNI VEKTORI**
    - 6.2.2. GAMARETROVIRALNI I LENTIVIRALNI VEKTORI**
    - 6.2.3. ADENO ASOCIRANI VIRALNI VEKTORI**

**7. ODOBRENI LIJEKOVI GENSKE TERAPIJE**

**8. FARMAKOLOŠKI PRATITELJI**

**9. ZAHVALE**

**10. LITERATURA**

**11. ŽIVOTOPIS**



## 1. Sažetak

### **Genska i farmakološka terapija molekulama pratiteljima**

Genska terapija je jedan od teorijski najperspektivnijih pravaca razvoja terapije u današnjoj medicini. Podloga znanja o identifikaciji i prijenosu gena postoji već više od pedeset godina te su tehnološki postupci danas dovoljno napredovali za postizanje značajnih terapijskih rezultata. Ovaj rad pruža pregled nastanka i današnjih mogućnosti genske terapije. Također će biti prikazano novo područje epigenetičke terapije bolesti smatanja proteina pomoću farmakoloških pratitelja.

Ključne riječi: genska terapija, farmakološki pratitelji

## **2. Summary**

### **Gene therapy and pharmacological therapy using molecular chaperones**

Gene therapy is one of the most promising therapeutic directions developing in medical science today. The groundwork of knowledge on the identification and transfer of genes has existed for over fifty years and the technological procedures are now sufficiently advanced for the achievement of significant therapeutic results. This paper aims to review the origins and current reach of gene therapy. The novel area of epigenetic therapy of protein folding diseases through the use of pharmacological chaperones will also be examined.

Key words: gene therapy, pharmacological chaperones

### **3. Uvod**

Genska terapija je eksperimentalno područje terapije u medicini bazirano na korištenju gena u liječenju ili prevenciji bolesti.

Postoji intrinzična privlačnost u ideji genske terapije – ova tehnologija nudi priliku za ispravljanje mnogih bolesti u korijenu patofiziološkog poremećaja, genetskoj grešci. Znanje i mogućnost egzaktne manipulacije gena su dostupni već gotovo pola stoljeća, no napredak je spor i malo je finaliziranih odobrenih produkata ove tehnologije. Nove metode ciljane modifikacije genoma i epigenetičke informacije mogle bi donijeti eksponencijalne pomake u ovom području i otključati vrata terapiji mnogih dosad neizlječivih bolesti. Ovaj rad donosi pogled u povijest i sadašnje dosege genske terapije i još jednog pogodnog ranog mjesta terapijske intervencije, procesa nabiranja u staničnoj proizvodnji proteina u kojem se pogreške mogu spriječiti ili ispraviti primjenom farmakoloških pratitelja.

## 4. Povijest genske terapije

### 4.1. Početak genske terapije – mjesto genske informacije

Ideji gena kao terapije prethode velika otkrića molekularne biologije. Prvi koraci bili su u prepoznavanju DNA kao nosioca genetske informacija i postavljanju centralne dogme molekularne biologije, koja postavlja put genetske informacije u smjeru DNA preko RNA do proteina.

Početna istraživanja u ovom području provodio je britanski bakteriolog Frederick Griffith. Njegov rad bavio se istraživanjem *S. pneumoniae*, kojeg se otkrićem obilježavanja antigena kapsule pomoću antitijela tada moglo razvrstati u serotipove. Proučavajući ovom metodom slučajeve pacijenata s pneumonijom, otkrio je da je ponekad kroz tijek bolesti u istog pacijenta prisutno više sojeva *S. pneumoniae*. Pretpostavio je da je vjerojatnije da pneumokoki na neki način prelaze iz jednog serotipa u drugi, nego da se radi o reinfekcijama novim sojevima. Godine 1928. objavljuje izvještaj o transformaciji nevirulentnog soja pneumokoka u virulentni (1). U ovom eksperimentu pomiješane su bile žive bakterije nevirulentnih R-formi pneumokoka tipa 1 sa toplinski inaktiviranim virulentnim S-formama pneumokoka tipa 2. Mješavinom su zaraženi miševi te su razvili pneumoniju, iako se pretpostavljalo da neće biti patogena. Ovo je bio prvi put da je zamijećen takav fenomen te je započelo spekulaciju o tome na koji način je informacija o patogenosti prešla u nevirulentan soj.

U daljnjim eksperimentima, pokazano je da se izom stanica virulentnog soja pneumokoka, filtriranjem i precipitacijom u alkoholu može izolirati „tvar“ koja će transformirati nevirulentne pneumokoke, a sama po sebi je sterilna (2). Ova „tvar“ nazvana je “transformirajući princip” te se nastavilo raditi na njezinoj purifikaciji i identifikaciji strukture. Do kemijske identifikacije “transformirajućeg principa” kao molekule DNA došlo je tek za desetak godina (3) jer je bilo teško isključiti kontaminaciju proteinima, koje je znanstvena zajednica u to vrijeme smatrala vjerojatnijim molekulama prijenosa genetske informacije.

## 4.2. Prijenos genske informacije

Nakon otkrića transformacije kao puta prijenosa genetskog materijala u bakterija, pronađeni su i dokazi konjugacije i transdukcije bakteriofagom. Američki molekularni biolog Lederberg je među prvima eksperimentalno potvrđivao genetsku rekombinaciju između živih bakterija. U eksperimentu je pokazao da će miješanjem dva homogena soja *E. coli*, od kojih je svaki imao po dvije različite genetske deficijencije u proizvodnji specifičnih aminokiselina, uspjeti razmijeniti genetski materijal i stvoriti novi, nedeficijentan soj puno brže nego što se to događa prirodnim mutacijama (4).

Također Lederberg sudjeluje u otkriću transdukcije u sličnom eksperimentu. Dva soja *S. typhimurium* uzgojena s potrebom za različitim aminokiselinama u mediju ovaj put nisu pomiješana, nego razdvojena filtrom sitnijim od bakterijske stanice, koji će spriječiti konjugaciju. Bakterije ponovo ipak uspijevaju razmijeniti informaciju, što se dalje istražuje mijenjanjem veličine filtra. Time je otkriveno da veličina pora filtra kroz koje će doći do rekombinacije točno odgovara veličini od ranije poznatog bakteriofaga, te je uspostavljena hipoteza o transdukciji fagom (5).

Uskoro su slični koncepti mogućnosti prijenosa DNA proučeni i kod stanica čovjeka. Na početku je bilo potrebno osmisliti medij za selekciju ljudskih stanica kojim bi se mogla jasno dokazivati neka monogenska promjena. To je postignuto s HAT medijem (6) koji vrši selekciju genetski modificiranih stanica prema korištenju HPRT metaboličkog puta. Normalne stanice za sintezu purina, gradivnih elemenata nukleinskih kiselina, koriste enzim dihidrofolat reduktazu (DHFR). Ako je DHFR put blokiran, mogu koristiti alternativni metabolički put preko enzima hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaze (HPRT). Novi HAT medij sadržavao je inhibitor DHFR puta pa su ga tako mogle preživjeti samo stanice s aktivnim HPRT putem. Na ovom temelju dokazana je prvi puta mogućnost nasljednog ispravljanja genetske greške, kada je eksperimentalno dokazano da se pomoću prenesene DNA HPRT pozitivnih stanica uputa za HPRT put može prenijeti u HPRT negativne stanice koje će tako preuzeti mogućnost preživljavanja u HAT mediju. Također je pokazano da stanice kćeri i

daljnje generacije zadržavaju ovo svojstvo te je tako ostvaren prvi nasljedni genetski transfer u ljudskoj stanici.

### **4.3. Oruđa genske terapije**

Dokaz načela transformacije humanih stanica pomoću vanjske DNA potiče razvoj učinkovitijih metoda unosa DNA u stanicu. Još su Szybalska i Szybalski u istom radu pokazali da je uspješnost transformacije ovisna o količini DNA kojoj su stanice bile izložene, pa tako o uspješnosti prijenosa DNA. U 1950-ima praćen je unos radioaktivno obilježenih molekula DNA u stanice i jezgru (7). Dalje se primjećuje da se unos DNA može povećati stvaranjem kompleksa s proteinima poput albumina, koji će je zaštititi od digestije enzimima (8). Szybalska i Szybalski koriste spermin, a kasnije se pronalaze i učinkovitije metode, transfekcija pomoću DEAE dekstrana te zatim tehnika transfekcije kalcijevim fosfatom.

Drugi smjer istraživanja prijenosa nukleinskih kiselina potiču otkrića stabilne transformacije stanica pilećeg embrija putem infekcije Rous sarcoma virusom (RSV), stanice embrija nasljeđuju i nastavljaju ekspresiju virusnih proteina (9). Pošto je RSV RNA virus, ovo je upućivalo na mogući tijek informacija od RNA prema DNA. Temin ovaj smjer prijenosa formulira kao tzv. provirus hipotezu, u to vrijeme kontroverznu iznimku centralne dogme biologije. Njegovu hipotezu potvrđuje zatim i otkriće kromosomske insercije gena nekih virusa (10). Postaje očita mogućnost da se takvi virusi mogu iskoristiti za prijenos ciljanih gena u genskoj terapiji (11). Međutim, tehnološke mogućnosti identificiranja i manipulacije genima kako bi ih inkorporirali u virusnu DNA još su bile siromašne.

U svakom slučaju, pokušava se indirektnim pristupima. Jedan takav pokušaj bio je uvođenje virusa za kojeg se smatralo da u genomu sadrži uputu za enzim arginazu pacijentima s deficijencijom arginaze (12). Rogers zamjećuje da tumori kože u zeca koje uzrokuje Shope papilloma virus pokazuju visoku razinu aktivnosti arginaze (13). U normalnoj koži zečeva nije registrirao aktivnu arginazu, iako drugi autori jesu (14). Također pronalazi antitijela u zečevima

koja neutraliziraju arginazu iz kože, a ne i normalnu arginazu iz stanica jetre (12). Prema tome zaključuje da je moguće da virus sam nosi uputu za virusnu arginazu u svojem genetskom sastavu. Pošto Shope papilloma virus nije pokazivao onkogenu aktivnost na ljudskim stanicama, odlučuje se prvi puta provesti pokušaj genske terapije na ljudima. Dvema djevojčicama s hiperargininemijom injicira se Shope papilloma virus, u nadi da će neke inficirane stanice početi s proizvodnjom arginaze i sniziti razine arginina u serumu. Nažalost, rezultati ove rane studije bili su negativni. Serumske razine arginine ostale su stabilne. Kasnije sekvencioniranje genoma ovog virusa nije našlo dokaza o postojanju gena za virusnu arginazu (15).

#### **4.4. Prve kliničke studije**

Pojava tehnologije rekombinantne DNA, potaknuta otkrićem restrikcijskih enzima u kasnim šezdesetima i sedamdesetima uzrok je naglog skoka u broju studija kojima se prikazuju mogućnosti izolacije i prijenosa pojedinih gena u ljudskim stanicama. S druge strane, napreduje razvoj retroviralnih vektora. Pripremljen je prvi rekombinantni viralni vektor od virusa SV40 koji uspješno prenosi novi gen u stanice sisavaca (16). Maturacija ovih dvaju tehnologija ohrabruje pojavu prvih pomaka u kliničkim studijama u polju genske terapije.

Među prvima se nalazi još jedan rani, neuspješni pokušaj, takozvana afera Cline. Cline i kolege 1980. provode kliničku studiju u kojoj pokušavaju liječiti beta talasemiju. Beta talasemija je monogenska bolest uzrokovana poremećenim genom za beta globin na 11. kromosomu, što uzrokuje tešku anemiju. Stanice koštane srži dvaju pacijenata s beta talasemijom transfecirane su plazmidom koji sadrži gen za beta globin, slabije učinkovitom metodom transfekcije kalcijevim fosfatom. Svi detalji ove studije nisu objavljeni, ali poznato je da nije bilo klinički značajnih rezultata kod pacijenata, kao ni štetnih posljedica. Negativna posljedica svakako je bila šteta za ugled genske terapije, jer je otkriveno da je Cline zaobišao neke regulacijske postupke svog sveučilišta i preuranjeno s istraživanja na životinjama prešao na testiranje na ljudima. S

druge strane, ovaj slučaj svratio je pažnju na rastuće dosege ovog područja znanosti i ubrzao donošenje regulativa i stvaranje uvjeta za kliničke studije (17).

Prva odobrena studija u kojoj je uvođenje stranih gena ostvareno na ljudima objavljena je 1990. Smisao ove studije bilo je praćenje limfocita označenih stranim genom markerom u infiltraciji tumorskog procesa. Limfocitima je rekombinantnom tehnikom uveden bakterijski gen za rezistenciju na neomicin. Cilj je bio pojasniti duljinu preživljavanja, kretanje limfocita te ima li korelacije između infiltracije limfocita i regresije tumorskog procesa (18). Nakon uspješne inicijalne studije, provedena je još jedna u kojoj su tumori infiltrirani limfocitima koji su genetski modificirani za ekspresiju TNF-a (engl. *tumor necrosis factor*) što se također pokazalo kao terapijski uspjeh, dovelo do lokalne regresije neoplazija i dokazalo koncept uvođenja gena u ljudske stanice u kliničkoj primjeni (19).

Sljedeća važna studija u povijesti primjene genske terapije provodi primjenu terapijskog gena kao liječenja za monogensku bolest, tešku kombiniranu imunodeficienciju koja proizlazi iz manjka adenzin deaminaze (engl. adenosine deaminase severe combined immunodeficiency - ADA-SCID) (20). Dvije djevojčice prolaze terapiju vlastitim limfocitima koji su *in vitro* modificirani da izraze gen za funkcionalnu adenzin deaminazu. Prva pacijentica, Ashanti DeSilva, imala je poboljšanje u nalazima i kasnije trajno smanjenu potrebu za nadoknadom enzima, dok je druga pokazala slabiji odgovor na liječenje. Ipak, rezultati su prihvaćeni s optimizmom i započeto je razdoblje sve brojnijih kliničkih istraživanja.

Nekoliko godina kasnije veliki zastoj i kritičnost prema polju genske terapije uzrokovala je smrt osamnaestogodišnjeg Jesseja Gelsingera, pacijenta u studiji u kojoj je liječena parcijalna deficijencija ornitin transkarbamilaze. Adenoviralni vektor kojim je u studiji pokušana zamjena defektnog gena za ornitin dekarboksilazu, izazvao je kod Gelsingera tešku imunoreakciju koja je uzrokovala višeorgansko zatajenje i smrt nakon nekoliko dana (21). Ovaj nesretan slučaj izazvao je veliku pažnju medija i nove revizije metoda kontrole kliničkih studija.



#### 4.5. Problem insercijske mutageneze

Značajan korak naprijed događa se pak godinu kasnije, kad Cavazzana-Calvo i kolege objavljuju kako su genskom terapijom došli do izlječenja X-vezane teške kombinirane imunodeficijencije (engl. X-linked severe combined immunodeficiency – X-SCID) u dvoje pacijenata (22). No nastavljanjem ove terapije u ukupno jedanaest pacijenata, u troje su se pojavile leukemije. Ovo je bio prvi slučaj u kojem su se potvrdile bojazni od komplikacija genske terapije zbog upotrebe vektora koji se integriraju u jezgrinu DNA domaćina. Problem se sastoji u tome da se vektorska DNA nasumično ugrađuje, te tako može završiti integrirana u neku regiju genoma koja kodira za domaćinov protein. U najgorem slučaju, insercija može poremetiti gene regulatore staničnog ciklusa – onkogene i gene supresore tumora te tako izazvati neoplastičnu pretvorbu stanica. Pojam je nazvan insercijska mutageneza.

Ugradnja terapijskog gena u jezgrinu DNA inače je poželjna jer bi osigurala prisutnost ugrađenog gena u obje stanice kćeri nakon stanične diobe i tako dugotrajnu stabilnu ekspresiju terapijskog produkta u diobeno aktivnim stanicama. Ovo bi bila i velika prednost genske terapije jer bi teoretski bilo moguće samo jednom primjenom osigurati doživotni terapijski učinak. Slijedom ovih atraktivnih ciljeva vektori koji se integriraju u genom nisu nikad napušteni, već se razvijaju različiti pristupi kojima se opasnost insercijske mutageneze pokušava razriješiti. Jedan pristup je modifikacija viralnih vektora kako bi se spriječile interakcije virusnih promotora i pojačivača s genima domaćina. Tu se koristi tzv. samoinaktivirajući dizajn vektora (SIN) gdje se uklanjaju promotori i pojačivači u LTR regiji viralnog genetskog koda, te se mogu vršiti zamjene unutarnjih vektorskih promotora koji osiguravaju transkripciju terapijskog gena koji vektor nosi. Drugi pristup se koncentrira na ciljani odabir i modifikaciju neke sekvence u genomu. Posljednjih godina otkriveno je nekoliko obitelji proteina koji imaju sposobnost ciljanog prepoznavanja i modifikacija određene DNA sekvence, što drastično olakšava dostupnost genetskog materijala različitim preciznim preinakama.

## 4.6 Ciljana modifikacija genoma

Glavna sredstva nove metode ciljane modifikacije genoma uključuju kimerne nukleaze ZFN (engl. *zinc finger nuclease*), TALEN (engl. *transcription activator-like effector nuclease*) i sustav CRISPR/Cas9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*).

Najvažnije svojstvo ovih sustava je posjedovanje domene koja specifično nalazi i veže određenu sekvencu DNA. Kod navedenih je domena za prepoznavanje vezana na enzim koji izaziva prekid DNA molekule, nukleazu – „molekularne škare“. Prekidom oba lanca DNA potiče se aktivacija nekog od mehanizama popravka DNA. Dva najčešća mehanizma su nehomologno sparivanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) i homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination*, HR). Kod NHEJ puta jezgri enzimi popravka će pokušati direktno zalijepiti odvojene krajeve DNA natrag u jednu molekulu, no ovaj put je neprecizan te često dovodi do pogrešaka, delecija ili insercija. Pogreške mogu pomaknuti okvir čitanja (engl. *frameshift*) DNA sekvence kod translacije u proteine i tako dovesti do gubitka funkcije rezultirajućeg proteina. Ovaj način inaktivacije gena pomakom okvira čitanja, mogao bi se također iskoristiti u terapiji, primjerice u liječenju autosomno dominantnih monogenih bolesti za inaktivaciju štetnog gena u heterozigota. Drugi put popravka DNA, homologna rekombinacija, koristi neoštećenu sestrinsku kromatidu kao model za popravak oštećenja. No ovaj mehanizam može se iskoristiti i za precizno umetanje stranog gena, ako se novi gen konstruira kao DNA sekvencija koja će imati krajeve koji se poklapaju sa prerezanim krajevima nuklearne DNA. Enzimi za popravak je tada prepoznaju i integriraju u prekinuto mjesto. Ovaj je princip iskorišten u genskoj terapiji, jer su potrebne komponente (ZFN, TALEN ili CRISPR/cas9 i DNA sekvencija koja se integrira) dovoljno male da se dostave viralnim vektorima. Problem ovog principa je da su dva puta popravka prekida dvolančane DNA u jezgri međusobno u konkurenciji, te da se NHEJ pojavljuje većom učestalošću. Kako bi se omogućila precizna ciljana integracija novih gena nužno je pomaknuti ravnotežu prema putu homologne rekombinacije, no mehanizmi kojima se put odabire u stanici nisu još dovoljno istraženi, pa nema

jasnog rješenja (23). Jedan mogući izlaz su inhibitori koji blokiraju neke od enzima NHEJ puta, no problematična je toksičnost za stanice koju bi uzrokovalo blokiranje najčešćeg mehanizma popravka jezgrine DNA (24).

Do 2016. objavljeno je 12 kliničkih studija koje su koristile tehnologije ciljane modifikacije genoma. Većina studija je koristila *ex vivo* pristup, izdvajajući T-limfocite ili hematopoetske stanice, kako bi ih se nakon primjene genske terapije novim sustavima ciljane modifikacije moglo sekvencionirati i procijeniti učinak te tako umanjiti rizik od onkogeneze, pogrešaka u modifikaciji ili pogrešnog mjesta djelovanja (engl. *off target*) sustava za modifikaciju. Najveći dio studija koristio je *zink fingers* metodu, a najvjerojatniji razlog je kašnjenje kliničke primjene za najnovijim genetičkom tehnologijom, pa će CRISPR/cas9 i noviji sustavi zbog jednostavnosti sigurno preuzeti veću ulogu u budućnosti (25).

## **5. Osnove genske terapije**

Američko društvo za gensku i staničnu terapiju (engl. *American society for gene and cell therapy*) definira gensku terapiju kao pristup liječenju bolesti putem modifikacije ekspresije gena čovjeka ili korekcije abnormalnih gena. Ideja primjene gena kao lijeka uzdigla se u šezdesetim i sedamdesetim godinama prošlog stoljeća (26) i nakon dužeg razvoja koncepta i tehnika, u prošlom desetljeću postiže zamah u broju kliničkih studija, te se pojavljuju i prvi odobreni lijekovi.

### **5.1. Genska terapija somatskih i germinativnih stanica**

Postoji više načina podjele genske terapije, a kao osnovnu možemo navesti podjelu prema mjestu djelovanja. Tako razlikujemo gensku terapiju usmjerenu prema somatskim ili prema germinativnim stanicama. Razlika je u tome što se u somatskoj genskoj terapiji modificiraju somatske stanice i tako genska ekspresija već postojećeg organizma, dok bi kod genske modifikacije germinativnih stanica promjene bile izražene na potomstvu. Dosadašnji znanstveni rad odnosi se na gensku terapiju provedenu na somatskim stanicama, te se modifikacija spolnih stanica u tijeku liječenja genskim lijekom vidi kao teška nuspojava koju je nužno izbjeći. Upotreba genske terapije za modifikaciju germinativnih stanica se smatra etički spornom i već je zakonom zabranjena u mnogim državama. Etičke kontroverze ovog područja odnose se na pitanje nesavršenosti tehnike, te tako izlaganja budućeg organizma nepotrebnom riziku. Postoji i zabrinutost zbog dosega genetskog inženjeringa u budućnosti, čak i ukoliko se krene od početnih, sasvim opravdanih ciljeva liječenja genskih nedostataka poput monogenetskih bolesti. Razvoj tehnologija na takvim terapijskim ciljevima mogao bi dovesti do distopijskog "humanog genetskog inženjeringa" tj. odabira i drugih poželjnih genetskih rekombinacija, osim onih vezanih uz bolest. Ovakav razvoj bi mogao donijeti nove etičke i socijalne probleme, poput promicanja društvene nejednakosti, te problema osobne volje i nemogućnosti djeteta da odlučuje o genetskim promjenama

kojima će biti podvrgnuto prije rođenja, te također i smanjene evolucijske bioraznolikosti ljudske vrste što bi moglo imati teško predvidive posljedice.

Do danas jedini primjer u kojem su izvršene terapijske modifikacije na razini spolnih stanica, u sklopu kojih se može reći da je izvršena genetska modifikacija, je u javnosti poznat kao “bebe s tri roditelja” (engl. *three parent babies*). U ovom slučaju, mitohondriji jajnih stanica majke nosili su poremećaj mitohondrijske DNA koji dovodi do Leighovog sindroma, teške bolesti koja obično dovodi do smrti djeteta unutar nekoliko godina od rođenja. Jezgra majčine jajne stanice je premještena u donorsku enukleiranu jajnu stanicu sa zdravim mitohondrijima te je dalje proveden postupak oplodnje *in vitro*. U 2016. godini rođeno je zdravo dijete, sa ispravnom donorskom mitohondrijskom DNA (27). Medijska pažnja koju je izazvao ovaj slučaj ukazuje na oprez i zabrinutost javnosti usmjerenu prema svim tehnikama u koje bi mogao biti uključen prijenos gena u germinativnim stanicama.

Modifikacija somatskih stanica je dakle glavno polje interesa genske terapije. Svi učinci ove terapije ostaju ograničeni na pojedinca. Razvojem tehnologije već se na razini kliničkih studija pokušava tretirati širok spektar bolesti. Prvi pokušaji genske terapije bili su usredotočeni na jasan cilj ubacivanja funkcionalne verzije gena kod pacijenata koji pate od monogenских bolesti. Danas se genska terapija istražuje i u liječenju raka, infektivnih bolesti, zatajenja srca, modifikaciji stanica imunološkog sustava i drugih, vrlo raznovrsnih stanja.

## **5.2. Pristup *in vivo* i *ex vivo***

Izvedbu genske modifikacije stanica u terapijske svrhe možemo ostvariti generalno na dva načina. Prvi bi bio pristup *in vivo*, u kojem se sredstvo prijenosa genetske informacije koju želimo unijeti u neke tjelesne stanice, najčešće virusni vektor, primjenjuje na pacijentu. Virus tada ulazi u one stanice za koje ima karakteristični tropizam, te prosljeđuje nukleinsku kiselinu od koje očekujemo terapijski učinak. Drugi pristup naziva se *ex vivo* (ili *in vitro*) u kojem se izoliraju stanice pacijenta i umnožavaju u kulturi. Takvim stanicama se tada

virusnim vektorom ili neviralnim metodama uvodi terapijski gen. Kod ove metode može se egzaktnije pratiti uspješnost zamjene gena i mjesto insercije te se takve promijenjene stanice vraćaju pacijentu da bi proizvodile produkt genskog transfera.

### 5.3. Vrsta prenesenog genetskog materijala

Genskom terapijom u širem smislu možemo smatrati i terapijsku primjenu različitih oblika genetskog materijala. Osim nukleinskih kiselina koje kodiraju nastajanje proteina, spektar ovih molekula u novije vrijeme se povećao otkrićima novih formi s raznim funkcijama u stanici. Zasad je moguće nabrojiti šest skupina nukleinskih kiselina čija funkcija je poznata, a koje bi mogle biti iskorištene u terapiji (28),(29). To su DNA oligonukleotidi, male katalitičke DNA i RNA, male regulatorne RNA (siRNA i microRNA), *antisense* RNA, decoy RNA te DNA i RNA aptameri.

DNA oligonukleotidi su kratke jednolančane DNA molekule. Mogu djelovati u engl. *antisense* ili engl. *antigene* smislu. Kod *antisense* djelovanja oligonukleotidi nakon ulaska u jezgru tvore komplekse sa mRNA ili pre-mRNA i time inhibiraju sintezu određenih proteina. U *antigene* djelovanju oligonukleotidi u jezgri tvore tripleks sa komplementarnom DNA sekvencom dvolančane nuklearne DNA, što inhibira transkripciju te sekvence.

Male katalitičke DNA i RNA su DNA i RNA koje mogu na temelju svoje trodimenzionalne strukture imati i katalitičku aktivnost. RNA s enzimskim djelovanjem nazivaju se još i ribozimi. U stanici mogu djelovati tako da hidroliziraju određenu specifičnu RNA i tako ciljano suprimiraju funkciju nekih gena.

Male regulatorne RNA (siRNA i microRNA) su RNA molekule koje sudjeluju u epigenetičkoj regulaciji genske ekspresije. MicroRNA ili miRNA su kratke jednolančane RNA molekule od 21 do 25 nukleotida. Vežu se na odgovarajuće mRNA i utišavaju ih cijepanjem, skraćivanjem poli-A repova i inhibicijom njihove

translacije. SiRNA su kratke dvolančane RNA, dužine 21 do 23 nukleotida, vežu se većom specifičnošću na ciljnu mRNA i inhibiraju ih cijepanjem.

Antisense RNA su RNA koje vežu komplementarne mRNA stvarajući tako dvolančanu molekulu što onemogućava translaciju ciljne mRNA.

*Decoy* RNA su RNA molekule dizajnirane da se nadmeću za vezna mjesta na proteinima aktivatorima translacije ili mRNA stabilizirajućim elementima i tako ometaju njihovu aktivnost.

Aptameri su DNA i RNA molekule koje zahvaljujući svojoj trodimenzionalnoj strukturi imaju specifične izravne interakcije s ciljnim proteinima, pa mogu služiti za inhibiciju neke njihove funkcije.

## **6. Metode genskog transfera**

Pod metodama prijenosa nukleinskih kiselina podrazumijevaju se načini na koje se strani gen unosi u citoplazmu ili jezgru eukariotske stanice. Postoje generalno dvije metode kojima se to postiže. Prva je viralna metoda, u kojoj se koriste vektori pripremljeni od virusa kojima je genetskim inženjeringom uklonjeno što više viralnih gena kako bi se neutralizirala patogenost, a zadržala sposobnost prijenosa nukleinskih kiselina. Viralna metoda ima učinkovitiju stopu prijenosa gena pa se češće i koristi. Kliničke studije o genskoj terapiji do 2012. godine u tri četvrtine slučajeva koristile su viralne vektore (30). Druga metoda prijenosa DNA je neviralna. Može imati fizikalni i kemijski pristup. U prvom se fizikalnim silama perforira stanična membrana da se ostvari unos nukleinskih kiselina u stanicu. Kemijski pristup razvija različite spojeve i čestice koje štite nukleinske kiseline od razgradnje i omogućavaju njihov ulazak u stanice.

Unutarnji milje somatskih stanica eukariota aktivno se štiti od ulaska stranih nukleinskih kiselina. Evolucijski se razvilo više fizioloških barijera koje priječe njihov ulazak i djelovanje. Čestice s nukleinskim kiselinama kojima želimo obavljati gensku terapiju moraju tako ispuniti mnoge uvjete za uspješan genski transfer. Obje metode, viralna i neviralna imaju svojih različitih prednosti, pa se nastavlja njihov paralelan razvoj.

### **6.1. Neviralni genski transfer**

Neviralne metode se oslanjaju na kemijska i fizikalna sredstva unosa genetskog materijala. Imaju nekoliko relativnih prednosti pred virusima. Materijali koji se koriste u ovim metodama općenito su manje imunogeni, pa imaju veći potencijal za ponavljaju primjenu u istog pacijenta, naspram virusa, koji često kod readministracija imaju smanjenu učinkovitost transfera zbog aktivacije imunoloških obrambenih mehanizama. Dizajnom molekula koje čine omotač čestica koje se koriste u kemijskim metodama može se postići zadovoljavajuća specifičnost prema određenim stanicama. Fizikalne metode mogu se pak



koristiti usmjerenom i lokalizirano. Još jedna praktična prednost je jednostavnija mogućnost razmjernog povećanja proizvodnje nego kod viralnih vektora.

Negativna strana ovih metoda je još uvijek manja učinkovitost transfera gena nego kod virusa, iako se razvojem različitih kemijskih spojeva i tehnika ovaj zaostatak pokušava nadoknaditi. Drugi problem je izostanak integracije DNA koju ovi sustavi nose u kromosomsku DNA, što je s jedne strane pozitivno jer izbjegava opasnost od insercijske mutageneze, no takvim neugrađenim episomalnim DNA funkcija se s vremenom utišava, pa terapijski učinak može biti vremenski ograničen.

### **6.1.1. Fizikalne metode**

#### **6.1.1.1. Mikroigle i mlazna injekcija**

Devedesetih je otkriveno da injekcija slobodne DNA u ciljno tkivo, čak i bez drugih dodataka koji bi je zaštitili ili poboljšali unos u stanice, ostvaruje nisku razinu genske ekspresije (31). Ekspresija DNA u stanicama bila je većinom lokalizirana na područje kojim je prošla injekcija, pa se pretpostavilo da su fizička oštećenja stanica omogućila unos DNA. Tehnika je dalje poboljšana povećanjem broja iglica za injiciranje i smanjenjem njihovog promjera. Danas se u aplikatoru za ovu metodu nalazi mreža igala, visine od 25–2000  $\mu\text{m}$ , pričvršćenih na podlogu (32). Promjeri igala su u rasponu od nekoliko mikrometara, a postoji više tipova mikroigala: solidne mikroigle nakon čije primjene se aktivna tvar nanosi u otopini ili same igle mogu biti prekrivene terapijskom tvari (33), šuplje mikroigle kod kojih tvar izlazi kroz kanal na vrhu igle, mikroigle koje se otapaju u tkivu (34) te mikroigle od hidrogela (35). Metoda je posebno pogodna za primjenu lijekova kroz kožu i predstavlja alternativni put uobičajenoj intravenskoj primjeni nositelja DNA. Transdermalna primjena ima niz prednosti: tvari unesene ovim putem izbjegavaju učinak prvog prolaska kroz jetru, može se koristiti za lokaliziranu i sistemsku terapiju, ima površinski veće područje preko kojeg se može dostaviti lijek, te mogućnost samoadministracije budućih lijekova i tako bolju suradljivost pacijenata.

Prednost korištenja mikroigala je i ekonomski prihvatljiva moguća proizvodnja u većem opsegu.

Mikroigle su dosada korištene za primjenu različitih lijekova i molekula, od oligonukleotida, DNA i RNA, peptida i proteina, do inaktiviranih virusa. Nukleinske kiseline su ovako uspješno primijenjene u genskoj terapiji, ali i u imunizaciji protiv nekih bolesti, npr. influenze (36) i hepatitisa B (37). Kliničke studije o genskoj terapiji korištenjem mikroigala provode se za rak dojke i prostate, ozljedu perifernih živaca i bolest perifernih arterija (38). Ova metoda pokazuje i obećavajuće rezultate kod liječenja više genetskih, hiperproliferativnih i neoplastičnih bolesti kože (39).

Mlazna injekcija je metoda u kojoj se otopina DNA dostavlja u tkivo u tankom mlazu plina pod pritiskom. Postupak stvara pore u staničnoj membrani što omogućuje transfer genetskog materijala u stanice. Metoda je prvi put opisana još 1947. godine i do danas je dokazano učinkovita u prijenosu različitih tvari poput inzulina, anestetika, heparina te u primjeni cjepiva, uključujući i DNA cjepiva (40).

U genskoj terapiji je dosada korištena za ubrzanje cijeljenja rana (41), u maloj studiji o intratumorskom genskom transferu u pacijenata s melanomom i rakom dojke (42) pokazala se sigurna i učinkovita, a trenutno se provode i studije u liječenju raka jajnika i dojke te limfoma istom metodom (38).

#### **6.1.1.2. Genski pištolj**

Genski pištolj je metoda genetskog transfera metalnim česticama koje se ispaljuju u tkivo. Čestice mogu biti od zlata, tungstena ili srebra i prekrivaju se otopinom DNA. Ubrzavaju se i dostavljaju u tkiva pištoljem koji može koristiti plin pod tlakom, barut ili ubrzanje čestica u visokonaponskom električnom polju (43). Ova metoda još se naziva balistički (negdje i biolistički) DNA transfer (engl. *ballistic DNA transfer*) ili bombardiranje česticama prekrivenim DNA (engl. *DNA particle bombardment*), te je prvotno razvijena za rad na biljkama

(44). Genskim pištoljem se lokalizirano može ostvariti genski transfer *in vitro* i *in vivo* u različita tkiva, poput kože, sluznice, tumorskog tkiva ili kirurški pripremljenih organa. Postoji i kombinacija mikroigala i genskog pištolja, koja smanjuje pritisak potreban za dostavu čestica u tkivo i tako umanjuje ozljedu tkiva na mjestu upotrebe (43).

Trenutno se koristi u istraživanju genske terapije uglavnom za dostavu DNA cjepiva u infektivnim bolestima, npr. malariji (45) i kroničnim bolestima poput Alzheimerove bolesti (46), te na životinjskim modelima za istraživanje tumorskih bolesti poput melanoma (47).

### **6.1.1.3. Elektroporacija**

Elektroporacija je metoda u kojoj se električnim poljem povećava propusnost stanične membrane kako bi se omogućio unos nukleinskih kiselina. Pretpostavljalo se da je mehanizam povećane propusnosti stvaranje hidrofiličnih pora u membrani kroz koje molekule prolaze, ali neka istraživanja ukazuju na kompleksniji mehanizam koji nije još do kraja razjašnjen (48,49).

Prva upotreba elektroporacije za genski transfer *in vitro* izvedena je 1982. godine (50), a *in vivo* 1991. (51). Prilagođavanjem parametara električnih impulsa koji se koriste, razvijeni su protokoli za elektroporaciju mnogih tipova stanica, početno bakterijskih, biljnih i životinjskih (52), a kasnije i tkiva čovjeka. Pomak prema *in vivo* elektroporaciji podržalo je i istraživanje (53) u kojem je u portalnu venu štakora injicirana plazmidna DNA te je zatim lokalno na jedan režanj jetre primijenjena elektroporacija, ostvarujući genski transfer samo u tom režnju. Tako je pokazano da sistemska injekcija nukleinske kiseline može uz pomoć elektroporacije ostvariti lokalnu gensku terapiju.

Prednost ove metode je jednostavnost i prilagodljivost različitim staničnim linijama, sigurnost i dobra reproducibilnost rezultata (54). Nedostatak je još uvijek slabija učinkovitost nego kod viralnih vektora. Jedno od ograničenja bio je nedostatak mehanizma kojim bi nukleinske kiseline nakon ulaska u citoplazmu

stanice ušle i u jezgru, osim kod diobe stanice gdje se jezgrina ovojnica privremeno razgrađuje. U novije vrijeme se i prepreka jezgrine membrane pokušava riješiti varijantom elektroporacije koja je nazvana nukleofekcija (55). Nukleofekcija kombinira električne impulse kao u elektroporaciji sa različitim otopinama reagensa specifičnih za pojedini tip stanica te tako, pretpostavlja se sličnim mehanizmom kao u elektroporaciji, ostvaruje unos nukleinskih kiselina u jezgru. Time je otvoren put neviralnim metodama za genetski transfer mitotički neaktivnih stanica koje je prije bilo problematično modificirati te je omogućen učinkovitiji genski transfer nego kod same elektroporacije (56).

Drugi nedostaci in vivo upotrebe elektroporacije su mali efektivni raspon djelovanja od samo oko jednog centimetra između elektroda, što otežava primjenu na veća tkiva, te potreba za kirurškom intervencijom kojom se elektrode smještaju u organ. Također treba detaljnije istražiti sigurnost s obzirom na stabilnost genomske DNA u stanicama nakon elektroporacije (57).

Prema izvještaju iz 2017., od 2010. do 2016. već postoji nekoliko kliničkih studija iz područja genske terapije koje su dosegle drugu fazu kliničkog ispitivanja i koriste elektroporaciju (38). Među njima su studija o liječenju melanoma intratumorskom injekcijom gena za IL-12 koju slijedi elektroporacija, genska terapija planocelularnih tumora glave i vrata i T-staničnih limfoma kože. Značajan udio u primjeni ove metode zauzimaju i DNA cjepiva. Druga faza ispitivanja trenutno se provodi za DNA cjepiva koja aktiviraju imunološki sustav protiv virusa HIV-a i HPV tipova 16 i 18 kod cervikalne intraepitelne neoplazije.

#### **6.1.1.4 Sonoporacija**

Sonoporacija je termin koji se koristi za fenomen u kojem ultrazvuk prolazno mijenja strukturu stanične membrane i tako omogućava povećan unos molekula male i velike molekularne mase (58). Kavitacijski efekt ultrazvuka (stvaranje mjehurića plina u tekućini izloženoj promjenama tlaka) u membrani stvara pore kroz koje molekule slobodno difundiraju (59). Učinkovitost prijenosa nukleinskih kiselina preko membrane može se tako povećati njihovom većom

koncentracijom oko stanica, primjenom manje molekule, te prilagodbom parametara duljine trajanja, frekvencije i intenziteta ultrazvuka (54). Dodatno povećanje prijenosa može se postići povećanjem fluidnosti membrane lokalnim anestheticima ili promjenom temperature (60) te korištenjem kontrastnih sredstava za ultrazvuk. Ona se sastoje od mikromjehurića ispunjenih plinom, okruženih stabilizirajućom ovojnicom od proteina, lipida, surfaktanta ili biokompatibilnih polimera, koji se šire i sužavaju pod utjecajem ultrazvuka. Kod većih intenziteta ultrazvuka, mjehurići osciliraju većom amplitudom te pucaju. Ovo dovodi do povećane permeabilnosti okolnih membrana te tako omogućuje bolji stanični unos bioaktivnih supstanci koje su ili dostavljene u tkivo zajedno s mjehurićima ili uključene u njihov sastav (61). Ova modifikacija sonoporacije naziva se ultrazvučna ciljana destrukcija mikromjehurića (eng. *Ultrasound targeted microbubble destruction – UTMD*). Također je otkriveno da kombiniranje metoda sonoporacije i elektroporacije daje bolji učinak (62).

Prednosti sonoporacije u genskoj terapiji su sigurnost, neinvazivnost i moguća transfekcija unutarnjih organa bez potrebe za kirurškim postupcima. Najveći problem je još uvijek niska učinkovitost prijenosa gena (57).

U studijama sonoporacija je do sada ispitivana in vitro i in vivo na životinjskim modelima. Izvedivost je dokazana na mnogim tkivima prikladnim za gensku terapiju, poput skeletnog mišića, jetre, bubrega, gušterače, kardiovaskularnog sustava i središnjeg živčanog sustava. Pokazuje obećavajuće rezultate u genskoj terapiji bolesti SŽS-a (63), mnogih tumorskih bolesti (64) i primjeni DNA cjepiva (65).

#### **6.1.1.5. Hidrodinamski genski transfer**

Godine 1997. otkrivena je metoda u kojoj je genski transfer u stanicama jetre postignut in vivo brzom injekcijom otopine DNA u aferentne žile jetre miša, štakora i psa (66). Kasnije se pokazalo da se na ovaj način mogu transfecirati i drugi organi, ali u jetri se postiže najveća učinkovitost (67). Temelj ovog postupka je davanje velikog volumena otopine DNA (8-12% tjelesne težine

miševa) u kratkom vremenu, što prolazno poveća tlak u žilama i propusnost endotela, a na membranama hepatocita uzrokuje stvaranje pora (68).

Zbog velikih volumena tekućine koji bi bili potrebni kod translacije ovog postupka na ljude prije se smatralo da će metoda ostati limitirana na istraživanje genskog transfera u malih životinja. Nove modifikacije koje su omogućile sigurnu i učinkovitu primjenu u većih životinja su izvođenje balon kateterom kojim se izolira dio vaskularnog sustava i tako spriječi hipervolemija, te preciznije izvođenje elektronički kontroliranim injektorom (engl. *computer-controlled injection device*) (69), tako da u budućnosti ova metoda može postati značajna i u genskoj terapiji čovjeka. Do danas je provedena jedna studija na ljudima, u primjeni plazmidne DNA s genom za trombopoetin u trombocitopeničnih pacijenata s cirozom jetre. Postupak je proveden bez nuspojava, ali nisu postignuti klinički značajni rezultati u povećanju broja trombocita (70).

## 6.1.2. Kemijske metode

### 6.1.2.1. Kationski lipidi

Genetski transfer pomoću pozitivno nabijenih lipidnih molekula, još nazvan lipofekcija, prvi put je osmišljen u osamdesetima (71). Danas je među najviše istraženim i najčešće korištenim neviralnim tehnikama. Prema analizi korištenja metoda genetskog transfera do 2012. godine (30) udio lipofekcije u kliničkim istraživanjima genske terapije je 5.9%.

Kationski lipidi su pozitivno nabijene molekule koje s negativno nabijenim nukleinskim kiselinama elektrostatskim interakcijama tvore relativno stabilne komplekse. Brojne molekule su testirane za ovu primjenu, a zajednička im je amfipatska struktura koja se sastoji od pozitivno nabijene hidrofilnih glava za interakciju s DNA i hidrofobnih repova koji izvana oblažu česticu i štite DNA od razgradnje nukleazama. Hidrofilne glave mogu imati jednu ili više pozitivno nabijenih skupina, poput primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina, kvartarnih amonijevih soli te guanidino, imidazolnih i piridinijevih skupina. Hidrofobni rep mogu činiti zasićeni ili nezasićeni alifatski ugljikovodici ili steroidne molekule. Veza između ova dva dijela može biti eterska, esterska, amidna ili karbamatna te njezina priroda utječe na biorazgradivost molekule.

Čestice koje nastaju kombinacijom kationskih lipida s DNA nazivaju se lipopleksi. Njihova formacija može se postići slobodnim miješanjem lipida i DNA, no lipopleksi koji tako nastaju su heterogeni po veličini i morfologiji, što utječe na njihovu sposobnost transfekcije. Razvijaju se tehnike kojima se ovo pokušava izbjeći, npr. dodavanjem DNA na suhi lipidni sloj ili sporom dijalizom, u kojoj se DNA kondenzira u miješane micle od kationskih lipida i neionskog deterdženta, koji se onda uklanja u dijalizi (72).

Dodatna komponenta u lipopleksima su kolipidi ili tzv. pomoćni lipidi (engl. *helper lipids*). Naime, za učinkovitu transfekciju nužna je stabilnost lipopleksa u serumu, uspješna interakcija sa staničnom membranom za unos u stanicu, te mehanizam za bijeg iz endosoma i oslobađanje DNA u citoplazmu (73). Kolipidi

poboljšavaju ova svojstva i tako sposobnost transfekcije. Najčešće korišteni kolipidi su kolesterol i dioleil-fosfatidiletanolamin (engl. *dioleoylphosphatidylethanolamine – DOPE*) (54).

Neki multivalentni kationski lipidi su i sami dovoljno učinkoviti, no za druge je miješanje s kolipidima nužno. Mehanizmi kojima kolipidi pomažu u transfekciji nisu potpuno razjašnjeni. Smatra se da DOPE zbog svojih karakteristika lipidne agregacije pomaže membransku fluidnost i fuziju membrana i time olakšava bijeg lipopleksa iz endosoma u stanici. No kod primjene in vivo komponente seruma inaktiviraju lipoplekse koji sadrže DOPE (74), dok kolesterol osigurava bolju stabilnost lipopleksa u serumu i tako bolje rezultate (75).

Prepreka korištenju lipopleksa u istraživanjima in vivo je njihovo kratko zadržavanje u cirkulaciji, što otežava dostavu u ciljne organe. Za preuzimanje lipopleksa iz krvotoka odgovorne su uglavnom Kupfferove stanice u jetri i makrofazi u slezeni (76).

Pronađeno je da dodavanje hidrofilnog polimera polietilenglikola (PEG) u njihov sastav produljuje vrijeme cirkulacije. Površinski vezani polietilenglikol tvori prepreku koja sprečava interakciju lipopleksa s molekularnim i staničnim komponentama seruma i sprječava njihovo prepoznavanje od strane stanica retikuloendotelne sustava. S druge strane, što je veći udio PEG-a u sastavu, manja je sposobnost transfekcije jer ometa i interakciju sa staničnom membranom ciljnih stanica. Razvija se više strategija kojima bi se unos u stanice poboljšao. Jedna mogućnost je konjugacija stanično specifičnih liganda na distalne krajeve PEG-a. Također su dizajnirani lipopleksi s PEG-lipidnim konjugatima s kraćim alkilnim lancima koji u cirkulaciji s vremenom otpuštaju PEG (77). Rješenje pak za otpuštanje PEG-a nakon što je čestica već u endosomu je pH-osjetljivo povezivanje PEG zaštite na česticu, tako da se u kiselom pH endosoma PEG odvaja od lipopleksa (78).

Izazivanje akutnog upalnog odgovora bio je još jedannedostatak lipofekcije. Prema radu iz 2000. , prisutnost nemetiliranih CpG sekvenca u DNA koja je bila prenesena u čestici vjerojatno je izazivala najveći udio upalnog odgovora i obećavajući rezultati su postignuti ciljanim uklanjanjem ovih sekvenci (79).



Lipofekcija je do danas istraživana u mnogim smjerovima kliničke primjene. Koncept je dokazan na brojnim staničnim tipovima in vitro te također i plućnom tkivu, mišićima, moždanom tkivu, koži i različitim tumorima (38). Dugo se predviđa kao dobar izbor u liječenju tumora, pogotovo zbog značajke lipopleksa da se nakupljaju na mjestima gdje je povećana propusnost krvožilne stijenke. Danas se terapija tumora nadograđuje i preciznijim ciljanjem ligandima na površini lipopleksa. Primjer je ciljanje tumorskih stanica koje imaju jaku ekspresiju folatnih receptora lipopleksima kojima je folat elektrostatski vezan na ovojnici, omogućujući vrlo efektivnu transfekciju i dostavu "suicide genes" u tumore (80). Strategija se pokazala uspješnom i u kliničkoj studiji na pacijentima s različitim solidnim tumorima koji su pokazivali ekspresiju transferinskog receptora. Tumorsko tkivo je ciljano lipopleksima koji su nosili gen supresor tumora p53 i na površini imali ugrađeno antitijelo na transferinski receptor te se ovaj put genske terapije pokazao siguran i učinkovit (81).

Još jedan smjer primjene lipofekcije je u lokalnoj genskoj terapiji dostavom DNA ili siRNA, s napretkom postignutim u lokalnom liječenju bolesti retine (82) i dostavom u respiratorni trakt za liječenje cistične fibroze (83).

Značajna je i uloga lipopleksa u dostavi DNA cjepiva. Trenutno se provode klinička istraživanja ovakvih cjepiva za influenzu, dengue, genitalni herpes i HIV.

Zaključno, lipofekcija je metoda koja izbjegava nedostatke viralnih vektora poput insercijske mutageneze i težih imunoloških reakcija. Prostor za daljnje usavršavanje je učinkovitost transfekcije i uklapanje mehanizma ugradnje DNA u genom kako bi se postigla dugotrajna genska ekspresija i terapijski učinak kod stanica koje se brže dijele. Lipopleksi su i dalje aktualna metoda u razvoju ovih ciljeva genske terapije.

### 6.1.2.2. Kationski polimeri

Druga skupina DNA nosača koja djeluje sličnim mehanizmom kao kationski lipidi su kationski polimeri. To su pozitivno nabijene molekule raznovrsnih kemijskih struktura koje s nukleinskim kiselinama tvore čestice koje nazivamo polipleksi. Interakcije s DNA ovdje su isto elektrostatske, a polipleksi su obično i stabilniji od lipopleksa.

Najviše i najranije korišteni kationski polimeri su polietilenimin (PEI) i poli-L-lizin (PLL). Polietilenimin se smatra jednim od najučinkovitijih u transfekciji. Prvi put je upotrijebljen u genskom transferu 1995. godine (84). U strukturi ima mnogo neprotoniranih amino skupina pri fiziološkom pH. One su zaslužne za tzv. efekt protonske spužve u endosomu, gdje sprječavaju acidifikaciju endosoma upijajući protone koje preko membrane ubacuje protonska pumpa. Protone slijede kloridni ioni što uzrokuje porast osmotskog tlaka i konačno pucanje endosoma (85).

PEI se može sintetizirati u obliku linearnih i razgranatih polimera. Obje vrste pokazuju transfekcijsku aktivnost, no linearni PEI je manje toksičan i ostvaruje jaču gensku ekspresiju, vjerojatno zbog lakšeg disociranja u citoplazmi, a pokazalo se da u većoj mjeri i ulazi u jezgru. (86).

Negativna strana polipleksa baziranih na PEI-u je toksičnost kod in vivo primjene. Sistemska primjena izaziva proizvodnju citokina i nespecifični upalni odgovor, no manje nego kod lipopleksa. (87). Otkriveno je da je toksičnost povezana s masom ovog polimera, te da manje molekularne mase (5000-25000 Da) imaju veću transfekcijsku učinkovitost uz smanjenu toksičnost (88). Dodatno smanjenje toksičnosti se može postići konjugacijom sa drugim molekulama, npr. dekstranom ili PEG-om kao kod lipopleksa (54). Također je moguća konjugacija polipleksa s antitijelima, transferinom ili drugim ligandima u ciljanoj terapiji određenih tkiva ili tumora (89).

Poli-L-lizin (PLL) je još jedan duže vrijeme poznat sintetički kationski polimer. Istražuje se isto tako u ciljanoj terapiji tumora (90). Polipleksi s PLL-om dosegli su i razinu kliničkih studija u liječenju cistične fibroze (91).

Predmet istraživanja u novije vrijeme su i mnogi drugi polimeri, čija bi prednost pred ranijima bila poboljšana biorazgradivost i sigurnost. To su primjerice ugljikohidratni polimeri kao heparin i dekstran, chitosan, dendrimeri, kationski proteini i peptidi. Pomak ove tehnologije je i otkriće proteinskih transdukcijskih domena (PTD-a). To su kratke proteinske sekvence (manje od 20 aminokiselina), prvi put izolirane iz proteina *Drosophila melanogaster* (92) i HIV virusa (93). Do danas je otkriveno ili sintetizirano više vrsta ovih molekula, i svrstani su u literaturi pod širi pojam "cell penetrating peptides" (CPP). Njihova osobitost je svojstvo brzog i homogenog prelaska membrane u različitim tipova stanica, preko još nepotpuno razjašnjenih mehanizama (94). Istraživani su najviše kao sredstvo za dostavu siRNA, prvo elektrostatskim interakcijama s nukleinskim kiselinama, kasnije kovalentnim vezanjem (95). Moguće ih je i integrirati u lipoplekse (96) i poliplekse (97) za bolje rezultate u genskom transferu.

## 6.2. Viralni genski transfer

### 6.2.1. Adenoviralni vektori

Adenovirusi su prva skupina virusa prilagođenih za genski transfer. To su uglavnom slabo patogeni respiratorni virusi, no pokazuju tropizam prema velikom broju staničnih tipova (98). U čovjeka je identificirano pedesetak serotipova, a pojavljuju se i u životinja (npr. *simian* adenovirusi u majmuna). Virusi sadrže dvolančanu DNA, ne ugrađuju se u genom i nemaju lipidnu ovojnicu. Kao vektori razvijani su u tri generacije: u prvoj je izbrisan samo manji dio virusnih gena, ostavljajući prostor za terapijsku DNA do veličine od 8,3 Kb. Pokazalo se da su vrlo imunogeni, pa je razvijena druga generacija, u kojoj je obrisano još veći udio viralnog genoma, povećavajući njihov kapacitet na 14 Kb. Međutim, to nije riješilo problem imunogenosti, a zabilježena je i slabija genska ekspresija nego kod prve generacije. Konačno, razvijena je i najnovija treća generacija engl. "*gutless*" vektora, kojima je izbrisana većina genoma i imaju kapacitet do 37 Kb, ali su ovisni o pomoćnom virusu za replikaciju (28).

Najveći problem kod adenoviralnih vektora je imunosni odgovor kod sistemske primjene, koji može biti toliko jak da dovede do smrti (slučaj Jesseja Gelsingera) (21). Primjena adenovirusa zbog toga je usmjerena u više lokalizirane terapije, te u primjene gdje je imunogeničnost ovih virusa poželjna, kao u terapiji tumora (99) i razvoju cjepiva (100).

Problem već postojećih antitijela u krvi čovjeka na vrlo raširene adenoviruse (101) pokušava se riješiti primjenom adenovirusa majmuna, na koje ljudi nemaju već stvoren imunosni odgovor, u stvaranju hibridnih vektora. Ipak, imunosni odgovor na stanice zaražene adenoviralnim vektorom ograničava ekspresiju prenesenog produkta genske terapije na oko 2 tjedna te zasad nisu pronađena rješenja kojima bi se to znatnije produžilo (102).

Korištenje ovog tipa vektora u genskoj terapiji, prema izvještaju iz 2016. godine (103), je posljednjih godina ipak u padu naspram drugih viralnih vektora.

### 6.2.2. Gamaretroviralni i lentiviralni vektori

Gamaretrovirusi i lentivirusi su retrovirusi, sadrže RNA i ugrađuju se u nuklearnu DNA. Važna razlika između njih je sposobnost lentirusa da se ugrađuju u stanice koje se ne dijele, što je pogodno za mnoge ciljeve u genskoj terapiji. Gamaretrovirusima je pak za ulazak u jezgru i integraciju potrebna dioba stanica. Obje vrste vektora su podložne modifikaciji ovojnice čime im se može suziti ili proširiti spektar ciljnih stanica (104), (105).

Gamaretrovirusi su ranije upotrijebljeni u kliničkim istraživanjima genske terapije, što je dovelo do spoznaje o riziku insercijske mutageneze kod virusne integracije u genom. Vektor iz ove skupine, virus mišje leukemije (MLV) korišten je u studiji u liječenju X-vezane teške kombinirane imunodeficijencije, što je kod nekih pacijenata dovelo do pojave leukemije (22). Kasnije je otkriveno da se kod insercije u genom ovaj virus preferencijalno ugrađuje na mjestima aktivne transkripcije u genomu, na početnim dijelovima blizu transkripcijske jedinice, gdje je veća vjerojatnost da će poremetiti aktivne gene (106). Lentiviralni vektori pokazali su se sigurnijima, jer se također preferencijalno ugrađuju ali na 3' krajevima aktivnih mjesta transkripcije, te eksperimentalno imaju znatno manje slučajeva inducirane mutageneze (107). Ipak, ta se opasnost ne može isključiti, pa su razvijene različite strategije za poboljšanje sigurnosti. Jedan način je samoinaktivirajući (SIN) dizajn vektora. Vektorima se uklanjaju dijelovi LTR (engl. *long terminal sequence*) na kraju viralnog genoma, koja inače sadrži promotorske sekvence koje bi mogle aktivirati ekspresiju onkogeno. Drugi pristupi mogu potpuno izbjeći integraciju virusa u genom onesposobljavanjem virusne integraze (108), ili se današnjim novim tehnologijama zinc finger nukleaza (109) ili CRISPR-CAS9 sustava (110) već može ostvariti ciljana integracija na sigurna mjesta u genomu. Zahvaljujući ovim postignućima u unaprjeđenju sigurnosti, obje vrste vektora nastavljaju se razvijati u širokom spektru primjena u genskoj terapiji.

Najčešći lentiviralni vektor potječe od HIV1 virusa. Zbog rizičnosti svog divljeg viralnog modela od početka je bio pod pozornom kontrolom i brojne studije su potvrdile njegovu sigurnost i pouzdanost. Koristi se u istraživanjima liječenja

zloćudnih hematoloških bolesti, raznih neurodegenerativnih i nasljednih bolesti, te u proizvodnji cjepiva (111).

### **6.2.3. Adeno asocirani viralni vektori**

Adeno asocirani virusi (AAV) su skupina nepatogenih virusa, koji su u prirodi za svoju replikaciju ovisni o pomoćnim virusima. Ime su dobili po adenovirusima, prvim virusima za koje je otkriveno da im služe kao pomoćni virusi. Pojavljuju se u čovjeka u više serotipova te u brojnih drugih vrsta sisavaca. Nemaju lipidnu ovojnica i sadrže jednolančanu molekulu DNA. Imaju mali kapacitet za prijenos gena od svega 4,5 Kb. AAV mogu transducirati i stanice koje se dijele i stanice u mirovanju. Ovo i sposobnost prelaska krvno moždane barijere i prolaska kroz endotel krvnih žila čine ih posebno pogodnim vektorima za gensku terapiju diobeno slabo aktivnih stanica poput neurona i stanica skeletnog mišića. Imaju širok prirodni tropizam, koji se može mijenjati rekombinacijom epitopa viralne kapside ili dodavanjem liganda prema različitim namjenama (112).

Prije se smatralo da se ovi virusi u pravilu ne ugrađuju u nuklearnu DNA, nego borave u jezgri u obliku episoma. Ugradnja je opažena u maloj učestalosti i tada kod divljeg tipa virusa gotovo uvijek preferencijalno na isto mjesto na 19. kromosomu (113). U novijim istraživanjima pokazano je da se nasumična viralna integracija u genom ipak češće događa, te da bi mogla potaknuti karcinogenezu (114). Godine 2012., sekvencioniranjem nuklearne i mitohondrijske DNA iz uzoraka mišića petero pacijenata koji su primili alipogen tiparvovec (Glybera), gensku terapiju na bazi adeno asociranog viralnog vektora, otkriveno je da je nasumična integracija u genom češća nego što se do sada smatralo, no autori smatraju da je frekvencija ugradnje i dalje premala da predstavlja značajan sigurnosni rizik. Također je otkriveno da se viralna DNA ugrađuje u mitohondrijsku DNA stanica, što bi također moglo predstavljati rizik, ali i perspektivnu mogućnost u terapiji mitohondrijskih bolesti (115).

Pretpostavljeni slabi imunosni odgovor na AAV bio je važan razlog njihovog intenzivnog razvoja kao vektora. Prema bazičnim istraživanjima na životinjama očekivano je da kod primjene vektora u ljudi dolazi samo do slabog proinflamatornog odgovora i do djelomične neutralizacije ako postoje antitijela od ranijih infekcija divljim tipom virusa, koja su dosta česta u populaciji (116). No u jednom od ranih kliničkih istraživanja na ljudima zamijećen je nakon nekoliko tjedana pad ekspresije produkta genske terapije. Ovo je ukazivalo na imunosni odgovor koji je smanjivao broj transduciranih jetrenih stanica in vivo (117). Vjerojatno objašnjenje je bilo u memorijskim CD8<sup>+</sup> T-limfocitima koji su se reaktivirali u reakciji na antigene kapside vektora zbog prijašnjih infekcija istim ili antigeno sličnim adeno asociranim virusom, kako su i još neke studije potvrdile (118,119). U kasnijim istraživanjima na više načina su umanjene ove poteškoće. Neutralizirajuća antitijela se pokušavaju zaobići modifikacijom kapside, zamjenom s drugim serotipom virusa, primjenom većih doza vektora, davanjem praznih kapsida zajedno s vektorom, lokaliziranom dostavom u ciljne organe putem katetera itd. Stanični odgovor protiv transduciranih stanica se pak uspješno može umanjiti kratkotrajnom primjenom kortikosteroida (120). Razvoj ovih strategija omogućava zaobilazanje imunološkog odgovora na AAV i njihovu široku primjenu u kliničkim istraživanjima, no nastavlja se uz strog nadzor, jer mehanizmi staničnog odgovora na AAV još uvijek nisu potpuno razjašnjeni.

Prvo kliničko istraživanje u genskoj terapiji uz pomoć AAV vektora provedeno je u devedesetima u liječenju cistične fibroze (121). Više monogenских bolesti je u liječenju ovim vektorima doseglo napredne faze kliničkih istraživanja, u sistemskoj (122) ili lokalnoj primjeni (123). Prvi lijek u genskoj terapiji koji je odobrila Europska agencija za lijekove, namijenjen liječenju nedostatka lipoprotein lipaze, također koristi AAV (124). Zbog sigurnosti i blagog imunološkog odgovora danas se istražuju i u različitim kroničnim bolestima, poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, ali i infektivnima, npr. u zaštiti od HIV infekcije (125).

## 7. Odobreni lijekovi u genskoj terapiji

Unatoč sporom razvoju tehnologija genske terapije, u novije vrijeme sve je više finaliziranih lijekova za medicinsku upotrebu. Prvi lijek genske terapije odobrila je Kineska agencija za hranu i lijekove 2003. godine. Nazvan je Gendicine, a radi se o genu za protein p53 kojeg nosi adenoviralni vektor, za liječenje planocelularnih karcinoma glave i vrata. U 2005. godini u Kini je odobren još jedan lijek, Oncorine, koji uzrokuje ciljanu lizu tumorskih stanica na temelju interakcije s p53 proteinom koji u tumorskim stanicama nedostaje, za terapiju kasnog stadija refrakternih nazofaringealnih karcinoma u kombinaciji s kemoterapijom (126).

Rexin-G je odobrila Filipinska agencija za hranu i lijekove 2007. u liječenju solidnih tumora. Rexin-G ima gen za ciklin G1 u retroviralnom vektoru, nakon intravenske primjene ciljano napada tumorske stanice i zaustavlja njihov stanični ciklus (127).

Neovasculogen je lijek genske terapije koji je odobren 2011. za rusko tržište. To je plazmid s genom za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i koristi se za liječenje periferne vaskularne bolesti i kritične ishemije ekstremiteta (128).

Prvi lijek koji je 2012. odobrila Europska agencija za lijekove je Glybera (generičko ime Alipogene tiparvovec), lijek u kojem adeno asocirani viralni vektor nosi gen za lipoprotein lipazu za ekspresiju u stanicama skeletnog mišića, u terapiji bolesnika s deficijencijom lipoproteinske lipaze (126).

Imlygic (generičko ime Talimogene laherparepvec) genetski je modificirani HSV1 onkolitički virus, s dodanim genom za granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija (GM-CSF). Odobren je za liječenje melanoma u Europi i SAD-u 2015. godine (129).

Strimvelis je lijek za terapiju teške kombinirane imunodeficijencije uzrokovane manjkom adenozin deaminaze (ADA SCID). U liječenju se koristi *ex vivo* pristup gdje se pacijentove autologne CD34<sup>+</sup> matične stanice izlože retroviralnom vektoru koji nosi gen za adenozin deaminazu. Odobrila ga je



Europska komisija 2016. godine za upotrebu kod djece s ADA SCID kod koje se ne može naći odgovarajućeg donora za transplantaciju koštane srži (130).

Zalmoxis je adjuvantna terapija kod odraslih pacijenata s malignim hematološkim bolestima visokog rizika koji prolaze transplantaciju haploidentičnih hematopoetskih matičnih stanica. U ovoj genskoj terapiji *ex vivo* se T-limfociti donora u transplantaciji genetski modificiraju retroviralnim vektorom koji kodira za skraćeni oblik ljudskog receptora za faktor rasta živaca niskog afiniteta (engl. *human low affinity nerve growth factor receptor*, LNGFR) i timidin kinazu virusa herpes simplex tip 1 (HSV-TK Mut2). LNGFR ovdje služi za selekciju transduciranih stanica, dok gen za timidin kinazu iz HSV1 služi kao "gen samoubojica", tj. kao sigurnosni prekidač kojim se T-limfociti mogu uništiti u slučaju pojave reakcije presatka protiv primatelja (engl. graft versus host disease, GVHD), čineći ih osjetljivima na primjenu ganciklovira ili valganciklovira. Ovaj lijek je odobren za europsko tržište u lipnju 2016 (131).

## 8. Farmakološki pratitelji

Farmakološki pratitelji (engl. *Pharmacological chaperones, pharmacoperones, pharmacochaperones, PC*) su skupina malih strukturno raznolikih molekula koje se vežu na ciljne proteine kako bi omogućile obavljanje njihovih bioloških funkcija, najčešće prevencijom ili ispravljanjem pogrešnog nabiranja proteina (132). Nabiranje ili smatanje proteina (engl. *protein folding*) je proces u kojem proteini poprimaju svoj konačan karakterističan trodimenzionalni oblik, o kojem ovisi njihova biološka aktivnost. Pogrešno nabiranje proteina, najčešće zbog genetskih pogrešaka koje rezultiraju poremećajem slijeda aminokiselina, uzrok je širokog spektra bolesti.

Pojam farmakoloških pratitelja prvi put se u današnjem smislu spominje 1987., kada su okarakterizirani kao klasa staničnih proteina čija funkcija je osiguravanje da se smatanje određenih drugih polipeptidnih lanaca i njihovo slaganje u oligomere odvija ispravno (133).

Praćenje pravilnog smatanja proteina dakle nije jedina funkcija farmakoloških pratitelja, iako se najčešće spominju u ovom smislu. Također mogu imati i ulogu u razmatanju i degradaciji proteina, te sastavljanju nabranih podjedinica u oligomerne strukture (134).

Prema mehanizmu djelovanja, farmakološke pratitelje možemo podijeliti na kompetitivne i alosteričke ligande. Kompetitivni farmakološki pratitelji djeluju vezanjem na aktivno mjesto proteina. Kod normalne funkcije ciljnog proteina – receptora, enzima ili kanala, imaju učinak agonista ili antagonista, tj. kompetitivnog inhibitora. Ovo dovodi do paradoksalnog učinka u kojem tvar koja u fiziološkim uvjetima inhibira funkciju određenog enzima, kod patološkog stanja funkciju može poboljšati. Lizosomske bolesti nakupljanja pružaju uvid u jedan mehanizam kojim se to odvija. Vezanjem na aktivno mjesto poremećenog enzima pratitelji nekovalentnim interakcijama ostvaruju prilagodbu konformacije, koja omogućuje izbjegavanje razgradnje enzima sustavom degradacije koji djeluje u endoplazmatskom retikulumu i usmjerava enzim za prolazak kroz uobičajene stanične odjeljke. Kada enzim doputuje do svog mjesta djelovanja u

lizosomu, smatra se da kiseli pH lizosoma ili visoka koncentracija supstrata u lizosomu uzrokuje pomak ravnoteže i disocijaciju pratitelja sa aktivnog mjesta te normalnu aktivnost enzima u procesiranju nakupljenog lizosomskog supstrata. Drugi pratitelji – inhibitori nemaju svi razjašnjene mehanizme, no mnogo ih pokazuje ovaj učinak, djelujući stimulatивно u subinhibitornim koncentracijama. Neki ipak funkcionalno oporavljaju strukturu ciljnog proteina ali slabo disociraju sa aktivnog mjesta, inhibirajući biološki učinak. Jedna strategija koja se može primijeniti u tom slučaju je pulsna primjena farmakoloških pratitelja. Temelj uspješnog djelovanja ovdje je relativno kratko vrijeme potrebno za ispravljanje strukture i promet proteina do mjesta djelovanja, a dugi poluživot proteina u kojem mogu obavljati svoju funkciju nakon što koncentracija pratitelja s vremenom opadne (135).

Drugi mehanizam djelovanja farmakoloških pratitelja je alosteričko vezanje. Kod ovog tipa farmakoloških pratitelja vezanje za protein se odvija na nekom drugom mjestu osim aktivnog, te ne utječe na vezanje supstrata.

Bolesti koje proizlaze iz pogrešnog nabiranja mogu biti posljedica gubitka normalne funkcije proteina ili sposobnosti da putuje do ispravnog staničnog odjeljka, kao kod cistične fibroze, pigmentnog retinitisa i lizosomskih bolesti nakupljanja, ili mogu nastati zbog stjecanja patološke funkcije kao kod Parkinsonove ili Alzheimerove bolesti, koje se povezuju s patološkom agregacijom proteina (136).

Budući da su greške tercijarne strukture proteina vrlo širok izvor patofizioloških poremećaja, istraživanje farmakoloških pratitelja novo je područje od intenzivnog interesa u farmakologiji. Razvoj tehnologija bioinformatike omogućava bolje predviđanje trodimenzionalnih struktura i grešaka proteina pa tako i budući brži dizajn prikladnih farmakoloških pratitelja.

Dva farmakološka pratitelja su do sada odobrena za terapijsku upotrebu. Jedan je Vyndaqel (generičko ime Tafamidis), lijek za transtiretinsku amiloidozu, rijetku nasljednu neurodegenerativnu bolest. Odobrila ga je Europska agencija za lijekove 2011. godine (137). Drugi je Kuvan (Sapropterin dihidroklorid), sintetički oblik tetrahidrobiopterina, kofaktora enzima fenilalanin hidroksilaze. Fenilalanin hidroksilaza je enzim čija disfunkcija uzrokuje bolest fenilketonuriju. Ovdje je

otkriveno da uobičajeni kofaktor enzima djeluje i kao farmakološki pratitelj i djelomično oporavlja rezidualnu funkciju fenilalanin hidroksilaze. Odobren je za europsko tržište 2008. godine (138).

Od dosada otkrivenih pratitelja, više ih prolazi napredne faze kliničkih studija.

To su npr. pratitelji u cističnoj fibrozi (139), nefrogenom dijabetesu insipidusu (140) i veći broj pratitelja za lizosomske bolesti nakupljanja (141). U lizosomskim bolestima nakupljanja terapija farmakološkim pratiteljima posebno je atraktivna zbog svojstva nekih pratitelja da kao male molekule prolaze krvno-moždanu barijeru za liječenje neuroloških simptoma bolesti. Tako su trenutno u ispitivanjima primjerice Migalastat (1-deoksigalaktonojirimicin) za Fabrijevu bolest, lijek slične strukture Miglustat (N-butil-deoksinojirimicin) u liječenju Pompeove bolesti, pirimetamin za gangliozidozu GM2 i drugi. Još jedan farmakološki pratitelj trenutno u istraživanjima na ljudima je Ambroxol, pratitelj za liječenje Gaucherove bolesti, sfingolipidoze koja nastaje zbog manjka glukocerebrozidaze (142). Ambroxol je otkriven kao pratitelj u ovoj bolesti metodom engl. *high-throughput screeninga*, gdje je u kemijskoj probi pretražena kolekcija aktivnih supstanci lijekova američke FDA i identificiran ovaj spoj prema svojoj interakciji s glukocerebrozidazom (143). Ovim postupkom je osigurana velika prednost ovog lijeka u kliničkoj translaciji, pošto je već dugo korišten kao ekspektorans i ima dokumentiranu nisku toksičnost. Dodatna prednost je upravo mogućnost ovog lijeka da prelazi krvno-moždanu barijeru i poboljša neurološke simptome, što je bio nedostatak dosadašnjih oblika terapije.

Zaključno, farmakološki pratitelji su novo područje farmakoterapije s vrlo izglednim rezultatima u liječenju poremećaja funkcije proteina. Buduća istraživanja ovih lijekova ostvariti će ključne doprinose u proširenju terapijskih mogućnosti mnogih bolesti.

## **9. Zahvale**

Zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Mariu Ćuku, na savjetima, te strpljivosti i vremenu koje mi je posvetio tijekom izrade mog diplomskog rada.

Zahvaljujem najviše svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, ljubavi i podršci tijekom svih ovih godina.

## 10. Literatura

1. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*. 1928;27(02):113-59.
2. Alloway JL. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts. *The Journal of experimental medicine*. 1932;55(1):91-9.
3. 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. *The Journal of experimental medicine*. 1944;79(2):137.
4. Tatum E, Lederberg J. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1947;53(6):673.
5. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *Journal of bacteriology*. 1952;64(5):679.
6. Szybalska EH, Szybalski W. Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1962;48(12):2026-34.
7. Gartler SM. Cellular uptake of deoxyribonucleic acid by human tissue culture cells. *Nature*. 1959;184(4697):1505-6.
8. Cocito C, Prinzie A, Somer P. Uptake by mammalian cells of nucleic acids combined with a basic protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1962;18(5):218-20.
9. Temin HM, editor Separation of morphological conversion and virus production in Rous sarcoma virus infection. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 1962: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Sambrook J, Westphal H, Srinivasan P, Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968;60(4):1288-95.
11. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspectives in biology and medicine*. 1966;10(1):19-32.
12. Rogers S, Lowenthal A, Terheggen H, Columbo J. Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *Journal of Experimental Medicine*. 1973;137(4):1091-6.
13. Rogers S. Induction of arginase in rabbit epithelium by the Shope rabbit papilloma virus. *Nature*. 1959;183(4678):1815-6.
14. Rothberg S, van Scott EJ. Localization of Arginase in Rabbit Skin. *Nature*. 1961;189:832-3.
15. Terheggen H, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo J, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *European Journal of Pediatrics*. 1975;119(1):1-3.
16. 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972;69(10):2904-9.
17. Beutler E. The cline affair. *Molecular Therapy*. 2001;4(5):396.

18. Rosenberg SA, Aebbersold 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. *New England Journal of Medicine*. 1990;323(9):570-8.
19. Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M, Hwu P, Yannelli JR, Yang JC, et al. The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Annals of surgery*. 1993;218(4):455-63; discussion 63-4.
20. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-negative SCID: Initial trial results after 4 years. *Science (New York, NY)*. 1995;270(5235):475.
21. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 1999;401(6753):517-8.
22. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5466):669-72.
23. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 2015;526(7573):351-60.
24. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature biotechnology*. 2015;33(5):538-42.
25. Chen KY, Knoepfler PS. To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells. *Regenerative medicine*. 2016;11(8):801-16.
26. Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nature genetics*. 1992;2(2):93-8.
27. Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chavez-Badiola A, Liu Z, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive biomedicine online*. 2017;34(4):361-8.
28. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):377-88.
29. Pushpendra S, Arvind P, Anil B. *Nucleic acids as therapeutics. From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine*: Springer; 2012. p. 19-45.
30. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *The journal of gene medicine*. 2013;15(2):65-77.
31. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, NY)*. 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.
32. Donnelly RF, Raj Singh TR, Woolfson AD. Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Deliv*. 2010;17(4):187-207.
33. Pearton M, Saller V, Coulman SA, Gateley C, Anstey AV, Zarnitsyn V, et al. Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *Journal of controlled release*. 2012;160(3):561-9.
34. Lara MF, Gonzalez-Gonzalez E, Speaker TJ, Hickerson RP, Leake D, Milstone LM, et al. Inhibition of CD44 gene expression in human skin models, using self-delivery short interfering RNA administered by dissolvable microneedle arrays. *Human gene therapy*. 2012;23(8):816-23.
35. Liu S, Jin MN, Quan YS, Kamiyama F, Kusamori K, Katsumi H, et al. Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics

- and safety after application to the skin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2014;86(2):267-76.
36. Belshe RB. Current status of live attenuated influenza virus vaccine in the US. *Virus research*. 2004;103(1-2):177-85.
  37. Mikszta JA, Alarcon JB, Brittingham JM, Sutter DE, Pettis RJ, Harvey NG. Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nat Med*. 2002;8(4):415-9.
  38. Slivac I, Guay D, Mangion M, Champeil J, Gaillet B. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert opinion on biological therapy*. 2017;17(1):105-18.
  39. McLean WI, Moore CT. Keratin disorders: from gene to therapy. *Human molecular genetics*. 2011;20(R2):R189-R97.
  40. Ren S, Li M, Smith JM, DeTolla LJ, Furth PA. Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC biotechnology*. 2002;2:10.
  41. Kunugiza Y, Tomita N, Taniyama Y, Tomita T, Osako MK, Tamai K, et al. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. *Gene therapy*. 2006;13(15):1143-52.
  42. Walther W, Siegel R, Kobelt D, Knosel T, Dietel M, Bembenek A, et al. Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(22):7545-53.
  43. Zhang D, Das DB, Rielly CD. Potential of microneedle-assisted micro-particle delivery by gene guns: a review. *Drug delivery*. 2014;21(8):571-87.
  44. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 1987;327(6117):70-3.
  45. Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Gene gun immunization to combat malaria. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;940:269-84.
  46. Lambracht-Washington D, Fu M, Frost P, Rosenberg RN. Evaluation of a DNA Aβ<sub>42</sub> vaccine in adult rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): antibody kinetics and immune profile after intradermal immunization with full-length DNA Aβ<sub>42</sub> trimer. *Alzheimer's research & therapy*. 2017;9(1):30.
  47. Steitz J, Tuting T. Biolistic DNA vaccination against melanoma. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;940:317-37.
  48. Sözer EB, Levine ZA, Vernier PT. Quantitative Limits on Small Molecule Transport via the Electropore — Measuring and Modeling Single Nanosecond Perturbations. *Scientific reports*. 2017;7.
  49. Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1292-7.
  50. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider P. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*. 1982;1(7):841.
  51. Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1991;1088(1):131-4.
  52. Shigekawa K, Dower WJ. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques*. 1988;6(8):742-51.



53. Sakai M, Nishikawa M, Thanaketpaisarn O, Yamashita F, Hashida M. Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation. *Gene therapy*. 2005;12(7):607-16.
54. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*. 2009;11(4):671.
55. Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, et al. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*. 2004;33(2):151-63.
56. Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T. Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*. 2008;19(5):328-34.
57. Gao X, Kim K-S, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal*. 2007;9(1):E92-E104.
58. ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2007;93(1-3):111-29.
59. Zhou Y, Yang K, Cui J, Ye JY, Deng CX. Controlled permeation of cell membrane by single bubble acoustic cavitation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;157(1):103-11.
60. Nozaki T, Ogawa R, Feril LB, Kagiya G, Fuse H, Kondo T. Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification. *The journal of gene medicine*. 2003;5(12):1046-55.
61. Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(15):2166-83.
62. Yamashita Y, Shimada M, Tachibana K, Harimoto N, Tsujita E, Shirabe K, et al. In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation. *Human gene therapy*. 2002;13(17):2079-84.
63. Mead BP, Mastorakos P, Suk JS, Klibanov AL, Hanes J, Price RJ. Targeted gene transfer to the brain via the delivery of brain-penetrating DNA nanoparticles with focused ultrasound. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;223:109-17.
64. Nomikou N, McHale AP. Microbubble-enhanced ultrasound-mediated gene transfer--towards the development of targeted gene therapy for cancer. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2012;28(4):300-10.
65. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Molecular Pharmaceutics*. 2011;8(2):543-54.
66. Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Human gene therapy*. 1997;8(15):1763-72.
67. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy*. 1999;6(7):1258-66.
68. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene therapy*. 2004;11(8):675-82.

69. Yokoo T, Kamimura K, Abe H, Kobayashi Y, Kanefuji T, Ogawa K, et al. Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(40):8862-8.
70. Khorsandi SE, Bachellier P, Weber JC, Greget M, Jaeck D, Zacharoulis D, et al. Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther*. 2008;15(4):225-30.
71. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(21):7413-7.
72. Hofland HE, Shephard L, Sullivan SM. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(14):7305-9.
73. Xu Y, Szoka FC, Jr. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*. 1996;35(18):5616-23.
74. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene therapy*. 1998;5(7):930-7.
75. Sakurai F, Nishioka T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2001;52(2):165-72.
76. 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 therapy*. 2002;9(16):1120-6.
77. Li W, Szoka FC, Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res*. 2007;24(3):438-49.
78. 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. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;163(3):267-76.
79. Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, Przybylska M, et al. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2000;1(3):255-62.
80. Duarte S, Faneca H, Lima MC. Folate-associated lipoplexes mediate efficient gene delivery and potent antitumoral activity in vitro and in vivo. *International journal of pharmaceutics*. 2012;423(2):365-77.
81. Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis D, Bedell C, Edelman G, Barve M, et al. Phase I study of a systemically delivered p53 nanoparticle in advanced solid tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(5):1096-103.
82. Zulliger R, Conley SM, Naash MI. Non-viral therapeutic approaches to ocular diseases: an overview and future directions. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;219:471-87.

83. Manunta MD, Tagalakis AD, Attwood M, Aldossary AM, Barnes JL, Munye MM, et al. Delivery of ENaC siRNA to epithelial cells mediated by a targeted nanocomplex: a therapeutic strategy for cystic fibrosis. 2017;7(1):700.
84. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(16):7297-301.
85. Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The journal of gene medicine*. 2005;7(5):657-63.
86. Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kurska M, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *The journal of gene medicine*. 2001;3(4):362-72.
87. Hwang S, Davis M. Cationic polymers for gene delivery: designs for overcoming barriers to systemic administration. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2001;3(2):183-91.
88. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer H-P, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical research*. 1999;16(8):1273-9.
89. Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *The journal of gene medicine*. 2004;6 Suppl 1:S3-10.
90. Liu T, Wu X, Wang Y, Zhang T, Wu T, Liu F, et al. Folate-targeted star-shaped cationic copolymer co-delivering docetaxel and MMP-9 siRNA for nasopharyngeal carcinoma therapy. *Oncotarget*. 2016;7(27):42017-30.
91. Konstan MW, Davis PB, Wagener JS, Hilliard KA, Stern RC, Milgram LJ, et al. Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Human gene therapy*. 2004;15(12):1255-69.
92. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(14):10444-50.
93. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(25):16010-7.
94. Li H, Tsui TY, Ma W. Intracellular Delivery of Molecular Cargo Using Cell-Penetrating Peptides and the Combination Strategies. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8):19518-36.
95. Huang YW, Lee HJ, Tolliver LM, Aronstam RS. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges. *BioMed research international*. 2015;2015:834079.
96. Yamano S, Dai J, Hanatani S, Haku K, Yamanaka T, Ishioka M, et al. Efficient in vivo gene delivery using modified Tat peptide with cationic lipids. *Biotechnology letters*. 2014;36(7):1447-52.
97. Yamano S, Dai J, Hanatani S, Haku K, Yamanaka T, Ishioka M, et al. Long-term efficient gene delivery using polyethylenimine with modified Tat peptide. *Biomaterials*. 2014;35(5):1705-15.

98. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus research*. 2009;143(2):184-94.
99. Fukazawa T, Matsuoka J, Yamatsuji T, Maeda Y, Durbin ML, Naomoto Y. Adenovirus-mediated cancer gene therapy and virotherapy (Review). *International journal of molecular medicine*. 2010;25(1):3-10.
100. Lasaro MO, Ertl HC. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(8):1333-9.
101. Nwanegbo E, Vardas E, Gao W, Whittle H, Sun H, Rowe D, et al. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(2):351-7.
102. Crystal RG. Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human gene therapy*. 2014;25(1):3-11.
103. Lukashov AN, Zamyatnin AA, Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry Biokhimiia*. 2016;81(7):700-8.
104. Froelich S, Tai A, Kennedy K, Zubair A, Wang P. Pseudotyping lentiviral vectors with aura virus envelope glycoproteins for DC-SIGN-mediated transduction of dendritic cells. *Human gene therapy*. 2011;22(10):1281-91.
105. Dropulic B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Human gene therapy*. 2011;22(6):649-57.
106. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5626):1749-51.
107. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature biotechnology*. 2006;24(6):687-96.
108. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology*. 1998;72(12):9873-80.
109. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu P-Q, Reik A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nature medicine*. 2012;18(5):807-15.
110. Fricano-Kugler CJ, Williams MR, Salinaro JR, Li M, Luikart B. Designing, Packaging, and Delivery of High Titer CRISPR Retro and Lentiviruses via Stereotaxic Injection. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2016(111).
111. Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *The new microbiologica*. 2013;36(1):1-22.
112. Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(7):445-51.
113. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(6):2211-5.
114. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science (New York, NY)*. 2007;317(5837):477.

115. Kaepfel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med.* 2013;19(7):889-91.
116. Erles K, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *Journal of medical virology.* 1999;59(3):406-11.
117. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. 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.
118. Pien GC, Basner-Tschakarjan E, Hui DJ, Mentlik AN, Finn JD, Hasbrouck NC, et al. Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119(6):1688-95.
119. Finn JD, Hui D, Downey HD, Dunn D, Pien GC, Mingozzi F, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2010;18(1):135-42.
120. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Current gene therapy.* 2011;11(4):321-30.
121. Flotte T, Carter B, Conrad C, Guggino W, Reynolds T, Rosenstein B, et al. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Human gene therapy.* 1996;7(9):1145-59.
122. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac L, Kissel JT, et al. 480. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy Type 1 Shows Potential to Improve Survival and Motor Functional Outcomes. *Molecular Therapy.*24:S190.
123. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human gene therapy.* 2008;19(10):979-90.
124. Ylä-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2012;20(10):1831-2.
125. Gardner MR, Kattenhorn LM, Kondur HR, von Schaewen M, Dorfman T, Chiang JJ, et al. AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature.* 2015;519(7541):87-91.
126. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene.* 2013;525(2):162-9.
127. Gordon EM, Hall FL. Rixin-G, a targeted genetic medicine for cancer. *Expert opinion on biological therapy.* 2010;10(5):819-32.
128. Deev R, Plaksa I, Bozo I, Isaev A. Results of an International Postmarketing Surveillance Study of pl-VEGF165 Safety and Efficacy in 210 Patients with Peripheral Arterial Disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs.* 2017;17(3):235-42.
129. Talimogene laherparepvec for melanoma. *Australian Prescriber.* 2017;40(1):38-9.
130. Ylä-Herttuala S. ADA-SCID Gene Therapy Endorsed By European Medicines Agency For Marketing Authorization. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2016;24(6):1013-4.

131. Weissinger EM, Borchers S, Silvani A, Provasi E, Radrizzani M, Beckmann IK, et al. Long term follow up of patients after allogeneic stem cell transplantation and transfusion of HSV-TK transduced T-cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2015;6.
132. Leidenheimer NJ, Ryder KG. Pharmacological Chaperoning: A Primer on Mechanism and Pharmacology. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2014;83:10-9.
133. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328(6129):378-9.
134. Williams D, Devi LA. Escorts Take the Lead: Molecular Chaperones as Therapeutic Targets. *Progress in molecular biology and translational science*. 2010;91:121-49.
135. Brandvold KR, Morimoto RI. The Chemical Biology of Molecular Chaperones-- Implications for Modulation of Proteostasis. *Journal of molecular biology*. 2015;427(18):2931-47.
136. Wang YJ, Di XJ, Mu TW. Using pharmacological chaperones to restore proteostasis. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2014;0:3-9.
137. Bulawa CE, Connelly S, Devit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9629-34.
138. Utz JR, Lorentz CP, Markowitz D, Rudser KD, Diethelm-Okita B, Erickson D, et al. START, a double blind, placebo-controlled pharmacogenetic test of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in phenylketonuria patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2012;105(2):193-7.
139. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012;67(1):12-8.
140. Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, et al. Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(1):232-43.
141. Matalonga L, Gort L, Ribes A. Small molecules as therapeutic agents for inborn errors of metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*. 2017;40(2):177-93.
142. Narita A, Shirai K, Itamura S, Matsuda A, Ishihara A, Matsushita K, et al. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2016;3(3):200-15.
143. Maegawa GHB, Tropak MB, Buttner JD, Rigat BA, Fuller M, Pandit D, et al. Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(35):23502-16.

## **11. Životopis**

Rođena sam u Koprivnici, 19.09.1991. godine. Osnovnu školu sam pohađala u OŠ Dragutina Tadijanovića u Petrinji. Srednjoškolsko obrazovanje završila sam u općoj gimnaziji u Petrinji 2010. godine. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Uz redovito obavljanje fakultetskih obaveza, bila sam član studentske udruge CroMSIC. Sudjelovala sam u Natjecanju u kliničkim vještinama koje organizira CPSA.

Imam više područja interesa u medicini, ali najviše sam zainteresirana za internističke grane, infektologiju, te hitnu medicinu. Aktivno se služim engleskim i osnovno poznajem njemački i španjolski jezik.