

# Genska terapija u liječenju lizosomskih bolesti

---

**Botica, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:731133>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lucija Botica

**Genska terapija u liječenju lizosomskih  
bolesti**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lucija Botica

**Gene therapy for lysosomal diseases**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Petre Korać.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Genska terapija u liječenju lizosomskih bolesti

Lucija Botica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lizosomske bolesti su rijetke nasljedne bolesti koje se pojavljuju u 1 od 5000 rođenja. Karakterizirane su mutacijom u specifičnom genu koji kodira protein potreban za pravilan rad lizosoma. Rezultiraju akumulacijom određenog supstrata u lizosomima i tako uzrokuju različite simptome koji zahvaćaju više organskih sustava. Dosadašnji pristupi liječenju uključuju terapiju zamjenskim enzimima, terapiju malim molekulskim šaperonima, terapiju smanjenja količine supstrata i transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica. Nova otkrića u genskoj terapiji zaobilaze ograničenja dosadašnjih terapija poput česte readministracije, slabe efikasnosti i prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Danas se intenzivno istražuju pristupi *ex vivo* i *in vivo* s integrativnim i neintegrirajućim virusnim vektorima kako bi se izbjegle poteškoće poput poticanja imunskog odgovora i insercijske mutagenze te kako bi se unaprijedilo ciljanje specifičnih tkiva. U budućnosti bi istraživanje mehanizama genske terapije na primjeru lizosomskih bolesti moglo biti temelj liječenja raznih drugih nasljednih genetskih poremećaja.

Ključne riječi: virus povezan s adenovirusom, lentivirus, klinička istraživanja, insercijska mutageneza, uređivanje gena  
(29 stranica, 3 slike, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Petra Korać

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

### Gene therapy for lysosomal diseases

Lucija Botica

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lysosomal diseases are rare inherited disorders that occur in 1 of 5000 births. They are characterized by a mutation in a single gene coding a protein necessary for the normal functioning of lysosomes. They result in the accumulation of specific substrates within the lysosome, causing various symptoms that affect multiple organ systems. Current treatment approaches include enzyme replacement therapy, therapy with small molecular chaperones, substrate reduction therapy, and hematopoietic stem cell transplantation. New discoveries in gene therapy bypass the barriers of previous therapies such as frequent readministration, low effectiveness, and crossing the blood-brain barrier. Currently, *ex vivo* and *in vivo* approaches with integrative and non-integrative viral vectors are being intensively researched to minimize risks such as immune response and insertional mutagenesis and to improve targeting of specific tissues. In the future, investigating the mechanisms of gene therapy using lysosomal diseases as an example could be a milestone in treating various other inherited genetic disorders.

Keywords: adeno-associated virus, lentivirus, clinical trials, insertional mutagenesis, gene editing

(29 pages, 3 figures, 65 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Petra Korać

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Lizosomske bolesti .....	2
2.1 Molekularne osnove lizosomskih bolesti.....	2
2.2 Dosadašnji pristupi liječenja i njihovi nedostaci .....	3
3. Genska terapija.....	6
3.1 Principi genske terapije .....	6
3.2 Vektori u genskoj terapiji.....	9
3.2.1 Virusni vektori .....	10
4. Primjena genske terapije u liječenju lizosomskih bolesti .....	14
4.1 Primjeri istraživanja primjena genske terapije <i>ex vivo</i> .....	15
4.1.1 Metakromatska leukodistrofija .....	16
4.1.2 Gaucherova bolest.....	17
4.2 Primjeri istraživanja primjena genske terapije <i>in vivo</i> .....	18
4.2.1 Battenova bolest .....	18
4.2.2 Pompeova bolest.....	19
4.2.3 Mukopolisaharidoza tip 1.....	20
4.3. Izazovi genske terapije u liječenju lizosomskih bolesti.....	22
5. Zaključak.....	23
6. Literatura .....	24

## 1.Uvod

Lizosom je organela u stanici koja djeluje kao njen probavni sustav, degradirajući štetne i nepotrebne spojeve proizvedene u stanici ili uvezene u stanicu te komponente same stanice poput starih i nefunkcionalnih organela. Enzimi koji omogućuju rad lizosoma su kisele hidrolaze, skupina enzima svaki s različitim supstratom kojeg razlaže na manje komponente. Osim 60 vrsta kiselih hidrolaza lizosomi sadrže i preko 300 različitih membranskih proteina koji sudjeluju u održavanju niskog pH unutar lizosoma i transportu supstrata (Cooper, 2019). Svaki od ovih enzima neophodan je za rad lizosoma, a tako i stanice. Nedostatak ili smanjena aktivnost samo jednog od ovih proteina uzrokuje razvoj bolesti koje skupno nazivamo lizosomske bolesti. Danas je poznato preko 70 lizosomskih bolest. Iako se međusobno razlikuju u simptomima dvije stvari su im zajedničke: to su nasljedne bolesti s mutacijom u jednom genu koje uzrokuju akumulaciju specifične vrste molekule u stanici. Vrijeme pojavljivanja simptoma, njihov intenzitet te organi koji su zahvaćeni variraju ovisno o zahvaćenom genu i tipu mutacije (Gieselmann, 1995). Ipak sve ove bolesti zahvaćaju više organskih sustava, s naglaskom na centralni živčani sustav. Prevalencija pojedinih lizosomskih bolesti u populaciji je rijetka što usporava razvoj terapija.

Trenutno dostupne terapije su terapija zamjenskim enzimima, terapija malim molekulskim šaperonima i terapija hematopoetskim matičnim stanicama. Terapija zamjenskim enzimima i terapija malim molekulskim šaperonima temelje se na dostavljanju funkcionalnog enzima ili povećanju aktivnosti mutiranog enzima u stanici. Jedno od ograničenja ovih terapija je efikasno dopremanje proteina ili malih molekula u različita zahvaćena tkiva s obzirom na razlike u prokrvljenosti, receptorima i imunskim svojstvima. Osim toga ove terapije imaju različitu uspješnost ovisno o tipu mutacije pacijenta i vremenu intervencije, a u svakom slučaju zahtijevaju česte readministracije. Suprotno njima terapija transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica predstavlja jednokratno rješenje. Transplantirane stanice i njihovi potomci luče funkcionalne enzime u krv, nakon čega se unose endocitozom u ostale stanice (Platt, 2018). Iako efikasan ovaj pristup je invazivan i često praćen snažnim imunskim reakcijama.

Jedan od većih problem efikasnosti trenutno dostupnih terapija za lizosomske bolesti je i krvno-moždana barijera (od eng. *blood-brain barrier*) koja sprečava dostavu terapijskih enzima i hematopoetskih stanica do centralnog živčanog sustava. Čak 70% lizosomskih bolesti prezentira



se kao neurodegenerativne bolesti (Platt, 2018), većina ih brzo napreduje te su letalne ukoliko se ne liječe.

Genska terapija uključuje zamjenu, utišavanje ili popravak određenog gena. Za dostavu *ex vivo* ili *in vivo* u somatske stanice koriste se virusni i nevirusni vektori koji se mogu dizajnirati i prilagođavati ovisno o ciljanom tkivu. Kako bi se mogao primijeniti odgovarajući tip genske terapije potrebno je definirati kako određen gen ili mutacija gena rezultira nastankom bolesti. Lizosomske bolesti su monogenetske bolesti s već poznatim i sekvenciranim genima odgovornim za njihov razvoj, pa su dobar model za gensku terapiju dopremanja funkcionalnog gena. Uz brojna aktivna klinička istraživanja usmjerena na lizosomske bolesti na tržištu je od 2020 godine dostupna genska terapija za metakromatsku leukodistrofiju Libmeldy (EMA 2020). Ova terapija primjer je pristupa *ex vivo* u kojem se hematopoetske matične stanice CD34+ pacijenta transformiraju genom ARSA. Nakon intravenoznog unosa transformiranih stanica u pacijenta hematopoetske matične stanice CD34+ proizvode funkcionalni protein arilsulfatazu A koji nedostaje u metakromatskoj leukodistrofiji.

Istraživanje genske terapije za lizosomske bolesti važno je iz dva razloga; trenutno nije dostupna terapija koja dugoročno liječi sve tipove bolesti, a posebno one koje zahvaćaju živčani sustav, osim toga ova istraživanja pružaju temelj za razvoj učinkovitijih i sigurnijih terapija za različite genetske bolesti te bolje razumijevanje mehanizama dostave gena, sigurnosti i dugoročnih učinaka terapije.

## **2. Lizosomske bolesti**

### **2.1 Molekularne osnove lizosomskih bolesti**

Na staničnoj razini lizosomske bolesti utječu na aktivnost, posttranslacijske modifikacije i transport citoplazmatskih i membranskih proteina lizosoma što utječe na razgradnju i prijenos supstrata iz lizosoma. U skupinu lizosomskih bolesti ubrajaju se i poremećaji koji indirektno utječu na rad lizosoma promjenama u šaperonskim proteinima i transportnim proteinima o čijoj funkciji ovise lizosomski proteini. Primjer takvih poremećaja su bolesti iz skupine mukopolidoza kod kojih je mutiran gen za enzim UDP-N-acetilglukozamin-1-fosfotransferazu koji ima ključnu ulogu u usmjeravanju lizosomskih proteina iz Golgijevog aparata u endosome. Zbog mutacija ovog enzima nema sinteze receptora manoza-6-fosfatnog (M6P od eng. *mannose 6-phosphate*) signala koji se

nalazi na površini lizosomskih proteina. U nedostatku receptora M6P većina nosivih sintetiziranih lizosomskih proteina ne može fuzionirati s endosomima (Filocamo i Morrone, 2011.).

Zajednička posljedica svih poremećaja je akumulacija supstrata u lizosomima, ali i u drugim unutarstaničnim i izvanstaničnim prostorima, no i dalje nije potpuno razjašnjeno kako poremećaj funkcije lizosoma pokreće složene stanične procese uzrokujući poremećaj funkcije stanica i na kraju staničnu smrt.

Predložena su 3 mehanizma patogeneze (Ballabio i Gieselmann, 2009): prvi se temelji na smanjenoj sposobnosti fuzije lizosoma s autofagosomima zbog akumuliranih supstrata. Ovisno o vrsti poremećaja dolazi do potpunog ili djelomičnog zaustavljanja autofagije te nakupljanja njenih supstrata, agregata poliubikvitiranih proteina i disfunkcionalnih mitohondrija. Nakupljanje supstrata autofagije u stanici dovodi do upalnog procesa i posljedično stanične smrti. Drugi mehanizam uključuje razne promjene u transdukciji signala unutar stanice. Akumulirani supstrati u stanici mogu djelovati kao ligandi receptora uzrokujući tako prekomjernu ekspresiju raznih molekula poput upalnih citokina u mukopolisaharidozama VI i VII. Treći predloženi mehanizam temelji se na promjeni koncentracije unutarstaničnog kalcija kao na primjer u Gaucherovoj bolesti gdje dolazi do nakupljanja glukozilceramida u membrani endoplazmatskog retikuluma što aktivira rijanodinske receptore i tako uzrokuje povećanu koncentraciju kalcija u citoplazmi što interferira s mnogim signalnim putovima unutar stanice.

Točan mehanizam i stupanj oštećenja ovisi o zahvaćenom proteinu i tipu stanice. Unatoč ovoj raznolikosti, u većini slučajeva, primarno su zahvaćeni organi s visokom metaboličkom aktivnošću, kao što su jetra, slezena, kosti, mišići, te posebno centralni živčani sustav (CNS od eng. *central nervous system*). CNS je zahvaćen u 70% lizosomskih bolesti (Platt, 2018). Oštećenje centralnog živčanog sustava može biti osobito teško jer može uzrokovati niz neuroloških simptoma, uključujući progresivni gubitak motoričkih i kognitivnih funkcija, epileptičke napadaje, mišićnu slabost i druge neurološke poremećaje. Stoga je dostava terapije u CNS glavni cilj nedavnih istraživanja.

## **2.2 Dosadašnji pristupi liječenja i njihovi nedostaci**

Kada se radi o bolestima uzrokovanim mutacijom u jednom genu dva su moguća pristupa razvoju terapije: ublažiti učinke mutiranog gena dostavljanjem funkcionalnog gena u stanice ili

dostava rekombinantnog funkcionalnog proteina u stanicu kao zamjena za promijenjeni protein ili nadomjestak za nepostojeći protein u stanici. Većina lizosomskih bolesti uključuje akumulaciju supstrata u centralnom živčanom sustavu i mnogim drugim organima, te je stoga najveći tehnički izazov svih pristupa liječenja kako dostaviti terapiju koja će učinkovito liječiti sve organe i tkiva koristeći jednu terapijsku strategiju.

Terapija zamjenskim enzimima (ERT od eng. *enzyme replacement therapy*) temelji se na intravenskoj dostavi funkcionalnog proteina u stanicu. Kada se radi o lizosomskim proteinima dostava egzogenih proteina u stanicu je olakšana. Razlog tome je glikozilacija većine lizosomskih proteina jer imaju obrazac glikozilacije manoza-6-fosfat (M6P) koji im omogućuje unos u sve stanice s receptorom M6P (Solomon i Muro, 2017).

ERT se koristi kao glavna metoda liječenja u mnogim lizosomskim bolestima: Gaucherovoj bolesti, Fabrijevoj bolesti, Pompe i mukopolisaharidozama. Tri su osnovna ograničenja ove terapije kod navedenih bolesti. Prvo je formiranje neutralizirajućih antitijela koji na različite načine inhibiraju aktivnost egzogenih enzima (Solomon i Muro, 2017). Pojava antitijela najčešća je kod oboljelih s mutacijama koje stvaraju stop-kodon tj. kod pacijenata koji uopće ne proizvode određeni protein zbog preuranjenog zaustavljanja translacije. U tih pacijenata protein nije poznat imunom sustavu i ne postoji tolerancija na njega (Hollak i Linthorst, 2009). Zatim, kod nekih poremećaja ERT je efikasna metoda liječenja samo u ranim stadijima bolesti pa se kasno dijagnosticirani i uznapredovali stadiji ne mogu liječiti. Razlozi variraju, Fukuda i sur. (2006) su utvrdili da je kod Pompeove bolesti uzrok deregulacija autofagije koja može dovesti do pogrešnog usmjeravanja endocitiranog terapijskog enzima. Pokazali su da u kasnim stadijima bolesti dolazi do nakupljanja uvećanih autofagosoma u mišićnim stanicama. Praćenjem fluorescentno obilježenih terapijskih enzima utvrđeno je da su usmjereni prema autofagosomima, kasnim endosomima i intermedijarnim autofagosomima te tamo ostaju zarobljeni. U tim odjeljcima enzimi ne mogu vršiti svoju funkciju, razgradnju glikogena, stoga lizosomi i dalje ostaju ispunjeni glikogenom, a autofagna nakupina nastavlja rasti kako bolest napreduje. Treća prepreka odnosi se na ciljane organe i mogućnost dostave terapije u njih. Centralni živčani sustav, zahvaćen u 70% lizosomskih bolesti, odvojen je od krvotoka krvno-moždanom barijerom koja onemogućuje dostavu terapijskih enzima, stoga ERT nije dobra terapija za lizosomske bolesti koje najvećim dijelom zahvaćaju centralni živčani sustav.

Terapija malim molekulskim šaperonima temelji se na povećanju aktivnosti neispravnog proteina. Male molekule vežu se za aktivno mjesto mutiranog enzima i trajno ga stabiliziraju. Glavna prednost ove terapije je mogućnost liječenja i centralnog živčanog sustava s molekulama koje mogu prijeći krvno-moždanu barijeru. Ova terapija moguća je samo kod pacijenata gdje se enzim sintetizira ali sa smanjenom aktivnosti te je ipak oblik personalizirane medicine koja uvelike ovisi o vrsti mutacije pacijenta pa razvoj takve terapije nije jednostavan (Platt, 2018).

Terapija smanjenja količine supstrata ne cilja enzim, već smanjuje akumulaciju supstrata u lizosomima usporavanjem biosinteze tog supstrata u stanici. Cilj joj nije u potpunosti zaustaviti biosintezu već uskladiti brzinu biosinteze s aktivnošću mutiranog enzima. Nedostaci su to što se može koristiti samo u slučajevima u kojima stanica može tolerirati manje količine određenog supstrata i u kojima je enzim zadržao djelomičnu aktivnost (Platt i Jeyakumar, 2008).

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica koristi zdrave donorske stanice za proizvodnju nefunkcionalnih enzima. Transplantirane donorske stanice uključuju leukocite koje cirkuliraju u krvi i makrofage koji se nalaze u raznim tkivima. Donorske stanice luče normalne količine enzima u krv ili tkivo (Parenti i sur., 2015), a enzim može biti unesen u stanice domaćina preko receptora za manozu-6-fosfat. Ovaj receptor prepoznaje lizosomske enzime koji nose manozu-6-fosfatni signal i unosi ih u stanicu nakon čega su usmjereni prema lizosomu (Leal i sur., 2020), postoji nekoliko nedostataka ove vrste terapije. Lizosomske bolesti u kojima nedostaje enzim bez manozu-6-fosfatnog signala ne mogu se liječiti transplantacijom, donorske stanice ne ulaze u sva tkiva u jednakoj količini, živčani i skeletni sustav slabo su zastupljeni donorskim stanicama pa su razine funkcionalnog enzima tamo niske (Leal i ostali, 2020). Uz to, glavni nedostatak je poteškoća u pronalaženju kompatibilnog donora, uz rizik od neuspjeha transplantacije, visoke stope morbiditeta i mortaliteta povezane s imunosupresivnim režimima, te mogućnost razvoja bolesti presatka protiv domaćina (od eng. *graft-versus-host disease*) (Boelens, 2006).

Zbog nedostataka navedenih pristupa liječenju i velike raznolikosti u količini i aktivnosti enzima kod oboljelih od istog poremećaja istraživanje su usmjerena u razvoj genske terapije koja može tretirati sve oblike pojedinog poremećaja.

### 3. Genska terapija

Genska terapija obuhvaća korištenje svih proizvoda koji djeluju transkripcijom ili translacijom prenesenog genetičkog materijala ili specifično izmjenjuju genetičke sekvencije (FDA 2020). Prvo odobreno kliničko istraživanje za gensku terapiju bilo je za lizosomsku bolest, Gaucherovu bolest 1988. godine (Alhakamy i sur., 2021). Od tada se primjena genske terapije istražuje i za liječenje drugih genetskih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, tumora i zaraznih bolesti te je do 2020. godine provedeno 2106 kliničkih istraživanja (Alhakamy i sur., 2021).

#### 3.1 Principi genske terapije

Sve genske terapije temelje se na unosu novog genetičkog materijala u organizam stoga je prije liječenja bilo kojeg stanja primjenom genske terapije potrebno definirati kako dopremiti željeni genetički materijal u stanicu odnosno koji vektor za prijenos koristiti, koji su principi djelovanja genetičkog materijala jednom kada se nalazi u stanici i koje su moguće posljedice odabranog vektora. Ovisno o tome na koji način genski produkt djeluje na razvoj bolesti koriste se različiti pristupi: dodavanje gena, utišavanje gena i uređivanje/popravak gena.

Dodavanjem gena (od eng. *gene addition*) unosi se novi gen u stanice. Ako mutirani gen uzrokuje sintezu neispravnog protein ili sinteze nema, terapijom dodavanjem gena može se unijeti ispravnu kopiju gena kako bi se stvarao funkcionalni protein. Alternativno, terapijom se može unijeti drugi gen koji pruža upute za protein koji pomaže stanicama da normalno funkcioniraju, unatoč genetičkoj promjeni (NIH 2022). Ovaj pristup koristi se za monogenetske bolesti poput lizosomskih bolesti, spinalne mišićne distrofije, hemofilije i cistične fibroze.

Utišavanje gena (od eng. *gene silencing*) za cilj ima smanjiti ili zaustaviti ekspresiju gena posttranskripcijskim interferiranjem s mRNA željenog gena. RNA interferencija (RNAi od eng. *RNA interference*) je proces posredovan malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA, od eng. *small interfering RNA*). Jednolančane siRNA usmjeravaju proteinski kompleks RISC prema ciljanoj mRNA, komplementarnoj siRNA. Nakon prepoznavanja kompleks RISC cijepa mRNA i tako onemogućava translaciju određenog gena (Aigner, 2006).

Utišavanje gena može se postići i pomoću oligonukleotida ASO (od eng. *antisense oligonucleotides*) pristupa koji koristi kratku RNA-ukosnicu (shRNA, od eng. *short hairpin*

RNA) (van Zundert i Brown, 2017). ASO je kratka dizajnirana sekvencija duga 8-50 nukleotida s različitim modifikacijama na okosnici. Kada se komplementarno veže za ciljane mRNA, sprečava njenu translaciju ili potiču degradaciju RNazom H1. Za razliku od ASO, koji svoju funkciju obavljaju u citoplazmi shRNA svoj ciklus započinje u jezgri. Korištenje shRNA u genskoj terapiji podrazumijeva unos u stanicu vektorom nakon čega shRNA ulazi u jezgru te se integrira u genom. U jezgri se shRNA transkribira i procesira pomoću staničnih proteina. Obrađena pre-shRNA u citoplazmi ulazi u kompleks s proteinom Dicer koji joj omogućava sazrijevanje. Zrela shRNA se u kompleksu s proteinom RISC ponaša isto kao i siRNA i uzrokuje degradaciju komplementarne mRNA.

Rao i sur. (2009) usporedili su djelovanje siRNA i shRNA u postupcima utišavanja gena te utvrdili da iako egzogeno uvedena siRNA može ući u kompleks s proteinom RISC, stvaranje kompleksa je 10 puta manje učinkovito nego za shRNA. Osim toga, shRNA se može, budući da se ugrađuje u genom, kontinuirano sintetizirati od strane domaćina pa je njezin učinak trajniji dok je praćenje fluorescentno obilježene siRNA ukazalo je na njenu visoku razgradnju te je 48 sati nakon primjene manje od 1% uvedenog dupleksa siRNA ostalo u stanicama. Zbog toga su koncentracije potrebne za učinkovito utišavanje gena obično u niskom rasponu nM za većinu siRNA, dok je manje od 5 kopija shRNA integriranih u genom domaćina dovoljno za kontinuirani učinak utišavanja gena.

Utišavanje gena interferirajućim RNA molekulama koristi se za neurodegenerativne bolesti kod kojih zbog genetskih mutacija dolazi ili do nakupljanja proteina ili sinteze toksičnog proteina. Često se primjenjuje ASO, koji se u centralni živčani sustav dostavljaju bez vektora injektiranjem u lumbalne prostore ili bočne ventrikule ispunjene cerebrospinalnom tekućinom jer nukleotidi ASO ne mogu proći krvno-moždanu barijeru (Bennett i sur., 2020). Primjeri trenutnih istraživanja uključuju utišavanje gena za sintezu amiloidnog prekusorskog proteina kao jedan od pristupa liječenju Alzheimerove bolesti i utišavanje gena *SOD1* čiji je toksični produkt vjerojatan uzrok amiotrofične lateralne skleroze (Bennett i sur., 2020).

Zanimljiv novi pristup je primjena genske terapije koja kombinira dodavanje i utišavanje gena. Ovaj pristup predložili su Brusson i sur. (2023) na primjeru liječenja srpaste anemije. Srpasta anemija uzrokovana je mutacijom  $\beta$ -globinskog gena zbog koje dolazi do proizvodnje promijenjenog hemoglobina (HbS, od eng. *hemoglobin S*). Dosadašnja terapija uključivala je

samo dodavanje gena za anti-srpasti hemoglobin ( $\beta AS$ ) u hematopoetske matične stanice i progenitorske stanice pomoću lentivirusnog vektora. Protein  $\beta AS$  ima supstituciju glicina za cistein zbog čega ima veći afinitet za vezanje na  $\alpha$  globinski lanac od srpastog HbS globina. No HbS se ne prestaje proizvoditi u stanici i natječe se za vezanje s  $\alpha$  globinom, zbog čega količina zdravog hemoglobina ne dostiže željenu razinu. Novi pristup također je koristio lentivirusni vektor koji je osim gena za  $\beta AS$  nosio i miRNA (konstruiranu iz shRNA) koja je smanjila ekspresiju HbS. Eritrociti miševa tretiranih vektorom  $\beta AS$ /miRNA u usporedbi s eritrocitima miševa tretiranim samo s vektorom  $\beta AS$  imali su manju količinu HbS i manji broj stanica sa srpastim fenotipom.

Posljednji način djelovanja genske terapije je onaj uređivanjem gena (od eng. *gene editing*). Uređivanje gena omogućeno je posebno napravljenim nukleazama koje su sastavljene od domene za vezanje DNA, koji određuje specifičnost nukleaze za DNA sekvenciju, i endonukleazne domene, koja katalizira stvaranje dvostrukog loma (DSB, od eng. *double strand break*) (Castiello i sur., 2023). Popravak dvostrukog loma DNA može se odvijati na temelju nepotpunog homolognog spajanja krajeva (NHEJ, od eng. *non-homologous end joining*) ili homologno usmjerenim popravakom (HDR, od eng. *homology-directed repair*). Kod NHEJ-a spajaju se krajevi DNA na mjestu dvolančanog loma. Ovaj put popravka sklon je pogreškama, a na mjestu dvolančanog loma nastaju insercije i delecije. Genska terapija temeljena na NHEJ-u omogućuje gubitak funkcije gena promjenama u kodirajućoj sekvenci ili poremećaj regulacije gena ciljanjem promotorskih sekvenci. Drugi način popravka dvolančanog loma je HDR. Za ovaj tip popravka nužna je prisutnost sekvencije DNA homologne mjestu dvolančanog loma. Genska terapija temeljena na HDR-u omogućuje mjesno-specifičnu integraciju kratkih ili dugih sekvencija u gen koji uzrokuje bolest, čime se gen inaktivira ili mjesno-specifičnu integraciju u sigurna mjesta ekspresije (GSH, od eng. *genomic safe harbor*) čime se omogućuje ekspresija transgena. Sigurna mjesta ekspresije su točno određena mjesta u ljudskom genomu koja podržavaju stabilnu i učinkovitu ekspresiju transgena, bez štetnog izmjenjivanja staničnih funkcija (Aznauryan i sur., 2022).

Glavne klase stvorenih nukleaza su nukleaze ZFN (od eng. *zinc fingers nucleases*), efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (TALEN, od eng. *transcription activator-like effector nucleases*) i sustav CRISPR/Cas9 (od eng. *clustered regularly interspaced short palindromic*

*repeats* ). Glavna razlika ovih nukleaza je način na koje su usmjerene prema ciljanoj sekvenciji DNA: nukleaze ZFN i TALEN-i usmjereni su proteinima, a sustav CRISPR/Cas9 usmjeren je kratkom vodećom RNA (gRNA, od eng. *guide RNA*).

Učestalost NHEJ i njegova nespecifičnost predstavlja glavni nedostatak korištenja nukleaza u kontekstu uređivanja gena. NHEJ je dominantan put popravka dvostrukih lomova u sisavaca, a budući da je NHEJ aktivan tijekom cijelog staničnog ciklusa i brži od homologno usmjerenog popravka, postoji veća vjerojatnost da će se koristiti za popravak DSB-ova (Yang i sur., 2020). Međutim, ta nespecifična aktivnost može dovesti do neželjenih učinaka, kao što su mutacije ili nepravilne integracije transgena. Novi pristup ovom problemu je uređivanje baza (od eng. *base editing*). Tipični uređivač baza sastoji se od dva dijela: katalitički onesposobljena nukleaza, npr. nukleaza Cas9 koja specifično veže DNA i enzim koji modificira jednolančanu DNA tako da modificira baze npr. citidinske deaminaze ili adeninske deaminaze (Dimitrievska i sur., 2024). Ovakav sustav ima potencijal za ispravljanje točkastih mutacija pa se koristi u istraživanjima terapija za bolesti uzrokovane točkastim mutacijama poput srpaste anemije. Chu i sur. (2021) korištenjem sustava CRISPR/Cas9 s adeninskom deaminazom ispravili su točkastu mutaciju u genu za  $\beta$ -globinski lanac u 70% stanica *in vitro*. Unatoč određenim ograničenjima kao što je nedovoljna specifičnost tj. deaminacija okolnih baza, uređivanje baza pokazuje potencijal kao vrijedan alat za rješavanje srpaste anemije. U 2024. godini odobrene su dvije genske terapije za srpastu anemiju: Casgevy i Lyfgenia (FDA 2024). Obje terapije koriste pristup *ex vivo* tako da se hematopoetske matične stanice pacijenta transformiraju korištenjem lentivirusnog vektora. Casgevy koristi tehnologiju CRISPR/Cas9 kojom modificira hematopoetske matične stanice tako da i u odrasloj dobi sintetiziraju fetalni hemoglobin (Olalla & Río, 2024). Lyfgenia ne koristi tehnologiju CRISPR/Cas9 već se pomoću lentivirusa u genom ugrađuje modificirani hemoglobin HbA<sup>T87Q</sup> koji djeluje slično kao i odrasli hemoglobin HbA (Parums, 2024).

### **3.2 Vektori u genskoj terapiji**

Svi navedeni načini genske terapije obuhvaćaju unos nukleinskih kiselina u stanicu pomoću vektora. Sama kemijska svojstva i izgled nukleinskih kiselina odnosno njihov negativni naboj i veličina onemogućuju samostalni prolaz kroz staničnu membranu. Osim toga, prije nego što dospiju do stanice, nukleinske kiseline razgrađuju se od strane nukleaza u krvi (Alhakamy i sur., 2021). Zato je za unos nukleinske kiseline u ciljanoj stanicu potrebno odabrati najbolji



vektor. Vektori se mogu podijeliti na virusne i nevirusne. Nevirusni vektori uključuju kationske lipide, polimere i peptide (Nayerossadat i ostali, 2012) te različite organske i anorganske nanočestice (Crespo-Barreda i sur., 2016). Genska terapija koja koristi nevirusne vektore čini samo ~30 % kliničkih istraživanja zbog manjeg stupnja transfekcije (Alhakamy i ostali, 2021) te se rijetko koristi u genskoj terapiji lizosomskih bolesti. Kod lizosomskih bolesti u najvećem broju slučajeva koriste se virusni vektori.

### 3.2.1 Virusni vektori

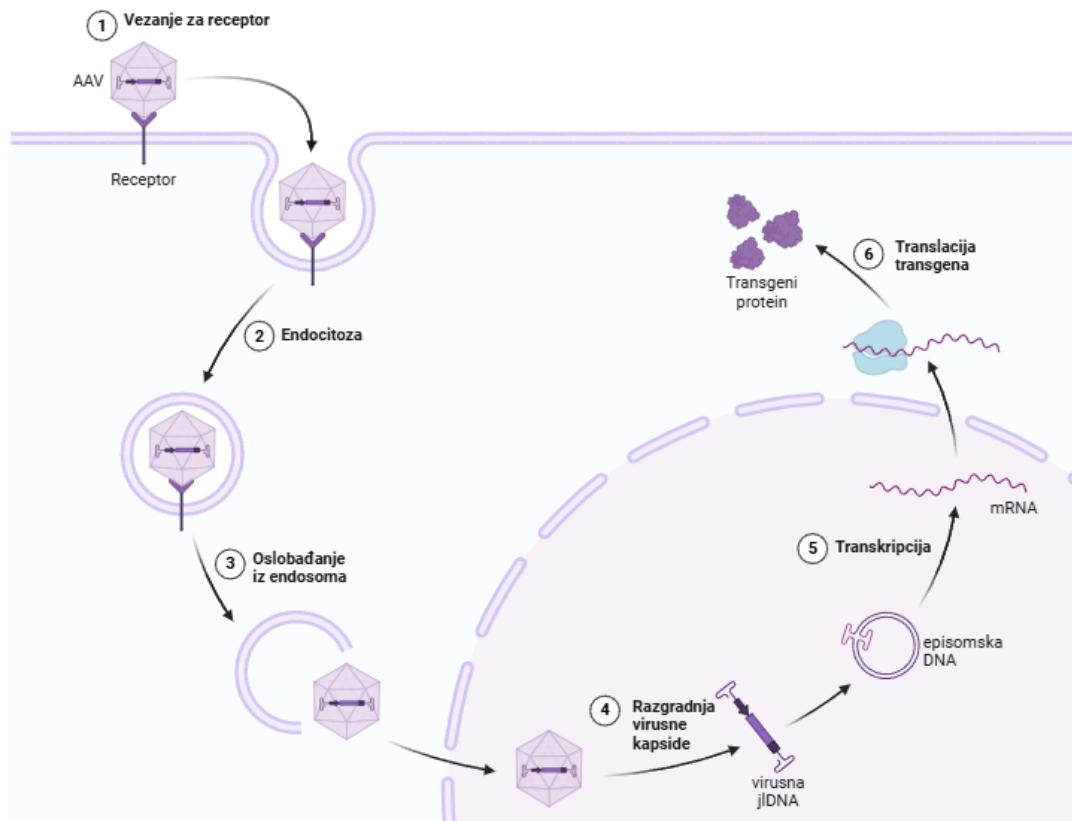
Virusni vektori su virusi modificirani kako bi bili sigurni za kliničku upotrebu. Imaju nekoliko primjena, uključujući liječenje korištenjem genske terapije *in vivo* ili *ex vivo*, liječenje malignih tumora te proizvodnju cjepiva (Merten i Gaillet, 2016). Od početka istraživanja genske terapije, virusi su razmatrani kao mogući vektori zbog njihove sposobnosti da inficiraju ciljane stanice i prenesu svoj genom u citoplazmu ili jezgru zaražene stanice, čime se pokreće proizvodnja virusnih proteina. Razvoj vektora za prijenos gena temelji se na principu uklanjanja jednog ili više gena iz virusnog genoma kako se rekombinantni virus ne bi mogao replicirati. Stoga, za proizvodnju virusnih vektora, te funkcije moraju biti nadoknađene korištenjem ili pomoćnih virusa (HVs od eng. *helper virus*) ili specifično dizajniranih linija stanica za nadomještanje proteina koji nedostaju.

Virusni vektori mogu se podijeliti na vektore koje se ne integriraju u genom i one koje se integriraju (Crespo-Barreda i sur., 2016). Neintegrirajući virusni vektori omogućuju kratkotrajnu ekspresiju terapijskog gena jer ne mogu proći jezgrinu ovojnicu i integrirati se u genom. Prednost ovih vektora je smanjen rizik od insercijske mutageneze, ali zbog kratkog vremena aktivnosti njima nije moguće liječiti kronične bolesti. Često korišteni neintegrirajući virusi su adenovirusi i virusi povezani s adenovirusima (AAV, od eng. *Adeno-associated virus*). Integrirajući virusni vektori mogu se koristiti za liječenje kroničnih bolesti, ali nose veći rizik insercijske mutageneze. Jedan od često korištenih integrirajući virusa je i lentivirus.

Adenovirus je prvi uspješno korišten virusni vektor te se i dalje intenzivno istražuje i koristi tako da je dio ~20% kliničkih istraživanja genske terapije. Rasprostranjenost adenovirusa u populaciji je velika, stoga je većina osoba tijekom života bila izložena i razvila je imunost. To predstavlja prepreku u korištenju adenovirusa kao vektora jer povećava rizik za imunosne

reakcije prilikom liječenja. Problem već postojećeg imuniteta uvelike je smanjen na dva načina, odabirom rijetkih serotipova i konstruiranjem vektora bez gena (od eng. *gutless vector*). Zasad je definirano 57 serotipova adenovirusa kojem je domaćin ljudska stanica (Rauschhuber i sur., 2012) te je utvrđeno da su adenovirusi serotipa 2 i 5 najrjeđi u populaciji stoga su oni odabrani za gensku terapiju (Crystal, 2014). Kako bi se smanjila imunogenost uklonjeni su geni ključni u ranoj fazi replikacije i tako je onemogućeno umnožavanje virusa. Adenovirusni vektori bez gena imaju dvolančani DNA genom koji se sastoji samo od željenog transgena i inverznih terminalnih ponavljajućih sljedova (ITR, od eng. *inverted terminal repeats*). Vektori bez gena predstavljaju treću generaciju adenovirusa korištenih u genskoj terapiji, generacije prije njih imale su sačuvane neke gene koji su uključeni u ranu fazu replikacije. U vektorima prijašnjih generacija postoji niska ekspresija virusnih gena u stanici što je uzrok njihove imunogenosti (Merten i Gaillet, 2016). Uklanjanjem virusnih kodirajućih sekvenci oslobađa se prostor u genomu adenovirusa za unos transgena pa je tako u adenovirusni vektor bez gena moguće unijeti sekvencu do 36 kb što je značajna razlika od ostalih virusnih vektora s kapacitetom 8-9 kb (Lee i ostali, 2017). Glavna prednost adenovirusa je to što inficiraju razne tipove stanica odnosno imaju široki tropizam jer većina ljudskih stanica eksprimira adenovirusni receptor (CAR od eng. *coxsackie-adenovirus receptor*), kao i integrine koji omogućuju unos virusa u stanicu pinocitozom (Wolfrum i Greber, 2013). Iako ovo čini adenoviruse idealnima za gensku terapiju *in vivo*, učinkovita ekspresija adenovirusnih vektora u ljudi doseže vrhunac tijekom prvog tjedan i ograničena je na dva tjedna (Crystal, 2014). Zbog toga su adenovirusni vektori dobri ako se želi postići kratkotrajna ekspresija. Dodatno, kombinirana imunost specifična za adenoviruse zajedno s kratkim vremenom ekspresije idealna je za korištenje adenovirusa kao platforme za razvoj cjepiva. Adenovirusni vektori također se mogu koristiti u terapijama malignih tumora, gdje je cilj poticanje imunskog odgovora specifičnog za tumorske stanice ili izravno uništavanje tumorske stanice (Choi i Yun, 2013).

Virusi povezani s adenovirusima integrirajući su virusi iz porodice *Parvoviridae*. Genom im čini jednolančana DNA, no on ne kodira sve gene potrebne za replikaciju pa su svi virusi AAV ovisni o pomoćničkim virusima (od eng. *helper virus*). Životni ciklus AAV-a je jedinstven jer infekcija AAV-om jedne stanice može rezultirati ili litičkom infekcijom ili trajnom prisutnošću virusne DNA (Slika 1.) u zaraženoj stanici u obliku episomske DNA (Monahan i Samulski, 2000).



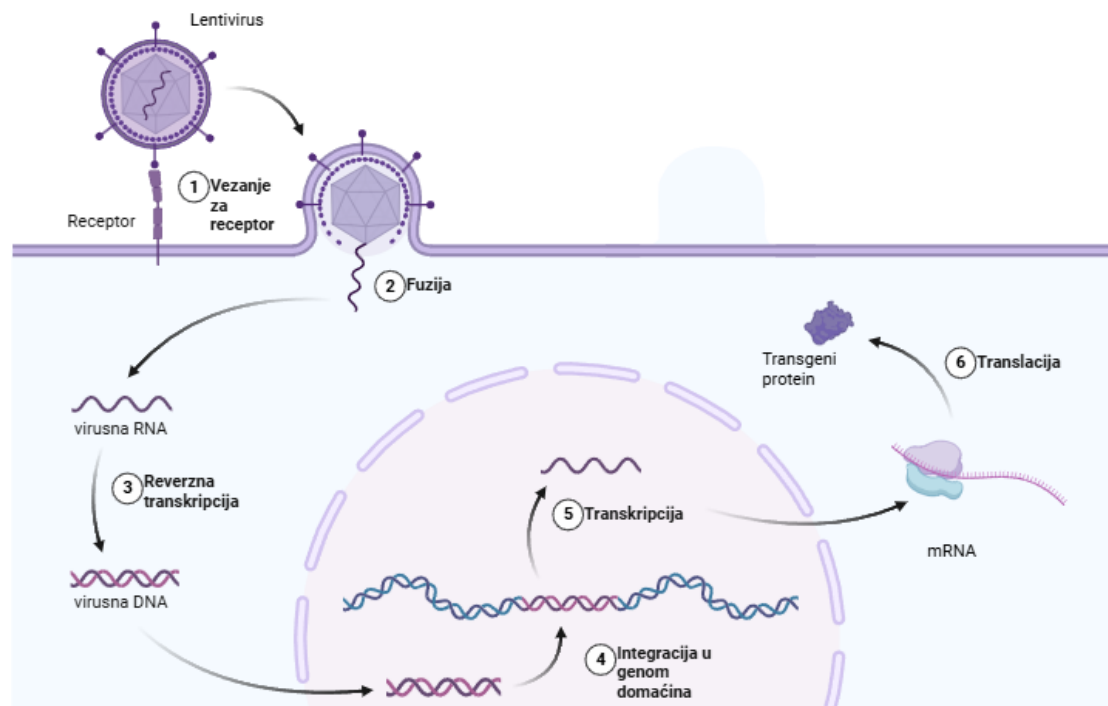
Slika 1. Dodavanje gena pomoću neintegrirajućeg vektora AAV. Izrađeno pomoću BioRendera (<https://www.biorender.com>) prema Dissen i sur. (2012)

Za replikaciju AAV treba pomoćni virus (obično adenovirus ili herpesvirus) kako bi se umnožio i ušao u litičku fazu ciklusa. U odsutnosti pomoćnog virusa DNA AAV-a perzistira u episomskom obliku tj. kao cirkularna dvostruka DNA koja je autonomna u odnosu na domaćinsku kromosomsku DNA (Wang i sur., 2019) ili se, u rijetkim slučajevima, integrira u genom domaćinske stanice. Kod divljeg tipa AAV (wtAAV, od eng. *wild type adeno-associated virus*) u ljudskim stanicama 70% integracija u genom događa se na točno određenom mjestu na kromosomu 19. Specifičnost mjesta integracije ovisi o specifičnoj endonukleaznoj i helikaznoj aktivnosti proteina Rep wtAAV-a koji su uklonjeni iz genoma rAAV pa je ugradnja kod rAAV rijetka i nasumična (Monahan i Samulski, 2000). Iako se smatra da je prednost AAV smanjeni rizik od insercijske mutageneze jer je uglavnom episomski vektor, ipak Russell (2007) sugerira da je integracija dovoljno česta da uzrokuje insercijsku mutagenezu na mišjem modelu. Budući da vektori AAV u potpunosti ovise o staničnim faktorima za integraciju, oni se mogu integrirati

samo na postojeće kromosomske lomove tj. na nasumična mjesta u genomu. Definirano je više od 12 serotipova AAV koji se međusobno razlikuju po vrsti stanica koje inficiraju (Serguera i Bemelmans, 2014). Ono što dodatno pridonosi širokom tropizmu AAV je mogućnost pakiranja rekombinantnog genoma određenog serotipa u kapsidu virusa različitog serotipa (Rabinowitz i sur., 2002).

AAV je vektor s najmanjim kapacitetom za transgen, maksimalna veličina transgena u rAAV je 5 kb. Zbog toga treba pažljivo osmisliti terapijsku transgenu sekvenciju, ali i uključiti regulacijske elemente potrebne za ekspresiju gena, kao što su promotori i poliadenilacijski signal (Wang i sur., 2019).

Lentivirus pripada porodici *Retroviridae* koja je predmet istraživanja zbog sposobnosti da se integrira u genom domaćina. Retrovirusi nose dvije kopije nekodirajućeg RNA genoma zatvorenog u kapsidu. Ulaze u stanice putem specifične interakcije između virusnog omotača i staničnog receptora, što često ograničava ulazak virusa u određene tipove stanica. Nakon ulaska u stanicu, dolazi do reverzne transkripcije virusne RNA i integriranja u genom domaćina (Slika 2.).



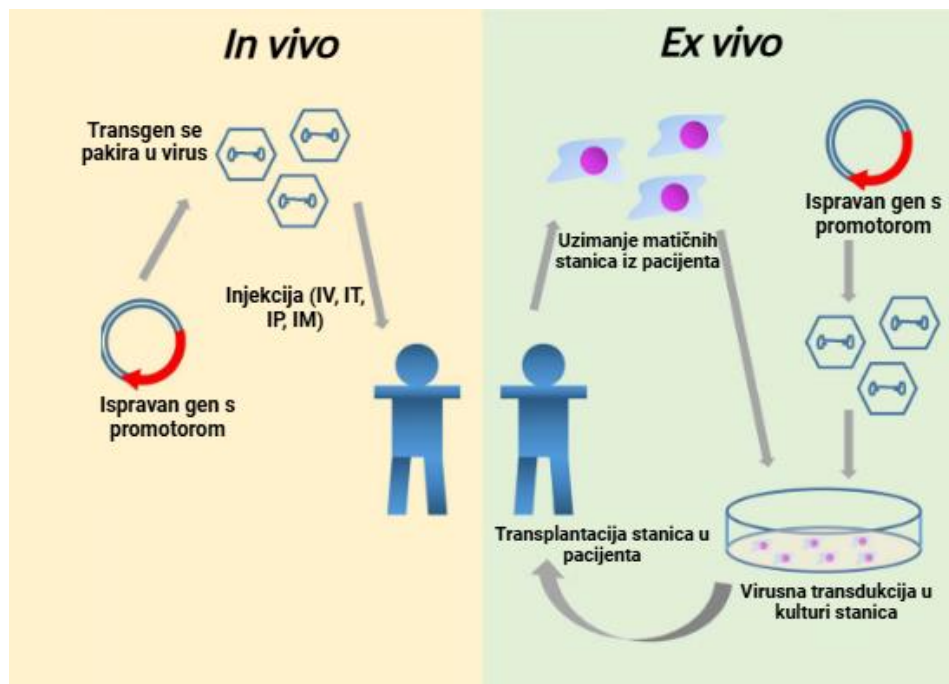
Slika 2. Dodavanje gena pomoću integrirajućeg vektora. Izrađeno pomoću BioRender (<https://www.biorender.com>) prema Dissen i sur. (2012)

Glavna prednost lentivirusa pred ostalim retrovirusima (skupine onkoretrovirusi) je njihov različiti put prema jezgri. Onkoretrovirusi zahtijevaju staničnu diobu jer ne mogu prijeći barijeru jezgrine membrane, dok DNA lentivirusa ulazi kroz nuklearnu pore. Sposobnost lentivirusa da inficiraju stanice koje se mogu i stanice koje se ne mogu dijeliti čini ih dobrim vektorima za razvoj terapija bolesti centralnog živčanog sustava (Serguera i Bemelmans, 2014). S obzirom na to da je *Lentivirus* rod retrovirusa koji uzrokuje smrtonosne bolesti ljudi poput virusa HIV-1 iznimno je važno osigurati da vektor nema mogućnost replikacije. Najveći doprinos povećanju sigurnosti lentivirusa napravili su Zufferey i sur. (1998) konstrukcijom samoinaktivirajućeg vektora HIV-1 s delecijom od 400 nukleotida u 3'-dugom terminalnom ponavljanju (LTR, od eng. *long terminal repeat*). Delecija, koja uključuje TATA-sekvenciju, uklonila je aktivnost promotora LTR-a i tako onemogućila sintezu potpune virusne RNAi stvaranje novih virusnih čestica, ali nije utjecala na ekspresiju transgena *in vitro*. Takav samoinaktivirajući lentivirus također smanjuje vjerojatnost promijenjene ekspresije gena smještenih uz integracijsko mjesto vektora jer isključuje aktivnost promotora LTR-a virusa HIV-1. Važna značajka lentivirusa je i ta što ostaju funkcionalni i s heterolognim virusnim omotačima, što omogućava interakciju s različitim tipovima stanica. Ove čestice nazivaju se pseudotipovi, a izbor omotača koji se koristi za pseudotipizaciju lentivirusa određuje ciljane stanice ili tkivo koje treba transducirati (Mátraí i sur., 2010). Prednosti lentivirusa kao vektora su integriranje u genom domaćina što osigurava dugoročnu ekspresiju gena i veličina transgena kojeg je moguće ugraditi u lentivirus. Maksimalna veličina transgena iznosi do 8 kb što je najveći kapacitet od integrirajućih vektora (Serguera i Bemelmans, 2014). Glavni nedostatak je insercijska mutagenza koja proizlazi iz sposobnosti integriranja u genom domaćina (Crespo-Barreda i ostali, 2016). Insercijska mutagenza odnosi se na moguću aktivaciju onkogeni ili inaktivaciju gena za tumorske supresore zbog blizine insercije transgena.

#### **4. Primjena genske terapije u liječenju lizosomskih bolesti**

Lizosomske bolesti su monogenetske bolesti kojima su neispravni geni već identificirani pa su idealni model za gensku terapiju. Ono što također čini lizosomske bolesti dobrim modelom za gensku terapiju je povlačenje simptoma bolest pri samo 1-10 % normalne koncentracije enzima (Massaro i sur., 2021) pa visoka uspješnost transdukcije nije potrebna kao u drugim bolestima. Razlog ovome je križni popravak (od eng. *cross-correction*), fenomen kod kojeg transducirane

stanice otpuštaju sintetizirane enzime u cirkulaciju pa ih mogu koristiti i ne transducirane, udaljene stanice. Dva su glavna načina primjene genske terapije: *ex vivo* gdje se transduciraju autologne hematopoetske matične stanice i *in vivo* gdje se virusni vektori direktno unose u pacijenta na način koji ovisi o zahvaćenim organima (Slika 3.).



Slika 3. Strategije genske terapije *in vivo* i *ex vivo*. Pristup *in vivo* uključuje pakiranje transgena u virusnu česticu i unos virusne čestice intravenozno (IV), intratekalno (IT), intramuskularno (IM) i intraparenhimno (IP). Pristup *ex vivo* pristup započinje uzimanjem hematopoetskih matičnih stanica, one se uzgajaju u kulturi, transduciraju virusnim vektorom s transgenom i transplaciraju u pacijenta (preuzeto i prilagođeno iz Sawamoto i sur. (2018))

#### 4.1 Primjeri istraživanja primjena genske terapije *ex vivo*

Pristup *ex vivo* temelji se na transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica. Dva su razloga zašto hematopoetske matične stanice mogu isporučiti lizosomske enzime u druge stanice. Prvi je receptor manoza-6-fosfata (M6P od eng. *mannose 6-phosphate*). Ovaj se receptor nalazi na površini većine stanica i veže proteine koji imaju signal M6P. Signal se dodaje tijekom sazrijevanja lizosomskih proteina u Golgijevom aparatu transduciranih stanica. Nakon prepoznavanja, enzim se zbog signala transportira prema lizosomu gdje se signal uklanja i enzim postaje funkcionalan (Gary-Bobo i sur., 2007). Drugi razlog je sposobnost transplantiranih hematopoetskih matičnih stanica ili njihovih potomaka da infiltriraju različita tkiva kako bi doprinijeli lokalnim

populacijama makrofaga i tako postanu izvori potrebnog lizosomskog enzima. Prvotno su se koristile donorske matične stanice koje su proizvodile enzim koji je nedostajao, ali zbog odgovora imunskog sustava na transplantirane stanice ishodi liječenja varirali su i ponekad bili smrtnosni (Peters i Steward, 2003). Nova istraživanja fokusiraju se na gensku terapiju autolognim hematopoetskim matičnim stanicama (HSC-GT, od eng. *hematopoietic stem cell gene therapy*). Princip HSC-GT je prikupljanje hematopoetskih matičnih stanica iz pacijenta, transduciranje ovih stanica s funkcionalnim genom virusnim vektorom i transplantacija ili intravenozni unos transduciranih stanica u pacijenta (Massaro i sur., 2021).

Najčešće korišteni vektor u HSC-GT je lentivirus jer se može integrirati u genom i tako omogućuje dugoročnu ekspresiju.

#### **4.1.1 Metakromatska leukodistrofija**

Metakromatska leukodistrofija (MLD) je rijetki genetski poremećaj nedostatka arilsulfataze A (ARSA) što uzrokuje nakupljanje cerebrozidnog sulfata u stanicama, posebno u živčanom sustavu. Nakupljanje rezultira progresivnim propadanjem živčanog sustava, što dovodi do simptoma poput slabosti mišića, gubitka motoričkih sposobnosti, napadaja i na kraju smrti. Prva istraživanja koristila su retrovirusni vektor i uspješno smanjila nakupljanje cerebrozidnog sulfata u lizosomima stanica jetre i bubrega (Matzner i sur., 2000). Međutim, ovim pristupom poboljšanje patologije živčanog sustava, koji je najviše zahvaćen MLD-om, bilo je samo blago. Biffi i sur. (2004) su uspješno transducirali hematopoetske matične stanice genom *ARSA* koristeći lentivirus. Arilsulfataza A locirana je u mikroglia stanicama CNS-a i makrofazima perifernog živčanog sustava te se koncentracija *ARSA* povećavala s vremenom što znači da je osigurana dugotrajna ekspresija. Kod tretiranih miševa spriječen je razvoj oštećenja motoričkih neurona, deficita u učenju i koordinaciji te neuropatoloških abnormalnosti tipičnih za bolest. Novost u usporedbi s prijašnjim istraživanjima je prekomjerna ekspresija gena *ARSA* ostvarena višestrukom integracijom u DNA hematopoetskih stanica. Autori pretpostavljaju da je za uspješnu terapiju živčanog sustava potrebna visoka koncentracija enzima koji je nedostajao postignuta efikasnom transdukcijom lentivirusom i prekomjernom ekspresijom transgena.

Biffi i sur. (2006) ponovno su proveli slično istraživanje, ali na simptomatskim miševima kod kojih je već došlo do akumulacije supstrata u lizosomima i demijelinizacije živaca. Ovim istraživanjem utvrdili su da je s HSC-GT moguće i ispravljanje postojećih neuroloških deficita poput remijelinizacije živaca te promjene u fenotipu i broju Purkenijevih stanica što je posebno važno jer se kod ljudi MLD vrlo često dijagnosticira tek kada postoje uznapredovali simptomi.

Libmeldy (EMA 2020) je jedina komercijalno dostupna genska terapija za lizosomsku bolest u Europi, a temelji se upravo na unosu *ex vivo* gena *ARSA* u hematopoetske matične stanice.

#### 4.1.2 Gaucherova bolest

Gaucherova bolest uzrokovana je nedostatkom enzima glukozilceramidaze. Zbog nedostatka enzima, dolazi do nakupljanja glukozilceramida. Nedostatak aktivnosti glukozilceramidaze rezultira hepatosplenomegalijom, citopenijama i osteoporozom kod pacijenata. Primarno su zahvaćeni makrofagi koji se pretvaraju u karakteristične Gaucherove stanice, infiltrirajući tkiva i uzrokujući simptome. Dahl i sur. (2015) koristeći lentivirusni vektor ublažili su simptome u miševa s Gaucherovom bolesti specifično ciljajući stanice makrofaga. Korištena su dva različita promotora, promotor fosfogliceratne kinaze (PGK, od eng. *phosphoglycerate kinase*) i promotor gena za CD68. Promotor PGK koristi se zbog visoke aktivnosti u mnogim tkivima i stanicama, pa se njegova aktivnost očekuje u svim hematopoetskim stanicama. Promotor gena za CD68 specifičan je za makrofage pa se ekspresije transgena očekuje primarno u makrofazima. Ekspresija transgena pod promotorom gena za CD68 u makrofagima je 1,7 puta viša nego ekspresija pod promotorom PGK. Ovakav pristup koji specifično cilja stanice omogućuje izbjegavanje prekomjerne ekspresije gena u tkivima i stanicama koje nisu zahvaćene bolešću. S druge strane, miševi tretirani stanicama s promotorom gena za CD68 i dalje su imali akumulacije glukozilceramida u jetri zbog malog broja makrofaga u tom tkivu. Tako je zaključeno da se ovim pristupom ne mogu liječiti multisustavne bolesti. Povećana aktivnost glukozilceramidaze, smanjenja akumulacija supstrata i odsustvo Gaucherovih stanica zabilježeni su kod miševa gdje je samo 6% hematopoetskih stanica proizvodilo enzim.



## 4.2 Primjeri istraživanja primjena genske terapije *in vivo*

Terapije genskog prijenosa *in vivo* temelje se na sposobnosti uvođenja genetskog materijala u zahvaćena tkiva izravnom administracijom u pacijenta. Iako genska terapija *ex vivo* predstavlja dobar terapijski pristup za nedostatke enzima uvelike se oslanja na križnu korekciju. Direktnom primjenom vektora genske terapije *in vivo* moguće je postići veći postotak transdukcije što je posebno važno za nedostatak enzima koji nemaju signal M6P. Nadalje pristup *in vivo* predstavlja manje invazivan pristup liječenju izbjegavajući potrebu za transplantacijom i moguće imunosne reakcije (Massaro i sur., 2021). Najčešće korišten vektor je AAV - neintegrirajući vektor s niskom imunogenosti (Mendell i ostali, 2021). Trenutno je na tržištu dostupno pet genskih terapija koje koriste AAV. Iako ove terapije nisu za lizosomske bolesti postoji veliki broj kliničkih istraživanja usmjerenih prema njima. Terapija *in vivo* vektorom AAV napravila je značajni napredak u liječenju bolesti živčanog sustava. Glavna prepreka liječenja bolesti živčanog sustava je krvno-moždana barijera (BBB, od eng. *blood-brain barrier*) koja onemogućuje prijelaz velikih i hidrofobnih molekula iz krvi u mozak pa se dosad lizosomske bolesti koje zahvaćaju živčani sustav nisu mogle liječiti intravenoznim putem. Gray i sur. (2011) istražili su dostavu gena u živčani sustav vektorom AAV9 intravenoznim putem te utvrdili da AAV9 može prijeći BBB i transducirati neurone i glija-stanice. Otkrili su da intravenozna primjena vektora AAV9 može rezultirati različitom distribucijom u mozgu i drugim organima, što može utjecati na učinkovitost istovremenog liječenja mozga i drugih organa. Ovo otkriće omogućava upotrebu AAV9 za liječenje multisustavnih bolesti poput lizosomskih bolesti jednom, neinvazivnom terapijom.

### 4.2.1 Battenova bolest

Battenova bolest je naziv za skupinu nasljednih bolesti koje su uzrokovane mutacijom u jednom od 13 poznatih gena povezanih s lipofuscinom (geni *CLN*). Zajednička karakteristika je nakupljanje autofluorescentnih lipidnih granula u lizosomima. Primarno je zahvaćen živčani sustav, a simptomi su progresivno pogoršanje vida, motoričkih sposobnosti i mentalnih funkcija, uz skraćeni životni vijek. Simptomi su uzrokovani smrću neuronu zbog nakupljanja lipofuscina, stoga su Cain i sur. (2019) dostavili vektorom AAV9 funkcionalni gen *CLN6* u cerebrospinalnu tekućinu (CSF, od eng. *cerebrospinal fluid*) lumbalne kralježnice. Iako je moguće vektor AAV9

unesti i intravenozno, takav unos za liječenje bolesti živčanog sustava u drugim istraživanjima trebao je veću dozu virusa nego dostava putem CSF-a. Visoke doze virusa, iako liječe simptome u mozgu mogu biti toksične za druge organske sustave pa su se zato Cain i sur. (2019) odlučili na unos putem CSF. Jednokratna niska doza virusa inducirala je stabilnu ekspresiju proteina CLN u mozgu i leđnoj moždini 18 mjeseci nakon tretmana. Tretiranim miševima šansa preživljenja bila je veća 65% od miševa u kontrolnoj grupi, te im je prosječan životni vijek bio sličan onome divljeg tipa. Gen *CLN* dostavljen u ovom istraživanju je gen *CLN6* koji kodira lizosomski transmembranski protein povezan s transportom lipofuscina. Kao transmembranski protein on nema signal M6P pa je očekivano da za ove proteine križni popravak nije moguć. To je potvrđeno u radu - nakupljanje lipofuscina spriječeno je samo u stanicama u kojim je protein CLN6 ekspimiran (odnosno u transduciranim stanicama), ali ne i u susjednim stanicama. Rezultati rada ukazuju na dobru učinkovitost i sigurnost jedne injekcije AAV9-CLN6 u CSF miševa i primata zbog čega je ovaj genski terapijski konstrukt prešao u sigurnosno ispitivanje faze I/II za pacijente s CLN6-Battenovom bolesti.

#### 4.2.2 Pompeova bolest

Pompeova bolest je nasljedna lizosomska bolest uzrokovana mutacijom u genu koji kodira za  $\alpha$ -glukozidaze (GAA od eng. *acid alpha-glucosidase*). Nedostatak enzima uzrokuje nakupljanje glikogena u lizosomima, a posebno su zahvaćeni skeletni mišići, srce, mozak i dišni sustav zbog oslabljenog rada dijafragme. Nedostatak korištenja terapije zamjenskim enzimima je velika količina enzima GAA potrebna za ispravljanje fenotipa i imunogenost GAA (de Vries i sur., 2010). Najveće ograničenje ERT-a je niska stopa unosa enzima u skeletnim mišićima i BBB koja onemogućava unos enzima u moždane stanice. Ideja genske terapije koja bi izbjegla visoke doze enzima korištene u ERT-u je selektivno ciljanje organa koji bi proizvodili i lučili terapijske proteine u krvotok. Visokovaskularizirani organi, poput jetre ili pluća, glavni su kandidati za ovakav genski prijenos (Massaro i sur., 2021).

Puzzo i sur. (2017) istaknuli su da je glavni izazov za gensku terapiju GAA to što većina proteina završava u lizosomima ciljanog organa i nije izlučena. Stoga su konstruirali GAA koji umjesto svog prirodnog sekrecijskog signalnog peptida ima ljudski  $\alpha$ -1 antritripsin sekrecijski signalni peptid. Protein  $\alpha$ -1 antritripsin ima veću stopu sekrecije od divljeg tipa GAA, ovdje korištenog kao

kontrole, pa se očekivala veća koncentracija ovog rekombinantnog proteina u krvi nakon transdukcije jetre. Konstruiran je vektor AAV8 s rekombinantnim proteinom GAA pod promotorom specifičnim za hepatocite. Ovaj vektor je pri niskoj dozi imao veću koncentraciju GAA u plazmi i veću aktivnost u srcu, dijafragmi i skeletnim mišićima nego divlji tip GAA. Sukladno tome 10 mjeseci nakon injekcije došlo je do > 50 % redukcije akumulacije glikogena u svim skeletnim mišićima i normalizacije histološkog fenotipa. U tretiranoj i kontrolnoj skupini zabilježena je smanjena akumulacija glikogena u živčanom sustavu. Iako GAA inače ne može prijeći BBB, pri visokim koncentracijama lizosomskih enzima u krvi moguće je „curenje“ kroz BBB (Ruzo i sur., 2012). Kako bi testirali imunogenost rekombinantnog enzima mjerena je koncentracija imunoglobulina G specifičnog za GAA u plazmi. Miševi tretirani rekombinantnim enzimom nisu razvili antitijela 1 mjesec nakon injekcije dok miševi iz kontrolne skupine jesu. Nakon prvog mjeseca nije primijećena povećana koncentracija antitijela niti u jednoj skupini.

Ovim radom predstavljeno je korištenje jetre kao „tvornice“ enzima za organske sustave s manjom sposobnošću transdukcije. Također, konstruiran je vektor AAV s visokom terapijskom učinkovitošću i pri niskim dozama, smanjenim imunskim reakcijama specifičnim za GAA i učinkovitom sekrecijom i apsorpcijom u velikom broju organa.

### 4.2.3 Mukopolisaharidoza tip 1

Mukopolisaharidoza tip I (MPS I od eng. *mucopolysaccharidosis type I*) je rijetki genetski poremećaj uzrokovan mutacijama u genu koji kodira enzim alfa-L-iduronidazu (IDUA od eng. *alpha-L-iduronidase*). Taj enzim ima ključnu ulogu u razgradnji glikozaminoglikana (GAG od eng. *glycosaminoglycan*), posebno heparanskog sulfata i dermatanskog sulfata. Kada ovog enzima nema ili ne funkcionira zbog mutacija, ti se GAG-ovi nakupljaju unutar stanica, posebno u lizosomima, što dovodi do različitih simptoma. Bolest primarno zahvaća živčani sustav, kosti i srce, a bez tretmana prosječni životni vijek je 12 godina.

Kako bi izbjegli insercijsku mutagenezu integrativnih vektora i problem razrjeđenja neintegrirajućih vektora Ou i sur. (2020) pristupili su liječenju mukopolisaharidoze tipa 1 metodom uređivanja gena. Upotreba CRISPR-a u području lizosomskih bolesti bazira se na umetanju terapijske sekvencije cDNA na različita mjesta unutar genoma, poput albuminskog

lokusa koji djeluje kao sigurno mjesto ekspresije. U istraživanju su korištena dva vektora AAV, prvi vektor AAV nosi sekvencu koja kodira protein Cas9 i gRNA za albuminski lokus, drugi AAV nosi sekvencu za inserciju, gen *IDUA*. Ovdje je jetra također korištena kao „tvornica“ enzima pa je korišten serotip AAV koji primarno inficira hepatocite. Također, protein Cas9 unesen u stanice bio je pod kontrolom promotora specifičnog za jetru,  $\alpha$ 1-antitripsin promotora. Osim u jetri, gdje je očekivano, utvrđena je prisutnost vektora AAV u mozgu i u srcu, ali je, vjerojatno zbog promotora specifičnog za jetru, insert gena *IDUA* i mRNA Cas9 moguće detektirati samo u jetri. To potvrđuje da je enzim IDUA produkt hepatocita iako su i druge stanice bile inficirane vektorom AAV. Grupa koja je primila oba vektora AAV imala je visoku koncentraciju IDUA u plazmi kroz cijelo trajanje istraživanja. Shodno tome aktivnost IDUA bila je visoka, a koncentracija njenih supstrata, glikozaminoglikana, niska u svim testiranim tkivima. Ovaj rad još jednom potvrđuje da visoka koncentracija endogeno proizvedenih enzima u plazmi omogućava njihov prijelaz preko BBB. Značajna prednost pristupa sustavom CRISPR-Cas9 u usporedbi s trenutno dostupnim ERT-om je niska doza potrebna za postizanje terapijskog efekta. Tjedna doza ERT-a iznosi 43.5 mg enzima, dok jetra proizvodi 105 g albumina tjedno. Stoga je dovoljno da se IDUA pod albuminskim promotorom proizvodi s efikasnošću od samo 0,05% u odnosu na albumin kao bi se postigao jednaki terapijski efekt kao korištenjem metode ERT (Ou i sur., 2020). Jednokratna niska doza vektora u usporedbi s tjednim administracijama ERT minimizira toksičnost, olakšava proizvodnju terapije i smanjuje troškove.

Glavna prednost sustava CRISPR-Cas9-AAV u odnosu na tradicionalnu gensku terapiju AAV je njezina sposobnost pružanja potencijalne doživotne terapije. S tradicionalnim vektorom AAV najveći problem je razrjeđivanja vektora što se događa diobama stanica pa ekspresija transgena opada vremenom. Uzrok tome je neintegrirajuća priroda vektora AAV, ali zbog njegove niske imunogenosti i sposobnosti da transformira razne stanice CRISPR-Cas9-AAV predstavlja obećavajuć smjer istraživanja genske terapije (Calcedo i Wilson, 2013).

### 4.3. Izazovi genske terapije u liječenju lizosomskih bolesti

Zajednički problem svih virusnih vektora, integrirajućih ili neintegrirajućih je imunogenost.

Imunogenost virusnih vektora proizlazi iz sposobnosti organizma da prepozna viruse kao opasne i strane čestice te aktivira imunski sustav kako bi ih uklonio. Glavna razlika virusnih vektora od onih divljeg tipa je što se ne mogu replicirati, stoga se ne mogu umnožavati u domaćinu. No, virusni vektori i dalje imaju neke komponente virusa koje imunski sustav prepoznaje, poput proteina kapside i dijelova nukleinskih kiselina. U imunskom odgovoru sudjeluje urođeni imunski sustav koji prepoznaje karakteristične konformacije nukleinskih kiselina, uzrokuje upalnu reakciju i pokreće antivirusni imunitet te stečeni imunski sustav koji prepoznaje proteine kapside ili ovojnice i uzrokuje aktivaciju T- i B-limfocita i stvaranje memorije (Shirley i ostali, 2020).

Reakcija urođenog imunskog sustava je upalna reakcija na mjestu djelovanja genske terapije, uključujući infiltraciju tog tkiva makrofagima i neutrofilima te proizvodnju interferona. Sve zajedno signal je za aktivaciju stečenog imunskog sustava, ali i smanjenu transdukciju stanica virusnim vektorom. Brown i sur. (2007) pokazali su da je transdukcija hepatocita lentivirusom u miševa efikasnija ukoliko je imunska reakcija specifična za interferon  $IFN\alpha\beta$  onemogućena. Smanjena transdukcija kao posljedica imunskog sustava domaćina predstavlja prepreku u liječenju jer stvara potrebu za administracijom visokih doza vektora što negativno djeluje na imunski sustav i predstavlja problem u proizvodnji genske terapije.

Stečeni imunski sustav prvotno reagira na virusne vektore proizvodnjom neutralizirajućih antitijela. Ona se proizvode ukoliko se organizam već susreo s tom virusnom česticom što je česti slučaj za vektore AAV koji se normalno pojavljuju u ljudskoj populaciji i sprečavaju transdukciju stanica. Prije administracije genske terapije AAV uobičajeno se radi test detekcije neutralizirajućih antitijela za serotip virusa koji se koristi kako bi se utvrdilo da li je osoba pogodan kandidat za terapiju (Shirley i ostali, 2020). Problem prethodno postojećeg stečenog imuniteta posebno je izražen kod vektora AAV jer onemogućuje readministraciju terapije koja je često potrebna zbog dilucije ovog neintegrirajućeg vektora u organizmu

Istraživanje složenih reakcija imunskog sustava specifičnog za gensku terapiju otežano je jer se ne može istraživati u uvjetima *ex vivo*, a istraživanje na životinjskim modelima razlikuje se od

rezultata kliničkih istraživanja na ljudima zbog razlike u kompleksnosti imunskog sustava (Shirley i sur., 2020). Dodatno, lizosomske bolesti su heterogene odnosno samo jedna bolest uključuje skupinu raznih mutacija koje različito djeluju na proteine djelomičnim i potpunim inaktivacijama ili promjenama konformacije proteina. Razlike u mutacijama rezultiraju različitim odgovorom imunskog sustava na gensku terapiju što dodatno otežava predviđanje reakcije pacijenta. Osim toga, lizosomske bolesti su rijetke bolesti što otežava prikupljanje sudionika za klinička istraživanja i njihovo financiranje zbog niskog tržišnog potencijala genske terapije.

## 5. Zaključak

Genska terapija predstavlja novi pristup liječenju različitih genetskih poremećaja, pružajući mogućnost dugoročnog terapijskog efekta za bolesti bez terapija ili s neefikasnim terapijama. Pojava genske terapije omogućila je napredak u liječenju lizosomskih bolesti. Prethodno dostupne terapije nisu pružale učinkovit i dugoročni terapijski efekt zbog prepreka u dopremanju u stanice i imunskih reakcija, a najmanji učinak imaju na bolesnike s najtežim simptomima.

Pristup *in vivo* s vektorom AAV predstavlja veliki doprinos u liječenju lizosomskih bolesti koje zahvaćaju živčani sustav, posebno zbog izazova koje uzrokuje krvno-moždana barijera. Do sada je upravo krvno-moždana barijera predstavljala značajan problem u dostavljanju terapije do ciljanih stanica unutar središnjeg živčanog sustava. Specifičan način prepoznavanja lizosomskih proteina putem receptora manoza-6-fosfata omogućuje precizno ciljanje i unos genskog materijala u stanice, uključujući i one koje nemaju integrirane vektore u genomu. Zbog toga je moguće koristiti manje doze vektora, a da se pri tome postigne jednaka učinkovitost terapije, što dodatno poboljšava sigurnost i potencijal za dugoročnu primjenu ove metode.

Daljnja istraživanja trebaju biti usmjerena prema istraživanju reakcija imunskog sustava čovjeka kako bi bolje razumjeli reakcije na gensku terapiju, te unaprijedili učinkovitost smanjenjem imunskog reakcije. Također genetskim inženjeringom potrebno je dizajnirati vektore s preciznom insercijom transgena u genom, kako bi se smanjila insercijska mutagenaza. Da bi genska terapija mogla biti primjenjiva za razne bolesti, nužno je dobro razumjeti mehanizme i genetiku tih bolesti. Razumijevanje mehanizma može nam pružiti učinkovite alate za liječenje, kao što su otkriće signala manoza-6-fosfat i križni popravak omogućili korištenje visoko vaskulariziranih organa kao tvornica za proizvodnju terapija.

Istraživanje genske terapije na primjeru lizosomskih bolesti ima više prednosti: pruža mogućnost izlječenja za pacijente koji trenutno nemaju adekvatne terapijske opcije, omogućava istraživanje principa genske terapije, uključujući razvoj i primjenu virusnih vektora za unos gena. Također omogućuje istraživanje i tretiranje bolesti koje dijele slične mehanizme s lizosomskim bolestima, kao što je Parkinsonova bolest. Istraživanja u ovom području ne samo da otvaraju nove mogućnosti za liječenje već i proširuje naše razumijevanje genetskih bolesti.

## 6. Literatura

- Aigner, A. (2006). Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 12–25. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.12.003>
- Alhakamy, N. A., Curiel, D. T., & Berkland, C. J. (2021). The era of gene therapy: From preclinical development to clinical application. U *Drug Discovery Today* (Sv. 26, Izdanje 7, str. 1602–1619). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.021>
- Aznauryan, E., Yermanos, A., Kinzina, E., Devaux, A., Kapetanovic, E., Milanova, D., Church, G. M., & Reddy, S. T. (2022). Discovery and validation of human genomic safe harbor sites for gene and cell therapies. *Cell Reports Methods*, 2(1). <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100154>
- Ballabio, A., & Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. U *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Sv. 1793, Izdanje 4, str. 684–696). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.001>
- Bennett, C. F., Kordasiewicz, H., & Cleveland, D. W. (bez dat.). *Antisense Drugs Make Sense for Neurological Diseases*. <https://doi.org/10.1146/annurev>
- Biffi, A., Capotondo, A., Fasano, S., Del Carro, U., Marchesini, S., Azuma, H., Malaguti, M. C., Amadio, S., Brambilla, R., Grompe, M., Bordignon, C., Quattrini, A., & Naldini, L. (2006). Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3070–3082. <https://doi.org/10.1172/JCI28873>
- Biffi, A., De Palma, M., Quattrini, A., Del Carro, U., Amadio, S., Visigalli, I., Sessa, M., Fasano, S., Brambilla, R., Marchesini, S., Bordignon, C., & Naldini, L. (2004). Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1118–1129. <https://doi.org/10.1172/jci19205>
- Boelens, J. J. (2006). Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2–3), 413–420. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-0258-8>
- Brown, B. D., Sitia, G., Annoni, A., Hauben, E., Sergi, L. S., Zingale, A., Roncarolo, M. G., Guidotti, L. G., & Naldini, L. (2007). In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response

- that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance. *Blood*, *109*, 2797–2805. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10>
- Brusson, M., Chalumeau, A., Martinucci, P., Romano, O., Felix, T., Poletti, V., Scaramuzza, S., Ramadier, S., Masson, C., Ferrari, G., Mavilio, F., Cavazzana, M., Amendola, M., & Miccio, A. (2023). Novel lentiviral vectors for gene therapy of sickle cell disease combining gene addition and gene silencing strategies. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, *32*, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.012>
- Cain, J. T., Likhite, S., White, K. A., Timm, D. J., Davis, S. S., Johnson, T. B., Dennys-Rivers, C. N., Rinaldi, F., Motti, D., Corcoran, S., Morales, P., Pierson, C., Hughes, S. M., Lee, S. Y., Kaspar, B. K., Meyer, K., & Weimer, J. M. (2019). Gene Therapy Corrects Brain and Behavioral Pathologies in CLN6-Batten Disease. *Molecular Therapy*, *27*(10), 1836–1847. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.06.015>
- Calcedo, R., & Wilson, J. M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Frontiers in Immunology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00341>
- Castiello, M. C., Ferrari, S., & Villa, A. (2023). Correcting inborn errors of immunity: From viral mediated gene addition to gene editing. U *Seminars in Immunology* (Sv. 66). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101731>
- Choi, I. K., & Yun, C. O. (2013). Recent developments in oncolytic adenovirus-based immunotherapeutic agents for use against metastatic cancers. U *Cancer Gene Therapy* (Sv. 20, Izdanje 2, str. 70–76). <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.95>
- Chu, S. H., Ortega, M., Feliciano, P., Winton, V., Xu, C., Haupt, D., McDonald, T., Martinez, S., Liquori, A., Marshall, J., Lam, D., Olins, J., Rinaldi, C., Rehberger, K., Lazarra, C., Decker, J., Gantzer, B., Bohnuud, T., Born, D., ... Ciaramella, G. (2021). Conversion of HbS to Hb G-Makassar By Adenine Base Editing Is Compatible with Normal Hemoglobin Function. *Blood*, *138*(Supplement 1), 951. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-150922>
- Crespo-Barreda, A., Encabo-Berzosa, M. M., González-Pastor, R., Ortíz-Teba, P., Iglesias, M., Serrano, J. L., & Martín-Duque, P. (2016). Viral and Nonviral Vectors for In Vivo and Ex Vivo Gene Therapies. U *Translating Regenerative Medicine to the Clinic* (str. 155–177). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800548-4.00011-5>
- Crystal, R. G. (2014). Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy*, *25*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>
- Dahl, M., Doyle, A., Olsson, K., Månsson, J. E., Marques, A. R. A., Mirzaian, M., Aerts, J. M., Ehinger, M., Rothe, M., Modlich, U., Schambach, A., & Karlsson, S. (2015). Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 gaucher disease in mice. *Molecular Therapy*, *23*(5), 835–844. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.16>
- de Vries, J. M., van der Beek, N. A. M. E., Kroos, M. A., Özkan, L., van Doorn, P. A., Richards, S. M., Sung, C. C. C., Brugma, J. D. C., Zandbergen, A. A. M., van der Ploeg, A. T., & Reuser, A. J. J. (2010). High antibody titer in an adult with Pompe disease affects treatment with alglucosidase alfa. *Molecular Genetics and Metabolism*, *101*(4), 338–345. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2010.08.009>



- Dimitrievska, M., Bansal, D., Vitale, M., Strouboulis, J., Miccio, A., Nicolaidis, K. H., El Hoss, S., Shangaris, P., & Jacków-Malinowska, J. (2024). Revolutionising healing: Gene Editing's breakthrough against sickle cell disease. U *Blood Reviews*. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2024.101185>
- Dissen, G. A., McBride, J., Lomniczi, A., Matagne, V., Dorfman, M., Neff, T. L., Galimi, F., & Ojeda, S. R. (2012). *Using Lentiviral Vectors as Delivery Vehicles for Gene Therapy* (str. 69–96). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-533-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-533-6_4)
- Filocamo, M., & Morrone, A. (bez dat.). *Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory testing*.
- Fukuda, T., Ahearn, M., Roberts, A., Mattaliano, R. J., Zaal, K., Ralston, E., Plotz, P. H., & Raben, N. (2006). Autophagy and Mistargeting of Therapeutic Enzyme in Skeletal Muscle in Pompe Disease. *Molecular Therapy*, *14*(6), 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.08.009>
- Gary-Bobo, M., Nirdé, P., Jeanjean, A., Morère, A., & Garcia, M. (2007). Mannose 6-Phosphate Receptor Targeting and its Applications in Human Diseases. U *Current Medicinal Chemistry* (Sv. 14).
- Gieselmann, V. (1995). et Biophysica A~ta Lysosomal storage diseases. U *Biochimica et Biophysica Acta* (Sv. 1270).
- Gray, S. J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S. R., & Samulski, R. J. (2011). Preclinical differences of intravascular aav9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular Therapy*, *19*(6), 1058–1069. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.72>
- Hollak, C. E. M., & Linthorst, G. E. (2009). Immune response to enzyme replacement therapy in Fabry disease: Impact on clinical outcome? U *Molecular Genetics and Metabolism* (Sv. 96, Izdanje 1, str. 1–3). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.10.013>
- Leal, A. F., Espejo-Mojica, A. J., Sánchez, O. F., Ramírez, C. M., Reyes, L. H., Cruz, J. C., & Alméciga-Díaz, C. J. (2020). Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. U *Journal of Molecular Medicine* (Sv. 98, Izdanje 7, str. 931–946). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01935-6>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. U *Genes and Diseases* (Sv. 4, Izdanje 2, str. 43–63). Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
- Massaro, G., Geard, A. F., Liu, W., Coombe-tennant, O., Waddington, S. N., Baruteau, J., Gissen, P., & Rahim, A. A. (2021). Gene therapy for lysosomal storage disorders: Ongoing studies and clinical development. U *Biomolecules* (Sv. 11, Izdanje 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11040611>
- Mátrai, J., Chuah, M. K., & Vandendriessche, T. (2010). Recent advances in lentiviral vector development and applications. U *Molecular Therapy* (Sv. 18, Izdanje 3, str. 477–490). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.319>

- Matzner, U., Harzer, K., Learish, R. D., Barranger, J. A., & Gieselmann, V. (2000). Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. U *Gene Therapy* (Sv. 7). [www.nature.com/gt](http://www.nature.com/gt)
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S. A., Rodino-Klapac, L. R., Goodspeed, K., Gray, S. J., Kay, C. N., Boye, S. L., Boye, S. E., George, L. A., Salabarria, S., Corti, M., Byrne, B. J., & Tremblay, J. P. (2021). Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. U *Molecular Therapy* (Sv. 29, Izdanje 2, str. 464–488). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.007>
- Merten, O. W., & Gaillet, B. (2016). Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches. *Biochemical Engineering Journal*, 108, 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.005>
- Monahan, P. E., & Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Molecular Medicine Today*, 6(11), 433–440. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(00\)01810-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-4310(00)01810-4)
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>
- Olalla, B., & Río, P. (2024). A new breakthrough in genome editing: the story of Casgevy. *Cytotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.06.003>
- Ou, L., Przybilla, M. J., Ahlat, O., Kim, S., Overn, P., Jarnes, J., O'Sullivan, M. G., & Whitley, C. B. (2020). A Highly Efficacious PS Gene Editing System Corrects Metabolic and Neurological Complications of Mucopolysaccharidosis Type I. *Molecular Therapy*, 28(6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.03.018>
- Parenti, G., Andria, G., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy. *Annual Review of Medicine*, 66, 471–486. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-122313-085916>
- Parums, D. V. (2024). Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPRCas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. U *Medical Science Monitor* (Sv. 30). International Scientific Information, Inc. <https://doi.org/10.12659/MSM.944204>
- Peters, C., & Steward, C. G. (2003). Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: An overview of outcomes and practice guidelines. U *Bone Marrow Transplantation* (Sv. 31, Izdanje 4, str. 229–239). <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703839>
- Platt, F. M. (2018). Emptying the stores: Lysosomal diseases and therapeutic strategies. U *Nature Reviews Drug Discovery* (Sv. 17, Izdanje 2, str. 133–150). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.214>
- Platt, F. M., & Jeyakumar, M. (2008). Substrate reduction therapy. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 97(SUPPL. 457), 88–93. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00656.x>
- Puzzo, F., Colella, P., Biferi, M. G., Bali, D., Paulk, N. K., Vidal, P., Collaud, F., Simon-Sola, M., Charles, S., Hardet, R., Leborgne, C., Meliani, A., Cohen-Tannoudji, M., Astord, S., Gjata, B., Sellier, P., Van Wittenberghe, L., Vignaud, A., Boisgerault, F., ... Mingozzi, † Federico. (2017). *Rescue of Pompe*

*disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secretable acid a-glucosidase.*  
<https://www.science.org>

- Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., & Samulski, R. J. (2002). Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *Journal of Virology*, *76*(2), 791–801. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.2.791-801.2002>
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. U *Advanced Drug Delivery Reviews* (Sv. 61, Izdanje 9, str. 746–759). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.004>
- Rauschhuber, C., Noske, N., & Ehrhardt, A. (2012). New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *European Journal of Cell Biology*, *91*(1), 2–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.01.006>
- Russell, D. W. (2007). AAV Vectors, insertional mutagenesis, and cancer. U *Molecular Therapy* (Sv. 15, Izdanje 10, str. 1740–1743). <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300299>
- Ruzo, A., Garcia, M., Ribera, A., Villacampa, P., Haurigot, V., Marcó, S., Ayuso, E., Anguela, X. M., Roca, C., Agudo, J., Ramos, D., Ruberte, J., & Bosch, F. (2012). Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular Therapy*, *20*(2), 254–266. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.220>
- Sawamoto, K., Chen, H. H., Alméciga-Díaz, C. J., Mason, R. W., & Tomatsu, S. (2018). Gene therapy for Mucopolysaccharidoses. U *Molecular Genetics and Metabolism* (Sv. 123, Izdanje 2, str. 59–68). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.12.434>
- Serguera, C., & Bemelmans, A. P. (2014). Gene therapy of the central nervous system: General considerations on viral vectors for gene transfer into the brain. *Revue Neurologique*, *170*(12), 727–738. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2014.09.004>
- Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C., & Herzog, R. W. (2020). Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. U *Molecular Therapy* (Sv. 28, Izdanje 3, str. 709–722). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>
- Solomon, M., & Muro, S. (2017). Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives. U *Advanced Drug Delivery Reviews* (Sv. 118, str. 109–134). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.004>
- van Zundert, B., & Brown, R. H. (2017). Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS. U *Neuroscience Letters* (Sv. 636, str. 32–39). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.059>
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. U *Nature Reviews Drug Discovery* (Sv. 18, Izdanje 5, str. 358–378). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Wolfrum, N., & Greber, U. F. (2013). Adenovirus signalling in entry. U *Cellular Microbiology* (Sv. 15, Izdanje 1, str. 53–62). <https://doi.org/10.1111/cmi.12053>

Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., Zhang, J., & Xia, N. (2020). Methods favoring homology-directed repair choice in response to crispr/cas9 induced-double strand breaks. U *International Journal of Molecular Sciences* (Sv. 21, Izdanje 18, str. 1–20). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186461>

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. U *JOURNAL OF VIROLOGY* (Sv. 72, Izdanje 12).