

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ГЕНСКА ТЕРАПИЈА

14. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Генска терапија

-Дефиниција

- **Генска терапија** представља намеран пренос генетског материјала у хумане соматске ћелије у профилактичке, терапијске или дијагностичке сврхе.
- Ген од интереса се до циљних ћелија испоручује употребом физичке силе или помоћу векторских система (носача) који могу да буду вирусни и невирусни.

Векторски системи који се најчешће користе код сисара	
Вирусни векторски системи Ретровируси Аденовируси Адено асоцирани вирус Херпес вирус Полио вирус Вирус вакциније	Невирусни векторски системи Липозоми који садрже нуклеинску киселину Молекулски коњугати Директна инјекција огољене ДНК Преципитација CaPO_4 Електропорација Убрзање (акцелерација) честица

Генска терапија

-Дефиниција

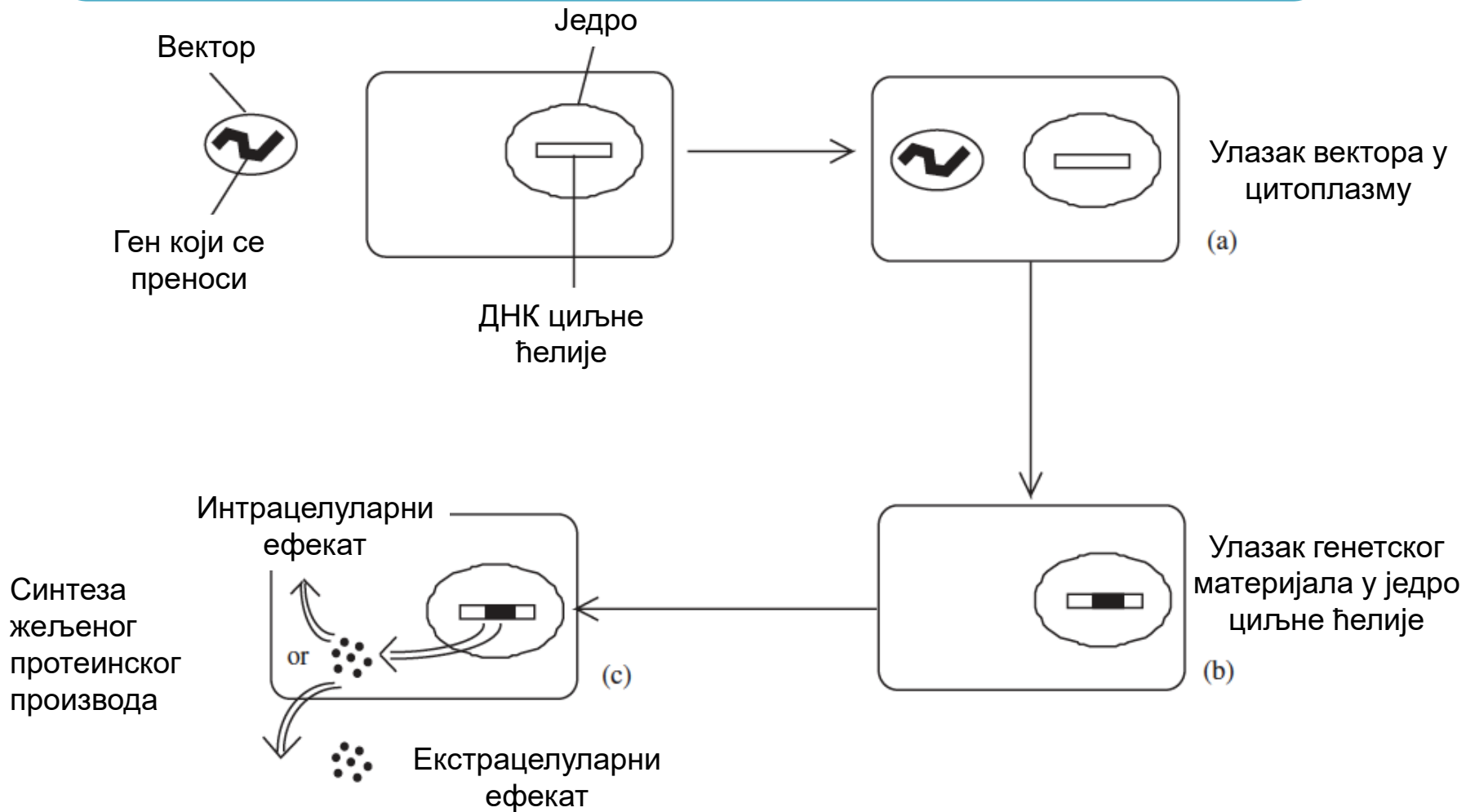
- Циљ генске терапије је кориговање генских дефеката и успостављање физиолошке функције ћелија.
- Већина техника генске терапије омогућава замену дефектних гена генима са очуваном физиолошком функцијом.
- Егзогени гени (трансгени) могу се пренети у соматске (органи) или герминативне (јајна ћелија, сперматозоиди) ћелије примаоца. Приликом трансфера гена у соматске ћелије, настале генетске промене се не преносе на потомство, за разлику од трансфера гена у герминативне ћелије.
- Генска терапија једно је од најважнијих достигнућа медицине, које пружа велике могућности за лечење како наследних, тако и стечених болести.

Генска терапија

-Потенцијална примена

- Овом терапијом постижу се циљне промене на нивоу ћелија, ткива и органа, продужено дејство и побољшање терапијског индекса. Најважније је да се генском терапијом уклања узрок болести.
- Тренутно се спроводе бројна истраживања која испитују ефикасност генске терапије у лечењу:
 - **различитих врста карцинома,**
 - наследних хиперхолестеролемија,
 - хемофилија,
 - тешких комбинованих имунодефицијентних обољења,
 - АИДС-а,
 - цистичне фиброзе,
 - реуматоидног артритиса,
 - *Gaucher*-ове болести,
 - хроничне грануломатозне болести,
 - недостатка пуринске нуклеозидне фосфорилазе,
 - периферне васкуларне болести,
 - спиналне мишићне атрофије,
 - недостатка $\alpha 1$ -антитрипсина.

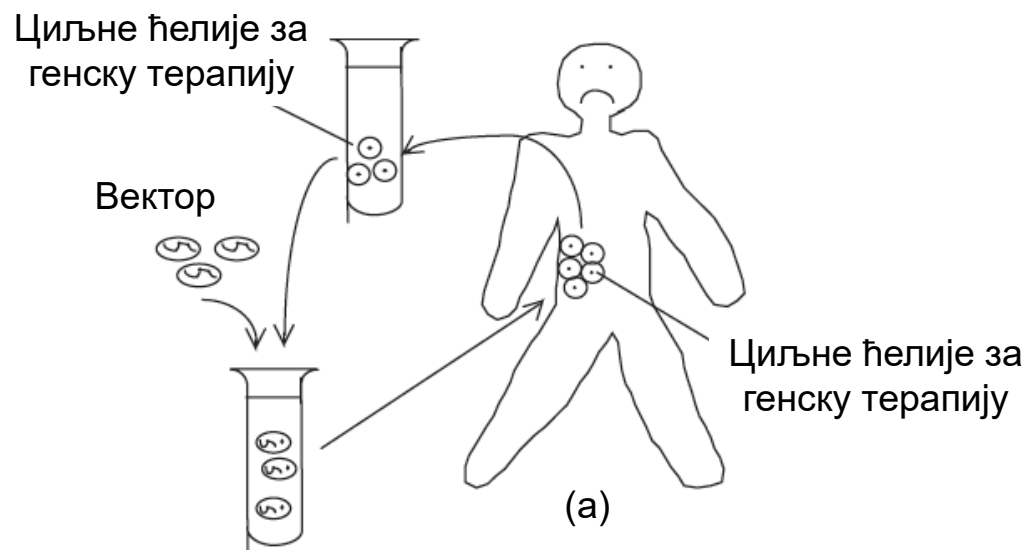
Принцип генске терапије



Принцип генске терапије

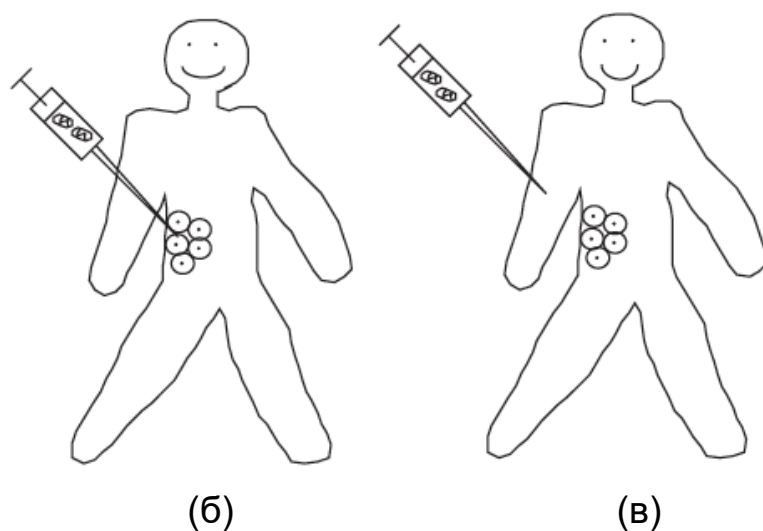
- Генетски материјал се до циљних ћелија преноси употребом вектора. Након што вектор доспе до цитоплазме неопходно је да се транспортује до једра. Улазак генетског материјала у једро циљне ћелије најчешће је праћен његовом интеграцијом у ДНК ћелије. Синтеза жељеног протеинског производа настаје када се страни гени (интегрисани или не) експримирају. Регулаторни елементи пренесеног генетског материјала се дизајнирају према потреби, тако да омогуће задржавање протеинског производа у/ван ћелије.
- Иако тачни механизми преноса генетског материјала до једра и даље нису познати, протоколи за примену генске терапије најчешће садрже једну од три различите стратегије: *in vitro*, *in situ* или *in vivo*.

Протоколи за примену генске терапије



(a) *In vitro* генска терапија подразумева прикупљање циљних ћелија из организма, њихову инкубацију са вектором који садржи нуклеинску киселину и инјектовање модификованих ћелија назад у организам.

(б) *In situ* генска терапија подразумева директно убризгавање вектора у организам, у близини циљних ћелија.



(в) *In vivo* генска терапија подразумева интравенску примену вектора. Вектор се дизајнира тако да препознаје и везује само циљне ћелије. На овај начин нуклеинска киселина се доставља искључиво у жељене ћелије.

(в)

Протоколи за примену генске терапије

-In vitro приступ

- *In vitro* приступ се најчешће употребљава и подразумева прикупљање циљних ћелија из организма, које се затим *in vitro* узгајају и инкубирају са вектором који садржи нуклеинску киселину од интереса.
- Након што вектор испоручи нуклеинску киселину у ћелију, ове генетски измењене ћелије се поново инјектују у организам пацијента.
- Како би процедура била ефикасна, неопходно је да прикупљање ћелија и инјектовање генетски модификованих ћелија у организам буде једноставно.
- *In vitro* приступ се успешно спроводи применом различитих типова ћелија, укључујући хематолошке, матичне, епителне, мишићне ћелије и хепатоците.

Протоколи за примену генске терапије

-In situ приступ

- *In situ* приступ подразумева да се вектор који садржи нуклеинску киселину директно инјектује/примени у циљне ћелије у организму. На пример:
 - директно убризгавање вектора у туморску масу,
 - примена вектора који садрже ген за цистичну фиброзу путем аеросола, како би ген доспео до ћелија респираторног тракта.
- Иако је једноставнији од *in vitro* приступа, није увек изводљиво да се вектор директно *in situ* инјектује у непосредну близину циљних ћелија, јер оне нису увек локализоване на једном одређеном месту (нпр. у случају крвних ћелија).

Протоколи за примену генске терапије

-In vivo приступ

- *In vivo* приступ подразумева развој вектора који препознаје и везује се само за одређене, унапред дефинисане ћелије. Ови вектори се примењују једноставно, најчешће *i.v.* путем, а одговарајућу нуклеинску киселину достављају до циљних ћелија биоспецифичним интеракцијама.
- Иако би овај приступ требало да буде једноставан и специфичан, до сада нису развијени векторски системи за рутинску терапијску употребу, па се и даље интензивно ради на њиховом развоју и унапређењу.
- Како би се омогућила селективна испорука, испитују се:
 - вектори који на својој површини имају антитело које се специфично везује за антиген на површини циљних ћелија;
 - вектори са одређеним хормоном који би се везивао само за ћелије са одговарајућим хормонским рецептором (нпр. ретровирусни вектор који на својој површини има ЕРО).

Избор циљних ћелија, вектора и протокола у генској терапији

- Избор циљних ћелија, вектора и протокола зависи од:
- крајњег циља генске терапије
 - за лечење цистичне фиброзе, где је циљ корекција наследног генетског оштећења - у епителне ћелије пацијента уноси се ген за регулацију цистично фиброзне трансмембранске проводљивости (CFTR ген);
 - за лечење АИДС-а, где је циљ измена функције ћелије - у леукоците пацијента уноси се ген чији протеински производ на неки начин може ометати репликацију ХИВ-а;
 - за лечење генетских обољења попут наследне хиперхолестеролемије - у хепатоците пацијента уноси се ген који кодира рецептор за липопротеин мале густине (LDL);

Избор циљних ћелија, вектора и протокола у генској терапији

- дужине експресије гена
 - код већине пацијената са генетским обољењем потребно је да се обезбеди дуготрајна експресија уметнутог гена, али код појединих пацијената (оболелих од карцинома или код којих се се генска терапија употребљава за испоруку вакцине засноване на ДНК), пожељно је да се обезбеди довољно ефикасна, краткотрајна експресија уметнутог гена;
- регулације експресије гена
 - иако у већини случајева није потребна, у појединим случајевима (нпр. за лечење дијабетеса тип 1) регулација експресије уметнутог гена је неопходна.

Избор циљних ћелија, вектора и протокола у генској терапији

- Иако је код појединих генских терапија само један тип ћелија заправо циљна ћелија (нпр. код хиперхолестеролемије - хепатоцити), у појединим случајевима читав скуп ћелија представља циљне ћелије.
 - На пример, код хемофилије где постоји недостатак фактора коагулације VIII и IX, циљна ћелија може бити било која ћелија примаоца која може да секретује генски производ у циркулацију.
- У случајевима када је то могуће, циљна ћелија се бира на основу практичних разлога: једноставност изоловања и култивисања, способност експресије (и секреције) протеина и њихов полуживот *in vivo*.
 - На пример, миобласти у које су инсертовани гени за фактор IX и хормон раста, могу да експримирају протеин и да га секретују у циркулацију.

Физичка средства за испоруку генетског материјала до циљних ћелија

- Употребом физичке силе једноставно се превазилази ћелијска мембрана и генетски материјал се испоручује до циљне ћелије. Поједини примери за овај приступ су:
 - Шприц са иглом на чијем врху се налази генетски материјал који се преноси до циљног ткива (кожа, солидни тумори, скелетни/срчани мишић и друго);
 - „Генски пиштољ“ који допрема ДНК (обложен наночестицама) до циљних ћелија.
- Овај приступ подразумева и електропорацију, сонопорацију, фотопорацију, хидропорацију и магнетофекцију.

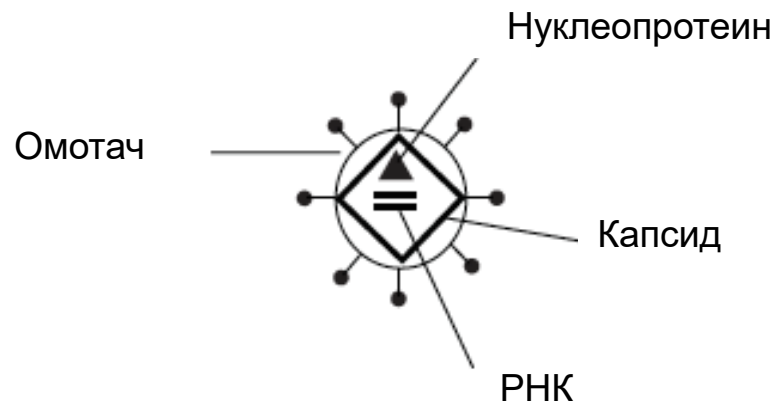
Векторски системи који се најчешће користе код сисара

Вирусни векторски системи	Невирусни векторски системи
Ретровируси	Липозоми који садрже нуклеинску киселину
Аденовируси	Молекулски коњугати
Адено асоцирани вирус	Директна инјекција огољене ДНК
Херпес вирус	Преципитација CaPO_4
Полио вирус	Електропорација
Вирус вакциније	Убрзање (акцелерација) честица

Вирусни вектори у генској терапији

- Ретровируси као вектори

- Ретровирусни вектори су највише испитивани системи за испоруку гена у генској терапији.
- Ретровируси имају омотач, а њихов геном се састоји од једноланчане РНК са 5 - 8 kb. Након уласка у сензитивне ћелије, вирусна РНК се реверзно транскрибује, при чему на крају настаје дволанчана ДНК. Ретровирус се као такав интегрише у геном ћелије домаћина.



Схематски приказ ретровируса

Вирусни вектори у генској терапији

- Ретровируси као вектори

- Способност ретровируса да уђу у различите типове ћелија и да стабилно и дуготрајно интегришу свој геном у геном ћелије домаћина, учинила их је потенцијално погодним векторима за генску терапију.
- Да би ретровируси послужили као вектори за гене, њихов ген за репликацију мора бити замењен егзогеним геном од интереса. Уклањањем овог гена, спречава се његова репликација.
- Ове вирусне честице функционишу као једнократни систем за пренос гена.

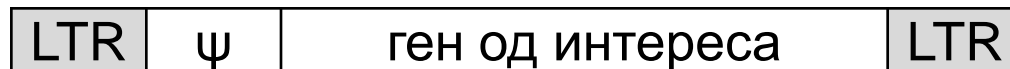
Вирусни вектори у генској терапији

-Ретровируси као вектори

Схематски приказ провирусног генома стандардног ретровируса



Схематски приказ провирусног генома ретровируса који је вектор за ген од интереса



1. *gag* (кодира једро вирусне честице),
2. *pol* (кодира ензим реверзну транскриптазу) и
3. *env* (кодира саставне делове вирусног омотача).

Вирусни вектори у генској терапији

- Ретровируси као вектори

- Ретровируси су погодни за примену у генској терапији јер:
 - су добро проучени и безбедни за употребу;
 - већина њих интегрише своју ДНК само у ћелије које се активно репликују;
 - је ефикасност преноса гена на најосетљивије типове ћелија висока (око 100%);
 - се интегрисана ДНК дуготрајно експримира;
 - се провирусна ДНК интегрише у хромозоме домаћина;
 - инфицирају различите типове ћелија које имају способност деобе;
 - се комплетне копије провирусне ДНК преносе на ћерке ћелије, ако се оригинална ћелија примаоца дели;
 - се могу произвести велике количине ретровирусних честица које немају способност репликације.

Вирусни вектори у генској терапији

- Ретровируси као вектори

- Међутим, поједине карактеристике ретровируса ограничавају њихову примену као вектора у генској терапији:
 - релативно су осетљиви - једноставно се размножавају, али се оштећују накнадним пречишћавањем и концентрисањем, што отежава клиничку употребу;
 - инфицирају само ћелије које имају способност деобе;
 - за улазак у ћелију неопходно је да се на површини циљне ћелије налази одговарајући рецептор за вирус; с обзиром да није позната структура већине њихових рецептора, није могуће претпоставити све ћелијске типове које ће ретровирус инфицирати током генске терапије;
 - пренесени ген ретровирусног вектора има склоност да се насумично интегрише у хромозоме ћелија примаоца, нпр.:
 - интеграција егзогеног гена и гена који има кључну улогу за ћелију може иреверзибилно оштетити њену функцију;
 - интеграција провирусне нуклеинске киселине у места која су у близини протоонкогена може довести до њихове активације.

Вирусни вектори у генској терапији

-Аденовируси као вектори

- Аденовируси су вируси без омотача, средње величине. Њихов генетски материјал је смештен у дволанчану ДНК, а геном им је већи (≈ 35 kb) и сложенији од генома ретровируса.
- У већини случајева, приликом конструисања аденовируса као вектора, уклања се само мали део овог генома. После ћелијске инфекције аденовирусна ДНК је локализована у једру, али се не интегрише у ДНК ћелије домаћина.
- Инфекција аденовирусима изазива благе клиничке симптоме код људи.
- Када се аденовируси користе као вектори дужина експресије гена је од 2 недеље до неколико месеци. Сходно томе да је за лечење генетских обољења потребна дуготрајна експресија гена, ови вектори се морају примењивати чешће.

Вирусни вектори у генској терапији

- Аденовируси као вектори

- Аденовирусни вектори имају бројне предности:
 - ефикасно преносе ген до диференцираних ћелија;
 - једноставно се умножавају;
 - експримирају велику количину жељених гена;
 - релативно су стабилни.
- Међутим, имају и недостатке:
 - високо су имуногени за људе;
 - дужина експресије пренесених гена је варијабилна и најчешће реверзибилна;
 - инфекција одређених ћелија аденовирусима може довести до лизе;
 - инфицирају широк спектар различитих типова ћелија (нису селективни).

Вирусни вектори у генској терапији

-Адено асоцирани вирус

- Адено асоцирани вирус (енгл. *adeno-associated virus*, AAV) је веома мали, једноланчани ДНК вирус, чији се геном састоји од само два гена.
- Репликује се искључиво у присуству аденовируса (или других вируса), односно нема способност самосталног умножавања.
- У ове вирусе могу се увести само релативно мали гени који се могу пренети до ћелија без способности деобе.
- Дуготрајно експримирају пренесени генетски материјал, а за разлику од аденовируса, нуклеинска киселина се интегрише у геном ћелије примаоца.
- Поред поменутих вируса, испитује се и употреба херпес, синдбис и многих других вируса као вектора у генској терапији.

Производња вирусних вектора

- Основни поступци за производњу вирусних вектора у терапијске сврхе:
 - иницијална пропација вируса у одговарајућим анималним ћелијским линијама,
 - жетва ћелија инфицираних вирусом,
 - пречишћавање и
 - формулација.
- Приступи у производњи разликују се за аденовирусне и остале вирусне векторе.

Невирусни вектори у генској терапији

- Иако тренутно преовлађују вирусни системи за доставу гена, велики број клиничких испитивања користи невирусне системе за испоруку гена. У невирусне векторе убрајају се: "огољена" ДНК и хемијски синтетисани носачи.
- Предности невирусних система испоруке гена су:
 - одсуство/ниска имуногеност;
 - једноставнија производња;
 - терапијски ген се не интегрише у хромозом домаћина, чиме се елиминише могућност да се измене есенцијални гени или да се активирају онкогени домаћина.
- Најзначајнија техничка ограничења и недостаци невирусних вектора су:
 - неадекватан трансфер гена;
 - реверзибилна, често краткотрајна експресија.

Невирусни вектори у генској терапији

- "Огољена" плазмидска ДНК

- У истраживању из 1990. године први пут је показано да се огољена плазмидска ДНК експримира у мишићним ћелијама мишева након *i.m.* примене. Ген од интереса је био ген за β -галактозидазу, а забележена експресија β -галактозидазе била је свега 1 - 2%. Битно је напоменути да се ДНК није интегрисала у хромозоме ћелије домаћина. То је довело до развоја ДНК вакцине која стимулише цитотоксични одговор Т-лимфоцита.
- Иако се до овог истраживања претпостављало да ћелије домаћина неће преузети и експримирати огољену ДНК примењену код животиња, након добијених резултата прописан је опрезнији приступ у погледу присуства слободне ДНК у биофармацеутским производима.

Невирусни вектори у генској терапији

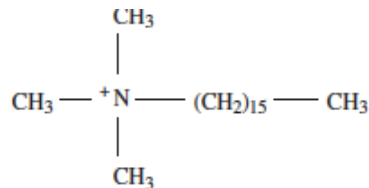
-Подела хемијских система

- Невирусни хемијски системи за испоруку нуклеинских киселина могу бити:
 - Неорганске наночестице различитих величина и облика. Најчешће се користе калцијум сулфат, силика-гел, злато, угљенични нанотубули и фулерени.
 - Синтетски/природни биоразградиви системи попут пептида, катјонских липида, катјонских полимера, липидних наноемулзија и наночестица.
- Међутим, постоје и коњугати:
 - ДНК/катјонских липида (липоплекси);
 - ДНК/катјонских полимера (полиплекси);
 - ДНК/катјонских полимера/катјонских липида (липополиплекси).

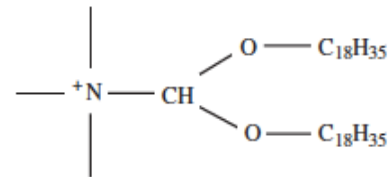
Невирусни вектори у генској терапији

-Липоплекси

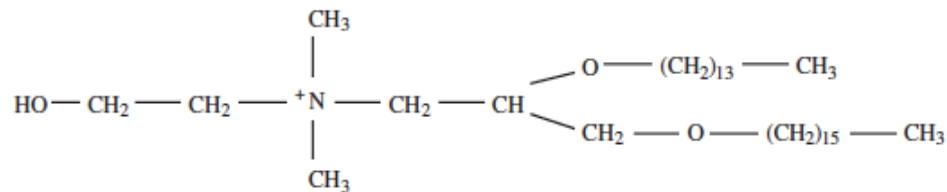
- Липоплекси су састављени од катјонских липида и ДНК.
- Катјонски липиди се састоје од:
 - позитивно наелектрисане хидрофилне главе,
 - хидрофобног репа и
 - структуре која повезује главу и реп.



СТАВ



DOTMA



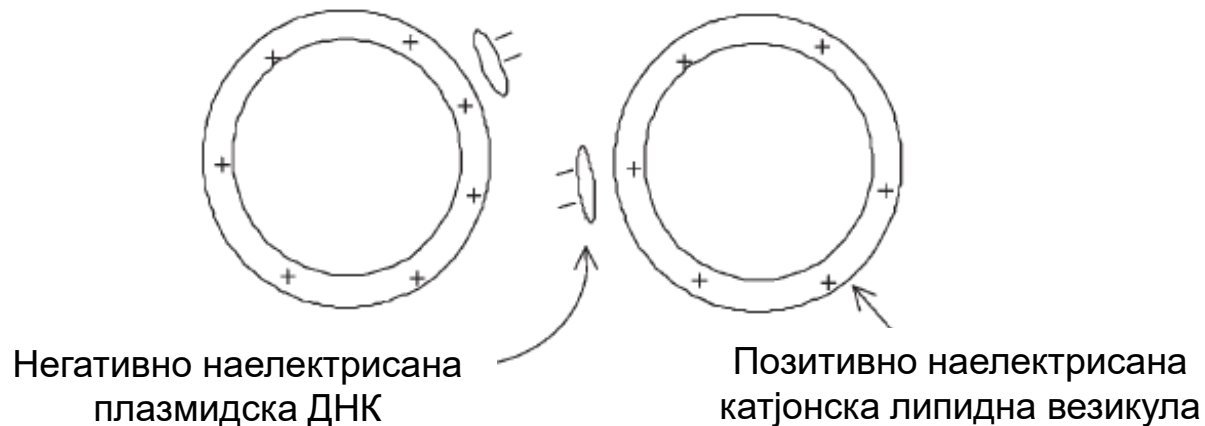
DMRI

Најчешће коришћени катјонски липиди у генској терапији

Невирусни вектори у генској терапији

-Липоплекси

- Како би се формирали вектори, катјонске липидне везикуле у воденим системима спонтано интерагују са плазмидском ДНК. Негативно наелектрисана плазмидска ДНК се у почетку понаша као "мост" између суседних везикула.



Почетна интеракција плазмидске ДНК са катјонским
(позитивно наелектрисаним) везикулама

Невирусни вектори у генској терапији

-Липоплекси

- У интеракцијама између негативно наелектрисане фосфатне групе ДНК и позитивно наелектрисане главе липида брзо настаје сложен тродимензионални решеткасти систем састављен од спљоштених везикула (од којих су неке највероватније оштећене) испреплетаних плазмидском ДНК, који се назива липоплекс.
- Функција таквих носача је да:
 - стабилизују ДНК,
 - физички заштите ДНК (нпр. од серумских нуклеаза) и
 - у идеалном случају измене интеракцију са биолошким системом (нпр. помоћ у усмеравању ДНК ка одређеним или удаљеним типовима ћелија).

Невирусни вектори у генској терапији

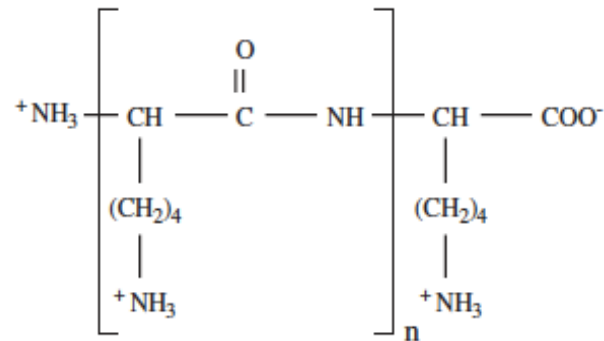
-Липоплекси

- Процес формирања липоплекса није једноставно контролисати, па различите серије произведене под наизглед идентичним условима не морају бити структурно идентичне.
- Такође, резултати *in vitro* испитивања липоплекса нису у потпуној корелацији са резултатима *in vivo* испитивања. Због тога је неопходно спровести већи број истраживања како би се обезбедила рационална употреба липоплекса у генској терапији.

Невирусни вектори у генској терапији

-Полиплекси

- Полиплекси су састављени од катјонских полимера и ДНК.
- За разлику од катјонских липида, катјонски полимери не садрже хидрофобни део и растворљиви су у води.
- Њихова главна предност је што могу да компресују молекуле ДНК па ефикасније преносе генску информацију.



Структура полилизина, једног од најчешће коришћеног катјонског полимера у генској терапији

Невирусни вектори у генској терапији

-Полиплекси

- Полилизински молекули, због свог позитивног наелектрисања, такође могу формирати електростатичке комплексе са ДНК који се називају полиплекси.
- Најзначајнији недостаци полиплекса:
 - смањена стабилност у биолошким течностима,
 - кратак полуживот у плазми, јер се брзо уклањају из циркулације.
- Ови недостаци могу се делимично ублажити пегиловањем које продужава полуживот различитих терапијских протеина (нпр. интерферона) у серуму.

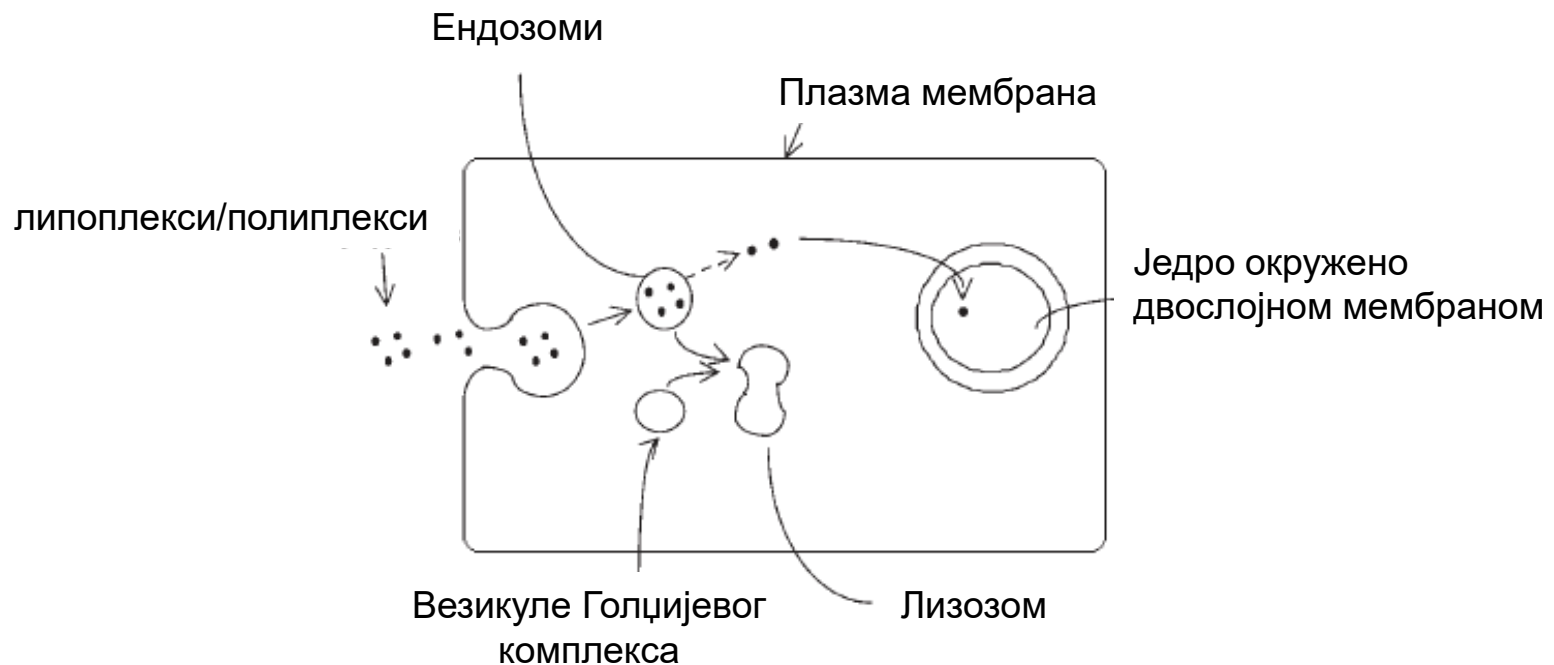
Доспевање невирусног вектора до циљних ћелија

- Како би ефикасно испоручили ген у ћелију, системи за испоруку се сусрећу са различитим биолошким баријерама:
 - пролазак кроз циркулацију;
 - биодистрибуција;
 - допремање до циљне ћелије;
 - улазак у ћелију и испорука до једра.
- Липоплекси и полиплекси штите плазмид од серумских нуклеаза, а њихово позитивно наелектрисање омогућава неспецифичне интеракције са ћелијама (ћелијама крви и васкуларним ендотелним ћелијама) и серумским протеинима.

Доспевање невирусног вектора до циљних ћелија

- Уколико се коњугати примене *i.v.* путем накупљају се у плућима и јетри.
- Усмеравање коњугата до специфичних типова ћелија још увек представља технички изазов, а уградња антитела за специфичне антигене на површини ћелија може повећати њихову селективност.
- Позитивно наелектрисани липоплекси и полиплекси се јонским везама везују за негативно наелектрисане површине еукариотске ћелије. Ове интеракције могу надјачати биоспецифичне интеракције карактеристичне за системе засноване на антителима или рецепторима.
- Међутим, и ови вектори се до циљног ткива/ћелија најефикасније допремају убризгавањем у/пored циљног подручја.

Унос невирусног вектора за испоруку гена у ћелију



Схематски приказ уноса невирусног вектора за испоруку гена у ћелију

Унос невирусног вектора за испоруку гена у ћелију

- Липоплекси и полиплекси улазе у ћелију ендоцитозом (инвагинацијом дела плазма мембране формирају се мале везикуле које се називају ендозоми).
- Ендозоми се затим фузионишу са везикулама Голџијевог комплекса, формирајући лизозоме.
- Хидролитички лизозомални ензими Голџијевог комплекса разграђују садржај лизозома, а део плазмидске ДНК избегава лизозомску деструкцију уласком у цитоплазму (поједини плаزمиди након тога улазе у једро).
- Молекуларни механизми одговорни за излазак плазмидске ДНК из ендозома и њен улазак у цитоплазму само су делимично разјашњени.

Унос невирусног вектора за испоруку гена у ћелију

- У циљу повећања изласка плазмидске ДНК из ендозома истраживани су многи приступи.
- Један од њих подразумева уградњу одабраних хидрофобних (вирусних) пептида у системе за испоруку гена. Многи вируси природно улазе у анималне ћелије ендоцитозом посредованом рецепторима. Ови вируси су развили ефикасне начине за излазак из ендозома, најчешће деформацијом мембране пептида насталих из протеина вирусног омотача.

Унос невирусног вектора за испоруку гена у ћелију

- Када се део плазмида разгради цитоплазматским нуклеазама, додатно се смањује ефикасност преноса инфекције.
- Плазмидска ДНК долази до једра на два начина:
 - директним уласком, јер услед митозе долази до разградње мембране;
 - транспортом кроз поре, пасивном дифузијом или специфичним транспортним процесима који захтевају енергију.
- Међутим, сматра се да ће само један од 10^4 - 10^5 плазмида преузетих ендоцитозом ући у једро и успешно се експримирати.

Процес производње плазмидске ДНК



- Непосредно пре производње плазмидске ДНК, потребно је синтетисати одговарајући вектор са терапијским геном и увести га у микроорганизам, најчешће *E. coli*.
- Рутинска производња плаزمида у великим количинама подразумева да се микроорганизам у довољној количини култивише ферментацијом, након чега следи екстракција и пречишћавање плазмида. Овај процес је сличан производњи рекомбинантних терапијских протеина.

Процес производње плазмидске ДНК

- Током ферментације се микроорганизми умножавају, а потом и биосинтетишу велике количине плазмида.
- Након ферментације, микроорганизми се сакупљају центрифугирањем/микрофилтрацијом, а после ресуспензије у пуферу, ћелије лизирају додатком NaOH и SDS и ослобађају се плазмиди.
- Детерџенти и висока рН вредност нарушавају зид/мембрану микроорганизама и последично се ослобађа унутарћелијски садржај. Поред жељене плазмидске ДНК, ова смеша садржи и разне нечистоће (остаци ћелијског зида, интактне ћелије, протеини, ДНК, РНК, ендотоксини, метаболити малих молекулских маса) које се морају уклонити током *downstream* процеса.

Процес производње плазмидске ДНК

- Након лизе ћелија, додаје се раствор за неутрализацију (калијум ацетат) који потпомаже формирање агрегата геномске ДНК и комплекса SDS-протеин, који се накнадно уклања центрифугирањем или филтрацијом.
- Плазмиди се преципитирају додатком одговарајућег растварача (изопропанола или етанола), а након ресуспензије, пречишћавају хроматографијом.
- Главни контаминанти који још увек могу бити присутни су РНК, фрагменти геномске ДНК, делови плаزمиде и ендотоксини.
- Гел-филтрацијом ефикасно се уклањају контаминанти који се по облику/величини разликују од жељеног плазмиде, док се јоноизмењивачком хроматографијом уклањају многи протеини и РНК. Међутим, геномска ДНК и ендотоксини се углавном пречишћавају заједно са плазмидском ДНК.

Процес производње плазмидске ДНК

- Такође, плазмиди се пречишћавају и хроматографијом заснованом на везивању плазида за хроматографске куглице, али је способност везивања плазида веома ниска. Величина пора хроматографских колона је недовољно велика, па је улазак плазида скоро онемогућен, а везивање за површину куглица ограничено.
- Пречишћени плазмиди се анализирају различитим техникама:
 - електрофорезом се испитује контаминација нуклеинским киселинама/протеинима;
 - стандарним тестовима се испитује присуство ендотоксина и стерилност производа.

Производња плазмидске ДНК

-Превазилажење потенцијалних проблема

- Водене суспензије невирусних вектора имају тенденцију да се брзо (након неколико минута или сати) агрегирају, а да би се овај проблем превазишао у клиничким испитивањима, вектори се формулишу непосредно пред примену.
- Међутим, у току су истраживања чији је циљ идентификација помоћних супстанци или формулација који би повећали стабилност вектора.
- Једна од опција је смрзавање јер је смрзнута формулација отпорна на агрегацију изазвану агитацијом. Са друге стране, замрзавање, посебно споро, само по себи индукује агрегацију, која се може умањити уколико се у те сврхе користи течни азот.
- Поједина истраживања показују да криопротектанти и различити шећери (глукоза, сахароза и трехалоза) помажу у спречавању агрегације.

Генска терапија и генетске болести

- Спор развој генске терапије последица је бројних фактора:
 - за веома мали број генетских обољења је идентификован и проучен ген одговоран за њихов настанак;
 - ниједан од вектора прве генерације за испоруку гена није се показао у потпуности задовољавајућим;
 - поједина генетска обољења су сложена и у њихов настанак је укључено неколико типова ћелија, а у пракси је показано да је тешко увести ген од интереса у све "погођене" ћелије;
 - регулација нивоа експресије пренесених гена је проблематична и захтевна;
 - фармацеутске компаније су више заинтересоване за примену генске терапије код болести са већом преваленцом (попут карцинома).

Генетска обољења за која је идентификован дефектни ген

Обољење	Дефектни ген	Обољење	Дефектни ген
Хемофилија А	Фактор VIII	Хемофилија Б	Фактор IX
Таласемија	β -глобин	Српаста анемија	β -глобин
Цитрулинемија	Аргиносукцинат синтетаза	Фенилкетонурија	Фенилаланин хидроксилаза
<i>Niemann-Pick</i> -ова болест	Сфингомилаза	Болест урина као јаворов сируп	Разгранат ланац α -кето кис. дехидрогеназе
Наследна хиперхолестеролемија	LDL рецептор	Тирозинемија	Фумарилацидоацетат хидроксилаза
Емфизем	α 1-антитрипсин	Фукозидоза	α -L-фукозидаза
Мукополисахаридоза тип I	α -L-идуронидаза	Мукополисахаридоза тип VII	β -глукуронидаза
<i>Gaucher</i> -ова болест	Глукоцереброзидаза	Цистична фиброза	CFTR ген
Дефицит складиштења гликогена тип 1A	Глукоза-6-фосфатаза	Галактоземија	Галактоза-1-фосфат уридил трансфераза
Тешка комбинована имунодефицијенција	Аденозин деаминаза	<i>Reye</i> -ов синдром	Орнитин транскарбаминаза
Дефицијенција адхезионих леукоцита	CD18		

Генска терапија и генетске болести

- хемоглобинопатије

- Генска терапија се најпре испитивала на хемоглобинопатијама (нпр. српаста анемија и таласемија), јер су ова генетска обољења прва окарактерисана на молекуларном нивоу.
- Дефектни ген се налази на α - или β -ланцу хемоглобина, па је уклањање или замена циљних ћелија релативно једноставна.
- Међутим, у пракси то није било тако једноставно, јер је неопходна и специфична регулација експресије гена, што превазилази тренутне могућности технологије генске терапије.
- *Zynteglo*® (2019. год.) је једнократна терапија замене гена која циља главни узрок β -таласемије, намењен за употребу код пацијената старијих од 12 година.

Генска терапија и генетске болести

- хемоглобинопатије

- Лек омогућава синтезу протеина β -глобина код пацијената додавањем копија модификованог гена за β -глобина у HSC пацијената трансдукцијом аутологних CD34⁺ ћелија помоћу лентиглобинског вирусног вектора BB305.

Генска терапија и генетске болести

- тешка комбинована имунодефицијенција

- Генска терапија се затим испитивала код пацијената са тешком комбинованом имунодефицијенцијом (енгл. *severe combined immunodeficiency*, SCID) који, с обзиром да немају ефикасан имунски систем, морају да буду у стерилном окружењу.
- Један облик SCID-а узрокован је недостатком активности аденозин деаминазе, услед чега долази до дисфункције Т- и Б-лимфоцита. Ензим аденозин деаминаза је кључан у разградњи пуринских нуклеозида, јер катализује уклањање амонијака из аденозина, стварајући инозин, који се најчешће преводи у мокраћну киселину.

Генска терапија и генетске болести

- тешка комбинована имунодефицијенција

- Научници су сматрали да је за лечење ове болести индикована генска терапија, јер у већини метаболичких обољења која настају услед недостатка ензима, експресија ензима чак и у нивоима мањим од физиолошких, може ублажити симптоме болести.
- *Strimvelis*[®] (2016. год.) - ретровирусни вектор који носи кДНК за хумани ген за аденозин деаминазу.

Генска терапија и генетске болести

-Хиперхолестеролемија

- Генска терапија се испитује и код наследне хиперхолестеролемије која је узрокована одсуством (или присуством дефектног облика) рецептора за липопротеин мале густине (LDL). Услед овог поремећаја долази до повећања нивоа холестерола у серуму, који је често праћен васкуларним обољењима.
- Генска терапија овог обољења подразумева да се пацијентима uklони већи део јетре, изолују и *in vitro* узгајају хепатоцити, да се гени пренесу помоћу вектора (ретровируса) и да се "кориговани" хепатоцити путем катетера врате у јетру.
- Накнадна експресија гена такође може бити променљива, па се за корекцију гена у хепатоцитима тренутно *in vivo* испитују вирусни и невирусни вектори.

Генска терапија и генетске болести

-Цистична фиброза

- Генска терапија се испитује и за лечење цистичне фиброзе која настаје услед мутације CFTR гена који служи као хлоридни канал у епителним ћелијама. Наслеђивање мутираног CFTR гена од оба родитеља условљава настанак цистичне фиброзе. Ово обољење захвата бројне органе, али су највише захваћене ћелије респираторног епитела.
- До сада је испитивано неколико вектора за испоруку CFTR гена до епителних ћелија дисајних путева. Као најбољи се показао векторски систем аденовируса и катјонских липозома. Комплементарна ДНК за CFTR се, помоћу аеросола вирусним и невирусним векторима, испоручује до епителних ћелија дисајних путева. Међутим, да би био терапијски значајан, неопходно је да се CFTR ген интегрише и експримира код 5 - 10% третираних пацијената, што у пракси није случај (ниска интеграција, краткотрајна експресија).

Генска терапија и карциноми

- У фокусу већине испитивања везаних за генску терапију нису генетске болести већ карциноми, јер је стопа преживљавања применом конвенционалних терапијских стратегија (хирургија, хемиотерапија/радиотерапија) недовољна, и износи свега 50%.
- Почетна истраживања која су за циљ имала да се генска терапија користи у лечењу/излечењу карцинома, отпочета су 1991. године.

Генска терапија и карциноми

- До сада су развијени различити стратешки приступи:
 - Модификација лимфоцита у циљу повећања њихове антитуморске активности;
 - Модификација туморских ћелија у циљу повећања њихове имуногености;
 - Инсерција гена за супресију у туморске ћелије;
 - Инсерција токсичних гена у туморске ћелије да би се поспешило уништавање туморских ћелија;
 - Инсерција самоубилачких гена у ћелије тумора;
 - Инсерција гена за вишеструку резистенцију на лекове (енгл. *multiple drug resistance*, MDR) у матичне ћелије у циљу заштите од оштећења изазваних хемиотерапијом;
 - Спречавање експресије онкогена у туморским ћелијама, инсертовањем одговарајућег антисенс гена.

Генска терапија и карциноми

- Тренутно се спроводе многобројна испитивања генске терапије за лечење различитих врста карцинома:
 - карцином дојке;
 - колоректални карцином;
 - малигни меланом;
 - тумори централног нервног система;
 - карцином јајника;
 - карцином бубрега;
 - карцином плућа.

Генска терапија и карциноми

- Иако досадашњи резултати истраживања дају наду, генска терапија још увек није успела да пружи адекватан "лек за карцином". Недостатак успеха генске терапије у лечењу карцинома је последица многих фактора:
 - векторски системи нису довољно специфични за циљно место;
 - још увек није довољно разјашњено како ћелије карцинома избегавају имунски одговор;
 - генска терапија је из етичких разлога најчешће испитивана на пацијентима у узнатредовалом, терминалном стадијуму болести (тј. мало/нимало наде за оздрављење ако се лече конвенционалном терапијом), а верује се да би имала боље ефекте уколико се примени у ранијим фазама развоја карцинома.

Генска терапија и карциноми

- Једно од најраније спроведених истраживања у чијем је фокусу била генска терапија, било је увођење гена за TNF у тумор инфилтрирајуће лимфоците (енгл. *tumour-infiltrating lymphocytes*, TIL).
- Хипотеза је била да ће TIL ћелије које се поново унесу у организам продрети у тумор и на месту тумора синтетисати TNF (тамо где је потребно).
- Ова идеја је од тада проширена увођењем гена који кодирају низ имуностимулишућих цитокина (нпр. IL-2, IL-4, IFN- γ и GM-CSF) у TIL.
- Варијације овог приступа подразумевају увођење цитокинских гена директно у туморске ћелије.

Генска терапија и карциноми

- Сматра се да ће поновно уношење ћелија које производе цитокине довести до брзог и ефикасног имунског одговора, тј. убијања ћелија тумора и "вакцинисања" пацијента против рецидива.
- У пракси, ова стратегија подразумева:
 - Изоловање циљних ћелија из организма,
 - *in vitro* култивисање,
 - уношење гена од интереса (углавном помоћу ретровируса као вектора),
 - поновно уношење измењених ћелија у организам.

Генска терапија и карциноми

-Гендицин

- Алтернативна стратегија против карцинома подразумева уношење (уметање) копије гена за сузбијање тумора у ћелије карцинома.
 - На пример, недостатак таквог генског производа, p53, директно је повезан са развојем различитих карцинома код људи. *In vitro* је показано да уметање p53 гена у поједине ћелијске линије које су дефицитарне овим геном, изазива смрт ћелија.
- Потенцијални недостатак овог приступа је да се 100% трансформисаних ћелија мора успешно третирати да би се карцином у потпуности излечио. Са друге стране, генска терапија заснована на супресији тумора у комбинацији са конвенционалним приступима (хемиотерапија/радиотерапија) је можда и најделотворнија.

Генска терапија и карциноми

-Гендицин

- На овом приступу је заснован гендицин, једина генска терапија карцинома која је до данас одобрена, и то само у Кини.
- Индикуван је за лечење карцинома плочастих ћелија главе и врата.
- Гендицин је инжењерисани хумани аденовирус серотип 5 који садржи нативни хумани супресорски p53 ген. Инјектује се директно у тумор, најчешће истовремено уз радиотерапију.
- Производња подразумева пропацију вирусног вектора у одговарајућој анималној ћелијској линији (познатој као *HEK 293*). Након жетве и лизе ћелија, сирови производ се пречишћава филтрацијом и концентрише ултрафилтрацијом.

Генска терапија и карциноми

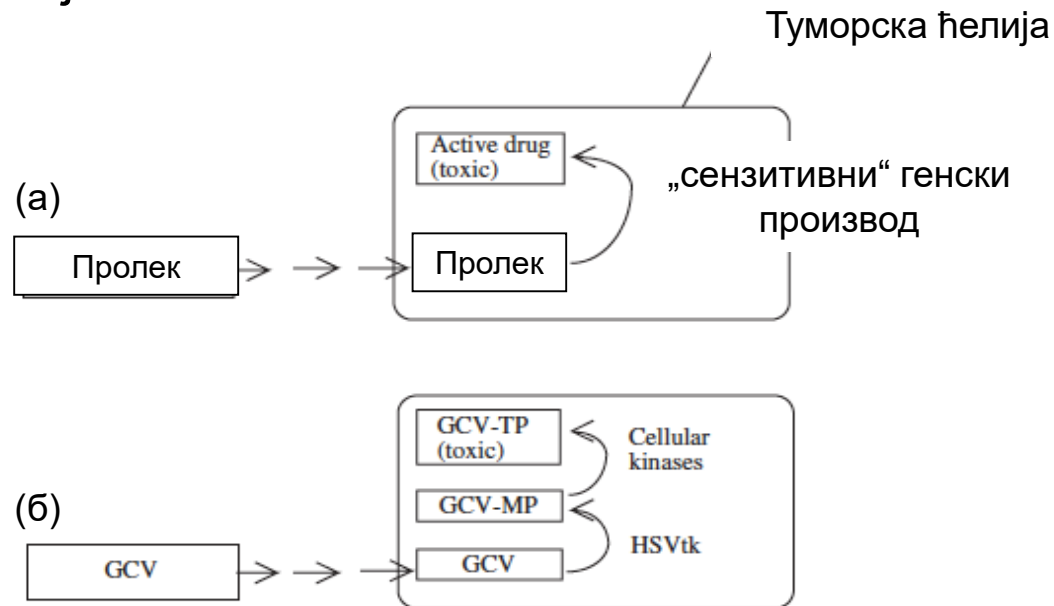
-Гендицин

- Да би се разградила ДНК у производ се додају нуклеазе, а *downstream* процес подразумева вишестепену хроматографију високе резолуције на колони.
- Инјектовање директно у тумор олакшава увођење вектора и експресију p53 у туморске ћелије, што доводи до заустављања ћелијског циклуса и апоптозе.
- Смањење тумора је примећено код 64% пацијената лечених гендицином у комбинацији са радиотерапијом, уз мали проценат нежељених ефеката.

Генска терапија и карциноми

-увођење „сензитивног“ гена у туморске ћелије

- Увођење „сензитивног“ гена у туморске ћелије подразумева концепт у коме ген има способност да унутар ћелија претвори нетоксични лек у токсичну супстанцу која селективно уништава ћелије.



Схематски приказ увођења „сензитивног“ гена у туморске ћелије како би се поспешило њихово селективно уништавање

Генска терапија и карциноми

-увођење „сензитивног“ гена у туморске ћелије

- Као што је приказано (а) ген преводи неактивни пролек у токсичан лек који може убити ћелију.
- Специфичан пример за овај приступ је (б) увођење гена за *Herpes simplex* тимидин киназу (HSVtk) "сензитивног" на ганцикловир (GCV, лек за лечење херпеса).
- Ганцикловир се претвара у монофосфатни облик (GCV-MP), који се даље ендогеним киназама фосфорилише до ганцикловир трифосфата (GCV-TP). GCV-TP индукује ћелијску смрт инхибицијом ДНК полимеразе.
- Потенцијална предност овог система је да се услед дифузије GCV-MP и/или GCV-TP (највероватније преко спојева) поједине суседне ћелије тумора (којима недостаје HSVtk ген), такође убијају. Овај, такозвани „ефекат посматрача“ значи да није неопходна трансдукција свих трансформисаних ћелија у тумору да би терапија била успешна.

Генска терапија и карциноми

-увођење гена у хематопоеетске матичне ћелије

- Генска терапија се користи и за увођење гена у хематопоеетске матичне ћелије да би се оне заштитиле од токсичних ефеката хемиотерапије.
- Већина антитуморских лекова има токсичне ефекте (најчешће уништавају матичне ћелије) који ограничавају примену ефективних доза лека. Уколико би се матичне ћелије заштитиле, или биле резистентне на хемиотерапеутике, примена лека у већим концентрацијама би била могућа. Самим тим, генска терапија би матичним ћелијама пружила вишеструку резистенцију на лекове (тип 1; MDR-1), што би их учинило отпорнијим на хемиотерапију.

Генска терапија и карциноми

-увођење гена у хематопоеетске матичне ћелије

- Овај приступ функционише тако што се из ћелија истискују бројни хемиотерапеутици (нпр. даунорубицин, таксол, винбластин, винкрестин, итд).
- У експерименталним студијама потврђено је да увођење MDR-1 гена у матичне ћелије штити ове ћелије од великих доза таксола.
- Овај приступ се тренутно испитује код пацијената на високим дозама хемиотерапеутика за различите типове карцинома (карцином дојке, јајника, тумор на мозгу).

Генска терапија и АИДС

- Генска терапија се показала ефикасном за лечење великог броја различитих обољења, а не само за лечење наследних генетских болести и карцинома.
- Посебна пажња усмерена је и на испитивање генске терапије за лечење обољења која изазивају инфективни узрочници, посебно интрацелуларни патогени попут ХИВ-а.
- Главни стратешки приступ подразумева увођење гена у ћелије сензитивне на патогене, јер ће производ гена ометати опстанак/репликацију патогена унутар те ћелије. Оваква стратегија се назива „интрацелуларна имунизација“.

Генска терапија и АИДС

- Једна од стратегија за борбу против АИДС-а је увођење гена који кодира измењени (дисфункционални) ХИВ протеин, као што је *gag*, *tat* или *env* у ћелије сензитивне на вирус.
- Наиме, присуство мутираних *gag* облика инхибира вирусну репликацију, највероватније услед мешања мутираних *gag* производа у склапање вирусног једра.
- Додатни приступ подразумева да се на сензитивне ћелије пренесе ген који кодира фрагменте антитела који се везују за протеине присутне на омотачу ХИВ-а. На овај начин се омета склапање вируса у инфицираним ћелијама.

Генска терапија и АИДС

- Научници су синтетисали рекомбинантне ћелије које синтетишу и излучују солубилне облике површинског рецептора за ХИВ ћелије, тј. антиген CD4.
- У *in vitro* студијама је показано да ослобађање солубилних вирусних рецептора у крв везује циркулишуће вирионе, чиме се спречава њихово везивање за сензитивне ћелије.
- Иако су добијени позитивни резултати у *in vitro* студијама, *in vivo* студије се нису показале охрабрујућим.

Непознанице у генској терапији

- Када се говори о генској терапији, не могу се заобићи ни главна питања попут перцепције јавности, етике и економског аспекта.
- Перцепција јавности и етичка разматрања су међусобно повезани. Једноставно модификовање генетског материјала има терапијски потенцијал, међутим, неопходни су стриктни прописи за надгледање употребе ове технологије (тренутно се примењују).
- Без одговарајуће контроле, постоји опасност да би се генска терапија на крају могла користити за „побољшање“ људских карактеристика. Техничко знање за побољшање еугенике данас је стварност, а најважнија заштитна мера, која је већ на снази, има за циљ да спречи развој еугеничког типа.

Непознанице у генској терапији

- Тренутно је генска терапија ограничена на соматске ћелије, јер се оне не преносе на наредне генерације, а манипулација генима хуманих ћелија је строго забрањена.
- Имајући на уму све предности и мане генске терапије, изазов је обезбедити да се манипулација генима код људи користи само у сврхе које су за "опште добро".
- Генска терапија је скупа, баш као и биофармацеутици. Међутим, ако се покаже успешном у лечењу многих, тренутно неизлечивих обољења, однос трошкова и користи увек ће ићи у прилог медицинске употребе ових препарата.

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи