

# Terapia genowa jako metoda leczenia chorób genetycznych

## *Gene therapy as a method of treating genetic diseases*

Artur Cieślewicz, Katarzyna Malesza

Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

### Streszczenie

Ludzki genom zawiera informację niezbędną do biosyntezy wszystkich białek budujących organizm. Oddziaływanie czynników egzogennych i endogennych indukuje mutacje genowe, zmiany epigenetyczne i zaburzenia poziomu ekspresji białek. Może to doprowadzić do powstania białka niefunkcjonalnego, czego następstwem może być choroba genetyczna. Nadzieję na skuteczne leczenie chorób genetycznych daje terapia genowa – nowoczesna metoda, pozwalająca na wprowadzenie do komórek pacjenta genu terapeutycznego, którego ekspresja prowadzi do pojawienia się w komórce niezmutowanego białka. Badania nad terapiami genowymi prowadzone przez ostatnie trzy dekady poskutkowało opracowaniem dla niektórych chorób genetycznych skutecznych metod leczenia, które od niedawna stały się dostępne dla pacjentów. Poniższy artykuł stanowi przegląd wybranych terapii genowych, które uzyskały akceptację Europejskiej Agencji Medycznej. (*Farm Współ 2021; 14: 3-13*) doi: 10.53139/FW.20211401

*Słowa kluczowe: terapia genowa, strimvelis, kymriah, zolgensma, zynteglo, luxturna, onpattro*

### Abstract

The human genome contains the information necessary for the biosynthesis of all human body proteins. As a result of molecular changes taking place in the cells, these genetic instructions are prone to errors. Such errors are called mutations and can disrupt the instruction for protein biosynthesis. This can lead to the formation of non-functional protein, resulting in a genetic disease. The hope for an effective treatment of genetic diseases is given by gene therapy – a modern method that allows to introduce a therapeutic gene into the patient's cells, which expression lead to the biosynthesis of functional non-mutated protein. The research on gene therapy over the past 3 decades has resulted in the development of effective treatments for certain genetic disorders that have recently become available to patients. The following article provides an overview of selected gene therapies approved by the European Medical Agency. (*Farm Współ 2021; 14: 3-13*) doi: 10.53139/FW.20211401

*Keywords: gene therapy, strimvelis, kymriah, zolgensma, zynteglo, luxturna, onpattro*

### Choroby genetyczne

Informacja zawarta w genomie leży u podłoża zmienności międzyosobniczej, stanowiącej o zdolnościach adaptacyjnych. Warunkuje kształtowanie wszystkich cech i prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Ludzki genom składa się w przybliżeniu z 3 miliardów par zasad DNA. Przeważająca część ludzkiego DNA znajduje się w jądrze komórkowym w postaci chromosomów, stanowiąc genom jądrowy (nDNA). Pozostała część DNA znajduje się w mitochondriach w postaci genomu mitochondrialnego (mDNA). Organizm ludzki w prawidłowych warunkach posiada 23 pary chromosomów, które złożone są z DNA występującego w dwóch kopiach [1]. Ludzki

genom zawiera w przybliżeniu 30 000 genów kodujących białka – dzięki alternatywnemu splicingowi każdy z genów przyczynia się do produkcji średnio trzech białek [2]. Co więcej, człowiek może posiadać około 20 000 genów kodujących wyłącznie cząsteczki RNA, takie jak tRNA czy rRNA, będące częścią kompleksu translacyjnego. Geny działają jak swoiste instrukcje potrzebne do tworzenia białek, zarówno tych strukturalnych, transportujących jak i tych potrzebnych do utylizacji szkodliwych substancji w komórkach. Oddziaływanie czynników egzogennych i endogennych indukuje mutacje genowe, zmiany epigenetyczne i zaburzenia poziomu ekspresji białek. Obecność mutacji zaburza biosyntezę białka. Następstwem tego

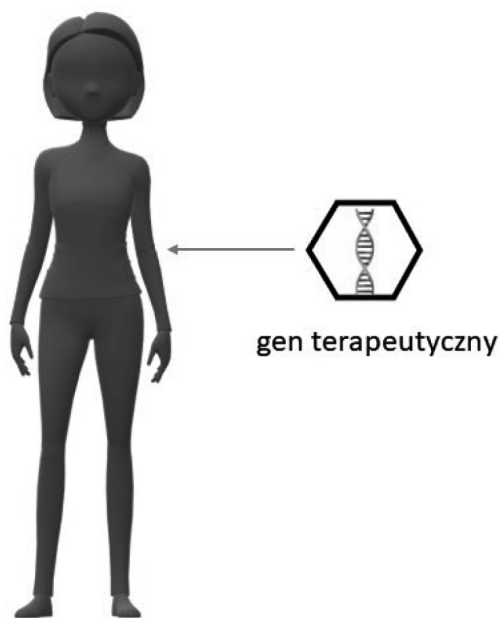
jest powstanie białka nieprawidłowo uformowanego, które ztraca swoje funkcje lub całkowity brak danego białka. Wynikiem takiej sytuacji może być stan chorobowy zwany chorobą genetyczną [1]. Choroby genetyczne mogą być spowodowane mutacją w jednym genie (zaburzenia monogenowe), mutacjami w wielu genach (wieloczynnikowe choroby genetyczne), lub aberracjami chromosomowymi. W przypadku kiedy choroba genetyczna jest rezultatem mutacji w pojedynczym genie, mamy do czynienia z zaburzeniem monogenowym. Choroby te należą do najlepiej poznanych zaburzeń genetycznych biorąc pod uwagę ich proste wzorce dziedziczenia i stosunkowo prostą etiologię genetyczną. Wśród zaburzeń monogenowych wyróżnić można zarówno choroby autosomalne (np. rdzeniowy zanik mięśni) sprzężone z płcią (np. hemofilia, dystrofia mięśniowa Duchenne'a) jak i mitochondrialne (dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera). Dziedziczenie może odbywać się w sposób dominujący (np. hipercholesterolemia rodzinna, achondroplazja) i recesywny (np. mukowiscydoza, fenyloketonuria, anemia sierpowata)[1,3]. Do pojawienia się zaburzeń jednorodnych mogą przyczynić się zarówno mutacje punktowe, jak i bardziej rozległe mutacje, obejmujące zmiany kilku zasad w sekwencji DNA (Liczbańska A, 2006). Mimo, że choroby te głównie wywoływane są przez jeden gen, manifestacja fenotypowa może w różnym stopniu zależeć od dodatkowych wariantów genetycznych w tym samym lub innych genach, zmian epigenetycznych i czynników środowiskowych [4]. Niemalże 90% tych chorób ujawnia się klinicznie przed okresem dojrzewania płciowego [5]. W przypadku chorób wielogenowych, lub też wieloczynnikowych, za rozwój choroby odpowiedzialne są interakcje genetyczno-środowiskowe, które przyczyniają się w różnych proporcjach w przypadku danego pacjenta lub rodziny. Choroby poligenowe powodowane są wynikiem interakcji szeregu niezależnie działających lub oddziałujących ze sobą genów, przy czym należy wziąć pod uwagę, że indywidualny wkład każdego genu może być niewielki. Zaangażowane geny mogą wywierać działanie addytywne lub działać synergistycznie. Pewne kombinacje genów mogą determinować występowanie klinicznie niejednorodnych postaci choroby, co rzutuje na skuteczność terapii. Co więcej, inne przypadki tej samej choroby mogą zależeć całkowicie od czynników środowiskowych [6,7]. Ogromną rolę odgrywa w tym przypadku epigenetyka. U ludzi istnieje wiele zaburzeń, które wykazują wieloczynnikowe wzorce dzie-

dziczenia. Należą do nich między innymi stwardnienie rozsiane, cukrzyca, astma, nowotwory i liczne wady wrodzone [1]. Istnieją pewne cechy charakteryzujące wieloczynnikowe choroby. Przede wszystkim, u ludzi zaburzenia wielogenowe występują znacznie częściej niż zaburzenia jednorodnych. Choroba może wystąpić u dziecka rodziców, którzy fenotypowo są zdrowi. Nie ma jasnego mendlowskiego wzoru dziedziczenia, może istnieć wiele przypadków choroby w jednej rodzinie (rodzinne agregacje zachorowań). Choroba może występować częściej u jednej z płci, a dodatkowo, krewni pierwszego stopnia osób należących do rzadziej chorującej płci mają większe ryzyko zachorowania. Ponadto, dana choroba może częściej dotyczyć konkretną grupę etniczną a wpływy czynników środowiskowych mogą zwiększać lub zmniejszać ryzyko wystąpienia choroby. W tym miejscu można przytoczyć przykład wyżej wymienionej choroby wieńcowej. Istnieje wiele czynników, które zwiększają ryzyko wystąpienia tej choroby, w tym otyłość, cukrzyca typu II, wysokie ciśnienie krwi, wysoki poziom cholesterolu LDL, a nawet choroby periodontologiczne. Chociaż choroba wieńcowa występuje u wielu członków rodzin, nie wykazuje mendlowskich wzorców dziedziczenia i może występować w izolacji, a co więcej, występuje częściej u mężczyzn [8]. Ostatnią grupą chorób genetycznych są te związane z aberracjami chromosomowymi. Aberracje mogą przejawiać się jako zmiany strukturalne (delecje, duplikacje, inwersje, translokacje) bądź ilościowe (monosomia, trisomia), zatem choroba wystąpi w przypadku braku części lub całych chromosomów czy zwielokrotnienia chromosomu. Do najbardziej znanych przykładów aberracji liczbowych zaliczyć można: zespół Downa – choroba występuje, gdy osoba posiada dodatkową, trzecią (trisomia) kopię chromosomu 21; Zespół Turnera – całkowity lub częściowy brak jednego z chromosomów X; Zespół Klinefeltera – obecność przynajmniej jednego dodatkowego chromosomu X. Z kolei do przykładów chorób spowodowanych aberracjami strukturalnymi wliczają się: Zespół Williamsa – brak materiału genetycznego z chromosomu 7; zespół kociego krzyku – delecja krótkiego ramienia chromosomu 5; chromosom Philadelphia – delecja jednego ramienia chromosomu 21 [1]. Choroby o podłożu genetycznym upośledzają czynności życiowe w większym lub mniejszym stopniu. W niektórych przypadkach wady genetyczna są powodem przedwczesnych zgonów, bądź przedwczesnej terminacji ciąży. W celu umożliwienia

życia lub polepszenia jakości życia osób dotkniętych chorobami genetycznymi, nieustannie prowadzone są badania dążące do ulepszenia metod diagnostycznych i produkcji nowych skutecznych terapii.

## Terapia genowa

Nadzieję na skuteczne leczenie chorób genetycznych daje terapia genowa. Pierwsze badania nad terapiami genowymi skupiały się na chorobach genetycznych dziedziczonych recesywnie, których przyczyną były mutacje w pojedynczych genach. Odziedziczenie dwóch recesywnych alleli skutkowało brakiem funkcjonalnego białka i stanowiło przyczynę choroby. Skuteczna terapia genowa polegałaby zatem na wprowadzeniu do komórek pacjenta genu terapeutycznego (najczęściej dzikiego allela genu, który w genomie pacjenta występuje w postaci zmutowanej), którego ekspresja prowadziłaby do pojawienia się w komórce prawidłowego niezmutowanego białka [9]. Odkrycie interferencji RNA – naturalnego procesu, pozwalają-



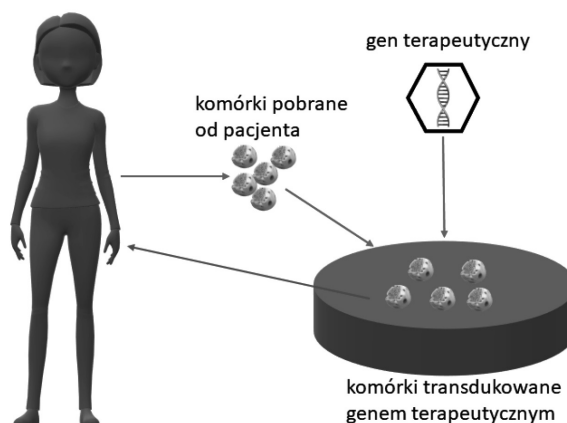
Rycina 1. Terapia genowa *in vivo*. Gen terapeutyczny zapakowany do wnętrza wektora jest podawany bezpośrednio do organizmu pacjenta

Figure 1. *In vivo* gene therapy. The therapeutic gene packaged inside the vector is administered directly into the patient's body

cego wyciszyć ekspresję konkretnego genu przy użyciu specyficznych krótkich cząsteczek RNA (siRNA, shRNA, miRNA) dało potencjalną możliwość leczenia chorób, których przyczyną była obecność zmutowanego allele, kodującego białko wywierające szkodliwy wpływ na organizm (np. choroby dziedziczone na sposób dominujący) [10]. Z kolei najnowsze odkrycia, takie jak CRISPR-Cas9, otwierają przed badaczami perspektywę precyzyjnego edytowania fragmentów naszego genomu, co dałoby szansę na skuteczną terapię chorób wielogenowych [11].

Od strony technicznej, można wyróżnić terapię genową *in vivo* (podanie genu terapeutycznego do organizmu pacjenta) oraz *ex vivo* (transdukcja komórek pobranych od pacjenta i ich późniejszy przeszczep) [12]. Techniki te przedstawiono na Rycinach 1 oraz 2.

Zarówno metody *in vivo*, jak i *ex vivo* wymagają zastosowania wektorów genetycznych, które umożliwiają transport genu terapeutycznego do docelowych komórek [9]. Naturalnymi kandydatami na wektory



Rycina 2. Terapia genowa *ex vivo*. Z organizmu pacjenta pobiera się komórki, które w warunkach laboratoryjnych transdukowane są wektorem genetycznym, przenoszącym gen terapeutyczny. Transformowane komórki przeszczepia się następnie do organizmu pacjenta

Figure 2. *Ex vivo* gene therapy. Cells are collected from the patient's body and transduced in the laboratory with a genetic vector carrying the therapeutic gene. The transformed cells are then engrafted back into the patient's body

Tabela I. Przykłady wektorów genetycznych stosowanych w terapii genowej

Table I. Examples of genetic vectors used in gene therapy

Wektor	Materiał genetyczny	Pojemność [kb]	Zalety	Wady
Adenowirus	dsDNA	8/37*	Infekuje szerokie spektrum komórek  Łatwość uzyskania wysokiego miana	Krótkotrwała ekspresja genu terapeutycznego  Odpowiedź immunologiczna organizmu ogranicza zastosowanie <i>in vivo</i>
Retrowirus	ssRNA	8	Integracja z genomem gospodarza, trwała ekspresja genu terapeutycznego	Infekuje jedynie komórki dzielące się  Niespecyficzna integracja z genomem, ryzyko onkogenezy insercyjnej  Odpowiedź immunologiczna organizmu ogranicza zastosowanie <i>in vivo</i>
Lentivirus	ssRNA	8	Integracja z genomem gospodarza, trwała ekspresja genu terapeutycznego  Możliwość infekowania komórek niedzielących się  Znacznie zredukowane ryzyko onkogenezy insercyjnej	Infekuje bardzo wąskie spektrum komórek
AAV	ssDNA	4,5	Obecność serotypów wykazujących dużą specyficzność względem infekowanej tkanki, co daje możliwość transdukowania konkretnych komórek po podaniu ogólnoustrojowym  Mniejsza immunogenność w porównaniu do innych wektorów wirusowych  Długotrwała ekspresja genu terapeutycznego	Bardzo mała pojemność wektora, niewystarczająca do pakowania dużych genów

\* w zależności od generacji wektora (wektory I i II generacji – 8kb; wektory III generacji – 37 kb)

są wirusy, które efektywnie infekują komórki i wykorzystują je do ekspresji swoich własnych genów i biosyntezy wirusowych białek. Zastąpienie w genomie wirusa jego genów genem terapeutycznym będzie zatem prowadziło do ekspresji tego genu w zainfekowanych komórkach. W Tabeli I przedstawiono wektory wirusowe najczęściej stosowane w terapii genowej. Do transportu genów terapeutycznych wykorzystuje się również liposomy, jednakże ich skuteczność transdukcji jest o wiele niższa w porównaniu do wektorów wirusowych. Wektory liposomowe nie pozwalają również uzyskać trwałej ekspresji genu terapeutycznego.

## Przykłady terapii genowych

W poniższych podrozdziałach omówiono wybrane terapie genowe, które uzyskały akceptację Europejskiej Agencji Medycznej (EMA) i stały się dostępne dla pacjentów. Krótkie podsumowanie omawianych terapii przedstawiono w Tabeli II.

### Strimvelis

SCID-ADA, czyli ciężki złożony niedobór odporności powodowany niedoborem deaminazy adenozynej jest pierwszą chorobą genetyczną, dla której zaprezentowano skuteczne leczenie terapią genową. Genetyczną przyczyną choroby są mutacje recesywne w genie ADA,

Tabela II. Charakterystyka wybranych terapii genowych  
Table II. Characteristic of selected gene therapies

Nazwa terapii	Nazwa choroby	Rodzaj wektora	Rodzaj terapii	Gen terapeutyczny	Data rejestracji terapii	Koszt terapii
Strimvelis	SCID-ADA	retrowirus	<i>ex vivo</i>	ADA	26.05.2016	648 tys. \$
Kymriah (tisagenlecleucel)	Ostra białaczka limfoblastyczna z linii B	lentiwirus	<i>ex vivo</i>	CAR	23.08.2018	475 tys. \$
Zolgensma (onasemnogen abeparwovek)	rdzeniowy zanik mięśni	AAV9	<i>in vivo</i>	SMN	18.05.2020	2,1 mln \$
Zynteglo (betibeglogene autotemcel)	β-talasemia	lentiwirus	<i>ex vivo</i>	β <sup>A-T87Q</sup> -globina	29.05.2019	1,8 mln \$
Luxturna (woretugen neparwovek)	wrodzona ślepota Lebera	AAV2	<i>in vivo</i>	RPE65	22.11.2018	850 tys. \$
Onpattro (patisyran sodu)	amyloidoza dziedziczna	nanocząsteczki lipidowe	<i>in vivo</i>	siRNA komplementarne do regionu 3'UTR genu TTR	27.08.2018	9500 \$/dawkę 345 tys. \$ 450 tys. \$ rocznie

skutkujące brakiem funkcjonalnego enzymu, deaminazy adenozyne. Stanowią one drugą co do częstości przyczynę zespołu SCID. Deaminaza adenozyne jest niezbędna do prawidłowego metabolizmu puryn, jej niedobór skutkuje nagromadzeniem toksycznych ilości adenozyne, 2' deoksyadenozyne i trifosforanu deoksyadenozyne, co upośledza proliferację komórek układu immunologicznego. Powoduje to znaczne obniżenie poziomu limfocytów T, B oraz komórek NK [13].

Pierwsze badanie nad terapią genową SCID-ADA miało miejsce na początku lat 90. Eksperymentalnemu leczeniu poddano dwie pacjentki, z których organizmów pobrano limfocyty T. Pobrane komórki transdukowano wektorem retrowirusowym, przenoszącym dziki allel genu ADA i przeszczepiono z powrotem do organizmów pacjentek. Przeprowadzone leczenie poskutkowało znacznym zwiększeniem poziomu limfocytów T oraz wzrostem aktywności deaminazy adenozyne, udowadniając po raz pierwszy, że terapia genowa może być skuteczną metodą wyleczenia choroby genetycznej [14]. Ponieważ taka terapia, pomimo poprawy funkcjonowania układu immunologicznego nie pozwalała całkowicie skorygować defektu metabolicznego, w kolejnych badaniach genetycznej modyfikacji poddano komórki krwiotwórcze CD34+. Protokół badania obejmował pobranie komórek krwiotwórczych od pacjenta i ich transdukcję wektorem retrowirusowym, przenoszącym dziki allel genu ADA. Przed przeszczepieniem transformowanych

komórek, pacjenta poddawano niemieloablacyjnemu kondycjonowaniu busulfanem w dawce 2 mg/kg masy ciała, w celu zapewnienia modyfikowanym komórkom wstępnej przewagi rozwojowej i stworzenia przestrzeni w szpiku kostnym. Terapii poddano dwójkę pacjentów, którzy nie otrzymali żadnego innego leczenia SCID-ADA. W jej wyniku zaobserwowano znaczny wzrost poziomu limfocytów, poprawę funkcjonowania układu immunologicznego oraz obniżenie poziomu toksycznych metabolitów [15]. Opracowana procedura została wykorzystana w późniejszych badaniach klinicznych, obejmujących w sumie grupę 18 dzieci chorych na SCID-ADA (Tabela III) [16]. Długoterminowa obserwacja pacjentów (mediana 12 lat) wykazała 100%

Tabela III. Podsumowanie badań klinicznych terapii genowej SCID-ADA

Table III. The summary of SCID-ADA gene therapy clinical trials

Oceniany parameter	Przed terapią genową	Po terapii genowej
Liczba pacjentów	18	
Przeżywalność	100%	
Liczba przypadków ciężkich zakażeń	40	15
Częstość występowania ciężkich zakażeń/osobę/rok	1,17	0,17

wskaźnik przeżycia. Ponadto, u 82% pacjentów nie było konieczności ponownego wdrożenia leczenia [17,18]. W rezultacie, 26.05.2016r. opracowana terapia została zarejestrowana przez Europejską Agencję Medyczną pod nazwą Strimvelis [18].

### Kymriah

Ostra białaczka limfoblastyczna to choroba nowotworowa, powodowana niekontrolowanym namnażaniem się prekursorów limfocytów linii B lub T. Jest to najczęściej występujący nowotwór w populacji dziecięcej. Leczenie obejmuje długotrwałą, wielolekową chemioterapię [19,20]. Od niedawna dostępna jest terapia genowa, celowana w ostrą białaczkę limfoblastyczną z linii B [21]. Jest to kolejny przykład terapii genowej *ex vivo*, podczas której z organizmu pacjenta pobiera się limfocyty T, a następnie transdukuje się je wektorem lentiwirusowym, przenoszącym gen CAR, kodujący chimeryczny receptor antygenowy. Receptor CAR zbudowany jest z następujących domen [22]:

- Zewnątrzkomórkowa domena wiążąca antygen
  - fragment mysiego przeciwciała przeciwko antygenowi CD19, obecnemu na powierzchni komórek linii B
- Domena transbłonowa, kotwicząca białko w błonie komórkowej limfocytu T
- Wewnątrzkomórkowa domena 4-1BB (CD37), nasilająca rozprzestrzenianie się i utrzymywanie modyfikowanych limfocytów
- Wewnątrzkomórkowa domena CD3-zeta, odpowiedzialna za inicjowanie aktywacji limfocytów T i aktywność przeciwnowotworową.

Zmodyfikowane w ten sposób limfocyty T po przeszczepieniu do organizmu pacjenta są w stanie rozpoznawać i niszczyć komórki nowotworowe z linii B, wykazujące ekspresję antygeny CD19. Skuteczność terapii potwierdzono w badaniach klinicznych, w tym również u pacjentów z nawrotem choroby

oraz chorych opornych na leczenie blinatomumabem (Tabela IV) [23-29]. 30.08.2017 r. terapia limfocytami CAR-T uzyskała zgodę FDA, stając się pierwszą terapią genową dopuszczoną do stosowania na terenie Stanów Zjednoczonych [30]. Od 23.08.2018 r. leczenie jest również dostępne w Europie pod nazwą Kymriah (tisagenlecleucel) [21].

### Zolgensma

Rdzeniowy zanik mięśni (SMA) to neurodegeneracyjna choroba genetyczna, prowadząca do osłabienia i zaniku mięśni, wynikającego z postępującej degeneracji i nieodwracalnej utraty komórek rogu przedniego rdzenia kręgowego. W zależności od czasu wystąpienia objawów wyróżnia się SMA typu 0 (prenatalnie), typu 1 (do 6 miesiąca życia), typu 2 (pomiędzy 6 a 12 miesiącem życia), typu 3 (po 12 miesiącu życia) oraz typu 4 (u osób dorosłych). Genetyczną przyczyną choroby stanowią mutacje w genie SMN1, prowadzące do usunięcia egzonu 7 z transkryptu, co skutkuje biosyntezą niefunkcjonalnego białka [31]. Białko SMN1 stanowi część kompleksu SMN, pełniącego niezwykle istotną rolę w rozwoju dendrytów i aksonów neuronów ruchowych [32]. Brak funkcjonalnego białka SMN1 prowadzi do utraty neuronów w rdzeniu kręgowym, co uniemożliwia pobudzanie komórek mięśniowych i prowadzi do ich degeneracji.

Terapia genowa stanowi leczenie *in vivo*. Wektor AAV9, przenoszący funkcjonalną kopię genu SMN1 jest podawany drogą dożylną. Badania kliniczne, przeprowadzone na grupie 63 pacjentów z SMA typu I, wykazały znaczną poprawę stanu pacjentów, przejawiającą się m.in. możliwością samodzielnego siedania, przewracania się z pleców na boki, kontrolowania głowy, a w niektórych przypadkach także samodzielnego chodzenia (Tabela V) [33-36]. Z dniem 24.05.2019 r. terapia została zarejestrowana przez FDA pod nazwą Zolgensma (onasemnogene abeparvovec),

Tabela IV. Badania kliniczne terapii genowej ostrej białaczki limfoblastycznej

Table IV. Clinical trials of acute lymphoblastic leukaemia gene therapy

Badanie kliniczne	Całkowity wskaźnik remisji (ORR)	Remisja całkowita z niepełną regeneracją hematologiczną (CRI)
ELIANA	81%	–
Pedi CART19	–	61,3%
CART19 to Treat B-Cell Leukemia or Lymphoma That Are Resistant or Refractory to Chemotherapy	83,3%	–

Tabela V. Badania kliniczne terapii genowej SMA

Table V. Clinical trials of SMA gene therapy

Badanie kliniczne	START	STRIVE	SPR1NT	
	Kohorta otrzymująca wysoką dawkę wektora		I kohorta (2 kopie SMN2)	II kohorta (3 kopie SMN2)
Liczba pacjentów	12	22	14	15
Przeżycie bez konieczności wspomaganego oddychania	100% (12)	91% (22)	100% (14)	100% (14)
Siedzenie bez podparcia przez min. 30 sekund	75% (9)	59% (13)	57% (8)	67% (10)
Kontrola głowy	-	85% (17)	-	-
Samodzielne chodzenie	17% (2)	5% (1/22)	29% (4)	13% (2)

Tabela VI. Badania kliniczne terapii genowej  $\beta$ -talasemiiTable VI. Clinical trials of  $\beta$ -thalassemia gene therapy

Badanie kliniczne	HGB-204		HGB-205	HGB-207		HGB-212	
	Genotyp $\beta^+$ lub $\beta E$	Genotyp $\beta 0$		Pacjenci <12 r.ż.	Pacjenci od 12 do 18 r.ż.	Pacjenci <12 r.ż.	Pacjenci od 12 do 18 r.ż.
Liczba pacjentów	10	8	4	7	6	5	4
Pacjenci nie wymagający transfuzji po 24 miesiącach od leczenia	80% (8)	12,5% (1)	75% (3)	75% (3)*	100% (6)	50% (1)*	100% (3)*

\*wynik cząstkowy – ocenie poddano pacjentów, dla których zakończył się 24-miesięczny okres obserwacji

stając się najdroższym dostępnym leczeniem na świecie (koszt terapii to 2,1 miliona dolarów) [37]. Rok później stosowną zgodę na stosowanie Zolgensmy wydała EMA [38].

### Zynteglo

$\beta$ -talasemia jest przykładem wrodzonej niedokrwistości hemolitycznej, prowadzącej do przedwczesnego rozpadu erytrocytów. Jej genetyczną przyczynę stanowią mutacje recesywne (bardzo rzadko dominujące) w genie HBB, kodującym  $\beta$ -globinę – jedno z dwóch białek, stanowiących podjednostki hemoglobiny. Prowadzi to do całkowitego braku (genotyp  $\beta 0$ ) lub znacznego ograniczenia biosyntezy  $\beta$ -globiny (genotyp  $\beta^+$ ), znacznie obniżając poziom funkcjonalnej hemoglobiny [39]. Opracowując terapię genową dla  $\beta$ -talasemii wykorzystano doświadczenia z badań nad leczeniem zespołu SCID. Zastosowano wektor lentiwirusowy, przenoszący wariant T87Q  $\beta$ -globiny (substytucja treoniny do glutaminy w pozycji 87, nadająca białku właściwość blokowania polimeryzowania hemoglobiny Hbs) [40]. *Ex vivo* transdukowano wektorem

komórki CD34+ pobrane od pacjenta, które następnie przeszczepiono po wykonaniu kondycjonowania busulfanem. Badania kliniczne potwierdziły, że terapia genowa pozwala uzyskać niezależność od transfuzji u poddanych leczeniu pacjentów (Tabela VI) [41-45]. W oparciu o opublikowane wyniki, 29.05.2019 r. terapia uzyskała zgodę EMA i została zarejestrowana pod nazwą Zynteglo (betibeglogene autotemcel) [46].

### Luxturna

Wrodzona ślepota Lebera to warunkowana genetycznie choroba oczu, dotycząca siatkówki. Objawy, takie jak światłowstręt, oczopląs, skrajna dalekowzroczność, pojawiają się wkrótce po urodzeniu. Postępująca choroba prowadzi do całkowitej utraty wzroku. Genetyczną przyczynę stanowią mutację w jednym z kilkunastu genów – najczęściej obserwowane dotyczą CEP20, CRB1, GUCY2D oraz RPE65 [47]. Gen RPE65 koduje białko izomerohydrolazę retinoidową, biorące udział w procesie regeneracji 11-cis retinalu, niezbędnego w procesie widzenia. Mutacje obniżające lub całkowicie wyłączające aktywność

Tabela VII. Terapia genowa wrodzonej ślepoty Lebera – wyniki badania III fazy  
 Table VII. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis - phase 3 trial results

Oceniany parameter (średnia zmiana po 1 roku od terapii)	Grupa badana	Grupa kontrolna
Liczba pacjentów	21	10
Obuoczny test mobilności multiluminacji (MLMT, ang. <i>multi-luminance mobility testing</i> )	1,8	0,2
Próg czułości na światło w pełnym polu [ $\log_{10} \frac{cd.s}{m^2}$ ]	-2,08	0,04
Jednooczny test mobilności multiluminacji	1,9	0,2
Ostrość widzenia	-0,16	0,01

Tabela VIII. Terapia genowa amyloidozy dziedzicznej – wyniki badania klinicznego  
 Table VIII. Gene therapy of hereditary amyloidosis – clinical trial results

Oceniany parameter (średnia zmiana po 18 miesiącach terapii)	Grupa badana	Grupa kontrolna
Liczba pacjentów	137	51
Modyfikowana skala oceny neuropatii +7 (mNIS+7)	-6,03	27,96
Ocena osłabienia neurologicznego (NIS-W)	0,05	17,93
Ocena jakości życia w neuropatii cukrzycowej – kwestionariusz Norfolk	-6,7	14,4
Skala ogólnej niepełnosprawności oparta na podejściu/modelu Rascha (R-ODS)	0,0	-8,9
Test przejścia 10 m (10-MWT) [m/s]	0,077	-0,235
Modyfikowany BMI (mBMI) [ $\frac{kg}{m^2} \cdot \frac{g}{l}$ ]	-3,7	-119,4
Skala oceny objawów autonomicznych COMPASS 31	-5,29	2,24

RPE65 będą prowadziły do akumulacji all-trans retinolu w komórkach nabłonka siatkówki i stopniowego obumierania fotoreceptorów [48]. Dla celów terapii genowej wykorzystano wektor AAV2, przenoszący funkcjonalną kopię genu RPE65. Wektor podawany był bezpośrednio do oka we wstrzyknięciu podsiatkówkowym. W badaniu I fazy na grupie 12 pacjentów, którym podano lek do jednego oka, wykazano, że preparat był dobrze tolerowany, a u wszystkich pacjentów odnotowano subiektywną i obiektywną poprawę widzenia [49,50]. Jedenastu pacjentów z tego badania zrekrutowano do kolejnego badania, obejmującego terapię genową drugiego oka i obserwację przez okres 3 lat. W badaniu potwierdzono brak działań niepożądanych, które można by powiązać z wektorem. Pacjenci odnotowali poprawę w testach mobilności i wrażliwości na światło, która utrzymała się przez cały okres obserwacji [51,52]. Pozytywny wpływ terapii na stan

pacjentów ostatecznie potwierdzono w badaniu III fazy, przeprowadzonym na grupie 31 pacjentów (Tabela VII) [53,54]. Od 22.11.2018 r. terapia jest dostępna w Europie pod nazwą Luxturna (woretygen neparwowe) [55].

### Onpattro

Amyloidozę dziedziczną to choroba genetyczna powodowana odkładaniem się złogów amyloidu w narządach i tkankach, zwłaszcza w obwodowym układzie nerwowym, co prowadzi do stopniowej utraty czucia w kończynach. Genetyczną przyczynę stanowią mutacje w genie TTR, kodującym transtyretynę – syntetyzowane w wątrobie białko transportujące tyroksynę oraz witaminę A [56]. Prawidłowa transtyretyna występuje w formie tetrameru, zbudowanego z czterech podjednostek białkowych. Mutacja (najczęściej jest to substytucja waliny w pozycji 30 do metioniny) zaburza formowanie tetramerów, co skutkuje poli-



meryzowaniem białka w długie amyloidowe włókna, odkładające się w komórkach w postaci złogów [57]. Opracowana terapia genowa wykorzystuje mechanizm interferencji RNA do wyciszenia ekspresji genu TTR, co prowadzi do zahamowania biosyntezy wadliwego zmutowanego białka. Zaprojektowano cząsteczkę siRNA, komplementarną do rejonu 3'UTR genu TTR, podawaną w wektorze liposomowym w infuzji dożyłnej (warto podkreślić, że w przeciwieństwie do poprzednio omawianych terapii genowych, takie leczenie nie jest zabiegiem jednorazowym – preparat musi być przyjmowany w odstępach trzytygodniowych). Tak przygotowane siRNA umożliwi rozpoznanie i zniszczenie cząsteczek mRNA kodujących transtyretynę [58]. Skuteczność terapii oceniono w badaniu APOLLO, przeprowadzonym na grupie 225 pacjentów z amyloidozą dziedziczną, w którym wykazano znaczną poprawę ocenianych parametrów po 18 miesiącach leczenia (Tabela VIII) [59]. W oparciu o przedstawione wyniki, 27.08.2018 r. EMA dopuściła preparat do obrotu pod nazwą Onpattro (patisyran) [60].

## Podsumowanie

Ostatnie trzy dekady były okresem intensywnego rozwoju w dziedzinie terapii genowej. Początkowo dostępna jedynie w badaniach klinicznych, z czasem uzyskała akceptację jako skuteczna metoda leczenia

chorób genetycznych. Warto podkreślić, że techniki molekularne opracowane na potrzeby terapii genowej rzadkich chorób genetycznych zaczynają znajdować bardziej powszechne zastosowania. Koronnym przykładem jest tutaj szczepionka na koronawirusa SARS-CoV-2, którą stanowi cząsteczka mRNA, kodująca wirusowe białko S, podawana w wektorze liposomowym. Pod względem mechanizmu działania szczepionka ta bardzo przypomina opisane powyżej terapie genowe, z tą różnicą, że jej celem jest uzyskanie krótkotrwałej biosyntezy antygeny w miejscu podania, tak aby sprowokować odpowiedź immunologiczną. Można zatem przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości terapia genowa będzie stanowiła ważny element nowoczesnej medycyny.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Artur Cieślewicz

Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

☎ (+48 61) 854 92 16

✉ artcies@ump.edu.pl

## Piśmiennictwo/References

1. Jackson M, Marks L, May GHW, et al. The genetic basis of disease [published correction appears in *Essays Biochem.* 2020 Oct 8;64(4):681]. *Essays Biochem.* 2018;62(5):643-723. Published 2018 Dec 2. doi:10.1042/EBC20170053
2. <https://www.genome.gov/human-genome-project/Completion-FAQ>
3. Chial, H. Rare Genetic Disorders: Learning About Genetic Disease Through Gene Mapping, SNPs, and Microarray Data. *Nature Education* 2008; 1(1):192
4. Sauer V, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. *Monogenic Liver Diseases*, Editor(s): Linda M. McManus, Richard N. Mitchell, Pathobiology of Human Disease, Academic Press, 2014, Pages 1857-1865, ISBN 9780123864574,
5. Liczbańska A, Woźniak A, Wawrocka A, et al. Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jednogenowych. *Techniques used in molecular diagnostics of monogenic disorders.* *Nowiny Lekarskie* 2006, 75, 5, 486–490
6. Williamson R, Kessler AM. The problem of polygenic disease. *Ciba Found Symp.* 1990;149:63-70; discussion 70-80. doi:10.1002/9780470513903.ch6. PMID: 2335126.
7. Lvovs D, Favorova OO, Favorov AV. A Polygenic Approach to the Study of Polygenic Diseases. *Acta Naturae.* 2012;4(3):59-71.
8. Lobo, I. (2008) Multifactorial inheritance and genetic disease. *Nature Education* 2008; 1(1):5
9. Cieślewicz AR. Podstawy terapii genowej. *Farmacja Współczesna* 2011;4:191-93
10. Cieślewicz AR, Kijak H, Korzeniowska K, et al. Interferencja RNA: możliwości terapeutyczne. *Farmacja Współczesna* 2013; 6:89-93
11. Czarnek M, Bereta J. System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2016; 70: 901-16
12. Fitzgerald-Hayes M, Reichsman F: *DNA and Biotechnology*, Third Edition. Elsevier Inc. 2010. ISBN 978-0-12-048930-5

13. Flinn AM, Gennery AR. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet J Rare Dis.* 2018 Apr 24;13(1):65. doi:10.1186/s13023-018-0807-5. PMID: 29690908; PMCID: PMC5916829.
14. Blaese RM. Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res.* 1993 Jan;33(1 Suppl):S49-53; discussion S53-5. doi:10.1203/00006450-199305001-00278. PMID: 8433875.
15. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2410-3. doi:10.1126/science.1070104. PMID: 12089448.
16. Cicalese MP, Ferrua F, Castagnaro L, et al. Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Blood.* 2016 Jul 7;128(1):45-54. doi:10.1182/blood-2016-01-688226. Epub 2016 Apr 29. Erratum in: *Blood.* 2017 Jun 15;129(24):3271. PMID: 27129325; PMCID: PMC5325048.
17. Stirnadel-Farrant H, Kudari M, Garman N, et al. Gene therapy in rare diseases: the benefits and challenges of developing a patient-centric registry for Strimvelis in ADA-SCID. *Orphanet J Rare Dis.* 2018 Apr 6;13(1):49. doi:10.1186/s13023-018-0791-9. PMID: 29625577; PMCID: PMC5889583.
18. Strimvelis. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_pl.pdf)
19. Krawczyk K. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL). <https://www.mp.pl/pacjent/hematologia/choroby/170547,ostra-bialaczka-limfoblastyczna-all>
20. Hołowiecki J. Ostre białaczki limfoblastyczne (ALL). <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.15.3>.
21. Kymriah. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_pl.pdf)
22. Ali S, Kjekken R, Niederlaender C, et al. The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist.* 2020 Feb;25(2):e321-e327. doi:10.1634/theoncologist.2019-0233. Epub 2019 Oct 16. PMID: 32043764; PMCID: PMC7011647.
23. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014 Oct 16;371(16):1507-17. doi:10.1056/NEJMoa1407222. Erratum in: *N Engl J Med.* 2016 Mar 10;374(10):998. PMID: 25317870; PMCID: PMC4267531.
24. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19;6(224):224ra25. doi:10.1126/scitranslmed.3008226. PMID: 24553386; PMCID: PMC4684949.
25. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2015 Feb 7;385(9967):517-528. doi:10.1016/S0140-6736(14)61403-3. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25319501; PMCID: PMC7065359.
26. Determine Efficacy and Safety of CTL019 in Pediatric Patients With Relapsed and Refractory B-cell ALL and High Risk B-cell ALL at First Relapse. Determine Feasibility and Safety of CTL019 Therapy in Pediatric Patients With High Risk B-cell ALL That Relapsed < 6 Months Post All-HSCT. (ELIANA). Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02435849>
27. Phase I/IIA Study of CART19 Cells for Patients With Chemotherapy Resistant or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma (Pedi CART19). Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01626495>
28. CART19 to Treat B-Cell Leukemia or Lymphoma That Are Resistant or Refractory to Chemotherapy. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01029366>
29. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018 Feb 1;378(5):439-448. doi:10.1056/NEJMoa1709866. PMID: 29385370; PMCID: PMC5996391.
30. Kymriah (tisagenlecleucel). Dokumentacja FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
31. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol.* 2011 Aug;68(8):979-84. doi:10.1001/archneurol.2011.74. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21482919; PMCID: PMC3860273.
32. SMN1 gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/smn1/>
33. Gene Transfer Clinical Trial for Spinal Muscular Atrophy Type 1. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02122952>
34. Gene Replacement Therapy Clinical Trial for Participants With Spinal Muscular Atrophy Type 1 (STRIVE). Opis badania klinicznego. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03306277>
35. Pre-Symptomatic Study of Intravenous Onasemnogene Apeparvovec-xioi in Spinal Muscular Atrophy (SMA) for Patients With Multiple Copies of SMN2 (SPRINT). Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03505099>
36. Stevens D, Claborn MK, Gildon BL, et al. Onasemnogene Apeparvovec-xioi: Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *Ann Pharmacother.* 2020 Oct;54(10):1001-1009. doi:10.1177/1060028020914274. Epub 2020 Mar 23. PMID: 32204605.
37. Zolgensma (onasemnogene apearvovec). Dokumentacja FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>
38. Zolgensma. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information_pl.pdf)
39. Beta thalassemia. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/beta-thalassemia/#causes>

40. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2018 Apr 19;378(16):1479-1493. doi:10.1056/NEJMoa1705342. PMID: 29669226.
41. Thompson AA, Kwiatkowski JL, Porter JB, et al. 154 Favorable Outcomes in Pediatric Patients in the Phase 3 Hgb-207 (Northstar-2) and Hgb-212 (Northstar-3) Studies of Betibeglogene Autotemcel Gene Therapy for the Treatment of Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. 62nd ASH Annual Meeting and Exposition. December 5-8, 2020. American Society of Hematology
42. A Study Evaluating the Safety and Efficacy of the LentiGlobin BB305 Drug Product in  $\beta$ -Thalassemia Major Participants. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01745120>
43. A Study Evaluating the Safety and Efficacy of LentiGlobin BB305 Drug Product in  $\beta$ -Thalassemia Major (Also Referred to as Transfusion-dependent  $\beta$ -Thalassemia [TDT]) and Sickle Cell Disease. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02151526>
44. A Study Evaluating the Efficacy and Safety of the LentiGlobin<sup>®</sup> BB305 Drug Product in Subjects With Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia, Who do Not Have a  $\beta$ 0/ $\beta$ 0 Genotype. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02906202>
45. A Study Evaluating the Efficacy and Safety of the LentiGlobin<sup>®</sup> BB305 Drug Product in Subjects With Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03207009>
46. Zynteglo. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_pl.pdf)
47. Leber congenital amaurosis. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/leber-congenital-amaurosis/#inheritance>
48. RPE65 gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/rpe65/#conditions>
49. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009 Nov 7;374(9701):1597-605. doi:10.1016/S0140-6736(09)61836-5. Epub 2009 Oct 23. Erratum in: *Lancet*. 2010 Jan 2;375(9708):30. PMID: 19854499; PMCID: PMC4492302.
50. Safety Study in Subjects With Leber Congenital Amaurosis. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00516477>
51. Bennett J, Wellman J, Marshall KA, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet*. 2016 Aug 13;388(10045):661-72. doi:10.1016/S0140-6736(16)30371-3. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27375040; PMCID: PMC5351775.
52. Phase 1 Follow-on Study of AAV2-hRPE65v2 Vector in Subjects With Leber Congenital Amaurosis (LCA) 2. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01208389>
53. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Aug 26;390(10097):849-860. doi:10.1016/S0140-6736(17)31868-8. Epub 2017 Jul 14. Erratum in: *Lancet*. 2017 Aug 26;390(10097):848. PMID: 28712537; PMCID: PMC5726391.
54. Safety and Efficacy Study in Subjects With Leber Congenital Amaurosis. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00999609>
55. Luxturna. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information_pl.pdf)
56. Transthyretin amyloidosis. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/transthyretin-amyloidosis/#causes>
57. TTR gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/ttr/#conditions>
58. Urits I, Swanson D, Swett MC, et al. A Review of Patisiran (ONPATPRO<sup>®</sup>) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol Ther*. 2020 Dec;9(2):301-315. doi:10.1007/s40120-020-00208-1. Epub 2020 Aug 12. Erratum in: *Neurol Ther*. 2021 Jan 12; PMID: 32785879; PMCID: PMC7606409.
59. APOLLO: The Study of an Investigational Drug, Patisiran (ALN-TTR02), for the Treatment of Transthyretin (TTR)-Mediated Amyloidosis. Opis badania klinicznego. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01960348>
60. Onpattro. Charakterystyka produktu leczniczego. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onpattro-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onpattro-epar-product-information_pl.pdf)