

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

Viry a virové vektory používané pro genovou terapii

Eliška Tesařová

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Tesařová**
Osobní číslo: **C14350**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Viry a virové vektory používané pro genovou terapii**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Viry využívané pro genovou terapii a jejich základní charakteristiky.
3. Základní vlastnosti virových vektorů používaných pro genovou terapii.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

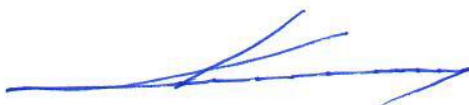
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

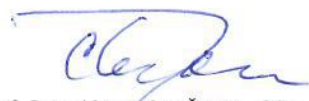
Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 27.6.2017

Eliška Tesařová

Podpis:

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi Ph.D. za ochotu a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi vždy byla oporou v dobách studia.

ANOTACE

Tématem této práce jsou virové vektory, které se v budoucnu mohou stát zásadní pro vývoj genové terapie. Práce popisuje jednotlivé vektory a jejich specifické vlastnosti, které budou moci být využívány k léčbě různých nemocí. Na konci se práce věnuje budoucnosti vývoje genové terapie a etickým otázkám, které jsou s tímto tématem spojeny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Genová terapie, virové vektory, vrozené nemoci, získané nemoci

ANNOTATION

The topic of this thesis are viral vectors which can be very important for the development of gene therapy in the future. The thesis is describing individual vectors and their specific properties which can be used to the treat of various diseases. The end of the work is describing development in the fututre and some ethic questions.

KEYWORDS

Gene therapy, viral vectors, congenital illness, acquired diseases

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM TERMÍNŮ.....	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD.....	12
1 GENOVÁ TERAPIE.....	13
1.1 SEZNÁMENÍ.....	13
1.2 HISTORIE.....	14
2 VIROVÉ VEKTORY	16
2.1 NEVIROVÉ VEKTORY	18
3 ROZDĚLENÍ VIROVÝCH VEKTORŮ	19
3.1 ADENOVIRY	19
3.2 ADENOASOCIOVANÉ VIRY	20
3.3 HERPETICKÉ VIRY.....	21
3.4 ALPHAVIRY	22
3.5 VIRY VAKCINIE.....	23
3.6 RETROVIRY	24
4 METODY STANOVENÍ.....	26
4.1 KLASICKÉ METODY	26
4.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY	27
4.2.1 METODA qPCR.....	27
5 VYUŽITÍ LÉČBY GENOVÉ TERAPIE.....	32
5.1 VROZENÉ NEMOCI	32
5.1.1 HEMOFILIE	34
5.1.2 CYSTICKÁ FIBRÓZA	35
5.1.3 HUNTINGTONOVA CHOROBA.....	36

5.2	ZÍSKANÉ NEMOCI.....	37
5.2.1	PARKINSONOVA CHOROBA	37
5.2.2	ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA	39
5.2.3	ALZHEIMEROVA CHOROBA	40
5.2.4	METABOLICKÉ PORUCHY	42
5.2.5	RAKOVINA	43
6	BUDOUCTNOST A VÝVOJ GENOVÉ TERAPIE	46
6.1	POČÁTEČNÍ SELHÁNÍ	46
6.2	VÝVOJ VE SVĚTĚ.....	46
6.2.1	LÉČBA RAKOVINY – GENDICINE	46
6.2.2	LÉČBA RAKOVINY NOSOHLTANU.....	47
6.2.3	LÉČBA ISCHEMICKÝCH VŘEDŮ	47
7	ETICKÁ HORZBA A OTÁZKY	49
7.1	VĚDECKÝ POHLED	49
7.1.1	VÝHODY A NEVÝHODY GT	49
7.2	MORÁLNÍ ASPEKT	50
8	ZÁVĚR.....	51
	POUŽITÁ LITERATURA	52
	ZDROJE OBRÁZKŮ	60

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Používané vektory v GT	19
Obrázek 2 - Organizace adenovirových částic	19
Obrázek 3 - Organizace genomu AAV	21
Obrázek 4 - Povrch alphaviru (počítačem generovaný model)	23
Obrázek 5 - Organizace genomu retrovirů	24
Obrázek 6 - Nasedání primerů; převzato z	28
Obrázek 7 - Teplota nasedání primerů pro daný počet bazí	28
Obrázek 8 - Genetický editor CRISPR/Cas9 j	33
Tabulka 1 -Virové vektory a jejich základní vlastnosti.....	17
Tabulka 2 - qPCR - Použití primerů zaměřených na E1A a GAPDH.....	30
Tabulka 3 - qPCR - Detekce hMSC DNA v nádorových xenograftech.....	30
Tabulka 4 –qPCR pro stanovení ONCOS – 102	31
Tabulka 5 – qPCR – Detekce virové DNA při stanovování telomelysinu	31

SEZNAM TERMÍNŮ

Beta-thalassemie - Dědičné onemocnění krve, ve kterých chybí beta hemoglobin a pacienti jsou závislí na pravidelných celoživotních krevních transfuzích

Bronchiolitida - Těžké akutní obstruktivní respirační onemocnění charakterizované edémem sliznice malých bronchů a bronchiolů a zvýšenou produkcí hlenu způsobené virovou infekcí

Cytidin deamináza – Enzym, který je u lidí kódován genem CDA. Tento gen kóduje enzym podílející se na záchraně pyrimidinu

Cytotoxicita - Schopnost buněk nebo chemických látek ničit buňky. Cytotoxické mohou být např. léky, imunitní buňky nebo jedy

Dystrofin - Protein, přítomný v malém množství v normální kosterní a srdeční svalové tkáni, chybějící u nemocných s Duchenneovou muskulární dystrofií a dalšími genetickými onemocněními

Imunogenicita - Vlastnost, která umožní látce vpravené do organismu vyvolat imunitní odpověď

Lipozom - Může být použit jako vehikulum, které může dopravit vitamín nebo léčivo na požadované místo v organismu. Často jsou složeny z fosfolipidů obohacených o fosfatidylcholinu

Neurotropismus - Nervová přitažlivost, tendence a schopnost přednostně se vázat na nervový systém

Nukleokapsida – Bílkovinný obal viru kapsida spolu s nukleovou kyselinou DNA či RNA nukleové kyseliny

Papilomavirus – Virus, který napadá kmenové buňky epidermis a s jejich diferenciací prochází vlastním cyklem a replikací. Považován za hlavní příčinu rakoviny děložního čípku

Permisivní teplota - Teplota umožňující přežívání termosenzitivních mikroorganismů

Virion - Označení pro kompletní virovou částici, která je schopna infikovat hostitele a dále se v něm množit

SEZNAM ZKRATEK

GT- Genová terapie

AAV- Adenoasociované viry

HSV-Herpes simplex virus

LV-Lentviry

VV – Viry vakcinie

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid

DNA – Deoxyribonucleic Acid

NGF – Nervový růstový faktor

APP – Amyloidní prekuzorový protein

GDNF – Gliová buněčná linie

ADA – Adenosindeamináza

QUIN- Kyselina chinolinová

GAD – Kyselina glutamová

CF - Cystic fibrosis

HD - Huntington's disease

MS – Multiple sclerosis

AD - Alzheimer's disease

WHO – World Health Organization

qPCR –Kvantitavní PCR

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ÚVOD

Genová terapie je druh léčebného postupu, při kterém je do genomu pacienta vložena sekvence DNA, tato sekvence kóduje nějaký nefungující či chybějící protein. Tato léčebná metoda by mohla být v budoucnosti použita k léčbě vrozených nebo získaných nemocí.

Bakalářská práce se zaměřuje na jednu z hlavních otázek – jak vložit DNA do genomu pacienta. Nejčastějším experimentálním způsobem je použití virů, které jsou schopny přenést svou DNA do genomu hostitelských buněk. Úspěch vývoje je závislý na vývoji virových vektorů.

Existuje několik druhů virových vektorů, které byly upraveny pro použití v aplikacích genové terapie, na těchto vektorech budou postupně stavěny základy této práce. V první řadě je cílem práce ujednotit dostupné informace o těchto vektorech, popsat klasifikaci a postupně se dostat k jednotlivým nemocím, které by mohli být pomocí genové terapie v budoucnu léčeny.

Jelikož je genová terapie považována jako „lék budoucnosti“ musí se zvážit všechny výhody a nevýhody léčebných postupů. GT vyvolává složité bezpečnostní etické otázky týkající se legitimního rozsahu a omezení genetické intervence.

V současnosti výzkum zažívá jakýsi boom, neboť se postupně uvolňuje regulace vývoje a vyspělé státy se snaží vyvíjet nové postupy, aby se genová terapie postupně dostala do běžné léčebné praxe. Za jak dlouho se to stane je otázkou, ale je zřejmé, že až k tomu dojde, nastane velký medicínský převrat.

1 GENOVÁ TERAPIE

1.1 SEZNÁMENÍ

V dnešní době je mnoho druhů nemocí spojeno s nesprávnou funkcí genů (jedná se o pozmeněnou sekvenci DNA či chybnou regulaci transkripce a translace), naskytá se zde možnost ovlivnit příčinu vzniku pomocí genové terapie. [4] Je zapotřebí zdůraznit, že ne všechny léčebné postupy, které způsobily změny v genetické výbavě pacienta lze považovat za genovou terapii. [3]

Většina tradičních léčiv jsou proteiny nebo malé molekuly, které s nimi interagují a to tak, že působí spíše na úrovni proteinu než na základní úrovni genu. Alternativním přístupem je genová terapie, která je založena na použití nukleových kyselin, na opravení nefungující sekvence DNA nebo zavede kompenzační změnu, která obnoví normální fyziologické procesy buňky. Genová terapie je součástí nově vznikající skupiny terapií, které lze souhrně nazvat jako genovou medicínu. Jednou z forem genové medicíny je použití nukleových kyselin stejným způsobem jako v konvenční léčbě, když je cílem léčby mRNA produkovaná změněným genem. Také použití DNA vakcín, které vyjadřují antigeny v těle spadá pod genovou medicínu.

Všechny tyto nové techniky jsou zvláště zajímavé pro léčení onemocnění, jako je rakovina - metoda založená na použití celých buněk odvozených buď z pacienta nebo z alternativního zdroje. Obě genové a buněčné terapie možná představují nejslibnější terapeutické strategie pro dlouhodobě nemocné. GT je léčebná strategie, kde jsou pacientovi buňky geneticky modifikované ve snaze léčit nemoci. Je zde důležitý rozdíl mezi somatickou GT, kde jsou změny zavedeny do somatických buněk a jsou omezeny na pacienta a na „GERM –LINE“ genovou terapii, kde jsou změny zavedeny do buněk a proto může být předáván pro následující generace. Avšak tato GT není v dnešní době ještě povolena z etických důvodů. [7]

O genové terapii lze ve stručnosti říci, že je to léčebný postup, při kterém je do genomu pacienta vložena sekvence DNA. Tato sekvence následně kóduje nefungující či chybějící protein.

Základní postupy v GT (nejčastěji studované jsou v dnešní době první dva)

- Základní gen je „vmezeřen“ do genomu a jeho funkce nahradí gen poškozený

- Ovlivnění patologické regulace genu
- Nahrazení abnormálního genu přirozeným genem pomocí homologní rekombinace
- Oprava za pomoci selektivní reverzní mutace
- Pomoc imunitnímu systému rozpoznat abnormální buňky

Při pokusech o vnesení správného genu do genomu pacienta se používají vektory na bázi virového genomu, který je upraven tak, aby ztratil patogenní vlastnosti a na druhou stranu, aby vnesl potřebný lidský gen do genomu pacienta. Druhou nejčastější metodou je použití DNA obalené v lipozomech, neboť jsou schopné pronikat do buňky a vnášet obsah do jádra.

Při ovlivňování regulace genu se využívají snahy o použití různých typů uměle připravených krátkých úseků RNA – interferujících RNA, u kterých je známo, že po zavedení do buňky umí selektivně napomáhat degradaci specifických mediátorových molekul RNA (mRNA).

Genová terapie by měla být do budoucna využívána k léčbě dědičných onemocnění. Bohužel se stále potýká s problémy a nebyla doposud zavedena na stálo do lékařské praxe. Neboť pro úplné zavedení genové terapie se zde objevují obavy týkající se nežádoucí imunitní odpovědi, nebezpečí infekce či genetické ovlivnění somatických i pohlavních buněk. [4]

Myšlenkou zvýšení efektivity GT je přenos nahé DNA. Mechanismem intravaskulární dodávky nahé DNA je myšlenka, která v praxi zahrnuje aktivní buněčné vychytávání pDNA. [6]

1.2 HISTORIE

Koncept genové terapie vznikl již v 60. a 70. letech minulého století a je stále ve svých počátcích, z toho plyne fakt, že nemáme dostatek dlouhodobých spolehlivých údajů, o bezpečnosti a spolehlivosti této léčby.

První pacient, u kterého se praktikovala léčba pomocí GT v roce 1990 byla čtyřletá dívka, trpící vrozenou nemocí, kdy trpěla nedostatkem adenosin deaminázy, která výrazně ovlivňuje imunitu a následnou schopnost organismu bojovat s infekcí. Při provedení terapie byly odebrány její bílé krvinky, které byly vystaveny působení

retrovirů s genem pro adenozyndeaminázu a poté byly geny znovu vloženy. Tento pokus byl proveden Dr. W. French Andersonem v National Institute of Health.

V roce 2003 proběhla v Číně první komerční genová terapie, kde byl využit Gendicine. Jedná se o rekombinantní adenovirus, který je upravený pro expresi wildtype-p53 (rAd-p53). Jednalo se o virus, který je určený pro léčbu karcinomu hlavy a krku. [8]

V září roku 2010 bylo oznámeno, že u 18letého muže z Francie, který trpí beta-talasemií proběhla úspěšná léčba. [9] Beta-thalassemie je dědičné onemocnění krve, ve kterých chybí beta hemoglobin a pacienti jsou závislí na pravidelných celoživotních krevních transfuzích. [10] Tato technika využila vektory pro transdukcí lidského beta-globin genu do čištěné krve a buněk kostní dřeně. [11]

V roce 1989 Rosenberg a kol. provedli první pokus týkající se genové terapie, když použili retrovirus pro zavedení genu kódujícího rezistenci k neomycinu do lymfocytů infikujících lidské nádory před tím, než je vpustili do pěti pacientů s pokročilým melanomem. Tato studie prokázala proveditelnost použití retrovirální genové transdukcí u lidí a stanovila podmínky pro další studie. Od té doby bylo dokončeno více než 900 klinických studií po celém světě. Tyto studie byly navrženy tak, aby dokázaly proveditelnost a bezpečnost, demonstrovaly realitu exprese terapeutických proteinů in vivo přenesenými geny a v některých případech ukázaly terapeutický přínos. Neexistuje jediný zdroj informací, který by prezentoval přehled všech klinických studií prováděných po celém světě. V roce 1997 byla založena databáze, která umožňuje hledat všechny informace o klinických studiích komplexně a co nejvíce globálně. Údaje byly sestaveny a pravidelně aktualizovány z oficiálních zdrojů agentury, publikované literatury, prezentace na konferencích a informací poskytnutých od vyšetřovatelů. Od 31. ledna 2004 bylo identifikováno 918 studií ve 24 zemích. USA tvoří dvě třetiny těchto zkoušek a rakovina je zdaleka nejčastější indikace onemocnění, následovaná vrozenými monogenními onemocněními a kardiovaskulárními chorobami. Virové vektory byly nejčastěji používanými nosiči pro přenos genů do lidských buněk, přičemž retroviry a adenoviry představují převážnou většinu. V jedné čtvrtině pokusů byla použita plazmidová (nahá) DNA a další neviróvé vektory. Bylo přeneseno více než 100 odlišných genů. [52]

2 VIROVÉ VEKTORY

Hlavní otázkou genové terapie je nalezení způsobu, jak vložit DNA do genomu pacienta. Nejčastějším experimentálním způsobem je použití virů, které jsou schopny přenést svou DNA do genomu hostitelských buněk. [4] Úspěch genové terapie je do určité míry závislý na vývoji virových vektorů (asi 70% využití), neboť viry jsou využívány především kvůli jejich vysoké účinnosti transdukce do lidských buněk. [7]

Několik typů virů, jako jsou retroviry, adenoviry, adeno-asociovaného viry, alphaviry a herpes simplex viry byly upraveny pro použití v aplikacích genové terapie. Tyto vektorové systémy mají jedinečné výhody a omezení, u každého z nich můžeme určit případy, pro které se nejlépe hodí. [12]

Genová terapie zahrnuje aplikaci různých virových vektorů, které jsou vhodné pro využití v savčích hostitelských buňkách. Vzhledem k různým vlastnostem každého virového vektoru, definice jejich aplikačního rozsahu závisí na faktorech, jako je replikační kompetence, integrace genomu a trvání exprese transgenů.

Nedávné studie modifikovaných virových vektorů přispěly ke zlepšení účinnosti dodání genu. Ačkoliv byly vkládány velké naděje týkající se rychlého průlomu studie, pokrok byl pomalejší, než se předpokládalo.

Můžeme si zde uvést 4 základní faktory, které brzdí pokrok pro využívání virových vektorů v genové terapii.

- **1.Neefektivní pro přenos genů:** Ačkoli virové vektory prokázaly vysokou účinnost dodání genu v buněčných liniích, jejich účinnost in vivo, byla neuspokojivě nízká.
- **2.Cílení projevu:** Toto se týká problematiky dopravy genů. Specifické cílení do buněk nebo tkání je nesmírně důležité, aby se zabránilo expresi toxických genových produktů ve zdravé tkáni.
- **3.Trvání výrazu:** Vytvoření dlouhodobé exprese bylo omezeno špatnou replikací a stabilitu episomálních vektorů a neúčinné nebo nevhodné integraci vektoru do genomu hostitele.
- **4.Bezpečnost:** Předpokladem pro klinickou genovou terapii musí být zajištěné příslušné bezpečnostní normy.

V této souvislosti, je velmi důležité umístění integrace genomu a snížení cytotoxicity a imunogenicity jsou velmi důležité. Celkově došlo k významným zlepšením ve všech aspektech vývoje pro přenos genů a aktivace genové exprese v průběhu několika posledních let. Nicméně se ukázalo, že nemáme k dispozici univerzálně použitelné ideální virové vektorové systémy. Různé rysy každého vektoru a typu onemocnění, které mají být léčeny, musí být definovány dříve, než se rozhodne o tom, který typ vektoru by měl být použitý. Některé vlastnosti vektorů je třeba řešit dříve, než při rozhodování, který systém použít, a proto je vhodné provést srovnání mezi různými virovými vektory, které se dnes v GT používají. [13]

Tabulka 1-Virové vektory a jejich základní vlastnosti

VEKTORY	KAPACITA	ROZSAH HOSTITELE	KLINICKÉ TESTY	VLASTNOSTI
AAV	Nízká < 4 kb	široký, infikuje jak nedělitelné, tak dělicí buňky	+	Pomalý nástup exprese, neefektivní virová produkce ve velkém měřítku
Adenoviry	Střední < 7,5 kb	široký, nízká transdukce neuronů	+	Přechodná exprese, silná imunogenicita
Alphaviry	Střední < 7,5 kb	široký, neurony, gliové buňky specifických kmenů	+	Přechodná, ale extrémní exprese, nízká imunogenicita
HSV	Vysoká > 30 kb	široký, neurony, kmenové buňky, svalové buňky	-	Latentní infekce, dlouhodobá exprese, nízká toxicita
Retroviry	Střední 8kb	Omezený, pouze dělicí buňka	+	Integrace genomu, dlouhodobá exprese

Všechny viry napadají své hostitele a zavádí svůj genetický materiál do hostitelské buňky jako součást svého replikačního cyklu. Tento genetický materiál obsahuje „návod“ jak produkovat více kopií těchto virů. Hostitelská buňka bude produkovat další kopie viru, což vede k další nákaze buněk. Některé typy virů ve skutečnosti vloží své geny do genomu hostitele. Manipulace imunitního systému indukuje toleranci vektorů v těle. Nejuspokojivější přístup spočívá ve vývoji vektorů s malým až žádným potenciálem pro vyvolání imunitní odpovědi. [14]

Zabíjení specifických buněk - cílem je vyjádřit v těchto buňkách sebevražedný gen, jehož produkt je toxický. Vzhledem k letálním účinkům sebevražedných genů, musí být zaměřeno na cílové buněčné typy s velkou přesností, aby se zabránilo vedlejším účinkům. [7]

2.1 NEVIROVÉ VEKTORY

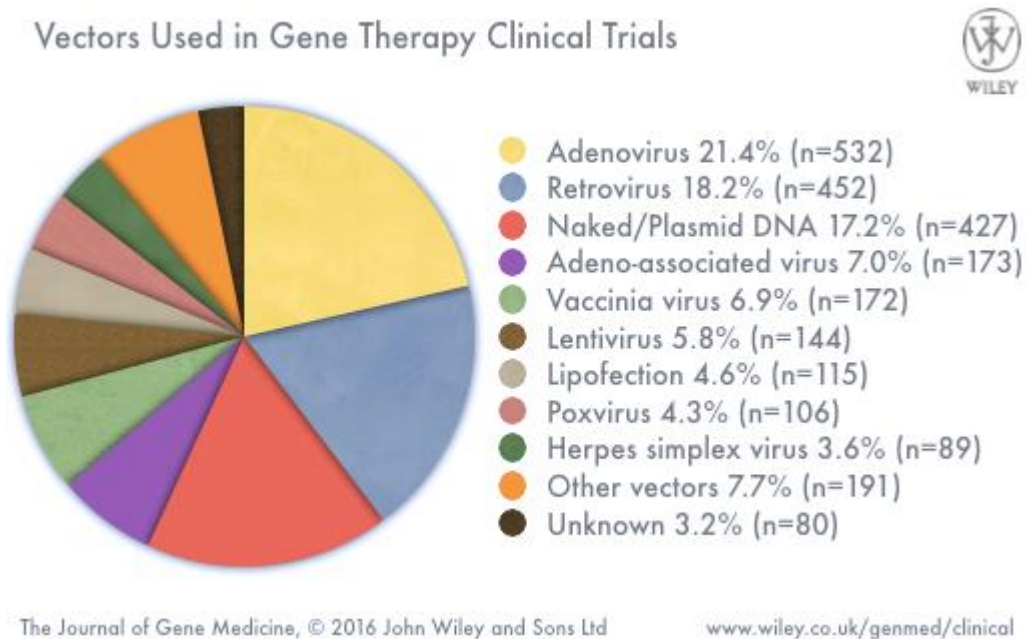
V posledních 10 letech došlo také k významnému pokroku ve vývoji a aplikaci nevirových vektorů v genové terapii. Nicméně jsou v klinické praxi problémy, které nejsou schopny zatím tuto problematiku plně vyřešit. [15]

Viry se postupně vyvinuly, aby se staly vysoce účinné při dodání nukleových kyselin na specifické typy buněk, přičemž se tím má zabránit imunologickému sledování. V případě, že patogenita konkrétního viru, bude odstraněna, může být gen velmi vhodný pro genovou terapii. Musí být však zachována účinnost přenosu genů a jejich exprese.

Nevirové vektory, jsou jasně nepatogenní a také méně efektivní v přenosu nukleové kyseliny do jádra buněk. Každý z vektorových systémů má své přednosti, ale i nedostatky, které vyžadují další úpravu, aby se postupem času stal vhodný pro běžnou aplikaci. [12]

3 ROZDĚLENÍ VIROVÝCH VEKTORŮ

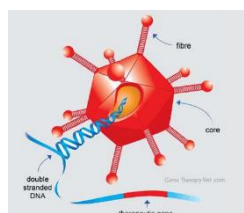
V následujících stránkách si zde rozebereme zástupce virových vektorů a jejich charakteristické znaky, které se mohou využívat pro genovou terapii. Pro přehlednost zde uvádím procentuální zastoupení jednotlivých vektorů, což nám může sloužit jako vodítko, které viry budou v budoucnu nejvíce využívány.



Obrázek 1- Používané vektory v GT; převzato z: Zdroj obrázků [1]

3.1 ADENOVIRY

Adenoviry infikují různé živočišné druhy včetně lidí. Adenoviry byly poprvé izolovány v nosních mandlích u lidí – od tohoto je také odvozen název Adenoviry. Jsou to viry střední velikosti (90 – 110nm), nejsou chráněny kapsidou. Jsou to dvacetistěnné viry tvořené z nukleokapsid a lineárního dvouvláknového genomu, jedná se o dvouvláknovou DNA. U člověka je známo více než 51 sérotypů, které jsou zodpovědné za infekce horních cest dýchacích. [16] Virion je rezistentní vůči éteru, je citlivý na chlór a jeho deriváty. [23]



Obrázek 2 - Organizace adenovirových částic ; převzato z: Zdroj obrázků [2]

Primární šíření probíhá prostřednictvím respiračních kapének, ale mohou se také šířit stolicí. Infekce způsobené adenoviry se projevují často jako zánět spojivek, angina či zánět ucha. U dětí mohou adenoviry rozvíjet bronchiolitidu. U kojenců mohou způsobovat záchvaty kašle, které se mohou v extrémních případech jevit jako černý kašel. Většina populace se vyléčí z těchto infekcí bez lékařské pomoci, avšak u některých osob s oslabenou imunitou mohou mít až smrtelné následky.

Když se tyto viry infikují do hostitelské buňky, zavádějí své molekuly DNA do hostitele. Genetický materiál adenovirů není zahrnutý do genetického materiálu hostitelské buňky. Molekula DNA je volně ponechána v jádře hostitelské buňky a instrukce v této extra DNA molekule jsou transkribovány jako každý jiný gen. Jediným rozdílem je, že tyto extra geny nejsou při buněčném dělení replikovány. Vstup adenovirů do hostitelské buňky zahrnuje vzájemné působení mezi virem a hostitelskou buňkou. Vstup do hostitelské buňky je spuštěn navázáním proteinu na receptor buněk.

Životní cyklus adenoviru je rozdělen pomocí procesu replikace DNA do 2 fází: Brzké (odpovídá událostem, které nastaly před replikací virové DNA) a Pozdní (odpovídá období po zahájení replikace virové DNA) fáze. [7] V obou fázích je generován primární transkript, který je alternativně spojený pro generování mRNA s ribozomy hostitele. Časné geny jsou zodpovědné za regulační proteiny. [16]

Velkým problémem adenovirových vektorů je jejich imunogenicita. I přesto, že vakcína adenoviru byla bezpečně podávána milionům amerických vojáků po několik desetiletí, objevoval se zde problém s nežádoucí imunitní reakcí. [7]

Adenovirové vektory jsou široce používány pro podávání genů in vivo a jsou využívány v klinických studiích pro léčbu rakoviny a CF. Adenovirové vektory mají tu výhodu, že mohou infikovat některé buňky v kultuře in vivo, což je proces vedoucí k vysoké úrovni přechodnou expresi genu. [13]

3.2 ADENOASOCIOVANÉ VIRY

Jsou to obalené viry patřící do čeledě parvovirů. Jsou to malé viry s genomem jednovláknité DNA. Jedná se o nepatogenní viry. Tento virus infikuje dané druhy primátů či člověka. V této době není známo, že by AAV způsoboval nějaká závažnější onemocnění. Virus způsobuje velmi malou imunitní odpověď.

Genom AAV je vytvořen z jednořetězcové deoxyribonukleové kyseliny (ssDNA). Genom obsahuje obrácené terminální repetice (ITR) na obou koncích řetězce DNA a dva otevřené čtecí rámce (ORF). Genom je dlouhý 4,7 kb. [17] První z nich se skládá ze čtyř překrývajících se genů kódujících proteiny Rep požadované pro AAV životního cyklu, a druhý obsahuje překrývajících se nukleotidové sekvence proteiny kapsidy: VP1, VP2 a VP3, které vzájemně spolu tvoří kapsidu. [18]



Obrázek 3 - Organizace genomu AAV; převzato z: Zdroj obrázků [3]

Nemodifikovaný lidský AAV integruje do chromosomální DNA na určitém místě – na 19q1S.5-qrer. Jedná se o vysoce žádoucí vlastnost, která poskytuje tu výhodu, že dlouhodobá exprese je bez rizika inzerční mutageneze. [7]

Vektory genové terapie využívající AAV mohou infikovat jak dělicí, tak i klidové buňky. Přetrvávají v extrachromosomálním stavu. Současné klinické studie dokazují, že využití AAV pro genovou terapii v oční sítnici se jeví jako velmi slibné. Tyto viry mohou vložit genetický materiál na určité místo 19. chromosomu s takřka stoprocentní jistotou. AAV jsou v dnešní době testovány pro léčbu svalových a očních onemocnění. Další klinické studie dokazují, že AAV mohou být využívány k doručování genů do mozku. Je to způsobeno tím, že viry mohou AAV mohou inhibovat klidové buňky (neurony), ve kterých jsou genomy vyjádřeny na dlouhou dobu.

Adenoasociované viry se staly velmi slibnými nástroji pro výzkum a klinickou aplikaci v centrálním nervovém systému. Nicméně specifické předání genu na určitý typ buněk je předmětem zájmu. A proto hraje velmi důležitou roli správná volba promotoru. [17]

3.3 HERPETICKÉ VIRY

Herpes simplex viry (HSV), patří do podčeledi alphaherpesvirinae. Herpetické viry se skládají z relativně velkého lineárního genomu dvouřetězcové DNA o délce 150 kb. Tyto geny kódují celou řadu proteinů podílejících se na formování kapsidy, osetení a obálky viru, jakož i řízení replikace a infekčnost viru. Jsou uzavřeny v bílkovinné kapsidě, která je zabalená v lipidové dvojvrstvě. Genom herpetických virů kóduje 100-

200 genů. Transkripce genů HSV je katalyzována RNA polymerázou II infikovaného hostitele.

Typickými vlastnostmi viru Herpes simplex je neurotropismus a latentní fáze životního cyklu, což znamená, že virový genom zůstává epizomálně v buněčném jádru po celou dobu životnosti hostitelského organismu. Vzhledem k latenci HSV jsou velmi atraktivní v aplikačních oblastech, kde je žádoucí celý život udržovat expresi transgenů [13]

Jsou známy 2 typy herpetických virů, které u člověka způsobují infekci - HSV-1 a HSV-2. Infekce virem herpes simplex se projeví výskytem vodnatých puchýřků na kůži nebo sliznici úst či rtů. Genomy HSV-1 a HSV-2, jsou složité a obsahují dvě unikátní oblasti tzv. dlouhou jedinečnou oblast (UL) a krátkou jedinečnou oblast (US). [19]

HSV je lineární dsDNA virů. Za použití nejméně dvou virových glykoproteinů, gB a gD, se virus váže prostřednictvím interakce s heparinem síranu skupinami na povrchu buněk. Virus pak vstoupí do buňky pomocí fúze, a tam lineární DNA cirkuluje. [12]

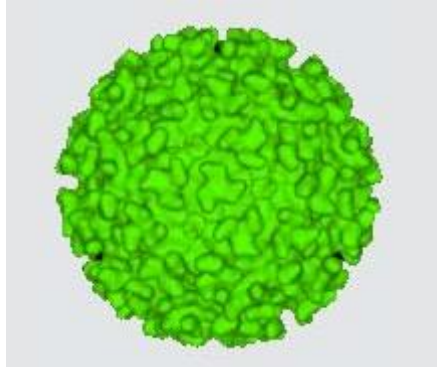
Jedním z problémů při použití herpetických virů byla toxicita vektoru v mnoha typech buněk. Alternativní přístup k produkci infekčních HSV vektorů je použití amplikonů. V tomto případě, plazmid obsahující počátek replikace HSV a obalových sekvencí je kotransfekován kosmidy obsahující HSV genom, ale s poškozeným balicí sekvencí. Výsledný virus obsahuje pouze plazmidové sekvence a tím je vyloučena toxicita spojená s nízkou úrovní exprese HSV. Přetrvávajícím problémem je, že exprese transgenů je ukončena v průběhu 1 týdne po infekci různých cílových buněk. [12]

Herpetické viry mají tropismus pro centrální nervový systém. Mohou zapříčinit celoživotní latentní infekci u sensorického ganglia, ve kterém existují jako neintegrováné extrachromozomální elementy. Jejich hlavní využití je v dodávání genů do neuronů při léčbě Parkinsonovi nemoci či nádorů CNS. Praktický výzkum, je ale stále v ranné fázi vývoje. [7]

3.4 ALPHAVIRY

Alphaviry můžeme zařadit do čeledě Togaviridae. Můžeme zde rozeznat 27 druhů alphavirů, které jsou schopné infikovat různé obratlovce, jako jsou lidé, hlodavci, ptáci, a větších savců. Alphaviry jsou obalené částice, které mají průměr 70 nm, mají tendenci být zakulacené a 40 nm izometrickou nukleokapsidu. Genom se skládá z jednořetězcové

pozitivní RNA. Celková délka genomu se pohybuje mezi 11 a 12 kb. Nestrukturní proteiny (replikáza) jsou umístěné na 5' konci, zaujímající zhruba 2/3 délky genomu, zatímco strukturní (kapsidový protein a 3 obalové proteiny) jsou v poslední třetině, na 3' konci.



Obrázek 4 - Povrch alphaviru (počítačem generovaný model); převzato z: Zdroj obrázků [4]

K dispozici jsou dva otevřené čtecí rámce (ORF) v genomu - nestrukturální a konstrukční. První z nich je nestrukturální a kóduje proteiny pro transkripci a replikaci virové RNA, a druhý kóduje čtyři strukturní proteiny: kapsidový protein C, Obálka glykoproteinu E1, Obálka glykoproteinu E2, E3 a Obálka glykoproteinu. Expresce těchto proteinů a replikaci virového genomu probíhá v cytoplasmě hostitelských buněk.

Alphavirové vektory nesou terapeutické nebo toxické geny používané při nitronádorových injekcích. Tyto postupy ukázaly efektivní regresi nádoru. [20]

3.5 VIRY VAKCINIE

Členové kmene Poxviridae včetně viru vakcinie jsou neobvyklé tím, že replikace a transkripce z genomu probíhá v cytosolu infikovaných buněk. [7] Mají lineární, dvouřetězcovou DNA, genom je přibližně 190 kb na dlouhý která kóduje asi 250 genů. Genom je obklopen lipoproteinovou membránou. Tyto viry jsou odlišeny od jiných virů na základě jejich schopnosti replikovat výhradně v cytoplasmě hostitelské buňky, ven z jádra. Rozměry virionu jsou přibližně 360 x 270 x 250 nm

Viry vakcinie jsou dobře známé pro jejich roli vakcíny, kterou byla vymýcena nemoc pravých neštovic. Tato léčba byla provedena podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v rámci programu eradikace neštovic. Po vymýcení neštovic, vědci využili virus vakcinie jako nástroj pro doručování genů do biologické tkáně.

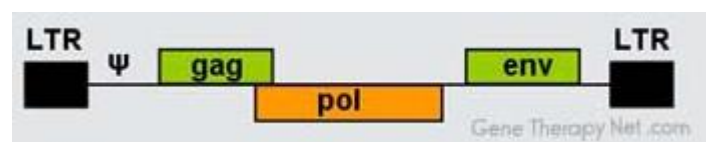
Během replikačního cyklu vackcinie produkuje čtyři infekční formy, které se liší ve svých vnějších membránách: vnitrobuněčný zralý virion (IMV), intracelulární obklopení virionu (IEV), buňka spojená s obklopeným virionem (CEV) a extracelulární obalené virionu (EEV). IMV se skládá z jedné lipoproteinové membrány, zatímco CEV a EEV jsou oba obklopeny dvěma membránovými vrstvami a IEV má tři membrány. IMV je nejrozšířenější infekční forma a předpokládá se, že je odpovědná za šíření mezi hostiteli. Na druhé straně, u CEV se předpokládá, že hraje roli při šíření z buňky do buňky a EEV se považuje za důležitou pro dlouhé vzdálenosti šíření v hostitelském organismu.[21]

3.6 RETROVIRY

Retrovirus je jakýkoliv virus patřící do virové čeledi Retroviridae. Jedná se o RNA viry obalené jednovláknitou nukleovou kyselinou. Jsou schopné přepsat svou genetickou informaci do DNA pomocí reverzní transkriptázy.

Viriony mají průměr okolo 100 nm, jsou obalené a kulovitěho tvaru. Uvnitř virionu můžeme také najít tRNA, která se využívá jako primer k syntéze komplementární negativní DNA v infikované buňce. Retroviry se replikují v cytoplasmě a dozrávají pučením z cytoplasmatické membrány napadené buňky.

Genom je tvořen 2 molekulami pozitivní jednovláknité RNA (+ssRNA). Retrovirové genomy obvykle obsahují tři otevřené čtecí rámce, které kódují proteiny, které lze nalézt ve zralém viru. Skupina-specifický antigen (gag) kódují jádra a strukturálních proteinů viru, polymerázy (pol) kódují pro reverzní transkriptázy, proteázy a integrázy, (env) kódují retrovirových obalových proteinů. [22]



Obrázek 5 - Organizace genomu retrovirů; převzato z: Zdroj obrázků [5]

Retrovirové vektory mohou trvale integrovat do genomu infikované buňky, ale vyžadují mitotické buněčné dělení pro transdukcii. [12]

Retrovirus infikuje cílové buňky prostřednictvím specifické interakce mezi virového obalového proteinu a buněčného povrchu "receptor" na cílové buňky. Schopnost retrovirů vložit svůj genom do hostitelské DNA, umožňuje stabilní genetickou

modifikaci pro život hostitelské buňky. Tato stabilita je v kontrastu k dodání genu za použití určitých DNA virů, jako je adenovirus, herpes simplex virus, a papilomaviru, které zůstávají epizomální. Jakmile provirová DNA dosáhne jádro, je integrována do hostitelské DNA pomocí virově kódovaného integrázy. Integrovaný provirus je pak transkribován a produkuje RNA kódující virový gag, pol, env a proteiny, které umožňují balení plné délky virové RNA, který obsahuje sekvenci psi; sestříhané zpráva neobsahuje psi míst, a tudíž není zabaleno.

Důležitým rysem životního cyklu viru je, že infikované buňky stabilně vytváří viry bez výrazného vlivu na vlastnosti růstu buňky. Tak mohou být vytvořeny stabilní linie producentů, které umožňují trvalou produkci rekombinantních virů. Vzhledem k tomu, retrovirové vektory mají tu výhodu, že stabilně integrují do hostitelské DNA v infikovaných buňkách a exprese terapeutického genu pro život této buňky se udržuje v průběhu následného dělení mitózy; tak mohou být retrovirové transdukované buňky klonově rozšířeny. Nevýhodou retrovirových vektorů MMLV bázi je, že vyžadují buněčné dělení, zejména mitózu, pro integraci. To znamená, že stávající retrovirové vektory jsou vhodnější pro genovou terapii ex vivo, ve kterých mohou být izolované buňky propagovány v kultuře, geneticky modifikovány retrovirovou infekcí, a pak transplantovány do pacienta příjemce. Retrovirové vektory mohou být také použity k infikování některé rychle se dělící buňky in vivo, jako jsou například hepatocyty po parciální hepatektomii, rychle se dělících nádorových buněk, nebo proliferující synoviální buňky lemující zánětům kloubů. Nedávné pokroky v produkci vyššího titru virů a dalšího rozvoje lentivirových vektorů, které mohou infikovat buňky, mohou počítat s obecnou působností retrovirových vektorů v genové terapii in vivo. [12]

Průkopnická práce na dodání genu in vivo byla provedena s pomocí retrovirových vektorů, typicky s použitím viru myší leukémie. Neboť výhodnými znaky retrovirů je jejich schopnost integrovat do genomu hostitele, a tedy podporovat expresi heterologního genu pro delší časové období. Neschopností retrovirových vektorů pro infekci nedělících se buněk je však omezena jejich potenciální aplikace. [13]

4 METODY STANOVENÍ

V této kapitole se zmíníme o metodách, kterými se stanovují již výše uvedené virové vektory. Tyto metody lze rozdělit do 2 skupin – prvními jsou klasické metody stanovení virů a druhou molekulárně biologické metody.

4.1 KLASICKÉ METODY

Mezi nejvýznamnější klasickou metodu detekce, která jde použít na stanovení imunitní odpovědi vyvolané virovými vektory je ELISA. Jedná se o imunochemickou metodu, při níž se používá enzym navázaný na Fc fragment protilátky ke značení antigenu a tím následně celého imunokomplexu. Navázání enzymu se znázorní reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu. Laboratorní průkaz protilátek je často používán při stanovování adenovirů. [66]

Western blot je další neméně důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii. Pomocí western blotu můžeme identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk. [68]

Jako příklad využití těchto metod můžeme uvést studii zabývající se léčbou cystické fibrózy. Tyto výše uvedené metody, slouží jako screening před případným použitím genové terapie.

V proběhlé studii byly zaznamenávány kohorty normálních subjektů a pacientů s cystickou fibrózou, které se zabývaly již existující imunitou vůči těmto virům způsobené přirozeně získanými infekcemi. Byla provedena řada humorálních a buněčných testů na adenovirový sérotyp 5 (Ad5) a adeno-asociovaný virus sérotyp 2 (AAV2) od sérových a periferních krevních mononukleárních buněk. Prakticky všichni pacienti měli Ig až Ad5, i když pouze 55% těchto protilátek neutralizovalo virus (NAB). Sérum bylo hodnoceno jako neutralizační protilátka (NAB), izotypy Ig pomocí metody ELISA, metoda Western blot analýzy byla provedena za účelem vyhodnocení distribuce protilátek proti kapsidovým proteinům. Tyto studie demonstrují značnou heterogenitu v již existující imunitě vůči Ad5 a AAV2 u lidských populací. [69]

4.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

Molekulárně biologické metody nám umožňují detekovat a identifikovat viry, které není možné běžně izolovat na buněčných kulturách nebo prokazovat jejich antigeny v infikovaných buňkách. Tyto metody jsou velmi rychlé a umožňují získat výsledek již za několik hodin. Tím, že amplifikační molekulárně biologické metody dokáží zmnožit nukleovou kyselinu, jsou velmi efektivní a mají význam pro analýzu takových vzorků, které obsahují jenom malé množství virových částic nebo bakterií, které by jinými metodami nebylo možné prokázat. Tyto metody dokáží také stanovit tzv. holou DNA – naked DNA. Určitým problémem těchto metod je, že nedokáží rozlišit DNA pocházející z mrtvých nebo živých entit.

Tyto metody řadíme mezi přímé diagnostické metody vedle mikroskopie, elektronové mikroskopie, izolace a kultivace, detekce antigenů. Komplexní diagnostika zahrnuje ještě nepřímé diagnostické metody založené na imunochemickém průkazu specifických protilátek. [63]

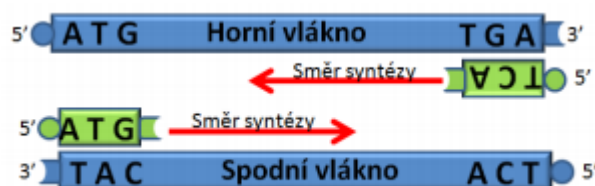
Nejdominantnější metodou je zde jednoznačně kvantitativní PCR (qPCR). Zavedení této technologie výrazně zlepšilo a zjednodušilo kvantifikaci nukleových kyselin a tato technologie se stala neocenitelným nástrojem pro mnoho vědců pracujících v oblasti molekulární diagnostiky. [70]

4.2.1 METODA qPCR

Metoda qPCR je používána pro kvantifikaci DNA a transkripci. Kvantitativní PCR je založena na klasické PCR, využívá se ale speciální cycler, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA, a to v průběhu každého cyklu. Detekce množství DNA je možná díky přítomnosti fluorescenčního substrátu, který je vázán na přítomnou DNA. Fluorescence je vyzařovaná substrátem až po jeho navázání na DNA, tedy nikoliv volným substrátem. Pro detekci cílové DNA je qPCR je vysoce citlivou metodou a pokud jsou využity specifické fluorescenční substráty, tak je to i metoda vysoce specifická.

Primery pro Real-time PCR jsou navrhovány standardně. Je nutná zvýšená pozornost ohledně nespecifického vázání primerů. Primery musí být specifické! Funkčnost primerů je třeba nejprve ověřit standardní PCR a elektroforetickou separací v agarosovém gelu. Doporučuje se vyhodnotit účinnost reakce s danými primery a tu

pak zohlednit při konečném výpočtu. Optimální délka produktu se pohybuje kolem 100bp, může být vyšší, ale neměla by přesáhnout 500bp.



Obrázek 6 -Nasedání primerů; převzato z: Zdroj obrázků [6]

Při navrhování sekvence primeru je nutné počítat s tím, že oba primery musí mít aspoň přibližně stejnou teplotu nasedání. Tuto teplotu lze ovlivnit samotnou sekvencí primerů, resp. GC/AT obsahem a délkou primerů. Čím větší délka a vyšší obsah GC párů, tím je teplota nasedání vyšší. Teplota nasedání primerů musí být dostatečně vysoká, aby nedošlo k nespecifickému nasedání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by nenasedaly vůbec. Je potřebné, aby teplota nasedání byla optimální pro oba primery a obsah GC párů v obou primerech byl srovnatelný, tzn., aby byla srovnatelná teplota nasedání obou primerů. [71]

Teplota nasedání primerů pro daný počet bazí a GC párů													
bp	Počet GC párů												
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
16	39	41	43	25	47	49	51	53	55	57	59		
17	43	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	
18	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	67
19	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71
20	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73
21	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75
22	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77
23	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79
24	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79	81
25	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79	81	83

Obrázek 7 -Teplota nasedání primerů pro daný počet bazí; převzato z: Zdroj obrázků [7]

Jako příklad používání qPCR můžeme uvést replikačně defektní adenoviry, které byly použity jako vektory v různých prostředích včetně genového přenosu, manipulace s genem a studií funkčnosti. Pro rychlé stanovení fyzikálních titrů rekombinantních adenovirových vektorů je popsán kvantitativní test na bázi qPCR. Tato metoda je založena na amplifikaci 77 bp fragmentu umístěného v blízkosti levého konce genomu adenoviru typu 5. Vyhodnocení této metody ukázalo, že je jednoduché, citlivé a reprodukovatelné. Tento test je použitelný pro purifikovaný adenovirus stejně jako pro

vektory připravené jednoduchým procesem lýzy buněk, vyžadující pouze malé množství výchozího materiálu.[54]

Přesná titrace adeno-asociovaných virových (AAV) genomových kopií genu je rozhodující pro zajištění správného a reprodukovatelného dávkování v předklinickém i klinickém prostředí. Kvantitativní PCR (qPCR) je současná metoda volby pro titraci AAV genomů z důvodu jednoduchosti, přesnosti a robustnosti testu. Byly však zaznamenány problémy s určením komplementárních titrů genu AAV založených na qPCR v důsledku vyloučení primer-sond pomocí genomového samočinného žíhání nebo balení předčasně ukončených defektních interferujících genomů (DI). Na překonání těchto problémů byly navrženy alternativní metody titrování qPCR, gelu nebo Southern blotting. Tyto metody však mohou být krok zpět od standardních metod qPCR právě z hlediska jednoduchosti a přesnosti. [53]

LÉČBA MALIGNÍCH GLIOMŮ

Genová terapie představuje slibnou léčebnou alternativu pro pacienty s maligními gliomy. Virové vektory, které byly testovány v klinických studiích, se často zaměřují pouze na ty nádorové buňky, které sousedí s místem vpichu. V jedné ze studií byla zkoumána proveditelnost použití lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC), aby poskytli replikačně kompetentní onkolytický adenovirus (CRAd) v modelu intrakraniálního maligního gliomu. K tomu byly zkoumány CRAds s chimérickým 5/3 vláknem nebo RGD páteří s nebo bez CXCR4 promotorem řídicího E1A s ohledem na replikaci a toxicitu v hMSC, lidských astrocytech a lidské gliomové buněčné linii U87MG pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce a membrány Testu integrity.

Replikace adenovirové E1A byly hodnoceny pro relativní změny exprese cDNA E1A pomocí kvantitativní PCR. Celková DNA byla extrahována pomocí „DNeasy Tissue kit“. DNA byla podrobena qPCR za použití primerů zaměřených na E1A a lidské GAPDH geny pro stanovení virové replikace in vitro a normalizováno na nanogramy DNA izolované z nádorových xenoštěpů a vzorků myších mozkových tkání.

Reakce probíhala za následujících podmínek: 2 minuty při 95 ° C, následovalo 32 cyklů, z nichž každý měl několik kroků: Nejprve 20 sekund při 94 ° C, poté 20 sekund při 56 ° C a na závěr 20 sekund při 72 ° C.

Pro každou qPCR byla jako negativní kontrola zahrnuta reakce bez templátu. Hodnoty prahového cyklu pro E1A a GAPDH byly získány z qPCR a převedeny na číslo genové kopie ze standardních křivek.

Tabulka 2 - qPCR - Použití primerů zaměřených na E1A a GAPDH

E1A-Forward	5'-AAC CAG TTG CCG TGA GAG TTG -3'
E1A-Reverse	5'-AAC CAG TTG CCG TGA GAG TTG -3'
GAPDH -Forward,	5'-GGT TTA CAT GTT CCA ATA-3'
GAPDH -Reverse	5'-ATG GGA TTT CCA TTG ATG ACA AG-3'

Pro detekci hMSC DNA v nádorových xenograftech nebo myších vzorcích mozkové tkáně byla kvantifikace lidské Y chromozomové oblasti DYS14 provedena s následujícími primery:

Tabulka 3- qPCR - Detekce hMSC DNA v nádorových xenograftech

DYS14-Forward	5'-GGG CCA ATG TTG TAT CCT TCTC-3'
DYS14 - Reverse	5'-GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTTC-3'

Reakce probíhala za následujících podmínek: 2 minuty při 50 ° C a 10 minut při 95 ° C pro počáteční denaturaci DNA a aktivaci polymerázy, následovalo 50 cyklů trvajících 1 minutu při 60 ° C a 15 sekund při 95 ° C. [59]

ONCOS-102

Byla provedena studie s onkolytickým adenovirem, stimulujícím faktor granulocytů makrofágů (GM-CSF), ONCOS-102, u pacientů s tumory, které byly odolné vůči jakékoliv léčbě. Cílem studie bylo stanovení optimální dávky pro další použití a posouzení profilu bezpečnosti ONCOS-102, tolerance a nežádoucích účinků. Pro stanovení onkolytického viru, byla použita metoda qPCR.

Izolace DNA pro qPCR byla provedena s použitím soupravy pro izolaci DNA z tělesných tekutin podle protokolu výrobce. Specifický adenovirový PCR produkt byl připraven z genomové DNA ONCOS-102 a klonován do plazmidu pCR4 TOPO TA, který byl použit jako pozitivní kontrolní standard pro qPCR test, qPCR se provádí za použití primerů [72]:

Tabulka 4 –qPCR pro stanovení ONCOS – 102

Ad_dE1 -Forward	5'-1 CTA TGC CAA AAC CTT GTA CCG -3'
Ad_dE1-Reverse	5'- TCC TCA CCC TCT TCA TCC TC-3'

URČENÍ TELOMELYSINU

Klinická studie byla provedena k určení klinické bezpečnosti telomelysinu, lidské telomerasové reverzní transkriptázy (hTERT) řízené modifikovaným onkolytickým adenovirem u pacientů s pokročilými solidními nádory. Vzorky pacientů byly shromážděny před infuzí a den 0 (1 hodina, 3 hodiny, 6 hodin po léčbě), den 1, 7, 14, 21, 28 a 56 po IT.

Virová DNA byla kvantifikována pomocí qPCR. DNA byla extrahována Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (vzorky plazmy a slin) nebo QIAamp Virální RNA Mini Kit (vzorky moči). qPCR byla provedena na iQ5 Q-termocyklu (BioRad, Hercules, CA) za použití primerů specifických pro telomelysin pro oblasti E1A a IRES a 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Množství detekovatelných virových částic bylo kvantifikováno extrapolací se standardní křivkou, generovanou se sériově zředěnými (1:10) DNA šablonami s předem stanovenými počty kopií (10 až 1 x 10⁶ kopií) čisté telomelysinové virové DNA. Pozitivní reakce je založena na detekci produktů amplifikace IRES a E1A s prahovou hodnotou 4 x 10² vp / ml pro plazma a sliny; 1 x 10³ vp / ml pro moč; 2 x 10³ vp / ml pro vzorky sputa pro obě reakce. [67]

Tabulka 5 – qPCR – Detekce virové DNA při stanovování telomelysinu

IRES-Forward	5'-GAT TTT CCA CCA TAT TGC CG 3'
IRES-Reverse	5'-TTC ACG ACA TTC AAC AGA CC3'
E1A-Forward	5'-CCT GTG TCT AGA GAA TGC AA3'
E1A-Reverse	5'-ACA GCT CAA GTC CAA AGG TT3'

5 VYUŽITÍ LÉČBY GENOVÉ TERAPIE

V dnešní době jsou velkým problémem v lékařství geneticky podmíněné choroby. Poté co byla v 90. letech minulého století poprvé použita GT, postupně stoupá zájem o tento léčebný způsob.

Strategie zahrnuje použití somatických kmenových buněk, přenosu genů, modifikaci RNA a v budoucnu využití embryonálních kmenových buněk. Navzdory účinnosti těchto technologií při léčbě experimentálních modelů dědičných chorob, je jejich úspěšná aplikace velkou výzvou, která bude překonána pouze při vynaložení značných intelektuálních a hospodářských zdrojů, a při řešení společenských problémů o změnách lidského genetického repertoáru

Nejprve se GT začala věnovat léčbě vrozených nemocí, postupem času se však začíná rozšiřovat i využití pro léčení získaných nemocí. [24]

5.1 VROZENÉ NEMOCI

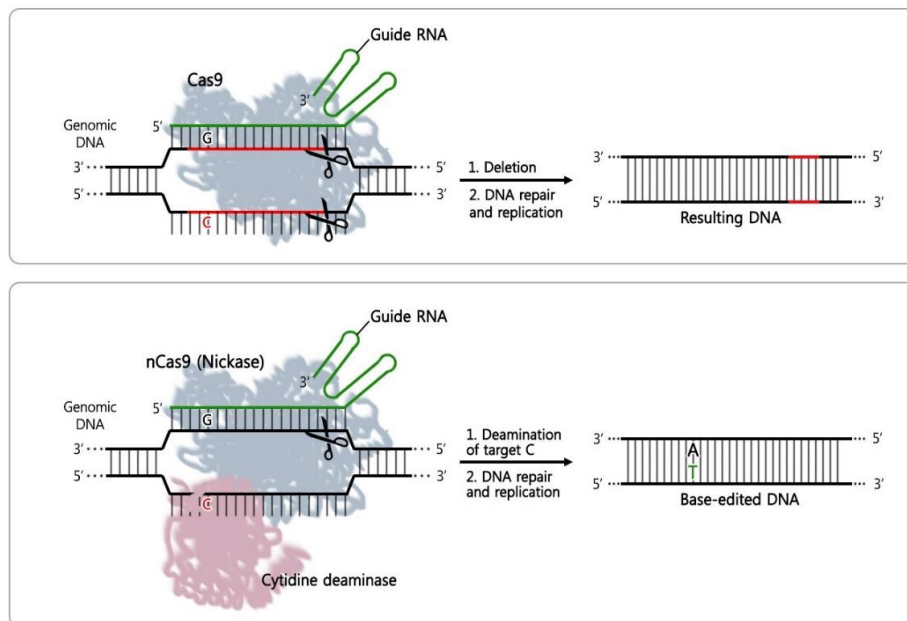
Léčba z více než 1800 známých monogenních dědičných poruch, závisí na vývoji „genetických léků“ - terapie, které využívají přenos DNA a / nebo RNA modifikuje expresi genu pro korekci nebo kompenzuje abnormální fenotyp.

Cystická fibróza, srpková anémie, Huntingtonova choroba, fenylketonurie či hemofilie. To jsou příklady onemocnění, která může vyvolat mutace v jediném nukleotidu řetězce DNA. Lidská DNA se přitom skládá z přibližně 3 miliard nukleotidů čtyř základních typů: adenin, cytosin, guanin a thymin. Odborníci doufají, že se časem podaří tato onemocnění vyléčit a to tím způsobem, že pouze přepíšeme chybné písmeno DNA a nahradíme ho správným. Problém je ale v tom, že pro současný top genetický editor CRISPR/Cas9 je něco takového technicky dost náročné.

Tým badatelů korejského centra Center for Genome Engineering z institutu IBS (Institute for Basic Science) teď proto upravil editor CRISPR/Cas9 a s jeho pomocí vytvořil transgenní myši s jediným přeepsaným nukleotidem. Dnes velice úspěšný genetický editor CRISPR/Cas9 funguje tak, že vystřihne krátký úsek řetězce DNA a nahradí novou sekvencí. Korejský tým použil verzi „nůžek“ editoru, tedy proteinu Cas9, zvanou nickáza Cas9 (nCas9), kterou ještě fúzí spojil s enzymem cytidin deaminázou, jenž dovede vyměnit jediný nukleotid za jiný.

Badatelé takto vytvořili zbrusu nový nástroj pro editaci DNA, fúzí CRISPR/nCas9/cytidin deaminázu, a hned jej vyzkoušeli u myši. S tímto editorem změnili vždy jediný nukleotid v genomu myších embryí, buď v genu pro dystrofin (Dmd), který hraje roli v řadě fatálních genetických poruch svalů, anebo v genu pro tyrozinázu (Tyr), nezbytnou pro tvorbu melaninu.

V obou dvou případech byli úspěšní. Z embryí s přeepsaným nukleotidem genu pro dystrofin vyrostly myši se svaly bez dystrofinu a z embryí se změnou písmene v genu pro tyrozinázu zase myši albíni. [25]



Obrázek 8 - Genetický editor CRISPR/Cas9 j; převzato z: Zdroj obrázků [8]

5.1.1 HEMOFILIE

Hemofilie B může být trvale vyléčena za pomoci genové terapie, a to zavedením správné kopie genu faktoru IX do somatických buněk pacienta.

V nedávné studii byl zaveden rekombinantní lidský faktor IX cDNA do primárních lidských keratinocytů pomocí retrovirových vektorů. V tkáňové kultuře bylo zjištěno, že transdukované keratinocyty vylučují biologicky aktivní faktor IX a po transplantaci těchto buněk do nahých myší, byl lidský faktor IX detekován v krevním oběhu v malých množstvích po dobu jednoho týdne. Toto je první demonstrace terapeutického proteinu dosahující do krevního oběhu z transdukovaných primárních keratinocytů. Toto může mít důsledky pro léčbu hemofilie B a dalších poruch. [26]

Strategie genové terapie určené k boji proti hemofilii B, způsobené vadou koagulačního faktoru IX, se dosud soustředila na přístup ex vivo. Nyní bylo vše přehodnoceno a adenovirovým vektorem byla zprostředkována exprese lidského faktoru IX in vivo. Injekce vektoru Av1H9B, která kóduje lidský faktor IX cDNA, do ocasní žíly myší vedlo k účinné jaterní transdukci a změně plazmatické hladiny lidského faktoru IX. Avšak po dobu devíti týdnů hladina pomalu klesla na základní hodnotu. Tyto výsledky řeší jak výhody, tak i překážky pro použití adenovirových vektorů pro léčbu hemofilie B. [27]

Studie hodnotili stabilitu exprese transgenu a dlouhodobé bezpečnosti u 10 pacientů s těžkou hemofilií B. Pacienti následně podstoupili rozsáhlejší klinické a laboratorní sledování. Byla jim podána infuze jedné dávky AAV8 vektoru, která měla za následek dlouhodobé terapeutické zlepšení faktoru IX. S navazujícím obdobím až 3 let, nebyly zjištěny žádné pozdní toxické účinky.

Závěrem, bylo zjištěno, že jedna infuze z AAV8 vektoru má za následek expresi odolného faktoru IX a dlouhotrvající zmírnění krvácení epizody u pacientů s těžkou formou hemofilie B. [51]

5.1.2 CYSTICKÁ FIBRÓZA

Důležitou otázkou pro in vivo genovou terapii cystické fibrózy (CF) je procento buněk v dýchacích cestách CF, která bude vyžadovat opravu. [30]

Genová terapie cystické fibrozy bude pravděpodobně vyžadovat dodání normálního genu CF do epitelu dýchacích cest pacientů s CF. Zde byla ohlášena výstavba nového adenoviru na bázi vektoru, Ad2 / CFTR-1, který je určen pro tento účel. Tento vektor je odvozen z adenoviru typu 2, a postrádá většinu z oblasti E1 kódující sekvence. Na místě sekvence E1, cDNA kódující CFTR, produkt genu CF, je substituován. Na rozdíl od mnoha E1-delečních vektorů, konstrukt zachovává celou oblast E3. Uvádíme údaje některých aspektů životního cyklu viru v buňkách tkáňové kultury, které demonstrují schopnost tohoto vektoru pro doplnění defekt trans epiteliální Cl sekrece charakteristikou lidské CF epiteliálních dýchacích cest buněk. [29]

Replikace rekombinantních virů nebyla detekována v jiných buňkách, i když by bylo možné měřit syntézu virové DNA a transkripce z oblastí E4 a L5. Tyto E1-deleční vektory byly také nedostatečné v buněčné transformaci, vypnutí syntézy proteinů hostitelské buňky. Ad2 / CFTR-1 produkovaný protein CFTR v různých buňkách, včetně epitelu dýchacích cest u pacientů s CF. Expresí funkčního proteinu CFTR v CF epitelu dýchacích cest monovrstvy byla detekována korekce charakteristiky defektu Cl dopravy CF. Překvapivě nízké multiplicity infekce (moi 0,1), byly dostatečné k vytvoření CFTR Cl proudu přes CF epitelové monovrstvy in vitro. Tyto údaje spolu s nedostatkem zjevné toxicity, naznačují, že Ad2 / CFTR-1 by měly být vhodné pro genovou terapii CF. [31]

Rekombinantní adenoviry jsou vyvíjeny pro léčbu cystické fibrózy, protože mohou účinně transdukovat do rekombinantních genů nedělicí se buňky in vivo. Současné strategie pro zlepšení rekombinantních adenovirů chtějí inaktivovat jiné důležité geny delecí nebo začleněním mutací do citlivých teplot, které umožňují množení viru v dostupných balících buněčných liniích při permissivní teplotě. Je popisován nový typ rekombinantního adenoviru, který je odstraněn ze všech virových otevřených čtecích rámců. Tento rekombinantní (tzv DrAd), který obsahuje pouze základní cis elementy (tj ITR a souvislé obaly sekvence), se množí v buňkách 293 v přítomnosti E1 deletovaným pomocného viru. Plně vypouští rekombinantní adenovirus, který exprimuje lidský transmembránový regulátor cystické fibrózy. [38].

5.1.3 HUNTINGTONOVA CHOROBA

Huntingtonova choroba (HD) je autosomálně dominantní genetické onemocnění s ničivými klinickými účinky na kognitivních, psychických a motorických funkcí. Tyto klinické příznaky se týkají především progresivní ztrátou GABA-ergní neuronů striatu.

V dnešní době neexistuje žádná stoprocentní známá léčba pro tuto nemoc, ačkoli některé neurotrofické faktory, včetně neurotrofního faktoru (BDNF) prokázaly schopnost chránit striatu neuronů v různých experimentálních modelech HD. [34]

Zvířecí modely, které nám úzce napodobují neurobiologické a klinické příznaky onemocnění mohou nabídnout alternativní přístup k vývoji nových léčebných postupů. Byl analyzován účinek adenovirem zprostředkované přenosu genu pro BDNF v modelu HD. Pomocí stereologického postupu, dostaly tři skupiny krys injekci s adenovirem BDNF, beta-galaktosidáza, nebo podstoupili placebo operaci.

Dva týdny po ošetření byla zvířata ošetřena lézí s kyseliny chinolinové (QUIN), toxin, který vyvolává striatální smrt neuronů pomocí excitotoxické procesu. Jeden měsíc po lézi, histologické studie ukázaly, že striatální neurony byly chráněny pouze u potkanů léčených BDNF adenovirem. Pro stanovení přežití striatálních GABA-ergní výstupních neuronů po QUIN indukované léze jsme imunologicky řezů mozku s DARPP-32, protilátky specifické pro striatálních výstupních neuronů. Předchozí léčba s BDNF adenoviru vedla k přežití 64% buněk, vzhledem k tomu, že po léčení beta-galaktosidázy byla 46% ($p < 0,05$). Tyto výsledky ukazují, že přenos genu BDNF má terapeutickou hodnotu pro léčbu Huntingtonovy choroby. [33]

5.2 ZÍSKANÉ NEMOCI

Některé nemoci, které člověk za svůj život může pochytit, nejsou podmíněny genetikou, může si za ně člověk ve větší či menší míře člověk sám. Může to ovlivnit mnoho faktorů, jako je špatný životní styl – nedostatek pohybu, nevyvážená životospráva, rizikový sexuální život nebo se v určitých případech může jednat o pouhou náhodu.

5.2.1 PARKINSONOVA CHOROBA

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění, postihující centrální nervovou soustavu. Její příčinou dochází k úbytku nervových mozkových buněk v oblasti černá substance (substantia nigra). V této části mozku je tvořen dopamin, přenašeč signálů mezi nervovými buňkami. Ten funguje na několika nervových drahách, z nichž jedna slouží k přenosu signálů při plánování a kontroly pohybu. Nedostatek dopaminu má za následek to, že pacient není postupně schopen ovládat, či kontrolovat své pohyby. [39]

Hlavní abnormality Parkinsonovy nemoci jsou způsobeny změnami aktivity síťových bazálních ganglií včetně inhibice subthalamického jádra (STN) a nadměrné aktivity hlavních výstupních jader. Pomocí genového přenosu somatických buněk zprostředkovaného adeno-asociovaným virovým vektorem byla exprimována dekarboxylasa kyseliny glutamové, enzym, který katalyzuje syntézu neurotransmiteru GABA, u excitačních glutamatergických neuronů STN u potkanů. Transdukované neurony, které byly poháněny elektrickou stimulací, produkovaly smíšené inhibiční odpovědi spojené s uvolňováním GABA. Tento fenotypový posun vedl k silné neuroprotekcí nigralních dopaminových neuronů a záchraně parkinsonského behaviorálního fenotypu. Tato strategie naznačuje, že existuje plasticita mezi excitační a inhibiční neurotransmisí v mozku savců, která by mohla být využita pro terapeutický přínos. [40]

V posledních několika letech, rekombinantní virové vektory odvozené od adenovirů, adeno-asociovaných virů nebo lentivirů byly vysoce vyvinuty, pro přenos genů do centrálního nervového systému dospělého člověka. V posledních pokusech, v krysím modelu Parkinsonovy choroby, všechny tři vektorové systémy prokázaly, že jsou účinné pro dlouhodobé podávání neurotrofního faktoru odvozeného od gliové buněčné linie (GDNF) na biologicky relevantních úrovních v nigrostriatálním systému. Injekce vektorů kódujících GDNF do striatum nebo substantia nigra tak umožňuje získat

regionálně omezenou nadměrnou expresi GDNF v nigrostriálním systému, která je dostatečná k blokování toxinem indukované degenerace neuronů nigrálního dopaminu. Injekce vektorů GDNF v striatu je zejména účinná nejen při záchraně buněčných těl v substantia nigra, ale také při zachování nigrostriální projekce a funkční striální dopaminové inervace v krysím modelu Parkinsonovy choroby. Dlouhodobé experimenty s použitím vektorů AAV-GDNF a LV-GDNF navíc ukazují, že trvalé podávání GDNF po dobu 3-6 měsíců může podpořit regeneraci a významné funkční zotavení u potkanů poškozených 6-OHDA a opic MPTP. Účinnost nových vektorů AAV a LV naznačuje, že nyní může nastat správný čas na to, aby se tyto vektorové systémy objevily jako nástroje pro neuroprotektivní léčbu u pacientů s Parkinsonovou chorobou. [41]

5.2.2 ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA

Roztroušená skleróza (MS) je onemocnění s hlubokou heterogenitou v klinickém kurzu, neurorádiologický vzhled lézí, zapojení lokusů susceptibility genu. Tyto rysy jsou podpořeny experimentálními důkazy, které demonstrují, že zásadně odlišné procesy, jako je autoimunita nebo virové infekce, mohou indukovat zánětlivé demyelinizační plaky podobné MS a naznačují, že MS může být onemocněním s heterogenními patogenetickými mechanismy.[36]

Za největší autoantigen onemocnění byl určen základní myelinový protein, který je rozeznáván T-lymfocyty, které aktivují imunitní reakci. Případné snížení specifické odpovědi na tento protein, může mít pozitivní efekt. v léčbě

První studie ke zmírnění autoimunitní odpovědi provedl Bar-Or který využil vektor BHT-3009. Jedná se o DNA vakcínu, která obsahuje gen pro základní myelinový protein. Tato studie prokázala bezpečnost a efektivitu vektoru BHT-3009 pro zvýšení antigen specifické tolerance k myelinovým proteinům u pacientů s roztroušenou sklerózou. Bylo pozorováno snížení CD4+ T-lymfocytů, reagujících na myelin, z periferní krve a snížení myelin specifických protilátek z mozkomíšního moku. Druhá fáze klinických pokusů potvrdila předchozí výsledky, a k tomu zaznamenala i pokles vzniku lézí. K výraznému snížení myelin specifických protilátek došlo u pacientů, jimž bylo podáno 0,5 mg BHT-3009. Zatímco u pacientů, kterým bylo podáno placebo či 1,5 mg BHT-3009, nebyly pozorovány změny.

První a druhá klinická fáze využití vektoru BHT-3009, prokázala jeho bezpečnost a dobrou snášenlivost pacienty a účinné navození imunitní tolerance k autoantigenu. Celkové zmírnění poškození mozku po aplikaci vektoru A proto se BHT-3009 se ukazuje jako slibná cesta léčby roztroušené sklerózy. [42]

5.2.3 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Během posledních 20 let bylo zjištěno, že neurotrofické faktory hluboce ovlivňují vývoj nervového systému a mají potenciál upravit chorobné procesy v dospělém nervovém systému. Schopnost růstových faktorů nervového systému zabránit nebo omezit degeneraci neuronů u zvířecích modelů neurodegenerativních onemocnění vedla k několika klinickým studiím.

Jednou z hlavních překážek úspěchu těchto studií je metoda dodávání růstových faktorů: v cílové oblasti mozku, kde musí být dosaženy dostatečně vysoké dávky neurotrofických faktorů, aby se efektivně upravily chorobné procesy, ale výdej musí být omezen, aby se předešlo nežádoucím účinkům. Nedávné pokroky v molekulární medicíně umožnily genové terapii v nervovém systému potenciálně realistický přístup k poskytování terapeutických molekul, jako jsou růstové faktory. [43]

Zdá se, že akumulace nerozpustných agregátů peptidu amyloidu-beta produktu štěpení amyloidního prekursorového proteinu (APP), je ústředním bodem patogeneze Alzheimerovy choroby (AD).

Důsledkem toho je nižší regulace APP nebo zvýšená clearance přípravku Abeta představující možné terapeutické strategie pro AD. Byly vygenerovány vektory replikace-vadný herpes simplex virus, který inhibuje akumulaci Abeta, in vitro i in vivo.

V buněčné kultuře HSV vektory exprimující buď (i) krátkou vlásenkovou RNA směřovanou k transkriptu APP (HSV-APP / shRNA), nebo (ii) neplysin, endopeptidázu, která degraduje Abeta (HSV-nepilysin), v podstatě inhibovala akumulaci Abeta. Pro zjištění, zda tyto vektory vykazují podobnou aktivitu in vivo, byl vyvinut nový myší model, ve kterém nadměrná exprese mutantní formy APP v hipokampu za použití lentivirálního vektoru (LV-APPSw) vedla k rychlé akumulaci Abety. Co-inokulace LV-APPSw s každým vektorem HSV ukázala, že HSV APP / shRNA nebo HSV- neplysin inhiboval akumulaci Abety v tomto modelu, zatímco kontrolní vektor HSV nebyl. Tyto studie demonstrují užitečnost vektorů HSV pro snížení akumulace abet v mozku, a tak poskytují užitečné nástroje pro vyjasnění úlohy Abety v AD, která může usnadnit vývoj nových terapií pro tuto důležitou chorobu. [44]

Dosud bylo schváleno pouze pět léčiv pro léčbu Alzheimerovy choroby. Tyto látky ovšem mají dopad na symptomy spíše než na progresi onemocnění. Je dobře známo, že nervový růstový faktor (NGF) zvyšuje funkci a přežití bazálních cholinergních neuronů

v předním mozku, které jsou v AD náchylné. NGF však nepřekročí hematoencefalickou bariéru a intraventrikulární injekce NGF u zvířat a lidí byly spojeny s významnými vedlejšími účinky. Dodávka genu na bázi adeno-asociovaného viru je nová technologie vyvinutá pro podávání NGF do mozku k léčbě AD symptomů a progresu. Účinnost podávání genu *ex vivo* byla skutečně prokázána u pacientů s AD, kteří zaznamenali zlepšení v metabolismu a poznávání mozku ve srovnání s předoperační funkcí bez nežádoucích účinků. nCERE-110 (AAV2-NGF), vyvinutý firmou Ceregene Inc, je vektor na bázi AAV sérotypu 2, který exprimuje lidský NGF dodávaný do jádra bazaliky Meynertu stereotaktickou injekcí pro léčbu AD. Studie na zvířatech prokázaly předklinickou účinnost CERE-110, což odhalilo vynikající bezpečnostní profil. CERE-110 prošla klinickou zkouškou fáze I a zahájila se multicentrická klinická studie fáze II. CERE-110 je slibným kandidátem na léčbu AD. [45]

Vadná manipulace s bílkovinami je ústředním rysem závažných neurodegenerativních onemocnění. Objev, že neuronální dysfunkce nebo degenerace mohou být způsobeny mutacemi v jednotlivých buněčných proteinech, dala nové příležitosti k modelování základních chorobných procesů genetickou modifikací buněk *in vitro* nebo generací transgenních zvířat nesoucích gen způsobující choroby. Nedávný vývoj v rekombinantní virové vektorové technologii otevřel zajímavou alternativu založenou na přímém přenosu genů do vybraných subregionů nebo podskupin neuronů v mozku. Použitím vysoce účinných adeno-asociovaných virů nebo vektorů lentivirů nedávné zprávy ukázaly, že nadměrná exprese mutovaných lidských huntingtinů nebo α synucleinů v neuronech v striatum nebo substantia nigra indukuje progresivní neuropatologii a neurodegeneraci podobnou jako u Huntingtonovi a Parkinsonovi choroby. Cílená nadměrná exprese genů způsobujících onemocnění rekombinantními virovými vektory poskytuje nový a vysoce flexibilní přístup pro modelování neurodegenerativních onemocnění *in vivo* nejen u myší a potkanů, ale také u primátů. [46]

5.2.4 METABOLICKÉ PORUCHY

Poruchy metabolismu jsou často závažné a v mnoha případech těžkou nebo nemožno léčitelné. Proto existuje v posledních letech naléhavá potřeba prozkoumat nové léčebné modality, včetně genové terapie, a zkoumat několik fenotypů, kde jsou rizika experimentální terapie vyvážena potenciálními přínosy pro účastníky hodnocení.

Mezi dostupnými systémy dodávání genů rekombinantní AAV vykazuje zvláštní příslib pro léčbu metabolického onemocnění vzhledem k nebývalé účinnosti dosažené při transdukcii klíčových cílových tkání, jako jsou játra a svaly, u malých zvířecích modelů. V dnešní době bylo při studiích na malých zvířatech zkoumáno více než 30 fenotypů metabolických onemocnění, přičemž v podstatné míře bylo dosaženo úplné korekce fenotypu.

Dosažení přiměřeně rozšířené transdukce v centrálním nervovém systému však zůstává hlavním úkolem a bude rozhodující pro realizaci terapeutického potenciálu genové terapie u mnoha z nejvíce klinicky znepokojujících fenotypů metabolické nemoci. Navzdory relativně nízké imunogenitě vektorů AAV se také objevují imunitní odpovědi, jako fakt vyžadující zvláštní pozornost, protože úsilí se zrychluje k lidskému klinickému překladu.

Čtyři fenotypy metabolických onemocnění dosáhly studií fáze I nebo I / II s jedním nedostatkem lipoprotein lipázy zaměřujícím se na léčbu, které ukazují vzrušující včasné důkazy účinnosti. [47]

5.2.5 RAKOVINA

Rakovina je onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovanému růstu určité skupiny buněk, které jsou zapříčiněny mutacemi genů, které řídí buněčný cyklus či apoptózu. Obecně lze říci, že u každého typu buněk, který v lidském organismu existuje, může dojít k rakovinnému bujení. Podle náležitosti buněk k určitým základním typům se také nádorová onemocnění dělí. Důležité je rozlišení nádorů na nezhoubné – benigní a zhoubné – maligní. Maligní nádor se na rozdíl od benigního vyznačuje velmi agresivním růstem s ničením okolní tkáně, zakládáním dceřiných ložisek (metastáz) a nakonec celkovým vyčerpáním organismu vedoucím k smrti. Genová terapie se snaží zabývat léčbou maligních nádorů. [48]

Široká oblast genové terapie slibuje řadu inovativních způsobů léčby, které se pravděpodobně stanou důležitými pro prevenci úmrtí na rakovinu. V současnosti se k tvorbě rekombinantních rakovinových vakcín používá genová terapie. Na rozdíl od vakcín proti infekčním činitelům nejsou tyto vakcíny určeny k prevenci onemocnění, ale k vyléčení nebo jejich potlačení vyškolením imunitního systému pacienta k rozpoznání rakovinných buněk tím, že je prezentují vysoce antigenní a imunostimulační buněčné úlomky

Velká budoucnost je vkládána do tří různých přístupů léčby genové terapie: imunoterapie, onkolytická viroterapie a přenos genů.

Imunoterapie používá geneticky modifikované buňky a virové částice ke stimulaci imunitního systému k ničení rakovinných buněk. Nedávné klinické testy vakcín druhé a třetí generace ukázaly povzbudivé výsledky se širokou škálou nádorů, včetně rakoviny plic, rakoviny slinivky, rakoviny prostaty a maligního melanomu. Počáteční rakovinné buňky se sklízí z pacientů (autologních buněk) nebo ze zavedených nádorových buněčných linií (alogenní) a pak se pěstují in vitro. Tyto buňky jsou pak navrženy tak, aby byly pro imunitní systém rozpoznatelnější přidáním jednoho nebo více genů, které jsou často cytokinovými geny, které produkují prozánětlivé molekuly stimulující imunitu nebo vysoce antigenní proteiny. Tyto pozměněné buňky jsou pěstovány in vitro a usmrceny a buněčný obsah je začleněn do vakcíny

Onkolytická viroterapie, která využívá virové částice, které se replikují v rakovinové buňce a způsobují buněčnou smrt, je nově se objevující léčebnou modalitou, která ukazuje velký příslib, zejména u metastatických nádorů. V tomto případě je nejvíce

zkoumaný nádorový supresor p53, který se pomocí rekombinantních virových vektorů začleňuje do nádorových buněk. Počáteční studie fáze I pro několik vektorů vyvolala vzrušení nad potenciální silou této techniky. Stejně jako imunoterapie se jedná o koncept, který je již téměř sto let a jako imunoterapie prochází renesancí kvůli genové terapii. Onkolytické genové terapeutické vektory jsou obecně viry, které byly geneticky navrženy tak, aby cíleně zničily rakovinové buňky, zatímco by zůstaly neškodné pro zbytek těla. Onkolytické vektory jsou navrženy tak, aby infikovaly rakovinné buňky a indukovaly buněčnou smrt. Šíření viru, exprese cytotoxických proteinů a buněčné lýzy. Pro tento účel bylo použito několik různých virů, včetně vakcinie, adenoviru, viru herpes simplex typu I, viru reovirů a newcastleské choroby. Tyto viry byly v mnoha případech vybrány pro svou přirozenou schopnost zaměřit se na rakovinu, stejně tak, jako pro snadnou manipulaci s nimi.

Transfer genů je nová modalita léčby, která zavádí nové geny do rakovinných buněk nebo do okolní tkáně, která způsobí buněčnou smrt nebo zpomalí růst rakoviny. Tato technika léčby je velmi flexibilní a v klinických studiích s úspěšnými výsledky se používá široká škála genů a vektorů. Vzhledem k tomu, že tyto terapie jsou zralé, mohou být užívány samostatně nebo v kombinaci se současnými léčbami, které pomáhají rakovině zvládat onemocnění. Jedná se o radikálně novou paradigmatu léčby zahrnující zavedení cizího genu do rakovinných buněk nebo do okolní tkáně. Pro tento typ terapie byly navrženy geny s řadou různých funkcí, včetně sebevražedných genů (geny, které způsobují buněčnou smrt při expresi), antiangiogenetické geny a buněčné stázové geny. V klinických studiích byla použita řada různých virových vektorů, které tyto geny dodávají, nejčastěji však používaly replikační nekompetentní adenovirus. Nevirové metody, včetně nahého přenosu DNA a oligodendromeru DNA povlaky, stejně jako elektroporace jsou rovněž životaschopnými způsoby dodávání genů. Typ vybraného nosiče závisí na požadované specifčnosti genové přenosové terapie, stejně jako na době, po kterou musí být gen exprimován, aby byl účinný. Například replikační nekompetentní adenovirový vektor obsahující gen thymidinkinázy viru herpes simplex potřebuje pouze přechodnou expresi k dosažení buněčné smrti a je obecně dodáván prostřednictvím adenovirového vektoru. Avšak antiangiogenetické geny, jako je sFLT-1 a statin-AE, vyžadují kontinuální expresi pro terapeutický účinek a byly dodány s použitím plasmidů, které obsahují transpozon pro vložení genu do buněčné DNA. [49]

Všechny tyto 3 léčebné postupy se jeví jako slibné pro budoucí léčbu rakoviny, není však v dnešní době možné používat jen jednu metodu. Jako nejslibnější se zdá zavedení kombinované léčby. Jedním z těchto z těchto příkladů můžeme uvést studii, která při využití samotné chemoterapie a RNAi dosáhla u rakoviny vaječnicků 90% zmenšení nálezu, než kdyby byla použita samotná RNAi. [50]

6 BUDOUCNOST A VÝVOJ GENOVÉ TERAPIE

Odborníci tvrdí, že se genová terapie postupně stane základem medicíny 21. století. Někteří však tvrdí, že pro společnost bude lépe, pokud vědci budou postupovat pomaleji a obezřetněji.

6.1 POČÁTEČNÍ SELHÁNÍ

Genová terapie se dočkala svého prvního boomu na počátku devadesátých let minulého století. Poté co roku 1999 selhala léčba Jesse Gelsingera, u kterého bylo diagnostikováno postupné orgánové selhání, které nakonec skončilo smrtí, FDA tuto léčbu zakázala. Tato smrt byla pravděpodobně způsobena vinou imunitní reakce a použitý adenovirový vektor.[61]

6.2 VÝVOJ VE SVĚTĚ

V posledních letech se regulace postupně uvolňuje a vyspělé státy jako např. Čína, či Norsko, Švédsko se snaží o stále nový vývoj, který by mohl genovou terapii posunout dál a mohla se stát součástí běžné léčebné praxe. Tento krok je ale pořád ve svých začátcích.

6.2.1 LÉČBA RAKOVINY – GENDICINE

V roce 2003 byla na čínském trhu dostupná první komerční genová terapie (Gendicine). Čínský úřad pro léčivé přípravky (China State Food and Drug Administration, SDF) schválil léčbu rakoviny poté, co dosáhl slibných výsledků v klinickém hodnocení dne 16. října 2003. Léčba, nazvaná Gendicine, byla zahájena komerčně společností SiBiono GeneTech Co. of Shenzhen, Provincie Guangdong. Gendicin byl schválen pro léčbu karcinomu skvamózních buněk hlavy a krku. Produkt genové terapie je adenovirový vektor nesoucí p53 nádor-supresorový gen. Schválení Gendicine bylo již dříve oznámeno, ale zanedlouho se odehrálo mimo Čínu. neboť existují obavy ohledně souhlasu mezi výzkumnými pracovníky jinde ve světě, pokud jde o kvalitu provedených studií a tím i bezpečnost a účinnost léčby. Dostupné klinické údaje a závěry byly získány z poměrně malého počtu pacientů v klinických studiích, kde bylo léčeno více osob, ale klinická data těchto pacientů jsou obtížně přístupná, částečně kvůli skutečnosti, že byly publikovány pouze v čínských časopisech. Navíc se zdálo, že schválení bylo učiněno spíše na základě smrtění nádoru.

6.2.2 LÉČBA RAKOVINY NOSOHLTANU

Společnost Shanghai Sunway Biotech Co. Ltd. oznámila v listopadu 2005, že SFDA schválil Oncorin (H101), onkolytický adenovirus, který se používá v kombinaci s chemoterapií jako léčba u pacientů s pozdní fází refrakterní rakoviny nosohltanu. Jedná se o první onkolytickou virovou terapii schválenou libovolnou regulační agenturou na světě, jedná se o druhý komerční terapeutický produkt. H101 je v podstatě upravená verze Onyx-015, původně vyvinutá společností Onyx Pharmaceuticals. Vedle společnosti Oncorine vyvinula společnost Shanghai Sunway Biotech nádorově zaměřenou injekci rekombinantního adenoviru (H102) a onkolytickou rekombinantní adenovirovou injekci (H103) pro léčbu rakoviny. H102 se specificky zaměřuje na primární hepatocelulární karcinom. H103 adenoviry lysují nádorové buňky a exprimují Hsp70, které mohou účinně stimulovat protinádorovou imunitní odpověď. [64]

6.2.3 LÉČBA ISCHEMICKÝCH VŘEDŮ

Další z aktuálních světových studií hlásí slibné výsledky inovativní genové terapie založené na DNA, která může nabídnout potenciální terapeutickou možnost nemocí s nesplněnými léčebnými potřebami. Studie zkoumala bezpečnost a účinnost genové terapie plazmidovou DNA s genem lidského hepatocytového růstového faktoru nazvaným VM202 u 52 pacientů s kritickou ischemickou končetinou. Celá tato studie probíhala ve výzkumných centrech a nemocnicích ve Spojených státech a Koreji. Bylo zjištěno, že VM202 je bezpečný a dobře snášen pacienty s CLI, kteří neměli jiné možnosti léčby. Výrazně se u nich zlepšily problémy s vyléčením vředů i s okysličením tkáně. Do svalů u postižené nohy jim podávány čtyři série injekcí s VM202 (v časovém intervalu 2 týdnů). Tyto pozitivní výsledky jsou velmi povzbuzující a VM202 je velkým příslibem pro léčbu pacientů s tímto oslabujícím onemocněním, kteří mají často omezené terapeutické možnosti.

Ve studii pacienti s vysokou dávkou (celkem 16 mg) VM202 vykazovali signifikantně lepší uzdravení vředů než pacienti, kteří byli léčeni placebovými injekcemi. Ve skutečnosti se 62% vředů léčených vysokým dávkováním VM202 úplně uzdravilo ve srovnání s pouze 11% vředů léčených placebem. Statisticky významné výsledky byly také pozorovány při okysličování tkáně (hladiny TcPO₂). U pacientů léčených vysokou

dávku VM202 vykazovalo 71% zvýšené hladiny TcPO₂, zatímco pouze 33% kontrolních pacientů vykazovalo lepší okysličení tkáně.

Studie byla sponzorována společností ViroMed Co., Ltd. a byla podpořena grantem od korejského ministerstva obchodu, průmyslu a energetiky (grant č. 10031644). Na základě výsledků této studie fáze II dostala společnost ViroMed souhlas s USA FDA, aby zahájila studii fáze III pro chronické, nehojící, ischemické vředy na nohy u pacientů s diabetem s VM202-PAD.

Společnost ViroMed vyvíjí nové a inovativní biofarmaceutické přípravky pro léčbu aktuálně neléčitelných onemocnění. VM202 byl vyvinut za použití vlastního vektorového systému a geneticky modifikovaného genu HGF. VM202-PAD je součástí skupiny léků odvozených z VM202. Při podávání injekcí pacientům obsahuje léčivo založené na DNA VM202-PAD proteinu hepatocytového růstového faktoru (HGF). Výsledky z klinické studie fáze I ukázaly možnost VM202-PAD jako nového koncepčního léčiva. Očekává se, že VM202-PAD se nakonec stane novým lékem v léčbě onemocnění periferních arterií. [65]

7 ETICKÁ HORZBA A OTÁZKY

Postupný vývoj v oblasti biotechnologie a genetického výzkumu vyvolává složité etické otázky týkající se legitimního rozsahu a omezení genetické intervence.

Poté, co začneme uvažovat o možnosti zasahovat do lidského genomu, abychom zabránili nemocem, nastane zde otázka, že lidský druh by brzy mohl být schopen vzít biologickou evoluci do svých rukou. "Hraní na Boha" je metafora běžně používaná pro tuto sebe-přeměnu druhu, která se zdá, že brzy bude v našich silách. Nemůžeme vyloučit možnost, že znalost vlastních dědičných faktorů se může ukázat jako omezující pro volbu způsobu života jednotlivce a může narušit symetrické vztahy mezi svobodnými a rovnými lidskými bytostmi. [60]

7.1 VĚDECKÝ POHLED

Existuje důležitá otázka, zda by současný farmaceutický průmysl měl sloužit jako model pro vývoj genové terapie. Pokud společnost podporuje rozšířenou genovou terapii zaměřenou na prevenci nemocí kromě léčby stávající nemoci, kdo určí, jak a jaké zdroje by měly být přiděleny k tomuto účelu?

7.1.1 VÝHODY A NEVÝHODY GT

Důležitým krokem pro budoucí vývoj genové terapie, je spojení s farmakoterapií. Právě nyní jsou nové výzkumy genové terapie z větší části zaměřeny na vývoj nových léčebných postupů u vysoce rizikových pacientů s těžkým onemocněním - pacientů mimo místo, kde je konvenční léčba účinná. Nakonec se však konvenční léčby a genové terapie překrývají.[61]

Hlavním nedostatkem vektorů je to, že nejsou schopny transdukovat nesourodé buňky. Tento problém může být překonán použitím nových retrovirových vektorů odvozených z lentivirů, jako je virus viru lidské imunodeficiencie (HIV). Nejčastěji používané vektory DNA viru jsou založeny na adenoviru a adeno-asociovaných virech. Přestože dostupné vektorové systémy jsou schopné přenášet geny in vivo do buněk, nebylo nalezeno ideální aplikační médium. Takže přítomné virové vektory by měly být používány s velkou opatrností u lidí a je nutný další pokrok ve vývoji vektorů. [55]

Dalším rizikem genové terapie, je případná možnost vzniku imunitní odpovědi, na antigeny přítomné na příslušném vektoru. Za problém musíme považovat i mutace,

kteře vyplývají z integrace transgenů. Je zde také riziko přenosu z osoby na osobu za pomoci infekci či začleněním vektoru do pohlavních buněk. V těchto případech je nutné přezkoumat rizika léčby a navrhnout obměněný postup či zcela zastavit léčbu. [42]

Jedna hlavních nevýhod GT spočívá v samotném postupu, který je částečně rizikový, neboť je stále ve vývojové fázi. Hledání přesného umístění defekovaného genu je stále předmětem výzkumu. Jakýkoli nesprávný výpočet by mohl způsobit riziko vzniku nové nemoci, jako je například rakovina. Náklady na genovou terapii jsou v současné době vysoké a mohou být obavami pro rodiny, které potřebují celoživotní léčbu a nemají zdravotní péči. Genetická terapie bude pravděpodobně levnější v běhu, protože je to jednorázová procedura. [62]

Pozitivní aspekt genové terapie je zřejmý. Může vymazat genetické onemocnění dříve, než začne a odstraní utrpení pro budoucí generace. Genetická terapie je také dobrou technikou pro choroby, které ještě nebyly zkoumány. Všichni z nás nesou defekované geny a možná to ani neví.

7.2 MORÁLNÍ ASPEKT

Důsledky genové terapie jsou v současné době četné. Myšlenka genové terapie je léčit dědičné onemocnění, které nezpůsobí, že by člověk nebo rasa nadřazovala. Další úvahou je náboženství. Někteří považují za hříšné manipulaci s DNA. Ve skutečnosti je to jen terapie genem. Je to nová forma moderní medicíny. Genetická terapie je zcela na dotyčné osobě.

Některé skupiny tvrdí, že předpisy budou obtížně kontrolovatelné, neboť i po vydání zákonů existuje možnost, že by se na černém trhu mohlo s tímto druhem léčby obchodovat. Mohla by být použita pro všechny geneticky spojené vlastnosti, jako je věčný vzhled, osobnost nebo fyzické vylepšení. Tyto obavy budou muset být včas řešeny. [62]

K dnešnímu dni, přijaté klinické studie genové terapie zahrnují terapii somatických buněk za použití genů, které způsobují onemocnění. Mnoho osob zabývajících se etikou, se však obává, že pokud se zlepší proveditelnost genové terapie v zárodečné fázi, objeví se více genů způsobujících odlišné rysy.[58]

8 ZÁVĚR

Bakalářská práce v mnoha pohledech a perspektivách shrnuje léčebnou metodu, která zatím nebyla uvedena do léčebné praxe – genovou terapii. Tato metoda je zatím jen experimentální, má však velký příslib do budoucna.

Práce se z větší části věnuje virovým vektorům, neboť díky nim byl nalezen způsob, jak vložit DNA do genomu pacienta. Jednotlivé druhy vektorů jsou v úvodních kapitolách podrobně popisovány, aby se docílilo přehledu, jak mohou vektory fungovat v následné léčbě.

Další kapitoly jsou věnovány konkrétním příkladům léčby vrozených a získaných nemocí, které by správně použité virové vektory byli schopny v budoucnosti vyléčit. Bylo by totiž pro medicínský vývoj fantastické, kdyby si vědci dokázali poradit s léčbou rakoviny či roztroušené sklerózy. Dále jsou zde zmíněny metody, podle kterých se VV mohou stanovovat. Tyto metody zahrnují mimo jiné metodu qPCR, která je používána pro kvantifikaci DNA a transkripci.

V závěrečných kapitolách je rozebíráno postupné uvolňování regulace a s tím i zvýšené procento výzkumu ve světě, které je snaží vychytávat všechny nedostatky a problémy spojené s léčbou, aby se genová terapie dostala do běžné medicíny, neboť doposud nikdo nebyl pomocí GT vyléčen z genetické nemoci.

V poslední části jsou řešeny etické otázky, neboť se GT stává potenciálně dostupnější a mohla by být v některých očích chápána jako hrozba. Genetická terapie je "lékem" pro budoucnost, protože může kontrolovat nebo eliminovat dědičné onemocnění.

Je proto nutné do budoucna stanovit přesné normy, které by se při aplikaci léčby striktně dodržovaly. Po shrnutí všech argumentů je potřeba říci, že genová terapie je jenom „nástroj vědy“ a je pouze na člověku, jak bude schopný s tímto nástrojem zacházet, neboť v lidských rukou, může být použit jak k velkému prospěchu, tak se může stát velkou hrozbou. Doufejme, že lidská populace je natolik vyspělá a schopná zhostit se této problematiky správným směrem.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ERMAK., GENNADY, *Emerging Medical Technologies*. World Scientific, 2015. ISBN 978-981-4675-81-9.
- [2] ROSENBERG, S.A., P. AEBERSOLD, a K. CORNETTA. a kol. "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction". *The new England Journal of Medicine* [online]. 1990, 570-578 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199008303230904#t=article>
- [3] ZIMMER, K. DNA Double Take. *The New York Times* [online]. 2013 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://ramonausd.schoolwires.net/cms/lib07/CA01000789/Centricity/Domain/363/DNA%20Double%20Take%20-%20NYTimes.pdf>
- [4] FUSEK, M., L. VÍTEK, J. BLAHOŠ JR., M. HAJDÚCH a T. RUML. *Biologická léčiva*. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3727-0.
- [5] Gene Therapy History. In: *News Medical Life sciences* [online]. [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Gene-Therapy-History.aspx>
- [6] HERWEIJER, H a JA WOLFF Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene therapy* [online]. 2003, **2003**(10), 453–458 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.nature.com/gt/journal/v10/n6/abs/3301983a.html>
- [7] MANCHE – O-CORVO P, MARTIN - DUQUE P :Viral gene therapy. *Clin Transl Oncol* [online]. 2006;8(12):857-867 [cit. 2017-03-28].
- [8] PEARSON, S., H. JIA a K. KANDACHI. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnology* [online].2004, **22**,3-4[cit.2017-03-28].Dostupnéz: <http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n1/full/nbt0104-3.html>
- [9] CAVAZZANA-CALVO, M., E. PAYEN, O. NEGRE a G. WANG. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* [online]. 2010, , 318–322 [cit.2017-03-28].Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7313/abs/nature09328.html>
- [10] Beta-thalassemia. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 5: 11, 2010 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://orjrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-5-11>

- [11] GENE THERAPY IN THE DEVELOPING COUNTRIES. *International Journal of Medical and Health Sciences Research* [online]. 2015, 2(5), 80-92 [cit. 2017-05-28]. Dostupné z: [http://www.pakinsight.com/pdf-files/med/9/IJMHSR-2015-2\(5\)-80-92.pdf](http://www.pakinsight.com/pdf-files/med/9/IJMHSR-2015-2(5)-80-92.pdf)
- [12] ROBBINS, Paul D. a Steven C. GHIVIZZANI. *Viral Vectors for Gene Therapy*. Elsevier Science Inc. 1998, (1), 35-47. ISSN 0163-7258/98.
- [13] LUNDSTROM, Kenneth. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Elsevier Science Inc.* 2003, (3), 117-122. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)00042-2.
- [14] BESSIS, N, Fj GARCIA COZAR a M-C BOISSIER. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene therapy*. 2004, (11), 10-17. ISSN 0969-7128/04.
- [15] NIIDOME, T a L HUANG. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors T. *Gene therapy*. 2002, (9), 1647–1652. ISSN 0969-7128/02.
- [16] Adenoviral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/adenoviruses.html>
- [17] PIGNATARO, Diego, Diego SUCUNZA, Lucia VANRELL, et al. Adeno-Associated Viral Vectors Serotype 8 for Cell-Specific Delivery of Therapeutic Genes in the Central Nervous System. *Frontiers in neuroanatomy*. 2017, , 13. DOI: 10.3389/fnana.2017.00002.
- [18] Adeno-Associated Viral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/adeno-associated-viruses.html>
- [19] Herpesvirus Viral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/herpesviruses.html>
- [20] Alphavirus Viral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/15-viruses-/alphavirus-viral-vectors.html>
- [21] Vaccinia Viral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/vaccinia-viruses.html>
- [22] Retroviral Vectors. In: *Gene therapy net.com* [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/retroviruses.html>
- [23] BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Věra FRAŇKOVÁ, et al. *Lékařská mikrobiologie : Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha : Marvil, 1999. 558 s. s. 416–419. ISBN 8023802976

- [24] O'CONNOR, P. a R.G. CRYSTAL. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* [online]. (7), 261-276 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1038/nrg1829. Dostupné z: <http://www.nature.com/nrg/journal/v7/n4/full/nrg1829.html>
- [25] *Genoví editoři vyrobili myši s jediným editovaným písmenem DNA* [online]. 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/genovi-editori-vyrobili-mysi-s-jediny-m-editovany-m-pismenem-dna/>
- [26] GERRARD, A.J., D.L. HUDSON, G.G BROWNLEE a F.M. WATT. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nature Genetics* [online]. 1993, (3), 180 - 183 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1038/ng0293-180. Dostupné z: <http://www.nature.com/ng/journal/v3/n2/pdf/ng0293-180.pdf>
- [27] SMITH, A.G., M.G. MEHAFFEY, D.B. KAYDA, J.M. SAUNDERS, S. YEI, B.C. TRAPNELL, A. MCCLELLAND a M. KALEKO. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nature Genetics* [online]. 1993, (5), 397 - 402 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.nature.com/ng/journal/v5/n4/pdf/ng1293-397.pdf>
- [28] BI, L., A.M. LAWLER, S.E. ANTONARAKIS, K.A HIGH, J.D. GEARHAR a H.H. KAZAZIAN JR. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nature Genetics* [online]. 1995, (10), 119 - 121 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1038/ng0595-119. Dostupné z: <http://www.nature.com/ng/journal/v10/n1/pdf/ng0595-119.pdf>
- [29] RICH, D.R., L.A. COUNTURE, V.M GUIGGIO a D. ARMENTANO a kol. Development and Analysis of Recombinant Adenoviruses for Gene Therapy of Cystic Fibrosis. *Human Gene Therapy* [online]. 2008, 4(4), 461-476. [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.1993.4.4-461>
- [30] JOHNSON, L.G., J.C. OLSEN a B. SARKADI. A kol, Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nature Genetics* [online]. 1992(2), 21-25 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1038/ng0992-21. Dostupné z: <http://www.nature.com/ng/journal/v2/n1/abs/ng0992-21.html>
- [31] GOLDMAN, M.J., Y. YANG a J.M. WILSON. Gene therapy in a xenograft model of cystic fibrosis lung corrects chloride transport more effectively than the sodium defect. *Nature Genetics* [online]. 1995, 9, 126 - 131 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1038/ng0295-126. Dostupné z: <http://www.nature.com/ng/journal/v9/n2/pdf/ng0295-126.pdf>

- [32] MOSS, R.B., C. MILLA, J. COLOMBO a F. ACCURSO a kol. Repeated Aerosolized AAV-CFTR for Treatment of Cystic Fibrosis: A Randomized Placebo-Controlled Phase 2B Trial. *Human Gene Therapy* [online]. 2007, **8**(18), 726-732 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1089/hum.2007.022. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.2007.022>
- [33] BEMELMANS A.P., HORELLOU P., PRAIDER L., BRUNET I., COLIN P., MALLET J. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Protection of Striatal Neurons in an Excitotoxic Rat Model of Huntington's Disease, as Demonstrated by Adenoviral Gene Transfer *Human Gene Therapy* [online]. July 2004, 10(18): 2987-2997 [cit. 2017-04-04]. doi:10.1089/10430349950016393. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/10430349950016393>
- [34] BACHOUD-LÉVI, A.C., N. DÉGLON, J. -P. NGUYEN a J. BLOCH. A kol. Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease Using a Polymer Encapsulated BHK Cell Line Engineered to Secrete Human CNTF. *Human Gene Therapy* [online]. 2004, **11**(12), 1723-1729 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/10430340050111377>
- [35] BLOCH, J., A.C BACHOUD-LÉVI, N. DÉGLON a J.P. LEFAUCHEUR. Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease, Using Polymer-Encapsulated Cells Engineered to Secrete Human Ciliary Neurotrophic Factor: Results of a Phase I Study. *Human Gene Therapy* [online]. 2004, **15**(10), 968-975 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.2004.15.968>
- [36] LUCCHINETTI, C., W. BRÜCK, J. PARISI, B. SCHEITHAUER, M. RODRIGUEZ a H. LASSMANN. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of Neurology* [online]. 2000, **47**(6), 707-717 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.327.4303&rep=rep1&type=pdf>
- [37] TSUNODA, I., N.D. TOLLEY, D.J. THEIL, J.L. WHITTON, H. KOBAYASHI a R.S. FUJINAMI. Exacerbation of Viral and Autoimmune Animal Models for Multiple Sclerosis by Bacterial DNA. *Brain pathology* [online]. 1999, **9**(3), 481-493 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00537.x/abstract>
- [38] FISHER, K.J., H. CHOI, J. BURDA, S. CHEN a J.M WILSON. Recombinant Adenovirus Deleted of All Viral Genes for Gene Therapy of Cystic Fibrosis. *Virology* [online]. 1996, **217**(1), 11-22 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682296900884>

- [39] *Parkinsonova choroba.cz portál o neurodegradativním onemocnění* [online]. 2016 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.parkinsonovachoroba.cz/>
- [40] LUO, J., M.G. KAPLITT, H.L. FITZSIMONS, D.S. ZUZGA, Y. LIU a M.L. OSHINSKY. Subthalamic GAD Gene Therapy in a Parkinson's Disease Rat Model. *Science* [online]. 2002, **11**(298), 425-429 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://science.sciencemag.org/content/298/5592/425>
- [41] BJÖRKLUND, A., D. KIRIK, C. ROSENBLAD, B. GEORGIEVSKA, C. LUNDBERG a R.J. MANDEL. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Research* [online]. 2000, **1-2**, 82-98 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899300029152>
- [42] ČELECHOVSKÁ, H. *Současné možnosti genových terapií* [online]. Brno, 2012 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/357848/prif_b/Bakalarska_prace_-_IS.txt. Bakalářská práce. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
- [43] TUSZYNSKI, M.H. a A. BLESCH. Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research* [online]. 2004, (146), 439-449 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612303460287>
- [44] HONG, C-S., W.F. GOINS, E.A. BURTON a J.C. GLORIOSO. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-b peptide in vivo. *Gene therapy* [online]. 2006, (13), 1068-1079 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://www.nature.com/gt/journal/v13/n14/pdf/3302719a.pdf>
- [45] MANDEL, r.j. *CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease* [online]. 2010, **12**(2), 240-247 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/20373268>
- [46] KIRIK, D. Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends in Neurosciences* [online]. 2003, **7**(26), 386-392 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223603001644>
- [47] ALEXANDER, I.E., S.C. CUNNINGHAM, G.J. LOGAN a J. CHRISTODOULOU. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene therapy* [online]. 2008, (15), 831-839 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <https://www.nature.com/gt/journal/v15/n11/pdf/gt200864a.pdf>

- [48] *Léčba-rakoviny.cz* [online]. 2017 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.lecba-rakoviny.cz/co-je-rakovina>
- [49] Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research* [online]. 2006, **2**(3), 218-227 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570487/pdf/0040218.pdf>
- [50] LANDEN, CH.N., A. CHAVEZ-REYES, C. BUCANA, R. SCHMANDT, M.T. DEEVERS, G. LOPEZ-BERESTEIN a A.K. SOOD. Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer research* [online]. 2005, **15**(65), 6910-6918 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/15/6910.short>
- [51] NATHWANI, A.C, U.M. REISS, E.G.D TUDDENHAM, C. ROSALES a P. CHOWDARY a kol. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *The new england journal of medicine* [online]. 2014, , 1994-2004 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1407309#t=article>
- [52] EDELSTEIN, M.L., M.R. ABEDI, J. WIXON a R.M. EDELSTEIN. Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *The Journal of Gene Medicine* [online]. 2004, **6**(6), 597–602 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.619/full>
- [53] LOCK, M., M.R. ALVIRA, S.J CHEN a J.M WILSON. *Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR.* [online]. 2014, **25**(2), 115-125 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24328707>
- [54] LIBIN, M., H.A.R BLUYSSSEN, M. RAEYMAEKER, V. LAURYSSENS, N. BEEK, H. PAVLISKA a P. TOMME. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *Journal of Virological Methods* [online]. **93**(1-2), 181-188 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093401002579>
- [55] PFEIFER, A. a I.M. VERMA. Annual Review of Genomics and Human Genetics. *GENE THERAPY: Promises and Problems* [online]. 2001, (2), 177-211 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genom.2.1.177>
- [56] GOLDSTEIN, D.J. a S.K. WELLER. Herpes Simplex Virus Type 1-Induced Ribonucleotide Reductase Activity Is Dispensable for Virus Growth and DNA Synthesis: Isolation and Characterization of an ICP6 lacZ Insertion Mutant. *JOURNAL OF VIROLOGY* [online]. 1988, **62**(1), 196-205 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://jvi.asm.org/content/62/1/196.full.pdf+html>

- [57] POLO, J.M, B.A. BELLI, D.A. DRIVER, I. FROLOV a S. SHERRILL. a kolektiv. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Medical Sciences* [online]. 1999, **96**, 4598–4603 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/96/8/4598.full.pdf>
- [58] Ethical and Social Issues in Gene Therapy. In: *Gene therapy net* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://genetherapynet.com/ethical-and-social-issues-in-gene-therapy.html>
- [59] SONABEND, A.M., I.V. ULASOV, M.A TYLER a A.A RIVERA. Mesenchymal Stem Cells Effectively Deliver an Oncolytic Adenovirus to Intracranial Glioma. *Stem Cells* [online]. 2008, **26**(3), 831–841 [cit. 2017-05-20]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2007-0758/full>
- [60] HABERMAS, J. *The Future of Human Nature* [online]. 2014 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://philpapers.org/rec/HABTFO-2>
- [61] MCCAIN, J. The Future of Gene Therapy. *Biotechnol Healthc* [online]. 2005, **2**(3), 52-54, 56-60 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564347/>
- [62] FLECK, A.M. A New Future: Gene Therapy. In: *Ndsu.edu* [online]. 1998 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/students98/fleck.htm>
- [63] ŠTĚPÁNOVÁ, V., L. PLÍŠKOVÁ a K. HROCHOVÁ. VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V DIAGNOSTICE INFEKČÍ DĚTSKÉHO VĚKU. In: *Www.solen.cz* [online]. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2002/03/04.pdf>
- [64] Review of Gene Therapy development in China. *Gene therapy net* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/m/130-newsletter.html>
- [65] KIBBE, M.R., A.T. HIRSCH a F.O. MENDELSON. Promising results from clinical study using plasmid DNA gene therapy. In: *ScienceDaily* [online]. 2016 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: https://www.sciencedaily.com/releases/2016/01/160128155749.htm?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+sciencedaily%2Fhealth_medicine%2Fgenes+%28Genes+News+---+ScienceDaily%29
- [66] ELISA - diagnostika antigenu. In: *Laboratorní metody* [online]. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/ELISA-diagnostika-antigenu.aspx>
- [67] NEMUNAITIS, J., A.W. TONG, M. NEMUNAITIS a N. SENZER. A kol. A Phase I Study of Telomerase-specific Replication Competent Oncolytic Adenovirus (Telomelysin) for

Various Solid Tumors. *Molecular Therapy* [online]. 2010, **18**(2), 429–434 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001616316264>

[68] MAHMOOD, T. a P-C YANG. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *Nort Americal Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **4**(9), 429-434 [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>

[69] CHIRMULE, N., K.J. PROPERT, S.A. MAGOSIN, Y QIAN, R. QIAN a J.M WILSON. Immune responses to adenovirus and adenoassociated virus in humans. *Gene therapy* [online]. 1999, **6**, 1574-1583 [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: file:///E:/Bakal%C3%A1%C5%99ka/Immune_responses_to_adenovirus_and_adeno-associate.pdf

[70] KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2002, **8**(6), 257-260 [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491402023559>

[71] POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). *Lab Guide* [online]. , 1-10 [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Kesta%C5%BEen%C3%AD-PCR1.pdf>

[72] RANKI, T., S. PESONEN, A. HEMMINKY a K. PARTANEN. Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors – an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* [online]. 2016, **4**(17)[cit.2017-05-25].Dostupnéz: <https://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40425-016-0121-5>

ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] Vectors used in Gene Therapy Clinical Trials. In: *The journal of Gene Medicine* [online]. 2016 [cit. 2017-04-8]. Dostupné z: <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- [2] Organizace adenovirových částic. In: *Genetherapynet.com* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/14-viruses-/adenoviral-vectors.html>
- [3] Organizace genomu AAV. In: *Genetherapynet.com* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/adeno-associated-viruses.html>
- [4] Povrch alphaviru (počítačem generovaný model). In: *Genetherapynet.com* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/15-viruses-/alphavirus-viral-vectors.html>
- [5] Organizace genomu retrovirů. In: *Genetherapynet.com* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/retroviruses.html>
- [6] Nasedání primerů a směr syntézy. In: *Lab Guide* [online]. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%C5%BEn%C3%AD-PCR1.pdf>
- [7] Teplota nasedání primerů pro daný počet bazí a GC párů. In: *Lab Guide* [online]. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%C5%BEn%C3%AD-PCR1.pdf>
- [8] MIHULKA, S. Genetický editor CRISPR/Cas9 j. In: *Gate2biotech* [online]. 2017 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/genovi-editori-vyrobili-mysi-s-jediny-editovany-pismenem-dna>