

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Genová terapie – klinické studie současný stav

Nikola Miadiková

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Miadiková**  
Osobní číslo: **C19268**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Genová terapie – klinické studie současný stav**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma techniky genové terapie (CRISPR, virové vektory,...)
2. Rešerše – klinické studie zaměřené na genovou terapii
  - a. Statistika studií (počet, zaměření)

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**  
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

L.S.



---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Genová terapie - klinické studie současný stav 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.7.2021

Nikola Miadiková

#### Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala mému školiteli panu Mgr.Vojtěchu Vejvodovi Ph.D. za ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval při psaní této práce. Také chci poděkovat mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Tématem bakalářské práce je „Genová terapie – klinické studie současný stav“. Začátek práce se zabývá principy techniky genové terapie, které umožňují změnu DNA v organismu. Následující kapitola se věnuje popisu vlastností virových vektorů a dále je v práci věnována pozornost proteinu p53, který hraje určitou roli v ochraně před onemocněním zvaným rakovinou. V závěru práce jsou podrobně popsány klinické studie u vybraných onemocnění, kdy vědci testují způsoby léčby, aby zajistili, že jakákoliv metoda genové terapie použitá při léčbě bude bezpečná a účinná.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Genová terapie, technika genové terapie, virové vektory, protein p53, klinické studie

## **ANNOTATION**

The topic of this bachelor thesis is "Gene therapy - clinical trials of the current State". At the beginning of the thesis are mentioned main principles of gene therapy techniques, which allow the change of DNA in the organism. Following chapters describes viral vectors properties and p53 protein that is an important component in the fight against a cancer. Final part of the work is focused on detailed description of clinical trials in selected diseases where researchers are carefully testing treatments to ensure that any gene therapy treatment will safe and effective.

## **KEY WORDS**

Gene therapy, gene therapy technique, viral vectors, p53 protein, clinical trials

# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>9</b>
<b>SEZNAM TERMÍNŮ</b> .....	<b>10</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>11</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>13</b>
<b>1 Historie</b> .....	<b>15</b>
<b>2 Technika genové terapie</b> .....	<b>17</b>
2.1 CRISPR/Cas9 .....	17
2.1.1 Systém Crispr /Cas9 .....	18
2.2 Zinkové prsty .....	19
2.3 Virové vektory .....	21
2.3.1 Adenoviry.....	21
2.3.2 Adenoasociované viry .....	22
2.3.3 Retroviry.....	23
2.3.4 Lentiviry .....	24
2.3.5 Herpes virus.....	24
<b>3 Protein 53</b> .....	<b>26</b>
3.1 Struktura p53 .....	26
3.2 Funkce TP53 .....	28
3.3 Funkce p53 v genové terapii .....	29
<b>4 Terapeutické využití genové terapie</b> .....	<b>30</b>
4.1 Rešerše klinické studie zaměřené na genovou terapii - úvod .....	31
4.2 Vrozené monogenetické nemoci .....	32
4.2.1 Cystická fibróza.....	32
4.2.2 Opakovaná aplikace genové terapie u pacientů s CF. Fáze 2 ( Identifikační číslo: NCT01621867).....	33

4.2.3	Těžká kombinovaná imunodeficience (SCID).....	34
4.2.4	Hemofilie.....	35
4.2.5	Klinická studie - Hemofilie B - genová terapie s AAV8 vektorem. Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT01620801).....	36
4.2.6	Svalová dystrofie.....	37
4.2.7	Klinická studie - Šestiměsíční studie gentamicinu v DMD se stop kodony. Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT00451074).....	38
4.3	Získané nemoci .....	39
4.3.1	Rakovina.....	39
4.3.2	Klinická studie - Genová terapie při léčbě pacientů s metastázujícím melanomem. Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT00005943) .....	40
<b>5</b>	<b>Klinické studie pro protein P53.....</b>	<b>42</b>
5.1	Vakcína terapie s interleukin-2 u žen s opakující se nebo progresivní rakovinou prsu nebo vaječníků ve IV. stádiu. Fáze 1 a 2. Zkušební záznam 33 (Identifikační číslo NCT00019916).....	42
5.2	Vakcína proti rakovině vaječníků - fáze 2. Zkušební záznam 46 (Identifikační číslo: NCT00001827) .....	44
5.3	Vakcínová léčba u pacientů s rakovinou hlavy a krku. Zkušební záznam 88 (Identifikační číslo: NCT00404339).....	46
5.4	Genová terapie při léčbě pacientů s rakovinou jater. Zkušební záznam 45 (Identifikační číslo: NCT00003147).....	48
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Zdroje obrázků .....</b>	<b>58</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> - Systém CRISPR/Cas9.....	19
<b>Obrázek 2</b> – Zinkové prsty .....	20
<b>Obrázek 3</b> - Struktura TP53.....	28
<b>Obrázek 4</b> - Schéma biologické funkce p53 .....	29
<b>Obrázek 5</b> - Podíl protokolů pro zkoušky genové terapie u člověka týkající se různých typů onemocnění.....	30
<b>Obrázek 6</b> – Graf četnosti využití p53 při léčbě různých onemocnění .....	50

## SEZNAM TERMÍNŮ

**Aferéza** – Metoda umožňující odběr krve různých krevních složek z krve dárce.

**Afinita** – Označuje vzájemný vztah.

**Epitop** – Konkrétní oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky.

**Imunomodulační účinky** – Zvyšující obranyschopnost organismu.

**Intralezionálně** – Aplikace léčiva dovnitř léze.

**Intratumorózně** – Vpravení látky do tumoru.

**Intravenózně** – Podání léku do žíly.

**Leukafaréza** – Je to metoda mimotělní separace a sběru leukocytů.

**Léze** – Poškození nebo porucha orgánů či tkáně, které má za následek narušenou funkci v důsledku chorobného procesu nebo úrazu.

**Multicentrická studie** – Studie, která probíhá ve více centrech (např. na klinikách různých nemocnic).

**Paliativní** – Mírnící bolest, ale neodstraňující příčinu choroby a bolesti.

**Perkutánní** – Procházející kůží. Označení chirurgických výkonů, které nejsou prováděny klasickým řezem, nýbrž zavedením nástrojů do organismu laparoskopicky či katetrizací drobným otvorem v kůži.

**Progrese** – Postup onemocnění, jeho zhoršení.

**Recidiva** – Návrat nemoci, která již byla vyléčena nebo u které již vymizely příznaky.

**Spinocelulární karcinom** – Zhoubný nádor, vycházející z epitelové tkáně. Bývá v různých oblastech těla, především v kůži, zde se označuje jako spinaliom.

**Subkutánně** – Podání léku do podkoží.

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AAV</b>	Adenoasociované viry
<b>ADA</b>	Adenosindeamináza
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>cdk2</b>	Cyclin- dependent kinase 2
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<b>CNS</b>	Cévní nervová soustava
<b>CRISPR/Cas9</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein 9
<b>CRP</b>	C-reaktivní protein
<b>CTD</b>	C-terminal domain
<b>CTL</b>	Cytotoxic T-lymphocyte
<b>DBD</b>	DNA-binding domain
<b>DC</b>	Dendritic cells
<b>DLT</b>	Dose-limiting toxicity
<b>DMD</b>	Duchenne muscular dystrophy
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DOPE</b>	Dioleoylfosfatidylethanolamin
<b>DSB</b>	Double-strand breaks
<b>FEV1</b>	Usilovný objem vzduchu vydechnutý za jednu sekundu
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>gRNA</b>	Guide RNA
<b>GT</b>	Genová terapie
<b>HDR</b>	Homology directed repair
<b>HLA-A2</b>	Human leukocyte antigen 2
<b>HLA-A2-DR4</b>	Human eukocyte Antigen 2 – DR isotope 4
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex virus 1
<b>HSV-2</b>	Herpes simplex virus 2
<b>IL-2</b>	Interleukin 2
<b>ISA-S1</b>	Montanide ISA-S1
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LPL</b>	Lipoproteinová lipáza
<b>MD</b>	Muscular dystrophy
<b>MDM2</b>	Mouse double minute 2 homolog
<b>MTD</b>	Stanovení maximální tolerované dávky

<b>NHEJ</b>	Non-homologous endjoining
<b>NTD</b>	N-terminal domain
<b>p21</b>	Protein 21
<b>p53</b>	Protein 53
<b>PAM</b>	Proto-spacer adjacent motif
<b>RD</b>	Regulatory domain
<b>RNA</b>	Ribonucleid acid
<b>SCID</b>	Severe combined immunodeficiency
<b>SDS – PAGE</b>	Sodium dodechl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
<b>sgRNA</b>	Single guide RNA
<b>TALEN</b>	Transcription activator-like effector nucleases
<b>TD</b>	Tetramerization domain
<b>Th</b>	T-helper
<b>TP53</b>	Tumor protein p53
<b>wt p53</b>	Wild type protein 53
<b>X-SCID</b>	X-linked severe combined immunodeficiency
<b>ZNF</b>	Zinc-finger Nuclease

## ÚVOD

Genová terapie používá geny jako léky. Je to experimentální léčba, která zahrnuje přenesení léčebné nebo pracovní kopie genu do specifických buněk jednotlivce za účelem opravy vadné kopie genu. Může se tedy použít k nahrazení vadného genu nebo k zavedení nového genu, jehož funkcí je léčit nebo příznivě měnit klinický průběh stavu (Baum et al., 2008).

Genová terapie je zatím k dispozici pouze v klinických studiích. Většina klinických studií genové terapie se provádí ve Spojených státech, Číně a v Evropě, přičemž v menším počtu se také provádí i v dalších zemích, včetně Austrálie (Linder, 2010). Dnes probíhá řada klinických studií, kdy vědci testují způsoby léčby u řady onemocnění, aby zajistili, že jakákoliv metoda GT použitá při léčbě bude bezpečná a účinná.

GT se z počátku zaměřovala na léčbu monogenně genetických onemocnění, jako je těžká kombinovaná imunodefice (SCID). Rostoucí počet úspěšných studií vedl k rozvoji přístupů genové terapie, které zahrnují rozšířenou použitelnost, například u rakoviny a chronických nebo progresivních onemocnění, jako je srdeční selhání, neurodegenerativní nebo metabolické poruchy, včetně Parkinsonovy choroby a diabetu mellitu (Misra 2013).

Existuje několik strategií pro genovou terapii, nejčastěji používaná metoda zahrnuje uložení léčebného genu do genomu, který nahradí „abnormální“ gen nebo gen způsobující nemoc. Tento gen je dodáván do cílové buňky prostřednictvím nosiče, známého jako vektor. Nejběžnějším typem vektorů používaných v genové terapii jsou viry. Viry jsou dobrou volbou pro zavedení genů do buňky, protože přenášejí genetický materiál. Jakmile jsou cílové buňky infikovány virovým vektorem, vektor uvolní léčebný gen, který se pak začlení do DNA buňky. Cílem je, aby buňka začala používat nový gen pro výrobu zdravých funkčních proteinů.

Podle cílové buňky se rozdělují dva typy genové terapie a to na somatickou a zárodečnou (gametickou). Somatická genová terapie zahrnuje přenos části DNA do jakékoliv buňky těla, která neprodukuje spermie nebo vajíčka. Je považována za konzervativnější a má bezpečnější přístup, protože ovlivňuje pouze cílené buňky u pacienta a není předávána dalším generacím. Je vhodná k léčbě mnoha poruch (Bank, 1996).

Zatímco gametická genová terapie léčí reprodukční tkáň pacienta. V genové terapii zárodečných buněk se kmenové buňky, např. se spermatem a vajíčkem, modifikují zavedením funkčních genů, které jsou integrovány do genomu. Modifikace jsou dědičné a předávají se dalším generacím. Změna je přenášena do dalších generací. U člověka se z bezpečnostních a etických důvodů neprovádí (Mathews et al., 2007).

GT lze rozdělit do dvou kategorií na metodu ex vivo a in vivo. Při metodě ex vivo jsou buňky z postižené oblasti (např. kostní dřeň) chirurgicky odstraněny a jsou kultivovány v laboratoři. Buňky jsou vystaveny viru, který nese požadovaný gen. Vir vstupuje do buněk, vloží tak požadovaný gen do DNA buňky a poté vyjmuté buňky jsou vráceny zpět do tkáň pacienta. Při metodě in vivo je gen přenesen do buněk uvnitř pacienta ( Meiligan,1993).

# 1 HISTORIE

Genová terapie se začala objevovat během 60. a 70. let minulého století a je stále ještě v počátcích, což znamená, že nemáme dostatek údajů o bezpečnosti a spolehlivosti této metody (Tesařová, 2017). Vědci byli schopni pomocí metody *in vivo* začlenit funkční DNA uvnitř lidských buněk již v roce 1961. Nicméně tyto pokusy o přenos genů byly však neúčinné a mnoho klinických pokusů se ukázalo jako neúspěšné.

V roce 1972 Friedman T. a Roblin R. publikovali článek s názvem „Gene therapy for human disease“, který citoval návrh Stanfielda Rogera, že „by mohla být funkční DNA použita k nahrazení vadné DNA u lidí s genetickými poruchami“ (Friedmann et al., 1972).

Veliký zlom nastal v roce 1983, kdy vědci z Massachusetts Institute of Technology vytvořili první retrovirový vektor z myšího leukemického viru vhodný pro použití v genové terapii.

V roce 1989 Rosenberg a jeho kolegové používali retrovirus pro zavedení genu kódujícího rezistenci na neomycin do lymfocytů infikujících nádory, získané od 5 pacientů s metastazujícím melanomem. Tyto lymfocyty pak byly rozšířeny metodou *in vitro* a později opětovně vráceny do těla pacientů. Protože tato první studie ukázala, že retrovirový genový přenos byl bezpečný a praktický, vedl tak k mnoha dalším studiím. Od roku 1989 bylo celosvětově schváleno více než 900 klinických studií (Edelstein et al., 2004).

Genová terapie byla poprvé použita u čtyřleté dívky, která se léčila v klinickém centru National Institute of Health. Dívka trpěla vrozeným onemocněním nazývané adenosin deamináza (ADA), která závažně ovlivňuje imunitu a schopnost organismu bojovat proti infekcím. Dívce byly odebrány T-lymfocyty z těla. Následně byly vyjmuté buňky vystaveny působení retrovirů s genem pro adenosin deaminázu. Poté byly buňky vráceny zpět do těla dívky. Později nastalo výrazné zlepšení imunitního systému dívky (Patil et al., 2012).

90. léta minulého století přinesla další inovace, například první použití hematopoetických kmenových buněk jako vektory pro doručení upravených genů, přesto byly však zaznamenány velké neúspěchy v genové terapii. Po smrti Jesse Gelingera, který podstoupil léčbu defektu ornithin transcarbamylázy pomocí adenovirálního vektoru nesoucího gen pro ornithin transcarbamylázu. Po aplikaci došlo ke zhoršení stavu pacienta a ten pak

zemřel po velké imunitní odpovědi na vektor používaný v klinické studii. Smrt chlapce měla negativní dopad na genovou terapii (Stolberg,1999).

V roce 2003 se Čína stala první zemí, která schválila komerční genovou terapii. Léčba se nazývá Gendicin. Je to rekombinatní adenovirus, který je upravený pro expresi wild-type53 (rAD-p53) a používá se k léčbě karcinomu hlavy a krku (Wirth et al., 2013).

V roce 2012 Evropská agentura pro léčivé přípravky doporučila schválení genové terapie poprvé ve Spojených státech. Glybera je první lék na léčbu genové terapie, který se doporučuje pro registraci v Evropské unii. Léčba genové terapie má potenciál vyléčit genetické poruchy nahrazením vadného genu pracovní kopií, čímž pomáhá tělu obnovit funkčnost. Glybera používá adeno-asociovaný virový vektor, jako nosič pro přidání pracovní kopie genu pro LPL do svalových buněk, aby umožnil produkci enzymu v buňkách (Bryant et al., 2013).

Klinický vývoj genové terapie začal před více než 25 lety. Od roku 1989 bylo provedeno více než 2400 klinických studií genové terapie, přičemž v současnosti probíhají více než 320 klinických studií genové terapie. V historii genové terapie byla zaznamenána kombinace slibu a zklamání, ale pokračující výzkum naznačuje, že na horizontu je nová éra medicíny.



## 2 TECHNIKA GENOVÉ TERAPIE

Stříh genomu (nazývané také genová editace) je skupina technologií, které vědcům umožňují změnu DNA v organismu. Editace genů je provedena pomocí konstruovaných nukleáz, kde je DNA vložena, odstraněna nebo nahrazena v genomu organismu za použití konstrukčních nukleáz nebo "molekulárních nůžek".

Koncept úpravy genomu není nový a existuje řada dostupných technologií pro editaci genomů, včetně efektorových nukleáz (TALEN) a nukleáz zinku-prstů (ZFN).

Nejnovější nástroj pro editaci genomu, CRISPR / Cas9, je účinnější, přesnější, cenově dostupnější a rychlejší než jiné techniky pro úpravu genomu. Existuje potenciál použití technologie pro úpravu genomu k nápravě nebo prevenci onemocnění vzniklé genetickými mutacemi. Je však potřeba si uvědomit, že tyto aplikace ještě nejsou ani zdaleka ověřené a je nutné shromáždit další data, aby mohly být bezpečně využity.

### 2.1 CRISPR/Cas9

CRISPR je zkratka pro „nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice“ (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). CRISPR a Cas geny jsou nezbytné pro adaptivní imunitu ve vybraných bakteriích a *Archaea*, umožňující organismům reagovat a eliminovat invazivní genetický materiál. Systém CRISPR byl objeven v roce 1987 v genomu *E. coli*. Ve skutečnosti vědci objevili fragmenty DNA, které byly postupně opakovány v pravidelných intervalech v bakteriálním genomu. Trvalo však 20 let, než bylo jasné, že opakované sekvence jsou ve skutečnosti získaným „imunitním systémem“ v bakteriích proti virům a plazmidům. Přičemž začíná tehdy neznámý CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a Cas 9 (CRISPR associated protein) (Marraffini et al, 2010). Tento tzv. imunitní systém je zodpovědný za ochranu zdraví a pohody organismu. Stejně jako my, tak i bakteriální buňky mohou být napadeny virem, které jsou malé, infekční činidla. Pokud virové infekce ohrožují bakteriální buňku, imunitní systém CRISPR může přerušit útok zničením genomu napadajícího viru (Brouns et al., 2008). Genom viru zahrnuje genetický materiál, který je nezbytný pro pokračování replikace viru. Tím, že zničí virový genom, imunitní systém CRISPR chrání bakterie před probíhajícími virovými infekcemi.

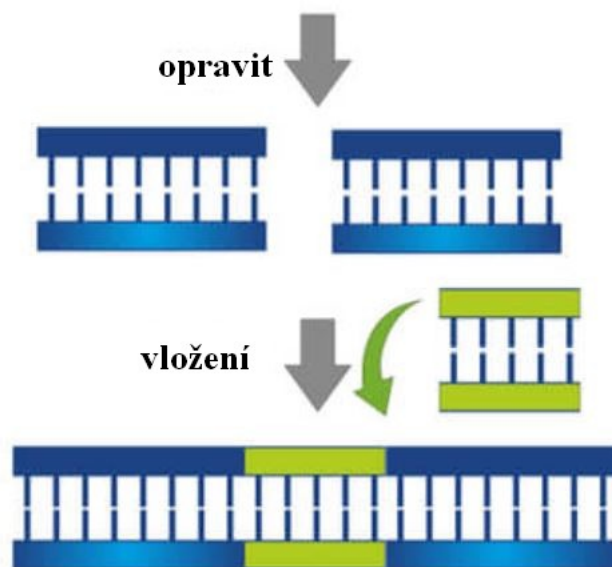
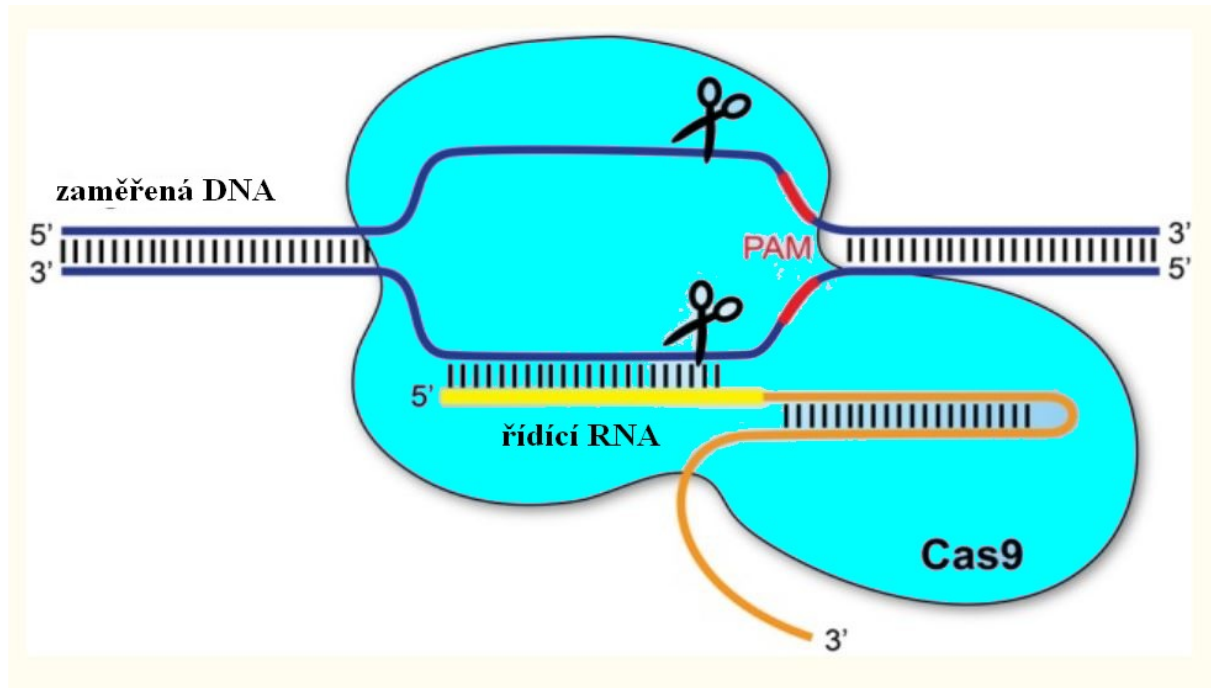
CRISPR jsou segmenty DNA obsahující krátké, opakující se sekvence bází v palindromických repetit (sekvence nukleotidů je stejná v obou směrech). Každá repetice je následována krátkými segmenty tzv. spacer DNA získaná z předchozí integrace cizí DNA z viru nebo plazmidu. Sekvence jsou tedy odvozeny od fragmentů DNA z viru, které dříve infikovaly prokaryotické organismy a používají se k odhalení a zničení DNA z podobných virů, průběhem následných infekcí. Proto tyto sekvence hrají důležitou roli v antivirovém obranném systému prokaryot (Barrangou, 2015). Cas 9 je restriční endonukleáza, která pochází ze *Streptococcus pyogenes*.

CRISPR používá sekvence jako pomůcku pro rozpoznání a štěpení specifických řetězců DNA, které jsou doplňkové ke CRISPR sekvenci. Cas9 spolu s CRISPR tvoří základ technologie známé jako CRISPR/Cas9, která může být použita k úpravě genů v organismech. Tento typ procesu pro úpravu genů má velké sliby v široké škále aplikací, jako je inženýrství kmenových buněk, genové terapie, v rozvoji biotechnologických produktů a potenciálně se může použít k léčbě nemocí (Zhang et al., 2014)

### 2.1.1 Systém Crispr /Cas9

Systém CRISPR/Cas9, který se dnes používá pro úpravu genomu je systém CRISPR/Cas typu II upravený ze *Streptococcus pyogenes* (Hsu et al., 2014). Systém se skládá ze dvou hlavních složek: řídicí gRNA a Cas9. gRNA obsahuje dvě molekulární složky a to cílovou specifickou CRISPR RNA (crRNA) a pomocnou trans aktivační crRNA (tracrRNA).

Endonukleáza je bakteriální nukleázový protein Cas9 ze *Streptococcus pyogenes*. Nukleáza Cas9 má dvě štěpicí domény DNA, které štěpí dvojřetězcovou DNA, čímž způsobí přerušení dvojitého vlákna (DSB) (Haft et al., 2005). Cas9 je směřován na svoji část RNA. To může být syntetizováno jako jednoduché vlákno nazvané jednotlivé naváděcí RNA (sgRNA), část RNA, která se váže ke genomové DNA. Při řezání musí být specifická sekvence DNA mezi 2 a 5 nukleotidem (přesná sekvence závisí na bakteriích, které produkují Cas9), musí ležet na 3'konci řídicí RNA, to se nazývá protospacer sousedící motiv (PAM). Oprava po rozštěpení DNA se může objevit dvěma způsoby: nehomologním spojením volných konců, typicky vedoucím k náhodnému vložení/ vymazání DNA nebo homologicky řízenou opravou, kde se jako opravná šablona používá homologní kus (Redman et al., 2016).



**Obrázek 1** - Systém CRISPR/Cas9; převzato a upraveno z: Redman et al., 2016.

## 2.2 Zinkové prsty

Zinkový prst je malý proteinový strukturní motiv umožňující vazbu bílkoviny na DNA. ZNF obsahuje 30 aminokyselin, je to funkční nezávisle složená doména, která koordinuje jeden nebo více iontů zinku, aby stabilizovala svou strukturu pomocí cysteinových nebo histidinových zbytků (Gaj et al., 2013). Proteiny zinkových prstů jsou největší rodinou

transkripčního faktoru v lidském genomu a regulují expresi genů (Klug et al., 1987). Každý zinkový prst se může navázat na sekvenci tří nukleotidů a může rozpoznat DNA sekvence o délce mezi 9- 18 párů bází (Liu et al., 1997).

Zinkové prsty nukleázy (Zinc Finger Nuclease - ZNF) jsou konstruované DNA vazebné bílkoviny, které mohou být navrženy tak, aby se vázaly na širokou škálu sekvencí DNA s funkcí vytvořit zlomy v DNA na určitém místě v genomu. ZFN se skládají ze dvou funkčních domén a to z domény vázající DNA a z domény štěpící DNA, která je tvořena endonukleázovou doménou Fok I. Když jsou DNA-vázající domény a domény štěpící DNA spojeny, vzniká vysoce specifická dvojice "genomických nůžek". Doména Fok I si musí dimerizovat svoji aktivitu pro nukleázovou činnost, čímž se zvyšuje cílová specifita a tím se musí objevit dvě proximální vazby DNA, aby se dosáhlo dvojitého zlomu.

Po vytvoření zlomu se buňka snaží opravit dvěma cestami, buď nehomologním spojením volných konců (NHEJ) nebo homologicky řízenou opravou (HDR). NHEJ často může způsobovat mutační inzerci nebo delecii, které mohou narušit translační čtecí rámec kódované sekvence. Oprava pomocí HDR, buňka se pokusí opravit přerušení vložením požadované sekvence do cílového místa s donorovými šablonami DNA (Sander and Joung, 2014).



**Obrázek 2** – Každá ZFN se skládá ze dvou funkčních domén: a) DNA - vazebná doména složená z řetězce dvouprstých modulů, z nichž každá rozpoznává unikátní hexamerovou (6 bp) sekvenci DNA. Moduly se dvěma prsty jsou spojeny k sobě, tak aby vytvořily protein zinkového prstu, každý se specificitou  $\geq 24$  bp. b) DNA - štěpící doména složená z nukleázové domény Fok I. Když jsou domény vázající DNA a DNA štěpící domény spojeny, vzniká vysoce specifická dvojice "genomických nůžek". Převzato z: <https://www.sigmaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/learning-center/what-is-zfn.html>

## 2.3 Virové vektory

Virové vektory jsou nástroje určené k dodávání genetického materiálu do buněk. Tento proces může být prováděn uvnitř živého organismu (in vivo) nebo v buněčné kultuře (in vitro). Genový přenos zprostředkovaný virovými vektory se označuje jako transdukcce. Viry si vyvinuly způsob, jak se zapouzdřit a přenášet své geny do lidských buněk patogenním způsobem. Vědci se pokusili využít této schopnosti a manipulovat s virovým genomem a nahradit ho pracovním lidským genem (Walther et al., 2000). Tento pozměněný virus lze pak použít k pašování genů do buněk s velkou účinností. Některé viry vloží své geny do genomu hostitele, ale ve skutečnosti nevstoupí do buňky. Ostatní viry proniknou přes buněčnou membránu, přemění se za proteinovou molekulu a vstupují do buňky. Jakmile je transplantovaný gen zapnut na správném místě uvnitř buňky infikované osoby, může vydat pokyny nezbytné pro to, aby buňka vytvořila bílkovinu, která byla dříve vynechána nebo pozměněna. Virové vektory jsou extrémně účinné při přenosu genů, ale mohou představovat určité bezpečnostní rizika (Misra, 2013).

Každý virový vektorový systém je charakterizován skupinou vlastností, které ovlivňují jeho vhodnost pro genovou terapii nebo pro jinou specifickou aplikaci. Pro vytvoření vektoru musí být kódovací geny a takzvané cis-působící regulační sekvence rozděleny na odlišné molekuly nukleových kyselin, aby se zabránilo jejich rekonstrukci a tvorbě produktivních virových částic.

Výběr nejvhodnějšího vektoru je klíčový a vyžaduje důkladnou znalost doručovacích systémů a jejich výkonů. Neexistuje univerzální víceúčelový virový vektor vhodný pro všechny požadavky; spíše každý z vektorů má své vlastní výhody, omezení a rozsah aplikací.

### 2.3.1 Adenoviry

Adenoviry byly poprvé izolovány z adenoidní tkáně v roce 1953. Bylo identifikováno více než 100 sérologicky odlišných typů adenoviru, včetně 50 typů, které infikují lidi. Adenoviry jsou nyní jedny z nejvíce studovaných vektorových forem a jsou používány v celosvětových klinických studiích.

Adenoviry jsou neobalené viry, které nesou svůj genetický materiál ve formě DNA velikosti 30-40 kb. Způsobují infekce dýchacích cest, středních a očních infekcí u člověka. Jestliže adenoviry nakazí hostitelskou buňku, předají své molekuly DNA do hostitelské buňky. Genetický materiál hostitelské buňky zůstává nezměněn. Infikovaná molekula DNA se

nachází volně v nucleu hostitelské buňky a instrukce této extra DNA molekuly jsou přepisovány jako každý jiný gen. Jediný rozdíl je v tom, že tyto geny se nereplikují, když se buňka podrobí buněčnému dělení, takže potomci této buňky nebudou mít extra gen (Misra, 2013).

Adenovirus také může infikovat širší škálu buněk než retrovirus, včetně buněk, které se dělí pomaleji, jako jsou buňky plic. Nicméně adenovirus je také pravděpodobněji napaden imunitním systémem pacienta a vysoká hladina viru potřebná k léčbě často vyvolává nežádoucí zánětlivou reakci. Navzdory těmto nevýhodám byl tento vektorový systém podporován pro léčbu rakoviny jater a rakoviny vaječníků. První produkt genové terapie, který má být registrován k léčbě karcinomu hlavy a krku je Gendicin (Peng et al., 2005). Obava o bezpečnost adenovirových vektorů byla vznesena po smrti Jesse Gelsinger v roce 1999, když se zúčastnil studie v genové terapii. Od té doby se práce s adenovirovými vektory zaměřila na geneticky zmrzačené verze viru.

### **2.3.2 Adenoasociované viry**

Adeno-asociované viry pochází z rodu Dependoviry rodiny Parvoviry, které byly poprvé objeveny v roce 1965 jako kontaminanty v přípravě adenoviru. Adeno-asociovaný virový vektor byl použit u prvního léku Glybera na léčbu genové terapie schválený v západním světě v listopadu 2012 k léčbě pacientů s nedostatkem lipoprotein-lipázy. Jsou to malé, nepatogenní a neobalené viry, jejichž genom obsahuje jednovláknovou DNA. Tyto viry obvykle vyžadují pomocný virus, jako je adenovirus, ke zprostředkování produktivní infekce (Muzyczka, 1992). Existuje šest známých lidských virových sérotypů, z nichž každý může mít různé vlastnosti.

AAV může infikovat jak dělicí, tak nerozděluující buňky a může zahrnovat svůj genom do genomu hostitelské buňky. Navíc AAV většinou zůstává jako epizomální (replikuje se bez začlenění do chromozomu). U AAV není v současné době známo, že způsobuje onemocnění a způsobuje velmi mírnou imunitní odpověď. Tyto vlastnosti činí AAV velmi atraktivním kandidátem na vytvoření virových vektorů pro genovou terapii (Tal, 2001).

Virový genom se skládá ze dvou genů, z nichž každý produkuje více polypeptidů: gen rep, potřebný pro replikaci virového genomu a cap, kódující strukturní proteiny. Hlavním nedostatkem AAV je to, že je malý a nese pouze dva geny v přirozeném stavu. Jeho užitečné zatížení je tedy relativně omezené. Kapacita AAV je asi 5,0 kb, což je hlavní omezení tohoto

vektorového systému. Divoký typ viru v přítomnosti genu rep má sklon k integraci do specifické oblasti lidského chromozomu 19. Tato vlastnost se ztrácí ve vektorech kvůli nepřítomnosti rep genu. Vzhledem k tomu, že v genomu AAV vektoru chybí virové kódující sekvence, samotný vektor nebyl spojen s toxicitou nebo s žádnou zánětlivou odpovědí. Vektorové částice mohou být dodány, pomocí metody in vivo do mnoha různých orgánů (například CNS, jater, plic a svalům) a bylo zjištěno (Monahan and Samulski, 2000), že AAV vektory účinně transdukuje nedělitelné buňky (Miao et al., 2000). V klinických studiích se používají AAV k léčbě cystické fibrózy, hemofilie a svalové dystrofie (Wagner et al., 1999). Je pravděpodobné, že tento vektor bude užitečný při léčbě některých onemocnění a brzy se očekávají další klinické testy s tímto vektorem.

### **2.3.3 Retroviry**

Retroviry jsou prvními viry, které byly použity jako vektory v experimentech genové terapie. Retrovirové vektory jsou efektivní přenosové systémy pro zavádění cizích genů do cílových buněk. Tyto vektory jsou široce používané systémy v genové terapii, což se odráží ve velmi vysokém procentu (asi 40%) protokolu klinické genové terapie, které jsou prováděny pomocí rekombinantních retrovirových částic nebo retrovirových produkčních buněk pro přenos genů.

Genetický materiál retroviru je ve formě molekul RNA, zatímco genetický materiál jejich hostitelů je ve formě DNA. Když retrovirus infikuje hostitelskou buňku, zavede do buňky svou RNA spolu s některými enzymy. Tato molekula RNA z retroviru musí produkovat kopii DNA z molekuly RNA před tím, než může být považována za součást genetického materiálu hostitelské buňky. Způsob výroby kopie DNA z molekuly RNA se nazývá reverzní transkripce. Jedná se o jeden z enzymů přenesený ve viru, nazývaných reverzní transkriptáza. Poté, co se tato kopie DNA vytvoří a je v jádře hostitelské buňky volná, musí být začleněna do genomu hostitelské buňky. Tento proces se provádí enzymem nesoucí virus nazývaný integráza. Nyní, když je genetický materiál viru začleněn a stal se součástí genetického materiálu hostitelské buňky, můžeme říci, že hostitelská buňka je nyní upravena tak, aby obsahovala nový gen. Pokud se tato hostitelská buňka rozdělí později, její potomci budou obsahovat všechny nové geny.

Přestože retroviry byly používány ve většině experimentů s genovou terapií, představují problémy (Bau et al., 2003). Jedním z problémů genové terapie využívající retroviry je, že enzym integrázy může vložit genový materiál viru do jakékoliv polohy

v genomu hostitele, náhodně tak vloží genetický materiál do chromozomu. Pokud dojde k vložení genetického materiálu uprostřed jednoho z původních genů hostitelské buňky, tento gen bude přerušeny a dojde tak k inzerční mutagenézi. Pokud dojde k porušení regulace buněčného dělení, může dojít k nekontrolovanému rozdělení buněk, což vede ke vzniku rakoviny. Tento problém se nedávno začal řešit použitím nukleáz se zinkovými prsty (Durai et al., 2005). Studie genové terapie používají retroviry k léčbě X-SCID a představují tak nejúspěšnější aplikaci dosavadní genové terapie (Gasper et al., 2005).

### **2.3.4 Lentiviry**

Lentiviry patří do retroviridae rodiny virů. Genom retrovirů je tvořen jednovláknovou RNA s pozitivním významem, která se během procesu replikace přeměňuje na dvouřetězcovou DNA. Ve většině ostatních typů virů se virová DNA přepisuje do RNA, která se pak převádí do proteinu. Naproti tomu retrovirová RNA je nejprve reverzně přepsána do DNA a pak je integrována do genomu hostitelské buňky. Po integraci bude hostitelská buňka transkribovat virové geny spolu se svými vlastními geny, čímž vytvoří stabilní expresi transgenů. V poslední době se používají jako nosiče pro přenos genů kvůli své schopnosti přirozeně se integrovat s nedělitelnými buňkami, což je jedinečný rys lentivirů ve srovnání s jinými retroviry, které mohou infikovat pouze dělicí buňky a tudíž je činí obzvláště atraktivní pro lidskou genovou terapii (Fouchier et al., 1997).

Bylo zdokumentováno, že jsou schopné transdukovat kmenové buňky, neurony a imunitní buňky pomocí metody *in vivo*, s vysokou účinností a transgenní expresní stabilitou, což je vysoce přesvědčivou možností pro přístupy genové terapie (Connolly, 2002). Lentiviry představují stejné riziko mutagenéze a onkogenéze jako retroviry. Navíc, zatímco retroviry a lentiviry mohou být patogenní, pokud se stanou schopné replikace, lentiviry představují větší bezpečnostní riziko, protože jsou schopné vyvolat chronické a smrtelné onemocnění, včetně AIDS.

### **2.3.5 Herpes virus**

HSV je lidský neurotropní virus, který se většinou používá pro přenos genů v nervovém systému. Má velký genom ve srovnání s jinými viry, což umožňuje vědcům vložit více než jeden terapeutický gen do jediného viru, což by prorazilo cestu k léčbě poruch způsobených více než jednou genovou vadou. HSV se představuje jako ideální vektor, protože může infikovat širokou škálu tkání včetně svalů, jater, slinivky břišní, nervových



a plicních buněk (Varghese et al., 2002). Hlavním rysem herpetických virů je, že vytváří latentní infekce, při nichž virový genom přetrvává v nepřítomnosti zjištělné infekčnosti. Latence umožňuje přítomnost viru v hostiteli za přítomnosti imunitní odpovědi (Lachmann, 2004).

Herpes simplex virus se dělí na dva druhy: herpes typu 1 (HSV-1) a herpes typu 2 (HSV-2). Infekce virem herpes simplex se projeví výskytem vodnatých puchýřků na kůži nebo sliznici úst či rtů. HSV-1 se přenáší slinami a způsobuje tak infekce kolem úst, zatímco HSV-2 se přenáší sexuální cestou nebo z matky na novorozence při porodu a častěji způsobuje genitální infekce (Balasubramaniam et al., 2014).

Virus divokého typu HSV-1 je schopen infikovat neurony a vyhnout se imunitní reakci hostitele, ale přesto se může znovu aktivovat a produkovat lytický cyklus virové replikace. Proto je typické používat mutantní kmeny HSV-1, které mají nedostatečnou schopnost se replikovat. Ačkoli latentní virus není transkripčně patrný, obsahuje neuronově specifické promotory, které mohou fungovat i nadále normálně. Protilátky proti HSV-1 jsou běžné u lidí, nicméně komplikace způsobené herpetickou infekcí jsou poněkud vzácné.

### 3 PROTEIN 53

P53 je protein, který je u lidí kódován genem TP53. P53 je rozhodující pro mnohobuněčné organismy, kde reguluje buněčný cyklus a tudíž funguje jako supresor nádorů, který se podílí na prevenci rakoviny. Je to jaderný transkripční faktor a transaktivuje řadu cílových genů, které se podílejí na indukci zastavení buněčného cyklu a nebo apoptózy. P53 působí jako supresor nádorů, což znamená, že reguluje buněčné dělení tím, že udržuje buněčný růst a dělí se (proliferuje) příliš rychle nebo nekontrolovaně. Jako takový byl p53 popsán jako "strážce genomu", kvůli své úloze při zachování stability tím, že brání genomové mutaci. Proto je TP53 klasifikován jako tumor supresorový gen (Deepthi et al., 2011).

Protein p53 byl nejprve identifikován v roce 1979 jako protein související s transformací a buněčný protein, který se hromadí v jádrech nádorových buněk a těsně se váže na velký T antigen (SV402). U genu kódujícího p53 byla nejprve zjištěna slabá onkogenní aktivita, protože byl pozorován přetlak p53 v myších a lidských nádorových buňkách. Nicméně téměř o 10 let později vědci zjistili, že jde o missense mutace p53, byla původně považována za divoký typ p53 (wt p53) v dřívější studii a že onkogenní vlastnosti p53 byly skutečně výsledkem mutace p53 (Chang et al., 1979). V dalších studiích se p53 stal široce uznávaným nádorovým supresorem a tak gen p53 se stal pravděpodobně nejběžnějším místem genetických změn u lidských rakovin. Následný výzkum s wt p53 jasně ukázal, že p53 je významným "strážcem genomu". V současnosti je známo, že p53 hraje klíčovou roli prakticky ve všech typech lidských rakovin a mutace nebo ztráta genu p53 může být identifikována ve více než 50% všech případů rakoviny u lidí po celém světě.

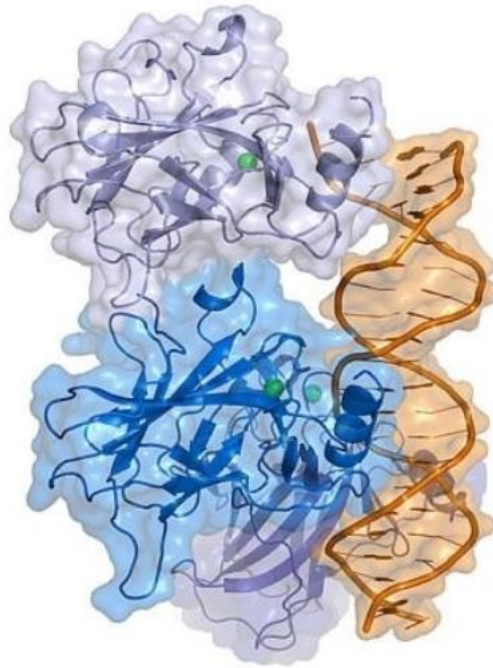
Název p53 popisuje zdánlivou molekulovou hmotnost; SDS-PAGE analýza ukazuje, že jde o protein s molekulovou hmotností 53 kilodaltonů (kDa). Avšak skutečná hmotnost proteinu p53 s plnou délkou (p53 $\alpha$ ) na základě součtu hmotností aminokyselinových zbytků je pouze 43,7 kDa. Gen TP53 je nejčastěji mutovaným genem (> 50%) u lidské rakoviny, což naznačuje, že gen TP53 hraje rozhodující roli při prevenci vzniku rakoviny. TP53 gen kóduje proteiny, které se vážou k DNA a regulují genovou expresi k prevenci mutací genomu (Surget et al., 2013).

#### 3.1 Struktura p53

P53 má mnoho mechanismů protinádorové funkce a hraje roli v apoptóze, genomové stabilitě a inhibici (snížení) angiogeneze. Ve své protinádorové funkci funguje p53

prostřednictvím několika mechanismů: Může aktivovat DNA opravné proteiny, když DNA utrpěla poškození. Může vyvolat zastavení růstu udržováním buněčného cyklu na G1 / S regulační bod při rozpoznávání poškození DNA (pokud tu buňku drží dostatečně dlouho, opravné proteiny DNA budou mít čas opravit poškození a buňka bude mít možnost pokračovat v buněčném cyklu). Mohou iniciovat apoptózu, naprogramovanou buněčnou smrt, pokud se poškození DNA ukáže jako nenapravitelné (Deepthi et al., 2011).

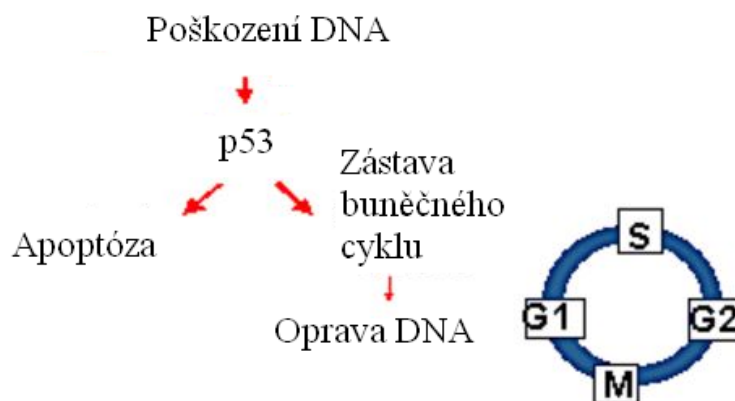
P53 je umístěn na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1). Celková délka genu je přibližně 20 kb, skládá se z 11 exonů, z nichž první je nekódující a z 10 intronů. P53 obsahuje 393 aminokyselin uspořádaných strukturálně a funkčně ve 4 doménách: N-terminální doménu (NTD), doménu vázající DNA (DBD), oligomerizační doménu a C-terminální doménu (CTD). NTD sestává z oblasti aktivace transkripce kyselého N-konce a z oblasti bohaté na prolin. CTD se skládá z tetramerizační domény (TD) a regulační domény (RD). TAD je místem, kde se odehrávají posttranslační modifikace a interakce negativních regulátorů, jakými jsou např. MDM2 a MDM4 (Helma, 2012). Protein Mdm2 hraje důležitou roli v kontrole stability p53 proteinu. Mdm2 je cíl p53 transkripční aktivace. Zároveň Mdm2 interaguje a inhibuje transkripční aktivitu p53. To se děje rychlým rozpadem p53 a tato cesta je pravděpodobně zodpovědná za nízkou hladinu p53 v buňkách. U nádorových buněk s mutací p53 se předpokládá, že nízká hladina Mdm2 přispívá ke stabilizaci p53 (Gelslehter et al., 1995). Fosforylace p53 na aminovém konci, která se vyskytuje po poškození DNA, snižuje vazbu Mdm2 a vede ke stabilizaci p53. Různé faktory vyvolávající změny v buněčné DNA specificky inhibují transkripci proteinu Mdm2 a indukují nepřímou reakci prostřednictvím p53. Aminokyselinová transkripční doména reaguje s různými proteiny, které pozitivně regulují funkci p53 transkripce ve fyziologických podmínkách. Centrální jaderná doména hraje důležitou roli ve vazbě sekvencí DNA (fragmentů) a také různých onkogenů a proteinů, které negativně ovlivňují transkripční aktivitu p53. V této oblasti se objevují mutace ovlivňující aktivitu potlačovače p53. Tetramerizační doména udržuje p53 jako tetramer v rozpuštěném stavu za fyziologických podmínek. Oligomerace p53 je důležitá pro jeho supresorovou aktivitu. C-terminální doména reguluje vazbu DNA fragmentů centrální nukleární doménou. Strukturální změny v terminální doméně jsou nutné pro aktivaci p53 s ohledem na propojení fragmentů DNA s jadernou doménou p53 (Ananiev et al., 2011).



**Obrázek 3** - Struktura TP53; převzato z: [https:// www. sciencenode.org/feature/stampede-is-down-with-p53-.php](https://www.sciencenode.org/feature/stampede-is-down-with-p53-.php)

### 3.2 Funkce TP53

Za normálních podmínek se p53 vyskytuje v malém množství. Když je DNA v buňce poškozena látkami, např. chemickými látkami, stresem, nedostatkem kyslíku a teplotou, hraje tento protein rozhodující roli při určování, zda bude DNA opravena, nebo poškozená buňka se samovolně zničí (podstoupí apoptózu). V buňce se protein p53 váže na DNA a stimuluje jiný gen pro produkci proteinu, nazvaného p21, který interaguje s proteinem stimulujícím buněčné dělení (cdk2). Jestliže p53 najde poškozené místo na DNA, spustí transkripci genu p21, pozastaví buněčný cyklus, což umožní čas na opravu DNA. Pokud je poškození rozsáhlé a DNA nemůže být opravena, tento protein zabraňuje rozdělení buněk a signalizuje, že podstoupí apoptózu. Tím, že zastaví buňky s mutovanou nebo poškozenou DNA, p53 pomáhá předcházet vzniku nádorů (Kabel, 2015).0



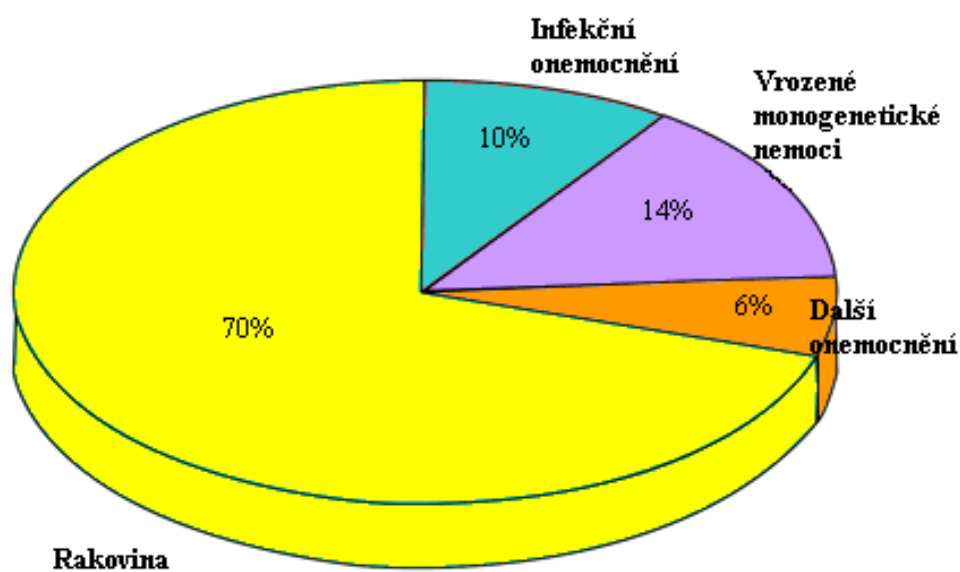
**Obrázek 4** - Schéma biologické funkce p53; převzato z: <http://www.meduniwien.ac.at/surgery-research/p53/about.htm>

### 3.3 Funkce p53 v genové terapii

V oblasti biotechnologie byly vyvinuty techniky, které mohou vědci využít k obnovení zdravého normálně funkčního genu p53 u buněk, které mají rakovinné mutace v genu p53. Tento složitý úkol zahrnuje virový vektor, který se používá k přenosu zdravého genu p53 do buněk. Prostřednictvím genetického inženýrství, vědci mění DNA virového vektoru, který modifikuje jeho přirozeně infekční povahu tím, že mu zabráňuje replikaci. Tato "bezpečná verze" viru je pak použita jako transportní zařízení pro vysoké koncentrace genu p53. Vědci přímo aplikují nádor těmito virovými vektory. Pokud je genová terapie úspěšná, gen p53 vytvoří funkční protein p53 v nádorových buňkách, který zabije nádorové buňky nebo obnoví normální funkci buňky, což zabráňuje růstu rakoviny (Wirth and Ylä-Herttuala, 2015).

## 4 TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ GENOVÉ TERAPIE

Lidská bytost trpí více než 5 000 různými onemocněními způsobené jedinou mutací genu. Onemocnění vyplývající z mutací jednoho genu jsou potenciálně dobrými kandidáty pro genovou terapii. Funkční kopie genu by měly být zavedeny do buňky spolu s prvky, které řídí její expresi vedoucí k produkci chybějících proteinů a obnovení funkce. Bylo zjištěno, že genová terapie by mohla být v budoucnosti účinná u mnoha nemocí, například u cystické fibrózy, rakoviny, hemofilie, svalové dystrofie a těžké kombinované imunodeficiencie a u mnoha dalších onemocnění.



**Obrázek 5** - Podíl protokolů pro zkoušky genové terapie u člověka týkající se různých typů onemocnění; převzato z: Morgan and Biaese,1999.

#### 4.1 Rešerše klinické studie zaměřené na genovou terapii - úvod

Genová terapie je k dispozici pouze v klinických studiích. Klinické studie jsou vědecké studie, jejichž cílem je nalézt lepší způsoby prevence, screeningu, diagnostiky nebo léčby onemocnění. Tyto klinické studie mohou také ukázat, které lékařské přístupy fungují nejlépe pro určité nemoci nebo skupiny lidí. Klinické studie poskytují vysoce kvalitní údaje pro rozhodování o zdravotní péči.

Účelem klinických studií je odpovědět na vědecké otázky. Proto se tyto studie řídí přísnými vědeckými standardy, které chrání pacienty a pomáhají vytvářet spolehlivé výsledky klinických studií. Klinické studie jsou jednou z posledních fází dlouhého a pečlivého výzkumu a vývoje. Tento proces často začíná v laboratoři, kde vědci nejprve rozvíjejí a testují nové myšlenky.

Před aplikací genové terapie u lidí je nutné provést předklinické studie; jsou to metody *in vitro* nebo *in vivo* před přechodem na klinické studie s lidmi. Cílem je chránit lidi před toxickými účinky, které může mít zkoumaný lék. Důležitým prvkem v předklinických studiích jsou zvířecí modely. Testy se provádějí na laboratorních myších. Pokud jsou úspěšné, pak se testy provádějí na větších zvířatech, jako jsou psi. Jestliže tyto studie dávají dobré výsledky, pak jsou předány vyšším zvířatům a to primátům nebo lidem.

Klinické studie týkající se léčiv jsou rozděleny do čtyř fází. Pokusy v každé fázi mají jiný účel a pomáhají vědcům odpovědět na různé otázky:

Studie fáze I testují experimentální lék, vakcínu nebo zařízení v malé skupině lidí, aby se vyhodnotila bezpečnost, možné nežádoucí účinky a určilo se, jak má být lék používán nebo podáván.

Studie fáze II zahrnují více lidí než fáze I a jsou navrženy tak, aby posoudily bezpečnost a účinnost experimentální léčby. Tato fáze může trvat několik let.

Studie fáze III jsou obvykle rozsáhlé studie s mnoha účastníky. Tato fáze porovnává experimentální lék nebo vakcínu s placebem nebo standardní léčbou, aby se vyhodnotila bezpečnost a účinnost. Některé vedlejší účinky, které nebyly identifikovány ve fázi II, mohou být identifikovány ve studii fáze III, protože se hodnotí mnohem více lidí. Regulační zdravotní orgán, jako je například Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA, zváží při určování, zda schválit nový lék nebo vakcínu, výsledky všech fází klinických studií.

Studie fáze IV následně sleduje účinnost a bezpečnost léčiva u velkých, různorodých populací.

V následujících kapitolách budou představeny vybrané choroby způsobené genetickými poruchami a příklady navrhované léčby pomocí genové terapie. Dále se práce soustředí především na nemoci spojené s poruchou funkce proteinu p53, které jsou prezentovány v širším záběru.

## **4.2 Vrozené monogenetické nemoci**

### **4.2.1 Cystická fibróza**

Cystická fibróza je dědičné onemocnění žláz, které vylučují hlen a pot. Cystická fibróza způsobuje, že hlen je hustý a lepivý, ucpává různé orgány v těle, což vede k dalším komplikacím. Většinou postihuje plíce, játra, pankreas, střeva a pohlavní orgány. Cystická fibróza také způsobuje nadměrnou ztrátu solí prostřednictvím potu, což vede k dehydrataci, únavě, slabosti a zvýšené srdeční frekvenci. Jedná se o autosomálně recesivní poruchu, u které je mutace způsobena genem CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) na chromozómu 7 (Burney and Davies, 2012). V současnosti neexistuje lék na cystickou fibrózu. Lékaři však léčí příznaky pomocí antibiotik spolu s dalšími léčebnými postupy, které by odstranily hlen, jenž se hromadí v různých orgánech. Obvykle se CF diagnostikuje během prvních pěti let života. V minulosti pacienti s CF převážně žili do svých 20 let, zatímco v současné době v důsledku zlepšení medicíny se očekává, že pacienti s CF budou moci dosáhnout 40 let a více (Mackenzie et al., 2014). Genová terapie nabízí velkou naději pro léčbu pacientů s cystickou fibrózou, jelikož se zaměřuje na hlavní příčinu CF, spíše než na léčbu příznaků jako dosavadní tradiční léčby.

#### **4.2.1.1.1 Klinická studie - Jednorázová dávka pGM169/GL67A podávána pacientům s CF. Fáze 1 a 2 (Identifikační číslo: NCT00789867)**

pGM169/GL67A je kombinace kationtových lipozomů (GL67A) a plazmidové DNA exprimující gen CFTR, který je u nemocných pacientů poškozen. Aerosolizace vektoru plazmidové DNA do plic pacientů představuje náročný úkol, protože plazmidovou DNA nelze efektivně samotnou dopravit do dýchacího ústrojí. Nedávno byl dokončen program klinických studií s tímto přípravkem. Kvůli problémům s dopravením do dýchacích cest kombinujeme negativně nabitý plazmid s pozitivně nabitými tukovými lipozomy (GL67A) a ty tvoří malé, silně vázané částice, které jsou dostatečně stabilní, aby vydržely aerosolizaci



a mohly být přijaty buněčnou membránou dýchacího ústrojí. Výzkumníci z Cambridge vytvořili lipid GL67A se zlepšenou účinností pro přenos genů, dobře charakterizovanými bezpečnostními parametry a žádoucí stabilitou během aerosolizace. GL67A byl doplněn neutrálním lipidovým dioleoylfosfatidylethanolaminem (DOPE), který má usnadnit únik endosomů pDNA spolu s malým množstvím lipidů, obsahující polyethylenglykol (DMPE-PEG5000) ke stabilizaci lékových forem, v koncentracích dostatečných pro dodávání aerosolu do plic.

Cílem studie je posoudit bezpečnost, snášenlivost a expresi genů po jedné dávce neviróvé genové terapie do nosu a plic (Alton et al., 1999).

Datum zahájení: listopad 2008

Datum ukončení: prosinec 2010

Typ studie: intervenční

Účastníků: 27

Fáze: 1 a 2

#### **Umístění: Spojené království Velké Británie**

Royal Brompton Hospital

Studie byla nakonec ukončena v květnu 2019, ale výsledky nebyly veřejně dostupné na webu Clinicaltrials v době sepisování bakalářské práce.

#### **4.2.2 Opakovaná aplikace genové terapie u pacientů s CF. Fáze 2 ( Identifikační číslo: NCT01621867)**

Primární výsledkem této studie je vyhodnotit relativní změnu usilovného výdechu za 1 sekundu (FEV1) po 12 dávkách léku pGM169/GL67A podávaného do nosu a plic jedincům s CF. Sekundární výsledky měření budou hodnotit účinnost tohoto genového produktu na fyziologický stav pacienta, sérologické ukazatele, radiologický vzhled plic a bezpečnost užívání tohoto přípravku.

Datum zahájení: květen 2012

Datum ukončení: květen 2014

Typ studie: intervenční

Fáze: 2

Účastníků: 130

### **Umístění: Spojené království Velké Británie**

Západní obecná nemocnice Edinburgh

Královská nemocnice pro nemocné děti

### **Průběh**

Náhodně vybraným pacientům bude podáváno buď dvanáct dávek léku pGM169/GL67A kódující CFTR nebo placebo v intervalech 4 týdnů po dobu 48 týdnů. V 50. týdnu a v 52. týdnu se všichni pacienti dostaví na kontrolní vyšetření FEV1, bude sledován očišťovací index plic, kultura a hmotnost hlenu, provedeno CT hrudníku a pacienti vyplní dotazníky o kvalitě života. Z hlediska bezpečnosti bude u pacientů monitorována funkce ledvin a jater, CRP, počet leukocytů.

**Výsledky:** Byl zaznamenán významný, i když skromný, léčebný účinek ve skupině užívající lék versus placebo po 12 měsících sledování (3,7%, 95% CI 0,1-7,3;  $p = 0,046$ ). Tento výsledek byl spojen se stabilizací plicních funkcí ve skupině užívající lék ve srovnání s poklesem ve skupině s placebem. Nebyly zaznamenány žádné nežádoucí příhody. Celkem bylo testováno 116 pacientů, kteří splňovali vstupní kritéria (Alton et al., 2015).

### **4.2.3 Těžká kombinovaná imunodeficience (SCID)**

Těžká kombinovaná imunodeficience je skupina genetických dědičných onemocnění, která ovlivňuje imunitní systém charakterizovaný vadami v odpovědi T i B buněk. T buňky přímo napadají cizí tělesa, která by mohla potenciálně způsobit onemocnění (patogeny) a B-buňky se používají jako nosiče pro rozpoznání patogenů a paměťových nosičů. Jelikož jsou tyto buňky nefunkční, imunitní systém nefunguje správně a není schopen bojovat s infekcí. SCID postihuje přibližně 1 z 100 000 živě narozených dětí. Tyto děti neměly žádný imunitní systém a jsou proto vysoce náchylné k infekci, neboť jejich těla nemají buněčné mechanismy potřebné k boji proti cizím antigenům. Pokud se neléčí, tyto děti obvykle zemrou během jednoho roku na infekce, jako je pneumonie a meningitida. Existuje několik typů SCID. Nejběžnější forma nazývaná X-Linked Severe Combined Immunodeficiency je

způsobena mutací genu "SCIDX1" umístěného na chromozomu X, proto je častější u chlapců a je známá jako bublinková nemoc chlapců. Další formou SCID je nedostatek adenosine deaminázy "ADA", který je způsoben mutací na chromozómu 20 (Cavazanna-Calvo et al., 2001).

Nejúčinnější léčbou pro SCID pomocí krvetvorných kmenových buněk je transplantace kostní dřeně od kompatibilního dárce. Navzdory své účinnosti nelze v mnoha případech nalézt odpovídajícího dárce. Existuje celá řada klinických studií genové terapie schválených pro SCID po celém světě.

V minulých letech byla zkoumána genová terapie pro SCID. Zahrnuje izolaci a molekulární korekci mutací hematologických kmenových buněk pacientů s následnou transplantací funkčních buněk zpět do pacienta. Retroviry se běžně používají jako vektory pro genovou terapii kvůli své jedinečné schopnosti proniknout do buněk pacientů. Po identifikaci místa genové mutace se připraví zdravá replika vadného genu. Retroviry jsou vylity ze svého genomu a zdravá replika vadného lidského genu je pak vložena do krunýře retroviru. Chybné kmenové buňky izolované od pacienta SCID se pak naočkují retrovirem obsahující zdravý lidský gen. Inkubace v příznivých podmínkách růstu zajišťuje inzerci a množení zdravého lidského genu uvnitř kmenových buněk pacienta, které jsou poté transplantovány zpět do těla po vyjmutí viru z buněk. Tyto "opravené" verze buněk se dále rozdělují a množí, čímž nakonec předávají normální kopie genu ke všem krvinkám. Tímto způsobem může genová terapie léčit onemocnění tím, že koriguje hlavní příčinu onemocnění. Výsledky klinických studií s genovou terapií byly vynikající a měly dlouhodobé účinky pro posílení imunitního systému (Fischer and Cavazanna-Calvo, 2007).

Účinnost genové terapie znamená, že se nyní používá k léčbě několika primárních onemocnění imunodeficiencie. V posledních letech se však vyskytlo znepokojení nad bezpečností virových vektorů. To vede k tomu, že mnoho organizací po celém světě pracuje na vývoji bezpečnějších genových variant a technik. Doufá se, že bezpečnostní otázky budou řešeny v blízké budoucnosti a budou k dispozici slibnější metody genové terapie k léčbě několika typů SCID.

#### **4.2.4 Hemofilie**

Jedná se o recesivní genetickou poruchu vázanou na chromozom X, ve kterém jednotlivci ztrácejí schopnost koagulovat krev. Jelikož geny pro srážlivé faktory VII a IX

(FIX) se nacházejí na pohlavním X chromozomu, ženy jsou přenašeči a muži trpí příznaky hemofilie. Nicméně ve vzácných případech mohou ženy také trpět hemofilií (Vandendriessche et al., 2003).

Existují dvě varianty poruchy. Hemofilie A, ke které dochází kvůli nedostatečnému faktoru srážlivosti VII. Hemofilie A je častější než hemofilie B. K Hemofilii B dochází kvůli nedostatečnému faktoru srážlivosti IX. Pravidelná infuze koagulačního faktoru, který chybí u jedince, pomáhá kontrolovat krevní ztráty způsobené nadměrným krvácením (Ponder, 2006). U pacientů, kteří se narodili s hemofilií, nedochází ke tvorbě krevní sraženiny, a proto trpí vnějším a vnitřním krvácením, které může být život ohrožující.

V klinické studii prováděné ve Spojených státech byl terapeutický gen zaveden do jater pacientů, kteří pak získali schopnost mít normální srážlivost krve (Identifikační číslo klinické studie NCT00076557). Terapeutický účinek však byl přechodný, protože geneticky korigované jaterní buňky byly rozpoznány jako cizí a odmítnuty zdravým imunitním systémem u pacientů. Jedná se o stejný problém, kterým čelí pacienti po transplantaci orgánů. Léčebný výsledek pomocí genové terapie může být dosažitelný s potlačením imunity nebo alternativními genetickými strategiemi, které se v současné době testují na zvířecích modelech v předklinických studiích (Kumar et al., 2014).

#### **4.2.5 Klinická studie - Hemofilie B - genová terapie s AAV8 vektorem. Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT01620801)**

Tato studie se zaměřuje na závažnější a častější typ hemofilie – hemofilii B. Výzkum plánuje použít virus zvaný adeno-asociovaný vir (AAV), který v přírodě nezpůsobuje žádné onemocnění a může být upraven tak, aby dodal lidský gen FIX (AAV8 - HFIX19 vektor) do jaterních buněk postižených jedinců.

##### **Průběh**

Pacientovi při krátkodobé hospitalizaci bude jednou aplikován vektor v dávce nízké, střední či vysoké do periferní žíly. Pokud budou laboratorní výsledky v pořádku, pacient bude následující den propuštěn z nemocnice. Množství dávky podávaného vektoru bude testováno na hladinách FIX. Pokud se u některých pacientů objeví zánět jater, budou aplikovány kortikosteroidy.

Datum zahájení: říjen 2012

Datum dokončení: březen 2016

Typ studie: Intervenční

Účastníků:4

Fáze:1

**Umístění: Spojené státy americké, Pensylvánie**

Dětská nemocnice ve Philadelphii

Pittsburghská univerzita

Výsledky studie zatím nebyly publikovány, protože studie byla prodloužena a není ukončena (poslední aktualizace plánu studie proběhla v březnu 2019).

#### **4.2.6 Svalová dystrofie**

Svalová dystrofie (MD) se týká skupiny geneticky zděděných poruch progresivní degenerace kosterních svalů. Způsobuje defekty svalových proteinů, úmrtí svalových buněk a tkání. Tyto poruchy se liší podle závažnosti, rozsahu a rozložení svalové slabosti. Ačkoli primárně postižené jsou kostní svaly, svalová dystrofie může zhoršit funkce jiných orgánů v těle. Zatímco v některých případech se příznaky objevují v dětském věku, v jiných případech dochází ke svalové degeneraci během dospělosti. Svalová dystrofie obsahuje třicet různých genetických poruch, které jsou obvykle rozděleny do devíti hlavních kategorií nebo typů.

Nejběžnějším typem je Duchennova svalová dystrofie (DMD). Jedná se o jednu z nejčastějších svalových dystrofií, které postihují pouze muže. Ženy jsou jen nositeli, a proto se u nich neprojevují příznaky. Symptom svalové slabosti obvykle začíná u chlapců ve věku čtyř let a rychle se zhoršuje. Typicky dochází k úbytku svalů, nejprve v horní části dolní končetiny, dále pánve, potom následuje ochabnutí svalů horní části paže. Tyto symptomy mohou postiženým způsobovat problémy se stabilitou ve stoje. Většina z nich nemůže již ve 12 let chodit. U pacientů je také častá skolióza a někteří mohou mít i mentální postižení (Kumar et al., 2014).

Porucha je způsobena mutací genu DMD (umístěného na chromozómu X), který kóduje proteinový dystrofin, jenž je důležitou složkou svalové tkáně. Asi u dvou třetin případů jsou nositeli matky, zatímco třetina případů je způsobena novou mutací. Dystrofin je zodpovědný za připojení cytoskeletu každého svalového vlákna k základní bazální vrstvě (extracelulární matrix) přes proteinový komplex obsahující mnoho podjednotek. Nepřítomnost dystrofinu umožňuje přebytku vápníku proniknout do sarkolemy (buněčné membrány). Změny vápníku a signalizační cesty způsobují, že voda vstupuje do mitochondrií, které pak prasknou.

Při dystrofii kosterního svalstva způsobuje mitochondriální dysfunkce zesílení cytosolických vápníkových signálů a zvýšení produkce reaktivního kyslíku vyvolaného stresem. V komplexním kaskádovém procesu, který zahrnuje několik cest a není jasně pochopen, zvýšený oxidační stres uvnitř buňky poškozuje sarkolemu a nakonec vede ke smrti buňky. Svalová vlákna podstupují nekrózu a jsou nakonec nahrazena tukovou a pojivovou tkání (Ramos and Jeffrey, 2015).

Další formou je Beckerova svalová dystrofie. Neexistuje žádná specifická léčba na léčbu nebo zvrácení MD. Využívají se léčebné možnosti, jako je logopedie, respirační terapie a korekční ortopedická chirurgie.

#### **4.2.7 Klinická studie - Šestiměsíční studie gentamicinu v DMD se stop kodony.**

##### **Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT00451074)**

Cílem této studie je stanovit bezpečnost intravenózního podání (IV) gentamycinu chlapcům s Duchennovou svalovou dystrofií, kteří mají mutaci stop kodonu.

Gentamycin se podává intravenózně dvakrát týdně po dobu šesti měsíců. Zjišťujeme, zda gentamycin může přispět k posílení svalů chlapců s DMD. Předpokládá se, že gentamycin umožňuje "čtení" mutaci stop kodonu a umožní produkci dystrofinu, který u chlapců s DMD chybí.

Datum zahájení: březen 2007

Datum ukončení: červenec 2009

Typ studie: Intervenční

Účastníků: 12

Fáze 1

### **Umístění: Spojené státy americké, Arizona**

Neuromuskulární výzkumný ústav – Scottsdale zdravotní nemocnice v Shea

### **Spojené státy americké, Kansas**

Kansaská univerzita

**Výsledky:** Ve 14 denní studii klesla sérová kreatinkináza (CK) o 50%, což nebylo pozorováno na rámcových kontrolách DMD. Po 6 měsících působení gentamicinu se výrazně zvýšila hladina dystrofinu ( $p = 0,027$ ); nejvyšší hladina dosáhla 13 až 15% normálu (1 v skupině 3 a 2 v skupině 4), doprovázené sníženou hladinou séra CK upřednostňovaným lékem indukovaným zpětným získáním stop kodonů. To bylo podpořeno stabilizací síly a mírným zvýšením vitální kapacity. Stabilní transkripce před léčbou předpovídaly zvýšení dystrofinu po gentamicinu. Účinnost čtení nebyla ovlivněna mutací stop kodonem (Malík et al., 2010).

## **4.3 Získané nemoci**

### **4.3.1 Rakovina**

Americká společnost pro výzkum rakoviny definuje rakovinu jako "skupinu onemocnění charakterizovanou nekontrolovatelným růstem a šířením abnormálních buněk. Pokud šíření není řízeno, může nastat smrt."

Nádory mohou být benigní (bez rakovinového bujení) nebo maligní (se zhoubným rakovinovým bujením). Benigní nádory mají tendenci růst pomalu a nerozšířit se. Zhoubné nádory mohou rychle růst, napadat a zničit okolní normální tkáň a šířit se po celém těle. Rakovina je druhou nejčastější příčinou smrti po celém světě, která je způsobena tím, že je výsledkem interakce mnoha různých genetických a environmentálních faktorů. Existuje mnoho typů léčby rakoviny, lékaři si mohou vybrat druh léčby v závislosti na místě, typu, stádiu rakoviny a věku pacienta (Swadesh et al., 2015). Standardní léčba zahrnuje operaci, ozařování, chemoterapii, imunoterapii a hormonální terapii. Tato léčba může být použita samostatně nebo v kombinaci. Nežádoucí účinky se pohybují od mírných až po závažné. Protinádorová léčba může ovlivnit zdravé buňky, které normálně rostou rychleji, např. krevní buňky, buňky pohlavních orgánů a buňky vlasových folikulů. Zvolený druh léčby může

v závažných případech postihnout buňky životně důležitých orgánů, včetně srdce, plic a nervového systému. Světová zdravotnická organizace (WHO) očekává, že úmrtnost na rakovinu se celosvětově zvýší. Odhaduje se, že tento rok dosáhne 9 milionů a v roce 2030 dosáhne 11,4 milionu. Genová terapie nabízí alternativní léčbu pacientům s rakovinou. Tato terapie mění rakovinné buňky uvnitř nebo vně těla pacienta pomocí různých vektorů, které dodávají gen. Od roku 1999 byly vytvořeny nové a bezpečné látky pro genovou terapii a tisíce pacientů s rakovinou po celém světě se účastnily studií genové terapie s výrazně menšími nežádoucími účinky v porovnání s tradiční léčbou. Více než 60% všech klinických studií zaměřených na genovou terapii je zaměřeno na rakovinu a výzkumníci se zaměřili na mnoho různých druhů rakoviny pomocí genové terapie (Wirth a Ylä-Herttuala, 2014).

Bylo vyvinuto několik strategií genové terapie pro léčbu širokého spektra nádorů, včetně sebevražděné genové terapie, onkolytické viroterapie, antiangiogeneze a terapeutických genových vakcín. Dvě třetiny ze všech studií genové terapie jsou určeny pro rakovinu a mnoho z nich vstupuje do pokročilého stádia, včetně studie fáze III Ad.p53 pro rakovinu hlavy a krku a dvě různé studie genové vakcíny fáze III pro rakovinu prostaty a rakovinu pankreatu. Kromě toho se v akademických lékařských centrech a biotechnologických společnostech uskutečňuje řada klinických studií fáze I a fáze II pro rakoviny mozku, kůže, jater, tlustého střeva, prsu a ledvin, s využitím nových technologií a terapeutik vyvinutých na místě. Genová terapie je užitečná pro glioblastomy, protože buňky se nerozptýlí po celém těle, jako ostatní nádorové buňky, a tak léčba může být lokalizována.

Dalším přístupem k léčbě rakoviny je náhrada poškozeného genu p53, genu potlačujícího nádor. Normální gen pomáhá opravit poškození DNA v buňce, ale pokud je ve zmutované formě, gen nemůže vykonávat svou funkci a vzniká nádor. Vědci nyní zkoumají možnost použití adenovirů pro pacienty s rakovinou jater. Cílem je vytvořit správnou kopii genu p53 (Kumar et al., 2014).

#### **4.3.2 Klinická studie - Genová terapie při léčbě pacientů s metastázujícím melanomem. Fáze 1 (Identifikační číslo: NCT00005943)**

Vložení genu interleukin-2 do buněk melanomu způsobí, že tělo buduje imunitní reakci, která zabíjí nádorové buňky.

Účelem studie fáze I je ověřit účinnost genové terapie u pacientů s metastázujícím melanomem.



## **Cíl**

- I.** Stanovit maximální tolerovanou dávku kombinovaného stafylokokového enterotoxinu B a interleukinu-2 plazmidové DNA u pacientů s metastázujícím melanomem.
- II.** Určit expresi lokálního genu v nádorových tkáních u pacientů léčených v tomto režimu.
- III.** Vyhodnotit protinádorové imunitní reakce vyvolané tímto léčebným režimem.
- IV.** Charakterizovat klinickou odpověď na tento léčebný režim z hlediska velikosti nádoru a histologie.
- V.** Určit klinickou odpověď na tento léčebný režim z hlediska úplné remise, částečné remise a progresu onemocnění u těchto pacientů.

## **Průběh**

Studie zvýšené dávky. Pacienti dostávají intratumorálním podáním lipozomový komplexní stafylokokový enterotoxin B (SEB) a interleukin-2 (IL-2) plazmidové DNA injekce do nádorových uzlin jednou za 2 týdny. Léčba pokračuje po dobu 6 cyklů, pokud nedochází k progresi onemocnění nebo nepřijatelné toxicitě. Pacienti s částečnou odpovědí po 4 týdnech po poslední injekci mohou pokračovat v léčbě jednou za 4 týdny, dokud nezůstane žádný zbytkový nádor. Skupina 3 pacientů dostává zvýšené dávky SEB a IL-2 plazmidové DNA, dokud není určena maximální tolerovaná dávka (MTD). MTD je definována jako dávka, při které nejméně 2 z 6 pacientů vykazují toxicitu omezující dávku. Pacienti jsou sledováni až do jejich smrti. Do této studie bude nashromážděno celkem 18 pacientů (Walsh et al., 2000).

Datum zahájení: únor 2000

Datum ukončení: září 2001

Typ studie: intervenční

Fáze: 1

**Umístění: Spojené státy americké, Colorado**

Coloradská univerzita

Výsledky studie jsou neveřejné, nelze je zobrazit.

## 5 KLINICKÉ STUDIE PRO PROTEIN P53

Ze všech klinických studií zaměřené na genovou terapii mě nejvíce zaujal p53, který se podílí na prevenci rakoviny. Pro tento protein je zaznamenáno 430 klinických studií. Vybrala jsem si tři studie, které se zabývají tímto proteinem, a ty jsem podrobněji popsala v následující podkapitole.

Dále jsem v grafu znázornila četnost využití proteinu při léčbě různých onemocnění z celkového počtu 221 klinických studií. Dle mého vyhodnocení z daného počtu studií p53 byl nejvíce použit při léčbě rakoviny prsu.

### 5.1 Vakcína terapie s interleukin-2 u žen s opakující se nebo progresivní rakovinou prsu nebo vaječnicků ve IV. stádiu. Fáze 1 a 2. Zkušební záznam 33 (Identifikační číslo NCT00019916)

Vakcíny mohou způsobit, že tělo vytvoří imunitní reakci, která zabije nádorové buňky. Interleukin-2 může stimulovat bílé krvinky člověka k zabíjení nádorových buněk. Dosud není známo, zda je kombinace léčby vakcínou s interleukinem-2 účinná při léčbě rakoviny prsu nebo vaječnicků.

**Cíl:** Tato náhodná studie I / II zkoumá vedlejší účinky léčby vakcínou s interleukinem-2.

Stav a onemocnění	Základ / léčba	Fáze
Rakovina vaječnicků Rakovina prsu	Biologická: aldesleukin Biologická: peptidová vakcína p53	Fáze 1 a 2

Datum zahájení studie: červen 2000

Datum dokončení studie: červenec 2006

Typ studie: Intervenční

#### Podrobnější popis

Zjistit, zda je endogenní buněčná imunita vůči peptidové vakcíně p53 přítomna u pacientů ve IV. stadiu s opakujícím se nebo progresivním karcinomem prsu nebo vaječnicků a zda

očkování těmito peptidy s nízkými dávkami interleukinu-2 může u těchto pacientů vyvolat nebo zvýšit buněčnou imunitu.

Stanovit typ a vlastnost buněčné imunity u pacientů vyvolané tímto režimem. Určit toxicitu tohoto režimu.

### **Průběh**

Toto je náhodná pilotní studie. Pacienti jsou náhodně rozděleni do jedné ze dvou léčebných skupin. Všichni pacienti podstoupí aferézu autologních mononukleárních buněk z periferní krve. Šestý den jsou odebrány monocyty. Frakce monocytů se kultivuje se sargramostimem (GM-CSF) a interleukinem-2 po dobu 7 dnů a potom se pulzuje peptidovou vakcínou p53.

**Skupina I:** Pacienti dostávají subkutánně (SC) podávanou peptidovou vakcínu p53 v první den.

**Skupina II:** Pacienti dostávají první den po dobu 5 minut p53 peptidovou vakcínu.

Léčba obou skupin se opakuje každé 3 týdny, celkem se tedy jedná o aplikaci 4 dávek.

Během studie 3 až 4 pacienti dostávají třetí až sedmý den a desátý až čtrnáctý den navíc nižší dávku interleukinu-2 (IL-2) podávané SC. Pacienti se stabilním nebo reagujícím onemocněním mohou nadále dostávat vakcínu s IL-2 po dobu až 2 let.

Pacienti jsou sledováni po dobu 1 měsíce a poté každé 2-4 měsíce po dobu 2 let.

Do této studie bude do 2 let nashromážděno maximálně 34 pacientů.

**Umístění: Spojené státy americké, Maryland**

NIC-centrum pro rakovinu

**5.2 Vakcína proti rakovině vaječníků - fáze 2. Zkušební záznam 46 (Identifikační číslo: NCT00001827)**

Stav a onemocnění	Zárok / léčba	Fáze
Nádor vaječníků	Biologická: peptidová vakcína p53	Fáze 2
	Biologická: léčebné autologní dendritické buňky	
	Biologická: aldesleukin	
	Biologická: neúplná Freund's látka	
	Biologická: sargramostim	
	Postup: transplantace periférních kmenových buněk pomocí metody in vitro	

Tato studie zkoumá, zda peptidová vakcína p53 může zvýšit imunitní reakci na rakovinu vaječníků a jaké jsou její vedlejší účinky.

Mnoho pacientek s rakovinou vaječníků má pozměněný gen zvaný p53, který způsobuje tvorbu abnormálních proteinů, nacházející se v nádorových buňkách. Imunitní systém těla se může pokusit s těmito abnormálními proteiny však neúspěšně bojovat. V této studii budou pacientky s rakovinou vaječníků očkovány peptidem p53, který je součástí stejného abnormálního proteinu nalezeného v jejich nádoru, aby se pokusili zvýšit imunitní reakci na rakovinu.

Pacientky budou rozděleny do dvou skupin. Skupina A bude mít čtyři vakcíny peptidu p53 v intervalu tří týdnů, aplikované pod kůži. Injekce bude zahrnovat lék nazvaný ISA-51, který zvyšuje účinek vakcíny. Tato skupina bude také dostávat dva další léky, které posilují imunitní systém, IL-2 a GM-CSF.

Skupina B bude mít po třech týdnech čtyři vakcíny peptidem p53. Peptid bude smíchán s vlastními krevními buňkami pacientky a aplikován do žíly. Této skupině bude rovněž podáván IL-2, ale ne GM-CSF.

Všechny kandidátky pro studie budou předem testovány, aby se zjistilo, zda jejich karcinom má odchylku p53 a zda by jejich imunitní systém proti němu postavil obranu. Tyto testy mohou zahrnovat biopsii nádoru (odstranění malé části nádoru pro mikroskopické vyšetření), lymfatické vyšetření (odběr krve, odstranění bílých krvinek nazývaných lymfocyty a návrat červených krvinek) a test imunitní odpovědi. Během studie budou pacientky podrobeny dodatečným kožním a krevním testům (Takahashi et al., 1989).

Datum zahájení studie: 26. červenec 1999

Datum dokončení studie: 25. ledna 2013

Typ studie: Intervenční

Účastníků: 21

**Umístění: Spojené státy americké, Maryland**

Národní instituty zdravotního klinického centra

### 5.3 Vakcínová léčba u pacientů s rakovinou hlavy a krku. Zkušební záznam 88 (Identifikační číslo: NCT00404339)

**Stručné shrnutí:** Vakcíny vyrobené z dendritických buněk člověka smíchané s peptidy mohou pomoci tělu vybudovat účinnou imunitní reakci pro usmrcení nádorových buněk.

**Účel:** Táto studie fáze 1 studuje vedlejší účinky očkování při léčbě pacientů s rakovinou hlavy a krku.

Stav a onemocnění	Zárok / léčba	Fáze
Rakovina krku a hlavy	Biologická: mutantní peptidická vakcína p53 s dendritickými buňkami	Fáze 1
	Biologická: pomocný peptid tetanového toxoidu	
	Postup: terapie s pomocnými látkami	

Datum zahájení studie: září 2005

Datum dokončení studie: březen 2014

Typ studie: Intervenční

Účastníků: 17

#### Podrobný popis

#### CÍLE

##### Primární

Stanovení toxicity intranodálně vložených autologních dendritických buněk (DC), které jsou naplněny peptidy divokého typu p53 s nebo bez epitopu T-helper peptidů u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku.

##### Sekundární

Určení lokálních a systémových imunomodulačních účinků této vakcíny u pacientů.

**Obsah:** Toto je náhodná zkušební studie.

Pacienti podstoupí leukaferézu. Výsledné dendritické buňky (DC) jsou pulzní s peptidy divokého typu (wt) p53 nebo bez peptidů T-helper (Th). Pro každého pacienta se připravují jednotlivé autologní vakcíny. Pacienti, kteří jsou HLA-A2-DR4-negativní, jsou náhodně rozděleny do 1 z 2 léčebných skupin (skupina I nebo skupina II). Pacienti, kteří jsou HLA-A2-DR4-pozitivní, jsou zařazeni do skupiny III.

**Skupina I:** Pacienti dostávají pouze autologní DC naplněné pouze HLA-A2.1 s omezenými peptidy p53.

**Skupina II:** Pacienti dostávají autologní DC naplněné peptidy HLA-A2.1 s omezenými wt p53 peptidy a peptid Th tetanového toxoidu.

**Skupina III (pouze HLA-A2-DR4-pozitivní pacienti):** Pacienti dostávají autologní DC naplněné peptidy HLA-A2.1 s omezenými wt p53 peptidy a peptid Th wt p53.

Ve všech skupinách se každá vakcína podává ultrasonograficky řízenou tříselnou intranodální injekcí po dobu 30 minut ve dnech 0, 14 a 28.

Po ukončení studie jsou pacienti pravidelně sledováni. Pro tuto studii bude získáno celkem 50 pacientů.

**Umístění: Spojené státy americké, Pensylvánie**

UPMC rakovinová centra

## 5.4 Genová terapie při léčbě pacientů s rakovinou jater. Zkušební záznam 45 (Identifikační číslo: NCT00003147)

**Stručné shrnutí:** Zkušební fáze 1 pro studium účinnosti GT s genem p53 při léčbě pacientů s rakovinou jater, které nelze chirurgicky odstranit. Vložení genu p53 do nádoru pacienta může zlepšit schopnost těla bojovat proti rakovině jater.

Stav a onemocnění	Zárok / léčba	Fáze
Rakovina jater	Biologická: Ad5CMV-p53 gen	Fáze 1

### Podrobný popis

#### CÍLE

- I. Stanovit bezpečnost adenoviru p53 (adeno-p53) u pacientů s hepatocelulárním karcinomem.
- II. Zjištění potencionálních účinků intralezionálním podáním adeno-p53, podávané měsíčními perkutánními injekcemi.

Datum zahájení studie: únor 1998

Datum dokončení studie: červen 2003

Typ studie: Intervenční

Účastníků: 30

**Průběh** Jedná se o stupňování dávek, multicentrická studie.

Pacienti dostávají adenovirový konstrukt p53 perkutánní injekcí maximálně do dvou lézí (poškození) denně. Léčba se opakuje každých 28 dní po dobu až 6 cyklů. Vzhledem k tomu, že v první skupině u 6 léčených pacientů nedochází k toxicitě s omezujícím dávkováním (DLT), následné skupiny 6 léčených pacientů dostávají stupňující se dávky léku podle stejného schématu. Pokud se objeví u 2 z 6 pacientů toxicita při dané dávce, pak se stupňování dávky ukončí a tato dávka je prohlášena za maximální tolerovanou dávku. Léčba může pokračovat i bez progresu onemocnění a nepříjemných nežádoucích účinků.



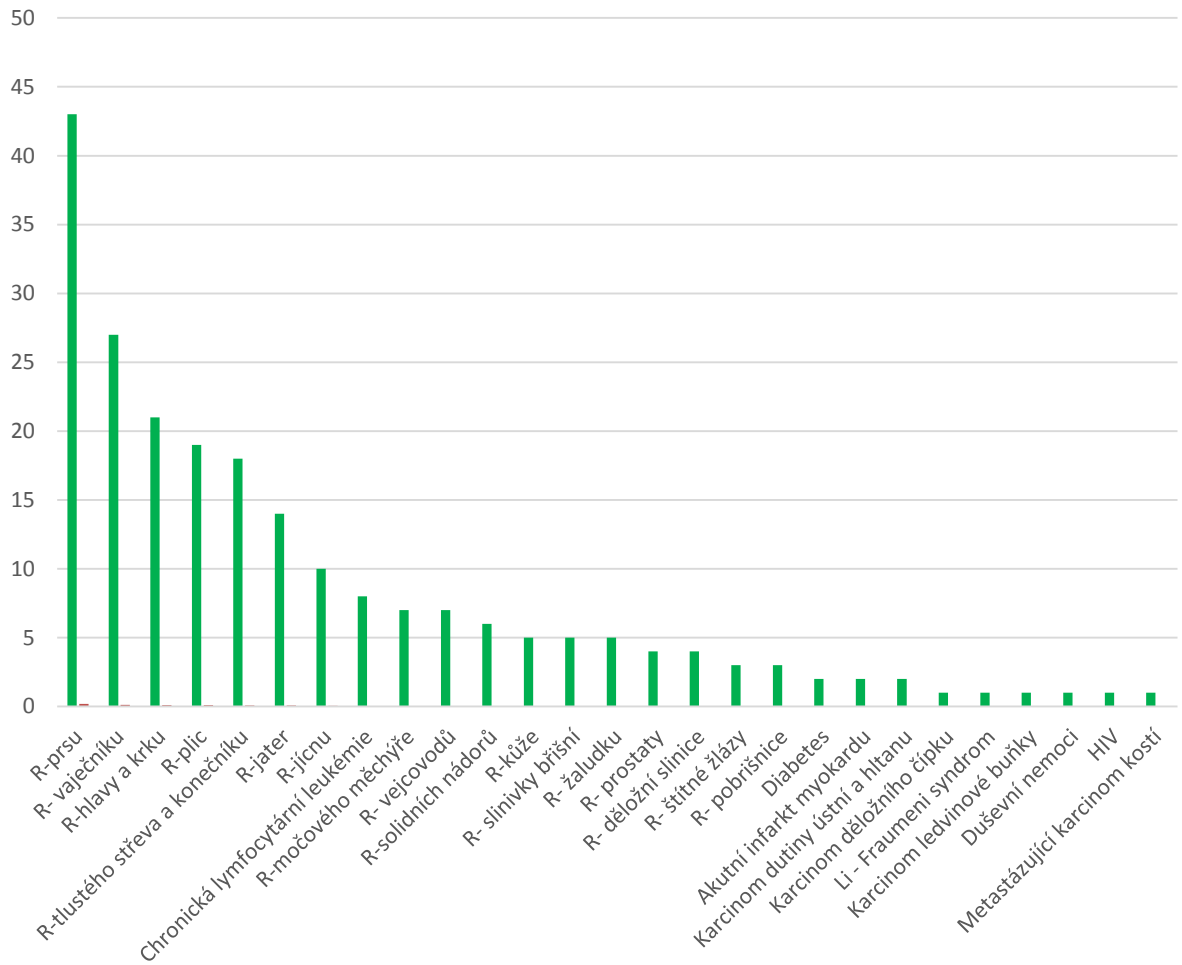
**Umístění: Spojené státy americké, New York**

Albert Einstein Komplexní onkologické centrum

**Spojené státy americké, Pensylvánie**

Univerzita v Pittsburghu institut pro výzkum rakoviny

### Graf četnosti využití p53 při léčbě různých onemocnění



**Obrázek 6** – Graf znázorňuje četnost využití p53 při léčbě různých onemocnění z celkového počtu 221 klinických studií. Z grafu vyplývá, že se p53 nejvíce využívá při léčbě rakoviny prsu; převzato z: vlastní zdroj.

## 6 ZÁVĚR

Dle provedené rešerše probíhá ve světě více než 400 různých klinických studií obsahujících genovou terapii. I přesto, že jsou informace o tom, jak studie budou naplánovány a jaký mají cíl k dispozici, je velmi obtížné se u většiny studií dopátrat skutečných výsledků. Pravděpodobnou příčinou nedostupnosti výsledků je jejich utajení, neboť pokud je léčba úspěšná, je pravděpodobné, že bude nutné výsledky patentovat, aby byla chráněna práva investora. I když je jistě prvotním impulzem záchrana lidských životů, nedílnou součástí naší společnosti je i zisk finančních prostředků z léčby. Který je často využíván pro vývoj nových léků.

Genová terapie je nový velmi se rozvíjející úsek léčiv. Podle získaných výsledků se jedná o slibné odvětví, které může zachraňovat životy a skutečně léčit příčiny tam, kde současná medicína dokáže podávat pouze pomocnou léčbu a zlepšovat život pacienta.

Je ovšem třeba mírnit nadšení většiny lidí, protože míra informací, které o genové terapii a jejich důsledcích v dlouhodobém horizontu máme, je velmi nízká. Proto každá provedená klinická studie přináší nové informace, které je třeba důsledně vyhodnocovat a dále zpracovávat, aby se tento obor medicíny mohl nadále rozvíjet a sloužit lidem.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**ALTON EW, STERN M, FARLEY R, et al.** Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*. 1999, **353**, 947-54.

**ALTON EFW, ARMSTRONG DK et al.** UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015, **9**, 684-691.

**ANANIEV JG, TCHERNEV JW, PATTERSON M, GULUBOVA AND GANCHEV G.** p53 – “the guardian of genome” - *Acta medica bulgarica*. 2011, **38**, 72-82.

**BALASUBRAMANIAM R, KUPERSTEIN AS, STOOPLER ET.** "Update on oral herpes virus infections". *Dental Clinics of North America*. 2014, **58**, 265–80.

**BANK A.** Human Somatic Cell Gene Therapy. 1996, **18**, 999-1007.

**BARRANGO R.** "The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond". *Current Opinion in Immunology*. 2015, **32**, 36–41.

**BAUM BJ. AND COTRIM AP.** Gene Therapy: Some History, Applications, Problems, and Prospects . *Toxicologic Pathology*. 2008, **36**, 97-103.

**BAUN C, DULLMAN J, Li Z, et al.** Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003, **101**, 2099-114.

**BROUNS SJ, JORE MM, LUNDGREN M, WESTRA ER, SLIJKHUIS RJ, SNIJDERS AP, DICKMAN MJ, MAKAROVA KS, KOONIN EV. AND VAN DER OOST J.** Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008, **321**, 960–964.

**BRYANT LM, CHRISTOPHER DM, GILES AR, HINDERER C, RODRIGUEZ JL, SMITH JB, TRAXLER EA, TYCKO J, WOJNO AP, WILSON JM.** Lessons learned from the clinical development and market authorization of glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013,**24**, 55-64.

**BURNEY TABINDA J AND DAVIES JANE C.** Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis . *Appl Clin Genet*. 2012, **5**, 29–36.

**CAVAZANNA-CALVO M, HACEIN-BEY S, YATES F, DE VILLARTAY JP, LE DEIST F, FISCHER A.** "Gene therapy of severe combined immunodeficiencies". *J Gene Med.* 2001, **3**, 201–206.

**CONNOLLY JB.** "Lentiviruses in gene therapy clinical research," *Gene Ther.* 2002, **9**, 1730-1734.

**DEEPTHI NAGA et al.** Role of Tumor Suppressor Protein p53 in Apoptosis and Cancer Therapy. *J Cancer Sci Ther* 2011, **1**, 1-6.

**DURAI S, MANI M, Kandavelou K, WU J, PORTEUS MH, CHANDRASEGARAN S.** Zinc finger nuclease: custom designed molecular scissors for genome engineering of plants and mammalian cells. *Nucleic Acid Res.* 2005, **33**, 5978-90.

**EDELSTEIN ML, ABEDI MR, WIXON J AND EDELSTEIN RM.** Gene therapy clinical trials worldwide . *J Gene Med.* 2004, **6**, 597-602.

**FISCHER ALAIN AND CAVAZZANA-CALVO MARINA.** Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest.* 2007, **117**, 1456–1465.

**FOUCHIER RAM, MEYER BE, SIMON JHM, FISCHER U. AND MALIM MH.** HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *Embo Journal.* 1997, **16**, 4531-4539.

**FRIEDMANN T, ROBLIN R.** "Gene therapy for human genetic disease?". *Science.* 1972, **175**, 949–55.

**GAJ THOMAS, GERSBACH CHARLES A. AND BARBAS III. CARLOS F.** ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology.* 2013, **31**, 397-40.

**GASPER HB, THRASER AJ.** Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther.* 2005, **9**,1175-82.

**GELSLEIHTER L et al.** p53 and mdm- 2 expression in malignant melanoma: an immunocytochemical study of expression of p53, mdm- 2, and markers of cell proliferation in primary versus metastatic tumors. – *Mod. Pathol.* 1995, **8**, 530-535.

- HAFT DANIEL H, et al.** A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*. 2005, **1**, 474-483.
- HELMA R.** Mechanizmy působení proteinů p53 v nádorové buňce. Bakalářská práce. 2012, **6**, 1-67.
- HSU PD, LANDER ES, ZHANG F.** Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014,**157**,1262–78.
- CHANG C, SIMMONS DT, MARTIN MA, MORA PT.** Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol*. 1979, **31**, 463-471.
- KABEL AM.** Tumor Protein p53: Novel Aspects of an Old Tumor Marker. *Journal of Cancer Research and Treatment*. 2015, **3**, 25-27.
- KATHERINE P. PONDER** Gene therapy for hemophilia *Current Opinion in Hematology* 2006, **13**,301–307.
- KLUG A, RHODES D.** "Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1987,**52**,473–82.
- KUMAR AMIT, SHARMA PEEYUSH, BHANDARI ANIL** “Gene Therapy: An Updated Review”. *European Journal of Biotechnology and Bioscience* 2014, **1**,42-53.
- LACHMANN ROBIN H.** Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol*. 2004, **85**, 177–190.
- LINDEN R.** Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be. *Estud Av*. 2010, **24**, 31–69.
- LIU Q.** et al. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, **94**, 5525–5530.
- MACKENZIE T., GIFFORD AH, SABADOSA K A, QUINTON, HB, KNAPP EA, GOSS CH AND MARSHALL BC.** Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. *Annals of Internal Medicine*. 2014, **161**, 233-241.

**MALIK V, RODINO-KLAPAC LR, VIOLLET L, WALL C, KING W, AL-DAHAK R, LEWIS S, SHILLING CJ, KOTA J, SERRANO-MUNUERA C, HAYES J, MAHAN JD, CAMPBELL KJ, BANWELL B, DASOUKI M, WATTS V, SIVAKUMAR K, BIEN-WILLNER R, FLANIGAN KM, SAHENK Z, BAROHN RJ, WALKER CM, MENDELL JR.** Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2010, **67**, 771-80.

**MARRAFFINI LA, SONTHEIMER EJ.** CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet.* 2010,**11**,181–190.

**MATHEWS QL,CURIEL DT,GRNE** Therapy: Human Gemline Genetics Modifications-Assessing the Scientific,Socioethical, and Religious Issues. *Southern Medical Journal.* 2007,**100**, 98-100.

**MEILIGAN R.** The basic science of gene therapy. *Science.* 1993, **260**, 926-32.

**MIAO CH, et al.** Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated viral vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J. Virol.* 2000, **74**, 3793–3803.

**MISRA S.** Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India.* 2013, **61**,127–133.

**MONAHAN PE. & SAMULSKI RJ.** AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther.* 2000, **7**, 24-30.

**MUZYCZKA N.** Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, **158**, 97–129.

**PATIL PM, CHAUDHARI PD, SAHUAD M. AND DURAGKAR NJ.** Review Article on Gene Therapy. *International Journal of Genetics.* 2012,**1**,74-79.

**PENG Z.** Current status of Gene therapy in China: recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Human Gene Therapy.* 2005, **16**, 1016-1027.

**RAMOS JULIAN PhD and JEFFREY S PhD.** Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy . *Expert Opin Orphan Drugs.* 2015, **3**, 1255–1266.

**REDMAN MELODY, KING ANDREW, WATSON CAROLINE, AND KING DAVID**

What is CRISPR/Cas9? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2016, **101**, 213–215.

**STOLBERG SG.** The biotech death of Jesse Gelsinger. N.Y. Times Mag. 1999, **140**, 149-150.

**SURGET S, KHOURY MP, BOURDON JC .** "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective". OncoTargets and Therapy. 2013, **7**, 57–68.

**SWADESH K. DAS, MITCHELL E. MENEZES, SHILPA BHATIA, XIANG-YANG WANG, LUNI EMDAD, DEVANAND SARKAR and FISHER PAUL B.** Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. J Cell Physiol. 2015, **230**, 259–271.

**TAKAHASHI H, MERLI S, PUTNEY SD, HOUGHTEN R, MOSS B, GERMAIN RN, BERZOFSKY JA.** A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. Science. 1989, **246**, 118-21.

**TAL J.** Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. J. Biomed. Sci. 2000, **7**, 279–291.

**TESAŘOVÁ E.** Viry a virové vektory používané pro genovou terapii. Bakalářská práce. 2017, **14**, 1-60.

**VANDENDRIESSCHE T, COLLEN D, CHUAH MKL.** Gene therapy for the hemophilias. J Thromb Haemost. 2003, **1**, 1550–8.

**VARGHESE S, ROBKKIN DS.** Oncolytic herpes simplex virus vector for cancer virotherapy. Cancer Gene Therapy. 2002, **9**, 967-78.

**WAGNER JA, et al.** Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. Laryngoscope 1999, **109**, 266–274.

**WALSH P, GONZALEZ R, DOW S, ELMSLIE R, POTTER T, GLODE LM, BARON AE, BALMER C, EASTERDAY K, ALLEN J, ROSSE P.** A phase I study using direct combination DNA injections for the immunotherapy of metastatic melanoma. University of Colorado Cancer Center Clinical Trial. Hum Gene Ther. 2000, **11**, 1355-68.

**WALTHER W, STEIN U.** Viral vector for gene transfer: a review of their use in the treatment of human disease. Drug. 2000, **60**, 249-271.



**WIRTH T AND YLÄ-HERTTUALA S.** Gene Therapy Used in Cancer Treatment, Biomedicines. 2014, **2**,149-162.

**WIRTH T, PARKER N. AND YLÄ-HERTTUALA S.** History of gene therapy. Gene. 2013, **525**, 162–169.

**ZHANG F, WEN Y, GUO X.** "CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges". Human Molecular Genetics.2014, **23**, 40–6.

## 8 ZDROJE OBRÁZKŮ

**MORGAN RA and BLAESE RM.,** 1999. *Gene therapy: lessons learnt from the past decade* [online]. [cit.2019-05-9]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1129086/>

**REDMAN MELODY, KING ANDREW, WATSON CAROLINE AND KING DAVID,** 2017. *What is CRISPR/Cas9* [online]. [cit.2019-05-9]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975809/>

Schéma biologické funkce p53. *P53 Tumor Suppresor Gene* [online]. [cit. 2019-05-9]. Dostupné z: <http://www.meduniwien.ac.at/surgery-research/p53/about.htm>

Struktura TP53. *Sciencenode* [online]. [cit. 2019-05-9]. Dostupné z: [https:// www.sciencenode.org/feature/stampede-is-down-with-p53-.php](https://www.sciencenode.org/feature/stampede-is-down-with-p53-.php)

Zinkový prst. *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2019-05-9]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/learning-center/what-is-zfn.html>