

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Terapeutická využití siRNA
Eliška Rutteová

Bakalářská práce

2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Rutteová**
Osobní číslo: **C16424**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Terapeutická využití siRNA**
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. Charakterizovat RNA a její jednotlivé typy.
2. Vysvětlit pojem RNA interference a popsat princip působení siRNA.
3. Popsat metody aplikace siRNA a seznámit s oblastmi, kde má siRNA léčebný potenciál.
4. Patisiran - schválené léčivo pro hereditární amyloidózu s defektem transthyretinu.
5. Probíhající klinické studie.
6. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

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

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2019

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., 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 21. 07. 2020

Eliška Rutteová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za trpělivost, ochotu, podporu a užitečné rady, které mi poskytovala, když jsem psala tuto práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za to, že mě vedli k rozvoji mého vzdělání a podporovali v průběhu studia.

ANOTACE

Práce se zaměřuje na aktuální výzkumný stav terapeutického využití siRNA. Nastiňuje obecné mechanismy RNA interference a její roli v eukaryotní buňce. Popisuje chemické modifikace a transportní systémy využívané při vývoji siRNA léčiv, včetně detailnějšího pohledu na historicky první schválené siRNA terapeutikum – Patisiran.

KLÍČOVÁ SLOVA

RNA interference, siRNA, Patisiran, ONPATPRO, hereditární transthyretinová amyloidóza, metody aplikace siRNA, siRNA léčiva

TITLE

Therapeutic applications of siRNA

ANNOTATION

This work covers the current situation in therapeutic siRNA research. It briefly explains the mechanisms of RNA interference and its role in eucaryotic cells. Describes chemical modifications and transport systems used in the developed of siRNA therapeutics, with emphasis on the historically first approved siRNA drug – Patisiran.

KEYWORDS

RNA interference, siRNA, Patisiran, ONPATPRO, hereditary transthyretin amyloidosis, siRNA delivery, siRNA medications

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM PŘÍLOH.....	11
SEZNAM ZKRATEK	12
TERMINOLOGIE.....	15
ÚVOD.....	16
1 RIBONUKLEOVÁ KYSELINA	17
1.1 Typy RNA uplatňující se přímo v proteosyntéze	20
1.1.1 Mediátorová RNA.....	21
1.1.2 Transferová RNA.....	21
1.1.3 Ribozomální RNA	22
1.2 Typy RNA uplatňující se při posttranskripčních modifikacích	23
1.2.1 Small nuclear RNA	23
1.2.2 Small nucleolar RNA.....	23
1.3 Typy RNA uplatňující se v regulaci genové exprese	24
1.3.1 Antisense RNA	25
1.3.2 Micro RNA a small interfering RNA	25
1.3.3 Piwi-interacting RNA	26
2 RNA INTERFERENCE	27
2.1 Historie výzkumu RNAi	27
2.2 Fyziologický význam RNAi	27
2.3 Micro RNA	28
2.4 Small interfering RNA.....	29
2.5 Mechanismus siRNA zprostředkované RNAi	29
2.5.1 Dicer.....	29
2.5.2 RNA-induced silencing complex	30
2.5.3 Argonaute 2.....	30
3 METODY APLIKACE siRNA	31

3.1	Překážky dosažení terapeutického účinku	31
3.2	Virové vektory	33
3.3	Nevirové transportní systémy	33
3.4	Chemické modifikace molekuly siRNA	34
4	TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL siRNA	36
4.1	V léčbě dědičných onemocnění	36
4.1.1	Huntingtonova choroba.....	36
4.1.2	Cystická fibróza	37
4.2	Léčba nádorových onemocnění	38
4.3	Léčba virových infekcí	39
4.3.1	HIV/AIDS	39
4.3.2	Hepatitida typu C	40
4.4	Další využití	40
5	ONPATRO (PATISIRAN)	42
5.1	Patisiran – popis léčiva	42
5.2	Systémové amyloidózy	42
5.3	Hereditární transthyretinová amyloidóza.....	43
5.3.1	Klinický obraz.....	43
5.4	Léčba Patisiranem.....	44
5.4.1	Princip účinku	44
5.4.2	Dávkování	45
5.4.3	Vedlejší účinky	45
5.4.4	Účinnost Patisiranu	46
5.4.4.1	Výsledky studie APOLLO III.....	46
5.4.5	Ostatní možnosti léčby.....	47
6	KLINICKÉ STUDIE	49
6.1	Léčiva v poslední fázi klinických studií	49
6.2	Vybraná léčiva v počátečních fázích klinických studií	51
6.3	Vybraná léčiva v preklinické fázi	52

ZÁVĚR	54
POUŽITÁ LITERATURA.....	55
ZDROJE OBRÁZKŮ	71
ZDROJE PŘÍLOH	73
PŘÍLOHY.....	74

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Snímek z elektronového mikroskopu – transkripce dvou genů pro ribozomální RNA.	17
Obr. 2: Funkce RNA polymerázy.	18
Obr. 3: Kroky transkripce.	18
Obr. 4: Zjednodušené zobrazení elementů sekundární struktury RNA.	19
Obr. 5: Příklady terciárních struktur RNA.	19
Obr. 6: Translace mRNA na ribozómu.	20
Obr. 7: Schematická struktura tRNA.	22
Obr. 8: Eukaryotní ribozomální RNA.	22
Obr. 9: Schéma vzniku funkční miRNA.	28
Obr. 10: Schematická struktura a funkce enzymu Dicer.	30
Obr. 11: Lidský Argonaute-2 protein.	30
Obr. 12: Překážky, které musí vesikuly překonat k úspěšnému transportu siRNA nebo shRNA do buňky.	32
Obr. 13: Chemická struktura fosfothioátované siRNA.	34
Obr. 14: Transport obalené a neobalené siRNA přes normální a CF mukus.	38
Obr. 15: Životaschopnost nádorových buněk po podání různých dávek siRNA cílené na polo- like kinázu-1 a množství PLK1 mRNA v buňkách v závislosti na dávce léčiva.	39

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Srovnání mechanismu působení miRNA a siRNA.....	74
Příloha 2: Patisiranová terapie k potlačení hATTR amyloidózy.....	75
Příloha 3: Korelace mezi snížením hladiny transthyretinu a změnou mNIS+7 od výchozí hodnoty po 18 měsících.	76
Příloha 4: Názvy vybraných siRNA léčiv v klinických studiích ve vztahu k jednotlivým částem těla.....	77

SEZNAM ZKRATEK

ADRB2	β 2 adrenergní receptory
AGO	označení pro rodinu proteinů Argonaute
Ago2	kataliticky aktivní protein Argonaute 2
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ALA	δ -aminolevulinic acid
ALAS1	δ -aminolevulinic acid synthase 1
aRNA	antisense RNA
ASO	antisense oligonukleotid
ATTR	transthyretin-mediated amyloidosis (amyloidóza zprostředkovaná transthyretinem)
ATTRwt	wild-type ATTR, divoký typ ATTR
BMI	Body Mass Index (index tělesné hmotnosti)
bp	páry bází
CF	cystická fibróza
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COMPASS-31	Composite Autonomic Symptom Score 31
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dsRNA	double-stranded RNA (dvouvláknová RNA)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Evropská agentura pro léčivé přípravky)

ENaC	epiteliální sodíkový kanál
FAC	familiární amyloidotická kardiomyopatie
FAP	familiární amyloidotická polyneuropatie
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GalNAc	N-acetylgalactosaminyl
GIT	gastrointestinální trakt
hATTR	hereditary transthyretin-mediated amyloidosis (hereditární transthyretinová amyloidóza)
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
IRES	internal ribosomal entry site (vnitřní vazebné místo pro ribozóm)
IRI	ischemia-reperfusion injury (ischemicko-reperfuzní poškození)
LNP	lipid nanoparticle (lipidová nanočástice)
miRNA	micro RNA
mNIS+7	modified Neuropathy Impairment Score (modifikované skóre neuropatického poškození)
mRNA	messenger RNA (mediátorová RNA)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
QOL-DN (Norfolk)	Norfolk Quality of Life – Diabetic Neuropathy (skóre kvality života – u diabetického neuropatického poškození)
PBG	porfobilinogen
PEG	polyethylenglykol
piRNA	Piwi interacting RNA

PIWI	P-element Induced WImpy (třída proteinů)
PLK-1	polo-like kinase 1
PTGS	post-transcriptional gene silencing (posttranskripční tlumení genů)
RBP	retinol binding protein (retinol vázající protein)
RISC	RNA-induced silencing complex
R-ODS	Rasch-built Overall Disability Scale (Raschova stupnice míry postižení)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RNAi	RNA interference
rRNA	ribozomální RNA
shRNA	small hairpin RNA (vláseňková RNA)
siRNA	small interfering RNA (malá interferující RNA)
SNALP	stable nucleic acid lipid particles (lipozomy z lipidů a nukleových kyselin pokryté PEG-lipidovým konjugátem)
snoRNA	small nucleolar RNA (malá jadéřková RNA), též guide RNA
snRNA	small nuclear RNA (malá jaderná RNA)
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
ssRNA	single-stranded RNA (jednovláknová RNA)
TRBP	trans-activation response RNA-binding protein
tRNA	transferová RNA
TTR	transthyretin

TERMINOLOGIE

Blokátor H₂ a blokátor H₁: blokátory histaminových receptorů, tzv. antihistaminika. Využívají se k prevenci a léčbě alergických reakcí a k snížení imunitní odpovědi (Vokurka & Hugo, 2015)

Chorea: symptom onemocnění charakterizovaný neobvyklými mimovolnými pohyby končetin a celého těla (Vokurka & Hugo, 2015)

Dicer: endoribonukleáza katalyzující štěpení RNA prekurzorů miRNA a siRNA (Wilson & Doudna, 2013)

Downregulace: potlačení exprese genu (Lodish et al., 2003, s. 577)

Duplex: dvouvlákno nukleové kyseliny spárované na základě komplementarity bází (Lodish et al., 2003, s. 104)

Komorbidity: výskyt více onemocnění současně (Vokurka & Hugo, 2015)

Komplementarita: specifické párování bází a jejich sekvencí u nukleových kyselin (Lodish et al., 2003, s. 103)

Konformace: druh izomerie, tedy prostorového uspořádání chemických sloučenin, nejčastěji organických molekul (Lodish et al., 2003, s. 21)

Kosuprese: jev, při kterém se cizorodá RNA páruje s mRNA již existující v buňce a potlačuje tak její expresi, vnesená RNA poté neexprimuje vlastní produkt (Napoli et al., 1990)

Loss-of-function mutace: mutace způsobující úplnou ztrátu funkce daného genu (Lodish et al., 2003, s. 353)

Prevalence: počet jedinců trpících sledovaným onemocněním v dané populaci, uváděný obvykle v procentech (vztah počtu nemocných k celkovému počtu jedinců v populaci) (Vokurka & Hugo, 2015)

Transpozon: DNA sekvence, která je schopna se pohybovat z jednoho místa na druhé v genomu. Transpozony se chovají se jako parazitické DNA, jejichž jedinou funkcí je replikace a propagace (Muñoz-López & García-Pérez, 2010)

ÚVOD

RNA interference je jeden z mnoha mechanismů regulace genové exprese. Díky schopnosti potlačit expresi genů, i jejich konkrétních alel sloužila od svého objevení často ve výzkumu k identifikaci funkce genů. V kombinaci s novými poznatky v oblastech molekulární biologie a patogeneze onemocnění má RNAi nepopiratelný potenciál v kauzální léčbě těchto onemocnění. Využití RNAi by tak mohlo vést k výrazným pokrokům v léčbě nádorových bujení, některých dědičných chorob, virových nemocí a dalších patologických stavů.

Hlavními předpokládanými výhodami léčiv založených na tomto principu jsou sekvenční specifita, která umožňuje „umlčení“ konkrétní alely nebo mutace genu, minimum vedlejších účinků, snadná syntéza RNA a využití mechanismu, který se přirozeně vyskytuje ve všech jaderných buňkách.

Systémová aplikace RNAi stále ještě naráží na problémy hlavně v efektivitě distribuce léčiva do cílových buněk. Dalšími překážkami úspěšné terapie jsou riziko působení na jiné, než cílové sekvence (angl. „off-target effects“), rychlá degradace RNA, toxicita, imunogenita a rizika spojená s metodami aplikace.

První léčivo založené na mechanismu RNAi bylo ve Spojených státech amerických schváleno FDA v roce 2018, jedná se o Patisiran (komerční název ONPATTRO) – lék pro terapii polyneuropatie způsobené hereditární amyloidózou s defektem transthyretinu.

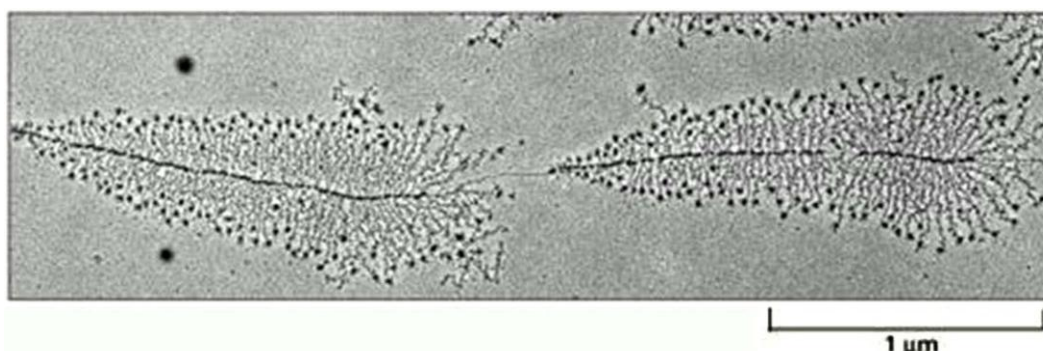
Tato práce představuje klíčové typy RNA, popisuje mechanismus RNAi především pro siRNA, podává přehled nejvýznamnějších oblastí uplatnění léků založených na principu RNAi a seznamuje s problematikou účinné a bezpečné aplikace tohoto typu léčiv. Dále se tato práce soustředí na léčivo Patisiran, klinické studie jiných siRNA léků a další konkrétní potenciální identifikované cíle terapie siRNA.

1 RIBONUKLEOVÁ KYSELINA

RNA (ribonukleová kyselina) se stejně jako DNA (deoxyribonukleová kyselina) skládá z nukleotidů. Každý nukleotid RNA obsahuje purinovou (adenin, guanin) nebo pyrimidinovou bázi (cytosin, uracil), monosacharid s pěti uhlíky ribózu a fosfátovou skupinu na pátém uhlíku. Ribóza se od deoxyribózy (monosacharid v DNA) liší přítomností hydroxylové skupiny na druhém uhlíku, což ji dělá reaktivnější a tedy méně stabilní. Nukleotidy jsou spojeny fosfodiesterovou vazbou mezi 5' uhlíkem na jednom cukerném zbytku a 3' uhlíkem předchozího cukerného zbytku (Soukupová & Soukup, 1998, s. 47; Lodish et al., 2003, s. 103).

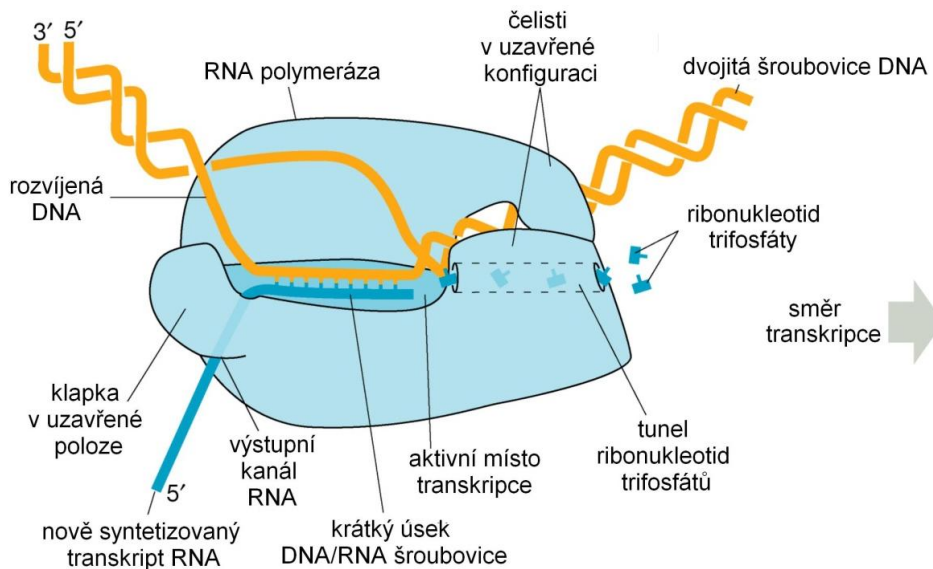
Většina RNA v buňkách vzniká transkripcí, tedy přepisem z DNA pomocí RNA polymeráz. Přepis probíhá vždy z jednoho vlákna DNA, které se označuje jako pracovní. Nové nukleotidy se připojují na 3' konec vznikajícího vlákna, protože pouze tam je volná hydroxylová skupina pro vytvoření nové fosfodiesterové vazby (Soukupová & Soukup, 1998, s. 48).

Transkripce je prováděna enzymem RNA polymerázou. Ta nejprve rozplétá dvoušroubovici DNA v místě specifické sekvence označující začátek genu (iniciace). Poté připojuje jednotlivé báze RNA (elongace) až dokud nenarazí na terminální sekvenci (terminace). Poté se polymeráza od vlákna odpojí. Transkribovány jsou nejen geny kódující proteiny, ale také geny pro RNA s katalytickou nebo signalizační funkcí. Transkripce probíhá v buňkách všech živých organismů (Alberts et al., 2002). Transkripci jsou věnovány **Obr. 1**, **Obr. 2** a **Obr. 3**.

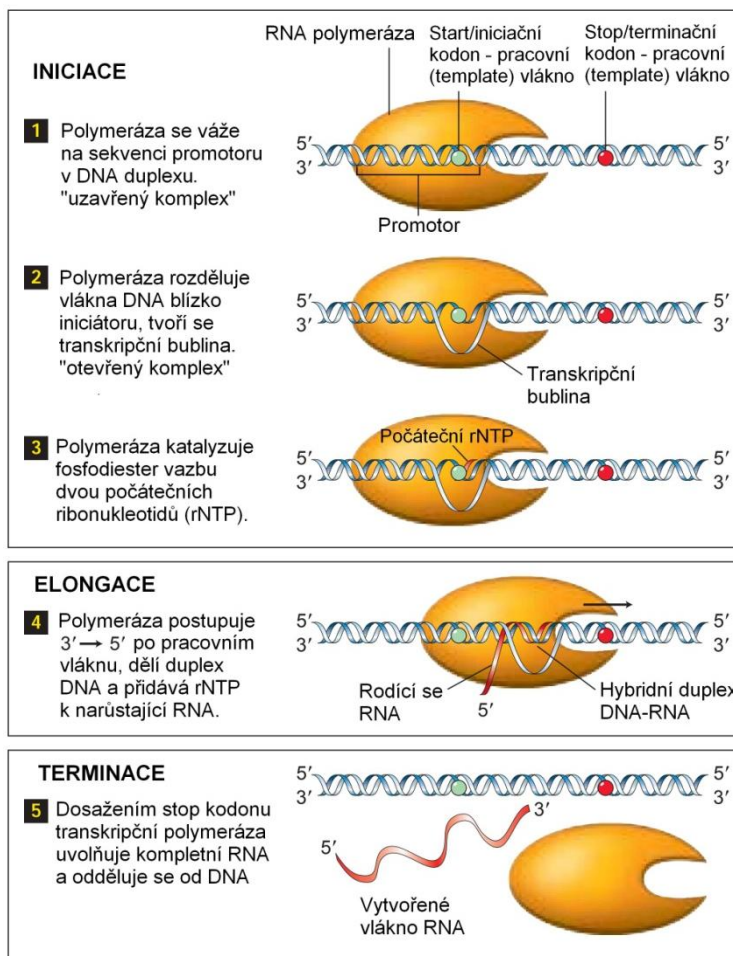


Obr. 1: Snímek z elektronového mikroskopu – transkripce dvou genů pro ribozomální RNA. Množství polymeráz (černé tečky podél vlákna DNA) simultánně transkribují gen na DNA do vláken RNA. Tato RNA bude tvořit součást ribozómů a nebude translatována do proteinů. Černé tečky na volných koncích vláken jsou formující se ribozomální podjednotky. Podle délky vláken lze odvodit, že transkripce na obrázku probíhá zleva doprava. Zdroj: (Alberts et al., 2002).

Transkripce je na úrovni přístupnosti DNA pro polymerázu komplexně regulována proteiny, které její přístup blokují nebo naopak usnadňují, což ovlivňuje také rychlost transkripce (Alberts et al., 2002).

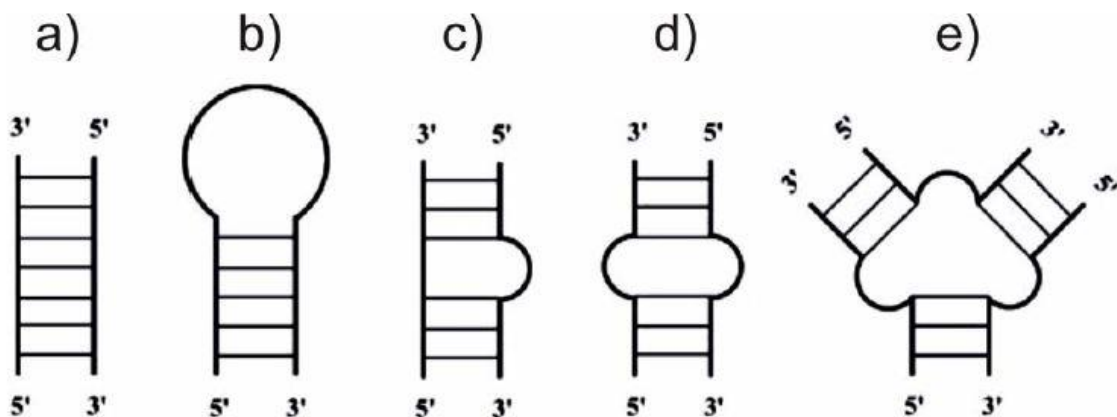


Obr. 2: Funkce RNA polymerázy. Zdroj: (Alberts et al., 2002)



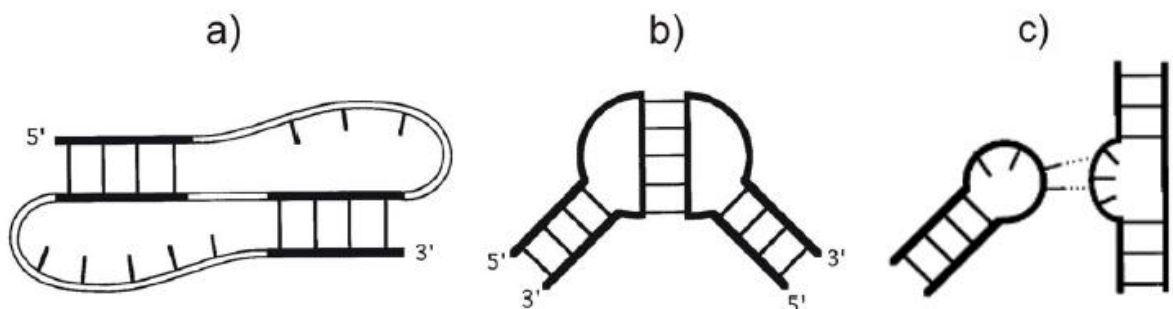
Obr. 3: Kroky transkripce. rNTP – ribonukleotidy. Zdroj: (Lodish et al., 2003, s. 110)

RNA se vyskytuje nejčastěji v jednovláknové podobě, ale její úseky se mnohdy váží vodíkovými můstky na základě komplementarity bází do dvoušroubovice (A forma stejně jako u DNA). Tak vzniká sekundární struktura RNA. Sekundární struktury, které lze u RNA pozorovat jsou vlásenky (angl. „hairpins“), u kterých jsou komplementární sekvence od sebe navzájem vzdáleny 5-10 nukleotidů, delší smyčky se stonkem (angl. „stem-loops“), výdutě neboli boule (angl. „bulge“), smyčky vnitřní (angl. „interior loop“) a rozvětvené (angl. „multi-branched loop“) (Lodish et al., 2003, s. 107; Pastuchová, 2007). Přehled těchto struktur obsahuje **Obr. 4**.



Obr. 4: Zjednodušené zobrazení elementů sekundární struktury RNA: a) dvoušroubovice, b) vlásenka nebo delší smyčka, c) výdut' neboli boule, d) vnitřní smyčka, e) rozvětvená smyčka. Zdroj: (Pastuchová, 2007; (Ding & Lawrence, 2003).

Motivy terciární struktury zahrnují interakce mezi sekundárními strukturními motivy. Patří mezi ně například „triple-strands“, pseudouzly (angl. „pseudoknots“) a „kissing hairpins“, existuje jich ale mnoho. Příklady jsou na **Obr. 5**. Jejich funkce spočívá ve sbližování vzdálených domén větších RNA a umístění všech funkčních sekcí RNA do správných pozic a úhlů (Nowakowski & Tinoco, 1997).



Obr. 5: Příklady terciárních struktur RNA: a) pseudouzlel, b) „kissing hairpins“, c) interakce vlásenky a výdutě. Zdroj: (Nowakowski & Tinoco, 1997)

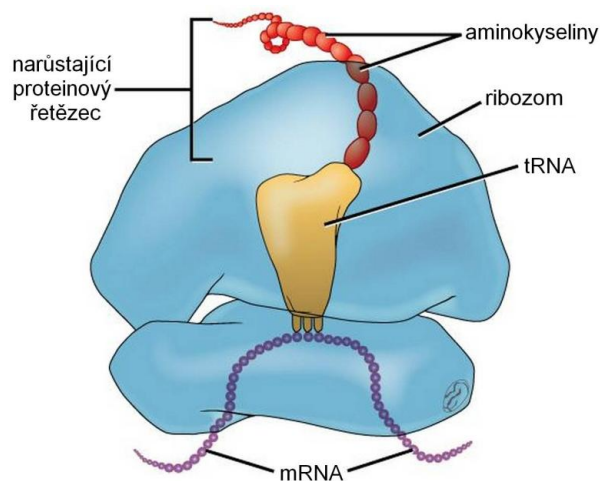
Konformace RNA může mít vliv i na posttranskripční úpravy. Konkrétní prostorové uspořádání molekul, které jim umožňuje plnit jejich rozmanité funkce, bude dále popsáno u jednotlivých typů RNA.

1.1 Typy RNA uplatňující se přímo v proteosyntéze

Jeden ze základních procesů, kterého se molekuly RNA účastní, představuje translace, což je proces výroby peptidů a bílkovin. Funkci zprostředkovatele informace o budoucím produktu vykonává mRNA. Funkci přenašečů aminokyselin na místo, kde mohou být do nového produktu kovalentně navázány, plní molekuly se souhrnným označením tRNA. Několik druhů tzv. rRNA se také podílí na stavbě ribozómů, ve kterých translace probíhá (Soukupová & Soukup, 1998, s. 52). Ribozóm a translace jsou znázorněny na **Obr. 6**.

RNA interference je založena na snížení množství dostupné mRNA v buňce a tím snížení nebo zastavení translace.

Translace v eukaryotických buňkách probíhá na ribozómech, což jsou komplexy proteinů a RNA. Ribozóm na základě signálních sekvencí v mRNA na ni nasedne a podle tripletů kódujících jednotlivé aminokyseliny tyto aminokyseliny přebírá od tRNA a spojuje je do proteinového řetězce. Vznikající protein se postupně skládá do funkční konformace, k čemuž mu pomáhá množství dalších proteinů (chaperony). Chaperony brání vzniku chybné konformace a špatně zfoldované proteiny pomáhají odbourat. Jde o širokou skupinu molekul s nejrůznějšími funkcemi v procesu kontroly a udržování funkce proteinů. Například u Huntingtonovy choroby však dochází k takové produkci mutantních a chybně poskládaných proteinů, že je ochranné systémy nedokáží odbourat (Ciechanover & Kwon, 2017).



Obr. 6: Translace mRNA na ribozómu. Zdroj: (Fowler et al., 2013)

1.1.1 Mediátorová RNA

Hlavní funkcí mRNA (mediátorová RNA, angl. „messenger RNA“) je kódování sekvence pro syntézu proteinů (translaci). Po transkripci je mRNA pomocí speciálních proteinů transportována přes jadernou membránu do cytoplazmy, kde na ni nasedne některý z ribozómů a zahájí translaci. Množství dané mRNA v cytoplazmě je zásadní pro možnost a rychlost translace daného proteinu. Rychlost vzniku, modifikace a degradace mRNA funguje jako přesný regulační mechanismus množství proteinu v buňce. Na regulaci se podílejí také malé RNA molekuly jako je siRNA. Jde o přirozený obranný mechanismus buňky, který lze využít také v moderní medicíně.

Na 5' konci je primární transkript mRNA bezprostředně po své transkripci opatřen tzv. čepičkou, tu tvoří zvláštní nukleotid 7–methylguanointrifosfát. Čepička brání degradaci vznikající mRNA endonukleázami. Na 3' konci se připojuje polyadenylová sekvence (přibližně 200 adeninových zbytků), která se podílí na transportu mRNA z jádra do cytoplazmy (Lodish et al., 2003, s. 493).

Pokud existuje více variant sestřihu jednoho řetězce mRNA (tzv. alternativní splicing), může to mít vliv na strukturu budoucích proteinů. Tento mechanismus zajišťuje, že z jednoho genu může u eukaryot vzniknout více různých proteinů a zvyšuje se tedy bohatost eukaryotické proteinové výbavy (Soukupová & Soukup, 1998, s. 53).

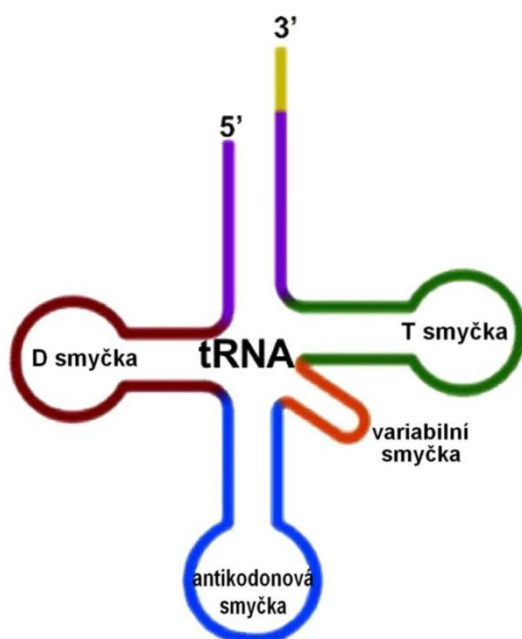
1.1.2 Transferová RNA

Transferová RNA neboli tRNA slouží především k přenosu aminokyselin na správné místo v řetězci nově vznikajícího proteinu na ribozómu. tRNA tedy spolupracuje s ribozómem a na něm navázanou mRNA na procesu translace.

Na jednom konci tRNA je tří-nukleotidová sekvence nazývaná antikodon. Během biosyntézy proteinu (translace) tvoří antikodon tři komplementární páry bází s kodonem v mRNA. Na druhém konci tRNA je kovalentní připojení k aminokyselině, která odpovídá antikodonové sekvenci. Kovalentní připojení ke 3' konci tRNA je katalyzováno enzymy zvanými aminoacyl-tRNA syntetázy (Lodish et al., 2003, s.121).

Primární struktura tRNA je daná sekvencí nukleotidů, sekundární struktura interakcemi mezi jednotlivými částmi molekuly tRNA. Za terciární strukturu se považuje celkové trojrozměrné uspořádání molekuly tRNA.

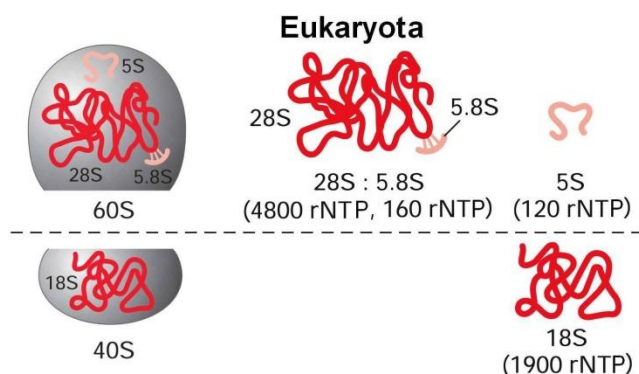
Na sekundární struktuře tRNA se vedle klasického párování bází podílí i newatsonovsky-crickovské párování bází, tedy tzv. kolísavé párování bází. Při ploché projekci molekuly má sekundární struktura tRNA typický vzhled trojlístku s několika charakteristickými oblastmi – tzv. rameny (či smyčkami), viz **Obr. 7**. Terciární struktura všech tRNA má přibližný tvar písmene "L" nutný ke správné prostorové interakci s ribozómem (Karlson, 1981, s. 148).



Obr. 7: Schematická struktura tRNA. Zdroj: (Li et al., 2018)

1.1.3 Ribozomální RNA

Tradičně se rRNA (ribozomální RNA), podjednotky ribozómů, na jejichž stavbě se rRNA podílejí, i samotné ribozómy označují Svedbergovými jednotkami (S), které vyjadřují rychlost sedimentace částic v roztoku při centrifugaci za standardních podmínek.



Obr. 8: Eukaryotní ribozomální RNA. S – Svedberg, rNTP – ribonukleotidy.

Zdroj: (Lodish et al., 2003, s. 124)

Jeden eukaryotní ribozóm odpovídá 80S a skládá se z velké podjednotky 60S a malé podjednotky 40S. Velkou podjednotku tvoří 50 různých proteinů a 3 molekuly rRNA, konkrétně 28S, 5,8S a 5S. Malou podjednotku tvoří 33 proteinů a jedna 18S molekula rRNA.

Stavba ribozómu a konformace rRNA je znázorněna na **Obr. 8**.

Prostorová struktura rRNA vykazuje mezi různými živočišnými druhy jen velmi malé rozdíly. Obsahuje četné smyčky a vazebná místa pro proteiny (Lodish et al., 2003, s. 125).

1.2 Typy RNA uplatňující se při posttranskripčních modifikacích

Transkripcí genů RNA polymerázou vzniká tzv. „surová“ pre-RNA. Nejčastěji je dále modifikována mRNA. Ta prochází třemi základními typy modifikací: přidáním guaninové čepičky na 5'konec, polyadenylová sekvence (cca 200 adeninových zbytků) na 3'konec a sestřihem (splicing). Sestřihem se odstraňují z mRNA introny, které neslouží ke kódování proteinů. Některé mRNA mohou být sestřihány více způsoby (tedy určitý úsek může být jednou vystřižen jako intron, jiný ponechán spolu s exony), čímž z jednoho genu mohou vznikat různé proteiny. To přidává buňce další možnost přesné regulace výskytu jednotlivých proteinů (Lodish et al., 2003, s. 114).

1.2.1 Small nuclear RNA

snRNA neboli malé jaderné RNA (angl. „small nuclear RNA“) obsahují velké množství uridinu a podílejí se na sestřihu mRNA v jádře. Patří mezi nekódující RNA, které nejsou přepisovány do žádných proteinů, nýbrž samy mají katalytickou funkci. Někdy se mezi ně zařazují i snoRNA, ale vzhledem k jejich odlišné funkci jim bude věnována samostatná podkapitola. snRNA je schopná rozeznávat sekvence intronů a spolu s 6 – 10 proteiny vytváří snRNP (small nuclear ribonucleoprotein), které se podílí na jejich vystřihování. Celý komplex k vystřihování intronů se nazývá spliceosom a je tvořen snRNP a množstvím dalších proteinů (Lodish et al., 2003, s. 499).

1.2.2 Small nucleolar RNA

snoRNA neboli malá jadéřková RNA (angl. „small nucleolar RNA“) slouží k chemickým modifikacím ribozomální RNA (rRNA), transferové RNA (tRNA) a výše popsané snRNA. Lze se setkat také s názvem guide RNA.

Dělí se na dva hlavní typy, přičemž typ C/D box zprostředkuje metylaci ribózových zbytků (v lidské RNA je využíváno asi 115 různých methylačních modifikací) a typ H/ACA box pseudouridylaci RNA. Pseudouridylace je izomerace uridinu na pseudouridin, přičemž dochází k rotaci uridinové báze kolem jeho glykosidové vazby na ribózu o 180°. Tato modifikace umožňuje této bázi jednu vodíkovou vazbu navíc, takže je schopna vytvářet celkem 3 vodíkové můstky. Dva využívá k párování s adeninem, tím třetím se pseudouridin může přichytit na vzdálenější báze, čímž vytváří komplexní terciární strukturu RNA, která je nutná k její funkci. Ve zralé RNA člověka se nachází cca 95 různých pseudouridinových modifikací (Maden & Hughes, 1997).

1.3 Typy RNA uplatňující se v regulaci genové exprese

Regulace genové exprese je základem buněčné homeostázy. Obsahuje enormní množství mechanismů vzájemně propojených zpětnovazebnými smyčkami, díky nimž buňka funguje jako supersložitý mechanismus. Regulace probíhá na úrovni DNA (např. methylace histonů a zneprístupnění pro RNA polymerázu) – na škále od úplného zneprístupnění celých chromozómů až po proteiny naopak podporující navázání RNA polymeráz v konkrétním místě. Celý systém se navíc neustále dynamicky mění a transkripční faktory zajišťují jeho řízení.

Dalším mechanismem je sestřih mRNA a posttranskripční modifikace v jádře, jak bylo popsáno výše, rychlost transportu z jádra, chemická stabilita jednotlivých mRNA, exprese proteinů zvyšujících stabilitu nebo naopak degradujících konkrétní mRNA.

Vzniklé proteiny jsou aktivovány/inaktivovány jinými proteiny, mají vlastní chemický poločas rozpadu, mohou být degradovány nebo sekretovány mimo buňku. Vzájemné poměry různých molekul v jádře a cytoplazmě tedy také ovlivňují, jak bude který gen na buňku působit (Lodish et al., 2003, s. 664).

U genetických poruch nebo virových onemocnění lze cílit na různé stupně regulace exprese. Nejčastěji se využívají protilátky nebo inhibitory již vzniklých proteinů. Moderní metoda RNA interference cílí na inaktivaci nebo degradaci mRNA a některé formy genetické léčby se zaměřují na úpravy samotného genomu – ty však zatím mají příliš mnoho rizik a nejsou v klinické praxi často využívány.

O RNA interferenci bude pojednávat druhá kapitola této práce.

1.3.1 Antisense RNA

Antisense RNA neboli aRNA je široce rozšířená u prokaryot. V cytoplazmě eukaryotních buněk se dsRNA vyskytuje hlavně ve specifických situacích jako je virová infekce. Stimuluje interferonovou odpověď. V jádře je však její výskyt běžnější – využívají ji pravděpodobně všechny eukaryotické organismy (Kumar & Carmichael, 1998).

Hlavním působením aRNA je komplementární vazba na mRNA a blokáce navázání translačních proteinů na 5'konec molekuly. Podle toho je lze rozdělit na ty, které tvoří krátké méně specifické duplexy s mRNA a na ty s delšími a přesnými duplexy. aRNA s krátkými duplexy mají komplementární úsek menší než 10 párů bází (bp) a jejich celková délka je kolem 100 bp. Jsou kódovány v jiném lokusu DNA než komplementární RNA, na kterou se vážou.

aRNA s delšími duplexy jsou kódovány v opačném směru komplementárního genu a přesahují jej. Přírodně se vyskytující aRNA byla detekována pro geny Surf-2 a Surf-4 u myši. aRNA obsahovala oproti protein kódující mRNA na 3' konci ještě 133 bp navíc z nepřekládané oblasti.

Například mRNA proteinu p53 důležitého pro regulaci buněčného cyklu je posttranskripčně regulována v jádře pomocí 1,3 kb dlouhého vlákna jaderné RNA schopné vázat se na její 5'konec v antisense směru (Khochbin & Lawrence, 1989). Existují i studie delších aRNA molekul schopných vázat se na p53 mRNA a snižovat translaci tohoto proteinu. Tento protein hraje významnou roli v patogenezi rakoviny a jeden z mechanismů jeho regulace je právě aRNA (Dony et al., 1985).

1.3.2 Micro RNA a small interfering RNA

Protože hrají klíčovou roli v mechanismu RNAi, budou miRNA a siRNA podrobně popsány až v další kapitole. Jedná se o malé nekódující RNA, které se vážou na mRNA v cytoplazmě a inhibují její translaci (RNA interference). Společným znakem je, že vznikají štěpením delších úseků dsRNA enzymem Dicer. V cytoplazmě se vážou na ASO proteiny a spolu s nimi se komplementárně vážou na cílovou mRNA. miRNA pouze blokuje translaci, zatímco siRNA má v rámci RISC komplexu schopnost cílovou mRNA rozštípnout. siRNA se v cytoplazmě přirozeně vyskytuje zejména v reakci na virovou infekci, zatímco miRNA má především regulační funkci.

Při vývoji léčiv se využívá exogenně dodaná siRNA, a to ve formě samotných chemicky modifikovaných molekul, obalena virovou kapsulou, malými liposomy nebo nanočásticemi. Může být podávána také jako shRNA, která se začleňuje do genomu a terapeutická siRNA je na základě získaného genu vytvářena dlouhodobě samotnou buňkou.

1.3.3 Piwi-interacting RNA

piRNA (piwi-interacting RNA) je třída malých nekódujících RNA o délce 26–31 nukleotidů. piRNA je nejvariabilnější skupinou malých RNA. Různé piRNA se navzájem liší v délce, sekundární struktuře a nejsou evolučně tak konzervované, jako některé jiné typy RNA.

Její vznik, na rozdíl od předchozích dvou, není závislý na enzymu Dicer. Váže se na specifický typ AGO proteinů zvaný PIWI, s nimiž také tvoří komplex RISC. piRNA komplexy se podílí na posttranskripčním umlčování transpozonů (většina piRNA má antisense sekvenci k transpozonům) a repetitivních sekvencí a také na epigenetické regulaci vývoje pohlavních buněk (Seto et al., 2007).

2 RNA INTERFERENCE

2.1 Historie výzkumu RNAi

V roce 1990 bylo poprvé pozorováno posttranskripční tlumení genů (PTGS). Cílem pokusu bylo zvýšit expresi chalkonové syntázy (CHS) v rostlinách petúnie zavedením CHS transgenů. Chalkonová syntáza umožňuje tvorbu flavonoidů, které pak rostliny využívají např. při produkci pigmentů. Výsledkem pokusu byla nečekaně ztráta zbarvení květů. Tento fenomén byl také označován pojmem kosuprese (Napoli et al., 1990).

V roce 1992 bylo PTGS prokázáno u hub pod pojmem „quelling“ (Romano & Macino, 1992).

V roce 1995 bylo zavedení jednovláknové RNA použito při zkoumání exprese genu PAR-1 v hlístici *Caenorhabditis elegans* (hád'átko, modelový organismus) (Guo & Kemphues, 1995).

Vlastní RNA interference byla objevena v roce 1998 právě u uvedeného organismu *Caenorhabditis elegans*. Po injekci dsRNA a ssRNA komplementární se sekvencí UNC-22 mRNA v *C. elegans* bylo prokázáno, že dsRNA způsobuje účinné potlačení genů ve srovnání s ssRNA. Za tento objev obdrželi v roce 2006 Andrew Z. Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za fyziologii (Fire et al., 1998).

V roce 2001 bylo provedeno úspěšné umlčení genu v savčích buňkách zavedením syntetické 21 nukleotidů dlouhé siRNA (Elbashir et al., 2001). Od té doby se začalo uvažovat o možných terapeutických aplikacích siRNA (Nikam & Gore, 2018).

V roce 2010 proběhla u pacientů s melanomem první klinická studie, ve které došlo k podání siRNA prostřednictvím systémové injekce v nanočásticích přizpůsobených cíli (nádorové bujení). Tato studie tak položila základ pro efektivní klinické využití siRNA (Davis et al., 2010).

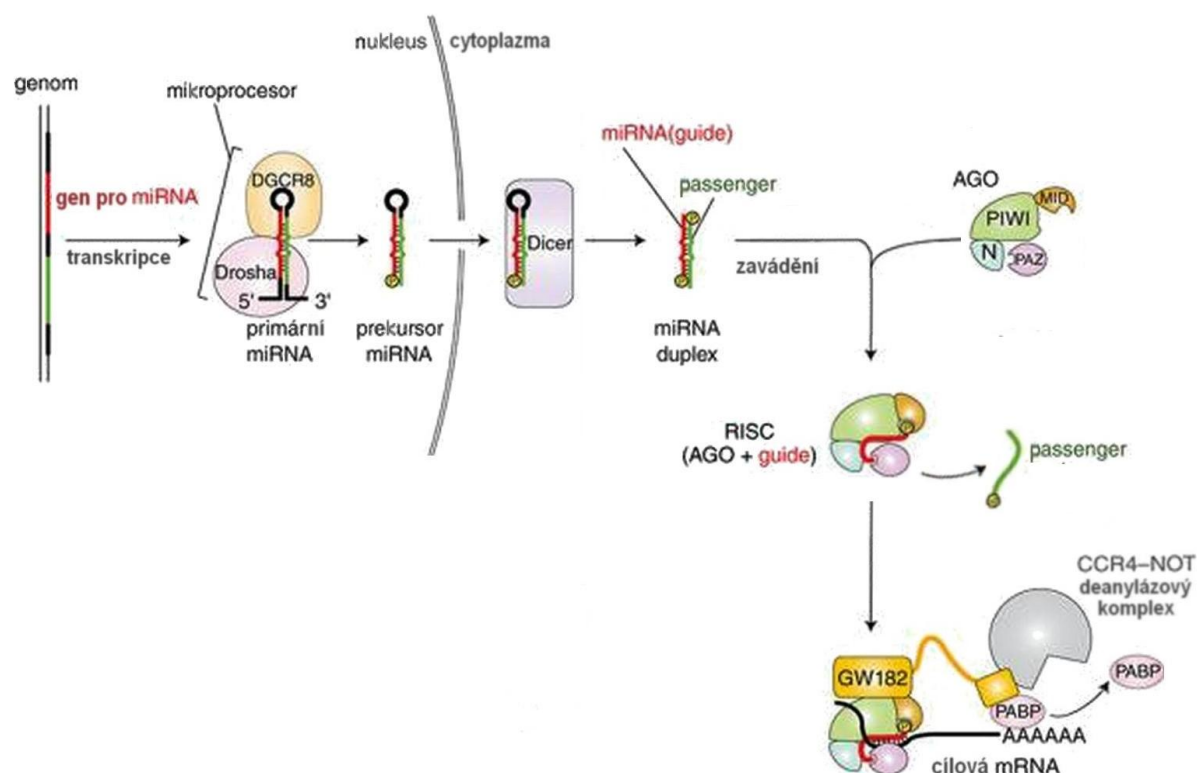
2.2 Fyziologický význam RNAi

RNA interference je evolučně starý, dobře konzervovaný mechanismus regulace genové exprese (především miRNA), vývoje a rozmnožování (piRNA) a imunity (siRNA). Je založen na komplementaritě řetězců malých RNA s částmi řetězců mRNA. Tím, že se malé RNA

navážou na mRNA, stericky blokují translaci do proteinů, nebo jejich komplexy rovnou zajišťují rozštěpení cílové molekuly

Až 5 % lidského genomu kóduje miRNA, které dále ovlivňují expresi minimálně 30 % genů. Tím vzniká další úroveň komplexity organizace buněčných procesů. Čím komplexnější organismus, tím více miRNA se v jeho genomu nachází. Dá se říct, že za specifika své existence člověk vděčí zejména malým RNA (Wilson & Doudna, 2013).

2.3 Micro RNA



Obr. 9: Schéma vzniku funkční miRNA. Zdroj: (Nakanishi, 2016)

MiRNA obsahuje kolem 22 nukleotidů. Lidský genom jich kóduje cca 2000, což naznačuje, že regulují expresi velké části genů člověka. Jsou transkribovány RNA-polymerázou II, čímž vzniká primární miRNA (pri-miRNA). Ta obsahuje jednu nebo více vlásenkových struktur. Tyto vlásenky jsou v jádře rozpoznávány komplexem Microprocessor, který se skládá z RNázy III zvané Drosha a z dvouvláknovou RNA vázajícího proteinu DGCR8. Microprocessor odstraní vlásenky, čímž vytvoří pre-miRNA. Její hlavní část obsahuje 25 nukleotidů a koncová smyčka průměrně 10. Pre-miRNA je dále transportována z jádra do cytoplazmy za spotřeby GTP (guanosin trifosfát) pomocí Exportinu-5 a proteinu

Ran-GTPázy. Nakonec je pomocí enzymu Dicer a TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) odstraněna koncová smyčka. Vzniklý duplex je dále navázán na AGO proteiny za vzniku RISC komplexu. Jedno z vláken je během skládání komplexu vystrčeno ven (tzv. passenger vlákno) a druhé zůstává uvnitř AGO proteinu jako tzv. guide vlákno. Guide vlákno pak slouží jako komplementární při rozeznávání cílových sekvencí. Viz **Obr. 9**.

MiRNA se v cytoplazmě váže na mRNA cílových proteinů a umlčuje translaci, avšak nemá sama o sobě schopnost je štěpit (Kobayashi & Tomari, 2016).

2.4 Small interfering RNA

SiRNA je obvykle dlouhá 21-23 nukleotidů a patří do rodiny malých RNA (small RNA) spolu s miRNA (microRNA) a piRNA (PIWI- interacting RNA). V přirozené formě slouží zejména k ochraně eukaryotní buňky před viry a transpozony. Je součástí tzv. vrozené imunity. Účastní se štěpení komplementární mRNA (Sidahmed et al., 2014; Lam et al., 2015).

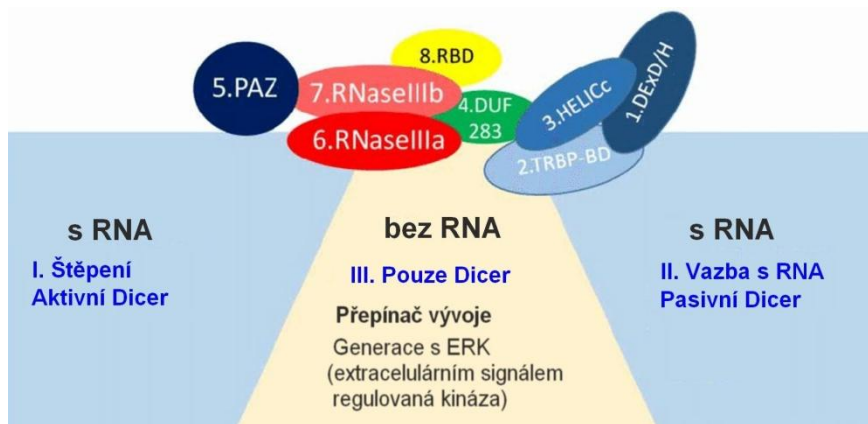
2.5 Mechanismus siRNA zprostředkované RNAi

SiRNA může vznikat z dlouhého dvouvláknového RNA transkriptu genu buňce vlastního, transkriptu genu infikujícího patogenu nebo z uměle do buňky dodané dsRNA. Tato dsRNA je naštěpena s pomocí RNázy III zvané Dicer na jednotlivé molekuly (dvouvlákna neboli duplexy) siRNA, která se poté stává součástí komplexu RISC (Lam et al., 2015). Za pomoci ATP se komplex aktivuje a může plnit svoji funkci – navázat se na komplementární DNA a rozštěpit ji na dva nefunkční řetězce k degradaci (Kobayashi & Tomari, 2016). Mechanismus RNA interference včetně srovnání rolí miRNA a siRNA znázorňuje **Příloha 1**.

2.5.1 Dicer

Dicer je enzym typu RNáza III, který zajišťuje sestřih delších vláken na jednotlivé molekuly miRNA a siRNA. U *Drosophila melanogaster* byl popsán analog lidského enzymu Dicer, který se nazývá Dcr-2.

Dicer se skládá z 8 podjednotek (z nichž 2 tvoří pseudo dimer RNáz III) a 3 hlavních částí (head, body a base) a zajišťuje sestřih malých RNA, vazbu na RNA, a bez RNA má také regulační funkci ve vývoji, viz **Obr. 10** (Song & Rossi, 2017).



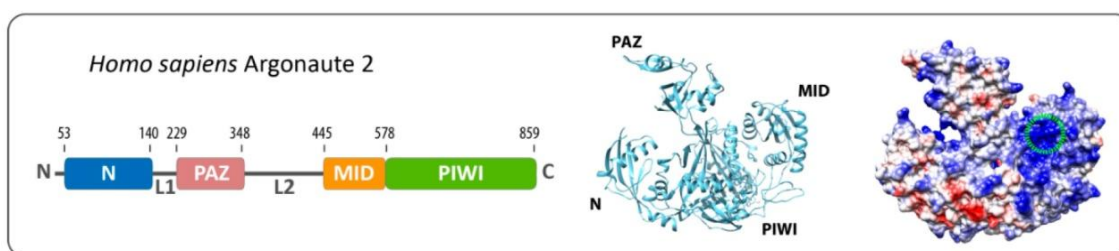
Obr. 10: Schematická struktura a funkce enzymu Dicer. Zdroj: (Song & Rossi, 2017).

2.5.2 RNA-induced silencing complex

RISC (RNA-induced silencing complex) je komplex malých RNA a AGO (Argonaute) proteinů. Skládání komplexu probíhá ve více krocích za působení Hsc70/Hsp90 chaperonů. Nejprve musí dojít k navázání dvouvlákna, posléze k jeho rozdělení na dva řetězce. Jak přesně tento proces probíhá, zatím není plně objasněno. Spojením malých RNA s AGO proteiny vzniká jádro RISC komplexu. K jeho efektivnímu fungování v regulaci genové exprese je však potřeba dalších proteinů zodpovědných za navazování na cílovou mRNA a iniciaci její degradace (Nakanishi, 2016).

2.5.3 Argonaute 2

Jedná se o jeden ze 4 AGO proteinů, které se vážou na miRNA nebo siRNA, a vytvářejí tak komplex RISC. Funguje jako obal pro RNA, který udržuje její vlákna rozpojená. Jedno z nich je vysunuté ven a druhé je uvnitř ve vazebné kapse, kde dochází ke komplementárnímu párování s mRNA. Všechny 4 lidské AGO proteiny vážou miRNA i siRNA, u *Drosophila melanogaster* je tomu jinak (Willkomm et al., 2015). Struktura Ago2 viz **Obr. 11**.



Obr. 11: Lidský Argonaute-2 protein. Vlevo doménová skladba, vpravo a uprostřed dva typy strukturálních modelů proteinu. Vpravo červeně vyznačené oblasti s negativním nábojem, pozitivně nabitě struktury modře. Světle zelené kolečko znázorňuje vazebnou „kapsu“ pro guide vlákno RNA. Zdroj: (Willkomm et al., 2015)

3 METODY APLIKACE siRNA

Molekuly siRNA lze do cílové tkáně dopravit přímo – lokální aplikace. Lze ji využít např. u pevných tumorů nebo u modifikace lokální zánětlivé reakce. Méně zatěžuje systémovou imunitu a dochází k menším ztrátám.

V některých případech však lokální podání nemá smysl – např. u lymfomů nebo HIV. V takovém případě je siRNA podávána intravenózně nebo subkutánně. K zefektivnění jejího působení jsou pak používány různé metody. Na myších bylo testováno podání pod vysokým tlakem, kdy spolu s siRNA byla do krevního oběhu myši vpravena tekutina v množství cca 10 % jejich tělesné hmotnosti. Ačkoli transport siRNA do buněk byl úspěšný, myši trpěly závažnými účinky zvýšeného tlaku, jako jsou poruchy dýchání, otok plic, poruchy srdečního rytmu a v některých případech smrt. Tato technologie tedy nemá žádné klinické využití u člověka.

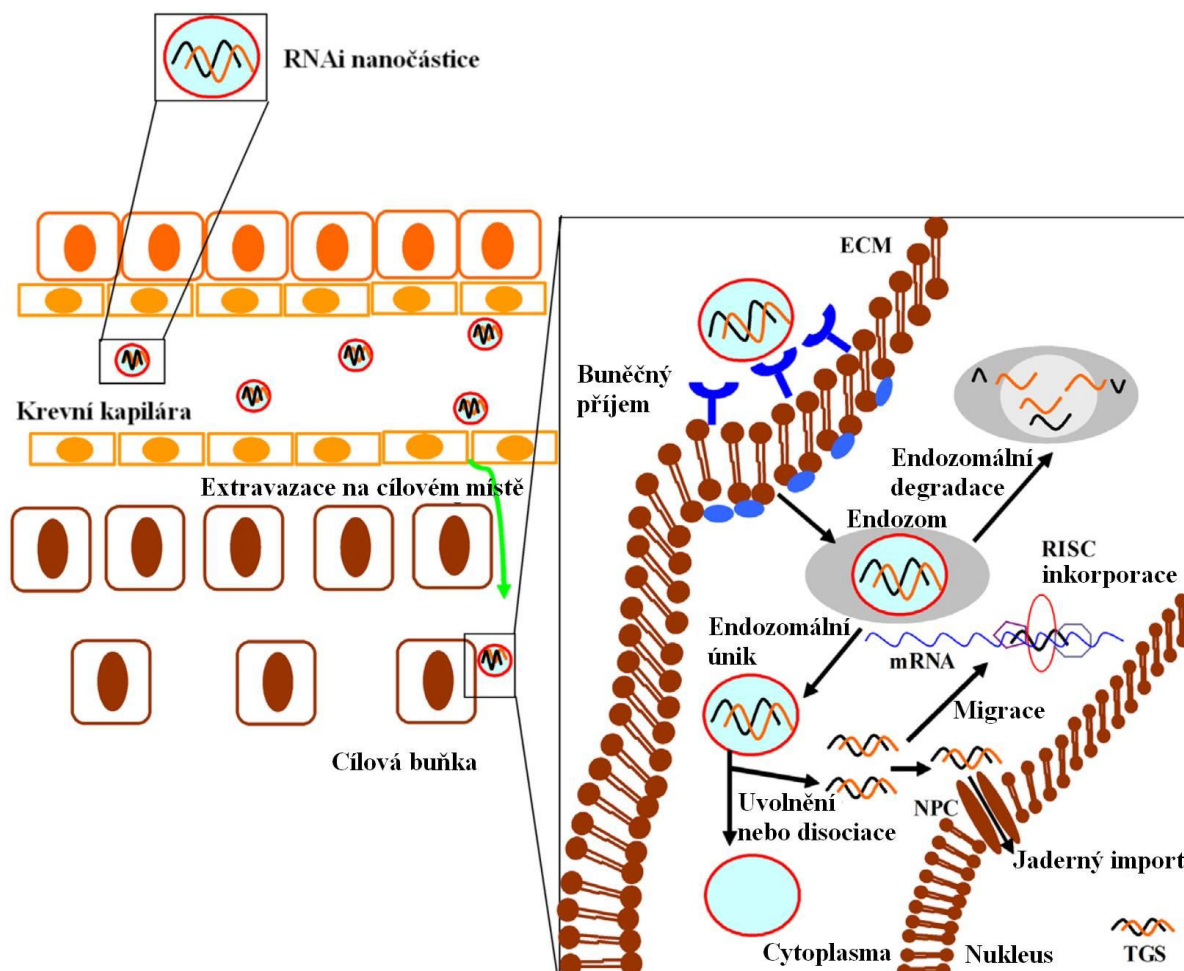
Slibnější možností je ultrazvuková metoda. Jsou vytvořeny bublinky ve vodě nerozpustného plynu, které jsou obaleny lipidovou vrstvou a na ně jsou navázány molekuly siRNA. Aplikují se do krevního oběhu a poté je využit vysokofrekvenční ultrazvuk v cílových (nádorových) tkáních. Ultrazvuk způsobí lokální praskání bublin a současné narušení membrány buněk, čímž se siRNA může dostat dovnitř. Jde tedy o kombinaci systémového a lokálního přístupu. Tento postup byl zkoumán u modelu rakoviny prostaty (Bae et al., 2016) nebo na zvířecím modelu adenokarcinomu prsu, kde došlo k úspěšnému transferu přednostně do nádorových buněk a zpomalení postupu nemoci (Xie et al., 2016). I další studie potvrzují efektivitu této metody – přednostní hromadění siRNA v cílových buňkách, umlčení cílového genu a zpomalení růstu nádorů (Xie et al., 2015).

3.1 Překážky dosažení terapeutického účinku

Jak bylo již nastíněno výše, efektivnímu využití RNA interference brání množství překážek. Především je to chemická nestabilita molekul, rychlé odbourání RNázami v krevním oběhu a vyloučení v játrech a ledvinách. Kvůli tomu se často musejí podávat extrémně vysoké dávky, které zase mohou vyvolat intenzivní reakci imunitního systému (interferonová odpověď).

Další bariérou je přestup siRNA z mezibuněčného prostoru do cílových buněk. Jedná se o záporně nabitě molekuly, které samy jen těžko procházejí přes lipidickou dvouvrstvu buněčné membrány. Proto se využívá obalení molekul do lipidových nebo nanočásticových partikulí, případně jejich chemická modifikace. Cesta léčiva na místo účinku je znázorněna na **Obr. 13**.

I v případě úspěšného transferu do cílových buněk může dojít k nežádoucím efektům. Například málo specifická vazebná sekvence může způsobit umlčování jiných genů, nebo může dojít k zahlcení přirozených regulačních mechanismů závislých na RNAi saturací zúčastněných enzymů. U léčby nádorů to není tak významné, ale může zde, stejně jako u virových onemocnění, dojít k vzniku rezistentních mutací. Proto je u nádorů vhodné cílit RNA interferenci na více genů současně.



Obr. 13: Překážky, které musí vesikuly překonat k úspěšnému transportu siRNA nebo shRNA do buňky. Zdroj: (Gao & Huang, 2013).

3.2 Virové vektory

Virové systémy se používají k distribuci shRNA do buněk a jejich zabudování do genomu (retroviry). Produkt takto inkorporovaného genu je pak enzymem Dicer sestříhán na jednotlivé siRNA molekuly. Ty vznikají přímo v buňce, ve velkém množství a dlouhodobě. Tento způsob je efektivnější než transport již hotové siRNA, ale má také hodně rizik. Např. může dojít k inkorporaci do některých důležitých genů v buňce, jejichž narušení může vést k vzniku rakoviny. Viry také výrazně aktivují imunitní systém a mohou způsobit život ohrožující alergickou reakci (Deng et al., 2014). K transportu shRNA se nejčastěji využívají adenoviry (AV), lentiviry (LV) a retroviry (RV). SiRNA transportovaná lentiviry dokázala proniknout do buněk myokardu a snížit hypertrofii srdečního svalu umlčením genu pro myotrophin (Gupta et al., 2009).

Adenoviry a s adenoviry asociované vektory (AAV) patří k nejbezpečnějším z hlediska vedlejších účinků. Bakuloviry a lentiviry jsou schopny přenášet do buněk velké množství polynukleotidů. Využívají se v transportu již hotové siRNA (Gao & Huang, 2013).

3.3 Nevirové transportní systémy

Vzhledem k rizikům využívání virových systémů jsou vyvíjeny také systémy neviróvé. Ty nemohou způsobit infekci a nejsou tolik imunogenní. Nejvíce studované jsou kationové lipidické systémy a systémy založené na polymerech – liposomy a nanočástice. Kationy slouží jednak k navázání záporně nabitě RNA, jednak k průniku přes záporně nabitou membránu. Nevirové systémy jsou méně efektivní než virové.

Záleží také na velikosti částic. Menší než 6 nm jsou rychle odstraňovány renální filtrací, zatímco příliš velké (150-300 nm) jsou fagocytovány v játrech. Maximální velikost je limitována průměrem mikrokapilár a možností extravazace v cílové tkáni (viz **Obr. 13**). Neexistuje žádná standardizovaná metoda k měření těchto částic, nejmodernější z používaných 4 využívá detekci Brownova pohybu a následný výpočet velikosti s pomocí Stoke-Einsteinovy rovnice (Gao & Huang, 2013).

Po dosažení cílové oblasti a extravazaci z krevního řečiště se mikročástice nacházejí v mezibuněčném prostoru. Kladný náboj jim umožní přiblížit se k membráně a často obsahují chemické modifikace usnadňující fagocytózu. Po průniku do buňky se musejí uvolnit

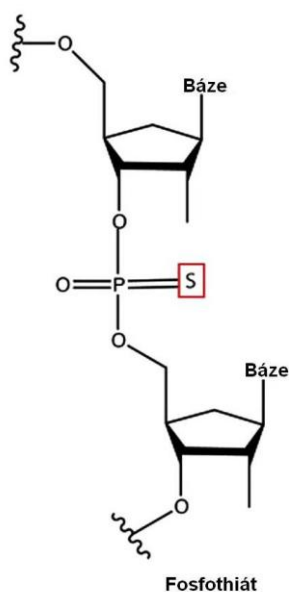
z endozomu a uniknout tak degradaci. Musí také dojít k uvolnění interferující RNA z transportních částic, u shRNA také k jejímu průniku do jádra.

3.4 Chemické modifikace molekuly siRNA

Chemické modifikace samotné siRNA zvyšují její stabilitu v séru nebo v cytoplazmě, chrání ji proti působení endonukleáz, snižují riziko imunitní reakce a nežádoucí účinky a podporují endocytózu, aniž by při tom ovlivňovali schopnost interference. Modifikovat lze sacharidové zbytky, kostru molekuly nebo samotné nukleotidy.

Sacharidové zbytky jsou modifikovány připojením fluoru, O-methylové skupiny, halogenů, aminoskupiny nebo deoxy-skupiny na druhý uhlík cyklů. Také lze propojit 2. a 4. uhlík cyklu pomocí O-CH₂- můstku, což vede ke stabilizaci molekuly v séru. 2-O-methylová skupina navíc působí imunosupresivně, neboť kompetitivně inhibuje toll-like receptor 7 (TLR7). O-methylace antisense vlákna navíc omezuje off-target efekty. Nelze O-methylovat všechny cykly některého z vláken, protože by to znemožnilo interferenci. Pokud ale modifikujeme pouze 2-4 uhlíky na každém vlákně, funkce zůstává zachována.

Modifikace uhlíkaté kostry také přispívá k stabilizaci molekuly v séru. Např. připojení fosfothioátu (P=S) posílí internukleotidové fosfátové můstky a vede ke stabilizaci. Navíc tato skupina zvyšuje příjem molekul buňkami a nenarušuje interferenční funkci siRNA (viz **Obr. 14**). Podle některých studií je však fosfothioátová skupina cytotoxická. Alternativou je boranofosfát (P=B), který také chrání molekulu před nukleázami a nepůsobí cytotoxicky.



Obr. 14: Chemická struktura fosfothioátované siRNA. Zdroj: (Gavrilov & Saltzman, 2012)

K modifikaci nukleotidových bází se navazuje 5-jodourin, N-3-Me-uridin nebo 2,6-diaminopurin na passenger vlákno nebo na koncové sekvence. Modifikace koncových sekvencí pomocí cholesterolu, folátu, peptidů nebo aptamerů zvyšuje příjem těchto molekul buňkami a nemá negativní vliv na schopnost interference.

K výzkumným účelům lze využít také modifikace pomocí fluorescentních molekul. Lze tak sledovat příjem siRNA do buněk (Deng et al., 2014).

4 TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL siRNA

RNA interference se nabízí jako kauzální léčba mnoha genetických onemocnění. Lze s její pomocí umlčet expresi mutantní alely v klíčových buňkách (např. v mozku nebo v oku) a zabránit poškození tkáně produktem genu. Pokud se podaří překonat v předchozí kapitole probrané problémy s aplikací, může jít o metodu lokálně působící, bezpečnou a s minimem vedlejších účinků, ve srovnání s konvenčními terapiemi zaměřenými na zlepšení odbourávání mutantního proteinu, nebo na zmírnění dysregulace homeostázy tímto proteinem způsobené.

Interference může umlčovat expresi nejen dědičně získaných škodlivých genů, ale také genů specifických pro nádorové nebo virem infikované buňky. Tím působí specificky na tyto původce patologie a nikoli na buňky zdravé (ve srovnání, např. s chemoterapeutiky nebo radiologickou léčbou).

4.1 V léčbě dědičných onemocnění

V této oblasti bylo provedeno zatím nejvíce výzkumů, a blíže se jí bude věnovat další kapitola v souvislosti s léčivem Patisiran. Kromě onemocnění hereditární amyloidóza s defektem transthyretinu, probíhá výzkum a klinické studie také u neurodegenerativního onemocnění Huntingtonova choroba nebo u cystické fibrózy.

4.1.1 Huntingtonova choroba

Jedná se o recesivní genetické onemocnění projevující se abnormálními motorickými projevy (chorea) a postupnou ztrátou kognitivních funkcí. Pacienti postupně přestávají ovládat tělo, ztrácejí inteligenci a paměť a dochází také k emočním změnám vedoucím v některých případech až k příznakům psychózy (Snowden, 2017). Nemoc se projevuje obvykle kolem 40. roku věku, ale s ohledem na počet dědičně získaných CAG repetitív může nastat i v dětském věku (čím více zděděných repetitív, tím rychleji nemoc postupuje).

Příčinou je nadměrný počet repetitív CAG v genu pro huntingtin. Produkt mutantního genu je pro buňky neodbouratelný a hromadí se s postupem času v mozkové tkáni, což způsobí její degeneraci.

Onemocnění je dobrým kandidátem pro genovou léčbu z více důvodů: jde o známou jednogenovou mutaci a k řešení jeho příčiny by stačilo zabránit expresi mutantní alely.

Zdravá alela heterozygotů dokáže dostatečně naplnit funkce huntingtinu. Problémem je tedy exprese a hromadění mutantního produktu. Byly provedeny studie s využitím siRNA, shRNA a antisense oligonukleotidů (ASO) (Wild & Tabrizi, 2017).

siRNA má velké množství nežádoucích vlastností, zejména velmi krátké přetrvání v organismu, proto zatím není používána v klinické praxi. Efektivnějším řešením se jeví shRNA (Agrawal & Kandimalla, 2004).

Pokusy na normálních (WT) a transgenních (YAC128, model obsahující kompletní lidský *Htt* gen se 128 CAG repeticemi) myších ukázaly, že dlouhodobé podávání 2'-O-methyl phosphorothioátované siRNA (Obr) injekčně do striata způsobilo pouze mírnou aktivaci mikroglíí, a je tedy z imunologického hlediska bezpečné (Johnson et al., 2015). Autoři však zmiňují, že efektivní léčba u člověka by trvala desítky let, nikoli 28 dnů jako v experimentu. Dlouhodobější účinky z hlediska neurotoxicity a imunitní reakce, která je u HD zvýšená sama o sobě, musí být předmětem dalších studií.

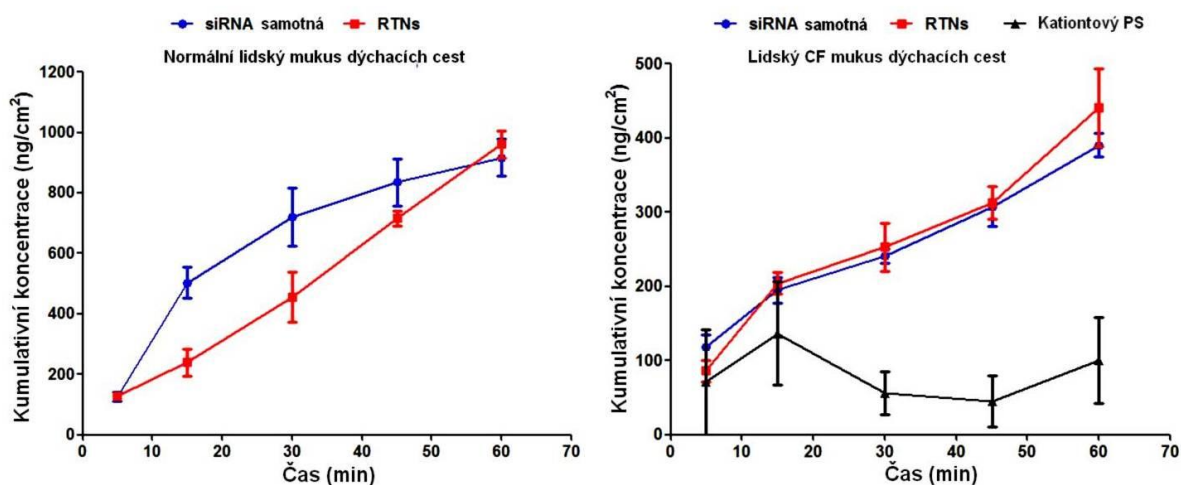
4.1.2 Cystická fibróza

Cystická fibróza je genetické onemocnění způsobené recesivní loss-of-function mutací genu pro chloridový kanál (CFTR, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Postihuje cca 1 z 2 500 narozených dětí a způsobuje život ohrožující multiorgánové poškození. Chloridové kanály se vyskytují v různých typech epiteliálních buněk a zásadně ovlivňují sekreci hlenu, potu a dalších látek. Snižují sekreci vody, takže sekret se stává příliš hustým a špatně se vylučuje, což vede k infekcím a zánětům. Nejvýrazněji se nemoc projevuje v oblasti dýchacího a trávicího traktu. Konvenční léčba se zaměřuje pouze na příznaky – inhalace k ředění hlenu, podávání antibiotik k potlačení infekcí, úprava výživy, fyzioterapie (Rafeeq & Murad, 2017).

Nefunkční CFTR způsobuje zadržování chloridu v buňkách, což sekundárně způsobuje nadměrnou absorpci sodných iontů a vody. SiRNA může být využita k snížení exprese epiteliálních sodíkových kanálů (epithelial sodium channel – EnaC).

Nanočástice nesoucí siRNA byly použity s větší efektivitou průniku přes lidský CF mukus (viz **Obr. 15**) a přes buněčné membrány, než samotná siRNA. Tyto nanočástice snížily expresi ENaC o 30 % a toto snížení přetrvalo minimálně 7 dnů. Podání tří dávek siRNA nanočástic způsobilo snížení o 50 % (Tagalakis et al., 2018).

Použití interference je efektivnější a má delší působení než použití chemických léčiv blokujičích již exprimované sodíkové kanály.



Obr. 15: Transport obalené a neobalené siRNA přes normální a CF mukus. Upraveno dle (Tagalakis et al., 2018).

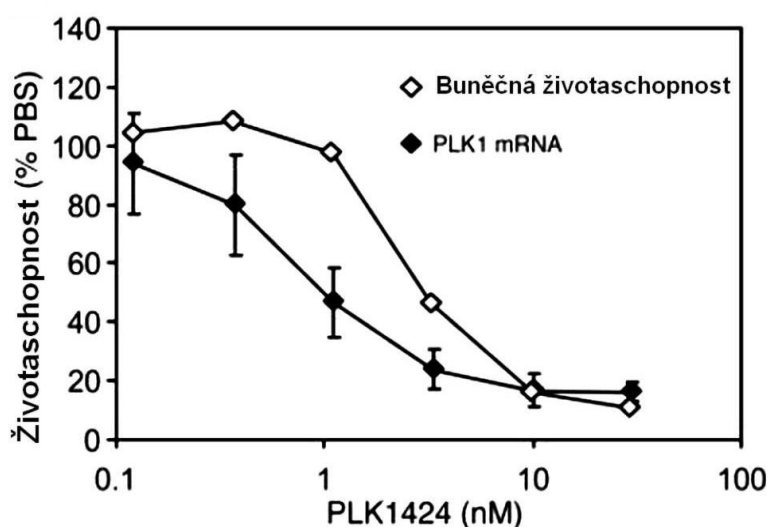
4.2 Léčba nádorových onemocnění

Rakovina je celosvětově druhou nejčastější příčinou smrti. Více než polovina pacientů s pokročilým onkologickým nálezem i přes aplikaci dostupné protinádorové léčby nepřežije první rok. Proto jsou nádory jedním z nejvýznamnějších potenciálních uplatnění genové terapie. Množství specifických genů zapojených do excesivní buněčné proliferace nebo rezistence nádorových buněk proti chemoterapii a radioterapii bylo zkoumáno jako potenciální cíle RNA interference. Na zvířecích a buněčných modelech byla prokázána účinnost siRNA v zastavení buněčného cyklu, omezení tvorby metastáz a zvýšení apoptózy nádorových buněk (Mansoori et al., 2014).

Nejvíce se osvědčily postupy cílení na více genů a kombinace nejméně 3 léčebných metod, protože nádorové buňky se i na genovou léčbu mohou adaptovat. Dobré výsledky byly dosaženy také personalizací léčby – genetickou analýzou biopsie nádorů a následným cílením léčby na specifická slabá místa (Bora et al., 2012).

Několik slibných léčiv již prošlo první fází klinických testů. Kromě siRNA interference je využívána také déle přetrvávající shRNA (Mansoori et al., 2014).

Umlčení genů pro proteiny řídící buněčný cyklus, jako jsou kinesin spindle protein (KSP) a polo-like kinase 1 (PLK-1) bylo testováno u kožních a jaterních nádorů. V obou případech došlo k zastavení buněčného cyklu a zvýšení apoptózy nádorových buněk (potvrzeno histologicky). Zároveň nedocházelo k přehnané imunitní odpovědi ani jiným nežádoucím účinkům u myši. SiRNA byla do nádorových buněk dopravována v lipidových partikulích (stable nucleic acid lipid particles – SNALP), které byly myšim podány intravenózně. Jednorázové podání stačilo k vyvolání pozorovatelného efektu, viz **Obr. 16** (Judge et al., 2009).



Obr. 16: Životaschopnost nádorových buněk po podání různých dávek siRNA cílené na polo-like kinázu-1 (světlé kosočtverce) a množství PLK1 mRNA v buňkách v závislosti na dávce léčiva. nM – 10^{-9} mol/l. Zdroj: (Judge et al., 2009).

4.3 Léčba virových infekcí

4.3.1 HIV/AIDS

Infekce virem HIV, způsobující nevléčitelné onemocnění AIDS, je nejvíce prozkoumaným cílem siRNA léčby virových infekcí. Léčba se může zaměřovat na potlačení exprese specifických virových proteinů v T-lymfocytech, monocytech a makrofázích.

V *in vivo* studiích na myších modelech byly interferencí downregulovány TAR-elementy, dále proteiny Tat, Rev, Gag, Env, Vif, Nef (Jacque et al., 2002) a reverzní transkriptáza (Ambesajir et al., 2012). Překážkou ve využití interference v klinické léčbě je

zejména vysoká diverzita a mutační rychlost virů (Boden et al., 2003). To se snaží obejít kombinace cílení na virové a hostitelské proteiny.

Slibných výsledků bylo dosaženo downregulací hostitelských proteinů souvisejících s invazí do buněk a replikací viru, např. NF κ B nebo receptor CD4, využívaný virem pro vstup do buňky, nebo jeho koreceptorů CXCR4 a CCR5. Zde je hlavní překážkou efektivní transport siRNA do infikovaných buněk. K překonání tohoto problému lze využít navázání siRNA vehikul na protilátky. Protilátky vázající se na receptor CD7 se již v klinických studiích využívají k transportu toxinů do cílových buněk u leukémie a lymfomů. Receptor CD7 je po navázání protilátky rychle internalizován a může lék dopravit dovnitř imunitních buněk (Ambesajir et al., 2012).

4.3.2 Hepatitida typu C

Hepatitida C je nevléčitelné onemocnění způsobené jednovláknovým RNA virem HCV. RNA interference zaměřená na vnitřní vazebné místo pro ribozóm (internal ribosomal entry site – IRES) a nestrukturální proteiny kódují mRNA (NS3 a NS5b) dokázaly dlouhodobě zastavit replikaci viru v kultuře *in vitro* (Wilson et al., 2003). Nicméně hlavním problémem využití v živých organismech je opět efektivní transport siRNA do cílových buněk. Z tohoto důvodu zatím neexistují siRNA léčiva k léčbě hepatitidy u lidí (Ambesajir et al., 2012).

Jak si bude popsáno v poslední kapitole, v klinických studiích jsou již také léčiva proti hepatitidě B.

4.4 Další využití

siRNA představuje slibnou metodu léčby také u nedědičných poruch genové exprese, např. u jaterní (Khaja et al., 2016), ledvinové (Khaja et al., 2016), plicní (Liu & Zheng, 2017) nebo srdeční fibrózy. Fibróza je stav kdy následkem chronického poškození orgánu dochází k přeměně epiteliálních buněk na fibrotickou tkáň excesivním ukládáním kolagenu. Takto změněná tkáň neplní funkce daného orgánu a jeho efektivita klesá.

Fibrotizací se poškozený orgán pokouší zahojit. Dochází k over-expresi proteinů růstový faktor pojivové tkáně (Connective tissue growth factor – CTGF) a profibrotický růstový faktor (profibrotic cytokine transforming growth factor β 1 – TGF- β 1).

siRNA se dá využít také v regenerativní medicíně, a to k umlčení exprese proteinů, které blokují regeneraci po traumatickém poškození tkáně. Byly provedeny studie ohledně regenerace kůže, kostí, chrupavky, nervové tkáně, ledvin, jater, oka, a srdce (Mottaghitlab et al., 2017). Regeneraci srdce po infarktu ztěžuje přítomnost prozánětlivě působících kyslíkových radikálů, generovaných oxidací NADPH v makrofázích. Snížení exprese katalytické podjednotky Nox-2 NADPH pomocí polyketonových nanočástic (ty byly nejlépe absorbovány makrofágy) nesoucích siRNA snížilo apoptózu a degenerativní změny v srdeční tkáni, a to i v minimálních dávkách (5 µg/kg) (Somasuntharam et al., 2013).

5 ONPATTRO (PATISIRAN)

5.1 Patisiran – popis léčiva

Toto léčivo vyrábí firma Alnylam Pharmaceuticals pod ochrannou známkou ONPATTRO. V rámci klinického testování mu patří označení ALN-TTR02. Jedná se o siRNA léčivo formulované v lipidových nanočásticích určené pro léčbu hereditární transthyretinové amyloidózy. Tato formulace usnadňuje specifické dodání siRNA do primárního místa produkce TTR, tedy do hepatocytů v játrech. Samotná siRNA Patisiranu je tvořena dvěma vlákny RNA o délce 21 nukleotidů. Chemické modifikace zahrnují navázání 2'-methoxy skupiny na cukerné zbytky 11 nukleotidů a 2'-deoxythymidinové zbytky u 4 nukleotidů (Milani et al., 2019; Müller et al., 2020).

5.2 Systémové amyloidózy

Tento pojem popisuje skupinu onemocnění způsobených ukládáním atypicky složených proteinů ve tkáních pacienta v podobě nerozpustných amyloidních fibril. Přítomnost těchto depozitů vede k narušení struktury a funkce postižených orgánů. Bylo identifikováno 36 různých prekurzorových proteinů schopných tvorby amyloidních vláken (Benson et al., 2018a), jejichž hromadění vyvolává řadu klinických projevů nejčastěji spojených s vlivem usazeného amyloidu na ledviny, játra, srdce a periferní nervový systém (Kristen et al., 2019).

Kvůli variabilitě a nízké specifitě projevů je diagnóza amyloidóz často zpožděna. Klinický obraz onemocnění je závislý na totožnosti usazovaného proteinu, konkrétních zasažených orgánech a míře narušení jejich funkce.

Mezi nejběžnější typy systémových amyloidóz patří například AA amyloidóza, u které je prekurzorovým proteinem sérový amyloid A, a AL amyloidóza, při níž dochází k hromadění lehkých řetězců imunoglobulinů. AA amyloidóza postihuje hlavně ledviny a funkci nervového systému narušuje pouze vzácně (Perfetto et al., 2010). Častěji se periferní neuropatie vyskytuje u AL amyloidózy, a to u přibližně 26 % pacientů (Matsuda et al., 2011).

Amyloidóza zprostředkovaná transthyretinem (ATTR) vzniká následkem nesprávného složení prekurzorového proteinu transthyretinu (TTR). ATTR se dělí na divoký typ (ATTRwt) a dědičný typ (hATTR, nebo také ATTRv). Ukládání divokého typu TTR proteinu

je také známo jako senilní systémová amyloidóza. Diagnóza ATTRwt je stále častější, její výskyt je odhadován u pacientů se srdečním selháním se zachovanou ejekční frakcí levé komory na 25 % u osob nad 80 let věku a 13 % u pacientů nad 60 let věku (Tanskanen et al., 2008; González-López et al., 2015). Prevalence byla v minulosti podceňována (Kristen et al., 2019; Ihne et al., 2020).

5.3 Hereditární transthyretinová amyloidóza

Dědičná amyloidóza zprostředkovaná transthyretinem je heterogenní, multisystémové, rychle progresivní onemocnění. hATTR je autozomálně dominantní a bylo identifikováno již více než 130 mutací TTR genu (Rowczenio et al., 2019). Hrubý odhad celosvětového počtu lidí s touto nemocí se pohybuje v rozmezí 5 000–10 000 osob (Schmidt et al., 2018). Jedná se tedy o vzácnou chorobu (Ihne et al., 2020).

Ukládání amyloidu postihuje zejména periferní a autonomní nervy, srdce a gastrointestinální trakt. Také může dojít k poškození ledvin a očí. Rychlá progresse onemocnění je spojena s výrazným zhoršením kvality života (QOL, Quality of life) a s dysfunkcí orgánů. Medián předpokládaného přežití je přibližně 4,7 let po diagnóze (Adams et al., 2015). Transthyretin je transportní protein syntetizovaný játry, retinálním pigmentovým epitelem oka a choroidními plexy (Mitsubishi et al., 2005).

Nejlépe prozkoumanými funkcemi TTR jsou transport tyroidního hormonu tyroxinu a účast na transportu vitamínu A prostřednictvím vazby na retinol vázající protein (RBP). TTR je podle výsledků elektroforézy sérových proteinů také označován jako prealbumin. Přítomnost amyloidogenních mutací destabilizuje tetramerický komplex TTR a podporuje proteolytickou přestavbu, jejímž konečným výsledkem je spojování monomerů do fibril a jejich depozice jako amyloidu v různých orgánech (Ando et al., 2013; Milani et al., 2019).

5.3.1 Klinický obraz

Historicky byla dle převládajících klinických projevů hATTR amyloidóza popsána buď jako familiární amyloidotická polyneuropatie (FAP) nebo familiární amyloidotická kardiomyopatie (FAC).

Zasažení více systémů vede k heterogenní klinické prezentaci, která zahrnuje sensorimotorickou a/nebo autonomní neuropatii, srdeční příznaky a méně často zákal sklivce

nebo nefropatii. Mnoho pacientů vykazuje současné, variabilní příznaky (Shin & Robinson-Papp, 2012).

Mezi projevy senzoričné neuropatie patří bolest, necitlivost a zhoršená tepelná citlivost. Příznaky začínají obvykle distálně u dolních končetin a postupně se šíří proximálně až postihnou v pozdějších stádiích i horní končetiny (Coelho et al., 2013b). Zhoršení motoriky dolních končetin vede ke slabosti svalů a způsobuje obtíže s chůzí a ztrátu rovnováhy (Ando et al., 2013).

Pod pojem autonomická dysfunkce spadají příznaky jako abnormality pocení, sexuální impotence, neúmyslný úbytek na váze, poruchy motility GIT (průjem, zácpa, nevolnost a zvracení), retence moči a ortostatická hypotenze (Ando et al., 2013).

Amyloid tvoří depozity i v kardiovaskulárním systému, což se může projevit jako kardiomyopatie, arytmie, dušnost a otoky (Dungu et al., 2012).

Další příznaky spojené s amyloidózou hATTR jsou například poškození ledvin a oční postižení ve formě zákalů sklivce, glaukomů a pupilárních poruch (Ando et al., 2013).

Heterogenita projevujících se příznaků, penetrance nemoci a proměnlivý věk nástupu často vedou k nesprávné diagnóze (Adams et al., 2016). hATTR amyloidóza s převažující polyneuropatií bývá zaměňována s chronickou zánětlivou demyelinizační polyneuropatií, která se také projevuje slabostí, smyslovými symptomy a motorickými symptomy. hATTR amyloidóza s kardiomyopatií častá u starších pacientů je mnohdy nesprávně diagnostikována jako hypertrofická kardiomyopatie nebo arteriální hypertenze kvůli podobným příznakům a vyšší prevalenci těchto onemocnění u starší populace (Hawkins et al., 2015).

Včasná diagnóza a zahájení léčby jsou kritické, protože u pacientů s hATTR amyloidózou často dochází k rychlému rozvoji neurologických a srdečních symptomů (Adams et al., 2015; Gilmore et al., 2015; Kristen et al., 2019).

5.4 Léčba Patisiranem

5.4.1 Princip účinku

Specifickou vazbou siRNA na geneticky konzervovanou sekvenci v 3'-UTR nepřekládané oblasti TTR mRNA mutantního i divokého typu způsobuje Patisiran degradaci této mRNA prostřednictvím RNA interference. Následné snížení hladiny TTR proteinu v séru

vede k poklesu ukládání TTR v tkáních (Hoy, 2018). Schéma působení Patisiranu obsahuje **Příloha 2.**

5.4.2 Dávkování

Léku jsou podávány 0,3 mg/kg tělesné hmotnosti formou 80 minut trvající intravenózní infuze jednou za 3 týdny. Optimální dávkování bylo stanoveno v otevřených studiích fázi I a II.

Ve fázi I byly zkoumány zvyšující se dávky ALN-TTR02 v rozmezí 0,01–0,5 mg/kg. Studie se účastnilo 17 zdravých jedinců. Účinnost léčiva byla posuzována podle hladiny transthyretinu v séru, která byla měřena metodou ELISA. ALN-TTR02 (0,3 mg/kg) způsobil za 3 dny snížení hladiny TTR o více než 50 %. Maximálního potlačení 87 % bylo dosaženo po 10 dnech. Potlačení TTR přetrvalo po dobu 28 dnů, kdy snížení hladiny TTR bylo stále o 67 %. Vyšší dávkou nebylo dosaženo významného zlepšení účinnosti (Coelho et al., 2013a).

Ve studii II. fáze dostávalo 26 pacientů s TTR-FAP infuze intravenózně každé 4 týdny (0,01, 0,05, 0,15 a 0,3 mg / kg) nebo každé 3 týdny (0,3 mg / kg). Patisiran způsobil na dávce závislé snížení hladiny TTR až o 96 % při dávkovém režimu 0,3 mg/kg každé 3 týdny (Suhr et al., 2015; Titze-de-Almeida et al., 2020).

5.4.3 Vedlejší účinky

S podáváním Patisiranu jsou spojeny mírně až středně závažné vedlejší účinky, z nichž mnoho souvisí s infuzním způsobem podání. Vedlejší účinky tohoto typu se s postupem léčby zmírňovaly. Bylo pozorováno začervenání, bolest v zádech, nepříjemné pocity v břiše nebo nevolnost, dušnost a bolesti hlavy, které postihly 19 % pacientů léčených Patisiranem oproti 9 % ve skupině s placebem (Titze-de-Almeida et al., 2020). Dále také periferní otoky se vyskytovaly častěji u pacientů léčených Patisiranem (Adams et al., 2018).

Vzhledem k riziku reakcí souvisejících s infuzí musí pacienti dostávat premedikaci zahrnující dexamethason (glukokortikoid s protizánětlivým účinkem), perorální paracetamol, blokátor H₂ a blokátor H₁ (Müller et al., 2020).

Sérový TTR slouží jako nosič retinol-vázacího proteinu, a tak se účastní transportu vitamínu A krví. Snížení hladiny TTR vedlo v 18-měsíční studii APOLLO fáze III v séru k redukci RBP o 45 % a vitamínu A o 62 %. Léčba Patisiranem je proto provázena suplementací vitamínu A (Alnylam Pharmaceuticals, 2018; Hoy, 2018).

Dále byly pozorovány nežádoucí události jako například průjmy nebo naopak zácpy, infekce močového ústrojí, závratě a únava. Tyto příznaky se vyskytovaly přibližně stejně často jak u skupiny pacientů léčené Patisiranem, tak u skupiny s placebem, a lze je považovat za projevy samotné hATTR (Adams et al., 2018).

5.4.4 Účinnost Patisiranu

Patisiran je výjimečný tím, že je zatím jediným dostupným lékem, při jehož podávání se stav pacientů s polyneuropatií zlepšil. Patisiran byl dobře tolerován a prokázal zvládnutelný bezpečnostní profil pro pacienty s amyloidózou hATTR. Přerušeni léčby v důsledku nežádoucích událostí bylo častější u pacientů, kterým bylo ve studii APOLLO III podáváno placebo (Adams et al., 2018; Kristen et al., 2019).

5.4.4.1 Výsledky studie APOLLO III

V této studii byla primárním sledovaným výstupem změna od výchozí hodnoty po 18 měsících v tzv. mNIS+7 (modified Neuropathy Impairment Score) s hodnotami v rozmezí 0 až 304, kde vyšší výsledek naznačuje větší neuropatické poškození.

Průměrné výchozí hodnoty mNIS+7 (\pm směrodatné odchylky) byly $80,9 \pm 41,5$ ve skupině s Patisiranem a $74,6 \pm 37,0$ ve skupině dostávající placebo. Po 18 měsících byla v mNIS+7 oproti výchozímu stavu průměrná změna (\pm střední chyby průměru) $-6,0 \pm 1,7$ u Patisiranu ve srovnání s $28,0 \pm 2,6$ u placeba. Účinek Patisiranu na mNIS + 7 byl pozorován již při testování po 9 měsících léčby.

Reakce na léčbu byla patrná napříč celou skupinou pacientů s Patisiranem, přičemž 74 % pacientů vykázalo v mNIS+7 po 18 měsících méně než 10-bodové zvýšení oproti výchozí hodnotě ve srovnání se 14 % pacientů ve skupině s placebem. Byla pozorována souvislost mezi mírou snížení hladiny transthyretinu proti výchozí hodnotě a změnou mNIS+7, viz **Příloha 3**. Ke zlepšení stavu (pokles mNIS+7 po 18 měsících) došlo u 56 % pacientů, kteří dostávali Patisiran, ve srovnání se 4 % u pacientů, kteří dostávali placebo.

Další výstupy zahrnovaly dotazník Norfolk Quality of Life – Diabetic Neuropathy (Norfolk QOL-DN) o rozsahu -4 až 136, kde vyšší skóre označuje horší kvalitu života.

Na počátku studie byly průměrné hodnoty (\pm směrodatné odchylky) Norfolk QOL-DN skóre ve skupině s Patisiranem $59,6 \pm 28,2$ a ve skupině s placebem $55,5 \pm 24,3$. Průměrné změny od výchozího stavu (\pm střední chyby průměru) po 18 měsících byly s Patisiranem $-6,7 \pm 1,8$ a s placebem $14,4 \pm 2,7$. Takto výrazné snížení změny po 18 měsících oproti výchozímu

Norfolk QOL-DN skóre dokazuje lepší kvalitu života s Patisiranem. Zlepšení stavu bylo pozorováno u 51 % pacientů s Patisiranem ve srovnání s 10 % pacientů s placebem.

Prospěch léčby Patisiranem byl pozorován u všech ostatních sekundárních výstupů. Jednalo se například o úroveň disability hodnocenou dle tzv. Rasch-built Overall Disability Scale (R-ODS, ve které nižší skóre na stupnici od 0 do 48 znamená horší postižení), výskyt autonomních příznaků (hodnocený dle tzv. Composite Autonomic Symptom Score 31 – COMPASS-31, kde vyšší skóre na stupnici od 0 do 100 odpovídá více autonomním symptomům), rychlost chůze v testu na 10 m a upravený index tělesné hmotnosti definovaný jako hmotnost v kilogramech dělená druhou mocninou výšky v metrech a vynásobená hladinou albuminu v g/l, kde nižší hodnoty znamenaly horší nutriční stav.

Ve srovnání s výchozím stavem bylo zlepšení pozorováno například v testu rychlosti chůze u 53 % pacientů, kteří dostávali Patisiran, oproti 13 % pacientů, kteří dostávali placebo. Dále v testu motorické síly (40 % vs. 1 %), což bylo stanoveno testem slabosti NIS (Neurological Impairment Score) po 18 měsících (Adams et al., 2018). Podávání Patisiranu mělo také pozitivní vliv na autonomní příznaky. Po 18 měsících se hodnota COMPASS-31 u pacientů, jimž byl nasazen Patisiran, zlepšila průměrně o -5,3 bodů a u pacientů, kteří dostávali placebo, se zhoršila průměrně o 2,2 bodu (González-Duarte et al., 2020).

U pacientů s kardiomyopatií byla také sledována hladina NT-proBNP (N-terminálního fragmentu prohormonu mozkového natriuretického peptidu), jehož koncentrace roste u osob s dekompenzovaným srdečním selháním. Po 18 měsících byl upravený geometrický průměrný poměr k výchozímu stavu 0,89 u Patisiranu a 1,97 u placeba. Léčba Patisiranem byla také spojena s lepší srdeční strukturou a funkcí, např. s vyšší střední tloušťkou stěny levé komory.

U všech sekundárních výstupů byly rozdíly ve prospěch Patisiranu patrné již v prvním kontrolním bodě hodnocení účinnosti, tedy po 3 měsících u modifikovaného BMI a po 9 měsících u ostatních sledovaných ukazatelů (Adams et al., 2018).

5.4.5 Ostatní možnosti léčby

Dosavadní léčebné režimy byly zaměřeny na zpomalení progresu onemocnění a úlevu od symptomů klíčovou pro zlepšení kvality života. Hlavní kategorie symptomatické terapie jsou léky proti neuropatickým bolestem, léky na motilitu, které se zabývají příznaky gastrointestinálního traktu, a léky určené pro potlačení srdečních symptomů, jako jsou srdeční selhání, fibrilace síní a ortostatická hypotenze (Kristen et al., 2019).

Ortotopická transplantace jater je považována za účinnou terapii u specifické podskupiny pacientů s mutací ValTRMet v časném stadiu hATTR s polyneuropatií, ale bez srdečního postižení (Ericzon et al., 2015). Doby přežití 5 let po transplantaci dosahuje 77 % pacientů (Herlenius et al., 2004).

Farmakologický přístup k terapii hATTR byl původně zaměřen na stabilizaci TTR tetrameru, aby se zabránilo jeho disociaci a tvorbě fibril.

Tafamidis byl prvním stabilizátorem TTR schváleným v Evropě pro pacienty se stádiem I se symptomatickou polyneuropatií. U části pacientů bylo prokazatelné zpomalení progresu neuropatie a delší zachování kvality života ve srovnání s placebem. Tafamidis se projevil účinným při snižování všech příčin úmrtnosti a hospitalizací souvisejících s kardiovaskulárními příznaky transthyretinové amyloidózy (Milani et al., 2019).

Diflunisal, generický protizánětlivý lék, byl použit jako stabilizátor TTR na základě výsledků randomizované, placebem kontrolované studie fáze III. V této studii Diflunisal mírně snížil rychlost progresu neurologické poruchy a pomáhal zachovat kvalitu života (Berk et al., 2013). Nebylo u něj prokázáno zlepšení v kardiovaskulárních příznacích. Navzdory nízkým nákladům tak tento lék není schválen pro léčbu hATTR a není široce dostupný (Milani et al., 2019).

V současné době jsou zkoumány přípravky snižující hladinu TTR. Tato třída v současné době zahrnuje Inotersen a Patisiran. Inotersen je antisense oligonukleotid, který působí na TTR mRNA produkovanou v jádru hepatocytů a inhibuje jaterní syntézu divokého typu i mutantního TTR. Ve fázi III NEURO-TTR studie prokázal významný přínos pro polyneuropatii hodnocený dle skóre postižení mNIS+7 a stupnice kvality života Norfolk QOL-DN. Byl schválen Evropskou lékovou agenturou (EMA) a US Food and Drug Administration (FDA). V podskupině pacientů se srdečním postižením nebylo použití Inotersenu spojeno s žádným detekovatelným zlepšením srdečních parametrů (Benson et al., 2018b). Podávání Inotersenu bylo ve studii NEURO-TTR spojeno s rizikem trombocytopenie a glomerulonefritidy, což vyžadovalo pravidelné sledování pacientů (Milani et al., 2019).

Přímé srovnání studií fáze III Patisiranu a Inotersenu, tedy sloučenin snižujících hladinu TTR, je omezeno různými velikostmi studovaných skupin pacientů, odlišným zastoupením mutací TTR a použitím různých měřítek mNIS+7. Výhodou Inotersenu je subkutánní způsob aplikace (Kristen et al., 2019).

6 KLINICKÉ STUDIE

Aktuálně existují na trhu dvě schválená siRNA léčiva, výše zmíněný ONPATTRO a nově v roce 2019 FDA schválený GIVLAARI (givosiran), určený k léčbě akutní hepatické porfyrie u dospělých. Oba tyto léky jsou určeny k léčbě poměrně vzácných onemocnění.

Porfyrie jsou skupinou poruch, u kterých enzymatické nedostatky v produkci hemu vedou k akumulaci neurotoxických prekurzorů, jako jsou kyselina δ -aminolevulinová (ALA) a porfobilinogen (PBG). Ty pak způsobují akutní porfyrické záchvaty, které se primárně projevují neuroviscerálními symptomy, jako jsou bolest břicha, akutní neuropatie a psychiatrické symptomy.

Givosiran působí degradaci mRNA pro syntázu δ -aminolevulové kyseliny (ALAS1), čímž snižuje hladiny ALA a PBG. Givosiran je podáván subkutánně jednou měsíčně v dávce 2,5 mg/kg. Po 6 měsících léčby klesly průměrné hladiny ALA a PBG o 77 %, respektive 76 % a prokazatelně se u pacientů snížila frekvence záchvatů (Scott, 2020; de Paula Brandão et al., 2020).

Pro transport na místo působení využívá většina moderních léků konjugát GalNAc-siRNA v případě systémového podání, nebo nevyužívají žádný specializovaný transportní systém v případě lokálního podání. Pravděpodobně všechny léky využívají modifikací siRNA, které prodlužují její efekt z řádu hodin až na měsíce. Ne u všech léků je ale informace o modifikacích veřejně dostupná (Hu et al., 2020).

V různých fázích klinických studií jsou již i léky na běžnější nemoci jako je dyslipidémie, glaukom, ischemická choroba srdeční, hemofilie, hepatitida B nebo nádorová onemocnění. Příklady testovaných siRNA léčiv ve vztahu k částem těla obsahuje **Příloha 4**.

6.1 Léčiva v poslední fázi klinických studií

Léčiva v posledních fázích klinických studií mají nejbližší ke schválení, proto jich zde bude představeno nejvíce ze všech uvedených.

Inclisiran (ALN-PCSsc) je terapeutikum k léčbě hypercholesterolemie a využívá stejný transportní systém i modifikace jako výše zmíněná léčiva. S dlouhodobou účinností inhibuje expresi PCSK9 (proprotein convertase subtilisin-kexin type 9), čímž snižuje hladinu LDL cholesterolu. Podle klinických studií může mít mírné až středně vážné nežádoucí účinky

zahrnující bolest svalů a kostí, bolest zad, kašel, zánět nosohltanu a průjem. Jednorázové podání 300 mg léčiva snížilo hladinu LDL o průměrných 74,5 % a vícenásobné podání efekt ještě zvýšilo (Fitzgerald et al., 2017).

Fitusiran (ALN-AT3SC) slouží k léčbě hemofilie A a B, využívá stejný transportní systém i modifikace jako výše zmíněná léčiva. Obsahuje siRNA interferující v játrech s mRNA pro antithrombin. Podává se týdně nebo měsíčně subkutánně. Efekt v preklinických a klinických studiích je závislý na dávce a vede ke zvýšení hladiny thrombinu a zlepšení srážlivosti krve. Neměl výrazné vedlejší účinky, avšak u jednoho pacienta, kterému byla současně podávána konvenční léčiva (vysoké dávky lidského koagulačního faktoru VIII), došlo k fatální trombóze (Machin & Ragni, 2018).

Lumasiran (ALN-GO1) je určen k léčbě primární hyperoxalurie typu 1. Využívá GalNAc transportní systém a siRNA je modifikována PS, 2'-OMe a 2'F. Hyperoxalurie je způsobena ztrátovou mutací (loss-of-function) enzymu alanine-glyoxylate aminotransferase (AGXT). Vysoké hladiny nerozpustných vápenatých oxalátů způsobují poškození ledvin u dětí, a mohou vést k multiorgánovému selhání. Konvenční léčba často vyžaduje transplantaci ledvin a jater. Lumasiran potlačuje expresi genu HAO1 a tím snižuje tvorbu oxalátu v játrech. Potlačení tohoto genu by klinicky mělo být bezpečné, protože existují lidé s vzácnou kompletní knock-out mutací genu HAO1, a tato mutace jim nepůsobí žádné zdravotní potíže (Hu et al., 2020).

Vutrisiran (ALN-TTRSC02) slouží k léčbě amyloidózy a využívá stejný transportní systém i modifikace jako Lumasiran. Byla více rozebrána v kapitole o Patisiranu (Hu et al., 2020).

DCR-PHXC slouží k léčbě primární hyperoxalurie (popsaná výše). Využívá GalNAc transportní systém. Modifikace siRNA nejsou známy (Hu et al., 2020).

QPI-1002 (15NP) je určen k léčbě komplikací po transplantaci ledviny. Je podáván lokálně do proximálních tubulů transplantované ledviny, takže nevyužívá žádných transportních částic. Modifikován je O-methylací. Po transplantaci ledviny často dochází k ischemickému a reperfusnímu poškození (IRI). Funkce orgánu je narušena fibrózou a atrofií ledvinových kanálků, může dojít i k akutnímu odmítnutí ledviny. Lék QPI-1002 krátkodobě potlačuje expresi *p53* genu, čímž snižuje apoptózu epitelálních buněk a snižuje závažnost IRI. Účinnost je pouze lokální, protože částice jsou rychle vyfiltrovány z ledviny nebo

vychytány buňkami epitelu – to zajišťuje určitou bezpečnost (Nieuwenhuijs-Moeke et al., 2020).

Tivanisiran (SYL1001) slouží k léčbě syndromu suchého oka a bolesti očí. Nevyužívá transportních částic a je podáván lokálně. Modifikace nejsou známy. Syndrom suchého oka je porucha regulace slzného omývání povrchu oka, vedoucí k zánětům a neurosenzorickým poruchám. Dostupná léčiva se zaměřují zejména na potlačení zánětu oka a mají pouze částečnou účinnost. Tivanisiran obsahuje siRNA potlačující expresi TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1). TRPV1 je kanál v nociceptivních neuronech, má ale i další funkce v odpovědi na stres, fibrotizaci a modulaci zánětu (zprostředkuje uvolňování prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 and IL-1 β). Snížení exprese tohoto receptoru potlačuje velkou část příznaků syndromu (Moreno-Montañés et al., 2018).

6.2 Vybraná léčiva v počátečních fázích klinických studií

Ve fázi 1 a 2 klinických studií se nachází několik desítek potenciálních léčiv. Bude zde představeno pouze několik zástupců s ohledem na četnost a závažnost onemocnění a s ohledem na neexistenci siRNA léčiva na danou nemoc v třetí fázi studií.

ALN-AGT je lék na hypertenzi. Využívá GalNAc transportní systém a siRNA je modifikována PS, 2'-OMe a 2'F. Lék dlouhodobě snižuje expresi angiotensinu v játrech. Umlčování exprese je efektivnější než jiné terapeutické přístupy, protože u běžných léků ovlivňujících renin-angiotensinový systém regulace tlaku dochází k postupné adaptaci a zvýšení angiotensinu na původní hodnotu. siRNA se proto jeví jako nadějně řešení, avšak dříve používané molekuly měly velmi krátký biologický poločas. ALN-AGT je první siRNA proti angiotensinu, která působí dlouhodobě (k pozorovatelnému efektu stačí jedno subkutánní podání). Zároveň dle preklinických studií ALN-AGT nepoškozuje ledviny. Nejlepšího efektu bylo dosaženo současným podáváním ALN-AGT a klasických antihypertensiv (testovány byly Captopril nebo Valsarta) (Uijl et al., 2019).

ARO-HBV je léčivo proti hepatitidě B. Využívá GalNAc transportní systém. Modifikace siRNA nejsou známy. Hepatitidou B trpí kolem 250 milionů lidí celosvětově. V klinických studiích je několik nadějných siRNA léků na tuto nemoc, cílících na různé oblasti virového genomu, které snižují produkci virových replikonů a tlumí expresi virových proteinů o 75-90 % in vitro (Ying et al., 2003). Výrazných účinků bylo dosaženo také v klinických studiích na lidských pacientech, ovšem panují určité obavy ohledně bezpečnosti

léku, zejména ve vztahu ke komorbidním onemocněním, věku pacientů a současného užívání jiných léčiv (Smolders et al., 2020).

ND-L02-s0201 slouží k léčbě idiopatické plicní fibrózy. K transportu siRNA využívá lipidových mikročastic v kombinaci s vitamínem A. Modifikace nejsou známy. Plicní fibróza je život ohrožující onemocnění, kdy se vlivem ukládání kolagenního vaziva v plicích ztrácí jejich funkce. Tato siRNA je zaměřena proti kolagenně specifickému chaperonu HSP47. Tím snižuje produkci kolagenu myofibroblasty, vede k jejich apoptóze a snižuje zánětlivou reakci v plicích (Otsuka et al., 2017).

Bamosiran (SYL040012) je lék proti vysokému nitroočnímu tlaku a zelenému zákalu (glaukom). Podává se lokálně, takže nevyužívá transportních systémů. Modifikace nejsou známy. Při glaukomu dochází k nevratné degeneraci optického nervu a ztrátě zraku. Vysoký nitrooční tlak je rizikovým faktorem. Je způsobem nerovnováhou mezi tvorbou tekutiny v oku a jejím odtokem. Blokadí $\beta 2$ adrenergických receptorů (ADRB2) lze dosáhnout snížení tvorby tekutiny v tyčinkových buňkách a tím snížení nitroočního tlaku. Bamosiran je siRNA umlčující expresi ADRB2 receptorů. Má dlouhotrvající účinek (Martínez et al., 2014).

6.3 Vybraná léčiva v preklinické fázi

Si-PT-LODER je určen k léčbě rakoviny prostaty. Jako transportní systém využívá polymerní matici LODER. Modifikace nejsou známy. Tato siRNA cílí na heat shock protein HSP90 (Hu et al., 2020).

SLN226 je lék určený k podpoře odvykání závislosti na alkoholu. K transportu využívá konjugátů, modifikace siRNA nejsou známy. Umlčuje gen *ALDH2*. Ten kóduje enzym, který při metabolizaci alkoholu odbourává toxický meziprodukt acetaldehyd (Hu et al., 2020). Lidé s mutací v *ALDH2* genu (u některých národů je častější) špatně snášejí alkohol a silněji pociťují jeho negativní účinky. Efekt léčby je tedy pravděpodobně založen na tom, že neodbouraný acetaldehyd bude u alkoholika způsobovat silné nepříjemné účinky alkoholové intoxikace. Účinek bude dlouhodobý, takže pacient nemůže léčbu samovolně vysadit a porušit abstinenci. Zatím je o léku SLN226 dostupných jen velmi málo informací.

SYL116011 je určen k oftalmologické léčbě alergického zánětu spojivek. Nevyužívá žádných transportních systémů, je aplikován lokálně. Modifikace nejsou známy. Působí na protein Orai1, který je součástí vápníkových kanálů aktivujících T-lymfocyty. Mutace

v tomto proteinu způsobuje těžkou imunodeficienci, nicméně při lokálním podání není lék v tomto ohledu nebezpečný (Hu et al., 2020).

ARO-ENaC je lék proti cystické fibróze. Využívá TRiM (Targeted RNAi Molecule) transportní systém a je modifikován PS, 2'-OMe a 2'F. Působí proti ENaC sodíkovým kanálům v epitelových buňkách, čímž zabraňuje excesivnímu příjmu sodíku do buňky (Clark et al., 2013).

ZÁVĚR

RNA interference je nadějnou oblastí medicínského výzkumu. Výsledkem dvacetileté usilovné práce mnoha laboratoří jsou dnes dva schválené léky proti závažným onemocněním, a několik desítek dalších v procesu klinických studií. Pomocí vzájemné spolupráce a díky interakcím mezi laboratořemi a výzkumnými centry bude zřejmě brzy možné léčit vzácná genetická onemocnění, mnohá degenerativní onemocnění nebo rakovinu. Své využití si siRNA nachází také v oftalmologii při léčbě zeleného zákalu, makulární degenerace, nebo relativně méně závažného, avšak častého, syndromu suchého oka. Naděje svítá také nemocným s HIV/AIDS nebo s virovou hepatitidou.

Kromě siRNA jsou zkoumány také další metody interference, např. shRNA, která po zabudování do genomu umožní produkovat terapeutickou siRNA přímo v buňkách. Každá metoda má však svá úskalí a rizika. U siRNA jsou to problémy s transportem, stabilitou molekul a imunogenitou. shRNA může zase svou inkorporací způsobit narušení funkce jiných genů. Jakýkoli zásah do regulace genové exprese může mít nežádoucí účinky ve formě ovlivnění jiných genů, narušení homeostázy a cytotoxicity, nebo zahlcení přirozených RNAi regulačních mechanismů.

V této práci byly prezentovány základní typy a fungování RNA, popsána struktura a funkce malých RNA zapojených do RNA interference a čtenář byl seznámen s metodami řešení problémů při terapeutickém použití siRNA – zejména s chemickými modifikacemi a transportními systémy. Blíže se práce zaměřuje na dosud nejlépe prozkoumané RNAi léčivo – Patisiran a nabízí shrnutí výsledků studie, která vedla k jeho schválení.

POUŽITÁ LITERATURA

ADAMS, David, Teresa COELHO, Laura OBICI, Giampaolo MERLINI, Zoia MINCHEVA, Narupat SUANPRASERT, Brian R. BETTENCOURT, Jared A. GOLLOB, Pritesh J. GANDHI, William J. LITCHY a Peter J. DYCK, 2015. Rapid progression of familial amyloidotic polyneuropathy: a multinational natural history study. *Neurology* [online]. **85**(8), 675–682 [cit. 20-07-18]. ISSN 1526-632X. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0000000000001870

ADAMS, David, Alejandra GONZALEZ-DUARTE, William D. O'RIORDAN, Chih-Chao YANG, Mitsuharu UEDA, Arnt V. KRISTEN, Ivailo TOURNEV, Hartmut H. SCHMIDT, Teresa COELHO, John L. BERK, Kon-Ping LIN, Giuseppe VITA, Shahram ATTARIAN, Violaine PLANTÉ-BORDENEUVE, Michelle M. MEZEI, Josep M. CAMPISTOL, Juan BUADES, Thomas H. BRANNAGAN, Byoung J. KIM, Jeeyoung OH, Yesim PARMAN, Yoshiki SEKIJIMA, Philip N. HAWKINS, Scott D. SOLOMON, Michael POLYDEFKIS, Peter J. DYCK, Pritesh J. GANDHI, Sunita GOYAL, Jihong CHEN, Andrew L. STRAHS, Saraswathy V. NOCHUR, Marianne T. SWEETSER, Pushkal P. GARG, Akshay K. VAISHNAW, Jared A. GOLLOB a Ole B. SUHR, 2018. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **379**(1), 11–21 [cit. 20-07-18]. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1716153

ADAMS, David, Ole B. SUHR, Ernst HUND, Laura OBICI, Ivailo TOURNEV, Josep M. CAMPISTOL, Michel S. SLAMA, Bouke P. HAZENBERG, Teresa COELHO a EUROPEAN NETWORK FOR TTR-FAP (ATTREUNET), 2016. First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Current Opinion in Neurology* [online]. **29 Suppl 1**, S14-26 [cit. 20-07-18]. ISSN 1473-6551. Dostupné z: doi:10.1097/WCO.0000000000000289

AGRAWAL, Sudhir a Ekambar R. KANDIMALLA, 2004. Role of Toll-like receptors in antisense and siRNA [corrected]. *Nature Biotechnology* [online]. **22**(12), 1533–1537 [cit. 20-07-18]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1042

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2002. From DNA to RNA. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition [online]. B.m.: Garland Science [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>

AMBESAJIR, Anghesom, Atul KAUSHIK, Jeevan J. KAUSHIK a Sham T. PETROS, 2012. RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. **19**(4), 395–403 [cit. 20-07-18]. ISSN 1319-562X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.sjbs.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.08.001)

ANDO, Yukio, Teresa COELHO, John L. BERK, Márcia Waddington CRUZ, Bo-Göran ERICZON, Shu-ichi IKEDA, W. David LEWIS, Laura OBICI, Violaine PLANTÉ-BORDENEUVE, Claudio RAPEZZI, Gerard SAID a Fabrizio SALVI, 2013. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **8**, 31 [cit. 20-07-18]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: [doi:10.1186/1750-1172-8-31](https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-31)

BAE, Yun Jung, Young Il YOON, Tae-Jong YOON a Hak Jong LEE, 2016. Ultrasound-Guided Delivery of siRNA and a Chemotherapeutic Drug by Using Microbubble Complexes: In Vitro and In Vivo Evaluations in a Prostate Cancer Model. *Korean Journal of Radiology* [online]. **17**(4), 497–508 [cit. 20-07-18]. ISSN 1229-6929. Dostupné z: [doi:10.3348/kjr.2016.17.4.497](https://doi.org/10.3348/kjr.2016.17.4.497)

BENSON, Merrill D., Joel N. BUXBAUM, David S. EISENBERG, Giampaolo MERLINI, Maria J. M. SARAIVA, Yoshiki SEKIJIMA, Jean D. SIPE a Per WESTERMARK, 2018a. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis* [online]. **25**(4), 215–219 [cit. 20-07-18]. ISSN 1744-2818. Dostupné z: [doi:10.1080/13506129.2018.1549825](https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1549825)

BENSON, Merrill D., Márcia WADDINGTON-CRUZ, John L. BERK, Michael POLYDEFKIS, Peter J. DYCK, Annabel K. WANG, Violaine PLANTÉ-BORDENEUVE, Fabio A. BARROSO, Giampaolo MERLINI, Laura OBICI, Morton SCHEINBERG, Thomas H. BRANNAGAN, William J. LITCHY, Carol WHELAN, Brian M. DRACHMAN, David

ADAMS, Stephen B. HEITNER, Isabel CONCEIÇÃO, Hartmut H. SCHMIDT, Giuseppe VITA, Josep M. CAMPISTOL, Josep GAMEZ, Peter D. GOREVIC, Edward GANE, Amil M. SHAH, Scott D. SOLOMON, Brett P. MONIA, Steven G. HUGHES, T. Jesse KWOH, Bradley W. MCEVOY, Shiangtung W. JUNG, Brenda F. BAKER, Elizabeth J. ACKERMANN, Morie A. GERTZ a Teresa COELHO, 2018b. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **379**(1), 22–31 [cit. 20-07-18]. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1716793

BERK, John L., Ole B. SUHR, Laura OBICI, Yoshiki SEKIJIMA, Steven R. ZELDENRUST, Taro YAMASHITA, Michael A. HENEGHAN, Peter D. GOREVIC, William J. LITCHY, Janice F. WIESMAN, Erik NORDH, Manuel CORATO, Alessandro LOZZA, Andrea CORTESE, Jessica ROBINSON-PAPP, Theodore COLTON, Denis V. RYBIN, Alice B. BISBEE, Yukio ANDO, Shu-ichi IKEDA, David C. SELDIN, Giampaolo MERLINI, Martha SKINNER, Jeffery W. KELLY, Peter J. DYCK a DIFLUNISAL TRIAL CONSORTIUM, 2013. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* [online]. **310**(24), 2658–2667 [cit. 20-07-18]. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2013.283815

BODEN, Daniel, Oliver PUSCH, Frederick LEE, Lynne TUCKER a Bharat RAMRATNAM, 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from RNA Interference. *Journal of Virology* [online]. **77**(21), 11531–11535 [cit. 20-07-18]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.77.21.11531-11535.2003

BORA, Roop Singh, Dikshi GUPTA, Trilochan Kanwaljit Singh MUKKUR a Kulvinder Singh SAINI, 2012. RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review). *Molecular Medicine Reports* [online]. **6**(1), 9–15 [cit. 20-07-18]. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2012.871

CIECHANOVER, Aaron a Yong Tae KWON, 2017. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience* [online]. **11**, 185 [cit. 20-07-18]. ISSN 1662-4548. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2017.00185

CLARK, Kenneth L., Stephen A HUGHES, Pallav BULSARA, Jill COATES, Kitty MOORES, Joel PARRY, Michael CARR, Ruth J MAYER, Paul WILSON, Chris GRUENLOH, Daren LEVIN, Jill DARTON, Wolf-Michael WEBER, Katja SOBCZAK, Deborah R GILL, Stephen C HYDE, Lee A DAVIES, Ian A PRINGLE, Stephanie G SUMNER-JONES, Vasant JADHAV, Sharon JAMISON, Walter R STRAPPS, Victoria PICKERING a Mark R EDBROOKE, 2013. Pharmacological Characterization of a Novel ENaCa siRNA (GSK2225745) With Potential for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* [online]. **2**(1), e65 [cit. 20-07-18]. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1038/mtna.2012.57

COELHO, Teresa, David ADAMS, Ana SILVA, Pierre LOZERON, Philip N. HAWKINS, Timothy MANT, Javier PEREZ, Joseph CHIESA, Steve WARRINGTON, Elizabeth TRANTER, Malathy MUNISAMY, Rick FALZONE, Jamie HARROP, Jeffrey CEHELKY, Brian R. BETTENCOURT, Mary GEISSLER, James S. BUTLER, Alfica SEHGAL, Rachel E. MEYERS, Qingmin CHEN, Todd BORLAND, Renta M. HUTABARAT, Valerie A. CLAUSEN, Rene ALVAREZ, Kevin FITZGERALD, Christina GAMBA-VITALO, Saraswathy V. NOCHUR, Akshay K. VAISHNAW, Dinah W. Y. SAH, Jared A. GOLLOB a Ole B. SUHR, 2013a. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **369**(9), 819–829 [cit. 20-07-18]. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1208760

COELHO, Teresa, Mathew S. MAURER a Ole B. SUHR, 2013b. THAOS - The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey: initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Current Medical Research and Opinion* [online]. **29**(1), 63–76 [cit. 20-07-18]. ISSN 1473-4877. Dostupné z: doi:10.1185/03007995.2012.754348

DAVIS, Mark E., Jonathan E. ZUCKERMAN, Chung Hang J. CHOI, David SELIGSON, Anthony TOLCHER, Christopher A. ALABI, Yun YEN, Jeremy D. HEIDEL a Antoni RIBAS, 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* [online]. **464**(7291), 1067–1070 [cit. 20-07-18]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature08956

DE PAULA BRANDÃO, Pedro Renato, Simoneide S. TITZE-DE-ALMEIDA a Ricardo TITZE-DE-ALMEIDA, 2020. Leading RNA Interference Therapeutics Part 2: Silencing Delta-Aminolevulinic Acid Synthase 1, with a Focus on Givosiran. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. **24**(1), 61–68 [cit. 20-07-18]. ISSN 1179-2000. Dostupné z: doi:10.1007/s40291-019-00438-6

DENG, Yan, Chi Chiu WANG, Kwong Wai CHOY, Quan DU, Jiao CHEN, Qin WANG, Lu LI, Tony Kwok Hung CHUNG a Tao TANG, 2014. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene* [online]. **538**(2), 217–227 [cit. 20-07-18]. ISSN 1879-0038. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2013.12.019

DONY, C., M. KESSEL a P. GRUSS, 1985. Post-transcriptional control of myc and p53 expression during differentiation of the embryonal carcinoma cell line F9. *Nature* [online]. **317**(6038), 636–639 [cit. 20-07-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/317636a0

DUNGU, Jason N., Lisa J. ANDERSON, Carol J. WHELAN a Philip N. HAWKINS, 2012. Cardiac transthyretin amyloidosis. *Heart (British Cardiac Society)* [online]. **98**(21), 1546–1554 [cit. 20-07-18]. ISSN 1468-201X. Dostupné z: doi:10.1136/heartjnl-2012-301924

ELBASHIR, S. M., J. HARBORTH, W. LENDECKEL, A. YALCIN, K. WEBER a T. TUSCHL, 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* [online]. **411**(6836), 494–498 [cit. 20-07-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35078107

ERICZON, Bo-Göran, Henryk E. WILCZEK, Marie LARSSON, Priyantha WIJAYATUNGA, Arie STANGOU, João Rodrigues PENA, Emanuel FURTADO, Eduardo BARROSO, Jorge DANIEL, Didier SAMUEL, Rene ADAM, Vincent KARAM, John POTERUCHA, David LEWIS, Ben-Hur FERRAZ-NETO, Márcia Waddington CRUZ, Miguel MUNAR-QUES, Juan FABREGAT, Shu-Ichi IKEDA, Yukio ANDO, Nigel HEATON, Gerd OTTO a Ole SUHR, 2015. Liver Transplantation for Hereditary Transthyretin Amyloidosis: After 20 Years Still the Best Therapeutic Alternative? *Transplantation* [online]. **99**(9), 1847–1854 [cit. 20-07-18]. ISSN 1534-6080. Dostupné z: doi:10.1097/TP.0000000000000574

FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER a C. C. MELLO, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [online]. **391**(6669), 806–811 [cit. 20-07-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35888

FITZGERALD, Kevin, Suellen WHITE, Anna BORODOVSKY, Brian R. BETTENCOURT, Andrew STRAHS, Valerie CLAUSEN, Peter WIJNGAARD, Jay D. HORTON, Jorg TAUBEL, Ashley BROOKS, Chamikara FERNANDO, Robert S. KAUFFMAN, David KALLEND, Akshay VAISHNAW a Amy SIMON, 2017. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *The New England journal of medicine* [online]. **376**(1), 41–51 [cit. 20-07-18]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1609243

GAO, Kun a Leaf HUANG, 2013. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **3**, 213–225 [cit. 20-07-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2013.06.005

GILMORE, Julian D, Mathew S MAURER, John VEST, Verena KARSTEN, Christine POWELL, Andrew STRAHS, Jared GOLLOB a Philip N HAWKINS, 2015. Analysis of disease progression in patients with transthyretin cardiac amyloidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **10**(Suppl 1), O10 [cit. 20-07-18]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-10-S1-O10

GONZÁLEZ-DUARTE, Alejandra, John L. BERK, Dianna QUAN, Michelle L. MAUERMANN, Hartmut H. SCHMIDT, Michael POLYDEFKIS, Márcia WADDINGTON-CRUZ, Mitsuharu UEDA, Isabel M. CONCEIÇÃO, Arnt V. KRISTEN, Teresa COELHO, Cécile A. CAUQUIL, Céline TARD, Madeline MERKEL, Emre ALDINC, Jihong CHEN, Marianne T. SWEETSER, Jing Jing WANG a David ADAMS, 2020. Analysis of autonomic outcomes in APOLLO, a phase III trial of the RNAi therapeutic patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Journal of Neurology* [online]. **267**(3), 703–712 [cit. 20-07-18]. ISSN 1432-1459. Dostupné z: doi:10.1007/s00415-019-09602-8

GONZÁLEZ-LÓPEZ, Esther, Maria GALLEGU-DELGADO, Gonzalo GUZZO-MERELLO, F. Javier DE HARO-DEL MORAL, Marta COBO-MARCOS, Carolina ROBLES, Belén BORNSTEIN, Clara SALAS, Enrique LARA-PEZZI, Luis ALONSO-PULPON a Pablo

GARCIA-PAVIA, 2015. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal* [online]. **36**(38), 2585–2594 [cit. 20-07-18]. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehv338

GUO, S. a K. J. KEMPHUES, 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* [online]. **81**(4), 611–620 [cit. 20-07-18]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90082-9

GUPTA, Sudhiranjan, Ratan MAITRA, Dave YOUNG, Anasuya GUPTA a Subha SEN, 2009. Silencing the myotrophin gene by RNA interference leads to the regression of cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* [online]. **297**(2), H627-636 [cit. 20-07-18]. ISSN 1522-1539. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00294.2009

HAWKINS, Philip N., Yukio ANDO, Angela DISPENZERI, Alejandra GONZALEZ-DUARTE, David ADAMS a Ole B. SUHR, 2015. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Annals of Medicine* [online]. **47**(8), 625–638 [cit. 20-07-18]. ISSN 1365-2060. Dostupné z: doi:10.3109/07853890.2015.1068949

HERLENIUS, Gustaf, Henryk E. WILCZEK, Marie LARSSON, Bo-Göran ERICZON a FAMILIAL AMYLOIDOTIC POLYNEUROPATHY WORLD TRANSPLANT REGISTRY, 2004. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. *Transplantation* [online]. **77**(1), 64–71 [cit. 20-07-18]. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/01.TP.0000092307.98347.CB

HOY, Sheridan M., 2018. Patisiran: First Global Approval. *Drugs* [online]. **78**(15), 1625–1631 [cit. 20-07-18]. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-018-0983-6

HU, Bo, Liping ZHONG, Yuhua WENG, Ling PENG, Yuanyu HUANG, Yongxiang ZHAO a Xing-Jie LIANG, 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **5** [cit. 2020-07-20]. ISSN 2095-9907. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-0207-x

IHNE, Sandra, Caroline MORBACH, Claudia SOMMER, Andreas GEIER, Stefan KNOP a Stefan STÖRK, 2020. Amyloidosis-the Diagnosis and Treatment of an Underdiagnosed Disease. *Deutsches Arzteblatt International* [online]. **117**(10), 159–166 [cit. 20-07-18]. ISSN 1866-0452. Dostupné z: doi:10.3238/arztebl.2020.0159

JACQUE, Jean-Marc, Karine TRIQUES a Mario STEVENSON, 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* [online]. **418**(6896), 435–438 [cit. 20-07-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature00896

JOHNSON, Emily, Kathryn CHASE, Sarah MCGOWAN, Erica MONDO, Edith PFISTER, Eric MICK, Randall H. FRIEDLINE, Jason K. KIM, Ellen SAPP, Marian DIFIGLIA a Neil ARONIN, 2015. Safety of Striatal Infusion of siRNA in a Transgenic Huntington's Disease Mouse Model. *Journal of Huntington's Disease* [online]. **4**(3), 219–229 [cit. 20-07-18]. ISSN 1879-6400. Dostupné z: doi:10.3233/JHD-150163

JUDGE, Adam D., Marjorie ROBBINS, Iran TAVAKOLI, Jasna LEVI, Lina HU, Anna FRONDA, Ellen AMBEGIA, Kevin MCCLINTOCK a Ian MACLACHLAN, 2009. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **119**(3), 661–673 [cit. 20-07-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI37515

KARLSON, Peter, 1981. *Základy biochemie*. Praha: Academia, 501 s.

KHAJA, Fatima, Dulari JAYAWARDENA, Antonina KUZMIS a Hayat ÖNYÜKSEL, 2016. Targeted Sterically Stabilized Phospholipid siRNA Nanomedicine for Hepatic and Renal Fibrosis. *Nanomaterials* [online]. **6**(1) [cit. 2020-07-20]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano6010008

KHOCHBIN, S. a J. J. LAWRENCE, 1989. An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiate. *The EMBO journal*. **8**(13), 4107–4114. ISSN 0261-4189.

KOBAYASHI, Hotaka a Yukihide TOMARI, 2016. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **1859**(1), 71–81 [cit. 20-07-18]. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.007

KRISTEN, Arnt V., Senda AJROUD-DRISS, Isabel CONCEIÇÃO, Peter GOREVIC, Theodoros KYRIAKIDES a Laura OBICI, 2019. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management* [online]. **9**(1), 5–23 [cit. 20-07-18]. ISSN 1758-2032. Dostupné z: doi:10.2217/nmt-2018-0033

KUMAR, Madhur a Gordon G. CARMICHAEL, 1998. Antisense RNA: Function and Fate of Duplex RNA in Cells of Higher Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**(4), 1415–1434. ISSN 1092-2172.

LAM, Jenny K. W., Michael Y. T. CHOW, Yu ZHANG a Susan W. S. LEUNG, 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* [online]. **4**, e252 [cit. 20-07-18]. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1038/mtna.2015.23

LIU, Yuan a Yi ZHENG, 2017. Bach1 siRNA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating oxidative stress in mice. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. **39**(1), 91–100 [cit. 20-07-18]. ISSN 1107-3756. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2016.2823

LODISH, Harvey F, Arnold BERK, Paul MATSUDAIRA, Chris A KAISER, Monty KRIEGER, Matthew P SCOTT, Stephen Lawrence ZIPURSKY a James E DARNELL, 2003. *Molecular cell biology*. New York, N.Y.: W.H. Freeman and Company, 973 s.. ISBN 978-0-7167-4366-8.

MADEN, B. E. a J. M. HUGHES, 1997. Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* [online]. **105**(7–8), 391–400 [cit. 20-07-18]. ISSN 0009-5915. Dostupné z: doi:10.1007/BF02510475

MACHIN, Nicoletta a Margaret V. RAGNI, 2018. An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B. *Journal of Blood Medicine* [online]. B.m.: Dove Press, **9**, 135 [cit. 20-07-18]. Dostupné z: doi:10.2147/JBM.S159297

MANSOORI, Behzad, Siamak SANDOGHCHIAN SHOTORBANI a Behzad BARADARAN, 2014. RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. **4**(4), 313–321 [cit. 20-07-18]. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.5681/apb.2014.046

MARTÍNEZ, Tamara, Maria Victoria GONZÁLEZ, Ingo ROEHL, Natalia WRIGHT, Covadonga PAÑEDA a Ana Isabel JIMÉNEZ, 2014. In vitro and in vivo efficacy of SYL040012, a novel siRNA compound for treatment of glaucoma. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* [online]. **22**(1), 81–91 [cit. 20-07-18]. ISSN 1525-0024. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2013.216

MATSUDA, M., T. GONO, H. MORITA, N. KATOH, M. KODAIRA a S. IKEDA, 2011. Peripheral nerve involvement in primary systemic AL amyloidosis: a clinical and electrophysiological study. *European Journal of Neurology* [online]. **18**(4), 604–610 [cit. 20-07-18]. ISSN 1468-1331. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03215.x

MILANI, Paolo, Roberta MUSSINELLI, Stefano PERLINI, Giovanni PALLADINI a Laura OBICI, 2019. An evaluation of patisiran: a viable treatment option for transthyretin-related hereditary amyloidosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. **20**(18), 2223–2228 [cit. 20-07-18]. ISSN 1744-7666. Dostupné z: doi:10.1080/14656566.2019.1671352

MITSUHASHI, Shigeaki, Masahide YAZAKI, Takahiko TOKUDA, Yoshiki SEKIJIMA, Yukihiro WASHIMI, Yuko SHIMIZU, Yukio ANDO, Merrill D. BENSON a Shu-Ichi IKEDA, 2005. Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis* [online]. **12**(4), 216–225 [cit. 20-07-18]. ISSN 1350-6129. Dostupné z: doi:10.1080/13506120500352404

MORENO-MONTAÑÉS, Javier, Anne-Marie BLEAU a Ana Isabel JIMENEZ, 2018. Tivanisiran, a novel siRNA for the treatment of dry eye disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. **27**(4), 421–426 [cit. 20-07-18]. ISSN 1354-3784, 1744-7658. Dostupné z: doi:10.1080/13543784.2018.1457647

MOTTAGHITALAB, Fatemeh, Ali RASTEGARI, Mehdi FAROKHI, Rassoul DINARVAND, Hossein HOSSEINKHANI, Keng-Liang OU, Daniel W. PACK, Chuanbin MAO, Meshkat DINARVAND, Yousef FATAHI a Fatemeh ATYABI, 2017. Prospects of siRNA applications in regenerative medicine. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **524**(1–2), 312–329 [cit. 20-07-18]. ISSN 1873-3476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.092

MÜLLER, Maximilian L., Javed BUTLER a Bettina HEIDECKER, 2020. Emerging therapies in transthyretin amyloidosis - a new wave of hope after years of stagnancy? *European Journal of Heart Failure* [online]. **22**(1), 39–53 [cit. 20-07-18]. ISSN 1879-0844. Dostupné z: doi:10.1002/ejhf.1695

MUÑOZ-LÓPEZ, Martín a José L. GARCÍA-PÉREZ, 2010. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics* [online]. **11**(2), 115–128 [cit. 20-07-18]. ISSN 1389-2029. Dostupné z: doi:10.2174/138920210790886871

NAKANISHI, Kotaro, 2016. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* [online]. **7**(5), 637–660 [cit. 20-07-18]. ISSN 1757-7004. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1356

NAPOLI, C, C LEMIEUX a R JORGENSEN, 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*. **2**(4), 279–289. ISSN 1040-4651.

NIEUWENHUIJS-MOEKE, Gertrude J., Søren E. PISCHKE, Stefan P. BERGER, Jan Stephan F. SANDERS, Robert A. POL, Michel M. R. F. STRUYS, Rutger J. PLOEG a Henri G. D. LEUVENINK, 2020. Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(1) [cit. 2020-07-20]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9010253

NIKAM, Rahul R. a Kiran R. GORE, 2018. Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. *Nucleic Acid Therapeutics* [online]. **28**(4), 209–224 [cit. 20-07-18]. ISSN 2159-3345. Dostupné z: doi:10.1089/nat.2017.0715

NOWAKOWSKI, Jacek a Ignacio TINOCO, 1997. RNA Structure and Stability. *Seminars in Virology* [online]. **8**(3), 153–165 [cit. 20-07-18]. ISSN 10445773. Dostupné z: doi:10.1006/smvv.1997.0118

OTSUKA, Mitsuo, Masanori SHIRATORI, Hirofumi CHIBA, Koji KURONUMA, Yasushi SATO, Yoshiro NIITSU a Hiroki TAKAHASHI, 2017. Treatment of pulmonary fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone HSP47 in vitamin A-coupled liposomes. *Experimental Lung Research* [online]. **43**(6–7), 271–282 [cit. 20-07-18]. ISSN 1521-0499. Dostupné z: doi:10.1080/01902148.2017.1354946

PASTUCHOVÁ, Markéta, 2007. 55 s. *Databáze experimentálně doložených sekundárních struktur v 5' nepřekládaných oblastech virových RNA*. Praha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

PERFETTO, Federico, Alberto MOGGI-PIGNONE, Riccardo LIVI, Alessio TEMPESTINI, Franco BERGESIO a Marco MATUCCI-CERINIC, 2010. Systemic amyloidosis: a challenge for the rheumatologist. *Nature Reviews. Rheumatology* [online]. **6**(7), 417–429 [cit. 20-07-18]. ISSN 1759-4804. Dostupné z: doi:10.1038/nrrheum.2010.84

RAFEEQ, Misbahuddin M. a Hussam Aly Sayed MURAD, 2017. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine* [online]. **15**(1), 84 [cit. 20-07-18]. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/s12967-017-1193-9

ROMANO, N. a G. MACINO, 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* [online]. **6**(22), 3343–3353 [cit. 20-07-18]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x

ROWCZENIO, Dorota, Candida C. QUARTA, Marianna FONTANA, Carol J. WHELAN, Ana MARTINEZ-NAHARRO, Hadija TROJER, Anna BAGINSKA, Stuart M. FERGUSON, Janet GILBERTSON, Tamer REZK, Sajitha SACHCHITHANANTHAM, Shameem MAHMOOD, Richa MANWANI, Faye SHARPLEY, Ashutosh D. WECHALEKAR, Philip N. HAWKINS, Julian D. GILLMORE a Helen J. LACHMANN, 2019. Analysis of the TTR gene in the investigation of amyloidosis: A 25-year single UK center experience. *Human Mutation* [online]. **40**(1), 90–96 [cit. 20-07-18]. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.23669

SCOTT, Lesley J., 2020. Givosiran: First Approval. *Drugs* [online]. **80**(3), 335–339 [cit. 20-07-18]. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-020-01269-0

SETO, Anita G., Robert E. KINGSTON a Nelson C. LAU, 2007. The Coming of Age for Piwi Proteins. *Molecular Cell* [online]. **26**(5), 603–609 [cit. 20-07-18]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.05.021

SHIN, Susan C. a Jessica ROBINSON-PAPP, 2012. Amyloid neuropathies. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* [online]. **79**(6), 733–748 [cit. 20-07-18]. ISSN 1931-7581. Dostupné z: doi:10.1002/msj.21352

SCHMIDT, Hartmut H., Márcia WADDINGTON-CRUZ, Marc F. BOTTEMAN, John A. CARTER, Avijeet S. CHOPRA, Markay HOPPS, Michelle STEWART, Shari FALLET a Leslie AMASS, 2018. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle & Nerve* [online]. **57**(5), 829–837 [cit. 20-07-18]. ISSN 1097-4598. Dostupné z: doi:10.1002/mus.26034

SIDAHMED, Abubaker, Shaza ABDALLA, Salahedin MAHMUD a Bruce WILKIE, 2014. Antiviral innate immune response of RNA interference. *Journal of Infection in Developing Countries* [online]. **8**(7), 804–810 [cit. 20-07-18]. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.4187

SMOLDERS, Elise J., David M. BURGER, Jordan J. FELD a Jennifer J. KISER, 2020. Review article: clinical pharmacology of current and investigational hepatitis B virus

therapies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [online]. **51**(2), 231–243 [cit. 20-07-18]. ISSN 1365-2036. Dostupné z: doi:10.1111/apt.15581

SNOWDEN, Julie S., 2017. The Neuropsychology of Huntington's Disease. *Archives of Clinical Neuropsychology: The Official Journal of the National Academy of Neuropsychologists* [online]. **32**(7), 876–887 [cit. 20-07-18]. ISSN 1873-5843. Dostupné z: doi:10.1093/arclin/acx086

SOMASUNTHARAM, Inthirai, Archana V. BOOPATHY, Raffay S. KHAN, Mario D. MARTINEZ, Milton E. BROWN, Niren MURTHY a Michael E. DAVIS, 2013. Delivery of Nox2-NADPH oxidase siRNA with polyketal nanoparticles for improving cardiac function following myocardial infarction. *Biomaterials* [online]. **34**(31), 7790–7798 [cit. 20-07-18]. ISSN 1878-5905. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.051

SONG, Min-Sun a John J. ROSSI, 2017. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *The Biochemical Journal* [online]. **474**(10), 1603–1618 [cit. 20-07-18]. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160759

SOUKUPOVÁ, Milena a František SOUKUP, 1998. *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II*. Praha: Karolinum, 98 s. ISBN 978-80-7184-581-2.

SUHR, Ole B., Teresa COELHO, Juan BUADES, Jean POUGET, Isabel CONCEICAO, John BERK, Hartmut SCHMIDT, Márcia WADDINGTON-CRUZ, Josep M. CAMPISTOL, Brian R. BETTENCOURT, Akshay VAISHNAW, Jared GOLLOB a David ADAMS, 2015. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **10**, 109 [cit. 20-07-18]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/s13023-015-0326-6

TAGALAKIS, Aristides D, Mustafa M MUNYE, Rositsa IVANOVA, Hanpeng CHEN, Claire M SMITH, Ahmad M ALDOSSARY, Luca Z ROSA, Dale MOULDING, Josephine L BARNES, Konstantinos N KAFETZIS, Stuart A JONES, Deborah L BAINES, Guy W J MOSS, Christopher O'CALLAGHAN, Robin J MCANULTY a Stephen L HART, 2018. Effective silencing of ENaC by siRNA delivered with epithelial-targeted nanocomplexes in

human cystic fibrosis cells and in mouse lung. *Thorax* [online]. **73**(9), 847–856 [cit. 20-07-18]. ISSN 0040-6376. Dostupné z: doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210670

TANSKANEN, Maarit, Terhi PEURALINNA, Tuomo POLVIKOSKI, Irma-Leena NOTKOLA, Raimo SULKAVA, John HARDY, Andrew SINGLETON, Sari KIURU-ENARI, Anders PAETAU, Pentti J. TIENARI a Liisa MYLLYKANGAS, 2008. Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau: a population-based autopsy study. *Annals of Medicine* [online]. **40**(3), 232–239 [cit. 20-07-18]. ISSN 1365-2060. Dostupné z: doi:10.1080/07853890701842988

TITZE-DE-ALMEIDA, Simoneide S., Pedro Renato de Paula BRANDÃO, Ingrid FABER a Ricardo TITZE-DE-ALMEIDA, 2020. Leading RNA Interference Therapeutics Part 1: Silencing Hereditary Transthyretin Amyloidosis, with a Focus on Patisiran. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. **24**(1), 49–59 [cit. 20-07-18]. ISSN 1179-2000. Dostupné z: doi:10.1007/s40291-019-00434-w

UIJL, Estrellita, Katrina M. MIRABITO COLAFELLA, Yuan SUN, Liwei REN, Richard VAN VEGHEL, Ingrid M. GARRELDs, René DE VRIES, Marko POGLITSCH, Ivan ZLATEV, Jae B. KIM, Ewout J. HOORN, Don FOSTER a A. H. Jan DANSER, 2019. Strong and Sustained Antihypertensive Effect of Small Interfering RNA Targeting Liver Angiotensinogen. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* [online]. **73**(6), 1249–1257 [cit. 20-07-18]. ISSN 1524-4563. Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12703

VOKURKA, Martin a Jan HUGO, 2015. *Velký lékařský slovník*. Praha: Maxdorf. Jessenius, 1113 s. ISBN 978-80-7345-456-2.

WILD, Edward J. a Sarah J. TABRIZI, 2017. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *The Lancet. Neurology* [online]. **16**(10), 837–847 [cit. 20-07-18]. ISSN 1474-4465. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(17)30280-6

WILLKOMM, Sarah, Adrian ZANDER, Alexander GUST a Dina GROHMANN, 2015. A Prokaryotic Twist on Argonaute Function. *Life* [online]. **5**(1), 538–553 [cit. 20-07-18]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life5010538

WILSON, Joyce A., Sumedha JAYASENA, Anastasia KHVOROVA, Sarah SABATINOS, Ian Gaël RODRIGUE-GERVAIS, Sudha ARYA, Farida SARANGI, Marees HARRIS-BRANDTS, Sylvie BEAULIEU a Christopher D. RICHARDSON, 2003. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **100**(5), 2783–2788 [cit. 20-07-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.252758799

WILSON, Ross a Jennifer A. DOUDNA, 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics* [online]. **42**, 217–239 [cit. 20-07-18]. ISSN 1936-122X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130404

XIE, Xiangyang, Wen LIN, Mingyuan LI, Yang YANG, Jianping DENG, Hui LIU, Ying CHEN, Xudong FU, Hong LIU a Yanfang YANG, 2016. Efficient siRNA Delivery Using Novel Cell-Penetrating Peptide-siRNA Conjugate-Loaded Nanobubbles and Ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. **42**(6), 1362–1374 [cit. 20-07-18]. ISSN 1879-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2016.01.017

XIE, Xiangyang, Yanfang YANG, Wen LIN, Hui LIU, Hong LIU, Yang YANG, Ying CHEN, Xudong FU a Jianping DENG, 2015. Cell-penetrating peptide-siRNA conjugate loaded YSA-modified nanobubbles for ultrasound triggered siRNA delivery. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* [online]. **136**, 641–650 [cit. 20-07-18]. ISSN 1873-4367. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.10.004

YING, Chunxiao, Erik DE CLERCQ a Johan NEYTS, 2003. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **309**(2), 482–484 [cit. 20-07-18]. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.021

ZDROJE OBRÁZKŮ

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2002. From DNA to RNA. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition [online]. B.m.: Garland Science [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>

DING, Ye a Charles E. LAWRENCE, 2003. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Research* [online]. **31**(24), 7280–7301 [cit. 20-07-18]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkg938](https://doi.org/10.1093/nar/gkg938)

FOWLER, Samantha et al., 2013. *Concepts of biology* [online]. OpenStax College, Rice University [cit. 2020-07-15]. ISBN: 978-1-938168-22-2. Dostupné z: <https://open.umn.edu/opentextbooks/textbooks/concepts-of-biology>

GAO, Kun a Leaf HUANG, 2013. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **3**, 213–225 [cit. 20-07-18]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.apsb.2013.06.005](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.06.005)

GAVRILOV, Kseniya a W. Mark SALTZMAN, 2012. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. **85**(2), 187–200. ISSN 1551-4056.

JUDGE, Adam D., Marjorie ROBBINS, Iran TAVAKOLI, Jasna LEVI, Lina HU, Anna FRONDA, Ellen AMBEGIA, Kevin MCCLINTOCK a Ian MACLACHLAN, 2009. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **119**(3), 661–673 [cit. 20-07-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: [doi:10.1172/JCI37515](https://doi.org/10.1172/JCI37515)

LI, Siqi, Zhengping XU a Jinghao SHENG, 2018. tRNA-Derived Small RNA: A Novel Regulatory Small Non-Coding RNA. *Genes* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **9**(5), 246 [cit. 20-07-18]. Dostupné z: [doi:10.3390/genes9050246](https://doi.org/10.3390/genes9050246)

LODISH, Harvey F, Arnold BERK, Paul MATSUDAIRA, Chris A KAISER, Monty KRIEGER, Matthew P SCOTT, Stephen Lawrence ZIPURSKY a James E DARNELL, 2003. *Molecular cell biology*. New York, N.Y.: W.H. Freeman and Company, 973 s. ISBN 978-0-7167-4366-8.

NAKANISHI, Kotaro, 2016. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* [online]. **7**(5), 637–660 [cit. 20-07-18]. ISSN 1757-7004. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1356

NOWAKOWSKI, Jacek a Ignacio TINOCO, 1997. RNA Structure and Stability. *Seminars in Virology* [online]. **8**(3), 153–165 [cit. 20-07-18]. ISSN 10445773. Dostupné z: doi:10.1006/smvy.1997.0118

PASTUCHOVÁ, Markéta, 2007. 55 s. *Databáze experimentálně doložených sekundárních struktur v 5' nepřekládaných oblastech virových RNA*. Praha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

SONG, Min-Sun a John J. ROSSI, 2017. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *The Biochemical Journal* [online]. **474**(10), 1603–1618 [cit. 20-07-18]. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160759

TAGALAKIS, Aristides D, Mustafa M MUNYE, Rositsa IVANOVA, Hanpeng CHEN, Claire M SMITH, Ahmad M ALDOSSARY, Luca Z ROSA, Dale MOULDING, Josephine L BARNES, Konstantinos N KAFETZIS, Stuart A JONES, Deborah L BAINES, Guy W J MOSS, Christopher O'CALLAGHAN, Robin J MCANULTY a Stephen L HART, 2018. Effective silencing of ENaC by siRNA delivered with epithelial-targeted nanocomplexes in human cystic fibrosis cells and in mouse lung. *Thorax* [online]. **73**(9), 847–856 [cit. 20-07-18]. ISSN 0040-6376. Dostupné z: doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210670

WILLKOMM, Sarah, Adrian ZANDER, Alexander GUST a Dina GROHMANN, 2015. A Prokaryotic Twist on Argonaute Function. *Life* [online]. **5**(1), 538–553 [cit. 20-07-18]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life5010538

ZDROJE PŘÍLOH

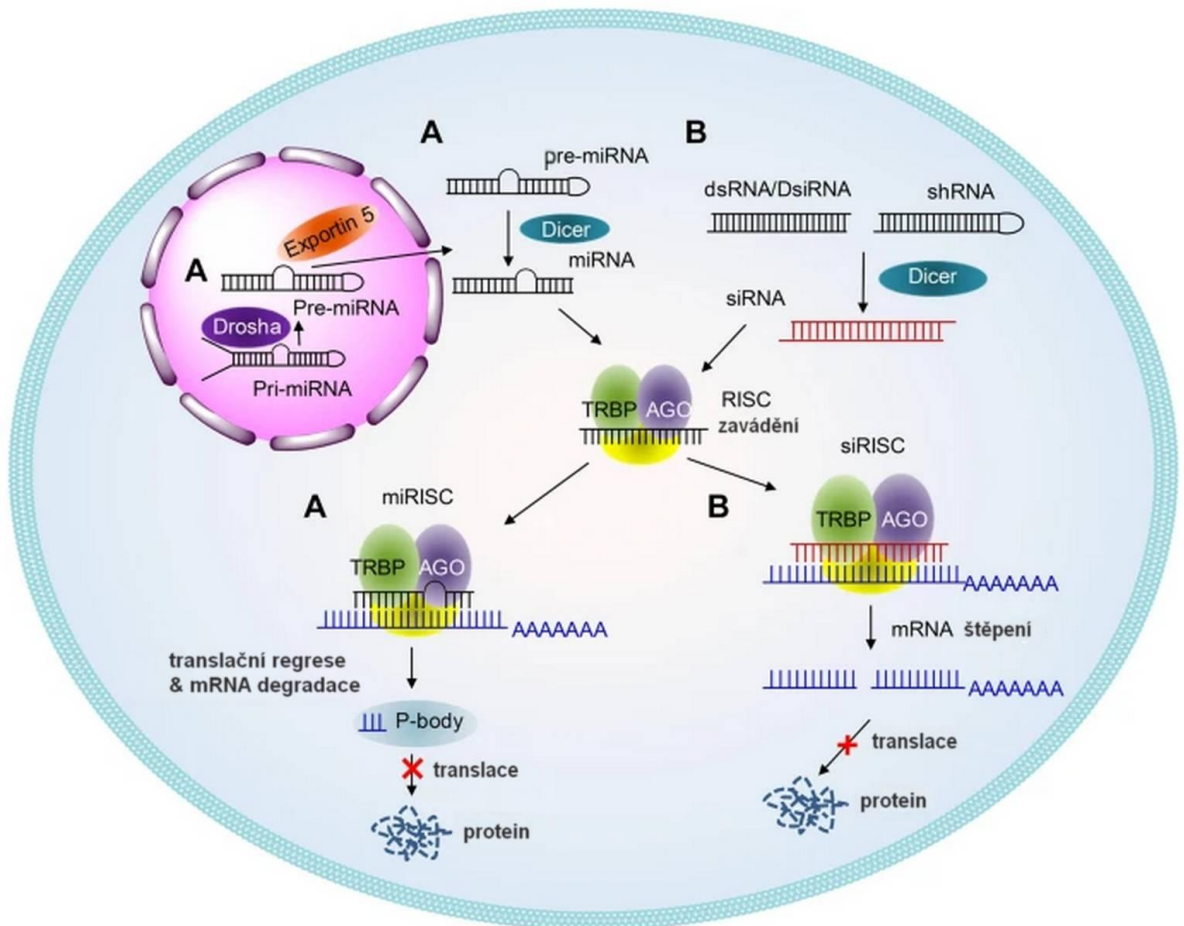
ADAMS, David, Alejandra GONZALEZ-DUARTE, William D. O'RIORDAN, Chih-Chao YANG, Mitsuharu UEDA, Arnt V. KRISTEN, Ivailo TOURNEV, Hartmut H. SCHMIDT, Teresa COELHO, John L. BERK, Kon-Ping LIN, Giuseppe VITA, Shahram ATTARIAN, Violaine PLANTÉ-BORDENEUVE, Michelle M. MEZEI, Josep M. CAMPISTOL, Juan BUADES, Thomas H. BRANNAGAN, Byoung J. KIM, Jeeyoung OH, Yesim PARMAN, Yoshiki SEKIJIMA, Philip N. HAWKINS, Scott D. SOLOMON, Michael POLYDEFKIS, Peter J. DYCK, Pritesh J. GANDHI, Sunita GOYAL, Jihong CHEN, Andrew L. STRAHS, Saraswathy V. NOCHUR, Marianne T. SWEETSER, Pushkal P. GARG, Akshay K. VAISHNAW, Jared A. GOLLOB a Ole B. SUHR, 2018. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **379**(1), 11–21 [cit. 20-07-18]. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1716153

HU, Bo, Liping ZHONG, Yuhua WENG, Ling PENG, Yuanyu HUANG, Yongxiang ZHAO a Xing-Jie LIANG, 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **5** [cit. 2020-07-20]. ISSN 2095-9907. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-0207-x

TITZE-DE-ALMEIDA, Simoneide S., Pedro Renato de Paula BRANDÃO, Ingrid FABER a Ricardo TITZE-DE-ALMEIDA, 2020. Leading RNA Interference Therapeutics Part 1: Silencing Hereditary Transthyretin Amyloidosis, with a Focus on Patisiran. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. **24**(1), 49–59 [cit. 20-07-18]. ISSN 1179-2000. Dostupné z: doi:10.1007/s40291-019-00434-w

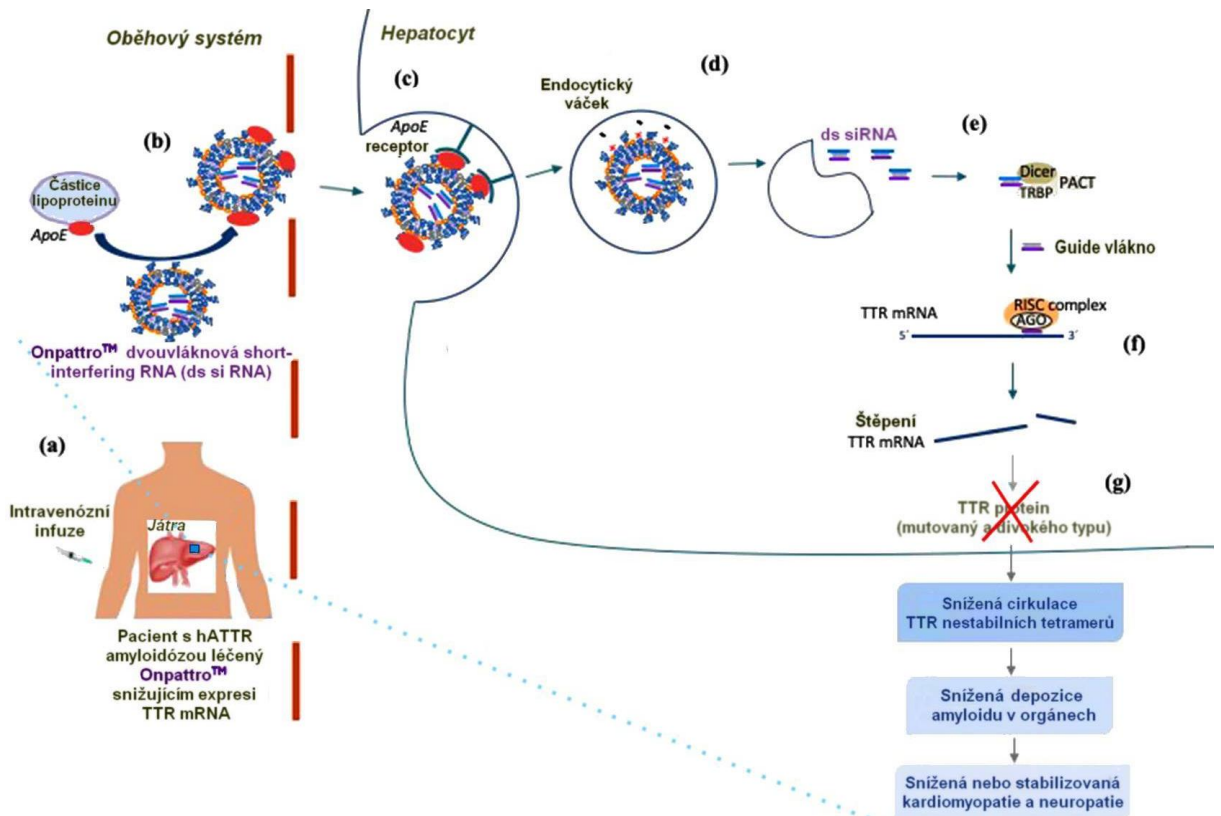
PŘÍLOHY

Příloha 1: Srovnání mechanismu působení miRNA a siRNA. Zdroj: (Hu et al., 2020)



Příloha 2: Patisiranová terapie k potlačení hATTR amyloidózy.

Upraveno: (Titze-de-Almeida et al., 2020)



(a) Pacienti s amyloidózou hATTR dostávají patisiran intravenózní infuzí.

(b) Patisiran se formuje v LNP, ty jsou opsonizovány ApoE přítomným v oběhovém systému.

(c) Opsonizované LNP se vážou na ApoE receptory v jaterních buňkách a jsou internalizovány endocytózou.

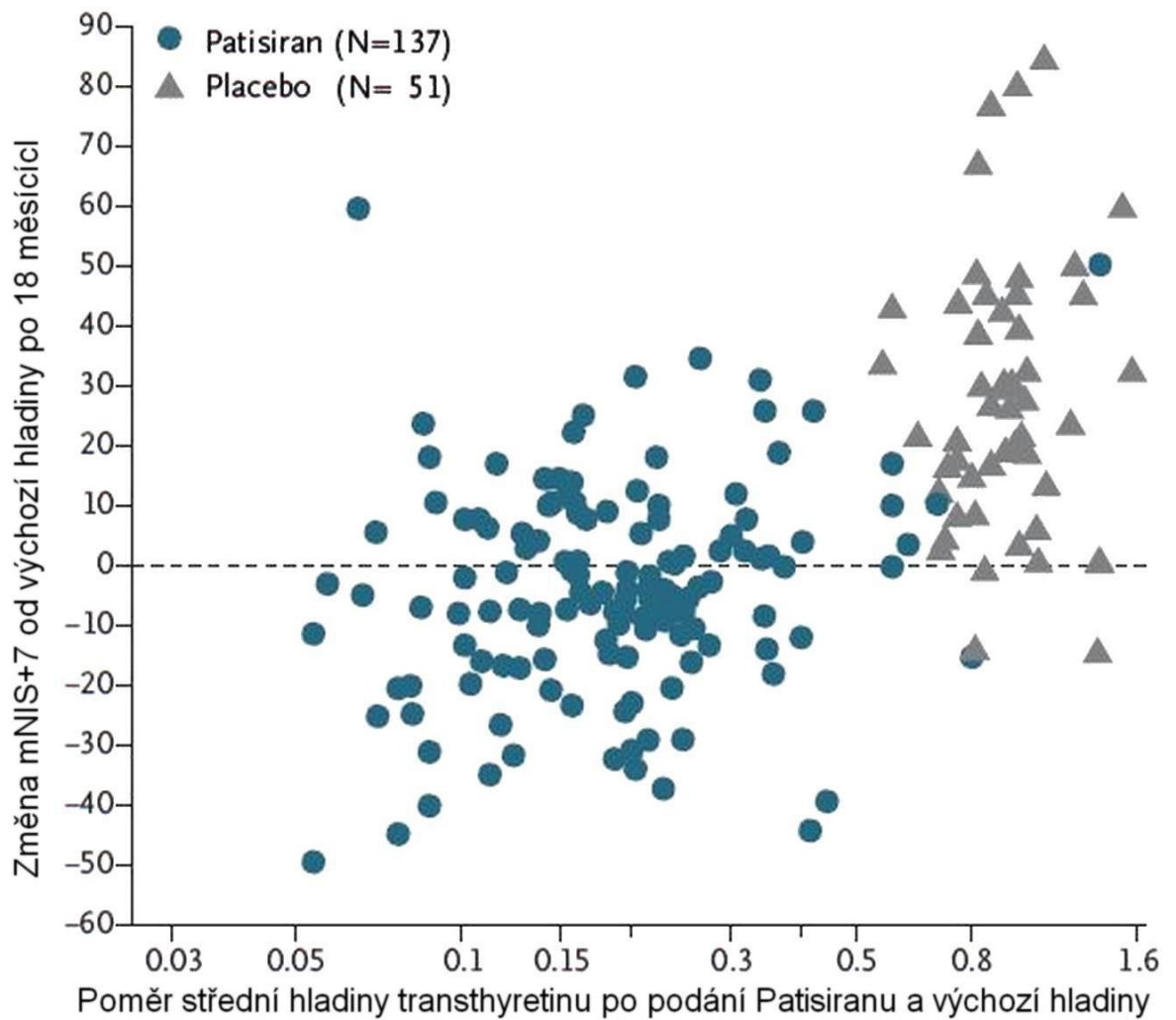
(d) Endocytické váčky obsahující LNP získávají kladný náboj protonací v důsledku jejich kyselého pH. Pozitivně nabitá LNP se vážou na negativně nabitou endozomální membránu a fúze těchto membrán dodává ds-siRNA do buněčné cytoplazmy.

(e) Dicer a pomocné proteiny (TRBP a PACT) tvoří komplex s ds-siRNA a odlučují passenger (sense) řetězec. Zbývající antisense guide řetězec TTR cílených siRNA zapojených do komplexu RISC se váže na komplementární sekvence v TTR mRNA.

(f) AGO enzym v komplexu RISC provádí TTR mRNA štěpení.

(g) Snížení exprese TTR zabraňuje hromadění abnormálních TTR amyloidních proteinů, snižuje množství nestabilních tetramerů TTR v krevním oběhu, omezuje ukládání β -amyloidů v orgánech a následně potlačuje nebo stabilizuje neurokardiopatii a kardiopatii.

Příloha 3: Korelace mezi snížením hladiny transthyretinu a změnou mNIS+7 od výchozí hodnoty po 18 měsících. Zdroj: (Adams et al., 2018)



Příloha 4: Názvy vybraných siRNA léčiv v klinických studiích ve vztahu k jednotlivým částem těla. Zdroj: (Hu et al., 2020)

