

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Staneková

Genová léčba u geneticky podmíněných neurologických chorob
Gene therapy for neurogenetic diseases

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Anna Uhrová Mészárosová, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

Mé poděkování patří RNDr. Anně Uhrové Mészárosové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Genová léčba u geneticky podmíněných neurologických chorob* zpracovala samostatně z uvedené literatury a na základě konzultací se svojí školitelkou. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Tereza Staneková

Abstrakt

Genová terapie představuje revoluční přístup k léčbě nemocí zaměřený na genetickou podstatu onemocnění. V budoucnu by se mohla stát převažujícím terapeutickým postupem u řady onemocnění. Současné schválené genové terapie se zaměřují na imunodeficiencie, nádorová bujení a dědičná hematologická a neurologická onemocnění, představují tak naději pro pacienty trpící vzácnými a dosud neléčitelnými chorobami. V současnosti je genová terapie primárně určena pro léčbu monogenních onemocnění, ale v budoucnosti by se její využití mohlo rozšířit i na oblast získaných onemocnění. Tímto způsobem může genová terapie přinést nové možnosti léčby a zlepšit kvalitu života pacientů. Pokrok v této oblasti je způsoben nejenom rozvojem genetické diagnostiky, ale také zdokonalením technik aplikace nukleové kyseliny do cílových míst, což umožňuje přesné a účinné řešení genetických vad. Bakalářská práce je zaměřena na využití genové terapie v oblasti dědičných neurologických onemocnění, jejichž prevalence stoupá v dětské i dospělé populaci. Práce také shrnuje historické události vedoucí k objevu genové terapie, metodické možnosti genové terapie a rizika s ní spojená. Poslední kapitola je věnována nejnovějšímu postupu v oblasti genové léčby, kterým je personalizovaný přístup léčby cílený na pacienty s extrémně vzácnými mutacemi.

Klíčová slova: genová terapie, editace genomu, RNA antisense oligonukleotidy, neurogenetická onemocnění, virové vektory

Abstract

Gene therapy is a revolutionary approach to treating diseases, targeting the genetic basis of disease. In the future, it could become the predominant therapeutic approach for many diseases. Current approved gene therapies target immunodeficiencies, cancers, hereditary haematological and neurological diseases, thus presenting hope for patients suffering from rare and previously untreatable diseases. At present, gene therapy is primarily intended for the treatment of monogenic diseases, but in the future its use could extend to the field of acquired diseases. In this way, gene therapy may provide new treatment options and improve the quality of life of patients. Advances in this field are due not only to the development of genetic diagnostics, but also to the improvement of techniques for the application of nucleic acid to target sites, which allows genetic defects to be addressed precisely and effectively. The bachelor thesis focuses on the use of gene therapy in the field of hereditary neurological diseases, the prevalence of which is increasing in both the pediatric and adult population. The thesis also summarizes the historical events leading to the discovery of gene therapy, the methodological possibilities of gene therapy and the risks associated with it. The last chapter is devoted to the latest advancement in gene therapy, which is a personalized treatment approach targeting patients with extremely rare mutations.

Key words: gene therapy, genome editing, RNA antisense oligonucleotides, neurogenetic diseases, viral vectors

Seznam zkratek

6MWT	six-minute walk test (šestiminutový test chůzí)
AAV	adeno-asociované viry
ADA-SCID	adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency
ALD	adrenoleukodystrofie
AMN	adrenomyeloneuropatie
ASO	antisense oligonukleotidy
BMD	Beckerova muskulární dystrofie
C	cytosin
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5
CNS	centrální nervová soustava
Crisp/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9
DMD	Duchennova muskulární dystrofie
dsRNA	double stranded RNA
EMA	European Medicines Agency (Evropská léková agentura)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficiency)
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
HSPC	hematopoietic stem and progenitor cells
IRD	inherited retinal diseases (dědičné retinální dystrofie)
IVF	in vitro fertilizace
LCA	Leberova kongenitální amauroza
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
NHEJ	non-homologous end joining
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RSV	Rous sarcoma vir
SCID-X1	X-linked severe combined immunodeficiency
siRNA	small interfering RNA
SMA	spinální muskulární atrofie
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
T	thymin
TALENs	transcription activator-like effector nucleases
TGF- β	transforming growth factor β (transformující růstový faktor beta)
TILs	tumor-infiltrating lymphocytes
TNF	tumor necrosis factor
VLCFA	very long-chain fatty acids (mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Genová terapie	2
2.1	Historické milníky	2
2.2	Metody genové terapie	5
2.2.1	Metodické možnosti genové terapie	5
2.2.2	<i>Ex vivo</i> vs <i>in vivo</i> provedení.....	6
2.2.3	Přidání genu vs editace genomu.....	7
2.2.3	Somatické vs zárodečné buňky	11
2.3	Rizika spojená s genovou terapií.....	12
3	Využití genové terapie v současnosti.....	14
3.1	Genová terapie u neurogenetických onemocnění.....	16
3.1.1	Duchennova svalová dystrofie	17
3.1.2	Spinální muskulární atrofie	21
3.1.3	Adrenoleukodystrofie.....	26
3.1.4	Retinální dystrofie	29
3.2	Personalizovaný přístup genové terapie	32
4	Závěr	34
	Seznam literatury a elektronických zdrojů.....	35

1 Úvod

Genová terapie představuje inovativní přístup v léčbě nemocí, který je založen na modifikaci genetického materiálu pacienta. Již od objevu struktury DNA v roce 1953 vědci věřili, že by nukleové kyseliny mohly sloužit jako léčebný prostředek. Avšak koncept genové terapie byl pro ně nepředstavitelný, dnes se pomalu stává realitou léčby. Terapeutický efekt genové terapie spočívá v různých metodách, jako je umlčení či snížení exprese mutovaného genu, oprava defektního genu nebo vložení genu, který nahradí defektní variantu. Existuje mnoho metod založených na DNA a RNA, přičemž systém Crispr/Cas9 patří mezi nejčastěji diskutované.

V současnosti je k dispozici několik schválených genových terapií, které přinášejí naději pro pacienty s různými chorobami. Neurologická onemocnění se v populaci vyskytují stále častěji a představují výzvu pro současnou medicínu. Překážky bránící vývoji účinného léčiva spočívají v komplexitě centrálního nervového systému a ochranné hematoencefalické bariéře. Dostupná léčba byla doposud pouze symptomatická, zaměřená na mírnění klinických projevů a zlepšování kvality života pacientů. Nicméně řada neurologických onemocnění, na které cílí genová terapie, jsou závažná a invalidizující, často charakteristická rychlou progresí a zkrácením délky života pacientů. Genová terapie je však na trhu relativně krátce, proto je stále nejasné, jak bude dlouhodobě účinná. V současnosti se také pomalu rozvíjí koncept personalizované léčby, který se zaměřuje na vývoj léčiv specificky pro jednotlivé pacienty s konkrétními genetickými mutacemi.

2 Genová terapie

Genová terapie slouží k prevenci nebo léčbě onemocnění za využití nukleových kyselin. Na rozdíl od tradičních léčebných postupů je cílena přímo na genetickou podstatu nemoci. Terapeutického účinku lze dosáhnout umlčením či snížením exprese mutovaného genu, opravou defektního genu nebo vložением genu, který v cílových buňkách nahradí defektní variantu (Herzog a Popplewell 2020).

K vývoji účinné genové terapie vede dlouhá a náročná cesta, pro kterou je zásadní identifikace mutací, které dané onemocnění způsobují a ovlivňují. Pro efektivitu a bezpečnost léčby je zapotřebí prozkoumat biologický charakter nemoci zahrnující transkriptom, proteom i metabolom, dále zjistit míru exprese kauzálního genu a identifikovat geny asociované s tímto genem. V neposlední řadě je nezbytné zvolit vhodnou metodu, jež ovlivní pouze cílové buňky či tkáň. Použitá metoda i způsob podání se odvíjí od charakteru nemoci a struktur, které postihuje (Herzog a Popplewell 2020).

V současné době lze ve státech Evropské unie použít přibližně 21 genových terapií, které byly během posledních let schváleny k terapeutickému využití Evropskou lékovou agenturou (EMA). Mezi tyto přípravky se řadí například Hemgenix k léčbě hemofilie B, Zolgensma pro pacienty trpícími spinální muskulární atrofií nebo Roctavian, který může být podáván pacientům s vážnou formou hemofilie A (European Medicines Agency 2024).

Z počátku se genová terapie zaměřovala na léčbu monogenních onemocnění, v současné době se však její aplikace pomalu rozšiřuje i na oblast získaných a multifaktoriálních onemocnění včetně infekčních nemocí a nádorového bujení (Tang a Xu 2020). Postupy genové léčby jsou stále zdokonalovány, v dnešní době je však touto formou terapie léčeno velmi málo pacientů a přípravky jsou určeny především pro léčbu vzácných onemocnění, pro která neexistuje jiná účinná terapie (Herzog a Popplewell 2020).

2.1 Historické milníky

Prvním milníkem, který započal vývoj vedoucí k objevu genové terapie, byl experiment z počátku 20. století, kdy Frederick Griffith infikoval laboratorní myš směsí různých kmenů bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Směs obsahovala živý nevirulentní R kmen a teplem deaktivovaný virulentní S kmen. Myš následkem bakteriální infekce zemřela (rozvinutí zápalu plic) a po rozboru krve myši Griffith zjistil, že došlo k transformaci nevirulentního kmene bakterie na kmen virulentní (Griffith 1928). O pár let později, v roce 1944, Oswald Avery se

svými kolegy zjistili, že transformující molekulou je DNA, nikoliv proteiny. Vědci potvrdili, že DNA může transformovat vlastnosti buněk, tedy změnit nevirulentní bakteriální kmen na virulentní (Avery et al. 1944). Dalším milníkem byl objev struktury dvoušroubovice DNA, o který se v roce 1953 zasloužili vědci J. D. Watson a F. Crick (Watson a Crick 1953). Již od objevu funkce a struktury DNA bylo cílem vědců využití lokální modifikace genomu jako možného řešení různých genetických onemocnění.

V roce 1961 přišel H. M. Temin s revoluční hypotézou, že mutace způsobené infekcí virů jsou dědičné. Ve svém experimentu využil kuřecí buňky, které infikoval Rous sarcoma virem (RSV), v genomu dceřiných buňkách poté objevil virové geny. Jelikož RSV patří mezi RNA viry, Temin tímto experimentem také vyvrátil v té době uznávanou teorii, že může docházet k výměně informace pouze mezi molekulami DNA. Svým pokusem rovněž přispěl k pozdějšímu objevu RNA dependentní DNA polymerázy (Temin 1961). Na poznatky z tohoto výzkumu navázali vědci E. H. Szybalska a W. Szybalski, kteří na pokusech se savčími buňkami zjistili, že genetické poruchy mohou být opraveny pomocí transformace a i takto opravené poruchy jsou dědičné, respektive přítomné v dceřiných buňkách (Szybalska a Szybalski 1962).

Rok 1966 byl pro vývoj genové terapie klíčový. E. Tatum přišel s myšlenkou využití virů k přenosu genu do somatických buněk a jejich využití v genové terapii. V tehdejší době však nebyly známy metody, které by umožňovaly úpravu virů tak, aby nezpůsobovaly onemocnění, ani metody k vložení terapeutického genu do virového genomu (Tatum 1966).

V roce 1968 provedli S. Rogers a jeho kolegové úspěšný přenos polyA konců do virové RNA za využití viru tabákové mozaiky jako vektoru (Rogers a Pfuderer 1968). Motivováni svým úspěchem, provedli první pokus genové terapie za účelem léčby onemocnění. Pomocí Shope papilloma viru přenesli gen pro arginázu do dvou pacientů trpících poruchou ornitinového cyklu. Experiment byl však neúspěšný a nedošlo k dosažení terapeutického účinku (Rogers et al. 1973). Později bylo díky sekvenování zjištěno, že genom Shope papilloma viru nekóduje arginázu.

V roce 1972 byl v časopise Science představen koncept genové terapie (Friedmann a Roblin 1972). První oficiální pokus o genovou terapii se uskutečnil v roce 1988 pod vedením Stevena Rosenberga. O dva roky později proběhl první klinický pokus. Cílem experimentu bylo zjistit, zda existuje klinická korelace mezi infiltrací TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) a jejich efektivitě v boji proti nádoru. Aby mohl sledovat pohyb TILs u onkologických pacientů, bylo nutné je označit pomocí markeru. Genový marker (gen kódující rezistenci k neomycinu) byl *ex vivo* přenesen pomocí retrovirového vektoru do extrahovaných TILs, a takto upravené buňky

byly transplantovány zpět do pacienta trpícího metastazujícím melanomem. Následně dostal Rosenberg povolení využít *ex vivo* upravené TILs k léčbě 2 pacientů s pokročilým stádiem rakoviny. V tomto případě byly buňky transdukovány genem kódujícím TNF (tumor necrosis factor). U pacientů došlo k zastavení růstu tumoru v místě vpravení modifikovaných buněk (Rosenberg 1992; Rosenberg et al. 1990; 1993).

Dalším významným milníkem bylo provedení genové terapie za pomoci terapeutického genu. Léčba byla aplikována pacientům s deficiencí adenosin deaminázy (ADA-SCID, MIM #102700), která vede k vážné imunodeficienci a způsobuje neschopnost pacientů čelit infekcím. K terapii byly využity *ex vivo* modifikované bílé krvinky, do kterých byl pomocí γ -retrovirového vektoru vnesen gen pro adenosin deaminázu. U pacientů však bylo pozorováno jen mírné zlepšení, některé benefity mohly být také zapříčiněny simultánním podáváním chybějícího enzymu (Blaese et al. 1995).

Důležitým rokem pro genovou terapii byl rok 1999, který její vývoj bohužel neposunul kupředu ale naopak jej zpomalil. V tomto roce došlo k úmrtí prvního pacienta (Jesse Gelsinger, Filadelfie, USA) v důsledku podání genové terapie. Tato zpráva samozřejmě způsobila, že účinnost a bezpečnost genové terapie a její využití jako léčby budoucnosti začaly být zpochybňovány. Pacient trpěl deficiencí ornitin transkarbonylasy. Příčinou úmrtí bylo multiorgánové selhání způsobené přehnanou imunitní reakcí na virový vektor, který byl ke genové léčbě využit (Stolberg 1999).

Oficiálně první účinná genová terapie byla provedena v roce 2000. Jednalo se o léčbu cílenou na X-vázanou kombinovanou imunodeficienci (SCID-X1, MIM #300400). Terapeutickým genem byl gen pro γ podjednotku cytokinového receptoru, jelikož jeho exprese u pacientů s SCID-X1 chybí. Po léčbě se však u části pacientů rozvinula leukémie jako následek inzerční mutagenese použitého retrovirového vektoru (Cavazzana-Calvo et al. 2000). U těchto pacientů bylo následně zjištěno, že se virový vektor vložil do blízkosti promotoru protoonkogenu *LMO2*, což mělo za následek aberantní transkripci genu *LMO2* (Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

Dvacáté první století s sebou přineslo nejen schválení dalších genových terapií ke klinickému využití, ale i nové metody genové terapie. První genová léčba ke klinickému využití byla schválena v roce 2003 v Číně. Genová léčba s názvem Gendicine je založena na adenovirovém vektoru a slouží k léčbě spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (Wilson 2005). V Evropě se prvního schválení dočkala genová léčba Glybera v roce 2012. Glybera se využívá u pacientů trpících hereditární deficiencí lipoprotein lipázy (MIM #238600), kteří nejsou

schopni rozštěpit lipidy přítomné v krvi. V krvi dochází k hromadění lipidů do toxických hladin, což způsobuje závažné potíže. Tato genová léčba je opět založena na virovém vektoru, tentokrát je využit vektor odvozený od adeno-asociovaných virů (European Medicines Agency 2017). V následujících letech byly postupně schvalovány další genové terapie, jako například Zolgensma určená pro pacienty se spinální muskulární atrofií či Roctavian k léčbě hemofilie A. V současné době dochází k neustálému zlepšování metod editace genomu a mnoho genových terapií je v současnosti ve fázi klinických studiích (European Medicines Agency 2024).

2.2 Metody genové terapie

Genová terapie využívá široké spektrum metod. Pro konkrétní typ onemocnění je poté zvolen postup umožňující dočasné ovlivnění exprese nebo trvalou modifikovanou expresi genu (Kaufmann et al. 2013).

2.2.1 Metodické možnosti genové terapie

Vpravení správného úseku nukleové kyseliny na místo mutace může být dosaženo třemi způsoby: 1) vpravení nahé nukleové kyseliny, 2) pomocí vektorů, 3) editací genomu.

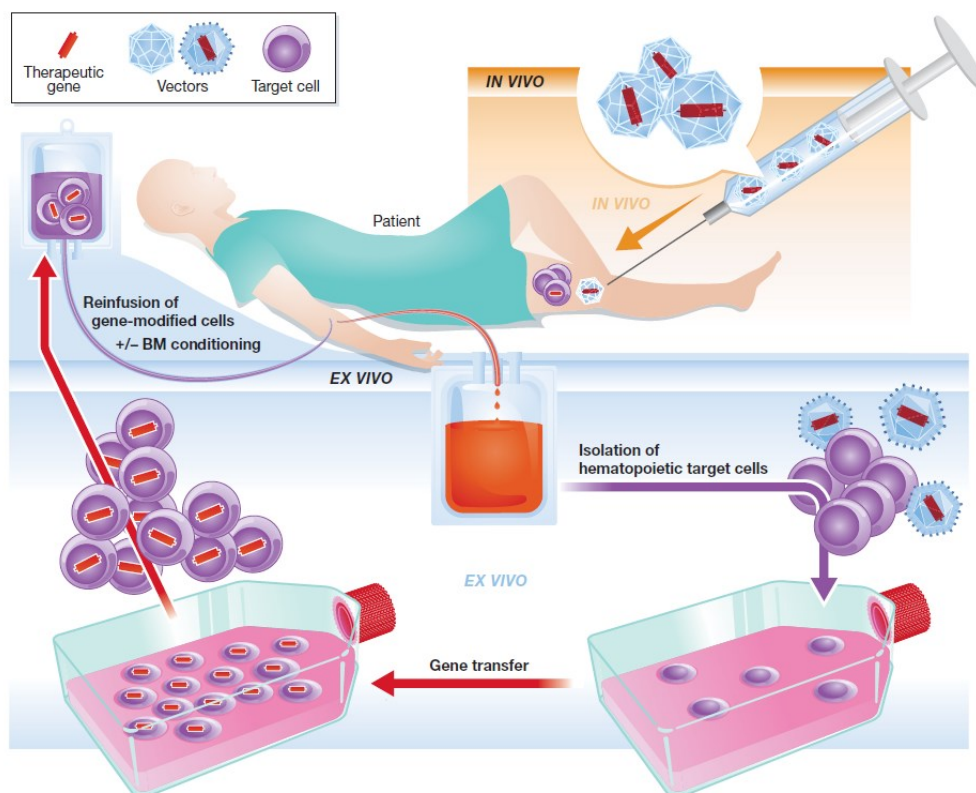
Použití nahé nukleové kyseliny (purifikovaná nukleová kyseliny, která neobsahuje proteiny, lipidy či jiné protektivní molekuly) s sebou nese mnoho problémů, které zahrnují například degradaci RNázami v séru, interakci se sérovými proteiny či tkáňově nespecifické působení (působení v jiném než cílovém místě). Díky rozvoji vědy a techniky se povedlo vyvinout metody, které překonávají zmíněné problémy (Pan et al. 2021).

Pro vnesení terapeutického genu do buněk se využívají tzv. vektory. Vektor musí splňovat několik bezpodmínečných požadavků: 1) musí efektivně a přesně uvolnit daný gen (geny) o správné délce, 2) nesmí být rozeznán imunitním systémem a 3) je nutné, aby jeho purifikace byla možná ve velkém měřítku a koncentraci. Ve zkratce musí být tyto vektory bezpečné nejen pro pacienta, ale i pro vědce a výrobce, kteří s nimi manipulují. Často jsou využívány virové vektory, které je však nutné modifikovat tak, aby nezpůsobovaly onemocnění (Gonçalves a Paiva 2017).

K editaci genomu lze použít moderní metody zahrnující specifické štěpení pomocí endonukleáz. Revolučním objevem v této oblasti byl objev systému Crispr/Cas9. Metody genové terapie jsou neustále vylepšovány a v budoucnu by mohly být využity i k léčbě dalších dědičných chorob (Gonçalves a Paiva 2017).

2.2.2 *Ex vivo* vs *in vivo* provedení

Genovou terapii lze provádět *in vivo* či *ex vivo* (**Obr. 1**). Při *ex vivo* provedení jsou nejdříve odebrány kmenové buňky pacienta, které jsou následně kultivovány a jejich genom je modifikován. Upravené kmenové buňky jsou selektovány a kontrolovány, čímž dojde ke zvýšení efektivity a bezpečnosti léčby. Následně jsou buňky transplantovány zpět do pacienta (High a Roncarolo 2019). Tento typ transplantace se liší od klasické tím, že jsou využívány autologní buňky, není tedy zapotřebí náročné hledání histokompatibilního dárce (Tang a Xu 2020). Nejčastěji jsou využívány hematopoetické buňky, které jsou odebrány z periferní krve po G-CSF mobilizaci. Do pacienta musí být injektován cytokin G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), který způsobí přesun hematopoetických kmenových buněk z kostní dřeně do krve, odkud mohou být buňky odebrány (Kaufmann et al. 2013). Jako vektory jsou nejčastěji využívány retroviry (lentiviry), pro které je charakteristická integrace do genomu hostitele. Nemoci, při jejichž léčbě je využívána *ex vivo* genová terapie, zahrnují například velkobuněčný B-lymfom (Tang a Xu 2020).



Obr. 1: *In vivo* a *ex vivo* genová terapie – při *in vivo* aplikaci je terapeutický gen vpraven do těla pacienta přímo, při *ex vivo* aplikaci dochází k izolaci a modifikaci buněk pacienta mimo jeho tělo a následnému vpravení modifikovaných buněk zpět do pacienta (autologní transplantací). Převzato z (Kaufmann et al. 2013).

Druhou variantou je provedení *in vivo*, kdy dochází k přímému vpravení kopie genu do pacienta. Při této metodě jsou nejčastěji voleny vektory odvozené od adeno-asociovaných virů, které se na rozdíl od retrovirů neintegrují do genomu hostitele. V současné době se *in vivo* genová terapie využívá například k léčbě spinální muskulární atrofie či retinální dystrofie (Tang a Xu 2020). Genová terapie může být podána intravenózně (systémové podání), inhalačně, intratekálně (lumbální punkcí do mozkomíšního moku) či injekčně do cílové tkáně (Herzog a Popplewell 2020).

2.2.3 Přidání genu vs editace genomu

K vložení nové kopie genu do buňky, a tudíž i k obnově exprese fungujícího proteinu, se využívají virové vektory. Viry jsou upraveny tak, aby po transdukci (přenosu genetického materiálu prostřednictvím viru z donorové buňky do buňky recipientní) nedocházelo k rozvoji imunitní reakce hostitele. Z virové DNA je odstraněna většina kódujících sekvencí. Dalšími požadavky, které musí vektory splňovat, jsou jednoduchá příprava a použití. Vektory jsou dále modifikovány, aby byla zvýšena efektivita přenosu genu (Scheller a Krebsbach 2009). Většina schválených genových terapií funguje na principu virových vektorů, využívají se například k léčbě těžkých forem kombinované imunodeficiency (SCID-X1, ADA-SCID) nebo k léčbě hemofilie B (MIM #306900) (Kovac et al. 2017). Mezi nepoužívanější viry se řadí adenoviry, adeno-asociované viry (AAV) a retroviry, lze však také použít bakteriofágy a podobné viry (Pan et al. 2021).

Adenoviry

Adenoviry patří mezi neobalené DNA viry, které se neintegrují do genomu. V buňkách se nachází nejčastěji ve formě episomů (extrachromozomální genetický materiál se schopností autonomní replikace, může se integrovat do chromozomu). Expze vneseného genu pomocí adenovirových vektorů je krátkodobá (Kaufmann et al. 2013). Vyznačují se stabilním genomem, poměrně velkou klonovací kapacitou a nízkou imunogenicitou. Adenoviry jsou schopné transdukce různých buněčných linií, což s sebou nese mnohostranné využití, ale také riziko toxicity v necílových tkáních (Brunetti-Pierri 2017).

Adeno-asociované viry (AAV)

Druhou skupinou jsou adeno-asociované viry (AAV), které se stejně jako adenoviry řadí mezi neobalené DNA viry. V buňce existují nejčastěji v podobě episomů, může však výjimečně docházet k jejich inzerci do genomu, a to s frekvencí 10^{-5} až 10^{-4} (integrace do hostitelského

genomu proběhne u 1 z 10 000 nebo 100 000 buněk) (Kaufmann et al. 2013). Výhodou AAV je fakt, že jsou nepatogenní, a tudíž způsobují jen mírnou imunitní reakci hostitele. S adenoviry sdílí také schopnost infikovat různé buněčné linie (Scheller a Krebsbach 2009). Vektory odvozené od této skupiny virů se využívají nejčastěji k dočasnému transferu genu do post-mitotických buněk, nejčastějšími cíli jsou sítnice, nervový systém, játra, kosterní a srdeční svalovina (Kaufmann et al. 2013).

Retroviry

Z retrovirů jsou ke genové terapii využívány γ -retroviry, lentiviry a spumaviry. Retroviry jsou na rozdíl od předchozích dvou skupin schopné integrace do genomu cílové buňky (Cotrim a Baum 2008). Využívají se u genových terapií prováděných *ex vivo*, čímž se zamezí exprese terapeutického genu mimo cílové buňky a zároveň dojde k zabránění modifikace germinální linie. Tímto postupem je také zabráněno imunitní reakci a nechtěnému vylučování léčiva metabolickou přeměnou nebo ledvinami (Kaufmann et al. 2013).

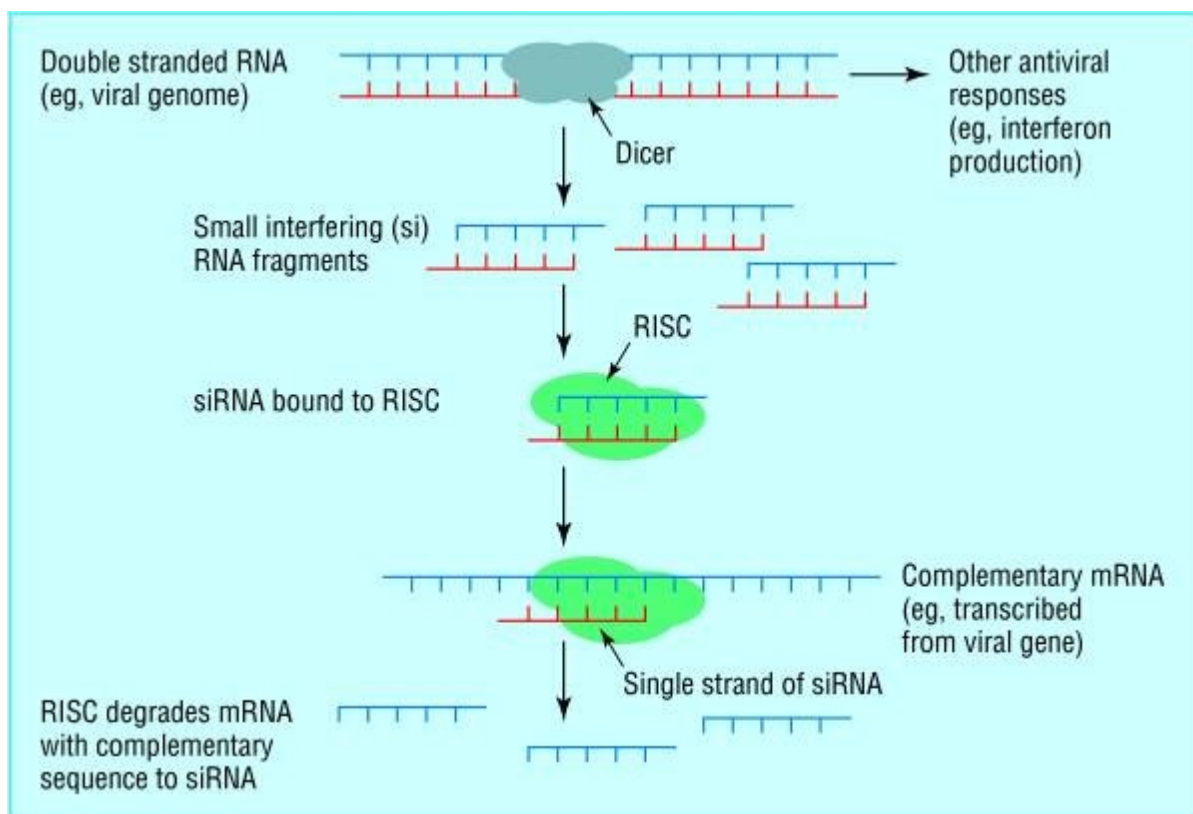
Editace genomu

Editací genomu rozumíme umělou/indukovanou změnu genetického materiálu (inzerce, delece, modifikace či výměna části nukleové kyseliny) v živém organismu. Cílem editace genomu je změna fyzických znaků či léčba onemocnění. Editace genomu může být dosaženo inhibicí exprese mutovaného genu (na úrovni mRNA), opravou defektní alely přímo v genomu nebo přidáním genu ovlivňujícího průběh onemocnění (Brunetti-Pierri 2017). K těmto postupům se využívají neviróvé vektory, jejichž výhody zahrnují dlouhodobou expresi vneseného genu, nízkou imunogenicitu, jednoduchou přípravu, poměr ceny a efektivity, možnost podání opakovaných dávek a neomezenou velikost inzertu (Scheller a Krebsbach 2009). K editaci genomu se využívá RNA interference, antisense oligonukleotidy, specificky štěpící endonukleázy a fyzikální metody (Pan et al. 2021).

RNA interference

RNA interference (**Obr. 2**) patří mezi metody editace genomu na úrovni mRNA (messenger RNA). Tento přístup je založen na přirozené schopnosti buněk inhibovat expresi specifických genů. Pokud do buňky vstoupí endogenní či exogenní dsRNA (double stranded RNA) je v cytoplazmě pomocí enzymu Dicer rozštěpena na kratší úseky zvané siRNA (small interfering RNA). Vzniklé 21 až 23 nukleotidů dlouhé fragmenty jsou navázány na RNA-induced silencing complex (RISC), jehož součástí jsou nukleázy. Pokud se siRNA komplementárně naváže na mRNA vznikající v buňce, dojde k nesespecifické degradaci dané mRNA pomocí nukleáz

v komplexu. Metoda zajišťuje vysoce specifický knock-out daného genu (Pan et al. 2021). Syntetická RNA je dopravována do buněk pomocí kationtových polymerů či jiných fyzikálních metod. Při této metodě nedochází k toxicitě v necílových buňkách, další výhodou je možné využití u širokého spektra onemocnění (Brunetti-Pierrri 2017).



Obr. 2: Mechanismus RNA interference. Převzato z (Downward 2004).

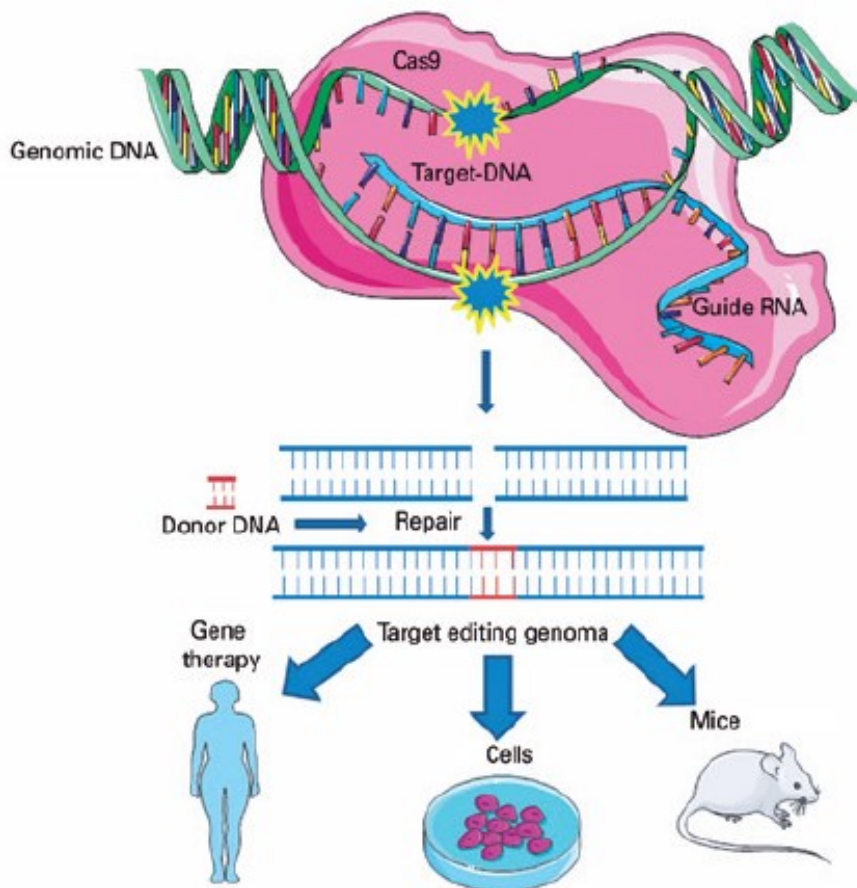
Inhibici translace specifické mRNA lze dosáhnout také pomocí miRNA (microRNA). Délka této nekódující RNA je v rozmezí 19 až 22 nukleotidů a její geny se nachází přímo v genomech eukaryotických buněk. Podílí se na regulaci genové exprese prostřednictvím degradace mRNA či inhibice translace a ovlivňuje tedy veškeré buněčné děje (Pan et al. 2021).

Antisense oligonukleotidy (ASO)

Další metodou založenou na RNA jsou antisense oligonukleotidy (ASO). Jedná se o syntetické jednovláknové RNA oligonukleotidy vážící se k cílové sekvenci na mRNA či hnRNA (heterogenous nuclear RNA). Na základě Watson–Crickova párování vzniká vazba ovlivňující expresi genu v různých fázích – od změny sestřihu hnRNA až po degradaci transkriptu (Bajan a Hutvagner 2020).

Specificky štěpící endonukleázy

Editace genomu nemusí probíhat pouze na úrovni RNA, ale i přímo na úrovni DNA. Opravy nebo vystřížení mutovaného genu nebo vložení nové alely lze dosáhnout použitím specificky modifikovaných endonukleáz, které vytvoří dvouřetězcové zlomy na přesně definovaných místech genomu. Oprava vzniklých zlomů je uskutečněna pomocí buněčných opravných systémů. Typ opravy se odvíjí od skutečnosti, zda je či není přítomna exogenní DNA. Pokud exogenní sekvence není přítomna, pak jsou zlomy opraveny pomocí NHEJ procesu, který je náchylný ke vzniku mutací a delecí v místě zlomu. Non-homologous End Joining (NHEJ) je reparační mechanismus během kterého dochází k přímé ligaci konců dvouřetězcových zlomů bez přítomnosti homologního templátu. Pokud exogenní DNA přítomna je, pak buňka zlomy opraví na základě homologní rekombinace, která vede k integraci správné sekvence (tzn. bez mutace) do specifického lokusu. První možností je v současné době často skloňovaný systém Crispr/Cas9 (**Obr. 3**), kde je specifické štěpení zajištěno tzv. guide RNA. Pokud dojde



Obr. 3: Editace genomu pomocí systému Crispr/Cas9 skládajícího se ze tří částí: nukleázy (nejčastěji wild-type Cas9 pocházející ze *Streptococcus pyogenes*), guide RNA a cílové molekuly DNA určené k modifikaci. Převzato z (Gonçalves a Paiva 2017).

k hybridizaci guide RNA a cílové sekvence na molekule DNA, pak provede v tomto lokusu nukleáza Cas9 zlomy. Systém Crispr/Cas9 slouží jako obranný mechanismus přirozeně se vyskytující u některých bakterií a archea (Pan et al. 2021). Za vynález metody editace genomu založeného na technologii Crispr/Cas9 byla v roce 2020 udělena Nobelova cena za chemii dvěma vědkyním, Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna (Gostimskaya 2022). Štěpení ve specifickém lokusu lze dosáhnout také fúzí nukleáz s DNA-vazebnými doménami. Ke specificky štěpicím endonukleázám řadíme TALENs (transcription activator-like effector nucleases) a Zinc-finger nukleázy. TALENs jsou restriční enzymy, které mohou být modifikovány tak, aby štěpily v určité sekvenci DNA. Zinc-finger nukleázy vznikají fúzí DNA-vazebné domény zvané zinkový prst s nukleázovou doménou, přesnost štěpení je dána specificky modifikovanou DNA-vazebnou doménou (Kaufmann et al. 2013).

Fyzikální metody

Fyzikální metody jsou v současnosti rychle se rozvíjející oblastí genové terapie. Nukleové kyseliny mohou být do buňky dopraveny pomocí kationtových polymerů, jejichž principem je elektrostatická interakce kladně nabitých polymerů a záporně nabitě DNA. Dalšími možnostmi jsou liposomy (sférické vezikuly ohraničené jednou či více lipidovými dvojrstvami) či endogenní vektory jako jsou ku příkladu exosomy (membránové váčky, které jsou sekretovány buňkami za účelem transportu materiálu či signalizace mezi buňkami) (Pan et al. 2021).

2.2.3 Somatické vs zárodečné buňky

Metody genové terapie lze aplikovat na somatické i zárodečné buňky. V současné době se však veškeré genové terapie schválené pro klinické použití týkají modifikace somatických buněk. Při použití somatických buněk dojde k modifikaci pouze daných buněk a úpravy se nepřenaší do další generace (Tang a Xu 2020).

V případě genových modifikací v zárodečné linii se jedná se o přímé úpravy gamet či preimplantačních embryí. Tímto postupem by bylo zamezeno přenosu onemocnění do další generace. Úprava zárodečných buněk je extrémně náročná a riziková, navíc se pojí s mnoha etickými otázkami, které nejsou dosud dostatečně ošetřeny, tudíž se zárodečné buňky ke genové terapii v současnosti nepoužívají (Tang a Xu 2020). V roce 2018 byla v Číně provedena modifikace zárodečné linie. Čínský vědec Jiankui He za využití systému Crispr/Cas9 vložil do lidských embryí alelu genu *CCR5*, která zajišťuje rezistenci vůči HIV. Tato mutovaná alela se přirozeně vyskytuje v evropské populaci a zajišťuje jejím nositelům zpomalení progresu či

rezistenci k HIV infekci. Avšak ani homozygoti v této alele nejsou stoprocentně rezistentní vůči všem kmenům HIV. Dle svých slov se vědec Jiankui He svým experimentem snažil zabránit přenosu HIV z nemocného otce na dvojčata. Kýženého výsledku lze však dosáhnout pomocí metod asistované reprodukce, které s sebou nesou výrazně menší rizika a fungují velmi spolehlivě. Vědec Jiankui He byl za své počínání potrestán čínskou vládou a tento riskantní a neetický experiment je kritizován vědci po celém světě (Wang a Yang 2019).

2.3 Rizika spojená s genovou terapií

Genová terapie disponuje velkou řadou výhod, ale jako každá jiná léčba s sebou nese i určitá rizika. Počet zaznamenaných nežádoucích účinků u pacientů, kteří se zúčastnili klinických studií, je však relativně malý. Některé dopady (například inaktivace supresorových nádorových genů inzercí virového vektoru) se mohou projevit až po určitém čase. Teprve dlouhodobé sledování ukáže, jak bezpečná a účinná léčba doopravdy je (High a Roncarolo 2019). Genová léčba se již od vzniku potýká s otázkami ohledně etiky, mnozí vyjádřili své obavy spojené s možným pokrokem metod genové terapie a jejich využitím k úpravě genetického materiálu potomků (Wirth et al. 2013).

Jedním z nejzávažnějších rizik je inzerční mutageneze způsobena virovými vektory schopnými integrace do genomu. Nespecifickou integrací může dojít k aktivaci či deaktivaci exprese necílového genu, což může mít za následek až rozvoj nádorového bujení. Jako možné řešení se nabízí použití virů, které nejsou schopné integrace jako jsou například adeno-asociované viry. Nevýhodou těchto vektorů je však limitovaný počet exprese vneseného genu. Inzerční mutagenezi lze zabránit odstraněním silných enhancerových oblastí z vektoru či modifikací retrovirového vektoru tak, aby se vkládal do specifického lokusu (Tang a Xu 2020).

Dalším rizikem, kterému je potřeba se vyhnout, je rozvinutí silné imunitní reakce hostitele. Během genové terapie jsou do těla pacienta vpravovány cizorodé látky, kterým se tělo přirozeně brání svým imunitním systémem (High a Roncarolo 2019). Snížení imunitní reakce lze dosáhnout lokálním podáním genové terapie do imunologicky privilegovaných orgánů. Pokud je k léčbě nutné systémové podání, pak lze pomocí imunosupresivních léků získat čas potřebný pro přenos genu do buněk. V neposlední řadě lze modifikací vektoru zvýšit efektivitu přenosu genu, což má za následek snížení dávky vektorů a tím i snížení míry imunitní reakce. Imunitní systém lidského těla však nereaguje pouze na virové vektory, ale i na jiné komponenty používané při genové terapii, jako jsou například endonukleázy. I v tomto případě je možné použít lokální podání do imunologicky privilegovaných orgánů či snížit imunitní reakci

pacienta podáním imunosupresiv. Další možností je použití endonukleáz pocházejících z nepatogenních bakteriálních kmenů či maskování epitopů, které spouští imunitní reakci (Tang a Xu 2020).

Závažná rizika jsou spojena s využitím genové terapie v zárodečné linii. Tato rizika zahrnují přenos nechtěných mutací do budoucí generace či vznik mozaik, tedy směsí zdravých a poškozených buněk v rámci jednoho embrya. Situaci komplikuje i fakt, že stále není znám přesný proces reparace DNA v raných embryích. V tomto případě rizika značně převažují nad výhodami, a proto je využití genomové editace v zárodečných buňkách ve více než 30 zemích zakázáno či přísně regulováno. V současné době existují levnější a bezpečnější metody, jako je například využití IVF (in vitro fertilizace), avšak žádná ze současných metod nedokáže řešit všechna onemocnění (Tang a Xu 2020).

Nežádoucí účinky se mohou projevit jako opožděná reakce, jejichž rozvinutí trvá i několik let. Genová terapie by mohla být řešením pro mnoho závažných onemocnění, je však nutné, aby byla co nejvíce prozkoumána a zamezilo se tak nežádoucím účinkům. V současné době jsou pacienti, jež obdrželi genovou terapii, dlouhodobě kontrolováni a zkoumáni. Není také dosud známo, jak dlouho efekt genové léčby potrvá, zda bude celoživotní nebo pouze dočasný (Anon. 2021a).

3 Využití genové terapie v současnosti

Genová terapie byla v minulosti považována za nepředstavitelný koncept, nyní je však realitou léčby některých vzácných a závažných onemocnění. Původně byla genová léčba cílena na monogenní onemocnění, dnes jsou ve vývoji i léčiva na získané choroby či nádorová bujení. V budoucnu by genová terapie mohla nahradit klasické přístupy léčby. Stále se však potýká s otázkami ohledně bezpečnosti a etiky, především oblast editace genomu v germinální linii zůstává velmi kontroverzní (Steffin et al. 2019).

Tab. 1: Přehled vybraných současně schválených genových terapií ke klinickému využití v EU. AAV – adeno-asociované viry, ADA-SCID – adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency, GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HSPC – hematopoietic stem and progenitor cells, siRNA – small interfering RNA. Data převzata z (European Medicines Agency 2024) a (Commissioner 2024).

Komerční název	Název léčiva	Mechanismus účinku	Onemocnění	Rok schválení EMA	Rok schválení FDA
Imlygic	talimogene laherparepvec	herpesvirus (gen kódující GM-CSF)	Melanom	2015	2015
Strimvelis	/	<i>ex vivo</i> modifikace HSPC (retrovirus)	ADA-SCID	2016	/
Spinraza	nusinersen	antisense oligonukleotid	Spinální muskulární atrofie	2017	2016
Kymriah	tisagenlecleucelum	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (lentivirus)	Nádorová onemocnění krve	2018	2017
Luxturna	voretigenum neparvovecum	AAV (gen RPE65)	Dědičná retinální dystrofie	2018	2017
Onpattro	patisiran	siRNA	Hereditární transthyretinová amyloidóza	2018	2018
Tegsedi	inotersen	antisense oligonukleotid	Hereditární transthyretinová amyloidóza	2018	2018
Yescarta	axicabtagenum ciloleucelum	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (retrovirus)	Nádorová onemocnění krve	2018	2017

Tab. 1: pokračování

Givlaari	givosiran	siRNA	Akutní hepatální porfyrie	2020	2019
Leqvio	inclisiran	siRNA	Primární hypercholesterolemie a smíšená dyslipidemie	2020	2021
Libmeldy	/	<i>ex vivo</i> modifikace HSPC (lentivirus)	Metachromatická leukodystrofie	2020	/
Oxlumo	lamasiran	siRNA	Primární hyperoxalurie 1. typu	2020	2020
Tecartus	brexucabtagene autoleucel	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (lentivirus)	Nádorová onemocnění B-lymfocytů	2020	2020
Zolgensma	onasemnogene abeparvovec	AAV (gen <i>SMN1</i>)	Spinální muskulární atrofie	2020	2019
Abecma	idecabtagene vicleucel	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (lentivirus)	Mnohočetný myelom	2021	2021
Breyanzi	lisocabtagene maraleucel	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (lentivirus)	Nádorová onemocnění leukocytů	2022	2021
Carvykti	ciltacabtagene autoleucel	<i>ex vivo</i> modifikace autologních T-lymfocytů (lentivirus)	Mnohočetný myelom	2022	2022
Roctavian	valoctocogene roxaparvovec	AAV (gen kódující faktor VIII)	Hemofilie A	2022	2023
Upstaza	eladocagene exuparvovec	virový vektor s (gen <i>AADC</i>)	Deficit dekarboxylázy aromatických L-aminokyselin	2022	/
Hemgenix	etranacogenum dezaparvovecum	AAV (gen kódující faktor IX)	Hemofilie B	2023	2022
Casgevy	exagamglogen autotemcel	<i>ex vivo</i> modifikace HSPC pomocí Crispr/Cas9	β -talasemie a srpkovitá anémie	2024	2023

V zemích Evropské unie jsou nová léčiva schvalována Evropskou lékovou agenturou (EMA), v USA plní tuto roli Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). V současné době jsou v Evropě schváleny genové léčby cílící na imunodeficienci, neurologická onemocnění, dědičná hematologická onemocnění a nádorová onemocnění (**Tab. 1**).

K roku 2021 bylo celkem ve 2. a 3. fázi klinického hodnocení přes 200 genových terapií, které by v dalším desetiletí mohly dát až 40 nových léčiv schválených pro klinické použití. Genová terapie je však kvůli vysoké ceně pro mnohé pacienty nedostupná. Cena za jednu dávku genové léčby se může vyšplhat až ke dvěma milionům dolarů (Anon. 2021b).

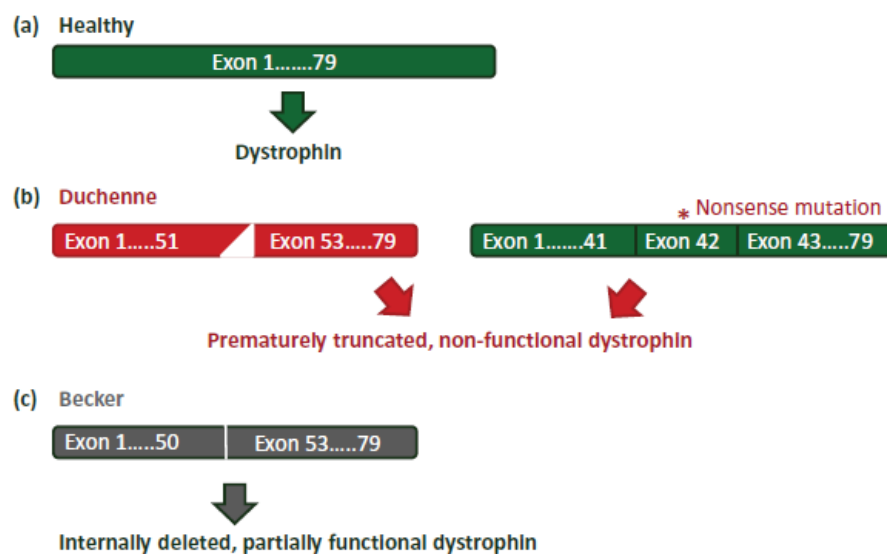
3.1 Genová terapie u neurogenetických onemocnění

Pacientů s neurologickými onemocněními neustále přibývá, a to jak v dospělé, tak dětské populaci (Paolini Sguazzi et al. 2021). Komplexita nervového systému a diagnostika v pozdějších stádiích limitují využití klasických terapeutických postupů při léčbě. Další překážkou u neurologických chorob pro dopravení léčiva do místa určení je hematoencefalická bariéra (Guan et al. 2022). Avšak genová terapie zaměřená na léčbu vzácných neurologických onemocnění se dostává ke klinickému využití a dává tak naději pacientům a jejich rodinám. V oblasti neurogenetických onemocnění jsou v současné době schváleny genové terapie například pro spinální muskulární atrofii, Duchennovu svalovou dystrofii, adrenoleukodystrofii a retinální dystofii. Léčiva jsou nejčastěji podávána intravenózně nebo intramuskulárně. Specifické dodání léčiva do mozku a překonání hematoencefalické bariéry umožňuje intratekální (lumbální punkcí do mozkomíšního moku) a intracerebroventrikulární (podání léčiva do mozkových komor, odkud se léčivo dostává do mozkomíšního moku) podání (Paolini Sguazzi et al. 2021).

Velký potenciál v této oblasti mají indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) modifikované systémem Crispr/Cas9. Tento přístup umožňuje přesný knock-out nebo opravu poškozeného genu či editaci příbuzných genů (Guan et al. 2022). Indukované pluripotentní kmenové buňky, které jsou odvozeny od krevních buněk či fibroblastů, mohou být diferencovány na motorické neurony či gangliové buňky sítnice. Hlavní překážkou při využití systému Crispr/Cas9 k editaci genomu je necílová modifikace, jejíž řešení je předmětem intenzivního výzkumu. Léčiva fungující na tomto principu prozatím nejsou dostupná na trhu (Paolini Sguazzi et al. 2021).

3.1.1 Duchennova svalová dystrofie

Duchennova muskulární dystrofie (DMD, MIM #310200) je X-vázané recesivní onemocnění, které se vyznačuje svalovou slabostí a atrofií. Tímto neuromuskulárním onemocněním trpí primárně muži, prevalence DMD je 1 : 3 500 narozených chlapců. Onemocnění je způsobeno mutací v genu pro dystrofin, proteinu nezbytného k udržení integrity sarkolemy. Mutace v genu pro dystrofin může být příčinou 2 různých typů svalových dystrofií, lehčí Beckerovy svalové dystrofie (BMD, MIM #300376) a závažnější Duchennovy svalové dystrofie (DMD) (Kole a Krieg 2015). Lehčí forma BMD s prevalencí 1 : 16 700–1 : 18 500 narozených chlapců je třikrát méně častá než DMD (Pula a Quinlivan 2020). Zatímco u DMD delece způsobí vznik mRNA kódující nefunkční protein (**Obr. 4**), u BMD delece nezpůsobí posun čtecího rámce a dochází k produkci zkráceného dystrofinu (**Obr. 4**). U pacientů s DMD je výrazně snížena doba přežití a smrt nastává kolem 20. roku věku (Kole a Krieg 2015). Délka života u pacientů s BMD nemusí být ovlivněna, u některých je však zkrácena následkem kardiomyopatie nebo respiračního selhání (Pula a Quinlivan 2020).



Obr. 4: Mutace v genu *DMD*.

(a) zdraví jedinci – normální exprese dystrofinu

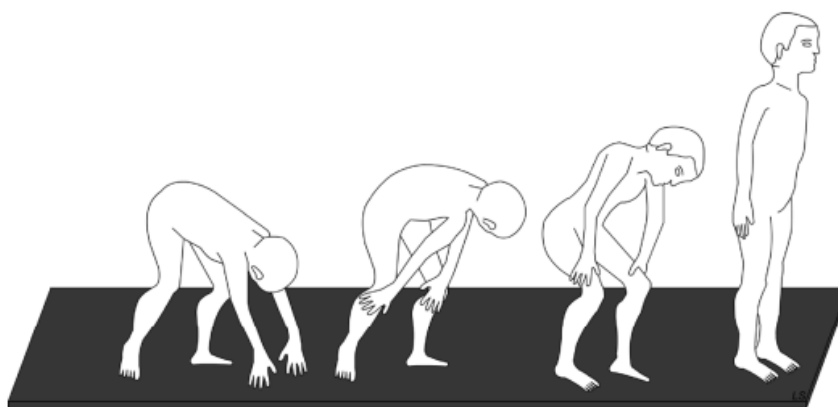
(b) pacienti s DMD – mutace narušují čtecí rámec a dochází k expresi nefunkčního dystrofinu

(c) pacienti s BMD – mutace neovlivňují čtecí rámec a dochází k expresi zkráceného, méně funkčního dystrofinu

Převzato z (Niks a Aartsma-Rus 2017).

Klinická manifestace choroby

Postupným průběhem nemoci se nejprve u chlapů rozvíjí hypertrofie svalů, později dochází ke svalové atrofii. Atrófií svalů dochází ke svalové slabosti, mimo to je nemoc doprovázena únavou, problémy s učením a motorikou. Atrófie svalů vede k postupnému rozvoji obtíží s chůzí, typické je obtížné vstávání z lehu či sedu – Gowersův příznak (**Obr. 5**). Svalová atrofie ve většině případů postupuje od proximálních k více distálním svalům. Typickým znakem Duchennovy svalové dystrofie je pseudohypertrofie lýtek zapříčiněna hromaděním vláknité tkáně a tukových zásob. U batolat je pozorována chůze po špičkách, která je způsobena právě postupným zkracováním plantárních flexorů. S postupem nemoci dochází k oslabování svalů trupu, především dýchacích svalů, jejichž snížená funkce je hlavní příčinou smrti u pacientů s DMD. Snížení respiračních funkcí je fatální v případě jeho kombinace s negativními účinky skoliózy, dalším projevem onemocnění. Příčinou mortality a morbidity mohou být také kardiomyopatie způsobené oslabením srdečního svalu a snížením respiračních funkcí. Onemocnění je diagnostikováno nejčastěji mezi 3. a 5. rokem věku. Kromě fenotypových znaků se k potvrzení diagnózy využívá biopsie svalů s typickým histologickým nálezem (Patterson et al. 2023).



Obr. 5: Gowersův příznak u pacientů s DMD – po postavení na dolní končetiny si pacienti pomáhají při zdvihu trupu opíráním o dolní končetiny (důvodem je slabost svalů trupu). Převzato z (Kaya a Sarikcioglu 2015).

Molekulárně genetická podstata nemoci a patofyziologie

Gen pro dystrofin (gen *DMD*) je umístěn na krátkém raménku chromozomu X (lokus Xq2.1). S délkou 2,4 Mb a s 79 exony a 78 introny je nejdelším lidským genem. Mutační rychlost genu pro dystrofin je 10^{-4} . U zdravých mužů vznikne spermie nesoucí mutaci v genu *DMD* přibližně každých 10 až 11 vteřin. Kvůli velikosti genu a vysoké mutační rychlosti je jedna třetina případů DMD způsobena mutací v genu *DMD* vzniklé *de novo*, zbylé dvě třetiny případů jsou mutace zděděné od matek přenašeček, které ve většině případů nemají žádné

klinické projevy (u přibližně 70 % přenašeček se vyskytuje mírně zvýšená hladina sérové kreatinkinázy) (Nussbaum et al. 2004). Nejčastějším typem mutace jsou delece v genu *DMD*, které změní čtecí rámec a vedou ke zkrácení výsledného proteinu. Ztráta dystrofínu vede k destabilizaci sarkolemy a zvýšené hladině vápníku přispívající k buněčné smrti svalové buňky. Postupně dochází ke zvyšování počtu svalových buněk, které podlehnou buněčné smrti. Tento jev je příčinou progresivní svalové slabosti, hlavního příznaku DMD (Patterson et al. 2023).

Možnosti léčby DMD

Dlouho dobu nebyla na trhu dostupná žádná léčiva určená pro pacienty s DMD. Mírného zlepšování kvality života pacientů bylo dosahováno využitím symptomatické léčby. Hlavním přístupem v léčbě je podávání glukokortikoidů spolu s fyzikální terapií (využití různých druhů fyzikální energie za účelem prevence či léčby onemocnění, nejčastěji je aplikována u poruch pohybového aparátu), respirační terapií, kardiologickou péčí, ortopedickou péčí a dietními opatřeními. Tyto postupy se snaží zlepšit kvalitu života pacienta a prodloužit jeho dobu přežití, neřeší však samotnou příčinu onemocnění (Patterson et al. 2023). V současné době nejvyužívanější glukokortikosteroidy zvyšují svalovou sílu a snižují zánět spojený s DMD, ale při dlouhodobém užívání mají značné vedlejší účinky jako osteoporóza, nežádoucí zvyšování váhy či šedý zákal (katarakta) (Markati et al. 2022).

Při posuzování účinnosti nových léčiv se k hodnocení změny stavu pacienta využívá test 6MWT, kdy se měří vzdálenost, kterou pacient ujde za 6 minut (Patterson et al. 2023). Mezi nové terapeutické postupy patří několik schválených genových terapií fungujících na různých principech (Kole a Krieg 2015). Všechna následující léčiva jsou ke klinickému využití schválena pouze v USA, EMA žádnému léčivu schválení v současnosti neudělila (European Medicines Agency 2024).

Elevidys

Přenos celého genu pro dystrofín pomocí virových vektorů je kvůli jeho dlouhé kódující sekvenci velmi náročný. Virové vektory by nebyly schopné se s tak dlouhým genomem sbalit. Vědci proto vytvořili rekombinantní geny kódující různé zkrácené varianty dystrofínu, tzv. mini-/mikro-dystrofíny, které mohou být do pacientů přeneseny pomocí AAV vektorů. U pacientů nedochází k úplnému vyléčení, ale pouze zmírnění příznaků na úroveň příznaků Beckerovy svalové dystrofie (Markati et al. 2022). Oproti standardnímu přístupu léčby glukokortikosteroidy vykazují pacienti léčení AAV mikro-dystrofínem mnohem výraznější zlepšení. Vedle dobré tolerance a vysoké efektivity s sebou genová léčba za použití

tzv. mini-/mikro-dystrofinů nese další výhodu, kterou je využití u všech pacientů s DMD bez ohledu na typ mutace (Patterson et al. 2023). Elevidys (delandistrogene moxeparvovec) je schválená genová terapie využívající AAV vektor kódující mikro-dystrofin o délce 138 kDa (oproti klasickému dystrofinu s 427 kDa). Léčba je podávána jednorázově intravenózně a její dávkování odpovídá 10 ml/kg tělesné váhy. Opakované podání léčivého přípravku není doporučeno (Hoy 2023).

Translarna

U přibližně 10 % pacientů je DMD způsobeno non-sense mutací, která způsobuje předčasné zařazení STOP kodónu a ukončení translace. Pro tyto pacienty byl vyvinut perorálně podávaný lék s názvem Translarna (ataluren), který umožňuje přeskočení předčasného STOP kodónu při translaci (Markati et al. 2022). V roce 2014 bylo tomuto léčivu uděleno schválení, které se však EMA v roce 2023 rozhodla neprodloužit kvůli množství možných rizik (European Medicines Agency 2023a).

Exon skipping metoda

K exon skipping metodě se využívají antisense oligonukleotidy (ASO), které svojí vazbou na mRNA indukují přeskočení exonu, ve kterém se vyskytuje mutace. Výsledkem je obnovení čtecího rámce a vznik mírně zkrácené formy dystrofinu. Opět nedochází k vyléčení ale pouze ke zmírnění fenotypu, ze závažného fenotypu DMD na mírnější projevy odpovídající fenotypu BMD. Většina léčiv založená na této metodě cílí na mutační hotspot, který se nachází v oblasti mezi 45 a 55 exonem (Markati et al. 2022). V současnosti jsou schváleny agenturou FDA čtyři léčiva: Exondys 51 (eteplirsen), Vyondys 53 (golodirsen), Viltepsa (viltolarsen) a Amondys 45 (casimersen) (Patterson et al. 2023).

Exon 45 skipping: Tato léčba je vhodná pro přibližně 9 % pacientů s DMD. Genová léčba cílící na exon 45 se nazývá casimersen a je podávána intravenózně v množství 30 mg/kg tělesné hmoty na týden. Casimersen je podáván jednou týdně, k zachování terapeutického účinku je nutné léčivý přípravek podávat opakovaně (Patterson et al. 2023).

Exon 51 skipping: U přibližně 14 % pacientů je příčinou onemocnění delece či mutace, která umožňuje využití exon 51 skipping přístupu. Léčivo eteplirsen má stejné dávkování a podání jako casimersen. Výhodou je malé množství vedlejších účinků, mezi vzácné nežádoucí účinky patří například koagulopatie (poruchy srážení krve), zánět či renální toxicita (poruchy funkce ledvin) (Patterson et al. 2023).

Exon 53 skipping: Mutace, u kterých je možné použít léčbu využívající exon 53 skipping metodu, jsou přítomny u přibližně 8 % pacientů s DMD. Na trhu se nacházejí hned dvě schválená léčiva fungující na tomto principu, golodirsén a viltolarsén. Viltolarsén je kratší a více potentní oligonukleotid (21-mer), kvůli délce je však jeho terapeutická dávka skoro třikrát vyšší než u golodirsenu (25-mer). Oba působí na stejnou část exonu 53. Obě léčiva se podávají intravenózně jedenkrát každý týden, k dosažení terapeutického účinku je nutné opakované podání (Patterson et al. 2023).

Budoucnost v léčbě DMD

V budoucnu by se mohly objevit další přístupy léčby DMD cílící na různé struktury. Jeden z možných léčebných přístupů budoucnosti cílí na vápníkovou homeostázu. Nestálá sarkolema (chybí ji stabilizace dystrofinem) má vyšší permeabilitu pro vápenaté ionty a jejich vysoká intracelulární koncentrace vede k buněčné apoptóze. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} je také příčinou mitochondriální dysfunkce, která je doprovázena zvýšenou produkcí ROS (reaktivní formy kyslíku, které významně přispívají k oxidačnímu stresu a mohou přímo poškodit DNA, RNA i proteiny) a zhoršením mitochondriálních dějů, jako je oxidativní fosforylace. Dalším možným cílem by mohl být myostatin patřící do rodiny TGF- β (transforming growth factor beta). Myostatin se podílí na negativní regulaci růstu svalů a jeho inhibice vede k nárůstu svalové hmoty. Všechny nové přístupy jsou však na samém začátku vývoje a jejich účinnost a bezpečnost musí být podrobena dalšímu studiu (Markati et al. 2022).

3.1.2 Spinální muskulární atrofie

Spinální muskulární atrofie (SMA) patří mezi neuromuskulární onemocnění vyskytující se převážně u dětí, výjimečně u dospělých. Jedná se o závažné onemocnění, které se vyznačuje vysokou mortalitou i morbiditou (Nicolau et al. 2021). S odhadovanou incidencí 1 : 11 000 živě narozených se SMA řadí za DMD na druhou příčku nejčastějších vrozených nervosvalových onemocnění. SMA je autozomálně recesivní onemocnění, které postihuje motorické neurony. Incidence přenašečů SMA je v naší populaci vysoká, 1 : 40 (Kolb 2011). Závažnost příznaků se odvíjí od počtu kopií genu *SMN2* a příznaky se liší u různých forem SMA: od extrémní slabosti a paraplegie novorozenců až po mírnou slabost proximálních částí těla v dospělosti (Kolb a Kissel 2015). Onemocnění se manifestuje v různé míře závažnosti od SMA typu 0 až po nejmírnější formu SMA typu 4. Jednotlivé skupiny pacientů se odlišují motorickými

schopnostmi během vývoje, u všech pacientů je však přítomna hypotonie (snížené svalové napětí), zhoršená mobilita, svalová slabost a atrofie (Erdos a Wild 2022).

SMA typ 0

Spinální muskulární atrofie typu 0 je charakteristická sníženými pohyby plodu, těžkou slabostí a hypotonií u novorozenců. Příznaky jsou přítomny již prenatálně. U nemocných novorozenců se může vyskytovat areflexie (nepřítomnost reflexů), obličejová diplegie (obrna mimického svalstva), defekty síňového septa a kloubní kontraktury (ztráta pohyblivosti kloubů). Největším problémem je respirační selhání. U většiny pacientů nedosáhne délka života 6 měsíců (Kolb a Kissel 2015).

SMA I

SMA typu I (MIM #253300) neboli Werdnig–Hoffmannovo onemocnění se vyznačuje hypotonií, špatným ovládním hlavy a snížením či chyběním šlachových reflexů. Příznaky se projevují u kojenců před 6. měsícem věku (Kolb a Kissel 2015). SMA typu I je nejčastější formou, trpí jí přibližně polovina pacientů s SMA. Pacienti s tímto typem SMA nejsou schopni samostatně sedět. Kognice není u nemocných jedinců ovlivněna (Nicolau et al. 2021). Pacienti s SMA I se bez umělé plicní ventilace dožívají v průměru 2 let věku (Kolb a Kissel 2015).

SMA II

Méně závažná SMA typu II (MIM #253550) se vyskytuje u dětí mezi 6 až 18 měsíci věku. Pacienti zvládají samostatně sedět, ale nejsou schopni samostatné chůze (Nicolau et al. 2021). Onemocnění se projevuje progresivní proximální slabostí nohou více než slabostí paží. Pacienti dále trpí různými ortopedickými problémy. Kombinací skoliózy a slábnutím mezižeberních svalů se může postupně vyvinout restrikce dýchání. Stejně jako v případě pacientů s SMA I není ovlivněna kognice (Kolb a Kissel 2015). Délka života je zkrácena, pacienti umírají ve 2.–3. dekádě života (Nicolau et al. 2021).

SMA III a IV

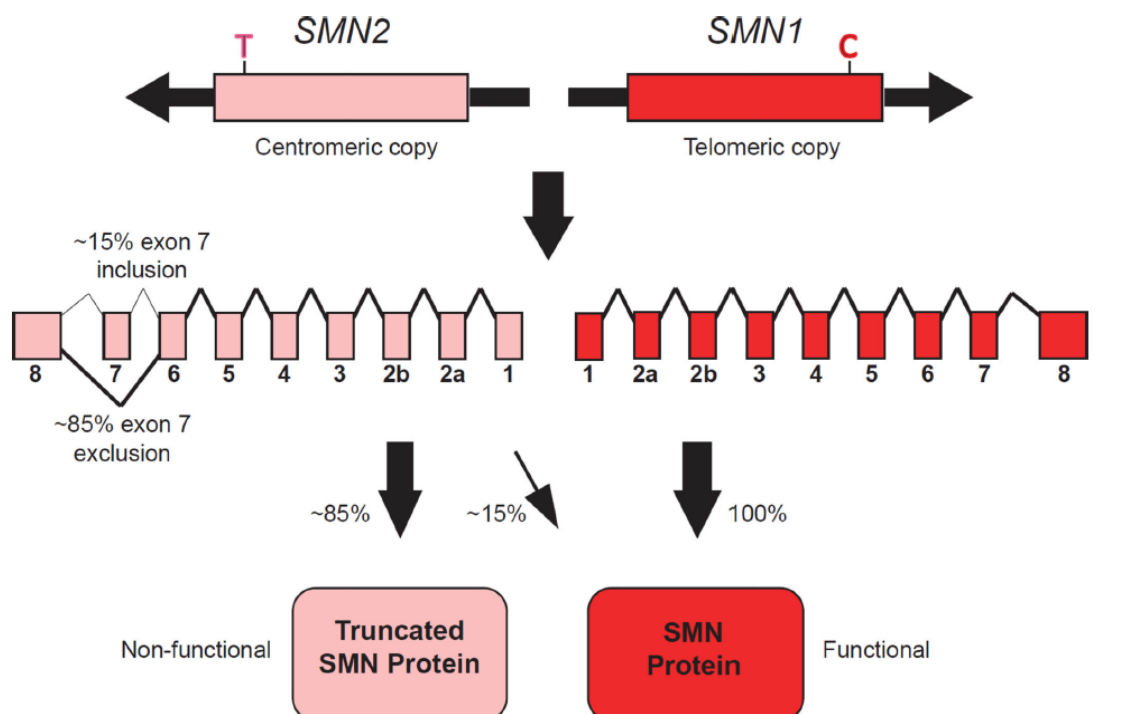
SMA typu III (MIM #253400) zahrnuje pacienty, kteří po nějakou dobu během dětství samostatně chodili. Jiným označením pro tento typ SMA je Kugelberg–Welderové onemocnění. Mezi projevy patří progresivní proximální slabost nohou, která je významnější než slabost paží a může vést i k nutnosti využití invalidního vozíku. Kognice není ovlivněna. Na rozdíl od předchozích typů většina pacientů s SMA III netrpí problémy spojenými se skoliózou a ke slábnutí dýchacích svalů u nich nedochází či dochází pouze v malé míře. Nejméně častou a nejlehčí formou je SMA typu IV (MIM #271150). Příznaky jsou podobné

jako u SMA III, ale první projevy nemoci se typicky dostávají kolem 30. roku věku či později. Doba dožití u pacientů s SMA III ani SMA IV není zkrácena (Kolb a Kissel 2015).

Včasná diagnóza nemoci umožňuje podání genové léčby před rozvinutím symptomů, čímž dojde k zajištění maximálního možného efektu terapie. U jedinců, kterým byla léčba podána presymptomaticky, bylo potvrzeno výraznější zlepšení a mírnější progresse nemoci. V mnoha státech světa je z tohoto důvodu SMA zařazena do novorozeneckého screeningu. V České republice probíhá ve všech porodnicích od 1. 1. 2022 pilotní projekt novorozeneckého screeningu. Vyšetření je plně hrazeno z veřejného zdravotního pojištění (Hejduk et al. 2022). Při screeningu jsou však detekovány pouze delece exonu 7, tudíž přibližně 5 % pacientů, u nichž je onemocnění způsobeno bodovými mutacemi, zůstává nedagnostikováno (Kolb a Kissel 2015).

Molekulárně genetická podstata SMA

Molekulární podstatou onemocnění je bíaleická loss-of-function mutace *SMN1* genu nacházejícího se na dlouhém raménku chromozomu 5 (lokus 5q13). Mutace v genu vede ve výsledku k progresivní degradaci motorických neuronů. U 95 % pacientů se vyskytuje homozygotní delece exonu 7, která vede ke vzniku zkráceného a nefunkčního SMN



Obr. 6: *SMN2* a *SMN1* gen a jejich výsledné produkty.

U pacientů s SMA se nachází mutace či delece v obou kopiích *SMN1* genu. Expresí *SMN2* genu, který je u pacientů funkční, vzniká v 85 % případů nefunkční zkrácený SMN protein (pre-mRNA neobsahuje exon 7), avšak v 15 % případů vzniká funkční SMN protein (pre-mRNA zahrnuje i exon 7). Převzato z (Kolb 2011).

proteinu (survival motor neuron). U zbylých pacientů s SMA se vyskytují jiné heterozygotní mutace v kombinaci s delecí exonu 7, pacienti jsou tedy složenými heterozygoty (Nicolau et al. 2021).

U lidí se vyskytují dvě formy *SMN* genu: telomerická forma *SMN1* a ceteromerická forma *SMN2*, která se může vyskytovat ve dvou i více kopiích. Právě počet kopií genu *SMN2* je rozhodující a zásadní v závažnosti klinických příznaků u pacientů s SMA a také limituje a určuje možnost podání genové léčby (Kolb a Kissel 2015). U zdravých jedinců transkripce *SMN1* genu vzniká mRNA transkript o plné délce, který kóduje funkční SMN protein (**Obr. 6**). Gen *SMN2* se od *SMN1* genu liší pouze nukleotidovou záměnou (C za T) v exonu 7, což vede k modifikaci sestřihu pre-mRNA. Výsledný zkrácený protein je ve většině případů nefunkční a podléhá rychlé degradaci. V 10–15 % případů nedochází při expresi *SMN2* genu k vystřížení exonu 7 a vzniká mRNA, jejíž translací vzniká funkční SMN protein (**Obr. 6**) (Kolb a Kissel 2015).

Patofyziologie SMA

U všech pacientů s SMA chybí funkční forma *SMN1* genu a jsou tedy odkázáni na málo efektivní *SMN2* gen. SMN protein je lokalizován v cytoplazmě a jádře, kde je součástí multiproteinového SMN komplexu, který hraje důležitou roli v biogenezi malých jaderných ribonukleárních proteinů (snRNP) a sestřihu pre-mRNA. Nedostatek SMN proteinu vede k selektivní degradaci motorických neuronů. Závažnost onemocnění je dána počtem kopií genu *SMN2* (viz výše, kap. Molekulárně genetická podstata SMA). Fenotyp je vedle počtu kopií *SMN2* genu však modifikován dalšími aspekty (Kolb a Kissel 2015).

Možnosti léčby SMA

Před vyvinutím cílené genové léčby byli pacienti odkázáni pouze na symptomatickou léčbu a podpůrnou péči zaměřenou především na respirační problémy, které jsou nejčastější příčinou smrti pacientů s SMA (Nicolau et al. 2021).

Spinraza

V současné době se na trhu nachází tři přípravky s terapeutickými účinky. První je Spinraza (nusinersen), jejíž princip je založen na existenci homologního genu *SMN2*. Jedná se o antisense oligonukleotidy, které svou vazbou na intron 7 brání formaci splicesomu a vystřížení exonu 7 u *SMN2* genu. Výsledkem je tedy produkce SMN proteinu o plné délce. Z chemického hlediska se jedná o syntetické 2'-O-methoxyethyl oligonukleotidy, které jsou odolné vůči degradaci v jádře, a tudíž mají relativně dlouhý poločas rozpadu. Léčivo se podává intratekálně, jelikož oligonukleotidy nejsou schopné překročit hematoencefalickou bariéru (Nicolau et al. 2021). Je

nutné jej podávat opakovaně ve více dávkách. Léčba přípravkem Spinraza je zahájena čtyřmi nasycovanými dávkami (ve dnech 0, 14, 28 a 63), udržovací dávka je podávána jednou za čtyři měsíce (European Medicines Agency 2023b). Výhodou Spinrazy je schválené podání pacientům všech věkových kategorií. Možnými nežádoucími příznaky jsou trombocytopenie (snížené množství trombocytů v krvi), problémy s koagulací, renální toxicita a problémy spojené se samotnou lumbální punkcí. Zatím však nejsou známy dlouhodobé účinky léčiva. V současnosti probíhá testování molekul, které by fungovaly na stejném principu, ale s méně invazivním způsobem podání (Nicolau et al. 2021). Nusinersen byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2016, o rok později byl schválen také Evropskou lékovou agenturou (EMA) a stal se tak prvním dostupným léčivem spinální muskulární atrofie (Erdos a Wild 2022).

Risdiplam

Nejnovějším léčivem na trhu je perorálně užívaný Evrysdi (risdiplam). Svou vazbou modifikuje sestřih pre-mRNA vzniklé přepisem *SMN2* genu za účelem zvýšení produkce funkčního SMN proteinu o plné délce (Paik 2022). Největšími výhodami léčiva Evrysdi jsou neinvazivní aplikace a systémové zvýšení exprese proteinu (tedy nejen v neuronech zacílených při intratekálním podání). Risdiplam se při perorálním podání rozšíří po celém těle, a tudíž zvýší expresi SMN proteinu v různých tkáních, nejen v CNS (Reilly et al. 2023). V EU a USA je od roku 2020 schválen pro léčbu SMA u pacientů od 2 měsíců a starších. Avšak v EU je risdiplam možné použít pouze u pacientů s klinickou diagnózou SMA typu 1, 2 nebo 3 nebo u pacientů s 1 až 4 kopiemi *SMN2* genu. Obecně je lék dobře tolerován a je potvrzeno, že zlepšuje motorické funkce u pacientů s SMA typem 1, 2 nebo 3. Dlouhodobý účinek léčiva a možné vedlejší účinky nejsou zatím dobře popsány (Paik 2022).

Zolgensma

Třetím dostupným a schváleným léčivem je Zolgensma (onasemnogene abeparvovec). Jedná se o genovou terapii, která k přenosu rekombinantního genu využívá AAV vektor. Tato genová terapie byla schválena FDA v roce 2019 a umožňuje podání dětem do 2 let s bialelickou mutací v *SMN1* genu. Evropská léková agentura (EMA) tuto genovou terapii schválila v roce 2020 a může být předepsána všem pacientům s hmotností do 21 kg bez ohledu na věk (Nicolau et al. 2021). V EU je však využití Zolgensmy omezeno na pacienty s SMA typu 1 nebo pacienty s 1 až 3 kopiemi *SMN2* genu (Erdos a Wild 2022). U pacientů, kterým je Zolgensma podávána, je často jako vedlejší účinek pozorována asymptomatická trombocytopenie a zvýšená hladina sérových transamináz. Genová léčba Zolgensma je podána jednorázově intravenózně. Po

podání se u pacientů vytvoří specifické protilátky proti použitému virovému vektoru, což znemožňuje aplikaci další dávky. Důležitou otázkou v oblasti bezpečnosti Zolgensmy je dlouhodobá toxicita způsobena over-expresí genu. U zdravých jedinců dochází v průběhu života přirozeně ke snižování exprese SMN proteinu. Vnášený transgen ale nepodléhá stejnému regulačnímu promotoru jako *SMN1* a *SMN2* gen, tudíž nedochází k postupnému úbytku proteinu, což se v budoucnu může ukázat jako nežádoucí rizikový faktor (Nicolau et al. 2021).

Rizika a budoucnost cílení léčby SMA

Po podání kteréhokoliv z uvedených léčiv pacienti stále vykazují příznaky SMA. Výhodná by mohla být kombinace léčiv, která by zajistila větší efektivitu v boji s nemocí. U zlomku pacientů byl tento postup již aplikován, jeho dlouhodobé účinky však nejsou zatím známy (Nicolau et al. 2021).

V současnosti jsou ve vývoji další léčiva, jejichž princip nevychází z exprese *SMN* genu. Jedním z možných přístupů je zacílení léčby místo motorických neuronů (které jsou při SMA degradované) na kosterní svalovinu, která je při onemocnění SMA primárně postižena. Tento postup by mohl přinést řešení pro některá další závažná neuromuskulární onemocnění. Léčba by cílila na zlepšení funkce kosterního svalstva a na oddálení nástupu příznaků svalové slabosti. Takového výsledku by mohlo být dosaženo například inhibicí myostatinu či aktivací troponinu (Nicolau et al. 2021).

3.1.3 Adrenoleukodystrofie

Adrenoleukodystrofie (ALD, MIM #300100) je X-vázané neurodegenerativní onemocnění způsobené mutacemi v genu *ABCD1*. X-vázaná ALD patří mezi nejčastější peroxisomální onemocnění, odhadovaná incidence je 1 : 17 000 narozených (Bezman et al. 2001). Onemocnění je typické heterogenním klinickým spektrem, ALD se může projevit jako rychle progredující závažná až letální adrenoleukodystrofie (postupná degenerace určitých částí mozku) nebo jako mírnější adrenomyeloneuropatie (degenerace části míchy) s nebo bez adrenální insuficience (dysfunkce kůry nadledvin: Addisonova nemoc) nebo jako Addisonova nemoc samostatně. Kvůli spektru projevů a jejich různé závažnosti je diagnostika ALD velmi komplikovaná, často je také zaměňována za jinou diagnózu jako je např. roztroušená skleróza. U některých jedinců s mutacemi v genu *ABCD1*, převážně žen, se příznaky neprojeví a zůstávají tak asymptomatictí celý život (Moser et al. 2007; Engelen et al. 2014).

Cerebrální forma adrenoleukodystrofie (ALD)

Ženy i muži nesoucí mutace v genu *ABCD1* se rodí bez příznaků s normálně funkčním mozkiem. Proces myelinizace probíhá u těchto jedinců normálně a bez vývojového zpoždění. Rychle progredující fatální demyelinizace se však objeví u 60 % mužů s ALD (Turk et al. 2020). Z počátku je klinická manifestace nenápadná (neklid, problémy s pozorností, emoční labilita aj.), postupně však u pacientů dochází ke zhoršení jemné motoriky a k rozvoji poruch sluchu a zraku. S postupnou degradací a demyelinizací určitých částí mozku dochází k rozvoji poruch chůze a motoriky horních a dolních končetin. Cerebrální forma je charakteristická rychlou progresí, kdy bez podání léčby končí pacienti ve vegetativním stavu, nebo umírají v průměru do 2 let od prvních symptomů onemocnění. V případě podávání léčby je doba dožití prodloužena, v průměru umírají do 10 let (Engelen et al. 2012; Turk et al. 2020).

Adrenomyeloneuropatie (AMN)

Onemocnění se u největšího procenta jedinců s mutacemi v genu *ABCD1* projeví jako mírnější, pomalu progredující adrenomyeloneuropatie (AMN), kdy dochází k degradaci určitých částí míchy. Mezi příznaky AMN patří spastická chůze (porucha chůze způsobena poškozením kortikospinálních drah, které jsou zodpovědné za tlumení svalového tonu), periferní neuropatie (poškození periferních nervů) a erektilní dysfunkce. K rozvoji symptomů myeloneuropatie dochází také u velké části žen, které jsou heterozygotními nositelkami mutací v genu *ABCD1*. Příznaky u postižených žen bývají mírnější a často omezené na poruchy chůze, vzácně dochází k poškození mozku a rozvoji adrenální insuficience (Moser et al. 2007; Engelen et al. 2012).

Adrenální dysfunkce (Addisonova nemoc)

Obecně hrozí u 80 % mužů s ALD celoživotní adrenální insuficience (dysfunkce kůry nadledvin) a jejich selhání. Adrenální dysfunkce však může být i jediným projevem ALD. Neléčená adrenální dysfunkce může vyústit v Addisonskou krizi (akutní nedostatečná činnost kůry nadledvin) s možným fatálním průběhem (Engelen et al. 2012).

Molekulárně genetická podstata a patofyziologie ALD

X-vázaná adrenoleukodystrofie je způsobena mutacemi genu *ABCD1*, který se nachází na chromozomu X (lokus Xq28). Je identifikováno přes 900 různých mutací v genu *ABCD1* vedoucích k rozvoji X-ALD. Doposud však nebyl nalezen žádný vztah mezi genotypem a fenotypem, jedinci se stejnou mutací se mohou lišit typem i závažností příznaků (Gupta et al. 2022). U většiny pacientů pocházejí mutace od jednoho z rodičů, pouze u minima pacientů se jedná o mutace vzniklé *de novo*. Gen kóduje ABCD1 protein (ATP binding cassette subfamily

D member 1), známý též jako ALDP. Protein ABCD1 patří do rozsáhlé rodiny transmembránových ATP vázajících proteinů, které se významně podílí na transportu různých substrátů přes extra i intracelulární membrány. Úkolem ABCD1 proteinu je transport mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA, very long-chain fatty acids) z cytosolu do peroxisomů, kde probíhá jejich odbourávání procesem β -oxidace. Většina VLCFA je syntetizována v organismu, pouze minimální podíl VLCFA pochází ze stravy. V případě mutace v genu *ABCD1* a vzniku defektního ATP vázajícího proteinu nedochází k transportu VLCFA do peroxisomů, a tudíž ani k jejich odbourávání. VLCFA se při onemocnění hromadí v krevní plazmě a v buňkách prakticky všech tkání, nejvíce je kumulací mastných kyselin zasažena tkáň mozku, míchy, kůry nadledvin a také Leydigovy buňky ve varlatech (Turk et al. 2020). Vysoká koncentrace VLCFA v buňkách při adrenoleukodystrofií je příčinou vzniku oxidativního stres, který vede ke spuštění procesu apoptózy. Procesem apoptózy velkého množství neuronů dochází k postupné demyelinizaci bílé hmoty. Vzniklý oxidativní stres má také za následek poruchu funkce mitochondrií v míšních nervech, což vede k poruchám axonálního transportu. U většiny mužů i žen s AMN jsou postiženy také periferní nervy. Apoptóza buněk v kůře nadledvin vede ve výsledku ke snížení produkce kortikosteroidních hormonů (kortizol a aldosteron). K diagnostice pacientů se využívá stanovení hladiny VLCFA v plazmě, avšak u přibližně 20 % žen s mutacemi v genu *ABCD1* nedochází k hromadění VLCFA v plazmě, a tudíž je diagnostika těchto žen odkázána pouze na genetické vyšetření (Engelen et al. 2012).

Možnosti léčby ALD

Jako standardní léčivo ke snížení hladiny VLCFA se u pacientů s ALD, AMN i bezpříznakových jedinců využívá Lorenzův olej (tekutá směs olejů glycerol-trioleát a glycerol-trierukát v poměru 4 : 1) v kombinaci s nízkolipidovou dietou. Tímto přístupem lze snížit hladinu VLCFA pouze v plazmě, ale nikoliv v postižených tkáních, tudíž využití Lorenzova oleje s nízkolipidovou dietou nevede ke zlepšení funkcí endokrinního ani nervového systému. U pacientů s adrenální dysfunkcí je jedinou volbou substituční léčba kortikosteroidy (Turk et al. 2020).

Nové možnosti léčby pacientů s ALD zahrnují transplantaci krvetvorných buněk a genovou terapii Skysona. Nevýhodou transplantace hematopoetických buněk je limitace využití pouze u pacientů s cerebrální formou v určité klinické fázi onemocnění. Léčba je založena na schopnosti mikroglíí, vzniklých z hematopoetických buněk, normálně odbourávat VLCFA v peroxisomech, a tak zastavit proces demyelinizace. Při úspěšné transplantaci se stabilizace

bílé hmoty dostaví během 6–12 měsíců po zákroku. U pacientů s AMN či s adrenální dysfunkcí nevede transplantace ke zlepšení zdravotního stavu. Transplantaci hematopoetických buněk nelze provést před projevem příznaků, proto je nutné jedince s mutacemi v genu *ABCD1* monitorovat (Eichler et al. 2017).

Skysona

Genová terapie Skysona (elivaldogene autotemcel) byla schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2022 k léčbě dětí (chlapců) ve věku 4–17 let s časnou mozkovou adrenoleukodystrofií. Skysona byla v roce 2021 schválena také Evropskou lékovou agenturou (EMA), avšak schválení nebylo prodlouženo a v současné době se k léčbě ALD v Evropě nevyužívá. Léčivý přípravek Skysona je podáván v případě, kdy není k dispozici vhodný dárcce hematopoetických kmenových buněk. Skysona obsahuje jako léčivou látku autologní CD34+ buňky získané z kostní dřeně nebo krve pacienta. Odebrané buňky CD34+ jsou následně modifikovány tak, aby obsahovaly zdravou kopii genu *ABCD1*. Vnesení kopie genu *ABCD1* do CD34+ buněk je umožněno pomocí lentivirového vektoru. Přípravek se podává intravenózně jednorázově. Jelikož se jedná o autologní transplantaci, léčba může být podána pouze tomu pacientovi, jehož kmenové buňky byly na přípravu využity. Modifikované CD34+ buňky se zachytí v kostní dřeni pacienta, kde začnou tvořit bílé krvinky, které jsou schopné exprimovat ABCD1 protein. Bílé krvinky se následně rozšíří po celém těle, odbourávají VLCFA a zmírňují příznaky onemocnění. Dlouhodobý účinek léčivého přípravku Skysona není zatím znám (European Medicines Agency 2022).

3.1.4 Retinální dystrofie

Dědičné retinální dystrofie (inherited retinal diseases, IRD) zahrnují rozmanitou skupinu dědičných onemocnění sítnice (retina) se spektrem různých klinických i genetických příčin. V současné době bylo identifikováno více než 300 genů vedoucích k retinální dystrofii. Dědičné poruchy zraku jsou zapříčiněny dysfunkcí a degenerací fotoreceptorů (čípků a tyčinek), pigmentového epitelu sítnice nebo poruchami cévnatky (Hu et al. 2021). Degenerace buněk sítnice je často nezvratná. Klinické projevy zahrnují noční slepotu, barvoslepost, vady periferního vidění a postupnou ztrátu zraku (Chiu et al. 2021). Dědičnými retinálními dystrofiemi trpí 1 z 2000 jedinců celosvětově a stávají se tak hlavní příčinou slepoty především v západním světě. První symptomy se mohou projevit kdykoliv během dětství i dospělosti. Překážkou v diagnostice pacientů s retinálními dystrofiemi je fakt, že různé mutace v odlišných

genech vedou ke stejnému fenotypu a pacienti se stejnými mutacemi mohou vykazovat různé fenotypy i v rámci jedné rodiny (variabilní expresivita). Mezi nejčastější retinální dystrofie patří retinitis pigmentosa, Leberova kongenitální amauroza, choroideremie, makulární dystrofie a achromatopsie (Hu et al. 2021).

Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa je nejčastějším subtypem retinální dystrofie s prevalencí 1 : 4 000. Onemocnění je způsobeno degradací fotoreceptorů. U pacientů se typicky vyskytují problémy s nočním viděním (šeroslepost) a periferní zúžení zorného pole, které může vést ke ztrátě centrálního vidění až k slepotě (Georgiou et al. 2021).

Leberova kongenitální amauroza

Leberova kongenitální amauroza (LCA) je geneticky heterogenní skupina onemocnění způsobujících ztrátu zraku, nystagmus (rytmické a vůlí nekontrolovatelné pohyby očíh bulbů) a abnormální výsledky elektroretinogramu. První projevy onemocnění se objevují v nízkém věku. Příčinou LCA není mutace pouze v jednom genu, kauzálních genů bylo identifikováno přes 18 (Hu et al. 2021). U některých mutací může dojít ke zpoždění neurologického, intelektuálního či psychomotorického vývoje. LCA s prevalencí mezi 1 : 30 000 až 1 : 81 000 tvoří 5 % všech dědičných retinálních dystrofií. Leberova kongenitální amauroza typu 2 (MIM #204100) je způsobena mutacemi v genu *RPE65*, které jsou příčinou také retinitis pigmentosa. Gen *RPE65* se nachází na krátkém raménku chromozomu 1 (lokus 1p31) a kóduje protein, který se podílí na regeneraci zrakových pigmentů fotoreceptorů sítnice (Chiu et al. 2021).

Choroideremie (MIM #303100)

Choroideremie je X-vázané onemocnění typické atrofíí cév v cévnatce. Příčinou choroideremie jsou mutace v *CHM* genu (Hu et al. 2021).

Makulární dystrofie (Stargardtova choroba a jiné)

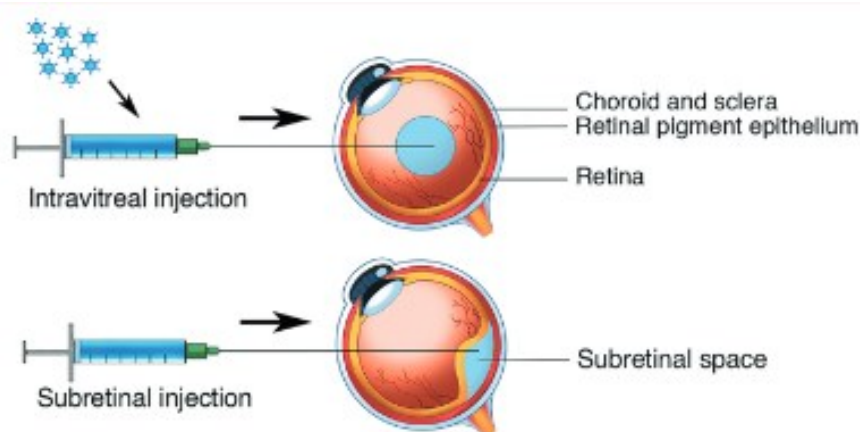
Pro fenotyp makulární dystrofie je typické snížené centrální vidění způsobené progresivní atrofíí žluté skvrny (*macula lutea*) (Georgiou et al. 2021).

Achromatopsie

Achromatopsie se řadí mezi autosomálně recesivní onemocnění s mutacemi v genech klíčových pro fototransdukční kaskádu čípků. Pacienti s achromatopsií vykazují světloplachost, sníženou zrakovou ostrost, špatné barevné vidění a nystagmus (Georgiou et al. 2021).

Možnosti léčby IRD

Rozvoj metod molekulární biologie v posledních letech, zejména next-generation sequencing, významně přispěl ke zlepšení genetické diagnostiky umožňující odhalení kauzálních genů a jejich mutací vedoucích k IRD. Pokrok v genetické diagnostice spolu s pokrokem v aplikaci nukleové kyseliny potažmo genové terapie do sítnice pohání výzkum v oblasti genové terapie cílené na dříve neléčitelné IRD. Výhodami aplikace genové terapie do oka jako orgánu je snadný přístup a snadná lokalizace do jednotlivých částí oka. Oko patří mezi imunoprivilegované orgány a spolu s hematoretinální bariérou je snižené riziko nežádoucího systémového rozšíření. Malá velikost oka také umožňuje použití menší dávky upraveného genetického materiálu, což opět přispívá ke snížení rizika imunitní reakce. Buňky sítnice během života neprocházejí proliferací, tudíž jednorázové podání genové terapie zajišťuje dlouhodobou



Obr. 7: Aplikace genové léčby u retinální dystrofie – intravitreální injekce (do sklivce) a injekce do subretinálního prostoru. Upraveno a převzato z (Hu et al. 2021).

expresi vneseného genu. Nejčastěji se jako vektory využívají adeno-asociované viry. Genovou léčbu lze aplikovat 2 způsoby (**Obr. 7**): 1) injekce do subretinálního prostoru, a 2) intravitreální injekce (podání léčiva do sklivce). Injekce do subretikulárního prostoru je invazivní a náročný chirurgický zákrok, avšak podání léčiva přímo do subretikulárního prostoru přináší dlouhodobější účinek než podání do sklivce (Hu et al. 2021).

Luxturna

První komerčně využívanou genovou léčbou v oblasti dědičných retinálních dystrofií byla Luxturna (voretigenum neparvovecum) fungující na principu přenosu genu *RPE65* pomocí AAV vektoru. Luxturna byla schválena v roce 2017 americkým FDA, v Evropě byla Evropskou lékovou agenturou schválena v roce 2018. Luxturna je určena k léčbě Leberovy kongenitální

amaurózy typu 2 (LCA2) a podskupiny autosomálně recesivních retinitis pigmentosa (Hu et al. 2021). Expresí genu *RPE65* vzniká enzym all-trans-retinyl izomeráza, který je klíčový pro správné fungování buněk sítnice. Přípravek Luxturna se podává formou jednorázové injekce do subretinálního prostoru. Nežádoucími vedlejšími účinky genové léčby Luxturna jsou zvýšený nitrooční tlak, katarakta (šedý zákal) a hyperemie spojivky (překrvení a následné zrudnutí oka) (European Medicines Agency 2023c). V současnosti probíhá vývoj dalších léčiv založených nejčastěji na vpravení zdravé kopie genu *RPE65* pomocí AAV vektoru. Ve výzkumu jsou také léčiva založena na principu RNA antisense oligonukleotidů (úprava sestřihu pre-mRNA) či na principech genové editace pomocí systému Crispr/Cas9 (Chiu et al. 2021).

V současné době se ve fázi klinických testů nachází nadějná léčiva cílicí na další retinální dystrofie jako je choroideremie či achromatopsie. Většina testovaných léčiv funguje stejně jako Luxturna, tedy na principu přenosu fungující kopie genu pomocí AAV vektoru (Hu et al. 2021).

3.2 Personalizovaný přístup genové terapie

Nové terapeutické přípravky na bázi genové terapie cílí na vzácná onemocnění s relativně vysokou prevalencí, pro jedince s velmi vzácnými variantami či neobvyklými mutacemi stále není žádná dostupná terapie. Léčbou budoucnosti by mohly být antisense oligonukleotidy (ASO) specificky vyrobené pro konkrétního pacienta s konkrétní mutací. Tento přístup je úplnou novinkou a dostal název N-of-1 (number-of-one) treatment, neboť by se jednalo o genovou léčbu připravenou na míru jednomu konkrétnímu pacientovi. Za tímto účelem vzniklo evropské konsorcium 1M1M (1 Mutation 1 Medicine), které se snaží takovou léčbu přiblížit pacientům s velmi vzácnými typy onemocnění, u kterých byla nalezena konkrétní kauzální genetická příčina (Synofzik et al. 2022).

Prvním léčivem přizpůsobeným potřebám jednoho konkrétního pacienta bylo léčivo milasen, které celý terapeutický přístup inspirovalo (Aartsma-Rus et al. 2023). Milasen byl využit k léčbě dětského pacienta, dívky Mily (dle ní bylo léčivo nazváno milasen), s neuronální ceroid lipofuscinózou typu 7 (MIM #610951), která patří mezi vzácné neurodegenerativní onemocnění s fatálním průběhem. Projevem onemocnění je slepota, ataxie (porucha koordinace pohybů), záchvaty, křeče a opožděný vývoj. U dívky byla genetickou příčinou nemoci mutace v kryptickém sestřihovém místě v genu *CLN7*, které bylo při použití genové terapie překryto komplementárním 22 nukleotidů dlouhým ASO. Při aplikaci byla použita veškerá technologie jako u léčiva nusinersen (léčivo SMA, viz kap. 3.1.2, Spinraza). Léčivo se podává intratekálně

stejně jako nusinersen (Kim et al. 2019). Od té doby byla na míru připravená genová léčba použita ještě u pacientů s onemocněním ataxia-telangiectasia (léčivo atipeksen), a také u 26leté pacientky Jaci Hermstad diagnostikované s onemocněním amyotrofická laterální skleróza s kauzální mutací v genu *FUS*. Léčivo bylo nazváno jacifusen, pacientka i přes podání léčby zemřela (Synofzik et al. 2022).

Na míru připravované antisense oligonukleotidy by představovaly řešení pro pacienty se vzácnými onemocněními, pro které nejsou v současnosti dostupná léčiva. ASO ovlivňují transkript cílového genu a způsobují obnovu exprese funkčního proteinu nebo snižují produkci toxického produktu. Princip celého konceptu je takový, že k léčbě je použita stejná technologie jako u genové léčby, která již prošla náročným procesem schvalování a všemi fázemi klinických studií. Personalizovaná genová léčba cílená na konkrétního pacienta by se technologicky od schválené genové léčby lišila pouze použitým ASO, který by byl komplementární dle Watson–Crickova párování na oblast konkrétní mutace u konkrétního pacienta. Prozatím se projekt zaměřuje na sestřihové mutace s použitím technologie léčiva nusinersen, schválené FDA i EMA.

Překážkou vývoje léčiv pro vzácná onemocnění je malé procento nemocných (často i jednotlivci v celosvětovém měřítku), které znemožňuje objektivní hodnocení efektivity léčby pomocí klinických studií. Efektivita je proto ověřována v rámci historie onemocnění konkrétního pacienta (porovnává se stav pacienta před podáním léčby a po podání léčby) (Aartsma-Rus et al. 2023). Tento fakt komplikuje i související etické a právní aspekty. Zatímco ve Spojených státech amerických je povolení takové léčby složitější a možné podání musí projít agenturu FDA, evropská legislativa umožňuje díky Článku 5(1) 2001/83 (EC) poskytnout neregistrovaný léčivý přípravek pacientům s život ohrožujícím stavem, kde neexistuje jiná alternativní léčba. Taková léčba je pak vedena ve výzkumném režimu a nemůže se stát obchodním artiklem (Synofzik et al. 2022; Aartsma-Rus et al. 2023). Podání experimentální léčby, pokud neexistuje žádná registrovaná, je dále v Evropě eticky ospravedlnitelné díky Helsinské deklaraci etických zásad pro lékařský výzkum s účastí lidských bytostí (Declaration of Helsinki, #37) (World Medical Association 2013).

4 Závěr

Principem genové terapie je ovlivnění genetické podstaty onemocnění skrze umlčení mutovaného genu, opravy defektního genu či vložení nových genů. Klíčovým krokem je identifikace mutací způsobujících onemocnění a zvolení vhodné metody terapie, která ovlivní pouze cílové buňky. Ve státech Evropské unie je již k dispozici přibližně 21 schválených genových terapií, avšak tato léčiva jsou určena pouze pro léčbu vzácných onemocnění.

Vývoj genové terapie započal ve 20. století objevem, že DNA může transformovat vlastnosti buněk. Postupně se objevily klíčové poznatky o struktuře DNA a vlivu virů na genetiku. První úspěšná genová terapie byla provedena v roce 2000, ale přinesla s sebou i komplikace, jako je rozvoj leukémie u některých pacientů. Nicméně, 21. století přineslo mnoho pokroků a úspěchů v oblasti genové terapie, včetně schválení léčiv v různých částech světa a neustálého vývoje nových metod a léčiv. Dnes jsou genové terapie důležitým nástrojem v léčbě genetických onemocnění.

Ovlivnění exprese genu či modifikace vlastního genu za účelem léčby onemocnění je nejčastěji dosaženo pomocí virových vektorů nebo metod editace genomu. Využívají se jak *in vivo* postupy, kdy se genová terapie aplikuje přímo do těla pacienta, tak *ex vivo* přístup, kdy jsou modifikované buňky transplantovány zpět do těla pacienta. K editaci genomu se využívají specificky štěpící endonukleázy, jako je systém Crispr/Cas9. Přestože se experimentuje i se zárodečnými buňkami, všechny současně schválené genové terapie se soustředí na modifikaci somatických buněk kvůli etickým a technickým výzvám, které jsou spojeny se změnami v zárodečné linii.

Genová terapie přináší mnoho výhod, ale současně s sebou nese rizika jako inserční mutagenézi, přehnanou imunitní reakci pacienta a etické otázky. Genové terapie jsou na trhu pouze krátce, a tudíž jejich dlouhodobý účinek není stále znám.

Nové terapeutické přípravky na bázi genové terapie se zaměřují na vzácná onemocnění s relativně vysokou prevalencí, ale pro jedince s velmi vzácnými variantami či neobvyklými mutacemi stále není dostupná žádná terapie. Možné řešení by mohl přinést přístup s názvem N-of-1 treatment založený na antisense oligonukleotidech (ASO), vytvořených na míru konkrétnímu pacientovi.

Seznam literatury a elektronických zdrojů

AARTSMA-RUS, A., W. VAN ROON-MOM, M. LAUFFER, C. SIEZEN, B. DUIJNDAM, T. COENEN-DE ROO, R. SCHÜLE, M. SYNOFZIK a H. GRAESSNER, 2023. Development of tailored splice-switching oligonucleotides for progressive brain disorders in Europe: development, regulation, and implementation considerations. *RNA* [online]. **29**(4), 446–454 [vid. 2024-04-01]. ISSN 1355-8382, 1469-9001. Dostupné z: doi:10.1261/rna.079540.122

Anon., 2021a. Gene therapy needs a long-term approach. *Nature Medicine* [online]. **27**(4), 563–563 [vid. 2024-02-24]. ISSN 1078-8956, 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-021-01333-6

Anon., 2021b. Gene therapies should be for all. *Nature Medicine* [online]. **27**(8), 1311–1311 [vid. 2024-04-01]. ISSN 1078-8956, 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-021-01481-9

AVERY, O. T., C. M. MACLEOD a M. MCCARTY, 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **79**(2), 137–158 [vid. 2024-02-27]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2135445/>

* BAJAN, S. a G. HUTVAGNER, 2020. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells* [online]. **9**(1), 137 [vid. 2024-02-24]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9010137

BEZMAN, L., A. B. MOSER, G. V. RAYMOND, P. RINALDO, P. A. WATKINS, K. D. SMITH, N. E. KASS a H. W. MOSER, 2001. Adrenoleukodystrophy: Incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Annals of Neurology* [online]. **49**(4), 512–517 [vid. 2024-04-18]. ISSN 0364-5134, 1531-8249. Dostupné z: doi:10.1002/ana.101

BLAESE, R. M., K. W. CULVER, A. D. MILLER, C. S. CARTER, T. FLEISHER, M. CLERICI, G. SHEARER, L. CHANG, Y. CHIANG, P. TOLSTOSHEV, J. J. GREENBLATT, S. A. ROSENBERG, H. KLEIN, M. BERGER, C. A. MULLEN, W. J. RAMSEY, L. MUUL, R. A. MORGAN a W. F. ANDERSON, 1995. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* [online]. **270**(5235), 475–480 [vid. 2023-12-19]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.270.5235.475

BRUNETTI-PIERRI, N., ed., 2017. *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders* [online]. Cham: Springer International Publishing [vid. 2023-12-11]. ISBN 978-3-319-53455-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-53457-2

CAVAZZANA-CALVO, M., S. HACEIN-BEY, G. De Saint BASILE, F. GROSS, E. YVON, P. NUSBAUM, F. SELZ, C. HUE, S. CERTAIN, J. CASANOVA, P. BOUSSO, F. Le DEIST a A. FISCHER, 2000. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* [online]. **288**(5466), 669–672 [vid. 2023-12-19]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.288.5466.669

COMMISSIONER, Office of the, 2024. U.S. Food and Drug Administration. *FDA* [online]. FDA [vid. 2024-03-28]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/>

COTRIM, A. P. a B. J. BAUM, 2008. Gene Therapy: Some History, Applications, Problems, and Prospects. *Toxicologic Pathology* [online]. **36**(1), 97–103 [vid. 2023-12-13]. ISSN 0192-6233, 1533-1601. Dostupné z: doi:10.1177/0192623307309925

DOWNWARD, J., 2004. RNA interference. *BMJ (Clinical research ed.)* [online]. **328**(7450), 1245–1248. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.328.7450.1245

EICHLER, F., C. DUNCAN, P. L. MUSOLINO, P. J. ORCHARD, S. DE OLIVEIRA, A. J. THRASHER, M. ARMANT, C. DANSEREAU, T. C. LUND, W. P. MILLER, G. V. RAYMOND, R. SANKAR, A. J. SHAH, C. SEVIN, H. B. GASPAR, P. GISSEN, H. AMARTINO, D. BRATKOVIC, N. J. C. SMITH, A. M. PAKER, E. SHAMIR, T. O'MEARA, D. DAVIDSON, P. AUBOURG a D. A. WILLIAMS, 2017. Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine* [online]. **377**(17), 1630–1638 [vid. 2024-03-27]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1700554

* ENGELEN, M., S. KEMP, M. DE VISSER, B. M VAN GEEL, R. J. WANDERS, P. AUBOURG a B. POLL-THE, 2012. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **7**(1), 51 [vid. 2024-04-08]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-7-51

ENGELEN, M., S. KEMP a B. POLL-THE, 2014. X-Linked Adrenoleukodystrophy: Pathogenesis and Treatment. *Current Neurology and Neuroscience Reports* [online]. **14**(10), 486 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1528-4042, 1534-6293. Dostupné z: doi:10.1007/s11910-014-0486-0

ERDOS, J. a C. WILD, 2022. Mid- and long-term (at least 12 months) follow-up of patients with spinal muscular atrophy (SMA) treated with nusinersen, onasemnogene abeparvovec, risdiplam or combination therapies: A systematic review of real-world study data. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. **39**, 1–10 [vid. 2024-03-11]. ISSN 10903798. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpn.2022.04.006

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2017. *Glybera* [online] [vid. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022. *Skysona* [online] [vid. 2024-03-27]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/skysona>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2023a. *EMA recommends non-renewal of authorisation of Duchenne muscular dystrophy medicine Translarna* [online] [vid. 2024-02-29]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-non-renewal-authorisation-duchenne-muscular-dystrophy-medicine-translarna>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2023b. *Spinraza* [online] [vid. 2024-03-25]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2023c. *Luxturna* [online] [vid. 2024-03-27]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2024. *European Medicines Agency* [online] [vid. 2024-03-28]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/homepage>

FRIEDMANN, T. a R. ROBLIN, 1972. Gene Therapy for Human Genetic Disease?: Proposals for genetic manipulation in humans raise difficult scientific and ethical problems. *Science* [online]. **175**(4025), 949–955 [vid. 2024-03-18]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.175.4025.949

* GEORGIU, M., K. FUJINAMI a M. MICHAELIDES, 2021. Inherited retinal diseases: Therapeutics, clinical trials and end points—A review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* [online]. **49**(3), 270–288 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1442-6404, 1442-9071. Dostupné z: doi:10.1111/ceo.13917

GONÇALVES, G. A. R. a R. De Melo Alves PAIVA, 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (São Paulo)* [online]. **15**(3), 369–375 [vid. 2023-12-11]. ISSN 1679-4508. Dostupné z: doi:10.1590/s1679-45082017rb4024

* GOSTIMSKAYA, I., 2022. CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry. Biokhimiia* [online]. **87**(8), 777–788. ISSN 1608-3040. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922080090

GRIFFITH, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene* [online]. **27**(2), 113–159 [vid. 2024-02-27]. ISSN 0022-1724. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2167760/>

GUAN, L., Y. HAN, C. YANG, S. LU, J. DU, H. LI a J. LIN, 2022. CRISPR-Cas9-Mediated Gene Therapy in Neurological Disorders. *Molecular Neurobiology* [online]. **59**(2), 968–982 [vid. 2024-03-10]. ISSN 0893-7648, 1559-1182. Dostupné z: doi:10.1007/s12035-021-02638-w

* GUPTA, A. O., G. RAYMOND, E. I. PIERPONT, S. KEMP, R. S. MCIVOR, A. RAYANAVAR, B. MILLER, T. C. LUND a P. J. ORCHARD, 2022. Treatment of cerebral adrenoleukodystrophy: allogeneic transplantation and lentiviral gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. **22**(9), 1151–1162 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1471-2598, 1744-7682. Dostupné z: doi:10.1080/14712598.2022.2124857

HACEIN-BEY-ABINA, S., C. VON KALLE, M. SCHMIDT, M. P. MCCORMACK, N. WULFFRAAT, P. LÉBOULCH, A. LIM, C. S. OSBORNE, R. PAWLIUK, E. MORILLON, R. SORENSEN, A. FORSTER, P. FRASER, J. I. COHEN, G. DE SAINT BASILE, I. ALEXANDER, U. WINTERGERST, T. FREBOURG, A. AURIAS, D. STOPPA-LYONNET, S. ROMANA, I. RADFORD-WEISS, F. GROSS, F. VALENSI, E. DELABESSE, E. MACINTYRE, F. SIGAUX, J. SOULIER, L. E. LEIVA, M. WISSLER, C. PRINZ, T. H. RABBITTS, F. LE DEIST, A. FISCHER a M. CAVAZZANA-CALVO, 2003. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* [online]. **302**(5644), 415–419 [vid. 2024-02-27]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1088547

HEJDUK, K., L. MANDELOVÁ, O. NGO, R. CHLOUPKOVÁ, T. VYSKOT, J. GREGOR a O. MÁJEK, 2022. NSC - Populační pilotní program screeningu spinální svalové atrofie (SMA) a těžké kombinované imunodeficience (SCID) u novorozenců. *Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online] [vid. 2024-04-08]. Dostupné z: <https://nsc.uzis.cz/projekt/7-populacni-pilotni-program-screening-sma-scid/>

HERZOG, R. a L. POPPLEWELL, 2020. *Fast Facts: Gene Therapy* [online]. B.m.: S. Karger AG [vid. 2023-11-10]. ISBN 978-3-318-06666-1. Dostupné z: doi:10.1159/isbn.978-3-318-06667-8

* HIGH, K. A. a M. G. RONCAROLO, 2019. Gene Therapy. *New England Journal of Medicine* [online]. **381**(5), 455–464 [vid. 2023-11-10]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1706910

HOY, S. M., 2023. Delandistrogene Moxeparvovec: First Approval. *Drugs* [online]. **83**(14), 1323–1329 [vid. 2024-03-10]. ISSN 0012-6667, 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-023-01929-x

HU, M. L., T. L. EDWARDS, F. O'HARE, D. G. HICKEY, J. WANG, Z. LIU a L. N. AYTON, 2021. Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities. *Clinical and Experimental Optometry* [online]. **104**(4), 444–454 [vid. 2024-03-27]. ISSN 0816-4622, 1444-0938. Dostupné z: doi:10.1080/08164622.2021.1880863

* CHIU, W., T. LIN, Y. CHANG, H. ISAHWAN-AHMAD MULYADI LAI, S. LIN, C. MA, A. A. YARMISHYN, S. LIN, K. CHANG, Y. CHOU, C. HSU, T. LIN, S. CHEN, Y. CHIEN, Y. YANG a D. HWANG, 2021. An Update on Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(9), 4534 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22094534

* KAUFMANN, K. B., H. BÜNING, A. GALY, A. SCHAMBACH a M. GREZ, 2013. Gene therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **5**(11), 1642–1661 [vid. 2023-12-11]. ISSN 1757-4676, 1757-4684. Dostupné z: doi:10.1002/emmm.201202287

KIM, J., C. HU, C. MOUFAWAD EL ACHKAR, L. E. BLACK, J. DOUVILLE, A. LARSON, M. K. PENDERGAST, S. F. GOLDKIND, E. A. LEE, A. KUNIHOLM, A. SOUCY, J. VAZE, N. R. BELUR, K. FREDRIKSEN, I. STOJKOVSKA, A. TSYTSYKOVA, M. ARMANT, R. L. DIDONATO, J. CHOI, L. CORNELISSEN, L. M. PEREIRA, E. F. AUGUSTINE, C. A. GENETTI, K. DIES, B. BARTON, L. WILLIAMS, B. D. GOODLETT, B. L. RILEY, A. PASTERNAK, E. R. BERRY, K. A. PFLOCK, S. CHU, C. REED, K. TYNDALL, P. B. AGRAWAL, A. H. BEGGS, P. E. GRANT, D. K. URION, R. O. SNYDER, S. E. WAISBREN, A. PODURI, P. J. PARK, A. PATTERSON, A. BIFFI, J. R. MAZZULLI, O. BODAMER, C. B. BERDE a T. W. YU, 2019. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. **381**(17), 1644–1652 [vid. 2024-04-01]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1813279

KOLB, S. J., 2011. Spinal Muscular Atrophy: A Timely Review. *Archives of Neurology* [online]. **68**(8), 979 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneurol.2011.74

KOLB, S. J. a J. T. KISSEL, 2015. Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics* [online]. **33**(4), 831–846 [vid. 2024-03-11]. ISSN 07338619. Dostupné z: doi:10.1016/j.ncl.2015.07.004

KOLE, R. a A. M. KRIEG, 2015. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **87**, 104–107 [vid. 2024-03-10]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2015.05.008

KOVAC, M., Y. A. LITVIN, R. O. ALIEV, E. Y. ZAKIROVA, C. S. RUTLAND, A. P. KIYASOV a A. A. RIZVANOV, 2017. Gene Therapy Using Plasmid DNA Encoding Vascular Endothelial Growth Factor 164 and Fibroblast Growth Factor 2 Genes for the Treatment of Horse Tendinitis and Desmitis: Case Reports. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. **4**, 168 [vid. 2023-12-11]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2017.00168

* MARKATI, T., M. OSKOUI, M. A. FARRAR, T. DUONG, N. GOEMANS a L. SERVAIS, 2022. Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy. *The Lancet Neurology* [online]. **21**(9), 814–829 [vid. 2024-03-10]. ISSN 14744422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(22)00125-9

MOSER, H. W., A. MAHMOOD a G. V. RAYMOND, 2007. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nature Clinical Practice Neurology* [online]. **3**(3), 140–151 [vid. 2024-04-08]. ISSN 1745-834X, 1745-8358. Dostupné z: doi:10.1038/ncpneuro0421

NICOLAU, S., M. A. WALDROP, A. M. CONNOLLY a J. R. MENDELL, 2021. Spinal Muscular Atrophy. *Seminars in Pediatric Neurology* [online]. **37**, 100878 [vid. 2024-03-11]. ISSN 10719091. Dostupné z: doi:10.1016/j.spen.2021.100878

* NIKS, E. H. a A. AARTSMA-RUS, 2017. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. **17**(2), 225–236 [vid. 2024-03-10]. ISSN 1471-2598, 1744-7682. Dostupné z: doi:10.1080/14712598.2017.1271872

NUSSBAUM, R. L., R. R. MCINNES, H. F. WILLARD, J. THOMPSON a M. W. THOMPSON, 2004. *Klinická genetika: Thompson & Thompson : 6. vyd. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7254-475-2.*

PAIK, J., 2022. Risdiplam: A Review in Spinal Muscular Atrophy. *CNS Drugs* [online]. **36**(4), 401–410 [vid. 2024-03-11]. ISSN 1172-7047, 1179-1934. Dostupné z: doi:10.1007/s40263-022-00910-8

* PAN, X., H. VERONIAINA, N. SU, K. SHA, F. JIANG, Z. WU a X. QI, 2021. Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **16**(6), 687–703 [vid. 2024-02-23]. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2021.05.003

* PAOLINI SGUAZZI, G., V. MUTO, M. TARTAGLIA, E. BERTINI a C. COMPAGNUCCI, 2021. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) and Gene Therapy: A New Era for the Treatment of Neurological Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(24), 13674 [vid. 2024-03-10]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222413674

PATTERSON, G., H. CONNER, M. GRONEMAN, C. BLAVO a M. S. PARMAR, 2023. Duchenne muscular dystrophy: Current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach. *European Journal of Pharmacology* [online]. **947**, 175675 [vid. 2024-03-10]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2023.175675

PULA, S. a R. QUINLIVAN, 2020. Becker muscular dystrophy. *Orphanet* [online] [vid. 2024-03-25]. Dostupné z: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/98895>

* REILLY, A., L. CHEHADE a R. KOTHARY, 2023. Curing SMA: Are we there yet? *Gene Therapy* [online]. **30**(1–2), 8–17 [vid. 2024-03-11]. ISSN 0969-7128, 1476-5462. Dostupné z: doi:10.1038/s41434-022-00349-y

ROGERS, S., A. LOWENTHAL, H. G. TERHEGGEN a J. P. COLUMBO, 1973. Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **137**(4), 1091–1096 [vid. 2024-02-27]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139227/>

ROGERS, S. a P. PFUDERER, 1968. Use of Viruses as Carriers of Added Genetic Information. *Nature* [online]. **219**(5155), 749–751 [vid. 2024-03-18]. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/219749a0

ROSENBERG, S. A., 1992. Gene therapy for cancer. *JAMA*. **268**(17), 2416–2419. ISSN 0098-7484.

ROSENBERG, S. A., P. AEBERSOLD, K. CORNETTA, A. KASID, R. A. MORGAN, R. MOEN, E. M. KARSON, M. T. LOTZE, J. C. YANG, S. L. TOPALIAN, M. J. MERINO, K. CULVER, A. D. MILLER, R. M. BLAESE a W. F. ANDERSON, 1990. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine* [online]. **323**(9), 570–578 [vid. 2024-04-21]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199008303230904

ROSENBERG, S. A., W. F. ANDERSON, M. BLAESE, P. HWU, J. R. YANNELLI, J. C. YANG, S. L. TOPALIAN, D. J. SCHWARTZENTRUBER, J. S. WEBER, S. E. ETTINGHAUSEN, D. N. PARKINSON a D. E. WHITE, 1993. The Development of Gene Therapy for the Treatment of Cancer: *Annals of Surgery* [online]. **218**(4), 455–464 [vid. 2024-04-21]. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/00000658-199310000-00006

SHELLER, E.L. a P.H. KREBSBACH, 2009. Gene Therapy: Design and Prospects for Craniofacial Regeneration. *Journal of Dental Research* [online]. **88**(7), 585–596 [vid. 2023-12-11]. ISSN 0022-0345, 1544-0591. Dostupné z: doi:10.1177/0022034509337480

STEFFIN, D. H.M., E. M. HSIEH a R. H. ROUCE, 2019. Gene Therapy. *Advances in Pediatrics* [online]. **66**, 37–54 [vid. 2024-03-10]. ISSN 00653101. Dostupné z: doi:10.1016/j.yapd.2019.04.001

STOLBERG, S. G., 1999. The biotech death of Jesse Gelsinger. *The New York Times Magazine*. 136–140, 149–150. ISSN 0028-7822.

SYNOFZIK, M., W. M.C VAN ROON-MOM, G. MARCKMANN, H. A. VAN DUUVENVOORDE, H. GRAESSNER, R. SCHÜLE, A. AARTSMA-RUS, a BEHALF OF THE 1M1M CONSORTIUM, 2022. Preparing n-of-1 Antisense Oligonucleotide Treatments for Rare Neurological Diseases in Europe: Genetic, Regulatory, and Ethical Perspectives. *Nucleic Acid Therapeutics* [online]. **32**(2), 83–94 [vid. 2024-04-08]. ISSN 2159-3337, 2159-3345. Dostupné z: doi:10.1089/nat.2021.0039

SZYBALSKA, E. H. a W. SZYBALSKI, 1962. Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **48**(12), 2026–2034 [vid. 2024-02-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC221117/>

TANG, R. a Z. XU, 2020. Gene therapy: a double-edged sword with great powers. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. **474**(1–2), 73–81 [vid. 2023-11-10]. ISSN 0300-8177, 1573-4919. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-020-03834-3

TATUM, E. L., 1966. Molecular Biology, Nucleic Acids, and the Future of Medicine. *Perspectives in Biology and Medicine* [online]. **10**(1), 19–32 [vid. 2024-03-18]. ISSN 1529-8795. Dostupné z: doi:10.1353/pbm.1966.0027

TEMIN, H. M., 1961. Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. *Virology* [online]. **13**(2), 158–163 [vid. 2024-03-18]. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/0042-6822(61)90049-6

TURK, B. R., C. THEDA, A. FATEMI a A. B. MOSER, 2020. X-linked adrenoleukodystrophy: Pathology, pathophysiology, diagnostic testing, newborn screening and therapies. *International Journal of Developmental Neuroscience* [online]. **80**(1), 52–72 [vid. 2024-03-27]. ISSN 0736-5748, 1873-474X. Dostupné z: doi:10.1002/jdn.10003

WANG, H. a H. YANG, 2019. Gene-edited babies: What went wrong and what could go wrong. *PLOS Biology* [online]. **17**(4), e3000224 [vid. 2024-02-24]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.3000224

WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK, 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. **171**(4356), 737–738 [vid. 2024-04-20]. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/171737a0

WILSON, J. M., 2005. Gendicine: The First Commercial Gene Therapy Product; Chinese Translation of Editorial. *Human Gene Therapy* [online]. **16**(9), 1014–1015 [vid. 2024-04-21]. ISSN 1043-0342, 1557-7422. Dostupné z: doi:10.1089/hum.2005.16.1014

WIRTH, T., N. PARKER a S. YLÄ-HERTTUALA, 2013. History of gene therapy. *Gene* [online]. **525**(2), 162–169 [vid. 2023-12-11]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2013.03.137

WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* [online]. **310**(20), 2191 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2013.281053

* označení souhrnných článků