

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií (41-KBES)

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Genová terapie v léčbě cystické fibrosy

Gene therapy in cystic fibrosis treatment

Alina Nezhinskaya

Vedoucí práce: RNDr. Edvard Ehler, Ph.D.

Studijní program: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na  
vzdělávání (B0114A030006)

Studijní obor: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na  
vzdělávání se sdruženým studiem Chemie se zaměřením na  
vzdělávání

Rok odevzdání 2025

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Genová terapie v léčbě cystické fibrosy potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Prohlašuji, že jsem při její tvorbě nepoužila nástrojů umělé inteligence jiným způsobem, než je uvedeno ve vyjádření, které je součástí textu práce. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 11.4.2025

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Edvardu Ehlerovi, Ph.D, za odborné rady a připomínky při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat mým blízkým za jejich trpělivost a podporu během celého studia.

## **ABSTRAKT**

Cystická fibrosa je nejčastější genetické onemocnění kavkazské rasy s autosomálně recesivním dědičným přenosem, způsobené mutacemi v genu CFTR. Tento gen kóduje protein, který zajišťuje transport chloridových iontů přes buněčné membrány. Mutace v genu CFTR vedou buď k úplné absenci proteinu, anebo ke špatně fungujícímu proteinu. Od objevení genu CFTR v roce 1989 se cystická fibrosa stala jedním z hlavních modelových onemocnění pro výzkum a vývoj genové terapie. Opravení mutací by mělo obnovit funkce CFTR proteinu a tím vyléčit pacienty s cystickou fibrosou.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na aktuální poznatky o genetické podstatě cystické fibrosy, jejích klinických projevech a dostupných možnostech léčby. Dále poskytuje přehled různých přístupů používaných v genové terapii. Práce obsahuje popis jak virových, tak nevirálních vektorů, včetně jejich výhod a omezení. Práce také analyzuje klinické studie, které zkoumají využití těchto metod v klinické praxi. Součástí práce je popis technologie přesné editace genomu, systému CRISPR/Cas9, a jeho potenciálu v léčbě tohoto onemocnění. Cílem práce je zhodnotit současný stav výzkumu genové terapie cystické fibrosy a posoudit její budoucí perspektivy v klinické praxi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

cystická fibrosa, genová terapie, editace genomu, virový vektor, nevirální vektor, CFTR protein

## **ABSTRACT**

Cystic fibrosis is the most common autosomal recessive genetic disease among people of Caucasian descent. The disease is caused by mutations in the CFTR gene, which encodes a protein for chloride ions transport through cell membrane. These mutations either lead to the complete absence of CFTR protein or causes its incorrect function. Since the Discovery of the CFTR gene in 1989, cystic fibrosis has become an object of gene therapy research. The correction of mutations in CFTR gene can potentially restore CFTR function and therefore become a treatment for patients with cystic fibrosis.

This thesis explores the genetic background of the disease, its clinical symptoms and current treatment options. It provides a review of gene therapy strategies, including both viral and non-viral delivery methods and describes their advantages and limitations. This thesis analyzes clinical trials that study effectiveness of these therapeutic approaches in cystic fibrosis treatment. The thesis includes a description of the precise genome editing technology, the CRISPR/Cas9 system, and its potential in the treatment of this disease. The aim of this thesis is to evaluate recent advancements in gene therapy for cystic fibrosis and assess its potential for future clinical applications.

## **KEYWORDS**

cystic fibrosis, gene therapy, genome editing, viral vector, non-viral vector, CFTR protein

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Metodologie práce .....	2
3	Cystická fibrosa .....	3
3.1	Klinické projevy .....	4
3.1.1	Projevy v dýchací soustavě.....	4
3.1.2	Projevy v trávicí soustavě.....	5
3.1.3	Endokrinní soustava a metabolické poruchy .....	6
3.1.4	Další systémové projevy.....	7
3.2	Genetická podstata onemocnění .....	7
3.2.1	Třída I – nedostatečná produkce proteinu CFTR. ....	9
3.2.2	Třída II – defekt transportu a vyzrání proteinu CFTR proteinu. ....	10
3.2.3	Třída III – defektivní regulace.....	10
3.2.4	Třída IV – snížený transport chloridů.....	11
3.2.5	Třída V – defekt sestřihu se sníženou produkcí. ....	11
3.2.6	Třída VI – ztráta regulační funkce dalších iontových kanálů.....	11
4	Současná léčba CF.....	13
4.1	Symptomatická léčba .....	13
4.2	Modulátory CFTR.....	14
4.2.1	Potenciátory .....	14

4.2.2	Korektory .....	16
4.2.3	Stabilizátory .....	17
4.2.4	Amplifikátory .....	18
4.2.5	CFTR read-through agents .....	18
5	Genová terapie jako potenciální léčebná strategie .....	20
5.1	Virové vektory .....	20
5.1.1	Adenovirové vektory .....	22
5.1.2	Adenoasociované vektory.....	26
5.1.3	Lentivirové vektory .....	29
5.2	Nevirální vektory .....	31
5.2.1	Neobalená DNA .....	31
5.2.2	Liposomové komplexy .....	33
5.3	Technologie genové editace.....	38
5.3.1	CRISPR/CAS 9 .....	38
6	Diskuse .....	43
	Závěr.....	48
	Seznam zkratek.....	49
	Seznam obrázků.....	50
	Seznam tabulek.....	50
	Vyjádření k použití nástrojů umělé inteligence (AI).....	51

Seznam použitých webových stránek.....	72
--	----

# 1 Úvod

Cystická fibrosa (dále CF) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi v genu pro regulaci transmembránové vodivosti CFTR. V důsledku mutací vznikají poruchy transportu iontů přes buněčnou membránu, což způsobuje tvorbu hustého a viskózního hlenu různých soustavách organismu, především v soustavě dýchací a trávicí. Navzdory obrovskému pokroku v symptomatické a farmakologické léčbě je CF nevyléčitelným onemocněním značně ovlivňujícím kvalitu života pacientů. Gen CFTR byl poprvé identifikován v roce 1989 a od té doby došlo k výraznému posunu v porozumění molekulární podstatě a léčbě tohoto onemocnění. Dnešní moderní medicína přináší nové terapeutické přístupy, které se snaží trvale odstranit příčinu nemoci prostřednictvím nástrojů genové terapie.

Téma genové terapie v léčbě CF je aktuální nejen z pohledu výzkumu, ale i klinické praxe. Některé přístupy jsou již ve fázi klinického testování, zatímco další se intenzivně vyvíjejí. Pokud by se tyto metody podařilo úspěšně zavést do klinické praxe, mohly by zásadním způsobem změnit prognózu tohoto onemocnění.

Cílem této práce je zmapovat současné poznatky o genetické podstatě CF, zejména o mechanismech mutací genu CFTR. Dalším cílem je také vytvořit přehled metod genové terapie, které již byly schválené pro využití nebo se nyní testují. Kromě popisu jednotlivých strategií bude zhodnocen i současný stav výzkumu a perspektivy budoucího vývoje v této oblasti.

## 2 Metodologie práce

Tato bakalářská práce je rešerší odborné literatury na téma genové terapie a jejích perspektiv v léčbě CF. Pro vyhledávání zdrojů informace byly využity vědecké databáze PubMed, Scopus, Web of Science a Google Scholar. Při výběru literatury jsem uvažovala aktuálnost a odbornou kvalitu. Vyhledané zdroje byly filtrované na základě typu dokumentů, jazyku a roku publikace. Informace jsem čerpala především z recenzovaných vědeckých článků, systematických přehledů a kapitol odborných knih. Přednostně byly zpracovány články odborných časopisů, které se cíleně věnují CF, např. „Journal of Cystic Fibrosis“, „Human Gene Therapy“ nebo „Molecular Therapy“. Většina zpracovaných článků byla publikovaná mezi lety 2010-2024. Ale byly také do práce zahrnuté starší publikace, jejichž přínos pro vývoj studií CF je významný. Dále byly aplikovány filtry na jazyk (angličtina) a dostupnost prací. V případech, kdy nebyl plný text přístupný, byly využity alternativní cesty, např. přístup přes instituce.

Pro vyhledávání relevantních studií byla použita klíčová slova: cystic fibrosis, CFTR gene, gene therapy, genetic mutations in CF, vector-based therapy, viral vectors, gene editing, CRISPR/cas9. Při výběru odborné literatury byl také zohledněn citační index konkrétních studií a impact faktor časopisů.

Analýza a syntéza informací byly prováděny na základě tematických okruhů: genetická podstata onemocnění, klinické projevy onemocnění, současná léčba, genová terapie a její budoucí. Každá z těchto oblastí byla zpracována na základě dostupné literatury. Jelikož se jedná o teoretickou práci, jejím hlavním omezením je absence vlastních experimentálních dat. Dalším limitem může být dostupnost některých odborných studií kvůli placenému přístupu.

### 3 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa (dále jen CF) je nejčastější dědičné onemocnění evropské populace, s odhadovaným výskytem 1 na 3 000 novorozenců. V České republice se CF vyskytuje přibližně u 1 z 2 500 novorozenců, což znamená, že ročně se narodí 35–45 dětí s touto diagnózou. Ne všechny případy však bývají odhaleny (Národní zdravotnický informační portál, b.r.).

Jedná se o vzácné genetické onemocnění plic, projevující se produkcí hustého hlenu, což způsobuje postižení více orgánových systémů, chronické plicní infekce, problémy s trávením (např. objemné průjmy). Dalším typickým příznakem je malý vzrůst a nadměrné pocení, které bylo hlavním symptomem pro diagnostiku v minulosti.

První zmínky CF najdeme již ze 17. století z literatury a lidových písní: „Běda dítěti, které při polibku na čelo chutná slaně. Je očarované a brzy musí zemřít.“ Později se začalo věřit, že se děti málo a špatně myjí, a proto jsou slané (Vávrová & Bartošová, 2016). Až do konce 30. let 20. století zůstávala CF jako specifické onemocnění necharakterizovaná. V roce 1936 Fanconi poprvé použil termín „mukoviscidóza“ (z němčiny „zahuštěný hlen“). Dalším důležitým krokem byla studia doktorky Dorothy Andersonové, která v roce 1938 sepsala klinický obraz pro dané onemocnění a pojmenovala jej jako „Cystická fibrosa pankreatu“ (Farinha, 2018). K důležitému objevu přispělo abnormální vedro v 50. letech v New Yorku, kdy Paul di Sant’Agnese identifikoval zvýšený obsah soli v potu pacientů s CF, čímž položil základy pro potní test na chloridy, který se v diagnostice CF používá dodnes (Farinha, 2018). Paul Quinton (1982) odhalil hlavní defekt v buněčných membránách, který zahrnuje sníženou propustnost pro chloridové ionty ( $\text{Cl}^-$ ) a zvýšený transport sodíku ( $\text{Na}^+$ ). Tyto poznatky vyvrcholily v roce 1989, kdy vědci díky spolupráci různých laboratoří

identifikovali gen zodpovědný za CF a protein známý jako CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (Farinha, 2018). Objev genu CFTR otevřel nové cesty v léčbě nemoci: farmakologické přístupy zaměřené na symptomatickou léčbu a perspektivní metody genové terapie.

### **3.1 Klinické projevy**

CF je genetické onemocnění postihující více orgánových soustav, především dýchací a trávicí. Onemocnění má progresivní průběh a příznaky se projeví již v dětství. Projevy jsou velice variabilní v závislosti na typu mutací. Typickými příznaky jsou kašel s hustým hlenem, náchylnost plicním infekcím, problémy trávení a další příznaky, které budou popsány v kapitolách níže (Fila, 2017).

#### **3.1.1 Projevy v dýchací soustavě**

CF primárně ovlivňuje dýchací trakt, kde dochází k hromadění hustého hlenu, který omezuje normální dýchání a podporuje chronické infekce. Chronické plicní infekce jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů s CF (Castellani & Assael, 2017).

Epitel dýchacích cest u zdravých jedinců je schopen vylučovat a absorbovat ionty a vodu, což je základ pro dobrou hydrataci hlenu. Dobře hydratovaný hlen lehce se pohybuje po dýchacích cestách a následně se odstraňuje. U pacientů s CF je epitel dýchacích cest náchylný k nadměrné absorpci tekutin kvůli poruše sekrece chloridových a hydrogenuhličitanových iontů. Tato abnormální absorpce tekutin epitelem zvyšuje osmotický tlak v hlenu, což vede k úbytku tekutiny na povrchu dýchacích cest. Důsledkem je hyperkoncentrovaný (dehydratovaný) hlen, zhoršený transport hlenu a jeho přilnavost k povrchu dýchacích cest (Turcios, 2020).

Hustý hlen je příznivé prostředí pro rozvoj kolonií bakterií. Plíce nemocných CF jsou in utero a krátce po narození bez patologií. Krátce po narození však mnoho pacientů podléhá bakteriální kolonizaci a vyvine se u nich chronický zánět. Endobronchiální kolonizace se obvykle objevuje během prvního až druhého roku života, přičemž mezi běžné patogeny patří *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a gramnegativní enterické organismy, jako *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Téměř u všech pacientů se vyskytuje infekce *Pseudomonas aeruginosa*, která přispívá progresivnímu zhoršování plicních funkcí. Chronický zánět přispívá k rozvoji obstrukčního plicního onemocnění a destrukci plicní tkáně, což ve výsledku vede k bronchiektáziím a selhání dýchání (Castellani & Assael, 2017).

Dýchací soustava je u pacientů s CF postižena nejen na úrovni dolních cest dýchacích, ale také v oblasti nosu a vedlejších nosních dutin. Nosní a sinusová onemocnění se vyskytují téměř u všech pacientů. Typickými příznaky jsou nosní neprůchodnost, rýma, bolesti hlavy, ranní kašel, zápach z úst a nucení k vykašlávání. U části pacientů se objevují i nosní polypy, které mohou být spojeny se sníženým čichem a rozšířením nosního kořene (Filbrun et al., 2016).

### **3.1.2 Projevy v trávicí soustavě**

Pankreas, česky slinivka břišní, je druhým nejvíce postiženým orgánem u pacientů s CF. Poruchy transportu iontů vedou k zahuštění pankreatické šťávy. U pacientů s cystickou fibrosou je pankreatická šťáva třikrát koncentrovanější než u zdravých jedinců. Zahuštěný sekret slinivky břišní vede k akutnímu a chronickému zánětu, který pak je příčinou poškození pankreatických buněk. Poškozené buňky nejsou schopné produkovat dostatečné množství enzymů, což způsobuje pankreatickou insuficienci neboli nedostatečnost.

V některých případech dochází k poškození beta buněk slinivky břišní, což má za následek snížení produkce insulinu a vede ke vzniku diabetu (Kelly & Buxbaum, 2015).

Vzhledem k snížené sekreci exokrinních enzymů musí pacienti brát doplňky stravy a dodržovat dietu, která by měla odpovídat nutričním normám. Doporučuje se, aby pacienti s cystickou fibrosou konzumovali 120–150 % doporučené denní dávky živin, vzhledem k zvýšené energetické spotřebě v klidu způsobené oslabenou plicní funkcí (Matel & Milla, 2009).

Husté a viskózní sekrety ucpávají tenké střevo, což způsobuje další gastrointestinální potíže. Pacienti s CF trpí zácpou, mekoniem ileus (zácpa novorozenců), distálním intestinálním obstrukčním syndromem (DIOS) atd. Příznaky zácpy u mladých dospělých a dětí jsou řešeny důslednou kontrolou stravy a pitného režimu, masážemi břicha apod. DIOS může vyžadovat hospitalizaci a dekompresi v závažných případech (Kelly & Buxbaum, 2015).

### **3.1.3 Endokrinní soustava a metabolické poruchy**

Jak již bylo zmíněno, v důsledku poškození beta buněk slinivky břišní dochází k nedostatečné produkci insulinu, což je příčinou diabetu. Prevalence diabetu spojeného s cystickou fibrosou (Cystic Fibrosis-Related Diabetes) stoupá s věkem. Růst případů CFRD se vysvětluje tím, že u dospělých jsou buňky pankreatu poškozené více než u mladších pacientů. U adolescentů je diagnostikováno téměř 20 % případů, zatímco u dospělých pacientů s CF se CFRD vyskytuje v 40–50 % případů. CFRD představuje kombinaci obou typů diabetu, na rozdíl od diabetu 1. typu, kde je ztráta inzulínových buněk téměř úplná, a diabetu 2. typu, kde je inzulínová rezistence obvykle hlavním problémem (Filbrun et al., 2016).

### 3.1.4 Další systémové projevy

Kromě již popsaných orgánových soustav je značně postižená soustava reprodukční. Azoospermie je typická pro více než 95 % mužů s cystickou fibrosou. Jinými slovy azoospermie je příčinou neplodnosti. Obstrukce je způsobena vrozenou bilaterální absencí vas deferens (semenných kanálků). Semenné vajíčky jsou rovněž atrofické nebo chybí. Tento stav může být způsoben obstrukcí dehydratovanými sekrety v pohlavních cestách během nitroděložního vývoje nebo vývojovými abnormalitami v reprodukčním traktu (Filbrun et al., 2016).

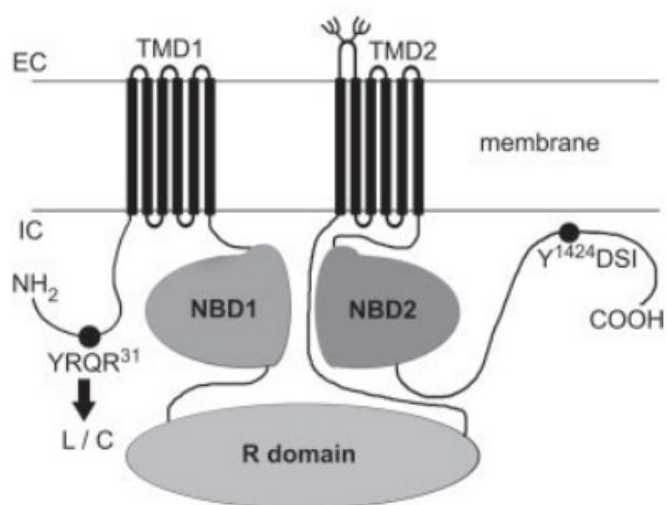
Podstatné jsou i psychické poruchy, které vznikly u pacientů v důsledku závažového chronického onemocnění, jakým je cystická fibrosa. Děti s chronickým onemocněním a jejich rodiče jsou vystaveni vyššímu riziku úzkosti a deprese než běžná populace. Během mezinárodních epidemiologických studií bylo zjištěno, že příznaky deprese a úzkosti byly 2–3krát častější než u zdravých jedinců (Quittner et al., 2016). Pro účely šířit informace a poskytovat podporu nemocným a jejich blízkým byl v roce 1992 založen Klub nemocných CF v České republice. Cílem klubu je především zlepšit kvalitu života pacientů prostřednictvím sociální, finanční, materiální i psychologické pomoci. Klub podporuje projekty zaměřené na zdokonalení léčby a diagnostiky, šíří informace rodinám i veřejnosti (*Klub cystické fibrózy, b.r.*).

## 3.2 Genetická podstata onemocnění

CF je vyvolána mutací v genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu. Tento gen kóduje integrální protein se stejným názvem CFTR, který funguje jako chloridový kanál a nachází se na apikální membráně buňky. CFTR je epiteliální iontový kanál, který hraje důležitou roli

v homeostáze tekutin dýchacích cest, zprostředkovává transport chloridových iontů přes buněčnou membránu. Také přispívá k regulaci pH a obsahu iontů ve vrstvě povrchové tekutiny dýchacích cest a tím hraje důležitou roli v obraně proti patogenům. Protein má vnitřní aktivitu ATPasy a využívá ATP k otevírání a uzavírání svého kanálu. Pasivní tok aniontů kanálem je řízen cykly vazby ATP a hydrolýzy doménami vázajícími ATP. Iontový kanál je také propustný pro  $\text{HCO}_3^-$ . Selektivita iontového kanálu závisí na koncentraci extracelulárního chloridu (*CFTR Protein*, 2020).

Molekula CFTR se skládá ze 2 transmembránových domén (TMD1 a TMD2), dvou cytoplazmatických domén vázajících nukleotidy (NBD1 a NBD2), regulační domény (R) a amino- a karboxyl-terminálních cytoplazmatických konců (Jurkuvenaite et al., 2006).



Obrázek 1 Stavba proteinu CFTR (převzato a upraveno z (Jurkuvenaite et al., 2006))

Z více než 2000 mutací genu CFTR, které byly identifikovány, je funkční abnormalita známa pouze u relativně malého počtu z nich (tab.1).

Třída	Účinek na CFTR	Přítomnost funkčního CFTR	Příklady mutací
I.	Nedostatečná produkce proteinu	Ne	G542X, 711+1G → T
II.	Defekt transportu proteinu	Ne	F508del
III.	Defektivní regulace	Ne	G551D
IV.	Snížený transport chloridů	Ano	A455E, R117H
V.	Defekt sestřihu se sníženou produkcí	Ano	IVS8-5T
VI.	Zrychlený rozpad proteinu	Ano	4326delTC

Tabulka 1. Klasifikace mutací CFTR. Zdroj: (Schechter & Chaudary, 2017, s. 5)

### 3.2.1 Třída I – nedostatečná produkce proteinu CFTR.

Mutace první třídy zahrnují mutace vedoucí k syntéze nefunkčního proteinu. Vyskytují se různé typy mutací, včetně posunových (frameshift), přítomnosti předčasného stop kodonu (tzv. nesmyslné mutace), a mutací ovlivňujících sestřih (splicing) (Anwar et al., 2024, s. 266-267).

Nesmyslné mutace (nonsense mutations) jsou způsobené předčasným ukončením syntézy mRNA zavedením stop kodonů před skutečný stop kodon. Taková mRNA je označena za defektní a podléhá degradaci. Příkladem nesmyslné mutace spadající do první třídy je R553X. Výsledkem mutace R553X je nestabilní mRNA a nerozpoznatelný protein (Hamosh et al., 1991). V jiných případech dochází k syntéze zkráceného proteinu. Poškozené proteiny jsou okamžitě rozpoznány a degradovány proteazomem ještě před jejich začleněním do apikální membrány. Mutace první třídy jsou považovány za tzv. „těžké“ mutace, neboť vedou k úplné nefunkčnosti chloridových kanálů. Průběh CF u pacientů s mutacemi první třídy je velmi těžký a doprovázen problémy v mnoha soustavách

organismu. Často u pacientů s mutacemi první třídy je diagnostikovaná pankreatická insuficience (Anwar et al., 2024).

### **3.2.2 Třída II – defekt transportu a vyzrání proteinu CFTR proteinu.**

Do druhé třídy spadají mutace, jejichž důsledkem je nesprávná terciální sktruktura proteinů CTFR. Takové proteiny mohou zachovat určitou funkci chloridového kanálu, ale jsou degradovány krátce po syntéze, ještě předtím, než se dostanou na své místo působení na povrchu buňky. Příkladem takové mutace je F508del (chybí zbytek fenylalaninu na pozici 508) a je nejčastější mutací u pacientů s CF (cca u 80-90%) (Schechter & Chaudary, 2017). V rekombinantních buňkách CFTR s mutací F508del není schopen dozrát do plně glykosylované formy. Ve výsledku je částečně glykosylovaný defektní protein krátce po syntéze degradován (Welsh & Smith, 1993). Průběh CF u nemocných s genotypem druhé třídy je velmi závažný.

### **3.2.3 Třída III – defektivní regulace.**

Kvůli abnormální vazbě ATP na nukleotidové vazebné domény (NBD1 a NBD2) a absenci hydrolýzy ATP nedokáže CFTR být správně aktivován, aby reguloval transport iontů i přesto že se nachází na správné pozici na povrchu buňky (Schechter & Chaudary, 2017) (Anwar et al., 2024).

Tyto mutace mají formu missense mutací, které umožňují produkci proteinu v normálním množství a jeho úspěšné začlenění do membrány. Přesto však vykazují rezistenci vůči aktivaci prostřednictvím proteinové kinasy A. Nejběžnější mutace třetí třídy je G551D. Třetí třída stejně jako předchozí je spojená s těžkými projevy CF (Anwar et al., 2024).

### **3.2.4 Třída IV – snížený transport chloridů.**

Mutace čtvrté třídy vedou k produkci normálního množství proteinu, který si zachovává své funkce, ale má nižší vodivost kanálu. Mutace čtvrté třídy mění vodivost kanálu tím, že narušují iontový vodivý pór, což vede ke snížené jednotkové vodivosti (Sheppard et al., 1993). Nejběžnější mutací této třídy je p.Arg117His. Syntetizovaný protein je správně zpracován a tvoří regulované apikální proudy chloridových aniontů (Fanen et al., 2014). Avšak Sheppard et al. pomocí analýzy metodou patch-clamp prokázal snížení jak pravděpodobnosti otevření kanálu, tak jeho vodivosti. Vzhledem k tomu, že určitá vodivost chloridů nebo hydrogenuhličitanů je zachována, lidé s mutacemi čtvrté třídy mají často mírnější příznaky CF (Anwar et al., 2024).

### **3.2.5 Třída V – defekt sestřihu se sníženou produkcí.**

Mutace páté třídy vedou k výraznému snížení syntézy funkčního CFTR na apikální membráně v důsledku mutace promotoru. Jedná se o mutace v sestřihovém místě, které mají za následek nesprávný sestřih mRNA CFTR genu. Produkovaný protein je nestabilní, a proto se snižuje podíl normálního CFTR proteinu (Vávrová, 2006). Změny na sestřihových místech mohou vést k úplnému nebo částečnému vyloučení exonu. V případě částečného vyloučení exonu pokračuje syntéza normální mRNA, ale na nižší úrovni. (Anwar et al., 2024). Tyto mutace jsou obzvláště významné, pokud jsou spojeny s jinou mutací, která vede k produkci molekuly CFTR se sníženou funkcí (Schechter & Chaudary, 2017).

### **3.2.6 Třída VI – ztráta regulační funkce dalších iontových kanálů.**

Mutace šesté třídy mají za následek produkci proteinu, které dosáhne místa účinku, ale je velice nestabilní (Schechter & Chaudary, 2017). Mutace šesté třídy jsou podle

některých zdrojů sloučeny s třídou V, protože vedou ke sníženému množství funkčního proteinu CFTR (Fanen et al., 2014).

## 4 Současná léčba CF

Léčba CF dnes zaměřuje především na zmírnění symptomů onemocnění a prodloužení života pacientů. Vzhledem k tomu, že CF je vrozené genetické onemocnění, nelze ji léčit běžnými metodami. Pro jednotlivé projevy však existují jednotlivé strategie léčby, jejichž cílem je zlepšit kvalitu života. Aktuální léčebné strategie zahrnují symptomatickou léčbu, modulátory CFTR proteinu a v závažných stádiích onemocnění také transplantaci plic.

### 4.1 Symptomatická léčba

Základem symptomatické léčby je péče o správnou průchodnost dýchacích cest a jejich inhalace, kontrola plicních infekcí, ředění hlenu, dobrá vysokokalorická strava a podpora imunitního systému (Skalická, 2014). Cílem terapie je zabránit zvýšené tvorbě hlenu v respiračních cestách. Za účelem zředit hlen se nejčastěji používá inhalace hypertonickým roztokem chloridu sodného o koncentraci 3-7 %. Hypertonický roztok sodné soli má baktericidní účinky a dobře ředí hlen. Nevýhodou ale zůstává krátká doba účinku: inhalace potřeba provádět třikrát denně po dobu 10-15 minut (Skalická, 2014).

Další způsob ředění hlenu jsou mukolytika, konkrétně enzym dornasa alfa. Jedná se o lidskou DNAsu, která se úspěšně používá v léčbě již od 90. let 20. století. Dornasa alfa štěpí DNA uvolněnou v hlenu a tím ho zkapalňuje (Skalická, 2014).

Nedílnou částí úspěšné léčby je fyzioterapie. Fyzická cvičení a dechová rehabilitace napomáhá odstranění zředěného hlenu z dýchacích cest a brání jejich ucpávání (Skalická, 2014).

Pro pacienty s CF jsou chronická infekční onemocnění plic charakteristická. Proto je důležité infekce sledovat a včas podávat antibiotika. Vzhledem k tomu, že je typický výskyt

více druhu infekce je potřeba aplikovat více druhů antibiotik. Používají se antibiotika širokého spektra účinku, jako jsou amoxicilin s klavulanátem, cotrimoxazol, cefalosporiny I. a II. generace, doxycyklin. Léčba antibiotiky je agresivní, neboť se podávají na nejvyšší hranici dávkovacího rozmezí po dobu minimálně 14 dní (Skalická, 2014). Agresivní antibiotika vedou k nežádoucím účinkům, proto je důležité dodržovat hygienická pravidla, aby se předešlo nákaze infekcí.

## **4.2 Modulátory CFTR**

Studium mutací CFTR genu umožnilo objevy nových metod léčby, které by vyřešily primární problém a necílily by na zmírnění následků. Takovým řešením se staly modulátory CFTR. Modulátory CFTR jsou léky, které cíleně ovlivňují funkce proteinů v závislosti na typu mutace (Chaudary, 2018). Na základě mechanismu účinku je dělíme na potenciátory, korektory, stabilizátory, amplifikátory a CFTR read-through agents (Lopes-Pacheco, 2020).

### **4.2.1 Potenciátory**

Potenciátory jsou aktivní molekuly, které zvyšují pravděpodobnost otevření chloridových kanálů anebo prodlužují doby kdy je kanál otevřen, a tak umožňují. Potenciátory jsou určené pro úpravu mutací spojené s nefunkčností chloridových kanálů, tedy mutace III a IV třídy, ze kterých jsou nejběžnější mutace R117H, R334W, R347P a G551D (Lopes-Pacheco et al., 2016). CFTR III. třídy je v důsledku absenci hydrolýzy ATP nedokáže štěpit ATP. V průběhu prvních studií se ukázalo, že účinné látky by měly být analogem ATP nebo obsahovat sloučeniny, které by zvýšily hladinu cAMP (Lopes-Pacheco, 2020).

Prvním schváleným potenciátorem se stál Ivacaftor. Ivacaftor byl vyvinut společností Vertex Pharmaceuticals ve spojení s Nadací cystické fibrosy. Ivacaftor je aktivní složkou léku Kalydeco. Byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v lednu 2012 pro léčbu pacientu starší 6 let s aspoň jednou alelou G551D (Lopes-Pacheco, 2020).

Normální CFTR protein funguje jako chloridový kanál, který se otevírá po fosforylaci a vazbě ATP. V případě mutací III. třídy Ivacaftor zprostředkovává potenciaci kanálu CFTR způsobem závislým na fosforylaci ale bez ohledu na hladinu ATP. Spojením s transmembránovou doménou CFTR dochází ke změně konformace proteinu, čímž se stabilizuje otevřený stav kanálu. To vede ke zvýšenému transportu chloridových iontů přes buněčnou membránu, což podporuje lepší hydrataci dýchacích cest. Výsledkem je zředění hlenu. Léčba Ivacaftorem měla pozitivní výsledky. Ukázalo se, že u pacientů s mutací G551D došlo k průměrnému zlepšení plicní funkce (FEV1) o 10–12 %, výraznému snížení koncentrace chloridů v potu a celkovému zlepšení kvality života, včetně zvýšení tělesné hmotnosti a snížení četnosti hospitalizací. Pozitivní účinky byly pozorovány i u dalších mutací třídy III, jako jsou R117H, G178R nebo S549N, a u některých mutací třídy IV, i když v menší míře (Lopes-Pacheco, 2020). I přesto že je lék velmi účinný, není bohužel dostupný pro veřejnost kvůli vysoké ceně. Ivacaftor patří mezi nejdražší léky. Cena dosahuje 297 tisíc dolarů ročně. Užívání léku ivacaftor je celoživotní. V současné době v mnoha zemích, včetně České republiky, je léčba ivacaftorem hrazená pojišťovnou v případě, že pacient splňuje určité podmínky. Mezi podmínky je řazen věk (starší 6 let), tělesná hmotnost (více než 25 kg) a přítomnost jedné z následujících mutací ovlivňujících otevírání kanálu (třídy

III) v genu CFTR: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N nebo S549R (*Státní ústav pro kontrolu léčiv, b.r.*).

#### 4.2.2 Korektory

Korektory jsou malé biologicky aktivní molekuly, které jsou schopné zvýšit množství CFTR proteinu na membráně. Korektory ovlivňují stabilitu proteinů a zlepšují jejich skládání (folding) a další buněčné úpravy. Díky těmto vlastnostem jsou korektory vhodné pro použití u pacientů s mutacemi druhé třídy, jako je F508del. Výsledkem mutace F508del je špatně složený protein, který, i přesto že zachovává částečnou funkci, degradován krátce po syntéze. Proteiny jsou zadrženy na endoplazmatickém retikulu proteostazovými sítěmi, proto pouze malá část proteinů dosáhne membrány, kde avšak kvůli jejich nestabilitě budou degradovány (Zegarra-Moran & Galietta, 2017).

Korektory fungují jako chaperony. Chaperony jsou proteiny, které kontrolují správné skládání proteinů. Mechanismus účinku korektorů se spočívá v stabilizaci NBD1 domény a zlepšení interakce mezi NBD1 a vnitrobuněčnými smyčkami (ICL). Správná interakce těchto složek je klíčová pro správnou terciární strukturu produkovaného proteinu. Velkou nevýhodou je schopnost jednoho korektoru odstraňovat pouze jednu vadu. Pro správnou funkci je podstatné odstranit obě poruchy: nestabilitu NBD1 a interakce NBD1 – ICL. Například VX-809 (lumacaftor) zlepšuje interakci NBD1 – ICL, ale neopravuje nestabilitu NBD1. Corr-4a se chová opačným způsobem. Proto je pro úspěšnou terapii nutná kombinace několika korektorů (Zegarra-Moran & Galietta, 2017).

Další výzvou je přítomnost více mutací různých tříd u jednoho jedince. Kombinace korektorů s potenciátory měla pozitivní výsledky. Již zmíněný lumacaftor, také známý pod názvem VX-809, se stal prvním lékem schváleným pro klinické využití. Lumacaftor

v kombinaci s potenciátorem ivacaftor poskytuje přínos pro pacienty s cystickou fibrosou homozygotní pro mutaci CFTR Phe508del. Celkem 1108 pacientů podstoupilo randomizaci a dostalo studovaný lék Orkambi. Průměrná výchozí hodnota FEV1 byla 61 % normálu. V obou studiích došlo k významnému zlepšení primárního cílového bodu o 2,6 až 4% (Wainwright et al., 2015). Orkambi je nyní dostupné na českém trhu pro pacienty starší 6 let, kteří jsou homozygotními nosiči mutace F508del pro gen CFTR (*SÚKL - Přehled léčiv*, b.r.).

#### **4.2.3 Stabilizátory**

Stabilizátory jsou molekuly, které ukotvují CFTR v plazmatické membráně, čímž zabraňují jeho odstranění a degradaci lysozomy. Použití stabilizátorů je vhodné pro mutace, jejichž výsledkem je protein se zkráceným poločasem životnosti (IV. třída). Proteiny jsou sice přítomné, ale stále vykazují sníženou stabilitu a jsou rychle odstraněny periferními mechanismy (Lopes-Pacheco, 2020).

Cavosonstat (N91115; Nivalis) byl prvním stabilizátorem CFTR testovaným v klinických studiích. Bylo prokázáno, že podporuje zrání CFTR a stabilitu plazmatické membrány inhibicí nitrosoglutathionreduktasy in vitro. V první fázi testu neprokázal cavosonstat žádné bezpečnostní riziko ani při nejvyšší podávané dávce, která dosud vedla ke snížení koncentrace chloridu v potu u pacientů s homozygotní mutací F508del. Ve druhé fázi testu byl cavosonstat použit v kombinaci s ivacaftorem/lumacaftorem. Studovaný stabilizátor neprokázal žádný další přínos pro funkci plic ani snížení koncentrace chloridů v potu. Z tohoto důvodu byl jeho klinický vývoj pro léčbu cystickou fibrosou ukončen (Lopes-Pacheco, 2020).

#### **4.2.4 Amplifikátory**

Amplifikátory jsou malé biologicky aktivní molekuly, které působí jako „zesilovači“. Jsou schopny zvyšovat syntézu CFTR proteinu a podporovat jeho funkce. Na rozdíl od korektorů a potenciátorů, které působí na strukturu a funkci CFTR proteinu, amplifikátory cílí na proces biosyntézy (Ong & Ramsey, 2016).

Jsou to modulátory, které jsou závislé na translaci. Stabilizují mRNA během translace (co-translačně) a proto nemají žádný účinek bez translace. Vzhledem k tomu, že působí kotranslačně, jsou amplifikátory vhodné pro léčbu pacientů s mutacemi V. třídy, u nichž je CFTR syntetizován ale v menším množství kvůli poruchám během translace mRNA. Mechanismus účinku amplifikátorů spočívá v přímé vazbě na poly(rC)-vazebný protein 1 (PCBP1), což je RNA-vazebný protein regulující stabilitu specifických mRNA obsahujících C-bohaté sekvence. Výzkumy ukázaly, že amplifikátor se váže na PCBP1 a že tato vazba se zesiluje, pokud je PCBP1 již připojen k CFTR mRNA (Dukovski et al., 2020). Amplifikátor zvyšuje množství CFTR proteinu dostupného pro další působení korektorů a potenciátorů. Lék nesolicaftor, také známý pod názvem PTI-428, je prvním schváleným amplifikátorem pro klinické studie. Koterapie nesolicaftorem s lumacaftorem a ivacaftorem měla pozitivní výsledky u pacientů s F508del a delII1234\_R1239 mutacemi. Koterapie vedla k významnému snížení koncentrace chloridu v potu a zlepšení funkce plic (8% v ppFEV1) (Lopes-Pacheco, 2020).

#### **4.2.5 CFTR read-through agents**

Deset procent mutací v genu CFTR jsou způsobené předčasným začleněním stop kodonu před skutečný stop kodon. Nesmyslné mutace jsou mutace I. třídy a patří mezi ně např. G542X (Lopes-Pacheco, 2020). Produkce nefunkčních proteinů na základě předčasně

ukončené translace je pro buňku energeticky neefektivní. Proto jsou defektní mRNA degradovány NMD (nonsense-mediated mRNA decay) mechanismem (Brognna & Wen, 2009). Vhodnou strategií v terapii pacientů s nesmyslnými mutacemi jsou látky, kterým se říká read-through agents. Read-through agents jsou látky, které indukují „přečtení“ předčasného stop kodonu. Díky tomu je možné začlenit jinou aminokyselinu aby translace proběhla až do normálního (původního) konce mRNA (Lopes-Pacheco, 2020).

Mezi read-through agents patří aminoglykosidy. Byla prokázána jejich účinnost v léčbě CF. Ve svých studiích McHugh et al. zkoumal efektivitu aminoglykosidů v kombinaci s inhibitory NMD. Bylo zjištěno, že kombinace read-through agentů (G418, gentamicinu, paromomycinu) s NMD inhibitory (SMG1i) je efektivní strategií k obnovení funkce CFTR u pacientů s nonsense mutacemi. Avšak mají aminoglykosidy velká omezení. Při dlouhodobém použití, které je pro pacienty s CF celoživotní, vyvolávají nefrotoxicitu a ototoxicitu (McHugh et al., 2021). Vyvíjejí se nové modifikované aminoglykosidy, u nichž se očekává nižší toxicita (Rowe et al., 2011).

## 5 Genová terapie jako potenciální léčebná strategie

Genová terapie je léčebný postup, při kterém jsou do buněk pacientů přeneseny nukleové kyseliny (NK), tedy DNA nebo RNA, přičemž tyto NK kódují chybějící nebo nefunkční gen. Tato terapeutická metoda může být široce aplikována: od monogenních poruch až po získaná onemocnění, jako je rakovina, infekční, autoimunitní a kardiovaskulární choroby (Brunetti-Pierri, 2017a).

Cílem genové terapie je vyřešit primární, tedy genetickou, příčinu onemocnění a tím zmírnit jeho průběh. Díky pokroku v léčbě a kvalitnější zdravotní péči se nyní střední délka života pacientů s CF pohybuje kolem 40 let (Keogh et al., 2018). Nicméně cca 10% pacientů nereaguje na modulátory CFTR, protože CFTR není u nich vůbec syntetizován nebo je jeho syntéza příliš nízká (Burgener & Moss, 2018). Na rozdíl od farmakologických přístupů je genová terapie, ať už prostřednictvím přidání genu nebo jeho editací, schopna ovlivnit expresi CFTR na úrovni DNA. Očekává se, že tato změna je trvalá po celou dobu života buněk, již přijaly editaci. Genová terapie je nezávislá na fenotypu neboli konkrétní mutaci, a tak se stává vhodnou léčebnou strategií pro všechny pacienty s CF, bez ohledu na jejich genotyp (Griesenbach et al., 2016; citovano v Sui et al., 2022).

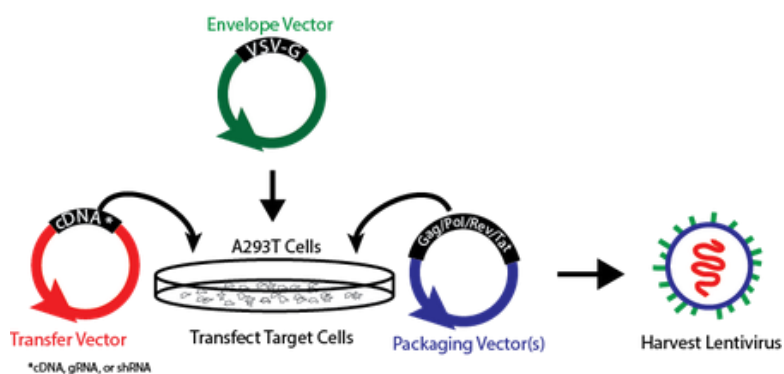
I přesto, že CF postihuje více orgánů, genová terapie cílí na plíce, protože 90-95% úmrtí na toto onemocnění je zapříčiněno těžkými plicními nemocemi (Orlov et al., 2014). Podstatou genové terapie je dodání genu CFTR do epitelových buněk dýchacích cest. To lze uskutečnit pomocí virových a nevirálních vektorů.

### 5.1 Virové vektory

Dle Griesenbacha et al. (2016) jsou virové vektory považovány za účinnější, protože díky přirozené schopnosti pronikat do buněk a začleňovat genetický materiál do buněčného

jádra umožňují efektivní doručení a expresi terapeutických genů. Kromě toho jsou některé vektory, jako např. adenoviry nebo adenoasociované viry, mají specifický tropismus, což je schopnost cílit konkrétní tkáň nebo buňky.

Pro bezpečné využití virových vektorů je nutno se zbavit schopnosti rozmnožovat se. Avšak je důležité zachovat schopnost infikovat buňky. Toho lze dosáhnout odstraněním části virového genomu, která reguluje replikaci a expresi cytotoxických proteinů, přičemž sekvence kódující kapsidové proteiny je zachována. Na místo odstraněných sekvencí se vkládá kazeta, která by měla obsahovat terapeutický gen a promotor. K výrobě virových vektorů se používají lidské embryonální ledvinové buňky (HEK 293). Do těchto buněk se vpravují plazmidy nesoucí potřebné složky pro výrobu virového vektoru (transgen, sekvence kódující kapsid). Po transfekci buněk dochází k produkci virových částic, které obsahují terapeutickou DNA. Následně se vektory podléhají promytí, aby se uvolnily z buněk. Pro odstranění nečistot a získání čistých virových vektorů se používají různé metody purifikace, například chromatografie nebo centrifugace. Poté se testuje kvalita vyrobených vektorů. Kontroluje se koncentrace (titr), přítomnost nečistot a úroveň exprese terapeutického genu. Pokud jsou splněny požadavky může být vektor schválen pro klinické studie (Brunetti-Pierri, 2017).



Obrázek 2 Schéma výroby virových vektorů na příkladě lentivirů. Do buněčné linie 293T se vpravují 3 plazmidy nesoucí cDNA a sekvence potřebné pro zabalení. Zdroj: (Addgene: Lentiviral Guide, b.r.)

V genové terapii se používají různé typy virových vektorů, např. adenoviry, adenoasociované viry, lentiviry a další. Výběr vektoru závisí na mnoha faktorech, jako jsou toxicita, kapacita genomu a ne v poslední řadě typ onemocnění a cílové buňky nebo tkáň (Benskey et al., 2019).

Virový vektor	Kapacita (kb)	Toxicita	Udržitelnost exprese	Výhody	Nevýhody
Ad	8-35	Značná imunogenicita / mírná cytotoxicita	Rychlá a vysoká exprese, ale omezená imunitní odpověď	Vysoká úroveň exprese transgenu, tropismus k dýchacím cestám	Silná imunitní odpověď
rAAD	5	Potenciální imunogenicita v závislosti na kapsidu / nízká toxicita	Přetrvává v nedělicích se buňkách, při dělení podléhá genomovému zředění	Široký tropismus	Malá kapacita
LV	8	mírná imunogenicita	Přetrvává v dělicích i nedělicích se buňkách	Prodloužená exprese transgenu	Značné riziko mutací

Tabulka 2 Přehled virových vektorů. Převzato a upraveno z (Benskey et al., 2019)

### 5.1.1 Adenovirové vektory

Adenoviry jsou neobalené, nesegmentované, lineární dvouvláknové DNA viry, které mají přirozený tropismus k plicím a dýchacím cestám. Jsou příčinou běžných nachlazení, pneumonie, bronchitidy. Z mnoha známých sérotypů je většina vektorů pro přenos genů založena na sérotypu 5, jenž u lidí způsobuje mírné respirační infekce (Griesenbach et al., 2010). Adenoviry jsou poměrně účinné jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Kromě toho mají dostatečně velkou přenosnou kapacitu a jsou schopné infikovat jak dělicí se, tak i nedělicí se buňky. Mimo jiné lze u adenovirů odstranit jejich virový genom, aby se zbavily své replikační funkce. Takovým modifikovaným adenovirům se říká „gutté“. Odstraněním replikační

části se zvětšuje kapacita pro přenos nukleových kyselin (Bronzino & Peterson, 2018). Díky těmto vlastnostem byly adenovirové vektory první volbou pro použití v genové terapii pro léčbu CF.

První klinická studia s použitím adenovirů byla provedena v roce 1989 doktorem Zabnerem et al.. Zabner et al. (1993) aplikovali Ad-CFTR na nosní epitel tří pacientů s CF. Nosní epitel byl zvolen, protože jeho buněčná struktura je podobná struktuře dolních dýchacích cest. Podání Ad2/CFTR-1, který obsahoval cDNA funkčního CFTR vedlo k částečné korekci defektu transportu chloridů. Při podání Ad2/CFTR-y nebyly pozorovány žádné známky virové replikace ani závažné vedlejší účinky. Mírný zánět a přechodné vedlejší účinky, jako je nosní kongesce nebo erytém, byly spíše přičítány anestetikům a aplikačnímu postupu než samotnému viru. Korekce genu, avšak byla přechodná. Elektrické změny, které indikují obnovu funkce CFTR, se postupně vrátily k původním hodnotám během několika týdnů (Zabner et al., 1993).

Mezi lety 1993-2001 bylo provedeno 9 klinických studií (tab. 3), ve kterých k dodání CFTR pacientům byly použité adenoviry. Tyto studie ukázaly, že i) v některých případech lze dosáhnout nízké úrovně genového přenosu na základě detekce CFTR mRNA a proteinu specifických pro vektor, ii) částečné korekce defektu transportu chloridů bylo dosaženo v nosním epitelu některých pacientů, iii) podávání adenovirových vektorů může způsobit zánět plic závislý na dávce, iv) účinnost byla obecně nižší, než se očekávalo na základě preklinických modelů, a v) opakované podávání vektorů vyvolalo humorální a buněčné imunitní odpovědi, které omezily účinnost při následných aplikacích (Griesenbach et al., 2010).

Ukázalo se, že použití adenovirů má své omezení. Dle Plasschaerta et al. (2024) kvůli vysoké imunogenicitě vektoru a jeho neschopnosti dosáhnout bazolaterálně umístěných coxsackie-adenovirových receptorů (CAR) jsou neúspěšné. Adenovirové vektory vstupují do buněk prostřednictvím interakcí s receptory. V prvním kroku se kapsid váže na glykoprotein CAR, dalším krokem je navázání pentonové bázi kapsidu na integrin v5, který se podílí na vazbě na fibronectin (Klink et al., 2004). Většina lidských epitelových buněk dýchacích cest nemá CAR na apikálně membráně, což výrazně omezuje účinnost transdukce adenovirovými vektory. Aby překonal toto omezení, Gregory et al. (2003) aplikovali sodnou sůl kaprátu (sodium caprate), která otevírá těsné spoje na luminální povrch AECs v plicích myši, aby umožnili přístup k receptoru CAR na bazolaterální straně epitelových buněk. Tato aplikace zvýšila genovou expresi v celkovém homogenátu plic 25krát, a až 45krát při použití adenoviru ve spojení s DEAE-dextranem (Griesenbach & Alton, 2009).

I přesto že „guttet“ adenoviry mají nižší imunogenicitu, stále vyvolávají imunitní odpověď. Proto se hledají jiné cesty doručení funkčního genu do buněk pacientů s CF.

Autoři	Místo aplikace	Opakovaná dávka	Bezpečnostní aspekty	Efektivita	
				Molekulární	Rozdíl potenciálů (PD)
Zabner et al. (1993)	Nosní sliznice	Ne	Žádné	mRNA nebyla detekována	snížení výchozí hodnoty směrem k normálním hodnotám
Crystal et al. (1994)	Nosní sliznice, plíce	Ne	Nejvyšší dávka vyvolává imunitní reakci	mRNA detekována v nose, ale žádná v plicích	nebyly prokázány žádné změny
Knowles et al. (1995)	Nosní sliznice	Ne	Mírné příznaky zánětu při vyšších dávkách	-	beze změn
Hay et al. (1995)	Nosní sliznice	Ne	Žádné	bylo detekováno malé množství CFTR mRNA	částečná korekce Cl <sup>-</sup>
Zabner et al. (1996)	Nosní sliznice	Ano	Žádné	-	částečná korekce Cl <sup>-</sup> , účinek klesá s podáním opakované dávky
Bellon et al. (1997)	Nosní sliznice, plíce	Ne	Žádné	v nose i plicích byla detekována mRNA v malém množství	-
Harvey et al. (1999)	Plíce	Ano	Žádné	v nose i plicích byla detekována mRNA v malém množství, s opakovanou dávkou klesá	-
Zuckerman et al. (1999)	Plíce	Ne	Příznaky chřipky při vyšších dávkách	Vector DNA, přechodná	-
Joseph et al. (2001) a Perricone et al. (2001)	Plíce	Ne	Mírné nespecifické zánětlivé reakce	bylo detekováno malé množství CFTR mRNA	-

Tabulka 3 Přehled klinických studií adenovirových vektorů mezi lety 1993-2001. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012)

### 5.1.2 Adenoasociované vektory

Adenoasociované viry (dále AAV) jsou lineární jednovláknové DNA viry s relativně širokým tropismem pro různé tkáně. AAV patří do čeledi Parvoviridae a rodu Dependoparvovirus. AAV se skládají ze dvou částí: rep regulující replikaci viru a cap kódující kapsidové proteiny a určující sérotyp a tropismus. AAV jsou považovány za poměrně bezpečné, protože nejsou spojeny s žádnou známou lidskou patologií a vyvolávají mírné imunitní odpovědi. Kromě toho mají relativně dlouhou dobu exprese, která dosáhá i řádu měsíců.

Mezi nejčastěji využívané sérotypy AAV v léčbě CF patří AAV2, AAV5 a AAV9, které mají schopnost transdukovat buňky dýchacího epitelu a umožnit tak expresi funkčního CFTR proteinu. Na rozdíl od adenovirů se AAV integrují do genomu pouze s nízkou frekvencí. Divoký typ AAV se vkládá do 19. chromozomu, avšak modifikované rekombinantní AAV, které se využívají k transportu nukleových kyselin, obvykle zůstávají v jádře jako epizomální konstrukty a tím se snižuje riziko mutagenních integrací (Flotte, 2005).

Replikace AAV vyžaduje přítomnost pomocného viru, např. adenoviru nebo herpesviru (Knipe & Howley, 2013). V případě rekombinantních AAV (rAAV) vektorů se však pomocné virové sekvence nahrazují terapeutickým genem, což eliminuje potřebu koinfekce pomocným virem a zvyšuje bezpečnost léčby (Kochergin-Nikitsky et al., 2021). Díky nízké toxicitě v porovnání s Ad, dlouhé době exprese a poměrně širokému tropismu se AAV staly předmětem studií. Wagner et al. (1998) v fázi I svých klinických testů aplikovali AAV-CFTR o různé dávce deseti pacientům s CF do nosních dutin v horní čelisti (maxillaris sinus). Pět pacientů náhodně dostalo jednu dávku vektoru a pět bylo léčeno počáteční nízkou

dávkou následovanou druhou vyšší dávkou. Dávky byly 100, 1000, 10000, 50000 a 100000 RU (replication unit). Při analýze PCR metodou na 14. den po aplikaci AAV-CFTR bylo zjištěno, že u pacientů, kteří dostali dávku více než 10000 RU byl prokázán detekovatelný přenos genu. Výsledky fáze I ukázaly, že účinek AAV závisí na dávce a nevyvolává skoro žádnou imunitní odpověď u pacientů (Wagner et al., 1998). S těmi to poznatky Wagner et al. (2002) začali fází II, ve které tgAAVCF byl podáván 23 pacientům. Dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebem kontrolovaná klinická studie potvrdila bezpečnost vektorů, ale účinnost byla nízká. Počet kopií tgAAVCF klesá z 0,6 na 14. den do 0,1 na 30. den. Na 90. den od podávání vektoru nebyla detekována žádná kopie tgAAVCF (Wagner et al., 2002). Vzhledem k tomu, že byla prokázána bezpečnost AAV, pokračují studie sérotypů a možných modifikací kapsidů (Plasschaert et al., 2024). Modifikací kapsidů lze ovlivnit tropismus k tkáním, což umožňuje využití více sérotypů AAV, a zvýšit stabilitu před systémy degradující viry v buňkách (Kochergin-Nikitsky et al., 2021).

AAV se vážou na eukaryotické buňky prostřednictvím specifických domén interagujících s buněčnými receptory (Drouin & Agbandje-McKenna, 2013). Po navázání na buněčný receptor je virus internalizován endocytózou, transportován do jádra a jeho genom je přepisován do dvouvláknové formy. Jedním z nejčastějších receptorů využívaných různými sérotypy AAV je heparan sulfát proteoglykan (HSPG), což je polyaniontový glykoprotein obsahující kovalentně vázané heparan sulfátové řetězce (HS) (Kochergin-Nikitsky et al., 2021). Několik studií prokázalo, že vložením oligonukleotidů do kapsidové domény AAV, která váže HSPG, lze změnit tropismus sérotypů. Například vložením oligopeptidu ESGLSQS do AAV8, již má přirozený tropismus k tkáním srdce, svalů a jater, zvýšila transdukce buněk plic in vivo u myši (Michelfelder et al., 2011). Další studie se

zaměřují na snížení degradace v buňce. Nahrazení různých povrchově exponovaných aminokyselinových zbytků na kapsidách AAV brání degradaci zprostředkované ubiquitinem a zvyšuje účinnost vektorové transdukce (Qi et al., 2013).

Jedním z velkých omezení je malá kapacitní velikost nosičů. AAV mohou zabalit přibližně 4,7 kb DNA, přičemž asi 0,3 kb je vyhrazeno pro virové mechanismy, tedy pro terapeutický gen zbývá jen 4,4 kb. Silný promotor v kombinaci s plnou délkou CFTR činí cca 4,5 kb a tak přesahuje kapacitu AAV vektoru (Plasschaert et al., 2024). Aby bylo možné překonat problém omezené kapacity balení AAV vektorů, byl vyvinut alternativní přístup spočívající ve zkrácení cDNA genu CFTR. Ostedgaard et al. (2002) prokázali, že CFTR cDNA s odstraněnou částí R-domény vede k částečné korekci transportu chloridů in vitro. Později bylo prokázáno, že odstranění R-domény spíše zhoršuje funkce proteinu. Na R-doméně probíhá fosforylace, která řídí otevírání kanálu CFTR a ovlivňuje interakce s jinými iontovými kanály (Ko et al., 2004; Liang et al., 2012).

AAV vektory vykazují značný potenciál v genové terapii díky svým vlastnostem. Již je schválen a úspěšně se používá lék Zolgensma (AAV9) v léčbě spinální svalové atrofie. Ale pro použití v léčbě CF je malá kapacita velkým omezením, které dosud nebylo úspěšně překonáno, což potvrzují výsledky studií (tab. 4).

Autoři	Místo aplikace	Opakovaná dávka	Bezpečnostní aspekty	Efektivita	
				Molekulární	Rozdíl potenciálů (PD)
Wagner et al. (1998)	Nosní dutiny	Ne	Žádné	-	částečná korekce Cl <sup>-</sup>
Aitken et al. (2001)	Plíce	Ne	Žádné	nebyla detekovaná žádná CFTR mRNA	beze změn

Wagner et al. (2002)	Nosní dutiny	Ne	Žádné	-	beze změn
Flotte et al. (2003)	Nosní sliznice	Ne	Ne	bylo detekováno malé množství CFTR DNA	beze změn
Moss et al. (2004)	Plíce	Ano	Ne	nebyla detekovaná žádná mRNA, byla detekovaná DNA v malém množství	beze změn
Moss et al. (2007)	Plíce	Ano	Ne	-	beze změn

Tabulka 4 Přehled klinických studií AAV. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012)

### 5.1.3 Lentivirové vektory

Lentiviry jsou obalené RNA viry patřící do čeledi Retroviridae. Jejich genom se skládá ze dvou kopií jednovláknové RNA (ssRNA) a obsahuje tři hlavní části: gag, pol a env. Gag kóduje strukturální proteiny kapsidy, pol kóduje enzymy reverzní transkriptasu, integrasu a proteasu, env kóduje obalové glykoproteiny umožňující vstup do buněk (Escors & Breckpot, 2010). Lentivirové vektory jsou odvozeny především z lidského imunodeficientního viru (HIV-1), přičemž jsou geneticky modifikovány tak, aby byly bezpečné a replikace-neschopné (Milone & O'Doherty, 2018). Na rozdíl od jiných retrovirů mají lentiviry schopnost infikovat jak dělicí se, tak nedělicí se buňky. Výhodou těchto vektorů oproti AAV je větší kapacita genetického materiálu (až 8 kb) (Brunetti-Pierri, 2017a), což umožňuje doručení celého CFTR genu spolu s regulačními sekvencemi, čímž se zvyšuje efektivita transdukce a exprese proteinu.

Po vstupu do buňky prostřednictvím receptorové endocytózy je lentivirová RNA přepsána na dvouvláknovou DNA pomocí reverzní transkriptasy. Tato DNA je následně integrována do hostitelského genomu pomocí virové integrasy, což umožňuje trvalou expresi terapeutického genu (Milone & O'Doherty, 2018). Tato vlastnost je zásadní pro

léčbu genetických onemocnění vyžadujících dlouhodobou nebo celoživotní expresi chybějícího proteinu, ale také zvyšuje riziko náhodných mutací, zejména onkomutací. Kromě toho jsou lentiviry velice nestabilní při přípravě vektorů, což komplikuje práci s nimi a zvyšuje náklady na realizaci jejich aplikace (Escors & Breckpot, 2010).

Využití lentivirových vektorů je spojeno s velkým rizikem onkomutací. Lentiviry integrují transgen do hostitelského genomu náhodně, což může vyvolat mutace. První klinické studie lentivirových vektorů byly velice úspěšné, dokud nebylo prokázáno nebezpečí. V roce 2000 se profesorce M. Cavazzana-Calvo et al. (2000) podařilo vyléčit 11 dětí s těžkou imunodeficiencí. Pro přenos správného genu byl použit MLV vektor, což je vektor na bázi viru leukemie u myši. Po několika letech u některých pacientů byla diagnostikována T-leukemie. Onkomutace byla způsobena aktivací genu LMO2, vedle kterého byl integrován vektor. Mutace měla za následek nadměrnou expresi a nekontrolované dělení buněk. Proto byly změněny strategie ve vývoje lentivirových vektorů, aby snížili riziko mutací. Potenciálním řešením se stala výroba neintegrujících lentivirových vektorů (NILV) (Escors & Breckpot, 2010). Lentiviry integrují do genomu pomocí integrasy. Vyvoláním mutace v sekvenci kodující integrasu lze snížit její množství a tím zabránit začlenění do hostitelského genomu. NILV tak zůstává v buňce epizomálně (Yáñez-Muñoz et al., 2006). NILV mohou být použitelné v případě, že buňky našeho zájmu jsou nedělicí. V jiných případech jejich účinek je nižší (Escors & Breckpot, 2010).

V léčbě CF pomocí lentivektorů mohou být použité vektory odvozeny od Sendai viru (SeV). SeV byly zvolené kvůli jejich přirozenému tropismu k epitheliálním buňkám dýchacích cest (Alton et al., 2017). Výsledný vektor rSIV.F/HN (také BI 3720931) je lentivirový vektor třetí generace pseudotypizovaný Sendai virus s F a HN obalovými

proteiny. Receptory pro F/HN proteiny jsou umístěny na apikálním povrchu epitelu dýchacích cest, což umožňuje vstup do buněk po inhalačním podání. Tento vektor ukázal účinnou in vivo transdukcí dýchacích cest primátů bez toxicity (Davies et al., 2024 a). Ve druhém čtvrtletí roku 2024 začala studie Lenticlair<sup>TM</sup>1. Je to první studie lentivirových vektorů v léčbě CF na lidech. Pacienti jsou rozděleni do tří skupin. Každá ze skupin dostala inhalací jednu dávku BI 3720931: nízkou, střední a vysokou. Konec studií je plánován v roce 2026. Po ukončení studie Lenticlair<sup>TM</sup>1 budou pacienti monitorováni dalších 15 let pro odhalení případných mutací spojených s použitím vektoru (Davies et al., 2024 b).

## **5.2 Nevirální vektory**

Sice virové vektory vykazují velký potenciál a účinnost pro přenos nukleových kyselin na místo našeho zájmu, mají určitá omezení jako je nebezpečí, velké náklady na jejich produkci. Vzhledem k těmto nedostatkům se genetici začali věnovat vývoji alternativních metod přenosu genů do buněk bez použití virových částic. Nevirální metody nevyvolávají imunitní odpověď a proto jsou bezpečnější pro zdraví v porovnání s virovými vektory (Bronzino & Peterson, 2018).

### **5.2.1 Neobalená DNA**

Samotná molekula DNA se může dostat do buňky pomocí injekce intramuskulárně nebo intravenózně. Avšak injekce nejsou tak účinné, jak bychom si přáli. Hlavním omezením použití neobalených DNA je jejich chemická vlastnost. DNA je kvůli přítomnosti fosfátů záporně nabitá, a proto není schopná projít membránou za normálních podmínek. Aby zvýšili efektivitu transfekce Neumann et al. (1982) použili fyzikální metodu

elektroporaci. Ukázalo se, že elektroporace pomocí elektrického proudu nebo iontů vápníku dočasně zvyšuje propustnost plazmatické membrány a tím umožňuje vstup DNA do buňky. Existují různé další způsoby, jak překonat fyzickou bariéru. Dnes se používají mikroinjekce (mikro stříkačky), sonoporace, a tzv. gene gun. Tyto metody umožňují přenos neobalené DNA přes buněčnou membránu (Wang et al., 2013).

Mikro stříkačky jsou vhodným nástrojem pro použití v případech, kdy exprese transgenů se vyžaduje na nižší, ale dostatečné úrovni k vyvolání imunologické odpovědi. Lze je použít pro očkování (Wang et al., 2013).

Sonoporace je metoda založena na použití ultrazvukových vln. Stejně jako elektroporace tato metoda zvyšuje propustnost membrány. Účinnost přenosu genů závisí na ultrazvukové frekvenci a intenzitě, délce procedury, množství použité DNA, kontrastních látkách a typu cílových tkání. Hlavními výhodami sonoporace jsou bezpečnost, neinvazivita a schopnost přenášet geny do buněk vnitřní orgány bez chirurgického zákroku. Avšak je sonoporace méně účinná v porovnání s jinými metodami (Wang et al., 2013).

Gene gun metoda byla původně vyvinutá a aplikovaná pouze na rostlinách. Později ale našla svoje využití i pro lidi. Gene gun je balistická metoda. Malé částice těžkých kovů (nejčastěji Au – zlato) nesou na sebe DNA. Částice jsou tak malé (cca 1 $\mu$ m), že dokážou proniknout do buňky. Metoda je použitelná jak in vivo, tak i ex vivo. Biologická balistická metoda se používá k přenosu genů do kůže, svalů, sliznic, chirurgicky odstraněných tkání nebo nádorových buněk. Metoda gene gun je poměrně bezpečná, ale má své omezení. Účinnost metody je nižší v aktivně dělících se buňkách (Lin et al., 2000).

Uvedené výše metody mají široké použití v genové terapii, ale bohužel nejsou vhodné pro přenos nukleových kyselin v léčbě CF.

### 5.2.2 Liposomové komplexy

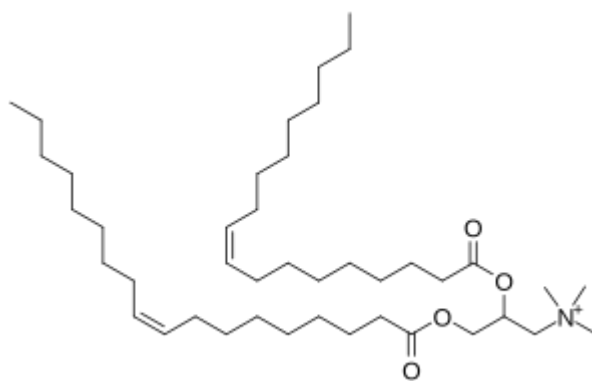
Liposomové komplexy (dál lipoplexy) jsou široce používány v genové terapii k přenosu genetického materiálu do rakovinných buněk prostřednictvím potlačení onkogenů, nebo aktivací genů, které potlačují nádor. Lipoplexy se také úspěšně používají k transfekci endoteliálních buněk dýchacích cest (Bronzino & Peterson, 2018).

Lipoplexy jsou komplexy vytvořené z nukleových kyselin a lipidů. Tyto komplexy představují kondenzované struktury, jež schopné procházet buněčnými membránami (Bronzino & Peterson, 2018).

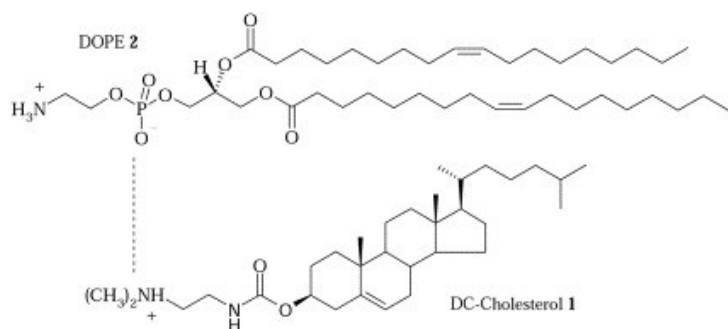
Přítomnost lipidů umožňuje překonat omezení v transportu neobalené DNA tím, že kolem záporně nabitě molekuly tvoří kladně nabitý obal. K tvorbě lipoplexů lze použít aniontové i neutrální lipidy, ale kationtové lipidy zvyšují stabilitu lipoplexů a zlepšují jejich pronikání do buněk, a proto jsou populárnější (Bronzino & Peterson, 2018). Kationtové lipidy jsou kladně nabitě amfifilní molekuly, které se skládají z čtyř složek: kationtové polární skupiny, hydrofobní domény, linkeru spojujícího polární hlavovou skupinu s nepolární ocasní skupinou, páteřní domény oddělující hlavovou skupinu od hydrofobní domény. Mezi nejčastěji používané kationtové lipidy patří dioleylpropyltrimethylamoniumchlorid (DOTMA) a dioleoyl-3-trimethylamoniumpropan (DOTAP) (Liu & Zhang, 2011). Bohužel lipoplexy s kationtovými lipidy ve vysokých koncentracích vykazují buněčnou toxicitu. Tato toxicita závislá na dávce omezuje množství genetického materiálu, který lze dodat (Bronzino & Peterson, 2018). V poslední době se intenzivně pracuje na vývoji nových kationtových lipidů s cílem zvýšit účinnost transfekce a snížit toxicitu. Tak byl vyvinut kationtový lipozomální vektor obsahující nový kationtový lipid N',N'-dioktadecyl-N-4,8-diaza-10-aminodekanoylglycin amid (DODAG) v kombinaci

s neutrálním lipidem 1,2-dioleyl-sn-glycerol-3-fosfoethanolaminem (DOPE). Výsledky ukázaly, že tento lipozomální vektor vykazuje vyšší transfekční účinnost v buňkách OVCAR-3, IGROV-1 a HeLa, přičemž zároveň vykazuje nízkou buněčnou toxicitu (Liu & Zhang, 2011).

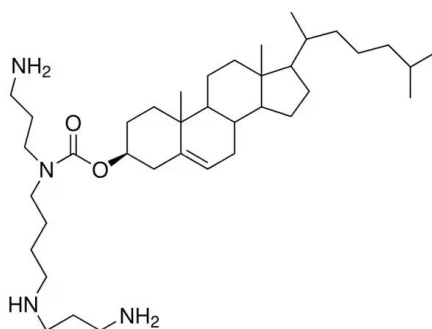
Kationtové lipidy se staly předmětem zájmu vědců, jíž se věnují CF. Od roku 1995 až po 2001 probíhaly studie (tab. 5) s použitím lipidů DC-Chol/DOPE (obr. 2), DOTAP (obr. 3) a GL-67 (obr. 4).



Obrázek 3 Chemická struktura DOTAP. Zdroj: (Dioleoyl-3-Trimethylammonium Propane, 2024)



Obrázek 4 Chemická struktura DC-Chol/DOPE. Zdroj: (Bianco et al., 2003)



Obrázek 5 Chemická struktura GL-67. Zdroj: (GL67 powder Avanti Polar Lipids, b.r.)

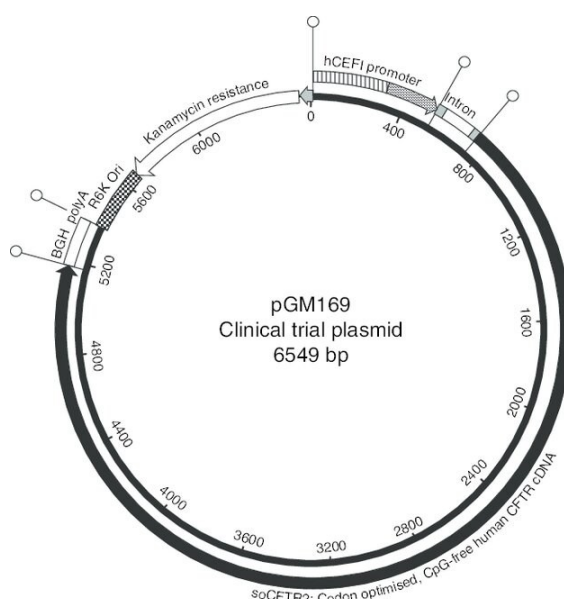
Výsledky těchto studií potvrzují jejich úspěšnou aplikaci a velký potenciál v léčbě CF. Na základě pěti studií lze posuzovat, že cDNA-CFTR transportovaná pomocí lipoplexů částečně obnovuje funkci proteinu CFTR a nevyvolává značnou imunitní odpověď.

Autoři, použitý vektor	Místo aplikace	Opakovaná dávka	Bezpečnostní aspekty	Efektivita	
				Molekulární	Rozdíl potenciálů (PD)
Caplen et al. (1995) DC- Chol/DOPE	Nosní dutiny	Ne	Žádné	nebyla detekovaná žádná mRNA	částečná korekce Cl <sup>-</sup>
Gill et al. (1997) DC- Chol/DOPE	Nosní dutiny	Ne	Žádné		částečná korekce Cl <sup>-</sup>
Porteous et al. (1997) DOTAP	Nosní dutiny	Ne	Žádné	bylo detekováno malé množství mRNA	částečná korekce sekrece Cl <sup>-</sup>
Hyde et al. (2000) DC- Chol/DOPE	Nosní sliznice	Ano	Žádné	bylo detekováno malé množství CFTR DNA, přítomný protein CFTR.	částečná korekce sekrece Cl <sup>-</sup>
Alton et al. (1999) GL-67	Nosní sliznice, plíce	Ne	příznaky chřipky	nebyla detekovaná žádná mRNA.	korekce sekrece Cl <sup>-</sup> až 25 %

Tabulka 5 Přehled klinických studií liposomových vektorů. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012)

Britský profesor Alton et al. (1999) provedl studii, která měla prokázat účinnost a bezpečnost liposomových vektorů na základě již dostupných údajů z předchozích studií. Fáze I se zúčastnili 16 kluků s CF, u nichž byla prokázána infertilita. Genotypy pacientů byly následující: 12  $\Delta F508/\Delta F508$ , 1  $\Delta F508/W1282X$  a 3  $\Delta F508$ /jiné. Pacienti byli náhodně rozdělení do dvou skupin: aktivní a kontrolní. Osm pacientů dostalo lipoplex (aktivní skupina) a dalších osm dostalo placebo. Alton et al. použili lipoplex GL-67/DOPE/DMPE-PEG<sub>5000</sub>. Tento lipoplex byl vytvořen společně s neutrálním lipidem DOPE, o němž se předpokládá, že usnadňuje endosomální únik DNA, spolu s malým množstvím lipidu obsahujícího polyethylenglykol (DMPE-PEG5000), aby se stabilizovaly formulace v koncentracích dostatečných pro aerosolový přenos do lidských plic (Eastman et al., 1997).

Terapie vedla ke zlepšení transportu chloridů u 6 z 8 pacientů v aktivní skupině, obnovení funkce CFTR odpovídalo 25 %. Avšak nebyla pozorovaná žádná změna v transportu sodíku. U pacientů z obou skupin byly pozorovány příznaky imunitní odpovědi. 7 z 8 pacientů v aktivní skupině měli příznaky chřipky: horečka  $38,3^{\circ}\text{C}\pm 0,3$  (hodnota teploty se vrátila k normálu do 36 h.), kašel, dusnost. 6 pacientů ze skupiny placebo také mělo mírné respirační příznaky, jako je kašel a dusnost. Studie měla určitý úspěch vzhledem nežádoucím účinkům a částečné korekci funkce CFTR (Alton et al., 1999). Fáze II, které se zúčastnilo 140 pacientů, měla za cíl prokázat bezpečnost a účinnost opakovaného podávání vylepšeného kationtového lipoplexu pGM169/GL67A, kde pGM169 (obr. 5) je plazmid nesoucí transgen a GL67A je lipid.



Obrázek 6 Schéma pGM169 v pre-klinických studiích. Zdroj: (Pringle et al., 2009)

Alton et al. (2015) rozdělili pacienty do dvou skupin následovně: 62 pacientů by mělo brát placebo, 78 pacientů by mělo dostávat aktivní lék podle protokolu. Avšak jenom 83 % pacientů, tedy 116 lidí, prošlo všemi vstupními testy a odpovídalo požadavkům studie. Pacienti museli být starší 12 let a mít FEV<sub>1</sub> (usilovný výdechový objem) 50-90 %. Účastníci studie byli vybíráni bez ohledu na jejich genotyp. Studie trvala 12 měsíců, během kterých pacienti dostali 9 dávek, buď léku anebo placeba. Každá dávka léku obsahovala 5 ml pGM169/GL67A s obsahem 0,2 mg plasmidové DNA. Stejně jako ve fázi I byla léčba doprovázena mírnými respiračními projevy bez dalších závažných nežádoucích účinků. Primárním kritériem pro hodnocení byla změna plicní funkce, tedy rozdíl FEV. V aktivní skupině výsledný rozdíl byl -0,4 % oproti kontrolní skupině, kde pokles FEV byl -4,0 %. Dále se hodnotily změny funkce chloridových kanálů, zánětlivé markery a bakteriální infekce. Nebyly zaznamenány žádné klinicky významné změny funkce CFTR. Mezi aktivní a kontrolní skupinami nebyl zjištěn významný rozdíl v kolonizaci *Pseudomonas aeruginosa*. Zánětlivé markery, jako jsou interleukin-8 (IL-8) a neutrofilní elastasa, potvrdily pokles

infekcí v aktivní skupině a nárůst v kontrolní. Hladina Il-8 klesla o 15 % u pacientů, již brali pGM169/GL67A, a stoupla o 10 % u placebo skupiny. Tyto výsledky znamenají snížení zánětu u pacientů z aktivní skupiny. Studie prokázala, že léčba CF pomocí opakovaného podání kationtových lipidových vektorů je bezpečná a má pozitivní vliv na funkce plic. Nevirální vektory mají velký potenciál a jejich rozvoj by měl pokračovat (Alton et al., 2015).

### **5.3 Technologie genové editace**

Základem genové editace jsou manipulace genomu prostřednictvím homologní rekombinace. Homologní rekombinace v savčích buňkách za normálních podmínek je poměrně neefektivní. Většina dvouřetězcových zlomů (DSB) se opravuje nehomologním spojením konců (NHEJ), což je rychlejší způsob, který ale vede k častým náhodným mutacím (Alberts et al., 2022). Bylo zjištěno, že indukce dvouřetězcových zlomů zvyšuje četnost a účinnost homologní rekombinace. Klíčovým krokem při manipulaci s genomem nebo editaci genů je tedy vytvoření sekvenčně specifického DSB v cílovém genu. Editace genů proto vyžaduje sekvenčně specifické endonukleasy, tzv. „molekulární nůžky“, k vytvoření DSB na požadovaném místě (Ceccaldi et al., 2016). Jedním z takových nástrojů, který vykazuje vysoké perspektivy v genovém inženýrství je systém CRISPR/cas9. Tento systém nabízí nové možnosti pro rozvoj genové terapie cystické fibrosy, umožní přesnou opravu jakékoli mutace CFTR v endogenním lokusu, což by teoreticky mohlo vyřešit složitosti regulace CFTR na buněčné úrovni v plicích pomocí vektorů (Yan et al., 2019).

#### **5.3.1 CRISPR/CAS 9**

CRISPR/cas9 je zkratkou pro „systém opakujících se palindromických sekvencí oddělených pravidelnými intervaly a jejich asociované proteiny (Cas)“. CRISPR/cas9

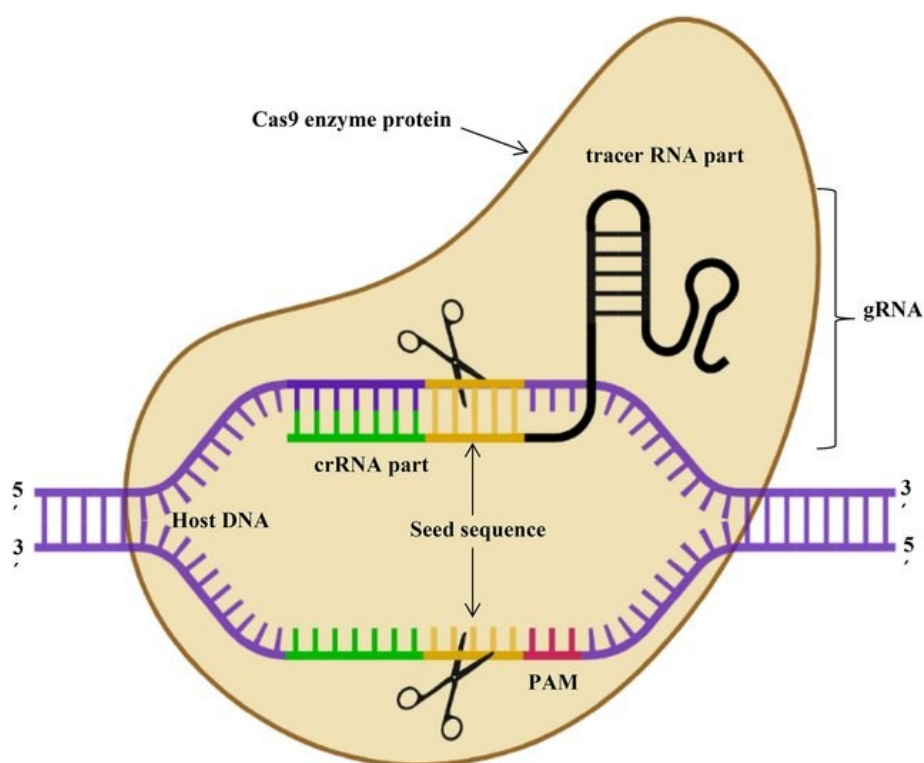
představuje adaptivní imunitní systém prokaryot, který si pamatuje předchozí infekce tím, že integruje krátké sekvence invazivních genomů, tzv. spacers, do CRISPR lokusu. Tyto spacers, prokládané repetitivními sekvencemi, jsou exprimovány jako malé vodící CRISPR RNA (crRNA), které jsou využívány proteiny Cas k cílenému rozpoznání a eliminaci invazivních sekvencí při opakované infekci (Jiang & Doudna, 2017). Přírodní systém pro archei bakterií našel svoji aplikaci i v savčích buňkách.

System CRISPR-Cas funguje sekvencně specifickým způsobem, kdy rozpoznává a štěpí cizorodou DNA nebo RNA. K rozpoznání cílového místa slouží jednovláknová vodící RNA (sgRNA), která je navržena tak, aby odpovídala cílové sekvenci v genomu. Tato RNA se váže na endonukleasu Cas9, což je enzym schopný přesně přestříhnout dvouřetězcovou DNA. Pro aplikaci systému CRISPR-Cas9 k editaci genů nebo jiným účelům je zapotřebí tři složek: crRNA s 5' spacerovou oblastí, transaktivující crRNA (tracrRNA) a efektorový protein Cas9. Tento obranný mechanismus lze rozdělit do tří fází: i) adaptace neboli získávání spacerů, ii) biogeneze crRNA a iii) interference s cílovou sekvencí (Hille & Charpentier, 2016).

Ve fázi adaptace dochází k získávání nových spacerových sekvencí z invazivní DNA do CRISPR lokusu. K tomu slouží pomocné proteiny Cas, které umějí vyhledat krátké úseky cizorodé DNA a následně je integrují do CRISPR lokusu. V důsledku tohoto procesu buňka získává „paměť“ o předchozích infekcích (Hille & Charpentier, 2016).

Po začlenění spacerových sekvencí do CRISPR lokusu dochází k transkripci celého CRISPR pole do pre-crRNA. Pre-crRNA je následně zpracována enzymy na jednotlivé krátké crRNA, které nesou sekvence odpovídající předchozím infekcím (Hille & Charpentier, 2016).

Ve třetí finální fázi dochází k rozpoznání a degradaci cizorodé DNA. Ribonukleoproteinový komplex Cas9-crRNA-tracrRNA se váže na cílovou dvouřetězcovou DNA (dsDNA). Vazba je řízena komplementaritou mezi přibližně 20 nukleotidů dlouhou spacerovou oblastí v crRNA a cílovým místem na komplementárním neboli cílovém, řetězci. Cas9 vytváří DSB v DNA (obr. 6), čímž deaktivuje virus nebo jiný genetický element (Hille & Charpentier, 2016). Cas9 má dvě domény, které se podílejí na tvorbě DSB. Jsou to RuvC a HNH domény, které zajišťují nukleasovou aktivitu, přičemž RuvC štěpí nekomplementární řetězec obsahující PAM a HNH komplementární řetězec. Nekomplementární řetězec, nazývaný také protospacer, obsahuje přibližně 20 nukleotidů dlouhou sekvenci, která odpovídá délce a sekvenci spacerové oblasti, avšak s rozdílem T-U. Na 3' konci protospaceru se nachází sekvence „NGG“, označovaná jako protospacer adjacent motif (PAM). Výsledkem tohoto procesu je dvouřetězcový zlom s tupými konci, který se nachází přibližně 3 bp před NGG PAM sekvencí. (Weng et al., 2023). Buňka pak využívá svých přirozených opravných mechanismů k rekonstrukci zlomu.



Obrázek 7 Proces vzniku DBS pomocí CRISPR/Cas9. Zdroj: (Kashtwari et al., 2022)

Velkým omezením použití CRISPR/Cas9 v léčbě CF je, že homologní rekombinace neprobíhá v nedělicích se buňkách jako jsou epitelální buňky dýchacích cest. Navíc se tyto buňky obnovují přibližně každé čtyři měsíce, a proto i v případě, že se editace podaří dosáhnout, je třeba ji provést opakovaně. Opakovaná editace je spojená se zvýšeným rizikem náhodných mutací a také s imunitní odpovědí na vektory použité k přenosu Cas9 (Graham & Hart, 2021).

Strategie k překonání těchto komplikací je cílení na basální buňky epitelu dýchacích cest. Jedná se o buňky schopné proliferace a diferenciaci. Tyto multipotentní kmenové buňky mohou být opravovány pomocí HDR a neustále vytvářet správně fungující buňky. Aby však bylo možné k těmto bazálním buňkám přistupovat *in vivo*, musí být nejprve odstraněna vnější epitelální vrstva buněk. Mechanickým seškrábáním lze odstranit části epitelálních buněk, zatímco bazální buňky zůstávají neporušené. Chemické odstranění

epitelu je však v obtížné, protože může narušit celkový stav dýchacích cest. Další možností je využití běžných rhinovirů, které mohou epitel mírně podráždit. Rhinovirus C a chřipkové viry H1N1 se specificky zaměřují na řasinkové buňky v dýchacích cestách, což vede k jejich infekci a následnému odstranění z epitelu. Záměrné vyvolání takové infekce by tedy mohlo usnadnit přístup k bazálním buňkám, i když je docela nebezpečné (Graham & Hart, 2021).

Další strategií je aplikace ex vivo. Odebrané kmenové buňky jsou upravené mimo tělo pacienta a transplantované zpátky. Tento přístup umožňuje dosáhnout co nejpřesnějších uprav bez necílených mutací (off-target mutations). Metoda je však vhodná pro léčbu onemocnění kůže, svalů apod. V současné době se navrhuje ex vivo editace bazálních buněk a jejich transplantace do dýchacích cest, ale zatím nejsou žádné úspěšné studie (Graham & Hart, 2021).

Navzdory obrovskému potenciálu CRISPR-Cas9 stále existují značné problémy spojené s jeho používáním. Jedním z dalších problémů jsou takzvané necílené účinky, kdy se v jiných částech genomu mohou objevit nežádoucí mutace, které mohou mít nepředvídatelné účinky.

Dalším problémem je dlouhodobá bezpečnost úpravy genů, zejména pokud jde o úpravu pohlavních buněk. Změny provedené v těchto buňkách budou předány budoucím generacím, což vyvolává etické diskuse (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

## 6 Diskuse

Cystická fibrosa se zpočátku jevila jako ideální kandidát pro léčbu genovou terapií. Ačkoliv původní optimismus vedl k mnoha klinickým pokusům, dosud se nepodařilo vyvinout metodu, která by byla použitelná v klinické praxi. Na základě rešerše literatury je možné identifikovat klíčové oblasti, které omezují aplikace genové terapie v léčbě CF.

Jedním z hlavních limitujících faktorů je způsob doručení genetické informace do cílových buněk plicního epitelu. Srovnání různých typů vektorů ukazuje, že žádný z nich zatím nenabízí ideální kombinaci účinnosti a bezpečnosti. Z virových vektorů pro léčbu CF byly testované adenovirové, adenoasociované a lentivirové vektory. Klinické studie se shodují na tom, že virové vektory vykazují vyšší efektivitu transdukce, ale zároveň jejich aplikace je spojená se zvýšeným rizikem imutotoxicity. Zatímco adenoviry umožňují vysokou úroveň exprese transgenů, jejich využití komplikuje silná imunogenicitata a nemožnost opakovaného podání (Griesenbach et al., 2016). Naproti tomu AAV vykazují výrazně lepší bezpečnostní profil, nicméně limitujícím faktorem zůstává jejich malá nosná kapacita, která je nedostatečná pro celý gen CFTR (Limberis et al., 2009). V současné době větší potenciál je přisuzován lentivirovým vektorům, jejichž preklinické studie naznačují slibné výsledky (Davies et al., 2024 a). Spornou otázkou zůstává jejich dlouhodobá bezpečnost. Aplikace těchto vektorů v genové terapii jiných onemocnění v minulosti vedla k nežádoucím mutacím v genomech pacientů, což mělo za následek rozvoj leukemie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Podobné následky nemohou být odhaleny během několika let, a proto je nutný dlouhodobější výzkum. Tyto aspekty velmi omezují zavedení genové terapie do praxe v nejbližší době a zároveň vyvolávají diskuse o etice genové terapie jak mezi vědci, tak i

mezi pacienty. Otázkou tedy je, zda by měla být CF léčena raději „bezpečně neúčinně“ nebo „potenciálně účinně, ale s neznámým rizikem“.

Na základě poznatků o nedostacích virových vektorů byly vyvinuté alternativní přístupy k doručení cDNA do cílových buněk. V léčbě CF velký potenciál vykazují liposomové vektory, jejichž úspěšná aplikace byla prokázána několika studii (Alton et al., 2015). Avšak účinnost lipoplexů je přechodná, proto je nutno aplikaci opakovat. Opakované podání liposomových vektorů může vyvolávat imunitní odpověď. Tím se přibližují problémům virových vektorů, proti kterým měly být výhodnější. V současné době se hledají cesty k vyřešení těchto problémů. Navrhují se nové liposomové komplexy. Výzkum se proto posouvá ke zlepšování složení lipoplexů, které by mohly nabídnout kompromis mezi bezpečností a účinností.

Kromě transportu správné kopie CFTR genu se uvažuje o použití nástrojů přesné editace. Velký potenciál pro genovou terapii vykazuje CRISPR/Cas9, jejíž aplikace je však stále v experimentální fázi. Jednou z hlavních překážek léčby cystické fibrosy metodou CRISPR-Cas9 je, že epitelové buňky dýchacích cest se přirozeně nedělí. To znemožňuje využití homologní rekombinace (HDR), která zajišťuje přesnou opravu genetických mutací. Vzhledem k tomu, že většina mutací CF se nachází v exonech, nehomologní spojování konců (NHEJ) není vhodnou alternativou (Graham & Hart, 2021).

Jedním z možných řešení je zaměřit se na bazální buňky, které jsou schopné regenerace a mohou využít HDR k opravě mutací. Tento přístup však přináší určitá zdravotní rizika pro dýchací cesty (Graham & Hart, 2021). Další možností je ex vivo strategie: pacientovy buňky se nejprve přeprogramují na indukované pluripotentní kmenové buňky, následně geneticky upraví a diferencují zpět do funkčního epitelu. Klíčovou výzvou však

zůstává bezpečné navrácení editovaných buněk zpět do dýchacích cest (Firth et al., 2015). Dalším problémem jsou necílené mutace (off-target mutations), které je obtížné minimalizovat (Graham & Hart, 2021).

CRISPR/Cas9 přinesl významné změny v genové terapii. Vylepšení technologie přesné editace genomu, odstranění nedostatků popsaných výše se může stát řešením genetických poruch nejen u pacientů s CF, ale i u mnoha dalších lidí. I když jde o perspektivní přístup, časový horizont jeho uplatnění v terapii CF je stále vzdálený.

Metody genové terapie přinášejí nejen vědecké a klinické výzvy, ale také závažná etická dilemata a diskuse. Jedním z hlavních problémů je riziko nežádoucích genetických změn, jejichž dlouhodobé dopady zatím nejsou dostatečně prozkoumány. Velká debata se také vede o úpravách zárodečných buněk. Takový zásah by sice mohl eliminovat mutace z rodové linie, ale zároveň otevírá kontroverzní otázky spojené s eugenikou. Zásahy do zárodečných buněk mění genom ještě nenarozeného jedince – a tím i zasahují do práv osoby, která zatím neexistuje. Navíc dopady těchto úprav mohou přetrvávat v dalších generacích. Jak uvádí Gyngell et al. (2019), právě tato mezigenerační nevratnost je klíčovým bodem sporu mezi zastánci a odpůrci těchto zásahů. Kritici často upozorňují na to, že jakmile editace zárodečných buněk bude schválena, může být technologie zneužita k vylepšování vlastností lidí, nikoliv jen k léčbě. Přesto existuje i etická argumentace ve prospěch zárodečné editace. Pokud by zásah byl bezpečný a zabránil by přenosu závažného genetického onemocnění, jako je CF, mohl by být považován za morálně přijatelný (Ormond et al., 2017). Je však důležité zdůraznit, že v současnosti je editace lidských zárodečných buněk mimo výzkumné rámce ve většině zemí, včetně České republiky, zakázána.

CF může být léčená i pomocí somatické buněčné genové terapie. Avšak takovou terapii bude nutno opakovat, což vzhledem k ceně léčby je pro většinu pacientů nedostupné. Tím narážíme na další sporné téma genové terapie – financování a ekonomická dostupnost.

Genová terapie patří mezi nejdražší formy léčby. Současné léčebné metody jsou extrémně nákladné, což značně omezuje přístup pacientů k této technologii. Například, cena léčby spinální svalové atrofie (Zolgensma) je 36 milionů Kč (*Státní ústav pro kontrolu léčiv*, b.r.), léčba hemofilie B (Hemgenix) stojí přes 80 milionů Kč (European Medicines Agency (EMA), 2023). Očekává se, že léčba CF genovou terapií bude mít podobně vysoké náklady, zejména pokud půjde o jednorázovou léčbu s trvalým účinkem. Z hlediska účinnosti to zní lákavě, ale pro zdravotní systémy je jednorázová vysoká investice obtížně udržitelná. Naopak opakované podávání (např. pomocí lipoplexů) by mohlo znamenat průběžné náklady po celý život pacienta. Pokud by se genová terapie stala standardní léčbou cystické fibrosy, bylo by nutné hledat způsoby, jak snížit její cenu a zajistit financování a úhradu pojišťovnou. Dle Ossandona et al. (2024) bez mezinárodních regulací a spravedlivých modelů financování může dojít k situaci, kdy budou metody genové terapie dostupné pouze vybraným skupinám obyvatel a medicína se rozdělí na „elitní“ a „běžnou“.

Z dostupné literatury vyplívá, že žádná z dosud dostupných metod zatím nenabízí plnohodnotné řešení. Každý přístup naráží na určité problémy, ať už jde o imunitní odpověď, technické možnosti vektoru, nebo bezpečnost genetické úpravy. Přesto vývoj v této oblasti pokračuje rychlým tempem a kombinace různých strategií může přinést zásadní průlom v léčbě CF. Pokroky v oblasti genového inženýrství naznačují, že by se v budoucnu mohla stát reálnou možností trvalé léčby tohoto závažného onemocnění. Avšak nestačí zvažovat

pouze technické aspekty, ale také systémovou realizovatelnost a etické otázky. Jinak zůstane genová terapie jen slibem bez skutečného dopadu na pacienty, kterým má pomoci.

## **Závěr**

Tato bakalářská práce si kladla za cíle zmapovat současné poznatky o genetické podstatě CF, popsat mechanismy genetických poruch, zhodnotit současný stav výzkumů a perspektivy genové terapie jako potenciálního přístupu k léčbě tohoto onemocnění.

I přesto, že se díky pokroku v medicíně kvalita života významně zlepšila a střední délka života pacientů s CF se pohybuje kolem 40 let, zůstává onemocnění nevyléčitelné. Významným pokrokem v terapii cystické fibrosy se staly modulátory CFTR, které částečně obnovují funkci proteinu, avšak jejich účinnost je závislá na konkrétním typu mutace. V této souvislosti představuje genová terapie slibnou možnost léčby. V současné době se výzkumy zaměřují na virové i nevirální vektory pro přenos funkčního genu CFTR do buněk dýchacích cest. Přestože některé přístupy vykazují nadějně výsledky, stále existují technické, biologické a etické překážky, které brání jejich běžnému využití v klinické praxi.

Práce splnila cíl poskytnout ucelený přehled o genetických mechanismech cystické fibrosy a současném stavu genové terapie. Další výzkum v této oblasti je nezbytný k překonání omezení spojených s efektivitou a bezpečností genového přenosu. Budoucí vývoj v oblasti genové terapie může přinést průlomové metody, které umožní úspěšnou léčbu pacientů s CF.

## Seznam zkratek

AAV – Adenoasociovaný virus

Ad – Adenovirus

CF – Cystická fibrosa

CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (membránový regulátor cystického transportu)

CFRD – Cystic Fibrosis-Related Diabetes (diabetes související s cystickou fibrosou)

cDNA – komplementární DNA

crRNA – CRISPR RNA (krátká vodící RNA v systému CRISPR)

DSB – dvouřetězcový zlom DNA

dsDNA – dvoušroubovicová DNA

HDR – Homology-Directed Repair (oprava řízená homologní rekombinací)

kb – kilobáze

NHEJ – Non-Homologous End Joining (nehomologní spojování konců)

ssRNA – jednovlaknová RNA

tracrRNA – Transaktivující CRISPR RNA (pomocná RNA v CRISPR systému)

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Stavba proteinu CFTR (převzato a upraveno z (Jurkuvenaite et al., 2006)).....	8
Obrázek 2 Schéma výroby virových vektorů na příkladě lentivirů. Do buněčné linie 293T se vpravují 3 plazmidy nesoucí cDNA a sekvence potřebné pro zabalení. Zdroj:(Addgene: Lentiviral Guide, b.r.).....	21
Obrázek 3 Chemická struktura DOTAP. Zdroj: („Dioleoyl-3-Trimethylammonium Propane", 2024).....	34
Obrázek 4 Chemická struktura DC-Chol/DOPE. Zdroj: (Bianco et al., 2003).....	34
Obrázek 5 Chemická struktura GL-67. Zdroj: (GL67 powder Avanti Polar Lipids, b.r.)...	35
Obrázek 6 Schéma pGM169 v pre-klinických studiích. Zdroj: (Pringle et al., 2009).....	37
Obrázek 7 Proces vzniku DBS pomocí CRISPR/Cas9. Zdroj: (Kashtwari et al., 2022) ....	41

## Seznam tabulek

Tabulka 1. Klasifikace mutací CFTR. Zdroj: (Schechter & Chaudary, 2017, s. 5).....	9
Tabulka 2 Přehled virových vektorů. Převzato a upraveno z (Benskey et al., 2019).....	22
Tabulka 3 Přehled klinických studií adenovirových vektorů mezi lety 1993-2001. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012) .....	25
Tabulka 4 Přehled klinických studií AAV. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012) .....	29
Tabulka 5 Přehled klinických studií liposomových vektorů. Převzato a upraveno z (Burney & Davies, 2012).....	35

## **Vyjádření k použití nástrojů umělé inteligence (AI)**

Při psaní této bakalářské práce byly využity nástroje umělé inteligence ChatGPT a DeepL. ChatGPT byl použit k vyhledávání zdrojů, kontrole pravopisu a gramatiky, k stylistickým úpravám textu. DeepL sloužil k překladům z anglického a dalších jazyků do češtiny. Přeložené texty jsem dále upravila a použila jako podklad pro vlastní text.

## Seznam použité literatury

- Aitken, M. L., Moss, R. B., Waltz, D. A., Dovey, M. E., Tonelli, M. R., McNamara, S. C., Gibson, R. L., Ramsey, B. W., Carter, B. J., & Reynolds, T. C. (2001). A Phase I Study of Aerosolized Administration of tgAAVCF to Cystic Fibrosis Subjects with Mild Lung Disease. *Human Gene Therapy*, *12*(15), 1907–1916. <https://doi.org/10.1089/104303401753153956>
- Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D. O., Raff, M. C., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J. H., & Hunt, T. (2022). *Molecular biology of the cell* (Seventh). W.W. Norton & Company. <https://go.exlibris.link/kVMnVw0b>
- Alton, E., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., Boyd, A. C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., Carvelli, P., Chan, M., Cheng, S. H., Collie, D. D. S., Cunningham, S., Davidson, H. E., Davies, G., Davies, J. C., Davies, L. A., ... UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet. Respiratory Medicine*, *3*(9), 684–691. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00245-3)
- Alton, E., Beekman, J. M., Boyd, A. C., Brand, J., Carlon, M. S., Connolly, M. M., Chan, M., Conlon, S., Davidson, H. E., Davies, J. C., Davies, L. A., Dekkers, J. F., Doherty, A., Gea-Sorli, S., Gill, D. R., Griesenbach, U., Hasegawa, M., Higgins, T. E., Hironaka, T., ... Zhu, J. (2017). Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, *72*(2), 137–147. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208406>

- Alton, E., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S. L., Phillips, J., Davies, J., Smith, S. N., Browning, J., Davies, M. G., Hodson, M. E., Durham, S. R., Li, D., Jeffery, P. K., Scallan, M., Balfour, R., Eastman, S. J., Cheng, S. H., Smith, A. E., ... Geddes, D. M. (1999). Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: A double-blind placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 353(9157), 947–954. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)06532-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)06532-5)
- Anwar, S., Peng, J.-L., Zahid, K., Zhou, Y.-M., Ali, Q., & Qiu, C.-R. (2024). Cystic Fibrosis: Understanding Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Mutation Classification and Modulator Therapies. *Advances in Respiratory Medicine*, 92, 263–277. <https://doi.org/10.3390/arm92040026>
- Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., Accart, N., Layani, M. P., Aymard, M., Bernon, H., Bienvenu, J., Courtney, M., Döring, G., Gilly, B., Gilly, R., Lamy, D., Levrey, H., Morel, Y., Paulin, C., ... Pavirani, A. (1997). Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: A phase I clinical trial. *Human Gene Therapy*, 8(1), 15–25. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.1-15>
- Benskey, M. J., Sandoval, I. M., Miller, K., Sellnow, R. L., Gezer, A., Kuhn, N. C., Vashon, R., & Manfredsson, F. P. (2019). Basic Concepts in Viral Vector-Mediated Gene Therapy. In F. P. Manfredsson & M. J. Benskey (Ed.), *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols* (s. 3–26). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9065-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9065-8_1)

- Bianco, A., Bonadies, F., Napolitano, R., & Ortaggi, G. (2003). Improved synthesis of DC-Chol, a cationic lipid for gene therapy. *Comptes Rendus Chimie*, 6(5), 613–615. [https://doi.org/10.1016/S1631-0748\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S1631-0748(03)00086-9)
- Brogna, S., & Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(2), 107–113. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1550>
- Bronzino, J. D., & Peterson, D. R. (2018). *Molecular, Cellular, and Tissue Engineering*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351228770>
- Brunetti-Pierri, N. (2017a). Gene Transfer Strategies and Applications in Genetic Diseases. In N. Brunetti-Pierri (Ed.), *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders* (s. 1–7). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2_1)
- Brunetti-Pierri, N. (Ed.). (2017b). *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2>
- Burgener, E. B., & Moss, R. B. (2018). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: Precision medicine in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pediatrics*, 30(3), 372. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000627>
- Burney, T., & Davies, J. (2012). Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The application of clinical genetics*, 5, 29–36. <https://doi.org/10.2147/TACG.S8873>
- Caplen, N. J., Alton, E. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffery, P. K., Hodson, M. E., & Coutelle, C. (1995). Liposome-

- mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Medicine*, 1(1), 39–46. <https://doi.org/10.1038/nm0195-39>
- Castellani, C., & Assael, B. M. (2017). Cystic fibrosis: A clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(1), 129–140. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2393-9>
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., & Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 669–672. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.669>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D’Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- CFTR protein. (2020, květen 11). UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P13569/entry#function>
- Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C. S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A., Eissa, N. T., & Danel, C. (1994). Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genetics*, 8(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/ng0994-42>
- Davies, J. C., Polineni, D., Boyd, A. C., Donaldson, S., Gill, D. R., Griesenbach, U., Hyde, S. C., Jain, R., McLachlan, G., Mall, M. A., & Alton, E. W. F. W. (2024a). Lentiviral Gene Therapy for Cystic Fibrosis: A Promising Approach and First-in-Human Trial.

*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 210(12), 1398–1408.

<https://doi.org/10.1164/rccm.202402-0389CI>

Davies, J. C., Polineni, D., Mall, M. A., Donaldson, S. H., Fajac, I., Jain, R., Rubin, B. K., Boyd, A. C., Gill, D. R., Griesenbach, U., Hyde, S. C., McLachlan, G., Avis, M., Diefenbach, C., Sigmund, R., Seibold, W., Gupta, A., & Alton, E. (2024b). P045 Lenticlair™ 1: A phase 1/2 trial evaluating the safety, tolerability and efficacy of an inhaled F/HN-pseudotyped lentiviral vector for CF gene therapy in people with CF ineligible for CFTR modulators. *Journal of Cystic Fibrosis*, 23, S80. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(24\)00350-3](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(24)00350-3)

*Dioleoyl-3-trimethylammonium propane*. (2024, prosinec 12). [Wikipedia]. [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dioleoyl-3-trimethylammonium\\_propane&oldid=1262623151](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dioleoyl-3-trimethylammonium_propane&oldid=1262623151)

Dukovski, D., Villella, A., Bastos, C., King, R., Finley, D., Kelly, J. W., Morimoto, R. I., Hartl, F. U., Munoz, B., Lee, P.-S., Zecevic, M., & Miller, J. P. (2020). Amplifiers co-translationally enhance CFTR biosynthesis via PCBP1-mediated regulation of CFTR mRNA. *Journal of Cystic Fibrosis*, 19(5), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.02.006>

Eastman, S., Tousignant, J., Lukason, M., Murray, H., Siegel, C., Constantino, P., Harris, D., Cheng, S. H., & Scheule, R. (1997). Optimization of Formulations and Conditions for the Aerosol Delivery of Functional Cationic Lipid:DNA Complexes. *Human Gene Therapy*, 8, 313–322. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.3-313>

- Escors, D., & Breckpot, K. (2010). Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 58(2), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s00005-010-0063-4>
- Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A., & Hinzpeter, A. (2014). Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 52, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.023>
- Farinha, C. M. (2018). *CFTR and Cystic Fibrosis: From Structure to Function*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-65494-2>
- Fila, L. (2017). Cystická fibróza dospělých. *Vnitřní lékařství*, 63(11), 834–842. <https://doi.org/10.36290/vnl.2017.156>
- Filbrun, A. G., Lahiri, T., & Ren, C. L. (2016). Introduction and Epidemiology of Cystic Fibrosis. In A. G. Filbrun, T. Lahiri, & C. L. Ren (Ed.), *Handbook of Cystic Fibrosis* (s. 1–4). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32504-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32504-0_1)
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., Dargitz, C. T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*, 12(9), 1385–1390. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.062>
- Flotte, T. R. (2005). Recent developments in recombinant AAV-mediated gene therapy for lung diseases. *Current Gene Therapy*, 5(3), 361–366. <https://doi.org/10.2174/1566523054064986>

- Flotte, T. R., Zeitlin, P. L., Reynolds, T. C., Heald, A. E., Pedersen, P., Beck, S., Conrad, C. K., Brass-Ernst, L., Humphries, M., Sullivan, K., Wetzel, R., Taylor, G., Carter, B. J., & Guggino, W. B. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: A two-part clinical study. *Human Gene Therapy, 14*(11), 1079–1088. <https://doi.org/10.1089/104303403322124792>
- Gill, D. R., Southern, K. W., Mofford, K. A., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., Thomson, A., MacVinish, L. J., Ratcliff, R., Bilton, D., Lane, D. J., Littlewood, J. M., Webb, A. K., Middleton, P. G., Colledge, W. H., Cuthbert, A. W., Evans, M. J., Higgins, C. F., & Hyde, S. C. (1997). A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy, 4*(3), 199–209. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300391>
- GL67 powder Avanti Polar Lipids.* (b.r.). Získáno 2. duben 2025, z <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/product/avanti/890893p>
- Graham, C., & Hart, S. (2021). CRISPR/Cas9 gene editing therapies for cystic fibrosis. *Expert Opinion on Biological Therapy, 21*(6), 767–780. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1869208>
- Gregory, L., Harbottle, R., Lawrence, L., Knapton, H., Themis, M., & Coutelle, C. (2003). Enhancement of Adenovirus-Mediated Gene Transfer to the Airways by DEAE Dextran and Sodium Caprate in Vivo. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 7*, 19–26. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(02\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(02)00021-7)

- Griesenbach, U., & Alton, E. W. F. W. (2009). Gene transfer to the lung: Lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.010>
- Griesenbach, U., Davies, J. C., & Alton, E. (2016). Cystic fibrosis gene therapy: A mutation-independent treatment. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 22(6), 602. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000327>
- Griesenbach, U., Inoue, M., Mamoru, H., & et, al. (2010). Viral vectors for cystic fibrosis gene therapy: What does the future hold? *Virus Adaptation and Treatment*, 2. <https://doi.org/10.2147/VAAT.S8887>
- Gyngell, C., Bowman-Smart, H., & Savulescu, J. (2019). Moral reasons to edit the human genome: Picking up from the Nuffield report. *Journal of Medical Ethics*, 45(8), 514–523. <https://doi.org/10.1136/medethics-2018-105084>
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., ... Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644), 415–419. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>
- Hamosh, A., Trapnell, B. C., Zeitlin, P. L., Montrose-Rafizadeh, C., Rosenstein, B. J., Crystal, R. G., & Cutting, G. R. (1991). Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis.

- Journal of Clinical Investigation*, 88(6), 1880–1885. Scopus.  
<https://doi.org/10.1172/JCI115510>
- Harvey, B. G., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Grasso, T. M., Williams, P. M., Tucker, A. L., Kaner, R. J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T. D., Ramalingam, R., Kovesdi, I., Shak, S., & Crystal, R. G. (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(9), 1245–1255.  
<https://doi.org/10.1172/JCI7935>
- Hay, J. G., McElvaney, N. G., Herena, J., & Crystal, R. G. (1995). Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Human Gene Therapy*, 6(11), 1487–1496. <https://doi.org/10.1089/hum.1995.6.11-1487>
- Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: Biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 371(1707), 1–12.
- Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M., Mofford, K. A., Waddell, B. E., Gooi, H. C., Goddard, C. A., Hannavy, K., Smyth, S. E., Egan, J. J., Sorgi, F. L., Huang, L., Cuthbert, A. W., Evans, M. J., Colledge, W. H., Higgins, C. F., Webb, A. K., & Gill, D. R. (2000). Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy*, 7(13), 1156–1165.  
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301212>
- Chaudary, N. (2018). Triplet CFTR modulators: Future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14, 2375–2383.  
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S147164>

- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(Volume 46, 2017), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Joseph, P. M., O’Sullivan, B. P., Lapey, A., Dorkin, H., Oren, J., Balfour, R., Perricone, M. A., Rosenberg, M., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., St George, J. A., & Meeker, D. P. (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Human Gene Therapy*, 12(11), 1369–1382. <https://doi.org/10.1089/104303401750298535>
- Jurkuvenaite, A., Varga, K., Nowotarski, K., Kirk, K., Sorscher, E., Li, Y., Clancy, J., & Collawn, J. (2006). Mutations in the Amino Terminus of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Enhance Endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 281, 3329–3334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508131200>
- Kashtwari, M., Mansoor, S., Wani, A. A., Najar, M., Deshmukh, R., Baloch, F., Abidi, I. A., & Zargar, S. (2022). Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: Opportunities, challenges and genome editing prospects. *Molecular Biology Reports*, 49. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06650-0>
- Kelly, T., & Buxbaum, J. (2015). Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(7), 1903–1913. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3546-7>
- Keogh, R. H., Szczesniak, R., Taylor-Robinson, D., & Bilton, D. (2018). Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2), 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.11.019>

- Klink, D., Schindelhauer, D., Laner, A., Tucker, T., Bebok, Z., Schwiebert, E. M., Boyd, A. C., & Scholte, B. J. (2004). Gene delivery systems—Gene therapy vectors for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.042>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields virology* (6th ed). Wolters Kluwer health - Lippincott Williams & Wilkins.
- Knowles, M. R., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Olsen, J. C., Noah, T. L., Hu, P.-C., Leigh, M. W., Engelhardt, J. F., Edwards, L. J., Jones, K. R., Grossman, M., Wilson, J. M., Johnson, L. G., & Boucher, R. C. (1995). A Controlled Study of Adenoviral-Vector–Mediated Gene Transfer in the Nasal Epithelium of Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 333(13), 823–831. <https://doi.org/10.1056/NEJM199509283331302>
- Ko, S. B. H., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P. J., & Muallem, S. (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature Cell Biology*, 6(4), 343–350. <https://doi.org/10.1038/ncb1115>
- Kochergin-Nikitsky, K., Belova, L., Lavrov, A., & Smirnikhina, S. (2021). Tissue and cell-type-specific transduction using rAAV vectors in lung diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 99(8), 1057–1071. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02086-y>
- Liang, X., Da Paula, A. C., Bozóky, Z., Zhang, H., Bertrand, C. A., Peters, K. W., Forman-Kay, J. D., & Frizzell, R. A. (2012). Phosphorylation-dependent 14-3-3 protein

- interactions regulate CFTR biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(6), 996–1009. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-08-0662>
- Limberis, M. P., Vandenberghe, L. H., Zhang, L., Pickles, R. J., & Wilson, J. M. (2009). Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(2), 294–301. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.261>
- Lin, M. T. S., Pulkkinen, L., Uitto, J., & Yoon, K. (2000). The gene gun: Current applications in cutaneous gene therapy. *International Journal of Dermatology*, 39(3), 161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2000.00925.x>
- Liu, C., & Zhang, N. (2011). Nanoparticles in Gene Therapy. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Roč. 104, s. 509–562). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00013-9>
- Lopes-Pacheco, M. (2020). CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662>
- Lopes-Pacheco, M., Sabirzhanova, I., Rapino, D., Morales, M. M., Guggino, W. B., & Cebotaru, L. (2016). Correctors Rescue CFTR Mutations in Nucleotide-Binding Domain 1 (NBD1) by Modulating Proteostasis. *ChemBioChem*, 17(6), 493–505. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500620>
- Matel, J. L., & Milla, C. E. (2009). Nutrition in cystic fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 30(5), 579–586. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1238916>

- McHugh, D. R., Cotton, C. U., & Hodges, C. A. (2021). Synergy between Readthrough and Nonsense Mediated Decay Inhibition in a Murine Model of Cystic Fibrosis Nonsense Mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms22010344>
- Michelfelder, S., Varadi, K., Raupp, C., Hunger, A., Körbelin, J., Pahrman, C., Schrepfer, S., Müller, O. J., Kleinschmidt, J. A., & Trepel, M. (2011). Peptide Ligands Incorporated into the Threefold Spike Capsid Domain to Re-Direct Gene Transduction of AAV8 and AAV9 In Vivo. *PLOS ONE*, 6(8), e23101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023101>
- Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>
- Moss, R. B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P. L., Clancy, J. P., Spencer, L. T., Pilewski, J., Waltz, D. A., Dorkin, H. L., Ferkol, T., Pian, M., Ramsey, B., Carter, B. J., Martin, D. B., & Heald, A. E. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: A randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Human Gene Therapy*, 18(8), 726–732. <https://doi.org/10.1089/hum.2007.022>
- Moss, R. B., Rodman, D., Spencer, L. T., Aitken, M. L., Zeitlin, P. L., Waltz, D., Milla, C., Brody, A. S., Clancy, J. P., Ramsey, B., Hamblett, N., & Heald, A. E. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest*, 125(2), 509–521. <https://doi.org/10.1378/chest.125.2.509>

- Národní zdravotnický informační portál. (b.r.). *Cystická fibróza*. NZIP.cz. Získáno 21. března 2025, z <https://www.nzip.cz/doporuceny-zdroj/112-cysticka-fibroza>
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, *1*(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
- Ong, T., & Ramsey, B. W. (2016). New Therapeutic Approaches to Modulate and Correct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Pediatric Clinics of North America*, *63*(4), 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.04.006>
- Orlov, A. V., Simonova, O. I., Roslavitseva, E. A., & Shadrin, D. I. (2014). *Cystic Fibrosis (clinical aspects, diagnostics, treatment, rehabilitation, clinical examination)*. <https://elibrary.ru/item.asp?id=30467304>
- Ormond, K. E., Mortlock, D. P., Scholes, D. T., Bombard, Y., Brody, L. C., Faucett, W. A., Garrison, N. A., Hercher, L., Isasi, R., Middleton, A., Musunuru, K., Shriner, D., Virani, A., & Young, C. E. (2017). Human Germline Genome Editing. *American Journal of Human Genetics*, *101*(2), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.012>
- Ossandon, H., Armijo, N., Vargas, C., Repetto, G. M., & Espinoza, M. A. (2024). Challenges for gene therapy in the financial sustainability of health systems: A scoping review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *19*(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s13023-024-03249-z>
- Ostedgaard, L. S., Zabner, J., Vermeer, D. W., Rokhlina, T., Karp, P. H., Stecenko, A. A., Randak, C., & Welsh, M. J. (2002). CFTR with a partially deleted R domain corrects the cystic fibrosis chloride transport defect in human airway epithelia in vitro and in

mouse nasal mucosa in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3093–3098.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.261714599>

Perricone, M. A., Morris, J. E., Pavelka, K., Plog, M. S., O’Sullivan, B. P., Joseph, P. M., Dorkin, H., Lapey, A., Balfour, R., Meeker, D. P., Smith, A. E., Wadsworth, S. C., & St George, J. A. (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Human Gene Therapy*, 12(11), 1383–1394.  
<https://doi.org/10.1089/104303401750298544>

Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>

Plasschaert, L., Macdonald, K., & Moffit, J. (2024). Current landscape of cystic fibrosis gene therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 15.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1476331>

Porteous, D. J., Dorin, J. R., McLachlan, G., Davidson-Smith, H., Davidson, H., Stevenson, B. J., Carothers, A. D., Wallace, W. A., Moralee, S., Hoenes, C., Kallmeyer, G., Michaelis, U., Naujoks, K., Ho, L. P., Samways, J. M., Imrie, M., Greening, A. P., & Innes, J. A. (1997). Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy*, 4(3), 210–218. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300390>

- Pringle, I., Hyde, S., & Gill, D. (2009). Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: Recent developments and future prospects. *Expert opinion on biological therapy*, *9*, 991–1003. <https://doi.org/10.1517/14712590903055029>
- Qi, Y. F., Li, Q. H., Shenoy, V., Zingler, M., Jun, J. Y., Verma, A., Katovich, M. J., & Raizada, M. K. (2013). Comparison of the transduction efficiency of tyrosine-mutant adeno-associated virus serotype vectors in kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *40*(1), 53–55. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12037>
- Quinton, P. (1982). Suggestion of an Abnormal Anion Exchange Mechanism in Sweat Glands of Cystic Fibrosis Patients. *Pediatric research*, *16*, 533–537. <https://doi.org/10.1203/00006450-198207000-00008>
- Quittner, A. L., Abbott, J., Georgiopoulos, A. M., Goldbeck, L., Smith, B., Hempstead, S. E., Marshall, B., Sadosky, K. A., Elborn, S., International Committee on Mental Health, & EPOS Trial Study Group. (2016). International Committee on Mental Health in Cystic Fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus statements for screening and treating depression and anxiety. *Thorax*, *71*(1), 26–34. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207488>
- Rowe, S. M., Sloane, P., Tang, L. P., Backer, K., Mazur, M., Buckley-Lanier, J., Nudelman, I., Belakhov, V., Bebok, Z., Schwiebert, E., Baasov, T., & Bedwell, D. M. (2011). Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *89*(11), 1149–1161. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0787-6>

- Sheppard, D. N., Rich, D. P., Ostedgaard, L. S., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl<sup>-</sup> channels with altered pore properties. *Nature*, 362(6416), 160–164. <https://doi.org/10.1038/362160a0>
- Schechter, M. S., & Chaudary, N. (2017). *Treatment of Cystic Fibrosis and Other Rare Lung Diseases*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0977-1>
- Skalická, V. (2014). Terapeutické trendy cystické fibrózy. *Pediatric pro Praxi*, 15(6), 340–343.
- Sui, H., Xu, X., Su, Y., Gong, Z., Yao, M., Liu, X., Zhang, T., Jiang, Z., Bai, T., Wang, J., Zhang, J., Xu, C., & Luo, M.-J. (2022). Gene therapy for cystic fibrosis: Challenges and prospects. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1015926>
- SÚKL - Přehled léčiv. (b.r.). SÚKL - Přehled léčiv. Získáno 21. březem 2025, z [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/)
- Turcios, N. L. (2020). Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respiratory Care*, 65(2), 233–251. <https://doi.org/10.4187/respcare.06697>
- Vávrová, V. (2006). *Cystická fibróza*. Grada Publishing a.s.
- Vávrová, V., & Bartošová, J. (2016). *Cystická fibróza: Příručka pro nemocné a jejich rodiče* (3. vyd.). Klub nemocných cystickou fibrózou.
- Wagner, J. A., Nepomuceno, I. B., Messner, A. H., Moran, M. L., Batson, E. P., Dimiceli, S., Brown, B. W., Desch, J. K., Norbash, A. M., Conrad, C. K., Guggino, W. B., Flotte, T. R., Wine, J. J., Carter, B. J., Reynolds, T. C., Moss, R. B., & Gardner, P. (2002). A Phase II, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of

- tgAAVCF Using Maxillary Sinus Delivery in Patients with Cystic Fibrosis with Antrostomies. *Human Gene Therapy*, 13(11), 1349–1359. <https://doi.org/10.1089/104303402760128577>
- Wagner, J. A., Reynolds, T., Moran, M. L., Moss, R. B., Wine, J. J., Flotte, T. R., & Gardner, P. (1998). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *The Lancet*, 351(9117), 1702–1703. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)77740-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)77740-0)
- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., Colombo, C., Davies, J. C., Boeck, K. D., Flume, P. A., Konstan, M. W., McColley, S. A., McCoy, K., McKone, E. F., Munck, A., Ratjen, F., Rowe, S. M., Waltz, D., & Boyle, M. P. (2015). Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 220–231. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547>
- Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. (2013). Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(1), 46–60. <https://doi.org/10.2174/138920113804805278>
- Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73(7), 1251–1254. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90353-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90353-R)
- Weng, Z., You, Z., Yang, J., Mohammad, N., Lin, M., Wei, Q., Gao, X., & Zhang, Y. (2023). CRISPR-Cas Biochemistry and CRISPR-Based Molecular Diagnostics. *Angewandte Chemie International Edition*, 62(17), e202214987. <https://doi.org/10.1002/anie.202214987>

- Yan, Z., McCray Jr, P. B., & Engelhardt, J. F. (2019). Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *Human Molecular Genetics*, 28(R1), R88–R94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz139>
- Yáñez-Muñoz, R. J., Balagán, K. S., MacNeil, A., Howe, S. J., Schmidt, M., Smith, A. J., Buch, P., MacLaren, R. E., Anderson, P. N., Barker, S. E., Duran, Y., Bartholomae, C., von Kalle, C., Heckenlively, J. R., Kinnon, C., Ali, R. R., & Thrasher, A. J. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nature Medicine*, 12(3), 348–353. <https://doi.org/10.1038/nm1365>
- Zabner, J., Couture, L. A., Gregory, R. J., Graham, S. M., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*, 75(2), 207–216. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80063-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80063-K)
- Zabner, J., Ramsey, B. W., Meeker, D. P., Aitken, M. L., Balfour, R. P., Gibson, R. L., Launspach, J., Moscicki, R. A., Richards, S. M., & Standaert, T. A. (1996). Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(6), 1504–1511. <https://doi.org/10.1172/JCI118573>
- Zegarra-Moran, O., & Galiotta, L. J. V. (2017). CFTR pharmacology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2392-x>
- Zuckerman, J. B., Robinson, C. B., McCoy, K. S., Shell, R., Sferra, T. J., Chirmule, N., Magosin, S. A., Probert, K. J., Brown-Parr, E. C., Hughes, J. V., Tazelaar, J., Baker,

C., Goldman, M. J., & Wilson, J. M. (1999). A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Human Gene Therapy*, *10*(18), 2973–2985. <https://doi.org/10.1089/10430349950016384>

## Seznam použitých webových stránek

- Addgene: Lentiviral Guide.* (b.r.). Získáno 3. duben 2025, z <https://www.addgene.org/guides/lentivirus/>
- CFTR protein.* (2020, květen 11). UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P13569/entry#function>
- Dioleoyl-3-trimethylammonium propane.* (2024). In *Wikipedia.* [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dioleoyl-3-trimethylammonium\\_propane&oldid=1262623151](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dioleoyl-3-trimethylammonium_propane&oldid=1262623151)
- GL67 powder Avanti Polar Lipids.* (b.r.). Získáno 2. duben 2025, z <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/product/avanti/890893p>
- European Medicines Agency (EMA).* (2023, únor 28). Hemgenix. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hemgenix>
- Klub cystické fibrózy.* (b.r.). O klubu cystické fibrózy - informace o organizaci. Získáno 24. březen 2025, z <https://klubcf.cz/klub-cysticke-fibrozy/klub-cf/o-klubu/>
- Státní ústav pro kontrolu léčiv.* (b.r.). Přehled léčiv - Kalydeco. Získáno 20. březen 2025, z [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/leciva/0238236](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/leciva/0238236)
- Státní ústav pro kontrolu léčiv.* (b.r.). Přehled léčiv - Zolgensma. Získáno 3. duben 2025, z [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/leciva/0238976](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/leciva/0238976)