

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.  
Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Klusoňová, PhD.

# **Problematika genové terapie v ČR**

(bakalářská práce)



## Obsah

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Úvod</b> .....  | 3  |
| <b>2. Vymezení genové terapie</b> .....                               | 4  |
| <b>3. Požadavky na úspěšnou genovou terapii in vitro</b> .....        | 5  |
| 3. 1. Cílové buňky pro genovou terapii .....                          | 5  |
| 3. 2. Přenos genů do cílových buněk.....                              | 5  |
| 3. 2. 1. Nevirové vektory .....                                       | 6  |
| 3. 2. 2. Virové vektory .....   | 7  |
| <b>4. Genová terapie dědičných chorob</b> .....                       | 8  |
| 4. 1. Genová terapie deficiencie adenoindeaminázy .....               | 10 |
| 4. 2. Genová terapie těžkého kombinovaného imunodeficitu (SCID) ..... | 11 |
| 4. 3. Genová terapie hemofilie.....                                   | 14 |
| 4. 4. Genová terapie cystické fibrózy .....                           | 15 |
| 4. 5. Genová terapie u kardiovaskulárních chorob .....                | 16 |
| 4. 6. Genová terapie Alzheimerovy choroby .....                       | 17 |
| <b>5. Genová terapie nádorů</b> .....                                 | 19 |
| 5. 1. Přímé ovlivnění nádorových buněk.....                           | 19 |
| 5. 2. Ovlivnění nenádorových buněk .....                              | 21 |
| 5. 3. Inhibice neoangiogeneze .....                                   | 22 |
| 5. 4. Onkolytické viry .....  | 23 |
| 5. 5. Genetické vakcíny .....   | 23 |
| 5. 5. 1. DNA vakcíny .....  | 24 |
| 5. 5. 2. Živé rekombinantní vakcíny .....                             | 24 |
| 5. 5. 3. Buněčné vakcíny.....   | 25 |
| 5. 6. Rizika spojená s genovou terapií zhoubných nádorů .....         | 26 |
| <b>6. Současné problémy genové terapie a situace v ČR</b> .....       | 28 |
| 6. 1. Problémy technické .....  | 28 |
| 6. 2. Problémy metodické .....  | 28 |
| 6. 3. Problémy etické .....   | 28 |
| 6. 4. Současná situace v České republice.....                         | 29 |
| <b>7. Diskuze</b> .....   | 30 |
| <b>8. Závěr</b> .....   | 36 |
| <b>9. Použitá literatura a internetové zdroje</b> .....               | 37 |

# 1. Úvod

Genová terapie (GT) je jedním z nejvýznamnějších a vědecky nejnáročnějších výstupů molekulární biologie a genového inženýrství v medicíně.

Do GT se řadí všechny postupy, které využívají přenosu funkčního genetického materiálu k léčebným účelům. Při zrodu GT, na počátku posledního desetiletí 20. století, se uvažovalo především o jejím využití při léčbě vrozených monogenních chorob. I když v této oblasti dosáhla GT prvních význačných úspěchů, velká očekávání s ní spojovaná se zatím nenaplnila. Většina současného úsilí se proto orientuje na získané choroby, mezi nimiž převažují zhoubné nádory.

Cílem této bakalářské práce je shromáždit informace týkající se problematiky GT, zaměřit se na používané systémy přenosu genů do lidských buněk, na monogenně podmíněné choroby, které připadají v úvahu pro genovou terapii. Dále se v bakalářské práci věnuji tématu genové terapie nádorů a snažím se nastínit nelehkou situaci GT, která panuje v České republice v současnosti.

## 2. Vymezení genové terapie

Cílem GT u člověka je oprava poruch genetické informace, které jsou příčinou geneticky podmíněných (tj. dědičných nebo nádorových) chorob. Teoreticky lze uvažovat o GT ve dvou úrovních - zárodečné (gametické) a somatické. Somatická GT je zaměřena na léčbu somatických buněk, tedy všech buněk těla kromě pohlavních buněk. Výsledkem je náprava genetické vady v nepohlavních buňkách jedince. Naproti tomu zárodečná GT léčí reprodukční tkáň pacienta, zárodečné či pohlavní buňky, a to navíc takovým způsobem, že i u všech potomků léčeného jedince bude porucha taktéž vyléčena. Zárodečná GT je předmětem obav a diskuzí a je třeba zdůraznit, že u člověka se vnášení genů z etických důvodů provádí jen do somatických buněk. GT je tak zaměřena na samotné pacienty a nedochází ke genetickému přenosu vnesených genů na potomstvo. (1, 2, 3)

Při přenosu genů do somatických buněk lidského organismu se rozlišují dva přístupy. Při metodě ex vivo (in vitro) jsou z těla pacienta vyjmuty vybrané buňky, do těchto buněk je v laboratorních podmínkách vpravena funkční kopie chybějícího genu a vyjmuté geny jsou následně vráceny do těla pacienta. Někdy však naráží odběr, pěstování nebo návrat buněk do těla pacienta na příliš velké obtíže. Potom připadá do úvahy genová léčba in vivo. V tomto případě je terapeutický gen aplikován přímo do cílových buněk těla. To však vyžaduje, aby se použil vektorový systém přísně specifický pro cílový orgán a naprosto se vyloučila možnost infekce zárodečných buněk. (1, 3, 4)

Současná GT se především zaměřuje na postupy in vitro. Podle způsobu integrace přeneseného genu do genomu hostitelských buněk se rozlišují tyto dvě možnosti:

1. Normální gen se integruje nehomologickou rekombinací do libovolného místa genomu hostitelské buňky jako doplněk k defektnímu genu. Tím se vytvoří funkční produkt, kterým je nahrazen produkt defektního genu.

2. U buněčných kultur bylo zjištěno, že funkční geny lze do genomu hostitelských buněk vnést též homologickou rekombinací a zaměnit je tak za geny poškozené mutací. Tento způsob provedení genové terapie by byl ideální,

jelikož taková výměna by dovolila nejen fyziologickou regulaci vnesených genů, ale také opravu dominantních defektů. (1)

### **3. Požadavky na úspěšnou genovou terapii in vitro**

Aby byla GT in vitro účinná, je nutné, aby splňovala základní požadavky, tzn., že musí být k dispozici vhodná cílové buňky, vhodný systém přenosu genu a musí být zaručena bezpečnost přenosu genu.

#### **3. 1. Cílové buňky pro genovou terapii**

Buňky pro genovou terapii in vitro musí mít takové vlastnosti, které umožňují, že se z těla pacienta snadno vyjmou, snadno se in vitro kultivují, jsou snadno manipulovatelné a lze je přenést do těla pacienta ve funkčním stavu.

Po přenosu genu by se buňky měly v těle množit tak, aby se vnesený gen mohl přenášet na dceřiné buňky. Ideálně jsou tyto předpoklady splněny u buněk kostní dřeně. Tyto buňky lze z organismu snadno získat, např. ze stehenní nebo hrudní kosti, a kultivovat je. Po přenosu se opět lokalizují v kostní dřeni.

Přesto vyvstává následující problém. Buňky kostní dřeně tvoří heterogenní populaci. Její značná část představuje buňky, které nejsou schopny v plně diferencovaném stavu dalšího dělení. Kostní dřev však kromě toho obsahuje nepatrné množství buněk kmenových, které jsou ještě v nediferencovaném stavu, a právě tyto buňky jsou cílem genové terapie. (1)

#### **3. 2. Přenos genů do cílových buněk**

K přenosu DNA do cílových buněk se používají tzv. vektory. Ideální vektor je schopen pronikat do co největšího počtu cílových buněk, aniž by ovlivňoval ostatní buňky organismu, je netoxický pro pacienta i životní prostředí, není imunogenní, ani mutagenní a lze ho snadno vyprodukovat ve vysokých koncentracích a za nízkou cenu. (5)

Prozatím nejsou k dispozici vektory, které by beze zbytku vyhovovaly všem uvedeným podmínkám. To je důvodem, proč se v současné době věnuje tolik úsilí vývoji nových, účinnějších a bezpečnějších vektorů. (6)

Vektory můžeme rozdělit na virové a neviróvé, přičemž každá skupina vektorů má své výhody a nevýhody.

### **3. 2. 1. Neviróvé vektory**

Nejjednodušší metodou neviróvého přenosu genetické informace je podání DNA ve formě plazmidu. Plazmidy jsou malé, cirkulární, nezávisle se replikující genetické elementy bakteriálního původu, do kterých byl začleněn gen naší volby. Po systémové aplikaci je však DNA degradována během 5 minut, a tak je zasažena jen malá část cílových buněk. Zjistilo se, že lepších výsledků je dosahováno s tzv. lipozomovými komplexy, v nichž je DNA plazmid obalen lipidy. Kationtové lipidové pouzdro lipozomového komplexu chrání DNA před degradací, dobře splyne s plazmatickou membránou buněk, a tak zlepšuje úspěšnost přenosu genetické informace do buněk. Výhodou tohoto postupu je nízká imunogenicita vektoru a bezpečnost přenosu, protože DNA plazmid nemá patogenní vlastnosti virů. Důsledkem aplikace lipozomových komplexů je delší biologický poločas vektoru a vyšší transfekční poměr (množství DNA obsažené ve vektorech, která se skutečně dostane do cílových buněk).

Jinou možností přenosu neviróových vektorů je přenos tzv. antisense oligonukleotidů (ASO). ASO jsou chemicky modifikované části jednovláknové DNA, komplementární k některým z oblastí mRNA, vytvořené podle DNA cílového genu. Tvorbou komplexů s mRNA ASO inhibují translaci genu, který chceme tímto způsobem ovlivnit. Úspěšnost užití ASO závisí na přesnosti hybridizace, protože pouze při přesné shodě ASO s cílovou frekvencí mRNA dochází k zablokování translace příslušné mRNA. Nevýhodou ASO, podobně jako u dalších neviróových vektorů, je jejich krátký biologický poločas, způsobený jejich štěpením endonukleázami. (5)

### **3. 2. 2. Virové vektory**

Převážná většina klinických studií, které už proběhly anebo jsou v chodu, je založena na vektorech virových. Viry totiž mají proti nevirovým vektorům dvě velké přednosti. První vyplývá z toho, že jejich povrchové struktury je předurčují k interakci s receptory na povrchu buněk a přenosu genetického materiálu do nitra buňky, což podstatně zvyšuje účinnost transdukce. Kromě toho jsou viry vybaveny regulačními elementy, které cílová buňka snadno rozpoznává. To zajišťuje účinnou expresi transgenů. Některé viry navíc umožňují integraci transgenů do buněčného genomu, která je zárukou dlouhodobé exprese. Virové vektory však mají i své nevýhody. Jejich příprava je o hodně náročnější než příprava nevirových vektorů. Dalším nedostatkem je malý rozměr virových částic, což omezuje velikost genetického materiálu, který jsou schopné pojmout. Konečně, biologická rizika virových vektorů jsou nesporně vyšší. Nejčastěji používanými virovými vektory jsou retroviry, adenoviry, poxviry, adeno-asociované viry (AAV) a herpetické viry. (6)

## 4. Genová terapie dědičných chorob

Terapie dědičných chorob je dosud omezena na léčbu substituční nebo karenční, tedy na léčbu symptomatickou. Při substituční terapii se dodává organismu protein, který je v důsledku dědičné poruchy defektní nebo dokonce zcela chybí. Takto je např. možno zmírnit příznaky hemofilie aplikací antihemofilického proteinu VIII do krevního oběhu. Léčení je vždy nákladné, zatěžující a omezující pacienta. Při karenční terapii se úpravou diety vyloučí nebo omezí ta složka potravy, která v důsledku dědičné poruchy není změněným nebo chybějícím enzymem odbourávána a je příčinou příznaků nemoci. U několika málo molekulárních chorob (např. fenyktonurie, galaktosemie) lze postižené takto uchránit před nepříznivými příznaky choroby. Technologie genového inženýrství již však umožňuje uvažovat o terapii kauzální, tj. o náhradě mutovaného, nefunkčního genu standardními a funkčními geny. (2)

Základním předpokladem pro úspěšnou léčbu jakékoliv genetické choroby je znalost její molekulární a biochemické podstaty, která umožňuje objasnit souvislosti mezi poškozením určitého genu a fenotypovým projevem choroby. Tento gen musí být identifikován a jeho funkce podrobně charakterizována. Dále musí být prokázáno, že po zavedení funkční formy genu do poškozených buněk, bude jeho produkt schopen odstranit nebo zmírnit projevy choroby a současně nebude mít negativní dopad na životně důležité funkce organismu.

Jelikož většina genetických poruch má komplexní charakter a jejich biochemický základ není podrobně znám, je GT zatím proveditelná toliko u nemocí, které jsou založeny na defektech v jednom. Tabulka 1 uvádí příklady některých nemocí založených na monogenních defektech.



**Tab. 1 Příklady lidských chorob podmíněných monogenně a připadajících v úvahu pro genovou terapii v současnosti**  
(převzato z Rozsypala a kol. 2002)

| Nemoc  | Hlavní symptomy  | Produkt defektního genu                 | Četnost                   |
|--|--|---|---------------------------|
| <b>Deficience adenozydeaminázy (ADA), SCID (těžká imunodeficience)</b> | Defektní T-lymfocyty, poruchy v tvorbě protilátek, definitivní selhání imunitního systému. | adenozydeamináza                        | 1/10 <sup>6</sup>         |
| <b>Fenylketonurie</b>  | Fyzická a psychická retardace.   | fenylalaninhydroxyláza                  | 1/12 000                  |
| <b>Hemofilie A + B</b>   | Porucha srážlivosti krve, krvácivost.  | faktor VIII, IX                         | 1/10 <sup>6</sup><br>mužů |
| <b>Familiární hypercholesterolemie</b>                                 | Předčasné arteriosklerotické změny cév.  | LDL-receptor                            | 1/500                     |
| <b>Deficience na <math>\alpha_1</math>-antitrypsin</b>                 | Plicní emfyzém (rozedma plic).   | $\alpha_1$ -antitrypsin                 | 1/3 500                   |
| <b>Gaucherova choroba</b>  | Nádory sleziny, zvětšení jater, žluté zbarvení (pigmentace) kůže.                          | glukocerebrozidáza                      | ?                         |
| <b>Cystická fibróza, CF</b>  | Porucha v transportu Na <sup>+</sup> , zahlenění dýchacích cest, embolie.                  | transmembránový regulátor CF            | 1/2 500                   |
| <b>Duchennova svalová dystrofie</b>                                    | Svalová ochablost.   | dystrofin                               | 1/3 000<br>mužů           |
| <b>Leschův-Nyhanův syndrom</b>   | Usazování kyseliny močové v kloubech a ledvinách, poruchy CNS                              | hypoxantinguaninfosforibozyltransferáza | 1/10 <sup>6</sup>         |

## 4. 1. Genová terapie deficiencie adenozyndeaminázy

Výzkum v rámci genové terapie se soustřeďuje na nemoci, jejichž defekty se projevují např. v buňkách kostní dřeně, a při kterých je regulace postiženého genu co nejméně komplikovaná. Takovým genem je ADA, který kóduje adenozyndeaminázu, tj. enzym katalyzující deaminaci adenozyinu, kterou vzniká inozin přeměňující se dále na hypoxantin. Mutace v genu ADA má za následek syntézu inaktivní adenozyndeaminázy, takže deaminace adenozyinu je pak zastavena. Adenozyin se pak přeměňuje na dAMP a ten pak na dATP, což je velmi účinný inhibitor biosyntézy deoxyribonukleotidů, bez nichž samozřejmě nemůže probíhat replikace DNA. Rychle se dělící buňky, jako jsou T-lymfocyty, jsou zvláště citlivé na snížení rychlosti syntézy DNA. Proto za nepřítomnosti aktivní adenozyndeaminázy dochází v T-lymfocytech k imunitní nedostatečnosti vzhledem k infekčním chorobám. Základem této nedostatečnosti je neschopnost T-lymfocytů proliferovat, což má u B-lymfocytů za následek snížení tvorby protilátek.

Až do začátku roku 1990 spočívala terapie deficiencie ADA v transplantaci kostní dřeně z vhodného a zdravého dárce, často se však takový dárce nenašel. U dětí se používá substituční terapie spočívající v podávání intramuskulárních injekcí ADA-enzymu navázaného na polyethylenglykol (PEG), který stabilizuje ADA-enzym v těle po několik týdnů. Avšak tato terapie nedává možnost úplné obnovy imunity. Proto se v roce 1990 pokusil americký lékař William French Anderson vyléčit genovou terapií čtyřletou Ashanti DaSilvaovou, která trpěla nedostatečností imunitního systému, právě z důvodu deficiencie ADA. Terapii však nebyly podrobeny buňky kostní dřeně, ale T-lymfocyty, které byly získány z krve pacientky a infikovány in vitro retrovirovým vektorem nesoucím nepoškozený ADA-gen. Po krátké kultivaci, během které se DNA retroviru nesoucí gen ADA integrovala do chromozomu T-lymfocytů, byly T-lymfocyty zavedeny zpět do těla pacientky.

Po 10 měsících se u malé dívky zřetelně zlepšila funkce imunitního systému a podíl T-lymfocytů s opraveným genem ADA se rovnal 20% z celkového množství T-lymfocytů. Zdravotní stav Ashanti se normalizoval. Dnes je z ní mladá žena, která žije normálním životem. Stále však ještě užívá enzym ADA v injekcích, ale na jejím dobrém zdravotním stavu se významně podílejí i výsledky 16 let staré

léčby nenarušeným genem. Výsledky získané v následujících letech u dalších pacientů potvrdily, že GT deficiencie adenozydeaminázy působí léčebně u pacientů s méně závažnými symptomy a může být účinná jako doplňující léčba i u pacientů s těžkou formou tohoto onemocnění. (1, 4, 7)

## **4. 2. Genová terapie těžkého kombinovaného imunodeficitu (SCID)**

Novorozenci postižení těžkým kombinovaným imunodeficitem nejsou schopni vytvořit imunitní odpověď. Takové děti zpravidla umírají během prvního roku života v důsledku opakovaných infekcí vyvolávaných oportunními zárodky. Ale příčinou generalizované smrtelné infekce se u nich může stát také imunizace živou očkovací látkou, např. vakcínou BCG, vakcínou proti poliomyelitidě nebo proti spalničkám. Nemocní mohou přežít, jen když je defekt včas rozpoznán a dítě je léčeno (nejčastěji transplantací kostní dřeně). Avšak diagnóza bývá učiněna v průměru až v sedmém měsíci života dítěte, kdy už může být na zahájení léčby pozdě.

Bylo zjištěno, že počet postižených chlapců je třikrát vyšší než děvčat, a že to souvisí s tím, že v polovině případů je těžký kombinovaný imunodeficit recesivně dědičné onemocnění vázané na chromozom X. V druhé polovině případů jde o autosomálně recesivní dědičnost.

Charakteristickým projevem těžkého kombinovaného imunodeficitu vázaného na chromozom X je normální počet B-lymfocytů v krvi, při úplném chybění T-lymfocytů a NK buněk. Naproti tomu při autosomálně dědičném imunodeficitu chybějí lymfocyty B i T, ale NK buňky jsou přítomné. (7)

Nositelé tohoto dědičného defektu imunitní obrany tráví většinu života po nemocnicích. Bohužel, v jejich případě není k dispozici lék, který by jim od potíží ulevil. Jednu z mála šancí na uzdravení nabízí transplantace kostní dřeně, při níž jsou do pacientova těla přeneseny krvetvorné buňky zdravého člověka. Problémem je to, že se pro mnoho dětí nedaří najít vhodného dárce kostní dřeně a transplantace může končit tragickými komplikacemi.

Někdy se takto nemocným dětem také říká „bublinové děti“. Snad nejznámějším „bublinovým dítětem“ se v sedmdesátých letech stal David Vetter.

Odborníci z americké kosmické agentury NASA mu zkonstruovali zvláštní skafandr. V této průhledné bublině se dalo udržovat sterilní prostředí a David v ní mohl chodit ven bez rizika nákazy. Chlapec, díky němuž se dostal termín „bublinové dítě“ do obecného podvědomí, zemřel na komplikace spojené s neúspěšnou transplantací kostní dřeně. (4, 8)

Ve Francii se lékaři pod vedením Alaina Fischera rozhodli pomoci „bublinovým dětem“ genovou terapií. Z kostní dřeně pacientů byly odebrány buňky s poškozeným genem, do nich byl ex vivo pomocí virového vektoru vpraven funkční gen. Poté se geneticky modifikované buňky vyizolovaly, namnožily a infúzí byly zavedeny zpět do těla pacientů. Tým francouzských lékařů oznámil úspěšné vyléčení 12 bublinových dětí v roce 2000. Bylo prokázáno, že tvorba T-lymfocytů a NK buněk byla plně obnovena. Fischer měl dlouhou řadu následníků, metoda se rychle ujala a začaly se pomocí ní léčit „bublinové děti“ po celém světě.

V roce 2002 se ovšem zjistilo, že jeden z vyléčených „bublinových“ hochů onemocněl leukémií a že existuje důvodné podezření, že zhoubné bujení je důsledkem virové léčby. Virus vnáší geny na náhodné místo dědičné informace. Může tedy nešťastnou shodou okolností zasáhnout i pacientovy geny a poškodit je. Šance je malá, protože geny zaujímají necelá 2% ze tří miliard písmen genetického kódu lidské dědičné informace. U jednoho z Fischerových pacientů ale uložil virus léčebný gen do blízkosti genu LMO2, který zodpovídá během vývoje lidského plodu za množení krvinek. Po narození člověka se gen LMO2 stává natrvalo neaktivní. Léčebný gen zřejmě neaktivní gen aktivoval a gen LMO2 začal plnit svou funkci v naprosto nevhodnou dobu. V těle malého pacienta se pod vlivem aktivovaného genu množily leukocyty a lékaři zvládali jejich nadbytek jen s pomocí silných cytostatik. Nad genovou léčbou vyvstal velký otazník a objevily se obavy, zda je bezpečná či nikoliv.

„Bublinové děti“ se uzdravily po léčbě geneticky upravenými viry v Německu, Británii, Nizozemí, USA a dalších zemích. Řada odborníků poukazovala na fakt, že k vážné komplikaci došlo jen v jednom jediném případě. Lékaři tedy začali řešit dilema, zda mají v riskantní léčbě pokračovat nebo mají odmítat malé pacienty, kterým by mohli zachránit život. Němečtí lékaři genovou terapii virem zastavili, francouzští se vzdali některých typů virových vektorů. V Británii a Spojených státech pokusy pokračovaly, i když možné riziko nikdo nebral na lehkou váhu.

V polovině ledna roku 2003 nastal dramatická zvrát, protože bylo zjištěno, že leukémií onemocněl další pacient. Výzkumy virologů potvrdily, že virus nevkládá vlastní geny do dědičné informace napadené buňky náhodně. Geny viru zjevně tíhnou do sousedství hostitelových genů, jejichž funkce mohou významně ovlivnit. Bohužel, v lidských buňkách to jsou zřejmě místa spojená s regulací genů zodpovědných za množení leukocytů.

GT využívající geneticky upravených virů byla zastavena i v USA. Po zprávě o onemocnění druhého Fischerova pacienta bylo s okamžitou platností ukončeno 30 klinických zkoušek. Rodiny dětí, které tak přišly o poslední naději na uzdravení, se bouřily. Pro mnohé rodiče bylo časově vzdálenější riziko leukémie menším zlem než téměř jistá smrt spojená s fatálními peripetiemi života „bublinového dítěte“.

Vědci usilovně hledali způsob, jak vzniku leukémie zabránit. Přijali striktní pravidla. Léčbě podrobovali jen děti starší než 6 měsíců, jež nejsou ke vzniku leukémie tak náchylné. Z bezpečnostních důvodů byly omezeny dávky viru a malí pacienti byly neustále pod důkladným lékařským dohledem, který by odhalil jakékoliv nežádoucí vedlejší účinky léčby v samém počátku, kdy by se daly komplikace ještě relativně snadno zvládnout.

Na znovuzahájení léčby se pomocí genové terapie se čekalo déle než rok. Teprve v létě roku 2004 se léčba dětí znovu rozběhla na klinikách ve Francii, Británii, Itálii a USA. Zdálo se, že genová léčba má jeden z nejtěžších momentů své existence zdárně za sebou.

Jenže počátkem roku 2005 přišla zpráva o třetím „bublinovém dítěti“, které po léčbě genem onemocnělo leukémií – i přesto, že bylo léčeno podle „bezpečného“ protokolu. Zároveň Alain Fischer oznámil, že jeden z jeho pacientů leukémií podlehl. Francouzský lékař opustil stávající způsob léčby. „Je účinný, ale není bezpečný“, řekl francouzský lékař. (4, 8, 9, 10, 11)

### 4. 3. Genová terapie hemofilie

Hemofilie je dědičná choroba vyznačující se krvácivostí. Příčinou je mutace na chromozomu X. Mutace brání normální produkci určitého koagulačního faktoru. U hemofilie typu A je defektní gen pro koagulační faktor VIII. Tato forma představuje 80% všech případů hemofilie. Protože se jedná o poruchu na chromozomu X, nemoc se většinou projeví jen u mužských potomků. U žen funkci chybného genu převezme druhý gen na druhém chromozomu X, ten pak zajistí dostatek tvorby koagulačního faktoru.

Hemofilie své nositele výrazně omezuje. Postiženým se špatně hojí rány a dokonce pouhý běh u nich může způsobit krvácení do kloubů s následnými těžkými záněty. Hemofilici musí mít vždy po ruce lékovou formu koagulačního faktoru, ale ani to hemofiliky nezbaví nebezpečí vzniku nejrůznějších komplikací spojených s krvácením. (12)

V časopise New England Journal of Medicine byla publikována studie, v které autoři (DA Roth et al.) testovali účinnost a bezpečnost genové terapie těžké hemofilie A. Gen byl přenášen nonvirální cestou prostřednictvím somatické buňky.

Do studie (šlo o 1.fázi klinického zkoušení) bylo zařazeno šest pacientů s těžkou hemofilií A. Kožní fibroblasty, získané z každého pacienta, byly kultivovány, provedena transfekce plasmidem, obsahujícím sekvence genu, kódujícího faktor VIII. Buňky, které produkovaly faktor VIII byly selektovány a klonovány.

Klonované buňky byly přeneseny do organismu pacientů laparoskopickou injekcí do omenta. Pacienti byli sledováni po dobu 12 měsíců po implantaci geneticky pozměněných buněk. Výsledky ukázaly, že tato procedura nepřinesla žádné závažné vedlejší účinky. Neobjevily se také žádné dlouhodobé komplikace, ani nebyla prokázána produkce protilátek proti faktoru VIII.

U většiny pacientů stoupla produkce faktoru VIII, incidence krvácení poklesla a poklesla potřeba externí dodávky faktoru VIII. Autoři docházejí k závěru, že implantace geneticky pozměněných fibroblastů je bezpečná a dobře tolerovaná metoda. Tento typ terapie je u těžké formy hemofilie A použitelný. (13)

## 4. 4. Genová terapie cystické fibrózy

Cystická fibróza je dědičné onemocnění způsobené jediným defektním genem. Onemocnění končí fatálně obvykle před dosažením věku 30 let. Dosud byla jedinou nadějí pro nemocné transplantace plic. Nemoc se projevuje nadprodukcí hlenu v plicích, který ucpává plicní sklípky a dělá z pacienta snadný terč pro chronická infekční onemocnění. GT je pro mnohé nemocné poslední nadějí.

Ve srovnání s ostatními vnitřními orgány jsou plíce poměrně snadno přístupné zvenčí. Proto panuje naděje, že by se GT, při které by byl nahrazen vadný gen, mohla aplikovat inhalačně. Dosavadní pokusy však nedopadly moc dobře. Léčebný efekt, pokud vůbec jaký, byl obvykle jen krátkodobý. To je dáno faktem, že díky snadné přístupnosti zvenčí se u plic vyvinul výkonný ochranný systém, který chrání povrch plic před všemi alergeny, viry, prachem a jinými cizími částicemi. Tato obrana přirozeně funguje i proti retrovirům, které se při genové terapii používají k zavedení funkčního genu do buňky.

Skupina výzkumníků z Women's and Children's Hospital v australském Adelaide tvrdí, že našla cestu ke prodloužení účinku terapie. Tým použil modifikovaného viru HIV k přenosu funkčního genu do buňky. Modifikovaný virus přitom není schopen vyvolat HIV infekci. Při aplikaci použili výzkumníci současně plicní surfaktant. Svou metodu zatím vyzkoušeli na nosních dutinách myší, které reagují podobně jako povrch plic. V experimentech buňky nejenže reagovaly na genovou terapii, ale udržely tuto odpověď po přinejmenším 110 dní. Buňky v nosních dutinách se obvykle nahrazují jednou za tři měsíce. Proto výsledek patrně znamená, že genetická změna se objevila i v nově vytvořených buňkách a nikoliv jen v těch původních. Což ve svém důsledku zřejmě znamená, že funkční gen byl touto metodou zaveden i do kmenových buněk.

V dalším kroku by měla být metoda použita na skutečné pacienty s cystickou fibrózou. Proto výzkumníci z Adelaide vyladují techniku, aby klinické experimenty mohly začít co nejdříve. (14)

## 4. 5. Genová terapie u kardiovaskulárních chorob

V kardiologii se GT zaměřuje na tři hlavní oblasti. Jde o novotvorbu cév, srdeční selhání a snahu zabránit reokluzi po provedené perkutánní transluminální intervenci. Ve 47 % kardiologických studií zaměřených na genovou terapii se užívaly nevirové vektory – v 39 % nahá DNA, v 8 % liposomové přenašeče. Využito bylo především genu kódujícího růstový faktor cévního endotelu (VEGF), aplikovaného i. v., i. m., intrakoronárně či intramyokardiálně, dále základního růstového faktoru fibroblastů (bFGF), popř. jaterního růstového faktoru (HGF).

Teprve později bylo užito virových vektorů, od nichž se očekávala výraznější a delší exprese genu (adenoviry). Není však pravděpodobné, že tento vektor bude úspěšný v širším měřítku i v humánní medicíně. Důvodem je limitované trvání exprese genu, problémy s jeho opakovaným podáním pro vznik neutralizačních protilátek proti adenovirům. Vznik myokarditidy po tomto způsobu přenosu nebyl zaznamenán.

Pokud jde o jednotlivé studie, jsou k dispozici buď pouze výsledky experimentálních prací (nebo studií fáze I), které byly zaměřeny především na bezpečnost podání a teprve později, a v menší míře, na účinek terapie samotné. První a nejdůležitější oblastí genové terapie je posílení novotvorby cév – tzv. terapeutická angiogeneze. Může se uplatnit především u těžkých ischemických postižení myokardu s refrakterní anginou pectoris a s nemožností provést úplnou revaskularizaci chirurgickou a/nebo katetrizační cestou (podobně se to týká ischemických syndromů na dolních končetinách).

První důkaz o účinnosti genové terapie při angioneogenezi podal v experimentu (1994) Takeshita, v humánní kardioangiologii Isner (1995–1996). Tyto práce odpovídají již dříve publikovaným zjištěním, že sval, především ischemický, velice ochotně přijímá plazmidy DNA, nejspíše pro svou mnohojadernou strukturu. Problémem není ani intramyokardiální podání intraoperační z epikardiálního přístupu, někdy za kontroly jícnovou echokardiografií. Déletrvající exprese genu se nezdá jako zásadní požadavek u genové terapie s cílem neovaskularizace myokardu. Bezpečnostní profil přechodné exprese genu byl ověřován v řadě studií zabývajících se ischemií myokardu. Z celkem 85 nemocných po transferu genu pomocí plazmidu byla



pozorována 3 úmrtí. V průběhu 1–3letého sledování 97 nemocných s užitím adenovirového vektoru došlo k 5 úmrtím, což odpovídá více než 1 000 pacientů léčených konvenčně medikamentózní terapií nebo laserovou revaskularizací.

Další potenciální terapeutickou indikací genové terapie v kardiologii představuje srdeční selhání. V tomto směru existují tři hlavní směry genové léčby, které se snaží docílit zvýšení kontraktility, a to cestou modulace homeostázy kalcia, ovlivněním beta-adrenergických receptorů a konečně zvýšením rezistence kardiomyocytů k apoptóze.

GT představuje v kardiologii možnost především v léčbě ischemických postižení. Vzhledem k nedostatku randomizovaných, placebem kontrolovaných studií však nelze zatím účinek této terapie posoudit. Do budoucna bude nutno nalézt optimální vektor, definovat nejvhodnější přístup (pravděpodobně transmyokardiální, doplněný i. v. aplikací) i dávky. Z dosud provedených studií se zdá, že GT je v kardiologii dobře tolerována, je bezpečná a umožňuje ve větším rozsahu než dosud zahájit éru randomizovaných, placebem kontrolovaných studií.

(15)

#### **4. 6. Genová terapie Alzheimerovy choroby**

Povzbudivé výsledky genové léčby Alzheimerovy choroby představil účastníkům kongresu American Academy of Neurology Mark Tuszynski z University of Kalifornia v San Diegu. Geneticky modifikovaná pokožka vnesená do mozku měla na pacienty desetkrát větší efekt než nejlepší stávající léky.

Před dvěma lety proběhala světem zpráva, podle které Mark Tuszynski voperoval osmi pacientům stíženým Alzheimerovou chorobou do mozku buňky jejich vlastní pokožky geneticky upravené tak, aby produkovaly značné množství nervového růstového faktoru (NGF). Tento faktor, jehož objev byl v roce 1986 po právu odměněn Nobelovou cenou, pomáhá neuronům „přežít“. Tuszynski doufal, že velká dávka NGF zbrzdí úhyn neuronů v mozcích pacientů postižených Alzheimerovou chorobou.

Na buňky pokožky padla volba hned z několika důvodů. Tyto buňky se pacientům snadno odebírají, dobře se množí v laboratorních podmínkách a ani s úpravou jejich dědičné informace nejsou větší problémy. Když jsou přeneseny

do tkáně tvořené hustě nahlučenými buňkami (a mozek je takovou tkání), pak ztrácejí vhodné podmínky pro růst a jejich množení se zastaví. Díky tomu snad nehrozí, že se transplantované buňky zvrhnou v nádor. Vzhledem k tomu, že pro zákrok byly použity pacientovy vlastní buňky, nepotýkal se Tuszynski s problémem nežádoucí odmítavé reakce imunitního systému.

Nyní je jasné, že Tuszynského předpoklad vyšel. Demence pacientů se sice nezastavila, ale její tempo kleslo na polovinu. Současné léky předepisované lidem s Alzheimerovou chorobou dovedou zpomalit postup demence jen o 5%. Důkladné vyšetření mozku také odhalilo výrazně vyšší prokrvení. To všechno napovídá, že buňky v mozku ještě žijí a produkují NGF.

Mark Tuszynski se pokusil využít pro přesné umístění geneticky modifikovaných buněk spolupráce s pacienty. Prvním dvěma dobrovolníkům lékaři navrtali malý otvor do lebky a tím prostrčili dlouhou jehlu, kterou pak pronikali hlouběji do mozku. Pacient měl lékařům referovat o jakékoli vzpomínce nebo pocitu, jaký se mu během zákroku vybaví. Navzdory tomu, že měli pacienti hlavu upjatou ve speciálním rámu, ani jeden nevydržel se nepohnout. V obou případech došlo ke krvácení do mozku a v jednom případě dokonce ke smrtelnému srdečnímu záchvatu. Proto byli zbývající pacienti už operováni v plné narkóze.

Většina lékařů se shoduje v tom, že Tuszynského práce je obrovským příslibem do budoucna. Prozatím ale zachovávají značnou zdrženlivost. Pacientů, kteří prošli léčbou, je málo a ani dvouletá doba není dostatečně dlouhá na to, aby se mohly projevit všechny komplikace, jež připadají do úvahy.

„Je to jen první z dlouhé řady studií, jež musejí následovat,“ říká americký neurolog Dave Holtzman z Washington University v St. Louis. (16)

## 5. Genová terapie nádorů

Většina současného úsilí se orientuje na získané choroby, mezi nimiž převažují zhoubné nádory. Je několik důvodů, proč se právě onkologie stala hlavní doménou genové terapie. Za prvé, je těžší buňku geneticky opravit tak, aby řádně fungovala, než ji zničit, a právě o to jde při léčbě nádorů. Za druhé, je k dispozici řada genetických strategií, s jejichž pomocí je možné buňky nádorů likvidovat, a to často s vysokou účinností. Za třetí, k úspěchu, tj. k zničení nádorové buňky, stačí zpravidla krátkodobá exprese genu. Za čtvrté, díky rychle se rozšiřujícím znalostem o nádorové biologii a imunologii a pokrokům v metodách genových manipulací se otevřela cesta k vývoji terapeutických protinádorových genetických vakcín. Za páté, rizika genové terapie, mezi nimiž je na prvním místě hrozba nádorové transformace cílové buňky, jsou u pacientů s maligními nádory zanedbatelná. Konečně za šesté, onkologičtí pacienti jsou velmi často ochotni podstoupit nové experimentální terapie, což rovněž souvisí s povahou jejich nemoci a tím, jak ji prožívají.

Metod, které se při genové léčbě nádorů využívají, neustále přibývá. Strategie, které jsou v současnosti používány nejčastěji, se mohou rozdělit na několik základních skupin.

### 5. 1. Přímé ovlivnění nádorových buněk

První skupinu strategií tvoří ty, které se zaměřují přímo na nádorovou buňku. Cílem je ji zničit nebo pozměnit tak, aby ztratila fenotyp nádorové buňky. Strategie vychází z toho, že příčinou vzniku nádorové buňky je alterace genů, jejichž produkty regulují růst buňky, ať již v pozitivním či negativním smyslu. Souborně se označují jako onkogeny a antionkogeny. Cílem zásahu je buď vyřadit z funkce aktivované onkogeny, či nahradit mutované, nefunkční antionkogeny plně funkčními. K vyřazení aktivovaných onkogenů se používají tzv. antisense nukleotidy, což jsou nukleotidové sekvence, které svou vazbou specificky zabrání jejich přepisu či překladu. Podobně působí ribozymy. Tak označujeme molekuly s vysokým katalytickým potenciálem, konstruované tak, aby specificky rozpoznaly a rozrušily cílovou RNA, a tím zabránily překladu nežádoucích genetické informace. V

poslední době se mnoho pozornosti věnuje takzvané interferující RNA (iRNA) jako metodě, která účinně snižuje škodlivou genovou expresi. Mnozí právě jí předpovídají velkou budoucnost v terapii nádorů. Aktivitu produktů onkogenů může významně snížit vnesení genů pro protilátky proti aktivovaným onkogenům. Takové protilátky se označují jako intrabodies. Jiná strategie využívá funkčních antionkogenů, jejichž produkty jsou s to obnovit kontrolu buněčného růstu.

Přes svou logičnost a nezpochybnitelný vědecký podklad mají všechny popsané postupy jedno slabé místo. Za podmínek *in vivo* je prakticky nemožné postihnout všechny buňky nádoru. Buňky, které se nepodaří geneticky modifikovat, mají oproti ostatním růstovou výhodu a snadno se stanou dominantní složkou buněčné populace nádoru.

Více pozornosti se nyní věnuje dvěma dalším strategiím, tj. využití genů, které kódují imunostimulační faktory (razí se pro ně název molekulární adjuvancia) a tzv. sebevražedné geny. Díky pokrokům nádorové imunologie se dnes ví, že většina nádorů či snad dokonce všechny nádory obsahují zvláštní antigeny, které je odlišují od normálních buněk. Podaří-li se přimět nádorové buňky k tvorbě imunostimulačních faktorů, pak se zvýší schopnost organismu rozpoznat takové antigeny. Geneticky modifikované buňky mohou zcela ztratit svůj onkogenní potenciál a mohou vyvolat silnou protinádorovou reakci. V posledních deseti letech bylo provedeno nesčetné množství experimentálních studií, které tento základní předpoklad potvrdily. Produkce imunostimulačních faktorů, jako jsou IL2 (interleukin 2) či GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), nádorovými buňkami zajišťuje jejich účinnou lokální koncentraci, aniž by se dostavovaly toxické projevy, které provázejí systémové podání stejných cytokinů.

Imunitní protinádorová reakce se dá vyvolat i pomocí sebevražedných genů. Označují se tak geny, často mikrobiálního původu, jejichž produkty mění některé jinak neškodné substance v látky vysoce cytotoxické. Buňka, která sebevražedný gen exprimuje, ničí sama sebe. Odtud pochází název. Genů, jejichž produkty mohou obdařit buňky takovými sebevražednými vlastnostmi, je známo několik desítek. Kupodivu, nejčastěji používaným sebevražedným genem zůstává ten, který byl použit jako první. Jde o gen pro tymidin-kinázu virus herpes simplex (HSV TK). Jeho produkt se liší od buněčných kináz svou schopností fosforylovat některé analogy nukleosidů, včetně těch, které jsou běžně používány k léčbě nemocí vyvolaných herpetickými viry. Jako příklady mohou sloužit acyclovir (ACV),

ganciclovir (GCV) či bromovinyl-deoxyuridin (BVDU). Dostanou-li se takové substance do buňky, která tvoří HSV TK, jsou fosforylovány na příslušný monofosfát, který je dále dotvořen buněčnými kinázami v trifosfát. Ten je pro buňku vysoce toxický, protože blokuje syntézu DNA. Předpokladem zdárného průběhu ovšem je, že se geneticky pozměněná buňka dostane ve styk s účinnou substancí, když je v S-fázi svého růstu. Stejně jako v případech výše popisovaných postupů nelze in vivo vpravit sebevražedný gen do všech buněk a postihnout celou buněčnou populaci nádorů. Naštěstí však existuje jev, který se označuje jako bystander-effect (česky bychom mohli říci „postranní účinek“). V jeho důsledku hynou i buňky okolní, které nebyly geneticky modifikovány. Toxické metabolity totiž do nich pronikají mezibuněčnými spoji a vykonají své ničivé dílo, jakmile se buňka octne v S-fázi růstového cyklu. Pak nastává třetí dějství, které může mít za následek vytvoření účinné protinádorové imunity. Její vznik je důsledkem uvolnění velkého množství nádorových antigenů a současné aktivace cytokinů, které doprovázejí hnutí nádorových buněk. Některé z nich způsobují nekrozu, jejímž důsledkem je zánět, který stimuluje imunitní reakce organismu.

Z řečeného by se dalo vyvodit, že kombinace sebevražedných genů s geny pro imunostimulační faktory by měla účinnost léčby dále umocnit a vytvořit optimální podmínky pro odhojení nádoru. Dosavadní výsledky jsou však nejednoznačné. V některých experimentálních systémech se skutečně podařilo prokázat synergický účinek kombinované terapie, v jiných nikoli. Proč tomu tak je, není zatím jasné. Odlišné výsledky nejspíše souvisejí s komplexností zkoumaných systémů a jejich vybalancováním a v neposlední řadě s povahou nádorových antigenů, které jsou ve hře.

## **5. 2. Ovlivnění nenádorových buněk**

Některé z popsaných manipulací se dají využít k léčbě nádorů nepřímo tak, že se geneticky modifikují nenádorové buňky. Sem patří podání heterologních buněk, do kterých byly zavedeny ex vivo geny pro imunostimulační faktory a které se, zpravidla po letálním ozáření, vpraví do okolí nádoru či přímo do něj. Tím se snadno a rychle vytvoří vysoká lokální koncentrace cytokinů, jen těžko dosažitelná při systémovém podání.

Sebevražedné geny vnesené do některých typů nenádorových buněk se osvědčily v experimentálních systémech. Například dobře může posloužit nepatogenní mutanta *Salmonella typhimurium*, která má tendenci kolonizovat nádorovou tkáň, je-li bakterie geneticky pozměněna tak, že produkuje enzym cytosin-deaminazu, který mění netoxický 5-fluorocytosin ve vysoce toxický 5-fluorouracil. Tak lze poměrně snadno dosáhnout vysoké lokální koncentrace cytostatika, která by měla být zárukou terapeutického účinku, aniž by se dostavily nepříjemné vedlejší potíže spojené s jeho celkovým podáváním.

Sebevražedné geny byly s úspěchem využity i k léčbě reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, graft-versus-host-disease), která je krajně nežádoucí komplikací alogenních transplantací. Sebevražedný gen je vnesen do buněk určených k transplantaci. Propukne-li GVHD a byl-li jako sebevražedný nástroj použit gen pro HSV TK, pak podání GCV má rychlý a výrazný terapeutický efekt. Výsledky prvních klinických studií jsou slibné.

Zcela zvláštní místo v této skupině strategií zaujímá využití genů, které zvyšují odolnost na cytostatika. Nezapomínejme, že jejich toxicita pro buňky kostní dřeně je často limitujícím faktorem chemoterapie. Cílovou buňkou je krevní kmenová buňka. Mezi nejčastěji používanými jsou geny pro MDR-1 (multidrug-resistance gene 1), pro mutantní dihydrofolát reduktázu, která je rezistentní k methotrexátu, a pro alkyl-transferázu, která zvyšuje rezistenci k hydroxyuree a jejím derivátům.

### **5. 3. Inhibice neoangiogeneze**

Pouze nádory do velikosti zhruba 1 mm<sup>3</sup> jsou vyživovány difuzí živin z okolí. Invazivní růst nádorů a metastazování se neobejde bez neoangiogeneze. Zábava angiogeneze se stala jedním z ústředních témat onkologického výzkumu. Vývoj nových chemoterapeutik brzdících angiogenezi, je v posledních několika letech doplňován pokusy využít k stejnému účelu GT.

Současné bádání je zaměřeno na genové manipulace jak nádorových, tak nenádorových buněk. Cílem je narušit poměr mezi faktory pozitivně a negativně regulujícími angiogenezi ve prospěch druhých. V preklinických studiích byla už vyzkoušena řada různých strategií. Ty z nich, které se zaměřují na nádorové buňky, usilují o vpravení transgenů (např. genu pro angiostatin), jejichž produkty

angiogenezi tlumí či aktivují jiné geny, jejichž produkty tak činí. Další možností je potlačení receptorů pro angiogenetické faktory na endoteliích. Takový postup se někdy označuje jako přímá antiangiogenetická GT. Předpokládá se, že výhodou GT oproti chemoterapeutickým zásahům bude dlouhodobost účinku a méně nežádoucích vedlejších efektů.

#### **5. 4. Onkolytické viry**

Posledních 5 až 7 let je dobou obnovy snah o využití virů pro rozrušení nádorů, tedy o přístup, kterému se věnovalo hodně pozornosti v 60. letech minulého století. Přes značné úsilí tehdy nepřinesl výsledky, které by stály za řeč. Rozvoj molekulární biologie virů, a zejména rozšíření vědomostí o replikaci virů a její závislosti na biologických vlastnostech buňky zvedl novou vlnu zájmu o onkolytické viry. Současné koncepce mají daleko racionálnější základ než před čtyřiceti lety. Podařilo se izolovat virové mutanty, které se selektivně množí v nádorových buňkách a nemnoží se buď vůbec, nebo jen ve velmi omezeném měřítku v buňkách normálních, a do značné míry se ví, proč tomu tak je. Mezi užívaná agens patří mutanty herpetických virů a adenovirů. Podařilo se též identifikovat několik virů, které se v důsledku svých biologických vlastností množí jen v buňkách nádorových. Mezi viry, které se nyní těší velké pozornosti, jsou reoviry, málo patogenní viry, s exkluzivní afinitou k nádorovým buňkám. V nedávné minulosti proběhlo několik prvních klinických studií s onkolytickými viry. Výsledky jsou povzbudivé. Lze očekávat, že v blízké budoucnosti bude jejich další prověřování jednou z dominant onkologického výzkumu.

#### **5. 5. Genetické vakcíny**

Jak už bylo zmíněno, současnou významnou součástí GT zhoubných nádorů se staly protinádorové vakcíny založené na genových manipulacích. Podmínky pro jejich vývoj vytvořil všeobecný pokrok v oboru imunologie, zvláště pak rozšíření vědomostí o povaze imunitních protinádorových reakcí, ale také přibývající poznatky o biologii nádorových buněk. V současné době se zvažuje uplatnění protinádorových vakcín hlavně u těch nádorů, které mají dobře definované nádorové antigeny a od nichž byly vyklonovány geny, které takové

antigeny kódují. Mezi nimi jsou na prvních místech nádory virového původu (jichž je asi 15-20 %). Produkty virových onkogenů, jimž se říká virové onkoproteiny, jsou totiž podrobně prozkoumanými, velkými a dobře zasažitelnými terči imunitních reakcí organismu. Nespornou výhodou všech studií s nádory virového původu je i možnost monitorovat, a to poměrně snadno, typ a intenzitu imunitních reakcí, které vakcinace vyvolává.

Podle užití základní metodologie jsou nejdůležitějšími genetickými protinádorovými vakcínami: DNA vakcíny, živé rekombinantní vakcíny a buněčné vakcíny. Velký perspektivní význam mají i vakcíny připravované na rostlinách.

### **5. 5. 1. DNA vakcíny**

Jde vlastně o imunizaci „nahou“ DNA. Jako vektory slouží plazmidy, které nesou gen kódující nádorový antigen. Vpravují se intramuskulárně či intrakutánně. Dosavadní zkušenosti ukazují, že druhý způsob inokulace je výrazně efektivnější. Terapeutický efekt se podařilo prokázat v řadě experimentálních systémů. Intenzivně se bádá, zda imunizaci bude možné podstatně podpořit současným podáním genů pro různé imunostimulační faktory.

### **5. 5. 2. Živé rekombinantní vakcíny**

Jako nosiče cizích genů je možné použít jak viry, tak bakterie. Jejich prototypem je virus vakcinie. Ten se pro vývoj rekombinantních vakcín zvláště hodí pro svou nízkou reziduální patogenost a značnou velikost genomu. Obsahuje řadu genů, jejichž produkty nejsou nutné (říkáme, že jsou „neesenciální“) pro replikaci viru. To umožňuje nahradit část z nich transgeny (teoreticky až více než 20 průměrně velkými geny), aniž bychom zbavili virus schopnosti se pomnožovat. Už bylo provedeno několik klinických studií, které potvrdily to, co předtím ukázaly experimentální studie na zvířatech, že totiž vakcinace vede k vyvolání specifické imunity proti nemocem, jejichž protekční antigeny se tvoří při množení viru.

I když se rekombinanty ukázaly být bezpečné a účinné jako profylaktické vakcíny, jejich vliv na klinický průběh nemoci nebyl tak dramatický. To nepochybně souvisí s tím, že do studií byli většinou začleněni pacienti s pokročilou chorobou.



Je pravděpodobné, že účinnost bude vyšší u nemocných s včasnější fází nemoci. Zvýšení terapeutického efektu se očekává od nových mutant viru vakcinie, které budou dále obohaceny geny kódujícími imunostimulační faktory.

### **5. 5. 3. Buněčné vakcíny**

Když se v souvislosti s GT mluví o protinádorových buněčných terapeutických vakcínách, máme na mysli buněčné linie odvozené z nádorů, které byly ex vivo modifikovány vnesením genů kódujících imunostimulační faktory, případně dalších genů. V uplynulých desíti letech byla vyzkoušena řada experimentálních systémů, v nichž se nade vše pochybnost prokázal imunizační potenciál takových vakcín, a proběhl i větší počet klinických studií. K modifikacím se používá genů pro cytokiny (jako jsou již zmíněné IL2 a GM-CSF), chemokiny (jako je např. MCP 1) a kostimulační molekuly (jako jsou B7.1 či B7.2). V závislosti na užitém immuno-stimulačním faktoru buněčné linie z pozměněných buněk ztrácejí svou onkogenost. Přitom si zachovávají schopnost vyvolat imunitu, která může příznivě ovlivnit probíhající neoplastický proces. K terapeutickým zásahům se dají použít jak autologní, tak alogenní buňky. Použití alogenních buněk má řadu výhod i nevýhod.

Mezi nevýhody počítáme:

- 1) Možnost, že užitá buněčná linie nemusí nutně obsahovat potřebný antigen.
- 2) Přítomné sdílené nádorové antigeny nemusí být prezentovány v kontextu pacientova MHC, což znamená, že nejsou rozpoznány jeho imunitním systémem.
- 3) Existuje riziko, že nad odpovědí k převážně slabým nádorovým antigenům převáží imunitní reakce k silným cizím antigenům MHC.

Nevýhody alogenních vakcín do jisté míry vyvažují jejich výhody. Na prvním místě je to skvělá možnost využít materiál, který je udržován za standardních podmínek v laboratoři. Dále odpadá nutnost izolovat od každého pacienta linii z jeho nádorů, což je záležitost časově náročná a nemusí být vždy úspěšná. Je rovněž možné použít jako vakcínu směs několika alogenních linií, což zvyšuje pravděpodobnost, že imunitnímu systému pacienta je nabídnut větší počet různých nádorových antigenů. Imunizační účinek se dá dále zvýšit tím, že

buněčné linie budou geneticky modifikovány tak, aby tvořily imunostimulační faktory. Za jistých okolností se může příznivě uplatnit i imunostimulační, adjuvantní účinek alogenních molekul MHC.

Genově modifikované buňky se užívají buď živé, a to za předpokladu, že zcela ztratily onkogenní potenciál, inaktivované (zpravidla ozáření), anebo ve formě lyzátů. Výzkumné práce s ozářenými genově modifikovanými buňkami překvapivě ukázaly, že často produkují více imunostimulačních faktorů než buňky neozářené. Kromě toho se může po ozáření zvednout exprese MHC I, což zvýší imunizační efekt. To má zvláštní význam u autologních vakcín. Srovnávací studie na zvířatech nicméně ukázaly, že živé buňky jsou více imunogenní než buňky letálně ozářené. V humánní medicíně se však z bezpečnostních důvodů prozatím pracuje jen s usmrcenými buňkami. Je ovšem lákavé uvažovat o živých buněčných vakcínách vybavených sebevraždnými geny a geny tlumícími neoangiogenezi. Produkty těchto genů by představovaly jakési bezpečnostní pojistky.

Mezi novinkami poslední doby je použití buněčných vakcín, které byly infikovány nepatogenními onkolytickými viry. Předpokládá se, že prezentace slabých nádorových antigenů ve spojení se silnými virovými antigeny zesílí stimulaci imunitního systému. Nedávno se též podařilo v experimentálním systému navodit protinádorovou imunitu vakcínou odvozenou z endoteliálních buněk, nejspíš proto, že částečně dediferencované endoteliální buňky obsahují antigeny sdílené s rychle proliferujícími endoteliemi rostoucího nádoru. V blízké budoucnosti se ukáže, zda tento objev má průlomový význam, či zda zůstane jen zajímavým pozorováním. (17, 18, 19)

## **5. 6. Rizika spojená s genovou terapií zhoubných nádorů**

Přestože rizika spojená s GT zhoubných nádorů představují méně závažný problém než u jiných chorob, nejsou zcela nepřehlédnutelná. Každá jednotlivá klinická studie musí být bedlivě posouzena jak z hlediska možné účinnosti, tak z hlediska bezpečnosti, a to nejen pacienta, ale i jeho okolí. Musí být v soulase s platnými zákony a musí odpovídat nejnovějším poznatkům lékařské vědy. Tak, jak je tomu v zemích, v nichž se při zavádění GT pokročilo dále než u nás, je nutné mít důkladně propracované systémy kontroly přípravy preparátů a jejich kvality a

jasná pravidla pro schvalování navrhovaných studií a pro způsob dozoru nad probíhajícími klinickými studiemi. Hlavní zásady je možné shrnout do šesti bodů:

- 1) Preparát musí být připraven podle tzv. Správné výrobní praxe.
- 2) Pacient, který má podstoupit léčbu, musí být dokonale a poctivě informován jak o přínosech léčby, tak i o jejích možných rizicích. Způsob informování musí respektovat inteligenci a vzdělání pacienta.
- 3) Každá studie se musí řídit pravidly Správné klinické praxe a neměla by být prováděna skupinami, které nemají rozsáhlé zkušenosti s prověřováním nových léků.
- 4) Dozorčí orgány příslušné instituce musí zajistit trvalý dohled nad průběhem studie.
- 5) Zvláštní pozornost se musí věnovat hodnocení výsledků. Každá studie by měla být dvojité slepá.
- 6) Rizika spojená s léčbou by měla být pečlivě zvažována zvláště tam, kde existuje spolehlivá alternativní léčba.

Přes veškeré pokroky, k nimž došlo v posledních letech, a přes skvělé úspěchy dosažené v mnoha preklinických systémech, představuje GT nádorů obtížný problém. Většina těch, kteří se snaží využít metodologie GT k léčbě nádorů, se shoduje na tom, že její další rozvoj bude záviset nejen na vývoji nových, účinnějších a bezpečnějších vektorů, ale především na hlubším poznání biologie nádorů a na objasnění imunologických, ale i dalších reakcí organismu na zhoubné bujení. Teprve pak se vytvoří podmínky pro široké zavedení GT, kterou bude charakterizovat interdisciplinární přístup a těsná spolupráce mezi klinickými lékaři, imunology, virology a molekulárními genetiky. (17)

## **6. Současné problémy genové terapie a situace v ČR**

V současné době se GT potýká s mnoha problémy, ale málokdo pochybuje, že její vstup do humánní medicíny je neodvratný a že v nejbližších letech změní zásadním způsobem léčbu mnoha lidských nemocí.

Současné problémy genové terapie můžeme rozdělit do 3 kategorií:

- 1) technické
- 2) metodické
- 3) etické

### **6. 1. Problémy technické**

Týkají se především přenašečů genetického materiálu, tzv. vektorů, které jsou zatím nejčastěji virového původu. Ty musí splňovat nemálo požadavků týkajících se zejména účinnosti a bezpečnosti. Vektory, které by je všechny beze zbytku splňovaly, nejsou zatím k dispozici.

### **6. 2. Problémy metodické**

Spočívají v hledání optimálních strategií pro dosažení žádaného účinku. Vhodnost strategie nepochybně závisí na typu nemoci, na jejím klinickém průběhu, ale i na mnoha dalších okolnostech. Tak, jak se hromadí další poznatky, jednotlivé postupy se upravují a přehodnocují.

### **6. 3. Problémy etické**

Rizika GT jsou nepřehlédnutelná. Každý návrh klinické studie musí být posouzen z hlediska platných zákonů a musí být ve shodě s nejnovějšími poznatky vědy. Pacient musí být poučen jak o možných přínosech tak i rizicích. Ta by měla být pečlivě zvažována především tam, kde existuje účinná alternativní léčba. (20)

## 6. 4. Současná situace v České republice

Přestože v Česku existuje řada výzkumných skupin, které pracují v oborech genetiky, imunologie, virologie a onkologie na vysoké úrovni a na experimentálních modelech dosahují mezinárodně uznávaných výsledků v oblasti GT, současné postavení GT v ČR nelze považovat za uspokojivé. Ani jedna z několika set klinických studií, které v současné době probíhají, se nekoná v ČR. Nepříznivá situace má několik důvodů, které navzájem těsně souvisí. Jsou to:

- 1) Až donedávna velmi malý zájem našich kliniků.
- 2) Chybění legislativy, která by stanovila pravidla pro klinické studie GT.
- 3) Neexistence pracoviště, které by bylo s to připravit experimentální biopreparáty podle Správné výrobní praxe.
- 4) Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) nedisponuje skupinou , která by mohla kvalifikovaně kontrolovat nové přípravky.
- 5) Nízká informovanost naší veřejnosti o GT. V důsledku toho chybí společenský tlak na zavádění a prověřování GT.

Přes velké úsilí několika institucí a jednotlivců se doposud nepodařilo vytvořit u nás zákonné podmínky, v jejichž rámci by se naši badatelé v oblasti GT mohli přidat k předním hlídkám lékařské vědy. Těžko pochopitelná těžkopádnost při zavádění příslušné legislativy brání i tomu, aby se česká klinická pracoviště mohla účastnit mezinárodních multicentrických studií, což nás řadí někam na samý konec členských států EU. Účast v takových projektech by umožnila získávat zkušenosti ještě předtím, než u nás vzniknou specializovaná pracoviště, která by mohla preparáty pro GT vyrábět a kvalifikovaně je kontrolovat. (17, 20)

## 7. Diskuze

Pod pojmem GT můžeme zahrnout všechny postupy, které využívají přenosu genetického materiálu do buněk pacienta k léčebným účelům. Metodologie GT je uplatnitelná tam, kde je známa molekulární podstata nemoci. Vzhledem k tomu, že poznatků o patogenezi chorobných stavů na molekulární úrovni přibývá, rozšiřuje se i okruh indikací pro GT. (20)

Z výsledků základního výzkumu je zřejmý obrovský potenciál skrytý v možnostech ovlivnění genetické informace genovou manipulací, avšak na druhé straně je třeba uvědomovat si i řadu problémů, které GT přinesla a stále ještě přináší.

První velká prohra potkala GT na podzim roku 1999, když na kliniku při University of Pensilvania nastoupil osmnáctiletý mladík Jesse Gelsinger. Spolu s dalšími 11 dobrovolníky se zúčastnil testu, při němž měla být prověřena bezpečnost viru, upraveného pro potřeby GT.

Pacient trpěl částečným vrozeným deficitem ornithinové transkarbamylázy (OTC), při němž je narušen močovinový cyklus a metabolismus dusíku, a který je příčinou vzniku onemocnění charakterizovaného řadou neurologických příznaků včetně záchvatů, a mentální retardací. Substituční léčba je možná, ale mortalita je vysoká.

Gelsingerovi bylo v souladu se schváleným protokolem aplikováno  $6 \times 10^{11}$  adenovirových částic s OTC genem. Bylo to vzhledem k tělesné hmotnosti pacienta maximální množství, až dosud považované za bezpečné, ale vyšší, než u ostatních pacientů. Důvodem bylo, že pacient sice měl při příjmu hladinu čpavku v krvi v mezích pro studii stanovených, ale krátce před aplikací OTC genu se hladina zvýšila a musela být další léčbou upravována. Vzhledem k tomu bylo rozhodnuto aplikovat i mimořádně vysokou dávku adenovirového vektoru a genu. Stav pacienta se prudce zhoršil druhý den po aplikaci, takže bylo nutné ho přeložit na JIP. Přes dodatečná léčebná opatření pacient další den upadl do komatu. Rozvinul se syndrom akutní respirační tísně a o dva dny později pacient zemřel na multiorgánové selhání způsobené anoxií.

Postmortem vyšetření přineslo několik překvapujících nálezů. Průkaz cytokinů potvrdil, že adenovirus vyvolal syndrom systémové zánětlivé reakce.

Žádný dřívější pokus na zvířeti nic takového nezjistil, stejně jako nikdy dříve nedošlo k postižení plic virem. Dále - ačkoli byl virus aplikován do jedné z jaterních cév a měl zůstat v jaterní tkáni, byl nalezen i v ostatních orgánech. Konečně, bylo zjištěno téměř úplné vymizení erytroidních prekurzorových buněk z kostní dřeně, pro které také chybí vysvětlení.

Tento případ je považován za velké varování v několika směrech. Především, adenoviry jsou sice už řadu let používány jako vektor pro vpravení nového genu do organismu pacienta, ale zjevně nejsou optimální. Ve snaze dostat do organismu pacienta co nejvíce správného genu jednotliví výzkumníci počet virových částic neustále zvětšují. Přitom chybí standardní metody spolehlivě měřící množství viru v organismu, takže údaje různých pracovišť o „bezpečných“ a „toxických“ dávkách nejsou dobře srovnatelné. Nejsou ani dost přesné metody zjišťování exprese genu v buňkách a tkáních léčeného organismu.

Je také známo, že exprese nového genu adenovirem je jen dočasná, ale deficit OTC vyžaduje nápravu OTC genu na celý život pacienta. Byly by proto pravděpodobně nezbytné opakovat aplikace adenoviru, po nichž by ovšem došlo k imunitní reakci a inaktivaci viru. Adenovirus se proto v daném případě nejeví jako nejvhodnější.

Vůbec nejsložitější otázkou diskuse o celém případě se ukázal být problém utajování, resp. veřejného hlášení závažných komplikací genové léčby. Americký poradní výbor pro rekombinantní DNA techniky, který odpovídá za informovanost veřejnosti o genové terapii, i jiné veřejné instituce vyžadují naprostou otevřenost informací. Avšak klinická pracoviště, vázaná v genových technikách na různé firmy, jsou opatrná, protože se bojí zveřejnění detailů léčebného protokolu, které by mohla využít konkurence.

Tragédie Jesseho Gelsingera zasadila GT těžký úder v době, kdy toto rodící se odvětví medicíny beztak začínalo skomírat na finanční úbytě. Slibný počín vyléčení Ashanti daSilvaové a několika dalších podobně postižených dětí nenásledovaly další úspěchy. Velké farmaceutické koncerny začaly obracet doslova každý dolar, který měly na vývoj GT vynaložit. Skrz prsty se na léčbu genem začala dívat i veřejnost.

Vykročila GT za rámec obvyklý pro nově se rozvíjející medicínské obory? Není to daň za zavádění nových metod? Kolik pacientů zpočátku přežilo transplantaci srdce? Transplantace srdce měly na počátku velmi nízkou účinnost a

pacienti umírali záhy po operaci. Veřejnost přesto neztrácela naději a transplantační chirurgové se těšili obecné důvěře. Proč stejný osud nepotkal i GT? Důvodů je hned několik. Transplantaci srdce si každý dokáže celkem dobře představit. Pro mnoho lidí z laické veřejnosti je to jen analogie opravy auta nebo jiného stroje, kdy se porouchaná součástka vymění za novou. Genetika, genové inženýrství a GT jsou na představu o poznání náročnější. Důvěra v to, co si lidé neumí představit se získává jen obtížně. K malé důvěře v GT přispěli i samotní lékaři. Transplantační chirurgové byli ve slibech veřejnosti opatrní. Zastánci GT sliby naopak nešetřili a vzbudili tak v laické veřejnosti obrovská očekávání. První neúspěchy GT pak logicky vyvolaly u veřejnosti těžkou deziluzi. (4)

Již na začátku bakalářské práce bylo řečeno, že aktuálně existují dva typy GT: somatická a zárodečná GT. Zárodečná GT je předmětem obav a diskuzí, zda vůbec představuje etický přístup k léčbě dědičných poruch. Je třeba zdůraznit, že terapie zárodečné dráhy není lékařským ošetřením pacienta, nýbrž genetickou manipulací embryonálních buněk po umělém oplození, které má za cíl zrození člověka prostého genetického onemocnění. Rozdílem oproti somatické GT je to, že následkem je změna genetické výbavy, která se přenáší na všechny další embryonální buňky. Bude-li se tedy nositel takové změny jednoho dne rozmnožovat, budou tyto změny děděny i do další generace. (21)

Musíme rozlišovat dvě různé věci - GT a genové vylepšení. Faktem je, že hranice mezi nimi není tak ostrá, jak by se mohlo na první pohled zdát. Jaroslav Petr ve svém článku v časopisu 21. století: Stane se z vylepšených lidí nadřazená kasta, píše, že ač to zní možná trochu děsivě, všichni už jsme dávno vylepšení. Jeden příklad za všechny. Za normálních okolností platí, že člověk po nákaze bacilem tetanu vážně onemocní. I v zemích s rozvinutou lékařskou pomocí mu hrozí v 30% případů smrt v křečích, při kterých praskají kosti v těle. Tak vypadá „norma“. Očkování proti tetanu nás před chorobou chrání a posouvá nás tak výrazně za hranice „normy“. Nemůže být sporu o tom, že očkování představuje významné „vylepšení“ člověka, přesto se je žádný, zdravě uvažující člověk nechystá zavrhnout. (4)

Očkování je záležitost zásahu do imunitního systému. Proč nedosáhnout stejného cíle i zásahem do lidské dědičné informace? Skutečně by byl hřích, získat takto odolnost k AIDS, zhoubnému melanomu nebo rakovině tlustého střeva?



Z řad odborné i laické veřejnosti se ozývají námitky a otázky: Budou vůbec takové extrémně náročné medicínské postupy dostupné široké veřejnosti? Budou jimi moci lékaři pomáhat všem? A pokud tomu tak není, měly by vlády do takového typu výzkumu i nadále investovat veřejné peníze, když by pak jeho výsledky sloužily pouze úzkému okruhu nejbohatších pacientů? Odpovědi se dnes hledají jen těžko. Nikdo si netroufá odhadovat, jaké budou ceny této léčby. Navíc u každého převratného objevu je obvyklé, že se do praxe zavádí postupně v závislosti na cenové dostupnosti. Přesto debaty na toto téma mezi experty probíhají už dnes a nemálo jich soudí, že tento druh medicíny bude mít dvě odnože.

Jedna její část, s jejíž pomocí budou lékaři bojovat proti dědičným či devastujícím chorobám, se podle jejich mínění stane běžnou součástí moderní medicíny, podobně jako je tomu dnes u transplantací, zatímco druhá - zaměřená na vylepšování dědičné informace - bude výsadou movitých, podobně jako dnes plastická a kosmetická chirurgie.

A právě tyto vyhlídky nenechávají část vědců chladnými. Kupříkladu Lee Silver, profesor molekulární biologie na Princetonské univerzitě, ve svém bestselleru *Remaking Eden* (Znovuvytváření ráje) varuje před „genetickým rozdělením lidstva“. Elita, která bude mít prostředky na to, aby si zaplatila „genovou plastiku“, se totiž podle Silverových odhadů stane společensky i ekonomicky úspěšnější, a získá tím pádem dostatek prostředků na další a další vylepšování svého genetického profilu. Naopak pro chudší, „nevylepšené“ vrstvy populace se vyšší příčky společenského žebříčku začnou rychle uzavírat a společnost se rozštěpí. (22)

Na závěr je třeba několik slov o GT v České republice. Bylo již řečeno, že situace v ČR je neuspokojivá a že ani jedna z několika set klinických studií, které se zabývají využitím GT neprobíhá u nás. V ČR je potřeba vytvořit podmínky pro rozšíření výzkumu GT a pro zahájení klinických studií využívajících GT, čímž by se naše republika přiřadila k nejvyspělejší zemím při zavádění nových biotechnologií.

V ČR byla 25. června 2002 založena Odborná společnost pro genovou terapii České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Tato společnost sdružuje lékaře, vědce a ostatní pracovníky jak ve zdravotnictví, tak příbuzných oborech, kteří se o problematiku GT zajímají. Náplní činností je podpora vědecko-výzkumné práce,

vytvoření podmínek pro zahájení klinických studií a pomoc při vytváření legislativy, která klinické studie umožní, podpora snah o vybudování moderních pracovišť pro přípravu vhodných preparátů podle Správné výrobní praxe a jejich kontrolu a informování lékařské i laické veřejnosti o možnostech a problémech této bouřlivě se rozvíjející oblasti medicíny. (23)

Předseda výboru Společnosti pro GT, Prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc. vytvořil soubor opatření, který by mohl vést k rozvoji GT v ČR. Soubor by se dal shrnout do několika bodů:

#### 1) Vědecko - výzkumný program

Vzhledem k současnému stavu rozpracovanosti by se mělo dostat priority vývoji terapeutických genetických protinádorových vakcín, kde je naděje na zahájení klinických zkoušek v horizontu několika let. Současně by měl být započat a podporován preklinický výzkum GT kardiovaskulárních a některých získaných metabolických chorob. Ale také by měla být podporována jakákoli kvalitně podložená iniciativa v dalších oblastech.

#### 2) Vytvoření právních norem pro GT

Je třeba v co nejkratší době vypracovat zákon, který umožní klinické využití GT v ČR. Podklady pro zákon by měla zajistit komise zřízená při 2. lékařské fakultě UK. Právní úprava regulace by měla vyjít z obdobných zákonů, které již byly přijaty v zemích EU.

#### 3) Vybudování moderního výrobního pracoviště

Je třeba vybudovat pracoviště, na kterém by bylo možné připravovat preparáty pro plánované klinické studie v oblasti GT podle Správné výrobní praxe. Vybudováním tohoto pracoviště by měla být pověřena 1. lékařská fakulta UK za finanční spoluúčasti MZ ČR a AV ČR, event. i farmaceutických firem.

#### 4) Vytvoření pracoviště biologické kontroly

V rámci SÚKL je třeba vytvořit pracovní skupinu, která by kvalifikovaně, tj. v souladu s nejnovějšími poznatky biomedicíny, kontrolovala preparáty pro klinické zkoušky.

##### 5) Výuka a informace veřejnosti

Problematika GT by měla být zařazena do výuky na lékařských, přírodovědeckých, farmaceutických a veterinárních fakultách. O existenci, přínosech i rizicích GT je třeba informovat i veřejnost a informační akce by měly být organizovány tak, aby přilákaly pozornost co největší část populace. (20)

## 8. Závěr

V celosvětovém měřítku bylo dosud povoleno několik set protokolů pro klinické použití GT jednotlivých typů onemocnění, řada dalších je v jednání. Z nich jsou zhruba dvě třetiny zaměřeny na léčbu rakoviny, zbývající se týkají monogenně podmíněných dědičných chorob. Asi v 75% projektů se využívá virových vektorů. (1)

GT vychází z teoreticky odůvodněných a experimentálně ověřených předpokladů. Přestože bylo v oblasti léčby genem dosaženo značných úspěchů, vyvolává GT rozporuplné reakce u laické, ale i u části odborné veřejnosti. Myslím si, že GT skýtá velkou naději na účinnou léčbu mnoha chorob, které současnými prostředky nelze zvládat vůbec, anebo jen s málo uspokojivými výsledky. Do té doby, než najde GT své pevné místo v klinické medicíně, bude ale zapotřebí překonat ještě řadu technických problémů - zejména zlepšit způsoby dopravování terapeutických molekul do cílových míst. Poukazuje se i na možnost zneužití postupů GT k cílenému ovlivňování genotypu lidí. Je tedy třeba najít odpovědi na etické otázky, které nejsou doposud jednoznačně vyřešeny.

## 9. Použitá literatura a internetové zdroje

1. S. Rosypal a kol.: Úvod do molekulární biologie, díl IV., Brno 2002, s. 1153 - 1172
2. O. Nečas a kol.: Obecná biologie pro lékařské fakulty. H&H, 2000, s. 435 - 437
3. <http://www.dobromysl.cz/scripts/detail.asp?id=776>, 2. 2. 2006, 20:05
4. Časopis 21. století speciál: Nové zázraky ve světě moderní medicíny, číslo 2/2005, str. 34 - 42
5. [http://www.linkos.cz/vzdelavani/1\\_04/02.pdf](http://www.linkos.cz/vzdelavani/1_04/02.pdf), 2. 2. 2006, 19:50
6. [http://www.sanquis.cz/clanek.php?id\\_clanek=484](http://www.sanquis.cz/clanek.php?id_clanek=484), 5. 3. 2006, 16:40
7. <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0602/med0623.html>, 7. 4. 2006, 14:20
8. <http://zpravy.centrum.cz/domov/clanek.phtml?id=346058>, 2. 2. 2006, 21:30
9. <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=1212>, 5. 4. 2006, 9:30
10. <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=198>, 17.3. 2006, 10:55
11. <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=1120>, 22 .4. 2006, 22:50
12. <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=1250>, 15.3. 2006, 23:10
13. [http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s\\_id=3465](http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=3465), 2. 2. 2006, 20:35
14. <http://blaznivamarketa.com/default.htm?stranka=clanek&clanekID=24204&date=2006-04-17>, 15. 3. 2006, 21:20
15. <http://www.coretvasa.cz/pp/obsah/moreinfo?maid=2811&idm=615>, 2. 2. 2006, 20:50
16. <http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=729>, 5. 4. 2006, 8:50
17. [http://www.sanquis.cz/clanek.php?id\\_clanek=484](http://www.sanquis.cz/clanek.php?id_clanek=484), 5. 4. 2006, 8:15
18. [http://www.koc.cz/pro\\_verejnost/lecba-ostatni-moznosti.html](http://www.koc.cz/pro_verejnost/lecba-ostatni-moznosti.html), 17. 3. 2006, 8:20
19. [http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0800/med0800\\_9.html](http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0800/med0800_9.html), 8. 2. 2006, 7:50
20. [http://www.biotrin.cz/czpages/p\\_g\\_t.htm](http://www.biotrin.cz/czpages/p_g_t.htm), 27. 1. 2006, 15:25
21. <http://prolife.cz/genetika/?id=236>, 7. 4. 2006, 15:50
22. <http://www.cs-magazin.com/2004-11/view.php?article=articles/cs041144.htm>, 7. 4. 2006, 14:50
23. <http://www.cls.cz/spolecnosti/csgct/profil.htm>, 7. 4. 2006, 15:10