

# Genska zdravila

## Gene-based medicines

Irena Mlinarič-Raščan

**Povzetek:** Genska zdravila so terapevtiki, ki vsebujejo rekombinanten genski material v obliki fragmentov nukleinskih kislin in se uporabljajo za nadomestitev genskega produkta ali za izničenje njegove funkcije. Prednost terapije z genskimi zdravili je v vzročnem pristopu k zdravljenju, pri katerem odpravljamo molekularno motnjo z dodajanjem ali odvzemanjem funkcije ciljnemu genu. Najšibkejša točka pri razvoju genskih zdravil je neuspešen transportni sistem, kar je vzrok slabemu ciljanju, toksičnosti in kratkotrajnosti terapije ter pojavu imunskih reakcij. Začetki razvoja genske terapije so bili usmerjeni predvsem v nadomestno terapijo monogenskih dednih bolezni, medtem ko je večina novih genskih zdravil namenjena zdravljenju kompleksnih obolenj kot so rak, imunska obolenja in nevrodegenerativne bolezni. Genska regulacije delovanja celic pri starostnikih je usmerjena predvsem v dvig kvalitete življenja. V skrbi za zdravje starostnikov vzbuja posebno veliko pozornosti genska terapija Alzheimerjeve bolezni.

**Ključne besede:** genska zdravila, Alzheimerjeva bolezen

**Abstract:** Gene-based medicines are therapeutic modalities of recombinant nucleic acids capable of interfering with gene function either by replacing its function or by silencing it. The main advantage of gene-based medicines is in targeting a molecular defect of treated pathogenesis. Current methods of gene delivery are still inadequate for successful applications and high efficiencies, causing unwanted toxicity and immune reactions. Genetic disorders that arise from mutations in a single gene are the best candidates for gene therapy. Despite this, recent developments of gene therapy are largely focused on treatment of complex disorders with combined effects of variations in many genes such as cancer, immune dysfunctions and neurodegenerative disorders. Modulation of gene function in geriatric population is intended to improve the quality of life of older persons. Gene therapy of Alzheimer's disease attracts a vast interest of researchers as well as geriatric population.

**Key words:** Gene therapy, Alzheimer's disease

### 1 Uvod

Izraz genska zdravila uporabljamo za terapevtike, ki vsebujejo genski material, kot so fragmenti nukleinskih kislin DNA ali RNA. Uporabljajo se za nadomestitev manjkajočega oziroma defektnega genskega produkta ali interferirajo z njegovim izražanjem. Začetki genske terapije segajo v leto 1990, ko je bila v ZDA odobrena prva klinična študija, in sicer za zdravljenje hude kombinirane imunske pomanjkljivosti (angl. severe combined immunodeficiency-SCID), vzrok katere je mutacija v genu za adenozin deaminazo. V celične kulture limfocitov T so z retovirusnim vektorjem vnesli zdrav gen za adenozin deaminazo (1). Pozneje so bile odobrene in izvajane še klinične študije v Milanu, Parizu in Londonu, ki so se uspešno zaključile za 17 pacientov, pri katerih je prišlo do rekonstrukcije imunskega sistema (2). Sicer uspešen razvoj genskega zdravljenja je leta 2003 zaustavilo nepričakovano poročilo o resnih stranskih učinkih genskega zdravljenja, ki so se pojavili pri pacientih s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo, vezano na X kromosom (X-SCID). Tri leta po sicer uspešnem genskem prenosu in rekonstrukciji imunskega sistema so se pri treh od skupno 15 pacientov pojavili znaki levkemije, kar je bila posledica integracije retrovirusnega vektorja v protoonkogen LMO 2 (3, 4). Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and drug administration, FDA) je po tem poročilu zaustavila 27 kliničnih poizkusov, pri katerih so uporabljali retrovirusne vektorje, kar je razvoj genske terapije zelo zavrla (5).

Začetki razvoja genske terapije so bili usmerjeni predvsem v nadomestno terapijo dednih obolenj, torej v dostavo zdravih genov v

izbrane celice ali tkiva, medtem ko je večina novih genskih zdravil usmerjena v zdravljenje rakastih obolenj in predstavlja v letu 2004 kar 60 odstotkov vseh kliničnih poskusov na področju genskega zdravljenja. Razvoj genskih zdravil je po podatkih svetovnega telesa ameriškega inštituta za zdravje (National Institute of Health-NIH, Recombinant DNA Advisory Committee-RAC) v zadnjih petnajstih letih spremljalo okrog 900 kliničnih študij, od tega okrog 600 v ZDA (6).

### 2 Genska zdravila

Gensko terapijo ali vnos genskih zdravil v celico izvajamo z namenom spremeniti funkcijo v genomu zapisani informaciji in s tem poseči v dejanski vzrok bolezni, ki je lahko posledica pomanjkljivega izražanja genov ali tvorbe nefunkcionalnega proteina, kakor tudi prekomernega izražanja genov ali sinteze prekomerno aktiviranega proteina. Z gensko modulacijo tako v primeru pomanjkanja funkcije gena dodajamo želeni gen, ki bo proizvajal manjkajoči protein. V primeru prekomerne aktivnosti bomo gen utišali ali poskušali doseči razgradnjo njegovih produktov. Z genskim zdravljenjem posegamo v bolezenska stanja, kjer je vzrok genske deformacije znan. Najuspešnejše so terapije monogenskih dednih bolezni, kot je primer cistične fibroze, kombinirane dedne pomanjkljivosti (SCID), nevrodegenerativnih obolenj, diabetesa in drugih. Genska zdravila pa se uveljavljajo tudi pri zdravljenju kompleksnih poligenetskih disfunkcij kot so rak, starostne demence in imunske disfunkcije. Osnovni pogoj pri načrtovanju genskega zdravljenja je dobro razumevanje molekularnih osnov bolezni (7).

### 2. 1 Opredelitev tarčne molekule

Iskanje genske motnje nekega bolezenska stanja je do nedavnega temeljilo na družinski anamnezi in segregaciji bolezni, ki se je pojavljala v družini po ključu dedovanja. Prav tako je iskanje odgovornega gena omogočala predhodna citogenetska analiza, ki je opredelila kromosomske nepravilnosti in posledično identifikacijo gena. Sodobni pristopi iskanja tarčnih molekul vključujejo tehnologije visokih zmogljivosti, kot so DNA mikročipi, ki omogočajo presejanje celotnega genskega prepisa celice, torej nekakšen odtis genske aktivnosti stanja celic. Primerjava genskih prepisov zdravih in patoloških celic, takoimenovana analiza diferencialne ekspresije genov, prikaže razlike na molekularnem nivoju, kar vodi v identifikacijo osnovne genske motnje (8).

### 2. 2 Načrtovanje genskih zdravil

Razvoj genskega zdravila je možen, ko je znan tarčni gen, funkcija kodiranega proteina in njegova ekspresija v specifičnih celicah in tkivih. Centralna dogma molekularne biologije pravi, da se v genomu zapisana informacija izrazi s prepisom v informacijsko RNA (mRNA) in njenim prevajanjem v aminokislinsko zaporedje. Modulacija v genomu zapisane informacije je torej možna na vseh stopnjah od DNA preko mRNA do proteina. Genska zdravila oblikujemo z namenom, da moduliramo osnovno motnjo in hkrati zadovoljimo principom optimalne terapije.

**Genski transfer.** Potreba po dodajanju genske funkcije je izražena v primeru delecije gena ali pri korekciji mutiranega, nefunkcionalnega gena. Dodajanje genske funkcije se uporablja tudi pri vnosu t.i. ubijalskih genov, ki s svojo ekspresijo povzročijo smrt celice, kar izkoriščamo pri genski terapiji raka. Naslednji primer je dodajanje *de novo* funkcije, kot je primer vnosa genskih zapisov encimov za aktivacijo predzdravil. Primer predstavlja citozin deaminaza, ki katalizira pretvorbo predzdravila v toksični 5-fluorouracil. Vnos in prepis celotnega gena je problematičen predvsem pri velikih genih, kot je primer pri genu za distrofin, katerega mRNA je dolga 14 kb in predstavlja resno oviro za uspešno gensko terapijo pri pacientih z Dushenovo mišično distrofijo (9).

**Delecija genske funkcije.** Oblikovanje genskih zdravil je možno tudi za utišanje genske funkcije ali izbris njegovega prepisa. Funkcijo prekomerno izraženega gena lahko moduliramo z dodatnim izražanjem mutirane kopije gena. Produkt mutiranega gena deluje po principu **dominanto negativne funkcije** (10). Najpogosteje se za utišanje genske funkcije uporabljajo **oligonukleotidna zdravila**. Tehnologija temelji na hibridizaciji komplementarnih fragmentov nukleinskih kislin, DNA in ali RNA. **Protismiselni oligonukleotidi** so oblikovni komplementarni fragmenti ciljanega gena ali mRNA. Z vezavo na mRNA se tvori kompleks dvoverižne RNA, ki ga specifično prepoznajo RNaze in razgradijo. Pri uporabi **alkilirajočih oligonukleotidov** ciljamo dvoverižno DNA, ki se zaradi posledičnega zamreženja ne prepisuje v RNA. **Interferirajoče RNA sekvence** predstavljajo najnovejše tipe genskih zdravil. Dvoverižna RNA (kratka, interferirajoča, siRNA) se veže v encimski kompleks, ki jo denaturira in ji omogoči vezavo na komplementarno mesto na tarčni mRNA, ki ga prepoznajo in razrežejo RNaze (11).

### 2. 3 Dostavni sistemi

DNA je relativno obstojna molekula, ki tudi prosto prehaja v celice in iz njih. Uspešnost terapije je odvisna od doseganja kriterijev kot so; (a) zahtevana učinkovita doza apliciranega genskega zdravila, (b) ciljan

vnos v celico in /ali v jedro, (c) ustreznost integracija v genom in (d) čas izražanja vnesenega gena. Uspešna genska terapija mora biti celično in tkivno specifična, kar zahteva načrtovanje ciljnega dostavljanja. Izbira dostavnega sistema poteka sočasno z oblikovanjem genskega fragmenta in je pogojena z naravo genske motnje ter specifikom celice, v katero želimo vnesti zdravilo. S tehnologijo rekombinantne DNA vnesemo genske fragmente v ustrezen vektor, ki bo omogočil uspešen vnos dednega materiala v celico oziroma njeno jedro (12).

#### 2.3.1 Nevirusni vektorji

Najenostavnejša metoda aplikacije bi bila seveda **aplikacija gole DNA**, vendar njen prehod v večino celic in tkiv ni enostaven. Mišične celice sicer lahko sprejmejo DNA, ko je elektroporirana ali injicirana v procesu obstreljevanja celice z DNA.

**Uporaba kationskih liposomov** omogoča prenos linearne in plazmidne DNA ter RNA. Liposome lahko apliciramo tudi *in vivo* (i.v. ali v tkivo). Liposomi, ki vsebujejo terapevtsko DNA, so sposobni preiti plazemsko membrano tarčne celice. Vnos terapevtske DNA lahko dosežemo tudi s kemično vezavo DNA na molekulo, ki se veže na specifične celične receptorje, nato pa se ovije s plazemsko membrano tarčne celice in prehaja v notranjost.

Liposomi, prekriti s polimeri polietilen glikola (PEG), se uporabljajo tudi za prenos genov v možgane, saj so virusni vektorji preveliki za prehod hematoencefalne bariere (13). Najnovejše raziskave dostavnih sistemov, ki prihajajo iz Univerze Case Western Reserve in Copernicus Therapeutics (Ohio, Cleveland), vključujejo izdelavo tako imenovanih nano-liposomov premera 25 nm, ki lahko prenašajo terapevtsko DNA tudi skozi pore jedrne membrane (14).

#### 2.3.2 Virusni vektorji

Za vnos genskih zdravil v celice se poslužujemo virusnih vektorjev, ki so primerno modulirani, in izkoriščamo le njihovo sposobnost prodiranja v celico in vnosa genskega materiala (12). **Retrovirusni vektorji** se uporabljajo najpogosteje. Gre za RNA viruse, ki lahko okužijo le celice, ki se hitro razmnožujejo, preneseno genetsko informacijo preprišejo v DNA, ki se nato integrira v gostiteljski genom. Retrovirusne vektorje uporabljamo pri *ex vivo* modulacijah celic z zadovoljivo proliferacijsko sposobnostjo. Ne moremo jih uporabljati pri živčnih, mišičnih, jetrnih ali pljučnih celicah. Slaba stran retrovirusne terapije je v slabi integraciji v genomsko DNA, saj se virusni vektor z DNA iz organizma odstrani že po kakem tednu. Bolj uspešno se uporabljajo spremenjeni **lentivirusi**, med katere spada tudi HIV, sicer tudi RNA virus. Prednost lentivirusnih vektorjev je boljša integracija v genom in zadovoljiva ekspresija vnesenega gena, ki ostane stabilen do šest mesecev po vnosu, ter sposobnost infekcije celic, ki se ne delijo. Kot vektorji se uporabljajo tudi **adenovirusi**, ki so virusi z dvoverižno DNA. Sposobni so infekcije celic v mirovanju in med delitvijo ter se ne integrirajo v genom inficirane celice, pač pa se razmnožujejo ekstrakromosomsko. Prav tako se uporabljajo **adeno-pridruženi virusi z enoverižno DNA**, ki lahko vgradijo genetski material na točno določeno mesto na kromosom 19.

### 2.4 Selekcija ciljnih celic

Moralna in etična načela današnje družbe dovoljujejo spremembo genskega materiala somatskih celic, medtem ko je genska manipulacija človeških zarodnih celic etično vprašljiva.

Gensko zdravilo se v celico lahko vnese zunaj telesa, modificirana celica se nato transplantira nazaj v pacienta, ali pa se zdravilo aplicira in se terapija izvaja v telesu (12). **Ex vivo:** celice najprej odstranimo iz pacienta ali darovalca in jih vzgajamo v kulturi ter jih genetsko modificiramo *in vitro*. Selekcionirane in pomnožene celice nato vnesemo v pacienta, kjer delujejo kot biološka mikročrpalka za izločanje nekega proteina. **In situ:** Gensko zdravilo apliciramo lokalizirano v nek organ. **In vivo:** Gre za sistemski vnos genskega zdravila, ki kroži po organizmu, po možnosti pa se ciljno vsadi v zelene celice in direktno modificira gostiteljski genom. Prednosti *in vivo* genske terapije je predvsem v enostavnosti postopka, saj se vnos gena izvede z vbrizganjem vektorja v tarčni organ ali obtok. Med pomanjkljivosti pa sodijo nespecifičnost infekcije tarčnih celic, toksičnost in sprožitvev imunskega odziva. Prednosti *ex vivo* genskega vnosa so v možnosti selekcije izbranih celic, kar omogoča ciljno dostavo, možnost izvedbe testov integracije, nivoja ekspresije in imunokompatibilnosti. Nujen pogoj za izvedbo terapije je, da se celice delijo in jih lahko vzdržujemo v *in vitro* pogojih, kot npr. primarne fibroblaste, matične celice, tumorske celice, Schwannove celice ali endotelne celice.

## 3 Genska terapija pri Alzheimerjevi bolezni

### 3.1 Alzheimerjeva bolezen kot posledica prekomerne smrti nevronov

Staranje celice in posledično organizma lahko razlagamo s teorijo poškodbe celice, ki naj bi bila rezultat akumuliranih mutacij, pa tudi s teorijo programiranega staranja, torej genetske regulacije procesa staranja celice. Vsaka celica ima namreč kodiran program svoje smrti, njen propad je fiziološko reguliran proces, imenovan apoptoza. To je gensko reguliran proces, ki se sproži po vplivu dejavnikov iz okolja, dejansko pa gre za odgovor celice, ki ni več sposobna popravljati napak, ki jih povzroči neka poškodba. Z razumevanjem molekularnega delovanja celic in vzdrževanjem homeostaze med proliferacijo in apoptozo lahko posežemo v proces staranja, v najpreprostejši obliki s preprečevanjem faktorjev poškodb celice, kot so izogibanje ultravijoličnim žarkom ter s sodobnimi oblikami genske manipulacije (15).

Primer genske terapije, ki je še prav posebej aktualna v starostnem obdobju, je genska modulacija nevronske aktivnosti pri Alzheimerjevi bolezni, ki je najpogostejša nevrodegenerativna bolezen, in sicer prizadene v Sloveniji okrog 10.000 bolnikov, v ZDA pa naj bi bilo pacientov več kot 10 milijonov. Predstavlja vzrok skoraj 60% vseh starostnih demenc. Število bolnikov narašča predvsem zaradi staranja prebivalstva, saj bolezen večinoma prizadene starejše od 65 let, in sicer je incidenca v tej starostni skupini 5-10%. Bolezen je posledica izgube nevronov v subkortikalnih bazalnih segmentih, ki so pomembni za sintezo živčnih prenašalcev, kar se odraža v pomanjkanju acetilholina, noradrenalina in serotonina. Klinična slika bolezni, značilna prisotnost amiloidnih plakov in izguba sinaps pri Alzheimerjevi bolezni korelirajo z degeneracijo holineričnega sistema, ki namreč modulira aktivnost nevronov v tarčnih regijah in naj bi bil odgovoren za kognitivno sposobnost posameznika (16).

Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni je simptomatsko, lajša posledice bolezni in upočasni napredovanje znakov bolezni. Terapije, ki

poskušajo zmanjšati ali preprečiti disfunkcijo holineričnih nevronov, izboljšajo kognitivno funkcijo. Najpomembnejša zdravila spadajo v skupino zaviralcev acetilholinesteraze, ki povečujejo nivo acetilholina v možganih. Inhibitorji acetilholinesteraze imajo le skromen vpliv na ostale simptome, kot so nemir, depresija, motnje spanja. Razvoj novih terapevtikov je usmerjen v preprečevanje izgube nevronov, kar naj bi omogočilo dvig živčnih funkcij ali celo preprečilo izgubo celic. Veliko pozornosti se posveča raziskavam ravnih faktorjev živčnega sistema, za katere je znano, da povečujejo preživetje in ohranjajo funkcijo nevronov (17).

### 3.2 Vloga živčnega rastnega dejavnika

Živčni rastni dejavnik (angl. nerve growth factor – NGF) spada med nevrotrofične molekule, ki v razvojnem obdobju živčevja spodbujajo rast, diferenciacijo in preživetje razvijajočih se živčnih celic. V odraslem obdobju je NGF odgovoren za inhibicijo intrinzičnih mehanskih apoptoze. Na ta način prispeva k ohranjanju njihovega fenotipa in morfoloških značilnosti (18). Pomanjkanje trofične podpore povzroči apoptozo živčnih celic tako po poškodbi možganov (mehanske poškodbe, vnetje, virusne okužbe) kot tudi pri nevrodegenerativnih boleznih, odgovorno pa naj bi bilo tudi za starostno odmiranje živčnih celic. Prav zato so se v zadnjih letih raziskave usmerile v intenzivno proučevanje njihove potencialne terapevtske vloge pri zdravljenju nevrodegenerativnih obolenj in poškodb živčnega sistema. V centralnem živčnem sistemu so identificirali številne nevrotrofične molekule, ki jih glede na podobnost lahko razvrstimo v več družin. Najbolje preučena je družina »klasičnega neurofina«, ki združuje NGF, neurofin-3 in neurofin-4/5. NGF je prototip družine, izločajo ga nevroni hipokampusu in neokorteksa tekom celotnega življenjskega obdobja, veže se na specifične receptorje, ki so prisotni na holineričnih aksonskih končičih. Nato se retrogradno transportira do telesc holineričnih celic. NGF deluje tudi lokalno na aksonski končič, in sicer signalizira preko rTrkA in p75NTR receptorjev ter aktivira signalno pot preko tirozin kinaz. Nivo NGF proteina je pri Alzheimerjevih pacientih znižana v subkortikalnih nevronih, medtem ko je nivo ekspresije v korteksu in hipokampusu nespremenjen.

Pri delu na eksperimentalnih živalskih modelih so odkrili, da vodi dodajanje NGF v odrasle možgane do manjše izgube holineričnih celic in reverzno holinerično atrofijo pri staranju. Na osnovi takih raziskav se je porodila domneva, da bi bilo lahko dovajanje NGF potencialna terapija pri Alzheimerjevih bolnikih. Možen način modulacije izražanja subkortikalnih nevronov je genska terapija, s katero dosežemo lokaliziran, ciljan in omejen vnos NGF v možgane (19).

### 3.3 Genska terapija z ravnim faktorjem

Terapija z NGF naj bi predvsem doprinesla k regeneraciji subkortikalnih bazalnih holineričnih nevronov, kar predstavlja le delno regeneracijo nevronov. Za uspešno zdravljenje bo z vnosom več specifičnih ravnih faktorjev potrebno ciljati tudi druge populacije nevronov. Koncept genskega vnosa ravnih faktorjev je lahko pomemben tudi pri zdravljenju drugih nevrodegenerativnih boleznih, npr. Parkinsonove bolezni, Huntingtonove bolezni in amiotrofne lateralne skleroze (20).

Julija 2004 se je pričela izvajati 1. faza klinične študije genske terapije z živčnim ravnim faktorjem CERE-110 (21). Kot vektor se uporablja tip adeno-priduženega virusa. Namen prve faze študija je določiti

potrebno dozo, tolerabilnost in biološko aktivnost genskega zdravila oziroma učinkovitost in varnost genskega transferja. V 1. fazi klinične študije bo vključenih šest pacientov z milejšo obliko bolezni. CERE-110 je oznaka za zdravilo, ki ima rekombinanten NGF vključen v adeno-pridružen tip vektorja. Pacienti bodo podvrženi injiciranju genskega zdravila CERE-110 v regije možganov. Aplikacija zdravila je ciljana obojestransko v točno predpisan segment možganov. Predviden je vnos dveh doz zdravila, nato štiritedensko opazovanje. V primeru, da se bo zdravilo izkazalo za varno, bodo aplikacijo po treh mesecih ponovili. Opazovali bodo serijo varnostnih in nevrofizioloških parametrov. Glavno vprašanje je, ali bo NGF značilno zmanjšal upad kognitivnih funkcij in ali NGF poveča aktivnost preostalih holinergičnih nevronov v možganih zdravljenih pacientov.

### 4 Regulatorni postopki pri genski terapiji

Evropska agencija za zdravila (EMA, European Medical Agency) ima oblikovano telo strokovnjakov za gensko terapijo, ki izdaja priporočila na področju genske terapije. Sicer pa so v državah evropske unije dovoljenja za izvajanje kliničnih študij genske terapije v pristojnosti nacionalnih komisij za biomedicinsko etiko oziroma relevantnih ministrstev. Zakonodaja, interpretacija in dovezetnost za nove terapije se med posameznimi državami EU razlikujejo (22). V ZDA izvajata nadzor nad postopki genske terapije FDA in NIH oziroma njegovo svetovalno telo RAC, ki svetuje o primernosti postopkov genske terapije, vodi pa tudi javno dostopno bazo podatkov o kliničnih preskusih (23).

### 5 Zaključek

Razvoj genskih zdravil in terapevtskih postopkov je v razmahu, predvsem v letih po končanem sekveniranju humanega genoma, ko so postali znani številni novi geni in smo v fazi odkrivanja genskih osnov patologij. Tako razvoj tehnologije rekombinantne DNA in tehnologij visokih zmogljivosti kakor tudi poznavanje molekularnega ustroja celice omogočata uspešne in ciljane manipulacije genetskega materiala od genomske DNA do informativne RNA (mRNA). Kljub ogromnemu napredku znanja in razumevanja mehanizmov pa je uveljavitev genske terapije v klinični praksi še vedno v fazi kliničnih testiranj in pod ostrim nadzorom strokovnih in regulatornih oblasti. Kritike, da genska terapija ne izpolnjuje pričakovanega hitrega napredka, so dejansko opravičljive z velikim številom različnih kliničnih poskusov, ki se ukvarjajo z reševanjem kompleksnih genskih disfunkcij, kot so rakasta obolenja in neurodegenerativne motnje.

### 6 Literatura

1. Blaese RM, Culver KW, Anderson WF. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 331-337.
2. Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Efficacy of gene therapy for SCID is being confirmed. *Lancet* 2004; 364: 2155-2156.
3. Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy. *Nature* 2004; 427: 779-781.
4. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 507-509.

5. *Cellular & Gene Therapy*. (10. 3. 2005). US Food and Drug Administration. Pridobljeno 1. 4. 2005 s svetovnega spleta: .
6. Crofts C, Krimsky S. Emergence of a scientific and commercial research and development infrastructure for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 169-177.
7. Mueller RF. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 11<sup>th</sup> ed. Leeds: Churchill Livingstone, 2001.
8. Glenys T. Mapping of disease loci. V: Kalow W. *Pharmacogenomics*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001.
9. Romero NB, Braun S, Benveniste O et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 1065-1076.
10. Suto R, Tominaga K, Mizuguchi H et al. Dominant-Negative Mutant of C-Jun Gene Transfer: A Novel Therapeutic Strategy for Colorectal Cancer. *Gene Therapy* 2004; 11: 187-193.
11. Ill CR, Chiou HC. *Gene Therapy Progress and Prospects: Recent progress in transgene and RNAi expression cassettes*. *Gene Ther* 2005; 7: [pred objavo]
12. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J et al. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA110-121.
13. Huwyler J, Wu D, Pardridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14164-14169.
14. *Gene Therapy*. (19. 10. 2004). Human Genome Program. Pridobljeno 29. 4. 2005 s svetovnega spleta: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml).
15. Mlinarič-Raščan I. Molekularni mehanizmi programirane celične smrti. *Farm Vestn* 2000; 51: 295-299.
16. Humpel C, Weis C. Nerve growth factor and cholinergic CNS neurons studied in organotypic brain slices. Implication in Alzheimer's disease? *J Neural Transm Suppl* 2002; (62): 253-263.
17. The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 263-272.
18. Ullrich A, Gray A, Berman C et al. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 1983;303: 821-825.
19. Tuszynski MH, Sang H, Yoshida K et al. Recombinant human nerve growth factor infusions prevent cholinergic neuronal degeneration in the adult primate brain. *Ann Neurol* 1991; 30: 625-636.
20. Tuszynski MH, Sang H, Alksne J et al. Growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Neurosurg Focus* 2002; 13:1- 5.
21. CERE-110 in Subjects with Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *ClinicalTrials.gov*. (25. 5. 2005). US National Institutes of Health. Pridobljeno 29. 4. 2005.s svetovnega spleta: .
22. Report from the CHMP Gene Therapy Expert Group Meeting. (27. 10. 2004). EMA/CHMP/ 127803/2004.
23. NIH and FDA Launch New Human Gene Transfer Research Data System. *NIH News*. (26. 3. 2004). National Institutes of Health. Pridobljeno 1. 4. 2005 s svetovnega spleta: .