

# GENSKO ZDRAVLJENJE Z VIRUSNIMI VEKTORJI

## VIRAL VECTORS IN GENE THERAPY

AVTOR / AUTHOR:

Andreja Šink, mag. biotehnol.

*Odsek za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo*

*Kemijski inštitut*

*Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andreja.sink@ki.si

## 1 UVOD

Glavnina aktivnosti na področju razvoja genskega zdravljenja obsega iskanje novih poti za uvajanje genov v somatske (ali zarodne) celice z naslednjimi cilji: (i) popraviti motnjo v delovanju celice z uvedbo nadomestnega funkcionalnega gena, (ii) dodati novo popravilno funkcijo celici z uvedbo novega gena, (iii) ciljanje gostiteljevega genoma in popravilo zaporedja, ki povzroča bolezen, ter (iv) poseganje v mehanizme izražanja proteina, ki povzroča bolezen (1). V zadnjem desetletju je gensko zdravljenje postalo eno najbolj obetavnih in najhitreje razvijajočih se področij medicine. Ima velik potencial pri zdravljenju dednih genskih bolezni, nalezljivih bolezni ter pri zdravljenju raka (2).

Na področju genskega zdravljenja z virusnimi vektorji so dosegli velik napredek, čeprav je bilo v preteklosti opaziti tudi nekaj hušjih neželenih učinkov, ki so zahtevali nadaljnje

### POVZETEK

Gensko zdravljenje je v zadnjem desetletju postalo eno najbolj obetavnih in najhitreje razvijajočih se področij medicine. Po svetu izvajajo mnogo raziskav v povezavi z genskim zdravljenjem z virusnimi vektorji, najpogosteje z adenovirusnimi, adenoasociacijskimi, retrovirusnimi ali lentivirusnimi vektorji. Na trgu so trenutno odobrena štiri zdravljenja z virusnimi vektorji: dve zdravljeni genetskih bolezni (alipogentiparvovek in avtologne celice CD34+, transducirane z retrovirusnim vektorjem, ki vsebuje gen za človeško adenozin deaminazo) in dve zdravljeni z onkolitičnimi virusi (talimogenlaherparepvek in adenovirus z vstavljenim tumor supresorskim genom p53). Poleg tega je še precej genskih zdravljenj s pozitivnimi rezultati v zadnjih fazah kliničnih raziskav, s pridobljenim statusom prebojnega zdravila oz. zdravila sirote v EU in ZDA.

### KLJUČNE BESEDE:

alipogentiparvovek, gensko zdravljenje, onkolitični virus, virusni vektorji, voretigeneparvovek

### ABSTRACT

During the last few decades, gene therapy has become one of the most promising branches of medicine. There are many active clinical studies worldwide focusing on gene transfer by viral vectors. Mostly viruses such as adenovirus, adeno-associated virus, retrovirus or lentivirus are used. Currently, there are four approved gene therapies available on the market: two for the treatment of genetic diseases (alipogene tiparvovec and autologous CD34+ cells transduced with retroviral vector containing human adenosine deaminase gen) and two treatments with oncolytic viruses (talimogene laherparepvec and adenovirus containing tumor-suppressor gene p53). Moreover, many gene therapies with promising results are in final phases of clinical trials with breakthrough therapy and/or orphan product designations obtained in the EU and USA.

### KEY WORDS:

alipogene tiparvovec, gene therapy, oncolytic virus, viral vectors, voretigene neparvovec

raziskovanje v smeri večje učinkovitosti, izboljšanja biološke varnosti in premagovanja tehničnih omejitev. Trenutno najpogosteje uporabljeni virusni vektorji so adenovirusni (AV),

adenoasociacijski (AAV), retrovirusni in lentivirusni (LV) vektorji. Razvili so tudi druge vektorje, npr. vektorje na osnovi virusa vakcinije, ošpic, herpesa in bakulovirusa (2, 3).

## 2 VIRUSNI VEKTORJI IN NJIHOVA UPORABA

Nezaščitene nukleinske kisline (RNA ali DNA) v biološkem okolju niso stabilne dolgo časa. Poleg tega same po sebi niso zmožne prehajati preko membrane v citoplazmo ali jedro, zato največji izziv pri genskem zdravljenju predstavlja dostava terapevtskega gena v celico. Med najučinkovitejše dostavne sisteme v genskem zdravljenju spadajo virusni vektorji. Med evolucijo so virusi pridobili mnogo mehanizmov za vstop v celice, dolgotrajno shranjevanje svojega genetskega materiala znotraj celic in spreminjanje oz. zaviranje zaščitnih mehanizmov gostiteljskega organizma. Za večino virusov obstajajo rekombinantne različice, ki bi lahko bile uporabne kot dostavni sistemi v genskem zdravljenju, dejansko pa razvijajo le omejeno število virusnih vektorjev (2).

### 2.1 ADENOVIRUSI

#### 2.1.1 Značilnosti vektorjev

AV so bili med prvimi natančno raziskanimi virusi. Za uporabo v genskem zdravljenju so jih predlagali že pred 20 leti (4). So virusi brez ovojnice, genom pa sestavlja približno 35 kb dolga dvoverižna DNA. AV so za uporabo v genskem zdravljenju oslabil; prva generacija vektorjev vsebuje delekcijo gena E1, ki kodira dva virusna proteina E1A in E1B, pomembna za razmnoževanje virusa. Druga generacija vsebuje delekcijo večine zgodnjih genov, poznamo pa tudi seve z delekcijo vseh genov (»*gutless*« vektorji), ki za svoje delovanje potrebujejo še pomožni AV prve generacije (5). Delecija virusnih genov poleg večje varnosti zagotavlja tudi več prostora za vnos eksogene DNA. Tako so vektorji prve generacije zmožni privzeti do 5 kb tuje DNA, vektorji druge generacije do 14 kb in »*gutless*« vektorji do 36 kb. Genom AV se ne integrira v genom gostiteljske celice, zaradi česar veljajo AV za precej varne za uporabo, vendar pa virusni življenjski cikel ne omogoča izražanja transgena daljši čas. Slabost sistema je močno imunogena virusna kapsida, ki tudi pri oslabljenih virusih sproža imunski odziv. Uporaba AV je zato mogoča le, kjer je možna lokalna aplikacija in je imunski odziv zaželen (2).

#### 2.1.2 Uporaba

AV danes uporabljamo le za prehodno izražanje transgena, kar zadostuje za zdravljenje tumorjev s tumorskim cepivom ali za popraviljanje genoma, na primer z dostavo donorske DNA in različnih nukleaz (nukleaza cinkovih prstov (ZFN), efektorska nukleaza podobna transkripcijskim aktivatorjem (TALENs) in RNA-usmerjena nukleaza (RGN)) (3). V cepivih so prisotni virusni vektorji, ki se ne morejo razmnoževati. Antigen se izrazi na površini virusnega plašča ali pa se izrazi kot produkt transgena, vključenega v rekombinantni AV (6). Slabost tega sistema je možna prevlada imunskega odgovora proti virusnim epitopom, ki lahko tako zamaskirajo imunski odziv proti tarčnemu antigenu (7). To je najverjetneje tudi vzrok za neuspešno preizkušanje cepiva proti HIV na ljudeh, medtem ko je na primatih kazalo pozitivne učinke (8).

AV vektorji so uporabni tudi pri zdravljenju raka. Zdravljenje je možno z vnosom funkcionalnega tumor supresorskega gena p53, ki spodbuja celično apoptozo. V kliničnih študijah so po osmih tednih sočasnega zdravljenja z obsevanjem in injiciranjem rekombinantnih AV pri 64 % pacientov v pozni fazi razvoja tumorja dosegli popolno regresijo in pri 32 % pacientov delno regresijo skvamoznoceličnega karcinoma vratu in glave. Kitajski državni urad za hrano in zdravila (SFDA) je leta 2003 ta pristop priznal kot prvo komercialno dostopno gensko zdravljenje (9).

### 2.2 RETROVIRUSI IN LENTIVIRUSI

#### 2.2.1 Značilnosti vektorjev

Retrovirusi so RNA-virusi. RNA se med pomnoževanjem virusa prepíše nazaj v dvoverižno DNA, ki se integrira v genom gostiteljske celice. Pred razvojem sistema CRISPR-Cas so retrovirusi predstavljali edini učinkovit način za spreminjanje pacientovega genoma (2). Prve klinične raziskave za gensko zdravljenje z retrovirusi so se pričele v začetku 90. let prejšnjega stoletja in so bile namenjene zdravljenju monogenskih bolezni (10). Z retrovirusi gensko zdravljenje največkrat izvajamo *ex vivo*: krvne ali krvotvorne (matične) celice izoliramo iz pacienta, jih gensko spremenimo in nato injiciramo nazaj v telo (11, 12, 13, 14).  $\gamma$ -retrovirus in LV sta podskupini retrovirusov, ki ju največkrat uporabljamo v genskem zdravljenju. Neželena lastnost  $\gamma$ -retrovirusov je, da imajo preferenčno mesto integracije v gostiteljev genom. To pomeni, da je večja verjetnost integracije DNA v aktivno prepisovan genski lokus, kar lahko spremeni izražanje onkogene in tumor supresorskih genov. Neželene učinke genskega zdravljenja, povzročene z insercijsko mutagenozo, imenujemo genotoksičnost. S tega vidika so LV pri-



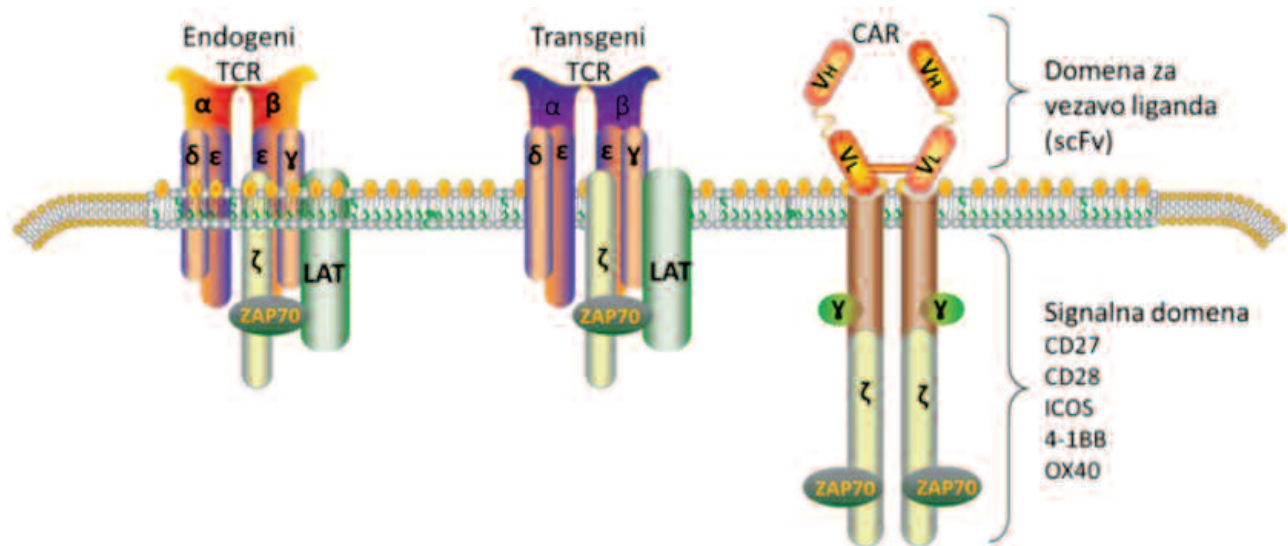
mernejši dostavni sistem, saj nimajo preferenčnega mesta integracije v genom blizu prepisovalnega mesta (15). Poleg tega imajo LV za gensko zdravljenje spremenjene dolge končne ponovitve (LTR) v regijah genoma U3 in U5, kar zmanjša genotoksičnost virusa. V postopku razvoja vektorja so regijo U3 zamenjali s citomegalovirusnim promotorjem, v regijo U5 pa so vstavili poliadenilacijsko mesto govejega gena za rastni hormon. Te spremembe po transdukciji povzročijo samoinaktivacijo virusa (virusu je onemogočeno razmnoževanje v gostiteljski celici, omejena pa je tudi možnost rekombinacije z virusi divjega tipa) (16).

### 2.2.2 Uporaba

Retroviruse in LV za prenos genov *ex vivo* uporabljamo na treh področjih: zdravljenje levkemije, limfomov in tumorjev, zdravljenje infektivnih bolezni ter zdravljenje primarne imunske pomanjkljivosti. Slednja je posledica redkih genetskih napak, od katerih jih do sedaj poznamo najmanj 176, ki vplivajo na delovanje imunskega sistema (17). Gensko zdravljenje razvijajo le za nekatere od njih: za beta talasemijo (zdravljenje z LV vektorjem, ki ima vstavljen gen za človeški beta-globin, je v letu 2015 pridobilo status prebojnega zdravila v ZDA), hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost s pomanjkanjem adenozin-deaminaze (ADA-SCID), na kromosom X vezano hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost, sindrom Wiskott-Aldrich, kronično granulomatozno bolezen, metakromatsko levkodistrofijo in adrenolevkodi-

strofijo (zdravljenje z LV vektorjem, ki kodira človeško ABCD1 cDNA, je trenutno v fazi II/III v kliničnih raziskavah in ima status zdravila sirote v EU in ZDA) (11, 12, 18, 19, 20, 21, 22). Maja 2016 so v EU odobrili prvo *ex vivo* gensko zdravljenje za zdravljenje ADA-SCID pri otrocih. Gre za izolirane celice CD34+, transducirane z modificiranim  $\gamma$ -retrovirusom, ki v celice vnese funkcionalni gen za adenozin-deaminazo. Pri skoraj vseh tretiranih otrocih kasnejše intervencije zaradi bolezni niso bile več potrebne (12).

Pristopi za zdravljenje raka temeljijo na spreminjanju celic T z genskim inženirstvom. V kliničnih raziskavah se pojavljata dva *ex vivo* pristopa (slika 1). V prvem pristopu gensko spremenjene celice T izražajo T-celične receptorje (TCR) z izpopolnjenimi lastnostmi, ki vodijo v povišano afiniteto do antigenov oziroma novo specifičnost teh celic. V drugem pristopu gensko spremenjene celice T izražajo himerne T-celične receptorje (CAR), ki so specifični za tumorske antigene. Ti receptorji so sestavljeni iz citoplazemskega dela T-celičnega receptorja (CD3 $\zeta$ ), transmembranske regije koreceptorja CD8 in ekstracelularnega enoverižnega fragmenta variabilnih regij protiteles (scFv), ki prepoznajo specifični antigen na površini rakavih celic. Po vezavi antigena na receptor se aktivira signalna pot, ki sproži sproščanje citotoksičnih snovi, ki pobijejo rakave celice (23). Trenutno sta najbolj obetavni dve klinični raziskavi v fazi II/III s celicami T, ki izražajo CAR: v prvem primeru so celice T spremenili z  $\gamma$ -retrovirusom in v drugem



Slika 1: Shematski prikaz celičnih receptorjev TCR in CAR T; prirejeno po (23).

Figure 1: Schematic representation of TCR and CAR T-cell receptors; adapted from (23).

primeru z LV (13, 14). Prva metoda je v EU in ZDA pridobila status prebojnega zdravila, medtem ko je druga pridobila status prebojnega zdravila v ZDA (24, 25). Čeprav obe obliki zdravljenja pri večjem deležu pacientov vodita v popolno remisijo limfoma, ostaja problem toksičnost spremenjenih celic T in pojav neželenih učinkov zdravljenja, kot sta nevrološka toksičnost in sindrom sproščanja citokinov. V *in vivo* raziskavah LV razvijajo za aplikacije pri zdravljenju mokre (neovaskularne) oblike starostne degeneracije rumene pege, Stargardtove bolezni in Usherjevega sindroma tipa 1B (14). Končana je tudi faza I/II klinične raziskave zdravljenja Parkinsonove bolezni *in vivo* z LV. Zdravilo se je izkazalo kot varno, brez hujših neželenih učinkov, pacienti z napredovalo Parkinsonovo boleznijo pa so kazali izboljšane motorične sposobnosti (26).

## 2.3 ADENOASOCIACIJSKI VIRUSI

### 2.3.1 Značilnosti vektorjev

AAV so majhni virusi brez ovojnice, z enoverižno DNA. V naravi lahko AAV okužijo človeka in ostanejo neaktivni v jedrih celic. Dosedanji rekombinantni virusni vektorji na podlagi AAV niso zmožni integracije v gostiteljski genom in torej nimajo genotoksičnega učinka (27). Njihova slabost je nezmožnost pomnoževanja, kar v delečih se celicah tekom delitev vodi v zmanjšanje ravni ekspresije transgena. Zato so najboljša izbira pri transfekciji počasi delečih se celic, npr. miocitov in kardiomiocitov (5). Plašč AAV je manj imunogen kot plašč adenovirusov, zato pri njihovi uporabi ni opaziti močnejšega sistemskega imunskega odziva. Zaradi enostavnosti načrtovanja, produkcije ter varnosti so postali AAV eni najbolj obetavnih sistemov za začasno izražanje genov v genskem zdravljenju (2).

### 2.3.2 Uporaba

Pri prenosu gena *ex vivo* so AAV vektorji precej neučinkoviti, vendar pa obetavni rezultati na različnih področjih zdravljenja dokazujejo, da so dovolj varni in učinkoviti za dostavo gena v *in vivo* razmerah. V preteklih dveh desetletjih so opravili več kliničnih raziskav genskega zdravljenja bolezni centralnega živčnega sistema, retinopatij, dednih bolezni jeter in metabolnih bolezni (28, 29, 30). Poleg tega lahko s pomočjo AAV v krvni obtok uvajamo sekretorne proteine (eritropoietin, rastni hormon in IL-10) in faktorje strjevanja krvi (faktor VIII in faktor IX) (31). Injiciranje heterolognega AAV vektorja v mišično tkivo pa uporabljamo za zdravljenje Beckerjeve in Duchennove mišične distrofije (32, 33). Omenjeni mišični distrofiji sta posledica mutacije na genu DMD, kar povzroči pomanjkanje distrofina v telesu. Zaradi ome-

jene kapacitete AAV vektorja vanj ni možno vstaviti celotnega gena za distrofin. To omejitev so premagali z večjo delečijo zaporedja v centralni domeni distrofina, po kateri protein še vedno ohrani aktivnost (33). V kliničnih raziskavah za zdravljenje Beckerjeve distrofije uporabljajo tudi postopek, kjer v telo namesto gena za distrofin vnesejo gen za folistatin, s čimer so pri pacientih dosegli ponovno povečanje mišične mase (32). Čeprav so se AAV v genskem zdravljenju pojavili dokaj pozno in so jih leta 2011 uporabili le v 10 % kliničnih raziskav, temelji prvo komercialno zdravilo za gensko zdravljenje genetske napake prav na AAV (2). Alipogentiparvovek predstavlja AAV z vstavljenim genom za lipoprotein-lipazo. V EU so izdali dovoljenje za promet pripravka leta 2012 (34).

Pripravek alipogentiparvovek je namenjen odraslim pacientom, ki imajo dedno pomanjkanje encima lipoprotein-lipaza (LPLD) in zato kljub dieti z omejenim vnosom maščob v telo trpijo za hudimi napadi pankreatitisa (34). Bolezen se pojavi kot posledica mutacije gena, ki kodira LPL, ali z mutacijami na drugih genih, ki kodirajo proteine ali encime, ki neposredno vplivajo na aktivnost LPL (35). Strategije v zdravljenju LPLD pred uvedbo alipogentiparvoveka so ciljale predvsem na zmanjšanje ravni trigliceridov in s tem zmanjšanje tveganja za pojav pankreatitisa. Že uveljavljena zdravila za zmanjšanje trigliceridov niso učinkovita pri pacientih z LPLD, poleg tega zaradi kratkega razpolovnega časa LPL (15 min) ni uspešno niti nadomestno encimsko zdravljenje z intravensko aplikacijo encima. Glede na pomanjkanje učinkovitega zdravljenja LPLD je gensko zdravljenje predstavljalo nov pristop pri obvladovanju te bolezni. Za uspešno zdravljenje z alipogentiparvovekom zadostuje že enkratno intramuskularno injiciranje pripravka v nogo pacienta (34). Zaradi rekordno visoke cene (1 milijon dolarjev za zdravljenje enega bolnika) in posledično izredno zahtevnih pogojev odobritve financiranja, pa je bilo od izdanega dovoljenja leta 2012, kljub nadvse uspešnim rezultatom, izvedeno le eno zdravljenje z omenjenim genskim zdravljenjem (36).

Sedaj investitorji gojijo velike upe za gensko zdravljenje z voretigenneparvovekom, s katerim se je nedavno zaključila III. faza kliničnih raziskav. S pozitivnimi rezultati kliničnih raziskav bi lahko postalo drugo odobreno gensko zdravljenje v ZDA. Uporabljamo ga za zdravljenje Leberjeve kongenitalne amavroze tipa 2, ki je posledica mutacije v genu RPE65. Mutacija povzroči dedno avtosomno bolezen, ki se pojavi v prvem letu življenja in povzroči hudo slabovidnost ali slepoto. Voretigenneparvovek omogoča vnos nadomestnega nepoškodovanega gena RPE65 v oko pacienta. Rezultati po III. fazi kliničnih raziskav nakazujejo, da



je zdravljenje uspešno in brez resnih neželenih učinkov. Voretigenneparovok je nedavno v EU in ZDA pridobil status zdravila sirote, poleg tega pa ima v ZDA priznan še status prebojnega zdravila (37).

## 2.4 HERPES VIRUS

### 2.4.1 Značilnosti vektorjev

Virus herpesa simpleksa (HSV) vsebuje dolgo linearno dvoverižno DNA. Ikozaedrnno obliko kapside obdaja še ovojnica iz lipidnega dvosloja. Med okužbo se lipidni dvosloj ovojnice zlije z lipidnim dvoslojem gostiteljeve celice in tako virusu omogoči vstop v celico. Največja prednost HSV vektorjev v genskem zdravljenju je visoka kapaciteta virusa, ki dovoljuje vstavljanje daljših zaporedij eksogene DNA. Poleg tega kompleksnost virusnega genoma omogoča dizajniranje več različnih tipov oslabiljenih vektorjev z onkolitično aktivnostjo. HSV vektorji so tudi sposobni ohraniti doživljenjsko latentno fazo v senzoričnih ganglijih, iz katerih se nato dolgo časa izražajo transgeni (38).

### 2.4.2 Uporaba

Iz HSV virusa izhajajo trije različni HSV vektorji: replikacijsko kompetentni (onkolitični) vektorji, replikacijsko okvarjeni rekombinantni vektorji in amplikon, ki za svoje delovanje potrebuje pomožni virus. Ti vektorji so največkrat namenjeni zdravljenju raka in različnih bolezni živčnega sistema, npr. kronične bolečine (39). Kot najučinkovitejši se je zaenkrat izkazal talimogenlaherparepvek, ki je leta 2015 postal prvi odobreni onkolitični virus v EU in ZDA. Talimogenlaherparepvek je pripravek iz onkolitičnega HSV vektorja z vstavljenim genom za granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (GM-CSF), ki v telesu sproži sistemski protitumorski imunski odziv. Uporabljamo ga za lokalno zdravljenje kožnega in podkožnega melanoma. Pripravek injiciramo neposredno v rakasto tvorbo na dva tedna, najmanj pol leta. Klinično učinkovitost so potrdili pri 26,4 % pacientov z melanomom v III. ali IV. stadiju, pri 16,3 % pacientov pa je ta odziv trajal več kot pol leta (40).

## 3 SKLEP

Napredek v poznavanju genetskega ozadja bolezni vodi v hiter razvoj orodij za spreminjanje genoma. V letu 2012, zgolj 9 let po dokončanem projektu Človeški genom, so v

Evropi odobrili prvo gensko zdravljenje za humano uporabo. Razvoj sicer še vedno upočasnjujejo nekateri dejavniki, eden izmed glavnih je cena končnih zdravil. Stroški zdravljenja enega samega bolnika z alipogentiparvovekom znašajo rekordnih milijon dolarjev. Eden izmed razlogov, zakaj je gensko zdravljenje tako drago, je ta, da je cena ekstremno dragega razvoja in pridobitve dovoljenja za promet porazdeljena med majhno število potencialnih pacientov. Kljub temu lahko kmalu v prihodnosti na trgu pričakujemo nove vrste genskih zdravljenj, saj so nekatera zdravljenja v zadnjih fazah kliničnih raziskav s pozitivnimi rezultati in brez resnih neželenih učinkov že pridobila status prebojnega zdravila oz. zdravila sirote.

## 4 LITERATURA

1. Papadopoulos KI, Wattanaarsakit P, Prasongchean W et al. *Gene therapies in clinical trials*. In: Narain R. *Polymers and nanomaterials for gene therapy*. Elsevier; 2016: 231-256.
2. Lukashov AN, Zamyatnin AA Jr. *Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives*. *Biochemistry (Moscow)* 2016; 81(7): 700-708.
3. Merten OW, Gaillet B. *Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches*. *Biochem Eng J* 2016; 108: 98-115.
4. Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S et al. *Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(7): 2581-2584.
5. Giacca M. *Gene therapy*. Springer-Verlag; 2010.
6. Bayer W, Tenbusch M, Lietz R et al. *Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection*. *J Virol* 2010; 84(4): 1967-1976.
7. Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S et al. *The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multi specificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens*. *Mol Ther* 2008; 16(9): 1609-1616.
8. Watkins DI, Burton DR, Kallas EG et al. *Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans*. *Nat Med* 2008; 14(6): 617-621.
9. Pearson S, Jia H, Kandachi K. *China approves first gene therapy*. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 3-4.
10. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. *T-lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years*. *Science* 1995; 270(5235): 457-480.
11. Bluebird bio. *FDA grants Breakthrough therapy designation to LentiGlobin for treatment of beta-thalassemia major*. <http://investor.bluebirdbio.com/>. Dostop: 13-10-2016.
12. GlaxoSmithKline. *Strimvelis™ receives European marketing authorisation to treat very rare disease, ADA-SCID*. <http://www.gsk.com>. Dostop: 12-10-2016.
13. Kite Pharma. *Pipeline*. <http://kitepharma.com>. Dostop: 28-10-2016.

14. Oxford BioMedica. R&D Pipeline. <http://www.oxfordbiomedica.co.uk>. Dostop: 28-10-2016.
15. Cattoglio C, Pellin D, Rizzi E et al. High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 2010; 116(25): 5507-5517.
16. Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 1999; 261(1): 120-132.
17. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol* 2013; 33(1): 1-7.
18. Cavazzana M, Six E, Lagresle-Peyrou C et al. Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency: where do we stand? *Hum Gene Ther* 2016; 27(2): 108-116.
19. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013; 341(6148): 1233151.
20. Kaufmann KB, Chiriacco M, Siler U et al. Gene therapy for chronic granulomatous disease: current status and future perspectives. *Curr Gene Ther* 2014; 14(6): 447-460.
21. Biffi A, Montini E, Lorioli L et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 2013; 341(6148): 1233158.
22. Bluebird bio. bluebird bio receives U.S. and European Orphan drug designation for novel gene therapy to treat adrenoleukodystrophy. <http://investor.bluebirdbio.com>. Dostop: 13-10-2016.
23. June CH, Maus MV, Plesa G et al. Engineered T cells for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(9): 969-975.
24. Kite Pharma. Kite Pharma announces positive topline KTE-C19 data from ZUMA-1 pivotal trial in patients with aggressive non-hodgkin lymphoma (NHL). <http://ir.kitepharma.com/>. Dostop: 14-10-2016.
25. Novartis. Novartis highlights new CTL019 Phase II data demonstrating 93% complete remission in pediatric patients with r/r ALL. <https://www.novartis.com/>. Dostop: 14-10-2016.
26. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 2014; 383: 1138-1146.
27. Bokhoven M, Stephen SL, Knight S et al. Insertional gene activation by lentiviral and gamma-retroviral vectors. *J Virol* 2009; 83(1): 283-294.
28. Murlidharan G, Samulski RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front Mol Neurosci* 2014; 19: 76.
29. Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2014; 43: 108-128.
30. Piccolo P, Brunetti-Pierri N. Gene therapy for inherited diseases of liver metabolism. *Hum Gene Ther* 2015; 26(4): 1-7.
31. Wang D, Zhong L, Nahid MA et al. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11(3): 345-364.
32. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V et al. A Phase 1/2a follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Molecular Therapy* 2015; 23(1): 192-201.
33. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res* 2010; 316(18): 3087-3092.
34. Wierzbicki AS, Viljoen A. Alipogene tiparovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(1): 7-10.
35. Ferreira V, Petry H, Florence S. Immune responses to AAV-vectors, the Glybera example from bench to bedside. *Front Immunol* 2014; 5(82): 1-15.
36. Regalado A. The world's most expensive medicine is a bust. *MITs Technol Rev* 2016.
37. Spark Therapeutics. Spark Therapeutics announces new positive data from continuation of phase 3 trial of voretigene neparovec. <http://ir.sparktx.com>. Dostop: 13-10-2016.
38. Gene Therapy Net. Herpesvirus viral vectors. <http://www.genetherapy.net.com/viral-vector/herpesviruses.html>. Dostop: 12-06-2017.
39. Manservigi R, Argnani R, Marconi P. HSV Recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol J* 2010; 4: 123-156.
40. Greig SL. Talimogene Laherparepvec: first global approval. *Drugs* 2016; 76(1): 147-154.

