



## POTENCJAŁ TERAPII GENOWEJ W CHOROBYCH NEURODEGENERACYJNYCH

Potential of gene therapy in neurodegenerative diseases



Karolina Aleksandrowicz<sup>1,2</sup>, Klaudia Porębska<sup>1</sup>, Monika Leśniak<sup>1</sup>, Robert Zdanowski<sup>1</sup>, Klaudia Brodaczevska<sup>1</sup>

1. Wojskowy Instytut Medyczny – Państwowy Instytut Badawczy, Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych, Polska
2. Szkoła Doktorska BioMedChem, Uniwersytet Łódzki, Polska

Karolina Aleksandrowicz – [id 0000-0002-5388-5784](#)

Monika Leśniak – [id 0000-0003-0340-4054](#)

Robert Zdanowski – [id 0000-0003-0455-1072](#)

Klaudia Brodaczevska – [id 0000-0003-2374-3600](#)

Klaudia Porębska – [id 0009-0004-6949-275X](#)

**Streszczenie:** W ostatnich latach obserwujemy coraz większe rozpowszechnienie występowania chorób neurodegeneracyjnych na całym świecie. Jest to związane ze wzrostem wieku populacji światowej. Pomimo intensywnej badań naukowych oraz prób klinicznych, w większości przypadków nie opracowano do tej pory skutecznej terapii. Tradycyjne postępowanie w przypadku zaburzeń neurologicznych łagodzi jedynie nasilenie objawów bez likwidowania przyczyny choroby. Poszukiwanie nowych metod leczenia chorób neurodegeneracyjnych jest utrudnione przez przepuszczalność BBB, ponieważ istnieją ograniczenia związane z wnikaniem leków do ośrodkowego układu nerwowego. Z powyższych względów kluczowe jest opracowanie takiej strategii terapeutycznej, która umożliwiłaby zastosowanie terapii bezpośrednio w miejscu patologicznie zmienionym. Ponadto dużym wyzwaniem jest opracowanie leczenia, które hamowałoby rozwój choroby. Prowadzone są liczne badania w celu znalezienia alternatywnych sposobów leczenia, takich jak stosowanie nanoskalowych nośników, mezenchymalnych komórek macierzystych oraz terapii genowej. W przypadku terapii genowej w trakcie badań jest wiele leków celowanych w geny m. in. AADC, GDNF i HTT. Innowacyjne sposoby leczenia potencjalnie mogą przynieść korzyści terapeutyczne milionom osób z chorobami neurodegeneracyjnymi.

**Abstract:** In recent years, there has been an increasing prevalence of neurodegenerative diseases worldwide. This is linked to the increasing age of the world population. Despite intensive research and clinical trials, in most cases no effective therapy has been developed to date. Typically, management of neurological disorders only alleviates the severity of symptoms without eliminating the cause of the disease. The development of new treatments for neurodegenerative diseases is hampered due to the limited permeability of the BBB; as the penetration of drugs into the central nervous system is restricted. For these reasons, it is crucial to develop therapeutic strategies that can be applied directly at the pathologically altered site. In addition, a major challenge is to develop a treatment that inhibits disease progression. Numerous studies are being conducted to find alternative treatment methods, such as the use of nanoscale carriers, mesenchymal stem cells and gene therapy. In the case of gene therapy, a number of gene-targeted drugs are under investigation, including AADC, GDNF and HTT. Innovative treatments have the potential to bring therapeutic benefits to millions of people with neurodegenerative diseases.

**Słowa kluczowe:** choroby neurodegeneracyjne, bariera krew-mózg, terapia genowa, wektory AAV.

**Keywords:** neurodegenerative diseases, blood-brain barrier, gene therapy, AAV vectors.

DOI 10.53301/lw/152017

Praca wpłynęła do Redakcji: 04.07.2022

Zaakceptowano do druku: 11.07.2022

**Autor do korespondencji:**

Karolina Aleksandrowicz

Wojskowy Instytut Medyczny – Państwowy Instytut Badawczy, Laboratorium Onkologii Molekularnej

i Terapii Innowacyjnych, Warszawa,

e-mail: kaleksandrowicz@wim.mil.pl

Choroby neurodegeneracyjne ośrodkowego układu nerwowego (OUN) dotyczą milionów ludzi na całym świecie. Związane są z postępującym, nieodwracalnym uszkodzeniem neuronów. Mogą mieć charakter wrodzony, jak np. płasawica Huntingtona lub nabyty, jak np. stwardnienie rozsiane. Czynniki predysponującymi do rozwoju

nabytych chorób neurodegeneracyjnych jest podeszły wiek. Natomiast występowanie wrodzonych chorób neurodegeneracyjnych jest przede wszystkim uwarunkowane genetycznie. Do najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych możemy zaliczyć: chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona (PD), płasawicę Huntingtona

(HD), stwardnienie rozsiane oraz stwardnienie zanikowe boczne [1].

Przyczyny uszkodzenia neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych są zależne od rodzaju występującego schorzenia. Często są związane z akumulacją dysfunkcyjnych białek w komórkach, zaburzeniem syntezy neuroprzekaźników lub zmianami zwyrodnieniowymi i zanikowymi w OUN. Konsekwencją tych zmian jest śmierć komórek mózgu [2].

Występowanie objawów u osób z chorobą neurodegeneracyjną jest zależne od miejsca uszkodzenia OUN. Najczęstsze objawy to zaburzenia motoryczne (ataksja), zaburzenia pamięci i ośpienie (demencja). Mogą również wystąpić: problemy z koncentracją, zaburzenia orientacji i mowy, napady drgawkowe oraz wahania nastroju [2].

Obecnie terapia zaburzeń neurodegeneracyjnych opiera się na łagodzeniu objawów przy użyciu środków farmakologicznych. Najczęściej stosowana farmakoterapia zakłada podawanie leków zwiększających przekazywanie dopaminergiczne oraz hamujących przekazywanie cholinergiczne w przypadku choroby Parkinsona, inhibitorów cholinesterazy w chorobie Alzheimera oraz interferonu  $\beta$  lub glatirameru w stwardnieniu rozsianym [3]. Wraz z postępem choroby neurodegeneracyjnej zmniejsza się skuteczność leczenia farmakologicznego. Skutki uboczne farmakoterapii nasilają się wraz ze wzrostem dawki leku. Bariera krew-mózg (BBB) ogranicza przedostawanie się znacznej ilości leków podawanych ogólnoustrojowo, które powinny działać w miejscu docelowym. Jest to związane z brakiem wykorzystania mechanizmów transportu miejscowego oraz wysoką masą cząsteczkową i polarnością leków [4]. Szacuje się, że 98% leków stosowanych obecnie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (białek rekombinowanych, przeciwciał monoklonalnych, genów), nie jest w stanie skutecznie przekroczyć bariery krew-mózg [5].

### Bariera krew-mózg (BBB)

Bariera krew-mózg (BBB) stanowi fizyczną i metaboliczną granicę regulującą transport substancji pomiędzy naczyniami krwionośnymi a tkanką nerwową. Odgrywa ważną funkcję w zachowaniu optymalnego środowiska tkanek mózgowych, zapobiega przed wnikaniem szkodliwych substancji i niektórych mikroorganizmów znajdujących się we krwi do mózgu, co ma na celu ochronę podstawowych funkcji ośrodkowego układu nerwowego [6].

BBB poprzez swoją złożoną strukturę jest jedną z najszczelniejszych barier w ludzkim organizmie oraz stanowi główny mechanizm ochrony OUN. Naczynia włosowate (*microcapillaries*) otaczające OUN, podobnie jak w innych tkankach, zbudowane są ze ściśle przylegających do siebie komórek śródbłonka (*endothelial cells*) tworzących ścianę, wyściełających naczynia oraz komórek mięśniowych i perycytów otaczających śródbłonek z zewnątrz [7]. Właściwości BBB wynikają w dużym stopniu z wyjątkowych cech komórek śródbłonka budujących unaczynienie mózgu: komórki te są połączone za pomocą ścisłych połączeń (TJ - *tight junctions*, *zonula occludens*), które w dużym stopniu ograniczają transport substancji.

Kluczowymi białkami transbłonowymi budującymi TJs są *claudins*, *occludins* i *JAMs* (*Junctional Adhesion Molecules*). Tworzą one kompleksy uszczelniające połączenia między komórkami. Ponadto to wyściółka śródbłonka nie posiada otworów szczelinowych oraz obserwuje się zmniejszoną liczbę pęcherzyków pinocytarnych w komórkach, co dodatkowo ogranicza transport przez BBB [6].

Komórki śródbłonka otoczone są przez sieć astrocytów, które stanowią granicę gleju oraz strukturalne i funkcjonalne wsparcie dla neuronów. W zależności od mikrośrodowiska immunologicznego komórki te mogą ulegać zmianom strukturalnym i funkcjonalnym, co w konsekwencji skutkuje zmianą pomiędzy fenotypem aktywnym, a spoczynkowym. Zjawisko to nazywane jest polaryzacją astrocytów. Perycyty, czyli komórki znajdujące się na powierzchni naczyń włosowatych mózgu, kontrolują transport wody. Komórki te wraz z endothelium otoczone są blaszką podstawną. Ich główną rolą jest regulacja transportu, stanowią strukturalną podporę dla BBB oraz przyczyniają się do polaryzacji astrocytów [7].

Przepuszczalność bariery krew-mózg dla substancji zależy od wielu czynników fizykochemicznych oraz czynników fizjologicznych. Do czynników fizykochemicznych należą: masa cząsteczkowa, ładunek, rozpuszczalność w lipidach, aktywność powierzchniowa i względna wielkość cząsteczki. Natomiast na czynniki fizjologiczne składają się: transportery wypływowe (np. glikoproteina P (P-gp)), aktywność enzymatyczna, wiązanie białek osocza i mózgowy przepływ krwi [8].

Transport przez BBB może zachodzić dwiema drogami: parakomórkową (między sąsiednimi komórkami) lub transkomórkową (przez komórkę). Szlak parakomórkowy warunkuje przechodzenie cząsteczek, wykorzystując gradient stężeń za pomocą mechanizmu dyfuzji biernej. Natomiast szlak transkomórkowy, oprócz dyfuzji biernej obejmuje również transport za pośrednictwem receptorów i transcytozę. Ze względu na obniżoną przepuszczalność naczyń OUN transport większości substancji jest kontrolowany i następuje poprzez transportery obecne w komórkach śródbłonka, głównie transportery wypływowe (*efflux transporters*) i transportery składników odżywczych. Transportery wypływowe, np. białko Mdr-1, wykorzystują energię do przenoszenia cząsteczek oraz rozpoznają wiele substratów. Cząsteczki te warunkują transport podstawowych substancji, jak elektrolity, nukleozydy, aminokwasy i glukoza oraz chronią OUN przed czynnikami szkodliwymi, stanowiąc ważną barierę dla farmakoterapii [8].

### Nowoczesne terapie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych

Alternatywą dla tradycyjnej farmakoterapii jest bezpośrednio, domózgowe dostarczenie leków. Kluczowym zadaniem dla współczesnej nauki jest opracowanie takiej strategii leczenia, która umożliwiłaby przekroczenie BBB i zastosowanie miejscowo-specyficznej farmakoterapii. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie nanoskalowych nośników w celu zwiększenia przechodzenia leków przez BBB. Na uwagę zasługują nośniki lipidowe, które mają zdolność do naśladowania naturalnego środowiska stanowiącego biomembrany, chronią

lek przed degradacją podczas transportu, zmniejszają toksyczność i zwiększają biokompatybilność leków w porównaniu do ogólnoustrojowego podawania [5]. Mają jednak pewne ograniczenia związane z ich trwałością i skutecznością ładowania lekiem.

Kolejną alternatywą dla tradycyjnego leczenia chorób neurodegeneracyjnych jest terapia z zastosowaniem Mezenchymalnych Komórek Macierzystych (MSCs). Przez wiele lat uważano, że komórki OUN nie mogą się zregenerować. Podejście to zostało zakwestionowane dzięki badaniom wykazującym nowe, migrujące komórki macierzyste w modelu urazów mózgu gryzoni oraz dzięki odkryciu nowych neuronów w hipokampie mózgu człowieka. Terapia z zastosowaniem MSCs zakładałaby podanie komórek na drodze iniekcji śródmózgowej, dooponowej lub infuzję drogą donosową [10]. Przeszczepione MSCs do mózgu zmniejszają apoptozę, regulują stan zapalny z pomocą wydzielanych czynników oraz mogą wpływać na endogenny wzrost, regenerację i ochronę neuronów [11]. W zabiegach tego typu można będzie wykorzystywać MSCs pochodzenia autologicznego (od pacjenta) lub allogenicznego (od osoby spokrewnionej lub niespokrewnionej z pacjentem). Zastosowanie allogenicznych MSCs w terapii niesie ze sobą ryzyko nieprawidłowego rozwoju cytoogenetycznego w hodowlach komórek oraz ektopowego różnicowania komórek do innych tkanek [11]. Ponadto wiele kontrowersji budzi potencjalny wpływ MSCs na progresję nowotworów oraz przerzuty [12]. W związku z powyższym bardzo ważnym kryterium kwalifikacyjnym do terapii z wykorzystaniem MSCs jest brak wcześniejszych guzów mózgu lub innych nowotworów w ciągu ostatnich 5 lat.

### Terapia genowa w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych

Przekraczanie BBB nie jest jedynym problemem w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Chociaż rozwój genetyki, mikrobiologii i wirusologii umożliwił poznanie genetyki tych chorób to niestety w dalszym ciągu brakuje terapii, które trwale likwidowałyby przyczynę dolegliwości. Z tego powodu alternatywą dla obecnego leczenia wydaje się być terapia genowa. Jest to innowacyjny sposób leczenia, który polega na wprowadzeniu prawidłowego wariantu genu, włączeniu lub wyłączeniu funkcji danego genu albo wprowadzeniu dodatkowego genu terapeutycznego. Terapia genowa może być stosowana zarówno do leczenia chorób dziedzicznych, jak i nabytych [13].

Pierwszym lekiem do terapii genowej zatwierdzonym przez Komitet ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (CHMP) Europejskiej Agencji Leków (EMA) jest preparat Glybera, przeznaczony do leczenia niedoboru lipazy lipoproteinowej (LPL) u pacjentów z ciężkimi lub mnogimi napadami zapalenia trzustki mimo ograniczeń w diecie [14]. Innym przykładem sukcesu terapii genowej jest warunkowe pozwolenie na dopuszczenie do obrotu w Unii Europejskiej (UE) preparatu Carvykti. Leczenie z zastosowaniem Carvykti polega na genetycznej modyfikacji limfocytów T pacjenta, aby wytwarzały białko o nazwie chimeryczny receptor antygenowy (CAR). Zmodyfikowane limfocyty T za pomocą CAR przyłączają się

do białka zwanego antygenem dojrzewania komórek B, co skutkuje śmiercią komórek szpiczaka. W wieloosrodkowym badaniu klinicznym wykazano skuteczność tego leku u pacjentów z nawrotowym i opornym na leczenie szpiczakiem mnogim [15]. Ponadto terapia genowa wydaje się mieć potencjał w leczeniu takich chorób jak np. hemofilia, nowotwory złośliwe, cukrzyca oraz choroby neurologiczne.

Głównym wyzwaniem stojącym na przeszkodzie w projektowaniu leków służących do terapii genowej jest znalezienie wydajnych i bezpiecznych nośników materiału genetycznego (wektorów). Naturalną częścią, która infekuje komórki, a następnie wprowadza do nich swój materiał genetyczny jest wirus. Chociaż jest to niepożądane zjawisko u zdrowych osobników, to dzięki tej niezwyklej zdolności stworzono szereg narzędzi terapii genowej opartych właśnie na wirusach, m.in. adenowirusach, rethrowirusach oraz wirusach AAV. Wektory wirusowe skutecznie przenoszą swój genom do komórek gospodarza, ale stosowanie ich ma pewne ograniczenia. Ludzki organizm nie rozróżnia leku od patogenu, więc tego rodzaju wektory mogą powodować reakcję immunologiczną i przez to wraz z komórkami transdukowanymi mogą być szybko usuwane z organizmu [16].

W przypadku chorób neurodegeneracyjnych najczęściej stosowane w terapii genowej są wektory oparte na wirusach AAV. Ostatnim sukcesem medycyny z użyciem tych wektorów jest dopuszczenie do sprzedaży leku o nazwie Upstaza. Jest to pierwszy lek stosowany w leczeniu rzadkiego genetycznego zaburzenia układu nerwowego – deficytu dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych (AADC). Składa się on z wektora wirusowego AAV-2, który zawiera funkcjonalną wersję genu AADC. Jego działanie polega na wprowadzeniu tego genu do komórek nerwowych, umożliwiając im wytwarzanie brakującego enzymu [17]. Podobna strategia jest stosowana w przypadku choroby Parkinsona i znajduje się w drugiej fazie badań klinicznych [18]. Obecnie leczenie tej choroby polega na podawaniu L-Dopy, która w wyniku działania dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów jest przekształcana w dopaminę. Powoduje to zmniejszenie objawów, ale nie likwiduje przyczyny. Neurony w dalszym ciągu ulegają degradacji, a wraz z nimi spada aktywność enzymu AADC i dopaminy [19]. Wyniki pierwszej fazy badań klinicznych AAV2-hAADC wskazują na poprawę jakości życia, funkcji motorycznych oraz mniejsze zapotrzebowanie na leki przeciw PD [20].

Gen AADC nie jest jedynym, nad którym prowadzone są badania w kontekście terapii Parkinsona. Równie interesujący wydaje się wektor z rekombinowanym genem czynnika neurotroficznego pochodzącego z linii komórek glejowych (GDNF). GDNF odgrywa rolę w utrzymaniu połączeń nerwowo-mięśniowych (NMJ). Ponadto pełni funkcję neuroprotekcijną oraz pomaga w tworzeniu nowych synaps między neuronami ruchowymi, a tkankami docelowymi. Przy niewystarczającej ilości GDNF następuje śmierć komórek nerwowych, co z kolei prowadzi do upośledzenia struktury i funkcji NMJ. W badaniu na szczurach wykazano zwiększoną ekspresję GDNF po iniekcji AAV-GDNF do prądkowia, co skutkowało ochroną komórek neuronalnych przed śmiercią [21]. Z kolei z badań na myszach wynika, że zwiększona ekspresja GDNF



znacząco chroniła przed utratą dopaminy i zapobiegała blokadzie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) [22]. Terapia genowa z wykorzystaniem AAV-GDNF może w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu choroby Parkinsona i obecnie jest prowadzona pierwsza faza badań klinicznych [23].

Kolejnym przykładem choroby, na którą poszukiwane są alternatywne sposoby leczenia, jest płasawica Huntingtona. Jest to śmiertelne zaburzenie neurodegeneracyjne spowodowane ekspansją powtórzeń trinukleotydowych CAG w genie huntingtyny (HTT). Prowadzone są badania nad wektorem serotypu 5 wirusa AAV z transgenem kodującym zmodyfikowane miRNA przeciwko mRNA HTT. Podczas jednorazowego doczaszkowego podania AAV5-miHTT w modelu transgenicznego świnki HD zarówno mRNA, jak i białko ludzkiej zmutowanej huntingtyny były znacznie zmniejszone we wszystkich obszarach mózgu [24]. Równie obiecujące wyniki uzyskano w badaniach tego wektora na myszach [25] oraz szczurach i *Macaca fascicularis* [26]. AAV5-miHTT został dopuszczony do pierwszej fazy badań klinicznych [27].

Wirusy nie są jedynym sposobem dostarczania genów do komórek. Istnieje wiele fizycznych oraz chemicznych metod transfekcji. Do fizycznych metod należą: elektroporacja, pistolet genowy, wtrysk hydrodynamiczny, sonoporacja oraz magnetofekcja. Natomiast do chemicznych nośników można zaliczyć: lipidy kationowe, polimery kationowe, dendrymery, nanocząstki nieorganiczne oraz wektory oparte na peptydach [28]. W dalszym ciągu są projektowane nowe narzędzia terapii genowej, aby poprawić ich biodostępność oraz ograniczyć rozpoznawanie ich przez układ immunologiczny.

## Podsumowanie

Projektowanie leków działających na ośrodkowy układ nerwowy wymaga znacznie więcej czasu niż w przypadku leków wpływających na pozostałe układy. Jest to związane ze złożoną budową mózgu, brakiem wydajnych technologii dostarczania leków, częstym występowaniem skutków ubocznych oraz selektywnością bariery krew-mózg. Jako skuteczne środki terapeutyczne do leczenia chorób mózgu bada się głównie mikro- i makromolekuły. Jednak tylko małe i lipofilowe cząsteczki mogą przechodzić skutecznie przez barierę krew-mózg.

Poszukiwanie nowych terapii w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki. Do tej pory nie opracowano odpowiedniej terapii, która likwidowałaby przyczynę dolegliwości. Terapie z zastosowaniem nanoskalowych nośników oraz mezenchymalnych komórek macierzystych wydają się obiecującą alternatywą dla tradycyjnych terapii. Jednak największe nadzieje pokładane są w terapii genowej, ponieważ zmieniając lub indukując ekspresję określonych białek będzie można skorygować podstawowy mechanizm patogeny choroby. Ostatnie sukcesy w postaci dopuszczenia do obrotu leków pokazują, jak wartościowa jest to dziedzina medycyny. Obecnie prowadzonych jest wiele badań zarówno pod kątem potencjalnego leczenia, jak i udoskonalania narzędzi dostarczania genów. Dynamiczny rozwój terapii genowej w przyszłości może nie tylko wyeliminować objawy

chorób neurodegeneracyjnych, ale daje nadzieję na ich skuteczne leczenie.

## Piśmiennictwo

1. Kiejna A, Frydecka D, Bieчек P, et al. Epidemiologia zaburzeń otępiennych w Polsce – przegląd badań. *Post Nauk Med*, 2011; 8: 676–681
2. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2004; 10: 10–17
3. Mutschler E. *Farmakologia i toksykologia*. Wrocław, Elsevier Urban & Partner, 2013
4. Pardridge WM, Boado R J. Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Meth Enzymol*, 2012; 503: 269–292
5. Cascione M, De Matteis V, Leporatti S, Rinaldi R. The New Frontiers in Neurodegenerative Diseases Treatment: Liposomal-Based Strategies. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020; 8: 566767
6. Belykh, E, Shaffer KV, Lin C, et al. Blood-brain barrier, blood-brain tumor barrier, and fluorescence-guided neurosurgical oncology: delivering optical labels to brain tumors. *Front in Oncol*, 2020; 10: 739
7. Tsou YH, Zhang XQ, Zhu H, et al. Drug Delivery to the Brain across the Blood-Brain Barrier Using Nanomaterials. *Small*, 2017; 13 (43): 1701921
8. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*, 2018; 8 (6): 1481-1493
9. Nunes, S, Madureira AR, Campos D, et al. Solid lipid nanoparticles as oral delivery systems of phenolic compounds: overcoming pharmacokinetic limitations for nutraceutical applications. *Crit Re. Food Sci Nutr*, 2017; 57: 1863–1873
10. Danielyan L, Schafer R, von Ameln Mayerhofer A, et al. Intranasal delivery of cells to the brain. *Eu. J Cell Biol*, 2009; 88: 315–324
11. Yao P, Zhou L, Zhu L, et al. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Eur Neurol*, 2020; 83: 235-241
12. Wang W, Zhong W, Yuan J, et al. Involvement of Wnt/beta-catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 2015; 6 (39): 42276–42289
13. Szala S. *Terapia genowa*, Warszawa, PWN, 2003
14. European Medicines Agency. Press release: European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval, <[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2012/07/news\\_detail\\_001574.jsp&mid=WCOb01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/07/news_detail_001574.jsp&mid=WCOb01ac058004d5c1)> (20.07.2012)
15. European Medicines Agency. Press release: New gene therapy to treat adult patients with multiple myeloma, <<https://www.ema.europa.eu/en/news/new-gene-therapy-treat-adult-patients-multiple-myeloma>> (25.03.2022)
16. Sharma D, Arora S, Singh J, Layek B. A review of the tortuous path of nonviral gene delivery and recent progress. *Int J Biol Macromol*, 2021; 183: 2055-2073
17. Pearson TS, Gupta N, San Sebastian W, et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by MR-guided direct delivery of AAV2-AADC to midbrain dopaminergic neurons. *Nat commun*, 2021; 12 (1): 1-12
18. Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm Suppl*, 2007; 113-120
19. Christine CW, Richardson RM, Van Laar AD, et al. Safety of AADC Gene Therapy for Moderately Advanced Parkinson

- Disease: Three-Year Outcomes From the PD-1101 Trial. *Neurology*, 2022; 98(1): 40-50
20. Cintrón-Colón AF, Almeida-Alves G, Boynton AM, Spitsbergen JM. GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons. *Cell Tissue Res*, 2020; 382(1): 47-56
  21. Kells AP, Fong DM, Dragunow M, et al. AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther*, 2004; 9 (5): 682-688
  22. Chen YH, Harvey BK, Hoffman A F, et al. MPTP-induced deficits in striatal synaptic plasticity are prevented by glial cell line-derived neurotrophic factor expressed via an adeno-associated viral vector. *FASEB J*, 2008; 22 (1): 261-275
  23. National Library of Medicine: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04167540?term=gene+therapy&cond=Parkinson+Disease&draw=2&rank=2> (19.10.2019)
  24. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, et al. AAV5-miHTT gene therapy demonstrates broad distribution and strong human mutant huntingtin lowering in a Huntington's disease mini-pig model. *Mol Ther*, 2018; 26 (9): 2163-2177
  25. Spronck EA, Brouwers CC, Vallès A, et al. AAV5-miHTT gene therapy demonstrates sustained huntingtin lowering and functional improvement in Huntington disease mouse models. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019; 13: 334-343
  26. Spronck EA, Vallès A, Lampen MH, et al. Intrastratial Administration of AAV5-miHTT in non-human primates and rats is well tolerated and results in miHTT transgene expression in key areas of Huntington disease pathology. *Brain Sci*, 2021; 11 (2): 129
  27. National Library of Medicine: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04120493?term=NCT04120493&draw=2&rank=1>>
  28. Sharma D, Aror S, Singh J, Layek B. A review of the tortuous path of nonviral gene delivery and recent progress. *Int J Biol Macromol*, 2021; 183: 2055-2073