

Pregledni prispevek/Review article

ZDRAVLJENJE Z GENSKO TERAPIJO

GENE THERAPY

Irina Milisav

Laboratorij za nevroendokrinologijo – molekularna celična fiziologija, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

Prispelo 2002-09-10, sprejeto 2002-11-15; ZDRAV VESTN 2003; 72: 85-9

Ključne besede: genska terapija; klinične študije; zdravljenje z nasprotno usmerjenimi oligonukleotidi; malignomi**Key words:** gene therapy; clinical studies; antisense therapy; cancer**Izvleček** – Izhodišča. Genska terapija ali gensko zdravljenje je zdravstveni poseg, pri katerem se vnese genetski material (nukleinske kisline) za nadomestilo, spremembo ali utišanje izražanja genov. Z nadomestilom ali z uravnavanjem okvarjenega gena bi želeli odpraviti vzroke bolezni.

Od prvih kliničnih poskusov, ki so se začeli leta 1990, do septembra 2001 je bilo po svetu začelih že približno 600 kliničnih študij, največ v ZDA. Do danes še ni bil odobren način zdravljenja, ki bi temeljil na tehnikah genske terapije, vendar je približno pet študij v zadnjih fazah kliničnih poskusov.

Zaključki. Trenutno so najbolj razvite metode za zdravljenje nekaterih malignih tumorjev. Poleg tega poskušajo gensko terapijo razviti še za zdravljenje bolezni srca in žilja, genetskih bolezni in okužb z virusi, predvsem s HIV. Ob ugodnih rezultatih se bodo ti postopki v nekaj letih začeli uporabljati v klinični praksi.

Abstract – Background. Gene therapy is a novel approach to treat, cure, or ultimately prevent disease by changing the expression of person's genes.

Gene therapy is in its infancy, and current gene therapy is primarily experimental, with most human clinical trials only in the research stages. There were 600 studies initiated from 1990-2001, mostly in USA.

Conclusions. Most of the gene therapy protocols currently tested are for treating various cancers. This is followed by the treatment of cardiovascular diseases, genetic diseases and infectious diseases, the latter mostly to control the HIV infection. About 5 studies devoted to cancer treatment are in the third phase of the trials and may be approved for clinical use in the near future.

Uvod

V sodobni medicini iščemo načine zdravljenja, ki bi odpravili vzroke za nastanek bolezni. Razvoj tehnik molekularne biologije, s katerimi lahko izoliramo, spreminjamo in ponovno vnašamo dedni material, je omogočil snovanje postopkov, namenjenih odpravljanju prirojenih ali pridobljenih napak dednega materiala, napak, ki povzročijo nastanek bolezni.

Kaj je genska terapija?Genska terapija ali gensko zdravljenje je zdravstveni poseg, pri katerem se vnese genetski material (nukleinske kisline) za nadomestilo, spremembo ali utišanje izražanja genov (1). Med tehnike genske terapije sodi tudi vnos dodatnih genov v žive celice, da bi spremenili njihove biološke lastnosti v terapevtske namene. Tak primer je vnos gena za beljakovino neomitska fosfotransferaza, ki označuje na novo vnesene limfocite T v bolnike po uničenju limfocitov z radiacijo (2). Nukleinske kisline se vnesejo v celice na dva načina (1): a) celice se gensko spremenijo izven telesa (*ex-vivo*) ali se b) geni vnesejo naravnost v organizem, največkrat z injiciranjem nukleinskih kislin.**Vnos nukleinskih kislin v celice izven telesa**

Celice se najprej odvzamejo iz organizma, nato se vanje vnesejo nukleinske kisline in celice se ponovno vrnejo v organizem. Ti postopki sodijo med celične terapije oziroma izdelovanje celičnih cepiv (vakcin). DNK se lahko vnese v lastne celice, odvzete iz bolnika (avtologne celice), ali v celice druge osebe (alogene celice). Ker so med postopkom celice gojene v celičnih kulturah, se lažje nadzorujeta kakovost izoliranih celic in pogoji vnosa nukleinskih kislin. Po vnosu nukleinskih kislin se opravi selekcija, kjer se preberejo in nadalje gojijo le celice, v katere so bile vnesene nukleinske kisline. V bolnika se zato vnesejo le gensko spremenjene celice. Na trenutni stopnji razvoja genskega zdravljenja je to zelo pomembna prednost, saj je največja ovira, ki zavira uspešnost postopkov genske terapije, prav neučinkoviti vnos genov v celice, torej nezmožnost prenosa genov v večje število celic (povzeto v 3, 4).

Vnos nukleinskih kislin neposredno v organizem

Majhno število celic, v katere bo uspešno vnesen dedni material, je trenutno glavna hiba postopkov genske terapije, kjer se nukleinske kisline injicirajo naravnost v organizem. Slabost takih postopkov je tudi, da se nukleinske kisline lahko vnesejo v več različnih tipov celic, zato se še zmanjša možnost odprave genetskih napak, kadar jih je treba popraviti samo v določeni vrsti celic. Za razliko od celičnih terapij pa so postopki vnosa

genetskega materiala neposredno v organizem manj zamudni, cenejši in primernejši za »masovnejšo« proizvodnjo, saj cepiva ni treba izdelati za vsakega bolnika posebej.

Uporaba nasprotno usmerjenih oligonukleotidov v genskem zdravljenju

Nukleinske kisline, DNK in RNK, sestavljajo osnovni gradniki – nukleotidi. Kratke verige nukleotidov se imenujejo oligonukleotidi. Po terminologiji ameriške Food and Drug Administration (FDA), ki nadzoruje največ poskusov z genskim zdravljenjem, se izvaja tovrstno zdravljenje, kadar se nukleinske kisline vnesejo v organizem v obliki DNK ali RNA (5).

Zdravljenje z nasprotno usmerjenimi oligonukleotidi (angl. antisense) oziroma zdravila na osnovi le-teh so s predpisi uravnavana kot genska terapija le v primerih, kadar so v celice vneseni kot DNK, ki jo celice prepišejo v oligonukleotide.

Vloga nasprotno usmerjenih oligonukleotidov je, da preprečijo delovanje beljakovine. Nasprotno usmerjeni oligonukleotidi so kratka zaporedja nukleinskih kislin, ki specifično blokirajo sintezo ali delovanje določene beljakovine. Teoretično lahko delujejo na vsaj tri načine (povzeto v 6):

1. z vezavo na dvojno vijačnico DNK preprečijo prepis DNK v mRNK;
2. z vezavo na mRNK oligonukleotidi preprečijo prepis le-te v beljakovine;
3. z vezavo na beljakovine vplivajo na njihove funkcije.

Možni načini delovanja nasprotno usmerjenih oligonukleotidov so prikazani na sliki 1 (A–C). Nasprotno usmerjeni oligonukleotidi se lahko sintetizirajo tudi v pogojih *in vitro*; ta sinteza je po zasnovi bližje masovni proizvodnji zdravil, kakršno poznamo danes. Zaenkrat je FDA odobrila le eno zdravilo, nasprotno usmerjeni oligonukleotid Vitravene[®], za zdravljenje retinitisa pri bolnikih z aidsom (7). Poskusi zdravljenja s sintetično pridobljenimi nasprotno usmerjenimi oligonukleotidi so uravnavana kot običajne zdravilne substance, zato tukaj ne bodo podrobneje opisani.

Vektorji

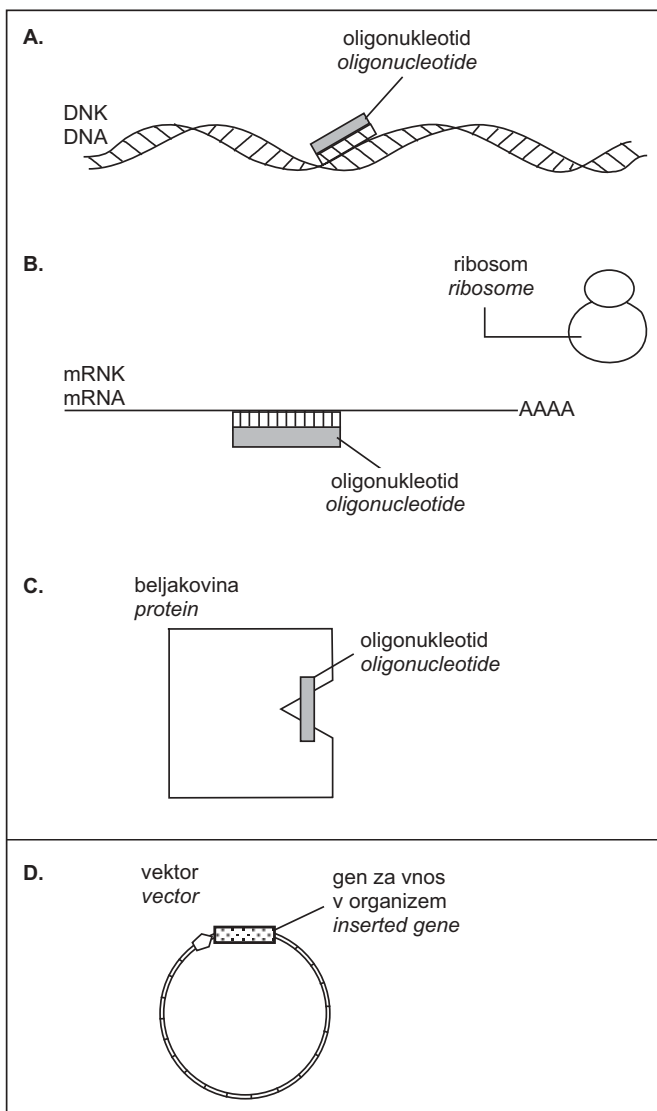
Poenostavljeno so geni verige DNK, iz katerih se lahko prepišejo beljakovine (sl. 1D). V celice v kulturi ali v organizmu se vnašajo vključeni v nosilce ali vektorje. Vektorji so tudi kosi nukleinskih kislin, ki poleg zelenega gena vsebujejo še informacijo za regulatorne elemente, ki določajo, kdaj in v katerih vrstah celic bo prišlo do prepisovanja v njih vključenih genov, in signale za ohranitev v človeških celicah. Glede na izvor ločimo dve vrsti vektorjev: virusne in nevirusne (povzeto v 3).

Virusni vektorji

Virusni vektorji so razviti iz virusov, ki so jim odstranili nekatere gene – povzročitelje virusnih bolezni, namesto njih pa vstavili gen, ki bi ga želeli vnesti v ljudi v postopku genskega zdravljenja. Poglavitna prednost virusnih vektorjev je učinkovit vnos v celice, slabosti so pa tveganje, da bi se v določenih okoliščinah lahko obnovila njihova funkcija povzročitelja bolezni, možno proženje intenzivnega imunskega odziva (še zlasti pri ponovnih vnosih istega vektorja) in nevarnost za raziskovalno osebo, ki mora pripraviti tak vektor pred vnosom v bolnika. Trenutno se najpogosteje uporabljajo vektorji, nastali iz retrovirusov in iz spremenjenega adenovirusa, sicer povzročitelja prehladov.

Nevirusni vektorji

Nevirusni vektorji ali plazmidi so drugi tip vektorjev. To so krožni kosi DNK, ki so bili sestavljeni v laboratoriju in prav



Sl. 1. Možni načini delovanja nasprotno usmerjenih oligonukleotidov. A – Vezava na dvojno vijačnico DNK. B – Vezava na mRNK. C – Vezava na beljakovino. D – Shematski prikaz vektorja.

Fig. 1. The binding sites for antisense oligonucleotides: A – the double strand DNA, B – mRNA, C – proteins. D – schematic diagram of a vector for DNA cloning.

tako kot virusni vektorji vsebujejo regulatorne elemente za izražanje genov in njihov obstoj v celicah. Poglavitna prednost plazmidov je manjša nevarnost za zdravje bolnikov in osebja, ki z njimi dela, glavna slabost pa je trenutno slabši vnos v celice, torej se le-ti vnesejo v manjše število celic kakor virusni vektorji.

Trenutno se v preskusih genske terapije uporablja več virusnih kakor nevirusnih vektorjev (2), hkrati pa tečejo intenzivne raziskave, da bi izboljšali obe skupini vektorjev. Vektorji imajo lastnosti, ki lahko določajo, v katerih vrstah celic bo prišlo do vnosa genov ter kdaj in kako dolgo se bo iz teh genov prepisovala zelena beljakovina. Te lastnosti so izredno pomembne za uspešnost zdravljenja, saj je treba za zdravljenje podedovanih genetskih bolezni po vnosu nadomestnega gena ohraniti prepisovanje tega gena skozi vse življenje, za proženje procesov celične smrti v maligno transformiranih celicah pa zadostuje le kratkotrajno izražanje ustreznega gena.

Trenutno ne znamo uravnati teh ključnih lastnosti za uspeh genskega zdravljenja, zato potekajo intenzivne raziskave o izdelavi novih vektorjev (povzeto v 8).

Prvi preskusi genske terapije

Klinični preskusi genske terapije so se začeli že leta 1990 za zdravljenje dedne bolezni hude kombinirane imunske deficience, SCID (angl. severe combined immunodeficiency, [9]). SCID je skupina bolezni, ki se v večini populacij redko pojavlja (incidenca 1 : 1.000.000 [10]), pogostejša pa je pri novorojencih Indijancev Apache, Jicarilla in Navajo na jugozahodu ZDA (11). SCID nastane zaradi okvare enega izmed genov, kar povzroči motnje v razvoju limfocitov B in T. SCID je skupina bolezni, pri kateri se okvare več genov preslikajo v enako klinično sliko; pomanjkljivo delovanje imunskega sistema se najpogosteje kaže v življenje ogrožujočih okužbah z mikroorganizmi. Ker morajo biti zboleli otroci ločeni od okolja, jih v ZDA pogosto imenujejo »bubble babies«. Prvi preskusi genskega zdravljenja so bili opravljeni na bolnikih s SCID, ko so leta 1990 v kulture limfocitov T dveh deklic vnesli gen za adenozijsko deaminazo (9). Zdravljenje je bilo uspešno in deklici danes živita v normalnem okolju (12). Kljub izrednemu uspehu tega zdravljenja pa iz primera teh deklic ni mogoče potrditi, da je izboljšano delovanje imunskega sistema izključno posledica vnosa nadomestnega gena, saj sta deklici sočasno prejemale tudi nadomestne odmerke manjkajočega encima adenozijske deaminaze (13). Tudi kasnejši preskusi genskega zdravljenja SCID so zaenkrat uspešni (14); kaže, da že manjše število vnesenih genov zadostuje, da se razvijejo zdravi limfociti T. Za ozdravljenje genetskih bolezni je potrebno, da ostane vneseni nadomestni gen v celicah desetletja, vsaj do konca povprečne življenjske dobe. Zato bo dokončni odgovor, ali se s prenosom genov lahko ozdravi SCID, znan šele čez desetletja.

Stranski učinki genske terapije

Po začetnih spodbudnih rezultatih so se razmahnila preskusi genske terapije, tako da je bilo število vseh opravljenih kliničnih poskusov do septembra 2001 že okoli 600 (15). Do leta 1999 ni bilo objav o stranskih učinkih, ki bi bili posledica preskusnih metod genske terapije, in zdelo se je, da to zdravljenje tudi v najslabših primerih ni škodovalo zdravju poskusnih oseb. To optimistično razmišljanje se je končalo s smrtjo 17-letnega Jesseja Gelsingerja, ki je prva oseba, ki je dokazano umrla za posledicami zdravljenja z gensko terapijo (16). Jesse je imel obliko dedne bolezni jeter zaradi okvare encima ornitinske transkarbamilaze, vendar je bilo njegovo stanje zaradi stroge diete in zdravil stabilno. Štiri dni po prejetju injekcije spremenjenega adenovirusa, v katerega je bil vnesen gen za ornitinsko transkarbamilazo, je umrl zaradi čezmernega imunskega odziva na vnos vektorja. V kasnejših preiskavah so ugotovili vrsto pomanjkljivosti tako glede izbire poskusne osebe kot postopkov nadzora kliničnih študij na Univerzi Pennsylvania, kjer je Jesse Gelsinger prejel gensko zdravljenje (17). Ker so opazili pomanjkljiv sistem nadzora tudi pri študijah drugih institucij, želijo spremeniti postopke zunanjega nadzora genske terapije, kar je opisano v naslednjem poglavju.

Nadzor nad postopki genske terapije

V ZDA, kjer se opravi največ postopkov preskušanja genske terapije, si delita nadzor nad postopki genske terapije Food and Drug Administration (FDA) in National Institute of Health (NIH). Vsi postopki morajo biti prijavljeni pri FDA in tja je treba prijavljati vse stranske učinke in sprotne rezultate zdrav-

ljenja, vendar pa FDA po zakonu ne sme posredovati podatkov o postopkih zdravljenja in njihovi uspešnosti (5). V okviru NIH deluje svetovalno telo Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), ki svetuje o primernosti postopkov genske terapije, v zvezi z zasnovno poskusov in kdaj je treba poskusno zdravljenje prekiniti (18). RAC izgrajuje tudi javno dostopno bazo podatkov o kliničnih preskusih. V bazi so navedeni vsi protokoli, ki jih vsaj delno sofinancirajo iz državne blagajne. Po smrti Jesseja Gelsingerja leta 1999 so začeli spreminjati postopke nadzora pri FDA in NIH in nameravajo ustanoviti tudi javno dostopno bazo podatkov, v kateri bodo objavljeni sprotne rezultati kliničnih poskusov in morebitni stranski učinki. Zaenkrat taka baza še ni javno dostopna, verjetno tudi zaradi nevarnosti padca vrednosti delnic farmacevtskih in biotehnoških podjetij, če se le nakažejo morebitni stranski učinki ali zapleti pri preskušanju novih zdravil.

Specifični zapleti zdravljenja z gensko terapijo

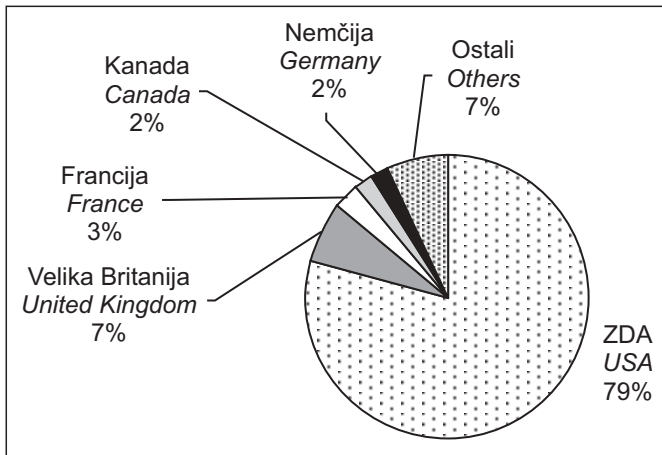
Zaradi dodatnih potencialnih zapletov zdravljenja z gensko terapijo je treba nadziranju teh postopkov posvetiti še večjo skrb kakor pri preskušanju klasičnih zdravil. Pri vektorjih, ki se v celicah vrinejo (integrirajo) v celični genom, ne znamo kontrolirati mesta vrivanja v genom. Teoretično bi lahko vnos vektorja v genom prekinil kak pomemben celični gen ali spremenil uravnavanje izražanja sosednjih genov. Prekinitev za celico pomembnega gena bi lahko vodila v razvoj druge genske bolezni ali okvare, če pa bi bil gen s spremenjenim izražanjem tumorski supresor ali onkogen, pa bi lahko prišlo do maligne transformacije. Na srečo do zdaj še niso zaznali zdravstvenih zapletov, povzročenih z vrivanjem vektorja v celični genom (19).

Predvsem pri zaporednem vnosu virusnih vektorjev so opazili, da so ponavljajoči se vnosi manj učinkoviti, verjetno zaradi imunskega odziva na vektorje. Močan imunski odziv na vnos vektorja, ki je povzročil sistemsko odpoved organov, je povzročil tudi smrt Jesseja Gelsingerja, opisano v prejšnjem poglavju.

Naslednji specifični zaplet zdravljenja z gensko terapijo izvira iz lastnosti, da se vektorji lahko vnašajo v različne celice in teoretično bi se lahko vnesli tudi v spolne celice ter se prenesli na potomce. Adenovirusni vektor so našli v celicah sperme bolnika v poskusih zdravljenja hemofilije (20). Ker vektorja ni bilo v spermijih, temveč samo v ostalih celicah v spermi, se klinični preskusi tega zdravljenja nadaljujejo, vendar je nadzor poostren in veljajo posebne omejitve: zdravljenje se sme opravljati le zaporedno, na vsakem bolniku posebej; naslednja oseba ne sme sodelovati v zdravljenju še tri mesece po prenehanju zdravljenja prejšnje osebe, kolikor znaša čas dozorevanja spermijev; bolniki morajo v času zdravljenja in še določen čas po njem uporabljati kontracepcijo.

Preskušanje postopkov genske terapije

Do danes še niso odobrili postopka genske terapije za prsto uporabo v klinični praksi, vendar se intenzivno opravljajo preskusi zdravljenja na ljudeh v številnih državah. Septembra 2001 je potekalo 482 kliničnih poskusov zdravljenja z gensko terapijo po svetu (15). Seznam držav, kjer razvijajo gensko zdravljenje, je prikazan na sliki 2. Septembra 2001 se je okoli 80% kliničnih poskusov opravljal v ZDA, v Veliki Britaniji je bilo 7%, v Franciji, Kanadi in Nemčiji pa v vsaki po približno 3%. Preskusi genskega zdravljenja potekajo še v vsaj 15 državah po vseh celinah. Potekajo tudi pri naših sosedih v Avstriji in v Italiji. Trenutno je večina kliničnih poskusov genske terapije v zgodnjih fazah kliničnih poskusov.



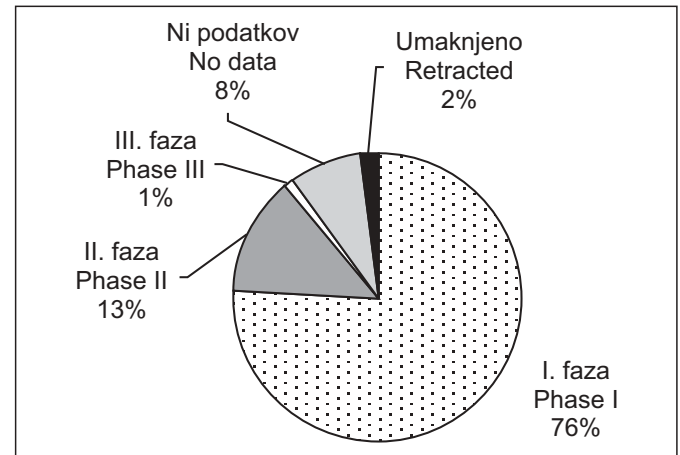
Sl. 2. Preskušanje genskega zdravljenja po svetu po državah. Podatki so iz baze Journal of Gene Medicine iz septembra 2001 (15) (100% = 482 študij).

Fig. 2. Countries involved in clinical trials of gene therapy. Data source: Journal of Gene Medicine from September 2001 (15) (100% = 482 studies).

Klinični poskusi novega zdravila ali postopka zdravljenja, ki privedejo do registracije zdravila, so razdeljeni v tri faze (povzeto v 21). V prvi fazi se presodi varnost zdravila na zdravih poskusnih osebah, v drugi fazi se na majhnem številu bolnikov preveri velikost odmerka in ocenijo se stranski učinki zdravila ali postopka, tretja faza obsega ugotavljanje terapevtske vrednosti in stranskih učinkov na večjem številu bolnikov v različnih institucijah, po navadi v različnih državah. Če so rezultati ugodni, se zdravilo ali postopek zdravljenja registrira in se prične uporabljati v klinični praksi. Septembra 2001 je bila večina poskusov genske terapije v prvi fazi kliničnih testiranj, kar 76%. 13% študij je bilo v drugi fazi kliničnih poskusov in 1% v tretji fazi (2). Porazdelitev kliničnih poskusov po fazah kliničnih študij je prikazano na sliki 3. Iz tega vidimo, da so maloštevilni postopki zdravljenja tik pred registracijo, da pa je velika verjetnost, da bo v naslednjih letih prišlo do odobritve uporabe postopkov genske terapije v klinični praksi. Razvoj genskega zdravljenja v klinični praksi že poteka približno 10 let. Tudi razvoj konvencionalnih zdravil traja povprečno več kot 10 let (21), tako da ni presenetljivo, da še nobena oblika genskega zdravljenja ni odobrena za splošno uporabo v klinični praksi. Konec leta 2001 se je verjetnost, da bodo nekateri postopki genske terapije prešli v klinično prakso, še dodatno okrepila z objavo dokaza, da je mogoče s postopki genskega zdravljenja ozdraviti anemijo srpastih celic pri miših (22). Tudi 10 mesecev po vnosu gena za hemoglobin so imele živali normalne eritrocite.

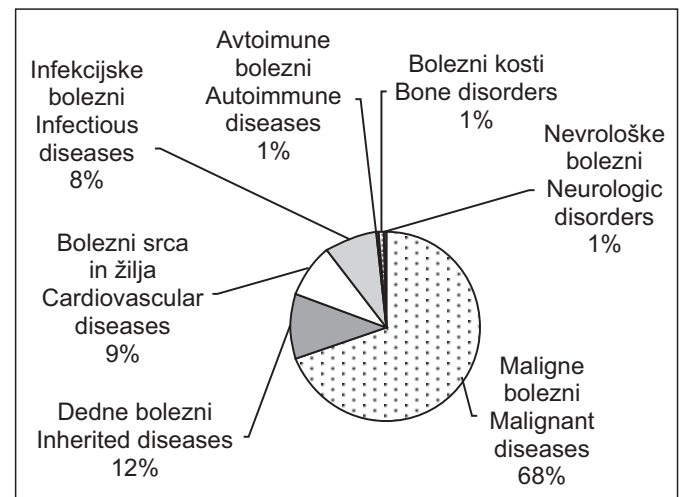
Uporabnost metod genskega zdravljenja

V začetkih kliničnih preskusov metod genskega zdravljenja se je to zdravljenje snovalo za odpravo podedovanih bolezni, ki nastanejo kot posledica okvare enega okvarjenega gena. Za ozdravljenje genetskih bolezni je potrebno, da ostane vnese ni nadomestni gen v celicah desetletja, vsaj do konca povprečne življenjske dobe. Glede na to, da trenutno še ni vektorja, ki bi omogočal učinkovit vnos genov in njihovo selektivno in dolgotrajno izražanje, so postopki genske terapije trenutno primernejši za zdravljenje bolezni, kjer je potrebno kratkotrajno izražanje gena za odpravo napak. Tak primer je zdravljenje malignih bolezni, kjer se postopki genske terapije pre-



Sl. 3. Napredek preskušanja genskega zdravljenja. Podatki so iz baze NIH iz septembra 2001 (2) (100% = 454 študij).

Fig. 3. Phases of clinical trials of gene therapy. Data source: NIH database from September 2001 (2) (100% = 454 studies).



Sl. 4. Porazdelitev postopkov genske terapije po skupinah bolezni. Podatki so iz baze NIH iz septembra 2001 (2) (100% = 454 študij).

Fig. 4. Groups of diseases and disorders treated by gene therapy. Data source: NIH database from September 2001 (2) (100% = 454 studies).

skušajo za nadomestitev okvarjenih genov ali za utišanje genov s čezmernim izražanjem oziroma za sprožanje celične smrti malignih celic. Glede na to, da za te bolezni večinoma ni učinkovitih načinov zdravljenja pri ponovnem izbruhu bolezni, ni presenetljivo, da kar 80% vseh novih načinov zdravljenja, ki se trenutno preskušajo, temelji na postopkih genskega zdravljenja (23). Zdravljenje različnih malignih bolezni je tudi najbolj zastopano med trenutnimi poskusi genskega zdravljenja in znaša 68% (2). Deleži zdravljenj različnih bolezni, kjer se uporablja genska terapija, so prikazani na sliki 4. Zdravljenju malignih bolezni po številčnosti postopkov sledi zdravljenje bolezni srca in žilja, kjer se s kratkotrajnim izražanjem rastnih faktorjev (npr. epitelijskega žilnega rastnega faktorja, fibroblastnega rastnega faktorja) želi lokalno spodbuditi rast žilja za nadomestilo okvarjenih žil. Kratkotrajno izražanje oziroma blokiranje izražanja genov utegne biti uspešno tudi za zdravljenje virusnih okužb, predvsem z virusom HIV.

Zaključki

Gensko zdravljenje je nova oblika zdravljenja, ki obljublja, da bo odpravila vzroke za nastanek bolezni. Razvoj in preskušanje postopkov v klinični praksi traja že dobrih 10 let. Kljub temu da trenutno še ni odobrenega postopka za širšo uporabo v klinični praksi, pa je zelo verjetno, da bodo taki postopki odobreni v naslednjih letih. Spodbudno je, da so na živalskem modelu uspeli s postopki genskega zdravljenja ozdraviti anemijo srpastih celic in da so nekateri postopki zdravljenja malignih bolezni v tretji fazi kliničnih preskusov. Kljub temu pa je treba pri postopkih genskega zdravljenja za razliko od drugih načinov zdravljenja poleg terapevtske vrednosti in stranskih učinkov skrbno nadzorovati še druge dejavnike, tudi morebitni prenos vnesenega genetskega materiala prek spolnih celic.

Opomba

Med pripravo članka za tisk je bolnik s SCID zbolel za levkemijo. Bolezen je posledica genskega zdravljenja SCID z retrovirusnim vektorjem, ki je spremenil izražanje gena *LMO-2*, povezanega s pojavom raka pri otrocih (24).

Zahvala

Zahvaljujem se Vanji Mavrin za pomoč pri pripravi slike 1.

Literatura

1. Anon. Guidance for industry. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. US Dept. of Health and Human Services, FDA, Center for Biologics Evaluation and Research, 1998: 3–4.
2. Clinical trials in human gene transfer. <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/clinicaltrial.htm>. Accessed: August 2002.
3. Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: Current applications and future goals. *The Oncologist* 1998; 3: 255–63.
4. Koenig S. Antibody gene therapy with adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 433–3.
5. FDA. <http://www.fda.gov/cber/gene.htm>. Accessed: September 2001.
6. Pachori AS, Huettelman MJ, Francis SC, Gelband CH, Katovich MJ, Raizada MK. The future of hypertension therapy: Sense, antisense or nonsense. *Hypertension* 2001; 37: 357–64.
7. FDA. <http://www.fda.gov/>. Accessed: September 2002.
8. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *TIBTECH* 2000; 18: 119–26.
9. Blaese RM, Culver KW, Anderson WF. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 331–7.
10. The Jeffrey Modell Foundation. Severe combined immunodeficiency. http://www.jmfworld.org/html/severe_combined_immunodeficiency.html. Accessed: May 2002.
11. OMIM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim?202500>. Accessed: May 2002.
12. French-Anderson W. Gene therapy: The best of times, the worst of times. *Science* 2000; 288: 627–9.
13. Blaese MR, Culver KW, Miller AD et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475–80.
14. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-XI disease. *Science* 2000; 288: 669–9.
15. J. Gene Medicine. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy>. Accessed: September 2001.
16. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999; 401: 517–8.
17. Smaglik P. Clinical trials at gene therapy institute. *Nature* 2000; 405: 497–7.
18. Wadman M. NIH under fire over gene-therapy trials. *Nature* 2000; 403: 237–7.
19. Smith AE. Gene therapy – where are we? *Lancet* 1999; 354: Suppl I: 1–4.
20. Marshall E. Panel reviews risks of germ line changes. *Science* 2001; 294: 2268–9.
21. Zivin JA. Understanding clinical trials. *Sci Am* 2000; April: 49–55.
22. Marshall E. Gene *Gemisch* cures Sickle cell in mice. *Science* 2001; 294: 2268–8.
23. Hunt S. Technology evaluation: MetXia-P450, Oxford BioMedica. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 595–8.
24. Check E. A tragic setback. *Nature* 2002; 420: 116–8.