

Teràpia Gènica

Com ha passat anteriorment centenars de vegades, les promeses que els mitjans de comunicació ens feien a principis dels 90 en relació a la teràpia gènica (TG) han resultat ser un miratge. Malgrat tot, això no significa que des de llavors no s'hagi avançat, ni molt menys. De fet, la TG ja ha guarit desenes de pacients amb malalties genètiques greus i, en algunes d'elles,

en constitueix el tractament d'elecció. Tot i que la majoria d'estudiosos estan convençuts que la TG va arribar per quedar-se, és cert que la velocitat de creuer a la que avança aquesta disciplina jove és més lenta del que s'esperava, en part perquè les expectatives van ser massa optimistes inicialment i, en part, perquè el camí ha resultat estar ple d'entrebancs.

Escrit per

Jordi Barquinero

Centre de Teixits i Teràpia Cel·lular del Banc de Sang i Teixits (BST)
i Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron

Les dues primeres malalties que s'han arribat a guarir mitjançant la TG són dues formes relativament rares i greus d'immunodeficiència primària, la X-SCID (1), que s'anomena així per estar lligada al cromosoma X, i la deficiència de l'enzima ADA (2). En ambdós casos s'han utilitzat vectors retrovírics per inserir còpies sanes dels gens responsables de la malaltia dins les cèl·lules mare hemopoètiques (CMH), la qual cosa dona com a resultat la correcció del defecte genètic en tots els llinatges cel·lulars san-

guinis, incloent les que constitueixen el sistema immunitari. El fet que aquesta estratègia funcioni en les dues situacions citades i hagi fracassat en dotzenes d'assajos clínics previs es deu a les peculiars característiques d'aquestes malalties, la profunda depressió immunitària, que facilita l'empelt de les cèl·lules transplantades i evita el seu rebuig, i a l'avantatge selectiu de les cèl·lules "corregides" genèticament, que els permet repoblar progressivament els nínxols buits i reconstruir la funció immunitària. Tot i això, la capacitat dels vec-

tors retrovírics per integrar-se en els genomes de les cèl·lules hoste és una arma de dues fulles. Per una banda, fa possible l'expressió a llarg termini del transgèn terapèutic en tota la progènie de les cèl·lules modificades, però per altra comporta un potencial risc de mutagènesi i oncogènesi per inserció, determinada atzarosament pels llocs del genoma en els que s'integren. De fet, aquest greu efecte advers ja s'ha observat en un dels assajos clínics abans esmentats, realitzat a França, en el qual, d'onze nens sotmesos al tractament experimental,

tres han desenvolupat síndromes linfoproliferatius relacionats amb la teràpia (3). Aquest tipus de complicació constitueix una de les cares fosques de la TG, especialment la que implica l'ús de vectors integratius (4). Les bones notícies són que set dels altres vuit nens sotmesos al mateix protocol estan probablement guarits de la seva letal malaltia, i que en els altres assajos clínics de TG per a aquesta mateixa i per a altres malalties que s'han portat a terme, en cap cas s'ha observat aquest tipus d'efectes adversos.

Els problemes de la pròpia defensa

El segon gran obstacle que limita la utilització de la TG, i la importància del qual només s'ha començat a tenir en compte recentment, és la barrera immunitària. Per mantenir la nostra integritat davant de potencials agressions per part de patògens, l'evolució ens ha dotat d'un eficaç arsenal d'elements defensius. Aquests inclouen des de simples i eficaces barreres físiques com la pell, fins a sofisticats sistemes cel·lulars i moleculars capaços de destruir o neutralitzar enemics externs (microorganismes) o interns (tumors). Alguns d'aquests sistemes defensius són exquisidament específics com els que constitueixen l'anomenada immunitat adquirida o adaptativa. El funcionament d'aquesta requereix uns mecanismes de reconeixement fins i precisos que per-



Les cèl·lules d'aquests ratolins transgènics expressen constitutivament una proteïna fluorescent (GFP). Els animals transgènics són àmpliament utilitzats per seguir inequívocament el rastre de les cèl·lules trasplantades *in vivo* mitjançant tècniques d'imatge, de citometria o de biologia molecular.

© Imatge cortesia de: J. Hayden, RBP, H. Kubota, and R. L. Brinster/PNAS.

metin discriminar el que és propi del que és aliè amb la finalitat de poder dirigir l'atac (o la defensa) davant l'invasor, però respectant a tota costa el que és propi. En ocasions, el sistema immunitari s'altera, responnent exageradament a antígens externs (al·lèrgies), o equivocadament davant d'antígens propis (autoimmunitat). En d'altres, com en el rebuig d'un òrgan trasplantat, les cèl·lules immunitàries només estan acomplint la seva missió.

A la vista d'aquests fets, la inducció de tolerància específica sense que es comprometi la funcionalitat global del nostre sistema immunitari (com fan els tractaments immunosupressors convencionals) és un dels grans rep-

tes de la medicina actual, una vella quimera que seria de gran utilitat en disciplines com el trasplantament d'òrgans, les al·lèrgies o les malalties autoimmunitàries. En un trasplantament d'òrgans, el sistema immunitari del receptor tendeix a atacar a l'òrgan trasplantat que eventualment acaba sent rebutjat. Per evitar o minimitzar aquest rebuig, els receptors dels trasplantaments han de rebre tractament immunosupressor, normalment de per vida. El trasplantament de progenitors hemopoètics (TPH) constitueix, des del punt de vista immunològic, una situació especial (5). A diferència dels receptors d'òrgans sòlids, les persones que reben un TPH al·logènic (d'un altre donant humà no idèntic) s'han de sotmetre, abans del trasplantament, a un tractament (l'anomenat condicionament) l'objectiu del qual és triple. En primer lloc, és un intent d'eradicar el clon o clons de cèl·lules malignes (la principal indicació del TPH són els càncers hematològics). A més, és mieloablatiu, és a dir, destrueix total o parcialment l'hemopoiesi del receptor, la qual cosa facilitarà l'empelt de les cèl·lules trasplantades (de fet, aquesta mieloablatió és el que fa necessari rescatar l'hemopoiesi amb el trasplantament). Per últim, el condicionament elimina o deixa inermes el sistema immune del receptor anul·lant la seva capacitat per rebutjar les cèl·lules trasplantades.

Tot i això, els empelts hematopoètics també són armes de dues fulles; a més de les cèl·lules mare necessàries per reconstituir l'hemopoiesi del receptor, també contenen cèl·lules T del donant, per un costat necessàries per facilitar l'empelt o implant de les CMH trasplantades, però, per l'altra, amb potencial d'al·lo reactivitat i capaços de produir la temuda malaltia de l'empelt contra l'hoste (EICH). Si el tractament immunosupressor la pot prevenir o l'arriba a controlar, en general s'aconsegueix finalment un estat de tolerància creuada que fa innecessari qualsevol tipus de tractament, a diferència del que passa amb els receptors de trasplantaments d'òrgans sòlids, que normalment necessiten immunosupressió de per vida. Quant al condicionament previ al trasplantament, com que està basat en la irradiació corporal total i/o en altes dosis de quimioteràpics, combinant un efecte mieloablatiu amb

l'immunosupressor, s'associa a una elevada morbimortalitat. Aquesta toxicitat podria estar justificada quan es tracta de salvar la vida de certs pacients (per exemple, davant d'una leucèmia que no respon a la quimioteràpia), però en altres situacions, com són la majoria de malalties hereditàries que afecten al sistema hematopoètic, la relació risc/benefici és molt més dubtosa, si no clarament desfavorable.

En el cas de la TG hematopoètica per a malalties hereditàries no hi ha necessitat d'eliminar cap tumor. A més, les cèl·lules per trasplantar són autòlogues i, si bé la pròpia modificació genètica els pot fer expressar gens potencialment immunogènics, la necessitat d'immunosupressió és molt menor o nul·la, i la mieloablatió només es requeriria per "crear" espai a la medul·la òssia per a les cèl·lules trasplantades. Per això, l'aplicació de la TG en el sistema hematopoètic passa necessàriament per la recerca de tractaments condicionadors d'intensitat reduïda que facilitin l'empelt, però que no comprometin la salut del receptor.

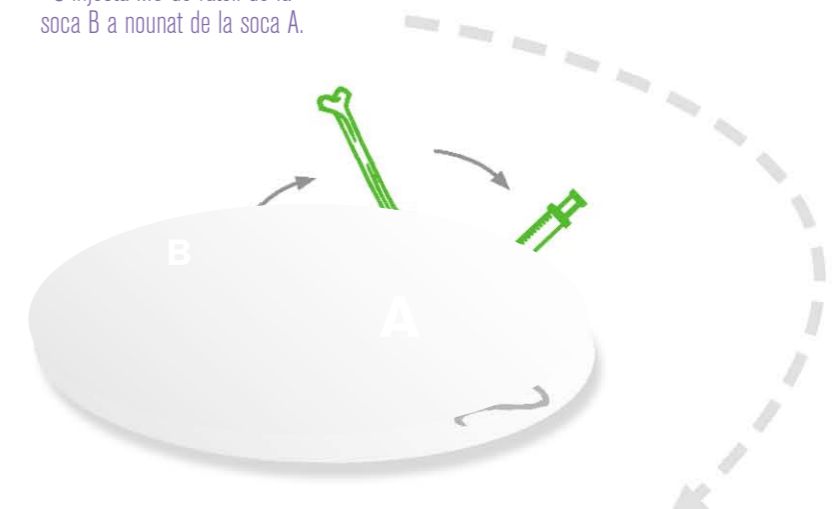
La descoberta de Medawar

De la mateixa forma que les vacunes indueixen o augmenten una resposta defensiva específica davant un determinat patògen, en el cas d'una malaltia autoimmunitària en la qual s'ha perdut la tolerància davant un o diversos autoantígens, una estratègia podria consistir en reeducar el sistema immunitari perquè deixi de reaccionar davant aquests antígens propis i es restauri la tolerància perduda. Fa més de mig segle, un investigador d'origen àrab, ciutadà del Regne Unit, Peter Brian Medawar, va establir mitjançant elegants experiments les bases de la tolerància immunològica (6), troballa per la qual se li va concedir el Premi Nobel de Medicina de 1960. A finals dels anys 70, Slavin *et al.* van demostrar que el quimerisme induït per la infusió de medul·la òssia al·logènica després de la irradiació limfoide total en ratolins adults s'associava a tolerància davant d'empelts cutanis de donants de la mateixa soca, però no d'una altra, una prova de què s'estava induint tolerància específica davant d'al·loantígens del donant, i de què les cèl·lules de la medul·la òssia albergaven la clau per crear aquesta tolerància (7).

Experiment de Medawar (1953)

Setmana 0

S'injecta MO de ratolí de la soca B a nounat de la soca A.



Setmana 6

Es trasplanta pell de les soques B i C al ratolí (ja adult) de la soca A.



Setmana 7

La pell de la soca B és acceptada, la de la soca C és rebutjada.





Els ratolins transgènics constitueixen una extraordinària eina en biomedicina. En àrees com el trasplantament, la teràpia cel·lular o la medicina regenerativa, la utilització de cèl·lules o òrgans de ratolins que expressen proteïnes fluorescents i altres marcadors permet conèixer el destí de les cèl·lules trasplantades.

© Imatge cedida pel Research Institute for Microbial Diseases de la Universitat d'Osaka.

En l'àmbit de la TG per a malalties hereditàries, la introducció de gens que codifiquen per a proteïnes que el sistema immunitari del receptor mai ha "vist" anteriorment, pot induir respostes immunitàries, com demostren multitud d'estudis experimentals preclínic i clínic. De forma anàloga al que passa amb els quimerismes mixtes donant/receptor, els quimerismes moleculars estables, consistents en la coexistència en un mateix individu de cèl·lules hemopoètiques que expressen transgens amb altres que no ho fan, s'associen a tolerància immunològica davant dels productes d'aquests transgens, ja que els potencials antígens codificats pels transgens seran presentats i reconeguts com si fossin propis. El problema és que, per crear quimerisme molecular en el sistema hematopoètic, és necessari modificar genèticament les CMH autòlogues *ex vivo* i trasplantar-les, un procediment que, com ja hem vist, requereix tractaments condicionadors altament tòxics.

Resultats amb EGFP

Utilitzant un model murí de trasplantament de cèl·lules hemopoètiques transduïdes amb un gen potencialment immunogènica com el de la proteïna fluorescent verda (EGFP), el nostre grup va descriure que la quantitat de mieloablació que rebien els receptors prèvia

al trasplantament es correlacionava amb els nivells d'empelt a llarg termini d'una forma dosi depenent, i que, com ja s'havia descrit, una dosi baixa de cèl·lules trasplantades, i la manipulació *ex vivo* de les cèl·lules de la medul·la òssia, tenien un impacte negatiu sobre els nivells d'empelt a llarg termini (8).

Tot i això, en aquests experiments, vam observar un detall aparentment nimí, però que ens va semblar ple de significat. Els percentatges de cèl·lules procedents del donant que expressaven el transgen (EGFP) en els teixits hematopoètics (sang, melsa i medul·la òssia) dels animals trasplantats eren independents de la quantitat de mieloablació administrada i que, fins i tot en ratolins experimentals que havien rebut pautes mínimament mieloablatives (2-3 Gy de radiació), i que presentaven nivells molt baixos de quimerisme del donant (inferiors a l'1% de les cèl·lules de la medul·la òssia), es mantenien les proporcions de cèl·lules transduïdes a nivells similars als dels ratolins sotmesos a mieloablació letal (9 Gy), la qual cosa suggeria que molt probablement n'hi havia prou amb nivells de quimerisme molecular molt baixos (< 1%) per a què s'induís tolerància davant el producte d'un transgen (8). Davant d'aquests descobriments vam decidir explorar el potencial de la creació de microquimerismes moleculars com a estratègia per induir tolerància antígen-específica a llarg termini en situacions de major interès clínic, com les que es donen en persones que reben teràpies substitutives, teràpia gènica o en certes malalties autoimmunitàries. L'avantatge del microquimerisme sobre el macroquimerisme és que, per crear-lo, es necessita una quantitat molt menor de condicionament, que té com a resultat una menor toxicitat.

Malalties amb autoantígens coneguts

En la majoria de malalties autoimmunitàries humanes es desconeixen els antígens que inicien o contra els quals va dirigit l'atac immunitari. Malgrat tot, existeixen models experimentals que reproduïen amb certa fidelitat la malaltia humana i en els quals els autoantígens sí són coneguts. Un exemple d'aquests és l'anomenada encefalomièlitis autoimmunitària experimental, o EAE, un model d'esclerosi

múltiple en rosegadors, en el qual la malaltia s'indueix experimentalment immunitzant amb determinats antígens que formen part de la beina de mielina de cèl·lules del sistema nerviós central, com per exemple el pèptid 40-55 de la glicoproteïna mielínica dels oligodendrocits, o MOG₄₀₋₅₅. En col·laboració amb membres de la Unitat de Neuroimmunologia Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, grup de referència i amb una dilatada experiència en el tema, vam postular que expressant el citat pèptid en les cèl·lules hemopoètiques dels ratolins experimentals s'induiria tolerància davant del citat autoantigen i es previndria o milloraria la malaltia. Per confirmar-ho, vam utilitzar vectors retrovírics per introduir la seqüència del pèptid MOG₄₀₋₅₅ de manera estable en les CMH de ratolins sotmesos a pautes mínimament mieloablatives.

Els resultats fins al moment indiquen que el microquimerisme molecular amb l'autoantigen (és a dir, expressat en menys de l'1% de les cèl·lules sanguínies), es tradueix en una marcada protecció davant la malaltia experimental. Malgrat això, a la pràctica, una estratègia preventiva d'aquest tipus no serveix de molt en la clínica humana, doncs ningú se sotmet a cap tractament abans de què se li diagnòstiqui la malaltia. Per això, aquesta estratègia només es podrà utilitzar si funciona també de manera terapèutica, és a dir, en individus en els que ja s'hagi desenvolupat la malaltia. Quan realitzem els experiments

Referències

- (1) Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., et al. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288:669-672.
- (2) Aiuti A., Slavin S., Aker M., et al. (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 296:2410-2413.
- (3) Cavazzana-Calvo M., Thrasher A., Mavilio F. (2004) The future of gene therapy. *Nature*, 427:779-781.
- (4) Baum C., Von Kalle C., Staal F.J., et al. (2004) Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol. Ther.*, 9:5-13.
- (5) Jankowski R.A., Ildstad S.T. (1997) Chimerism and tolerance: from freemartin cattle and neonatal mice to humans. *Hum Immunol.*, 52:155-161.
- (6) Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B. (1953) Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172:603-606.
- (7) Slavin S., Strober S., Fuks Z., et al. (1976) Long-term survival of skin allografts in mice treated with fractionated total lymphoid irradiation. *Science*, 193:1252-1254.
- (8) Puig T., Kadar E., Limon A., et al. (2002) Myeloablative enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther.*, 9:1472-1479.
- (9) Alderuccio F., Murphy K., Toh B.H. (2003) Stem cells engineered to express self-antigen to treat autoimmunity. *Trends Immunol.*, 24:176-180.

de forma terapèutica –trasplantant cèl·lules hemopoètiques que expressaven el pèptid MOG₄₀₋₅₅–, hem observat millores clíniques significatives en els grups de ratolins tractats amb la TG, però no en els grups control. Tot i això, en aquest cas no s'arriba a produir quimerisme molecular estable. Les cèl·lules que expressen MOG₄₀₋₅₅ són detectables durant 2 o 3 setmanes després del trasplantament, però deixen de ser-ho a llarg termini, la qual cosa suggereix que són eliminades, ja que els animals malalts ja tenen una resposta immune davant el pèptid antigènica que eventualment resultarà en un rebuig immunològic. Malgrat tot, la seva simple presència, encara que sigui transitòria, es tradueix en un cert benefici terapèutic. En aquest moment estem investigant el possible mecanisme pel qual les cèl·lules trasplantades milloren les manifestacions clíniques dels ratolins amb EAE.

Com ja s'ha esmentat, una de les limitacions d'aquesta estratègia és que demana conèixer l'antigen (o antígens) contra els que s'ha produït la resposta autoimmunitària. Són poques les malalties autoimmunitàries amb aquest requisit, però cada dia se'n coneixen més, i és presumible que, en un futur no molt llunyà, s'arribin a caracteritzar els autoantígens responsables en totes elles (9). Per últim, una altra de les potencials aplicacions d'aquesta estratègia és la inducció de tolerància en teràpies gèniques no hemopoètiques en les que el producte del transgen pot resultar immunogènica.

Jordi Barquineró Mané



Es va llicenciar en Medicina a la Universitat Autònoma de Barcelona l'any 1982. Especialitzat en Medicina Interna el 1989 i Premi Extraordinari de Doctorat el 1992 a la mateixa universitat, va fer unes estances a la Universitat de Louisville el 1990 i al Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle de 1992 a 1994. Durant gairebé deu anys va ser col·laborador del suplement de ciència i medicina de La Vanguardia i, també en el terreny de la divulgació, el 1995 va rebre, juntament amb Antonio Salgado, el Premi Boehringer al millor article divulgatiu sobre Biotecnologia en Medicina. Investigador a l'Institut de Recerca Oncològica (IRO) (1995-2001) i investigador FIS al Centre de Teixits i Teràpia Cel·lular (BST) / IRHUVH de Barcelona (des de 2001), les seves investigacions s'han centrat en l'autoimmunitat i la teràpia gènica en cèl·lules mare hemopoètiques, àrees sobre les quals és, o ha estat coautor, de més de seixanta articles científics.