

Promeses i perills de la teràpia gènica: gegants o molins de vent?

Jordi Barquineró

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Correspondència: Jordi Barquineró. Vall d'Hebron Institut de Recerca. Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. Adreça electrònica: jordi.barquineró@vhir.org.

DOI: 10.2436/20.1501.02.167

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 29/12/2015

Acceptat: 11/02/2016

Resum

Després de vint-i-cinc anys plens d'alts i baixos, la teràpia gènica ha arribat a la majoria d'edat com a disciplina científica, i ja no en diem que és una possibilitat futura molt atractiva, sinó que és una realitat que està curant i millorant la qualitat de vida d'un nombre cada vegada més alt de pacients. Aquest camí tortuós, però, ha anat acompanyat d'un debat bioètic paral·lel íntimament relacionat amb les peculiaritats i l'essència mateixa d'aquesta disciplina. Moltes de les pors inicials enfront al que aleshores era desconegut s'han anat esvainent, però n'han anat apareixent d'altres com ara la constatació dels perills i els riscos oncogènics dels vectors integratius, els elevats costos dels primers productes que han estat comercialitzats o l'ús cosmètic de les eines de teràpia gènica. Més recentment, a la llum del descobriment d'unes noves eines per fer edició gènica o genòmica d'una manera eficient, ha reaparegut el vell debat entorn de la possibilitat de fer teràpies gèniques en la línia germinal, un tema que ha estat tabú i, de fet, explícitament prohibit en la majoria de països que han legislat al respecte.

Paraules clau: Teràpia gènica, bioètica, teràpia gènica germinal, edició genòmica.

Promises and hazards of gene therapy: giants or windmills?

Summary

After 25 years of ups and downs, gene therapy has reached adulthood as a scientific discipline and we no longer say that it is an attractive future possibility but rather a reality that is healing and improving the quality of life of an increasing number of patients. This winding road, however, has been accompanied by a parallel bioethical debate that is closely related to the peculiarities and the very essence of this discipline. Many of the initial fears about what was then known have already faded, but others have emerged such as the realization of the dangers and risks of the use of oncogenic integrative vectors, the high costs of the first products that have reached the market or the cosmetic use of gene therapy tools. More recently, in light of the discovery of new and efficient tools for gene or genome editing, the old debate about the possibilities of germ-line gene therapy has reemerged, a subject that has been taboo and indeed explicitly prohibited in most countries that have legislated on this subject.

Keywords: gene therapy, bioethics, germ gene therapy, genome editing.

Introducció

Poques disciplines han generat controvèrsies tan intenses com les relacionades amb la genètica, la reproducció i les neurociències, potser perquè tenen a veure amb el que molts percebem com la nostra essència més íntima. Probablement també té alguna cosa a veure el vertigen que ens produeix l'acceleració amb què avança el coneixement en aquestes àrees, i la por que ens suscita la possibilitat que algú pugui fer un mal ús d'aquests coneixements, sense comptar que encara arrosseguem fantasmes d'esdeveniments històrics relativament recents. Exemples paradigmàtics d'aquests debats són l'eugenèsia, la biotecnologia, el clonatge, la teràpia gènica (TG) o l'ús de cèl·lules mare procedents d'embrions. Des del moment que els humans vam disposar d'eines per modificar les molècules portadores d'informació genètica (el DNA), fins al desenvolupament i utilització cada vegada més habitual d'organismes transgènics, la biotecnologia ha estat una de les àrees més sensibles en el debat bioètic. Aquestes pors ja havien generat una conferència internacional a Asilomar (Califòrnia)

l'any 1975, quan els experts i la societat es van adonar del potencial del DNA recombinant. Arran d'aquesta conferència es va consensuar una moratòria, basada en el principi de precaució, en relació amb l'ús i aplicació d'aquesta nova tecnologia. Més tard va aparèixer la TG, un dels darrers exemples de disciplina que la societat considera material altament sensible, que en els seus inicis era percebuda com a potencialment beneficiosa però alhora feia por perquè les seves conseqüències eren desconegudes. Les mateixes pors s'havien produït quan es van començar a fer els primers trasplantaments d'òrgans, un quart de segle abans, i sens dubte tornaran a produir-se en el futur davant de nous avenços que encara han de venir.

La TG no és una única estratègia perfectament definida i estudiada, i inclou diferents tipus d'eines, diferents tipus de teixit diana, i diferents estratègies, que a més estan en contínua evolució. Pel que fa a les eines, els vehicles que s'utilitzen per introduir material genètic en les cèl·lules, els vectors, habitualment deriven de virus, i poden ser integratius o no integratius,

depenent de si el seu material genètic és inserit o no en el genoma de les cèl·lules hoste. Els primers (per exemple, els derivats dels retrovirus) són més eficaços quan es tracta de corregir de manera permanent defectes genètics en cèl·lules mare, però comporten dos tipus de risc, l'oncogènesi insercional i la possibilitat de transmissió a la línia germinal.

D'altra banda, en funció de si les cèl·lules diana són somàtiques o germinals la TG es pot classificar en TG somàtica i TG germinal. Atès que els vectors integratius actuals s'insereixen en els genomes de les cèl·lules hoste d'una manera semialeatòria, fins ara no ha estat possible controlar on ho faran, i això ja s'ha demostrat problemàtic, per una banda a causa de la possibilitat esmentada d'oncogènesi insercional i, en l'hipotètic cas que es transdueixin cèl·lules germinals, la possibilitat de modificar el genoma de les futures generacions. Una segona manera de classificar la TG té en compte la manera com s'exposen les cèl·lules o teixits diana als vectors. Segons aquest fet podem distingir entre TG *in vivo* i TG *ex vivo*. En el cas de la TG *ex vivo*, la possibilitat de transmissió a línia

germinal és pràcticament nul·la, ja que els vectors només entren en contacte amb les cèl·lules diana fora de l'organisme, en cultiu, i en el moment de ser readministrades als pacients, els vectors només es troben al seu interior, però no es podran transmetre a altres cèl·lules (per exemple, les germinals). En canvi, en la TG *in vivo* els vectors s'administren directament als pacients de manera local (per exemple, sistema nerviós, retina, múscul) o bé sistèmica (intravenosa), cosa que deixa oberta la possibilitat que arribin a transduir i integrar-se en cèl·lules germinals segons el seu tropisme natural i altres factors propis de l'hoste.

La preocupació social per la TG inclou aspectes bioètics que van des del possible mal ús a l'autonomia dels individus futurs, passant per la justícia distributiva o el seu àmbit d'aplicació, és a dir, l'ús d'aquestes tecnologies per a la «millora» dels individus en lloc de tractar malalties. En el cas de la transducció de la línia germinal, sigui com a objectiu primari o, involuntàriament, com a efecte colateral d'una TG somàtica, les persones que serien objecte del procediment encara no han nascut, i per tant genera un conflicte amb el principi bioètic d'autonomia. Atesa la seva enorme transcendència, deixarem la discussió sobre la TG germinal per al final d'aquest article.

Mala conducta

Abans que s'iniciessin els primers assaigs clínics controlats de TG, abans fins i tot que apareguessin els primers vectors vírics que garanteixin una eficiència mínima, aquesta incipient disciplina ja es «va estrenar» amb un esdeveniment força desafortunat. L'any 1980, el doctor Martin Cline, un hematòleg i brillant investigador de la Universitat de Califòrnia a Los Angeles, va convèncer col·legues d'Itàlia i Israel per tractar en aquests països dues pacients afectes de talassèmia, una anèmia hereditària causada per mutacions en el gen que codifica una de les subunitats de l'hemoglobina. El doctor Cline tenia experiència en trasplantament hemopoètic i, en una època en què s'estava iniciant la tecnologia del DNA recombinant, malgrat que els vectors vírics encara no estaven disponibles, volia aplicar una idea molt simple: incubaria les cèl·lules de la medulla òssia dels pacients amb el gen en qüestió i després seleccionaria les cèl·lules que l'havien incorporat gràcies a un segon gen que conferia resistència al metotrexat i permetia fer aquesta selecció *ex vivo*, com havia demostrat prèviament en ratolins, en els quals havien assajat una teràpia similar amb èxit. El problema és

que el doctor Cline no havia comunicat a cap dels cinc comitès ètics implicats en l'assaig que utilitzaria DNA recombinant per tractar els pacients, ni per descomptat ho va fer a les autoritats sanitàries del seu país. L'assaig no només no va funcionar, sinó que a més va posar en risc els dos pacients tractats i va jugar amb unes substàncies de què es desconeixien els possibles efectes. L'excés d'ambició de Cline va ser castigat i se li va retirar la llicència per exercir la medicina al seu país (Beutler, 2001).

Quasi dues dècades més tard, el 1999, quan la TG encara era una disciplina molt jove, va tornar a ser el centre d'atenció a causa d'un altre trist esdeveniment. Jesse Gelsinger tenia divuit anys i patia una deficiència de l'enzim ornitina-transcarbamilasa, una malaltia del fetge en la qual subjeu una incapacitat de metabolitzar l'amoni, subproducte del metabolisme dels aminoàcids. Encara que la malaltia sol ser mortal en la infància, Jesse patia una forma més lleu que li permetia gaudir d'una qualitat de vida decent seguint una dieta estricta i medicació. Amb tot, va ser reclutat en un assaig clínic de TG que feia la Universitat de Pennsilvània. Gelsinger va ser tractat amb un vector adenovíric portador d'una versió normal del gen responsable de la malaltia, i que tenia com a òrgan diana el fetge. Després de ser-li administrada la dosi més alta del vector, va desenvolupar una resposta inflamatòria exacerbada que li va produir una fallada multiorgànica i la mort quatre dies més tard. La investigació duta a terme per les autoritats de la FDA va concloure que el responsable de l'assaig, el doctor James Wilson i el seu equip, havien actuat amb negligència. Concretament, havien inclòs Gelsinger com a substitut d'un altre voluntari que s'havia fet enrere, tot i que pels seus nivells plasmàtics d'amoni hauria estat exclòs de l'assaig. A més, la Universitat no va informar degudament del fet a les autoritats sanitàries. Es van detectar fallades en el document del consentiment informat, en el qual no es discutia clarament sobre la mort de micos que havien estat exposats a un tractament similar. Finalment, també va sortir a la llum l'existència d'un clar conflicte d'interessos en saber-se que l'investigador principal del projecte, el doctor Wilson, tenia invertides quantioses sumes de diners en la companyia Genovo, una empresa privada que clarament es podia beneficiar dels resultats d'aquell assaig. Tot i que la Universitat va discrepar en alguns d'aquests punts, els pares de Jesse van rebre una generosa compensació econòmica i el doctor Wilson va ser desacreditat per la comunitat científica.

Aquest darrer exemple de mala conducta va ser força airejat en els mitjans de comunicació i va representar una greu estocada per a la TG, que a més, després de quasi deu anys de proves, encara no havia donat cap resultat positiu. Però en molt poc temps la situació va fer un gir inesperat, i l'any 2000 la revista *Science* va publicar el primer èxit inqüestionable de la TG. Els resultats d'un assaig clínic fet en nens afectats d'un tipus d'immunodeficiència combinada greu lligada al cromosoma X parlaven d'autèntiques curacions (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). En aquest assaig, fet a França, s'havia aplicat una teràpia *ex vivo* i utilitzava com a teixit diana cèl·lules mare hemopoètiques, que des de feia dècades es podien trasplantar amb èxit, i com a vectors retrovirus convencionals. Malauradament, a partir de l'any 2003, entre la cohort de nens tractats en aquest assaig van començar a aparèixer casos de leucèmia, que van acabar afectant un total de cinc dels setze nens tractats. Immediatament les autoritats sanitàries van aturar els assaigs que implicaven l'ús de vectors integratius a tot el món, i els investigadors implicats van dur a terme una recerca del que havia passat, que va ser un exemple de transparència i de rigor. Es va trobar que les leucèmies havien estat induïdes per insercions del vector retrovíric en punts del genoma propers a oncogens, principalment un d'anomenat *LMO2*, que havien resultat activats pel vector i havien transformat les cèl·lules en canceroses (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). També es va observar l'aparició de leucèmies en un altre assaig clínic per la síndrome de Wiskott-Aldrich, un altre tipus d'immunodeficiència greu en el qual s'utilitzava un vector similar (Boztug *et al.*, 2010). En canvi, no s'han descrit casos de transformació maligna en cap altre assaig clínic de TG, incloent-hi alguns que també utilitzaven el mateix tipus de vectors integratius, com ara els dirigits a tractar un altre tipus d'immunodeficiència causat per la deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa (ADA), i que actualment es considera un èxit rotund de la TG (Aiuti *et al.*, 2002). Malgrat l'aparició d'aquestes complicacions, en molts casos la relació risc/benefici encara resulta favorable a la TG, tenint en compte que les úniques alternatives terapèutiques disponibles (com el trasplantament hemopoètic a partir d'un donant no emparentat), sovint provoquen complicacions més greus que les observades amb la TG. Cada any es fan centenars d'assaigs clínics amb nous medicaments a tot el món, i dels voluntaris sans, sovint remunerats, i dels pacients que hi participen, molts

pateixen efectes adversos sovint imprevisibles, i de vegades greus o fins i tot letals. En general els mitjans de comunicació no solen parlar gaire d'aquests fets, si és que es fan públics. Aquesta incertesa, que és una característica intrínseca dels assaigs clínics, pot semblar que violi el principi de no-maleficència pel que fa a aquests afectats, però això es justifica pel fet que teòricament els resultats obtinguts poden proporcionar un benefici superior que justifiqui els riscos. Encara que no ens agradi, ara com ara els assaigs clínics són necessaris perquè es produeixin avenços en el coneixement mèdic, i la història ens demostra que el progrés es basa massa sovint en la prova-error. La societat entén que aquests riscos són un peatge obligat i ho accepta per aconseguir un possible benefici superior. Però amb la TG, que juntament amb la teràpia cel·lular es considera una teràpia avançada, els nivells d'exigència reguladora però que s'apliquen als medicaments tradicionals, i la tolerància davant possibles errors o desviacions és menor, en part per la naturalesa mateixa d'aquests medicaments tan heterogenis (Flory *et al.*, 2013).

Medicina de la millora. Objectiu: el perfeccionament humà

Algunes preocupacions respecte a la TG tenen a veure amb els límits relatius al seu àmbit d'aplicació. En el nostre entorn pràcticament ningú no dubta que la TG està justificada per tractar malalties greus per a les quals no hi ha gaire alternatives, o bé si el cost d'aquestes és molt alt, ja que el risc quedaria compensat pels beneficis potencials. En el que probablement ja no estarien tant d'acord és en el fet que també estigui justificat aplicar la TG per millorar trets humans bàsics com la bellesa física, l'alçada, la intel·ligència o la capacitat atlètica, el que alguns han anomenat *medicina* o fins i tot *teràpia de millora*, encara que estrictament no són teràpies, i llavors seria més correcte parlar de *intervencions genètiques de millora*. Entre aquestes dos tipus d'aplicacions hi ha una bona distància, però entremig queda un ampli territori de límits difusos, que inclouria malalties lleus, prevenció, reducció de factors de risc de malalties, per exemple per reduir pes, mitigar els efectes d'envelliment o lluitar contra la calvicie. Però qui decideix quins trets són normals i quins constitueixen una discapacitat o trastorn? Si comencéssim acceptant aquestes pràctiques com a adequades estariem davant d'un pendent rellescós que comporta el risc que potser no podríem posar el fre abans que s'hagi arribat massa lluny. Exemples passats d'aquests

pendents rellicosos són, per exemple, la cirurgia estètica, que en els seus inicis plantejava dubtes relatius al seu ús amb finalitats no mèdiques, però que avui dia és una pràctica rutinària acceptada socialment en molts països, encara que provoca problemes seriosos a moltes persones; però, qui vol renunciar als drets i llibertats individuals que ja s'han aconseguit?

El temps ho haurà de confirmar, però l'experiència ens demostra que quan les tecnologies arriben a ser suficientment segures i assequibles, s'acaben imposant i són acceptades en aplicacions de millora, i llavors és molt probable que les eines de la TG també acabin per aplicar-se a aquest fi. Aquesta noció de la intervenció genètica per a la millora o el perfeccionament humà entronca amb el transhumanisme, un moviment intel·lectual que defensa la utilització de la tecnologia per tal de millorar la condició humana des dels punts de vista físic, psicològic e intel·lectual, una evolució que ens portaria a convertir-nos en posthumans. El terme *transhumanisme* va ser proposat l'any 1957 pel biòleg Julian Huxley, germà de l'escriptor Aldous Huxley, i el va conceptualitzar d'aquesta manera: «Fins ara la vida humana ha estat, en general, com Hobbes la va descriure, “desagradable, brutal i curta”; la gran majoria dels éssers humans (si no han mort joves) han estat afectats per la misèria [...]. Podem sostenir justificadament la creença que existeixen aquests horitzons, i que les limitacions actuals i frustracions miserables de la nostra existència podrien ser en gran manera suportades [...]. L'espècie humana pot, si ho desitja, transcendir-se a si mateixa —i no només de manera esporàdica, un individu aquí d'una manera, un individu allà d'una altra manera, sinó en la seva totalitat, com a humanitat» (Huxley, 1957).

Desigualtat

Un altre debat bioètic que planteja la TG és que, a causa dels alts costos econòmics, el seu model comercial dominant molt probablement contribuirà a augmentar les diferències entre els països i entre les persones. Això també ha passat i està passant amb altres tipus de serveis mèdics, diagnòstics o terapèutics, cada vegada més sofisticats i cars, com els trasplantaments, els medicaments biològics o els antivírics per tractar la hepatitis C o la infecció per HIV, i per això és previsible que no seran accessibles en molts països, ni tan sols per a una majoria de persones dins els països econòmicament més avançats. En aquest sentit, la TG no és diferent d'altres tractaments més tradi-

cionals, encara que molt probablement serà més cara i complexa que aquests. Com a contrapartida, la TG ofereix la possibilitat de curar molts pacients en una única intervenció, i evitar així tractaments sovint cars que a més s'han d'administrar durant tota la vida, per la qual cosa el seu cost/benefici serà generalment favorable a la TG.

Tradicionalment els avenços més importants en TG han estat fruit del treball de grups acadèmics en hospitals, universitats, centres públics de recerca o bé petites empreses, que durant anys han generat idees i les han validades en models preclínics i, en molts casos, fins i tot en assaigs clínics promoguts per aquests mateixos grups amb finançament públic. Però arribat un punt (habitualment l'assaig clínic de fase 3), aquests grups ja no poden assumir els elevats costos que representa la fabricació de grans estocs de vectors en condicions GMP (*good manufacturing practice*), obligatòries quan aquests vectors han de ser aplicats a humans. Tant els productes de TG com de teràpia cel·lular es consideren medicaments de teràpies avançades, i com a tals estan sotmesos a una forta regulació que per a molts d'aquests grups acadèmics és una llosa que frena enormement el progrés en aquesta àrea. Malgrat tot, un cop demostrat que la TG en qüestió funciona, generalment entren en acció les mitjanes o grans companyies farmacèutiques, que sí que tenen la capacitat i l'experiència necessàries per a aquesta mena de desenvolupaments. Així ha estat en el cas del primer medicament de TG aprovat a Europa, l'INN-alipogene tiparvovec (Glybera®), un vector basat en un virus adenoassociat (AAV) que cal administrar per via intramuscular en tres dosis després d'immunosuprimir el pacient, i que està indicat en pacients amb deficiència hereditària de l'enzim lipoproteïna lipasa. El cost d'aquest tractament supera el milió d'euros per pacient, una xifra que està fora de l'abast de la majoria d'afectats. Molt recentment s'ha comercialitzat a Europa un segon producte, Strimvelis, per tractar la immunodeficiència combinada greu deguda a la deficiència de l'enzim ADA.

Altres exemples de productes de TG que s'estarien a prop de comercialitzar són els utilitzats en estratègies de TG que ja han demostrat que funcionen clínicament i que en molts casos són un model a seguir per abordar altres malalties. En el moment d'escriure aquestes línies (octubre de 2016) podríem dir que hi ha diferents exemples de models d'èxit en TG (Naldini, 2015), la dirigida a cèl·lules mare hemopoètiques basada en vectors integratius

ex vivo, la basada en administració de vectors AAV a la retina (Simonelli *et al.*, 2010), els ma-teixos AAV administrats sistèmicament però dirigits transcripcionalment al fetge com els utilitzats en pacients amb hemofília B (Nath-wani *et al.*, 2011) o bé els administrats via in-traràquidea (per exemple, els nens amb atròfia muscular espinal), i la basada en cèl·lules T au-tòlogues transduïdes amb receptors quimèrics d'antigen (CAR), que ja s'ha demostrat molt eficaç en diferents tipus de leucèmies B (Maus *et al.*, 2014). Caldrà veure si quan es comercia-litzen aquests productes estaran a l'abast de la majoria de pacients.

TG versió 2.0: edició genòmica (EG)

Al llarg dels darrers vint-i-cinc anys, la TG s'ha basat en estratègies que el que pretenen és in-

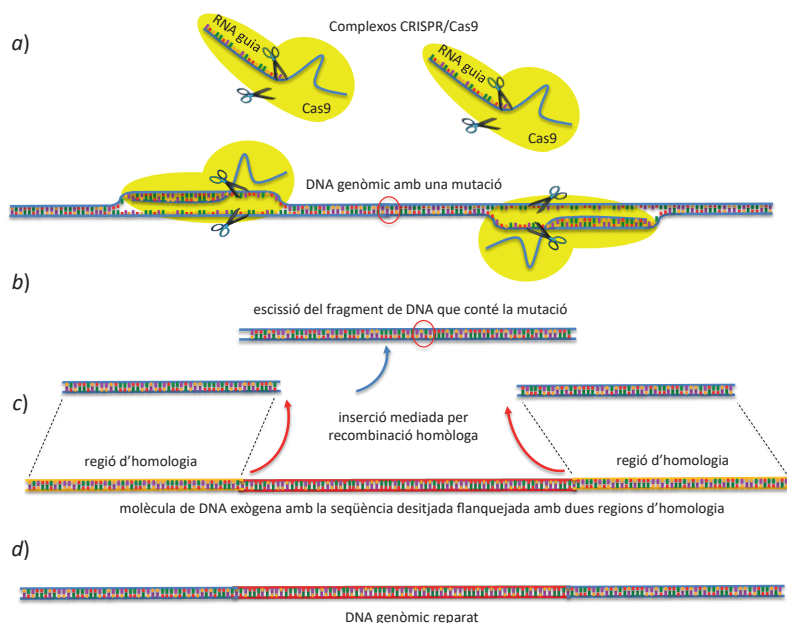
.....
 † Figura 1. Exemple de com es podria substituir un fragment de DNA genòmic afectat per una mutació per una seqüència normal. Els complexos CRISPR/Cas9 contenen la nucleasa (Cas9) acoblada a molècules de RNA guia, que han estat dissenyades perquè s'uneixin específicament a seqüències que flanquegin la mutació (a). Una vegada units a aquestes seqüències la Cas9 s'activarà i tallarà la doble cadena de DNA, en aquest cas per dos llocs diferents, i alliberarà el fragment que conté la mutació (b). Tot aquest procés activa la maquinària cel·lular reparadora del DNA, que, en presència de molècules de DNA aportades exògenament i que continguin seqüències amb homologia amb els extrems lliures del DNA genòmic, facilitarà la unió d'aquestes regions homòlogues i la inserció de la seqüència desitjada (c), que substituirà la que contenia la mutació (d).

.....

troduir còpies normals d'un transgèn o altres seqüències terapèutiques en un teixit diana per tal que s'expressin, generalment, a llarg termi-ni. La TG actual que coneixem es tracta, doncs, d'una TG additiva que, en el cas d'utilitzar vec-tors integratius, de cap manera no permet diri-gir les seqüències terapèutiques a localitza-cions del genoma desitjades, ni tan sols a regions més o menys segures allunyades d'on-cogens (*safe harbors*), ja que els punts d'inser-ció són pràcticament aleatoris. D'aquest fet deriva el risc d'oncogènesi insercional i, en el cas de la TG *in vivo*, que es produeixin possi-bles modificacions en el genoma de les cèl·lules germinals. Però la TG ideal, la que en el fons sempre ha estat en la ment dels investigadors, seria una TG que corregís els defectes genètics directament sobre les mutacions, la qual cosa permetria una expressió fisiològica i més segu-ra, cosa que alguns han anomenat cirurgia del genoma o edició genòmica (EG) (vegeu la fi-gura 1). No és que fins ara no hagin existit, conceptualment, estratègies per aconseguir aquest adreçament específic en el genoma. La idea d'utilitzar la recombinació homòloga (RH), que explota l'existència de mecanismes presents en les cèl·lules per reparar el DNA, entre altres funcions, és fins i tot anterior a la TG (Folger *et al.*, 1982). El principal obstacle era la baixa eficiència del procés. Es va descobrir que aquesta eficiència de la RH podia incremen-tar-se en diversos ordres de magnitud si es generaven talls en la doble cadena de DNA, els anomenats DSB (*double strand breaks*). Per produir aquests talls amb una mínima especi-ficitat es disposa d'una sèrie d'enzims, les me-

ganucleases, que, introduïdes o expressades en cèl·lules, produïen DSB, fet que activava la ma-quinària reparadora cel·lular i millorava nota-blement la RH.

Els darrers anys han estat molt intensos en el desenvolupament d'eines per a l'EG, des de l'aparició el 2002 de les nucleases en dit de zinc (*zinc-finger nucleases*) (Bibikova *et al.*, 2002), les TALEN (*transcription activator-like ef-fector nuclease*) el 2011 (Zhang *et al.*, 2011) o les més recents CRISPR/Cas9 al 2012 (Jinek *et al.*, 2012). Es tracta de molècules que contenen dos elements fonamentals: una nucleasa que pot tallar una o les dues cadenes de la molècula de DNA, i una subunitat de reconeixement que permetrà dirigir la nucleasa específica-ment a seqüències concretes del genoma, de manera que els talls que faci en aquests punts activaran la maquinària cel·lular reparadora del DNA. En el cas de les ZFN i les TALEN, aquest reconeixement es fa a través de proteï-nes modulars, en les quals cada mòdul reconeix (i s'hi uneix de manera específica) un triplet de nucleòtids concret (en les ZFN) o un nucleòtid concret (en les TALEN), de manera que poden ser dissenyades per reconèixer i unir-se pràcticament a qualsevol seqüència d'interès. Pel que fa a les CRISPR/Cas, els ele-ments de reconeixement es basen en RNA que s'uneixen directament a la nucleasa, i són molt més fàcils de dissenyar i produir. Des de lla-vors, la tecnologia s'ha aplicat amb èxit per editar genomes de bacteris, insectes, plantes, peixos, animals de granja, primats no humans (Niu *et al.*, 2014) i, en un estudi recent molt controvertit, d'embrions humans, encara que els resultats no han estat massa satisfactoris quant a eficiència i seguretat (Liang *et al.*, 2015). Atès que les seqüències guia (de reconeixement) per a aquestes nucleases es poden fabricar a mesura per reconèixer i tallar pràcti-cament qualsevol seqüència de nucleòtids, teòricament és factible dirigir aquestes tisores moleculars a qualsevol punt del genoma, on la nucleasa tallarà la doble cadena, o bé, utilitzant una versió modificada, només una de les dues cadenes de DNA. Aquests trencaments poden activar en la cèl·lula dos tipus de maquinària reparadora: a) la que resulta en la unió d'ex-trems no homòlegs, i que en un percentatge molt alt dels casos dona lloc a insercions o de-lecions (*indels*) en el lloc de la ruptura (cosa que generalment resulta en la inactivació del gen afectat), o b) la RH, que pot conduir a l'ac-tivació, la inactivació o, si es proporciona una molècula de DNA que pugui fer de plantilla, a la inserció d'aquest DNA en el punt de tall, de



manera que amb aquestes tecnologies teòricament és possible modificar quasi qualsevol seqüència genòmica.

D'altra banda, una de les limitacions més crítiques és que la nucleasa no sempre talla exclusivament en el lloc desitjat, i també pot reconèixer i tallar en altres seqüències que tinguin homologia amb la desitjada però fora de l'objectiu o diana (els anomenats efectes *off-target*) (Hsu *et al.*, 2013), fet que pot tenir conseqüències imprevisibles. També es coneix molt poc sobre com l'epigenètica (per exemple, la metilació del DNA) pot afectar l'escissió de les nucleases o, inversament, com s'altera l'estat epigenètic del genoma de les cèl·lules com a conseqüència de l'acció de les diferents eines d'EG, tots aspectes clau que encara han de ser investigats en profunditat.

Així, amb l'EG s'ha aconseguit, des del canvi d'un únic o d'uns pocs nucleòtids, fins a la inserció de fragments de DNA de fins a 15 kb en el punt de trencament. Un obstacle addicional per a l'aplicabilitat de l'EG a la clínica és la seva baixa eficiència. En general, el procés requereix fer arribar les nucleases a un gran nombre de cèl·lules, i si s'utilitza la RH, també la d'un vector donant, que no solament han d'arribar als citoplasmes de les cèl·lules, sinó a l'interior dels seus nuclis. Una eficiència de transducció limitada pot no ser un problema important quan es vol fer una TG en cèl·lules somàtiques, però si s'aplica a la línia germinal, porta indefectiblement a la generació de quimeres genètiques, embrions en els quals coexistirien cèl·lules no modificades amb cèl·lules modificades, en les quals a més no es podria assegurar que les modificacions s'haguessin produït en el sentit desitjat, i llavors no es pot garantir que els teixits o òrgans rellevants en la malaltia a tractar derivessin de cèl·lules amb el defecte genètic corregit. En el cas de les malalties hereditàries potencialment tractables mitjançant TG *ex vivo*, especialment en aquelles en les quals les cèl·lules corregides tenen un avantatge selectiu (com en algunes immunodeficiències o l'anèmia de Fanconi), hi hauria una via potencialment més segura basada en la generació de cèl·lules amb pluripotència induïda (iPSC) específiques dels pacients, la correcció del defecte genètic utilitzant eines d'EG i l'anàlisi i selecció dels clons que s'hagin corregit adequadament, i derivar-ne cèl·lules madures «sanes» que podrien ser transplantades al pacient, teòricament sense risc de rebuig. Es tracta d'un canvi qualitatiu, conceptual, que té el potencial per revolucionar, entre moltes altres coses, la manera com es fa la TG,

i és probable que en pocs anys les tecnologies actuals ja siguin obsoletes i en disposem d'altres més segures i eficients. En aquests moments l'EG ja s'ha aplicat a pacients humans en un assaig clínic de TG somàtica que va utilitzar ZFN per alterar el gen que codifica la molècula CCR5, un coreceptor de l'HIV, en les cèl·lules T de pacients infectats per aquest virus, per tal de fer-los resistents a la infecció, i amb la intenció que les cèl·lules resistents al virus acabessin per repoblar el sistema immunitari. Malgrat algunes limitacions, l'assaig ha estat considerat exitós (Tebas *et al.*, 2014). En un estudi més recent s'ha descrit l'eficàcia terapèutica del sistema CRISPR/cas9 per eliminar un exó mutat en cèl·lules musculars en un model murí de malaltia de Duchenne (Nelson *et al.*, 2016).

La fina línia vermella de la TG germinal

Tot això ens porta que reflexionem i ens replantegem de nou els possibles beneficis i els riscos de la TG germinal, la delicada frontera que tothom estava d'acord que no s'havia de travessar quan només disposàvem dels vectors de TG convencionals. Ja hem vist que els recents esdeveniments en tecnologies d'EG ens proporcionen una nova caixa d'eines que en el seu estat actual encara estan molt lluny de ser ideals i aplicables a la clínica a gran escala, però representen un salt qualitatiu molt important respecte a les que hi havia disponibles i que majoritàriament encara es fan servir en TG. És probable que moltes de les limitacions actuals puguin ser superades en els propers anys gràcies a refinaments tècnics, però les bases ja estan assentades i, com diu J. Craig Venter, la pregunta que ara ens hem de fer no és si l'EG s'aplicarà en TG germinal o no, sinó quan es farà. De fet, un article publicat a la revista *Nature Biotechnology* recollia les respostes de vint-i-sis experts a un qüestionari que la revista va fer en relació amb l'EG basada en CRISPR en cèl·lules germinals. Una gran majoria opinava que simplement amb prohibicions, que a més haurien d'aprovar-se a tots els països del món, no s'aconseguiria evitar que aquestes tecnologies s'arribin a aplicar. Alguns es mostren partidaris d'establir una moratòria consensuada i d'altres que es promogui un debat social que determini la idoneïtat i els límits de la investigació i es defineixin raonablement els àmbits d'aplicació. En el cas de la moratòria d'Asilomar i els acords signats, el cert és que molts no van ser respectats (Larrion, 2011), amb el principal argu-

ment que els EUA no es podien permetre perdre el lideratge en aquest terreny, però també és cert que la majoria de les pors i preocupacions inicials es van anar esvaïnt al llarg dels anys posteriors, i vistes en perspectiva ara ens semblen alarmistes i injustificades. Pel que fa a la modificació genètica de les cèl·lules germinals humanes, la moratòria ha perdurat, s'ha anat renovant repetidament en subseqüents reunions i, amb motiu dels descobriments de noves i potents eines per a l'EG, fa poc que han tornat a ser un centre d'atenció. Concretament, al gener del 2015 va tenir lloc una reunió a Napa (Califòrnia) en què divuit experts, incloent-hi científics i bioeticistes, van consensuar desaconsellar qualsevol intent de modificació genètica a la línia germinal per a aplicacions clíniques, però alhora fomentar el debat entre la comunitat científica i bioètica, i promoure la recerca i millora en la seguretat d'aquestes tecnologies d'una manera transparent (Baltimore *et al.*, 2015).

Malgrat l'enorme transcendència del tema, també hi ha detractors del debat. En el cas de la TG germinal i la promesa d'acabar amb la majoria de malalties hereditàries, alguns es pregunten si aquest debat és massa precipitat. Per què cal plantejar el tema ara si ja disposem de maneres d'eradicar la majoria de les malalties hereditàries, sense necessitat de fer servir l'EG? L'abaratiment de la seqüenciació massiva posarà en les mans de cadascú de nosaltres que ho vulgui la informació detallada dels nostres genomes, de les variants al·lèliques i de les mutacions de les quals som portadors. Quan una parella decideix que vol tenir fills, podrà conèixer *a priori* els riscos concrets de transmetre malalties genètiques a la seva descendència i, si el risc ho justifica, tindrà a l'abast la fertilització *in vitro* i el diagnòstic genètic preimplantacional, dues tecnologies que fa temps que han deixat de ser sospitoses o plantejar dubtes de caire bioètic, per poder seleccionar els embrions sans. Ciència-ficció? L'escenari plantejat abans en té una bona dosi, de fet recorda *Gattaca*, la visionària pel·lícula escrita i dirigida per Andrew Niccol el 1997. Però molts opinen que al món hi ha molts altres problemes més importants (superpoblació, fam, canvi climàtic, sostenibilitat, desigualtats socials creixents, guerres, refugiats...) i que els debats sobre la TG germinal, l'EG o el transhumanisme no haurien d'estar en primera línia, ja que encara queden relativament lluny de la nostra realitat. Malgrat tot, no deixen de preocupar a molts altres que opinen que és bo que es comencin a plantejar i se'n

parli obertament atès que, ho vulguem o no, més tard o més d'hora ens els trobarem a la cara. En aquest sentit, la implicació de la societat i la transparència en el debat és absolutament necessària si es vol evitar el que s'ha anomenat «problema Monsanto», la desconfiança o la clara hostilitat que van provocar els organismes modificats genèticament, en gran part a causa de la manca de debat social i transparència quan aquests van aparèixer a la passada dècada dels noranta (Specter, 2015). Esperem que algun dia els humans aprendrem les lliçons de la nostra pròpia història, si més no de la més recent.

Al llarg d'aquesta nostra història com a humans, no hem tingut gaires objeccions a seleccionar les variants genètiques d'altres espècies que més ens afavorien, ni més recentment a modificar-les genèticament també per al nostre benefici propi. I això ens ha permès arribar a una situació de domini quasi absolut sobre les altres espècies i sobre els recursos del planeta, cosa que d'altra banda ens ha portat una superpoblació i greus problemes de sostenibilitat. Ara estem davant la possibilitat de modificar el nostre propi genoma, i ja ho hem començat a fer d'una manera rudimentària amb la TG, que majoritàriament acceptem

perquè creiem que és per una bona causa, en aquest cas curar malalties. Però quan tinguem un coneixement prou ampli dels genomes dels éssers vius i les tecnologies de modificació genètica germinal arribin a ser raonablement segures, el més probable és que se n'accepti l'ús per eradicar malalties genètiques o millorar la salut de la nostra descendència. Però si fem un pas més enllà, seguirem també pensant que és millor deixar a l'atzar com han de ser els nostres fills, o trobarem èticament acceptable la possibilitat de moure els fills voluntàriament per tal que siguin més intel·ligents, més empàtics i físicament més atractius?

Bibliografia

- AIUTI, A. [et al.] (2002). «Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning». *Science*, 296: 2410-2413.
- BALTIMORE, D. [et al.] (2015). «Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification». *Science*, 348: 36-38.
- BEUTLER, E. (2001). «The Cline affair». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 4: 396-397.
- BIBIKOVA, M. [et al.] (2002). «Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases». *Genetics*, 161: 1169-1175.
- BOZTUG, K. [et al.] (2010). «Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome». *N. Engl. J. Med.*, 363: 1918-1927.
- CAVAZZANA-CALVO, M. [et al.] (2000). «Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease». *Science*, 288: 669-672.
- FLORY, E.; REINHARDT, J. (2013). «European regulatory tools for advanced therapy medicinal products». *Transfusion Medicine and Hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 40: 409-412.
- FOLGER, K. R. [et al.] (1982). «Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules». *Mol. Cell Biol.*, 2: 1372-1387.
- HACEIN-BEY-ABINA, S. [et al.] (2003). «LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1». *Science*, 302: 415-419.
- HSU, P. D. [et al.] (2013). «DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases». *Nat. Biotechnol.*, 31: 827-832.
- HUXLEY, J. (1957). «Transhumanism». A: *New bottles for new wine*. Londres: Chatto & Windus, p. 13-17.
- JINEK, M. [et al.] (2012). «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science*, 337: 816-821.
- LARRION, J. (2011). «Historia de las reuniones de Asilomar. Éxitos y fracasos de la autorregulación en las comunidades tecnocientíficas». *Sociología y Tecnociencia: Revista Digital de Sociología del Sistema Tecnocientífico*, 1: 63-83.
- LIANG, P. [et al.] (2015). «CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes». *Protein & Cell*, 6: 363-372.
- MAUS, M. V. [et al.] (2014). «Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies». *Blood*, 123: 2625-2635.
- NALDINI, L. (2015). «Gene therapy returns to centre stage». *Nature*, 526: 351-360.
- NATHWANI, A. C. [et al.] (2011). «Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B». *N. Engl. J. Med.*, 365: 2357-2365.
- NELSON, C. E. [et al.] (2016). «In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy». *Science*, 351: 403-407.
- NIU Y. [et al.] (2014). «Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos». *Cell*, 156: 836-843.
- SIMONELLI, F. [et al.] (2010). «Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18: 643-650.
- SPECTER, M. (2015). «Can CRISPR avoid the Monsanto problem?». *The New Yorker* (12 novembre).
- TEBAS, P. [et al.] (2014). «Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV». *N. Engl. J. Med.*, 370: 901-910.
- ZHANG, F. [et al.] (2011). «Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription». *Nat. Biotechnol.*, 29: 149-153.