

## LA TERÀPIA GÈNICA

MIGUEL CHILLÓN<sup>1</sup> I ASSUMPCIÓ BOSCH<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Programme Thérapie Génique, Généthon II. Evry. França, i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.*

<sup>2</sup> *Laboratoire de Rétrovirus et Transfert Génétique. Institut Pasteur. Paris. França, i Departament de Genètica Molecular. Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynalds.*

Adreça per a la correspondència: Miguel Chillón. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Farmàcia, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. Adreça electrònica: [mchillon@genethon.fr](mailto:mchillon@genethon.fr)

### CONCEPTES BÀSICS

Podríem definir la teràpia gènica com la introducció de material genètic dins les cèl·lules d'un organisme amb finalitat terapèutica. El material genètic introduït conté una còpia del gen d'interès i els elements que controlen la seva expressió. La transferència de gens pot ser realitzada *ex vivo* o *in vivo* i comporta les següents etapes (figura 1): *a*) la unió del DNA a la cèl·lula, *b*) la seva internalització, *c*) el seu transportament a l'interior del nucli cel·lular, i *d*) la transcripció i expressió de la proteïna. En la teràpia gènica *in vivo* el material genètic és administrat directament al pacient. Al-

ternativament, en la transferència *ex vivo*, el DNA és introduït, en el laboratori, dins les cèl·lules prèviament aïllades del pacient, que més tard són reinjectades a l'organisme.

En cada cas, l'estratègia de teràpia gènica més adequada vindrà determinada pel problema que s'ha de tractar. L'efecte terapèutic es pot aconseguir mitjançant:

- La introducció d'una còpia normal d'un gen defectiu per restaurar la producció d'una proteïna no funcional o no produïda. S'utilitza principalment per tractar malalties hereditàries monogèniques com la fibrosi quística, les mucopolisacari-

- sis o la deficiència d'adenosina deaminasa, entre d'altres.
- L'expressió del transgèn (gen d'interès) que pot actuar estimulante o inhibint altres proteïnes de l'organisme. Per exemple, la introducció de citoquines que modulen la producció d'altres proteïnes del sistema immunitari contra els propis tumors; l'ús d'antioncogens (com *p53*) que inhibeixen l'expressió d'oncogens en cèl·lules tumorals; o bé l'expressió de gens que codifiquen anticossos recombinants, els quals interfereixen específicament en les funcions de les cèl·lules canceroses.
  - L'administració dels denominats *gens suïcides*, els quals són introduïts en cèl·lules que es volen eliminar (tumorals o cèl·lules infectades) i les sensibilitzen contra substàncies específiques. Quan aquestes substàncies són administrades posteriorment es produeix una destrucció selectiva de les cèl·lules que han incorporat el gen suïcida.
  - La introducció de seqüències d'oligonucleòtids o fragments de RNA antisentit que inhibiran l'expressió *a)* d'oncogens, *b)* de gens mutats que produeixen proteïnes tòxiques per la cèl·lula (com en la malaltia de Huntington), o *c)* de gens virals, per exemple, contra el virus HIV o de l'hepatitis C.

## VECTORS PER A TERÀPIA GÈNICA

L'administració de gens com a teràpia requereix la utilització de vehicles, anomenats vectors, els quals encapsulen el material genètic i el guien fins a la cèl·lula diana. Els vectors actualment disponibles es classifiquen en: virals (d'origen biològic, concretament virus modificats) i no virals (d'origen fisicoquímic) (taula 1). L'elecció d'una estratègia *ex vivo* o *in vivo*, i del tipus de vector que cal utilitzar, ve dictada per les característiques del teixit i dels tipus cel·lulars que s'han de tractar.

## Vectors virals

Al llarg de la història, el cos humà ha après a defensar-se de la introducció de DNA estrany dins el seu genoma. Els virus són parcialment capaços d'evitar aquestes defenses, per això es va decidir utilitzar-los inicialment com a vectors de teràpia gènica. Per evitar que els vectors virals puguin replicar-se dins l'organisme receptor i, per tant, provocar una infecció massiva, es treballa amb virus deficientes en replicació. Del genoma d'aquests vectors s'han eliminat aquells gens que prenen part en la replicació del virus salvatge, sempre que no siguin imprescindibles per a la seva viabilitat. Més tard, una còpia normal del gen terapèutic és introduïda dins el vector en el lloc dels gens virals eliminats. Un cop modificats, els virus no poden produir noves partícules virals per ells mateixos, per aquest motiu s'han creat línies cel·lulars que expressen les proteïnes necessàries per a la replicació del virus, les quals s'associen per formar partícules virals buides. La introducció del genoma viral modificat dins aquestes partícules permet l'obtenció de virus capaços d'infectar les cèl·lules que es tractaran (figura 1).

### Retrovirus

Els retrovirus són els vectors més estudiats i els més utilitzats per a teràpia gènica.

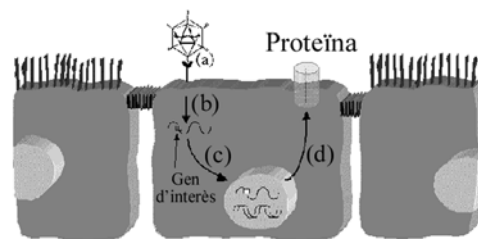


FIGURA 1. Esquema de la introducció, integració i expressió d'un gen d'interès dins una cèl·lula mitjançant un vector viral.

Són virus de RNA de cadena senzilla, de 10 kilobases (kb), amb una coberta externa (Coffin, 1990). Retrovirus recombinants, deficients en replicació, poden incorporar fins a 8 kb d'informació exògena, mida normalment superior a la majoria dels gens candidats per a teràpia gènica. Després de la infecció, l'RNA viral és convertit per transcripció reversa a DNA de doble cadena i integrat dins el genoma de la cèl·lula hoste, la qual cosa és un avantatge quan es pretenen guarir malalties cròniques o hereditàries. Tanmateix, una integració a l'atzar corre el risc de ser mutagènica.

Els vectors retrovirals més utilitzats són els derivats del virus de la leucèmia de ratolí (MMLV, de l'anglès Moloney Murine Leukemia virus). En la seva forma salvatge són virus poc patogènics per a l'home. Després de la infecció, el material genètic ha de penetrar dins el nucli per integrar-se dins el cromosoma cel·lular. Això només és possible si la membrana nuclear no està present, és a dir, quan la cèl·lula està en procés de mitosi. Fins a l'actualitat, la majoria dels protocols clínics de teràpia gènica amb retrovirus ha utilitzat estratègies *ex vivo* a causa de la baixa eficiència de producció d'aquests vectors i de la impossibilitat d'infectar cèl·lules quiescents. En aquests protocols, les cèl·lules del pacient (generalment limfòcits que es poden aconseguir fàcilment directament de la sang) són cultivades i infectades *in vitro* i readministrades posteriorment. Per poder aplicar els retrovirus directament *in vivo* en un teixit amb un baix índex de mitosi, com és el cas del fetge, és necessari activar la seva divisió cel·lular. Estudis recents mostren que l'administració local de factors de creixement (Bosch *et al.*, 1980) podria substituir eficaçment mètodes tradicionals com l'hepatectomia parcial, d'alt risc sobretot per als pacients amb problemes hepàtics.

Darrerament s'està utilitzant un grup diferent de retrovirus, anomenats lentivirus,

amb capacitat d'infectar i integrar-se tant en cèl·lules en divisió com en quiescents (Naldini *et al.*, 1996). A diferència dels vectors derivats de MMLV, en els vectors lentivirals s'han eliminat tots els gens que podrien produir patogenicitat, especialment en el cas de HIV (virus de la immunodeficiència humana adquirida), però també per a altres virus d'origen animal, com FIV (virus de la immunodeficiència felina) o el virus de l'anèmia infecciosa equina. En el cas dels lentivirus derivats de HIV, que són els més estudiats, s'ha demostrat una transferència gènica eficaç i preferencial a cèl·lules neuronals de rates injectades *in vivo*. Aquests vectors tenen, per tant, un gran potencial malgrat que estiguin encara en fase de desenvolupament i siguin necessaris més estudis, sobretot de seguretat, abans de poder ser aplicats clínicament.

#### *Adenovirus*

Els adenovirus són virus de DNA de doble cadena. El genoma viral és de 36 kb i la majoria dels seus gens són essencials per a la seva replicació. Com vectors de teràpia gènica, els adenovirus de primera generació, que contenen la major part de les seqüències virals, poden incorporar al voltant de 7,5 kb. Són produïts fàcilment en concentracions elevades, la qual cosa possibilita la seva administració *in vivo*, i infecten eficaçment un gran nombre de tipus cel·lulars, tant si estan en divisió com si no. Contràriament als retrovirus, el material genètic transferit resta episomal (fora del propi genoma), per la qual cosa desapareix el risc de mutagènesi per integració del DNA viral al de la cèl·lula hoste. Tanmateix, la divisió cel·lular va diluint el nombre de partícules adenovirals fins a desaparèixer.

D'altra banda, els adenovirus de primera generació provoquen una forta inflamació no específica i una important resposta

immunitària (Yang *et al.*, 1995). Aquestes reaccions limiten la duració de l'expressió a un període que va d'algunes setmanes a pocs mesos, en funció del teixit, i fan difícil una readministració eficaç.

La construcció de nous vectors adenovirals on s'han eliminat totes les seqüències endògenes ha augmentat la capacitat d'incorporació de DNA exogen fins a 32 kb. Són els anomenats adenovirus *gutless* (Podsakoff *et al.*, 1994). La seva eficiència és controvertida i sembla que pot dependre del teixit que s'ha de tractar, de l'origen exacte del vector, de l'hoste i del tipus de transgèn. Altres estratègies per reduir la resposta immunitària passen per l'expressió o administració de substàncies immunosupressores, o la protecció de l'adenovirus per un embolcall de lípids que redueix la seva interacció i posterior inactivació per anticossos antiadenovirals (Chillon *et al.*, 1998). Ja que dins el genoma de l'adenovirus salvatge hi ha gens que confereixen resistència immunitària i d'altres que mantenen l'estabilitat del genoma viral dins la cèl·lula hoste, caldria arribar a una situació ideal en què l'a-

denovirus mantingués únicament els gens virals essencials per la seva estabilitat i baixa toxicitat i es pogués eventualment integrar per assegurar la seva permanència en cèl·lules en divisió.

#### *Virus adenoassociats*

Els virus adenoassociats (AAV, de l'anglès *adenoassociated viruses*, de la família dels Parvovirus), són virus de DNA de cadena senzilla de 4,8 kb, els quals requereixen la presència d'adenovirus o herpesvirus per a poder-se propagar. Fins a l'actualitat no han estat associats a cap patologia humana, malgrat que infectin l'espècie humana de manera comuna. Els virus AAV poden infectar tant cèl·lules en divisió com cèl·lules quiescents (Fisher *et al.*, 1996) i un cop estan en el nucli cel·lular poden integrar-se dins el genoma de la cèl·lula hoste. El virus salvatge s'integra dins el braç curt del cromosoma 19; malauradament, els vectors AAV no conserven aquesta propietat i si s'integren, ho fan a l'atzar.

Els vectors AAV infecten eficaçment i esta-

<i>Vectors</i>	<i>Avantatges</i>	<i>Desavantatges</i>
Adenovirus	Elevada eficiència Pot infectar cèl·lules quiescents	Expressió transitòria Provoca resposta immunitària
Virus adenoassociats	Estabilitat elevada Pot infectar cèl·lules quiescents	Poca capacitat pel DNA exogen Producció ineficaç
Retrovirus (MMLV)	Expressió estable	No infecta cèl·lules quiescents
Lentivirus	Pot infectar cèl·lules quiescents Expressió estable	Calen més estudis per garantir-ne la no patogenicitat
Herpesvirus	Pot infectar cèl·lules quiescents	Neurotoxicitat mal caracteritzada Expressió transitòria
Lípids i polímers catiónics	Fàcils de produir Poden infectar cèl·lules quiescents Poden transfectar grans molècules de DNA	Baixa eficàcia Citotòxics en grans quantitats

TAULA 1. Avantatges i desavantatges dels diferents tipus de vectors.

ble diferents tipus cel·lulars com el fetge, el cervell i sobretot el teixit muscular, però també algun tipus de cèl·lules sanguínies. Tanmateix, la seva eficàcia és molt més feble que la dels adenovirus, principalment perquè les preparacions són menys concentrades a causa de problemes tècnics. Finalment, un altre desavantatge és la baixa capacitat per a la incorporació d'un gen exogen, essent només de 4,8 kb. Malgrat tot, els AAV són bons candidats a vectors de teràpia gènica i la seva utilització presenta molt poc risc potencial.

Els vectors derivats de l'herpes simple són altres vectors de DNA que tenen la capacitat d'incorporar seqüències exògenes de fins a 30 kb i permeten infectar cèl·lules del sistema nerviós. Tanmateix, l'expressió del gen terapèutic és transitòria i semblen produir neurotoxicitat.

### Vectors no virals

Els vectors no virals tenen com a principal avantatge la seguretat, ja que no provenen d'agents infecciosos. Hi ha diversos tipus de teràpia gènica no viral, com l'ús de lípids catiónics, polímers catiónics i la injecció directa de DNA.

#### *Administració directa del DNA*

La forma més senzilla de teràpia gènica és aquella en què les molècules de DNA s'administren directament (injecció, electroporació o *gene-gun*), sense estar empaquetades dins de càpsides víriques o protegides per molècules catióniques (lípids o polímers). D'aquesta manera, s'eliminen problemes derivats de la utilització de vectors, principalment la citotoxicitat, i en el cas dels vectors virals també la resposta immunològica i riscos de patogenicitat viral. Tanmateix, l'administració directa de DNA té un rendiment molt baix, primer perquè la seva entrada dins la cèl·lula (malgrat que no és

ben coneguda) no es fa a través d'un sistema eficient com la interacció receptor-ligand. En segon lloc, el DNA no està protegit, i és fàcilment degradat tant a l'exterior com a l'interior de la cèl·lula, principalment dins dels endosomes. A causa d'aquesta baixa eficàcia, s'han d'administrar grans quantitats de DNA, pel que l'administració directa s'utilitza en molt pocs casos i només quan el teixit és de fàcil accés, com per al tractament del càncer de pell.

#### *Lípids i polímers catiónics*

Els lípids i els polímers catiónics són molècules amb una forta càrrega positiva les quals interaccionen amb el DNA, amb càrrega neta negativa, formant un complex estable que protegeix el DNA de la degradació. Aquest complex s'uneix a proteïnes de la membrana cel·lular que faciliten l'entrada a la cèl·lula. Un cop a l'interior, el DNA es localitza dins els endosomes, on la presència de les molècules catióniques dificulta la seva degradació. El DNA entra posteriorment dins el nucli, on resta de manera extracromosòmica, per la qual cosa l'expressió del gen terapèutic és temporal. Actualment, es coneix una gran diversitat de molècules catióniques, però l'eficiència dels diferents complexos *in vivo* encara és reduïda, ja que la major part del DNA és degradat en els endosomes abans d'arribar al nucli (Zabner *et al.*, 1995). Generalment, els complexos de lípid i DNA no donen resposta immunitària o processos inflamatoris. Tampoc tenen límit respecte de la capacitat del material genètic que poden transferir. Un altre avantatge que presenten els lípids i polímers catiónics com a vectors de transferència gènica és la possibilitat d'unió de lligands específics per a receptors de les cèl·lules diana. Aquesta especificitat resulta molt convenient per evitar problemes secundaris deguts a l'expressió del gen en cèl·lules no desitjades.

El principal desavantatge d'aquest vector és la baixa eficàcia, el que obliga a utilitzar elevades concentracions de lípids, fins a nivells citotòxics. Tanmateix, és un vector que està evolucionant i millorant molt ràpidament. Per exemple, en el cas de la fibrosi quística (FQ), concentracions elevades de complexos de lípid i DNA han aconseguit corregir temporalment el fenotip FQ en l'epiteli respiratori proximal del model FQ de ratolí (Hyde *et al.*, 1993). Aquestes dades, juntament amb la possibilitat d'administració dels complexos en forma d'aerosol i la seva aparent manca d'immunogenicitat, han permès utilitzar aquests vectors en pacients afectats de fibrosi quística (Zabner *et al.*, 1997).

## EXPERIMENTS EN HUMANS

Abans d'aplicar la teràpia gènica de manera rutinària en humans, és necessari contestar les següents preguntes:

- És segura la teràpia gènica?
- Quines són les malalties que poden ser tractades per teràpia gènica?
- Quins vectors són els més efectius en cada cas?
- Quines són les millors rutes d'administració per a cada òrgan que cal tractar?
- Quina és la freqüència de readministració del vector?

En funció d'aquestes qüestions, els assajos clínics es classifiquen en quatre fases o etapes:

- Assaig clínic de fase I: Farmacologia i seguretat clínica.

En aquesta primera fase, s'estudia per primera vegada un vector concret per a teràpia gènica. El principal interès d'aquesta fase és determinar els paràmetres farmacològics i de seguretat del vector utilitzat, com per exemple la dosi que caldrà administrar en les següents fases. Per raons

ètiques i de seguretat, només participen en aquesta fase individus amb malalties molt greus, en els quals els tractaments clàssics no han funcionat.

- Assaig clínic de fase II: Investigació inicial de l'efecte terapèutic del conjunt vector-transgèn.

En aquesta fase s'estudia l'efecte terapèutic del sistema, encara que es continuen acumulant dades sobre la seguretat i la dosi idònia. El nombre d'individus que hi participen és més elevat que en la fase I, pel que les dades són més rellevants.

- Assaig clínic de fase III: Evaluació del vector a gran escala

Quan s'ha comprovat que existeix un efecte terapèutic en un nombre limitat de pacients és necessari realitzar assajos clínics en grups d'individus més nombrosos per establir la validesa de l'efecte observat en els estudis de la fase II. També es compara el nou tractament amb altres estratègies ja existents. El primer assaig de teràpia gènica en fase III va ser aprovat l'agost del 1996. És un estudi per a pacients de glioblastoma a escala internacional, en el qual participen diversos centres.

- Assaig clínic de fase IV: Aplicació general i seguiment del tractament.

Quan el tractament ha estat aprovat per a un ús general (en el moment d'escriure aquestes línies encara cap tractament de teràpia gènica es troba en aquesta fase), és necessari un seguiment del vector per observar efectes secundaris rars que podrien aparèixer quan s'estudia un nombre molt més elevat de pacients.

Fins al novembre de 1998, havien estat aprovats 363 assajos clínics de teràpia gènica amb participació de 2.791 pacients (taula 2). El 90 % d'aquests protocols són de fase I, alguns dels quals ja estan acabats. El 1999 un comitè d'aprovació dels Estats Units estava estudiant dos assajos de fase III per a teràpia gènica contra el càncer.

Patologies	Protocols	Pacients
Càncer	227	1.801
Malalties hereditàries monogèniques	52	286
Malalties infeccioses	29	405
Estudis de marcatge cel·lular	41	227
Altres	14	72
<b>Total</b>	<b>363</b>	<b>2.791</b>

Font: Lloc web de Wiley

TAULA 2. Malalties tractades per protocols clínics de teràpia gènica.

## CONSIDERACIONS FINALS

És evident que la teràpia gènica és un camp molt jove: els primers experiments de transferència de material genètic en cèl·lules humanes es van realitzar durant els anys vuitanta. Tanmateix, des d'aleshores ja s'han publicat més de cinquanta mil articles sobre teràpia gènica. Això demostra que és un dels camps amb més possibilitats i perspectives de futur. Actualment, es parla molt dels avenços que canviaran la medicina en els propers anys. La teràpia gènica tindrà un paper molt important en aquests canvis. Gràcies al descobriment dels gens associats a les malalties hereditàries, a la seqüenciació del genoma humà (esperada abans del 2005) i als avenços tecnològics que han permès la transferència específica de seqüències de DNA dins les cèl·lules humanes ja es pot començar a considerar la teràpia gènica com a tractament per a les causes primàries de les malalties d'origen genètic.

Per aquests motius, la teràpia gènica ha creat moltes expectatives (i també alguns temors) entre la població general. Tanmateix, no hem d'oblidar que es tracta d'una especialitat molt jove i que cal aprofundir encara molt en el tema abans de poder-la aplicar com a tractament de rutina.

Quan la causa de la malaltia és genètica, l'ús de fàrmacs tradicionals pot, en la major

part dels casos, pal·liar però no curar la causa primària de la malaltia. A més a més, per a determinades situacions la farmacologia clàssica presenta una sèrie de desavantages respecte de la teràpia gènica, alguns dels quals són:

- La producció sintètica de la proteïna és un procés llarg i costós. En general, la vida mitjana d'aquestes proteïnes és curta, pel que s'han d'administrar sovint i és difícil que el pacient porti una vida normal.
- Les modificacions posttranscripcionals de la proteïna, quan aquesta és produïda sintèticament, no són exactament les mateixes que quan són sintetitzades per la cèl·lula de l'individu (p. ex. glicosilacions), la qual cosa pot afectar l'activitat proteica i disminuir encara més la vida mitjana de la proteïna sintètica.
- La regulació de la quantitat de proteïna necessària per cèl·lula no és possible quan s'administra de forma exògena però sí quan és produïda per la cèl·lula modificada genèticament, on l'expressió de la proteïna està sota la regulació d'un promotor específic.

Cada malaltia té unes característiques particulars. Per tant, l'estratègia de teràpia gènica que cal seguir dependrà tant del tipus de malaltia com dels òrgans i tipus cel·lulars afectats. Per aquest motiu no hi ha un vector ideal per a teràpia gènica, sinó que cal aplicar l'adequat en cada cas. Per exemple, si es necessita una producció permanent d'una proteïna determinada (cas de les malalties hereditàries amb defecte d'expressió d'una proteïna), es poden utilitzar retrovirus murins, AAV o lentivirus, els quals permeten integrar el gen d'interès en el genoma cel·lular. Contra els tumors sòlids, generalment es necessita una expressió forta però transitòria d'un gen suïcida o de gens activadors del sistema immunitari;

es recomana, doncs, l'ús dels adenovirus, d'elevada eficàcia en aquests casos. També caldrà tenir en compte el tipus de teixit; així, si són cèl·lules quiescents no podrem utilitzar retrovirus murins, o contràriament, si les cèl·lules que cal corregir es divideixen ràpidament i estem interessats en una expressió a llarg termini, podrem administrar retrovirus o AAV.

El sistema es complica encara més quan s'ha de limitar l'expressió del gen d'interès a un òrgan o a un tipus cel·lular concret, o quan cal regular els nivells d'expressió, ja que la presència de la proteïna en cèl·lules fora del seu context natural o bé una sobreexpressió del gen introduït podria, en alguns casos, tenir efectes secundaris no desitjats. Això es pot aconseguir mitjançant la injecció directa del vector en les cèl·lules d'interès, o bé dirigint el vector a les cèl·lules diana a través d'una interacció específica lligand-receptor cel·lular, o utilitzant promotors regulables i/o específics de teixit.

Cal recordar que els vectors més utilitzats en els protocols clínics són els vectors virals. El disseny d'aquests vectors es fa seguint uns criteris de màxima seguretat malgrat que pugui anar en detriment de la màxima expressió. Per damunt de tot, cal evitar qualsevol possibilitat de recombinació entre el vector i una seqüència de la cèl·lula hoste o fins i tot de la cèl·lula productora de virus, la qual cosa podria donar lloc a virus potencialment patògens. Fins al moment, no s'ha detectat cap fenomen de complementació viral que pugui generar una infecció massiva, ni fenòmens de mutagènesi per inserció de vectors integratius, ni tampoc casos d'infecció de cèl·lules germinals. Tanmateix, encara s'han de realitzar més experiments abans d'obtenir conclusions definitives. Els comitès que vetllen per la seguretat dels vectors de teràpia gènica tenen en compte tots aquests factors i per tant, el procés d'acceptació de cada protocol clínic és llarg i complex.

Un dels problemes més importants de la teràpia gènica és la resposta immunitària, sobretot quan s'utilitzen vectors virals. La resposta immunitària es dirigeix principalment contra el vector, malgrat que també pot dirigir-se contra el gen terapèutic sobretot quan no s'expressa normalment en l'individu. L'estratègia més utilitzada per evitar aquest problema és la immunosupressió temporal i/o local de l'organisme. Tanmateix, això no és sempre aconsellable, dependent del tipus de malaltia i de les característiques de cada pacient.

Malgrat la baixa eficàcia de la teràpia gènica a l'hora de transfectar un òrgan o tipus cel·lular concret, no sempre es requereix una infecció del 100 % de les cèl·lules d'aquest òrgan. Un exemple n'és la fibrosi quística, on la producció tan sols del 10-15 % de la proteïna total reverteix en el fenotip normal (Chillón *et al.*, 1995). Un altre cas és l'efecte *bystander* que s'observa en cèl·lules tumorals veïnes de cèl·lules transfectades amb gens suïcides com la timidina-quinasa (Mesnil *et al.*, 1996). En aquest cas, només cal transfectar un baix percentatge de cèl·lules canceroses per sensibilitzar la major part del tumor contra l'acció del ganciclovir, l'agent tòxic que és administrat posteriorment i que provocarà la mort de la majoria de les cèl·lules tumorals, malgrat que no expressin la timidina quinasa.

Per obtenir un efecte terapèutic, no sempre cal transfectar l'òrgan afectat en cada malaltia. Així, en malalties on la proteïna deficitària és secretada, com l'hemofília, la diabetis, les anèmies o la majoria de les mucopolisacaridosis, es poden transfectar teixits i òrgans fàcilment infectables per vectors de teràpia gènica, com el múscul o el fetge. Aquests actuaran com a òrgans secretors per a l'administració sistèmica de proteïnes terapèutiques, les quals passaran al sistema circulatori i des d'allí seran distribuïdes a tot l'organisme. Una altra opció és l'ús de neodr-



gans o cèl·lules encapsulades modificades genèticament (Moullier *et al.*, 1996; Aebischer *et al.*, 1996), on les cèl·lules són transfectades *ex vivo* i protegides per polímers inerts que impedeixen l'entrada de cèl·lules fagocítiques de l'individu però, d'altra banda, permeten la secreció de la proteïna.

Resumint, l'ús de la teràpia gènica en humans és encara poc eficient i per aquest motiu continua l'esforç d'investigació bàsica en aquest camp. Cal recordar que tots els estudis han estat realitzats durant els darrers deu anys i encara queda molt de camí per fer, no solament pel que fa a la investigació, amb la confirmació de l'eficàcia dels nous vectors en situacions clínicament rellevants, l'avaluació de la seva seguretat biològica i el desenvolupament de la metodologia adequada per a la seva producció a gran escala, sinó també en els àmbits legal i ètic, amb la creació de lleis que regulin la manipulació genètica en humans. Malgrat tot, els resultats preliminars són encoratjadors i donen esperances respecte de la possibilitat de tractament de malalties que fins avui són incurables.

## BIBLIOGRAFIA

- AEBISCHER, P.; M. SCHLUEP; N. DEGLON; J. M. JOSEPH; L. HIRT; B. HEYD; M. GODDARD; J. P. HAMMANG; A. D. ZURN; A. C. KATO; F. REGLI; E. E. BAETGE (1996). «Intrathecal Delivery of CNTF Using Encapsulated Genetically Modified Xenogeneic Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients». *Natural Medicine*, núm. 6, pàg. 696-699.
- BOSCH, A.; P. D. JR. MC CRAY; K. S. WALTERS; M. BODNER; D. J. JOLLY; H. H. VAN ES; T. NAKAMURA; K. MATSUMOTO; D. L. DAVIDSON (1998). «Effects of Keratinocyte and Hepatocyte Growth Factor *in vivo*: Implications for Retrovirus Mediated Gene Transfer to Liver». *Human Genetics Therapy*, núm. 9, pàg. 1747-1754.
- CHILLÓN, M.; T. CASALS; B. MERCIER; L. BASSAS; W. LISSENS; S. SILBER; M. C. ROMÉY; J. RUÍZ-ROMERO; C. VERLINGUE; M. CLAUSTRES (1995). «Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Congenital Absence of the Vas Deferens». *New England Journal of Medicine*, núm. 332, pàg. 1475-1480.
- CHILLÓN, M.; J. H. LEE; A. FASBENDER; M. J. WELSH (1998). «Adenovirus Complexed with Polyethylene Glycol and Cationic Lipid is Shielded from Neutralizing Antibodies *in vitro*». *Genetic Therapy*, núm. 7, pàg. 995-1002.
- COFFIN, J. M. (1990). «Retroviridae and Hier Replication». A: B. N. FIELDS; D. M. KNIPE; R. M. CHANOCK; M. S. HIRSCH; J. L. MELNICK; T. P. NOMALLS; B. ROIZMAN, ed. *Fields Virology*. 2nd Edition. Nova York: Raven Press, pàg. 1437-1500.
- FISHER, K. J.; H. CHOI; J. BURDA; S. J. CHEN; J. M. WILSON (1996). «Recombinant Adenovirus Deleted of all Viral Genes for Gene Therapy of Cystic Fibrosis». *Virology*, núm. 217, pàg. 11-22.
- HYDE, S. C.; D. R. GILL; C. F. HIGGINS; A. E. TREZISE; L. J. MACVINISH; A. W. CUTHBERT; R. RATCLIFF; M. J. EVANS; W. H. COLLEDGE (1993). «Correction of the Ion Transport Defect in Cystic Fibrosis Transgenic Mice by Gene Therapy». *Nature*, núm. 362, pàg. 250-255.
- MESNIL, M.; C. PICCOLI; G. TIRABY; K. WILLECKE; H. YAMASAKI (1996). «Bystander killing of cancer by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins». *Proceedings National Academy of Sciences, USA*, vol. 93, pàg. 1831-1835.
- MOULLIER, P.; D. BOHL; J. M. HEARD; O. DANOS (1993). «Correction of Lysosomal Storage in the Liver and Spleen of MPS VII Mice by Implantation of Genetically Modified Skin Fibroblasts». *Nature Genetics*, núm. 4, pàg. 154-159.
- NALDINI, L.; U. BLOMER; P. GALLAY; D. ORY; R. MULLIGAN; F. H. GAGE; I. M. VERMA; D. TRONO (1996). «*In vivo* Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector». *Science*, núm. 272, pàg. 263-267.
- PODSAKOFF, G.; K. K. JR. WONG; S. CHATTERJEE (1994). «Efficient Gene Transfer into Nondividing Cells by Adeno-associated Virus-based Vectors». *Journal Virology*, núm. 68, pàg. 5656-5666.
- YANG, Y.; Q. LI; H. C. ERTL; J. M. WILSON (1995). «Cellular and Humoral Immune Responses to Viral Antigens Create Barriers to Lung-directed Gene Therapy with Recombinant Adenoviruses». *Journal Virology*, núm. 69, pàg. 2004-2015.
- ZABNER, J.; S. H. CHENG; D. MEEKER; J. LAUNSPACH; R. BALFOUR; M. A. PERRICONE; J. E. MORRIS; J. MARSALL; A. FASBENDER; A. E. SMITH; M. J. WELSH (1997). «Comparison of DNA-lipid Complexes and DNA alone for Gene Transfer to Cystic Fibrosis Airway Epithelia *in vivo*». *Journal Clinical Investigation*, núm. 6, pàg. 1529-1537.
- ZABNER, J.; A. J. FASBENDER; T. MONINGER; K. A. POELLINGER; M. J. WELSH (1995). «Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by Cationic lipid». *Journal Biological Chemistry*, núm. 270, pàg. 18997-19007.