

## DE LA PATOLOGIA MOLECULAR A LA TERÀPIA GÈNICA

ANNA M. GÓMEZ-FOIX<sup>1</sup> I CRISTINA FILLAT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de Barcelona.*

<sup>2</sup>*Departament de Genètica Molecular. Institut de Recerca Oncològica. IRO.*

Adreces per a la correspondència: <sup>1</sup>Martí i Franquès, 1. 08028-Barcelona. Tel. 93 402 12 09. Fax 93 402 12 19. <sup>2</sup>Autovia de Castelldefels, km 2,7. 08907 L'Hospitalet. Tel. 93 260 77 75. Fax 93 260 77 76.

### INTRODUCCIÓ

El coneixement de les bases moleculars de les malalties ha obert la possibilitat de noves estratègies terapèutiques. La identificació de les proteïnes, l'alteració o deficiència de les quals origina una determinada malaltia o bé l'administració de les quals podria pal·liar els símptomes o el desenvolupament d'aquesta malaltia, ha estat el fonament de la teràpia gènica. La transferència de gens té utilitat general per substituir l'administració d'una proteïna amb valor terapèutic per l'administració del DNA que la codifica. D'aquesta manera es pot aconseguir teòricament la generació *in situ* de la proteïna de manera perllongada, regulada i específica. Alternativament, es pot administrar DNA amb la finalitat de bloquejar l'expressió d'una determinada proteïna (tecnologia antisentit o ribozimes). El desenvolupament de la teràpia gènica suposa un treball d'identificació i caracterització de gens d'interès terapèutic. D'altra banda, es

requereixen vehicles per introduir de manera eficient, específica i innòcua el DNA a cèl·lules de teixits, és a dir, vectors gènics.

El primer dels objectius, l'aïllament de gens d'interès terapèutic, ha avançat considerablement en els darrers anys i continua progressant a bon ritme. A més, cal esperar que el projecte de seqüenciació del genoma humà ens permeti en un futur proper disposar de la informació corresponent als 50.000-100.000 gens que es calcula que posseeix el genoma humà. Per contra, els avenços referents a vectors gènics són menys previsible. No existeix en l'actualitat un vector que reuneixi totes les qualitats necessàries per fer-lo idoni per a la majoria d'aplicacions, ni tampoc sembla clara la solució que pugui resultar finalment reeixida. Un altre aspecte encara no resolt és el control de la integració del transgen en els cromosomes de la cèl·lula receptora. Les aproximacions actuals de teràpia gènica suposen la introducció d'una o diverses

còpies del transgèn a la cèl·lula hoste i de vegades la integració d'aquesta(es) còpies en el genoma cel·lular, la qual es realitza a l'atzar. Seria desitjable poder introduir elements que dirigissin la integració específica del transgèn, però encara desconeixem els mecanismes que regulen aquest procés en eucariotes.

## MALALTIES POTENCIALMENT TRACTABLES PER TERÀPIA GÈNICA I TEIXITS DIANA

La teràpia gènica es concebí inicialment per al tractament de malalties d'origen genètic causades per deficiències en un únic gen. D'entre aquestes malalties, de les quals se n'han descrit més de cinc mil, algunes són bastant freqüents: anèmia perniciosa, fibrosi quística, distròfia muscular de Duchenne, talassèmia o fenilcetonúria; d'altres són rares: malaltia de Lesch-Nyan o trastorns en el metabolisme de lípids i carbohidrats. Els gens involucrats en més de mil d'aquestes malalties han estat ja identificats i clonats. La filosofia d'aplicació de la teràpia gènica era clara: si una malaltia és causada per la deficiència en un determinat gen, es pot corregir mitjançant la restitució del gen funcional. La teràpia gènica podria, en teoria, proporcionar una solució definitiva per a aquestes malalties si s'aconseguís afectar exclusivament les cèl·lules diana i s'assolís una expressió adient i persistent.

Tanmateix, aviat es va fer palès que a més de les malalties causades per la deficiència en un únic gen, la teràpia gènica té una aplicació molt àmplia i pot emprar-se per a malalties molt variades: cardiovasculars, càncer, desordres endocrins o infeccions víriques.

De fet l'origen poligènic o multifactorial no és un inconvenient per al disseny de teràpia gènica sempre que es demostrï la possible utilitat terapèutica de la introducció d'un

gen adient. De fet, en l'elecció de les malalties diana cal considerar factors tan importants com l'elevada morbiditat o mortalitat de la malaltia i l'existència d'una relació benefici/risc positiva. També és important el fet que les teràpies actuals siguin inadequades (Ledley *et al.*, 1987; Macer, 1992).

La teràpia gènica en humans es restringeix a la manipulació gènica de cèl·lules somàtiques. La modificació genètica de cèl·lules germinals, per qüestions ètiques (Danks, 1994), només s'aplica a animals per a l'obtenció d'animals transgènics amb un enfocament molt diferent: creació de models animals o millora de la producció. Dins de la teràpia de cèl·lules somàtiques cal diferenciar la teràpia fetal. Aquesta teràpia s'aplicaria a fetus que hagin estat identificats com a afectes en proves de diagnòstic prenatal i que haurien d'ésser tractats en l'úter en el període de desenvolupament. Aquesta aproximació està en fase d'experimentació molt inicial en models animals.

Molt més avançada es troba la teràpia gènica aplicada a individus adults de la qual existeixen nombrosos protocols clínics en curs. Pel que fa referència als tipus de teixits tractables mitjançant teràpia gènica, tots hi poden ésser susceptibles. Les característiques del teixit diana (replicació cel·lular, massa i localització) determinaran la via d'administració o el vector que s'utilitzarà. També serà determinant el tipus de proteïna que es vol expressar, si és intracel·lular o és una proteïna sistèmica. En el primer cas, en general es pretindrà modificar el major nombre possible de cèl·lules diana; en l'altre, la secreció de la proteïna des d'unes poques cèl·lules pot ésser suficient. Podem distingir les estratègies per a intervencions de teràpia gènica en actuacions *in vivo* o *ex vivo*. La transferència de gens al teixit intacte o administració *in vivo* es pot realitzar *in situ* al teixit diana o via sistèmica. Aquest tipus d'estratègia té una sèrie de particularitats

com el fet que no permet un procés de selecció de les cèl·lules que han adquirit el gen i que en general requereix afectar un gran nombre de cèl·lules. Quan l'administració és sistèmica, el DNA administrat tindrà una biodisponibilitat limitada per una sèrie de barreres de teixit (membranes connectives, epiteli vascular, membrana hematocèfalica), proteïnes inactivants (proteases-nucleases, proteïnes amb càrrega positiva que adsorbiran el DNA) i immunològiques (sistema del complement, resposta immune cel·lular i anticossos neutralitzants). Serà doncs necessari disposar d'un vector que vehiculi una òptima biodisponibilitat i especificitat del DNA al teixit diana. L'especificitat de teixit es podrà conferir alternativament utilitzant una regió reguladora teixit específica de l'expressió del transgèn. En el cas de l'administració *ex vivo*, es tracta d'aïllar *in vitro* les cèl·lules d'un determinat

teixit i efectuar el procés de transferència gènica. Aquestes cèl·lules, que poden fins i tot sotmetre's a un procés de selecció, seran posteriorment reimplantades en l'individu donant. En la pràctica, aquest sistema resulta idoni per a cèl·lules que tinguin capacitat de proliferació *in vitro* i que poden seleccionar-se per expressar establement el transgèn abans de ser reimplantades. Una alternativa a la teràpia gènica *ex vivo* consisteix en la utilització de cèl·lules alienes a l'individu, habitualment línies cel·lulars, les quals han estat modificades genèticament per expressar de manera estable el transgèn.

### VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA

Per aconseguir l'expressió d'un DNA forà en una cèl·lula diana caldrà vèncer una

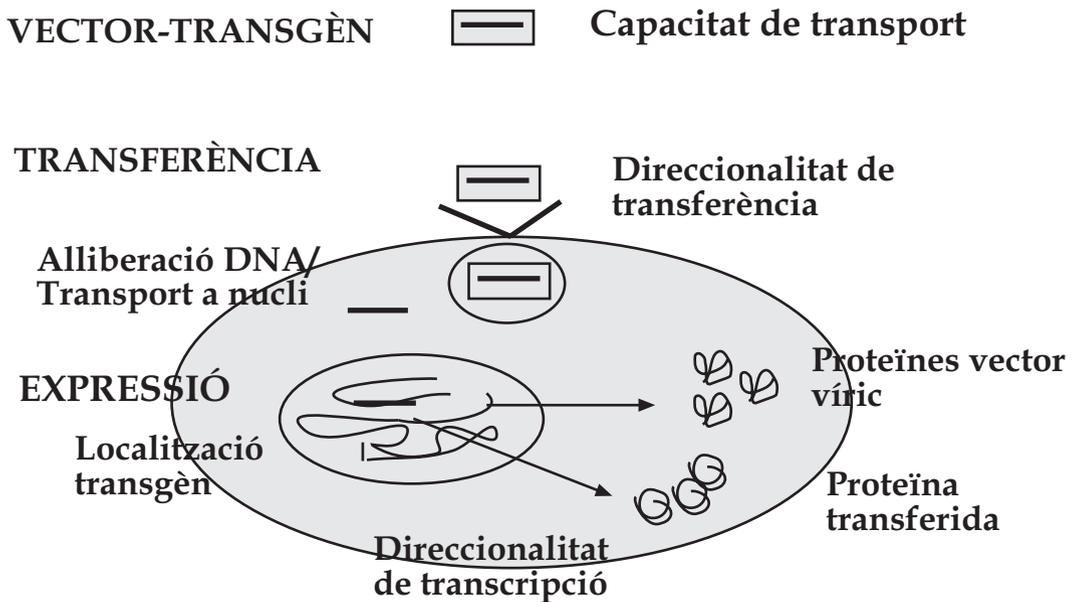


FIGURA 1. Etapes en la transferència cel·lular de gens.

TAULA I: Característiques del vector idoni.

Capacitat de transport	1-1.000 kb
Eficiència transferència: relació vector/cèl·lula	> 10
Integració	Sí (direccional) /No
Expressió sostinguda	Sí
Transferència cèl·lules quiescents/replicatives	Sí/Sí
Transferència in vivo	Sí
Direccionalitat de transferència	Sí
Direccionalitat de transcripció	Sí
Partícules virus recombinants salvatges	No
Expressió de proteïnes virals	No
Oncogenicitat	No

sèrie de barreres (figura 1). En primer lloc el DNA o el vehicle hauran de ser capaços d'interaccionar específicament amb la membrana cel·lular. Després d'aquesta interacció el complex DNA-vector haurà d'ésser internalitzat, procés que majoritàriament implica l'entrada per vesícules d'endocitosi i en una minoria dels casos la fusió amb la membrana. A continuació el DNA haurà de salvar la degradació lisosomal associada al procés endocític i traspasar la membrana nuclear. Un cop al nucli, el DNA podrà integrar-se o romandre episomal i així determinar la durada de l'expressió (transitòria o estable). El vector tindrà un paper fonamental a determinar i optimitzar cadascuna d'aquestes etapes.

El vector idoni per a ésser utilitzat en teràpia gènica és una entitat teòrica inexistent però és el model cap al qual tendeixen els vectors actuals i futurs (Hodgson, 1995). El vector idoni reuniria les característiques recollides en la taula I. En els sistemes de transferència actuals podem diferenciar entre mètodes físics de transfecció i transducció vírica. Entre els mètodes fisicoquímics d'aplicació en teràpia gènica cal destacar: els liposomes, els conjugats mol·leculars i el microbombardeig. Entre els vectors virals

els més remarcables són els retrovirus, adenovirus, virus adenoassociats i virus herpes.

### Vectors retrovírics

Els vectors retrovírics constitueixen un vehicle per introduir DNA a cèl·lules eucariotes i han estat els primers vectors utilitzats en els estudis de teràpia gènica. El 1981 es va descriure el primer vector i el 1990 es va iniciar el primer assaig clínic en pacients que presentaven una deficiència en l'enzim adenosina desaminasa (Blase *et al.*, 1990). Ara com ara, aquests vectors continuen tenint una gran utilitat en clínica i s'estan duent a terme nombrosos estudis d'investigació bàsica dirigits a millorar-ne l'eficàcia.

#### *Cicle de vida i construcció de vectors retrovírics*

Per tal de comprendre les característiques d'aquests vectors cal conèixer el cicle vital dels retrovirus (Salmons *et al.*, 1993). Els retrovirus són virus RNA. El procés d'infecció d'una cèl·lula necessita en primer lloc la interacció entre una proteïna de la co-

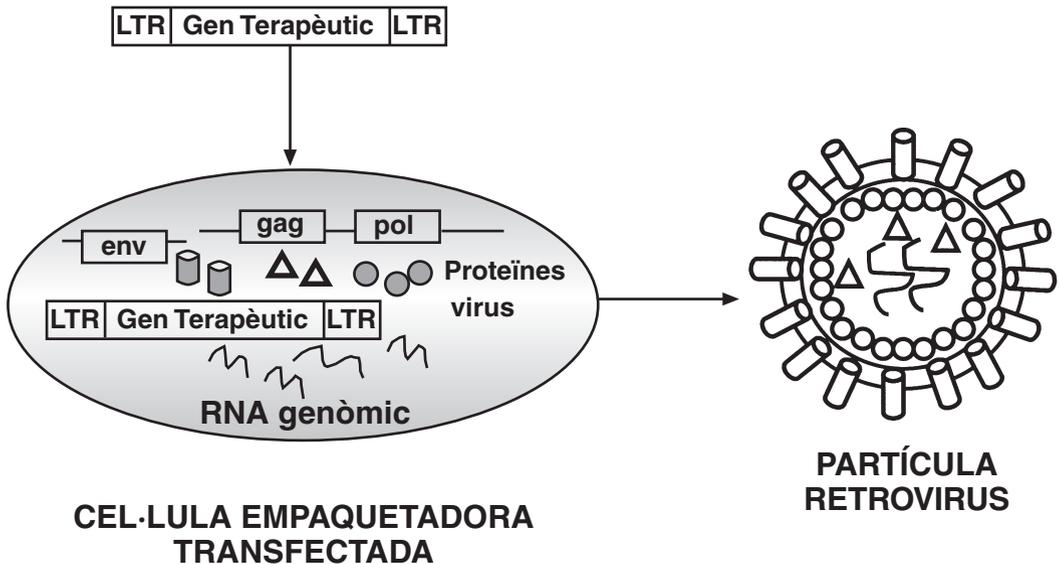


FIGURA 2. Estratègia de preparació i propagació de vectors retrovírics.

berta del virus i una proteïna de la membrana cel·lular que actua com a receptor. Com a conseqüència, es produeix la internalització de la partícula viral i l'alliberament del genoma, l'RNA. Aquest RNA, mitjançant la transcriptasa reversa, és retrotranscrit en el citoplasma i així s'obté un DNA còpia, el cDNA, que és traslladat al nucli on s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste i es manté així de forma estable. Aquest DNA viral un cop integrat es coneix com a provirus i s'expressa com un gen més de la cèl·lula i utilitza tota la maquinària de transcripció i traducció de la pròpia cèl·lula. Aquest provirus consta de dues regions LTR (*long terminal repeats*), que defineixen els extrems del provirus i que contenen seqüències reguladores de l'expressió dels gens virals: zona promotora, *enhancers*, elements repressors i senyals de poliadenilació. Entre els dos LTR se situen els gens virals, *gag*, *pol* i *env* que codifiquen proteïnes estructurals del virus.

Com a resultat de la interacció entre una de les proteïnes *gag* i el senyal d'encapsidació es produeix l'empaquetament de les partícules víriques i l'alliberament de noves partícules infectives.

El vector retrovíric s'obté després de substituir part del genoma viral, els gens *gag*, *pol* i *env*, pel DNA d'interès. Aquest vector continuarà, per tant, els LTR virals, els senyals d'encapsidació i el gen d'interès. Els gens *gag*, *pol* i *env* poden ser proporcionats en *trans*. Això ha permès el desenvolupament de les denominades línies cel·lulars empaquetadores (Markowitz *et al.*, 1988; Markowitz *et al.*, 1988). Aquestes són cèl·lules a les quals s'han transferit de forma estable els gens *gag*, *pol* i *env*, però que no contenen les seqüències necessàries per a l'encapsidació del virus.

El sistema que permet obtenir retrovirus recombinants consisteix en dos components: d'una banda, el vector retrovíric que

conté el gen d'interès, i d'altra banda les línies cel·lulars empaquetadores (figura 2). Només quan els dos components del sistema, és a dir, el vector retrovíric i les cèl·lules empaquetadores, es posin en contacte, serà quan es produiran els retrovirus recombinants. Per tal que això es doni, cal transfectar el vector retrovíric que conté el gen terapèutic a la línia cel·lular empaquetadora. En conseqüència en el medi extracel·lular s'acumularan les partícules virals. Aquests retrovirus recombinants seran capaços de transduir les cèl·lules diana i aconseguir així que aquestes cèl·lules continguin i expressin el gen d'interès.

Sovint els vectors retrovírics contenen dos gens heteròlegs: el gen marcador que confereix avantatge selectiu a la cèl·lula transduïda i el gen terapèutic. Ambdós gens poden ser expressats sota el control del mateix promotor, aprofitant el mecanisme de *splicing* del propi retrovirus, o bé sota dos promotors diferents, essent generalment un d'ells el propi LTR viral (Levine *et al.*, 1991 i Byun *et al.*, 1996).

#### *Estratègies de transferència gènica utilitzant vectors retrovírics*

La via d'administració més comuna per a aquests tipus de virus és la que s'ha denominat *ex vivo* i consisteix en aïllar les cèl·lules diana del pacient, cultivar-les *in vitro* en presència del vector retrovíric que conté el gen terapèutic i finalment administrar al pacient les cèl·lules corregides. Aquesta estratègia s'està utilitzant molt per transduir cèl·lules hemopoètiques (Bordignon *et al.*, 1995; Fillat *et al.*, 1996). S'ha utilitzat també per modificar altres tipus de cèl·lules com ara cèl·lules hepàtiques (Grompe *et al.*, 1992) i fibroblasts (Levy-Yeyati *et al.*, 1995) entre d'altres.

L'estratègia alternativa és la que con-

templa l'administració dels retrovirus recombinants directament *in vivo*. Com que els títols que s'obtenen de retrovirus no són molt alts, aquesta via generalment resulta poc eficient, si bé actualment molts esforços s'encaminen a desenvolupar mètodes que permetin concentrar el nombre de partícules infectives/ml. Com a sistema alternatiu, i d'aplicació en determinats càncers que desenvolupen tumors sòlids, resulta molt més eficient l'administració *in situ* de les cèl·lules productores dels retrovirus recombinants (Wei *et al.*, 1995; Tamiya *et al.*, 1995).

#### *Característiques dels vectors retrovírics com a vectors de transferència. Avantatges i inconvenients*

Els retrovirus presenten un conjunt de característiques que en determinen l'ús com a vectors de transferència. Els vectors retrovírics disposen d'una capacitat per a la clonació de l'insert que pot arribar a tenir fins a 8 kb com a màxim, la qual cosa limita el tipus de fragment que podran vehicular.

Una altra de les particularitats dels retrovirus es basa en el fet que la transducció de les cèl·lules diana és mitjançada per receptors (Weiss *et al.*, 1995). Aquest pas té lloc durant la primera etapa del procés d'infecció d'una cèl·lula i es caracteritza per la unió de la proteïna de la coberta del retrovirus (proteïna *env*) a un receptor específic situat en la membrana de la cèl·lula diana. Cada tipus de retrovirus reconeix un receptor determinat. Els retrovirus més utilitzats són els que es basen en el virus de la leucèmia murina i aquests es divideixen en dos tipus: els retrovirus ecotròpics, que només infecten cèl·lules murines i utilitzen com a receptor un transportador d'aminoàcids bàsics (Kim *et al.*, 1991), i els retrovirus amfotròpics, que poden infectar cèl·lules tant hu-

manes com murines i que utilitzen com a receptor un transportador de fosfats (Miller *et al.*, 1994). Segons si les cèl·lules diana presenten o no aquests receptors i segons el nombre de receptors dels quals disposen, aquests retrovirus podran modificar més o menys eficientment les cèl·lules. Modificar el tropisme d'aquests retrovirus pot interessar tant per afavorir l'eficiència de transducció com per aconseguir una major especificitat de transducció.

Una de les estratègies desenvolupades per modificar el tropisme dels retrovirus es basa en la substitució total de la proteïna de la coberta *env* del virus original per una altra proteïna *env* que procedeixi d'un virus diferent i que posseeixi unes altres característiques pel que fa al mecanisme d'entrada a la cèl·lula diana; els virus així generats reben el nom de retrovirus pseudotipats. Un exemple concret és el que es basa en la substitució de la proteïna de la coberta del virus originari, el de la leucèmia murina, per la glucoproteïna G del virus de l'estomatitis vesicular humana. Mentre que el virus originari només és capaç de modificar cèl·lules que expressin el receptor requerit, el nou virus generat podrà modificar un ampli espectre de cèl·lules, ja que no reconeix un receptor específic sinó un fosfolípid de membrana present en molts tipus cel·lulars. Aquests retrovirus modificats, a més de presentar un ampli espectre d'infecció, quan se sotmeten a un procés de concentració aconseguen obtenir títols de fins a  $10^9$  partícules infectives/ml (Burns *et al.*, 1993). Aquests títols són molt més elevats que els títols obtinguts amb el virus de la leucèmia murina, que en el millor dels casos poden arribar a ser de  $10^7$  partícules infectives/ml. Aquesta estratègia aconsegueix millorar l'eficiència en el procés de transducció de les cèl·lules diana.

Una estratègia encaminada a modificar l'especificitat d'infecció dels retrovirus és la

que introdueix elements pont entre la proteïna *env* del retrovirus i la superfície de la cèl·lula. Aquests elements pont permeten que el retrovirus reconegui altres receptors que poden ser més específics del tipus cel·lular. Aquests elements pont poden ser diversos; un exemple seria el que utilitza l'acoblament de lligands químics com és la unió de molècules de lactosa per tal d'aconseguir transduir els hepatòcits a través del receptor de la galactosa (Neda *et al.*, 1991).

Una altra estratègia dirigida a modificar el tropisme dels retrovirus és la que desenvolupa sistemes basats en la modificació de la capacitat d'unió de la proteïna *env* de la coberta del virus. Aquestes modificacions inclouen la introducció de nous dominis d'unió en la regió N-terminal de la proteïna (Somia *et al.*, 1995), la substitució dels fragments naturals d'unió al receptor per d'altres amb una especificitat diferent (Kassahara *et al.*, 1994) o bé petites modificacions en el domini natural d'unió al receptor (Cosset *et al.*, 1996). Si bé aquestes estratègies permeten la unió específica del virus amb el receptor, s'ha observat que la posterior translocació de les càpsides virals al citoplasma és molt ineficient, de manera que la transducció s'esdevé en uns nivells baixos.

El desenvolupament de mètodes eficients i específics d'infecció mitjançada per retrovirus és un dels reptes principals que aquests vectors de transferència plantegen per al seu millor ús en teràpia gènica.

Una altra de les particularitats dels vectors retrovírics més utilitzats, els derivats del virus de la leucèmia murina, és que les cèl·lules susceptibles de ser modificades han d'estar en divisió per tal que el DNA terapèutic accedeixi al nucli de la cèl·lula. Aquest fet representa una limitació important en l'ús d'aquests vectors, ja que exclou la modificació de cèl·lules quiescents. D'altra banda, però, un cop al nucli, el transgèn s'integra de manera estable en el genoma de

la cèl·lula hoste, la qual queda així permanentment modificada (Miller *et al.*, 1990). La integració del transgèn en el genoma de la cèl·lula representa un avantatge important sobretot quan es tracta d'actuar en malalties hereditàries i alteracions cròniques, però també existeixen uns riscos potencials com possibles alteracions degudes a una sobreexpressió crònica del producte o bé la possible introducció de canvis mutacionals com a resultat de l'efecte d'inserció que es produiria en integrar-se el transgèn de forma aleatòria en el genoma de la cèl·lula hoste. (ex.: disrupció d'un gen supressor de tumor o activació d'un oncogen).

### Lentivirus

El desenvolupament dels lentivirus com a vectors de transferència ha sorgit recentment i per tant existeixen pocs estudis que permetin valorar àmpliament l'eficiència d'aquest sistema. Els lentivirus són un tipus de retrovirus que presenten la capacitat d'integrar-se de manera estable en el genoma de la cèl·lula hoste tant en cèl·lules en proliferació com en cèl·lules no proliferatives. Això és perquè aquests virus expressen unes proteïnes que són capaces d'interaccionar amb la maquinària d'import nuclear i mitjançar així el transport a nucli (Naldini *et al.*, 1996). Aquesta és una propietat que els fa molt atractius, ja que una de les limitacions principals que presenten els vectors retrovírics derivats del virus de la leucèmia murina (MLV) és el requeriment que les cèl·lules per ser modificades de manera estable han d'estar en divisió. Els primers vectors lentivírics desenvolupats es basen en el virus de la immunodeficiència humana (VIH) i s'ha pogut demostrar en experiments *in vivo* que transdueixen de manera eficient cèl·lules hepàtiques, musculars (Kafri *et al.*, 1997) i neuronals (Naldini *et al.*,

1996). En canvi, en investigacions realitzades en cèl·lules totalment diferenciades de l'epiteli pulmonar s'ha detectat un bloqueig en la transferència, probablement al nivell d'entrada del virus a la cèl·lula (Goldman *et al.*, 1997). El desenvolupament de vectors basats en el virus VIH presenta consideracions importants de seguretat biològica. La utilització de lentivirus d'origen no primat com el *feline immunodeficiency virus* (FIV) comença a ser estudiada, si bé cal realitzar diverses modificacions per tal d'incrementar l'eficiència de la transferència per causa del seu reduït tropisme (Peoschla *et al.*, 1998).

### Vectors adenovirals

Els adenovirus es van aïllar per primera vegada el 1953 a partir d'adenoides humans en la recerca dels agents causals d'un refredat comú. S'han descrit un total de quaranta-un serotipus, la majoria clínicament innocus. Els més estudiats són els serotips 2 i 5, els quals estan totalment seqüenciats. La utilització dels adenovirus com a vectors de transferència gènica és recent; les primeres experiències descrites són del període 1991-1993 (Berkner *et al.*, 1988; Becker *et al.*, 1994). Els vectors adenovírics, o adenovirus recombinants, són virus deficients, als quals s'han delecionat regions del genoma indispensables per a llur replicació.

### Estructura i cicle lític

La partícula de l'adenovirus té simetria icosaèdrica, i té un diàmetre de 70 nm. La coberta proteica està constituïda per una molècula de 30 nm de llarg formada per tres polipeptids idèntics que es projecta des de la superfície del virus i es troba en cadascun dels dotze vèrtexs. Aquest complex anomenat pentó està constituït per una proteïna, la

base del pentó, que forma una cavitat on s'inserta l'extrem N-terminal de la fibra. L'extrem C-terminal de la fibra és el domini d'interacció amb les cèl·lules hostes.

El seu genoma (pes molecular de  $24 \times 10^6$  dàltons) està constituït per un DNA de doble cadena de 36 kb, amb una capacitat codificadora per a vint proteïnes, i que uneix covalentment a cada extrem una proteïna de 55 kDa. De manera arbitrària, el genoma de l'adenovirus es divideix en cent unitats de mapa ( $\mu$ ), cadascuna de les quals correspon a 360 bp.

El primer esdeveniment que es dona en la infecció viral és el reconeixement específic de la cèl·lula diana amb un receptor específic a la superfície cel·lular. Recentment s'ha identificat una proteïna anomenada CAR (receptor dels adenovirus i virus Coxsackie) com a responsable de la interacció específica amb la proteïna de la fibra adenovírica (Bergelson *et al.*, 1997). Després d'haver-se fixat a la superfície cel·lular, el virus s'introdueix a la cèl·lula per endocitosi i en aquest procés interaccionen la base del pentó i les integrines cel·lulars (Wickham *et al.*, 1995). Un cop internalitzada la partícula vírica i gràcies a la capacitat endocitolítica de la base del pentó en la càpsida (Pastan *et al.*, 1986), pot fer arribar el seu genoma íntegre al nucli de la cèl·lula hoste. El genoma de l'adenovirus no s'integra en els cromosomes cel·lulars, sinó que roman extracromosòmic. Poc temps després de l'arribada al nucli (hores) s'inicia l'expressió dels gens virals, en la qual es diferencien una etapa primerenca (abans de la replicació), en què s'expressen gens de proteïnes reguladores de la transcripció i relacionades amb el control de la replicació del virus, i una etapa tardana, en què s'expressen els gens de les proteïnes estructurals de la càpsida. Al final del cicle lític, aproximadament dos dies després de la infecció, s'han produït de mil a cinc mil partícules víriques per cèl·lula.

*Característiques dels adenovirus com a vectors de transferència gènica i estratègies per a la preparació d'adenovirus recombinants*

Els adenovirus que s'utilitzen com a vectors de clonatge i expressió són virus delecionats; els primers virus recombinants preparats (anomenats de primera generació) estan delecionats en la regió primerenca o *early E1* (essencial per a la replicació). La delecio té una doble finalitat: d'una banda converteix els adenovirus en vectors incapaçs de replicar-se, i d'altra banda proporciona cabuda al gen forà; la longitud màxima de genoma que es pot empaquetar és de 38 kb (106 unitats de mapa). Posteriorment, s'han preparat altres virus recombinants en què s'han delecionat parts addicionals dels genomes i que, en conseqüència, tenen més capacitat de transport de gens forans i una reduïda expressió de proteïnes virals (Armentano *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1996).

Així doncs, els adenovirus vectors són capaços d'infectar cèl·lules permissives, en les quals es produirà l'expressió del genoma viral i els gens forans que portin insertats, però on no tindrà lloc la replicació. Per aconseguir la propagació del virus s'utilitzen línies cel·lulars en les quals s'ha insertat la regió E1, que expressen. La més utilitzada és la línia de cèl·lules epitelials de ronyó 293. En aquestes cèl·lules es durà a terme el cicle lític, i en el medi de cultiu es trobaran els adenovirus a títols d'entre  $10^8$  i  $10^{10}$  pfu/ml (pfu = unitats formadores de plaques).

La introducció del gen forà en el genoma adenovíric es pot realitzar fonamentalment mitjançant dues aproximacions. Una d'elles es basa en el lligament de fragments de DNA víric i el gen d'interès, i la posterior transfecció de les cèl·lules propagadores (293) amb la molècula recombinant. Aquesta aproximació presenta la dificultat d'haver de manipular el gran genoma viral (36 kb) i l'inconvenient que es produeixen algu-

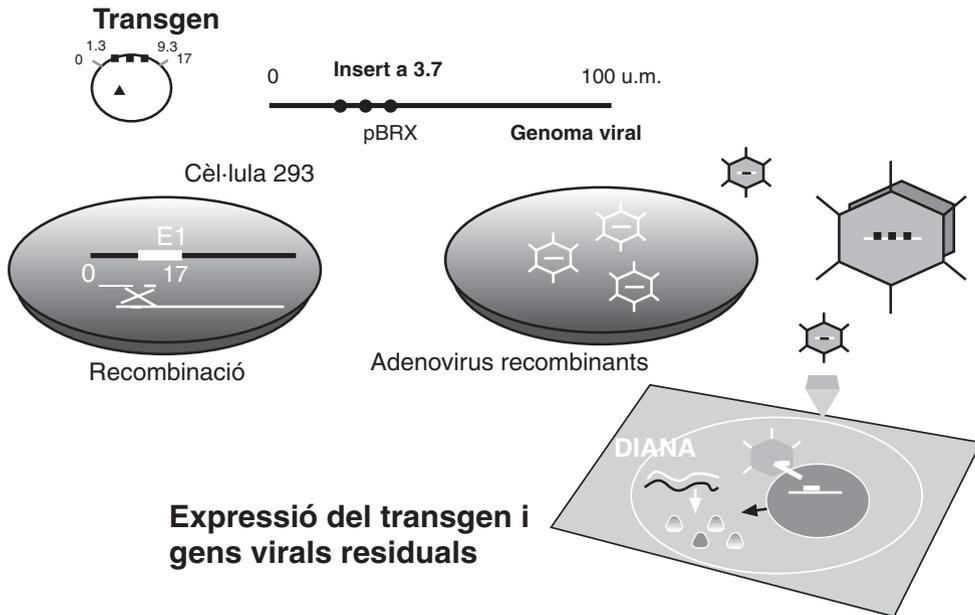


FIGURA 3. Estratègia de preparació i amplificació d'adenovirus recombinants E1-deficients.

nes partícules de virus no recombinants per la presència de petites quantitats de DNA víric no trencat, altament infectiu. Una segona aproximació, habitualment utilitzada, es basa en la cotransfecció de les cèl·lules permissives amb dos plasmidis que contenen fragments genòmics de l'adenovirus superposables; un d'aquests plasmidis inclou, a més, el gen forà (figura 3). Aquests plasmidis sofriran recombinació homòloga *in vivo*, la qual cosa generarà partícules infectives d'adenovirus amb el genoma recombinant deficient (Berkner, 1988; Becker *et al.*, 1994).

#### *Avantatges i inconvenients dels adenovirus com a vectors de DNA en teràpia gènica*

Un primer aspecte positiu dels vectors adenovírics és la seguretat biològica dels adenovirus. Existeix l'antecedent que determinats adenovirus intactes han estat àmpliament emprats en l'obtenció de vacunes.

A més, en cap cas s'han relacionat els adenovirus amb la generació de tumors en humans.

Un altre avantatge a destacar, i que els fa superiors als retrovirus en aquest camp d'aplicació, és la possibilitat d'obtenir títols molt elevats de virus (de fins a  $10^{10}$  pfu/ml), els quals poden ésser encara incrementats, mitjançant concentració per mètodes físics, fins a  $10^{12}$  pfu/ml o més.

La capacitat dels adenovirus per infectar un gran ventall de diferents tipus de cèl·lules eucariotes representa un avantatge addicional; fonamentalment tenint en compte que els humans són els hostes naturals d'aquests virus. Han estat infectats amb èxit amb vectors adenovírics: hepatòcits (Gómez-Foix *et al.*, 1992), cèl·lules beta pancreàtiques (Becker *et al.*, 1994), miòcits (Baqué *et al.*, 1994), cèl·lules del sistema nerviós (LaSalle *et al.*, 1993), cèl·lules epitelials (epiteli bronquial) (Lemarchand *et al.*, 1992), entre d'altres, i d'espècies diferents. Els adenovi-

rus, a més, no tenen un requeriment especial per a cèl·lules quiescents o en replicació. Tanmateix, i pel fet que el seu genoma no s'integra en el de la cèl·lula hoste, l'expressió del virus resulta transitòria en cèl·lules en divisió, mentre que es manté estable, *in vitro*, en cèl·lules no replicatives.

Un altre fet destacable dels adenovirus és que l'eficiència de transducció en molts sistemes cel·lulars assoleix valors propers al 100%, eficiència no aconseguida amb cap altre sistema de transferència.

Un dels inconvenients dels adenovirus com a vectors és que el disseny i construcció dels vectors adenovírics, per recombinació homòloga, és més complex que, per exemple, el cas dels retrovirus. Una altra limitació dels vectors adenovírics més usuals és la restringida capacitat per acceptar seqüències de DNA fora d'entre 5-7,5 kb, segons el tipus de vector.

Finalment, el principal inconvenient dels adenovirus com a vectors de transferència gènica *in vivo* és la resposta immunitària que generen. Les cèl·lules transduïdes amb adenovirus donen lloc a una resposta inflammatòria, la generació de limfòcits T citotòxics i la destrucció de les cèl·lules modificades. Això causa la desaparició de l'expressió del transgèn en un temps relativament curt (setmanes). Aquest fet es relaciona amb l'expressió en la cèl·lula de proteïnes víriques que serien altament immunogèniques. En aquest sentit, les noves generacions de virus incorporen deleccions més extenses del genoma en un intent de minimitzar l'expressió de proteïnes víriques, per tal de disminuir la resposta immunològica.

### Vectors adenoassociats

Els virus adenoassociats (AAV) són virus de DNA de la família dels parvovirus que no han estat implicats com a agents causals de

cap malaltia. El serotipus 2 infecta de manera natural cèl·lules de l'epiteli pulmonar en humans, i en cultiu mostra un ampli tropisme. Els AAV presenten unes característiques potencials altament interessants per a la transferència gènica: la infecció de cèl·lules per part de virus salvatges condueix a la integració del genoma viral de manera estable en un lloc específic del cromosoma 19 i no es restringeix a cap moment del cicle cel·lular. Donades aquestes característiques, emergiren com una alternativa atractiva a la dels vectors retrovírics, la inserció dels quals es produeix de forma aleatòria en el genoma, i només en cèl·lules replicatives. Nogensmenys, els vectors recombinants adenoassociats dels quals es disposa en l'actualitat semblen haver perdut la propietat d'integració específica i en l'actualitat s'està estudiant quins són els elements responsables d'aquest efecte (Samulski *et al.*, 1991).

### Estructura i cicle de vida

El virus és una partícula icosaèdrica proteica altament resistent a tractaments químics o físics que inactiven altres virus. El genoma és una cadena senzilla lineal d'aproximadament 4,68 kb en la qual es distingeixen tres regions. Unes seqüències repetides i invertides de 145 nucleòtids en els extrems o ITR (*inverted terminal repeat*), on s'inclouen l'origen de replicació i el senyal d'empaquetament i integració, i que són les úniques regions indispensables en *cis* per dur a terme els esmentats processos. Entre els dos ITR es troben els gens *Rep* i *Cap*, que codifiquen proteïnes necessàries per a la replicació i encapsidació del virus. La regió *Rep* conté dos marcs oberts de lectura que s'expressen sota els promotors p5 i p9 i que generen les proteïnes *Rep* (*Rep* 78, *Rep* 68, *Rep* 52 i *Rep* 40). Aquestes proteïnes estan involucrades en la regulació de la replicació viral, en el control

de l'expressió de les proteïnes de la càpsida i en la integració específica en el cromosoma cel·lular. La regió Cap codifica les tres proteïnes de la càpsida, VP-1, VP-2 i VP-3, que es transcriuen des del promotor p40 (Lebrowski *et al.*, 1988; Rolling *et al.*, 1995).

La infecció amb virus adenoassociats dona lloc a un cicle de vida latent. La partícula de virus s'uneix a un receptor encara no identificat. La partícula es transporta al nucli on perd la càpsida. Els ITR formen unes estructures en forma de T per complementarietat de seqüència, que constitueixen el lloc d'inici de la síntesi de DNA i de formació de la molècula bicatenària que s'integrarà en els cromosomes cel·lulars en forma de provirus. La integració del virus salvatge es dona en un lloc específic del cromosoma 19. Quan es produeix la coinfecció o superinfecció amb un virus auxiliar (adenovirus, herpesvirus o vaccí), el virus adenoassociat realitza un cicle de vida lític. Aquest virus implica també el rescat del provirus insertat i comprèn l'activació de l'expressió de la regió Rep de l'AAV, la replicació del genoma viral i l'empaquetament de les partícules en càpsides.

### Construcció de vectors AAV

En els vectors adenoassociats se substitueixen els gens *Rep* i *Cap* pel gen terapèutic que quedarà comprès entre els ITR. Per tal d'obtenir partícules infectives i en les primeres preparacions es duia a terme la cotransfecció del vector recombinant AAV (que conté el gen terapèutic) conjuntament amb els gens *Rep* i *Cap* a la línia cel·lular 293 que prèviament ha estat infectada amb un adenovirus. Ara es disposa de línies derivades de les cèl·lules 293 productores, generades per inserció estable dels gens *Rep* i *Cap* (Clark *et al.*, 1995). A partir d'aquestes línies és possible preparar línies cel·lulars que portin integrat

establement el vector AAV recombinant. La generació de partícules del virus s'indueix per infecció d'aquestes línies amb adenovirus. Els vectors recombinants s'alliberen per la lisi i mort de les cèl·lules que el produeixen. Aquests vectors són posteriorment purificats, sotmesos a un procés de concentració i ja estan preparats per al seu ús com a vectors de transducció (Flotte *et al.*, 1995).

### Característiques dels AAV. Avantatges i inconvenients

Es tracta d'un virus no patogènic, ja que l'exposició al virus no s'ha associat, fins ara, a cap malaltia. Un avantatge d'aquests vectors consisteix en el fet que són capaços d'infectar cèl·lules i integrar el DNA situat entre els dos ITR independentment de la fase del cicle cel·lular (Podsakoff *et al.*, 1994), si bé l'eficiència d'infecció és molt més alta quan les cèl·lules diana s'estan replicant (Russell *et al.*, 1994). Pel que fa a les limitacions, aquestes són diverses; d'una banda, la baixa eficiència d'infecció en comparació amb retrovirus o adenovirus. D'altra, les limitacions de la mida del DNA que pot ésser empaquetat; com que el genoma de l'AAV és petit, la mida màxima del transgèn que es pot vehicular es de 5 kb. Finalment, els títols aconseguits amb els mètodes de preparació descrits són baixos, prop de  $10^6$  partícules/ml.

### Virus derivats d'*Herpes simplex*

Els virus *Herpes simplex* HSV-1 i HSV-2 causen de manera natural infeccions de les cèl·lules epitelials humanes que cursen amb un cicle lític. Durant la infecció el virus estableix una infecció latent de les neurones que innerven el lloc de la lesió, per causa del manteniment del seu genoma com un element extracromosòmic en un estat quiescent, i des

d'allà actuen com a reservori i infecten de manera recurrent les cèl·lules epitelials.

### Estructura

La partícula vírica està formada per una coberta que inclou glicoproteïnes i rodeja una càpsida proteica icosaèdrica, separada del genoma per una capa de proteïnes anomenada tegument. El genoma és una doble cadena de DNA de 152 kb que conté almenys vuitanta gens. Aproximadament la meitat dels gens són essencials per a la replicació viral i els altres són dispensables. Per tant tenen una gran capacitat per acceptar DNA. El genoma consta de dues regions úniques (llarga i curta) flanquejades per seqüències repetides. Hi ha dos orígens de replicació i tres còpies de la seqüència «a» que mitjança el trencament i empaquetament del DNA víric (Fink *et al.*, 1997).

### Cicle de vida

Aquest virus infecta les cèl·lules per interacció amb un receptor i la coberta es fusiona amb la membrana cel·lular, la nucleocàpsida entra a la cèl·lula i es mou cap al nucli on allibera el DNA viral, el qual roman episòmic en forma circular. En el cicle de vida latent, la transcripció és limitada i només es formen uns quants transcrits anomenats transcrits associats a la latència o LAT RNA, que no pertorben la cèl·lula hoste. En el cicle lític es distingeixen dues etapes de transcripció: la *early* (abans de la replicació) i la *late*. Les proteïnes expressades en la època *early* tenen a veure amb factors de transcripció, la DNA polimerasa viral i la timidina quinasa. Les proteïnes *late* són proteïnes estructurals de la càpsida. El genoma es replica per un mecanisme de rodet on es forma un concatàmer d'unitats de genoma que són

després trencades i empaquetades. L'encapsidació té lloc al nucli de la cèl·lula.

### Vectors

S'han descrit dos tipus de vectors. Els vectors genòmics i els amplicons. La construcció de vectors genòmics requereix la deleció de regions relacionades amb la replicació i la patogènia, i la utilització del promotor víric actiu en la latència per dirigir l'expressió del transgèn. Aquests vectors expressen proteïnes víriques i tenen l'inconvenient d'una molt alta citotoxicitat (Marconi *et al.*, 1996).

Una alternativa consisteix a utilitzar únicament les seqüències d'origen de replicació i d'empaquetament: són els amplicons. Aquests vectors es varen desenvolupar en observar que quan s'infecten cèl·lules a una elevada multiplicitat d'infecció es formen virus defectius, el genoma dels quals, si bé tenia una longitud de 150 kb, estava format per còpies unides cap a cua d'una unitat d'aproximadament 3 kb. Les regions de DNA presents en aquests concatàmers contenen les regions essencials en *cis* per replicar i empaquetar el DNA: l'ori-s o origen de replicació del DNA viral i la regió «a» (senyal de trencament dels concatàmers i d'empaquetament).

S'han construït plasmidis bacterians que inclouen aquesta unitat on es pot insertar el gen forà expressat des d'un promotor propi viral (*lacZ* + *polyA*) o un promotor regulable. Aquest genoma es replica i s'encapsida amb l'ajut de cèl·lules empaquetadores que expressen el gen *IE3* de la regió *early* i el virus auxiliar (virus herpes defectiu en el gen *IE3*) (DeLuca *et al.*, 1985). Es produeixen per tant partícules víriques que empaqueten el virus auxiliar defectiu i el virus recombinant. Els vectors recombinants estan formats per concatàmers que inclouen ele-

ments vírics i el gen forà fins a mides de 150 kb. S'ha demostrat que aquest procés és eficient per a transgens de fins a 15 kb. En rondes successives d'infecció, el virus recombinant creix amb més eficiència que l'auxiliar per la disposició del lloc de replicació (ori), el qual fa innecessari un procés de selecció.

#### *Avantatges i inconvenients*

Aquests virus presenten un ampli tropisme i una particular afinitat per les cèl·lules neuronals. Se n'obtenen títols de l'ordre de  $10^7$  partícules/ml. Els inconvenients inclouen una eficiència d'infecció relativament baixa.

### **Transferència mitjançada per liposomes**

Els liposomes són vesícules de lípids amfipàtics que vehiculen l'entrada de DNA a cèl·lules eucariotes. El tipus de complex DNA-liposomes pot ésser de dos tipus: 1) El DNA es transporta encapsidat a l'interior de la vesícula lipídica; aquest és el cas de vesícules formades per lípids aniònics. 2) El DNA, com a molècula carregada negativament, s'acomplexa a vesícules preformades de liposomes catiònics (Felgner *et al.*, 1989; Legendre *et al.*, 1992). El mecanisme de transferència a la cèl·lula es basa en l'adsorció del complex liposoma-DNA sobre la superfície cel·lular, procés altament eficient pels liposomes catiònics, i posterior entrada principalment per endocitosi i, en una petita fracció, per fusió amb la membrana cel·lular. En la vesícula d'endocitosi el DNA entrarà en contacte amb els lisosomes i per tant serà majoritàriament degradat. Es calcula que només una de cada mil molècules de les que entren a la cèl·lula arribaran a expressar-se. Aquesta és la principal limitació de l'eficiència de transferència mitjançada per

liposomes. En aquest sentit s'estan desenvolupant estratègies que plantegen la coadministració dels liposomes juntament amb proteïnes amb capacitat endocitolítica o drogues que alteren la funció lisosomal (Baru *et al.*, 1995).

La distribució *in vivo* dels liposomes depèn de la composició lipídica i mida de la partícula (Baru *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1993; Gabizon *et al.*, 1988; Thierry *et al.*, 1995). Aquests factors es poden modificar per aconseguir un grau de transferència més específic. Una altra via que permet conferir direccionalitat en l'adsorció cel·lular de les vesícules és l'addició de lligands (com ara de receptors o anticossos) a la superfície dels liposomes (Heath 1987; Huang *et al.*, 1987).

#### *Avantatges i inconvenients*

La lipofecció és un mètode relativament eficient i adaptable, si bé l'eficiència és clarament inferior a la dels mètodes vírics i variable en funció del tipus de cèl·lula diana. La transferència és principalment transitòria, ja que la integració és molt ineficient. La lipofecció presenta importants avantatges respecte als vectors vírics pel que fa a la no limitació de la mida del transgèn que transporta o a la seguretat biològica. També cal destacar que el procés de preparació del complex DNA amb liposomes catiònics resulta extremadament senzill i ràpid. D'altra banda, els liposomes ofereixen un gran potencial respecte a la possibilitat de direccionalitat de la transferència mitjançant manipulació de la composició de la vesícula.

### **Transferència de DNA mitjançada per receptor**

Aquesta estratègia es fonamenta en acomplexar el DNA amb proteïnes (lligands

de receptors o anticossos) capaces d'interaccionar amb receptors cel·lulars i ser internalitzades per endocitosi a la cèl·lula diana (Wu *et al.*, 1987). A més d'aquesta funció, el lligand proteic ha de complir altres requisits com són: ésser capaç d'interaccionar espontàniament amb el DNA que ha de vehicular i arribar amb una eficiència acceptable al nucli de la cèl·lula. Per això se sintetitzen complexos moleculars o proteïnes híbrides que consten de: 1) un domini d'unió específica a un receptor cel·lular; 2) un domini d'unió al DNA, sigui un policatíon com la polilixina o un domini proteic capaç de lligar-se amb afinitat al DNA com el present en activadors transcripcionals (Fominaya *et al.*, 1996), i 3) un domini endocitolític, capaç de desestabilitzar els lisosomes i evitar la degradació del DNA. Aquest complex s'unirà posteriorment al DNA per interacció espontània deguda a la seva càrrega negativa o afinitat. Les construccions més estudiades han estat la mitjançada per asialoglicoproteïnes, les quals són reconegudes específicament per un receptor hepàtic (Wilson *et al.*, 1992) i els complexos amb la transferrina de caràcter ubic (Zenke *et al.*, 1990).

En últim terme, si bé la tècnica presenta clars avantatges com la direccionalitat i la seguretat biològica, presenta serioses limitacions pel que fa a la seva eficàcia: d'una banda l'eficiència en la introducció del DNA és baixa per causa de la degradació per acció dels enzims lisosomals en el seu camí cap al nucli, i d'altra banda la inestabilitat del DNA, que no arriba a integrar-se en el nucli cel·lular i que fa que l'expressió sigui transitòria.

### Microbombardeig

Es basa en l'acceleració a grans velocitats (cap a 400 m/s) de partícules que inclouen el DNA, que impacten i penetren en la cèl·lula.

Algunes de les partícules arribaran directament al nucli on s'alliberarà el DNA. En el mètode convencional s'empren micropartícules esfèriques de tungstè, que han estat recobertes amb el DNA. Les micropartícules es posen enfront del cilindre de niló com una suspensió aquosa i es projecten mitjançant corrent d'heli (o descàrrega elèctrica) sobre el teixit (Klein *et al.*, 1987). S'ha demostrat l'efectivitat d'utilitzar aquest sistema en la transferència de gens a diferents tipus cel·lulars (Williams *et al.*, 1991; Fitzpatrick-McElligott *et al.*, 1992; Jiao *et al.*, 1993).

### Avantatges i inconvenients

L'eficiència de transferència és comparable a l'electroporació o a la lipofecció. Aquest sistema presenta l'avantatge de la rapidesa; cal tenir present que el procés de transferència té lloc en menys d'un minut. Una de les principals limitacions és l'accessibilitat de la «pistola de DNA» al teixit diana i també la delimitació de l'àrea afectada, definida pel diàmetre de sortida del dispositiu. Un altre aspecte limitador és la facilitat del DNA per abandonar la micropartícula transportadora. S'han fet modificacions d'aquest mètode en les quals eviten unir el DNA a micropartícules i el mantenen en solució. En aquest cas, el DNA està vehiculat per gotes en suspensió que s'acceleren en un corrent d'aire i que contenen tant el DNA com els microprojectils. Un cop s'arriba a la cèl·lula, les micropartícules creen forats a la membrana pels quals penetra el DNA, que es mou de manera independent. Finalment, un inconvenient del mètode és que causa un cert grau de lesió cel·lular deguda al bombardeig amb les micropartícules. Cal esperar que futures modificacions i optimitzacions del sistema permetran utilitzar aquesta estratègia, si més no en algunes de les aproximacions de teràpia gènica.

## PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES SISTÈMIQUES

La producció de proteïnes circulants mitjançant transferència o enginyeria genètica és un procés complex, ja que la quantitat de la proteïna produïda, la regulació de la secreció i la biodistribució resulten crítiques. Una producció insuficient de la proteïna podria no tenir un impacte suficient per revertir la malaltia; per contra, l'excés podria resultar perniciosos. Les primeres aproximacions que s'han dut a terme les podem diferenciar en:

### *Aproximacions ex vivo*

Un dels millors teixits candidats per a aquest tipus d'aproximació són les cèl·lules hemopoètiques, ja que són fàcils d'obtenir, de modificar genèticament amb vectors retrovírics, de seleccionar i de reimplantar. Les diferents poblacions cel·lulars circulen per tot l'organisme i poden difondre fàcilment el producte del transgèn. Tanmateix s'ha demostrat que el transgèn introduït és inactivat amb freqüència durant els complexos processos de diferenciació (Challita *et al.*, 1994). Una alternativa és utilitzar cultius primaris de fibroblasts obtinguts a partir de biòpsies de pell, modificar-los genèticament i reimplantar-los en organoides (Moullier *et al.*, 1993). També les cèl·lules endotelials resulten particularment atractives per la seva accessibilitat i el fet que alliberen els productes directament al torrent sanguini. Aquestes cèl·lules es poden fins i tot utilitzar per recobrir catèters que seran posteriorment implantats en el sistema circulatori. D'altra banda els mioblasts també ofereixen la possibilitat d'ésser modificats *ex vivo* i ésser posteriorment reimplantats al múscul, on es fusionaran amb fibres pre-existents i des d'on es produirà l'allibera-

ció dels productes de secreció (Barr *et al.*, 1991).

### *Cèl·lules encapsidades*

És possible implantar cèl·lules heteròlogues a l'individu, prèviament encapsidades en membranes de permeabilitat selectiva (Hubell, 1995) que les protegiran del sistema immunitari i n'evitaran la disseminació. Aquestes cèl·lules acostumen a ésser cèl·lules immortalitzades, a les quals s'han inserit prèviament i establiment transgens, i que podran replicar-se i per tant mantenir-se actives durant llargs períodes (Chang *et al.*, 1993). En aquest sentit s'han preparat fibroblasts capaços de secretar l'hormona del creixement (Chang *et al.*, 1993) o cèl·lules de pituïtària productores d'insulina (Newgard *et al.*, 1994).

## APLICACIONS DE LA TERÀPIA GÈNICA

### *Cèl·lules hemopoètiques*

Les cèl·lules hemopoètiques es componen de diferents poblacions cel·lulars, totes derivades d'una cèl·lula mare, i això representa un sistema molt atractiu per a la manipulació genètica. Així, la modificació d'una única cèl·lula resultaria en la modificació de totes les que en deriven. Les cèl·lules pluripotencials hematopoètiques que es troben en el moll d'os han estat tradicionalment les cèl·lules diana per als experiments de transferència gènica. Més recentment s'ha demostrat que les cèl·lules progenitores de la hemopoesi presents tant en sang perifèrica com en sang de cordó umbilical són susceptibles també de ser modificades genèticament de manera prou eficient. L'aproximació més comuna que s'utilitza per transferir

gens a aquestes cèl·lules es fonamenta en la teràpia *ex-vivo* utilitzant vectors retrovírics. Cèl·lules hemopoètiques d'un donant es mantenen en cultiu i s'exposen als retrovirus ja sigui per cocultiu amb cèl·lules productores de retrovirus irradiades, ja sigui utilitzant estocs de virus procedents de sobrenedants d'aquestes cèl·lules. Després les cèl·lules transduïdes s'injecten a l'organisme receptor, el qual s'haurà acondicionat, generalment per irradiació, i afavorirà així el procés d'implantació de les cèl·lules transplantades.

Estudis dirigits a millorar l'eficiència de transferència i la capacitat d'implantació de les cèl·lules modificades en l'organisme receptor constitueixen els dos punts principals sobre els quals actuar per incrementar l'eficiència en el conjunt del procés. Les millores en l'eficiència de transferència es dirigeixen tant a manipulacions en els vectors retrovírics (Krall *et al.*, 1996) com a modificacions en el sistema de cultiu de les cèl·lules hemopoètiques. En aquest sentit cal destacar l'enriquiment de cèl·lules mare en la població del cultiu que té lloc per selecció de les cèl·lules que presenten en la superfície l'antigen CD34; com més indiferenciada és la cèl·lula, més elevat és el nivell d'expressió de l'antigen CD34 (May *et al.*, 1995). D'altra banda, el tipus de cultiu de les cèl·lules hemopoètiques també condiciona l'eficiència de transferència. Els anomenats cultius a curt termini han donat bons resultats en ratolins, mentre que en animals grans i en humans han estat menys satisfactoris. En aquests casos la utilització de cultius a llarg termini sembla més beneficiosa. En aquest tipus de cultius s'aprofita que les cèl·lules de l'estroma presents en el cultiu secreten els factors de creixement necessaris per tal que es doni tant el procés de diferenciació dels progenitors com la capacitat d'autoreplicar-se de la cèl·lula mare. L'eficiència de transferència en aquest tipus de

cultius s'ha demostrat tant en animals murins com en animals superiors (Bienzle *et al.*, 1994; Fillat *et al.*, 1996) i recentment en cultius humans s'ha observat també que la presència de cèl·lules de l'estroma permet incrementar l'eficiència de transferència i la longevitat dels precursors hemopoètics (Nolta *et al.*, 1995). Els estudis dirigits a incrementar la capacitat d'implantació de les cèl·lules transduïdes en l'organisme receptor se centren en combinacions de tractaments per irradiació i administració de factors de creixement com el G-CSF, factor estimulador de granulòcits (Mardiney *et al.*, 1996).

En teoria qualsevol malaltia que sigui curable per trasplantament de moll d'os pot ésser tractada per la introducció del gen defectiu en cèl·lules de la línia hemopoètica. Amb aquesta idea es varen iniciar els primers estudis de teràpia gènica en humans a cèl·lules hemopoètiques. La malaltia escollida va ésser la immunodeficiència greu combinada. Es tracta d'una deficiència en l'enzim adenosina deaminasa, ADA, el qual intervé en el catabolisme de les purines. Aquesta alteració condueix a un dèficit en les funcions de les cèl·lules T i B i resulta amb infeccions recurrents en les persones afectades per aquesta patologia. Com que la malaltia és totalment curable per trasplantament de moll d'os, la inserció del gen ADA en les cèl·lules del moll d'os d'aquests pacients hauria de solucionar les manifestacions clíniques. A més existeix l'avantatge que les cèl·lules poden suportar nivells variables d'activitat de l'enzim, de manera que nivells d'un 5-10 % del normal serien suficients. Els primers experiments duts a terme en pacients han demostrat que el grau de transducció de les cèl·lules hemopoètiques era baix; en estudis més recents, si bé es mostra un increment en l'eficiència del sistema, no es pot parlar encara d'un clar benefici terapèutic (Barragner *et al.*, 1996).

### Cèl·lules hepàtiques

Les cèl·lules hepàtiques poden ésser transduïdes amb gran eficiència *in vivo* amb adenovirus. L'administració sistèmica d'aquests vectors vírics ha posat de manifest el seu marcat tropisme per a aquest teixit (Hertz *et al.*, 1993). També és possible la transducció dels hepatòcits mitjançant retrovirus, si bé està condicionada a la inducció de replicació cel·lular, ja sigui per factors de creixement *in vitro* o mitjançant hepatectomia parcial prèvia *in vivo*. Tot i així, l'eficiència demostrada és relativament baixa (Grossman *et al.*, 1991). Un sistema que resulta atractiu per la seva especificitat és el de l'entrada mitjançada pel receptor de les asialoglicoproteïnes, malgrat que la baixa eficiència del sistema ha limitat l'èxit d'aquesta estratègia (Wu *et al.*, 1988).

Hi ha diverses malalties que afecten el teixit hepàtic, en les quals el restabliment de la funció perduda seria d'utilitat en la teràpia. Entre elles cal destacar la hipercolesterolemia familiar deguda a manca en el receptor de les LDL, la fenilcetonúria resultant de deficiència en fenilalanina hidroxilasa (Wu *et al.*, 1988), les hemofílies per carença dels factors VIII o IX de coagulació (Key *et al.*, 1994) o la deficiència en l'ornitina transcarbamilasa (Morsy *et al.*, 1993).

### Cèl·lules musculars

Per a l'administració de gens al múscul s'han proposat dues estratègies: la modificació *ex vivo* de mioblasts i posterior reimplantació, o l'administració directa al teixit muscular *in vivo*, per injecció intramuscular (Svensson *et al.*, 1996) o per infusió en el sistema vascular muscular aïllat (Welling *et al.*, 1996). L'aplicació de mioblasts genèticament modificats sembla restringida a la producció de proteïnes circulants. La trans-

ferència de mioblasts és massa costosa, en temps i recursos econòmics, per ser útil en el tractament de miopaties. A més, el múscul humà sembla poc receptiu al trasplantament de mioblasts (Mendell *et al.*, 1995). *In vivo*, els vectors de transferència més útils han resultat els adenovirus (Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992), si bé s'ha demostrat que el DNA plasmídic injectat intramuscularment arriba a expressar-se en les miofibres (Wolff *et al.*, 1991). Tot i això aquestes estratègies han demostrat ésser d'una eficiència limitada de cara a afectar una proporció considerable de la massa muscular, ja que la transferència resulta localitzada a l'àrea injectada o infundida. Les principals malalties diana en el múscul són la malaltia de Duchenne o la distròfia muscular de Becker produïdes per alteracions en la proteïna del citoesquelet distrofina (Ragot *et al.*, 1993).

### Cèl·lules endotelials

D'entre les malalties que afecten aquest teixit, cal destacar els intents de teràpia gènica per a la fibrosi quística. Aquesta afecció és originada per alteracions en el gen CFTR, el qual codifica una proteïna transmembrana que forma un canal de clor. Com a resultat de la reducció o pèrdua de la funció del canal, principalment en les cèl·lules de l'epiteli pulmonar, apareixen els símptomes clàssics de la malaltia. La transferència *in vitro* del cDNA de la proteïna CFTR a cèl·lules procedents de pacients amb fibrosi quística ha demostrat ésser capaç de recuperar la capacitat de secretar ions clorur (Rich *et al.*, 1990). *In vivo*, la via d'administració més adient sembla l'administració dels vectors mitjançant aerosols. Essencialment, s'han dut a terme assajos utilitzant liposomes i adenovirus, que en l'actualitat no han demostrat encara un benefici terapèutic sufi-

cient donada la relativa ineficiència de la transferència (Grubb *et al.*, 1994; Caplen *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1995).

### Cèl·lules nervioses

Entre les aplicacions potencials de la teràpia gènica de malalties del teixit nerviós hi hauria la malaltia de Parkinson, causada per degeneració de les neurones dopaminèrgiques; la malaltia d'Alzheimer, neurodegeneració per pèrdua progressiva de neurones colinèrgiques, o la malaltia de Lesch-Nyhan, deficiència en l'enzim hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa HPRT de la via salvatge de síntesi de purines (Blömer *et al.*, 1996), entre altres. Les principals estratègies apuntades per a la malaltia de Parkinson es basen en la transferència *in situ* de fibroblasts transduïts amb retrovirus que contenen la tirosina hidroxilasa i que són productors de precursors de dopamina (Jiao *et al.*, 1993). També la generació *in situ* de factors de creixement neuronal podria ésser d'utilitat per a les malalties de Parkinson i Alzheimer. Pel que fa als vectors, els primers emprats varen ésser els herpes virus donat el seu conegut tropisme per a les cèl·lules neuronals (Chiocca *et al.*, 1990). Tanmateix aquests han estat àmpliament desplaçats pels adenovirus (Akli *et al.*, 1993) més eficients i menys citotòxics.

### CONCLUSIONS

En resum, les eines i tècniques de transferència gènica de què disposem són encara imperfectes i això ha fet que les demostracions clíniques de l'èxit d'aquests procediments obtingudes fins a l'actualitat siguin, de fet, reduïdes. De totes maneres, la filosofia de la teràpia gènica és molt simple i el potencial d'aplicació molt important. Per tant,

si bé els mitjans tècnics de què disposem en l'actualitat són limitats, cal esperar que el ràpid progrés de les tècniques que sustenten aquesta teràpia ens apropin a un futur molt prometedor.

### BIBLIOGRAFIA

- AKLI, S.; C. CAILLAUD; E. VIGNE; L. D. STRATFORD-PERRICAUDET; L. POENARU; M. PERRICAUDET; A. KAHN; M. R. PESCHANSKI (1993). «Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors». *Nature genetics*, núm. 3, pàg. 224-228.
- ARMENTANO, D.; C. C. SOOKDEO; K. M. MEHIR; R. J. GREGORY; J. A. ST. GEORGE; G. A. PRINCE; S. C. WADSWORTH; A. E. SMITH (1995). «Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion». *Hum. Gene Ther.*, núm. 6, pàg. 1343-1353.
- BAQUÉ, S.; C. B. NEWGARD; E. D. GERARD; J. J. GUINO-VART; A. M. GÓMEZ-FOIX (1994). «Adenovirus-mediated delivery into myocytes of muscle glycogen phosphorylase, the enzyme deficient in patients with glycogen storage disease type V». *Biochem. J.*, núm. 304, pàg. 1009-1014.
- BARR, E.; J. N. LEIDEN (1991). «Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts». *Science*, núm. 254, pàg. 1507-1512.
- BARRANGER, J. A. (1996). «Hematopoietic stem cell gene transfer». *Gene Therapy*, núm. 3, pàg. 379-380.
- BARU, M.; J. H. AXELROD; I. NUR (1995). «Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice». *Gene*, núm. 161, pàg. 143-150.
- BECKER, T. C.; H. BELTRANDELRIO; R. J. NOEL; J. H. JOHNSON; C. B. NEWGARD (1994). «Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 21234-21238.
- BECKER, T. C.; R. J. NOEL; W. S. COATS; A. M. GÓMEZ-FOIX; T. ALAM; R. D. GERARD; C. B. NEWGARD (1994). «Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells». *Methods Cell Biol.*, núm. 43, pàg. 161-189.
- BERGELSON, J. M.; J. A. CUNNINGHAM; G. DROGUETT; E. A. KURT-JONES; A. KRITHIVAS; J. H. HONG; M. S. HORWITZ; R. L. CROWELL; R. W. FINBERG (1997). «Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5». *Science*, núm. 275, pàg. 1320-1323.
- BERKNER, K. L. (1988). «Development of adenoviral vectors for the expression of heterologous genes». *Biotechnology*, núm. 6, pàg. 616-630.

- BIENZLE, D. A.; C. G. ABRAMS-OGG; S. A. KRUTH; J. ACKLAND-SNOW; R. F. CARTER; J. E. KICK; R. M. JACOBS; S. KAMEL-REID; I. D. DUBE (1994). «Gene transfer into hematopoietic stem cells. Long-term maintenance of in vitro activated progenitors without marrow ablation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 350-354.
- BLAESE, R. M.; K. W. CULVER; W. F. ANDERSON (1990). «The ADA human gene therapy clinical protocol». *Hum. Gene Ther.*, núm. 1, pàg. 331-362.
- BLÖMER, U.; L. NALDINI; I. M. VERMA; D. TRONO; F. H. GAGE (1996). «Applications of gene therapy to CNS». *Hum. Mol. Gen.*, núm. 5, pàg. 1307-1404.
- BORDIGNON, C.; L. NOTARANGELO; N. NOBILI; G. FERRARI; G. CASORATI; P. PANINA; E. MAZZOLARI; D. MAGGIONI; C. ROSSI; P. SERVIDA; A. G. UGAZIO; F. MAVILLO (1995). «Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA\_Immuno-deficient patients». *Science*, núm. 270, pàg. 470-474.
- BURNS, J.; T. FRIEDMANN; W. DRIEVER; M. BURRASCANO; J. K. YEE (1993). «Vesicular stomatitis virus Glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 8033-8037.
- BYUN, J.; S.-H. KIM; J. M. KIM; S. S. YU; P. D. ROBBINS; J. YIM; S. KIM (1996). «Analysis of the relative level of gene expression from different retroviral vectors used for gene therapy». *Gene Therapy*, núm. 3, pàg. 780-788.
- CAPLEN, N. J.; E. W. F. W. ALTON; P. G. MIDDLETON; J. R. DORIN; B. J. STEVENSON; X. GAO; S. R. DURHAM; P. K. JEFFERY; M. E. HODOSN; C. COUTELLE; L. HUANG; D. J. PORTEOUS; R. WILLIAMSON; D. M. GEDDES (1995). «Liposome-mediated cTFR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis». *Nature Med.*, núm. 1, pàg. 39-46.
- CHALLITA, P.-M.; D. B. KOHN (1994). «Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 2567-2571.
- CHANG, P. L.; N. SHEN; A. J. WESTCOTT (1993). «Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells in vivo». *Hum. Gene Ther.*, núm. 4, pàg. 443-440.
- CHIOCCA, A. E.; B. B. CHOI; W. CAI; N. A. DELUCA; P. A. SCHAFFER; M. DEFILGLIA; X. O. BREAKFIELD; R. L. MARTUZA (1990). «Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons by herpes simplex virus mutants». *New Biol.*, núm. 2, pàg. 739-746.
- CLARK, K. R.; F. VOULGAROPOULOU; D. M. FRALEY; P. R. JOHNSON (1995). «Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus». *Hum. Gene Ther.*, núm. 6, pàg. 1329-1341.
- COSSET, F.-L.; S. J. RUSELL (1996). «Targeting retrovirus entry». *Gene Therapy*, núm. 3, pàg. 946-956.
- DANKS, D. M. (1994). «Germ-line gene therapy: no place in treatment of genetic disease». *Hum. Gene Ther.*, núm. 5, pàg. 151-152.
- DELUCA, N. A.; A. M. MCCARTHY; P. A. SCHAFFER (1985). «Isolation and characterization of deletion mutants of *Herpes simplex* virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP-4». *J. Virol.*, núm. 56, pàg. 558-570.
- FELGNER, P. L.; G. M. RINGOLD (1989). «Cationic liposome-mediated transfection». *Nature*, núm. 337, pàg. 87-88.
- FILLAT, C.; C. M. SIMONARO; P. L. YEYATI; J. L. ABKOWITZ; M. E. HASKINS; E. H. SCHUCHMAN (1996). «Arylsulfatase B activities and glycosaminoglycan levels in retrovirally transduced Mucopolysaccharidosis type VI cells». *J. Clin. Invest.*, núm. 98, pàg. 497-502.
- FINK, D. J.; J. C. GLORIOSO (1997). «Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons». *Nature Med.*, núm. 3, pàg. 357-359.
- FITZPATRICK-MCELLIGOTT S. (1992). «Gene transfer to tumor-infiltrating lymphocytes and other mammalian somatic cells by microprojectile bombardment». *BioTechnology*, núm. 10, pàg. 1036-1040.
- FLOTTE, T. R.; B. J. CARTER (1995). «Adeno-associated virus vectors for gene therapy». *Gene Therapy*, núm. 2, pàg. 357-362.
- FOMINAYA, J.; W. WELS (1996). «Target-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 10560-10568.
- GABIZON, A.; D. PAPAHDJOPOULOS (1988). «Liposome formulation with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 85, pàg. 6949-6953.
- GOLDMAN, M. J.; P.-S. LEE; J.-S. YANG; J. M. WILSON (1997). «Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis». *Hum. Gene Ther.*, núm. 8, pàg. 2261-2268.
- GÓMEZ-FOIX, A. M.; W. S. COATS; S. BAQUÉ; T. ALAM; R. D. GERARD; C. B. NEWGARD (1992). «Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 25129-25134.
- GROMPE, M.; S. N. JONES; H. LOULSEGED; T. CASKEY (1992). «Retroviral-mediated gene transfer of human ornithine transcarbamylase into primary hepatocytes of spf snd spf-ash mice». *Hum. Gene Ther.*, núm. 3, pàg. 35-44.
- GROSSMAN, M.; S. RAPER; J. M. WILSON (1991). «Towards liver-directed gene therapy: retrovirus-mediated gene transfer into human hepatocytes». *Som. Cell Molec. Gen.*, núm. 17, pàg. 601-607.
- GRUBB, B. R.; R. J. PICKLES; H. YE; J. R. YANKASKAS; R. N.

- VICK; J. F. ENGELHARDT; J. M. WILSON; L. G. JOHNSON; R. C. BOUCHER (1994). «Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans». *Nature*, núm. 371, pàg. 802-806.
- HEATH, T. D. (1987). «Covalent attachment of proteins to liposomes». *Meth. Enzymol.*, núm. 149, pàg. 111-119.
- HERZ, J.; R. D. GERARD (1993). «Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 2812-2816.
- HODGSON, C. P. (1987). «The vector void in gene therapy». *Biotechnology*, núm. 13, pàg. 222-225.
- HUANG, L.; J. CONNOR; C. Y. WANG (1987). «pH sensitive immunoliposomes». *Methods in Enzymol.*, núm. 149, pàg. 88-99.
- HUBELL, J. A. (1995). «Biomaterials in tissue engineering». *Biotechnology*, núm. 13, pàg. 565-576.
- JIAO, S.; L. CHENG; J. A. WOLFF; N-S. YANG (1993). «Particle bombardment-mediated gene transfer and expression in rat brain tissues». *Biotechnology*, núm. 11, pàg. 497-502.
- JIAO, S.; V. GUREVICH; J. A. WOLFF (1993). «Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy». *Nature*, núm. 362, pàg. 450-453.
- KAFRI, T.; U. BLÖMER; D. A. PETERSON; F. H. GAGE; I. M. VERMA (1997). «Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors». *Nature Genetics*, núm. 17, pàg. 314-317.
- KASSAHARA, N.; A. M. DOZY; Y. W. KAN (1994). «Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions». *Science*, núm. 266, pàg. 1373-1376.
- KAY, M. A.; C. N. LANDEN; S. R. ROTHENBERG; L. A. TAYLOR; F. LELAND; S. WIEHLE; B. FANG; D. BELLINGER; M. FINEGOLD; A. R. THOMPSON; M. READ; K. M. BRINKHOUS; S. L. C. WOO (1994). «In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 2353-2357.
- KIM, J. W.; E. I. CLOSS; L. M. ALBRITTON; J. M. CUNNINGHAM (1991). «Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor». *Nature*, núm. 352, pàg. 725-731.
- KLEIN, T.; E. WOLF; R. WU; J. SANFORD (1987). «High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells». *Nature*, núm. 327, pàg. 70-73.
- KNOWLES, M. R.; K. W. HOHNEKER; Z. ZHOU; J. C. OLSEN; T. L. NOAH; P-C. HU; M. LEIGH; J. F. ENGELHARDT; L. EDWARDS; K. R. JONES; M. GROSSMAN; J. M. WILSON; L. G. JOHNSON; R. BOUCHER (1995). «A controlled study of adenoviral-vecr-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis». *N. Engl. J. Med.*, núm. 333, pàg. 823-831.
- KRALL, W. J.; D. C. SKELTON; X.-J. YU; I. RIVIERE; P. LEHN; R. C. MULLIGAN; D. B. KOHN (1996). «Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells». *Gene Therapy*, núm. 3, pàg. 37-48.
- LASALLE, G. L. G.; J. J. ROBERT; S. BERRARD; V. RIDOUX; L. D. STRAFFORD-PERRICAUDET; M. PERRICAUDET; J. MALLET (1993). «An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain». *Science*, núm. 259, pàg. 988-990.
- LEBROWSKI, J. S.; M. M. MCNALLY; T. B. OKARMA; K. B. LERCH (1988). «Adeno-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 8, pàg. 515-524.
- LEDLEY, F. D. (1987). «Somatic gene therapy for human diseases: background and prospects. Part I». *J. Pediatr.*; núm. 110, pàg. 1-8, «Part II», *J. Pediatr.* núm. 110, pàg. 167.
- LEGENDRE, J.-Y.; F. C. SZOKA (1992). «Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes». *Pharm. Res.*, núm. 9, pàg. 1235-1242.
- LEMARCHAND, P.; H. A. JAFFE; C. DANIEL; M. C. CID; K. KLEINMAN; L. D. STRATFORD-PERRICAUDET; M. PERRICAUDET; A. PAVIRANI; J.-P. LECOQ; R. G. CRYSTAL (1992). «Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, pàg. 6482-6486.
- LEVINE, F.; J. K. YEE; T. FRIEDMANN (1991). «Efficient expression in mammalian cells from a dicistronic transcriptional unit in an improved retroviral vector». *Gene*, núm. 108, pàg. 167-174.
- LEVY-YEYATI, P., V. AGMON; C. FILLAT; T. DINUR; A. DAGAN; R. J. DESNICK; S. GATT; E. H. SCHUCHMAN (1995). «Fluorescence-based selection of retrovirally transduced cells in the absence of a marker gene: Direct selection of transduced type B Niemann-Pick disease cells and evidence for bystander correction». *Hum. Gene Ther.*, núm. 6, pàg. 975-983.
- MACER, D. R. J. (1992). «Public acceptance of human gene therapy and perceptions of human genetic manipulation». *Hum. Gene Ther.*, núm. 3, pàg. 511-518.
- MARCONI, KRISKY, D.; T. OLIGINO; P. L. POLIANI; T. RAMAKRISHMAN; W. F. GOINS; D. J. FINK; J. C. GLORIOSO (1996). «Replication-defective HSV vectors for gene transfer in vivo». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 11319-11320.
- MARDINEY III, M.; H. L. MALECH (1996). «Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: Implications for gene therapy». *Blood*, núm. 87, pàg. 4049-4056.

- MARKOWITZ, D.; S. GOFF; A. BANK (1988). «A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids». *J. Virol.*, núm. 62, pàg. 1120-1124.
- MARKOWITZ, D.; S. GOFF; A. BANK (1988). «Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line». *Virology*, núm. 167, pàg. 400-406.
- MAY, G.; T. ENVER (1995). «Targeting gene expression to haemopoietic stem cells: a chromatin-dependent upstream element mediates cell type-specific expression of the stem cell antigen CD34». *EMBO J.*, núm. 14, pàg. 564-574.
- MCCANN, J. D.; K. W. KLINGER; A. E. SMITH; M. J. WELSH (1990). «Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells». *Nature*, núm. 347, pàg. 358-363.
- MENDELL, J. R. (1995). «Myoblast transfer in treatment of Duchenne's muscular dystrophy». *New Engl. J. Med.*, núm. 333, pàg. 832-838.
- MILLER, D. G.; R. H. EDWARDS; A. D. MILLER (1994). «Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 78-82.
- MILLER, D. G.; A. A. MOHAMMED; D. A. MILLER (1990). «Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 10, pàg. 4239-4242.
- MORSY, M. A.; E. L. ALFORD; A. BETT; F. L. GRAHAM; T. CASKEY (1993). «Efficient adenoviral-mediated ornithine transcarbamylase expression in deficient mouse and human hepatocytes». *J. Clin. Invest.*, núm. 92, pàg. 1580-1586.
- 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 Genet.*, núm. 4, pàg. 154-159.
- NALDINI, L.; U. BLÖMER; F. H. GAGE; I. M. VERMA (1996). «Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 11382-11388.
- NALDINI, L.; U. BLÖMER; P. GALLAY; D. ORY; R. MULLIGAN; F. H. GAGE; I. M. VERMA; D. TRONO (1996). «In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector». *Science*, núm. 272, pàg. 263-267.
- NEDA, H.; C. WU; G. WU (1991). «Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 14143-14146.
- NEWGARD, C. B. (1994). «Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes». *Diabetes*, núm. 43, pàg. 341-350.
- NOLTA, J. A.; E. M. SMOGORZEWSKA; D. B. KOHN (1995). «Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction of primitive human hematopoietic cells». *Blood*, núm. 86, pàg. 101-110.
- PASTAN, I.; P. SETH; D. FITZGERALD; M. WILLINGAHM (1986). *Virus Attachment and entry into cells*. Crowell, R. L.; Lonberg-Holm, K. [ed.], Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pàg. 141-146.
- PODSAKOFF, G.; J. K. K. WONG; S. CHATTERJEE (1994). «Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors». *J. Virol.*, núm. 68, pàg. 5656-5666.
- POESCHLA, E. M.; F. WONG-STAAAL; D. J. LOONEY (1998). «Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors». *Nature Med.*, núm. 4, pàg. 354-357.
- RAGOT, T.; N. VINCENT; P. CHAFEY; E. VIGNE; H. GILGENKRANTZ; D. COUTON; J. CARTAUD; P. BRIAND; J.-C. KAPLAN; M. PERRICAUDET; A. KAHN (1993). «Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of medx mice». *Nature*, núm. 361, pàg. 647-650.
- RICH, D. P.; M. ANDERSON; R. J. GREGORY; S. H. CHENG; S. AUL; D. M. JEFFERSON; F. ROLLING; R. J. SAMULSKI (1995). «Adeno-associated virus as a viral vector for human gene therapy. Generation of recombinant virus». *Mol. Biotechnol.*, núm. 3, pàg. 9-15.
- RUSSELL, D. W.; A. D. MILLER; I. E. ALEXANDER (1994). «Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 8915-8919.
- SALMONS, B.; W. H. GYNZBURG (1993). «Targeting of retroviral vectors for gene therapy». *Hum. Gene Ther.*, núm. 4, pàg. 129-141.
- SAMULSKI, R. J.; X. ZHU; X. XIAO; J. D. BROOK; D. E. HOUSMAN; N. EPSTEIN; L. A. HUNTER (1991). «Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into chromosome 19». *EMBO J.*, núm. 10, pàg. 3941-3950.
- SOMIA, N.; M. ZOPP; I. VERMA (1995). «Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92, pàg. 7570-7574.
- STRATFORD-PERRICAUDET, L. D.; I. MAKEH; M. PERRICAUDET; P. BRIAND (1992). «Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart». *J. Clin. Invest.*, núm. 90, pàg. 626-630.
- SVENSSON, E. C.; S. K. TRIPATHY; J. F. LEIDEN (1996). «Muscle-based gene therapy: realistic possibilities for the future». *Mol. Med. Today*, pàg. 166-172.
- TAMIYA, T.; M. X. WEI; M. CHASE; Y. ONO; F. LEE; X. O. BREAKEYFIELD; E. A. CHIOCCA (1995). «Transgene in-

- heritance and retroviral infection contribute to the efficiency of gene expression in solid tumors inoculated with retroviral vector producer cells». *Gene Therapy*, núm. 2, pàg. 531-538.
- THIERRY, A. R.; Y. LUNARDI-ISKANDAR; J. L. BRYANT; P. RABINOVICH; R. C. GALLO; L. C. MAHAN (1995). «Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92, pàg. 9742-9746.
- WEI, M. X.; T. TAMIYA; R. K. HURFORD JR; E. J. BOVIATIS; R. I. TEPPER; A. CHIOCCA (1995). «Enhancement of interleukin-4-mediated tumor regression in athymic mice by in situ retroviral gene transfer». *Hum. Gene Therapy*, núm. 6, pàg. 437-443.
- WEISS, R. A.; C. S. TAILOR (1995). «Retrovirus receptors». *Cell*, núm. 82, pàg. 531-533.
- WELLING, T. H.; B. L. DAVIDSON; J. A. ZELENOK; J. C. STANLEY; D. GORDON; B. J. ROESSLER; L. M. MESSINA (1996). «Systemic delivery of the interleukin-1 receptor antagonist protein using a new strategy of direct adenoviral-mediated gene transfer to skeletal muscle capillary endothelium in the isolated rat hindlimb». *Hum. Gen. Ther.*, núm. 7, pàg. 1795-1802.
- WICKHAM, T. J.; M. E. CARRION; I. KOVESDI (1995). «Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs». *Gene Therapy*, núm. 2, pàg. 750-756.
- WILLIAMS, R. S.; S. A. JOHNSTON; M. RIEDY; M. J. DEVIT; S. G. MCELLIGOTT; J. C. SANFORD (1991). «Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 2726-2730.
- WILSON, J. M.; M. GROSSMAN; C. H. WU; N. R. CHODHURY; G. Y. WU; J. R. CHOWDHURY (1992). «Hepatocyte directed gene transfer in vivo leads to transgen improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein-receptor deficient rabbits». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 963-967.
- WOLFF, J. A.; P. WILLIAMS; G. ACSADI; S. JIAO; A. JANI; W. CHONG (1991). «Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo». *Biotechniques*, núm. 11, pàg. 474-485.
- WU, G. Y.; C. H. WU (1988). «Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo». *J. Biol. Chem.*, núm. 263, pàg. 14621-14624.
- YEH, P.; J. F. DEDIEU; C. ORSINI; E. VIGNE; P. DENEFLÉ; M. PERRICAUDET (1996). «Construction and autonomous propagation of an E1- and E4-deleted recombinant adenovirus in a 293 (E4+) cell line expressing a minimal E4 unit». *J. Virol.*, núm. 70, pàg. 559-565.
- ZENKE, M.; P. STEINLEIN; E. WAGNER; M. COTTEN; G. H. BEUG; M. L. BIRNSTIEL (1990). «Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 87, pàg. 3655-3659.
- ZHU, N.; D. LIGGITT; Y. LYU; R. DEBS (1993). «Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice». *Science*, núm. 261, pàg. 209-211.