

Temas de actualidad

Terapia génica: problemas del pasado, presente y esperanzas de futuro

Juan Ruiz Echeverría

División de Terapia Génica y Hepatología. Departamento de Medicina Interna.
Universidad de Navarra. Irunlarrea, 1 - 31007 Pamplona.
E-mail: jruiz@unav.es

La terapia génica nace como consecuencia natural del enorme progreso que en los últimos 25 años se ha experimentado en áreas como la biología molecular (en especial lo que se conoce como técnicas del DNA recombinante), la biología celular y la virología. La posibilidad de tratar las enfermedades tanto en su raíz etiológica como de forma sintomática, empleando la transferencia de ácidos nucleicos, constituye la mayor esperanza de la medicina del siglo XXI. Sin embargo, este concepto teórico universalmente aceptado y que levantó enormes expectativas hace 10 años, no ha producido hasta ahora más que escepticismo en el mejor de los casos, decepción la mayoría de las veces y recientemente cierta alarma social. ¿Es justa esta evolución de la visión acerca de la terapia génica? ¿Estaba bien fundada la esperanza inicialmente despertada o hemos de creer a sus críticos y pasar página, abandonar este área de investigación y buscar otras alternativas?

Un símil histórico

Hace ya dos siglos, a finales del XIX, los hermanos Wright sentaron (tras los diseños revolucionarios de Leonardo da Vinci y el desarrollo de los globos aerostáticos) las bases de la aeronáutica moderna con sus primeros modelos de aeroplano. Aunque sus intentos iniciales no puedan considerarse un éxito de acuerdo con los estándares actuales (apenas un centenar de metros de recorrido), sí sirvieron para demostrar que esas máquinas podían volar. Buena parte de lo que sucedió después lo conocemos gracias a divertidos documentales de los inicios del cine: máquinas voladoras de todos los tipos y tamaños, que en su mayoría constituyeron estrepitosos fracasos. Afortunadamente, los arriesgados pioneros de los comienzos de la aviación no se dejaron desmoralizar (dejando su vida en el empeño alguno de ellos), perseveraron y junto con la ayuda de ingenieros y mecánicos y otras gentes que trabajaban en áreas no relacionadas en un principio con la aeronáutica, llevaron a la aviación a ser la realidad que ha llegado a nuestros días. ¿Qué relación

tienen los inicios de la aviación con el tema que nos ocupa? Creo que es evidente. Actualmente nadie discute que la idea en la que se basa la terapia génica está bien fundamentada y afortunadamente hemos pasado ya la fase inicial de los hermanos Wright y se ha demostrado la prueba de concepto de que la transferencia genética con efecto biológico *in vivo* (volar) es posible. Aceptado este punto, la identificación y el reconocimiento de las limitaciones y deficiencias de lo realizado hasta ahora (tanto desde el punto de vista de la eficacia como de la seguridad), deben constituir la base sobre la que continuar invirtiendo tiempo, esfuerzo, dinero e imaginación para desarrollar el enorme potencial de la terapia génica en el tratamiento de los enfermos y sus enfermedades.

Situación actual de la terapia génica

Si hace solo unos meses hubiésemos tenido que hacer un balance global de los resultados obtenidos diez años después de la primera aplicación clínica de la terapia génica, la palabra que mejor podría describir la sensación general hubiese sido decepción. Ni siquiera los prometedores resultados de la inyección intratisular de un plásmido que produce VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e induce neovascularización y mejora los síntomas de pacientes con enfermedad crónica vascular o isquemia miocárdica eran suficientes para mejorar esa impresión. Sin embargo, los recientes resultados en dos ensayos clínicos en pacientes con hemofilia B, e inmunodeficiencia grave combinada pueden hacer cambiar pronto esa negativa percepción hacia el optimismo. En el primero de estos estudios, se ha inyectado en el músculo de pacientes con hemofilia B, un virus adeno-asociado portador del factor IX de la coagulación, no detectándose toxicidad alguna, al tiempo que se ha observado un pequeño aunque significativo efecto biológico. En el segundo, más reciente, se ha demostrado la eficacia de un retrovirus para transducir células madre (*stem cells*) hematopoyéticas y corregir el defecto responsable de un tipo de inmunodeficiencia grave combinada

(el déficit de la cadena γ -c del receptor de varias citoquinas) en dos niños con esta enfermedad. Estos ensayos demuestran claramente la versatilidad de la terapia génica, capaz de corregir enfermedades de causa bien distinta (congénitas dos de ellas, adquirida la tercera) con vectores también distintos (virales y no virales).

Sin embargo, hace sólo unos meses el panorama era como digo bien distinto. Desde que se trataron los primeros pacientes en 1990 con inmunodeficiencia grave combinada por déficit de ADA (adenosina deaminasa) hasta la fecha, el número de ensayos clínicos, pacientes enrolados y patologías tratadas ha crecido de manera continua hasta situarse a finales del año pasado en cerca de 400 ensayos con más de 4000 pacientes tratados en todo el mundo. Si en un principio, la terapia génica fue concebida fundamentalmente para el tratamiento de enfermedades congénitas monogénicas, su elevado número y el escaso número de pacientes potenciales en cada una de ellas (y por tanto también su escaso interés económico) hizo que pronto estas patologías fueran superadas por el tratamiento del cáncer y el SIDA. En este sentido, el cáncer supone algo más del 60% de los ensayos y el 70% de los pacientes,

seguido por las enfermedades genéticas monogénicas, con un 13.5% y 9%, y por el SIDA, con un 8% y un 12.6% respectivamente. Hacer un resumen de lo que han aportado estos ensayos hasta ahora es complicado: la mayor parte incluyen un pequeño número de pacientes y han buscado fundamentalmente establecer la seguridad de las estrategias estudiadas, como corresponde a ensayos en fase I o fase I/II. Además, bajo el epígrafe de cáncer o de enfermedades monogénicas se engloban una gran variedad de patologías en las que se han utilizado distintos genes en distintos vectores; por otra parte los datos de los que se dispone no son del todo fiables ya que con demasiada frecuencia se han limitado a datos parciales presentados en reuniones científicas o en ruedas de prensa marcadas por el objetivo comercial, en lugar de detallados informes aparecidos en publicaciones sometidas a la mirada crítica de revisores entendidos en el tema. Este tipo de problemas llevaron en 1995 al entonces director del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH), Harold Varmus, a encargar a un comité de expertos la redacción de un informe donde se estableciese el estado actual de la terapia génica, así como que se indicasen recomendaciones sobre la actitud a tomar desde esa institución. Las conclusiones fundamentales fueron las de que la idea sobre la que se basa la terapia génica (la transferencia de material genético con fines terapéuticos) estaba perfectamente fundamentada y su utilidad y potencial eficacia demostradas, pero que la forma en que se habían hecho las cosas hasta entonces dejaba mucho que desear. Sus principales recomendaciones eran las de poner más énfasis en la investigación básica sobre las distintas enfermedades para identificar las dianas terapéuticas más adecuadas, desarrollar vectores de transferencia génica más eficaces y mejorar la investigación preclínica en modelos animales relevantes desde el punto de vista de la eficacia y la toxicidad de las estrategias ensayada. Se criticaba además la carrera en la que muchos centros asistenciales parecían haber entrado, para iniciar ensayos clínicos demasiado repetitivos, poco fundamentados y de los que se extraía escasa información útil. Este informe supuso un importante toque de atención a la comunidad científica, así como una toma de realidad por parte de la sociedad, a la que hasta entonces había llegado un mensaje demasiado optimista de la terapia génica. Cinco años después podemos decir que parte de estos objetivos se han conseguido, habiéndose desarrollado nuevos vectores con propiedades que los hacen especialmente indicados para algunas patologías y se han logrado ya resultados clínicos

Juan Ruiz Echeverría es

Licenciado y Doctor en Medicina por la Universidad de Navarra (1993) y realizó su formación como especialista en Medicina Interna en la Clínica Universitaria de Navarra. Tanto su formación clínica como su actividad investigadora han estado vinculadas al estudio y tratamiento de las enfermedades hepáticas y en especial las causadas por los virus de la hepatitis B y C. Comenzó su formación en Biología Molecular en el Departamento de Patología Tumoral del Instituto Karolinska de Estocolmo y durante su estancia post-doctoral en la Universidad de Connecticut trabajó en el diseño de ribozimas para la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis B. Actualmente lleva a cabo su labor de investigación en la Unidad de Terapia Génica del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Navarra dedicado al diseño y aplicación de estrategias dirigidas a la prevención y tratamiento de la hepatitis B y C basadas en la transferencia de ácidos nucleicos, utilizando para ello vectores virales (adenovirus) y no virales (DNA desnudo o pistola génica). Es responsable del control de calidad de los vectores adenovirales que van a utilizarse en ensayos clínicos en la Universidad de Navarra y socio fundador y actual vicepresidente de la recientemente creada Sociedad Española de Terapia Génica.



esperanzadores.

No obstante, cuando el panorama estaba mejorando, la muerte el año pasado de un joven con una enfermedad congénita bien controlada (déficit de ornitina transcarbamilasa) que participaba como voluntario en un ensayo clínico ha llenado las páginas de los periódicos, ha puesto brusca y manifiestamente el peligro de estas técnicas cuando no se emplean de forma adecuada y ha sacado a la luz numerosas irregularidades por parte de los investigadores que participaban en el mismo. A ello se han sumado otras noticias que hablan de problemas en otros ensayos en los que podrían haberse producido efectos secundarios importantes que no se notificaron a las autoridades pertinentes como estaba previsto. ¿Qué es lo que suponen estas noticias para el desarrollo de la terapia génica? ¿Ha de detenerse la investigación clínica en terapia génica por su especial peligrosidad? Creo que no. Lo que estas noticias significan es una llamada a la reflexión y un toque de atención a las autoridades y los investigadores que trabajan en este campo. La terapia génica incluye un conjunto de herramientas terapéuticas muy poderosas que estamos aprendiendo a utilizar y en el que hay que establecer unas estrictas normas de utilización y unas precauciones que han de definirse de lo que se observe en los ensayos clínicos, único vehículo que puede proporcionarnos esa información. Lógicamente, los ensayos clínicos han de diseñarse desde la seguridad y deben ser capaces de proporcionar esa información. Otra cosa es que, inevitablemente, se produzcan problemas que lleven al fallecimiento de algunos pacientes. Por poner un ejemplo, en el año 1997 fallecieron en Estados Unidos 16.500 pacientes en relación con el uso de antiinflamatorios no esteroideos (que incluyen fármacos tan comunes como el ácido acetil salicílico, la Aspirina, o el diclofenaco sódico, el Voltarén). Sin embargo nadie ha planteado por ello su prohibición.

Problemas de la Terapia Génica: herramientas y ensayos clínicos

Siendo la terapia génica el sistema que busca tratar enfermedades mediante la transferencia de genes a las células para conseguir un efecto biológico, es evidente que el éxito de la misma depende tanto de que los genes terapéuticos sean capaces de expresarse en las células diana al nivel y durante el tiempo que sea necesario, como de que el proceso de transferencia de los genes a esas células sea eficaz y asegure que se mantiene su integridad. Los vectores de terapia génica son los responsables de llevar a cabo esta función y su

mejora en cuanto a seguridad, eficacia y adaptación a la patología que se quiera tratar, junto a la mejora de la expresión génica una vez que el gen ha alcanzado el núcleo de las células, constituyen los factores limitantes que hasta ahora han impedido a la terapia génica responder a las expectativas creadas.

Expresión génica: el denominado cassette de expresión está constituido generalmente por un promotor más o menos potente, una señal de poliadenilación y entre ellas el cDNA (DNA complementario) del gen terapéutico, obtenido mediante transcripción reversa de RNA mensajero de un tejido donde se exprese, seguido de una PCR con cebadores específicos. Este esquema tan sencillo presenta sin embargo importantes limitaciones, que poco a poco han ido identificándose y mejorándose. Así, en lo que respecta al transgen, es importante introducir la secuencia de un intrón cuyo procesamiento mejora la estabilidad del RNA mensajero y por tanto su capacidad de ser traducido. En cuanto a los promotores, los de tipo viral como los del citomegalovirus (CMV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) o los derivados de las LTR retrovirales son muy potentes y capaces de dirigir la transcripción de forma universal en cualquier tipo celular. Sin embargo, a medio-largo plazo se produce un progresivo silenciamiento de los mismos, que lleva a la pérdida total de su actividad y que se ha relacionado con la metilación específica de secuencias reguladoras. Por este motivo, aunque menos potentes, los promotores de genes eucariotas ofrecen mejores resultados a largo plazo. Por otro lado, se está avanzando enormemente en el desarrollo y caracterización de promotores selectivos de tejido o regulables mediante la administración de fármacos (tetraciclina, rapamicina, RU 480), lo que ofrece la posibilidad de controlar la expresión a un determinado tipo celular activándola o desactivándola a voluntad.

Vectores: la escasa eficacia de los vectores de transferencia génica constituye el auténtico talón de Aquiles de la terapia génica. Partiendo de la base de que no existe un único vector que reúna las condiciones que lo hagan útil en todas las posibles aplicaciones, los vectores basados en virus (retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y herpesvirus) representan en este momento la alternativa más eficaz a la hora de conseguir una elevada expresión del transgen. Sin embargo, existen ventajas e inconvenientes en cada uno de ellos que hacen que la elección de uno u otro dependa de la patología a tratar. Los retrovirus, por su ciclo biológico, son capaces de integrar el transgén del

que son portadores, lo que permite en teoría alcanzar una expresión continuada del mismo y los hacen especialmente indicados para el tratamiento de enfermedades congénitas o todas aquellas en las que sea necesario alcanzar una expresión a largo plazo. Sin embargo, tienen como inconveniente que no son capaces de infectar células quiescentes (aquellas que no se encuentran en división) y solamente pueden albergar genes de hasta 8 Kb. Los adenovirus constituyen hasta el momento los sistemas de transferencia génica disponibles más eficaces y con mayor espectro celular, actuando tanto sobre células en división como en reposo, pero tienen el inconveniente de que son altamente inmunogénicos, lo que hace que la expresión del transgen sea transitoria (las células transducidas son eliminadas por el sistema inmune) y que se desarrollen anticuerpos neutralizantes que impiden una segunda administración del vector. Los virus adeno-asociados, a pesar de ser muy escasamente inmunogénicos y de infectar tanto células en división como en reposo, disponen de una limitada capacidad de transportar genes (por debajo de 5 Kb) y son difíciles de producir en cantidades suficientes. Finalmente, los herpesvirus se encuentran todavía en una fase menos avanzada y su utilidad está demasiado enfocada en la transducción de células del sistema nervioso. Frente a los virus, los vectores no virales ofrecen como mayor ventaja la sencillez de su producción, su seguridad y su capacidad para transferir genes sin límite de tamaño, aunque como contrapartida su eficacia sea en general muy escasa, lo que ha limitado su utilización a determinadas indicaciones terapéuticas en las que no se precisa una elevada producción del transgen, como son las de inducir respuesta inmune (vacunación génica) o la producción local de un factor angiogénico, por ejemplo.

Por último, otro de los problemas con que se ha encontrado la terapia génica es el de que la mayor parte de los ensayos clínicos llevados a cabo hasta la fecha no sólo han sido poco eficaces desde el punto de vista terapéutico, sino que además han proporcionado poca información desde el punto de vista científico y tampoco han servido para estudiar expresión génica, por lo que no han sido de utilidad en el diseño de otros ensayos.

Nuevas vías de desarrollo y expectativas de la terapia génica

Afortunadamente, la terapia génica es un área extremadamente viva y se trabaja intensamente en la resolución de buena parte de los problemas antes mencionados. Éste es el caso de los

vectores de transferencia, donde se están desarrollando nuevos vectores virales y no virales más eficaces y específicos, menos inmunogénicos, que permitan una expresión más prolongada del transgen y que sean más sencillos de manufacturar. Así, en el campo de los vectores virales, se han desarrollado los adenovirus "gutless", de los que se ha eliminado cualquier resto del genoma del adenovirus excepto las secuencias necesarias para su empaquetamiento, lo que les permite albergar genes de mayor tamaño (hasta 35 kb) y los hace mucho menos inmunogénicos, permitiendo una expresión prolongada del transgen. También se ha descrito un nuevo tipo de vectores retrovirales, los lentivirus, derivados del virus del HIV o el SIV, que manteniendo a semejanza de los retrovirus la capacidad de integrar el transgen, son además capaces de infectar células en reposo. En cuanto a los virus adeno-asociados, se ha descubierto su gran eficacia para transducir el músculo esquelético, lo que permite alcanzar niveles terapéuticos sistémicos del transgen que transportan y se ha mejorado también sustancialmente el rendimiento que se obtiene en su preparación. Además, se han diseñado virus híbridos adenovirus/virus adeno-asociados que permiten aprovechar las ventajas de ambos vectores. Finalmente, se están desarrollando nuevos vectores derivados de los alfavirus (Semliki forest virus) o del SV40, que ofrecen interesantes características.

En cuanto a los vectores no virales, se han realizado también importantes avances dirigidos a conseguir un vector artificial que, alcanzando la eficacia de los virus, tenga las indudables ventajas de los vectores sintéticos. En este sentido, las características ideales que debe incorporar el vector son las de poder ser dirigido de forma específica a un tipo celular, proteger al transgen y no ser inactivado en suero cuando es administrado por vía sistémica; finalmente, conseguir hacer llegar el transgen hasta el núcleo de la célula, salvando la degradación asociada con el proceso de endocitosis y permitiendo la translocación al núcleo del material genético. En este sentido, además del importante avance experimentado por los nuevos liposomas catiónicos o el sistema de bombardeo de partículas mediante la pistola génica (*gene gun*), los vectores más prometedores son los sistemas basados en moléculas policatiónicas como la polietilenimina (PEI), capaces de condensar el DNA en pequeñas partículas que lo protegen de su degradación y mejoran su captación mediante endocitosis, poseyendo además actividad endosomolítica (lo que permite su escape de la degradación en este compartimento) y pudiendo ser modi-

ficados químicamente para añadir ligandos que faciliten su direccionabilidad.

Otra vía importante de expansión de la terapia génica es su combinación con otro tipo de estrategias con las que puede complementarse de forma natural como es la terapia celular. Éste es el caso de la modificación de células madre (como en el caso del ensayo clínico antes comentado para la inmunodeficiencia grave combinada) o el uso de células de gran potencial terapéutico, como son las células dendríticas, fundamentales en la inducción de respuesta inmunitaria antitumoral o antiviral y que pueden ser modificadas genéticamente para aumentar su efecto biológico con genes como los de la interleuquina 12.

Finalmente, se ha descrito recientemente una nueva estrategia con enorme potencial en el tratamiento de las enfermedades genéticas monogénicas causadas por mutaciones puntuales. Se trata del uso de los quimeroplastos, que son moléculas de pequeño tamaño, mezcla de DNA y RNA, que tienen la capacidad de reconocer e hibridar con zonas específicas de un gen (determinadas en función de la secuencia del quimeroplasto) e introducir mutaciones en nucleótidos predeterminados con una altísima eficacia. Esta técnica, que permitiría tratar un gran número de enfermedades genéticas sin posible cura actualmente, se ha ensayado ya con éxito en distintos modelos animales, lo que abre definitivamente la esperanza a esos grupos de pacientes que sufren enfermedades devastadoras.

Como colofón, quiero mencionar las que (sin exclusión de otras posibles) parecen ser las estrategias más prometedoras de terapia génica en un futuro inmediato: (1) la vacunación génica frente a enfermedades infecciosas o el cáncer mediante DNA desnudo u otros sistemas no virales; (2) la utilización de DNA desnudo u otro sistema no viral para producir una proteína necesaria durante un corto espacio de tiempo en una localización concreta (por ejemplo factores angiogénicos en enfermedades cardiovasculares o factores inductores de la formación de hueso o la reparación de heridas en traumatología); (3) la aplicación de los virus adeno-asociados por vía intramuscular al tratamiento de enfermedades donde sea necesario producir niveles sistémicos de un determinado factor; (4) la utilización de lentivirus en la corrección de enfermedades congénitas donde la corrección del defecto ha de ser intracelular, (5) la potenciación de la terapia celular con células dendríticas en el tratamiento del cáncer mediante la transferencia genética de citoquinas inmunomoduladoras; y (6) el uso de quimeroplastos en enfermedades genéticas causadas por mutaciones puntuales.

BIBLIOGRAFIA

- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7297-301.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Saint basile G, y cols (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
- Clakson T (2000) Regulated gene expression systems. *Gene Therapy* 7:120-125.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA: DNA vaccines. *Ann Rev Immunol* 1997; 15:617-648.
- Gomez-Navarro J, Curiel DT, Douglas JT (1999) Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* 35:2039-2057.
- Isner JM, Asahara T (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103:1231-1236.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, y cols. (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genet.* 24:257-261.
- Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ (1998) In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med.* 1998 4:285-290.
- Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA (1999) Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol.* 73:9314-9324.
- Melero I, Duarte M, Ruiz J, Sangro B, Galofre JC, Mazzolini G, Bustos M, Qian C, Prieto J (1999) Intraosseous injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete remissions of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Therapy* 6:1779-1784.
- Mountain A (2000) Gene therapy: the first decade. *Trend Biotechnol* 18:119-128.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Orkin SH, Motulsky AG (1995) Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. Bethesda, MD: Accesible en <http://www4.od.nih.gov/oba/documents.htm>. Oficina de Productos Biotecnológicos (OBA) del Instituto Nacional de la Salud Norteamericano (NIH).
- Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genet.* 18:180-183.