

PERSPECTIVAS ACTUALES DE LA TERAPIA GÉNICA

C. Fillat

Centre de Regulació Genòmica-CRG. Barcelona.

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético a las células de un individuo con la finalidad de corregir la enfermedad que padece. Este tipo de terapia implica un cambio conceptual, al entenderse como un tratamiento causal de las enfermedades basado en acciones directas sobre los genes. Es por ello que una de las ventajas manifiestas de esta nueva forma de medicina molecular es su flexibilidad, ya que su aplicación a la gran variedad de dolencias que afectan al ser humano tiene como única referencia a los ácidos nucleicos. Pero no hemos de entender la progresiva emergencia de la terapia génica en el futuro como una sustitución del potencial farmacológico actual, sino que para muchas patologías podrá aplicarse como una complementación de la terapia farmacológica convencional en beneficio del paciente.

Los objetivos fundamentales que persigue la investigación y el desarrollo actuales en terapia génica son la efectividad de la transferencia génica, la especificidad de dicha transferencia al tipo o tipos celulares relevantes para la enfermedad a tratar y la persistencia del material transferido. Aunque el razonamiento fundamental de la terapia génica, el atacar las dolencias allá donde se originan, es conceptualmente sencillo, los científicos se están encontrando con enormes dificultades para su implementación debido a las formidables barreras y mecanismos de defensa que el complejo organismo humano interpone para preservar su patrimonio hereditario. Sin embargo, día a día se van produciendo nuevos avances tecnológicos aunque todavía nos queda mucho para diseñar y fabricar hasta conseguir la administración segura y eficaz de la secuencia nucleotídica terapéutica.

Cada enfermedad requiere un abordaje de terapia génica que puede ser distinto. Las estrategias de manipulación genética con finalidad terapéutica las podemos clasificar en tres grupos.

1) *Adición génica.* Esta aproximación se basa en introducir una copia correcta del gen funcional que dé lugar a la expresión de la proteína diana en el tejido adecuado

y con niveles suficientes para que pueda desarrollar su función de forma apropiada. Esta estrategia es la más ampliamente utilizada y puede aplicarse a la mayoría de enfermedades humanas.

2) *Supresión génica*. En este caso el objetivo final es anular o reducir la expresión de un determinado gen. Ello puede ser de interés en el caso de las enfermedades infecciosas, bloqueando la acción del agente patógeno y también en cáncer donde algunas proteínas están sobreexpresadas. Recientemente se ha descrito una nueva tecnología que consigue de forma muy eficaz reducir la expresión de un gen concreto y se conoce como interferencia del RNA. Se basa en la evidencia descrita de que un RNA corto de doble cadena, cuando está en una célula activa un complejo multiproteico llamado RISC que permite primero la separación de la doble cadena de RNA y la unión de la cadena antisentido al mRNA endógeno complementario; como consecuencia se induce la degradación de dicho RNA, con lo que no se puede sintetizar la proteína correspondiente.

3) *Corrección génica*. En esta estrategia lo que se busca es corregir el gen alterado por el gen correcto. Para ello, en teoría, se puede proceder a procedimientos de recombinación homóloga que permiten intercambiar el gen mutado por el gen correcto; sin embargo este proceso es muy poco eficiente y es por tanto inviable para su aplicación en terapia génica. Más recientemente ha surgido una nueva estrategia que permite el intercambio del nucleótido específico mutado (unidad defectuosa de la secuencia génica) por el nucleótido apropiado dando lugar así a una copia correcta del gen. Esta estrategia puede ser muy interesante para la corrección de enfermedades monogénicas, donde mutaciones puntuales en un único gen son las responsables de la enfermedad.

Para conseguir introducir las secuencias nucleotídicas (genes, oligonucleótidos, etc.) en el núcleo de una célula diana cabe vencer una serie de barreras celulares. Cuando el DNA/RNA es administrado *in vivo* tendrá además una biodisponibilidad limitada por barreras de tejido (membranas conectivas, epitelio vascular, membrana hemato-encefálica), proteínas inactivadoras (proteasas-nucleasas, proteínas con carga positiva que adsorberán el DNA) e inmunológicas (sistema del complemento, respuesta inmune celular y anticuerpos neutralizantes). Para optimizar la introducción del DNA en las células se requieren vehículos. Los vehículos de transferencia, también llamados vectores, son los transportadores de las secuencias nucleotídicas terapéuticas. En la actualidad disponemos de dos grandes grupos de vectores para poder introducir el material genético a los tejidos diana, bien sea para adicionar, suprimir o corregir secuencias: los vectores víricos y los no víricos. De entre los vectores víricos cabe destacar especialmente los derivados de retrovirus y lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados. Los métodos no víricos más relevantes desde el punto de vista de su potencial aplicación clínica son, el uso de liposomas de diversas composiciones, los conjugados moleculares y la transferencia directa de DNA purificado. Los vectores

virales poseen la ventaja de transferir el DNA/RNA de forma más eficaz, sin embargo poseen mayor toxicidad. Los vectores no víricos son más seguros y resulta más sencillo su elaboración, caracterización, manipulación y escalado, frente a los vectores víricos, sin embargo su eficacia es menor.

Los adenovirus son virus de DNA y cápside proteica sin envuelta. Son virus mayoritariamente asintomáticos o bien causantes de enfermedades leves, con afectación respiratoria o gastrointestinal. Se han descrito un total de 51 serotipos humanos, entre éstos los serotipos 2 y 5, son los más utilizados como vectores. El primer acontecimiento en la infección viral es el reconocimiento entre la proteína fibra de la cápside y el receptor celular altamente conservado CAR (coxsackie-adenovirus receptor). El virus se introduce a continuación por endocitosis y gracias a la elevada capacidad endocitolítica de la proteína pentón de la cápside escapa de la degradación lisosomal. La partícula intacta interacciona con la membrana del núcleo celular e inyecta el genoma, el cual no se integra en los cromosomas. A las pocas horas se inicia la expresión de los genes virales y el ciclo replicativo, que comprende: la síntesis del DNA vírico, su encapsidación en nuevas partículas ensambladas y la liberación por lisis celular. Los adenovirus utilizados como vectores están delecionados en al menos la región temprana (early) E1, la cual es esencial para la replicación. En el espacio liberado puede acomodarse el transgén que se introduce mediante ligación enzimática y recombinación homóloga para los genomas E1-deficientes. La generación y propagación de partículas víricas con genomas E1-deficientes se lleva a cabo mediante transfección en líneas celulares que han incorporado establemente las regiones virales indispensables delecionadas. En estas células se completa el ciclo lítico y en el medio de cultivo se recogen los adenovirus recombinantes. Los adenovirus presentan notables ventajas como vectores. En primer lugar, su relativa inocuidad y en consecuencia su seguridad biológica. También los elevados títulos de virus que se obtienen y que hacen posible administraciones efectivas *in vivo*. Otra cualidad destacable es su amplio tropismo o capacidad para infectar un extenso espectro de células eucariotas, procedentes de distinto tejido o especie. También la capacidad de transducir con igual eficiencia células quiescentes o replicativas. Por otra parte, es una característica esencial de los vectores adenovíricos, dada la no-integración del genoma o elementos adenovirales en los cromosomas celulares, la transitoriedad de la expresión, debido a la hidrólisis enzimática del DNA viral a la que se suma un efecto de dilución en células replicativas. Por último, el principal inconveniente de los adenovirus parcialmente delecionados es la elevada expresión de proteínas víricas acompañantes que pueden resultar tóxicas y que *in vivo* causan una potente respuesta inflamatoria y la generación de linfocitos T citotóxicos y anticuerpos. Esta reacción fisiológica conlleva la destrucción de la célula transducida y acorta el tiempo de expresión.

Sin embargo este amplio tropismo puede convertirse en un efecto indeseado cuando lo que se quiere modificar es un tipo celular específico. En este sentido, y pensando en la utilidad de los adenovirus en cáncer es interesante redirigir su entrada

hacia la célula tumoral, ello además de inducir la selectividad como veremos también puede traducirse en un aumento en la potencia terapéutica. Existen varias estrategias y comentaré las vías que utiliza nuestro grupo y su eficacia en modelos in vitro. En el contexto de búsqueda de terapias antitumorales basadas en la administración de genes citotóxicos se presentan datos de eficacia terapéutica sobre un modelo de adenocarcinoma de páncreas utilizando la transferencia directa de DNA purificado al tumor seguido de electroporación. Esta metodología que se conoce como electrotransferencia de DNA se basa en la aplicación de un elevado voltaje durante un periodo muy corto a las células de un tejido. Durante este tiempo la membrana celular se despolariza y se forman pequeños orificios por los que penetran las moléculas (entre ellas el DNA inyectado) que están alrededor. La ventaja de esta técnica es que facilita eficientemente la entrada del DNA a la célula.

El objetivo final de la investigación en terapia génica consiste en trasladar a la clínica las estrategias que han dado buenos resultados en los ensayos en modelos preclínicos. En base a ello se inician los ensayos clínicos en Fase I, Fase II, Fase III y con el fin de conseguir comercializar el producto y entrar en fase IV. Según datos del 2004 existen algo más de 900 ensayos clínicos distribuidos a lo largo de todo el planeta, un 68% de ellos se desarrollan en Estados Unidos y sólo un 27% en Europa. Un 64% de estos ensayos se encuentran en Fase I y sólo entre un 1 y 2 por ciento se hallan en Fase III. Recientemente se ha comercializado el primer producto de terapia génica, *Gendicine* (Adp53), en los países asiáticos y se está empezando a usar para el tratamiento de los tumores de nasofaringe.

La evolución en el número de ensayos clínicos ha ido variando a lo largo de los años. Empezó en 1989 con el primer ensayo, y alcanzó un máximo en 1999 con 113 ensayos aprobados. Este mismo año sucedió la primera muerte en un paciente como consecuencia directa de un tratamiento de terapia génica. Probablemente recordaréis porque tuvo una alta repercusión mediática, fue el caso de Jesse Gelsinger que sufría una enfermedad genética hereditaria llamada deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC). El malogrado paciente formaba parte de un grupo de 18 individuos que estaban siendo sometidos a diferentes dosis de un vector adenovírico dirigido al hígado, que contenía una copia correcta del gen de la OTC. Gelsinger y otro de los pacientes, que no se vio afectado por el tratamiento, recibieron la dosis más elevada prevista en el ensayo clínico con lo que otros órganos a parte del hígado fueron modificados con el vector. Este podría haber sido el factor determinante que le provocó una respuesta inmune exacerbada causándole un colapso agudo del sistema respiratorio y un fallo multisistémico inflamatorio que le provocó la muerte. Además, en el análisis de la autopsia se encontró que la médula ósea de Gelsinger estaba dañada probablemente debido a una infección mediada por otro virus, que se pudo producir durante o incluso antes del tratamiento experimental y pudo desencadenar la extraordinaria respuesta inmune que acabó con su vida. En consecuencia a este fatal acontecimiento las agencias reguladoras aumentaron el control sobre los ensayos clínicos y eso se tradujo en una reducción en el número de ensayos presentados en los años posteriores.

En el año 2000 tuvo lugar el primer éxito claro en el tratamiento de una enfermedad mediante terapia génica. La enfermedad que se trató fue la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X. Desafortunadamente, a los 30 meses de la administración de la terapia, de los 16 pacientes tratados en dos de ellos, en momentos distintos apareció una leucemia que si bien no ha sido letal para los niños ha requerido el tratamiento con quimioterápicos. Esto supuso cierta desmoralización y evidentemente un toque de atención que ha hecho reorientar la investigación usando vectores retrovirales; sin embargo es importante destacar que los demás niños tratados permanecen libres de la enfermedad que padecían gracias al tratamiento recibido, y sin el cual algunos de ellos, con toda probabilidad, habrían fallecido.

