



Terapèutica gènica

Salvador F. Aliño

Dept. de Farmacologia, Facultat de Medicina, Universitat de València, València

Correspondència: Salvador.F.Alino@uv.es

La terapèutica gènica ha estat definida de moltes maneres. A mi m'agrada definir-la com una nova estratègia terapèutica basada en la utilització dels àcids nucleics com a medicaments o dianes terapèutiques. Aquesta nova estratègia ha estat possible gràcies a l'avanç de moltes àrees del coneixement, però fonamentalment, al desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant i al profund coneixement aconseguit de les bases moleculars de la patologia.

Inicialment, la terapèutica gènica fou considerada com una estratègia terapèutica destinada a resoldre un important nombre de malalties monogèniques de caràcter hereditari, per a les quals els tractaments disponibles mancaven d'alternativa. D'aquesta manera, s'obria una nova esperança terapèutica. No obstant això, a mesura que aquest nou procediment s'ha anat posant en pràctica, s'ha descobert que té moltes altres possibilitats terapèutiques i que permet abordar també el tractament de malalties de caràcter adquirit. En aquest sentit, el seu espectre de possibilitats és molt ampli i abasta des de malalties hereditàries com ara les immunodeficiències, la fibrosi cística, l'hemofília, la hipercolesterolèmia familiar, la deficiència d'antitripsina α -1, fins a malalties de caràcter adquirit com ara el càncer, les malalties cardiovasculars, les malalties infeccioses o les malalties neurològiques.

Vectors de terapèutica gènica

La terapèutica gènica té, malgrat el seu gran potencial, un gran factor limitant: els àcids nucleics són fàcilment degradables pels fluids biològics i, a més, són molècules polianióniques, de tal manera que presenten una càrrega negativa per cada grup fosfat del nucleòtid. S'ha de considerar que qualsevol molècula de DNA administrada presenta un nombre molt elevat de nucleòtids i, per tant, de càrregues negatives, la qual cosa les transforma en molècules que difícilment poden travessar les membranes biològiques. Per aquest motiu, les cèl·lules han de ser considerades molt refractàries per a la transferència dels gens. Per tal de facilitar l'accés dels gens a les cèl·lules, és necessari l'ús de vectors. Els vectors de terapèutica gènica han de ser considerats com a agents que faciliten el lliurament dels gens a les cèl·lules. En l'actualitat disposem de dos grans grups de vectors per al transferiment de gens: els vectors d'origen viral i, en contraposició, els denominats vectors no virals.

Vectors virals. Els primers són, en general, més eficaços i entre els seus avantatges, destaquen el tropisme i l'especificitat per certs teixits o òrgans i la seva capacitat natural per infectar les cèl·lules. Els vectors no virals són, al contrari, menys eficaços, però ofereixen, entre els seus avantatges, la seguretat en el seu ús, que està relacionada amb la seva mínima capacitat per generar efectes secundaris. Cal assenyalar que, perquè els virus puguin ser utilitzats com a vectors en la terapèutica gènica, és necessari fer importants modificacions en el seu genoma, com ara eliminar-ne les regions responsables de la seva patogenicitat o la seva replicació dins la cèl·lula. És necessari fer importants esforços d'enginyeria genètica per substituir els fragments virals eliminats per altres regions gèniques exògenes d'interès, a les quals denominem gens terapèutics. L'eliminació d'aquestes regions pròpies sol transformar-los en virus defectius per a la replicació. Així, per a la seva amplificació, és necessari el concurs d'altres cèl·lules denominades cèl·lules empaquetadores, les quals han estat prèviament modificades mitjançant la incorporació dels gens complementaris del virus. Això permet suplir-ne la deficiència en entrar en aquestes cèl·lules empaquetadores i completar així el cicle viral.

Hi ha una extensa varietat de vectors virals per a la terapèutica gènica, entre els quals hem de destacar els retrovirus, que es caracteritzen per ser uns virus d'RNA que, després d'infectar la cèl·lula i alliberar l'RNA al

citoplasma, generen primer una còpia de DNA fent servir com a motllo l'RNA (retrotranscripció) i finalment una còpia de DNA de doble cadena mitjançant la síntesi de la seva complementària. La doble cadena de DNA arriba al nucli i s'integra al genoma de la cèl·lula. Aquest mecanisme té l'avantatge de la permanència de gens de la cèl·lula i la seva transmissió a la descendència; ofereix, però, com a possible desavantatge, les mutacions que puguin derivar-se de la seva integració a llocs que no siguin adequats.

Altres vectors virals molt utilitzats són els adenovirus, els quals es caracteritzen per ser virus de DNA que, un cop entren a la cèl·lula, faciliten l'alliberament del DNA al nucli i hi romanen com a un episoma, és a dir, com a un fragment gènic independent del genoma. La seva persistència al nucli de la cèl·lula està limitada en el temps tant per la inestabilitat del DNA com per la seva pèrdua progressiva a cada nova divisió cel·lular. En contrapartida, l'absència d'integració fa que no presenti efectes secundaris relacionats amb possibles mutacions derivades del procés d'inserció, encara que aquest tipus de virus sol presentar importants respostes proinflamatòries i immunitàries. Existeixen molts tipus diferents de virus que són transformats en vectors de terapèutica gènica, com ara els derivats del virus *herpes simplex*, de virus adenoassociats, del virus VIH o del virus de la hepatitis. Cadascun ofereix els seus particulars avantatges quant a les característiques biològiques o l'afinitat pels diferents teixits o òrgans.

Vectors no virals. Els vectors no virals es caracteritzen perquè els gens s'incorporen en plasmidis, que són transportats mitjançant el concurs d'agents artificials com ara lípids o polímers, els quals són capaços de formar complexos amb el DNA de forma espontània gràcies a la interacció entre les càrregues positives del complex i les negatives del DNA. L'excés de càrregues positives presents al complex ha de facilitar d'alguna manera la interacció amb la superfície de la membrana cel·lular, facilitant així la seva internalització. Tanmateix, el veritable mecanisme de l'alliberament del DNA a l'interior de la cèl·lula és actualment desconegut. Encara que els complexos de DNA són els vectors virals més utilitzats en terapèutica gènica, també existeixen altres procediments físics mitjançant els quals, el DNA o bé s'associa a partícules que són projectades (bombardeig) directament sobre el teixit o òrgan al qual es pretén transferir el gen o bé l'entrada a aquests teixits o òrgans és facilitada mitjançant el concurs de descàrregues elèctriques (electrotransferència).

Estratègies en terapèutica gènica

Les estratègies que es fan servir a l'actualitat en terapèutica gènica són molt variades. Tenint en compte els seus objectius, podem distingir-ne dues de principals: una està destinada a augmentar la dotació genètica de les cèl·lules, i l'altra està dirigida a inhibir-hi l'expressió de gens específics.

L'augment de la dotació genètica suposa la introducció d'un gen a l'interior de les cèl·lules, que pot codificar: *a)* una proteïna fisiològica d'interès, la qual pot contribuir a introduir funcions noves a les cèl·lules o a restablir-hi funcions que s'havien perdut; *b)* una toxina, la producció intracel·lular de la qual pot abocar a la mort cel·lular i, per tant, és un procediment d'interès quan es pretén limitar el creixement o l'expansió d'un grup cel·lular; *c)* una proteïna responsable de la transformació d'un profàrmac inactiu (no tòxic) en un fàrmac actiu (tòxic), de tal manera que la seva eficàcia només es manifestarà en aquelles cèl·lules que hagin incorporat el gen exogen; *d)* un antigen estrany, el qual representa la base d'una nova generació de vacunes anomenades vacunes de DNA.

Les estratègies de silenciament gènic suposen la inhibició de l'expressió de gens amb una inadequada expressió que és responsable d'una determinada malaltia, com podria ser el cas dels oncogens en el càncer. Entre els procediments de silenciament gènic, hem de distingir: *a)* oligonucleòtids antisentit, que són en realitat seqüències curtes de 17–21 nucleòtids, complementàries de regions específiques de l'RNA o del DNA, la qual cosa condueix a una interrupció de la informació genètica. La seva eficàcia dependrà de les característiques i del tipus d'oligonucleòtid utilitzat. *b)* Ribozims, que són molècules d'RNA amb activitat enzimàtica capaces d'hidrolitzar RNA específics mitjançant el reconeixement de seqüències complementàries de nucleòtids. *c)* RNA interferent, constituït per seqüències curtes d'RNA de doble cadena, que pot induir la hidròlisi d'RNA específics a través d'un procés complex que causa inhibició de l'expressió gènica, amb una eficàcia molt superior a l'aconseguida amb els oligonucleòtids antisentit.

Procediments de terapèutica gènica

Per introduir gens a les cèl·lules amb finalitat terapèutica, disposem de dos procediments anomenats *ex vivo* i *in vivo*, segons que el procediment de transferència gènica tingui lloc a fora de l'organisme (sobre cèl·lules *in*

vitro) o en el propi organisme. En el primer cas, les cèl·lules són modificades genèticament fora de l'organisme, amplificades i posteriorment seleccionades, segons la seva capacitat per portar a terme correctament les noves funcions que li han estat conferides pel gen. Aquest procediment té l'avantatge que, després de la transfecció, les cèl·lules poden ésser ben caracteritzades i només seran reincorporades a l'organisme quan compleixin les característiques de seguretat suficients per a ser transplantades. Les cèl·lules utilitzades poden procedir d'un òrgan normal, d'un tumor, i en ocasions, de cèl·lules troncales o cèl·lules mare. El segon procediment és, en principi, més senzill i suposa l'administració sistèmica de gens o vectors genètics, els quals han d'arribar a l'òrgan o teixit específic, entrar a la cèl·lula, arribar al nucli i generar l'efecte terapèutic desitjat. Malauradament, amb aquest procediment és més difícil arribar amb èxit al procés de transfecció selectiva. No obstant això, s'estan realitzant importants esforços per aconseguir l'especificitat cel·lular mitjançant la incorporació, bé en la construcció genètica de promotors específics de teixit, bé mitjançant la incorporació en el vector de lligands o anticossos que permetin reconèixer receptors o determinants antigènics específics en la superfície de les cèl·lules i facilitar l'entrada del DNA per un mecanisme mediat per un receptor.

En la present exposició es presenten dos exemples representatius d'ambdós procediments de terapèutica genètica. Com a exemple de procediment de terapèutica genètica «ex vivo», hem modificat genèticament cèl·lules de melanoma de ratolí mitjançant la incorporació del gen *mGM-CSF*. Després d'aconseguir cèl·lules que produeixen la proteïna de forma estable (clons) es va procedir a irradiar les cèl·lules i utilitzar-les com a vacunes contra el tumor. S'ha comprovat que la vacunació pot arribar a protegir el 100 per cent dels ratolins contra la implantació posterior del tumor. Com a exemple de procediment de terapèutica genètica «in vivo» hem transferit al feto del ratolí el gen humà α -1 antitripsina, mitjançant un procediment no viral denominat hidrodinàmic. Atès que la proteïna és secretada pel feto a la circulació sistèmica, és possible avaluar l'eficàcia del procediment de transferència genètica mesurant els nivells plasmàtics de la proteïna humana en el plasma dels ratolins transfectats. Els nostres resultats posen de manifest, mitjançant estudis de dosi-dependència, que la resposta aconseguida és gradual, depèn de la dosi, té un efecte màxim per sobre del qual s'aconsegueixen efectes tòxics i una menor resposta i, el que és més important, és possible aconseguir nivells plasmàtics terapèutics de la proteïna en sang durant períodes de temps molt prolongats

d'entre sis i vuit mesos, passats els quals és possible administrar noves dosis i recuperar de nou els nivells terapèutics.

A partir dels resultats aconseguits, podem concloure de forma general: *a)* els vectors no virals poden modificar genèticament les cèl·lules amb l'eficàcia suficient per aconseguir respostes d'interès terapèutic; *b)* en models experimentals de terapèutica gènica del càncer s'aconsegueix inhibir el creixement del tumor i fins i tot prevenir-ne el desenvolupament; *c)* els resultats donen suport a la idea que el perfeccionament dels procediments no virals permetrà, en un futur pròxim, formular els gens com a medicaments.