



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Terapia génica: realidades actuales y expectativas

R. Alemany Bonastre, J. Barquinero Máñez y S. Ramón y Cajal Agueras

Laborari de Recerca Translacional. Institut Català d'Oncologia (RA). Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular. Centre de Transfusió i Banc de Teixits (JB) y Servicio de Patología. Hospital Vall d'Hebron (SRyC). Barcelona.

En esta revisión se describe la situación actual de la terapia génica en enfermedades hematológicas, inmunológicas y en cáncer. En todas ellas el objetivo principal de los diversos abordajes de la terapia génica es el transducir los genes terapéuticos en la mayor parte de las células diana. A nivel de enfermedades crónicas o inmunológicas se requiere, asimismo, una expresión estable de los genes terapéuticos y a nivel de las células tumorales la eficiencia o porcentaje de células transducidas condiciona el éxito de los tratamientos. Por consiguiente, los vectores son uno de los elementos básicos para optimizar los abordajes y protocolos de terapia génica dado que sabemos que con el empleo de liposomas menos del 10% de las células van a ser transducidas, que con el empleo de retrovirus sólo se van a infectar células en replicación y que con los adenovirus va a haber una respuesta inflamatoria importante y una transducción transitoria del gen terapéutico. Asimismo se discuten los últimos abordajes en terapia génica del cáncer con virus de replicación selectiva, genes suicidas, etc.

PALABRAS CLAVE: retrovirus, adenovirus, terapia génica.

Alemany Bonastre R, Barquinero Máñez J, Ramón y Cajal Agueras S. Terapia génica: realidades actuales y expectativas. *Rev Clin Esp* 2005;205(4):178-88.

Gene therapy: current situation and expectations
In this review the current situation of gene therapy is described in hematological diseases, immunological conditions, and cancer. In all of them, the principal objective of various approaches with gene therapy is transduction of therapeutic genes in most of target cells. In chronic or immunological diseases, a stable expression of therapeutic genes is also required; in tumor cells, the efficiency or percentage of transduced cells make conditional on the treatment success. Consequently, vectors are one of the basic elements to optimize gene therapy approaches and protocols in view of the facts that we know that with liposomes less than 10% of cells are transduced, that retrovirus only infect cells in replication, and that adenovirus give rise to an important inflammatory response and a transitory transduction of the therapeutic gene. In addition recent approaches in cancer gene therapy with selective replication virus, suicidal genes, etc., are discussed.

KEY WORDS: retrovirus, adenovirus, gene therapy.

Introducción

En esta revisión vamos a resumir el concepto de terapia génica, los tipos de genes y de vectores que se están empleando en la actualidad, así como dar una visión global de los ensayos clínicos que se han realizado o están en marcha. En primer lugar, recordar que un gen es aquel segmento de ADN que lleva la información para transcribirse en un ARN mensajero que posteriormente se traducirá a una proteína. Las mutaciones, o cambios en la secuencia de ADN, tienen que conllevar un aumento o disminución de la función de la proteína para ser patológicas. Distinguimos entre enfermedades monogénicas y poligénicas si se originan por alteración

de uno o más genes (tabla 1). El concepto de terapia génica surgió en los años ochenta como posible solución a enfermedades monogénicas como la hemofilia A, en la que el gen del factor VIII de coagulación está mutado¹. Es una forma de intervención médica basada en la modificación del material genético de las células. Se puede aplicar *in vivo*, es decir, introduciendo el material genético en el interior del organismo, o *ex vivo* con células extraídas del paciente que posteriormente se implantan (fig. 1). La reparación de un defecto genético causante de una enfermedad ofrece la atractiva posibilidad de una cura definitiva. La reparación puede aportar beneficios terapéuticos incluso si sólo se consigue introducir el gen que falta en unas pocas células de un tejido. Por ejemplo, la introducción de un gen de un factor de coagulación en un cierto número de células musculares puede aportar niveles suficientes de proteína a la circulación sanguínea. El caso del cáncer es único en este sentido, pues las células no modificadas continúan proliferando y la terapia no será efectiva (fig. 2).

Correspondencia: S. Ramón y Cajal.
 Servicio de Patología.
 Hospital Vall d'Hebron.
 Paseo Valle d'Hebron.
 08035 Barcelona.
 Correo electrónico: sramon@vhebron.net

Aceptado para su publicación el 22 de octubre de 2004.

TABLA 1
Principales enfermedades candidatas a la terapia génica en células madre hematopoyéticas. La mayoría de ellas pueden ser curadas mediante un trasplante alogénico de médula ósea

Enfermedad	Gen responsable
Inmunodeficiencia combinada severa	ADA, PNP, receptor γ c, Jak-3
Deficiencia de G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
Deficiencia de PK	Piruvato cinasa
Porfiria eritropoyética	Uroporfirinógeno III sintetasa
Síndrome de Wiskott-Aldrich	WASP
Enfermedad granulomatosa crónica	Phox
Talasemia	α y β -globina
Anemia falciforme	β -globina
Enfermedad de Gaucher	β -glucocerebrosidasa
Síndrome de Hurler (MPS-I)	α -L-iduronidasa
Síndrome de Hunter (MPS-II)	Iduronato sulfatasa
Enfermedades de Sanfilippo (MPS-III)	N-sulfatasa
(MPS-III B)	N-acetil- α -D-glucosaminidasa
(MPS-III C)	α -glucosaminidasa-N-acetiltransferasa
(MPS-III D)	N-acetil- α -D-glucosaminidasa-6-sulfatasa
Enfermedades de Morquio (MPS-IV)	Galactosamina-6-sulfato sulfatasa
(MPS-IV B)	β -galactosidasa
Anemia de Fanconi	FACC
Enfermedad de Maroteaux-Lamy (MPS-V)	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa
Enfermedad de Sly (MPS-VII)	β -glucuronidasa
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa ácida
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa β -galactosidasa
Leucodistrofia metacromática	Arlsulfatasa A
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquelatasa
Anemia de Blackfan Diamond	RPS19
Hemofilia A/B	FVIII, FIX

ADA: adenosín desaminasa.

En cualquiera de los protocolos de terapia génica hay que considerar dos elementos básicos: los genes terapéuticos y los vectores. Los genes terapéuticos pueden reemplazar genes que producen proteínas no

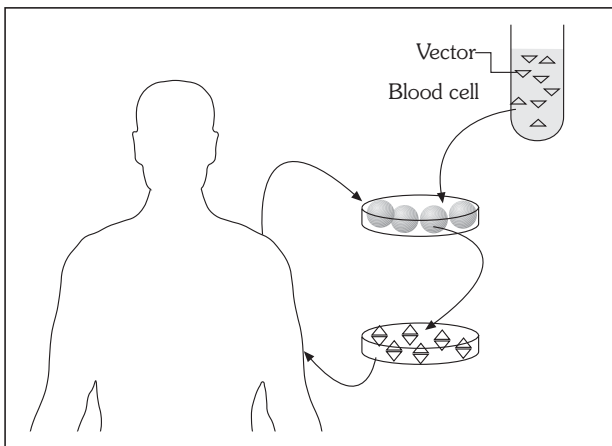


Fig. 1. Esquema de cómo se realiza la terapia ex vivo. Se extraen células del paciente que se manipulan en el laboratorio y posteriormente se le vuelven a implantar inyectadas.

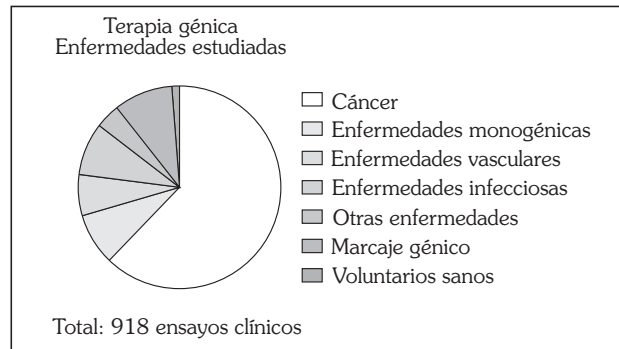


Fig. 2. Porcentaje de utilización de los principales vectores en ensayos de terapia génica.

funcionales, inhibir el efecto de genes que están patológicamente activos, o incluso pueden ser genes tóxicos o suicidas capaces de eliminar células tumorales. Los vectores son los vehículos que transportan estos genes y de ellos depende el porcentaje de células que expresan el gen terapéutico (eficiencia), el que la expresión del gen sea continua o transitoria, así como el que la expresión del gen sea lo más selectiva y específica posible en las células diana. El diseño de nuevos vectores es uno de los grandes desafíos actuales en terapia génica.

Vectores

El ADN extracelular está expuesto a la acción de nucleasas y atraviesa con dificultad la membrana celular. Además, una vez en el citoplasma su transporte hasta el interior del núcleo es también muy ineficiente. Aun así, si se inyectan grandes cantidades de ADN en un tejido se logra transferir el gen o «transfectar» un alto porcentaje de células alrededor del punto de inyección. Esta técnica de inyección de ADN «desnudo» se utiliza sobre todo para transfectar el músculo esquelético y puede verse incrementada mediante la aplicación de un pulso eléctrico que genera poros transitorios en la membrana celular (electroporación o electrotransfección). Para aumentar la eficiencia el ADN se empaqueta en un vehículo o vector que lo protege de las nucleasas y lo introduce en la célula. Hay dos grandes grupos de vectores según deriven de virus o no. Los vectores no virales son compuestos macromoleculares basados en lípidos o en polímeros catiónicos que se unen al ADN. La estructura de los fosfolípidos se caracteriza por una cadena hidrófoba unida a un grupo polar hidrófilo. En un medio acuoso forman bicapas similares a la membrana celular con los grupos polares hacia el exterior y la cadena hidrocarbonada hacia el interior. La bicapa forma esferas llamadas liposomas. Si la hidratación se produce en presencia de ADN éste puede quedar encerrado en el liposoma. Pueden hacerse liposomas de una bicapa llamados unilamelares o de múltiples bicapas concéntricas llamados multilamelares. Normalmente los liposomas contienen fosfatidil-colina y fosfatidil-serina y se añade colesterol para estabilizar la estructura

ra de la bicapa. Si además se añaden proteínas con regiones hidrófobas éstas se anclan en la bicapa. Por ejemplo, un anticuerpo de membrana puede dar lugar a un inmunoliposoma dirigido contra un determinado antígeno (por ejemplo, un receptor celular). Otras proteínas interesantes para aumentar la capacidad de transferencia de ADN son las proteínas fusogénicas derivadas de virus, como el de la estomatitis vesicular (glucoproteína de VSV) que al unirse a la membrana inducen la fusión de ésta con la bicapa del liposoma. A medida que la complejidad del lisosoma aumenta, su estructura y propiedades se asemejan más a un virus artificial con envuelta lipídica de mayor eficiencia, pero también mayor inmunogenicidad. La transferencia de ADN desnudo o envuelto en liposomas se utiliza cuando existen posibilidades terapéuticas sin necesidad de transducir eficientemente el tumor, por ejemplo, cuando se busca la inducción de una respuesta inmune antitumoral. Cuando, por el contrario, se requiere la máxima transducción posible, hay que recurrir a los vectores virales. En este caso ya no se habla de transfección, sino de transducción.

Hay varios tipos de virus que se utilizan para generar vectores: retrovirus, virus adenoasociados (AAV), adenovirus, virus del herpes, etc. (figs. 3 y 4). Los retrovirus son virus de ARN, con un genoma de unas 8 a 10 kilobases sustituible casi íntegramente por ADN terapéutico en los vectores. Los vectores retrovirales se integran en el genoma de células en división, aunque los retrovirus derivados de lentivirus (virus del SIDA) tienen la ventaja de no requerir división celular para integrarse y expresarse. La integración supone la presencia estable del ADN terapéutico en la célula diana y en toda su progenie, pero conlleva un cierto riesgo intrínseco de mutagénesis y oncogénesis por inserción. En general, los retrovirus no se pueden concentrar a más de 10^6 viriones por ml y son inactivados por el complemento en sangre, por lo que se usan *ex vivo*. Los AAV son virus de ADN de doble cadena de 5 kilobases que, como los retrovirus, se integran en la célula transducida. Los AAV sí pueden concentrarse hasta 10^{13} viriones por ml y no se inactivan en sangre, con lo que son aptos para su administración *in vivo*. Al contrario que los retrovirus y AAV, los adenovirus son muy inmunogénicos y no se integran en la célula transducida. Se usan en terapia génica del cáncer, donde la expresión estable no es esencial. Describiremos sus características en el apartado dedicado a esta enfermedad.

Aplicación a enfermedades monogénicas

Las enfermedades monogénicas constituyen el paradigma de las candidatas a máximas beneficiarias de la terapia génica. De las casi 10.000 enfermedades genéticas descritas, por el momento sólo unas pocas son un objetivo de esta terapia por el mejor conocimiento que se tiene de ellas a nivel molecular, por el órgano o tejido afectado, por la necesidad de regulación en la expresión del gen terapéutico o porque ya se disponga de los vectores y de la experiencia adecuada en su corrección a nivel molecular. La intro-

ducción en las células o tejido adecuado de una versión funcional de un gen cuya alteración es responsable de una enfermedad es la aproximación terapéutica más obvia. La idea es tan simple que no es de extrañar que los primeros éxitos contrastados de esta terapia se hayan producido precisamente en dos enfermedades monogénicas. Desde el primer ensayo clínico para la inmunodeficiencia severa combinada por carencia de adenosín desaminasa (SCID-ADA), y tras 10 largos años de relativa frustración, al publicarse las primeras curaciones en el año 2000 quedó claro que la terapia génica era mucho más que una simple idea². Desde los inicios de la terapia génica a principios de los noventa y hasta principios del 2004 se han iniciado un total de 93 ensayos clínicos para enfermedades monogénicas, lo que representa un 9,4% del total de ensayos aprobados en el mundo (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). La corrección permanente de los defectos genéticos requiere de vectores que integren los genes terapéuticos en el genoma de las células diana, de forma que éste se transmita a toda su progenie. Los vectores retrovirales basados en virus de la leucemia Moloney murina (MoMLV) fueron los primeros en ser utilizados como vectores en los ensayos clínicos y siguen siendo, 15 años más tarde, los vectores integrativos más utilizados, sobre todo en aplicaciones basadas en las células madre.

Dada la relativamente alta prevalencia de la hemofilia, la terapia génica para las diversas formas de esta enfermedad ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años. Actualmente, los modelos caninos de hemofilia (A y B) han sido curados mediante esta terapia³. Sin embargo, los ensayos en humanos no han sido tan exitosos. Han finalizado un total de tres ensayos clínicos y otros dos están todavía en activo. Dichos ensayos incluyen diversas estrategias (músculo esquelético, hígado y fibroblastos cutáneos como tejido diana), así como distintos tipos de vectores (retrovirus, adenovirus y AAV) en las dos formas de la enfermedad. En general sólo se ha demostrado producción del factor (VIII o IX) de forma transitoria y en menos de la mitad de los pacientes tratados, con picos de producción que en el mejor de los casos llegó al 6%. Algunos grupos han comenzado a investigar las células madre hematopoyéticas como potencial tejido diana, pues se ha demostrado que éstas pueden sintetizar y segregar adecuadamente el factor VIII, una proteína de gran tamaño y que requiere de complejas modificaciones postraduccionales que no todos los tipos celulares pueden garantizar.

Terapia génica en células madre hematopoyéticas: los primeros éxitos

Para los defectos genéticos que afectan a los distintos linajes hematopoyéticos (tabla 1) las dianas ideales son las células madre hematopoyéticas (CMH), ya que una vez trasplantadas son capaces de reconstituir la hematopoyesis (incluyendo el sistema inmune) de por vida. A pesar de no estar completamente caracterizadas, las CMH humanas pueden ser enriquecidas unas

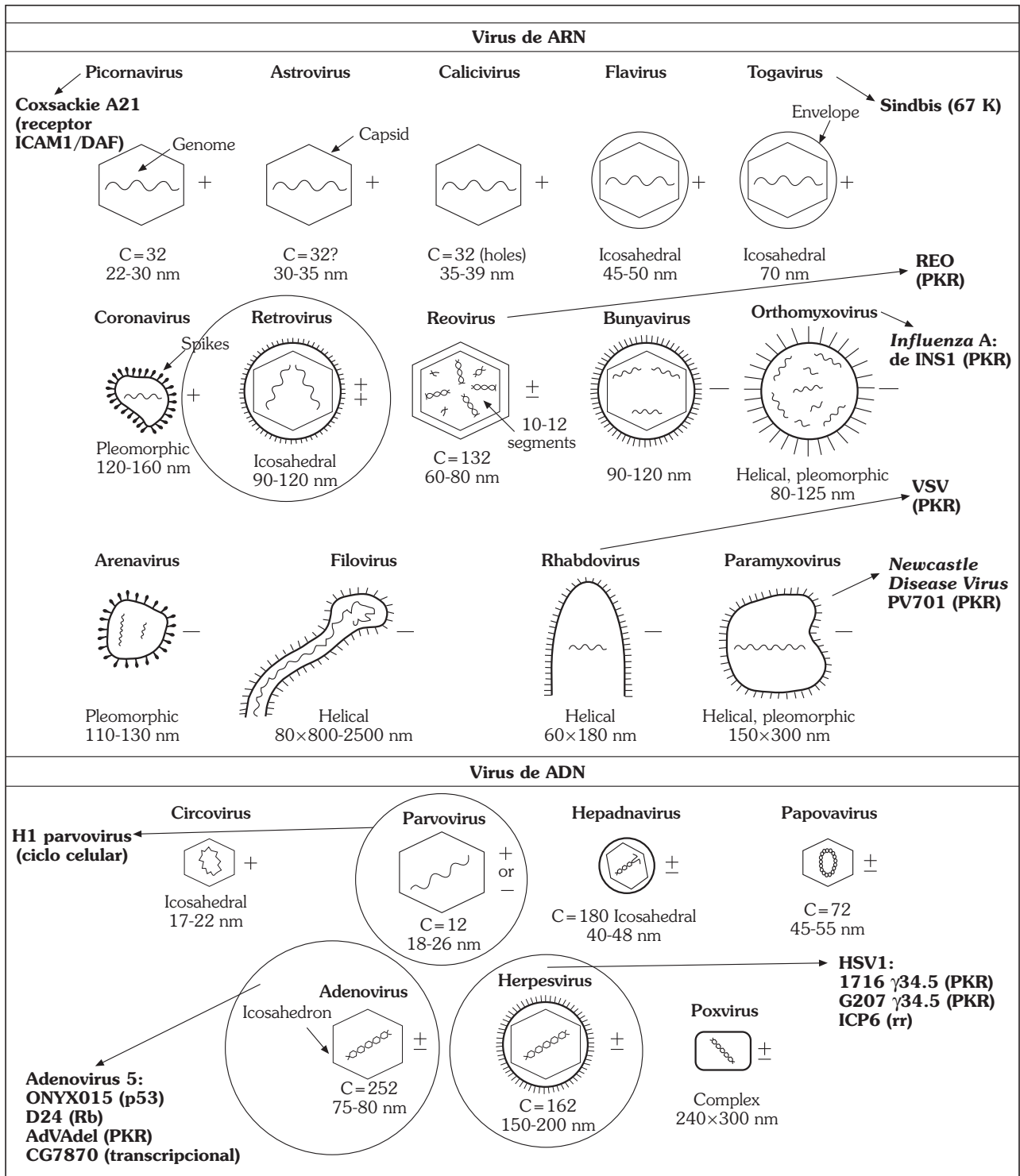


Fig. 3. Virus utilizados en terapia génica y viroterapia. Los virus se clasifican según la naturaleza de su material genético en virus de ARN (arriba) o ADN (abajo) que puede ser de cadena doble o simple en ambos casos. La presencia de envuelta lipídica es el segundo factor más importante para su clasificación. Los virus usados en terapia génica se han enmarcado en círculos; los usados en viroterapia están indicados con flechas.

100 veces seleccionando la fracción CD34⁺, transducidas *ex vivo* y trasplantadas de forma análoga a un trasplante de médula ósea. Con todo, los múltiples ensayos realizados desde 1990 se saldaron con fracasos, de forma que un panel de expertos recomendó

en 1995 una vuelta a los laboratorios y a la investigación básica. Los clínicos se habían precipitado a iniciar los ensayos clínicos con herramientas que aún no estaban a punto. A finales de los noventa se volvió a la carga con mejores herramientas y más cono-

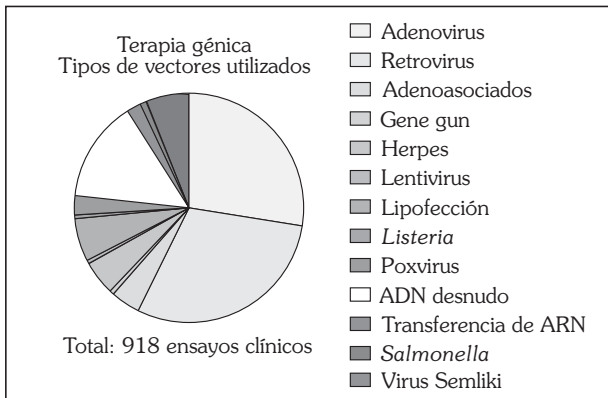


Fig. 4. Diagrama de tipos y porcentaje de enfermedades estudiadas mediante ensayos de terapia génica.

cimientos hasta que en verano de 2000 los grupos de Fischer y Cavazzana-Calvo (París, Francia) hicieron público el primer gran éxito de la terapia génica en niños con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (SCID-X1)². La enfermedad se caracteriza por un defecto en el gen de la cadena gamma común (γc), que codifica para una subunidad de los receptores de las interleucinas 2, 4, 7, 9, 15 y 21, y representa aproximadamente la mitad de todos los casos de SCID. Se manifiesta como una ausencia casi total de células B, T y NK funcionales, lo que da lugar a infecciones graves y frecuentes que suelen ser fatales durante los primeros años de vida. El ensayo del grupo francés se basó en la introducción del gen γc utilizando un vector retroviral en las células CD34⁺ de la médula ósea, que se reinfundieron de nuevo a los pacientes en ausencia de tratamiento mieloablativo. Pocos meses después de la infusión de las células corregidas genéticamente los recuentos de células T alcanzaron cifras normales y la función inmunitaria mejoró significativamente en 9 de los 10 niños tratados. Estos resultados fueron confirmados independientemente por investigadores británicos usando un protocolo análogo en otros 6 pacientes. La clave del éxito radicaba en el hecho de que las células genéticamente modificadas, ya capaces de responder a los factores de crecimiento específicos, podían proliferar y diferenciarse y tenían una ventaja selectiva para repoblar los nichos (células T y NK y secundariamente B) virtualmente vacíos, mientras que las células no corregidas seguían muriendo por apoptosis, lo que da como resultado una repoblación completa por células T y NK genéticamente corregidas.

El segundo éxito reconocido de la terapia génica para enfermedades monogénicas fue publicado en el 2002 en pacientes con SCID secundaria a deficiencia de la enzima adenosín desaminasa (ADA)⁴. Esta deficiencia representa entre el 10% y el 20% de todas las SCID. La enzima cataliza la desaminación de la desoxiadenosina a adenosina, resultando su ausencia en un acúmulo de metabolitos altamente tóxicos para las células T, entre otras. Como ocurre en la SCID-X1, el trasplante de médula ósea de un donante compatible (hermano), si está disponible, constituye la mejor al-

ternativa terapéutica. Si no hay donante, los pacientes pueden ser tratados con ADA bovina pegilada (PEG-ADA), que corrige parcialmente la deficiencia inmune en la mayoría de casos. Como se ha apuntado anteriormente, el primer ensayo clínico de terapia génica se realizó en niños con deficiencia de ADA en 1990. El ensayo consistió en la inserción de una versión funcional del gen ADA en células T autólogas, que fueron reinfundidas de nuevo a los pacientes. Doce años más tarde, los pacientes así tratados, a los que se les mantuvo la terapia con PEG-ADA, expresaban la enzima, pero a unos niveles muy bajos, probablemente subterapéuticos. Durante muchos años este ensayo clínico se consideró fallido. Sin embargo, un análisis detallado de los dos pacientes tratados hace 14 años reveló que en uno de ellos la actividad ADA era del 25% de su nivel normal y que más del 15% de sus células mononucleares circulantes contenían el gen terapéutico. El protocolo italiano se aplicó a dos pacientes, que reconstituyeron eficientemente su sistema inmune con células genéticamente corregidas. La diferencia entre éste y el protocolo iniciado en 1990 es que en éste no se empleó mieloablación en los pacientes y además se les mantuvo con la terapia sustitutiva con PEG-ADA, que probablemente anulaba la ventaja selectiva para las células genéticamente modificadas.

Estos primeros éxitos aportan renovadas esperanzas a esta joven disciplina. El hecho de que dos tipos de SCID fueran las primeras enfermedades en ser curadas mediante terapia génica no fue una sorpresa. Ya se ha comentado la fuerte ventaja selectiva que opera para las células genéticamente corregidas para proliferar o escapar de la apoptosis y por tanto para repoblar *in vivo*. Otras formas de SCID, ahora en distintas fases de desarrollo preclínico, como el síndrome de Wiskott-Aldrich, o las deficiencias de JAK3, RAG-1 y RAG-2 y Artemis, podrían sumarse en un futuro cercano a la lista de éxitos. Por desgracia, no se espera que resulte tan fácil para la mayoría de enfermedades candidatas a ser corregidas usando células madre en las que no existe ninguna ventaja selectiva para las células modificadas. Para evitar este inconveniente se están investigando estrategias encaminadas a facilitar el injerto de las células trasplantadas, dándoles artificialmente una ventaja que de otra forma no tendrían. Una de ellas es la búsqueda de pautas de acondicionamiento mínimamente ablativas que sean bien toleradas y que eliminen parcialmente las células hematopoyéticas endógenas que compiten con las células que se trasplantan⁵. Por si fuera poco, el cultivo y la manipulación *ex vivo* de las CMH les hace perder capacidad de injerto⁶, lo que aumenta todavía más su desventaja para repoblar *in vivo*. Otra prometedora línea consiste en el empleo de genes seleccionables que, una vez introducidos junto al gen terapéutico, permiten la selección *in vivo* de las células transducidas usando agentes farmacológicos. Uno de los mejor conocidos es el sistema de la O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), una enzima reparadora del ADN que confiere resistencia a agentes alquilantes mielotóxicos como el BCNU. El hecho de

que la MGMT se exprese normalmente en muchos tejidos, incluida la médula ósea, limita su utilidad como agente selectivo, por ello se recurre al empleo de ciertas formas mutantes de la enzima que son resistentes a la acción de la O⁶-bencilguanina (O⁶-BG), un inhibidor selectivo de la MGMT normal, pero que no afecta a la forma mutante. El empleo combinado de estas MGMT mutantes y de O⁶-BG como sistema de selección *in vivo* funciona limpiamente en los modelos experimentales⁷.

Inserciones retrovirales: riesgo oncogénico y utilidad para el análisis clonal

Uno de los grandes avances de los últimos años ha sido la aparición de técnicas que permiten analizar con relativa facilidad y a gran escala los sitios o puntos de inserción o integración retroviral (IR) en los genomas de las células. Cada IR constituye un marcador único de una célula madre que también se transmite a su progenie, convirtiendo estos IR en valiosas huellas clonales. Tradicionalmente se han utilizado técnicas moleculares como la hibridación Southern de fragmentos de restricción conteniendo secuencias del vector, que ha permitido una caracterización clonal de la hematopoyesis murina y humana tras el trasplante de células de médula ósea transducida retroviralmente⁸. Sin embargo, la introducción de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite una caracterización mucho más precisa de los IR, dada su elevada sensibilidad. Dichas técnicas incluyen la PCR inversa y, más recientemente, la PCR mediada por ligación (LM-PCR) y por amplificación lineal (LAM-PCR)⁹. Dichas técnicas permiten amplificar las secuencias de ADN adyacentes a los vectores integrados. La identificación exacta de los IR requiere de exhaustivas búsquedas *in silico* para localizar las secuencias que flanquean al vector en las bases de datos genómicas. Por definición, todas las inserciones en el genoma son mutagénicas. Sin embargo, el riesgo de oncogénesis por inserción tras los procedimientos de transferencia génica estándar usando vectores integrativos en los modelos preclínicos se consideraba extraordinariamente remoto. Por ello, el hallazgo de que dos de los 10 niños tratados en el ensayo clínico francés para SCID-X1 antes mencionado desarrollaran una leucemia T sorprendió a toda la comunidad médica y científica, especialmente cuando se comprobó que en ambos casos existía una única inserción retroviral cercana a la región reguladora del protooncogén LMO2¹⁰. Previamente no se habían descrito efectos adversos similares en los cerca de 200 pacientes tratados en ensayos clínicos análogos que también usaban vectores integrativos, incluyendo la deficiencia de ADA, o, excepto en casos puntuales, en los miles de animales experimentales sometidos a procedimientos de transferencia génica realizados hasta ahora¹¹. Esto planteaba la pregunta crucial de si la terapia génica basada en el uso de vectores integrativos era más peligrosa de lo que se pensaba, o de si estos dos casos estaban más relacionados con factores dependientes del contexto, y por tanto no podían ser extrapolables a otras

situaciones. Buscando en una base de datos de varios miles de cánceres hematológicos murinos inducidos por IR experimentales (<http://RTCGD.ncicrf.gov>), Dave et al encontraron dos casos asociados a inserciones cercanas al locus LMO2 y dos con inserciones en el locus IL2RG (el del gen terapéutico en esta enfermedad)¹². Una de ellas contenía las dos inserciones en ambos loci. Las probabilidades de que esos dos eventos se produjeran en la misma célula son tan remotas que el hallazgo indica que la expresión no regulada del transgén γc dirigida por el LTR retroviral se convirtió en un inesperado cofactor para la transformación leucémica. Aún se desconoce si la expresión de los otros componentes de dichos receptores puede limitar o modular la expresión del receptor funcional. Sin embargo, no se ha detectado ninguna anomalía en la vía de señalización mediada por el receptor γc en las células leucémicas de los pacientes. Los dos casos de leucemia descritos por los investigadores franceses generaron una respuesta desmedida por parte de los medios de comunicación y la sociedad, así como escepticismo por parte de la comunidad científica. Las agencias reguladoras de diversos países prohibieron los ensayos clínicos basados en vectores integrativos. En conjunto, estas reacciones negativas condujeron a una profunda recesión en el campo, llegándose a la paradoja de que a los niños con SCID-X1 se les vetaba una terapia que podía salvarles la vida. Aunque el riesgo estimado de desarrollar una leucemia por el tratamiento fuera del 15% (2 de 16 niños tratados), la única alternativa terapéutica es un trasplante alogénico de médula ósea, con una probabilidad de éxito del 90% si el donante es un hermano compatible (disponible en menos de un tercio de los casos) y alrededor de un 70% si el donante es no relacionado. En este caso, los supervivientes con frecuencia deben enfrentarse a graves complicaciones médicas como la enfermedad del injerto contra el huésped o un riesgo aumentado de linfoma. Esto representaba un gran dilema ético, ya que la terapia génica para dicha enfermedad era una alternativa superior al trasplante no relacionado. La realidad era que la terapia génica había salvado 15 de 16 pacientes tratados (10 en Francia y 6 en Gran Bretaña) y que los dos pacientes que desarrollaron leucemia recibieron un trasplante de médula ósea no relacionado y se hallan en remisión. En este momento muchos países han levantado el veto a los vectores integrativos, o los permiten en casos individuales.

Terapia génica del cáncer

El cáncer se caracteriza por una acumulación de varios defectos genéticos que contribuyen a la agresividad del tumor. Cuando la célula tumoral ha traspasado barreras de tejido conectivo, se ha diseminado por vía linfática o sanguínea y se ha implantado en diversos tejidos, la reparación de un solo defecto genético no consigue convertirla en una célula normal. Por ello la terapia génica del cáncer se plantea como objetivo destruir la célula tumoral. Pero eliminar todas y cada una de las células tumorales es un objetivo muy am-

bicioso que impone unas características propias a la terapia génica del cáncer. Por suerte, en ocasiones es suficiente restablecer la función de uno de los genes alterados en la célula tumoral para conseguir eliminarla. Por ejemplo, una copia normal de un gen supresor tumoral puede inducir la muerte celular de una célula tumoral con múltiples defectos genéticos. Tal es el caso de genes proapoptóticos que se hallan mutados en numerosos tipos de tumores, como p53 en el 50% de los tumores humanos. Sin embargo, en la mayoría de los casos las estrategias de terapia génica contra el cáncer utilizan genes sin relación alguna con los defectos genéticos de la enfermedad maligna: genes tóxicos o que estimulan el sistema inmune. Así, el armamento genético contra el cáncer refleja el conocimiento de múltiples áreas biológicas. Si a esta posibilidad de atacar la enfermedad desde muchos campos científicos le sumamos la cantidad de recursos económicos destinados a curar la enfermedad más letal que existe con los tratamientos actuales, se entiende fácilmente que la gran mayoría de ensayos clínicos de terapia génica se realicen en oncología. Después de unos años noventa de optimismo científico y económico, los resultados clínicos obtenidos han sido muy pobres e indican que la terapia génica contra el cáncer llegará con retraso.

Los requisitos especiales de transducción eficiente y transitoria que presenta la terapia génica del cáncer explican que el vector más utilizado sea el adenovirus. El adenovirus humano tipo 5 (Ad5) es un virus formado por una cápside proteica icosaédrica que encierra un ADN lineal de 36 kilobases. En adultos la infección por Ad5 suele ser asintomática y en niños causa un resfriado común y conjuntivitis. En general el Ad5 infecta células epiteliales, que en el curso de una infección natural son las células del epitelio bronquial. Entra en la célula por medio de la interacción de la fibra, la proteína viral que se extiende a modo de antena desde los doce vértices de la cápside, con una proteína celular implicada en adhesión intercelular llamada receptor de coxsackie-adenovirus (CAR). Cuando el ADN viral llega al interior del núcleo empieza ordenadamente la transcripción de los genes «tempranos» del virus: E1A, E1B, E2, E3 y E4. Éstos codifican para proteínas que regulan el ciclo celular y la replicación del ADN viral. E1A se une a la proteína celular Rb que está formando un complejo con el factor de transcripción E2F. Con ello se libera E2F para iniciar la transcripción de otros genes virales y de genes que activan el ciclo celular. E1B se une a p53 para activar el ciclo celular e impedir la apoptosis de la célula infectada. E2 codifica para proteínas de replicación del virus; E3 para proteínas que inhiben la respuesta inmune antiviral. E4 para proteínas de transporte de ARN viral. La expresión de genes tempranos conduce a la replicación del ADN viral y una vez replicado se activa el promotor que regula la expresión de los genes tardíos o estructurales que forman la cápside. Para construir un vector en el laboratorio se eliminan los genes E1A y E1B mediante técnicas de ADN recombinante. Estos genes eliminados han de ser complementados por la línea celular

empaquetadora del vector. Una célula de la línea empaquetadora produce unas 30.000 partículas virales o viriones, de los cuales un 10% son funcionales en un ensayo de formación de placas o calvas (pfu, unidad formadora de placa). El vector de Ad5 se puede llegar a purificar hasta un título de 10^{13} partículas virales por mililitro.

Las primeras aproximaciones clínicas contra el cáncer han sido la inyección directa en el tumor o en la cavidad que lo alberga (pleural en mesotelioma, peritoneal en carcinoma de ovario, intravesicular en carcinoma de vejiga, etc.). Sin embargo, el tratamiento del cáncer diseminado requiere la administración sistémica en el torrente sanguíneo. Aquí el Ad5 presenta un grave inconveniente por su marcado tropismo hacia el hígado. El virus, con un diámetro de 100 nm, sale del torrente vascular, donde hay fenestraciones suficientemente grandes: en el hígado, el bazo y el tumor. En el bazo, compuesto por células no epiteliales, no parece generar toxicidad. En el hígado interactúa con los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) y con los hepatocitos. Los primeros eliminan rápidamente el Ad5 de la sangre y activan una respuesta inflamatoria que cursa con una fiebre transitoria y que eventualmente eliminará todos los hepatocitos transducidos. De hecho, la toxicidad limitante en clínica es la hepatotoxicidad con elevación de transaminasas.

Inmunoterapia génica contra el cáncer

La estrategia de estimular el sistema inmune para reaccionar contra las células tumorales es muy atractiva, pues a partir de una reacción focal la respuesta inmune terapéutica se amplifica y se distribuye por todo el organismo hasta la destrucción del antígeno. Los linfocitos B y T se amplifican en los nódulos linfáticos hasta que cesa la presentación de antígeno por parte de las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. Además, la distribución sistémica de estos linfocitos en busca de antígeno es muy eficiente. Para estimular el sistema inmune se pueden utilizar los genes que codifican para citocinas (interleucina-2 [IL-2], IL-12, interferón- γ [IFN- γ], IL-18, etc.), moléculas de membrana que participan en la coestimulación de los linfocitos específicos (B7.1, CD40, ICAM-1, etc.) o el propio antígeno tumoral a modo de vacuna (alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, MAGE-1, MUC-1, MART-1, etc.). La utilización del gen en lugar de la proteína resulta en menor toxicidad, mayor duración de la acción y mayor inmunogenicidad. Administrando estos genes en distintos vectores se ha constatado la aparición de linfocitos citotóxicos antitumorales que, al ser aislados, son capaces de destruir células con el antígeno y el sistema de histocompatibilidad correspondientes. En general, los melanomas y los carcinomas renales son los tipos tumorales que mejor responden a la inmunoterapia. Sin embargo, los resultados terapéuticos han sido muy modestos. Por ejemplo, la inyección antitumoral de liposomas con el gen de B7.1 en pacientes con melanoma en un ensayo clínico fase II produjo regresiones en el 18%

de las lesiones inyectadas y respuestas sistémicas sólo en un 4% de los pacientes¹³. Inyectando células tumorales y fibroblastos transducidos con IL-2 se ha conseguido un 10% de enfermedad estable, pero sin respuestas parciales o completas¹⁴. Administrando IL-12 en células tumorales irradiadas o en vectores adenovirales¹⁵ por inyección directa en melanomas o tumores digestivos, respectivamente, se logró estabilizar la enfermedad en un 30% de los pacientes. La falta de respuestas más efectivas se debe a que los linfocitos citotóxicos activados no pueden erradicar los tumores de los pacientes. La célula tumoral se hace resistente por la pérdida de expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC), de antígenos tumorales y de otras moléculas que participan en la interacción linfocito-célula diana, la pérdida de la capacidad de procesamiento de los antígenos o por la expresión de proteínas que inhiben la acción del linfocito (IGF-1, TGF-B, etc.). La propia respuesta inmune selecciona las células tumorales que desarrollan estas características. Para conseguir que todas las células tumorales vuelvan a ser inmunogénicas se requeriría la transducción completa del tumor. Otro aspecto a tener en cuenta en la inmunoterapia génica es que la activación del sistema inmune frente a antígenos muy inmunogénicos, como pueden ser los de cápside de un vector vírico, puede enmascarar la respuesta frente a antígenos tumorales menos inmunogénicos. Además es difícil evaluar la eficacia de una terapia en enfermos terminales usando como parámetro la respuesta clínica.

Genes tóxicos o activadores de profármacos

La estrategia terapéutica más directa es inducir toxicidad letal en el tumor. Para ello podemos utilizar genes que codifican para toxinas como la ricina, la toxina diftérica, etc. Su elevada toxicidad requiere un control transcripcional muy selectivo difícil de conseguir. También existen varios genes cuyos productos proteicos metabolizan un profármaco inactivo en un fármaco citotóxico. El profármaco y el vector que transporta el gen activador se administran separadamente en el paciente (fig. 5). La cinasa de timidina (TK) fosforila el ganciclovir para permitir su incorporación en el ADN y detener su replicación. Existe un cierto efecto colateral, pues células adyacentes que no reciben el transgén pueden recibir el ganciclovir fosforilado a través de uniones intercelulares tipo GAP. Tras numerosos ensayos clínicos con retrovirus o adenovirus que expresan TK y administración sistémica de ganciclovir se ha comprobado que la eficacia terapéutica requiere unos niveles de transducción más elevados de los que se han conseguido hasta el momento¹⁶. Para mejorar estos resultados se han usado genes que producen metabolitos más pequeños y que difunden mejor que el ganciclovir-trifosfato y que dañan el ADN sin necesidad de replicación celular, como, por ejemplo, la nitrorreductasa de *Escherichia coli* activadora del profármaco dinitrobenzamida CB1954. En la clínica, la toxicidad se ve limitada al tumor si el vector se administra intratumoralmente, puesto que el

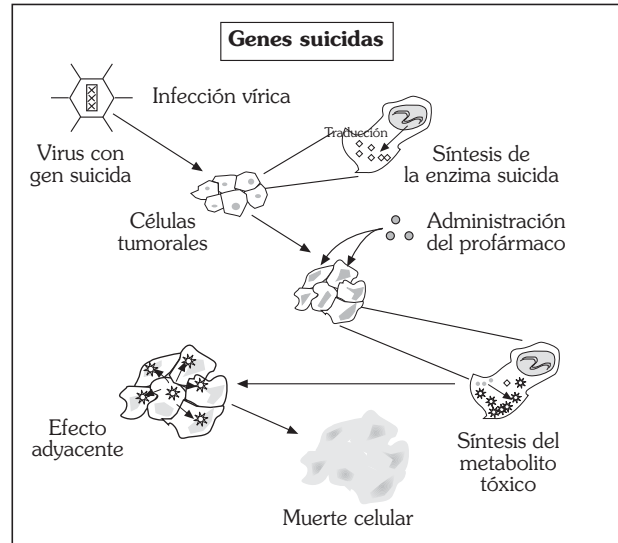


Fig. 5. Esquema representativo de cómo actúan los genes suicidas.

fármaco activado tiene una vida corta. En otros casos la acción selectiva sobre el tumor se consigue utilizando promotores selectivos de tumor para controlar la expresión del transgén. Por ejemplo, el promotor de erb-B2, que se sobreexpresa en un 20% de los tumores de mama, se ha utilizado para controlar la expresión de la citosina deaminasa. Esta enzima, ausente en mamíferos, hidroliza la 5-fluorocitosina a 5-fluorouracilo, que a su vez inhibe la síntesis de ADN y ARN en la fase S del ciclo celular. En un ensayo clínico en fase I la inyección de un plásmido con citosina deaminasa bajo el promotor erbB-2 resultó en regresiones de los nódulos de mama inyectados en dos de 12 pacientes¹⁷. Pero en 6 pacientes el nivel de transducción de los nódulos inyectados no llegó a un 30% de las células del tumor, evidenciando la dificultad de llevar el gen a un número significativo de células tumorales, incluso por inyección directa. La administración sistémica para el tratamiento efectivo de la enfermedad metastásica supone todavía un reto mucho mayor.

Supresión de oncogenes y expresión de genes supresores tumorales

El avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas que originan el cáncer ofrece nuevas dianas terapéuticas selectivas. Toda célula tumoral presenta una activación aberrante de oncogenes que estimulan la proliferación celular y una pérdida de genes supresores tumorales que controlan el ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis. En algunos casos las alteraciones afectan a distintos niveles de una misma vía de control. Por ejemplo, la entrada en fase S del ciclo celular requiere de la presencia del factor de transcripción E2F que activará varios genes implicados en síntesis de ADN. En una célula que no prolifera, E2F se halla secuestrado por la proteína Rb (retinoblastoma). La pérdida de esta función bloquean-

te de Rb es una característica común a todos los tumores. Esta pérdida funcional puede ocurrir por mutación del propio gen de Rb o por fosforilación de Rb mediada por la sobreexpresión de las cinasas CDK4 y CDK6, de la ciclina D (que activa estas cinasas) o por la pérdida de los inhibidores de estas cinasas como p16 y p27 (vía p16-ciclina D-CDK4-Rb). Otra vía alterada en casi todos los tumores es la que controla la muerte celular inducida en presencia de ADN celular dañado. Esta vía converge en el factor de transcripción p53, que regula múltiples genes que detienen el ciclo celular e inducen la muerte celular. La pérdida de p53, sobreexpresión de proteínas que lo bloquean como Mdm2, o incluso la pérdida de los inhibidores de estas últimas como ARF resultan en un mismo defecto funcional (vía ARF-Mdm2-p53). Las señales de proliferación recibidas por la célula se transmiten desde la membrana al núcleo y convergen en estas vías, sobre todo a nivel de la ciclina D, cuya síntesis depende de señales mitogénicas. Por ejemplo, muchos factores de crecimiento se unen a receptores transmembranales induciendo fosforilación de sus tirosinas. Los residuos fosforilados sirven para anclar un complejo que contiene Grb2/Sos/Ras. Sos permite la unión de GTP a Ras, provocando su unión a múltiples proteínas efectoras que fosforilan otras proteínas a modo de vías efectoras. Entre ellas destacan las vías Raf-MEK-Erk, Ral y PI3K-AKT. Todas las vías contribuyen a la expresión de genes que activan la proliferación como la ciclina D, que induce la fosforilación de Rb.

Al introducir los genes supresores tumorales como Rb, p16 y p53, o al inhibir la expresión de oncogenes como Ras, se inhibe el crecimiento tumoral y se puede inducir apoptosis. En este tipo de estrategias es más difícil inhibir suficientemente la expresión de un oncogén, aunque las herramientas moleculares para conseguirlo han evolucionado desde el ARN antisentido hasta el ARNi pasando por los ribozimas. De entre éstas, la más utilizada ha sido la transferencia de p53 mediante un vector adenoviral. La toxicidad de Adp53 en células normales es mínima y un 50% de los tumores humanos son sensibles a los efectos proapoptóticos de p53. Se han realizado numerosos ensayos clínicos con Ad-p53 en cáncer de pulmón, cabeza y cuello y carcinoma de ovario, pero sólo los ensayos en fase II-III permiten una interpretación objetiva de los resultados clínicos. Su actividad proapoptótica quimio y radiosensibilizante y la falta de respuesta como agente único en fases iniciales ha implicado que en estas fases II-III el Adp53 se administre en combinación con quimioterapia. En carcinoma de pulmón la evidencia de actividad terapéutica no ha podido confirmarse en ensayos en fase II¹⁸. En carcinoma de ovario pudo incluso aumentar la morbilidad del tratamiento quimioterapéutico¹⁹. Las razones que subyacen a esta falta de eficacia son varias: transducción incompleta del tumor, selección de células que carecen de los receptores para la entrada del vector, alteraciones en la vía de apoptosis posteriores a la acción de p53 o independientes de p53, expresión de mutaciones dominantes de p53 en el tumor,

presencia o incremento de anticuerpos que neutralizan el vector. Aunque la mayoría de resultados preclínicos resaltan la eficacia antitumoral de p53, todos éstos se han constatado en modelos tumorales murinos.

Viroterapia génica

La baja eficiencia de transducción del tumor es un denominador común que explica en parte la escasa respuesta clínica de las anteriores estrategias. Un vector vírico que tuviese capacidad replicativa en la célula tumoral podría paliar esta deficiencia. A su vez la célula tumoral moriría por el efecto citopático de la replicación. Esta área de la biomedicina se denomina terapia viral del cáncer o viroterapia. La viroterapia surgió a principios del siglo XX, al observarse curaciones en pacientes oncológicos que contraían enfermedades víricas. Inicialmente se inyectaron todo tipo de virus. El adenovirus se descubrió en 1953 y se ensayó en 1956. Actualmente se usan virus de ARN y ADN con propiedades oncotrópicas o diseñados para replicarse selectivamente en tumores (fig. 3).

Los virus ARN tienen la ventaja de replicarse en el citoplasma con ciclos vitales rápidos. En su ciclo producen grandes cantidades de ARN de doble cadena activador de una proteína cinasa celular inducida por IFN llamada PKR que detiene la síntesis proteica y la replicación viral. En una célula tumoral las vías de señalización del IFN suelen ser deficientes y además Ras inhibe la activación de PKR. Por ello los virus de ARN que no pueden evitar ser inhibidos por IFN, como el reovirus o el virus de la enfermedad de Newcastle (*Newcastle Disease Virus*), son oncotrópicos. En otros casos este oncotropismo se consigue al delectar los genes virales que contrarrestan esta respuesta del IFN. Así, por delectación de la proteína g34.5 del virus del herpes simple que se une a PKR se han conseguido los mutantes HSV-1716 y G207 utilizados en la clínica contra glioblastomas y otros tumores. En otros casos, como con el virus coxsackie en melanoma, la selectividad tumoral viene determinada por una mayor cantidad de receptor de virus (CAR) en la célula tumoral en comparación con la célula normal. Finalmente podemos conseguir selectividad tumoral al eliminar los genes virales que inducen el ciclo celular. Como hemos mencionado, el adenovirus y otros virus de ADN secuestran p53 y Rb para inducir la fase S. En células tumorales en las que p53 o Rb se halla inactivado por el proceso de oncogénesis estas funciones virales sobran y pueden ser eliminadas sin afectar el ciclo viral.

El adenovirus es el virus más utilizado para el diseño de vectores oncolíticos, bien por sustitución de un promotor viral por un promotor selectivo de tumor o bien por delectación de funciones virales que el tumor aporta²⁰ (fig. 6). CN706 es un adenovirus en el que el promotor de E1a se ha sustituido por el del antígeno específico de próstata (PSA). En el adenovirus CG7870, PSA regula E1b y el promotor de la probasina regula E1a. Estos dos se hallan en fase clínica en cáncer de próstata. Se han llegado a inyectar diez

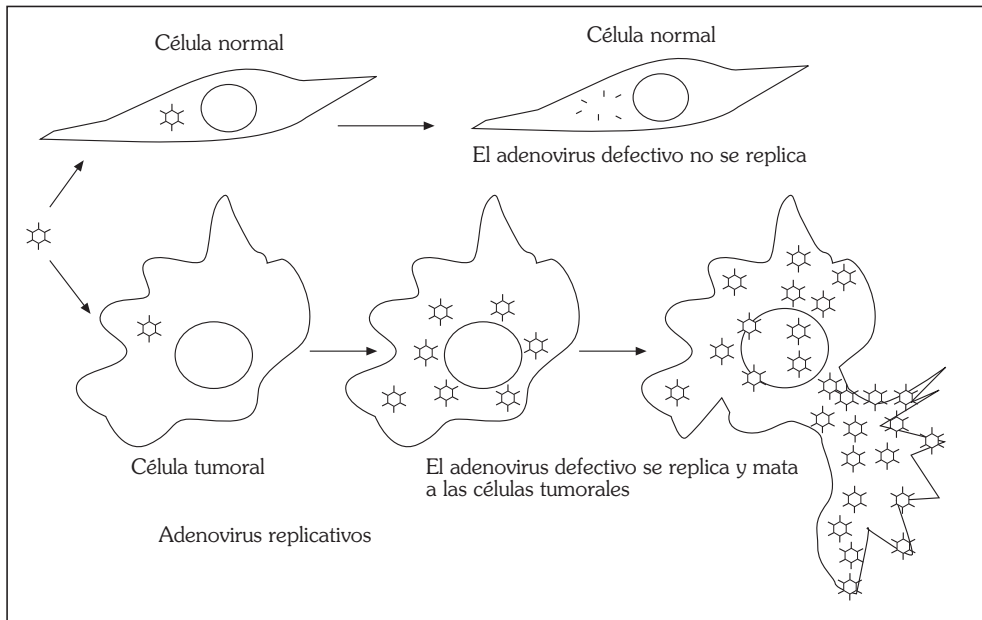


Fig. 6. Esquema representativo de cómo actúan los adenovirus de replicación selectiva.

mil millones de partículas virales en sangre con una leve toxicidad pseudogripal y transaminitis transitorias. Onyx015 y AdD24 son otros dos adenovirus diseñados para replicarse sólo en tumores. Onyx015 carece de la proteína viral que secuestra p53 (proteína E1b55K) y crece en tumores en los que p53 se halla inactiva o ausente. Su eficacia clínica es modesta debido a que E1b55k tiene otras funciones además de unirse a p53. AdD24 presenta una pequeña deleción en E1a, de modo que E1a-D24 no puede secuestrar a Rb que regula el ciclo celular. El adenovirus secuestra Rb para inducir la fase S y liberar el factor E2F que activará la transcripción de sus genes E2. En una célula normal el virus AdD24 no puede romper el complejo Rb-E2F y no puede replicarse. En una célula tumoral Rb se halla inactivo por hiperfosforilación o ausente y AdD24 puede crecer normalmente. Todavía faltan datos clínicos para corroborar su eficacia.

La principal limitación de la viroterapia reside en el hecho de que el virus ha de alcanzar todos los focos o nódulos tumorales y ha de propagarse antes de que una respuesta inmune antiviral lo neutralice. Se ha comprobado que al eliminar los residuos de la fibra que se unen a heparán sulfatos se logra evitar el hepatotropismo del adenovirus. Por lo que respecta a la respuesta inmune, se están diseñando protocolos clínicos que combinan viroterapia con quimioterapia mieloablativa o con agentes inmunosupresores como el anticuerpo anti-CD20. Se espera que la inhibición transitoria del sistema inmune pueda permitir al virus ejercer su efecto terapéutico durante un período suficiente para eliminar los nódulos tumorales.

Finalmente, terapia génica y viroterapia se combinan en lo que puede denominarse viroterapia génica. Esta combinación utiliza virus de replicación selectiva armados con genes que cooperan en el proceso oncolítico. Los genes utilizados pueden facilitar la salida del virus de la célula infectada, como p53, que cuando se

expresa en las fases tardías del ciclo viral induce una apoptosis que beneficia al virus ayudándole a liberarse de la célula. En otros casos multiplican el efecto lítico del virus con diversas combinaciones de genes suicidas, inductores de ciclo celular, promotores específicos²¹. Por ejemplo, el gen TK aumenta su porcentaje de actividad en presencia del gen E1a y también aumenta la capacidad lítica de un adenovirus en presencia de ganciclovir. En estos casos es importante controlar la expresión de p53 y TK para que se produzcan sólo en la fase tardía del ciclo viral cuando el adenovirus ya se ha almacenado en el núcleo celular. De otro modo la acción proapoptótica de p53 o citotóxica del ganciclovir fosforilado impedirían la replicación viral.

Conclusión

La terapia génica se está aplicando a múltiples enfermedades. En enfermedades no malignas causadas por la ausencia de una función génica se requiere la expresión estable del gen terapéutico. Las perspectivas de éxito son mucho mayores si la corrección genética confiere una ventaja selectiva a las células modificadas. Por el contrario, en cáncer no se busca corregir, sino destruir las células diana, y la eficiencia de transducción condiciona el éxito de los tratamientos. En cada caso los vectores son los elementos básicos para optimizar los abordajes y protocolos de terapia génica. Cada enfermedad requerirá un vector adecuado y un control de las condiciones apropiadas para su uso. Ya podemos hablar de curaciones concretas en el caso de inmunodeficiencias primarias y se está progresando rápidamente en hemofilias. En cáncer los resultados son muy modestos y la aparición de nuevos fármacos, como inhibidores de cinasas de tirosina y anticuerpos monoclonales, ha frenado el entusiasmo inicial depositado en la terapia génica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature*. 1998;392:25-30.
2. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-72.
3. Kelley K, Verma I, Pierce GF. Gene therapy: reality or myth for the global bleeding disorders community? *Haemophilia*. 2002;8:261-7.
4. Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med*. 2002;8:423-5.
5. Puig T, Kadar E, Limon A, Cancelas JA, Eixarch H, Luquin L, et al. Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther*. 2002;9:1472-9.
6. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp Hematol*. 1995;23:461-9.
7. Bowman JE, Reese JS, Lingas KT, Gerson SL. Myeloablation is not required to select and maintain expression of the drug-resistance gene, mutant MGMT, in primary and secondary recipients. *Mol Ther*. 2003;8:42-50.
8. Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell*. 1986;45:917-27.
9. Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Haas S, Wissler M, Muessig A, et al. Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood*. 2002;100:2737-43.
10. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003;348:255-6.
11. Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem HP, Candotti F, et al. American Society of Gene Therapy (ASGT). American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther*. 2003;8:180-7.
12. Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science*. 2004;303:333.
13. Stopeck AT, Jones A, Hersh EM, Thompson JA, Finucane DM, Guchteil JC, et al. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2285-91.
14. Trudel S, Li Z, Dodgson C, Nanji S, Wan Y, Voralia M, et al. Adenovector engineered interleukin-2 expressing autologous plasma cell vaccination after high-dose chemotherapy for multiple myeloma-a phase I study. *Leukemia*. 2001;15:846-54.
15. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22:1389-97.
16. Serman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther*. 1998;9:1083-92.
17. Pandha HS, Martin LA, Rigg A, Hurst HC, Stamp GW, Sikora K, et al. Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: a phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *J Clin Oncol*. 1999;17:2180-9.
18. Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2002;11:521-35.
19. Zeimet AG, Marth C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol*. 2003;4:415-22.
20. Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2000;18:723-7.
21. Parada C, Hernández J, Guinea J, Sánchez-Arévalo V, Sánchez-Prieto R, Ramón y Cajal S. Adenovirus E1a protein enhances the cytotoxic effects of herpes thymidine kinase-GCV system. *Cancer Gene Ther*. 2003;10(2):152-60.