



ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de Ingreso

como Académico Correspondiente

MEDICAMENTOS CELULARES Y
GÉNICOS
PARA TERAPIAS AVANZADAS:
DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A
LA PRÁCTICA CLÍNICA

ILMO. SR. D. Juan Antonio Buenen Fondejo



Santiago de Compostela, Mayo de 2006

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso

**MEDICAMENTOS CELULARES Y GÉNICOS
PARA TERAPIAS AVANZADAS:
DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA
PRÁCTICA CLÍNICA**

ILMO. SR. D. JUAN ANTONIO BUEREN RONCERO

Santiago de Compostela

Mayo de 2006

A mi padre y madre, por su eterna confianza.

A mis hijos Juan y Jesús, por su alegría.

A Ana, mi mujer, por su ayuda incondicional.

Imprime: ARTES GRÁFICAS VICUS, S.A.L.
c/ Segovia, 19 - 36205 VIGO

Depósito Legal: VG- -2006

TABLA DE CONTENIDO

1. Prólogo	7
2. Introducción	11
3. Los primeros pasos de la investigación en células madre	13
4. El trasplante de células madre hematopoyéticas: El paradigma de la terapia celular	15
5. Los bancos de sangre de cordón umbilical: Células madre con disponibilidad inmediata	17
6. Hallazgos de nuevas propiedades de las células madre adultas	23
6.1. Bases celulares de las terapias regenerativas	23
6.2. Ensayos clínicos representativos de terapia celular regenerativa	25
7. Las células madre mesenquimales: Una población con grandes posibilidades en el campo de la terapia celular	27
8. Posibilidades y limitaciones de las células embrionarias para la terapia de enfermedades	31
9. Vectores de transferencia génica: Una nueva familia de medicamentos	35
9.1. Medicamentos basados en vectores virales	36
9.1.1. Vectores retrovirales	36
9.1.2. Vectores adenovirales	38
9.1.3. Vectores adenoasociados	39
9.2. Medicamentos basados en vectores no-virales	40
9.2.1. Liposomas catiónicos	40
9.2.2. Conjugados moleculares, policationes y vectores	
de naturaleza peptídica	41
9.3. Implantación de los diferentes vectores de transferencia	
génica en ensayos clínicos de terapia génica	42
10. Principales logros de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades hereditarias	45
11. Terapia génica del cáncer	49
11.1. Inmunoterapia génica en el tratamiento del cáncer	51
12. La seguridad en Terapia Génica	53
12.1. Un caso de toxicidad aguda por infusión con vectores adenovirales	53
12.2. Oncogénesis insercional en pacientes SCID-X1 tratados	
mediante terapia génica ex vivo con vectores retrovirales	54
13. Legislación relativa a terapias avanzadas con medicamentos celulares y génicos	57
14. Epílogo	61
15. Referencias	65

1. PRÓLOGO.

Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia,

Ilustrísimas Sras. y Sres. Académicos,

Señoras y Señores,

Queridos amigos:

Antes de nada quiero comenzar expresando mi agradecimiento al Excelentísimo Sr. Presidente, D. Isaac Arias Santos, por la confianza que ha depositado en mí al proponer mi candidatura como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

Asimismo, quiero también agradecer muy sinceramente la amabilidad de todos los Sres. Académicos al permitirme compartir con ellos una plaza de Académico Correspondiente en esta tan digna Academia, plaza que sin duda constituye el mayor honor en mi carrera profesional.

Quiero que mis primeras palabras en esta toma de posesión sirvan para recordar mi primera emoción al saber de la propuesta de este nombramiento por parte de nuestro Excelentísimo Sr. Presidente, mi amigo, Isaac. A tal emoción le sucede el orgullo presente, y compromiso futuro para cumplir con entusiasmo mis obligaciones como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

Aunque madrileño de nacimiento y también de casta, desde mi llegada a este mundo nunca he dejado de acampar por esta tierra galle-

ga. He aprendido a disfrutar de sus fríos mares, a saborear sus exquisitos manjares, y sobre todo a querer a sus entrañables gentes. Sea cual fuere la razón por la que he sido llamado a formar parte de la Academia de Farmacia de Galicia, son tantos los vínculos que me unen a esta querida tierra, que mi compromiso a contribuir con el progreso de la ciencia en Galicia queda ratificada desde el mismo día de hoy.

Han sido muchos los que me han ayudado en mi formación y progreso científico. He tenido la suerte de contar con el consejo y apoyo de grandes maestros en el campo de la Hematología Experimental. Particularmente importante fue contar con la ayuda de mis colegas Nydia Testa y Bryan Lord, del Instituto Paterson en Manchester, quienes siempre me ofrecieron excelentes consejos para que nuestro laboratorio del CIEMAT fuera un referente nacional en el cultivo de progenitores hematopoyéticos. También promovieron mi participación en ambiciosos proyectos de investigación internacional desde el comienzo de mi carrera. Tengo también un recuerdo particularmente grato de la colaboración mantenida con mi buen amigo del Centro de Biología Molecular, José Almendral. Él me ayudó a interesarme por los virus, y con él empecé a trabajar en el campo de la terapia génica. Aunque muchas otras personas han sido esenciales en mi formación, creo que han sido mis propios colegas del laboratorio, los postdoctorales, los técnicos, los propios estudiantes.... los que más me han ayudado en mi formación técnica y humana en el laboratorio. La generosidad y entusiasmo por compartir ideas es la esencia de un trabajo como el nuestro, en el cual es muy frecuente ver cómo el protagonismo de los investigadores por mostrar su “genialidad” es causa de la pérdida de las mejores colaboraciones y de interesantes Proyectos.

En estos últimos años de mi trabajo he podido comprender el compromiso que equipos de investigación - como el que tengo el honor de dirigir - tienen con la sociedad, con la salud, con los enfermos. La investigación y el desarrollo de complejas herramientas biológicas no puede quedarse limitada a la satisfacción que produce el hecho de ver un trabajo publicado en una prestigiosa revista científica. Entre nuestros objetivos ha de ocupar un lugar prioritario el de conseguir que aquellos enfermos que no tienen alternativas terapéuticas aceptables, puedan beneficiarse de las posibilidades que ofrece la moderna biología molecular y celular. El reto está ahí, los pacientes también, por lo que no sería aceptable no poder demostrar, en breve plazo de tiempo,

nuestra contribución a mejorar el desarrollo de la biomedicina para el beneficio de los pacientes. En particular, el conocimiento de una enfermedad pediátrica, la anemia de Fanconi, está constituyendo un revulsivo para mí y para mi manera de progresar en el trabajo que realizo. A ellos y sus familias quiero rendir un especial homenaje en este día.

Quiero, cómo no, tener muy presente en estos momentos a toda mi gente; mi familia, la que siempre está ahí, con su apoyo incondicional a mi dedicación a este oficio que tan poco tiempo material y espiritual deja para otros quehaceres. Cuántas horas con el portátil, el “paper”, el proyecto, el informe.....

Por último, es momento de tener recuerdo muy especial de mi padre. Fue durante sus últimos días en la clínica - donde tan cariñosamente le cuidaron sus amigos - donde elaboré una parte importante de un discurso que hoy tengo el enorme placer de presentar. Para entonces, él ya había contado a todos tus amigos, una gran parte de ellos de Galicia, que a su hijo le iban a nombrar Miembro de la Academia de Farmacia de Galicia.

Vaya este discurso dedicado a todos vosotros!

2. INTRODUCCIÓN.

El objetivo que persigue la terapia celular es la regeneración de tejidos que por defectos del organismo o por causas exógenas al mismo, no pueden producir el número preciso de células funcionalmente competentes. Ejemplos de estas enfermedades son la diabetes, las diferentes enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, o también diferentes tipos de neoplasias, en las que es necesario reemplazar las células tumorales por células sanas. Los primeros avances de la terapia celular se realizaron con células de la médula ósea, tanto por su facilidad de acceso, como por las posibilidades de infundir las mismas en el torrente sanguíneo, desde donde pueden dirigirse a su microambiente fisiológico. El conocimiento de la biología y las aplicaciones de las células troncales hematopoyéticas, más comúnmente llamadas células madre hematopoyéticas, permitió progresar en el conocimiento de otros tipos de células madre. De manera paralela, el desarrollo de la biología molecular y el conocimiento de la biología de los virus permitió la generación de virus modificados genéticamente, los cuales podían transferir genes terapéuticos a pacientes con enfermedades hereditarias o adquiridas. Había nacido la terapia génica. Los avances en el conocimiento de las células madre adultas han dado paso a la investigación de los posibles usos terapéuticos de células madre de origen embrionario; lo que ha dado lugar a una gran discusión sobre aspectos tanto técnicos como éticos.

Aunque una gran parte de las aplicaciones de la terapia celular que han trascendido a la sociedad tiene todavía pendiente la demostración de su eficacia terapéutica, no cabe duda que nos encontramos ante

una nueva era terapéutica basada en la obtención, la manipulación y la implantación de células en el paciente. Los procesos de manipulación realizados sobre células autólogas o alogénicas son enormemente variados, pues incluyen desde procedimientos más o menos sencillos de purificación, a complejos sistemas de manipulación genética. Con objeto de controlar la calidad y seguridad de los medicamentos de naturaleza celular y génica se han desarrollado normas legales específicas para este tipo de terapias avanzadas, las cuales probablemente tendrán que ser menos restrictivas en un futuro para facilitar su acceso a los pacientes.

3. LOS PRIMEROS PASOS DE LA INVESTIGACIÓN EN CÉLULAS MADRE.

Estudios pioneros realizados en el año 1955 por Stroud y colaboradores (1) pusieron de manifiesto que la recuperación hematológica de ratones expuestos a irradiación se podía pronosticar mediante la observación de nódulos esplénicos en los mismos. Algunos años después, la existencia de células con capacidad de diferenciación linfoide y mieloide fue demostrada por Barnes y Ford (2). En el año 1961, los canadienses Ernest McCulloch y James Till publicaron un trabajo que marcó un hito en la historia de la Hematología Experimental (3). En este trabajo demostraron que el trasplante de células de médula ósea a ratones irradiados generaba también nódulos esplénicos, cuyo número era proporcional al número de células de médula ósea trasplantadas. A la célula responsable de la formación de cada nódulo se la denominó unidad formadora de colonias esplénicas (CFU-S), o “célula madre hematopoyética”. Por otra parte, el ensayo experimental desarrollado por Till y McCulloch constituyó la base de todos los estudios posteriores sobre cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos. Así, en el año 1969 los equipos de Pluznik y Sachs (4) por un lado, y de Donald Metcalf (5) por otro, mostraron simultáneamente la posibilidad de cultivar progenitores de médula ósea, que



daban lugar a colonias de células maduras, *in vitro*. A pesar de la relevancia de estos ensayos, estudios posteriores demostraron que ningún ensayo clonogénico podía reflejar el comportamiento de las auténticas células madre hematopoyéticas. Por ello, seguía siendo preciso recurrir a técnicas basadas en el trasplante de médula ósea y al seguimiento de la reconstitución hematológica de los receptores del trasplante.

El desarrollo de vectores retrovirales para marcado genético permitió introducir huellas genéticas que caracterizaban a cada célula de la médula ósea que sería posteriormente trasplantada a un animal. Esto permitió definir de manera rigurosa a cada célula madre hematopoyética mediante el análisis genético de su progenie. La primera observación de marcado retroviral fue llevada a cabo por John Dick y colaboradores en 1985 (6). Este trabajo, además de confirmar la existencia de células madre con capacidad de generar células linfoides y mieloides, constituyó el comienzo de la terapia génica. Merece la pena destacar cómo a pesar de los grandes avances de la biología molecular y celular, las bases que hoy se siguen manejando para definir las células madre siguen siendo las mismas que estableció L. Lajtha hace más de 25 años: son células que poseen capacidad de diferenciación múltiple y de mantenerse a sí mismas durante una gran parte de la vida de un individuo (7).

4. TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS: EL PARADIGMA DE LA TERAPIA CELULAR.

Como no puede ser de otra manera, este apartado he de comenzar haciendo una referencia particular al Dr. Donnal Thomas, Premio Nobel de Medicina en 1990 por su eminente contribución al campo del trasplante. El Dr. Thomas comenzó sus experimentos de trasplante de médula ósea en perros en los años 50. Sus observaciones sobre tratamiento del síndrome hematopoyético en animales irradiados le llevó a iniciar los primeros estudios clínicos de trasplante en pacientes. Gracias al esfuerzo de E. D. Thomas y de muchos otros colegas y discípulos suyos, el trasplante de médula ósea se ha venido contemplando como una de las alternativas de elección para el tratamiento de enfermedades neoplásicas de la sangre, inmunodeficiencias o aplasias. El trasplante de médula ósea constituye, por tanto, el paradigma del uso clínico de las células madre adultas y, en definitiva, de la terapia celular (8).



El conocimiento de moléculas capaces de movilizar las células madre desde la médula ósea hacia la sangre periférica - principalmente el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) - ha supuesto un importante hito en el campo de los trasplantes hematopoyéticos. Así, los procedimientos de anestesia general y extracción de la

médula ósea se están viendo desplazados en gran medida por tratamientos de movilización de células madre, que permiten recolectar las mismas a partir de la sangre periférica del donante. Como consecuencia de ello, la fuente de células madre que se está utilizando en los trasplantes hematopoyéticos está cambiando de manera significativa en estos años. Como se muestra en la Figura 1, desde el año 1.999 el uso de la médula ósea se está quedando estabilizada a costa de nuevas fuentes de células progenitoras (ver Figura 1).

Durante esta última década las indicaciones del trasplante hematopoyético se han ampliado conforme se ha aprendido a manipular la medula ósea *in vitro* y modulado el efecto inmunológico que acompaña al trasplante hematopoyético. Este hecho es de gran importancia, puesto que en la mayoría de los trasplantes, el efecto curativo del procedimiento se basa en su efecto inmunoterapéutico. Ahora bien, para optimizar el trasplante de células hematopoyéticas es necesario tener en cuenta que la infusión de este tipo de inóculos conlleva la administración de un elevado número de células accesorias, implicadas en una gran parte de los procesos que ocurren tras el trasplante. Entre ellos cabe destacar el anidamiento de las células madre en un microambiente adecuado, o las temidas reacciones de rechazo del injerto contra el huésped (EICH). El conocimiento de la biología de los diferentes tipos celulares infundidos es, sin embargo, muy limitado. Por ello, y para optimizar el uso de estas células en protocolos de trasplante necesitaremos profundizar en aspectos básicos de la función de cada tipo celular.

5. LOS BANCOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL: CÉLULAS MADRE CON DISPONIBILIDAD INMEDIATA.

Estudios realizados en la década de los 80 sobre las propiedades de la sangre del cordón umbilical pusieron de manifiesto el elevado número de progenitores hematopoyéticos primitivos presentes en este tejido. Entre los trabajos realizados han de destacarse los llevados a cabo por los pediatras españoles Fernández-Delgado, Besalduch y Colomer (9), y los hematólogos Broxmayer y Boys (10), quienes predijeron las posibilidades de la sangre de cordón umbilical para ser utilizada como fuente de células madre, alternativa a la médula ósea. En virtud de este tipo de observaciones, la Dra Eliane Gluckman en el año 1988 realizó en el Hospital San Luis de París el primer trasplante de células de sangre de cordón a un paciente, en este caso un niño con anemia de Fanconi (11). Estudios posteriores mostraron que la alorreactividad de la sangre de cordón umbilical es inferior a la de médula ósea o sangre periférica (12), por lo que esta nueva fuente de progenitores comenzó a utilizarse para el trasplante de un elevado número de pacientes.



Teniendo en cuenta las propiedades anteriores, y considerando la gran cantidad de unidades de sangre de cordón que podrían recogerse cada año, no se tardó en organizar un sistema internacional de registro

y criopreservación de estas unidades. A diferencia de lo que ocurre con la red de donantes de médula ósea - en donde una vez localizado el donante es necesario confirmar la disposición del mismo a donar sus células, y entonces proceder a la obtención de las mismas - los bancos de sangre de cordón umbilical permiten la disposición inmediata de células previamente caracterizadas y criopreservadas, para proceder al trasplante del enfermo.

Gracias a los bancos de sangre de cordón umbilical se han realizado ya 6.000 trasplantes en todo el mundo, 330 de los cuales se han realizado en España. Tal como ha sido el caso con los progenitores hematopoyéticos movilizados a sangre periférica, el número de trasplantes realizados a partir de unidades de sangre de cordón umbilical también está experimentando un aumento progresivo en el tiempo. En virtud ello, la proporción de trasplantes realizados en el año 2004 con cada una de las tres fuentes de progenitores ya fue prácticamente la misma (Figura 1).



Figura 1: Evolución de los trasplantes alogénicos realizados en España a partir de distintas fuentes de células madre hematopoyéticas. (Información cedida por la Organización Nacional de Trasplantes)

La limitación fundamental del trasplante de sangre de cordón umbilical proviene de su reducida celularidad, y por tanto, de su capacidad para reconstituir en un periodo aceptable de tiempo la hematopoyesis de pacientes adultos. Así, mientras que para los trasplantes de

médula ósea o progenitores movilizados a sangre periférica se vienen infundiendo alrededor de 2 millones de progenitores CD34⁺ por Kg de peso del paciente, el contenido total de células CD34⁺ en una unidad de sangre de cordón umbilical es de entre uno y ocho millones. Para tratar de compensar esta limitación, diferentes laboratorios hemos intentado expandir *in vitro* el número de progenitores presentes en unidades de sangre del cordón umbilical. En modelos de ratón, nuestro laboratorio demostró la viabilidad de expandir *in vitro* células progenitoras hematopoyéticas, y también que a través de este procedimiento es posible mejorar la velocidad de prendimiento del injerto infundido, aumentando así la tasa de supervivencia de los receptores trasplantados (13-16). Asimismo, demostramos que el cultivo *in vitro* de sangre de cordón umbilical humano permite aumentar el contenido de progenitores hematopoyéticos, manteniendo su potencial para reconstituir la hematopoyesis de ratones inmunodeficientes a largo plazo (17). A pesar de estas observaciones prometedoras, han sido pocos los laboratorios que han sido capaces de mostrar una expansión significativa de las auténticas células madre, y a día de hoy, ningún ensayo clínico ha conseguido demostrar que las técnicas de expansión *ex vivo* de células progenitores acortan de manera significativa el periodo de prendimiento tras el trasplante (18). Probablemente, el uso de factores de crecimiento *in vitro* implique un cambio en la expresión de las moléculas de adhesión de las células madre que modifique su anidamiento (19), por lo que la visión simplista de pensar que el prendimiento es sencillamente proporcional al número de progenitores infundidos no tenga suficiente relevancia clínica.

Como consecuencia de la poca eficacia de las alternativas basadas en la expansión *ex vivo* de progenitores, otros procedimientos han surgido en la clínica, tales como los trasplantes de varias unidades de sangre de cordón, o los trasplantes de cordón junto con progenitores CD34⁺ procedentes de un donante haploidéntico. A diferencia de lo observado con las técnicas de expansión *ex vivo*, este tipo de estrategias sí parece que está ofreciendo buenos resultados como medio de acelerar la recuperación hematológica de pacientes trasplantados con sangre de cordón umbilical (20).

Los hallazgos obtenidos acerca del uso de la sangre de cordón permiten concluir que esta fuente de progenitoras está siendo de extraordinaria importancia para el trasplante de pacientes pediátricos, y está

ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con médula ósea o progenitores movilizados (20). Para que más pacientes puedan beneficiarse de estas células será necesario aumentar el número de unidades que actualmente permanecen criopreservadas en los bancos públicos; particularmente de unidades pertenecientes a grupos de histocompatibilidad poco frecuentes. Para ello, será necesario que los gobiernos optimicen los sistemas públicos de donación y almacenamiento de sangre de cordón umbilical, y que aumente aún más la solidaridad de los padres para donar estas unidades a los bancos públicos.

Como alternativa a los bancos públicos de sangre de cordón, han aparecido los llamados “bancos privados”. El debate entre estas dos opciones ha surgido en España muy recientemente. A este respecto merece la pena indicar que han sido muchas las cuestiones que se han discutido de manera simultánea, entremezclando aspectos éticos y técnicos. La información que a menudo se ha dado a los padres de un recién nacido para mantener criopreservadas las células del cordón umbilical de su hijo no ha sido siempre correcta. En este sentido, las aplicaciones actuales de la sangre del cordón umbilical son claras, y están restringidas a la terapia de enfermedades hematológicas. Por otra parte, las probabilidades de que un determinado individuo pudiera necesitar las células de su propio cordón umbilical criopreservado, para curarle de una patología hematológica, son muy reducidas por dos razones principales: En primer lugar, la probabilidad de padecer una enfermedad hematológica grave es muy reducida, y en segundo lugar, en el caso de que esto ocurriera, el trasplante a partir de células de un cordón alogénico podría ser más recomendable, pues así se facilitaría un efecto inmunoreactivo del injerto contra el tumor. De hecho, de las 200.000 unidades de sangre de cordón umbilical actualmente criopreservadas, tan sólo en un par de casos se han solicitado estas células para el trasplante del donante.

¿Será posible que el niño donante del cordón umbilical pueda beneficiarse en un futuro de sus células criopreservadas para el tratamiento de otras enfermedades no hematológicas?. Tales aplicaciones no son evidentes, y no es fácil predecir cuales podrían ser éstas. Como consecuencia de lo dicho, presentar las células de la sangre del cordón umbilical como un “seguro de vida” para el nuevo bebé, no parece una práctica éticamente aceptable, y por tanto los gobiernos deberían tratar de garantizar la correcta información que se ofrece a los padres que

quieren guardar en un banco privado la sangre del cordón de su hijo. Por otro lado, acusar de insolidarios a estos padres por no donar la sangre del cordón de su hijo a los bancos públicos tampoco parece muy justificable teniendo en cuenta que la inmensa mayoría de los cordones de los recién nacidos son desechados. En todo caso, garantizar el mantenimiento del sistema de donación altruista, en el cual España es ejemplo mundial, ha de tratar de salvaguardarse tal como se ha venido haciendo hasta hoy.

6. HALLAZGOS DE NUEVAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.

6.1. BASES CELULARES DE LAS TERAPIAS REGENERATIVAS.

Aunque las células madre adultas mejor conocidas son las células madre hematopoyéticas, se han identificado células madre adultas en músculo, hígado, cerebro y otros tejidos (21-23). En la médula ósea se estima que tan sólo una de cada cien mil células es una célula madre. Ahora bien, probablemente baste una auténtica célula madre para regenerar el sistema sanguíneo durante toda la vida de un individuo, tal como ya se ha demostrado en modelos experimentales (24).

Durante estos últimos años, tanto experimentos realizados en modelos animales, como estudios clínicos en pacientes, han mostrado la posibilidad de que células presentes en tejidos hematopoyéticos puedan adquirir marcadores y desarrollar funciones características de células pertenecientes a otros tejidos (25, 26). Asimismo, existen también evidencias de que células presentes en muy diferentes tejidos pueden contribuir a la generación de células del sistema hematopoyético (ver esquema en Figura 2).

Uno de los estudios experimentales que mayor expectación despertó en relación a la terapia celular regenerativa tenía como objeto la utilización de células de médula ósea para regenerar miocardio *de novo* en modelos murinos de infarto de miocardio. Los autores demostraron

la mejora de la función cardíaca de los animales, así como la contribución de las células de la médula ósea a la regeneración del músculo cardíaco (27).

En un modelo de cirrosis hepática, nuestro laboratorio ha demostrado recientemente la presencia de marcadores hepáticos en células hematopoyéticas que se habían dirigido al tejido hepático dañado (28). Asimismo, demostramos que la contribución de la médula ósea a este fenómeno podía aumentarse muy significativamente mediante tratamientos que movilizan las células madre desde la médula ósea a la sangre periférica; en particular con G-CSF (28).

Los mecanismos por los que células de un determinado tejido pueden contribuir a la regeneración de un tejido de diferente naturaleza están muy discutidos. Mientras que unos autores postulan que las células madre de un tejido cambian su programa de diferenciación para trans-diferenciarse a células de otro tejido (25), otros proponen que el cambio de fenotipo celular se produce por procesos de fusión celular entre dos estirpes celulares diferentes (28-30). Sea cual fuere el mecanismo por el que esto ocurre, la posibilidad de que células madre de un determinado tejido contribuyan a la regeneración de otros tejidos constituye un campo de investigación del mayor interés.

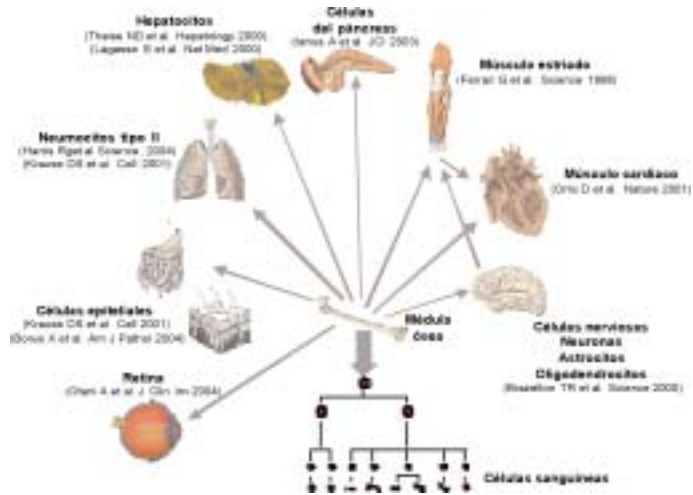


Figura 2. Esquema del potencial pluripotente propuesto para las células madre hematopoyéticas. Modificado a partir de (31).

6.2. ENSAYOS CLÍNICOS REPRESENTATIVOS DE TERAPIA CELULAR REGENERATIVA.

Como consecuencia de las observaciones que muestran la gran capacidad de regeneración de determinadas células madre adultas o de determinadas poblaciones celulares parcialmente diferenciadas, se planteó la posibilidad de utilizar estas células para la terapia de muy diferentes patologías, dando lugar al campo que hoy conocemos como “terapia regenerativa”. La utilización de células madre adultas como fuente de estas terapias plantea una serie de ventajas respecto al uso de células embrionarias. Entre ellas destaca el hecho de que no comporta elevados riesgos de tumorigénesis, no implica el uso de trasplantes alogénicos, y no conlleva problemas éticos. Por otra parte, las células madre adultas no parecen poseer ni la capacidad de multipotencia, ni el potencial de regeneración que caracteriza a las células embrionarias.

En virtud de los resultados obtenidos en modelos animales, diferentes grupos han ido poniendo en marcha ensayos de terapia regenerativa en pacientes. Entre los estudios que más expectativas han despertado se encuentran los que tienen por objeto la regeneración del músculo cardíaco mediante terapia celular. Algunos de ellos se han iniciado en España utilizando células de médula ósea (32) o mioblastos (33). En ambos casos, el procedimiento terapéutico resultó bien tolerado, y se obtuvieron resultados sugerentes de mejoría clínica. Aunque también se ha sugerido que la simple movilización de progenitores hematopoyéticos con factores de crecimiento podría facilitar la regeneración cardíaca tras la lesión del miocardio, un estudio randomizado de doble ciego publicado recientemente, no ha mostrado eficacia terapéutica significativa (34).

En virtud de estudios experimentales previos, el equipo de José López-Barneo trasplantó, en un ensayo piloto, células del cuerpo carotídeo a seis pacientes en estadio avanzado de enfermedad de Parkinson. Al cabo de un año de la terapia se observaron claras mejorías en tres de los pacientes, discretas mejorías en dos y no se observó mejoría en uno de los pacientes (35).

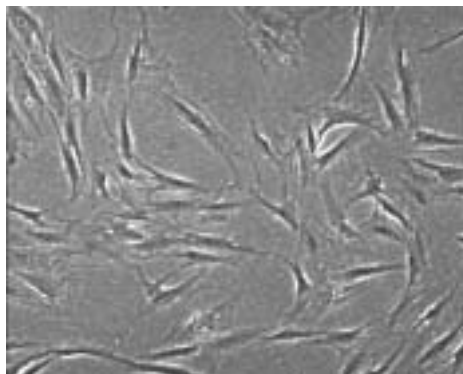
El cultivo y trasplante de queratinocitos como medio para facilitar la regeneración de la piel ha sido también realizado con éxito por investigadores del CIEMAT y el Centro de Transfusión de Asturias.

Recientemente han sido reportados los resultados clínicos obtenidos tras el trasplante de piel artificial sobre un total de veinte pacientes. En todos los casos, la piel generada *in vitro* prendió en los pacientes. El grado de prendimiento dependió de la severidad de la patología previa, encontrándose ésta en un rango del 10-90% en pacientes quemados, y del 70-90% para pacientes no críticos (36).

Numerosos otros estudios clínicos de terapias celulares regenerativas se han puesto en marcha para el tratamiento de muy diferentes patologías. En la mayor parte de los casos, los estudios se encuentran todavía en fases precoces de la investigación. Por ello, tan sólo existen resultados claros sobre la toxicidad del procedimiento. Puesto que en muchos casos la eficacia de estas terapias está todavía pendiente de conocerse, tendremos todavía que esperar nuevos resultados que nos permitirán evaluar cuáles son las aplicaciones terapéuticas más recomendadas para cada tipo de medicamento celular.

7. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: UNA POBLACIÓN CON GRANDES POSIBILIDADES EN EL CAMPO DE LA TERAPIA CELULAR.

Las células mesenquimales constituyen una población celular de marcado interés en el campo de la terapia celular regenerativa. Estas células fueron descritas por primera vez en 1976 por A. Friedenstein (37). Se han aislado principalmente a partir de médula ósea adulta, aunque también se han podido obtener de otras fuentes tales como la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical, o el tejido graso, entre otros. Son progenitores no hematopoyéticos multipotentes con capacidad de autorrenovación, y de diferenciación múltipotente, que incluye el tejido óseo, cartilaginoso o adiposo. Esta capacidad para diferenciación multilinaje, y su facilidad de manejo *in vitro* - se expanden rápidamente en cultivo - ha levantado grandes expectativas respecto a la posible utilización de estas células para el tratamiento de numerosas patologías.



Estudios llevados a cabo por Catherine Verfaillie demostraron que una subpoblación de células mesenquimales, las denominadas *MAPC* (multipotent adult progenitor cell), son capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a diferentes linajes, y regenerar tejidos de origen endodérmico, mesodérmico y ectodérmico (38). A diferencia de lo que ocurre con las células embrionarias, las *MAPC* no parecen formar tumores cuando se inoculan a animales adultos, lo que constituye una observación de notable interés para su posible aplicación clínica.

En virtud de las propiedades de las células mesenquimales, se han empleado ya en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes patologías, tales como la osteogénesis imperfecta, o para facilitar la cicatrización de heridas quirúrgicas. En virtud de los estudios que muestran el papel inmunomodulador de estas células (39), también han comenzado a utilizarse en diferentes laboratorios, entre ellos el nuestro, para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), frecuentemente asociado al trasplante hematopoyético alogénico.

Con relación al uso de las células mesenquimales para el tratamiento de la osteogénesis imperfecta, resultados preliminares han puesto de manifiesto la seguridad y también la eficacia de estas células en tratamientos precoces (40), incluso durante el estadio fetal (41) de estos enfermos. Así, los resultados obtenidos, pendientes de confirmarse en series más grandes de pacientes, han mostrado su eficacia para prevenir roturas óseas y aumentar la talla de estos pacientes. Centrándonos en el uso de las células mesenquimales para mejorar la cicatrización de heridas, el equipo del doctor García-Olmo y la empresa española de terapia celular Cellerix han puesto en marcha el primer ensayo clínico para el tratamiento de fístulas con células mesenquimales autólogas derivadas de tejido graso (42). Este ensayo se encuentra actualmente en fase II, y de nuevo ha puesto de manifiesto la seguridad del proceso, y sugerido el efecto terapéutico del tratamiento.

Como resultado de las observaciones experimentales que evidenciaban las propiedades inmunomoduladoras de las células mesenquimales (39), se han iniciado estudios clínicos dirigidos a controlar la EICH en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En un estudio piloto realizado por la Dra. Leblanc, se generaron grandes cantidades de células mesenquimales de médula

ósea mediante cultivo y expansión *in vitro*. Las células mesenquimales así obtenidas se infundieron en un paciente con EICH grado IV. Como consecuencia de la infusión de las células mesenquimales el EICH remitió, demostrando la eficacia terapéutica asociada a esta terapia celular (43). Estudios recientes de nuestro equipo han demostrado que las células mesenquimales derivadas de tejido graso poseen el mismo fenotipo, y también las mismas propiedades inmunosupresoras que las células mesenquimales derivadas de la médula ósea. A la vista de los resultados obtenidos *in vitro*, decidimos evaluar la capacidad de las células mesenquimales generadas a partir del tejido graso para revertir la EICH en un modelo de trasplante haploidéntico en ratón. Mientras que todos los ratones que no recibieron las células mesenquimales adipocíticas murieron como consecuencia de un EICH severo, el 80% de los ratones que recibieron las células mesenquimales adipocíticas sobrevivieron el trasplante a largo plazo (44).

Si se confirma la aplicación terapéutica de las células mesenquimales adipocíticas, éstas podrían constituir una importante baza de la terapia celular. Tal como ocurre con la sangre de cordón umbilical, grandes cantidades de tejido graso son destruidas diariamente tras procedimientos estéticos o terapéuticos de lipoaspirado. La recolección de este material, seguido de la expansión de sus células mesenquimales permitiría criopreservar células mesenquimales adecuadamente testadas y validadas para su posterior utilización terapéutica. Cuáles serán las aplicaciones terapéuticas más adecuadas de células mesenquimales alogénicas es todavía una cuestión por resolver, pero en ello están trabajando activamente importantes laboratorios. En todo caso, como ocurre con cualquier otro tipo celular, antes de que las células mesenquimales se empleen de manera extensiva en ensayos clínicos será necesario comprobar las condiciones experimentales que son compatibles con su uso seguro en el paciente.

8. POSIBILIDADES Y LIMITACIONES DE LAS CÉLULAS EMBRIONARIAS PARA LA TERAPIA DE ENFERMEDADES.

La célula totipotente por excelencia es el cigoto: la célula resultante de la fecundación del óvulo por un espermatozoide. En los animales vertebrados el cigoto experimenta un número preciso de duplicaciones que supone una gran producción de células y una primera especialización en un grupo de células llamado blastocisto, que está formado por una membrana celular externa, que dará lugar principalmente a la placenta, y una masa celular interna que dará lugar a la parte somática del embrión. Es a partir de esta masa celular interna de donde se obtienen las células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias poseen una altísima capacidad de proliferación. De hecho, pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro*, expandidas e incluso manipuladas genéticamente sin que pierdan sus propiedades de totipotencia. La generación de células madre embrionarias de ratón se consiguió por primera vez en el año 1981 (45). En humanos, la generación de tales células madre embrionarias ha sido mucho más difícil y sólo en unos pocos casos se han conseguido mantener en condiciones restringidas (46).

Debido a la gran capacidad proliferativa de las células embrionarias, se ha propuesto que podrían ser de gran utilidad para el tratamiento de muy diferentes enfermedades. No obstante, aparte de restricciones de tipo ético, la aplicación terapéutica de estas células está

actualmente limitada por importantes problemas prácticos. Entre ellos destaca el hecho de que al ser trasplantadas en animales generan teratomas; tumores de una gran agresividad, formados por células de diferentes linajes. Una restricción común al uso de otro tipo de células madre tiene que ver con el hecho de que las células madre embrionarias pueden ser inmunogénicas en organismos que no sean HLA idénticos. Para paliar este problema se ha propuesto la creación de bancos de células madre embrionarias, de manera análoga a como se está realizando con las células de sangre de cordón umbilical. Otra aproximación dirigida a paliar el problema de las reacciones de rechazo se basa en la estrategia conocida como “clonación terapéutica”. Esta técnica tiene como fundamento la sustitución del núcleo de células madre embrionarias de un donante alogénico, por núcleos del propio paciente. Las células resultantes poseerán la información genética del paciente, por lo que no serían rechazadas por el mismo. El gran inconveniente de esta aproximación es, no obstante, su complejidad y la necesidad de realizar tratamientos de corrección genética, en el caso de tratarse de pacientes con enfermedades de base genética.



Figura 3. Diferenciación embrionaria de células madre totipotentes.

Modificado de Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. NIH report

Por último, la utilización terapéutica de células madre embrionarias ha abierto una gran discusión ética, siendo rechazada por una parte importante de la sociedad. El principal problema reside en la necesidad de destruir un embrión para la obtención de las células madre embrionarias. Para paliar este problema, se han propuesto nuevas aproxima-

ciones que tienen como fundamento la obtención de células embrionarias a partir de embriones o fetos en desarrollo, sin necesidad de afectar al organismo donante de las células. En los años venideros observaremos hasta qué punto los programas de terapia celular se orientan hacia este tipo de células o por el contrario, continúan centrándose en células procedentes de donantes adultos.

9. VECTORES DE TRANSFERENCIA GÉNICA: UNA NUEVA FAMILIA DE MEDICAMENTOS.

La posibilidad de transferir genes a células eucariotas ha permitido que comience una nueva aproximación terapéutica denominada “terapia génica”. En esencia, existen dos aproximaciones para la terapia génica de pacientes. La alternativa ideal para restaurar la funcionalidad de genes defectivos se basa en la recombinación homóloga de los genes no funcionales por genes homólogos funcionales, ya que de este modo es posible conseguir una precisa reparación del gen defectivo, y con ello, una perfecta regulación de su expresión génica. Esta alternativa, sin embargo, no es todavía aplicable a la terapia humana debido a la reducida eficacia de recombinación que actualmente se alcanza. A diferencia de lo que ocurre con las aproximaciones de recombinación homóloga, en la “terapia de adición”, el gen terapéutico se añade al fondo genético de la célula diana, proceso que sí permite alcanzar eficacias de transferencia génica elevadas, compatibles con un beneficio clínico para el paciente.

La transferencia de los genes terapéuticos se ha realizado tanto mediante la infusión directa de los genes en los tejidos del paciente (in vivo), como de manera indirecta sobre células previamente extraídas (in vitro), las cuales tendrán que ser luego reinfundidas en el enfermo. En general, la eficacia de transferencia génica es notablemente superior cuando el proceso se realiza *in vitro*, en comparación a los procedimientos realizados in vivo. Por ello, una gran parte de los protocolos

actuales de terapia génica tienen su fundamento en la extracción de las células diana del organismo, seguido de la transferencia *in vitro* del gen terapéutico y la infusión de las células corregidas genéticamente en el paciente.

Los medicamentos de naturaleza génica están diseñados para facilitar la transferencia de genes terapéuticos a las células del paciente. Por ello, estos medicamentos están basados en el diseño de “vectores de transferencia génica”. Existen dos tipos principales de vectores de terapia génica: los “vectores virales”, cuya base estructural está constituida por virus, y los “vectores no virales”, que a diferencia de los anteriores, parten de estructuras sencillas para dar lugar a compuestos de naturaleza eminentemente artificial.

9.1 MEDICAMENTOS BASADOS EN VECTORES VIRALES.

Un vector viral es un virus que ha sido manipulado genéticamente para aprovechar su capacidad infectiva, pero eliminando las secuencias génicas implicadas en su propagación y patogenicidad. En los vectores virales, estas secuencias se sustituyen por los genes terapéuticos deseados. El estudio de la organización genética de las diferentes familias de virus permitió diseñar los primeros vectores virales de potencial uso terapéutico. Los vectores virales fueron los primeros en utilizarse en ensayos clínicos a comienzos de 1990 y continúan siendo los más utilizados. Puesto que la incorporación del gen terapéutico implica la pérdida de algunos genes esenciales para el virus, este proceso tiene que ser compensado mediante estrategias que varían de acuerdo con la biología de cada familia de virus.

9.1.1. VECTORES RETROVIRALES.

Los retrovirus son virus RNA con envuelta. Fueron elegidos como vehículos de transferencia génica por su elevada eficacia de transducción y porque son capaces de integrarse de forma estable en el genoma de la célula. Este proceso de integración en el genoma celular constituye una gran ventaja cuando se pretende mantener la presencia y la expresión de un gen terapéutico en un determinado tejido. La inmensa mayoría de los ensayos clínicos realizados con vectores retro-

virales se han realizado con vectores gamaretrovirales, derivados del virus Moloney de la leucemia del ratón. En el genoma de estos retrovirus existen tres regiones: Una región media, contiene los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, que codifican proteínas responsables de la replicación, encapsidación, transcripción reversa e infección. Dos regiones que flanquean a la zona media contienen las secuencias de control, necesarias en cis para la replicación viral. Estas secuencias se encuentran en las repeticiones terminales largas (LTRs) y en regiones vecinas a éstas, necesarias para la iniciación de la transcripción reversa y la encapsidación del RNA viral. Esta disposición facilita la construcción de los vectores retrovirales en los que el gen terapéutico sustituirá a los tres genes estructurales. Puesto que el empaquetamiento del vector y la integración del genoma del virus requieren de las proteínas *gag*, *pol* y *env*, se ha desarrollado una estrategia básica que consiste en la utilización de “líneas empaquetadoras” que se generan mediante la transfección de plásmidos que portan estos genes. Por otra parte, se transfecta la línea empaquetadora con el plásmido que lleva el genoma del vector terapéutico. Una vez integrado éste en el genoma de las células empaquetadoras, el DNA del vector se retrotranscribirá a RNA, y se empaquetará con ayuda de las proteínas estructurales que le aporta la línea empaquetadora.

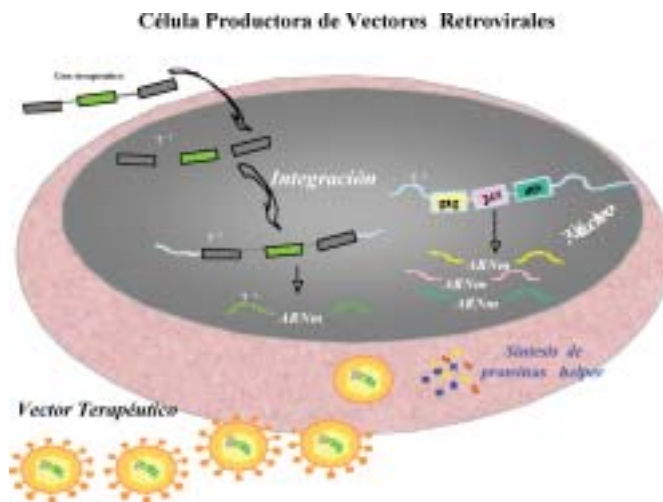


Figura 4. Esquema básico seguido para la fabricación de medicamentos compuestos por vectores retrovirales

Los vectores retrovirales así generados efectúan una transducción "limpia" mediante un ciclo de infección abortivo; es decir, son capaces de infectar la célula diana, pero no podrán realizar ciclos repetidos de replicación, re-infección y diseminación del virus. La mayor limitación de estos vectores reside en el hecho de que solo son capaces de transducir eficazmente células en división, ya que el acceso al núcleo del complejo de preintegración requiere la ruptura de la membrana nuclear. A diferencia de los gamaretrovirus, los lentivirus presentan mecanismos de transporte activo del DNA viral al núcleo de la célula. En consecuencia, una de las limitaciones principales de los vectores gamaretrovirales ha sido ya superada mediante el uso de vectores lentivirales, principalmente los derivados del virus de la inmunodeficiencia humana adquirida o HIV. Los lentivirus poseen un "genoma complejo" ya que, además de los tres genes comunes a todos los retrovirus, poseen otros genes responsables del control de la transcripción y del transporte del RNA viral del núcleo al citoplasma. Estos virus son más complicados de manipular genéticamente, por lo que en la actualidad no existen líneas empaquetadoras análogas a las utilizadas para la producción de los vectores gamaretrovirales. Su producción, pues, se realiza de manera transitoria, mediante la cotransfección de las células productoras del vector lentiviral con tres o cuatro plasmidos diferentes que portan todos los genes esenciales para el vector.

9.1.2 VECTORES ADENOVIRALES.

Los adenovirus son virus DNA sin envuelta con un genoma bicatenario de hasta 36 kb. De los diferentes serotipos de adenovirus que infectan células humanas, se han seleccionado los serotipos 2 y 5 para la generación de vectores de uso terapéutico, ya que no están asociados con ninguna enfermedad severa. Los adenovirus pueden transducir un elevado número de tipos celulares, independientemente de su actividad proliferativa. Sin embargo, el genoma viral no se integra en el genoma celular, por lo que en tejidos proliferativos, sólo facilitan la expresión transitoria del gen terapéutico. La producción de adenovirus recombinantes ha variado mucho a lo largo de la última década. Los únicos elementos del genoma de los adenovirus que son requeridos en cis son las repeticiones terminales invertidas (ITRs) y la secuencia de empaquetamiento cercana a la ITR izquierda. Los genes estructurales tempranos y tardíos se han incorporado al sistema de empaquetamiento de estos

vectores de diferente modo. Así, en el caso de los vectores adenovirales de primera generación, el adenovirus defectivo se generó mediante deleción de parte de la región E1 del virus, cuya función, esencial para la replicación viral, es aportada en trans por la línea celular humana 293, que expresa constitutivamente los genes E1A y E1B. Los vectores adenovirales de 1ª y 2ª generación se diferencian tan sólo en que los últimos han sido desprovistos de otros genes tempranos, aparte de E1. En cualquiera de los casos, la expresión residual de algunos genes virales genera una respuesta inmune del paciente que limita las aplicaciones de este tipo de vectores en la práctica clínica. Para eludir este inconveniente, se ha generado una nueva familia de vectores adenovirales desprovistos de todos los genes estructurales, conservando solamente las ITRs y la región de encapsidación. Sobre este esqueleto viral se añade el gen terapéutico, así como DNA de relleno hasta alcanzar un tamaño empaquetable.

9.1.3. VECTORES ADENOASOCIADOS.

Los virus adenoasociados (AAV) son parvovirus humanos. Estos son pequeños virus sin envuelta, con un genoma de DNA monocatenario. Las principales ventajas de los vectores adenoasociados derivan de su simplicidad genética y del hecho de no ser patógenos humanos. En ausencia de la coinfección por un virus auxiliar (adenovirus, principalmente), la infección por un AAV es improductiva y su genoma se integra en un sitio específico del genoma humano; en particular, en el brazo largo del cromosoma 19, de donde es rescatado una vez que la célula huésped es infectada por uno de los virus auxiliares. Aparte de las funciones aportadas por el virus auxiliar, la replicación del genoma del AAV y la formación de las partículas virales requieren la presencia de los productos de los genes *rep* y *cap*, que codifican respectivamente una replicasa y la proteína de la cápsida. Ambos genes pueden ser, como en el caso de otros virus, suministrados en trans a la hora de generar los vectores AAV. Una de las limitaciones de los vectores AAV es su baja capacidad de empaquetamiento de genes exógenos (inferior a 5 kb).

Propiedades	Vectores Retrovirales	Vectores Adenovirales	Vectores Adenoasociados
Integración	Sí	No	Sí
Capacidad de empaquetamiento Inmunogenicidad	7-8 kb Baja	35 kb Elevada	4.5 kb Baja
Dependencia del estado de división celular	Sí (excepto en LVs)	No	No

Tabla I: Principales características de los vectores más utilizados en terapia génica

9.2. MEDICAMENTOS BASADOS EN VECTORES NO-VIRALES.

Los vectores no virales se asemejan mucho más que los vectores virales a los productos farmacéuticos tradicionales. En este caso, se pretende mimetizar el proceso de infección viral utilizando materiales de síntesis conocidos. Los vectores no virales presentan, en general, una eficacia para transferir genes notablemente inferior a la que caracteriza a los vectores virales. Asimismo, la capacidad que poseen algunos vectores virales para integrar genes en el genoma de la célula huésped está aún por desarrollar en el caso de los vectores no virales. Los vectores no virales presentan, no obstante, una serie de ventajas que les hacen muy atractivos para determinadas aplicaciones. Así por ejemplo, son muy fáciles de manipular, tienen mayor estabilidad que los vectores virales, son más seguros biológicamente, y son menos inmunogénicos. Existe muy diferente tipo de vectores no virales, entre los cuales señalaremos los siguientes:

9.2.1.- LIPOSOMAS CATIONICOS.

En virtud de la experiencia farmacéutica en la encapsulación de fármacos en vesículas lipídicas, se trató de aplicar la tecnología de los liposomas al transporte de ácidos nucleicos. Puesto que la eficacia de

los liposomas convencionales para el transporte de DNA fue pobre, se generaron liposomas catiónicos en los cuales el DNA interacciona con los grupos catiónicos de la superficie lamelar. La eficacia de estos liposomas catiónicos ha motivado que sean los de mayor uso en ensayo clínicos con vectores no virales. Los lípidos catiónicos utilizados están formados por estructuras anfifílicas, compuestas de un dominio hidrofóbico y una cabeza polar. Los grupos catiónicos más frecuentes son aminas cuaternarias y poliaminas. Su eficacia de transfección depende de la presencia de un lípido neutro que actúa como “lípido de apoyo”, posibilitando la fusogenicidad del liposoma y la entrada del DNA en el citosol.

9.2.2. CONJUGADOS MOLECULARES, POLICATIONES Y VECTORES DE NATURALEZA PEPTÍDICA.

Estos vectores están formados por moléculas bifuncionales obtenidas por unión covalente entre un policación, que posibilita la unión y condensación del DNA, y un ligando o anticuerpo monoclonal, que confiere la especificidad celular. Forman complejos con DNA de estructura definida (toroidal) que permite su fácil captura por parte de la célula diana. Aunque la ventaja más clara del sistema es su especificidad, la mayor parte de los complejos que entran en los endosomas son degradados luego en los lisosomas.

El carácter catiónico es la base para el desarrollo de los vectores denominados policationes. Este carácter permite, no solo la interacción con el DNA, sino también su condensación e interacción de los complejos resultantes con la membrana celular. Para que los complejos policación-DNA sean electropositivos, se utiliza un exceso de policación.

Un grupo heterogéneo de vectores tiene su base en el uso de proteínas multidominio, basadas en el carácter modular de las toxinas bacterianas. Estos vectores incorporan en una cadena peptídica diferentes dominios dirigidos a facilitar la introducción del DNA en la célula. Las proteínas quiméricas poseen un dominio de unión celular, ligando o anticuerpo monocatenario, un dominio que posibilita el escape del endosoma, el dominio de translocación de la toxina, y un dominio de unión a DNA. Las limitaciones principales de estos vectores están relacionadas con su inmunogenicidad.

9.3 IMPLANTACIÓN DE LOS DIFERENTES VECTORES DE TRANSFERENCIA GÉNICA EN ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA.

El vector a utilizar en un determinado ensayo clínico de terapia génica depende de numerosas variables; entre ellas destaca el tipo de patología a tratar, así como la conveniencia de mantener estable la expresión del gen terapéutico – farmagén - en el paciente. Es también necesario conocer las características de las células a modificar genéticamente; en particular si se trata de células en proliferación activa o no. Por último, dependiendo de la accesibilidad y susceptibilidad de las células diana al vector seleccionado, se decidirá el procedimiento de transferencia génica a realizar: *in vitro* o *in vivo*. En aquellos casos en los que se requiera que el farmagén se transmita y se exprese establemente en la descendencia de las células diana de la transducción, será necesario utilizar vectores de tipo integrativo. De ahí que los vectores que facilitan tal integración, los retrovirales principalmente, han sido los más utilizados para la terapia de enfermedades hereditarias, en las que alguna proteína esencial no se expresa en el organismo. En el caso de que el vector terapéutico no se integre en el genoma celular, los procesos de división celular implicarán una progresiva dilución del gen terapéutico en el tejido en cuestión, y con ello, una progresiva pérdida de su eficacia terapéutica.

La revista *Journal of Gene Medicine* ha reportado que en enero de 2006 estaban en marcha un total de 1.145 ensayos clínicos de terapia génica en el mundo, repartidos en las fases clínicas que se muestran en la Tabla II.

FASE	ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA	
Fase I	714	62,4%
Fase I/II	234	20,4%
Fase II	161	14,1%
Fase II/III	12	1,0%
Fase III	24	2,1%
Total	1.145	100,0%

Tabla II: Relación de ensayos clínicos de terapia génica distribuidos por la fase del estudio en la que se encuentran. Tomado de la revista J. Gene Medicine. Marzo 2006.

La distribución de los diferentes vectores de terapia génica en estos ensayos es muy variada. Tal como refleja la tabla III, el 50% de todos los ensayos está realizándose con vectores adenovirales y retrovirales:

VECTOR	ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA	
Adenovirus	287	25,0%
Retrovirus	276	24,0%
DNA plasmídico/desnudo	192	17,0%
Lipofección	95	8,3%
Poxvirus	59	5,2%
Virus Vaccinia	51	4,5%
Virus Adenoasociado	38	3,3%
Virus Herpes Simplex	38	3,3%
RNA	14	1,2%
Otros	21	2,1%
Desconocido	43	3,8%

Tabla III: Relación de ensayos clínicos de terapia génica distribuidos por el tipo de vector. Tomado de la revista J. Gene Medicine. Marzo 2006.

Por último, las patologías que están siendo tratadas mediante terapia génica son también muy diversas, aunque tal como figura en la tabla IV, la mayor parte de los ensayos clínicos están dirigidos a la terapia del cáncer.

INDICACIÓN	ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA	
Cáncer	762	66,6%
Enfermedades monogénicas	100	8,7%
Enfermedades vasculares	100	8,7%
Enfermedades infecciosas	75	6,6%
Marcado genético	52	4,5%
Voluntarios sanos	19	1,7%
Otras	37	3,2%

Tabla IV: Relación de ensayos clínicos de terapia génica distribuidos en función de su aplicación terapéutica. Tomado de la revista J. Gene Medicine. Marzo 2006.

La mayor parte de estos ensayos clínicos se está realizando en Estados Unidos y en menor proporción en Europa y Japón, si bien los resultados más significativos se han obtenido en Europa; sobre todo en Francia, Italia e Inglaterra (ver apartado 10). En España la implantación de protocolos clínicos de terapia génica es escasa, particularmente en el campo de células del sistema hematopoyético. Nuestro laboratorio acaba de obtener la autorización de la Agencia Nacional del Medicamento para realizar el primer ensayo clínico español sobre modificación genética de linfocitos T, en pacientes que serán objeto de trasplante hematopoyético alogénico en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (ver apartado 11.1).

10. PRINCIPALES LOGROS DE LA TERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS.

Aunque la mayor parte de los protocolos de terapia génica actualmente en marcha tiene por objeto el tratamiento de enfermedades adquiridas, sobre todo en el cáncer, los principales logros de la terapia génica se han conseguido en enfermedades monogénicas hereditarias. Unas treinta enfermedades monogénicas pueden ser actualmente tratadas mediante trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. No obstante, las limitaciones para el hallazgo de donantes histocompatibles y los riesgos asociados a dicho tipo de trasplante, han promovido la búsqueda de otras alternativas terapéuticas, tales como la terapia génica. De entre las diferentes enfermedades hereditarias, las inmunodeficiencias congénitas severas SCID-X1 y ADA han sido las que han mostrado mayores beneficios terapéuticos como consecuencia de su tratamiento génico.

La inmunodeficiencia SCID-X1 representa aproximadamente la mitad de todas las inmunodeficiencias severas y está asociada a un defecto en la cadena γ_c ; una proteína que forma parte de numerosos receptores de interleuquinas. El primer protocolo de terapia génica de estos pacientes se realizó en el Hospital Necker de París, a través de un procedimiento *ex vivo* que consistió en la colecta de la médula ósea del paciente, el enriquecimiento de sus células madre, la transferencia del

gen γ_c mediante vectores retrovirales, y por último, la infusión de las células en el paciente (ver Figura 5). El procedimiento fue, por tanto, muy poco agresivo para el paciente, comparado con los tratamientos convencionales de trasplante alogénico.

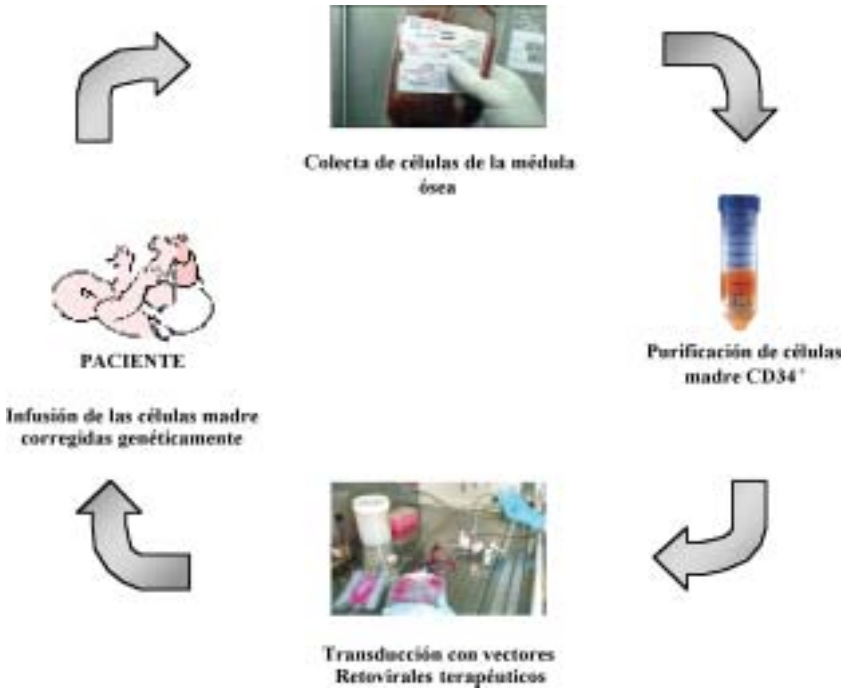


Figura 5: Esquema básico seguido para el tratamiento genético de pacientes con inmunodeficiencias combinadas severas.

En nueve de los diez pacientes tratados en París se observaron mejorías clínicas objetivas. Así, aumentó progresivamente el número de linfocitos T y células NK funcionales en la sangre periférica de los pacientes, quienes recuperaron una respuesta inmune que les permitió abandonar las unidades de aislamiento a las pocas semanas del tratamiento (47, 48). A la vista de los resultados obtenidos, se considera que el protocolo desarrollado por los Drs. Alain Fischer y Marina Cavazzana-Calvo constituye el primer ensayo clínico de terapia génica de eficacia terapéutica incuestionable. Más recientemente, el Dr. Adrian Thrasher comenzó en Londres un ensayo clínico análogo al realizado en París, obteniendo respuestas en los siete pacientes pediátricos tratados hasta el momento (49). En dos pacientes de mayor edad, sin embargo,

las respuestas no han sido positivas, sugiriendo la importancia del tratamiento precoz de estos pacientes.

La primera inmunodeficiencia que fue tratada mediante terapia génica es la inmunodeficiencia severa combinada, asociada a mutaciones en el gen que codifica la enzima adenosinadesaminasa (ADA). Los pacientes con inmunodeficiencia ADA que no tienen un donante de médula ósea histocompatible son tratados de forma convencional mediante terapia de remplazamiento con ADA soluble. Este es un tratamiento que frecuentemente deja de ser eficaz con el tiempo, necesita administrarse de forma continuada, y es extremadamente caro. En 1990 Michael Blaese y sus colaboradores comenzaron un ensayo clínico para el tratamiento de la inmunodeficiencia ADA, utilizando células T autólogas transducidas ex vivo con un vector retroviral que portaba el cDNA codificante de ADA (46). Este tratamiento no resultó muy eficaz, pues los pacientes no pudieron prescindir de la infusión de la terapia de reemplazamiento (46). En 1993, el grupo de D. Kohn comenzó un ensayo basado en la transferencia del gen ADA a células CD34+ autólogas. Posteriormente, en 1995, C. Bordignon y colaboradores publicaron los resultados de un estudio basado en la corrección génica de células progenitoras de médula ósea y linfocitos T de sangre periférica. Desgraciadamente, estos pacientes también tuvieron que continuar los tratamientos de remplazamiento con ADA (50,51).

A diferencia de lo realizado en los protocolos anteriores, en un nuevo ensayo desarrollado por el equipo de C. Bordignon, un paciente con inmunodeficiencia ADA recibió infusiones de linfocitos transducidos de manera paralela a una progresiva disminución en la dosis de ADA soluble. Este tratamiento facilitó la progresiva aparición de linfocitos que portaban el gen ADA, y mostró la actividad intracelular de ADA en los linfocitos de sangre periférica, los cuales adquirirían una funcionalidad esencialmente normal (46). Un protocolo posterior mostró la relevancia de realizar un acondicionamiento no mieloablativo como procedimiento necesario para el prendimiento de las células autólogas transducidas con el gen ADA. En dos pacientes se observó el prendimiento mantenido de progenitores hematopoyéticos transducidos, el aumento en las cifras de leucocitos, la mejora de las funciones inmunológicas, y finalmente, la reducción de metabolitos tóxicos (52).

La granulomatosis crónica constituye otra inmunodeficiencia que ha recibido atención particular para su tratamiento genético. Esta enfermedad se caracteriza por un fallo de las células fagocíticas para generar anión superóxido, manifestándose un síndrome recurrente de infecciones y formación de granulomas. Estudios experimentales sugieren que la corrección genética de aproximadamente un 5% de los granulocitos circulantes puede ser suficiente para poner de manifiesto un beneficio terapéutico. Los estudios clínicos basados en el trasplante de células CD34+ transducidas sobre pacientes no acondicionados, no han mostrado beneficio terapéutico. No obstante, los resultados de un ensayo clínico muy recientemente reportados por el equipo de Manuel Grez en Frankfurt, han mostrado la mejoría clínica de dos pacientes en los cuales sus células CD34+ se corrigieron genéticamente, y se infundieron tras un acondicionamiento no mieloablativo con busulfán (53).

11. TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER.

El principal problema del tratamiento génico del cáncer deriva del hecho de que en la mayor parte de los casos no se trata de una enfermedad monogénica. Por el contrario, las células cancerosas presentan frecuentemente un gran número de anomalías genéticas. Teniendo en cuenta que en cada tipo de tumor los circuitos implicados en su génesis pueden ser múltiples, las estrategias de terapia génica que se están siguiendo son también muy variadas, y en esencia lo que pretenden es neutralizar las diferentes vías por la que una célula sana se convierte en tumoral.

Éstas pueden resumirse en:

- Bloqueo de los programas de muerte celular programada.
- Insensibilidad a señales antiproliferativas.
- Generación de circuitos de supervivencia alternativos.
- Proliferación descontrolada.
- Invasividad y metástasis.
- Inducción de angiogénesis asociada al desarrollo de tumores sólidos.

Es sabido que la mayor parte de los tumores genera señales y sustancias que alteran su entorno fisiológico en su propio beneficio. Así, los tumores primarios pueden crecer autónomamente hasta que sus necesidades nutricionales les obligan a reclutar más recursos. Este es

un momento crítico en el que el tumor atrae células de soporte, promueve la neovascularización de su entorno y atrae células inmunes circulantes y las estimula para que secreten proteínas tales como metaloproteasas para favorecer su expansión y extravasación. En términos generales, para neutralizar mutaciones en genes responsables de la inhibición de la proliferación celular, se han transducido las células tumorales con genes tales como p53 o p16. Para revertir la resistencia a mecanismos de apoptosis celular, se han utilizado genes que codifican diferentes caspasas o el ligando de Fas. Para tumores muy dependientes de neovascularización o muy propensos a metastatizar, se han introducido genes que puedan bloquear dichos procesos, tales como VEGF-R, análogos de angiostatina, moduladores de integrinas o metaloproteasas. Los procedimientos empleados para realizar la transferencia génica están siendo muy variados y dependen fundamentalmente de la biología del tumor. En todo caso, éste es un aspecto esencial para el resultado terapéutico, pues como con en cualquier otra terapia se pretende la eliminación de todas las células tumorales presentes en el enfermo oncológico.

Entre los tratamientos génicos antitumorales que han tenido mayor impacto en la clínica destacan aquellos que tienen por objeto la introducción de genes pro-citotóxicos en las células tumorales. De los diferentes genes utilizados, el gen que codifica la timidina quinasa del virus Herpes Simplex (HSV-tk), ha sido uno de los más utilizados. Esta enzima facilita la fosforilación de ganciclovir, convirtiéndolo en un producto citotóxico. Así, la transducción del gen HSV-tk, seguido del tratamiento del paciente con ganciclovir, eliminaría las células tumorales transducidas. La terapia génica antitumoral con HSV-tk y ganciclovir tiene la ventaja de que el fármaco citotóxico sintetizado in situ, puede difundir a células tumorales vecinas, incluidas aquellas que no han sido transducidas con el vector terapéutico. Este fenómeno de difusión se considera crítico para conseguir un beneficio clínico del paciente oncológico, pues facilita el tratamiento de un elevado número de células tumorales. Entre los tumores que se han tratado mediante esta aproximación destacan los glioblastomas, tumores de cabeza y cuello, cáncer de próstata, etc. Los resultados obtenidos han sido variables, aunque en general demuestran que los efectos secundarios del tratamiento son aceptables, y que la terapia presenta una eficacia relativa (54).

Otro gen muy utilizado en este tipo de terapias antitumorales ha sido p53. Recientemente ha sido revisada la eficacia terapéutica asociada al tratamiento de pacientes con este tipo de gen citotóxico. Como en el caso de HSV-tk, la transferencia de p53 en tumores ha sido muy bien tolerada, ha facilitado el bloqueo proliferativo de los tumores, o revertido su resistencia a la quimio o radioterapia, indicando que puede ser una gran alternativa como terapia anticáncer (55).

En estos últimos años han despertado un interés especial los virus modificados genéticamente, cuya replicación es selectiva de la célula tumoral. Uno de los virus oncolíticos de mayor interés ha sido desarrollado por el español Ramón Alemany, actualmente en el Instituto Oncológico de Cataluña. El adenovirus Ad-Delta24RGD posee una elevada eficacia de infección y replicación en tumores deficientes en retinoblastoma. Recientemente, este investigador ha desarrollado una versión optimizada de este virus para su uso en terapia humana (56).

11.1. INMUNOTERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.

Puesto que el sistema inmune constituye uno de los medios más eficaces para controlar el crecimiento tumoral, numerosos ensayos de terapia celular y génica se han puesto en marcha como medio de tratamiento antitumoral, o como procedimiento para controlar reacciones adversas asociadas a la inmunoterapia.

Entre los ensayos clínicos de inmunoterapia destacan los que tienen por fundamento las siguientes aproximaciones:

- Utilización de linfocitos autólogos (TILs, LAKs, ALTs), expandidos ex vivo y/o modificados genéticamente.
- Inmunización de pacientes con DNA codificante de oncogenes.
- Generación de vacunas autólogas basadas en el uso de células tumorales inactivadas, primando células dendríticas, o potenciando la inmunogenicidad de las células tumorales mediante la introducción de genes que favorecen el proceso.

Un ensayo de inmunoterapia con células modificadas genéticamente que está suscitando notable expectación, tiene por objeto el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), que

frecuentemente se desencadena en pacientes oncológicos sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Ésta es una grave complicación del trasplante que está mediada por los linfocitos T del donante presentes en el inóculo a trasplantar. La estrategia desarrollada por el equipo de C. Bordignon consistió en modificar genéticamente los linfocitos T del donante, de forma que éstos fueran susceptibles a la administración de un fármaco pro-citotóxico, y por tanto eliminados como consecuencia de la administración de éste. El protocolo incluía la transducción *in vitro* de los linfocitos de donante con el gen suicida HSV-tk (57). En este estudio, iniciado en 1993, se incluyeron 23 pacientes y los resultados mostraron la resolución completa de la EICH en los tres pacientes a los que hubo que administrar ganciclovir. Aunque con carácter preliminar, se sugirió el mantenimiento del efecto antitumoral del procedimiento. Asimismo, un estudio multicéntrico europeo en el que participó nuestro equipo del CIEMAT ha puesto de manifiesto que la infusión de linfocitos transducidos con este vector nunca ha generado evento tumorigénico (58), análogo a lo descrito en algún paciente con inmunodeficiencia SCID-X1 (ver Apartado 12.2).

Los resultados obtenidos justifican que el medicamento consistente en “linfocitos transducidos con el gen HSV-tk” haya recibido recientemente de la Agencia Europea del Medicamento la calificación de medicamento “huérfano”. En colaboración con el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona comenzaremos brevemente un ensayo clínico con linfocitos transducidos en condiciones optimizadas por nuestro laboratorio (59, 60). El objeto de este ensayo clínico será el tratamiento de pacientes mayores de 45 años que reciban un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos bajo acondicionamiento reducido. Este ensayo clínico ha recibido ya la aprobación de los diferentes Comités Éticos, así como de la Agencia Española del Medicamento.

12. LA SEGURIDAD EN TERAPIA GÉNICA.

12.1. UN CASO DE TOXICIDAD AGUDA POR INFUSIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES .

La deficiencia de la ornitín transcarbamilasa (OTC) da lugar a una acumulación potencialmente fatal de amoniaco en sangre. Puesto que la OTC se expresa de manera fisiológica en el hígado, se consideró que éste debería ser el tejido diana de vectores que expresaran la versión correcta del gen OTC. En virtud de la eficacia de los adenovirus para infectar células hepáticas, se propuso la utilización de vectores adenovirales para transducir hepatocitos de estos pacientes con el gen OTC. Estudios *in vitro*, y también en animales de experimentación mostraron la eficacia del protocolo propuesto. Como consecuencia de ello, se inició el tratamiento de 17 pacientes con dosis progresivamente crecientes del vector, no manifestándose efectos tóxicos severos. No obstante, en uno de los pacientes tratados con la dosis más alta se desencadenó un proceso febril seguido de inflamación hepática y aumento descontrolado de los niveles de amonio, dando lugar a la entrada en coma del paciente. Lamentablemente el paciente falleció poco después, disparando las alarmas de los organismos reguladores sobre los riesgos de la inoculación in vivo de vectores adenovirales, como consecuencia de sus efectos inmunogénicos. Se confía que los nuevos vectores adenovirales desprovistos de la mayor parte del esqueleto viral implicado en su inmunogenicidad facilite el uso más seguro de estos vectores.

12.2. ONCOGÉNESIS INSERCIONAL EN PACIENTES SCID-X1 TRATADOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA EX VIVO CON VECTORES RETROVIRALES.

De los diez pacientes con inmunodeficiencia severa combinada SCID-X1 tratados en el Hospital Necker con vectores gama-retrovirales, tres han desarrollado leucemias asociadas a la inserción del gen terapéutico en la proximidad de oncogenes (61, 62), habiendo fallecido uno de ellos. A diferencia de estos tres efectos adversos severos generados en el ensayo clínico francés, en ninguno de los otros protocolos de terapia génica actualmente en marcha (52), ni siquiera en los pacientes SCID-X1 tratados en Londres por el Dr Adrian Thrasher (49), se han observado efectos adversos severos similares.

¿Cual es la causa por la que se han generado tales efectos adversos? De manera paralela a la observación de las primeras leucemias en los pacientes SCID-X1, el Dr Christopher Baum observó por primera vez en animales de experimentación un fenómeno similar. En sus experimentos trasplantó células madre hematopoyéticas que habían sido transducidas con vectores gama-retrovirales a animales receptores (63). Al cabo del tiempo observó en algunos animales la aparición de una leucemia clonal que investigó a nivel molecular. En su estudio, C. Baum observó que el vector retroviral se había insertado junto al oncogén *ev1*, al cual había activado mediante las secuencias promotoras presentes en el vector. De manera análoga, en el estudio clínico francés se observó que una gran proporción de las inserciones del vector terapéutico tuvieron lugar en regiones próximas a – o dentro de – genes de las células diana. De hecho, se observó que en dos de estos pacientes, la inserción del vector terapéutico ocurrió junto al oncogén *LMO2*, implicado en leucemias linfocíticas (64).

Estudios posteriores han evidenciado que los vectores gama-retrovirales se insertan preferentemente junto a, o dentro de genes que se están transcribiendo activamente en el momento de la transducción (65). Es más, de manera absolutamente impredecible, se ha observado que estos vectores se insertan preferentemente en regiones próximas al inicio de la transcripción, facilitando con ello la trans-activación de los genes proximos. Con objeto de minimizar el riesgo de trans-activar oncogenes por la inserción de vectores terapéuticos, se están desarro-

lizando vectores de mayor seguridad. Así, a diferencia de lo que ocurre con los vectores gama-retrovirales, los vectores lentivirales no muestran una preferencia tan grande por integrarse junto al inicio de la transcripción del gen (66). La introducción de promotores menos potentes a los promotores virales constituye también otra alternativa que está comenzando a utilizarse por una gran parte de investigadores.

En todo caso, los riesgos asociados a la terapia génica han de ser correctamente ponderados, por una parte para minimizar en lo posible el riesgo asociado a su uso, pero también para no impedir su aplicación a pacientes que no tienen alternativas terapéuticas de beneficio comparable. En este sentido no podemos olvidar que para pacientes con enfermedades monogénicas que no tienen donante familiar HLA idéntico, el riesgo de muerte asociado a un trasplante a partir de donante alternativo puede ser próximo al 30%. A los seis años de haberse iniciado la terapia de los pacientes SCID-X1, 3 de 14 pacientes han desarrollado una leucemia linfocítica, que en dos casos ha entrado en remisión, y en un caso ha sido fatal.

Es evidente que como también sucedió con la quimioterapia y la radioterapia, los primeros efectos severos adversos asociados a la terapia génica también han quedado ya de manifiesto. En los próximos años los investigadores tendremos que ser capaces de demostrar si la relación entre el beneficio clínico y el riesgo asociado a la terapia génica es positiva para el paciente. De ser así, una nueva era de la farmacoterapia será realidad en muchos hospitales, para la cual todos habremos de estar convenientemente preparados.

13. LEGISLACIÓN RELATIVA A TERAPIAS AVANZADAS CON MEDICAMENTOS CELULARES Y GÉNICOS.

La regulación relativa al uso de células y genes como medicamentos es compleja, pues hasta hace pocos años no estaba recogida de manera específica en la normativa española, ni tampoco en la europea. Más recientemente ha ido apareciendo una regulación más específica, que recoge aspectos particulares de las diferentes etapas de preparación y uso de medicamentos de naturaleza celular y génica. A continuación se recogen las Directivas europeas más relevantes al respecto, así como algunas de las transposiciones nacionales que se han venido realizando:

Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de fecha: 6 de noviembre de 2001: En esta directiva se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.

Directiva 2003/63/CE de la Comisión, de fecha: 25 de junio de 2003: Esta Directiva modifica la anterior (2001/83/CE). En ella se realiza una adaptación de los requisitos científicos y técnicos del anexo I de la Directiva 2001/83/CE. Se regulan de manera explícita por primera vez los medicamentos de terapia avanzada basados en medicamentos de terapia génica y medicamentos de terapia celular somática.

Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de fecha: 31 de marzo de 2004: Se establecen normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la fabricación, el procesamiento, la

preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.

Directiva 2005/28/CE de la Comisión, de fecha: 8 de abril de 2005: Tiene por objeto establecer los principios y las directrices de las buenas prácticas clínicas respecto a medicamentos en investigación de uso humano, así como los requisitos para autorizar la fabricación o importación de dichos productos.

Directiva 2006/178/CE de la Comisión, de fecha: 8 de febrero de 2006: Se aplica la Directiva 2004/23/CE en lo relativo a determinados requisitos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.

La mayor parte de las diferentes Directivas Europeas se han ido trasponiendo a la legislación nacional. De entre las diferentes normas legales nacionales destacan las siguientes:

Ley 25/1990, de 20 de diciembre: Ley del Medicamento dirigida a contribuir el desarrollo de medicamentos seguros, eficaces, de calidad, correctamente identificados y con información apropiada.

Real Decreto 411/1996, de 1 de marzo. Este Real Decreto tiene por objeto la regulación de las actividades relativas a la utilización clínica de tejidos.

Real Decreto 223/2004, de 1 de marzo. El Real Decreto tiene por objeto la regulación de los ensayos clínicos con medicamentos. Por tanto, en la actualidad, los medicamentos de terapia avanzada basados en productos de terapia génica y terapia celular somática deben acogerse a esta normativa.

La consideración de medicamento a todos los productos celulares que conllevan una manipulación *ex vivo* diferente a lo que es una simple purificación, o enriquecimiento de determinadas poblaciones celulares (inmunoselección de células CD34+, o depleción de células T) se realizó con objeto de garantizar la seguridad de aquellos pacientes que iban a ser tratados mediante nuevas terapias avanzadas. En la práctica, la complejidad y coste que supone el cumplimiento de la normativa actual ha supuesto la finalización de numerosos ensayos clínicos de terapia celular. En virtud de ello, y para facilitar el desarrollo seguro de las terapias celulares avanzadas, se está preparando una nueva Directi-

va Europea sobre ingeniería tisular y terapias avanzadas. Confiamos que esta Directiva sea aprobada en breve plazo para facilitar el desarrollo seguro y eficaz nuevas terapias celulares y génicas en la Unión Europea.

14. EPÍLOGO.

Han transcurrido 50 años desde que Stroud y colaboradores observaron la presencia de unos nódulos en el bazo de ratones irradiados, cuya presencia predecía la supervivencia de los animales al daño producido por la irradiación. Tomando como punto de partida las observaciones de estos investigadores, pocos años después, James Till y Ernest McCulloch desarrollaron el primer ensayo que permitía analizar la presencia de células madre hematopoyéticas en la médula ósea del ratón. Este ensayo permitió el desarrollo de todos los ensayos posteriores dirigidos a la identificación de los diferentes tipos de células madre. Por ello, y en virtud de la relevancia de estas observaciones, la Fundación Lasker galardonó el año pasado a ambos investigadores con el premio Albert Lasker de investigación médica básica.

Gracias a los trabajos de investigación básica de estos geniales investigadores, se pensó en la posibilidad de utilizar células madre hematopoyéticas para el tratamiento del síndrome de irradiación, y también de las leucemias. En este caso, la labor desarrollada por el investigador clínico Donald Thomas, fue reconocida mundialmente al otorgar a éste el premio novel de medicina en el año 1990. Gracias a este investigador y a muchos otros que le han sucedido, el trasplante de progenitores hematopoyéticos se considera el paradigma de la terapia celular. Para mejorar la eficacia de los protocolos de trasplante hematopoyético hemos aprendido a manipular *in vitro* los inóculos a trasplantar. Tanto es así, que la mayor parte de las unidades de trasplante viene realizando purificaciones o depleciones de determinadas poblaciones para optimizar el resultado del trasplante. En función de la con-

veniencia, los progenitores se pueden movilizar desde la médula ósea hacia la sangre periférica, para mayor eficacia y seguridad del protocolo. La posibilidad de conocer la biología y funcionalidad de los progenitores hematopoyéticos mediante modelos experimentales permitió, también, predecir la relevancia de las células de sangre de cordón umbilical en el campo del trasplante. Así, en virtud de la gran capacidad proliferativa de las células madre de cordón umbilical, se han creado numerosos bancos al servicio inmediato de pacientes con enfermedades hematológicas.

Todas las aplicaciones de terapia celular mencionadas hasta aquí constituyen realidades clínicas incuestionables, que ciertamente han servido para salvar la vida a miles de enfermos. Ahora bien, en estos últimos años se han encontrado nuevas evidencias sobre las propiedades biológicas de las células madre, así como nuevas aplicaciones que aún se encuentran en estado incipiente de desarrollo. En el caso de las células madre hematopoyéticas, se ha comprobado cómo estas células constituyen una muy buena diana de vectores que portan genes terapéuticos. De hecho, la terapia génica sobre células madre está empezando a ofrecer resultados clínicos de eficacia evidente. Por otra parte, las observaciones que muestran que las células madre hematopoyéticas pueden contribuir a la formación de células de otros tejidos ha constituido una revolución, pues como consecuencia de ello se comenzó a pensar en la posibilidad de regenerar tejidos a partir de las células madre hematopoyéticas. Otros tipos de células madre, como las células madre mesenquimales, queratinocitos, células del cuerpo carotídeo, etc. están también comenzando a mostrar beneficios terapéuticos claros, tanto en modelos experimentales como en los primeros ensayos clínicos.

En el discurso que aquí presento, he pretendido dejar constancia que nos encontramos en un momento extraordinariamente interesante de la biomedicina, en el cual estamos definiendo por primera vez la eficacia, la seguridad, y consecuentemente la conveniencia, de aplicar nuevas terapias celulares y génicas avanzadas al tratamiento de enfermedades humanas. Como en muchos otros campos de la farmacia y la medicina, una gran parte de la eficacia terapéutica de estos nuevos medicamentos está todavía por demostrar. En mi opinión, en los próximos años vamos a ser testigos, o tal vez protagonistas, de la potencia terapéutica de una nueva generación de medicamentos de naturaleza

celular y génica, cuya aplicación se irá haciendo progresivamente más definida. Es tarea de todos los que participamos en esta interesante carrera, que el trabajo se realice con la responsabilidad que la sociedad y los enfermos esperan de nosotros.

15. REFERENCIAS.

1. Stroud, A. N., Chaterley, D. M., Summers, M. M., and Brues, A. M. Regeneration and recovery of the spleen and thymus after single doses of X irradiation. Report of the Argonne National Laboratory., 15: 5456-5460, 1955.
2. Barnes, D. W. H., Ford, C. E., Gray, S. M., and Louit, J. F. Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice". Progress in Nuclear Energy, series VI, 2. Pergamon Press, London, p 1., 1959.
3. Till, J. and McCulloch, E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res., 14: 1419-1430, 1961.
4. Pluznik, D. H. and Sachs, L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. J Cell Physiol, 66: 319-324., 1965.
5. Metcalf, D., Moore, M. A., and Warner, N. L. Colony formation *in vitro* by myelomonocytic leukemic cells. J.Natl.Cancer Inst., 43: 983-1001, 1969.
6. Dick, J. E., Magli, M. C., Huszar, D., Phillips, R. A., and Bernstein, A. Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. Cell, 42: 71-79., 1985.
7. Lajtha, L. G. Haemopoietic stem cells: concept and definitions. Blood Cells, 5: 447-455, 1979.
8. Thomas, E. D. The evolution of scientific evolution of marrow transplantation based on human studies. Bone Marrow Transplantation. Blackwell Scientific Publications, Boston. Forman SSJ, Blume KG, Thomas ED (eds). 12-15, 1994.
9. Fernandez-Delgado, R., Besalduch, J., Momparler, P., Balaguer, H., Garcia-Mora, R., Jubert, A., Donat, J., and Colomer, J. [Granulocyte-macrophage precursor cells in umbilical cord blood]. An Esp Pediatr, 24: 221-226, 1986.
10. Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Army, M., Thomas, L., and Boyse, E. A. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 3828, 1989.
11. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., and et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med, 321: 1174-1178., 1989.
12. Guardiola, P., Pasquini, R., Dokal, I., Ortega, J. J., van Weel-Sipman, M., Marsh, J. C., Ball, S. E., Locatelli, F., Vermylen, C., Skinner, R., Ljungman, P., Miniero, R., Shaw, P. J., Souillet, G., Michallet, M., Bekassy, A. N., Krivan, G., Di Bartolomeo, P., Heilmann, C., Zanesco, L., Cahn, J. Y., Arcese, W., Bacigalupo, A., and Gluckman, E. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Blood, 95: 422-429., 2000.
13. Serrano, F., Varas, F., Bernad, A., and Bueren, J. A. Accelerated and long-term hematopoietic engraftment in mice transplanted with ex vivo expanded bone marrow. Bone Marrow Transplantation, 14: 855-862, 1994.
14. Albella, B., Segovia, J. C., and Bueren, J. A. Does the granulocyte-macrophage colony-forming unit content in ex vivo-expanded grafts predict the recovery of the recipient leukocytes? Blood, 90: 464-470, 1997.
15. Albella, B., Segovia, J. C., Guenechea, G., and Bueren, J. A. The role of ex vivo expansion in the hematopoietic transplantation of myeloablated recipients. World Scientific, 16: 1-4, 1998.
16. Albella, B., Segovia, J. C., Guenechea, G., Pragnell, I. B., and Bueren, J. A. Preserved long-term repopulation and differentiation properties of hematopoietic grafts subjected to ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin 11. Transplantation, 67: 1348-1357., 1999.

17. Guenechea, G., Segovia, J. C., Albella, B., Lamana, M., Ramirez, M., Regidor, C., Fernandez, M. N., and Bueren, J. A. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood*, 93: 1097-1105., 1999.
18. Fernandez, M. N., Granena, A., Millan, I., Regidor, C., Cabrera, R., Querol, S., and Garcia, J. Evaluation of engraftment of ex vivo expanded cord blood cells in humans. *Bone Marrow Transplant*, 25 Suppl 2: S61-67, 2000.
19. Ramirez, M., Segovia, J. C., Benet, I., Arbona, C., Guenechea, G., Blaya, C., Garcia-Conde, J., Bueren, J. A., and Prosper, F. Ex vivo expansion of umbilical cord blood (UCB) CD34(+) cells alters the expression and function of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Br J Haematol*, 115: 213-221, 2001.
20. Fernandez, M. N., Regidor, C., Cabrera, R., Garcia-Marco, J. A., Fores, R., Sanjuan, I., Gayoso, J., Gil, S., Ruiz, E., Little, A. M., McWhinnie, A., and Madrigal, A. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol*, 31: 535-544, 2003.
21. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97: 703-716, 1999.
22. Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100: 157-168., 2000.
23. Torella, D., Ellison, G. M., Mendez-Ferrer, S., Ibanez, B., and Nadal-Ginard, B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 3 Suppl 1: S8-13, 2006.
24. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273: 242-245., 1996.
25. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377, 2001.
26. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 6: 1229-1234., 2000.
27. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-705., 2001.
28. Quintana-Bustamante, O., Alvarez-Barrientos, A., Kofman, A. V., Fabregat, I., Bueren, J. A., Theise, N. D., and Segovia, J. C. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*, 43: 108-116, 2006.
29. Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422: 897-901, 2003.
30. Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J., and Alvarez-Buylla, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425: 968-973, 2003.
31. Bueren, J. A., Albella, B., Casado, J. A., Grande, T., Guenechea, G., Lamana, M. L., and Segovia, J. C. Progenitores y células madre hematopoyéticas. In: A. G. Brage (ed.), *Tecnologías energéticas e impacto ambiental*, pp. 567-578. Madrid: McGraw Hill/Interamericana de España, S. A. U., 2001.

32. Fernandez-Aviles, F., San Roman, J. A., Garcia-Frade, J., Fernandez, M. E., Penarrubia, M. J., de la Fuente, L., Gomez-Bueno, M., Cantalapiedra, A., Fernandez, J., Gutierrez, O., Sanchez, P. L., Hernandez, C., Sanz, R., Garcia-Sancho, J., and Sanchez, A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*, 95: 742-748, 2004.
33. Gavira, J. J., Herreros, J., Perez, A., Garcia-Velloso, M. J., Barba, J., Martin-Herrero, F., Canizo, C., Martin-Arnau, A., Marti-Climent, J. M., Hernandez, M., Lopez-Holgado, N., Gonzalez-Santos, J. M., Martin-Luengo, C., Alegria, E., and Prosper, F. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 131: 799-804 e791, 2006.
34. Ripa, R. S., Jorgensen, E., Wang, Y., Thune, J. J., Nilsson, J. C., Sondergaard, L., Johnsen, H. E., Kober, L., Grande, P., and Kastrup, J. Stem Cell Mobilization Induced by Subcutaneous Granulocyte-Colony Stimulating Factor to Improve Cardiac Regeneration After Acute ST-Elevation Myocardial Infarction. Result of the Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) Trial. *Circulation*, 2006.
35. Arjona, V., Minguez-Castellanos, A., Montoro, R. J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J. J., Pardal, R., Mendez-Ferrer, S., Martin, J. M., Perez, M., Katati, M. J., Valencia, E., Garcia, T., and Lopez-Barneo, J. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 53: 321-328; discussion 328-330, 2003.
36. Llames, S., Garcia, E., Garcia, V., Del Rio, M., Larcher, F., Jorcano, J. L., Lopez, E., Holguin, P., Miralles, F., Otero, J., and Meana, A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*, 7: 47-53, 2006.
37. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-274., 1976.
38. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49., 2002.
39. Le Blanc, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 5: 485-489, 2003.
40. Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., and Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 8932-8937, 2002.
41. Le Blanc, K., Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., Norden-Lindeberg, S., Jansson, M., Dalton, A., Astrom, E., and Westgren, M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*, 79: 1607-1614, 2005.
42. Garcia-Olmo, D., Garcia-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., and Rodriguez-Montes, J. A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*, 48: 1416-1423, 2005.
43. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363: 1439-1441, 2004.
44. Yáñez, R., Lamana, M., García-Castro, J., Ramírez, M., and Bueren, J. A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCS) have in vivo immunosuppressive properties that control graft-versus-host disease (GVHD) in a mouse model. In: *ISCT 2006 Annual Meeting*, Berlín, Mayo, 2006 2006.
45. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156, 1981.

46. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147, 1998.
47. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288: 669-672., 2000.
48. Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.-P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., and Cavazzana-Calvo, M. Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. *N Engl J Med*, 346: 1185-1193, 2002.
49. Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M. A., Christensen, H. O., Al Ghonaium, A., White, H. N., Smith, J. L., Levinsky, R. J., Ali, R. R., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*, 364: 2181-2187, 2004.
50. Bordignon, C., Notarangelo, L. D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, A. G., and Mavilio, F. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science*, 270: 470-475, 1995.
51. Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., Nolte, J. A., Crooks, G., Kapoor, N., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Madsen, E., Snyder, F. F., Bastian, J., Muul, L., Blaese, R. M., Weinberg, K., and Parkman, R. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA- deficient SCID neonates. *Nat. Med.*, 4: 775-780, 1998.
52. Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G., and Bordignon, C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with. *Science*, 296: 2410-2413., 2002.
53. Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A. J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R., and Grez, M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*, 2006.
54. Ayala, G., Satoh, T., Li, R., Shalev, M., Gdor, Y., Aguilar-Cordova, E., Frolov, A., Wheeler, T. M., Miles, B. J., Rauen, K., Teh, B. S., Butler, E. B., Thompson, T. C., and Kadmon, D. Biological Response Determinants in HSV-tk + Ganciclovir Gene Therapy for Prostate Cancer. *Mol Ther*, 2006.
55. Roth, J. A. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 55-61, 2006.
56. Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J. R., and Alemany, R. Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther*, 2006.
57. Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 276: 1719-1724, 1997.
58. Bonini, C., Grez, M., Traversari, C., Ciceri, F., Marktel, S., Ferrari, G., Dinuer, M., Sadat, M., Aiuti, A., Deola, S., Radrizzani, M., Hagenbeek, A., Apperley, J., Ebeling, S., Martens, A., Kolb, H. J., Weber, M., Lotti, F., Grande, A., Weissinger, E., Bueren, J. A., Lamana, M.,

- Falkenburg, J. H. F., Heemskerk, M. H. M., Austin, T., Kornblau, S., Marini, F., Benati, C., Magnani, Z., Cazzaniga, S., Toma, S., Gallo-Stampino, C., Introna, M., Slavin, S., Greenberg, P. D., Bregni, M., Mavilio, F., and Bordignon, C. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med*, 9: 367-369., 2003.
59. Lamana, M. L., Segovia, J. C., Guenechea, G., and Bueren, J. A. Systematic analysis of clinically applicable conditions leading to a high efficiency of transduction and transgene expression in human T cells. *J Gene Med*, 3: 32-41., 2001.
60. Lamana, M., Bueren, J. A., Vicario, J. L., and Balas, A. Functional and phenotypic variations in human T cells subjected to retroviral mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 11: 474-482, 2004.
61. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348: 255-256, 2003.
62. Marshall, E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science*, 299: 320, 2003.
63. Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kuhlcke, K., Eckert, H. G., Fehse, B., and Baum, C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, 296: 497., 2002.
64. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302: 415-419, 2003.
65. Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science*, 300: 1749-1751, 2003.
66. Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local. *Cell*, 110: 521-529., 2002.

