

REFERATE GENERALE

TERAPIA GENICĂ ÎN PATOLOGIA UMANĂ

Livia Chiorean

Disciplina de genetică
Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș

Terapia genică este o nouă metodologie terapeutică în studiu, rezultată din posibilitățile aproape nelimitate de clonare a genelor sănătoase funcțional normale, în celulele somatice, germinale, embrioni, sau în stadii incipiente de dezvoltare. Aceste celule vor fi transferate în organismul indivizilor care au moștenit o copie anormală a aceleiași gene (1, 2, 3, 8, 9, 13, 17, 18).

Posibilitatea tratării bolilor umane și a celor mai importante tulburări genetice fundamentale, a fost de mult timp visul clinicienilor. Existența a peste 4000 de boli genetice distincte, multe debilitante sau mortale, majoritatea incurabile prin metode terapeutice obișnuite, justifică îndreptățite speranțe în aplicarea terapiei genice (22).

Aplicarea terapiei genice este justificată în următoarele condiții când:

1. Se poate demonstra că riscurile aplicării sale sunt mici;
2. Față de alte mijloace terapeutice, terapia genică este mai valoroasă;
3. Pacienții nu pot beneficia de alte alternative terapeutice.

Inițial cercetările au urmărit obținerea unor metode de tratament prin reinserție genică normală, interesând diferite celule somatice, dar foarte recent s-au utilizat și celulele seriei germinale (5, 11, 12).

Inserția genică în celulele germinale

O preocupare foarte actuală a terapiei genice o constituie selecționarea și modificarea prin reinserție genică a liniilor de celule germinale. Opiniile europene în acest sens sunt fie pesimiste, justificate de pericolele alunecării spre practicile eugenice, fie optimiste, bazate pe avantajele reale terapeutice care domină considerentele de ordin etic.

Se apreciază chiar că obligația normală a profesiei medicale, este aceea de a face utilizabile și publice unele tehnologii, capabile de a trata sau preveni mutații, cauzatoare de variate îmbolnăviri sau moarte, atât pentru generațiile prezente cât și cele viitoare (8, 24).

Deoarece metodele de screening prenatal sau embrionar precoce nu pot preveni decât o mică parte din tulburările genetice cunoscute, intervenția genetică directă asupra celulei ou este unica posibilitate pentru exercitarea drepturilor legale reproductive ale unor cupluri conjugale stigmatizate genetic (heterozigoți) (24).

O premieră genetică mondială (aprilie 1993) s-a înregistrat în cazul fibrozei chistice a pancreasului (mucoviscidoza). Astfel, după aplicarea tehnologiei de fertilizare in vitro a gameților de analiză computerizată a ADN-ului uneia din blastomere, dublată de transferul intrauterin al blastomerei gemene normale, s-a putut naște o fetiță normală într-o familie de heterozigoți pentru această mutație și cu primul copil bolnav de mucoviscidoză (11).

Această tehnologie anglo-americană a putut fi aplicată și în cazul altor boli determinate monogenic, la care produsul de sinteză al genei normale este cunoscut (hemofilie și unele miopatii) (11).

Ca urmare a acestui succes, în cazul mucoviscidozei, beneficiem deja de un program de diagnostic în faza de preimplantare pentru embrionii umani fecundați in vitro.

Insertia genică în celule somatice

Utilizarea în scop terapeutic a celulelor somatice manipulate genetic, poate avea efecte deosebite în caz de deficit și deficiențe proteice determinate monogenic, pentru gene care au fost deja și clonate, având șanse mari de terapie genică, față de bolile determinate poligenic. De asemenea ele pot fi aplicate în monosomii (pierderea unui cromozom întreg) sau trisomii (prezența unui cromozom suplimentar).

Condițiile pentru o terapie ideală au fost enunțate în 1990 de Verma (14), ele fiind următoarele:

- să asigure o vindecare pe viață a bolii;
- inserția genei să nu prezinte efecte secundare;
- gena să poată fi inserată în locusul său normal (recombinare omologă) în celulele gazdei;
- gena sănătoasă să substituie specific copia genei anormale;
- gena inserată să nu activeze oncogene latente sau să inactiveze o antioncogenă activă;
- cunoașterea bolilor care se pretează la terapie genică;
- cunoașterea posibilităților de control corespunzător a expresiei genei transferate.

Tehnicile de bază mai utilizate în transferul de gene normale în celulele somatice ale pacienților sunt: microinjecția de ADN normal purificat direct în celule; transfecția, preluarea de către celule în timpul cultivării a ADN-ului normal administrat; fuziunea protoplastelor bacteriene sau liposomilor conținând ADN cu membrana plasmatică a celulelor țintă;

- electroporația, o metodă prin care un șoc electric punctic face permeabilă membrana celulelor țintă pentru ADN-ul extracelular liber administrat;

- introducerea unor "vectori retrovirali" manipulați genetic, în celulele infectate, care convertesc ARN-ul lor în ADN, integrându-l într-un cromozom. Utilizarea cu preponderență a vectorilor virali, pentru introducerea de gene normale în ADN-ul celulelor afectate, a permis constatarea că numai anumite celule "țintă" pot fi utilizate în transferul genic, ele trebuind a fi: suficient de rezistente pentru a suporta manipularea; să poată fi ușor recoltate din corp și reintroduse; să aibă o durată lungă de viață, luni, ani sau toată viața.

Celule țintă

Cele mai utilizate celule și țesuturi, apte pentru a fi manipulate genetic prin transfer genic sunt:

A. Celule medulare

1. *Culturi de celule stem*, optimizate ca număr, corectate genetic prin inserția genei normale, asociate concomitent cu administrarea unor factori de creștere celulară ca interleukina 1, 3, 6 și factorul de creștere a coloniilor de macrofage pentru stimularea proliferării acestor celule la receptori (12).

2. *Culturi de celule medulare* cu reinsertia de gene normale, eficiente atât în transferul genetic normal, cât și în exprimarea genelor transferate în aceste celule (12, 18, 19).

3. *Transfer genic în culturi de limfocite T*, autologe corectate prin reinsertie genică, pentru diferite gene normale umane readministrate bolnavilor în injecții lunare. Recent National Institute of Health (NIH), a aprobat aplicarea clinică curentă a acestei metode, în tratamentul cancerului și al unor imunodeficiențe ale enzimei adenzin-deaminaza, reprezentând începutul unei noi ere în medicina moleculară (6, 22).

În cazul adenzin-deaminazei (ADA), după reinjectarea celulelor la bolnavi, gena normală ADA a fost capabilă a exprima enzima normală restaurând potențial funcția imună (5).

Sindromul SCID (imunodeficiența combinată severă), are următoarele caracteristici principale:

- deficitul ADA este cauza a 1/4 din cazurile SCID,
- nu se deosebește clinic de alte cauze SCID,
- din copilărie apar frecvente infecții oportuniste,
- se moștenește autozomal recesiv,
- are o frecvență rară de 1/100 000 nașteri,
- netratat are o evoluție fatală în primul an de viață,
- acumularea metaboliților deoxiadenosinei, în special dATP, conferă o toxicitate selectivă pentru limfocite.

Pe lângă tratamentul SCID (3) celulele medulare au făcut posibilă corectarea și tratarea talasemiei (prin inserția genelor pentru alfa și beta globină normală) (2, 21).

4. *Transplant de măduvă osoasă alogenă, de la un donor HLA compatibil* (19). A fost eficace în 60% din defectele congenitale imune, ca tratament precoce în osteopetroză, teaurizmoze congenitale mucopolizaharidoza Hurler sau Gaucher.

5. *Transplant de măduvă osoasă sărăcită în celulele T de la unul din părinți, haploidentică* (19).

B. *Culturi de celule somatice nehematopoietice (fibroblaști, celule endoteliale, cheratinocite etc.)*, corectate prin reinserție genică, obișnuit folosite în terapia de suplimentare, atât în tulburări ereditare, cât și în variate alte boli (infecțioase și cancerul).

1. *Implante de celule epiteliale*

Scopul acestor implante de celule epiteliale manipulate genetic este de a asigura sinteza și secreția unor proteine, produse normal în anumite celule și deversate în plasma sangvină, care să poată fi utilizate și de alte tipuri celulare.

Posibilitățile de tratament în acest caz includ: hemofilia, boli prin deficit hormonal, STH, boli prin deficit proteic.

2. *Implante de fibroblaste*

Sunt celule preferate, accesibile, rezistente, capabile de cultivare și de manipulare genică prin vectori virali, pot secreta substanțe în sânge, ar putea fi ușor de înlăturat la nevoie, posedă un mare potențial terapeutic.

Au fost create fibroblaste manipulate genetic pentru factorul VIII și IX a coagulării (deși normal nu-l produc), pentru a sintetiza proteine diferite ca STH, NGF-factorul de creștere a nervilor, levodopa.

Verificarea experimentală a eficacității terapeutice in vivo pe șoareci și șobolani a demonstrat următoarele posibilități:

a) Gena umană pentru factorul VIII a fost inserată în ADN-ul celulelor ovariene de hamster în cultură. Globulina antihemofilică astfel sintetizată se aplică în tratamentul hemofiliei, din anul 1987, produsul fiind perfect tolerat de pacienți fără efecte secundare, sau risc de contaminare virală.

b) În cazul factorului IX uman al coagulării a fost realizată injectarea la șoareci a vectorului viral cu inserția genei pentru factorul IX uman. S-a evidențiat sinteza acestuia timp de 15 zile, șoarecii reacționând imun împotriva proteinei străine umane.

Au fost deja verificate în modele experimentale animale următoarele implante:

1. *Implante intracerebrale de fibroblaste manipulate genetic cu scopul de a corecta afectarea neuronilor*, permite depășirea barierei hematoencefalice pentru producții genelor inserate (clonate); permite

programarea fibroblastelor pentru diferite proteine care să difuzeze în celulele nervoase.

2. *Implante de fibroblaste manipulate genetic pentru a secreta factorul de creștere a nervilor (NGF).* Au stimulat creșterea neuronilor la șobolan, iar la om regenerarea neuronilor al căror deficit se asociază cu pierderea memoriei în boala Alzheimer (deși rolul NGF în determinismul bolii nu a fost evidențiat).

3. *Implante de fibroblaste programate pentru sinteza de Levodopa*

Au fost verificate în modele animale create pentru boala Parkinson, a cărei cauză nu este precis cunoscută.

4. *Celule hepatice manipulate genetic*

Au fost create în vederea unei terapii genice în hepatopatiile prin deficit, hipercolesterolemie familială sau cu deficit de receptori LDL, fiind verificate experimental la iepuri.

Hepatocite recoltate de la iepurii din linia Watanabe, o linie cu deficit genetic de receptori LDL (low density lipoprotein), după inserarea genei normale în ADN-ul celular, celulele au sintetizat un receptor LDL biologic activ. Acest model extrapolat la om ar permite utilizarea sa în cazuri de hipercolesterolemie familială sau cu deficit de receptor LDL.

Injectarea directă a iepurilor Watanabe cu gene pentru receptori LDL, a permis detectarea tranzitorie în corpul lor a acestor proteine.

5. *Implante de celule endoteliale umane manipulate genetic prin vectori retrovirali*

Aceste celule manipulate genetic, pot insera gene pentru producția de secreție în celulele endotelului care mărginește vasele sangvine, eliberând mai repede producția, oferind un contact mai intim cu sângele decât fibroblastele.

6. *Mușchii*

Terapia degenerescenței musculare Duchenne, beneficiază de rezultatele cercetărilor de inginerie genetică (16).

S-a demonstrat că copiii suferinzi de această boală le lipsește o proteină numită distrofina. Gena care codifică această proteină este prea mare pentru a putea fi inserată într-un vector retroviral. Severitatea simptomelor poate fi mult ameliorată prin înlocuirea doar a unei jumătăți a genei absente sau anormale. Verificarea eficienței terapeutice s-a făcut la șoareci cu distrofie musculară prin injectarea intramusculară directă de ADN normal crud sau numai a genei normale pentru sinteza distrofinei. Administrarea a dus la ameliorarea simptomatologiei cu sinteza produsului timp de câteva luni. În mod similar, alte gene injectate direct în mușchii unor animale de experiență au dus la o creștere a cantității proteinelor codificate de acestea timp de câteva luni, chiar dacă ADN-ul injectat nu s-a integrat în cromozomi.

În prezent se fac cercetări pentru găsirea unui vehicul potrivit, care prin administrarea in vivo sau in vitro în culturi de celule deficitare să insereze gena în ADN-ul propriu, celulele urmând a fi reinjectate bolnavului în țesutul țintă (16).

7. Plămânul

Se preconizează în cazul tratamentului fibrozei chistice a pancreasului, inhalarea de spray sau aerosoli conținând vectori retrovirali, cu gene normale umane inserate.

Terapia genică anticanceroasă

Orice celulă modificată genetic în sens malign, v-a prezenta una din următoarele modificări care interesează:

- factorii de creștere celulară sau receptorii pentru factorii de creștere și diferențiere celulară;
- căile lor pentru transducerea semnalelor nucleare și citoplasmatice;
- creșterea rezistenței la factorii citotoxici;
- alterarea comunicării intercelulare între celulele învecinate (4, 7, 10).

În măsura descifrării mecanismelor genice și biochimice de cancerizare, scopul terapiei genice în afecțiunile maligne urmărește:

- identificarea indivizilor cu antioncogene defective moștenite sau câștigate (gene supresoare ale tumorilor);
- identificarea modificărilor precursorale ale cancerizării;
- caracterizarea gradului de progresie a unei tumori nediagnosticsabile;
- formarea de anticorpi antimembranari ai celulelor tumorale;
- sinteza de substanțe imune variate, care să transporte citotoxine sau izotopi radioactivi în anumite populații celulare;
- folosirea semnalelor celulare pentru a modifica proliferarea tumorală (15).

Strategiile genetice ale supresiei tumorale prin terapie genică se bazează pe următoarele considerente:

- clonarea și caracterizarea genelor supresoare ale tumorilor, descoperite până acum;
- constatarea prezenței aceleiași gene supresoare (antioncogenă) sau oncogenă în mai multe tipuri tumorale;
- prezența în aceeași tumoare a mai multor tipuri de oncogene sau antioncogene;
- tipuri de gene supresoare și oncogene, caracteristic alterate în tipuri tumorale specifice;
- observarea că antioncogenele au ca funcție controlul activității celulelor normale în special proliferarea, diferențierea și senescența;
- identificarea genelor implicate în învingerea senescenței (ele duc la imortalitate având un potențial de proliferare nelimitat);

- utilizarea vectorilor retrovirali în scopuri terapeutice prin terapie genică.

Vectorii retrovirali după *Sincovics* (20) posedă următoarele avantaje:

1. rup și transduc oncogene celulare;

2. pot introduce în ADN-ul celulelor maligne antioncogene (gena Rb), pentru a le transforma în celule revertante normale urmând a fi reinjectate intratumoral după cultivarea lor in vitro;

3. virusurile oncolitice lizează celulele tumorale.

Parvovirusurile se replică numai în celulele în curs de diviziune pe care le lizează, exercitând astfel un efect selectiv antitumoral, fără a afecta celulele normale aflate în repaus mitotic.

- infecția cu mixovirusuri și paramixovirusuri asigură creșterea capacității de răspuns a antigenelor de suprafață celulară și stimularea capacității de apărare a gazdei, acționând și asupra altor celule de același tip, neinfectate cu virus, fiind denumită *imunitate antitumorală postoncolitică*.

4. Virusurile, celulele infectate viral și celulele tumorale, induc sinteza de limfokine, citochine și a factorului de necroză a tumorilor (TNF), care activează celulele NK (natural killer) și T (celulele T citotoxice), împotriva celulelor infectate viral și a celulelor tumorale.

5. Virusul rujeolei poate activa direct sau indirect celulele supresoare, cauzând remisia limfopatiilor și hematopatiilor maligne. Activarea directă are loc prin infectarea celulelor de limfom cu virusul rujeolei, iar activarea indirectă se realizează prin inducerea mediatorilor moleculari ai celulelor mononucleare supresoare, față de proliferarea celulelor tumorale în limfo- și hematopatiile maligne, cauzând remisiunea lor.

6. Vectorii retrovirali pot introduce în celulele tumorale antioncogene (gene supresoare tumorale normale) sau alte gene virale (herpes) ce codifică noi antigene de suprafață sau proteine specifice normale, crescând astfel antigenitatea celulelor tumorale, care devin mai vulnerabile în reacția de rejecție a gazdei împotriva tumorii. Vectorii ca retrovirusurile au următoarele avantaje:

a) În celulele infectate, retrovirusurile convertesc ARN-ul propriu în ADN, integrându-l într-un cromozom (dar numai în celulele care se divid).

b) Pot include mai mult material genetic străin pentru vehiculare decât virusurile ADN.

c) Pot infecta o gamă largă de specii și tipuri celulare.

d) Retrovirusul modificat în vector retroviral nu conține genele proprii pentru sinteza proteinelor virale și ca urmare el nu se va reproduce în organism, decât gena străină inclusă în genomul său.

e) În transferul genic se utilizează numai anumite "celule țintă" suficient de rezistente pentru a suporta manipularea genică (celule medulare, limfocite, fibroblaste etc.). Celulele țintă trebuie să poată fi recoltate ușor de la pacienți și reintroduse în organism cu ușurință: să aibă o durată de viață

În prezent se fac cercetări pentru găsirea unui vehicul potrivit, care prin administrarea in vivo sau in vitro în culturi de celule deficitare să **insezeze** gena în ADN-ul propriu, celulele urmând a fi reinjectate bolnavului în **tesutul țintă** (16).

7. Plămânul

Se preconizează în cazul tratamentului fibrozei chistice a pancreasului, inhalarea de spray sau aerosoli conținând vectori retrovirali, cu gene normale umane inserate.

Terapia genică anticanceroasă

Orice celulă modificată genetic în sens malign, v-a prezenta una din următoarele modificări care interesează:

- factorii de creștere celulară sau receptori pentru factorii de creștere și diferențiere celulară;

- căile lor pentru transducerea semnalelor nucleare și citoplasmatic;

- creșterea rezistenței la factorii citotoxici;

- alterarea comunicării intercelulare între celulele învecinate (4, 7, 10).

În măsura descifrării mecanismelor genice și biochimice de cancerizare, scopul terapiei genice în afecțiunile maligne urmărește:

- identificarea indivizilor cu antioncogene defecte moștenite sau câștigate (gene supresoare ale tumorilor);

- identificarea modificărilor precursorale ale cancerizării;

- caracterizarea gradului de progresie a unei tumori nedagnosticabile;

- formarea de anticorpi antimembranari ai celulelor tumorale;

- sinteza de substanțe imune variate, care să transporte citotoxine sau izotopi radioactivi în anumite populații celulare;

- folosirea semnalelor celulare pentru a modifica proliferarea tumorală (15).

Strategiile genetice ale supresiei tumorale prin terapie genică se bazează pe următoarele considerente:

- clonarea și caracterizarea genelor supresoare ale tumorilor, descoperite până acum;

- constatarea prezenței aceleiași gene supresoare (antioncogenă) sau oncogenă în mai multe tipuri tumorale;

- prezența în aceeași tumoare a mai multor tipuri de oncogene sau antioncogene;

- tipuri de gene supresoare și oncogene, caracteristic alterate în tipuri tumorale specifice;

- observarea că antioncogenele au ca funcție controlul activității celulelor normale în special proliferarea, diferențierea și senescența;

- identificarea genelor implicate în învingerea senescenței (ele duc la **imortalitate** având un potențial de proliferare nelimitat);

- utilizarea vectorilor retrovirali în scopuri terapeutice prin terapie genică.

Vectorii retrovirali după *Sincovics* (20) posedă următoarele avantaje:

1. rup și transduc oncogene celulare;

2. pot introduce în ADN-ul celulelor maligne antioncogene (gena Rb), pentru a le transforma în celule revertante normale urmând a fi reinjectate intratumoral după cultivarea lor in vitro;

3. virusurile oncolitice lizează celulele tumorale.

Parvovirusurile se replică numai în celulele în curs de diviziune pe care le lizează, exercitând astfel un efect selectiv antitumoral, fără a afecta celulele normale aflate în repaus mitotic.

- infecția cu mixovirusuri și paramixovirusuri asigură creșterea capacității de răspuns a antigenelor de suprafață celulară și stimularea capacității de apărare a gazdei, acționând și asupra altor celule de același tip, neinfectate cu virus, fiind denumită *imunitate antitumorală postoncolitică*.

4. Virusurile, celulele infectate viral și celulele tumorale, induc sinteza de limfokine, citochine și a factorului de necroză a tumorilor (TNF), care activează celulele NK (natural killer) și T (celulele T citotoxice), împotriva celulelor infectate viral și a celulelor tumorale.

5. Virusul rujeolei poate activa direct sau indirect celulele supresoare, cauzând remisia limfopatiilor și hematopatiilor maligne. Activarea directă are loc prin infectarea celulelor de limfom cu virusul rujeolei, iar activarea indirectă se realizează prin inducerea mediatorilor moleculari ai celulelor mononucleare supresoare, față de proliferarea celulelor tumorale în limfo- și hematopatiile maligne, cauzând remisiunea lor.

6. Vectorii retrovirali pot introduce în celulele tumorale antioncogene (gene supresoare tumorale normale) sau alte gene virale (herpes) ce codifică noi antigene de suprafață, sau proteine specifice normale, crescând astfel antigenitatea celulelor tumorale, care devin mai vulnerabile în reacția de rejecție a gazdei împotriva tumorii. Vectorii ca retrovirusurile au următoarele avantaje:

a) În celulele infectate, retrovirusurile convertesc ARN-ul propriu în ADN, integrându-l într-un cromozom (dar numai în celulele care se divid).

b) Pot include mai mult material genetic străin pentru vehiculare decât virusurile ADN.

c) Pot infecta o gamă largă de specii și tipuri celulare.

d) Retrovirusul modificat în vector retroviral nu conține genele proprii pentru sinteza proteinelor virale și ca urmare el nu se va reproduce în organism, decât gena străină inclusă în genomul său.

e) În transferul genic se utilizează numai anumite "celule țintă" suficient de rezistente pentru a suporta manipularea genică (celule medulare, limfocite, fibroblaste etc.). Celulele țintă trebuie să poată fi recoltate ușor de la pacienți și reintroduse în organism cu ușurință: să aibă o durată de viață

lungă (luni sau ani); în celule expresia genei terapeutice inserate în vector să imite exact pe aceea a genei normale.

Metode de terapie genică anticanceroasă

1. Metoda TIL (limfocite T care infiltrază tumorile).

A fost creată și utilizată cu mare succes de *Rozenberg*, în terapia antineoplazică umană. Constă în prelevarea din țesutul tumoral de limfocite T care se cultivă in vitro în prezența interleukinei.

În urma cultivării, limfocitele devin ucigăse numite și celule LAK (limphokine activated killers). Reinjectarea intratumorală a acestor limfocite a dus la dispariția tumorilor și metastazelor la zeci de pacienți.

2. *Transfecția* (preluarea directă de gene normale sau de mici fragmente de ADN normal) in vivo sau in vitro urmată de reinjectarea celulelor.

Această tehnică terapeutică a fost verificată în culturi de celule tumorale din retinoblastom, transfectate cu gena Rb normală sau cu celule dintr-o tumoră mamară sau prostatică, transfectate cu ADN normal.

Reinjectarea celulelor transfectate la bolnavi a prevenit dezvoltarea tumorilor primare, prin apariția fenomenului de revertanță (transformarea celei cancerose în celulă normală) (7, 27).

3. *Imunomodularea genetică* prin introducerea în celulele cancerose sau limfocite a genelor pentru citokine, acizi nucleici antisens, ribozimi (molecule circulare mici intronice care funcționează ca gene mobile) sau gene pentru diferiți factori de creștere sau necroză a tumorilor (12).

Inserția factorului de necroză al tumorilor (TNF) în limfocitele LAK extrase din tumori, cultivate în prezența interleukinei este o tehnică terapeutică în lucru, determinând stimularea capacității antitumorale a limfocitelor LAK.

4. *Utilizarea de vectori virali cu afinități tisulare specifice* (herpes, hepatită B) special construiți, pentru replasarea țintită a unor gene.

Virusul herpes modificat a putut insera în ADN-ul celulelor tumorale în cultură o genă care le conferă sensibilitate la distrugerea prin ganciclovir, medicament antiviral. Administrarea de ganciclovir cobailor sau bolnavilor la o săptămână de la reinjectarea intratumorală a celulelor cultivate a determinat regresia tumorilor. Ca urmare National Institute of Health a solicitat autorizarea aplicării metodei la pacienții fără șanse de supraviețuire.

5. Transfer de gene mediat de cromozomi în celulele transfectate

Se realizează izolarea cromozomilor metafazici printr-o tehnică specială, care vor interacționa cu o suspensie de celule tumorale ($2 \cdot 10^6$) cultivate inițial pe un mediu neselectiv, apoi pe un mediu selectiv, permițând proliferarea doar a celulelor transfectante, în care a pătruns cromozomul străin administrat.

În cazul tumorilor renale s-a realizat în cultură replasarea în celule tumorale a unui cromozom 11 normal. Reinjectarea celulelor la bolnavi a

suprimat dezvoltarea tumorii (Stanbridge citat de 7). Cromozomul 11 conține diferite oncogene dintre care amintim: HRAS 1 (sarcom de șobolan tip Harvey 1); TCL2 (leucemie/limfom cu celule T); MEN (neoplazii endocrine multiple); SEA (eritroblastoză aviară S 13); BCL 1 (leucemie cu celule B); ANC (carcinom de canal anal-2); CBL 2 (secvență retrovirală transformantă); antioncogenul ST 3 (genă supresoare a tumorigenității-3) (Mc Kusick. Mendelian Inheritance in Man. Ed. 9-a.1993).

În acest caz, suprimarea dezvoltării tumorale a fost indusă de antioncogenul ST3 normală, existentă pe cromozomul 11, transfectat în celulele tumorale.

6. Metode specifice de imunoterapie

a) Utilizarea terapeutică a anticorpilor monoclonali (25).

Administrarea anticorpilor monoclonali în carcinoame de glandă mamară (antigen pozitiv) împotriva oncogenei neu/Her-2, exercită un efect direct de inhibare a dezvoltării tumorale (25).

b) *Imunoterapia* antitumorală bazată pe manipularea genelor pentru sinteza antigenelor tumorale specifice. Schema cea mai actuală și eficientă de imunoterapie specifică se bazează pe descoperirea că limfocitele T citolitice, izolate de la unii pacienți canceroși pot fi induse a reacționa cu un complex molecular numit antigen E (o moleculă specifică HLA-A1 și o peptidă derivată dintr-o proteină MAGE-1).

MAGE-1 este prezentă la peste 30% din melanoame la peste 15% din tumorile mamare și pulmonare. Metoda nu e aplicată decât la pacienții cu alele HLA-A₁ (26% albi și 17% negri). Se caută variante tehnice pentru aplicarea schemei la pacienții care au moștenit alte tipuri de alele HLA.

Redăm după Boon Thierry (29) schema etapelor de imunizare.

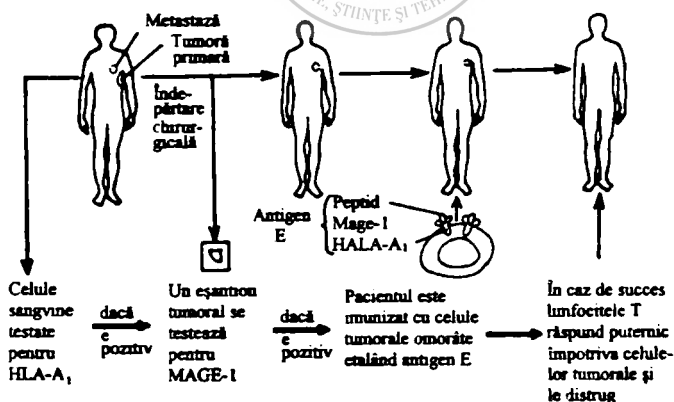


Fig. nr. 1: Terapia genetică a bolii SIDA

O terapie eficace a bolii SIDA este dificil de realizat ținând cont de existența genelor suprapuse în genomul viral. În principiu se urmărește creșterea rezistenței limfocitelor față de atacul virusului HIV (SIDA).

Ipoteza de lucru vizează două obiective și așuri:

- manipularea genică a limfocitelor recoltate de la bolnavii de SIDA, prin inserția în ADN-ul celulelor a unor gene care să împiedice pătrunderea virusului SIDA în celule și diseminarea sa în organism;

- obținerea unor celule de diferite tipuri programate a sintetiza o proteină de înveliș (CD₄) găsită pe limfocitele T, de care se fixează virusul. Se speră că lansarea în circulație a unor celule programate pentru sinteza proteinei CD₄ ar deveni o capcană de fixare a virusului salvând limfocitele T, care și-ar menține capacitatea de apărare antivirală (26).

Bibliografie selectivă

1.Akhurst R.J.: Prospects for gene therapy now and in the future.J. Inherited Metab.Dis. 1989, 12 Suppl. 191-201;

2.Bank A., Markowitz D., Lerner N.: Gene therapy transfer. Apotential aproach to gene therapy for sickle cell disease. Ann N.J., Acad. Sci. 1989, 564, 37-43;

3.Blaese R.M.: Progress toward gene therapy. Clin.Immunol. Immunopathol. 1991, 61, 547-555;

4.Cerruti P.A.: Response modification in carcinogenesis. Environ Health Perspect. 1989, 81, 39-43;

5.Coenetta K., Wieder R., Anderson W.: Gene transfer into primates and prospects for gene therapy in humans. Prog.Nucleic Acid. Res.Mol.Biol. 1989, 36, 311-322;

6.Culver K.W., Anderson W.F., Blaese R.M.: Lymphocyte gene therapy.Hum. gene ther., 1991, 2, 107-109;

7.Darling D., Tarin D.: The spread of cancer in the human body. New Scientist, 1990, 426, 50-53;

8.Fawler G., Juengst E.I., Zimmerman B.K.: Germ line gene therapy and the clinical ethos of medical genetics. Theor.Med. 1989, 10, 151-165;

9.Friedman I.: Progress toward human gene therapy. Science, 1989, 244, 1275-1281;

10.Gutierrez A.A., Lemoine N.R., Sikura K.: Gene therapy for cancer. Lancet, 1992, 339, 715-721;

11.Handyside A.H. et al.: Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. The New Engel.J. of Med. 1992, 327, 905-909;

12.Hosderfer C. et al.: Somatic gene therapy. Hematol. Oncol. Clin. North Am.J. 1991, 5, 423-432;

13. *Hughes P.F. et al.*: High efficiency gene transfer to human hematopoietic cells maintained in long-term marrow culture. *Blood*, 1989, 1/4, 1915-1922;
14. *Inder Verma*: Gene therapy, *Sci. Am.* 1990, 34-41;
15. *Jarbo J.W.*: The new biology of cancer future clinical applications *Semin. Oncol.* 1989, 16, 254-259;
16. *Kingman Sharon*: Gene therapy inches closer. *New Scientist*, 1990, 20 jan.31;
17. *Lim B. et al.*: Long-term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus-infected hematopoietic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1989, 86, 8892-8896;
18. *Mayer M.P.*: Human cells models for genetic engineering. *Med. Prog.Technol.* 1989, 15, 83-100;
19. *Schiason G., Bardigoni P., Leverger G.*: Bone Marrow transplation for genetic and metabolic disorders. *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 1989, 31, 119-123;
20. *Sincovics J.*: Oncogenes-antioncogenes and virus therapy of cancer. *Anticancer Res*, 1989, 9, 1281-1290;
21. *Talbot D. et al.*: A dominant control region from the human betaglobin locus conferring integration site independent gene expression. *Nature*, 1989, 338, 252-355;
22. *Uzama K.*: Recent advances in gene therapy and future prospects *Hum. cell.* 1991, 4, 13-17;
23. *Watts Susan*: Surprise succes for genetic jabs. *New Scientist*, 1990, 1713, 31;
24. *Zimmerman B.K.*: Human germ-line therapy: the case for its development and use. *J.Med. Philos.* 1991, 16, 593-612;
25. *Hellstrom K.E., Hellstrom I.*: Oncogene-associated tumor antigens as targets for immunotherapy. *Faseb J.* 1989, Apr. 3, 1715-1722;
26. *Coghlan A.*: Engineering the therapies of tomorrow. *New. Scientist*, 1993, 1870, 26-36;
27. *Kohn D.B., French W.A., Blaese R.M.*: Gene therapy for Genetic Diseases. *Cancer invest.* 1989, 1, 179-192;
28. *Boon T.*: Teaching the Immune system to fight cancer. *Sci.Amer.* 1993 March, 32-39.

GENE THERAPY IN HUMAN PATHOLOGY

Livia Chiorean

Gene therapy is a new therapeutic methodology under study, resulting from the almost limitless possibilities of cloning healthy, normally functioning genes in the somatic, germinal cells, or embryos or in initial development stages. After inserting the gene in the patient's cells, they will be retransferred in the body of the individuals who inherited an abnormal copy of the same gene. The conditions of

application of gene therapy, as well as the technologies of gene insertion in germinal and somatic cells are specified.

The transfer of normal genes into the somatic genes of patients is achieved through: direct microinjection of normal purified DNA into the cells; transfection (the taking over of normal DNA during cell culturing); the fusion of bacterial protoplasts or DNA containing liposomes (artificial phospholipidic vesicles in bimolecular layer) with the plasmatic membrane of the target-cells; electroporation, the permeation of target-cell membrane by means of a strong electric shock for free extracellular DNA; the use of retroviral vectors, genetically manipulated etc.

This study analyzes different target-cells used for genetic reinsertion in different diseases, cancer therapy included.

Sosit la redacție: 20.06.1994
