

Terapia génica: opción terapéutica para neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas

Gene therapy: a therapeutic option for neoplasias, infections and monogenic diseases

Dr. Brian M. Cavagnari^a

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas, los resultados de varios protocolos de terapia génica llevaron al descreimiento de la comunidad médica. Sin embargo, en años recientes se obtuvieron resultados muy exitosos que la reposicionaron como una opción prometedora para el tratamiento de muchas enfermedades. Frente a este resurgimiento del interés de la comunidad científica internacional en la terapia génica, resulta apropiado que el médico generalista comprenda sus fortalezas y limitaciones. El objetivo de este artículo es comentar la forma en que la terapia génica encara actualmente el tratamiento de patologías tan diversas como neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas.

Palabras clave: *terapia génica, neoplasias, enfermedades monogénicas, infecciones.*

SUMMARY

During the last two decades, the outcome of various gene therapy protocols lead to medical community disbelief. Nevertheless, successful results obtained in recent years, repositioned gene therapy as a promising option for treatment of several diseases. Facing this renaissance of the international scientific community interest on gene therapy, it seems to be necessary for the generalist physician to understand its strength and limitations. The objective of this article is to comment the way gene therapy addresses nowadays the treatment of such different pathologies as neoplasias, infections and monogenic diseases. **Key words:** *gene therapy, neoplasias, monogenic diseases, infections.*

INTRODUCCIÓN

La terapia génica (TG) es una modalidad terapéutica que consiste en transferir nuevo material genético dentro de una célula con el propósito de conseguir un beneficio para el paciente.^{1,2}

Desde la aprobación del primer protocolo de TG en seres humanos³⁻⁵ hasta el presente han pasado menos de 25 años, pero las expectativas depositadas frente al surgimiento de esta nueva opción terapéutica fueron mucho mayores que los resultados obtenidos en los años siguientes. De

hecho, el desarrollo de síndromes mieloproliferativos en niños asignados a protocolos de TG^{6,7} llevó en 2003 a la suspensión de varios de ellos.⁸

Sin embargo, resultados más que alentadores, publicados recientemente en algunas de las revistas más prestigiosas del mundo,⁹⁻¹⁴ han puesto nuevamente sobre el tapete a la TG y llevado a pensar que, finalmente, pueda cumplir con parte de las expectativas depositadas en ella dos décadas atrás.

Ante este resurgimiento del interés de la comunidad científica en la TG se torna razonable que el médico generalista cuente con elementos para comprender sus fortalezas y limitaciones. Por lo tanto, el objetivo de este artículo es compartir la forma que la TG tiene para encarar el tratamiento de diversas patologías (neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas) al día de hoy.

Terapia génica para el tratamiento de defectos monogénicos

Se estima que, en promedio, solo un 15% de los pacientes con trastornos monogénicos tiene una expectativa de vida cercana a la normal. Solo un 11% de ellos tiene una capacidad reproductiva adecuada y apenas el 6% vive una vida absolutamente normal,² por lo que resulta imperioso hallar alguna alternativa terapéutica que mejore la calidad de vida de estos pacientes.

Conceptualmente, si la patología a tratar es dominante, la estrategia de TG consistirá en anular la expresión del gen defectuoso. Esto se puede lograr mediante el uso de ribozimas (ARN con capacidad catalítica que, al cortar moléculas de ARN en sitios específicos, pueden eliminar los ARN

a. Departamento de
Pediatria.
Hospital Alemán.
Buenos Aires.

Correspondencia:
Dr. Brian M. Cavagnari:
bcavagna@gmail.com

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 1-3-11
Aceptado: 30-3-11

mensajeros involucrados en una enfermedad), ARN de interferencia (pequeñas moléculas de ARN con secuencias complementarias al ARN mensajero endógeno, el cual al ser identificado será degradado por la propia maquinaria celular) o de oligonucleótidos antisentido (ácidos nucleicos pequeños de cadena simple que se unen al ARN mensajero endógeno formando un dúplex e impidiendo su traducción). A modo de ejemplo, actualmente existen protocolos de TG para la enfermedad de Alzheimer¹⁵ y se ensayan terapéuticas que utilizan ARN de interferencia para el tratamiento de la enfermedad de Huntington,¹⁶ entre otras.

Por otra parte, si la patología a tratar es recesiva, la estrategia básica consistirá en lograr la expresión de la proteína faltante, por ejemplo mediante la introducción de plásmidos que la codifiquen. Como claro ejemplo de este tipo de enfermedades, cabe mencionar a la Inmunodeficiencia Combinada Grave (ICG) por déficit de adenosina deaminasa (ADA), ya que es la patología que se vio involucrada en los primeros protocolos de TG. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva que lleva a una disfunción de las células B y T, y ocasiona la muerte precoz de los enfermos –llamados “niños burbuja”– por infecciones graves. Durante mucho tiempo, la terapéutica consistió en extraer linfocitos del paciente, insertarles el gen ADA vía retrovirus y devolverlos al torrente circulatorio. Con esta estrategia se apreció inicialmente una restitución de la respuesta inmunitaria de varios niños, aunque también se produjeron importantes efectos adversos por mutagénesis insercional (mutación causada por la inserción de ADN exógeno dentro del genoma).¹⁷ Este riesgo se ve actualmente disminuido merced al uso de lentivirus con capacidad de autoinactivación, como vectores del gen terapéutico.¹⁸ Básicamente, se hace la transferencia *ex-vivo* del gen terapéutico a células madre hematopoyéticas autólogas, mediante vectores virales que no se replican.¹⁹ Si bien el tratamiento de elección actual para la ICG es el trasplante de células madre hematopoyéticas de un donante HLA idéntico, los trasplantes alogénicos y de donantes no relacionados continúan asociándose con alta morbilidad. Por lo tanto, si la mutación causante de la patología resulta identificada, la TG puede ser un tratamiento alternativo.

Otra patología muy estudiada es la distrofia de Duchenne. Este trastorno se origina por la ausencia de síntesis de distrofina (codificada en el cromosoma X) y lleva a la pérdida de masa mus-

cular y debilidad progresivas. Para su tratamiento se han ensayado estrategias en donde el gen de la distrofina se introduce como parte de un cromosoma artificial, con lo cual se obtiene la expresión de la distrofina en los modelos de estudio.²⁰ Actualmente, se utilizan variados enfoques para el tratamiento de esta patología por TG, muchos de ellos con resultados promisorios.²¹

Por su parte, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, los fibroblastos de los pacientes pueden ser transfectados mediante virus portadores del gen de la glucocerebrosidasa, alcanzándose niveles normales de expresión de la enzima en dichas células.^{22,23} Estrategias similares son ensayadas contra otras tesarismosis.²⁴

Existen muchos ejemplos de patologías recesivas en donde el concepto es el mismo que el señalado para las tres enfermedades ya citadas: la introducción de una copia sana del gen defectuoso. Sin embargo, vale la pena señalar otros casos en donde la estrategia desarrollada para lograr la incorporación del gen terapéutico a un órgano específico es interesante.

Como primer ejemplo, podemos citar a la hipercolesterolemia familiar debida a mutaciones en el gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Los pacientes homocigotas para esta mutación generalmente sufren problemas cardíacos antes de los veinte años. Resultados preliminares, obtenidos en ratones, muestran una marcada regresión de la aterosclerosis con la introducción del gen para el LDLR.²⁵ En los seres humanos, una estrategia planteada consistiría en realizar una hepatectomía parcial, introducir el gen del LDLR en los hepatocitos del enfermo, y luego reinfundirlos en el hígado en regeneración.

El otro ejemplo clave de enfermedad autosómica recesiva en la que permanentemente se ensayan protocolos de TG es la fibrosis quística, en donde se ve afectado el gen CFTR (que codifica para el regulador de la conductancia transmembrana). En estos ensayos, varios vectores (generalmente retrovirus) son los encargados de transportar el gen CFTR. Muchos han sido los protocolos ensayados en humanos, con resultados alentadores, pero resta aún resolver el problema de la corta duración de la expresión del gen, que requeriría tratamientos reiterados.²⁶⁻²⁸ Actualmente se ensayan protocolos en donde los vectores con el gen terapéutico se vehiculizan mediante un aerosol, para que actúen directamente sobre el epitelio pulmonar.²⁹⁻³¹

En este punto es dable reflexionar que mientras algunas patologías exigen que la corrección

genética se efectúe puntualmente en el tipo celular afectado (tal el planteo de la TG para la talasemia, en donde el ADN que codifica para una hemoglobina adecuada se debe introducir en células eritroides),^{14,32} en otras se puede introducir el gen terapéutico en diferentes tipos celulares, para corregir el defecto sistémico (tal el planteo de la TG a la hora de introducir un gen codificante de Factor IX para el tratamiento de la Hemofilia B).^{33,34}

En líneas generales, las enfermedades monogénicas ideales para aplicar TG serían aquellas en donde el gen involucrado estuviera clonado, secuenciado y con conocimiento sobre su expresión y regulación, que cupiese en un vector y que su sobreexpresión no resultara peligrosa.²

Si bien resulta intuitivamente sencillo imaginar la aplicación de TG frente a defectos monogénicos (ya que involucra o bien anular la expresión de un gen causante de la patología o bien lograr la expresión de una proteína faltante), este recurso terapéutico también utiliza estrategias muy interesantes para encarar el tratamiento de neoplasias e infecciones.

Terapia génica para el tratamiento de neoplasias

La TG desarrolló formas muy diferentes de encarar el tratamiento de las neoplasias, entre ellas se incluyen las siguientes:

Inhibición de oncogenes

Los protooncogenes son genes cuya presencia es normal en un individuo y desempeñan una importante función en la regulación de la proliferación celular. Por mutaciones, pueden transformarse en oncogenes y contribuir al desarrollo de cáncer. Por lo tanto, una de las estrategias de TG consiste en inactivar oncogenes mediante el uso de oligonucleótidos que se unen directamente al ADN y forman un triplex (estructura tricatenaria compuesta por la doble cadena del ADN nativo asociada a la simple cadena del oligonucleótido)³⁵ o actuar sobre el ARN mensajero del oncogén vía oligonucleótidos antisentido³⁶ o ribozimas,³⁷ e impedir así su expresión.

En este último caso se debería asegurar el ingreso del material genético a todas las células tumorales, pues de existir células que no los incorporaran, tendrían una ventaja proliferativa sobre las otras y se regeneraría el tumor.

Incorporación de genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores o antionco-

genes, inhiben el crecimiento celular, por lo que, al perderse o inactivarse, se ven involucrados en el desarrollo de tumores. A modo de ejemplo, cuando el gen p53 funciona adecuadamente y se detecta una anomalía en el ADN celular que no ha sido correctamente reparada, esta célula sigue la vía de la apoptosis (muerte celular programada). Si p53 no funciona adecuadamente, estas anomalías en el ADN celular persisten, y se puede desarrollar una neoplasia.

De esto se desprende que otra forma con la cual la TG puede interferir con el desarrollo de un tumor es la restauración de esta función eventualmente perdida, mediante la introducción de genes supresores de tumores.^{38,39} En este caso, al igual que lo señalado previamente con respecto al tratamiento de las enfermedades recesivas, se observa que la estrategia básica consiste en lograr la expresión adecuada de una proteína faltante o que no funcione adecuadamente.

Activación de profármacos

Otra estrategia desarrollada involucra la introducción de un "gen suicida" en las células tumorales. Un ejemplo clásico es el del gen de la timidina quinasa del herpes simplex, enzima que fosforila el profármaco ganciclovir y lo transforma en metabolitos tóxicos que destruyen la célula tumoral que incorporó el gen.

En el caso particular de las neoplasias del sistema nervioso central, nos encontramos con una ventaja: salvo excepciones (hipocampo, bulbo olfatorio) el tejido nervioso sano no se divide, por lo que no captará determinados vectores virales (que llevarán el gen letal condicional). Los virus, en cambio, serán captados por las células tumorales en activa división y, al ser expuestas al ganciclovir (de aquí el término "condicional"), producirán su actividad letal en las células que los incorporen.⁴⁰ Frente a esta lisis celular, se corre el riesgo de que las células no tumorales vecinas capturen el "gen suicida" y terminen muriendo por el mismo mecanismo que las tumorales,⁴¹ por lo que, lo ideal, sería elaborar una construcción en donde se coloque al "gen suicida" bajo un promotor tumoral específico, de forma tal que solo las células tumorales puedan expresar la timidina quinasa y, en consecuencia, morir.

Estos "genes suicidas" no solo se ensayaron para tumores del sistema nervioso, sino también para el tratamiento del cáncer de mama, páncreas, ovario, colon y melanoma.⁴²

Por otra parte, muchas células malignas no son reconocidas adecuadamente por el sistema

inmunitario, por lo que se utiliza la TG para potenciar la respuesta inmunológica frente a distintas neoplasias.

Aumento de la actividad antitumoral de células del sistema inmunitario

Este enfoque se basa en utilizar linfocitos infiltrantes de tumores (LIT): se los extrae del paciente, se los trata para aumentar la expresión de citoquinas, se los expande y se los devuelve al paciente con una actividad inmunológica aumentada.⁴³ Recientemente se obtuvieron resultados exitosos contra el melanoma metastásico en seres humanos mediante linfocitos genéticamente modificados para atacarlo.⁴⁴ También se ha introducido el gen del factor de necrosis tumoral (TNF, por su sigla en inglés) en LIT, de forma tal que, al dirigirse hacia el tumor, éste sea destruido.

Aumento de la inmunogenicidad del tumor

Otro enfoque de la TG para potenciar la respuesta inmunitaria es transformar en reconocible para el sistema inmunológico un antígeno tumoral previamente desconocido,⁴⁵ a través de la expresión de moléculas presentadoras de antígeno en células tumorales. Por ejemplo, en algunas células tumorales se pueden incorporar genes que expresen la proteína B7 (la cual media interacciones entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno), para tornar más inmunogénico al tumor. Esto disminuiría la anormal tolerancia del tumor y favorecería la inmunidad, tanto contra las células tumorales que expresan B7, como contra las células del tumor original.^{46,47}

Éstas y otras estrategias se han ensayado frente a diferentes neoplasias, como cáncer de ovario,^{48,49} melanoma,⁵⁰⁻⁵² cáncer de mama,⁵⁰ glioblastoma,^{53,54} carcinoma hepatocelular⁵⁵ y neuroblastoma,⁵⁶ entre muchas otras.

Cabe destacar que, al día de hoy, los protocolos oncológicos de TG están dirigidos a pacientes con metástasis, más que contra las neoplasias primarias. No habría que esperar que la TG sea la solución final para esta enfermedad, pero sí considerarla como una opción complementaria a la terapéutica tradicional, como la quimioterapia y la radioterapia.

Terapia génica para el tratamiento de infecciones

La TG en este caso estaría restringida a enfermedades de mal pronóstico y con tratamiento actual infructuoso. La idea es interferir con la replicación de un patógeno mediante diferentes

estrategias, ya que el ciclo de vida del virus presenta varios puntos vulnerables para abordarlos con la TG.

Actualmente, existen protocolos de TG que ensayan aptámeros (ácidos nucleicos que pueden interactuar directamente con las proteínas involucradas en el desarrollo de una enfermedad, de manera similar a la de los anticuerpos)⁵⁷ y ribozimas⁵⁸ para el tratamiento de la hepatitis B. Del mismo modo, se intenta combatir la hepatitis C mediante aptámeros,⁵⁹ oligonucleótidos⁶⁰ y ribozimas.⁵⁹

Otros oligonucleótidos se ensayan a su vez para el tratamiento de algunas infecciones por citomegalovirus⁶¹ y papilomavirus.⁶²

No obstante, la mayoría de los protocolos intenta interferir con el ciclo de vida del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Para cumplir con este objetivo se han ensayado varias estrategias:

1. Usar oligonucleótidos antisentido^{63,64} y ribozimas,^{65,66} que eliminen el ARN blanco (ARN mensajero destinado al ensamblaje del virus o ARN genómico viral).
2. Armar una estructura en donde el gen que codifique interferón esté bajo un promotor inducible por el mismo virus. Así, la célula funcionará normalmente, pero al ingresar el virus se expresará el interferón que impedirá la replicación viral y su diseminación hacia otras células.⁶⁷
3. Interferir con la entrada del virus a la célula, mediante una forma soluble del receptor viral en circulación (CD4 soluble), el cual se unirá a la superficie del patógeno e impedirá su internalización.⁶⁸
4. Utilizar la estrategia "negativa dominante", introduciendo proteínas mutantes (de las proteínas virales tat, rev, gag y env, entre otras) que interferirán con las proteínas normales del patógeno y dificultarán el armado final de los virus.⁶⁹⁻⁷²

Tal como se señaló en referencia a las posibilidades de la TG frente al cáncer, el criterio de emplearla frente al VIH es como una terapia complementaria a los antirretrovirales convencionales, de modo de poder lograr un mayor período libre de enfermedad en los pacientes.

CONCLUSIÓN

En función de las enormes expectativas generadas, el progreso de la TG en los últimos 20 años ha sido bastante lento. Muchos de los ensa-

yos mostraron no ser eficaces y otros se asociaron con efectos adversos inaceptables. De todos modos, resultados exitosos publicados en los últimos años muestran a la TG como una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades tan disímiles como la enfermedad de Parkinson,⁷³ adrenoleucodistrofia,¹⁰ enfermedad granulomatosa crónica,^{18,74,75} síndrome de Wiscott Aldrich⁷⁶⁻⁷⁸ y amaurosis congénita de Leber,^{79,80} entre otras. Además, en el corto plazo se iniciarán ensayos clínicos para el tratamiento de otras importantes patologías, como la anemia de células falciformes.⁸¹

Este reposicionamiento de la TG, como una alternativa importante para el tratamiento de enfermedades hasta hoy incurables, obliga a que quien realice su actividad médica durante el presente siglo XXI no pueda permanecer al margen del desarrollo de esta nuevamente prometedora modalidad terapéutica.

Agradecimientos

Al Dr. Diego J. Rodríguez Gil (Facultad de Medicina de la Universidad Yale, New Haven, CT, EE.UU.) por la lectura crítica del manuscrito y por sus oportunas sugerencias. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992;256(5058):808-13.
- Lever AML. Terapia génica. En: Cox TM, Sinclair J. Biología molecular en medicina. Madrid: Panamericana; 1998. Págs. 304-19.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270(5235):475-80.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995;270(5235):470-5.
- Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, Heiss LN, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995;1(10):1017-23.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346(16):1185-93.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302(5644):415-9.
- Saraswat P, Soni RR, Bhandari A, Nagori BP. DNA as therapeutics; an update. *Indian J Pharm Sci* 2009;71(5):488-98.
- Naldini L. Medicine. A comeback for gene therapy. *Science* 2009;326(5954):805-6.
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009;326(5954):818-23.
- Kohn DB, Candotti F. Gene therapy fulfilling its promise. *N Engl J Med* 2009;360(5):518-21.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2009;360(5):447-58.
- Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 2008;371(9629):2044-7.
- Kaiser J. Gene therapy. Beta-thalassemia treatment succeeds, with a caveat. *Science* 2009;326(5959):1468-9.
- Qu BX, Lambracht-Washington D, Fu M, Eagar TN, et al. Analysis of three plasmid systems for use in DNA A beta 42 immunization as therapy for Alzheimer's disease. *Vaccine* 2010;28(32):5280-7.
- Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, Wagh S, et al. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol* 2009;19(9):774-8.
- Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr Opin Hematol* 2007;14(4):337-42.
- Aiuti A, Romcarolo MG. Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;682-9.
- Kohn DB. Gene therapy for childhood immunological diseases. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(2):199-205.
- Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, et al. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2010;18(2):386-93.
- Park KS, Oh D. Gene therapy for muscular dystrophies: progress and challenges. *J Clin Neurol* 2010;6(3):111-6.
- Hong YB, Kim EY, Yoo HW, Jung SC. Feasibility of gene therapy in Gaucher disease using an adeno-associated virus vector. *J Hum Genet* 2004;49(10):536-43.
- Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, Barton NW, et al. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: In vivo detection of transduced cells without myeloblasts. *Hum Gene Ther* 1998;9(17):2629-40.
- Dodge JC, Clarke J, Song A, Bu J, et al. Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(49):17822-7.
- Kassim SH, Li H, Vandenbergh LH, Hinderer C, et al. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One* 2010;5(10):e13424.
- Griesenbach U, Geddes D, Alton E. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 2006;13(14):1061-7.
- Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, et al. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 2004;125(2):509-21.
- Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, et al. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther* 2007;18(8):726-32.
- Gautam A, Waldrep JC, Densmore CL. Aerosol gene therapy. *Mol Biotechnol* 2003;23(1):51-60.
- Rochat T, Morris MA. Gene therapy for cystic fibrosis by means of aerosol. *J Aerosol Med* 2002;15(2):229-235.
- Pringle IA, Hyde SC, Gill DR. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(8):991-1003.
- May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 2000;406(6791):82-6.
- Mátraí J, Chuah MK, VandenDriessche T. Preclinical and clinical progress in hemophilia gene therapy. *Curr Opin Hematol* 2010;17(5):387-92.

34. Arruda VR, Stedman HH, Haurigot V, Buchlis G, et al. Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood* 2010;115(23):4678-88.
35. Ebbinghaus S, Gee J, Rodu B, Mayfield C, et al. Triplex formation inhibits HER-2/neu transcription in vitro. *J Clin Invest* 1993;92(5): 2433-9.
36. Collins J, Herman P, Schuch C, Bagby G Jr. C-myc antisense oligonucleotides inhibit the colony-forming capacity of Colo 320 colonic carcinoma cells. *J Clin Invest* 1992;89(5):1523-7.
37. Snyder DS, Wu Y, Wang JL, Rossi JJ, et al. Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood* 1993;82(2):600-5.
38. Ogawa N, Fujiwara T, Kagawa S, Nishizaki M, et al. Novel combination therapy for human colon cancer with adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer and DNA-damaging chemotherapeutic agent. *Int J Cancer* 1997;73(3):367-70.
39. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, et al. Retrovirus mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996;2(9):985-91.
40. Thomas SM, Naresh KN, Wagle AS, Mulherkar R. Preclinical studies on suicide gene therapy for head and neck cancer: A novel method for evaluation of treatment efficacy. *Anticancer Res* 1998;18(6A):4393-8.
41. Wygoda MR, Wilson MR, Davis MA, Trosko JE, et al. Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by bystander cells: the Good Samaritan effect. *Cancer Res* 1997;57(9):1699-703.
42. Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9(12):967-78.
43. Yannelli J, Hyatt C, Johnson S, Hwu P, Rosenberg SA. Characterization of human tumour cell lines transduced with the cDNA encoding either tumour necrosis factor alpha (TNF- α) or interleukin-2 (IL-2). *J Immunol Methods* 1993;161(1):77-90.
44. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314(5796):126-9.
45. Barnes MN, Deshane JS, Rosenfeld M, Siegal GP, et al. Gene therapy and ovarian cancer: a review. *Obstet Gynecol* 1997;89(1):145-55.
46. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992;71(7):1093-102.
47. Whelan MC, Casey G, MacConmara M, Lederer JA, et al. Effective immunotherapy of weakly immunogenic solid tumours using a combined immunogene therapy and regulatory T-cell inactivation. *Cancer Gene Ther* 2010;17(7):501-11.
48. Tait DL, Obermiller PS, Hatmaker AR, Redlin-Frazier S, Holt JT. Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin Cancer Res* 1999;5(7):1708-14.
49. Álvarez RD, Gómez-Navarro J, Wang M, Barnes MN, et al. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther* 2000;2(5):524-30.
50. Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, Bailey DJ, et al. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: Results of a phase I clinical trial. *Gene Ther* 1999;6(3):350-63.
51. Fujii S, Huang S, Fong TC, Ando D, et al. Induction of melanoma-associated antigen systemic immunity upon intratumoral delivery of interferon-gamma retroviral vector in melanoma patients. *Cancer Gene Ther* 2000;7(9):1220-30.
52. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biological activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(23):11307-11.
53. Wohlfahrt ME, Beard BC, Lieber A, Kiem HP. A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL Leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models. *Cancer Res* 2007;67(18):8783-90.
54. Kinoshita Y, Kamitani H, Mamun MH, Wasita B, et al. A gene delivery system with a human artificial chromosome vector based on migration of mesenchymal stem cells towards human glioblastoma HTB14 cells. *Neurol Res* 2010;32(4):429-37.
55. Tu Y, Kim JS. Selective gene transfer to hepatocellular carcinoma using homing peptide-grafted cationic liposomes. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20(4):821-7.
56. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008;14(11):1264-70.
57. Zhang W, Ke W, Wu SS, Gan L, et al. An adenovirus-delivered peptide aptamer C1-1 targeting the core protein of hepatitis B virus inhibits viral DNA replication and production in vitro and in vivo. *Peptides* 2009;30(10):1816-21.
58. Wang CX, Lu YQ, Qi P, Chen LH, Han JX. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by hepatitis delta virus ribozymes delivered by targeting retrovirus. *Virology* 2010;7:61.
59. Thompson AJ, Patel K. Antisense inhibitors, ribozymes, and siRNAs. *Clin Liver Dis* 2009;13(3):375-90.
60. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, Paumgartner G, Caselman WH. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology* 1995;22(3):707-17.
61. Azad RF, Driver VB, Tanaka K, Crooke RM, Anderson KP. Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to RNA of the human cytomegalovirus major immediate-early region. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(9):1945-54.
62. Tonkinson JL, Stein CA. Antisense oligodesoxynucleotides as clinical therapeutic agents. *Cancer Invest* 1996;14(1):54-65.
63. Chatterjee S, Johnson PR, Wong KK Jr. Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 1992;258(5087):1485-8.
64. Anazodo MI, Salomon H, Friesen AD, Wainberg MA, Wright JA. Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'-LTR region of the viral genome. *Gene* 1995;166(2):227-32.
65. Yu M, Leavitt MC, Maruyama M, Yamada O, et al. Intracellular immunization of human fetal cord blood stem/progenitor cells with a ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(3):699-703.
66. Zhou C, Bahner IC, Larson GP, Zaia JA, et al. Inhibition of HIV-1 in human T-lymphocytes by retrovirally transduced anti tat and rev hammerhead ribozymes. *Gene* 1994;149(1):33-9.
67. Sanhadji K, Leissner P, Firouzi R, Pelloquin F, et al. Experimental gene therapy: the transfer of Tat-inducible interferon genes protects human cells against HIV-1 challenge in vitro and in vivo in severe combined immunodeficient mice. *AIDS* 1997;11(8):977-86.
68. Sanhadji K, Grave L, Touraine JL, Leissner P, et al. Gene transfer of anti-gp41 antibody and CD4 immunoadhesin strongly reduces the HIV-1 load in humanized severe combined immunodeficient mice. *AIDS* 2000;14(18):2813-22.
69. Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ. Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human

- immunodeficiency virus-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(7):2889-94.
70. Lori F, Lisziewicz J, Smythe J, Cara A, et al. Rapid protection against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication mediated by high efficiency non-retroviral delivery of genes interfering with HIV-1 tat and gag. *Gene Ther* 1994;1(1):27-31.
 71. Buchschacher GL Jr, Freed EO, Panganiban AT. Cells induced to express a human immunodeficiency virus type 1 envelope gene mutant inhibit the spread of wild-type virus. *Hum Gene Ther* 1992;3(4):391-7.
 72. Bevec D, Dobrovnik M, Hauber J, Böhnlein E. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(20):9870-4.
 73. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007;369(9579):2097-105.
 74. Seger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol* 2008;140(3):255-66.
 75. Kang EM, Malech HL. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res* 2009;43(1-3):77-84.
 76. Galy A, Roncarolo MG, Thrasher AJ. Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(2):181-90.
 77. Charrier S, Dupré L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, et al. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 2007;14(5):415-28.
 78. Marangoni F, Bosticardo M, Charrier S, Draghici E, et al. Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Mol Ther* 2009;17(6):1073-82.
 79. Brainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358(21):2231-9.
 80. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358(21):2240-8.
 81. Stroncek DF, Puri RK. Cell and gene therapies: moving from research to clinic. *J Transl Med* 2010;8:31.