

# Descubrimiento de genes en el proyecto del genoma humano y terapia génica

Rubén F. Moreno-Palanqués  
*Director del Servicio y Laboratorio de Oncología Molecular.  
Departamento de Oncología  
Facultad de Medicina, Universidad de Navarra;  
y Clinical Gene Therapy Branch,  
National Center for Human Genome Research,  
National Institutes of Health,  
Bethesda, Maryland, U.S.A.*

## 1. Introducción

Cada una de los varios billones de células nucleares que existen en el cuerpo humano dispone al menos de una copia del genoma, colección completa de genes que son los últimos responsables del desarrollo de un ser humano. Estos genes, cuyo número se estima en 70-100.000, están empaquetados en el núcleo celular formando estructuras individuales alargadas conocidas como cromosomas. En nuestro organismo existen alrededor de 100.000 proteínas distintas que varían enormemente en tamaño y función. La mayoría de las proteínas son enzimas que regulan la velocidad de las reacciones químicas que tienen lugar en las células, produciendo energía o sustancias químicas necesarias para la vida. Algunas proteínas, como las existentes en las membranas, tejidos conectivos, y fibras musculares, constituyen un soporte estructural para la célula. Otras, regulan una amplia variedad de actividades

biológicas, incluyendo el crecimiento, el metabolismo, la reproducción, y la respuesta al estrés y otros factores ambientales. Los genes son los que ordenan a las células la construcción de las proteínas a partir de las unidades básicas o aminoácidos. Para que una proteína funcione correctamente, su cadena de aminoácidos debe estar ensamblada con absoluta precisión. La alteración de un sólo aminoácido puede dar lugar a que la proteína no pueda ser sintetizada o a que no funcione correctamente.

### **1.1. El Proyecto del Genoma Humano**

El Proyecto del Genoma Humano es un esfuerzo internacional destinado a caracterizar el material genético del ser humano mediante la mejora de los mapas genéticos, la construcción de mapas físicos de todos los cromosomas, y en última instancia, la determinación de la secuencia completa de las subunidades de ácido desoxirribonucleico (ADN) de su genoma (1). El objetivo final del Proyecto es descubrir todos los genes humanos para facilitar su estudio biológico posterior, tarea que se extenderá probablemente durante la mayor parte del próximo siglo (2). La tecnología de la que se dispone actualmente, podría utilizarse probablemente para conseguir los objetivos del Proyecto, pero el coste y tiempo requerido serían inaceptables. Por este motivo, uno de los principales objetivos de los primeros diez años del Proyecto, es la mejora de los métodos existentes, y el desarrollo de nueva tecnología para incrementar la eficacia de la secuenciación y del estudio cartográfico del ADN (3). Eventualmente, se podrá secuenciar la totalidad de los estimados 3.000 millones de pares de bases que constituyen el genoma humano, utilizando una tecnología que está en continuo desarrollo, y métodos revolucionarios de los que aún no se dispone actualmente.

La mayoría de las enfermedades hereditarias son raras, pero en conjunto, estos trastornos producidos por la alteración de genes únicos y que representan más de 3.000, afectan a millones de individuos (4). Actualmente, todavía no se puede hacer mucho para tratar estas enfermedades, y mucho menos para curarlas. Invertir en la búsqueda de genes tiene sentido porque una vez identificados, se puede estudiar su estructura y caracterizar sus posibles alteraciones moleculares o mutaciones. Este es el primer paso para entender el mecanismo causante de una enfermedad genética y eventualmente para vencerla. Las mutaciones de algunos genes también juegan un papel importante en la mayoría de los trastornos más comunes, que son probablemente el resultado de interacciones complejas entre genes y factores ambientales. Cuando se conozcan estos genes, se podrá estudiar cómo factores específicos tales como alimentos, medicamentos, o contaminación, interactúan con los mismos.

## 2. Descubrimiento rápido de genes: Expressed sequence tags

Uno de los objetivos que no se especificaban en el plan inicial del Proyecto del Genoma Humano, aunque estuviera implícito en él, es el del desarrollo de métodos para la identificación de genes y su localización en los mapas físicos y en la secuencia de ADN del genoma. Los avances técnicos y estratégicos llevados a cabo desde 1990 hacen que se contemple este objetivo como deseable (3). Uno de los mayores avances en el descubrimiento de nuevos genes fue la estrategia de secuenciación de ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de los distintos tejidos del ser humano durante todas las fases de su desarrollo, que nuestro equipo inició en 1990 (5-7). Este procedimiento ha permitido adelantar la información procedente del Proyecto Genoma Humano en una o dos décadas.

Como se ha dicho anteriormente, el genoma humano está constituido por unos 3.000 millones de pares de bases, aunque no todos codifican proteínas. Estas secuencias codificantes representan sólo el 5% de todo el genoma, que es lo que utilizan las células para sintetizar proteínas. Las instrucciones de los genes se transmiten indirectamente a través de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que es un intermediario temporal similar a una cadena simple de ADN. El ARNm pasa del núcleo al citoplasma de la célula, donde es leído por la maquinaria de síntesis de proteínas. Esta maquinaria traduce este mensaje en una cadena de aminoácidos que constituye la proteína que el gen codifica. La molécula de ARNm puede aislarse en el laboratorio para sintetizar una cadena de ADNc (8). Este ADNc, es por lo tanto, una copia del gen original. Es decir, la estrategia de secuenciación de ADNc utiliza la capacidad de nuestras células para seleccionar ese 5% del genoma que representa su parte más importante, la constituida por nuestros genes. Utilizando esta estrategia hemos llegado a descubrir más de dos tercios de los genes que constituyen nuestro genoma (7).

Con estas secuencias o “ESTs” (Expressed Sequence Tag), se puede localizar el gen completo en los cromosomas y tejidos, y luego determinar su función. Para buscar similitudes u homologías con las secuencias de ADN y de proteínas conocidas, los ESTs se comparan en masa con las bases de datos que contienen a las primeras. El análisis computerizado de tantas secuencias es posible gracias a ordenadores con procesadores en paralelo y a programas sofisticados desarrollados con este propósito en nuestro laboratorio y en el Centro Nacional de Información en Biotecnología de la National Library of Medicine de los Estados Unidos, entre otros. De acuerdo con este análisis comparativo, los ESTs se clasifican en varios grupos. Algunos coinciden con secuencias de origen humano ya descritas, es decir, corresponden a genes conocidos. Otros, muestran homología con genes conocidos, tanto de

origen humano como de otros organismos, es decir, son genes desconocidos que pueden tener una función similar a aquellos con los que muestran homología, o pertenecen a la misma familia genética. Finalmente, otros carecen de homología con secuencias conocidas, es decir, corresponden a genes totalmente desconocidos. Posteriormente, cada uno de estos fragmentos de genes se localizan físicamente en los cromosomas (9). Aquellos que corresponden a una área en la que se ha localizado genéticamente la alteración responsable de una enfermedad genética, es considerado un candidato a responsable de la enfermedad y se le concede prioridad en su estudio. En colaboración con otros grupos, esta estrategia ya ha permitido el descubrimiento de genes que han sufrido una delección en el síndrome de Angelman-Prader-Willi, el descubrimiento del gen responsable de la deficiencia del enzima glicerol quinasa (10) y la identificación de los genes MLH1, PMS1 y PMS2 que intervienen en el desarrollo del cáncer de colon hereditario de origen no polipósico (11,12), entre otros.

## 2.1. Terapia génica

El primer protocolo clínico autorizado que utilizó la transferencia de un gen, lo aprobó el Director de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (NIH) el 19 de Enero de 1989, y la primera transferencia de genes se realizó el 22 de Mayo de ese mismo año. El primer protocolo de terapia génica, fue el dirigido al tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia severa combinado producido por el déficit del enzima deaminasa de adenosina (ADA). El protocolo de terapia génica de la deficiencia de ADA, se presentó revisado el 23 de Febrero de 1990, y la primera aplicación no tuvo lugar hasta el 14 de Septiembre de 1990, es decir, tras tres años y medio de exposición y revisión públicas. El síndrome de inmunodeficiencia severa combinado producido por el déficit de ADA es, efectivamente, una enfermedad que amenaza la vida de los pacientes, y que no tenía un tratamiento adecuado para todos ellos. El protocolo ha sido modificado posteriormente para conseguir el establecimiento de una normalidad génica permanente en algunas de las células progenitoras hematopoyéticas. De este modo, se pretende liberar a los pacientes de la necesidad de tratamientos periódicos a los que estaban sujetos por el efecto temporal que tiene la transducción de linfocitos maduros utilizada en el protocolo original (13).

Actualmente existen más de 100 protocolos clínicos que incluyen casi 400 pacientes en todo el mundo. Más del 75% de estos protocolos está dirigidos al tratamiento del cáncer, o al marcaje de médula ósea para el trasplante utilizado en procesos cancerosos (15). Entre las enfermedades genéticas,

aquellas que acumulan un mayor número de protocolos son la fibrosis quística, la deficiencia de ADA y la enfermedad de Gaucher. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) también es uno de los trastornos al que se han dirigido un número significativo de protocolos clínicos de terapia génica. De los pacientes sometidos a terapia o transferencia génica el 80% son pacientes con cáncer. Los Estados Unidos de América sigue siendo el país en el que se están aplicando un mayor número de protocolos (>80%). Europa representa practica mente el resto. Entre los Centros, por el número de protocolos y pacientes sometidos a terapia o transferencia génica, destacan los NIH y el St. Jude Children's Research Hospital, ambos en los Estados Unidos.

### **3. Terapia y transferencia génica en el tratamiento del cáncer**

Una gran parte de la actividad investigadora se está centrando en la aplicación de las técnicas de transferencia génica para el tratamiento del cáncer. Por el tipo de estrategia, estos protocolos pueden agruparse en tres categorías:

#### **I. Corrección génica de las células tumorales.**

- Utilización de genes supresores de tumores y antioncogenes.

#### **II. Destrucción de las células tumorales.**

- Por el sistema inmunológico
- Por efectos tóxicos directos

#### **III. Terapia adyuvante**

- Utilización de genes de resistencia a drogas múltiples para proteger a las células de la médula ósea y permitir dosis de quimioterapia mayores.

Los procedimientos de terapia génica dirigidos a la destrucción de las células tumorales por efectos tóxicos directos consiste en la inserción intratumoral *in situ* de un gen suicida y la activación subsiguiente del mecanismo suicida. Hay varios tipos de genes que pueden utilizarse para desencadenar una reacción suicida en el tumor. Actualmente hay más de ocho protocolos que utilizan como gen suicida el de la timidina kinasa del virus herpes simple (HStk) (16,17). Nuestras células también poseen el gen para la timidina kinasa, enzima que puede fosforilar un nucleótido de timidina, como el TMP, TDP, o TTP; pero que es incapaz de fosforilar al nucleósido T. Sin embargo, la HStk sí que puede añadir un fosfato al nucleósido, y por lo tanto, puede fosforilar a un análogo como el ganciclovir (GCV) o el aciclovir. Con la fosforilación, estos nucleósidos entran en el mecanismo de síntesis de ADN y lo bloquean destruyendo a la célula. Otros genes que se están estudiando a nivel experimental para inducir una susceptibilidad celular a medicamentos son el

gen para la deaminasa de citosina (18-20) y el gen para la timidina kinaso derivado del virus varicela-zoster. El fundamento de la utilización de éste último es el mismo que el descrito para la HStk, mientras que el gen para la citosina-deaminasa se utiliza en combinación con la 5-fluorcitosina. Esta combinación resulta en la producción intracelular de 5-fluoruracilo, agente tóxico utilizado por vía general en quimioterapia del cáncer. Independientemente del procedimiento, la utilización de genes suicidas tiene un elemento en común, que es la producción intracelular tumoral, y sólo tumoral, de un producto tóxico. Por lo tanto, al no ser administrado por vía general para combatir al cáncer, carece de los efectos tóxicos generalizados propios de la quimioterapia. En la mayoría de los casos, la especificidad de la selección de las células tumorales se basa en las características de los vectores retrovirales que se utilizan para la transferencia del gen. Los retrovirus y vectores retrovirales sólo se integran, y por lo tanto, sólo expresan su genoma, en aquellas células que se están dividiendo activamente. La primera aplicación en seres humanos de esta estrategia se ha dirigido al tratamiento de los tumores cerebrales debido al carácter privilegiado del cerebro para conseguir el objetivo de la transferencia selectiva. Debido a la ausencia de actividad proliferativa en un cerebro normal, los vectores retrovirales se integran únicamente en el genoma de aquellas células que se están dividiendo, es decir, las tumorales, y eventualmente, en el de las células endoteliales de los vasos sanguíneos que sirven de soporte al tumor. Pero además, por su mecanismo de acción, el análogo tóxico creado por la HStk a partir del ganciclovir sólo puede actuar en las células que entran en la fase de síntesis de ADN. Este mecanismo es ya de por sí, un sistema de selección, por lo que ya han empezado a utilizarse vectores adenovirales con el gen para la HStk. La inyección directa intratumoral de fibroblastos murinos NIH-3T3 que producen vectores retrovirales con el gen HStk, ha tenido una utilidad terapéutica gracias al fenómeno conocido como efecto "espectador". Los estudios con animales de experimentación demuestran una transferencia génica que se extiende al 30-60% de las células tumorales, pero por el efecto espectador, las células tumorales vecinas a las que contienen el gen HStk, son destruidas aun sin disponer del mismo. En algunos casos de modelos experimentales, el tumor desapareció aun cuando sólo el 10-20% de las células tumorales poseían el gen HStk. Hay estudios que sugieren que el fenómeno es debido al cruce de metabolitos tóxicos de una célula a otra a través de uniones tipo gap.

#### 4. Perspectivas

La tecnología de transferencia génica se está desarrollando de forma muy rápida. Los protocolos clínicos que existen actualmente están basados

fundamentalmente en la modificación *ex vivo* de células autólogas y en algún caso heterólogas, o en la modificación *in vivo* de un número pequeño de células. Entre los problemas que hay que solucionar en la transferencia *ex vivo* están el aumento del nivel de expresión génica en las células transducidas, y el mantenimiento de esta expresión *in vivo*, evitando la desactivación de la misma. En cuanto a la transferencia génica *in vivo*, el objetivo es conseguir un mayor número de células transducidas, aumentar el nivel de expresión génica por célula transducida, y limitar esta expresión a la población celular de interés. En general, hay tres parámetros que habrá que tener presente en el desarrollo de esta tecnología de transferencia génica: Precisión, eficacia y acceso a las células diana.

## 5. Conclusiones

El atlas del genoma humano revolucionará la práctica de la medicina y de la investigación biológica durante, e incluso más allá del siglo XXI. Eventualmente, se encontrarán todos los genes, y se desarrollarán diagnósticos precisos para la mayoría de las enfermedades genéticas. Además, facilitará el desarrollo de modelos animales para investigar la enfermedad humana y para entender la función de los genes en los estados de salud y de enfermedad. La identificación de estos genes y sus proteínas, prepararán el camino hacia tratamientos más efectivos o nuevos, como la terapia génica, y hacia medidas preventivas.

Durante los próximos años se realizarán avances en la capacidad de transferir genes a los tejidos del ser humano. El cáncer seguirá siendo el campo prioritario de aplicación e investigación de la tecnología de transferencia génica. También observaremos un incremento significativo de la actividad investigadora en este campo dirigida a la búsqueda de soluciones al SIDA. En cuanto a las enfermedades genéticas monogénicas, que pudieron ser consideradas inicialmente como el campo natural de aplicación de la terapia génica, es previsible que se mantenga la tendencia actual de menor actividad. El posible aumento de los recursos destinados a este campo, y el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano pueden, no obstante, incidir positivamente en el avance de la investigación terapéutica génica en este tipo de enfermedades.

Es previsible un debate social importante sobre la introducción de los protocolos de terapia génica en la práctica clínica rutinaria. Una de las tareas más importantes será la de la educación mutua de investigadores, clínicos y sociedad sobre qué es posible y aceptable en transferencia génica. Mientras tanto, las instituciones y órganos competentes deben decidir la introducción

clínica de un protocolo en base a los datos de eficacia y seguridad. En última instancia, siempre habrá que decidir tomando en consideración los posibles beneficios para un paciente individual frente a los riesgos que puede correr ese paciente y la comunidad en general.

El conocimiento de la secuencia de un gen, ya permitió en su día reproducir la hormona del crecimiento en el laboratorio. Hoy se dispone comercialmente de esta hormona sintética que se utiliza para tratar a aquellos individuos que no pueden producirla de forma natural dando lugar a trastornos del crecimiento. Existen otros productos sintetizados en el laboratorio a partir de genes recombinantes, tales como interferon, plasminógeno tisular, interleuquina-2, insulina, factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos, factor estimulante de las células progenitoras hematopoyéticas, y eritropoyetina. El mercado mundial para algunos de estos productos es ya del orden de decenas de miles de millones de pesetas, y continua en aumento. Finalmente, cuando se conozca mejor la organización del genoma y la regulación de los genes, se empezará a entender cómo un ser humano puede desarrollarse a partir de una sola célula hasta convertirse en un individuo adulto, cómo los distintos genes son coordinados en los distintos órganos y tejidos durante este proceso, por qué este proceso se altera en ocasiones, y qué cambios tienen lugar con el envejecimiento de nuestro organismo.

## 6. Referencias

1. Grisolia, S. and Moreno-Palanques, R.F., El Proyecto del Genoma Humano., in *Iniciación a la Genética Humana.*, C.M. Romeo Casabona, Editor. 1995, Universidad de Deusto: Bilbao.
2. Human Genome, 1991-1992 Program Report. 1992, U. S. Department of Energy.
3. Collins, F. and Galas, D., A new five-year plan for the U. S. human genome project. *Science*, 1993. 262: p.43-46.
4. McKusick, V., *Online Medelian Inheritance in Man*. Continuous update, William H. Welch Medical Library, The Johns Hopkins University: Baltimore, MD. 10
5. Adama, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., and Venter, J.C., Complementary DNA sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. *Science*, 1991. 252(5013): p.1651-1656.

6. Adama, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C., and Venter, J.C., Sequence Identification of 2375 Human Brain Genes. *Nature*, 1992. 355(6361): p.632-634.
7. Adama, M.D., Kerlavage, A.R., Fleischmann, R.D., Fuldner, R.A., Bult, C.J., Lee, N.H., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Gocayne, J.D., White, O., Sutton, G., Blake, J.A., Brandom, R.C., Chiv, M.W., Clayton, R.A., Cline, R.T., Cotton, M.D., Earle-Hughes, J., Fine, L.D., FitzGerald, L.M., FitzHugh, W.M., Fritchman, J.L., Geoghagen, N.S.M., Glodek, A., Gnehm, C.L., Hanna, M.C., Hedblom, E., Hinckle Jr., P.S., Kelley, J.M., Kelley, J.C., Liu, L.I., Marmaros, S.M., Merrick, J.M., Moreno-Palanques, R.F., McDonald, L.A., Nguyen, D.T., Pellegrino, S.M., Phillips, C. A., Ryder, S.E., Scott, J.L., Sudek, D.M., Shirley, R., Small, K.V., Spriggs, T.A., Utterback, T.R., Weidman, J.F., Li, Y., Bednarik, D.P., Cao, L., Cepeda, M.A., Coleman, T.A., Collins, E.J., Dimke, D., Feng, P., Ferrie, A., Fisher, C., Hastings, G.A., He, W.W., Hu, J.S., Greene, J.M., Gruber, J., Hudson, P., Kim, A., Kozak, D.L., Kunsch, C., Ji, H., Li, H., Meissner, P.S., Olsen, H., Raymond, L., Wei, Y.F., Wing, J., Xu, C., Yu, G.L., Rubén, S.M., Dillon, P.J., Fannon, M.R., Rossen, C. A., Haseltine, W.A., Fields, C., Fraser, C.M., and Venter, J.C., Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 52 million basepairs of cDNA sequence. *Nature*, 1995. (in press).
8. Moreno-Palanques, R.F. and Fuldner, R.A., Construction of cDNA Libraries., in *Automated DNA Sequencing and Analysis.*, M.D. Adams, C. Fields, and J.C. Venter, Editor. 1994, Academic Press Limited: London. p.102-109.
9. Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Glodek, A., Gorski, M., Adams, M.D., Moreno, R.F., FitzGerald, M.G., Venter, J.C., and Merril, C.R., Chromosomal Assignment of 46 Brain cDNAs. *Genomics*, 1992. 12(3): p.492-496.
10. Sargent, C. A., Affara, N.A., Bentley, E., Pelmeur, A., Bailey, M.D., Davey, P., Dow, D., Leversha, M., Aplin, H., Besley, G.T.N., and Ferguson-Smith, M.A., Cloning of the X-linked glycerol kinase deficiency gene and its identification by sequence comparison to the bacillus subtilis homologue. *Human Molecular Genetics*, 1993. 2(2): p.97-106.

11. Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y.F., Rubén, S.M., Carter, K.C., Rosen, C. A., Haseltine, W.A., Fleischman, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Watson, P., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B., Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 1994. 263: p.1625-1629.
12. Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K.C., Rubén, S.M., Rosen, C. A., Haseltine, W.A., Fleischman, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Dunlop, M.G., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., de la Chapelle, A., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W., Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 1994. 371: p.75-80.
13. Moreno-Palanques, R.F. and Grisolfá, S., *Terapia Génica: La Nueva Frontera.*, in *Farmacología y Terapéutica*, N.A. Terragano and R.H. Iermoli, Editor. 1994, Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires.
14. Moreno-Palanques, R.F., Gene therapy: Protocols and patient register. Gene therapy for cancer using suicide genes., in *Gene Therapy*. 1995, Fundación BBV: Bilbao.
15. Moreno-Palanques, R.F., Brugarolas, A., García-Focillas, J., Subirá, M.L., Fernandez-Hidalgo, O., and Ramsey, W.J., Clinical Protocol. Phase I Study of Chemo-Immunotherapy of Advanced Non Small Cell Lung Cancer and Hepatic Metastases of Gastrointestinal Carcinomas by Neomycin Resistance Gene and Herpes Simplex Thymidine Kinase Marked Blood Cell Subpopulations. *Human Gene Therapy*, 1995.
16. Moolten, F.L. and Wells, J.M., Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990. 82(4): p.297-300.
17. Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H., and Blaese, R.M., In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 1992. 256: p. 1550-1552.
18. Huber, B.E., Austin, E. A., Richards, C. A., Davis, S.T., and Good, S.S., Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994. 91(17): p.8302-8306.

19. Mullen, C.A., Kilstrup, M., and Blaese, R.M., Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells contera lethal sensitivity to 5fluorocytosine: A negative selection system. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1992. 89(1): p.33-37.
20. Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S.S., Knick, V.C., Tibbels, S., and Richards, C.A., In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to expresa cytosine deaminase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1993. 53(19): p.4619-4626.