

Terapia génica y retrovirus

Antonio Talavera

Centro Nacional de Biotecnología

1.- Introducción

Hasta muy recientemente, esta comunicación habría comenzado definiendo la Terapia Génica del siguiente modo: “La introducción de genes activos en células apropiadas de individuos que padecen enfermedades metabólicas, también llamadas enfermedades moleculares”. Una definición más reciente de T. Friedmann dice así: “Terapia Génica es la producción de una sustancia dinámicamente útil *in vivo* mediante la introducción de un gen o células modificadas genéticamente para la curación de enfermedades humanas”.

La aparente ambigüedad que resulta de la comparación de ambas definiciones viene dada no sólo por los rápidos avances de esta rama de la genética molecular, sino también por la propia idiosincrasia del idioma inglés, de cuyo término “Gene Therapy” se traduce el término castellano “Terapia Génica”. La traducción más directa sería “Terapia del gen”, lo que sugiere la inmediata idea de la curación de un gen no funcional. Esta idea, sin embargo, lleva implícita su limitación a las enfermedades metabólicas. Una traducción más liberal sería “Terapia por medio de genes”, traducción que, como veremos, cubre toda la gama actual de aplicación de esta técnica.

2.- Estado actual de la terapia génica

Para tener una visión de conjunto del campo de la Terapia Génica, basta con repasar el temario de un reciente simposio celebrado en el Laboratorio de Cold Spring Harbor (Nueva York) en septiembre de 1992:

- 1) 7 comunicaciones sobre células del tejido hematopoyético.
- 2) 16 comunicaciones sobre enfermedades metabólicas.
- 3) 8 comunicaciones sobre Terapia Génica del sistema nervioso central (SNC).
- 4) 7 comunicaciones sobre protocolos clínicos de terapia Génica en humanos.
- 5) 6 comunicaciones sobre Terapia Génica antitumoral.
- 6) 6 comunicaciones sobre modelos animales de enfermedades humanas.
- 7) 8 comunicaciones sobre la aplicación de la Terapia Génica para la curación o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
- 8) 4 comunicaciones sobre el impacto de la Terapia Génica en la opinión pública.

Se presentaron además 98 posters que, en gran medida, incidían sobre uno u otro de los temas apuntados.

Como vemos, si sumamos los apartados 1 a 4, todavía las enfermedades metabólicas dominan el campo de interés de la Terapia Génica. Específicamente, la terapia del tejido hematopoyético apunta a la corrección de enfermedades causadas por deficiencias genéticas que afectan directamente a células de dicho tejido, tales como deficiencia en adenosina deaminasa (ADA), hemoglobinopatías (talasemias o anemia falciforme), y enfermedad de Gauscher, entre otras. En cuanto a la Terapia Génica del SNC, una de las aplicaciones previstas es la curación de la enfermedad de Parkinson o la sustitución de células dañadas en otro tipo de enfermedades del SNC. Sin embargo, tal como apuntan los apartados 5) y 7), se está abordando la curación mediante terapia génica de enfermedades no estrictamente metabólicas, como el cáncer, o infecciosas, como el SIDA. Tanto en el caso de las enfermedades metabólicas como en el de las no metabólicas, el tratamiento tiene en común la introducción de genes en células adecuadas.

En la Tabla 1 se enumeran los protocolos clínicos de terapia génica aprobados, hasta febrero de 1992, por la Comisión de DNA Recombinante del Instituto Nacional de la Salud de los EEUU. La lista se divide en dos partes: en la pri-

TABLA I.- Protocolos de Terapia Genica aprobados por NIH

A.- Marcaje celular			
Gen	Células blanco	Investigador	Institución
neo	TILs	Rosenberg	NIH
"	"	Lotze	Pittsburgh
"	"	Economu	UCLA
"	Hepatocitos	Ledley	Baylor
"	Linfocitos CD4	Greenberg	Washington
"	Cel. leucemicas	Brenner	Memphis
"	"	Deisseroth	Texas
"	"	Cornetta	Indiana
"	Cel. neuroblast.	Brenner	Memphis

B.- Terapia génica			
Gen	Células blanco	Investigador	Institución
ADA	linfocitos	Blaese	NIH
ADA	Stem cells	Blaese	NIH
LDLr	Hepatocitos	Wilson	U.Michigan
TNF	TILs	Rosenberg	NIH
TNF	Cel. tumorales	Rosenberg	NIH
IL2	Cel. tumorale	Rosenberg	NIH
Antígenos	Cel. tumorale	Nabel	U.Michigan
Toxinas	Cel. tumorales	Freeman	U.Rochester

Fuente: AD. Miller. Nature 357:455-460 (1992).

mera figuran experimentos que no pueden ser estrictamente considerados como terapia génica, ya que su objetivo es meramente el marcaje genético de células implantadas, con el fin de determinar su permanencia, localización y duración de la expresión del gen exógeno (transgen) en el organismo receptor. En la segunda parte figuran tres tratamientos de enfermedades metabólica –dos de deficiencia en ADA y uno de deficiencia del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL)– además de cinco protocolos dirigidos al tratamiento de tumores, ya sea suministrando a un tipo especial de linfocitos que se infiltran en tumores (Tumor-infiltrating lymphocytes o TILs) genes que expresan el factor de necrosis tumoral (TNF) de manera que dichos linfocitos sean capaces de eliminar las células tumorales entre las que se infiltran, o bien administrando este mismo u otros genes a las propias células tumorales.

Esta lista ha quedado rápidamente anticuada, ya que en la mencionada reunión de Cold Spring Harbor se citó un total de 36 protocolos aprobados con fecha 21 de septiembre de 1992, 19 de los cuales eran de marcaje celular y 17 de terapia génica en sentido estricto, entre los que se incluían protocolos de terapia génica contra el virus HIV, agente causante del SIDA. En este caso, los protocolos se basan en la introducción en las células blanco de dicho virus (linfocitos T4) de genes sintéticos que expresen RNAs con similares a RNAs virales, de manera que las proteínas virales transactivadoras, producto del gen viral TAT, se unan a los RNAs producto del transgén, evitando así la activación del virus.

3.– Tecnología general de la Terapia Génica

3.1.– Premisas

Las premisas necesarias para que la aplicación de la Terapia Génica sea posible son las siguientes:

a) El gen a transferir ha de ser conocido. Su identificación puede ser realizada por métodos diversos. Por ejemplo, en el caso de las hemoglobinopatías, se conoce desde hace bastante tiempo la naturaleza del gen mutado (el gen de la beta-globina) y, en muchos casos, se han caracterizado las mutaciones por un simple análisis de la secuencia de aminoácidos en las globinas de los individuos afectados. En otros casos la identificación del gen afectado requiere estudios muy complejos. Un ejemplo ilustrativo lo constituye la fibrosis cística, enfer-

medad que afecta al transporte de iones Cl^- en las células epiteliales de los conductos respiratorios, y cuya manifestación clínica más frecuente es la obstrucción de éstos por mucosidad. La identificación del gen afectado se llevó a cabo estudiando el ligante de la enfermedad con marcadores polimórficos, lo que permitió localizar el gen en una zona del cromosoma 7 humano. El clonaje y secuenciación de dicha zona condujo finalmente al aislamiento de un gen que mostraba diferencias entre individuos normales y afectados. Dicho gen, que ocupa 250.000 pares de bases y contiene 27 exones, codifica la proteína CFTR (reguladora transmembranal de la conductancia) de 1.480 aminoácidos, y su mutación más frecuente es la deleción de 3 pares de bases en el exón 10, lo que origina la pérdida de una fenilalanina en el producto final. (Collins, 1992).

b) Una vez identificado el gen, éste debe ser aislado por medio de las ya normales técnicas de recombinación in vitro.

c) El tercer paso sería la introducción del gen normal en células que permitan su expresión. Teóricamente, las células receptoras podrían ser tanto somáticas como de la línea germinal. En este caso, la Terapia Génica se convierte en una tecnología diferente: la construcción de organismos transgénicos, capaces no sólo de expresar el transgen, sino también de transmitirlo a su descendencia, técnica que está resultando muy útil en el campo de la experimentación genética, pero que no es aplicable a humanos, tanto por razones éticas como médicas, ya que su finalidad no es la curación de organismos vivos presentes, sino, en todo caso, la manipulación genética de organismos futuros.

3.2.- Células blanco

Ciñéndonos al campo de la Terapia Génica en sentido estricto, la administración de genes exógenos puede llevarse a cabo idealmente en las células pertenecientes a los tejidos que normalmente deben expresar el gen correspondiente. Sin embargo, esto no es absolutamente necesario en muchos casos, ya que si el producto génico está destinado a actuar en una parte del organismo diferente al tejido en que se produce, se puede recurrir a células pertenecientes a tejidos alternativos.

Un ejemplo lo constituyen los linfocitos, en el caso de la deficiencia en ADA. El gen que codifica este enzima puede ser transferido no ya a las células precursoras del tejido hematopoyético, sino a linfocitos maduros del paciente

que, una vez transformados genéticamente se reinsertan en el propio individuo. Este tipo de terapia ha de ser repetitiva, ya que los linfocitos poseen una vida limitada. Otro tipo de terapia génica en que la célula blanco es diferente del tejido que normalmente expresa el gen es la que se aplica en casos de enfisema pulmonar, enfermedad que se caracteriza por la ausencia de alfa antitripsina, cuyo gen se expresa en el hígado (Kay *et al*, 1992). Este enzima neutraliza la acción de la elastasa neutrofílica, capaz de digerir los alveolos pulmonares si no es debidamente neutralizada, provocándose así el enfisema. En este caso, las células alternativas encargadas de expresar el gen defectivo son también linfocitos que, una vez transformados genéticamente, son administrados directamente al pulmón por medio de aerosoles.

3.3.– Modalidades de la introducción del transgen

La administración de genes funcionales a células que poseen un gen homólogo no funcional, ya sea por mutación del propio gen o de sus elementos de control, puede hacerse de dos modos diferentes (Tabla 2).

a) Añadiéndolo al genoma, sin preocuparse de la presencia del gen endógeno. Esta metodología presenta inconvenientes, tales como efectos de posición, falta de especificidad de tejido, mutación imprevista por inserción de otros genes, activación no deseada de oncogenes o, en el caso de codominancia del gen mutado, que la mera presencia del gen funcional no garantice la curación de la enfermedad.

b) Sustituyendo el gen no funcional por el exógeno, lo que puede llevarse actualmente a cabo mediante la técnica llamada “puntería genética” o recombinación homóloga, actualmente en rápido desarrollo, y sobre la que volveremos a hablar más tarde.

La introducción de genes exógenos en células somáticas requiere tres pasos fundamentales:

- a) explante de células del individuo afectado
- b) introducción del gen exógeno en dichas células
- c) reimplante en el paciente de las células modificadas genéticamente.

Estos pasos requieren que las células a tratar exhiban una serie de características, como ser fácilmente explantables, capaces de proliferar *in vitro*, y de

TABLA 2 .– Modos de suministrar genes exógenos.

ADICION (Gen endógeno defectivo presente)

Inconvenientes:	-Efectos de posición -Posible mutación insercional -Posibilidad de activación de oncogenes -Interferencia entre productos génicos normales y defectivos, en el caso de proteínas multiméricas (Anemia falciforme y Osteogénesis Imperfecta)
Ventajas:	-Procedimiento eficiente

SUSTITUCION (Gen endógeno eliminado)

Inconveniente:	-Baja eficiencia de sustitución con los medios actuales.
Ventajas:	-Las opuestas a los inconvenientes de la adición y la perfecta regulación de la expresión del gen exógeno

regenerar el tejido de procedencia. Los tejidos que mejor cumplen estas condiciones son: médula ósea, hígado y piel.

3.4.– Métodos de introducción del transgen

Una vez explantado el tejido receptor del transgen, éste ha de introducirse por una de las técnicas enumeradas en la Tabla 3. Los métodos fisicoquímicos tienen el gran inconveniente de que normalmente el DNA se integra en copias múltiples, a menudo repetidas en tándem, lo que determina que la dosis génica final no sea controlable. Por otra parte, estos métodos someten a las células a

condiciones muy alejadas de las fisiológicas, con la consiguiente pérdida de viabilidad, lo que determina una pérdida de eficiencia neta.

En cuanto a los métodos físicos, a la mencionada carencia de control del número de copias introducidas se suma la extrema laboriosidad del método, lo que hace que la cantidad de células tratadas sea limitada, lo que dificulta su posterior selección.

Los métodos biológicos disponibles para la introducción de genes exógenos se basan en el uso de virus con vectores, aprovechando su capacidad natural para introducir su propio material genético en la célula huésped y así iniciar su ciclo biológico.

TABLA 3. Métodos para la introducción de genes

FISICOQUIMICOS

Coprecipitación del DNA con $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ (PO_4Ca)

Fusión con liposomas

Fusión con eritrocitos fantasmas

FISICOS

Electroporación

Microinyección

Microproyectiles

BIOLOGICOS

Vectores virales

Virus DNA (Polyoma, SV40, AAV, Herpes)

Virus RNA - RETROVIRUS

4.- Los retrovirus en la terapia génica

Entre los virus que se utilizan para la transferencia génica se encuentran los adenovirus, un parvovirus, el AAV (Adeno-associated virus) y los herpesvirus, todos ellos con DNA como material genético. El primer grupo citado presenta

el inconveniente de su escasa capacidad de integración del DNA. En cuanto a AAV, con alta capacidad de integración, ésta se lleva a cabo de manera específica en un lugar del genoma situado en el cromosoma 19 humano, lo que impide una selección por selección de lugares de integración más convenientes. Actualmente se están desarrollando vectores basados en herpesvirus, aprovechando su capacidad de infectar células del sistema nervioso central, con el fin de realizar terapia en dicho sistema.

La mayor parte de los proyectos de terapia génica actualmente en curso utilizan, sin embargo, vectores basados en retrovirus.

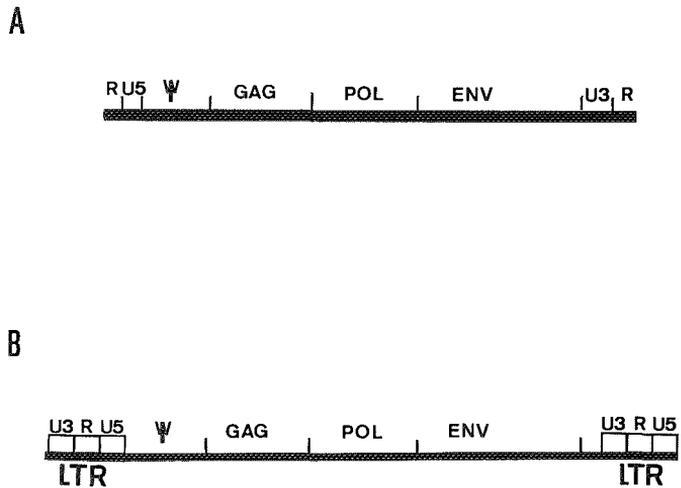
4.1.- Definición y estructura génica de los retrovirus

Los retrovirus pueden definirse como virus con RNA como material genético, y con una fase de DNA en su ciclo biológico.

Antiguamente eran denominados virus tumorales RNA u oncornavirus, dada su capacidad de producir neoplasias (sarcomas o leucemias).

La partícula viral contiene dos moléculas idénticas de RNA de cadena positiva, es decir, con la misma polaridad que el RNA mensajero viral. En cada molécula están contenidos tres genes (Fig. 1a): *gag*, que codifica las proteínas

Figura 1. a) Estructura del RNA viral de un retrovirus no defectivo. La región denominada con la letra griega Psi es la zona que contiene las secuencias necesarias para la encapsidación de la molécula. b) Estructura del provirus. Las líneas sinuosas representan DNA del huésped. Obsérvese la repetición a uno y otro lado de las secuencias U3, R y U5 para dar lugar a las LTRs.



internas del virión, *pol*, que codifica una DNA polimerasa dependiente de RNA (Reverso-transcriptasa o RT) y otro enzima llamado integrasa. El tercer gen viral, *env*, codifica las proteínas de la envuelta del virus. Aparte de los genes estructurales, los extremos del RNA contienen regiones de control: R, repetida en ambos extremos, U5 y U3, así como las regiones adyacentes a estas últimas, todas ellas necesarias para las transcripciones reversa y directa del virus.

A la entrada del virus en la célula infectada, un complicado mecanismo de transcripción reversa realizado por la RT produce, a expensas del RNA viral, que se destruye en el proceso, una molécula de DNA de doble cadena, colinear con el RNA, pero en el que las regiones U3, R y U5 quedan duplicadas, formando a ambos lados las llamadas repeticiones terminales largas, ó LTRs. Una vez formada la molécula de DNA, la integrasa entra en acción para integrar el DNA en lugares al azar del genoma de la célula huésped. El DNA queda así en un estado que recibe el nombre de provirus (Fig. 1b). El provirus se comporta a efectos de replicación como un gen más de la célula, pero en cuanto a expresión, el LTR izquierdo, que contiene un fuerte promotor, determina la expresión de los genes virales, con lo que se producen nuevos virus que abandonan la célula por gemación, cerrándose así el ciclo.

En algunos retrovirus, parte del genoma viral ha sido sustituido, mediante un mecanismo de recombinación no caracterizado, por oncogenes que se originan como mutación o truncamiento de protooncogenes celulares. Estos virus, que son defectivos en su replicación, necesitando a este efecto la coinfección con virus no defectivos, son, sin embargo capaces de transportar (transducir) oncogenes a las células que infectan, y producir tumores, como sucede en el caso del virus de la leucemia murina de Moloney, cuyo oncogen, *mos*, fue uno de los primeros oncogenes conocidos y caracterizados.

4.2.- Vectores retrovirales

La naturaleza transductora que exhiben algunos retrovirus, así como el agrupamiento en el genoma de zonas estructurales y no estructurales bien definidas, determinó que se abordase el diseño de vectores de transferencia génica basados en retrovirus. Los primeros vectores retrovirales (Eglitis y Anderson, :1988) se construyeron a partir del provirus correspondiente al virus de la leucemia murina de Moloney, análogo al del sarcoma anteriormente

citado, pero no defectivo. Una vez clonado el provirus, se le desprovoyó de los genes estructurales, que fueron sustituidos por:

- a) un gen testigo, capaz de delatar la presencia del provirus. (generalmente un gen de resistencia a antibiotico).
- b) un sitio apropiado para introducir el gen que se desea transferir.

La figura 2 es un ejemplo de vector retroviral, llamado pM5 NEO. En este caso, el gen testigo es un gen bacteriano de resistencia a neomicina, pero que en células eucarióticas produce resistencia al antibiotico sintético G418.

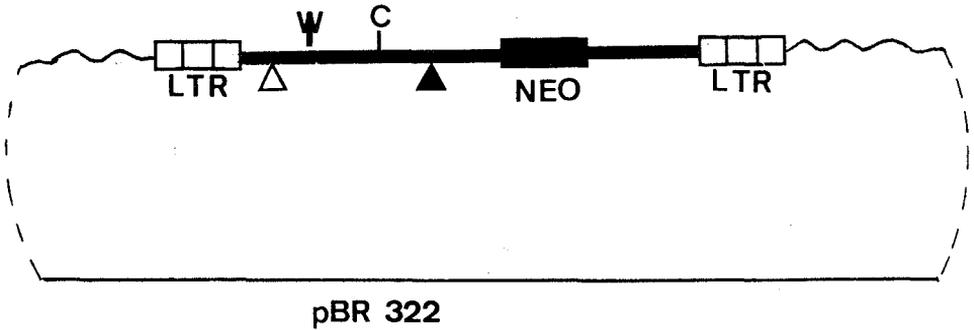


Figura 2. Estructura del plásmido pM5 NEO. Las líneas sinuosas representan secuencias del genoma de ratón que fueron clonadas junto con el provirus original (un derivado del virus de la leucemia murina de Moloney). Las líneas gruesas representan secuencias virales, mientras que las líneas finas son secuencias del plásmido bacteriano pBR 322, usado para clonar y propagar en *E. coli* esta construcción.

Los rectángulos blancos representan las LTRs. El rectángulo oscuro es el gen bacteriano *neo* de resistencia a *G418*. El sitio señalado con la letra C, contiene dianas de restricción y es el apropiado para insertar el gen exógeno que se desea transferir. Los triángulos señalan los sitios donante (blanco) y receptor (negro) de "splicing". Obsérvese que el gen *neo* no lleva promotor propio, sino que se traduce del RNA que, transcribiéndose desde el LTR izquierdo, sufre "splicing".

4.2.1.- Tipos vectores

El hecho de que los vectores retrovirales posean dos genes, los cuales deben ser ambos expresados, ha llevado a construir varios tipos de vectores, los principales son:

a) aquellos en los que ambos genes se transcriben a partir del promotor situado en el LTR izquierdo. El gen distal se expresa por medio de un RNA mensajero que sufre “splicing” mediante los sitios donante y aceptor presentes en el provirus original. (En los virus no defectivos, el gen *env* se traduce a partir de un RNA con “splicing”, mientras que los genes *gag* y *pol* se traducen de un RNA común que no ha sufrido tal proceso). El vector pM5 NEO de la Figura 2 es de este tipo.

b) aquellos en los que cada uno de los genes se transcribe a partir de un promotor independiente, pudiendo ser uno de ellos el propio del LTR.

4.2.2.- PROMOTORES

Los promotores mas utilizados en el segundo de los tipos citados pueden ser:

a) Virales, tales como promotores de citomegalovirus o del SV40. El promotor de citomegalovirus fue usado por Kay y colaboradores (1992) para transferir y expresar el gen humano de la alfa-antitripsina en hepatocitos de perro, que, una vez transfectados fueron reimplantados en el animal donante. Los resultados demostraron que los niveles del enzima humano, normales en un principio, iban decayendo con el tiempo, y ello era debido a inactivación del promotor. Análogos resultados fueron obtenidos por el grupo de Palmer (1991), introduciendo en fibroblastos de ratón el gen de la adenosina deaminasa (ADA) humana expresado a partir del mismo promotor. El mecanismo de la inhibición de este tipo de promotores no esta caracterizada, habiendose determinado únicamente que no es debida a metilación.

b) Celulares. Para obviar la posible inhibición de los promotores virales, Sharfman y colaboradores transdujeron, mediante vectores retrovirales, un gen bacteriano, que codifica beta-galactosidasa, (cuya actividad es fácil de detectar mediante técnicas histoquímicas), bajo el control de dos promotores diferentes, uno de ellos el citado promotor de citomegalovirus, y el otro, el correspondiente al gen que codifica la dihidrofolato reductasa. Este enzima pertenece a un grupo de enzimas no inducibles que se expresan normalmente en todo tipo de tejidos (genes “housekeeping” o de mantenimiento celular). Los resultados demostraron que mientras el promotor viral exhibía una vez mas inactivación, el promotor celular mantuvo su actividad durante muchos meses, una vez las células transducidas habían sido reimplantadas en el animal donante.

4.3.- Empaquetamiento

Para que un vector retroviral sea efectivo, es decir, exhiba las características ventajosas de la infección con partículas de retrovirus, el paso siguiente a la construcción de vectores retrovirales es su conversión en RNA que entre a formar parte de partículas virales. El vector retroviral es, por otra parte, defectivo, en cuanto que no posee los genes estructurales necesarios para la producción de partículas infectivas. La encapsidación del RNA producto de la transcripción del vector retroviral se consigue mediante el uso de estirpes celulares llamadas empaquetadoras (McLachlin et al, 1990), que contienen un provirus retroviral completo, excepto para una zona indispensable para la encapsidación del RNA. Estas estirpes celulares producen continuamente cápsidas vacías. Sin embargo, cuando se les introduce, por uno u otro de los medios físicos enumerados mas arriba, un vector retroviral (el cual ha de incluir necesariamente la secuencia de empaquetamiento), los RNAs transcritos a partir de este son capaces de ser encapsidados y aptos para ser utilizados como virus transductores.

4.4.- Vectores retrovirales y terapia génica de sustitución

Anteriormente hemos señalado que una de las modalidades posibles de la administración de genes exógenos sería la sustitución de un gen defectivo por su homólogo no defectivo. Este tipo de transferencia génica de sustitución, que esta siendo actualmente objeto de muchos estudios (Capecchi, 1989), y que recibe normalmente el nombre de “gene targeting” (“puntería genética”), se basa en la recombinación entre segmentos homólogos de ambos genes, endógeno y exógeno. Todos los estudios actuales (encaminados mas que a la terapia génica, a la construcción de animales transgénicos con genes predeterminadamente inactivados), se realizan por medio de vectores no virales, lo que implica que la introducción del gen exógeno en las células receptoras haya de hacerse por microinyección o electroporación. En nuestro laboratorio estamos investigando la posibilidad de utilizar vectores retrovirales como instrumentos de sustitución génica, para lo cual hemos desarrollado un modelo que consta de dos componentes:

a) Células de ratón en las cuales hemos introducido el gen de la timidina kinasa del virus herpes, *htk*. Este gen se transcribe a partir de su propio promotor, pero esta inactivado por una mutación en su parte media. (células HTK-).

b) Un vector retroviral que contiene el gen *htk* sin la mutación citada, pero desprovisto esta vez del promotor y parte de su extremo 5'. El vector contiene, además, una deleción en un extremo, para evitar su integración por medio de integrasa.

Los retrovirus recombinantes preparados mediante encapsidación del vector retroviral, tras infectar las células HTK-, producen un DNA que puede interaccionar con el genoma celular de dos formas diferentes: integración al azar e integración por recombinación homóloga. Sólo en este caso, la integridad del gen *htk* puede ser restituida, dando lugar a células con actividad timidina kinasa, seleccionables en presencia de aminopterina y timidina (células HTK+). El uso de marcadores genéticos adicionales presentes en el vector nos permite determinar, por una parte, la frecuencia de recombinación homóloga respecto a la integración al azar y, por otra parte, la eficacia del método con respecto a los actualmente usados, no basados en retrovirus.

REFERENCIAS

1) Generales

- Anderson WF. (1992). Human gene therapy. *Science* 256:808-813.
- Beutler E. (1992). Gauscher disease: New molecular approaches to diagnosis and treatment.
- Felgner PL and Rhodes G. (1991). Gene therapeutics. *Nature* 349:351-352.
- Levin F and Friedmann T. (1991). Gene therapy techniques. *Current Opinion in Biotechnology* 2:840-844.
- Miller A. D. (1992). Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455-460.
- Verma IM and Naviaux RK. (1991). Human gene therapy. *Current Opinion in Genetics and development* 1:54-59.

2) Citada

- Capecchi M. R. (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *TIG* 5:70-76.
- Collins F. S. (1992). Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256:774-779.
- Eglitis M. A and Anderson W. F. (1988). Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells. *BioTechniques* 6:608-614.
- McLachlin J. R. et al. (1990). Retroviral-mediated gene transfer. *Prog. Nucl Acid Res. and Mol. Biol.* 38:91-135.
- Kay MA et al. (1992). Expression of human alpha 1antitripsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *PNAS* 89: 89-93.
- Palmer T. D. et al. (1991). Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *PNAS* 88:1330-1334.
- Scharfmann R. et al. (1991). Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *PNAS* 88:4626-4630.