

# Terapia Génica: Vectores Virales y sus Aplicaciones

## Gene therapy: Viral vectors and applications

Beatriz E. China Rodríguez

Tutor:

Óscar Escribano Blanes

Universidad Complutense de Madrid

### *Resumen*

La terapia génica se basa en la modificación del repertorio genético utilizando vectores virales (retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados) o no virales (lisosomas, DNA desnudo). Los virus adenoasociados presentan diversas aplicaciones al poder infectar diversos tipos celulares, aunque están limitados por no poder incluir transgenes grandes y por su inmunogenicidad. Los vectores retrovirales pueden causar genotoxicidad, mientras que los vectores lentivirales tienen menor posibilidad de efectos mutagénicos adversos, siendo importantes en el avance de la terapia génica dirigida al sistema nervioso central. En los próximos años, estos avances en el desarrollo de vectores y el posible uso de la edición génica pueden conducir a avances significativos en el tratamiento de enfermedades hepáticas, renales, pulmonares, musculares, cardíacas y neurológicas.

*Palabras clave: terapia génica, vectores virales, virus adeno-asociados, vectores lentivirales, retrovirus.*

### *Abstract*

Gene therapy is based on the modification of the genetic repertoire using viral vectors (retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-associated virus) or non-viral vectors (lysosomes, naked DNA). Adeno-associated viruses have various applications to infect different cell types, although they are limited by not being able to include large transgenes and by their immunogenicity. Retroviral vectors can cause genotoxicity, while lentiviral vectors have less possibility of adverse mutagenic effects, being important in the advance of gene therapy in the central nervous system. In the years to come, these advances in vector development and possible use of gene editing can lead to significant improvements in the treatment of liver, kidney, lung, muscle, heart and neurological diseases.

*Keywords: gene therapy, viral vectors, adeno-associated virus, lentivirus, retroviruses.*

## Introducción

La terapia génica es una estrategia terapéutica basada en la modificación del repertorio genético de cualquier tipo celular mediante la administración de ácidos nucleicos y destinada para el tratamiento de enfermedades monogénicas o multigénicas, aunque su aplicación ha sido más efectiva en enfermedades monogénicas. A comienzos de 1970, la manipulación genética, la adición de elementos reguladores y el uso de virus, principalmente para conducir su entrada en las células indicadas, atrajo a muchos científicos hacia el estudio de la terapia génica (Fischer, 2016) como forma de añadir copias de un gen para: modificar un gen (por ejemplo omitir un exón), para inactivar un gen (por ejemplo en el marco de una mutación dominante con un efecto trans negativo) o para corregir una mutación genética a base de tecnología recombinante.

El vector es el medio transportador que permitirá introducir el material genético de interés en el paciente (Lukashhev y Zamyatnin, 2016). Durante la evolución, los virus desarrollaron diversos mecanismos de entrada en las células, para la preservación prolongada de su propio material genético generando procesos de supresión o modificación de mecanismos protectores en el organismo huésped.

Actualmente, se están haciendo grandes descubrimientos, tanto en virus adenoasociados como en retrovirus y lentivirus, sobre su posible uso en terapia génica. Las tecnologías disponibles han hecho posible la terapia génica tanto *ex vivo* (transducción de células fuera del cuerpo, luego se introducen estas células en el paciente, por tanto, el vector en sí mismo no es administrado directamente al cuerpo del paciente) como *in vivo* (se inyecta el vector directamente en el paciente, las células son corregidas en el paciente para obtener el efecto terapéutico) teniendo el transgén no integrado o integrado en el genoma. En función del tipo de virus se pueden infectar células quiescentes (lentivirus y virus adeno-asociados), o células en división (retrovirus, lentivirus y virus adeno-asociados; Fischer, 2016; Kantor, McCown, Leone y Gray, 2014).

Los virus adenoasociados (AAV) pueden infectar todo tipo de células y logran mantener estable el transgén. Estos vectores pueden ser manipulados de forma relativamente fácil como virus no replicativos y producidos en grandes cantidades; aunque su limitada capacidad para incluir transgenes grandes y su inmunogenicidad presentan inconvenientes en su aplicación terapéutica, pues al infectar humanos de forma natural generan respuestas inmunológicas neutralizando su eficacia. Sin embargo, algunas cepas de AAV infectan de manera menos frecuente a humanos (como AAV8 o 9), de forma que el sistema inmune no reacciona contra el vector.

Los retrovirus gamma y lentivirus han sido diseñados para llevar el material genético a las células y conducir a una integración estable en el genoma, pero el principal inconveniente de la utilización de vectores retrovirales es el carácter semi-aleatorio de su integración, que puede causar genotoxicidad, mientras que los vectores lentivirales reducen la posibilidad de efectos mutagénicos.

## Discusión

Las primeras décadas de investigación en el campo de virus adenoasociados fueron realizadas con AAV serotipo 2, la cepa más prevalente en la población humana, tanto en el hígado para el tratamiento de la hemofilia B (Miao, 2016), en el pulmón para el tratamiento de la fibrosis quística y en el cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Asokan, Schaffer y Jude Samulski, 2012). Los ensayos clínicos para esta última han mostrado resultados alentadores, pero su efecto placebo ha hecho difícil la evaluación del potencial de la terapia génica; sin embargo, otros ensayos han caracterizado cápsidas de AAV más eficientes que AAV2, como AAV9 y AAVrh10 (Kantor et al). Durante la última década, se han aislado varios serotipos y nuevas cepas de AAV, las cuales se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

En los pacientes tratados con vectores gamma-retrovirales los efectos adversos generalmente se han atribuido a la

Tabla 1  
Vectores AAV aislados adecuados para aplicaciones clínicas específicas.

Organs	Disease targets	AAV serotypes and isolates	Emerging vector candidates
Liver	Hemophilia, $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency, ornithine transcarbamylase deficiency	AAV8	AAV2 (Y→F), AAV7, AAV-HSC15/17
Heart	Congenital heart failure, cardiomyopathies	AAV1, AAV6, AAV9	AAVM41, AAV218, AAV9.45
Skeletal Muscle	Muscular dystrophies, $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency, lipoprotein lipase deficiency, lysosomal storage disorders	AAV1, AAV6, AAV9	AAV7, AAV2.5, AAV6 (Y445F/Y731F), AAV218, AAV9.45
Lung	Cystic fibrosis, $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency	AAV5	AAV6.2, AAV2.5T, AAV-HAE1/2
CNS	Parkinson's, Alzheimer's, Batten's, Canavan's, epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy, Rett syndrome, lysosomal storage disorders	Intracranial: AAV1, AAV5, AAV8 Systemic: AAV9	For systemic use: AAVrh.10, AAV Clone 32/83
Eye	Leber's congenital amaurosis, macular degeneration	AAV4, AAV8	AAVSh10, AAV2 (Y→F), AAV8(Y733F)

Tabla 2

Pruebas de terapia génica del SNC utilizando vectores retrovirales y lentivirales.

ID/References	Diseases	Vector	Title	Transgene	Phase
US-0322	Alzheimer	Retrovirus	A Phase I study of NGF ex vivo gene therapy for Alzheimer's disease	Nerve growth factor	I
US-0851	Multiple sclerosis	Retrovirus	Cell-based gene therapy using MRC-MBP for treatment of multiple sclerosis	Myelin basic protein	I/II
FR-0041	Parkinson's	Lentivirus	Study of the safety, efficacy, and dose evaluation of ProSavin for the treatment of bilateral idiopathic Parkinson's disease	Tyrosinase GTP Cyclohydrolase 1 DOPA decarboxylase	I/II
UK-0191	Parkinson's	Lentivirus	Study of the safety, and dose evaluation of ProSavin, administered using stereotaxic injection to the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease	Tyrosinase GTP Cyclohydrolase 1 DOPA decarboxylase	I/II
Cartier et al. (2009)	X-linked adrenoleukodystrophy	Lentivirus	Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy	ABCD1	I/II
Biffi et al. (2013)	Metachromatic leukodystrophy	Lentivirus	Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy	ARSA	I/II
Aiuti et al. (2013)	Wiskott-Aldrich syndrome	Lentivirus	Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome	WASP	I/II

ARSA, arylsulfatase A

integración del vector en el entorno de los protooncogenes específicos o genes específicos de tumores que dan como resultado una expresión dañina para el individuo. Posteriormente se ha demostrado que la integración de vectores lentivirales está asociada con una frecuencia significativamente menor de mutagénesis por inserción, además de una mayor pureza y rendimientos del vector. En el mismo estudio no se demostró que los vectores basados en HIV-1 indujeran la tumorigénesis. Además, los vectores lentivirales superan a los vectores  $\gamma$ -retrovirales en muchas aplicaciones dada su capacidad para transducir células en quiescencia replicativa (Kantor et al). En ensayos sobre la transducción lentiviral de células madre hematopoyéticas han demostrado tener función terapéutica (Wang y Torbett, 2015). En conjunto, las perspectivas son prometedoras para el crecimiento continuo del uso del vector lentiviral en ciertas aplicaciones clínicas, por ejemplo, ensayos clínicos que han establecido bases importantes en el avance de la terapia génica dirigida al sistema nervioso central (CNS), pues una vez que se haya logrado avanzar en la terapia génica para una enfermedad, la plataforma y el abordaje del vector pueden servir como plantilla para el tratamiento de una amplia gama de trastornos neurológicos (Kantor et al). Los estudios actuales en terapia génica del CNS se resumen en la tabla 2.

### Conclusión

Los avances clínicos que se han logrado en los últimos años, en los que se han determinado resultados favorables en el tratamiento de fisiopatologías, son en un limitado número de enfermedades entre las que se incluyen trastornos hereditarios del sistema inmune, leucodistrofias, hemofilia B, distrofia de retina, Parkinson y Alzheimer.

En algunos ensayos clínicos, que utilizan vectores lentivirales mediante transferencia *ex vivo*, se ha logrado la curación de la enfermedad sin causar genotoxicidad. Aunque una mayor comprensión de la capacidad de estos vectores y la confirmación de estos resultados preliminares requeri-

rán ensayos clínicos más amplios. El conjunto de vectores de AAV actualmente presentan una amplia gama de serotipos de origen natural, variantes rediseñados y cepas quiméricas y mutantes. Aunque aún se requieren nuevas estrategias para ampliar la cantidad de AAV actual y así permitir la generación de un mayor espectro de cepas sintéticas.

A pesar de todo, es posible que en poco tiempo los avances en el desarrollo de vectores, tanto víricos como no víricos, permitan una mayor aplicación de la edición génica como tratamiento médico.

### Referencias

- Asokan, A., Schaffer, D. V., & Samulski, R. J. (2012) The AAV vector toolkit: Poised at the clinical crossroads. *Molecular Therapy*, 20(4), 699-708. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.287>
- Fischer, A. (2016). Gene therapy: Myth or reality? *Comptes Rendus Biologies*, 339(7-8), 314-318. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.04.011>
- Kantor, B., McCown, T., Leone, P., & Gray, S. J. (2014) Clinical applications involving CNS gene transfer. *Advances in Genetics*, 87, 71-124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800149-3.00002-0>
- Lukashev, A. N., Zamyatnin, A. A., Jr. (2016) Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, 81(7), 700-708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>
- Miao, C. H. (2016) Hemophilia A gene therapy via intraosseous delivery of factor VIII-lentiviral vectors. *Thrombosis Journal*, 14(Suppl. 1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12959-016-0105-1>
- Soslau, G. (2016). DNA recombinante y biotecnología. En T. M. Devlin (Ed.), *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, Volumen I* (4ª Ed. pp. 279-329). Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Wang, C. X., & Torbett, B. E. (2015) Role of the mammalian target of rapamycin pathway in lentiviral vector transduction of hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Hematology*, 22(4), 302-308.