



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TÍTULO: Vectores Virales en Terapia Génica**

Autor: Julia María Coronas Serna

D.N.I.: 71303876N

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: Junio 2015

## **RESUMEN.**

Modificar el material genético de las células de un individuo con la finalidad de prevenir, paliar o curar una enfermedad es el principal objetivo de la Terapia Génica (TG). Los vectores virales, virus recombinantes defectivos, transfieren el DNA terapéutico pero ni se replican ni son patogénicos. Los más estudiados son los adenovirus, los virus adenoasociados y los retrovirus. En esta revisión bibliográfica se describen los protocolos de TG aplicada al Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa por déficit de Adenosina Desaminasa (SCID-ADA). En este caso se utiliza un vector retroviral, portador del gen ADA humano, *ex vivo* sobre células madre hematopoyéticas del propio paciente, que una vez modificadas se reimplantan como trasplante autólogo. También se detallan las mejoras técnicas en el diseño de vectores virales integrativos que minimicen el riesgo de mutagénesis insercional y potencial desarrollo de leucemia post-TG, junto a nuevas alternativas no virales. Por último, se identificaron en la base de datos de ensayos clínicos de U.S National Institutes of Health (NIH) 8 ensayos clínicos en fases I/II de TG *ex vivo* para SCID-ADA, 3 de los cuales desarrollan vectores lentivirales autoinactivados, como una alternativa más segura a los vectores  $\gamma$ -retrovirales que se aplicaron en los primeros ensayos.

## **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.**

### **Terapia Génica. Conceptos generales**

La Terapia Génica (TG) consiste en una serie de técnicas que permiten la transferencia de material genético a las células de un individuo, con la finalidad de corregir un defecto genético, para prevenir, paliar o curar una enfermedad<sup>1</sup>.

Durante las últimas cuatro décadas se han ido desarrollando poco a poco distintas estrategias para luchar contra enfermedades muy distintas: 1) Trastornos genéticos graves, como el Síndrome de la Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID de su denominación anglosajona) o las hemofilias A y B. 2) Enfermedades de larga duración como el cáncer, trastornos cardiacos y autoinmunes, que son multifactoriales y por tanto de abordaje mucho más complejo. 3) Patologías adquiridas como la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o el Virus de la Hepatitis B (HBV por su denominación en inglés).

Sin embargo, el avance de la terapia génica no estuvo exento de dificultades y diversas complicaciones. La aparición de graves efectos adversos, principalmente por problemas de seguridad relacionados con los vectores, provocaron un retraso en el desarrollo de estos tratamientos. Hasta la fecha sólo dos protocolos de terapia génica han sido autorizados:

Gendicine® en China (2004), p35 en adenovirus para el carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello, de administración *in vivo* intratumoral y Alipogene tiparvovec (Glybera®) en la Unión Europea (2012), lipoprotein lipasa en vector viral adenoasociado (AAV), que también se administra *in vivo*, por vía intramuscular en pacientes con deficiencia de lipoprotein lipasa familiar<sup>2</sup>.

La terapia génica implica una modificación del ADN, con lo cual no está exenta de controversias. Se consideran dos tipos de células: somáticas y germinales. Técnicamente ambas pueden ser modificadas con un objetivo terapéutico, pero con distintas implicaciones. La terapia génica en células somáticas presenta la dificultad de lograr un direccionamiento específico al tipo celular afectado y que los cambios pueden no ser permanentes. Sin embargo, al cambiar el ADN de una célula germinal, o bien de una célula embrionaria en sus primeros estadios, esta modificación se mantiene de por vida y se transmite a la descendencia, perpetuándose en las generaciones siguientes. Actualmente sólo se han autorizado ensayos en células somáticas. Así en esta revisión sólo se considerará de ahora en adelante este último enfoque.

Existen diversas formas de abordar la TG. 1) Transferir, mediante un vector, una copia funcional del gen defectuoso. En este caso se introduce en el núcleo celular el ADN codificante de la proteína que es deficitaria en el trastorno, para que la expresión de la misma permita la curación y reversión de los síntomas. 2) Inhibir la expresión de los genes endógenos que causan la patología. Mediante la transferencia de ARN de interferencia u oligonucleótidos antisentido que dificulten la expresión<sup>1</sup>, o administrando nucleasas muy específicas<sup>3</sup>. 3) Corrección de los genes: implica eliminar el gen defectuoso original y sustituirlo por una copia funcional, en lugar de aportar solamente éste último.

Contemplando la modalidad de TG que consiste en introducir una copia sana del gen en la célula somática que lo necesita, se identifican dos estrategias: 1) TG *in vivo*: La técnica se aplica sobre el paciente directamente y 2) TG *ex vivo*: la transformación se realiza en las células aisladas del individuo. Las células se extraen del paciente, se cultivan, reciben el gen terapéutico y luego son reimplantadas en el paciente<sup>1,4</sup>.

### **Vectores virales. Tipos y características**

Para introducir el gen terapéutico en la célula diana es necesario disponer de vectores, vehículos que facilitan la llegada del ADN al núcleo<sup>1</sup>. Pueden clasificarse en dos tipos. 1) Vectores virales: Virus modificados para que transporten el material genético de interés. 2)

Vectores no virales: Nanopartículas sintéticas de distinta naturaleza y estrategias basadas en endonucleasas específicas.

El vector ideal en TG debe ser: fácil de obtener, ofrecer gran capacidad de carga (genes de gran tamaño), actuar tanto sobre células en división como en células que ya no se replican, que no genere respuesta inmune, sea fácil de dirigir a diferentes tipos celulares concretos, logre que el DNA se mantenga y se exprese un tiempo prolongado y que incluya un sistema de regulación de la expresión de la proteína terapéutica<sup>5</sup>.

Los virus fueron los primeros en ser utilizados como vectores. Están compuestos por un ADN o ARN rodeado por una cápsida proteica y además, en el caso de los virus envueltos, una envuelta lipoproteica. Presentan una alta eficacia como vehículos de ácidos nucleicos, ya que se aprovecha su sistema natural de replicación, que requiere la introducción de su material genético en tipos celulares concretos, reconocidos por receptores en la membrana plasmática<sup>5</sup>.

Para generar un vector viral apto para terapia génica a partir de un virus silvestre, es preciso generar virus modificados, recombinantes y defectivos, es decir, insertar el gen de interés y eliminar alguna función necesaria para su replicación que reduzca su patogenicidad. La estrategia general para modificar los virus consiste en generar dos plásmidos, uno que incluya el genoma viral, al que se le han eliminado genes indispensables para la replicación o de interacción patogénica con la célula hospedadora y las señales de empaquetamiento y otro que lleve el gen terapéutico con las señales de empaquetamiento. En líneas celulares empaquetadoras, que han sido manipuladas para que expresen estos genes esenciales del virus separados entre sí, se cotransforman los plásmidos anteriores. Dentro de la célula se generan partículas virales, que incluyen el gen de interés en vez de los genes eliminados, que posteriormente se aíslan y purifican. No se generan partículas patogénicas, ya que sólo las partículas con el gen terapéutico presentan señal de empaquetamiento<sup>5</sup>.

Entre los vectores virales más utilizados se encuentran los adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, retrovirus, entre otros (alfavirus y vaccinia)<sup>1,4</sup>.

1.-Adenovirus: Los adenovirus son virus ADN de doble cadena (dsDNA) sin envuelta, de nucleocápside icosaédrica, de la que parten filamentos proteicos para el reconocimiento de la célula diana. Son responsables de las principales enfermedades de vías respiratorias altas, con muy buen tropismo por células humanas<sup>5</sup>.

El genoma adenoviral es de aproximadamente 35 kb de tamaño. Presenta dos regiones donde se agrupan distintos genes: genes tempranos (early) y tardíos (late). Estas últimas contienen la información para la formación de las partículas virales, sin embargo, las

tempranas se expresan antes de comenzar la replicación de los viriones y pueden dividirse en cuatro áreas: en E1, genes que interfieren con la célula hospedadora; en E2, las proteínas necesarias para la replicación; en E3, sistemas de evasión del sistema inmune y en E4, proteínas silenciadoras de genes de la célula infectada, regulando el tráfico de ARNm<sup>5</sup>.

El ciclo replicativo de un adenovirus es sencillo: se une a un receptor de membrana específico para después ser internalizado por endocitosis. La propia cápside adenoviral desestabiliza el endosoma, que se rompe y libera las partículas virales al citoplasma. Así las nucleocápsides llegan a la membrana nuclear y son capaces de introducir el genoma viral a través de los poros nucleares<sup>5</sup>.

Para generar adenovirus recombinantes defectivos se aplica la estrategia general. Delecionando la región E1 se logra una capacidad para 5kb, y si además se eliminan E3 y E4 se alcanzan las 7-8kb. Los últimos avances pasan por la obtención de adenovirus vacíos, con una capacidad teórica de 30 kb<sup>5</sup>.

Ventajas: infectan todo tipo de células, tanto si se dividen como si no y son estables y fáciles de purificar y concentrar. Inconvenientes: toxicidad a dosis altas, generan una fuerte respuesta inmune (destacar el caso de una muerte en un ensayo clínico en 1999)<sup>6</sup>, no son integrativos y la duración de la expresión es limitada, sobre todo en células en división<sup>5</sup>. Hoy en día son los más utilizados *in vivo*, para ocasiones en las que no se requiere una expresión duradera del gen. Un ejemplo es Gendicine®, cuyo objetivo es expresar p53 en las células tumorales.

2.-Adenoasociados (AAV): Son virus ADN monocatenario (ssDNA) sin envuelta que necesitan de la confección con otro virus (adenovirus o herpesvirus) para completar su ciclo. Infectan al ser humano pero no son patógenos. El genoma de un AAV es de 4,8 kb y tiene dos regiones codificantes: cap, que codifica las tres proteínas de la cápside, y rep, que codifica 4 proteínas necesarias para la replicación viral<sup>5</sup>.

La infección por AAV comienza por la unión a receptores celulares y su entrada en la célula. El genoma viral entra en el núcleo, se convierte a doble hebra y se integra en un locus específico localizado en el brazo largo del cromosoma 19 humano (banda 19q13), dirigido por proteínas de la célula infectada y por dos proteínas virales. Así el genoma viral queda integrado en el genoma, como un provirus latente. Ante una sobreinfección por adenovirus ó herpesvirus, el AAV comienza su fase lítica con la transcripción de los genes virales, la replicación del genoma viral y el empaquetamiento en las cápsides para dar lugar a nuevos viriones<sup>5</sup>.

El mecanismo de obtención de vectores AAV es muy similar al anterior, solo que necesita además la coinfección con un adenovirus silvestre, o bien incluyendo un tercer plásmido con las funciones del virus, lo que reduce el riesgo de contaminación por adenovirus al purificar los AAV.

Ventajas: buena infectividad, transducen células en división y no mitóticas, integración en el genoma de la célula huésped, muy baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune celular. Inconvenientes: requieren de las funciones de un adenovirus para su obtención, y la especificidad de la integración en un locus concreto se pierde en los AAV recombinantes, y en consecuencia, la integración se realiza al azar. Los AAV están ganando popularidad rápidamente y están especialmente indicados en aplicaciones *in vivo* en las que se requiere una expresión prolongada del gen terapéutico<sup>5</sup>. Un ejemplo es Glybera®, cuyo objetivo es expresar la lipoproteína lipasa y se administra vía intramuscular.

3.-Virus Herpes: Basados en el virus Herpes simplex (HSV), son virus envueltos con un genoma lineal de 152 kb de dsDNA. Tienen un marcado tropismo neuronal. Tras la entrada en la célula, el virus penetra por los poros nucleares. Se expresan entonces los genes inmediatos tempranos, que activan la expresión de los genes tempranos (necesarios para la síntesis de ADN viral) y de los genes tardíos (proteínas estructurales). Cuando no se replican entran en un periodo de latencia, donde se expresan solamente los genes de la región de latencia de forma persistente. Además, se trata de vectores de gran capacidad porque permiten acomodar hasta 50 kb de ADN exógeno<sup>5</sup>.

4.-Retrovirus: Son virus ARN de polaridad positiva (+RNA) envueltos, de cápside icosaédrica que contiene la transcriptasa inversa (RT), la integrasa y dos copias del genoma viral. Éste tiene 3 tipos de genes: genes gag (que codifican las proteínas de la cápside), genes pol (que codifican las enzimas necesarias para el ciclo viral, como la proteasa y la integrasa) y genes env (que codifican las glicoproteínas de la envuelta)<sup>5</sup>.

El ciclo replicativo de los retrovirus comienza cuando el virus es reconocido por receptores celulares, seguido de la fusión de la envuelta viral con la membrana celular y a la internalización del nucleoide. A continuación tiene lugar la retrotranscripción del genoma para formar un ADNc bicatenario, dentro de la nucleocápside, después se desensambla la cápside y se transporta al núcleo. Mediante la integrasa, el genoma viral se integra en el genoma de la célula hospedadora, y entonces comienza la transcripción. Los ARNm son exportados al citoplasma y traducidos, dando lugar a poliproteínas gagpol, que forman nuevas nucleocápsides al unirse a la señal de empaquetamiento de los ARN positivos, y a las proteínas de la envuelta, que se dirigen a la membrana<sup>5</sup>.

Tras el empaquetamiento, que tiene lugar en el citoplasma, las cápsides salen de la célula por evaginación de la membrana, quedando rodeadas de nuevo por una envuelta fosfolipídica procedente de la célula hospedadora que contiene las glicoproteínas codificadas por el virus que habían llegado anteriormente a la bicapa. Las nuevas partículas retrovirales se activan cuando la proteasa rompe la poliproteína gagpol dentro de la propia partícula viral y da lugar a moléculas independientes de proteasa, integrasa y retrotranscriptasa. Para generar un retrovirus recombinante defectivo, se sigue el esquema general descrito anteriormente<sup>5</sup>.

La familia Retroviridae está compuesta por las subfamilias Spumaviridae, Lentiviridae y Oncoviridae. Los derivados de oncovirus murinos tipo C o  $\gamma$ -retrovirus han sido los más utilizados, en concreto el virus de leucemia murina (MLV)<sup>7</sup>. Ventajas: tienen buena infectividad, amplio tropismo y son integrativos, con lo cual aseguran una larga duración de la expresión. Inconvenientes: baja capacidad de carga (7-8kb), son bastante lábiles y difíciles de purificar, son inactivados por el sistema del complemento, sólo transducen células en división y se han detectado casos de procesos oncogénicos en algunos ensayos clínicos<sup>8</sup>. Se aplican principalmente en terapia génica *ex vivo* transformando células madre hematopoyéticas (HSC), por ejemplo en el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID), como se detalla más adelante.

Por otro lado, recientemente se han desarrollado vectores retrovirales basados en lentivirus, familia a la cual pertenece el HIV1, uno de los virus mejor estudiados. Algunas de las proteínas virales tienen señales de localización nuclear y facilitan la entrada del virus por los poros nucleares. Por eso, al contrario que los oncovirus, presentan la ventaja de infectar células que no están en división y parecen evitar algunos de los problemas de seguridad de estos. Su principal aplicación está en la transferencia de genes a células del sistema nervioso *in vivo*, y a progenitores hematopoyéticos *ex vivo*, que también se aplica en el SCID<sup>5</sup>.

### **Terapia génica en las inmunodeficiencias primarias.**

Las inmunodeficiencias primarias (PID por sus siglas en inglés) son un conjunto de enfermedades raras hereditarias en las que por el déficit de un gen concreto y único (enfermedades monogénicas), se observan alteraciones graves del sistema inmunitario. Se conocen más de 190 genes cuya ausencia puede desencadenar uno de estos cuadros que reducen considerablemente la esperanza de vida del paciente<sup>2</sup>. El tratamiento de elección es el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) de HLA compatible. Para aquellos casos en los que es imposible localizar un donante adecuado, la terapia génica se ofrece como una alternativa inigualable.

Las PID más estudiadas son el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID por sus siglas en inglés) también conocida como la enfermedad de los niños burbuja, que puede ser debido a la ausencia autosómica recesiva de la Adenosina Deaminasa (SCID-ADA), donde se ve interrumpida la ruta catabólica de las purinas; o bien a una mutación en la cadena gamma del receptor de IL-2 ( $\gamma_c$ ), localizado en el cromosoma X, es decir SCID ligado al cromosoma X (SCID-X1). En ambos casos se ve afectada la línea linfoide, ya sea porque no se produce o por presentar una función disminuida. Otras PID que también han sido objetivo de la TG son el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) y la enfermedad crónica granulomatosa (GCD)<sup>2</sup>.

### **OBJETIVOS.**

1) Descripción de los vectores virales y los protocolos aplicados en la terapia génica para el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa por déficit de Adenosina Desaminasa.

2) Búsqueda de los avances tecnológicos desarrollados recientemente en materia de vectores integrativos encaminados a mejorar la seguridad de este tratamiento.

3) Revisión de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo para la terapia génica de esta enfermedad.

### **METODOLOGÍA.**

Se realizaron búsquedas bibliográficas en las bases de datos PubMed (NCBI)<sup>9</sup> con las palabras clave “viral vector” “gene therapy”, limitándose a aquellas revisiones publicadas entre 2010 y 2015 y en humanos como especie de estudio. Se consultaron las revistas especializadas Nature Gene Therapy y Blood.

Búsqueda de ensayos clínicos. La búsqueda de ensayos clínicos se realizó en la base de datos de ensayos clínicos<sup>10</sup> de U.S National Institutes of Health (NIH), aplicando los términos de búsqueda: "gene therapy" OR "gene transfer" OR "virus delivery", en enfermedad: "Severe Combined Immunodeficiency" AND "Adenosine Deaminase Deficiency" y se seleccionaron aquellos ensayos clínicos de diseño experimental (no observacional). Los gráficos generales se obtuvieron del sitio web del Journal of Gene Medicine<sup>11</sup>, base de datos que recoge información sobre ensayos clínicos en TG de las agencias oficiales, literatura científica y presentaciones y posters de congresos y conferencias. La información de esta página se encuentra actualizada a fecha de enero de 2015.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **¿Qué es el SCID por déficit de ADA?**

ADA es la encargada de la de una de las etapas de degradación de purinas, en concreto es responsable de la desaminación de adenosina y 2'-desoxiadenosina para formar inosina y 2'-desoxiinosina, respectivamente. Cuando falta esta enzima, se acumulan ambos metabolitos, pero es el aumento de los niveles de 2'-desoxyadenosina y la formación de dATP lo que causa toxicidad en los linfocitos T inmaduros<sup>12</sup>. De esta forma se ve alterada o impedida la proliferación, supervivencia, desarrollo y correcta función de los linfocitos, lo que termina desencadenando en un cuadro de inmunosupresión característico. El SCID-ADA suele diagnosticarse en torno a los 6 meses de edad, cuando el paciente presenta recurrentes infecciones oportunistas, las cuales su sistema inmunitario es incapaz de controlar. Se detecta panlinfopenia y la ausencia de respuesta inmune tanto humoral como celular<sup>13</sup>.

### **¿Qué tratamientos están disponibles actualmente?**

El tratamiento de elección actual para el SCID por déficit de ADA es el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas anglosajonas), de un donante de HLA compatible emparentado<sup>13</sup>. Sin embargo, en muchos de los casos no es posible encontrar un donante de estas características y se recurre a donantes no emparentados de HLA compatible, o bien donantes haploidenticos (paternos). Estos últimos presentan resultados significativamente peores que el de donante compatible emparentado, por el efecto de injerto contra el huésped<sup>13</sup>.

Cuando el trasplante de médula ósea no es posible, se aplica la terapia de reemplazo enzimático (ERT por sus siglas en inglés), con la versión pegilada de la enzima, adenosina desaminasa bovina modificada con polietilenglicol, ADA-PEG (Adagen®), disponible desde finales de los años 1980. La pauta más común es la inyección intramuscular una o dos veces por semana<sup>13</sup>. Aunque la ERT logra un aumento en el recuento linfocitario y una mejora en la función inmunológica, el número de linfocitos sigue manteniéndose por debajo de lo normal, y la respuesta inmune va decayendo con el tiempo<sup>12</sup>. Además requiere una administración de por vida y el coste elevado limita el acceso al tratamiento<sup>13</sup>.

### **¿Terapia génica para el SCID por déficit de ADA?**

Se ha contemplado la hipótesis de que si se corrigiera el defecto genético en unas pocas células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) del paciente, y éstas se reimplantarán como trasplante de médula ósea autólogo, esta nueva población generaría una

nueva línea linfoide que tendría una fuerte ventaja selectiva sobre los linfocitos T afectados y terminaría por repoblar completamente el compartimento de células T. El efecto de la ventaja selectiva de los linfocitos T sanos se ha comprobado en casos de pacientes que experimentaron una reversión espontánea de la mutación. En estos casos se observa que, con el paso del tiempo, todo el conjunto de la población de células T estaba compuesto por células sanas<sup>12</sup>.

A partir de esta hipótesis surge la idea de la aplicación de la terapia génica (TG) en el SCID-ADA. Las propias HSC del paciente serían modificadas genéticamente, a través de un vector viral integrativo portador del gen funcional de ADA junto a un promotor que asegure su expresión. Este es capaz de llevar el gen sano a los núcleos de las células que presentaban el defecto genético y lo integra en el genoma asegurando su mantenimiento y expresión. Esta técnica se aplicaría *ex vivo* y una vez corregidas, las HSC sanas se reimplantarían en el paciente mediante un trasplante autólogo. De esta forma se elimina la necesidad de un donante adecuado y se minimizan los riesgos de rechazo<sup>13</sup>. A continuación se detalla la evolución cronológica de la aplicación de TG en el SCID-ADA.

- Principio de los años 1990: Se inician los primeros ensayos clínicos de terapia génica para SCID por déficit de ADA. Las estrategias utilizadas fueron la transferencia del cDNA de la adenosina desaminasa humana a través de un vector  $\gamma$ -retroviral (oncovirus) murino, (MLV)<sup>7</sup>, en linfocitos T periféricos y en HSC CD34+ extraídos de la médula ósea o de sangre del cordón umbilical<sup>12, 13</sup>. Desgraciadamente, estos primeros no demostraron beneficios clínicos. Presentaban un bajo rendimiento en la transformación génica, obteniéndose un escaso número de HSC corregidas, el prendimiento del injerto estaba dificultado y por tanto se detectaban bajos niveles de linfocitos T sanos en sangre periférica<sup>12</sup>. No se realizaba acondicionamiento previo ni se suprimía la ERT. En este punto surge la hipótesis de que la continuación de la ERT tras el autotrasplante inhibía o dificultaba el prendimiento de las células corregidas y bloqueaba su ventaja selectiva, ya que cuando la ERT disminuía o se suprimía, los rendimientos de la TG mejoraban<sup>12</sup>.

- Finales de los años 1990: Las mejoras técnicas en el aislamiento y transformación génica de HSC permitieron el desarrollo de nuevos ensayos clínicos<sup>13</sup>. En estos momentos se incluye en el protocolo una fase de acondicionamiento previo. Se trató a los pacientes con agentes quimioterápicos citorreductores como busulfan o melfalan, a dosis bajas no mieloablativas<sup>13</sup>. De esta forma se reduce la población celular de la médula ósea y aumenta considerablemente la probabilidad de prendimiento del injerto. En estos ensayos ya si se detectaron efectos clínicos beneficiosos de reconstrucción del sistema inmune. Los estudios a

largo plazo de estos primeros casos favorables muestran que las células corregidas se mantienen más de 10 años y presentan distintos lugares de integración vectorial<sup>12</sup>.

- Años 2000: Se realizan nuevos ensayos clínicos con vectores mejorados y aplicando el acondicionamiento citorreductor previo y suprimido la ERT tras el trasplante<sup>12</sup>. En torno al 70% de los pacientes recuperaron la función del sistema inmunitario. En una revisión de 2013<sup>2</sup>, se afirma que los 40 pacientes SCID-ADA tratados hasta entonces en Italia, UK y USA siguen vivos, con el sistema inmunitario reconstruido y de los cuales 29 han podido abandonar la ERT unos resultados mucho más favorables que los que se obtienen tras un trasplante de HSC no compatible.

### **Terapia génica para SCID-X1 y sus efectos adversos**

También se ha ensayado la terapia génica en el caso de la SCID-X1. Aquí el gen deficitario codifica para la cadena gamma del receptor de IL-2 ( $\gamma_c$ ) y aún no está disponible una terapia de reemplazo. Al igual que en el SCID-ADA, los beneficios de este tratamiento son superiores (mortalidad de un 10%) al trasplante de HSC alogénico (mortalidad de un 25%) y el acondicionamiento no mieloablativo aumenta las posibilidades de éxito de la terapia<sup>2</sup>. De igual manera las células T sanas presentan ventajas selectivas sobre las afectadas, lo cual favorece el éxito del trasplante.

A pesar de los prometedores resultados hallados (17 de los 20 pacientes tratados por SCID-X1 están vivos y tienen el sistema linfocitario corregido), la aparición de leucemia linfoblástica de células T en 5 de los 20 pacientes SCID-X1 que participaron en los ensayos clínicos de terapia génica a los 2,5-5 años de la intervención hizo necesaria una evaluación más exhaustiva de la seguridad de esta técnica<sup>14</sup>.

En el tratamiento del SCID-X1 se eligió un vector  $\gamma$ -retroviral, como en el caso anterior. Recientes estudios indican que los sitios de integración de los  $\gamma$ -retrovirus no se distribuyen al azar sino que se localizan en clusters de genes relacionados con las funciones hematopoyéticas y de crecimiento y supervivencia celular, como demuestran meta-análisis bioinformáticos<sup>15</sup>. En concreto tienden a localizarse en zonas próximas a los lugares de inicio de transcripción. Al integrarse el provirus, además de incluir el gen terapéutico en el genoma, inserta consigo los potentes promotores virales. Tienen como objetivo asegurar la expresión del gen de interés, sin embargo podrían aumentar la expresión de otros genes del genoma del paciente<sup>2</sup>.

Se identificaron los lugares de integración vectoriales, que en los casos de hiperproliferación linfocitaria correspondieron con zonas próximas a proto-oncogenes. En

cuatro de los cinco casos se trataba del gen *LMO2* (LIM domain only 2), donde se desencadenaba una expresión desmesurada del mismo que activaba los procesos de leucemia linfoblástica identificados. El protocolo de quimioterapia resultó efectivo en cuatro de los cinco pacientes afectados, encontrándose actualmente en remisión y sin haber sufrido una pérdida de las líneas celulares corregidas<sup>7, 14, 16</sup>.

Existe una diferencia importante entre la terapia génica de ambos tipos de SCID. Aunque en los dos casos se han aplicado protocolos y vectores  $\gamma$ -retrovirales con un patrón de integración muy similar, los casos de desregulación transcripcional integrativa leucemigénicos sólo se han detectado en los pacientes SCID-X1 y no así en el SCID-ADA. Las causas aún se desconocen, pero su descubrimiento será de gran ayuda para aumentar la seguridad de la terapia génica<sup>14</sup>.

### **Mejoras en los vectores virales**

Como se ha descrito anteriormente, durante el curso de los ensayos clínicos para la terapia génica del SCID-X1 se detectaron procesos oncológicos, en concreto leucemia linfoblástica de células T, en 5 de los pacientes. Se ha demostrado que este grave efecto adverso estuvo directamente relacionado con las características del vector  $\gamma$ -retroviral que se aplicó. En 4 de los 5 casos, el vector se integró en la región regulatoria cercana al proto-oncogen *LMO2* y activó por mutagénesis insercional su sobreexpresión<sup>14</sup>. Estos eventos impulsaron la investigación y el desarrollo de vectores virales más seguros, que se describen a continuación.

1) Vectores  $\gamma$ -retrovirales autoinactivados (SIN- $\gamma$ -retroviral, Self-inactivating  $\gamma$ -retroviral vector): El genoma viral de los  $\gamma$ -retrovirus está compuesto por tres genes, como se ha descrito anteriormente, y además contiene una señal de empaquetamiento (PSI) mediante la cual las moléculas de ARN se unen a las proteínas de la cápside y son empaquetadas eficazmente. En ambos extremos se encuentran dos secuencias conocidas como repeticiones terminales largas (LTR, Long Terminal Repeat). En el 5'LTR se encuentra una región (U3) con función promotora de la transcripción y la zona de unión al cebador (pbs) necesaria para la retrotranscripción<sup>5</sup>. Para la obtención de un retrovirus SIN, se delecciona precisamente la región promotora U3 del 5' LTR (Fig. 1). De esta forma se logra un LTR inactivo a la transcripción. La eliminación de la actividad promotora del vector se compensa mediante la inclusión un promotor interno heterólogo que permite la expresión del transgen de interés.

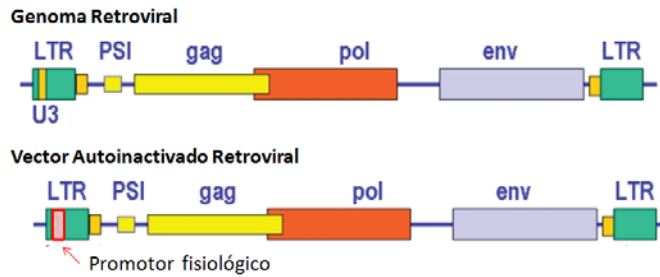


Figura 1: Esquema y comparación del material genético de un vector clásico retroviral y los vectores autoinactivados (SIN). Modificado de Human Molecular Genetics. Open course<sup>5</sup>.

A pesar de que el vector SIN sigue siendo un vector  $\gamma$ -retroviral y su patrón de integración no se ve modificado, su la genotoxicidad está fuertemente reducida al encontrarse regulado por un promotor propio, como se evidencia en estudios *in vitro* de immortalización celular de Modlich en 2006<sup>2(revisión)</sup>. Los SIN, además de presentar la ventaja de ofrecer unos niveles de expresión mucho más similares a los fisiológicos, demostró una reducción del riesgo de activación de proto-oncogenes vecinos<sup>2</sup>. Actualmente se está aplicando en ensayos clínicos para el SCID-X1 registrados en la base de datos de ensayos clínicos<sup>10</sup> de U.S National Institutes of Health (NIH) bajo los números NCT01129544 y NCT01175239<sup>17</sup>.

2) Vectores lentivirales: Además de ofrecer la ventaja de poder transducir células post-mitóticas, los vectores lentivirales tienen un patrón de integración diferente. En lugar de dirigirse a las zonas regulatorias de proto-oncogenes, parece preferir incluirse en el cuerpo de los genes<sup>2</sup>. Esto, si bien no lo elimina, reduce el riesgo de genotoxicidad, como demuestran los estudios de potencial oncogénico *in vivo* e *in vitro* de Moldlich y Montini en 2009<sup>2(revisión)</sup>.

A raíz de estas investigaciones surge el consenso de que la integración de los virus es un proceso activo, catalizado por el complejo de preintegración viral, que se dirige principalmente a regiones que se encuentran más expuestas: zonas poco empaquetadas en cromatina, zonas sensibles a DNAsa I y con marcas epigenéticas<sup>2</sup>. Existen además estudios para su aplicación *in vivo* en trastornos neurodegenerativos (Parkinson) y oculares (Degeneración macular exudativa), pero aún requieren un perfeccionamiento del targeting y las técnicas de obtención en grandes concentraciones.

3) Vectores lentivirales autoinactivados (SIN-lentiviral): La versión SIN de los vectores lentivirales también se ha contemplado, al aportar las ventajas de ambos tipos de vector y de hecho es la preferida en la terapia *ex vivo* sobre HSC. Actualmente está presente en ensayos clínicos de terapia génica contra SCID-ADA, como se detalla más adelante, otras PID como WAS y CGD entre otros.

4) Vectores lentivirales no integrativos (NILV): En estos casos se ha eliminado del vector todo aquello indispensable para la integración, y al llegar al núcleo quedan como círculos extracromosómicos. A parte de ser interesantes para aplicar en células que no se dividen y cuando se desea una expresión temporal del gen de interés, en el caso del SCID podrían ser de utilidad en estrategias basadas en el uso de endonucleasas<sup>17</sup>.

### **Alternativas a los vectores virales.**

Al mismo tiempo que se busca mejorar la seguridad de los vectores virales integrativos, de los que ya se tienen antecedentes de éxito y sus riesgos asociados en el tratamiento del SCID, surgen nuevas ideas para lograr llevar el gen terapéutico y mejorar aún más el balance riesgo beneficio. Existen tres enfoques, los dos primeros basados en el principio de recombinación homóloga:

1) Corrección genética: Implica modificar el gen responsable de la enfermedad *in situ*, lo que ofrecería la ventaja de que se mantendrían los promotores y otros mecanismos naturales de regulación de la expresión<sup>17</sup>.

2) Direccionamiento en locus específico. Consiste en integrar el gen terapéutico ya no al azar, ni siquiera manteniendo un patrón conocido, como se observa en el uso de virus integrativos, si no que localizándolo en zonas seguras del genoma. En estas zonas, conocidas como “puertos seguros”, la integración de un gen no causaría ningún daño ni una desregulación perjudicial<sup>17</sup>.

3) Transposones: Se trata de elementos de DNA que tienen la propiedad de poder translocarse espontáneamente de un lugar a otro de los cromosomas, ayudados por una enzima transposasa. Algunos de estos sistemas son a) *Sleeping Beauty*: cuyo patrón de integración es al azar y parece no estar relacionado con deleciones o recombinación al cambiarse de sitio, b) *Tol2* similar al anterior pero con una capacidad de carga de DNA mayor y c) *PiggyBac* que aunque su transposición es más eficiente que la de los anteriores tiene un patrón de integración similar al de virus integrativos<sup>17</sup>.

Para lograr el éxito en cualquiera de las dos primeras estrategias es necesario un sistema que permita la recombinación homóloga de forma eficaz. Este sistema utiliza los mecanismos naturales de reparación del ADN de las células, que se activan al detectarse una rotura en la doble hélice. Ya que estas roturas ocurren espontáneamente en muy baja proporción, se requiere de mecanismos que sean capaces de cortar la doble cadena en el lugar escogido y sin dañar al resto del genoma. Se contemplan dos alternativas:

1) “Homing endonucleases” (HE): Son enzimas capaces de cortar en secuencias específicas que van de 14 a 40 pares de bases. La HE modelo, I-SceI, identificada en levaduras sólo presentaba un único punto de corte. Para poder aplicarlas, es necesario desarrollar una HE que sea específica para la secuencia donde se quiere inducir la recombinación homóloga, mediante mutagénesis en las regiones de reconocimiento de secuencias y posterior selección por mecanismos de “High-Throughput screening” (HTS)<sup>17</sup>.

2) Nucleasas dedos de Zinc (ZFN): Son enzimas generadas por fusión, uniendo el dominio nucleasa de la endonucleasa Fok I a dominios dedos de Zinc. Estos son regiones de unión a DNA y reconocimiento específico de secuencias. De esta forma se puede lograr una nucleasa específica para el punto de corte de interés<sup>3</sup>. Esta última estrategia ha sido probada en estudios preclínicos *in vitro* para el SCID-X1, con un éxito del 5-17%<sup>17(revisión)</sup>.

### Ensayos clínicos.

Hasta la fecha se han llevado a cabo más de 2000 ensayos clínicos de terapia génica en todo el mundo, y en estos últimos cinco años (2010-2015), se ha autorizado al año 100 ensayos de media<sup>11</sup>. La gran mayoría, un 64,2%, estaban enfocados al tratamiento del cáncer y las enfermedades monogénicas ocuparon el segundo lugar con un 9,2%. (Fig. 2). En el año 2012, la fibrosis quística era el trastorno más estudiado entre estas enfermedades, con un 22,4%, seguido por los SCID, que supusieron un 20% de los ensayos clínicos en terapia génica para alteraciones de un solo gen<sup>18</sup>.

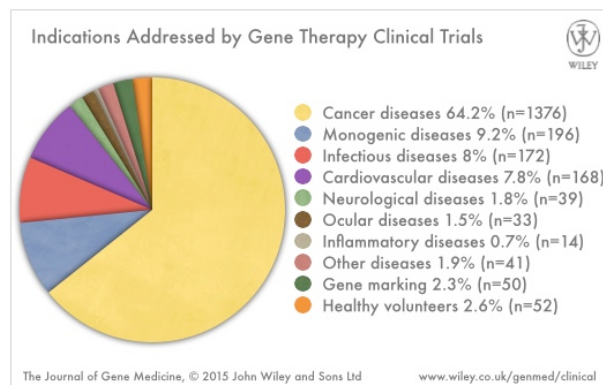


Figura 2: Indicaciones de los ensayos clínicos de terapia génica. Tomado del sitio web de The Journal of Gene Medicine<sup>11</sup>. Actualizado enero 2015.

Por su parte los vectores preferidos son los adenovirus (22,5%), seguidos de los retrovirus (18,8%). Se observa un descenso en el uso de vectores retrovirales, en 2004 suponían el 28%, posiblemente a raíz de los efectos adversos detectados en los ensayos de la

terapia del SCID-X1<sup>18</sup>. Poco a poco van apareciendo nuevos vectores que presentan menor problemática, al menos de momento, como son los lentiviurs, que actualmente suponen un 4,6%. (Fig. 3)

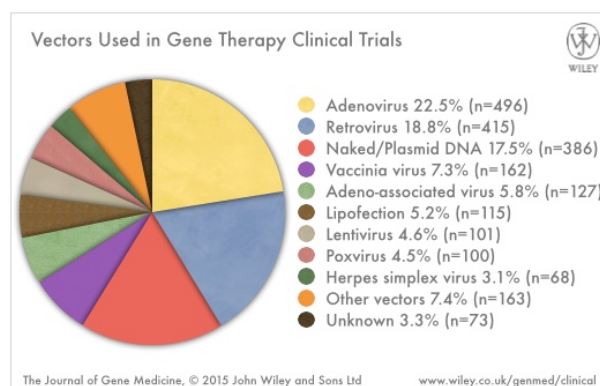


Figura 3: Vectores utilizados en los ensayos clínicos de terapia génica. Tomado del sitio web de The Journal of Gene Medicine (web wiley). Actualizado enero 2015.

En la base de datos de ensayos clínicos<sup>10</sup> de U.S National Institutes of Health (NIH), se localizaron ocho ensayos clínicos para el desarrollo de la terapia génica *ex vivo* del Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa por déficit de Adenosina Deaminasa (SCID-ADA), llevados a cabo en Italia, Inglaterra y Estados Unidos.

Todos los ensayos consultados son abiertos, no aleatorizados y no emascarados de fase I/II, en la que se aplica por primera vez el protocolo en humanos. La participación está restringida a pacientes, en este caso niños de pocos meses, dadas las características de la terapia y la patología.

Con respecto al vector viral empleado, en 5 de los 8 ensayos clínicos se utiliza un vector  $\gamma$ -retroviral basado en el virus murino MLV. Los 3 restantes, de inicio más reciente aplican un vector SIN-lentiviral en el que los LTR han sido modificados y la función promotora de la transcripción la ejerce el promotor del EF1 $\alpha$  (EFS-Lentiviral).

Estos virus transducen del cDNA del gen ADA humano *ex vivo* en células madre hematopoyéticas (HSC) y además en células CD34+ de sangre del cordón umbilical en uno de los ensayos o linfocitos de sangre periférica en otro (Tabla 1).

Registro <sup>1</sup>	Estado <sup>2</sup>	Organismo	Vector	Células
1 NCT00018018	Completo (2001-14)	NHGRI <sup>3</sup> (EEUU)	$\gamma$ -Retroviral	HSC
2 NCT00599781	Completo (2008)	IRCCS <sup>4</sup> (Italia)	$\gamma$ -Retroviral	HSC y linfocitos



<b>3</b>	NCT00794508	Activo (2008-15)	NIH <sup>5</sup> (EEUU)	$\gamma$ -Retroviral	HSC
<b>4</b>	NCT00598481	Inicio (2008-15)	GSK <sup>6</sup> (UK)	$\gamma$ -Retroviral	HSC
<b>5</b>	NCT01279720	Reclutando (2011-12)	NHS <sup>7</sup> (UK)	$\gamma$ -Retroviral	HSC
<b>6</b>	NCT01380990	Inicio (2011-12)	NHS <sup>7</sup> (UK)	EFS- lentiviral	HSC
<b>7</b>	NCT01852071	Reclutando (2013-15)	NHGRI <sup>3</sup> (EEUU)	EFS- lentiviral	HSC
<b>8</b>	NCT02022696	Completo (2013-15)	NHGRI <sup>3</sup> (EEUU)	EFS- lentiviral	HSC y cordón umbilical

Tabla1: Resumen de los registros de ensayos clínicos consultados. <sup>1</sup>Número de registro en clinicaltrials.gov. <sup>2</sup>La primera fecha indica el inicio del registro en la base de datos y la segunda la última actualización del registro. <sup>3</sup>National Human Genome Research Institute. <sup>4</sup>IRCCS San Raffaele, Fondazione Telethon. <sup>5</sup>National Institutes of Health. <sup>6</sup>GlaxoSmithKline. <sup>7</sup>Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust.

El número de pacientes y los criterios de inclusión y exclusión se muestran en la Tabla 2. Destacar que en 5 de los ensayos se aplicó un tratamiento no mieloablativo previo con busulfan que facilita el prendimiento del injerto y que no se admitió en el estudio ningún paciente con algún proceso oncológico maligno.

	<b>Sujetos</b>	<b>Sexo<sup>1</sup></b>	<b>Edad</b>	<b>Sin donante<sup>2</sup>/ Fallo ERT<sup>3</sup></b>	<b>Diagnóstico molecular<sup>4</sup></b>	<b>Criterios exclusión<sup>5</sup></b>
<b>1</b>	8	M-F	≥ 1 mes	Sí/-	Sí	
<b>2</b>	8	M-F	-	Sí/Sí	-	
<b>3</b>	10	M-F	≥ 1 mes- 18años	Sí/-	Sí	
<b>4</b>	12	M-F	<17años	Sí/Sí	-	

5	10	M-F	<18años	Sí/-	Sí	HIV+
6	10	M	<5años	Sí/Sí	Sí	HIV+
7	15	M-F	≥ 1 mes	Sí/-	-	
8	1	M-F	≥ 1 mes -65años	Sí/-	-	HIV+, HBV+,HCV+

Tabla 2: Criterios de inclusión a los ensayos clínicos <sup>1</sup> M: Masculino, F: Femenino. <sup>2</sup>No disponen de un donante emparentado de HLA compatible. <sup>3</sup>Fallo en la Terapia de Reemplazo Enzimático (ERT). <sup>4</sup>Existe un diagnóstico de SCID-ADA por análisis genético o por detección de una actividad enzimática ADA celular muy reducida. <sup>5</sup>HIV+: infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana. HBV+: infección por Virus de Hepatitis B, HCV+: infección por Virus Hepatitis C.

### Perspectivas de futuro

La idea de poder modificar los genes que son responsables de una enfermedad ya no es una utopía. La terapia génica estará en pocos años irrumpiendo con fuerza en muy diversos ámbitos de la medicina. En el caso del SCID, los ensayos clínicos muestran unos resultados espectaculares en la amplia mayoría de los sujetos tratados. A pesar de los problemas que se detectaron a principios de los años 2000 en la terapia génica del SCID-X1, la comunidad científica no ha perdido la esperanza en esta estrategia terapéutica. Por el contrario, ha decidido redoblar sus esfuerzos en la lucha contra las enfermedades hereditarias, desarrollando avances técnicos que permitan mejorar el balance riesgo beneficio.

Los vectores SIN lentivirales se disponen como una alternativa más segura que los  $\gamma$ -retrovirus utilizados en los primeros ensayos, ya que su patrón de integración tiene menos riesgo de provocar mutagénesis insercional y la expresión del transgen se encuentra regulada por un promotor fisiológico. Por otro lado hay que destacar los recientes avances en técnicas de transducción mediante vectores no virales, como son el empleo de nucleasas específicas de secuencias (HE y ZFN) y los sistemas transposon-transposasa. Aún así, no debemos olvidar que, aunque mejoren los sistemas, siempre va a existir un riesgo de mutagénesis asociado, cuando se trata de manipular nuestro material genético.

## **CONCLUSIONES.**

1) Los primeros ensayos clínicos con vectores  $\gamma$ -retrovirales de terapia génica para SCID-ADA tuvieron un gran éxito al incluirse en el protocolo un acondicionamiento no mieloablativo previo a la intervención y la suspensión del reemplazo enzimático después.

2) Los vectores SIN-lentivirales reducen el riesgo de desregulación transcripcional y se presentan como una alternativa más segura a los vectores  $\gamma$ -retrovirales clásicos. Sin embargo, los sistemas basados en endonucleasas específicas o en transposones podrían ofrecer mayores ventajas en el futuro.

3) Si bien hasta la fecha no se ha detectado ningún caso de mutagénesis insercional asociada al uso de vectores  $\gamma$ -retrovirales en la terapia génica para SCID-ADA, ya se están aplicando vectores SIN lentivirales en ensayos clínicos para minimizar el riesgo.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. SETGyC. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. [Online].; 2015 [visto 16 Mayo 2015]. Disponible en: <http://www.setgyc.es/>.
2. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. EMBO Molecular Medicine. 2013; 5: p. 1642–1661.
3. Palpant NJ, Dudzinski D. Zinc finger nucleases: looking toward translation. Nature Gene Therapy. 2013; 20: p. 121-127.
4. Bleijs R. Gene Therapy Net. [Online].; 2015 [visto 15 Mayo 2015]. Disponible en: <http://www.genetherapynet.com/>.
5. Novo Villaverde FJ. Human Molecular Genetics. Open course.Tema 12.3.1 Terapia Génica. Vectores virales. Universidad de Navarra. [Online].; 2012 [visto 5 Mayo 2015]. Disponible en: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema12-3-1.html>.
6. Yarborough M, Sharp RR. Public trust and research a decade later: What have we learned since Jesse Gelsinger's death? Molecular Genetics and Metabolism. 2009; 97: p. 4-5.
7. Yu JH, Schaffer DV. Advanced Targeting Strategies for Murine Retroviral and Adeno-associated Viral Vectors. Advanced Biochemistry Engineering Biotechnology. 2005; 99: p. 147–167.

8. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(9): p. 3132–3142.
9. NCBI. PubMed-NCBI. [Online].; 2015 [visto 2 Marzo 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
10. US National Institutes of Health. Database of Clinical Trials. [Online].; 2015 [visto 28 Mayo 2015]. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/>.
11. Wiley J. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. [Online].; 2015 [visto 23 Mayo 2015]. Disponible en: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
12. Carbonaro DA, Jin X, Wan X, Yu XJ, Rozengurt N, Kaufman ML, et al. Gene therapy/bone marrow transplantation in ADA-deficient mice: roles of enzyme-replacement therapy and cytoreduction. *Blood*. 2012; 120(18): p. 3677-3687.
13. Candotti F, Shaw KL, Muul L, Carbonaro D, Sokolic R, Choi C, et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood*. 2012; 120(18): p. 3635-3646.
14. Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Aiuti A. Gene therapy for primary immunodeficiencies: part 1. *Current Opinion in Immunology*. 2012; 24: p. 580–584.
15. Deichmann A, Brugman MH, Bartholomae CC, Schwarzwaelder K, Verstegen MM, Howe SJ, et al. Insertion Sites in Engrafted Cells Cluster Within a Limited Repertoire of Genomic Areas After Gammaretroviral Vector Gene Therapy. *Molecular Therapy*. 2011; 19(11): p. 2031–2039.
16. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003; 302: p. 415-419.
17. Pessach IM, Notarange LD. Gene therapy for Primary Immunodeficiencies: looking ahead, towards gene correction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011; 127(6): p. 1344–1350.
18. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *The Journal of Gene Medicine*. 2013; 15: p. 65–77.