

Aplicació de vectors AAV en el tractament de la fibrosi cística

Gonzalo Lobato Trenado

Grau en Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

Conceptes clau

- **Virus adeno-associat (AAV):** Virus de la família Parvoviridae que es caracteritza per la necessitat d'un virus "helper" per seguir un cicle lític. En absència d'aquest, realitza un cicle lisogènic. Tot i que té un alt índex de seroprevalença a la població humana, no causa malaltia. El genoma és una molècula de DNA lineal monocatenari de 4,7kb aproximadament i es compon de dos seqüències ITR flanquejant els gens virals *rep* (replicació) i *cap* (càpsida) [1,2,3,4].
- **Virus adeno-associat recombinant (rAAV):** Virus adeno-associat en el que se li ha realitzat una modificació del seu genoma, que consisteix en l'eliminació dels gens *rep* i *cap*, i la introducció d'un transgen entre les seqüències ITR. La construcció gènica s'aconsegueix seguint el procediment representat a Fig.1 [5]
- **Fibrosi cística:** malaltia autosòmica recessiva causada per una mutació en la proteïna reguladora de la conductància transmembranal de la fibrosi cística (CFTR). Afecta a nivell de pàncreas i de pulmó. Aquest últim on es produeixen els símptomes més agressius [10].

Vectors AAV

La base dels vectors AAV és el serotip 2 d'AAV (AAV2), ja que és el més prevalent i per tant presenta menys riscos per a la salut [5].

- **Modificacions del tropisme:** el tropisme del vector depèn exclusivament de la seva càpsida. Aquest tropisme es pot modificar o bé realitzant tractaments químics, immunològics o genètics, o bé transencapsidant els ITRs de AAV2 en càpsides d'altres serotips, aportant una gran varietat de tropismes [6].
- **Mecanismes de persistència del DNA del vector:** La destinació de la molècula de DNA, una vegada dintre del nucli, depèn de l'activitat metabòlica de la cèl·lula hostatgera. Quan els sistemes de reparació de la cèl·lula detecten el transgen aportat per el vector l'integren al genoma per NHEJ o recombinació homologa. Hi ha un cert risc d'integració errònia de transgens alterant elements reguladors o truncant gens dins del cromosoma cel·lular [7, 8].
- **Tecnologies emergents:** les tecnologies estan basades en la modificació del vector per tal de millorar la seva persistència dins de la cèl·lula hostatgera i la seva capacitat gènica. Com exemple tenim els scAAV que tenen la capacitat de passar a doble cadena dintre de la cèl·lula sense la necessitat de DNA sintetitzat de novo [9].

Aplicació en fibrosi cística

Es va provar la utilització de vectors rAAV, construïts a partir del cDNA de CFTR de 4,4Kb entre els ITRs i empaquetant-se en una càpsida de AAV2 (tgAAVCF), a la línia cel·lular de l'epiteli respiratori afectada per fibrosi cística, ja que en estudis murins es va demostrar una restauració del transport normal de clor, que a la vegada podria prevenir l'aparició d'infeccions bacterianes repetides que puguin generar la patologia pulmonar. (Taula 1) [10,11,12,13].

Taula 1: Assajos Clínics [12]

Autors	Fase	Ruta d'administració	Subjectes d'estudi	Conclusions
Afione et. al. (1996)	I	Broncoscòpia, nas	25	Es corrobora la seguretat del vector.
Wagner et. al. (1998-1999)	I	Sinus maxil·lars	10	Es demostra l'activitat del vector al augmentar la resposta fisoelèctrica una vegada administrat.
Wagner et. al. (1999-2002)	II	Sinus maxil·lars	23	S'observa un augment de la IL-10 i una disminució de la IL-8 amb l'administració del vector. Resultats contraris als paràmetres de la malaltia.
Aitken et. al. (2001)	I	Pulmonar via aerosol	12	Aparició de resposta humoral contra el vector després d'un temps de l'administració.
Moss et. al. (2004)	II	Pulmonar via aerosol	20:18	Anàlisi de la seguretat del vector i extrapolació de resultats a pacients joves on la prevalença de la malaltia és mes alta.
Moss et. al. (2004)	II	Pulmonar via aerosol	50:50	Pacients que reben tgAAVCF disminueixen la seva concentració de IL-8 a l'esput a diferència dels tractats amb placebo.

Conclusions

Avantatges

- Expressió gènica persistent
- Propagació del seu genoma durant la divisió cel·lular
- No generen malaltia

Inconvenients

- Genoma de poca grandària
- Sensibilitat de l'organisme
- Permanència curta a l'organisme

Conclusió final: Tot i que el vector encara no arriba a realitzar la seva funció de forma permanent degut a diferents factors, no s'ha de deixar la seva investigació, ja que en models murins i assajos clínics ha donat resultats molt prometedors. L'objectiu actual seria la modificació del vector per tal d'eliminar aquests problemes que pot donar l'organisme humà.

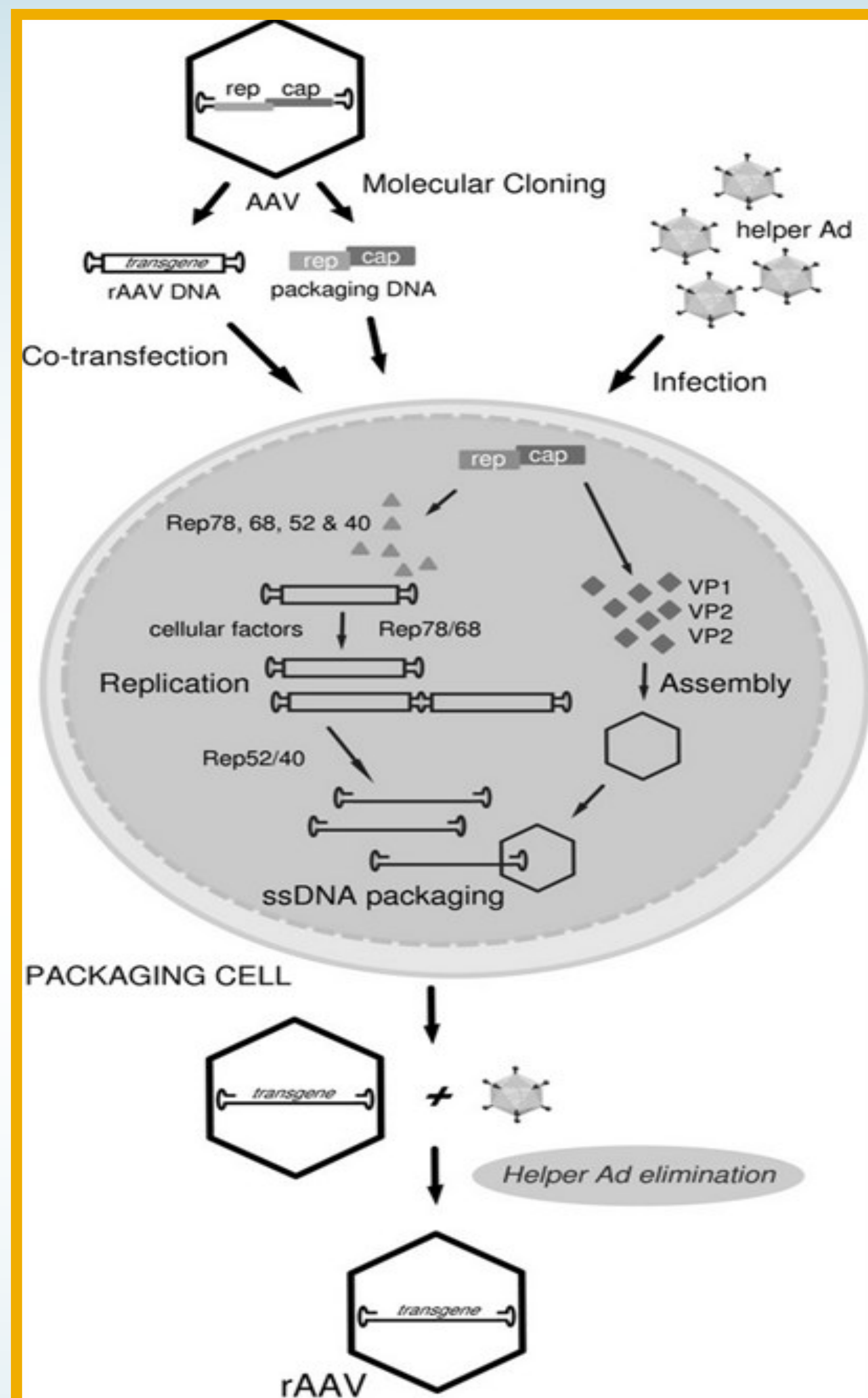


Fig. 1. Sistema de producció de rAAV [6].

Aquestes partícules es creen a partir de la transfecció de cèl·lules productores amb un rAAV al qual se li ha modificat el genoma en tant que s'han eliminat els gens *rep* i *cap* i s'ha introduït el transgen flanquejat per 145 nucleòtids que pertanyen als ITRs de AAV, ja que és l'únic element necessari en *cis* per tal de que es doni l'empaquetament i l'acoblament de les partícules virals. Per altre banda s'introdueix una construcció amb un plàsmid que expressa en *trans* els gens virals *rep* i *cap*. En presència d'adenovirus, el genoma rAAV comença el procés lític que realitzaria una partícula de AAV *wt* utilitzant els gens aportats en *trans* per acabar el procés, replicant i empaquetant el genoma en forma de ssDNA, en càpsides de AAV preformades.

Bibliografia

- Lawrence S Yang, Peter F. Searle, David Onion and Vivien Mautner. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *Journal of Pathology* 2006; 208: 299-318. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/path.1896
- Henckaerts E, Linden RM. Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future virology*. 2010;5(5):555-574. doi:10.2217/fv.10.48.
- Bristler JR, Muzyczka N. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 2000; 74:7762-7771.
- Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2000; 74:2777-2785
- Mitchell AM, Nicolson SC, Warrischalk JK, Samulski RJ. AAV's Anatomy: Roadmap for Optimizing Vectors for Translational Success. *Current gene therapy*. 2010;10(5):319-340.
- Gonçalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology*. 2005 May 6; 2:43
- David DR, Russel DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* 2009 Aug; 11(4):442-7
- Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther*. 2008 July; 16(7): 1189-99. doi: 10.1038/mt.2008.103. Epub 2008 May 20.
- Douglas M McCarty. Self-complementary AAV vectors; *Advances and Applications. Molecular Therapy* (2008) 16:10, 1648-1656. doi:10.1038/mt.2008.171
- Christine L. Halbert, A. Dusty Miller, Sharon McNamara, Julie Emerson, Ronald L. Gibson, Bonnie Ramsey, and Moira L. Aitken. Prevalence of Neutralizing Antibodies against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 2, 5 and 6 in Cystic Fibrosis and Normal Populations: Implications for Gene Therapy using AAV Vectors. *Hum Gene Ther*. 2006 April; 17(4): 440-447. doi:10.1089/hgtb.2006.17.440
- Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature medicine*. 2012;18(4):509-519. doi:10.1038/nm.2715.
- Carter, Barrie I. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Human gene therapy* 16.5 (2005): 541-550.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583-593. doi:10.1128/CMR.00008-08