

TRANSFERÈNCIA GÈNICA A CÈL·LULES HEMATOPOÈTIQUES: UTILITZACIÓ DE VECTORS RETROVÍRICS

CRISTINA FILLAT

Departament de Genètica Molecular, Institut de Recerca Oncològica,
L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona

VECTORS RETROVÍRICS

Els vectors retrovírics constitueixen un vehicle per a introduir DNA a cèl·lules eucariotes. Han estat els primers vectors utilitzats en els estudis de teràpia gènica; el 1981 es va descriure el primer vector i el 1990 es va tractar el primer pacient, un pacient que presentava una deficiència en l'enzim adenosina desaminasa (1). Avui per avui, aquests vectors segueixen tenint una gran utilitat i al voltant del 86% dels assaigs clínics aprovats utilitzen com a vehicle els vectors retrovírics (4).

CONSTRUCCIÓ DE VECTORS RETROVÍRICS

Per tal de comprendre les característiques d'aquests vectors, cal conèixer quin és el cicle vital dels retrovirus (6). Els retrovirus són virus RNA. El procés d'infecció d'una cèl·lula requereix, en primer lloc, de la interacció entre una proteïna de la càpsida del virus i una proteïna de la membrana cel·lular que actua com a receptor. Com a conseqüència, es produeix la internalització de la partícula vírica i l'alliberament del genoma, el RNA. Aquest RNA, mitjançant la transcriptasa reversa, és retrotranscrit en el citoplasma obtenint així un DNA còpia, el cDNA, que és traslladat al nucli, on s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste i es manté així de forma estable. Aquest DNA víric, un cop integrat, es coneix com a provirus i s'expressa com un gen més de la cèl·lula, utilitzant-ne tota la maquinària de transcripció i traducció. Aquest provirus consta de dues regions, els *Long Terminal Repeat* (LTR), que defineixen els extrems del provirus i que contenen seqüències reguladores de l'expressió dels gens vírics: Zona promotora, *enhancers*, elements repressors i senyals de poliadenilació. Entre els dos LTR es situen els gens vírics, *gag*, *pol* i *env* que

codifiquen proteïnes estructurals del virus. Com a resultat de la interacció entre una de les proteïnes *gag* i el senyal d'encapsidació, es produeix l'empaquetament de les partícules víriques i l'alliberament de noves partícules infectives.

El vector retrovíric s'obté després de substituir part del genoma víric, els gens *gag*, *pol* i *env*, pel DNA d'interès (Fig. 1). Aquest vector contindrà, per tant, els LTR vírics, els senyals d'encapsidació i el gen d'interès.

Els gens *gag*, *pol* i *env* poden ser proporcionats en *trans*. Això ha permès el desenvolupament de les denominades línies cel·lulars empaquetadores. Aquestes són cèl·lules a les quals s'ha transferit de forma estable els gens *gag*, *pol* i *env*, però que no contenen les seqüències necessàries per a l'encapsidació del virus.

El sistema que permet obtenir retrovirus recombinants consisteix en dos components: d'una banda, el vector retrovíric que conté el gen d'interès, i d'altra banda les línies cel·lulars empaquetadores. Només quan els dos components del sistema, és a dir, el vector retrovíric i les cèl·lules empaquetadores, es posin en contacte es produiran els retrovirus recombinants. Per tal que això es doni, cal transfectar el vector retrovíric que conté el gen terapèutic a la línia cel·lular empaquetadora. En conseqüència, s'acumularan les partícules víriques al medi extracel·lular. Aquests retrovirus recombinants seran capaços de transduir les cèl·lules diana i aconseguir així que aquestes cèl·lules continguin i expressin el gen d'interès.

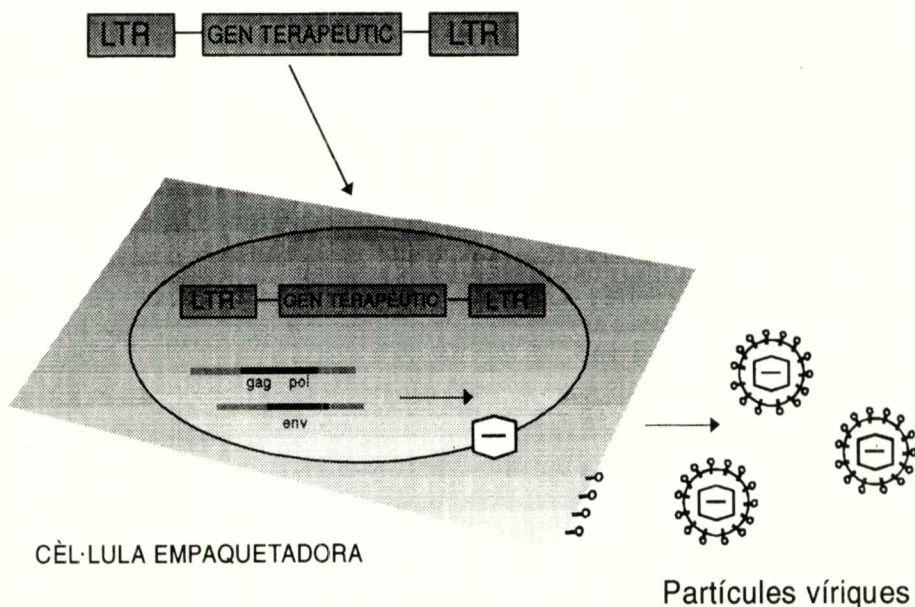


FIG. 1. Estratègia de preparació i propagació de vectors retrovírics.

Sovint els vectors retrovírics contenen dos gens heteròlegs, el gen marcador que confereix avantatge selectiu a la cèl·lula transduïda i el gen terapèutic. Ambdós gens poden ser expressats sota el control del mateix promotor, aprofitant el mecanisme d'acoblament (*splicing*) del propi retrovirus o bé sota dos promotors diferents, essent generalment un d'ells el propi LTR víric.

CARACTERÍSTIQUES DELS VECTORS RETROVÍRICS

Els retrovirus presenten un conjunt de característiques que condicionen el seu ús. Entre elles cal destacar la limitació en la mida de l' insert, que pot arribar a tenir fins a 8 Kb com a màxim. D'altra banda, cal que les cèl·lules diana presentin en la seva superfície els receptors necessaris per què pugui tenir lloc la transducció. A més, aquestes cèl·lules hauran d'estar en divisió, la qual cosa permetrà que el transgèn s'integri de forma estable en el genoma de la cèl·lula hoste i que aquesta quedi permanentment modificada. Això representa un avantatge important quan es tracta d'actuar en malalties hereditàries i alteracions cròniques, però també comporta riscos com possibles alteracions degudes a una sobreexpressió crònica del producte o bé la possible introducció de canvis mutacionals com a resultat de l'efecte d'inserció (ex: disrupció d'un gen supressor de tumor o activació d'un oncogèn). És important assenyalar que aquests vectors s'integren de forma aleatòria en el genoma de la cèl·lula hoste.

ESTRATÈGIES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA UTILITZANT VECTORS RETROVÍRICS

La via d'administració més comuna per aquests tipus de virus és la que s'ha denominat *ex vivo* i consisteix en aïllar les cèl·lules diana del pacient, cultivar-les *in vitro* en presència del vector retrovíric que conté el gen terapèutic i finalment administrar al pacient les cèl·lules corregides. Aquesta estratègia s'està utilitzant molt en assaigs clínics per a transduir cèl·lules hematopoètiques (2). S'ha utilitzat també per modificar cèl·lules hepàtiques i cèl·lules tumorals.

L'estratègia alternativa consisteix l'administració dels retrovirus recombinants directament *in vivo*. Atès que els títols que s'obtenen de retrovirus no són molt alts, aquesta via, generalment, resulta poc eficient. En el cas d'actuar sobre tumors sòlids, el que resulta eficient és administrar *in situ* les cèl·lules productores del retrovirus recombinant, prèviament irradiades per frenar-ne la divisió, però que fins a ser destruïdes estaran produint els retrovirus recombinants de forma continuada.

TRANSDUCCIÓ DE LES CÈL·LULES HEMATOPOÈTIQUES: APLICACIÓ A MALALTIES MONOGÈNIQUES HEREDITÀRIES

Les cèl·lules progenitores de la hematopoesi són potencialment una població cel·lular ideal per ser transduïda mitjançant vectors retrovírics, ja que la

transducció de les cèl·lules mare (*stem*), les cèl·lules progenitores de l'hematopoesi més primitives i amb característiques totipotencials, representaria una aportació continuada de cèl·lules hematopoètiques modificades al llarg de tota la vida de l'individu (7). La transducció de les cèl·lules mare (*stem*) és difícil, ja que, a més de trobar-se en petita quantitat, es troben principalment en estat quiescent.

Nombrosos esforços s'encaminen a aconseguir modificar aquestes cèl·lules (5). La transducció d'aquestes cèl·lules és interessant principalment per aquelles malalties en què l'alteració primària radica en les cèl·lules hematopoètiques. De tota manera, el trasplantament de moll d'os s'ha mostrat efectiu també per a algunes malalties metabòliques en que l'afectació principal no radica en les cèl·lules hematopoètiques. Això ha fet pensar que, en aquests casos, la transferència gènica a cèl·lules mare (*stem*) podria donar beneficis terapèutics, sobretot si el producte gènic pot ésser eficientment secretat. Algunes malalties hereditàries, com el grup de malalties lisosomals, esdevenen models excel·lents en els quals avaluar aquesta estratègia.

Les malalties lisosomals constitueixen una família de malalties metabòliques hereditàries amb unes 40 alteracions diferents i que resulten de la deficiència en algun dels enzims localitzats en el lisosoma. Una d'elles, la mucopolisacaridosi tipus VI (MPS VI), consisteix en la deficiència en l'arilsulfatasa B (ASB), enzim que hidrolitza èsters de sulfat presents en els glucosaminoglicans, principalment el sulfat de dermatà. Els individus afectats per aquesta malaltia presenten dismòrfia facial, estatura curta, disostosi múltiple, hepatoesplecnomegàlia, cardiomegàlia i cataractes. Les cèl·lules diana d'aquesta malaltia són principalment els fibroblasts i condrocits, encara que totes les cèl·lules de l'individu es troben alterades. Diferents aproximacions s'estan emprant per al tractament de la MPS VI; entre les quals es troba el trasplantament de cèl·lules de moll d'os. S'ha pogut observar que, després del trasplantament, aquests pacients experimenten millores en algunes de les alteracions principals, com ara en les funcions respiratòria i cardíaca i reduïda hepatoesplecnomegàlia. D'altra banda, però, no s'observen canvis en les alteracions òssies. La possible efectivitat d'una teràpia gènica per a aquesta malaltia està essent estudiada per diversos grups. Els nostres estudis indiquen que la transferència del gen de l'ASB mediatitzada per vectors retrovírics a cèl·lules hematopoètiques de moll d'os condueix a uns nivells elevats d'expressió de l'enzim. L'enzim és a més secretat a l'exterior de la cèl·lula i pot ser endocitat via receptor manosa 6-fosfat per la cèl·lula veïna. Com a resultat, s'observa una correcció del defecte metabòlic (3). Els estudis iniciats en els models animals, com el gat MPS VI, ens permeten avaluar l'efectivitat del sistema en l'organisme viu.

Les situacions patològiques preferentment candidates a una teràpia gènica dirigida a cèl·lules hematopoètiques són aquelles malalties en què les pròpies cèl·lules hematopoètiques estan alterades com a resultat de modificacions en algun gen que s'expressa en aquesta població cel·lular. En constitueix un

exemple la síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), una malaltia lligada al cromosoma X, que apareix com a conseqüència d'un defecte genètic en el gen WASP. La clínica cursa amb immunodeficiència, trombocitopènia i èczema. Amb el trasplantament al·logènic de medul·la òssia, s'aconsegueix el guariment definitiu de la malaltia. Donada la dificultat d'obtenir donants histocompatibles, aquesta malaltia és una candidata excel·lent a la teràpia gènica. En el nostre grup s'estan iniciant estudis encaminats a un millor coneixement de les bases moleculars d'aquesta malaltia com també a estudiar diferents estratègies de teràpia gènica mediatitzada per vectors retrovírics.

REFERÈNCIES

1. Blaese, R. M., Culver, K. W., Anderson, W. F. (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol. *Human Gene Ther.* **1**, 331–362.
2. Bordignon, C., Notarangelo, L., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, A. G., Mavillo, F. (1995). Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-Immunodeficient patients. *Science* **270**, 470–474.
3. Fillat, C., Simonaro, C. M., Levy-Yeyati, P., Abkowitz, J. L., Haskins, M. E., Schuchman, E. H. (1996). Arylsulfatase B activities and glycosaminoglycan levels in retrovirally-transduced Mucopolysaccharidosis Type VI cells: Prospects for gene therapy. *J. Clin. Invest.* **98**, 497–502.
4. Hodgson, C. P. (1995). The vector void in gene therapy. *Biotechnology* **13**, 222–225.
5. Nolte, J. A., Smogorzewska, E. M., Kohn, D. B. (1995). Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction of primitive human hematopoietic cells. *Blood* **86**, 101–110.
6. Salmons, B., Günzburg, W. H. (1993). Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Human Gene Ther.* **4**, 129–141.
7. Scott, M. A. (1995). In search of the haemopoietic stem cell. *British J. Haem.* **90**, 738–743.

