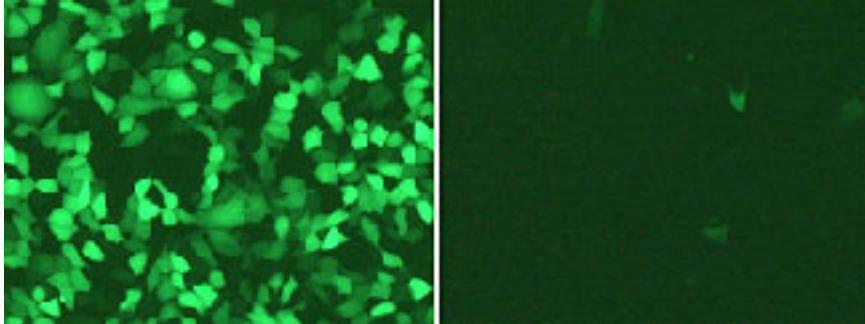


## Nou avenç en teràpia gènica

**12/2007 - Medicina i Salut.** Un grup d'investigadors del CBATEG de la UAB, dirigit pel doctor Miguel Chillón, ha descrit el desenvolupament d'un sistema nou de producció d'adenovirus d'última generació (utilitzats com a vectors per a tractaments de teràpia gènica) que permet reduir, significativament, els inconvenients que existeixen fins ara per realitzar assaigs en humans. La UAB ha patentat recentment aquesta tècnica.



En aquesta micrografia veiem en verd la contaminació amb virus Ad helper, usant el mètode tradicional (esquerra) i el nou mètode desenvolupat a la UAB (dreta)

La introducció de material genètic d'interès en les cèl·lules diana, amb finalitats terapèutiques, necessita l'acció de vectors que l'empaquetin i el protegeixin dels sistemes de degradació extra i intracel·lulars i que el guiïn cap al lloc final d'expressió. En aquest sentit, els adenovirus (Ad) són un dels vectors més atractius en el camp de la teràpia gènica, sent actualment el vector més utilitzat en assajos clínics en humans. No obstant això, no s'integren al genoma, i per obtenir una expressió perllongada del gen terapèutic (imprescindible per al tractament de malalties cròniques humanes) és necessari administrar el vector en repetides dosis, la qual cosa genera una resposta immune contra el vector.

Per evitar aquests problemes, recentment s'han generat els vectors-adenovirus de tercera generació: són adenovirus amb un gen terapèutic o marcador d'interès, però sense el genoma per produir proteïnes víriques, i se'ls coneix com *Ad gutless* ("sense entranyes"). Bàsicament, són la càpsida del virus (que els permet introduir-se a les cèl·lules) que porta el gen terapèutic i altres seqüències de genoma que no criden l'atenció del sistema immune. L'avantatge d'aquests vectors de 3<sup>a</sup> generació és que poden romandre episomals en la cèl·lula, és a dir, el seu genoma, al no expressar proteïnes víriques, roman al citoplasma sense ser atacat per les defenses cel·lulars. Si en aquest genoma tenim inserit un gen terapèutic (per exemple, un que sigui deficient o manqui en aquesta cèl·lula) s'expressarà i les proteïnes que es produeixin corregiran el defecte de la cèl·lula. Això permet que el gen terapèutic s'expressi durant llargs períodes de temps, fins i tot durant tota la vida de l'organisme.

Al laboratori, els *Ad gutless* han estat administrats in vivo en diferents teixits, com el fetge, el múscul, el sistema nerviós central, la retina, el pulmó i l'úter, en diferents models animals, com el ratolí, la rata, el gos i els primats no humans. Així, en el fetge, els *Ad gutless* s'han utilitzat en models animals per tractar la hipercolesterolèmia familiar, l'obesitat, la deficiència d'ornitina transcarbamilasa, la diabetis i l'hepatitis viral crònica. Els bons resultats obtinguts en el ratolí, on s'observa l'expressió del gen terapèutic durant tota la vida de l'animal, van dur a utilitzar aquests vectors en gossos, així com en primats no humans, per tractar l'hemofília A i B.

No obstant això, encara que aquests vectors tenen nombrosos avantatges, el seu ús en assajos clínics encara no és possible, perquè cap dels sistemes actuals de producció permet disminuir els nivells de contaminació dels *Ad helper* per sota de l'1%. Atès que els *Ad-helper* desperten la resposta immunogènica, una contaminació per sobre d'aquest nivell és intolerable en un assaig o tractament en humans, el que fa imprescindible el desenvolupament d'estratègies conceptualment noves.

Per produir aquests vectors es necessiten tres elements fonamentals: un *Ad gutless* que faci de motlle per fabricar d'altres com ell; un adenovirus "ajudant" que porti les proteïnes virals necessàries (*Ad-helper*) i una línia cel·lular permissiva per a la producció d'Ad (és a dir, un tipus de cèl·lules aptes perquè els adenovirus es reproduïxin en elles). Els *Ad gutless*, també són denominats "dependents d'ajudant" (*Ad helper-dependent*), ja que sense la presència dels ajudants els manca la maquinària viral necessària per a reproduir-se. És a dir, per a produir les quantitats necessàries d'*Ad gutless* per utilitzar en teràpia, es necessita la presència dels *Ad-helper*, que són els que subministren tota la "infraestructura de producció" del virus.

És aquí on pren rellevància una recent investigació de l'equip dirigit per Miguel Chillón, investigador ICREA del CBATEG de la UAB. Aquest grup ha descrit el desenvolupament d'un nou sistema de producció, basat en la generació d'una família d'*Ad helper* amb el senyal de empaquetament alterat. El senyal d'empaquetament és la seqüència del genoma que codifica les instruccions per "embolicar" tot el genoma víric dins de la seva càpsida i deixar-ho enllestit per entrar en funcionament.

L'assoliment de l'equip de la UAB ha estat alterar la manera en què l'*Ad-helper* interpreta aquest senyal, aconseguint que retardi el seu empaquetament, però sense alterar la producció de proteïnes víriques. Ho han aconseguit flanquejant aquesta

seqüència amb altres seqüències de DNA, anomenades attB/attP, que tenen significat per a la proteïna recombinasa #C31. Aquesta modificació causa un retard significatiu de l'empaquetament del genoma de l'*Ad helper*, però sense disminuir els seus nivells d'expressió proteica i, per tant, l'ajuda que proporciona per a la producció d'*Ad gutless*. Els nivells d'amplificació d'aquests *Ad helper* són del 0.001-0.01% respecte als controls. És a dir, en proporció, es produeixen moltíssims més vectors terapèutics que vectors contaminants; això facilitaria el procés de producció a gran escala en bioreactors. Finalment, el que s'obtenen són "collites" d'*Ad gutless* pràcticament lliures de contaminants, que podrien ser utilitzats d'una manera segura en els tractaments de teràpia gènica i permetria, per primera vegada, la utilització d'*Ad gutless* en assajos clínics humans.

Aquests resultats han permès a la UAB patentar recentment aquesta tecnologia (WO/2007/125146, Method for producing adenovirus vectors for gene therapy and DNA sequences used therefor ).

Miguel Chillón

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona Investigador vinculat ICREA

"Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-PhiC31 sequences: implications for helper-dependent adenovirus production." Alba R, Hearing P, Bosch A, Chillón M. (Virology. 2007 Oct 10;367(1):51-8. Epub 2007 Jun 8.)