

# VECTORES DE TRANSFERENCIA EN TERAPIA GENICA

Jesús M. Fominaya. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas



## INTRODUCCIÓN

El concepto de terapia génica, definida como la introducción de material genético en una célula con el propósito de aliviar o eliminar un proceso patológico, surgió a nivel ideológico a mediados de los años 60, incluso antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante. Su apoyo experimental comenzó en los 80 con la aparición de los vectores retrovirales. Las primeras demostraciones *in vitro* de la potencialidad de esta nueva tecnología generaron un optimismo desmesurado en la comunidad científica que ha provocado, a lo largo de poco más de una década, el establecimiento de más de un millar de ensayos clínicos. Sin embargo, la euforia inicial se ha traducido en prudencia e, incluso en cierto escepticismo en algunos sectores, al no cumplirse las expectativas temporales de evolución y consecución de resultados. El fallecimiento de un joven paciente implicado en uno de estos programas, junto con la aparición inesperada de varios casos de leucemia inducida tras la integración del transgen, ha provocado una dura crítica al desarrollo que se está produciendo en este campo. En contraposición, comienzan a obtenerse las primeras evidencias de éxito terapéutico, además de acumularse datos experimentales prometedores. Por otra parte, la baja toxicidad de los tratamientos y las grandes posibilidades

aún por desarrollar, siguen justificando, e incitando, un continuo avance en este apasionante campo de la investigación biotecnológica.

El cuello de botella del desarrollo de la terapia génica se encuentra en la obtención de sistemas eficaces de transferencia génica. Hasta el momento, existe una gran variedad de vectores que presentan diversas ventajas e inconvenientes, pero ninguno de ellos alcanza el nivel de calidad requerido para que la terapia génica obtenga la madurez que le permita ser una alternativa real y competitiva frente a las terapias tradicionales. La potencialidad sigue siendo desmesurada. El conocimiento de la totalidad de nuestro material genético, como resultado de la finalización del proyecto Genoma Humano, abre unas expectativas ilimitadas. Por ello, necesitamos que los vehículos de transporte del material genético se desarrollen suficientemente, de modo que permitan la utilización de los genes como nuevos agentes farmacológicos y se posibilite su explotación terapéutica.

El objetivo de este trabajo es dar una idea general del estado en el que se encuentra actualmente el campo del diseño y desarrollo de vectores de transferencia génica con aplicación terapéutica. Antes de comenzar conviene recordar que estamos tratando con un concepto terapéutico global, ya que cualquier célula puede ser el objetivo del tratamiento. Además, la aplicación terapéutica de material genético es potencialmente ilimitada, puesto que va más allá de la reparación, sustitución o compensación de una alteración genética, permitiendo su utilización como agente farmacológico *per se*, incorporando nuevas actividades en el organismo que permitirían tanto tratamientos de patologías sin daño genético (enfermedades infecciosas, por ejemplo) como tratamientos preventivos (vacunas de DNA). Por lo tanto, la diversidad de situaciones en las que se podría aplicar justifica el desarrollo de una amplia diversidad de vectores (el tratamiento de cada patología puede requerir el diseño de un vector específico). La obtención de un vector universal con aplicación generalizada es una quimera, ya que diferentes enfermedades pueden tener requerimientos opuestos. Sin embargo, sí se pueden definir las características de un "vector ideal" y adaptarlas posteriormente a situaciones concretas:

1. Que sea **reproducible**.
2. Que sea **estable**.
3. Que permita la inserción de material genético sin restricción de **tamaño**.
4. Que alcance **concentraciones elevadas** ( $>10^8$  partículas/ml).
5. Que permita la **transducción** de células tanto en división como quiescentes.

## Vectores de transferencia en terapia génica

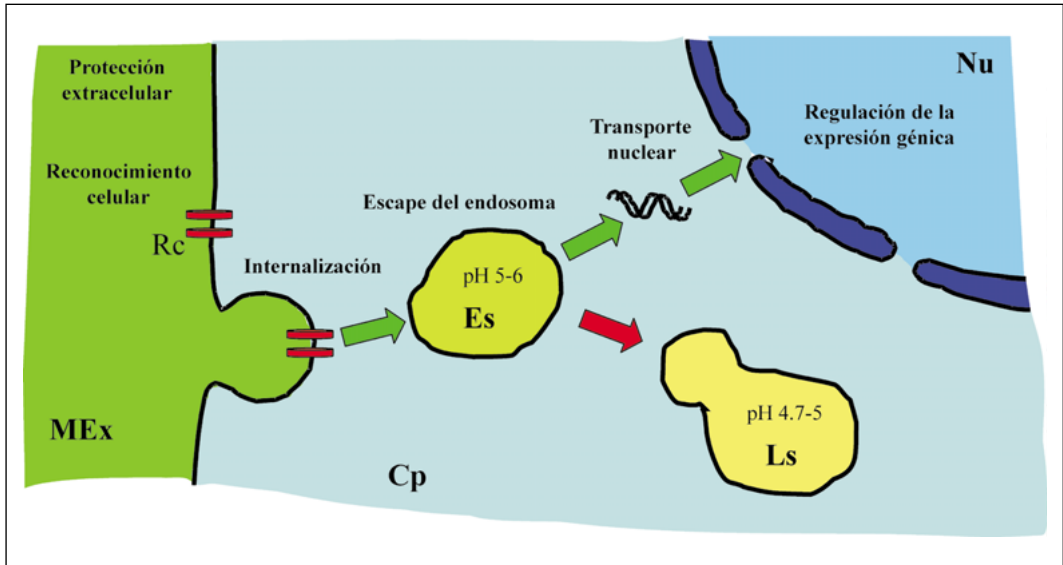
6. Que posibilite la **integración específica** del gen terapéutico.
7. Que reconozca y actúe sobre **células específicas**.
8. Que la **expresión** del gen terapéutico pueda ser regulada.
9. Que carezca de elementos que induzcan una **respuesta inmune**.
10. Que pueda ser **caracterizado** completamente.
11. Que sea **inocuo** y minimice sus posibles **efectos secundarios**.
12. Que sea fácil de **producir** y **almacenar** y a un **coste** razonable.

Los vectores son sólo una parte, aunque fundamental, del sistema terapéutico. El sistema en sí consta de dos componentes, el "vector" (vehículo de transporte) y el "carga" (material transportado). Este, a su vez, se puede subdividir en otros dos componentes: el "efector" (gen a introducir) y el "soporte" (los elementos que condicionan su expresión).

El **carga** suele ser una estructura de tipo plasmídico (ADN bicatenario y circular) aunque puede ser de diversa naturaleza y complejidad, desde un simple oligonucleótido hasta un cromosoma artificial, que permite incorporar una cantidad elevada de material genético con capacidad de perpetuación en el tiempo.

El **efector** que se utilice dependerá del efecto que se persiga. Si se pretende compensar, sustituir o reparar un gen dañado, el efector ha de ser una copia del gen intacto o un elemento que posibilite su reparación. Si se pretende inducir un efecto biológico concreto (eliminar específicamente un tipo de células, bloquear la expresión de un virus, inducir una respuesta inmune...), se pueden introducir genes naturales que potencien dicho efecto o genes que originen nuevas actividades que produzcan el efecto perseguido. Es el caso, por ejemplo, de los genes suicida, en la denominada terapia con enzimas procesadoras de drogas. Consiste en la introducción de genes que codifican enzimas capaces de convertir un sustrato inocuo (pro-droga) en una potente droga citotóxica. El sistema más utilizado es el del gen de la timidina quinasa del virus Herpes Simplex (HSV), que convierte el glanciclovir en su derivado tóxico glanciclovir trifosfato que, además, es capaz de afectar a las células adyacentes no transducidas, aumentando su eficacia por el denominado efecto "*bystander*".

El **soporte** es la base para el control de la expresión del transgén e incluye distintos tipos de elementos reguladores. El primero y fundamental es el promotor, la zona de ADN anterior al gen donde se recluta la maquinaria de transcripción. La naturaleza del promotor condiciona el tipo de regulación de la expresión génica. Así, se pueden utilizar promotores constitutivamente activos o promotores específicos, que sólo son activos en un tipo celular concreto. De la

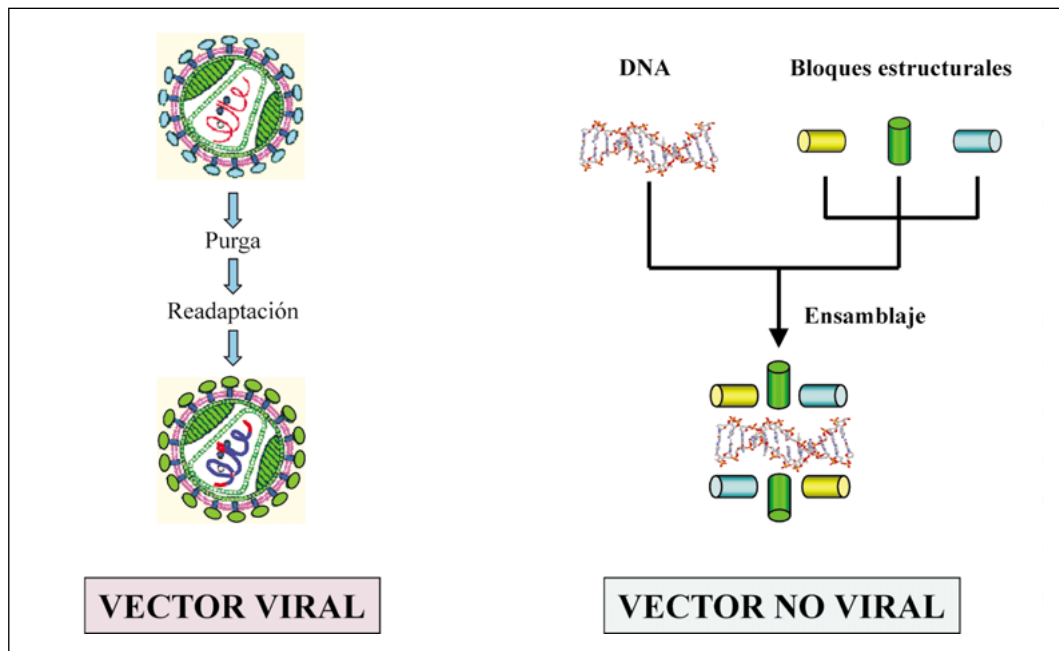


**Figura 1. Puntos clave**  
**par regular la eficacia**  
**de un vector**  
**de transferencia génica.**

misma manera, se pueden emplear promotores inducibles, que requieren la presencia de un elemento concreto para ejercer su función. Este puede ser un agente de adicción exógena (control externo) o un agente determinado por características fisiológicas especiales (por ejemplo, los promotores sensibles a situaciones de hipoxia). Existen otros elementos del soporte de diversa importancia, dependiendo de la funcionalidad perseguida. Entre ellos se encuentran potenciadores y represores de los promotores, secuencias de aislamiento ("insulators") que impiden las influencias de secuencias reguladoras próximas, secuencias de integración (para permitir la inclusión del material exógeno dentro del genoma de la célula hospedadora), secuencias de recombinación homóloga (para permitir el intercambio de material genético con el genoma hospedador en una región específica), secuencias de empaquetamiento (para introducir el material genético en el interior de un vector viral), o secuencias inmunoestimulantes (secuencias bacterianas del tipo islas CpG no metiladas, que sirven como coadjuvantes en las vacunas de ADN).

Los **vectores** son los encargados de asegurar la estabilidad del material genético transportado y de vencer todas las barreras biológicas hasta alcanzar su destino final, el núcleo de la célula diana, donde tiene lugar la regulación génica. También de ellos va a depender la vía de administración a utilizar. En la Figura 1 se esquematizan las barreras más importantes que el vector ha de solventar en su

## Vectores de transferencia en terapia génica



**Figura 2.** Tipo de vectores y proceso esquematizado de obtención.

camino hacia su destino funcional. Entre ellas se incluyen la estabilidad en el medio extracelular (para evitar su eliminación y degradación), el reconocimiento de la célula diana (generalmente mediante un receptor específico), su unión a la membrana, su internalización en la célula (normalmente utilizando un sistema de transporte vesicular como la endocitosis), el escape de los sistemas de degradación intracelular (lisosomas) y su entrada final al núcleo, donde debe desmantelarse para permitir que el material genético que transporta gane acceso a su ubicación final y a la maquinaria de transcripción.

Existen dos grandes grupos de vectores: **virales** y **no-virales** (Figura 2). Los primeros incluyen todos aquellos que se han obtenido a partir de un virus, tratando de eliminar sus características patológicas y de adaptarlos a su nueva función como transportadores de material genético heterólogo. Pretenden aprovechar la ventaja que aportan los virus como vectores naturales, que han sufrido procesos de evolución complejos a lo largo de millones de años para optimizar su función de introductores de material genético en las células que invaden. Los vectores no-virales siguen una estrategia opuesta, de síntesis en lugar de modificación. Parten de estructuras sencillas, conocidas, e intentan reconstruir desde la base un sistema completamente artificial que posibilite el transporte efectivo de

genes en el interior de una célula. Como resulta obvio, las opciones son muy diversas, aunque todas ellas tienen en consideración puntos equivalentes, que han de resolver, en el intento de incorporar todos los elementos necesarios para la construcción de un sistema de transferencia efectivo. Ambas estrategias tienen ventajas y desventajas, que analizaremos a continuación. Existen también algunos casos de vectores biológicos no virales (bacterianos) como portadores de genes terapéuticos, alguno de ellos incluso en ensayos clínicos (para más información, visitar la base de datos de ensayos clínicos en terapia génica que facilita el portal de la revista *Journal of Gene Medicine*: <http://www.wiley.co.uk/gen-med/clinical/>), pero no van a ser analizados en este documento.

---

## VECTORES VIRALES

---

Los vectores de tipo viral son actualmente los más efectivos, fueron los primeros en utilizarse en ensayos clínicos a comienzos de 1990 y continúan siendo los más utilizados en dichos ensayos. Los virus son, de hecho, sistemas naturales de transferencia genética. Para modificar un virus y transformarlo en un vector con potencialidad terapéutica, el primer paso es bloquear su capacidad de propagación eliminando los genes responsables de su replicación. Normalmente, se suelen establecer líneas celulares que incorporan parte del genoma vírico y que permiten completar el ciclo reproductivo del virus, cuando son transfectadas con plásmidos que introducen el material genómico complementario. Estas líneas celulares se denominan "empaquetadoras" y son las herramientas de producción de los vectores virales. El segundo paso en el proceso de obtención de un vector viral es la eliminación de parte del genoma viral para crear espacio donde introducir el material terapéutico (gen o genes, más los elementos de control). Se han de eliminar genes que no sean esenciales y, especialmente, aquellos que puedan resultar tóxicos o perjudiciales para la célula a tratar.

En general, los vectores virales presentan como ventaja su gran eficacia de transferencia y la posibilidad, en algunos casos, de integrar el transgén en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, arrastran importantes limitaciones que incluyen su falta de especificidad celular en la mayoría de los casos; la limitación del tamaño en el material genético a incorporar, debido a que han de empaquetarlo en la cápsida; su elevada inmunogenicidad y, sobre todo, el riesgo biológico que conllevan (reconstitución de partículas replicativas por re-

## Vectores de transferencia en terapia génica

combinación genética y oncogenicidad inducida por integración inespecífica). De hecho, esto es lo que ha ocurrido en un reciente ensayo clínico, por otra parte exitoso, de terapia compensatoria en una inmunodeficiencia congénita tratada con vectores retrovirales portadores de una copia "sana" del gen dañado. En este ensayo, la inserción del transgén en el genoma del paciente generó, en un par de casos, el desarrollo de una leucemia producida por su integración cerca del oncogén LMO2, provocando su activación.

La lista de vectores virales es cada día más amplia. Aquí solo se muestran algunos de los más representativos, y que están siendo utilizados en ensayos clínicos.

### Vectores retrovirales

Los retrovirus son virus RNA con envuelta y fueron elegidos inicialmente como prometedoros vehículos de transferencia génica debido a su elevada eficacia de transducción en un gran número de tipos celulares, a que son capaces de integrarse de forma estable en el genoma de la célula que infectan, sin expresar ninguna proteína viral inmunogénica, y a que son relativamente poco patogénicos, con pocas excepciones como el virus del SIDA (HIV, Human Immunodeficiency Virus). La mayoría de ellos derivan del virus de la leucemia murina (MuLV). El virus parental posee tres genes, gag, pol y env, que codifican proteínas responsables de la replicación, encapsidación, transcripción reversa e infección. Estos tres genes pueden ser utilizados en trans (facilitados por las células empaquetadoras), permitiendo la generación de vectores que limitan el genoma retroviral a la señal de empaquetamiento y las secuencias terminales necesarias para la integración (LTRs, *Long Terminal Repeats*). De esta forma se minimiza el componente genómico viral y se maximiza la capacidad de incorporación de material genético heterólogo, aunque el límite sigue siendo discreto, unas 7-8 kilobases (kb).

Su mayor limitación reside en el hecho de que sólo son capaces de transducir eficazmente células en división, ya que el acceso al núcleo del complejo de preintegración requiere la ruptura de la membrana nuclear. Esto inicialmente ha sido utilizado como una ventaja para el tratamiento de patologías oncológicas, generando un cierto grado de especificidad debido al elevado nivel de proliferación de las células transformadas. Sin embargo, limita grandemente su utilización en sistemas tan atractivos como las células progenitoras, normalmente en estado quiescente. La utilización de vectores derivados de otro tipo de retrovirus, los lentivirus (HIV, SIV...), que sí son capaces de infectar e inte-

grarse en células quiescentes, abre nuevas posibilidades a estos vectores, aunque los riesgos inherentes al uso de los mismos han retrasado su utilización en ensayos clínicos, habiéndose iniciado recientemente.

Un segundo tipo de inconvenientes reside en la poca estabilidad de las partículas y su baja tasa relativa de producción. Esto ha sido parcialmente resuelto mediante la sustitución de la proteína de la envuelta por la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, que posibilita la obtención de títulos de hasta 109 p.i./ml y estabiliza las partículas. Además, la utilización de células empaquetadoras de origen humano produce vectores resistentes a la inactivación por complemento.

Finalmente, la carencia de especificidad celular inherente a estos virus (poseen un rango de infectividad muy amplio) está tratando de resolverse mediante la utilización de vectores que poseen proteínas quiméricas en la envuelta. Estas incorporan ligandos heterólogos o anticuerpos monocatenarios que generan nuevas especificidades y permiten transducir selectivamente una población celular.

### Vectores adenovirales

Los adenovirus son virus DNA sin envuelta con un genoma bicatenario de hasta 36 kb. Se han seleccionado los serotipos 2 y 5 para la obtención de vectores por no estar asociados con ninguna enfermedad severa ni originar tumores en animales. Pueden transducir un número bastante amplio de tipos celulares distintos, tanto células en división como post-mitóticas, con una eficacia muy elevada. Sin embargo, el genoma viral se mantiene episómico, lo que permite sólo una expresión genética transitoria.

La primera generación de vectores adenovirales se obtuvo mediante delección de la región E1, que bloqueaba su capacidad replicativa, y la E3, aparentemente no esencial. Sin embargo, posteriormente se demostró que la presencia de E3 incrementaba significativamente la expresión del transgen y disminuía la respuesta inmune, por lo que volvió a introducirse en la segunda generación de vectores a expensas de otras regiones, como la E4 o la E2A. En ambos casos, la capacidad del vector para acomodar genes terapéuticos no sobrepasaba los 7-8 kb, muy por debajo de la capacidad teórica de las partículas originales. Recientemente, se ha conseguido eliminar la mayoría del genoma viral manteniendo sólo las señales de empaquetamiento y las secuencias terminales (ITRs, *Inverted Terminal Repeats*), rindiendo vectores con gran capacidad incorporadora (hasta 35 kb), que se han denominado "vectores sin tripas" (*gutless*).


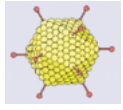
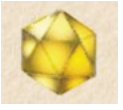


## Vectores de transferencia en terapia génica

La eliminación de material genómico viral no sólo aumenta la capacidad del vector, sino que disminuye también el riesgo de inducción de respuesta inmune. De hecho, éste es uno de los problemas más graves de estos vectores, y ha sido la causa del fallecimiento accidental mencionado anteriormente. La mayoría de la población humana ha sido infectada en algún momento con adenovirus y presenta una respuesta inmunitaria inicial. Existen estrategias inmunosupresoras transitorias y se están tratando de desarrollar vectores adenovirales de origen animal (canino, bovino u ovino). Sin embargo, el problema se mantiene sin resolver de una forma satisfactoria y el uso de vectores adenovirales se reduce a aplicaciones unitarias.

Una de las mayores ventajas de estos vectores radica en su alta productividad, con títulos de hasta 10<sup>10</sup> p.i./ml, y su gran estabilidad, que les permiten ser concentrados adicionalmente para alcanzar valores de 10<sup>12</sup> p.i./ml. Esto, junto con la posibilidad de transducir células quiescentes, les ha hecho muy

**Tabla 1.**

Características	V. Retrovirales	V. Adenovirales	V. Adenoasociados
			
Soporte génico	RNA lineal bicatenario	DNA lineal bicatenario	DNA lineal monocatenario
Capacidad transportadora	7-8 kb	Hasta 35 kb (gutless)	4.5 kb
Inmunogenicidad	Baja	Elevada	Baja
Eficacia de transfección	Elevada	Elevada	Elevada
Dependencia del estado de división celular	Sí (excepto lentivirus)	No	No
Integración del transgén	Sí, aleatoria	No	Sí, específica
Estabilidad	Baja	Elevada	Elevada
Especificidad	Baja	Baja	Baja
Otras	Riesgo biológico (infect., mutag. insercional)	Limitado a aplicaciones reducidas	Elaboración tediosa

atractivos para la comunidad científica y son el segundo tipo de vectores en frecuencia de utilización en ensayos clínicos.

Su falta de especificidad celular también ha sido compensada por el desarrollo de estrategias de redireccionalidad: quimeras que introducen ligandos específicos en proteínas de la cápsida y moléculas biespecíficas que reconocen tanto la cápsida viral como el receptor seleccionado, para conferir un nuevo tropismo celular.

### Vectores basados en virus adenoasociados

Los virus adenoasociados son parvovirus humanos no patológicos. Son pequeños virus sin envuelta con un genoma de DNA monocatenario, capaces de infectar un gran número de células de diverso origen, tanto en división como en su estado quiescente. A diferencia de los adenovirus, pueden integrarse en la célula huésped en una ubicación específica (el brazo q del cromosoma 19) eliminando la posibilidad de mutagénesis insercional. Otra ventaja adicional es la carencia de respuesta inmune observada *in vivo*.

Sus mayores limitaciones se centran en su reducida capacidad de transporte (unos 4.5 kb) y en su tediosa producción, que requiere la presencia de virus de apoyo (adenovirus o herpesvirus), difíciles de eliminar completamente. Una complicación adicional surgió al comprobar que la eliminación de parte del genoma viral para permitir la introducción del transgén se tradujo en la pérdida de la capacidad de integración específica. Recientemente se ha descubierto que la proteína Rep78, en presencia de los ITRs, es capaz de potenciar la integración específica en el genoma celular y podría ser la clave que solucionara este problema.

Finalmente, como hemos visto en los vectores anteriores, la falta de especificidad celular ha sido también tratada empleando la estrategia de moléculas biespecíficas.

### Vectores virales quiméricos

Una opción interesante, que cada día se está explotando con más frecuencia, es la combinación de varios vectores para compensar las limitaciones que presentan cada uno por separado, a la vez que se aprovechan las ventajas más destacables que aportan individualmente. Existen diversas estrategias experimentales de estas quimeras, pero sólo voy a mencionar, a título de ejemplo, la quimera adenovirus-retrovirus. Consiste en la utilización simultánea de dos tipos de vectores adenovirales, uno que incorpora la maquinaria de empaquetamiento retroviral (gag, pol y env) y otro que

## Vectores de transferencia en terapia génica

introduce el material genético equivalente a un vector retroviral (LTRs, señal de empaquetamiento y material terapéutico). Se aprovecha la elevada eficacia de transducción de los vectores adenovirales para cotransfectar con ambos vectores, transformando las células dianas en células productoras de vectores retrovirales. Los vectores así generados son capaces de infectar las células vecinas e integrarse en su genoma.

## VECTORES NO-VIRALES

El concepto general aplicado al desarrollo de este tipo de vectores se asemeja más al de los productos farmacéuticos tradicionales. Se pretende mimetizar el proceso natural de introducción de material genético en una célula huésped, utilizando material sintético y, por lo tanto, conocido y controlable. La eficacia de estas nuevas "medicinas génicas" depende de dos niveles de actuación: el sistema de introducción de los genes (el vector propiamente dicho) y el sistema de regulación de su expresión (el soporte). Ambos son fundamentales y complementarios, pero aquí sólo vamos a tratar el primero de ellos.

Los vectores no-virales presentan, en general, una eficacia inferior al de sus oponentes (no es fácil competir con sistemas desarrollados por la naturaleza). Algunas características virales, como la capacidad de integración en el genoma huésped, están en proceso de desarrollo. Actualmente se está trabajando en el empleo de transposones como "Sleepy Beauty", capaz de insertar transgenes en cromosomas de mamíferos. La explotación de estrategias alternativas, que no requieren la integración del transgén para asegurar un efecto terapéutico estable, también favorece el desarrollo de estos vectores. Es el caso de los métodos de inducción de reparación de DNA *in situ*, como la "quimeroplastia", aunque su eficacia no está claramente establecida.

En cuanto a sus ventajas, destacan su facilidad de manipulación, mayor estabilidad, bioseguridad, gran capacidad transportadora, menor inmunogenicidad y especificidad celular, en algunos casos. Los tipos de vectores son muy variados, pero pueden agruparse en categorías, que veremos a continuación.

### Métodos físicos

Se basan en la introducción de DNA en la célula mediante la aplicación de un sistema mecánico o eléctrico. Alguno de ellos está siendo utilizado en ensayos clínicos, aunque presentan claras limitaciones, principalmente por su aplicación

local y el número reducido de células que afectan. En esta categoría se encuentran la microinyección (introducción de DNA en el núcleo celular mediante el uso de una microaguja), bombardeo de partículas, popularmente conocido como la "pistola génica" (proyección de micropartículas metálicas recubiertas de DNA mediante un sistema balístico impulsado por gas), electroporación de bajo voltaje (permeabilización transitoria de la membrana celular por aplicación de pulsos eléctricos de alta frecuencia y bajo voltaje) e inyección intersticial de DNA desnudo. Este último método ha resultado especialmente efectivo en músculo.

### Liposomas catiónicos (Lipoplexes)

Buscando la similitud con otras formulaciones farmacéuticas, y tratando de aprovechar la experiencia acumulada en sistemas particulados de encapsulación de pequeños fármacos en vesículas lipídicas, se trató de aplicar la tecnología de los liposomas al transporte de ácidos nucleicos. Aunque inicialmente se intentó encapsular el DNA en el interior de liposomas, el rendimiento fue pobre y la eficacia se incrementó considerablemente al cambiar los liposomas tradicionales por otros basados en lípidos catiónicos. A diferencia de aquellos, el DNA interacciona con los grupos catiónicos de la superficie lamelar y no se incluyen en el interior vesicular. El éxito de este tipo de estrategias ha sido claro desde el principio y actualmente da cuenta del mayor número de protocolos en ensayo clínico dentro de los vectores no virales.

Existe un número bastante elevado de estos lípidos tanto en explotación como agentes de transfección como en desarrollo para su utilización como vectores de transferencia en terapia génica. Entre los más populares se encuentran DOTMA (Lipofectin), DOTAP, DMRIE, DOGS (Transfectam), DOSPA (LipofectAMINA) y DC-Colesterol. Presentan niveles de eficacia aceptablemente altos, una inmunogenicidad casi nula, una capacidad de transporte de DNA sin restricción de tamaño, gran estabilidad de almacenaje y sencillez de uso. Sin embargo, son difíciles de caracterizar estructuralmente y no presentan especificidad celular, aunque ambos puntos están en desarrollo.

Los lípidos catiónicos utilizados están formados por estructuras anfifílicas, compuestas de un dominio hidrofóbico y una cabeza polar. La naturaleza de esta última es la que marca la diferencia entre ellos. Los grupos catiónicos más frecuentes son aminas cuaternarias y poliaminas (espermina, espermidina, polilisisina...). Su eficacia de transfección depende, en la mayoría de los casos, de la presencia de un lípido neutro adicional, DOPE, que actúa como "lípido de apoyo", posibilitando la fusogeni-

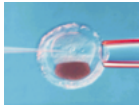


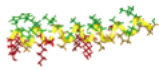
## Vectores de transferencia en terapia génica

dad del liposoma y la entrada del DNA en el citosol. La compactación del DNA con policationes, especialmente protamina, antes de la adicción del liposoma ha supuesto un incremento importante en la efectividad del sistema. Otras modificaciones interesantes incluyen la utilización adicional de lípidos aniónicos, que activan su capacidad fusogénica en el microambiente ácido del endosoma, la inclusión de ligandos o de anticuerpos para generar especificidad celular y la optimización de formulaciones que eviten su opsonización, una de las principales limitaciones de su utilización *in vivo*.

### Quimeras HVJ-liposomas (Virosomas)

Un concepto muy interesante, desarrollado por un grupo japonés, es la obtención de liposomas quiméricos por fusión con el virus hemaglutinante del Japón (HVJ), también llamado virus Sendai. La estrategia consiste en la encapsulación de complejos DNA-HMG1 en liposomas clásicos (fosfolípidos, colesterol) y su fusión

Tabla 2.

Características	M. Físicos	Lipoplexes	Poliplexes	Peptiplexes
				
Soporte génico	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera
Capacidad transportadora	Ilimitada	Ilimitada	Ilimitada	Ilimitada
Inmunogenicidad	Muy baja	Muy baja	Baja (en algunos casos)	Baja (en algunos casos)
Eficacia de transfección	Elevada, pero muy localizada	Media	Media	Media
Dependencia del estado de división celular	Relativa	Relativa	Relativa	Relativa
Integración del transgén	No	No	No	No
Estabilidad	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Especificidad	Elevada (aplicación local)	Baja (con excepciones)	Elevada, en algunos casos	Elevada, en algunos casos
Otras	Aplicación bastante limitada	Experiencia farmacológica	Económicos, rel. controlables	Versátiles, biodegradables

posterior con HVJ inactivado con luz ultravioleta. De esta forma se combinan las ventajas del vector no viral con la capacidad de unión celular y fusogenicidad aportadas por las proteínas de la envuelta vírica. A diferencia de los vectores virales, esta nueva quimera resulta muy poco inmunogénica y permite administraciones repetidas.

### Conjugados moleculares (Poliplexes)

Estos vectores se basan en moléculas bifuncionales obtenidas por unión covalente entre un polication (polilisina), que posibilita la unión y condensación del DNA, y un ligando o anticuerpo monoclonal, que confiere especificidad celular. Estas moléculas forman complejos con DNA de estructura definida (toroidal) que permite su fácil captura por la célula, siguiendo una ruta endocítica mediada por receptor. La ventaja más clara del sistema es su especificidad. Sin embargo, la mayor parte de los complejos que entran en los endosomas finalizan en los lisosomas, donde son degradados. Esta importante limitación ha tratado de solucionarse mediante la adición de reactivos que bloqueen la acidificación del endosoma (cloroquina, monensina, bafilomicina A1...) o la incorporación de actividades fusogénicas que se activen con la disminución del pH que tiene lugar en el endosoma. Entre estos últimos se incluyen adenovirus inactivados con psoralen y luz UV (generan eficacias de transfección muy altas) y péptidos fusogénicos. Para su utilización *in vivo* se necesita la incorporación de esta nueva actividad en los complejos, en lugar de su utilización *in trans*.

### Policationes (Poliplexes)

De nuevo, el carácter catiónico es la directriz para el desarrollo de un vector no viral. Este carácter permite, no sólo la interacción con el DNA (polianión), sino también su condensación y la interacción de los complejos resultantes con las membranas celulares, que poseen cargas negativas en su superficie. Para ello se requiere que los complejos polication-DNA sean electropositivos, lo que se consigue con un exceso del polication. Por tanto, la determinación de la estequiometría óptima es fundamental para obtener un buen rendimiento de transferencia génica.

Los policationes más desarrollados y de mayor eficacia en la actualidad son los basados en polímeros ramificados. Entre ellos destacan los dendrímeros de poliamidaminas (PAMAM) y la polietilénimina (PEI). Los primeros son estructuras esféricas con una arquitectura muy definida y controlable. La presencia de grupos protonables

## Vectores de transferencia en terapia génica

con diferentes pKs le confiere un carácter tamponador que bloquea la acidificación del endosoma, incrementando la eficacia de escape al citosol. El fraccionamiento parcial del dendrímero, mediante la eliminación de alguna de sus ramificaciones, ha permitido una mejora sustancial del vector. El dendrímero fracturado actúa como una "esponja" en el interior del endosoma, posibilitando una liberación más efectiva del DNA.

PEI es también una alternativa muy interesante. Comparte la funcionalidad tamponadora de los dendrímeros y su coste de producción es muy bajo. Sin embargo, es de naturaleza polidispersa y más difícil de caracterizar. Actualmente se han conseguido introducir con éxito diversos tipos de ligandos, que le confieren selectividad celular.

### Vectores de naturaleza peptídica (Peptiplexes)

Existe un grupo heterogéneo de vectores que se basan en estructuras de naturaleza peptídica. De ellos sólo voy a mencionar dos tipos. El primero utiliza proteínas multidominio, basadas en el carácter modular de las toxinas bacterianas. El concepto general es similar al de los conjugados moleculares pero con la ventaja de la utilización de técnicas de ingeniería genética. El sistema incorpora, en una sola cadena peptídica, diferentes dominios estructurales, que confieren actividades específicas necesarias para la eficiente introducción de DNA en las células dianas. Las proteínas quiméricas obtenidas poseen un dominio de reconocimiento y unión celular (ligando o anticuerpo monocatenario), un dominio que posibilita el escape del endosoma (el dominio de translocación de la toxina) y un dominio de unión a DNA (específico o inespecífico). Una de las ventajas de este sistema es su versatilidad, que le permite la adaptación a requerimientos específicos mediante la simple sustitución de un dominio. Sin embargo, presenta limitaciones en cuanto a la expresión a gran escala de proteínas tan complejas, así como su posible inmunogenicidad.

El segundo tipo está basado en la utilización de una estrategia similar mediante el uso de péptidos modulares: la aplicación de péptidos con funcionalidades específicas (unión a DNA, reconocimiento celular, fusogénesis, tropismo nuclear...) como sillares estructurales. De esta forma se permite el establecimiento de complejos de tamaño controlado (el mínimo posible) y de reducida inmunogenicidad, que han permitido mejorar la eficacia de la transferencia génica.

Para finalizar, solo quiero recordar que éste es un campo en continuo desarrollo y evolución, y que aún quedan estrategias por explotar. Probablemente, la solución no se encuentre en ninguno de los vectores como se conocen en la actua-

lidad. La combinación de varios de ellos se está empleando con éxito en algunos sistemas. En cualquier caso, cuantas más alternativas se exploren, más cerca estaremos de la obtención de un buen vector de transferencia.

En paralelo al desarrollo de vectores, los avances en el diseño del soporte (promotores inducibles y específicos de tejido, secuencias reguladoras, aislantes génicos, sistemas de integración, replicación episómica en el huésped...) compensan y complementan a aquellos, permitiendo una evolución integral del sistema que posibilitará una mayor eficacia y una disminución de sus limitaciones. Mientras tanto vamos conociendo en mayor detalle los mecanismos biológicos que permiten la introducción de material genético heterólogo en una célula y eso repercutirá positivamente en el diseño de las nuevas generaciones de vectores.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Crystal, R.G. (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* **270**, 404.
2. Anderson, W.F. (1998) Human Gene Therapy. *Nature* **392**, 25.
3. Verma, I.M. and Eitzman, M.D. (2005) Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711.
4. Rolland A. (2005) Gene medicines: The end of the beginning? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 669.
5. Kenneth Lundstrom (2003) Latest development in viral vectors for Gene Therapy. *Trends in Biotech* **21**, 117.
6. Cavazzana-Calvo, M, et al. (2005) Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu. Rev. Med.* **56**, 585.
7. Peng K.-W. and Russell S.J. (1999) Viral vector targeting. *Cur. Op. Biotech.* **10**, 454.
8. Schmidt-Wolf, G.D. and Schmidt-Wolf, I.G.H. (2003) Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends in Mol. Med.* **9**, 67.
9. Gene Therapy Progress and Prospects (2004) *Gene Ther.* **11**. Número especial dedicado a vectores.
10. Tseng, W. And Huang, L. (1998) Liposome-based gene therapy. *PSTT.* **1**, 206.
11. Kaneda Y. et al. (1999) Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? *Mol. Med. Today* **5**, 298.
12. Pack, D.W. et al. (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (7), 581.
13. Wels, W. and Fominaya, J. (1998) Peptides and fusion proteins as modular DNA carriers. En "Self-assembling complexes for gene delivery: from laboratory to clinical trial" (John Wiley & sons), p351.