

RESPUESTA INMUNE Y TERAPIA GÉNICA CON VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS

JULIETH A. SIERRA-DELGADO^{1,2*}, PAULA K. BAUTISTA-NINO^{2*}, CLARA I. VARGAS-CASTELLANOS¹,
NORMA C. SERRANO DIAZ^{2,3}, MELVIN Y. RINCON²

¹Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, ²Dirección de Investigaciones, Fundación Cardiovascular de Colombia, Floridablanca, Santander, ³Hospital Internacional de Colombia, Piedecuesta, Santander, Colombia

*Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo

Resumen En los últimos años la terapia génica se ha posicionado como una opción real y segura en el desarrollo de alternativas terapéuticas para la cura y la prevención de diferentes enfermedades. Consiste en la inserción de material genético en un tejido o célula defectuosa, mediante el uso de un vector. Existen varias consideraciones para seleccionar el vector más apropiado, incluyendo el potencial de unión y entrada a la célula diana, la capacidad de transferencia del material genético al núcleo, la habilidad de expresión del inserto y la ausencia de toxicidad. En el panorama actual, los vectores virales más utilizados son los derivados de los virus adenoasociados (AAV). Características como su bioseguridad, baja toxicidad y tropismo selectivo, han posibilitado su evaluación como opción terapéutica en un amplio número de enfermedades monogénicas o complejas. A pesar de sus ventajas, los vectores AAV presentan inconvenientes, siendo el más importante la respuesta inmune del paciente al vector, especialmente la respuesta mediada por anticuerpos neutralizantes (NAb). Los NAb disminuyen la transducción del vector e impiden la expresión del gen que transporta, limitando su aplicación clínica. Por lo tanto, identificar y cuantificar la presencia y actividad de los NAb, es el primer paso en cualquier protocolo de terapia génica con vectores AAV. La presencia de NAb depende principalmente de la exposición al virus en la naturaleza y varía drásticamente según edad, localización geográfica y estado de salud de la persona evaluada.

Palabras clave: sistema inmunitario, anticuerpos neutralizantes, vector viral adenoasociado, terapia génica

Abstract *Immune response and gene therapy with adenoassociated viral vectors.* In recent years, gene therapy has been positioned as a real and safe option in the development of therapeutic alternatives for the cure and prevention of different diseases. It consists in the insertion of genetic material in a defective tissue or cell, through the use of a vector. There are several considerations for selecting the most appropriate vector, including the potential for binding and entry to the target cell, the ability of the genetic material to transfer to the nucleus, the ability to express the insert, and the absence of toxicity. In the current scenario, the most commonly used viral vectors are those derived from adeno-associated viruses (AAV). Characteristics such as biosafety, low toxicity and selective tropism have enabled its evaluation as a therapeutic option in many monogenic or complex diseases. Despite their advantages, AAV vectors have drawbacks, the most important being the patient's immune response to the vector, especially the response mediated by neutralizing antibodies (NAb). NAb decrease the transduction of the vector and prevent the expression of the gene it transports, limiting its clinical application. Therefore, identifying and quantifying the presence and activity of NAb is the first step in any gene therapy protocol with AAV vectors. The presence of NAb depends mainly on exposure to the virus in nature and varies drastically according to age, geographic location and health status of the person evaluated.

Key words: immune system, neutralizing antibodies, adeno-associated viral vector, gene therapy

La terapia génica es una disciplina que busca la inserción de material genético para el tratamiento o corrección de una enfermedad. Esta inserción puede realizarse *ex vivo*, tratando células del individuo con el gen de interés en el contexto del laboratorio, siendo posteriormente

suministradas al paciente. Esta modalidad fue utilizada en los primeros tratamientos para la inmunodeficiencia grave combinada ligada a X durante la década de 1990 e inicios del siglo 21. En la modalidad *in vivo* la inserción del material genético se realiza de manera directa utilizando un vector¹. La terapia génica *in vivo* tiene el potencial de aumentar la eficiencia y aumentar el espectro de aplicaciones con respecto a la terapia *ex vivo*².

Las estrategias de transferencia génica *in vivo* se caracterizan por tres elementos: el gen a transferir, el tejido blanco en el que se introduce el gen, y el vector, el cual

Recibido: 15-XI-2018

Aceptado: 4-IX-2019

Dirección postal: Melvin Y. Rincon, Carrera 5 # 6-33 Esquina, 681003 Floridablanca, Santander, Colombia

e-mail: rinconmy@gmail.com

se utiliza para facilitar la entrada del gen³. Existen varias consideraciones para escoger el vector más apropiado, como el potencial de unión y entrada a la célula diana, la transferencia adecuada del material genético al núcleo, la habilidad de expresión prolongada del inserto y la ausencia de toxicidad⁴.

Dentro de los vectores que se pueden utilizar para la transferencia del material genético se encuentran los virus y vectores no virales. Algunos de los vectores virales utilizados han sido lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y virus de herpes simplex^{1,5}. Los vectores no virales incluyen inyección directa de ácido desoxirribonucleico (ADN), ya sea en plásmidos o productos desnudos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando dispositivos como electroporación, sonoporación, magnetofección o pistolas de genes para facilitar su entrada a la célula y núcleo¹.

Debido a su pobre inmunogenicidad, su bajo riesgo de mutagénesis insercional y su buen perfil de seguridad, los vectores AAV constituyen una gran opción terapéutica. Actualmente son ampliamente utilizados en terapia génica para la transferencia de genes de interés en estudios preclínicos y ensayos clínicos de patologías monogénicas⁵.

A finales de 2017 la terapia de reemplazo genético del gen *RPE65* para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber utilizando el serotipo AAV2 en administración sub-retinal (*Luxterna*, *Spark therapeutics*), se convirtió en la primera terapia génica con vectores AAV en ser aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) en EE.UU.^{6,7}. En mayo de 2019 la FDA aprobó la terapia de reemplazo genético del gen *SMN1* utilizando el vector AAV9 para el tratamiento de la atrofia muscular espinal en pacientes menores de 2 años (*Zolgensma*, *AveXis Inc.*)^{8,9}. La aprobación inicial es para la administración por vía intravenosa en pacientes de hasta 2 años de edad; sin embargo, AveXis está llevando a cabo estudios clínicos para la administración intratecal de zolgensma en pacientes con atrofia muscular espinal de hasta 5 años de edad¹⁰. También se está evaluando la efectividad de la transferencia genética en pacientes con hemofilia A (*BioMarin Pharmaceutical*). En un estudio clínico fase I que evaluó el efecto de una dosis intravenosa única de un vector AAV5 optimizado, que codifica para el factor VIII, en nueve hombres con hemofilia A grave se observó la normalización sostenida de la actividad del factor VIII, con estabilización de la hemostasia y una profunda reducción en el uso del factor VIII¹¹. Todos estos resultados validan el potencial terapéutico de los vectores AAV para el tratamiento de diversas clases de enfermedades.

Características de los virus adenoasociados

Los AAV son virus de ADN, de 25 nm, de la familia *Parvoviridae* y el género *Dependovirus*. El genoma de los AAV










es linear, de 4.7 kilobases (Kb), contiene dos secuencias palindrómicas invertidas en su región terminal (ITR, por sus siglas en inglés) flanqueando dos genes: el gen *Rep*, el cual codifica las enzimas necesarias para la replicación, la actividad endonucleasa y la actividad ATPasa y el gen *Cap*, que produce las tres proteínas de la cápside viral. Estas proteínas en la cápside viral diferencian los serotipos de AAV y les confieren diversos tropismos tisulares^{4,12,13}. Hasta ahora se han descubierto 12 serotipos de AAV humanos (AAV1-AAV12) y 100 de primates no humanos, cada uno de ellos con un tropismo celular característico^{4,14} (Tabla 1).

El ciclo de vida de los AAV tiene dos etapas: *lítica* y *lisogénica*. Una infección productiva (ciclo lítico) por AAV solo puede ocurrir en presencia de un virus adyuvante, ya sea un adenovirus o herpesvirus; en esta etapa ocurre replicación activa, expresión de genes virales y producción de viriones. En ausencia del virus adyuvante el AAV entrará a ciclo lisogénico, en el cual se limita la replicación y la expresión de genes virales; en este ciclo el genoma de los AAV puede integrarse de manera específica al cromosoma 19 en la región q13.4, estableciendo latencia hasta que se produzca una infección por adenovirus o herpesvirus, en cuyo caso el AAV entrará a ciclo lítico. La integración específica del genoma viral al cromosoma 19 depende de proteínas codificadas por el gen *Rep*. Para evitar el riesgo de mutagénesis insercional, y debido al tamaño de la secuencia, cuando se diseña un vector viral utilizando AAV se reemplazan los genes *Rep* y *Cap* por el gen de interés conservando solo las regiones ITR, las cuales son fundamentales para la replicación del material genético⁴.

Respuesta inmune contra los virus adenoasociados

A pesar de que la infección por AAV ha sido detectada en diversos tejidos, tanto en animales como en humanos, hasta el momento no se han asociado con ninguna patología¹⁵. Los AAV se encuentran libremente en la naturaleza, por lo cual los humanos y los modelos animales de experimentación utilizados en investigación biomédica pueden haber tenido exposición previa a algunos de los serotipos de AAV y por tanto generar respuesta inmune celular y humoral^{16,17}. A nivel inmunológico, la cápside del vector AAV es una réplica del virión encontrado en la naturaleza por lo que la administración del vector genera la activación de la respuesta inmune frente a proteínas de la cápside del virus tanto en los pacientes previamente expuestos a los AAV como en aquellos sin exposición previa^{4,17}. La presencia de respuesta inmune contra la cápside impide el acoplamiento y entrada del material genético a las células de interés, por esta razón es una de las principales barreras, tanto para el tratamiento

TABLA 1.— Tropismo celular característico de los principales serotipos de virus adenoasociados humanos

Serotipo/ Tropismo	 Sistema nervioso central	 Músculo esquelético	 Retina del epitelio vascular	 Páncreas	 Célula lisa	 Hígado	 Riñón	 Corazón	 Pulmón
AAV1	X*	X	X	X				X	
AAV2	X*	X			X	X	X		
AAV3		X				X			
AAV4	X*		X						
AAV5	X*	X	X						X
AAV6		X						X	X
AAV7	X*	X	X						
AAV8	X*	X	X	X		X		X	
AAV9	X*	X		X		X	X	X	X

AAV: Virus adenoasociado

*Hasta el momento el AAV9 es el único serotipo presente en la naturaleza que ha demostrado atravesar la barrera hematoencefálica

inicial como para a readministración del vector¹⁸. No obstante la similitud de la cápside entre los vectores y los AAV presentes en la naturaleza, la administración del vector difiere de la infección natural en tres aspectos: la introducción de un número mayor de partículas virales al organismo, la ruta de la administración (la exposición natural a AAV usualmente se lleva a cabo por vía aérea) y, por último, la no replicación activa del AAV dada a la ausencia de adyuvante, lo cual disminuye la respuesta inmune generada¹⁵.

La primera línea de respuesta que desencadena la infección por AAV es mediada por el sistema inmune innato. El sistema inmune innato reconoce secuencias evolutivamente conservadas ajenas al huésped (PAMPs por sus siglas en inglés, *pathogen-associated molecular pattern*) mediante receptores de reconocimiento de patógenos, generando un aumento en secreción de citoquinas y quimoquinas y un aumento de moléculas coestimuladoras, induciendo o modulando el sistema inmune adaptativo. Los PAMPs presentes en los AAV son reconocidos por los *Toll-like receptors* tipos 2 y 9 generando respuesta inmune mediada por el factor nuclear *Kappa Beta* y secreción de interferón tipo I, respectivamente¹⁷.

La infección por AAV también genera respuesta adaptativa celular mediada principalmente por linfocitos T-CD8⁺¹⁹. Estudios de monitoreo de reactividad de células T hacia la cápside del AAV2 muestran que alrededor de dos tercios de adultos mayores de 25 años presentan células T que responden a péptidos de la cápside del AAV2; de la misma manera, se han reportado frecuencias

de 30% de células T reactivas contra epítopes de AAV1 en población sana^{20, 21}. Debido a que los vectores AAV son no replicativos, se asume que la cápside permanece inmunológicamente detectable en una célula por un período definido del tiempo, que varía de semanas a meses según el tejido diana, alterando la respuesta celular²⁰. Se ha descrito que, la infusión de un vector derivado del serotipo AAV2 en hepatocitos provoca una expansión clonal de linfocitos T-CD8⁺ específicos para la cápside del virus¹⁹. A pesar de este conocimiento, las implicaciones y mecanismos de esta respuesta inmune aún no están del todo dilucidados, y, por lo tanto, son necesarios mayores estudios sobre la naturaleza y potencia de la respuesta celular, tanto en infección natural, como en el contexto de terapia génica²¹.

A pesar de que los vectores derivados de AAV pueden generar una respuesta celular, el principal obstáculo para la implementación de terapia génica con vectores AAV es la generación de inmunidad humoral²². La inducción de anticuerpos por exposición natural a AAV y la repetida exposición a vectores virales en pacientes previamente seronegativos provocan una respuesta humoral potente que compromete la transducción del vector y su persistencia disminuyendo la expresión del transgen^{23, 24}.

La exposición natural a AAV resulta en la producción de anticuerpos tipo IgG, en especial de la subclase IgG1²⁵⁻²⁷. Esta respuesta humoral inmune puede ser de dos tipos: neutralizante o no neutralizante. Los anticuerpos neutralizantes (NAbs por sus siglas en inglés) reconocen epítopes en la cápside del virión inhibiendo la transducción del AAV

a las células diana. Por otra parte, los anticuerpos no neutralizantes se unen al virus, marcándolo sin bloquear la transducción celular^{15,24}. Los primeros ensayos clínicos que buscaban la transducción hepática de vectores AAV en pacientes con hemofilia B demostraron que los NAb son el principal factor a superar para el establecimiento y mantenimiento de la terapia¹⁹. Se ha descrito que títulos relativamente bajos, de hasta 1:17, neutralizan por completo grandes dosis de vector, por lo cual no hay detección de la expresión del gen²⁸. Estudios posteriores sugieren que títulos incluso más bajos (1:5-1:10) pueden impedir la transducción completa del vector en el órgano diana y alterar su biodisponibilidad, aumentando la transducción en bazo y nódulos linfáticos^{27,29}. Esta inhibición por NAb también es dependiente de la vía de administración: la administración del vector por vía intratecal, o directamente en ojo o músculo parece ser menos susceptible a la acción de los NAb³⁰. Debido al efecto de los NAb en la respuesta terapéutica deseada al infectar con el transgen, pacientes con títulos positivos de anticuerpos (incluso

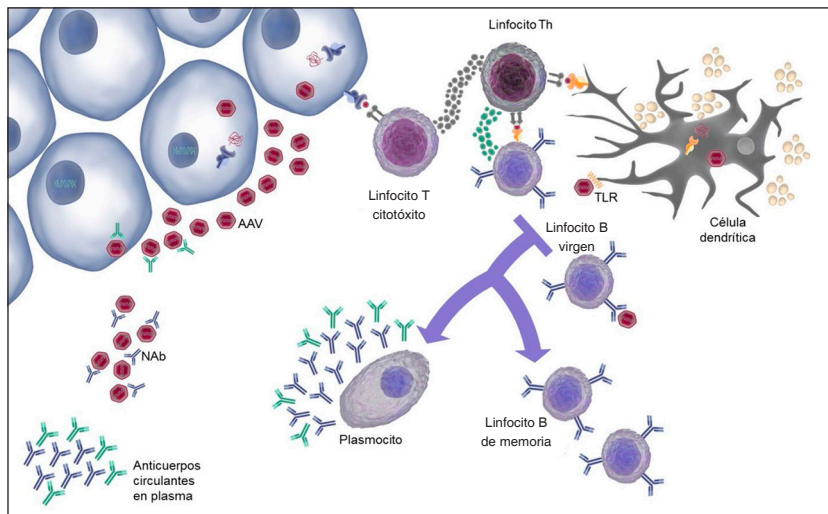
tan bajos como 1:2) son inmediatamente excluidos de la mayoría de los ensayos clínicos con vectores AAV³¹.

Resulta interesante que las respuestas humoral y celular a la infección con vectores AAV parecen no estar acopladas; sujetos positivos para anticuerpos contra AAV no presentan reactividad celular contra la cápside y, de igual manera, pacientes con reactividad celular tienen menores títulos de anticuerpos contra vectores AAV. Esto sugiere que, posterior a la exposición al AAV, ciertos individuos favorecen una respuesta Th1 al antígeno, mientras otros desarrollan una respuesta Th2²⁰. Un resumen de la respuesta inmune frente a la infección con AAV puede encontrarse en la Figura 1.

Estrategias para determinar los niveles de NAb

Una adecuada identificación no solo de la presencia de NAb, sino de los títulos y actividad de los NAb, es de vital importancia en las primeras fases de los ensayos

Fig. 1.– Respuesta inmune *in vivo* frente a la infección contra virus adenoasociados



Los virus adenoasociados pueden generar respuesta del sistema inmune innato por medio del reconocimiento de PAMPS por los TLR presentes en células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, liberando citoquinas proinflamatorias. Las células presentadoras de antígeno son capaces de activar la respuesta de los linfocitos T cooperadores (Th) que a su vez colaboran con la activación de los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos también pueden ser activados por la presentación de antígenos de algunas líneas celulares, como los hepatocitos. La respuesta inmune humoral comprende el reconocimiento de los antígenos de la cápside del virus por medio del linfocito vírgen, que expresa la proteína unida al complejo mayor de histocompatibilidad para activar los linfocitos Th. El linfocito Th promueve la maduración de los linfocitos B a plasmocitos, los cuales liberan anticuerpos, y la formación de linfocitos B de memoria. Luego de la infección inicial, los anticuerpos remanentes en el plasma pueden ser de dos clases, neutralizantes (azul) que evitan la entrada del virus a la célula y no neutralizantes (verdes) los cuales solo marcan el virus, sin impedir su transducción

PAMP: pathogen-associated molecular patterns, TLR: toll-like receptor

clínicos con vectores AAV. Actualmente, se han descrito tres estrategias para determinarlos: el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la detección de NAb*s in vitro* y finalmente la detección *in vivo*¹⁶. En general, todas las técnicas utilizan suero como sustrato para la determinación debido a su facilidad de obtención y a que es altamente indicativo del estado humoral inmune del paciente, sin embargo, otros sustratos como tejidos o líquido sinovial pueden ser utilizados para la caracterización de los NAb*s*³⁰. La Tabla 2 presenta las ventajas y desventajas de cada técnica.

ELISA

La técnica de ELISA fue la primera empleada para el estudio de anticuerpos contra AAV, y fue ampliamente utilizada en los primeros reportes generados en la década de los '70. Para el estudio de anticuerpos contra AAV se utiliza la variante técnica denominada ELISA indirecto, la cual emplea un sistema de detección de doble anticuerpo, con los antígenos de interés fijados en la superficie, un anticuerpo primario que en este caso corresponde al anticuerpo a evaluar y un anticuerpo secundario que revela la presencia de los complejos antígeno-anticuerpo²⁵. La reducción la señal de luminis-

cencia o fluorescencia dada por el anticuerpo secundario es la que determina la seropositividad, pues se toma como título positivo la primera dilución en la cual se logra una reducción de la señal en un 50% comparado con la señal emitida en el control.

Determinación de NAb*s in vitro*

La técnica utiliza diluciones seriadas del suero del paciente que son mezclados con un número fijo de vectores AAV que expresan el gen reportero. Las mezclas resultantes son incubadas con una línea celular permisiva. Posterior a la incubación se mide la eficacia de la transducción viral de acuerdo al nivel de expresión del gen reportero utilizado. El título de anticuerpos es reportado como la dilución más alta que inhibe la expresión del 50% del gen reportero con relación al control positivo^{16,24,32}.

Varios estudios han utilizado esta técnica, no solo para evaluar la presencia previa de NAb*s* en posibles candidatos a terapias sino también para evaluar posibilidad de reinyección en pacientes donde sea necesario administrar una nueva dosis de virus. Entre estos estudios se encuentran la mayoría de ensayos para terapia génica contra la hemofilia y más recientemente el estudio Cupid-2 en pacientes con falla cardíaca^{26, 31}.

TABLA 2.– Descripción general, ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas para la determinación de anticuerpos contra los virus adenoasociados

Nombre	ELISA	Técnicas NAb <i>In vitro</i>	NAb <i>In vivo</i>
Descripción	– Incubación de suero con extractos purificados de cápside de AAV, lavado e incubación con anticuerpo revelador	– Mezcla de diluciones seriadas de suero + AAV con gen reportero. Se incuba la mezcla con línea celular de elección. Control positivo: pozo incubado solo con AAV con gen reportero	– Inyección de diluciones de suero problema y AAV con gen reportero en ratón. Control positivo: atón inyectado solo con AAV y gen reportero
Ventajas	– Económico – Fácil de realizar – Caracterización del tipo de inmunoglobulinas	– Mejor correlación con transducción <i>in vivo</i> – Mayor facilidad y menor costo que pruebas <i>in vivo</i> – Patrón de oro	– Mayor sensibilidad – Evaluación de otras vías de neutralización
Desventajas	– No indica actividad neutralizante	– No evalúa otras vías de neutralización – Diferencias en protocolo entre investigadores	– Costoso – Técnicamente complicado – Menor correlación con transducción <i>in vivo</i> del vector – Limitaciones éticas

NAb: anticuerpo neutralizante, AAV: virus adenoasociados

Determinación de NAbs *in vivo*

Debido a que el ensayo *in vitro* no evalúa la neutralización por fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y otros componentes sanguíneos y puede presentar problemas de reproducibilidad, algunos investigadores han desarrollado el ensayo de detección *in vivo* para evaluar la respuesta inmune y la actividad de los anticuerpos en un modelo animal^{16, 24}.

La técnica consiste en inyectar varios ratones, cada uno con una mezcla de diferentes diluciones del suero problema de manera posterior o simultánea a una infusión de AAV que expresa un gen reportero y se mide la actividad del gen reportero^{24,33}. El título de NAbs es definido como la dilución en la cual se redujo la expresión del transgen un 50% comparado con un ratón control inyectado sólo con el vector²⁴.

Prevalencia de anticuerpos neutralizantes en la población

Los primeros estudios para determinar la prevalencia de anticuerpos contra los AAV fueron realizados por Blacklow en 1968^{34,35}. A partir de los primeros ensayos clínicos utilizando vectores derivados de AAV, se realizaron estudios de prevalencia de NAbs en población sana y en pacientes con enfermedades específicas² (Tabla 3). Los serotipos más comunes en investigación básica, preclínica y clínica son los AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y, por ende, los estudios poblacionales se han centrado en ellos.

Estudios poblacionales en EE.UU. y países de Asia, África, Oceanía y Europa han comunicado diferencias entre las prevalencias de NAbs según el serotipo evaluado y la población estudiada (Tabla 3). La prevalencia de NAbs en población sana, independiente del serotipo, es generalmente mayor en países en vía de desarrollo que en países desarrollados, con excepción de Francia, donde se reporta una alta prevalencia contra AAV1 y de Holanda, donde un estudio reportó un gran porcentaje de seropositividad contra los serotipos AAV1, AAV6, AAV7 y AAV8^{21, 27, 36}. Los factores que pueden explicar este fenómeno incluyen variaciones en condiciones socioeconómicas, de vivienda, densidad poblacional, condiciones higiénicas y acceso a salud entre las poblaciones de los países y regiones y la diferencia en metodología, previamente expuesta, en el ensayo *in vitro*²⁴. Cabe anotar que hasta el momento solo se tienen datos de prevalencia de NAbs en población latinoamericana procedentes de un único estudio en población brasileña que empleó la técnica de ELISA²⁵. El proyecto ANVIAS, actualmente en curso, busca establecer la prevalencia para tres serotipos de AAV en individuos sanos y pacientes con falla cardíaca colombianos, por lo cual pronto se tendrán datos poblacionales de la región³⁷.

Varios estudios han encontrado diferencias significativas entre diferentes grupos etarios sin importar el serotipo evaluado^{2, 23, 34, 35, 39, 40, 43, 46}. Los títulos de anticuerpos aumentan con la edad y describen el siguiente comportamiento: desde el nacimiento hasta aproximadamente 6 meses los títulos se mantienen altos debido a la inmunidad pasiva materna, y luego disminuyen hacia los 7-11 meses de edad. Posterior a la maduración del sistema inmune, en el primer año de vida, los títulos comienzan a aumentar, coincidiendo con un aumento de exposición a los AAV presentes en la naturaleza²⁴.

Existe evidencia conflictiva sobre si hay o no diferencia en la prevalencia de NAbs de acuerdo al sexo. Algunos estudios han descrito prevalencias significativamente mayores de títulos de NAbs contra AAV1 en mujeres comparado con hombres³⁶, mientras que en otros no se ha encontrado diferencia significativa en las prevalencias o títulos entre hombres y mujeres^{30, 42, 45}.

Con respecto a la especificidad de la respuesta inmune humoral a la infección con AAV, se ha descrito una fuerte relación en la seropositividad entre diferentes serotipos de AAV. La gran mayoría de sueros (50-100%) presentan seropositividad frente a dos o más serotipos^{23, 27, 41, 42, 45, 46}. Esta reactividad cruzada puede deberse a exposición a los diversos serotipos presentes en la naturaleza o bien a reactividad cruzada entre anticuerpos contra solo un serotipo, debido a la homología entre las proteínas de las cápsidas^{4, 41}. Estudios longitudinales recientes con chimpancés parecen favorecer la segunda hipótesis, pues se ha encontrado que la infección por solo un serotipo de AAV induce anticuerpos neutralizantes capaces de neutralizar múltiples serotipos diferentes⁴⁹.

Estrategias para burlar la presencia de NAbs en la aplicación de terapia génica con vectores adenoasociados

Debido al alto porcentaje de individuos seropositivos y la presencia de reactividad cruzada, se han desarrollado diversas estrategias para la administración de vectores AAV a pacientes con títulos positivos de NAbs. La primera estrategia es la plasmaféresis, en la cual se remueve la sangre y se la separa en sus componentes. La fracción celular se retorna al cuerpo, mientras el plasma es desechado y reemplazado por albúmina. La plasmaféresis ha sido utilizada para reducir niveles de NAbs antes de la administración del vector, y resulta en una disminución de los títulos de 2 a 3 veces por cada sesión de aféresis. Esta estrategia es especialmente útil en pacientes con bajos niveles de NAbs o pacientes que se seroconvirtieron y requieran readministración posterior del vector^{20, 24}.

Otra estrategia consiste en minimizar contacto del vector con los NAbs mediante el uso de vías de administración directa en el órgano diana y no en el sistema

TABLA 3.- Estudios de prevalencia de anticuerpos neutralizantes para diversos serotipos de virus adenoasociados en diferentes poblaciones

Técnica	Título de corte	Lugar	Serotipo (% de muestras positivas)											Edad	Población diana	Ref.	
			AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV12	BAAV				
NAb	<i>n vitro</i>	1:10	EE.UU.	20	40	30	0	-	-	-	-	-	-	-	18-30 años	Sanos	34
				40	60	60	0	-	-	-	-	-	-	-	5-10 años		
NAb	<i>in vitro</i>	1:10	EE.UU.	-	36.6	40.5	-	-	-	-	-	-	-	-	3 meses-3 años	Sanos	35
ELISA/NAb	<i>in vitro</i>	1:20	EE.UU.	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18-54 años	Sanos	2
				-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18-52 años	Fibrosis quística	
ELISA	N/A		Alemania	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20-29 años	Sanos	25
			Brasil	-	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Japón	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
NAb	<i>in vitro</i>	1:20	EE.UU.	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16-44 años	Fibrosis quística	38
NAb	<i>in vitro</i>	1:20	EE.UU.	-	30	-	-	14	30	-	-	-	-	-	18-47 años	Sano	23
				-	12.4	-	-	6.7	9	-	-	-	-	-	0-17 años	Fibrosis quística	
				-	27.5	-	-	20	22	-	-	-	-	-	18-47 años		
NAb	<i>n vitro</i>	1:20	EE.UU.	20	28	-	-	-	-	12	14	-	-	-	NI	NI	36
			Australia	30	35	-	-	-	-	29	27	-	-	-			
			Europa	27	35	-	-	-	-	25	22	-	-	-			
			África	43	56	-	-	-	-	31	31	-	-	-			
ELISA/NAb	<i>in vitro</i>	1:3,1	EE. UU.	-	37.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18-77 años	Sanos	26
ELISA/NAb	<i>in vitro</i>	1:20	Francia	50.5	59	-	-	3.2	37	-	19	33.5	-	-	25-64 años	Sanos	27
NAb	<i>n vitro</i>	1:20	EE. U.U	-	22	-	-	-	-	-	15	-	-	-	0-18 años	Sanos	39
NAb	<i>in vitro</i>	1:100	Holanda	79	50	-	31	77	67	-	94	-	-	-	20-69 años	Sanos	40
				63	50	-	44	53	85	-	70	-	-	-	16-84 años	EII: Crohn y CU	
NAb	<i>in vitro</i>	1:2	EE. UU.	-	43.6	-	-	25.8	-	-	22.5	-	-	-	9 meses-7 años	Hemofilia	41
ELISA/NAb	<i>in vitro</i>	1:2	Francia	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NI	Sanos	21
NAb	<i>in vitro</i>	1:10	China	69.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<18-56 años	Sanos	42
NAb	<i>in vitro</i>	1:14	Japón	36.5	35.3	-	-	37.6	-	-	32.9	32.9	-	-	12->52 años	Sanos	43
				39.7	28.8	-	-	35.6	-	-	32.9	27.4	-	-		Hemofilia	
NAb	<i>in vitro</i>	1:5	Italia	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	5-25 años	MPS IV: Morquio	44
			Holanda	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-			
			Turquía	-	-	-	-	-	-	-	67	-	-	-			
NAb	<i>in vitro</i>	1:10	China	-	96.6	-	-	40.2	-	-	82	-	-	-	<18-56 años	Sanos	42
				-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	-	5-64 años	HIV +	
NAb	<i>in vitro</i>	1:2	Bélgica	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18-80 años	Falla cardíaca	31
			Suecia	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Holanda	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Reino Unido	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Alemania	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Hungría	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Polonia	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Israel	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Dinamarca	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			EE. UU.	32-67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
NAb	<i>in vitro</i>	1:20	China	-	92	89	-	-	-	-	69	-	-	-	18-< 51 años	Sanos	45
NAb	<i>in vitro</i>	1:20	EE. UU.	-	20	-	-	-	-	-	22	24	-	-	2-31 años	Acidemia metila-	46
NAb	<i>in vitro</i>	1:25	EE. UU.	-	17	-	4	4	-	-	-	-	0	15	17-72 años	Sanos	47
				-	24	-	8	15	-	-	-	-	3	24	24-76 años	Sjögren	
NAb	<i>in vitro</i>	1:16	EE. UU.	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	NI	Sanos	48

AAV: virus adenoasociado; NAb: anticuerpo neutralizante; NI: no información; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; CU: colitis ulcerativa; EC: enfermedad de Crohn; MPS: mucopolisacaridosis

circulatorio. De esta manera se limita la exposición a NAb circulantes en plasma, se limita la acción solo al tejido deseado y también se limita la dosis necesaria del vector, reduciendo así su inmunogenicidad. Esta táctica ha sido altamente efectiva utilizando vías de administración muscular, intratecal y ocular^{20, 47, 50}.

También se ha propuesto la inmunosupresión como un mecanismo para reducir la producción de anticuerpos neutralizantes mediante depleción farmacológica de células B, sin embargo, esta estrategia ha presentado resultados mixtos en modelos animales^{20, 31}.

Finalmente, se ha propuesto el diseño de cápsides específicas con una combinación de epítopes que no sea reconocida por los anticuerpos. Estas cápsides pueden ser diseñadas según los anticuerpos presentes en los pacientes (terapia personalizada) o para uso como terapia en la población general. Este diseño se basa en la utilización de librerías creadas por PCR *prona error* y generar vectores que no solo escapen a la neutralización mediada por anticuerpos sino también con tropismo para el tejido de interés. Por el momento la estrategia ha tenido buenos resultados en estudios *in vivo* con modelos murinos³³.

A pesar de estos resultados prometedores en modelos animales, ninguna de estas estrategias ha sido aplicada en los estudios clínicos para hemofilia, atrofia muscular espinal o amaurosis congénita de Leber, razón por la cual es importante continuar el estudio de estrategias para disminuir la respuesta inmune y que más pacientes puedan beneficiarse de la terapia génica basada en AAV^{8, 11}.

En conclusión, los AAV cuentan con un amplio potencial para su uso como vector en terapia génica. El principal obstáculo para la implementación de una terapia con AAV está en la presencia de inmunidad humoral contra las cápsides del vector, cuya prevalencia cambia según la edad, localización geográfica, y estado inmunológico. Se requieren más estudios poblacionales que midan más de un serotipo y evalúen diferencias entre variables socioeconómicas y clínicas para establecer posibles factores que se asocien a un incremento de la prevalencia AAV y puedan actuar como factores de riesgo en futuros estudios. De igual manera es recomendable tener un protocolo de detección de anticuerpos neutralizantes *in vitro* estandarizado con la misma línea celular, gen reportero, título de corte para seropositividad y estándares definidos. También es necesario iniciar estudios para evaluar la presencia de inmunidad celular previa, especialmente en pacientes con títulos negativos de anticuerpos neutralizantes.

Agradecimiento: Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS) por el apoyo financiero para la presente revisión (Proyecto código 656671250485, FP44842-307-2016).

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India* 2013; 61: 127-33.
- Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 1999; 6: 1574-83.
- Di Pasquale G, Chiorini JA. AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol Ther* 2006; 13: 506-16.
- Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 583-93.
- Rincon MY, Vander Driessche T, Chuah MK. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc Res* 2015; 108: 4-20.
- Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 849-60.
- Ledford H. FDA advisers back gene therapy for rare form of blindness. *Nature* 2017; 550: 314.
- Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1713-22.
- Food Drugs Administration. FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality. En: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease>; consultado mayo 2019.
- Clinical Trials. Study of intrathecal administration of avxs-101 for spinal muscular atrophy (STRONG). En: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03381729>; consultado mayo 2019.
- Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe Hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377: 2519-30.
- Moskalenko M, Chen L, van Roey M, et al. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* 2000; 74: 1761-6.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Koch WJ, Rabinowitz JE. Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart. *Clin Transl Sci* 2010; 3: 81-9.
- Gao MH, Lai NC, McKirnan MD, et al. Increased regional function and perfusion after intracoronary delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 574-87.
- Calcedo R, Wilson JM. Humoral immune response to AAV. *Front Immunol* 2013; 4: 341.
- Jungmann A, Muller O, Rapti K. Cell-based measurement of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV). *Methods Mol Biol* 2017; 1521: 109-26.
- Mingozzi F, Buning H. Adeno-associated viral vectors at the frontier between tolerance and immunity. *Front Immunol* 2015; 6: 120.
- Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 341-55.
- Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, et al. Modulation of tolerance to the transgene product in a

- nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 2007; 110: 2334-41.
20. Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F. Cell-mediated immunity to AAV vectors, evolving concepts and potential solutions. *Front Immunol* 2014; 5: 350.
 21. Veron P, Leborgne C, Monteilhet V, et al. Humoral and cellular capsid-specific immune responses to adeno-associated virus type 1 in randomized healthy donors. *J Immunol* 2012; 188: 6418-24.
 22. Milani M, Annoni A, Bartolaccini S, et al. Genome editing for scalable production of alloantigen-free lentiviral vectors for in vivo gene therapy. *EMBO Mol Med* 2017; 9: 1558-73.
 23. Halbert CL, Miller AD, McNamara S, et al. 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; 17: 440-7.
 24. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 2013; 24: 59-67.
 25. Erles K, Sebkova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; 59: 406-11.
 26. Murphy SL, Li H, Mingozzi F, et al. Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. *J Med Virol* 2009; 81: 65-74.
 27. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 704-12.
 28. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-7.
 29. Fitzpatrick Z, Leborgne C, Barbon E, et al. Influence of pre-existing anti-capsid neutralizing and binding antibodies on AAV vector transduction. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018; 9: 119-29.
 30. Mingozzi F, Chen Y, Edmonson SC, et al. Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene Ther* 2013; 20: 417-24.
 31. Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Ther* 2016; 23: 313-9.
 32. Meliani A, Leborgne C, Triffault S, Jeanson-Leh L, Veron P, Mingozzi F. Determination of anti-adeno-associated virus vector neutralizing antibody titer with an in vitro reporter system. *Hum Gene Ther Methods* 2015; 26: 45-53.
 33. Li C, Wu S, Albright B, et al. Development of patient-specific AAV vectors after neutralizing antibody selection for enhanced muscle gene transfer. *Mol Ther* 2016; 24: 53-65.
 34. Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol* 1968; 88: 368-78.
 35. Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 319-27.
 36. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* 2009; 199: 381-90.
 37. Rincon MY, Prada CE, Lopez M, Castillo V, Echeverria LE, Serrano N. Determination of anti-adeno-associated viral vector neutralizing antibodies in patients with heart failure in the Cardiovascular Foundation of Colombia (ANVIAS): Study Protocol. *JMIR Res Protoc* 2016; 5: e102.
 38. Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH, et al. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1349-59.
 39. Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 1586-8.
 40. van der Marel S, Comijn EM, Verspaget HW, et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: implications for gene therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2436-42.
 41. Li C, Narkbunnam N, Samulski RJ, et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene Ther* 2012; 19: 288-94.
 42. Liu Q, Huang W, Zhao C, et al. The prevalence of neutralizing antibodies against AAV serotype 1 in healthy subjects in China: implications for gene therapy and vaccines using AAV1 vector. *J Med Virol* 2013; 85: 1550-6.
 43. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, et al. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol* 2014; 86: 1990-7.
 44. Ferla R, Claudiani P, Savarese M, et al. Prevalence of anti-adeno-associated virus serotype 8 neutralizing antibodies and arylsulfatase B cross-reactive immunologic material in mucopolysaccharidosis VI patient candidates for a gene therapy trial. *Hum Gene Ther* 2015; 26: 145-52.
 45. Ling C, Wang Y, Feng Y, et al. Prevalence of neutralizing antibodies against liver-tropic adeno-associated virus serotype vectors in 100 healthy Chinese and its potential relation to body constitutions. *J Integr Med* 2015; 13: 341-6.
 46. Harrington EA, Sloan JL, Manoli I, et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated viral capsids in patients with mutant methylmalonic acidemia. *Hum Gene Ther* 2016; 27: 345-53.
 47. Gray SJ, Nagabhusan Kalburgi S, McCown TJ, Jude Samulski R. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther* 2013; 20: 450-9.
 48. Ellsworth JL, OCallaghan M, Rubin H, Seymour A. Low seroprevalence of neutralizing antibodies targeting two Clade F AAV in humans. *Hum Gene Ther Clin Dev* February 2018.
 49. Calcedo R, Wilson JM. AAV Natural infection induces broad cross-neutralizing antibody responses to multiple AAV serotypes in chimpanzees. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2016; 27: 79-82.
 50. Willett K, Bennett J. Immunology of AAV-mediated gene transfer in the eye. *Front Immunol* 2013; 4: 261.